

機関番号：14401
研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）
研究期間：2018年度～2020年度
課題番号：16K21747
研究課題名（和文）
ヒト細胞でDNA損傷部位にネオセントロメアが形成される機構とその生物学的意義
研究課題名（英文）
The significance and the molecular mechanism of neocentromere formation at DSB sites
研究代表者
北川 克己 (KITAGAWA, Katsumi)
大阪大学・生命機能研究科・招聘教授
研究者番号：20796544
交付決定額（研究期間全体）：(直接経費) 43,200,000円

研究成果の概要（和文）：染色体DNA二重鎖切断が生じた際に活性化されるDNA損傷応答におけるセントロメア蛋白CENP-Aの働きを分子レベルで解明するため、HeLa細胞等のヒト培養細胞を用いて細胞生物学的なCENP-Aの機能解析を行った。CENP-AはDNA二重鎖切断部位に局在したが、他のDNA損傷部位にはしなかった。CENP-Aの発現量が増えたときには、細胞の放射線への感受性が下がり、CENP-Aの発現量が減ったときには、細胞の放射線への感受性が上がった。また、DNA二重鎖切断時特異的に、CENP-Aに結合する蛋白質の同定に成功した。また、スピンドルチェックポイント因子BUB1もDNA二重鎖切断部位に局在した。これらの結果はDNA二重鎖切断時におけるCENP-Aのスピンドルチェックポイントの活性化をする役割を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境因子である放射線、重金属、大気汚染と変異誘導化合物の細胞への曝露はDNA二重鎖切断や他のDNA欠損を引き起こす。このような環境によって引き起こされたDNA欠損は保存されたDNA損傷反応機構によって修復される。DNA損傷反応機構に問題があると、DNAは修復されず、ガンや発達障害などの重篤な健康障害を引き起こされる。DNA二重鎖切断時におけるCENP-Aのスピンドルチェックポイントの活性化をする役割を示唆する我々の結果はこの分子機構の解明に貢献する。

研究成果の概要（英文）：We aimed to define the role of centromere protein A (CENP-A), a histone H3 variant, as a key mediator of this crosstalk. CENP-A is a constituent of the centromere-specific chromatin essential for the assembly of the kinetochore, a proteinaceous structure that provides the connection between chromosomes and spindle microtubules. CENP-A plays a crucial role in centromere identity and kinetochore assembly. Interestingly, CENP-A also localizes to DNA double-strand breaks (DSBs) but not at other DNA lesions. We found that CENP-A depleted cells were highly sensitive to ionizing irradiation, but over-expression of CENP-A reduced radiosensitivity. We identified several novel proteins that associate with CENP-A specifically when DSBs occur. We also found BUB1, a spindle checkpoint component, is present at DSBs. Our results suggest the role of CENP-A in the activation of the spindle checkpoint in response to failed DNA damage repair.

研究分野：細胞生物学

キーワード：セントロメア、ヒストン、染色体安定性、DNA損傷、DNA二重鎖切断、放射線感受性、クロマチン

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報を安定に維持するために、細胞には、ゲノム情報を担う染色体 DNA が細胞周期の S 期に正確に複製され、細胞分裂の際二つの娘細胞に均等に分配されるよう制御する機構が備わっている。細胞分裂期における正常な染色体分配を司る染色体上の領域をセントロメアと呼ぶ。セントロメアは各染色体に一カ所ずつ存在し、ヒストン H3 の一種である CENP-A 蛋白を構成因子とする特異的なクロマチンを形成している。このセントロメア特異的なクロマチン構造は、細胞周期の M 期において染色体が紡錘体微小管と結合するために必要な蛋白質複合体 (キネトコア) が形成されるための基盤となる。CENP-A 蛋白はセントロメア特異的なクロマチン構造とその機能を決定する重要な因子である。近年、この CENP-A がセントロメアだけではなく、染色体上の DNA 二重鎖が切断された部位に局在するということが報告されたが、その分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

