

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18491

研究課題名(和文)細胞周期依存的なセントロメアタンパク質ネットワークの配置変換の制御機構とその意義

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of cell cycle-dependent switching of protein interaction network in vertebrate kinetochore

研究代表者

原 昌稔 (HARA, Masatoshi)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：30565099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：構成的セントロメアタンパク質ネットワーク(CCAN)の構成因子のひとつであるCENP-Cは、CCAN内でのその結合様式を細胞周期の間期とM期とで変化させる。本研究では、CENP-CはM期特異的にCdk1によりリン酸化され、それにより、CENP-Cと他のセントロメア因子との結合ネットワークが変換されることを見出した。さらに、この結合変換は、CENP-Cを介したセントロメア/微小管相互作用に依存した染色体分配に必要であることが示唆された。これらの結果は、CCAN内結合変換がキネトコアの機能に重要な役割を果たすことを意味しており、キネトコアタンパク質結合ネットワークの新たな制御の一面を提示する。

研究成果の概要(英文)：CENP-C, a component of the constitutive centromere-associated network (CCAN), has been shown that it changes its interaction partners in the CCAN between interphase and M-phase. Using chicken DT40 cells, we found that C-terminus of CENP-C is phosphorylated by Cdk1 in M-phase that causes the cell cycle-dependent change in interaction of CENP-C with other centromere factors in CCAN. Further detail analyses suggested that the interaction change is required for cell viability when chromosome segregation is driven by only CENP-C-dependent linkage between centromere and microtubules. These results imply a new regulatory aspect of the kinetochore protein interaction network during cell cycle progression, leading to a model in which cell cycle-dependent interaction changes in the CCAN could play a key role for kinetochore functions.

研究分野：生物学

キーワード：キネトコア セントロメア 細胞周期

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報が次世代の細胞・個体へ受け継がれるために、遺伝情報を担う染色体は、細胞周期の S 期において正確に複製された後、M 期において娘細胞へ均等に分配されなければならない。正確な染色体分配の分子機構の解明は、生物の恒常性維持の理解にとって本質的かつ重要な課題である。

染色体分配に際して、染色体上のセントロメア領域にキネトコアとよばれるタンパク質複合体が形成される。この複合体が紡錘体微小管と正確に結合することで、染色体の均等分配が担保される。これまでに、およそ 100 種類をこえるキネトコア構成タンパク質が、我々の研究室および国内外の研究室により同定されている。そのうち CCAN (constitutive centromere-associated network) とよばれるタンパク質複合体は、16 種のタンパク質群により形成される。この複合体は、セントロメア特異的ヒストンバリエーションである CENP-A を含むヌクレオソームと結合して、セントロメア領域に細胞周期を通じて恒常的に局在する。M 期になると KMN ネットワーク (KNL1 複合体; Mis12 複合体; Ndc80 複合体) とよばれる他の複合体が CCAN ヘリクルートされる。KMN ネットワークは直接微小管と結合する。そのため、CCAN による KMN ネットワークのリクルートは、M 期における微小管とセントロメアとの結合の橋渡しとなり、正確な染色体分配を保証する。

CCAN は恒常的にセントロメアに局在するため、その内部では安定なタンパク質結合ネットワークが形成されていると考えられていた。しかし最近我々の研究室では、CCAN 構成因子の CENP-C が、細胞周期の間期と M 期において CCAN 内の結合因子を変化させていることを明らかにした。さらに、間期では CENP-C の中央領域、M 期ではその C 末端領域を介して異なる因子と結合することも示している。これらは、細胞周期の進行に応じて CENP-C が CCAN 内でその配置を変えることで、CCAN のネットワークを動的に変換させていることを意味している。しかしながら、(1) 細胞周期依存的な CENP-C の CCAN 内での動的配置変換の制御機構や、(2) その切り替えのキネトコア形成・機能への意義については、まだ明らかになっていなかった。

間期、M 期それぞれで CCAN での結合に重要な CENP-C の中央領域、C 末端領域のそれぞれの配列は種間で保存されている。興味深いことにそれらの領域に、M 期キナーゼのコンセンサス配列が見られる。ヒトやハエの CENP-C が細胞内で高度にリン酸化されている知見を考えると、CENP-C の M 期キナーゼによるリン酸化が、細胞周期における CENP-C の CCAN 内の動的配置変換を制御していると予想される。また、CENP-C が KMN ネットワークと CCAN をつなぐ足場であることから、CENP-C の CCAN 内での動的配置変換が、M 期における CCAN を介した、KMN ネットワークとセントロ

