

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440093

研究課題名(和文) 機能的インナーセントロメア形成機構の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism of the establishment of functional inner centromere

研究代表者

丹野 悠司 (Tanno, Yuji)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：20583123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞に広く観られる性質である高頻度の染色体分配異常(染色体不安定性)は、細胞のがん化、がんの悪性化の引き金となることが示唆されているものの、その分子基盤については未解明の点が多い。本研究課題では、培養細胞を用いて染色体不安定性を引き起こす分子機構について解析を行った。その結果、分裂期の姉妹動原体間に形成されるインナーセントロメア構造の不安定化が、染色体不安定性を引き起こす要因であることが明らかとなった。また、インナーセントロメア形成に必須の分裂期キナーゼHaspinが、ヒト細胞においてコヒーシン複合体構成因子PDS5との結合に依存してセントロメアに局在することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Frequent chromosome mis-segregation, known as whole chromosomal instability, is the major trait of cancer cells. Previous studies have suggested that chromosomal instability initiates and progresses tumor formation. However, the molecular mechanism of chromosomal instability is to be elucidated. In this project, we clarified that the destabilization of the inner centromere structure, which is formed in between sister kinetochores in mitosis, could be the major cause of chromosomal instability. We also reported that Haspin, a mitotic kinase which establishes inner centromere, localizes at inner centromere through direct interaction with a cohesin-associated protein PDS5. These findings clarified a part of the molecular mechanisms and the physiological significances of the functional inner centromere formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：染色体分配 セントロメア 分裂期

1. 研究開始当初の背景

次世代の細胞に正しい遺伝情報を継承するためには、複製された染色体を2つの娘細胞へと均等に分配することが必須である。均等分配の過程に異常が生じると、娘細胞の染色体数が増減してしまう(異数性)。異数性は、多くの場合に細胞死を引き起こす。一方で、細胞死を免れた細胞が、がんの引き金となることも知られている。実際に、多くのがん細胞が異数性を示すことが知られている。さらに、高頻度の染色体分配の異常(染色体不安定性)もよく知られたがん細胞の性質である。染色体不安定性は、細胞がん化に加えて、がんの悪性化の原因の原因となることも報告されている。しかしながら、がん細胞において染色体不安定性がどのようにして引き起こされるのか、その分子基盤については未解明の点が多い。

分裂期の姉妹動原体間に形成されるインナーセントロメアと呼ばれる領域は、シュゴシンタンパク質や、染色体パッセンジャー複合体などの、均等分配を保障する因子が集合する部位である。分裂期キナーゼ Haspin はインナーセントロメア形成に必須の因子で、セントロメア部位のヒストン H3 のリン酸化を通じて、染色体パッセンジャー複合体をインナーセントロメアへとリクルートする。これまで、動物細胞においては Haspin の局在部位およびその制御機構については明らかにされておらず、その解明はインナーセントロメア形成機構を理解する上で重要な課題の1つである。

2. 研究の目的

私たちはこれまで、種々のヒト染色体不安定性細胞株において、シュゴシンタンパク質や染色体パッセンジャー複合体のインナーセントロメア局在が不安定化していることを見出し、この不安定化が染色体不安定性の要因ではないかと考えていた。さらに、この不安定化の一因が、セントロメア領域におけるヘテロクロマチン構造の異常であることも見出していた。染色体不安定性細胞株は、広くセントロメアにおける HP1 タンパク質の局在レベルの低下を示し、さらに、その足場として知られるヒストン H3 の9番目のリジンのメチル化(H3K9me)レベルも低下していた。しかしながら、どのような分子メカニズムによって、H3K9meレベルの低下が引き起こされているのかについては未解明であった。そこで、がん遺伝子として知られる H3K9 脱メチル化酵素 KDM4 ファミリータンパク質の機能が、染色体不安定性細胞株において亢進している可能性を考え、解析を行った。また、染色体分配安定株に KDM4 を過剰発現することで、インナーセントロメアの不安定化および染色体不安定性が引き起

こされる可能性についても検討した。

また、機能的なインナーセントロメア形成に必須である Haspin の制御機構を明らかにすることを目的とし、ヒト培養細胞における Haspin の局在部位を調べた。さらに、局在を制御する分子メカニズムについて知見を得るために、以前私たちのグループが報告していた、分裂酵母における Haspin ホモログ Hrk1 とコヒーシン相互作用因子 Pds5 との直接的な結合に着目し、ヒト細胞においても PDS5 との相互作用が Haspin のセントロメアへの局在化を促進する可能性を検討した。

3. 研究の方法

染色体不安定性細胞株における H3K9me レベルの低下が、KDM4 ファミリータンパク質の発現レベルの増加による可能性を検討するため、染色体分配安定細胞株と染色体不安定性細胞株から細胞抽出液を調整し、ウェスタンブロットにより KDM4 ファミリータンパク質の発現レベルを調べた。また、KDM4 発現レベルの増加が、インナーセントロメアの不安定化および染色体不安定性を引き起こす可能性を検討するために、染色体分配安定細胞株に KDM4C を過剰発現させた細胞株を作製し、その表現型を解析した。さらに、染色体不安定性細胞株における KDM4 の機能阻害が、インナーセントロメアを安定化し、染色体不安定性を抑圧する可能性について検討するため、染色体不安定性細胞株に KDM4 阻害薬剤を処理し、表現型を解析した。