セントロメアに関連する有糸分裂制御機構と DNA 損傷反応機構の分子クロストークの解明

DNA 二重鎖切断は、細胞周期の S 期において染色体上に DNA 複製フォーク進行を阻害するような損傷をうけることによって生じる。また、DNA 二重鎖は放射線照射や化学物質への暴露によっても物理的に切断される。二重鎖切断が生じると、細胞は細胞周期の進行を停止させる DNA 損傷チェックポイントや、DNA 修復を活性化させる。切断箇所が未修復のままになっている細胞はアポトーシスによる細胞死を起こす。これらの反応を総じて DNA 損傷応答と呼ぶ。ゲノム情報を正確に維持するためには切断された箇所は寸分変わらず元通りに修復される必要があるが、修復の際に切断部位の塩基が欠損したり余分に付加されたりして DNA 配列に変異が生じたり、切断箇所が誤った部位と接合して染色体転座を起こすことがある。こういった染色体の不安定性は多くの癌細胞に共通して見られる。従って DNA 損傷応答に関わる因子の同定と分子レベルでの機能解明は染色体不安定性に起因する発癌の機構を理解する上で重要な課題である。DNA 損傷応答には二重鎖切断部位の認識、切断部位周辺のクロマチン構造の動的変化、DNA 修復因子の切断部位への導入といった過程が含まれる。

CENP-A の DNA 損傷応答における働きについて、CENP-A は DNA 二重鎖切断部位に局在して DNA 損傷部位特異的なクロマチン形成を促し、DNA 損傷チェックポイント経路や DNA 修復経路の活性に必要な蛋白質を損傷部位に導入するための基盤を形成するのかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

HeLa 細胞等のヒト培養細胞を用いて細胞生物学的な CENP-A の機能解析を行った。

細胞を 1 Gy から 10Gy の範囲で X-線照射し、照射後 5 分、30 分、1 時間、4 時間の時点でメタノール固定を行う。CENP-A が DNA 二重鎖切断部位に局在しているかどうかを抗 CENP-A 抗体を用いた間接蛍光抗体法により調べ、CENP-A の局在の様子と比べる。二重鎖切断部位のマーカーには抗 H2AXS139p 抗体を用い、セントロメア領域のマーカーには抗 CENP-B 抗体を用いる。

制限酵素 I-SceI の認識部位をゲノム上に挿入したヒト P175 細胞に GR(グルココルチコイド受容体)を融合させた I-SceI を発現させ、培地にグルココルチコイドのリガンドである TA(triamcinolone acetonide)を加えると、I-SceI が核内へ輸送され、ゲノム上の認識部位を切断する。この系を用いることにより ChIP アッセイにより CENP-A と BUB1 の切断部位への局在を調べる。

4. 研究成果

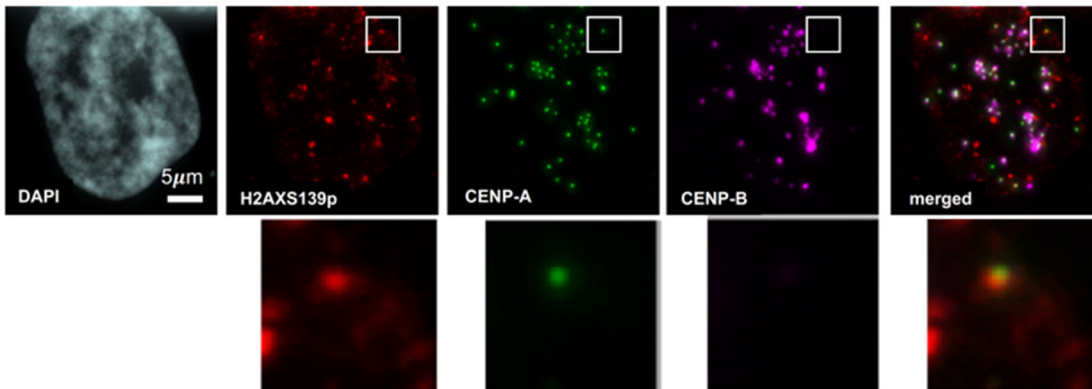


Fig. 1. 数個 of CENP-A 染色部位 (緑) だけが X 線で誘導された γ H2AX 染色部位 (赤) と共局在する。DNA は DAPI で染色。CENP-B (紫) はセントロメアの位置を示す。

