

平成 2 1 年 4 月 6 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 -2008

課題番号：19591097

研究課題名（和文）新規キネトコアタンパク CENP-50 の転写制御と染色体分配における機能解析

研究課題名（英文） Roles of a novel kinetochore protein CENP -50 in the transcriptional regulation and chromosome dividing

研究代表者 川島 敏行

氏名（アルファベット）KAWASHIMA TOSHIYUKI

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号 10306839

研究成果の概要：

CENP-50 がキネトコアに局在するメカニズムに関して様々な欠損変異体を持ちいて検討し、キネトコアへの局在が減弱する変異体を得ることに成功している。現在 MgcRacGAP、CENP-50 およびクロマチン構造関連分子が、細胞周期のどの時点で相互作用するのかを詳細に解析中である。今後はツーハイブリッド法以外の pull-down 法や共免疫沈降法等を予定している。また結合部位が同定されれば、結合能のない変異体を作製しその機能を解析する。これらの解析を通して、MgcRacGAP の GAP としての活性、クロマチンリモデリング因子のリモデリング活性およびポリコームグループのヒストンメチル化活性等が結合により影響を受けるかどうかを明らかにできる。それによりそれぞれの相互作用のもつ生物学的意義を検討していく予定である。これらの研究の過程で、転写因子 STAT が核内移行するためには MgcRacGAP の Nuclear Localization Signal(NLS)を介していることを発見し、この結果を MCB 誌に論文発表した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：生体分子, 発生・分化, シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

申請者らのグループはこれまでに、GAP (GTPase activating protein) ファミリーに属する新規遺伝子 MgcRacGAP が細胞の分裂および分化に重要な働きをもつことを明らかにしてきた (Kawashima et al., Blood, 2000; Hirose et al., J. Biol. Chem., 2001; Minoshima et al., Dev. Cell, 2003; Tonozuka et al., Blood 2004; Kawashima et al., J. Cell. Biol., 2006)。

MgcRacGAP は細胞分裂後期に中央体に局在し細胞質分裂の完了に必須である (Hirose et al., J. Biol. Chem., 2001; Minoshima et al., Dev. Cell, 2003)。一方、細胞分裂前期および中期にはセントロメア領域に局在し染色体分配に関与することが報告されている (Oceguera-Yanez et al., J. Cell. Biol., 2005)。間期においては主に核内に局在するが、核内での役割については不明であった。しかしながら最近、予備的な実験からの結果ではあるが、核内に移行できない MgcRacGAP の変異体を細胞に強制発現すると細胞死に至るという結果もあり、MgcRacGAP は間期の細胞核内においても重要な役割を担っていると考えられる。この核内における MgcRacGAP の機能を明らかとする目的で MgcRacGAP を bait として yeast two-hybrid 法を行った結果、KLIP1/MLF1IP およびクロマチンリモデリング因子群やポリコームグループ遺伝子群などのクロマチン構造関連分子が多数単離された。

KLIP1/MLF1IP については、アメリカ・テキサスのグループが 2003 年にカポジ肉腫に関連したヘルペスウイルスの Latent

Nuclear Antigen (LNA) に相互作用するタンパクとして yeast two-hybrid 法により同定しており、過剰発現の系で TK プロモーターに対して転写の repressor として機能することを報告している (Pan et al., J. Virol., 2003)。また、アメリカ・テネシーのグループは 2004 年に MDS/myeloid leukemia に伴う MLF fusion protein の機能解析の一端として、MDS/myeloid leukemia factor 1 (MLF1) に結合するタンパクの同定を yeast two-hybrid 法により試み、KLIP1 と同一の cDNA を同定し MLF1IP として報告している (Hanissian et al., Oncogene., 2004)。しかしながら上記の 2 報とも局在についての詳細な記述はなかったことから、申請者らは局在についての検討を行った。その結果、この分子が恒常的にセントロメア領域に局在することを明らかとし、予想分子量が約 50kDa だったことから、CENP-50 (Centromere protein 50kDa) と名づけた。次に、CENP-50 の機能解析のためニワトリ DT40 細胞を用いて CENP-50 遺伝子破壊細胞を樹立した。この遺伝子破壊細胞は分裂期の染色体分配に軽度の異常が見られ、増殖速度が遅いものの致死ではなかった。さらに、この遺伝子破壊細胞を用いた解析から、CENP-50 がスピンドルチェックポイントからの回復に必要であることを示した (Minoshima et al., Mol. Cell. Biol., 2005)。