ヒト培養細胞において Haspin の免疫染色に適した抗体を入手することができなかったため、Haspin の C 末端に GFP を付加した Haspin-GFP 発現細胞株を作製した。この細胞株では、Haspin-GFP が内在性の Haspin と同程度のレベルで発現されるように、誘導発現型のプロモーターを用いた。また、Haspin と PDS5 との相互作用について、酵母ツーハイブリッド法により直接的な結合の可能性について検討し、細胞内での相互作用を調べるために、分裂期細胞抽出液を用いて抗 Haspin 抗体による免疫沈降を行った。

4. 研究成果

H3K9me レベルが低下している染色体不安定性細胞株は、染色体分配安定株と比較して、KDM4 ファミリータンパク質のいずれかが過剰発現していることが明らかとなった。この結果から、がん遺伝子として知られる KDM4 の過剰発現は、H3K9 の脱メチル化を通じて、インナーセントロメアの不安定化を引き起こし、染色体不安定性を誘導する可能性が考えられた。

上記の可能性を支持するように、KDM4 を過剰発現させた染色体分配安定細胞株では、

H3K9me レベルの低下とともに、インナーセントロメアの不安定化が引き起こされ、染色体分配異常の頻度も増加した。また、染色体不安定性細胞株を KDM4 阻害剤で処理した結果、インナーセントロメアの安定化および染色体不安定性の抑圧が観察された。

これらの結果より、染色体不安定性細胞株におけるセントロメアヘテロクロマチンの構造異常の一因が、KDM4 ファミリータンパク質の過剰発現である可能性が示唆された。

Haspin-GFP 発現細胞株を用いて抗 GFP 抗体による免疫染色を行った結果、Haspin-GFP が分裂期の染色体上においてセントロメアへと局在することが観察された。

また、酵母ツーハイブリッド法による解析の結果、ヒト Haspin は分裂酵母 Haspin(Hrk1) と同様に、N 末端側の領域で PDS5 と直接的に相互作用することを見出した。分裂期細胞抽出液を用いた抗 Haspin 抗体による免疫沈降の結果、細胞内においても Haspin と PDS5 は相互作用することが明らかとなった。

以上の結果より、これまで未解明であった動物細胞における Haspin のセントロメア局在が示され、その足場がコヒーシオン複合体であることも明らかになった。これらの知見により、機能的なインナーセントロメア形成機構の一端が新たに解明された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Seira Miyazaki, Jihye Kim, Yuya Yamagishi, Tadashi Ishiguro, Yuki Okada, Yuji Tanno, Takeshi Sakuno, Yoshinori Watanabe
Meikin-associated polo-like kinase specifies Bub1 distribution in meiosis I
Genes to Cells, 査読有、印刷中

2. Yuhei Goto, Yuya Yamagishi, Miyuki Shintomi-Kawamura, Mayumi Abe, Yuji Tanno Y, Yoshinori Watanabe
Pds5 Regulates Sister-Chromatid Cohesion and Chromosome Bi-orientation through a Conserved Protein Interaction Module
Current Biology, 査読有、Vol. 27, 2017, pp. 1005-1012

3. Yuji Tanno, Hiroaki Susumu, Miyuki Kawamura, Haruhiko Sugimura, Takashi Honda, Yoshinori Watanabe
The inner centromere-shugoshin network prevents chromosomal instability
Science, 査読有、Vol. 349, 2015, pp. 1237-1240

4. Jihye Kim, Kei-ichiro Ishiguro, Aya

Nambu, Bungo Akiyoshi, Shihori Yokobayashi, Ayano Kagami, Tadashi Ishiguro, Alberto M. Pendas, Naoki Takeda, Yogo Sakakibara, Tomoya S. Kitajima, Yuji Tanno, Takeshi Sakuno, Yoshinori Watanabe
Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function
Nature, 査読有、Vol. 517, 2015, pp. 466-471

[学会発表](計5件)

1. 丹野悠司

ICS ネットワークの不安定化により引き起こされる染色体不安定性
東北大学加齢医学研究所研究会セミナー
2016年11月4日 宮城県仙台市

2. Yuji Tanno, Miyuki Shintomi-Kawamura, Hiroaki Susumu and Yoshinori Watanabe.
Destabilization of the inner centromere-shugoshin network causes chromosomal instability
Centromere Biology, Gordon Research Conference
July 24-29, 2016, Mount Snow, West Dover, VT, USA

3. Yuji Tanno

Destabilization of the Inner Centromere-Shugoshin Network Causes Chromosomal Instability
Centromere Biology (GRS), Gordon-Kenan Research Seminar
July 23-24, 2016, Mount Snow, West Dover, VT, USA

4. 丹野悠司、新富(川村)美雪、進寛明、渡邊嘉典

ICS ネットワークの不安定化は染色体不安定性を引き起こす
第68回日本細胞生物学会大会
2016年6月15日-17日 京都府京都市

5. Yuji Tanno, Hiroaki Susumu, Miyuki Kawamura, Yoshinori Watanabe.
The inner centromere-shugoshin network prevents chromosomal instability.
EMBO Workshop on Cell Cycle
September 4-7, 2015, Danubius Health Spa Resort Margitsziget, Budapest, Hungary

[図書](計1件)

丹野悠司、渡邊嘉典

インナーセントロメア-シュゴシンネットワークは染色体不安定性をふせぐ
ライフサイエンス 新着論文レビュー
2015

ホームページ

http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/watanabe-lab/watanabe_lab/Home.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

丹野 悠司 (TANNO, Yuji)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：20583123