染色体 DNA 二重鎖切断が生じた際に活性化される DNA 損傷応答における CENP-A (セントロメアプロテイン A) の働きを分子レベルで解明するため、HeLa 細胞等のヒト培養細胞を用いて細胞生物学的な CENP-A の機能解析を行った。CENP-A は DNA 二重鎖切断部位に局在したが、他の DNA 損傷部位にはしなかった (Fig. 1)。CENP-A の発現量が増えたときには、細胞の放射線への感受性が下がり、CENP-A の発現量が減ったときには、細胞の放射線への感受性が上がった。また、DNA 二重鎖切断時特異的に CENP-A に結合する新しいタンパク質の同定に成功した (data not shown)。また、スピンドルチェックポイント蛋白である BUB1 も DNA 二重鎖切断部位に局在した (Fig. 2)。これらの結果は CENP-A の DNA 二重鎖切断時におけるスピンドルチェックポイントの活性化をする役割を示唆する。

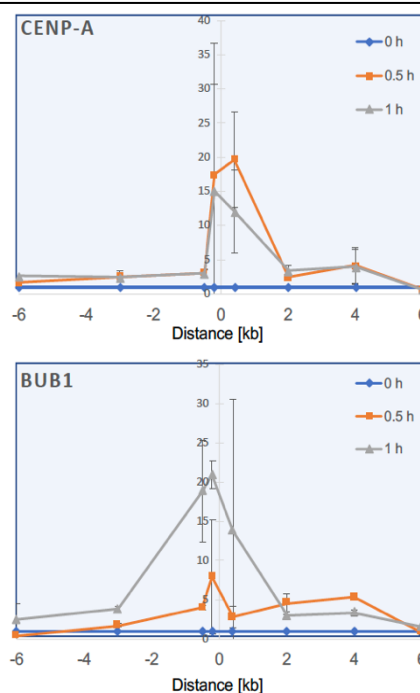


Fig. 2. BUB1 も CENP-A と同じように DNA 二重鎖切断部位に局在する。BUB1 の方が CENP-A よりも時間的に遅れて DNA 二重鎖切断部位に局在する

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件) (全て査読有)

- 1) Leclerc S and Kitagawa K*. The Role of Human Centromeric RNA in Chromosome Stability. *Frontiers Molecular Biosciences*. 2021 March 31; (31). doi.org/10.3389/fmolb.2021.642732
- 2) Niikura Y, Fang L, Kitagawa R, Li P, Xi Y, You J, Guo Y, Kitagawa K*. Mass Spectrometry Analysis to Identify Ubiquitylation of EYFP-tagged CENP-A (EYFP-CENP-A). *J Vis Exp*. 2020 Jun 10;(160). doi: 10.3791/61138. PubMed PMID: 32597847.

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

- 3) Niikura Y, Kitagawa R, Fang L and Kitagawa K*. CENP-A Ubiquitylation is indispensable to Cell Viability. *Developmental Cell* 2019; 50(6):683-689. e6. PMID: PMC6761987
- 4) Niikura Y, Kitagawa R, Kitagawa K*. CENP-A Ubiquitylation Contributes to Maintaining the Chromosomal Location of the Centromere. *Molecules*. 2019; 24(3): 402-7.

[学会発表] (計 1 件)

Niikura Y, Kitagawa R, and Kitagawa K. The Role of CENP-A Dysfunction in Chromosome Instability in Ewing Sarcoma, Centromere Biology Gordon Research Conference. 2018

[図書] (計 1 件)

Niikura Y and Kitagawa K. The Functions of SGT1, a Co-chaperone. *Heat Shock Protein 90 in Human Diseases and Disorders*. Volume 19. pp 317-370. Heat Shock Proteins Book series, Springer Nature Publishers, 2019

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織