

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16084207

研究課題名(和文) 染色体分配に必須なセントロメアの核内機能構築の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular Properties of Nuclear Architecture and Centromere Function for Faithful Chromosome Segregation

研究代表者

高橋 考太 (TAKAHASHI KOHTA)

久留米大学・分子生命科学研究所・教授

研究者番号：40303804

研究成果の概要：

遺伝情報をコードする DNA は、細胞核内の染色体に収納され、セントロメアを制御拠点として子孫細胞に伝達される。本研究では、分裂酵母および高等真核細胞をモデル系にして、進化的に保存されたセントロメア核内機能と染色体分配における新規制御機構を分子的に明らかにした。これらセントロメア機能の制御破綻が、細胞がん化などの病態にどのように関わるかを探ることで、新たな治療戦略の考案に資することが期待できよう。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	28,700,000	0	28,700,000
2005 年度	31,100,000	0	31,100,000
2006 年度	31,100,000	0	31,100,000
2007 年度	31,100,000	0	31,100,000
2008 年度	31,100,000	0	31,100,000
総計	153,100,000	0	153,100,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：核ダイナミクス

キーワード：(1) セントロメア (2) 染色体 (3) 細胞周期 (4) ヘテロクロマチン (5) がん

1. 研究開始当初の背景

生命の設計図である遺伝情報をコードする DNA は、細胞核内の染色体という構造体に収納され、染色体上に一か所だけ存在するセントロメアと呼ばれる分子複合体を制御拠点として子孫細胞に安定に伝達分配される。セントロメアは細胞核内において特殊な構造配置をとり、分裂期におけるダイナミックな染色体分配運動を制御する分子シグナルの集積点として、未知の相互作用を介して機能発現すると考えられる。その重要性にもかかわらず、セントロメアの核内構築基盤は、そ

の複雑さのため研究開始当初は、ほとんど未解明の状態であった。またセントロメアは進化的スピードの速い領域であることが知られ、そのため世界的にも真核細胞で共通に保存された分子機構の解明が遅れている研究状況であった。染色体の核内機能発現には、ヘテロクロマチン構造が重要な役割を担うことが示唆されており、セントロメア機能との関連解明が待たれる状況でもあった。このような状況下、分裂酵母セントロメア研究を専門とする研究代表者の高橋は、ヘテロクロマチン研究で実績のある石井と高等真核細胞セントロメア研究の第一人者である深川

に研究分担を依頼することで、以下の課題について効率的総合的に研究推進を図ることを計画した。

(1) 研究代表者の進化的に保存されたセントロメア機能分子の分子運動ダイナミクスに着目し、その生理的意義を理解することにより、複雑なセントロメア制御機構の解明を試みることを計画した。モデル系として、これまでに研究実績のある分裂酵母を用いた。研究ターゲットとして、セントロメア特異的ヒストン CENP-A、スピンドルチェックポイントのマスターレギュレーターである Mad2 の二つのセントロメア構成因子の局在ダイナミクスの解明に焦点を絞って研究を進めることにした。これらは進化的に保存され、非常に重要な生理的意義をもつと考えられながら、その局在制御機構は未解明のまま残されている状況であった。

(2) 多くの生物においてセントロメアは反復 DNA 配列によって構成され、それらは部分的にヘテロクロマチン構造を呈している。しかしながら、キネトコア構造の基盤となる領域はヘテロクロマチン領域とは明確に区別される。研究分担者の石井は、そのようなセントロメアにおけるヘテロクロマチン領域の確立と画定の機構を解明する研究を計画した。特にヘテロクロマチン確立機構に関しては、RNAi 機構の関与が指摘されていたが、そのような拡散性をもつ因子の作用領域の限定機構についての理解は十分に為されていないかった。

(3) 酵母などのモデル細胞と比べて、高等動物細胞のセントロメアやセントロメア近傍のヘテロクロマチン構造は不明な点が数多くある。研究分担者の深川は、ニワトリの DT40 細胞を研究材料として、研究開始時点では、不明であった高等動物細胞のセントロメア構築の理解を目標に、セントロメア近傍のヘテロクロマチン形成機構および細胞分裂に必須なキネトコア構造形成機構の解明を目指して研究を進めた。