クロマチン構造関連分子は、クロマチンの構造の変換や維持を通して転写制御に関与していることは良く知られた事実である。

このように、CENP-50 およびクロマチ

ン構造関連分子はともに、間期の細胞核内において転写制御に関与することが明らかとなっている。一方 MgcRacGAP についても、IL-6 の下流で転写因子である STAT3 と直接結合し、その結合が STAT3 の転写活性化に必要であることも申請者らは見出している (Tonozuka et al., Blood, 2004)。よって、MgcRacGAP、CENP-50 およびクロマチン構造関連分子の 3 者が共同して転写制御を行っているのではないかと考えるに至った。

さらに、上述のように MgcRacGAP は細胞分裂前期および中期にはセントロメア領域に局在し染色体分配に関与することが報告されており、それと相互作用する CENP-50 は恒常的セントロメア局在分子である。また、クロマチン構造関連分子の一部は細胞分裂期にセントロメア局在を示すという報告 (Craig et al., Hum. Mol. Genet., 2003) や、染色体分配にも関与するという報告 (Hsu et al., Mol. Cell. Biol., 2003) もある。よって、MgcRacGAP、CENP-50 およびクロマチン構造関連分子は、細胞分裂期にはセントロメア領域において染色体分配にも共同して機能することも十分考えられる。

2. 研究の目的

多細胞生物の一個体内の細胞は同じゲノム情報を有しているにも関わらず、それぞれが特有の細胞機能を有している。これはそれぞれの細胞における遺伝子発現の違いにより説明されるが、その差異の情報を担っているのがヒストンの翻訳後修飾や DNA のメチル化である。この概念はエピジェネティクスと言われ、転写、複製、修復、発生分化、発癌および免疫システム等ほとんどの生命現象に関与することから、ここ数年で非常に大きく成長した学問分野

である。

ヒストンの翻訳後修飾にはアセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化および SUMO 化等があり、これらの修飾は様々なヒストン修飾酵素の働きにより達成される。クロマチン構造にはヒストン修飾酵素以外にも、修飾を認識して結合する分子やクロマチン構造を変換する分子など多種多様な分子群が関与していることが知られている。2000 年にはヒストン修飾が認識コードとして働き、さらにリモデリングに関与する分子がリクルートされるというヒストンコード仮説が提唱された (Strahl et al. Nature. 2000)。

申請者らが同定した MgcRacGAP と相互作用するポリコムグループ遺伝子群とクロマチンリモデリング因子群も上記のようなクロマチン構造に関わる分子である。ポリコムグループ遺伝子群は一般に、核内のクロマチン構造を通じて一度確立した遺伝子発現パターンを、その後の細胞分裂を経ても維持していく cell memory 機能に関与すると考えられている。また、クロマチンリモデリング因子は、ATP 依存的に DNA に沿ってヌクレオソームをスライディングさせることによりクロマチン構造の変換を引き起こすことが示されている。一方で細胞分裂におけるこれらの分子群の役割についても、近年以下のような報告がなされた。

ポリコムグループ遺伝子群について

- ・セントロメア領域に存在する (Saurin et al. J Cell Biol. 1998, Obuse et al. Genes Cells. 2004)

- ・染色体分配に必要 (O'Dor et al. Dev Biol. 2006)

クロマチンリモデリング因子群

- ・セントロメア領域に存在する (Xue et al.