2. 研究の目的

生物が生命を維持するためには、ゲノム情報を包括する構造体である染色体が安定に保持・増殖されなければならない。正常な細胞では、ほぼ決まった時間周期でゲノムの複製と分配が正確に行われ、その破綻は細胞がん化と密接に関連している。したがって、染色体分配の正確な分子機構を解明することは、極めて重要な研究である。セントロメアは、染色体分配のための重要な機能ドメインであり、新たな視点からその核内構築基盤を解明することは、遺伝情報の伝達という生命の基本メカニズムをより深く理解するために必要不可欠なアプローチである。本研究では、

研究者それぞれが以下の独立した目的意識の下、独自に計画を考案、情報交換を頻繁に行いながら、総合的に研究を推進した。

(1) 研究代表者の高橋の目的は、それぞれセントロメア機能にユニークな貢献をする二つの構成因子、CENP-A と Mad2 の局在ダイナミクスの解明であり、その制御システムの分子的理解にある。将来的には CENP-A の局在機構の解明を、「なぜセントロメアが進化的に速いスピードで変化し、なおかつ種分岐につながる柔軟性に富んだ配置を可能にしたのか」の理解、Mad2 の局在機構の解明を「多数の染色体を間違いなく均等に分配するための洗練されたチェックポイントシステム」の理解に、それぞれつなげてゆきたいと考えている。

(2) 研究分担者の石井の目的は、セントロメア機能ドメインの主要成分の一つとしてヘテロクロマチンの制御を理解することであり、RNAi 機構の関与するセントロメアヘテロクロマチン領域の確立と画定の機構、およびその生理的意味を理解していくことを目標にする。

(3) 研究分担者の深川の目的は、高等動物細胞を対象として、セントロメアの機能ドメインおよびそこに結合する分子群と、これら足場となる構造体との未知の機能連関を見出すことであり、その生理的意味を解明していくことを目標にする。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者の高橋の研究では、分裂酵母の分子遺伝学的手法を駆使することにより、CENP-A と Mad2 のセントロメア局在に関与する局在化因子およびその関連因子の同定を進める。またその破壊株や遺伝子変異株を作成し、その細胞表現型を高性能顕微鏡で詳細に観察することにより、それぞれの遺伝システムが関与する生理的意義の解明に努める。進化的に保存された制御機構を分裂酵母の系でより深く理解するため、研究分担者の深川らの高等真核細胞でのセントロメア研究の成果を参照し意見交換しながら研究を進める。また染色体の再編成現象を分子的に解明するための新たな研究手法の開発にも意欲的に取り組む。分裂酵母で得られた成果をヒト正常培養細胞に展開するための基盤整備（セントロメア関連因子の遺伝子組み換え細胞の作製や手法の開発など）を行う。新たな研究視点として、細胞老化とセントロメア機能の連関について、基礎的研究を行う。

(2) 分裂酵母セントロメアでは、そのヘテロクロマチン領域に RNAi 装置が局在化し、そこから転写されるノンコーディング RNA を鋳型に siRNA が生成されるが、その一方で siRNA 生成反応自体が RNAi 装置のセントロメアへ

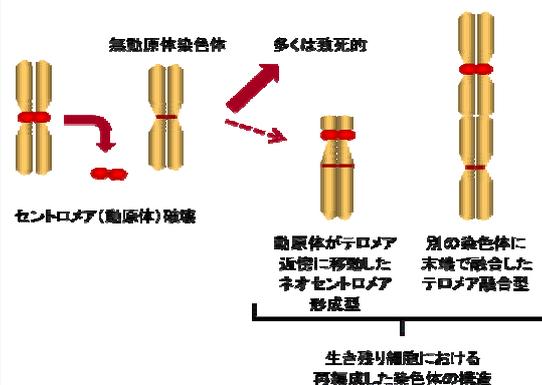
テロクロマチン局在化とヘテロクロマチン形成に寄与することが知られている。しかし、その作用機序は不明である。研究分担者の石井の研究では、まず、セントロメア由来の内在性 siRNA となっている配列領域を決定し、ヘテロクロマチン形成において siRNA が果たす役割を明確にする。また、セントロメア DNA のなかで異所的なヘテロクロマチン形成を誘導することが可能な配列領域を決定し、ノンコーディング RNA 転写との関連を明らかにする。それらの結果を互いに比較し、シス配列が RNAi 機構とヘテロクロマチン形成に果たす役割を統合的に解析する。また、ヘテロクロマチンに由来する siRNA がどの程度異所的に作用する能力を備えるかについても、ゲノム遺伝子改変を導入して精力的に解析する。RNAi 変異株を有効に活用しながら、分子遺伝学的アプローチと生化学的アプローチの双方で解析を進める。

(3) 酵母などでは、RNAi 装置が、セントロメア近傍のヘテロクロマチン形成に関与する報告があった。研究分担者の深川の研究では、高等動物において RNAi 装置がセントロメア構築に関与しているかを検証する。深川らは、以前に分子レベルの詳細な構造が解かれたヒト X 染色体由来の人工染色体を保持する DT40 細胞を樹立していた。この DT40 細胞を対象に、RNAi 装置に関与する Dicer 遺伝子や Argonaute 遺伝子(群)の条件的ノックアウト細胞株を樹立する。それら遺伝子の発現が失われた細胞で、ヒト人工染色体のセントロメア領域を構成する サテライトくり返し配列や近傍ヘテロクロマチン形成配列からの RNA 転写物が蓄積するかを解析する。蓄積が見られれば、高等動物のセントロメアやヘテロクロマチン構築にも RNAi 装置が関与することを強く示唆する。ヘテロクロマチン蛋白質群やセントロメア蛋白質類の局在、トポイソメラーゼ活性、セントロメア領域のメチル化状態、近傍ヘテロクロマチン領域のヒストン H3 のメチル化状態などを細胞生物学的手法と生化学的手法を併用し解析、セントロメアや近傍ヘテロクロマチン構築に異常が生じるか検討する。さらに深川の研究では、高等動物のセントロメア内に構成されるキネトコア構造の分子基盤の理解も目指す。CENP-H や CENP-I というキネトコアに存在するタンパク質と複合体を形成するタンパク質を DT40 細胞から同定する。具体的には、CENP-H や CENP-I の発現を CENP-H-FLAG や CENP-I-FLAG と置換した細胞を作成して、免疫沈降法によって、結合タンパク質を同定する。新規タンパク質が同定できれば、局在を確認して、ノックアウト法を用いた機能解析を進める。

4. 研究成果

それぞれの研究者が有機的に研究成果を共有し、積極的な意見交換を行うことにより、きわめて実り多い成果を得ることができた。それぞれの成果は国際的にも高い評価を受け、Science や Cell といった一流誌にも発表することができた。染色体分配に必須な基本シス因子であるセントロメアの機能と構造を、核ダイナミクスという新しい視点から捉えなおすことにより、研究目標であった未知の相互作用因子や制御システムを解明できただけでなく、細胞のがん化や老化、染色体進化といったセントロメア研究が進むべき新たなフィールドへの先駆け研究となるユニークな成果を得ることができたと考えている。