Proc Natl Acad Sci USA. 2000)

・染色体分配に必要 (Hsu et al. Mol Cell Biol. 2003)

・スピンドルチェックポイントに関与 (Vries et al. Genes Dev. 2005)

また、ヒストンのアセチル化を認識し結合する Brd4 の発現量低下によりスピンドルチェックポイントからの回復に異常が生じるが、その原因としてヒストンのアセチル化レベルの低下が示唆されている

(Nishiyama et al. Mol Biol Cell. 2006)

また、Brd4 は CENP-50 と同様にカポジ肉腫に関連したヘルペスウイルスの Latent Nuclear Antigen (LNA) に相互作用することも示されている (You et al., J. Virol., 2006)。つまり Brd4 および CENP-50 はどちらも LNA に結合することが示され、スピンドルチェックポイントからの回復に必要であることを考え合わせると、CENP-50 もヒストンの翻訳後修飾に関与していると考えるのが妥当と思われる。

以上のように、MgcRacGAP、CENP-50 およびクロマチン構造関連分子が共同して、ヒストンの翻訳後修飾、クロマチン構造の変換あるいは維持を通じて、転写制御のみならず染色体分配にも機能を有することを明らかとしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

クロマチン構造に関わる因子群は多種多様あるが、申請者らが MgcRacGAP と相互作用することを見出した分子はその一部に過ぎない。よって、様々な既知のクロマチン構造関連分子に対し yeast two-hybrid 法を用いて MgcRacGAP との結合の有無について検討する。

MgcRacGAP、CENP-50 およびクロマチン構造関連分子が、細胞周期のどの時点で相互作用するのか詳細に解析する。

MgcRacGAP は間期には主に核内に存在し、抗体を用いて染色を行うと核全体が染まる。クロマチン構造関連分子も同じような染色パターンを示すものも多いため、抗体染色で相互作用を判断することは非常に困難である。よって、方法としては FRET 等のイメージング技術を用いた生細胞における観察や免疫沈降法により行う。MgcRacGAP とクロマチンリモデリング因子間の結合については、既にツーハイブリッド法を用いて結合部位の特定を行ったが、その他の分子間の相互作用部位についても同様の解析を行う。方法はツーハイブリッド法、pull-down 法、共免疫沈降法等を予定している。また結合部位が同定されれば、結合能のない変異体を作製しその機能を解析する。これらの解析を通して、MgcRacGAP の GAP としての活性、クロマチンリモデリング因子のリモデリング活性およびポリコームグループのヒストンメチル化活性等が結合により影響を受けるかどうかを明らかにできる。それによりそれぞれの相互作用の持つ生物学的意義を検討する。

MgcRacGAP は 385 番目のアルギニン残基をアラニン残基に置換することで、GAP 活性を消失した変異体を作製することが可能である。この変異体を用いて、その GAP 活性が上記の結合に必要であるか検討する。GAP 活性の関与が認められれば、どの GTP 結合タンパク質が影響しているのかを pull-down 法により明らかにする。この実験により Rho ファミリー-GTP 結合タンパク質が染色体分配や転写制御にいかに関与するかを明らかとする。

MgcRacGAP および CENP-50 が DNA 結合活性を有していることを認めており、これらの分子の欠損がクロマチン構造関連分子の局在に影響を与える可能性も十分考え

られる。また、既に CENP-50 の遺伝子破壊細胞および MgcRacGAP の条件的遺伝子破壊細胞も樹立している。よって、これらの細胞を用いて、MgcRacGAP および CENP-50 欠損によりクロマチン構造関連分子の局在に変化が生じるか解析を行う。方法としては種々のクロマチン構造関連分子に対する抗体を用いた染色に加え、蛍光蛋白質との融合遺伝子を用いた生細胞における細胞周期に伴う経時的な観察も行う。これらにおいてクロマチン構造に関わる因子群の挙動に変化が認められた場合、その変化がヒストン修飾にも影響していると考えられる。よって、ヒストンの特異的な修飾を認識する抗体を用いて解析する。特に以下の点には詳細に検討を行う。

MgcRacGAP と相互作用するポリコームグループ遺伝子はヒストンのメチル化活性を有しているため、MgcRacGAP 遺伝子破壊によるヒストンメチル化への影響を検討する。

上述のように、MgcRacGAP を bait とする yeast two-hybrid 法によりクロマチンリモデリング因子やポリコームグループ遺伝子群が単離されているが、それ以外に転写のコリプレッサーも単離されている。これらのクロマチンリモデリング因子および転写のコリプレッサーは共に、ヒストンと機能的に連関している可能性があることから、MgcRacGAP 欠損細胞でのヒストンアセチル化の程度について解析する。