(1) 研究代表者の高橋の研究では、スピンドルチェックポイント蛋白質 Mad2 とセントロメア特異的ヒストン CENP-A の局在ダイナミクスの解析、染色体構築の基本単位であるコアヒストンの転写制御機構、セントロメア機能不全に伴う細胞の応答反応の解明などを、分裂酵母およびヒト培養細胞をモデル系にして推進してきた。これまでに、スピンドルチェックポイントへの Mis6 複合体および DASH 複合体の関与、CENP-A の二相的な局在機構の証明とその生理的意義の解明、Ams2GATA 因子依存的なヒストン転写活性化と反復ヒストン遺伝子の機能差異、およびセントロメア破壊によるネオセントロメア形成とテロメア融合現象の発見とヘテロクロマチンの関与(図参照)などの成果を発表した。未発表であるが、セントロメア構造と細胞老化についての研究もヒト正常細胞を用いて推進した。核内染色体ドメインであるセントロメアの機能と構造のダイナミクスを中心に、染色体の可塑的な性質を、細胞周期、細胞老化、種分岐などの時間軸で解明することができた。



(2) 研究分担者の石井の研究では、異所的ヘテロクロマチンを誘導するゲノム配列の分裂酵母セントロメア DNA からの抽出に成功した。セントロメアの反復配列ユニット中の独

立な 2 領域にその活性は限局された。また、分裂酵母セントロメア由来の siRNA を詳細にマッピングした結果、2 領域はともに siRNA の特異的産生元に相当することが判明した。一方、異所的ヘテロクロマチンの近傍への拡大反応は siRNA の配列に拘束されないことを示した。siRNA 産生経路は主にヘテロクロマチンの確立に寄与しており、siRNA の前駆体となる RNA の転写はその転写 DNA 部位のヘテロクロマチン化を引き起こすことを明らかにした。また、分裂酵母に存在する内因性 siRNA が相同な転写産物の二次的 siRNA 産生を誘起することを示した。さらにヘテロクロマチン変異株において僅かに検出される内在性 siRNA のセントロメア反復配列へのマッピングを行い、それらが siRNA 前駆体であるノンコーディング RNA において特徴的な局在を示すことを明らかにした。加えて、ノンコーディング RNA と RNAi エフェクター複合体 RITS の直接結合についても検討を行い、それが RITS にあらかじめ含まれている siRNA の配列依存的な反応であることを明らかにした。

(3) 研究分担者の深川の研究では、ヒト 21 番染色体由来の人工染色体を保持する DT40 細胞を対象にして、RNAi 装置に関する Dicer、Argonaute3 および Argonaute4 遺伝子の条件的ノックアウト細胞を樹立した。Dicer の発現が失われた細胞で、ヒト人工染色体のセントロメア領域からの RNA 転写が確認できた。また、Dicer ノックアウト細胞で、ヘテロクロマチンタンパク質やコヒーシタンパク質の局在異常が観察されたことから、Dicer は高等動物細胞においてヘテロクロマチンの形成に重要な働きを担っていることが示唆された。さらに高等動物の CENP-H および CENP-I と結合するセントロメアタンパク質については、精製作業を何度も繰り返し最終的に 15 種類以上の構成的キネトコア局在タンパク質を同定できた。ノックアウトを用いた機能解析から、構成的キネトコアタンパク質がいくつかのサブ複合体に分類できることがわかった。また、DNA 結合活性をもつサブ複合体なども同定できた。

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 29 件)

1. Kojiro Ishii, Yuki Ogiyama, Yuji Chikashige, Saeko Soejima, Fumie Masuda, Tatsuyuki Kakuma, Yasushi Hiraoka, and Kohta Takahashi, Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere

dysfunction. *Science* 321, 1088-1091 (2008) 査読有り

2. Tetsuya Hori, Miho Amano, Aussie Suzuki, Chelsea Backer, Julie Welburn, Yimin Dong, Bruce F. McEwen, Emiko Suzuki, Katsuya Okawa, Iain M. Cheeseman, and Tatsuo Fukagawa, CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell* 135, 1039-1052 (2008) 査読有り

3. Shigeaki Saitoh, Yasuyo Kobayashi, Yuki Ogiyama, and Kohta Takahashi. Dual regulation of Mad2 localization on kinetochores by Bub1 and Dam1/DASH that ensure proper spindle interaction. *Mol. Biol. Cell.* 19, 3885-3897 (2008) 査読有り

4. Tetsuya Hori, Masahiro Okada, Katsumi Maenaka, and Tatsuo Fukagawa, CENP-0-class proteins form a stable complex and are required for proper kinetochore function. *Mol. Biol. Cell* 19, 843-854 (2008) 査読有り

5. Yuko Takayama, Hiroshi Sato, Shigeaki Saitoh, Yuki Ogiyama, Fumie Masuda, and Kohta Takahashi. Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* 19, 682-690 (2008) 査読有り

6. Yuko Takayama, and Kohta Takahashi. Differential regulation of repeated histone genes during the fission yeast cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 35, 3223-3237 (2007) 査読有り

7. Yasuyo Kobayashi, Shigeaki Saitoh, Yuki Ogiyama, Saeko Soejima, and Kohta Takahashi. The fission yeast DASH complex is essential for satisfying the spindle assembly checkpoint induced by defects in the inner-kinetochore proteins. *Genes Cells.* 12, 311-28 (2007) 査読有り

8. Masahiro Okada, Iain M. Cheeseman, Tetsuya Hori, Katsuya Okawa, Ian X. McLeod, John R. Yates III, Arshad Desai, and Tatsuo Fukagawa, The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nature Cell Biol.*, 8, 446-457 (2006) 査読有り

9. Shigeaki Saitoh, Kojiro Ishii, Yasuyo Kobayashi, and Kohta Takahashi, Spindle checkpoint signaling requires the Mis6 kinetochore subcomplex, which interacts with Mad2 and mitotic spindles. Mol. Biol. Cell 16, 3666-3677 (2005) 査読有り

10. Tatsuo Fukagawa (他7名1番目) Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. Nature Cell Biol., 6, 784-791 & Cover (2004) 査読有り

〔学会発表〕(計136件)

1. Kohta Takahashi. Chromosome reorganization after centromere dysfunction. EMBO workshop, Chromosome Segregation: Centromere & Kinetochore. Bordeaux (2008)

2. Tatsuo Fukagawa. Molecular architecture of the vertebrate constitutive centromere associated network. EMBO workshop, Chromosome Segregation: Centromere & Kinetochore. Bordeaux (2008)

3. Kojiro Ishii. Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere dysfunction. The 3rd Asian Chromosome Colloquium, Osaka (2008)

4. Kohta Takahashi. Neocentromere formation and telomere fusion: Two modes of survivors from centromere disruption. The 4th International Fission Yeast Meeting, Copenhagen (2007)

5. Kohta Takahashi. Two distinct cell cycle phases responsible for centromere localization of CENP-A in fission yeast. The Royal Society discussion meeting on chromosome segregation, London (2004)

〔図書〕(計12件)

1. 高橋 考太, 動原体. 酵母のすべて 系統、細胞から分子まで(大隈良典・下田親編), シュプリンガー・ジャパン, 30-37 (2007)

2. Kohta Takahashi, and Mitsuhiro Yanagida. Chromosome cohesion and segregation. The Molecular Biology in Fission Yeast (Egel R., Ed.), Springer-Verlag Inc., 171-187 (2004)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称:小分子RNAの検出方法および小分子RNA検出用試薬

発明者:石井浩二郎

権利者:久留米大学、科学技術振興機構

種類:特許

番号:特願 2005-013338、PCT/JP2006/301074

出願年月日:平成17年1月20日

国内外の別:国内

名称:RNA干渉誘導エレメント及びその用途

発明者:石井浩二郎、高橋考太

権利者:久留米大学、科学技術振興機構

種類:特許

番号:特願 2005-145876、PCT/JP2006/310079

出願年月日:平成17年5月18日

国内外の別:国内、国外

〔その他〕

研究成果は、複数の新聞等のメディアで紹介された。

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 考太 (TAKAHASHI KOHTA)

久留米大学・分子生命科学研究所・教授

研究者番号:40303804

(2)研究分担者

石井 浩二郎 (ISHII KOJIRO)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授

研究者番号:40360276

深川 竜郎 (FUKAGAWA TATSUO)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授

研究者番号:60321600