ヒストンのアセチル化を認識し結合する Brd4 についての解析から示されているように、スピンドルチェックポイントからの回復にはヒストンのアセチル化が関与していることが示唆されている。CENP-50 もスピンドルチェックポイントからの回復に必要であることから、CENP-50 遺伝子破

壊細胞においてスピンドルチェックポイントを活性化している時期に、ヒストンのアセチル化の程度を解析することは興味深い。これまでの報告から MgcRacGAP と CENP-50 は少なくとも染色体分配時にはセントロメア領域において相互作用していると考えられる。よって、MgcRacGAP および CENP-50 遺伝子破壊細胞を用いて、セントロメア領域への局在にお互いがどのように影響を持つのかを決定する。また、それぞれが共に染色体分配へ機能を有することから、機能的連関についても解析する。MgcRacGAP および CENP-50 遺伝子破壊細胞に対し、マイクロアレイ等を用いた遺伝子発現解析を行い、MgcRacGAP および CENP-50 がどのような遺伝子の発現に影響を持つのかを明らかとする。

4. 研究成果

CENP-50 がキネトコアに局在するメカニズムに関して様々な欠損変異体をもちいて検討し、キネトコアへの局在が減弱する変異体を得ることに成功している。しかし完全にキネトコアへの局在が消失する変異体の同定にはまだ至っていない。もしキネトコアへの局在が消失する変異体が同定されればそのドメインのもつ生物学的意義の検討をおこなっていく予定である。そのドメインの機能として Polo kinase と協調して染色体の分配や安定性への関与を予想している。すなわちカポジ肉腫に関連したヘルペスウイルスの Latent Nuclear Antigen (LNA) に相互作用するタンパクである CENP-50 が癌化のプロセスにそのドメインのもつ機能の破綻を介して関与している可能性があり、今後この仮説を検討したいと考えている。現在 MgcRacGAP、CENP-50 およびクロマチン構造関連分子が、細胞周期のどの時点で相互作用するのかを詳細に解析中である。今後はツーハイ

ブリッド法以外の pull-down 法や共免疫沈降法等を予定している。また結合部位が同定されれば、結合能のない変異体を作製しその機能を解析する。これらの解析を通して、MgcRacGAP の GAP としての活性、クロマチンリモデリング因子のリモデリング活性およびポリコームグループのヒストンメチル化活性等が結合により影響を受けるかどうか明らかにできる。それによりそれぞれの相互作用のもつ生物学的意義を検討していく予定である。これらの研究の過程で、転写因子 STAT が核内移行するためには MgcRacGAP の Nuclear Localization Signal(NLS)を介していることを発見し、この結果を MCB 誌に論文発表した。

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 2件)

1. Toshiyuki Kawashima, Ying Chun Bao, Yukinori Minoshima, Yasushi Nomura, Tomonori Hatori, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa, Toshiyuki Fukada, Noriko Takahashi, Tetsuya Nosaka, Makoto Inoue, Tomohiro Sato, Mutsuko Kukimoto-Niino, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, and Toshio Kitamura

“A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is an NLS-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors”
Molecular and Cellular Biology (2009) 29:1796-813.

2. Toshiyuki Kawashima and Toshio Kitamura

“Rac and Nuclear Translocation of STAT Transcription Factors”
Methods in Enzymology (2008) 439:171-189

[学会発表](計 1件)

新しいメカニズムでJAK/STATシグナルを抑制する阻害剤の同定

川島 敏行、土屋 秋穂、
北村 俊雄

日本血液学会 シンポジウム
平成20年10月10日
国立京都国際会館

図書](計 0件)

[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

(1)研究代表者

川島 敏行 (KAWASHIMA TOSHIYUKI)
東京大学・医科学研究所・助教
10306839

(2)研究分担者

北村 俊雄 (KITAMURA TOSHIO)
東京大学・医科学研究所・教授
20282527

(3)連携研究者

なし