メアとの相互作用に關与する可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

複製された染色体を次世代の細胞へ正確に分配することは、生物の恒常性維持に必須である。そのためには、キネトコアと呼ばれるタンパク質複合体がセントロメア領域に正確に形成されなければならない。これまでにキネトコア構成タンパク質が多数同定されており、そのうち、CCAN は細胞周期を通じてセントロメアに局在するタンパク質複合体である。最近、我々は、CCAN の構成因子である CENP-C が、細胞周期の進行にともなって、CCAN 内でのその結合因子を動的に変化させていることを明らかにした。しかしながら、その制御メカニズムと生理的意義は明らかになっていなかった。本研究においてこれらの解明を行うことにより、CCAN の動的ネットワークを明らかにし、キネトコアの分子構造基盤の理解に貢献することを目的とした。

### 3. 研究の方法

細胞周期に依存した CENP-C の CCAN 内における結合変化を調べるために、ニワトリ DT40 細胞を用いて、遺伝学、細胞生物学、生化学的手法を組み合わせた解析を行った。CENP-C C 末端領域の M 期におけるセントロメア因子との結合には、M 期キナーゼによるリン酸化の關与が考えられたため、リン酸化サイトを同定し、そのサイトに変異を導入することにより、そのリン酸化および、M 期における CENP-C C 末領域とセントロメア因子との結合の意義の解明を目指した。

### 4. 研究成果

(1) 細胞周期進行にともなう CENP-C の CCAN 内における動的配置変換の制御機構の解析

はじめに、ニワトリ CENP-C の C 末領域 (CENP-C C-term) が M 期でリン酸化を受けていることを確かめた。まず、GFP 融合 CENP-C C-term を DT40 細胞に発現させ、その細胞を M 期に同調させた。その細胞もしくは非同調の細胞から抽出したタンパク質を Phos-tag PAGE で分離後、CENP-C 抗体によりイムノプロットを行った。すると、CENP-C C-term が M 期において高度にリン酸化されることが明らかとなった。また、CENP-C を免疫沈降/質量分析を行い、M 期における CENP-C のリン酸化サイトを複数同定した。CENP-C C-term にも、いくつかのリン酸化サイトが確認できた。これら同定されたリン酸化サイトには、脊椎動物の CENP-C で保存されている Cdk1 のリン酸化コンセンサス配列が含まれていた。そこで、CENP-C C-term が Cdk1 により直接リン酸化されるか調べるために、リコンビナント CENP-C C-term を精製し、それを *in vitro* で Cyclin B-Cdk1 と反応させた。すると、CENP-C C-term は Cyclin B-Cdk1 により直接リン酸化された。一方、CENP-C C-term の Cdk1 コンセンサス

配列内のリン酸化サイトを Ala に置換すると、そのリン酸化が減少したことから、CENP-C C-term が Cdk1 により直接リン酸化されることが示された。次に、同定されたリン酸化サイトが、CENP-C C-term で見られる M 期特異的なセントロメア結合の制御に関与するか調べた。そのために、同定されたリン酸化サイトを Ala に置換した GFP-CENP-C C-term 変異体 (Ala 変異体) を作製し、細胞に発現させた。すると、CENP-C C-term Ala 変異体は、野生型 (WT) CENP-C C-term で見られる M 期特異的なセントロメア結合を示さなかった。このことは、M 期によるリン酸化が、CENP-C C-term の M 期特異的なセントロメア結合に必要であることを示している。これまでに、CENP-C C-term は CENP-A ナクレオソームと直接結合することが明らかになっていることを考えると、CENP-C C-term の M 期特異的なリン酸化は、CENP-A ナクレオソームとの結合を介した CENP-C のセントロメア結合に寄与する可能性が考えられる。

## (2) キネトコア機能における CCAN 動的配置変換の役割及び意義の解明

Cdk1 によるリン酸化によって引き起こされる CENP-C C-term とセントロメア因子との結合が、キネトコア機能にどのように関与するか調べることにした。そのために、(1) で同定された Cdk1 リン酸化サイトを全長 CENP-C において Ala に置換した CENP-C Ala 変異体を作製し、その変異体と内在性 CENP-C とを置換した細胞を作製した。すると、M 期における CENP-C Ala 変異体のキネトコア局在量は、CENP-C WT のそれと比べて 40% 減少した。このことは、Cdk1 による CENP-C C-term のリン酸化は、M 期における CENP-C の正しいキネトコア局在に必要であることが示唆された。ところが、CENP-C Ala 変異体のキネトコア局在は減少するにも関わらず、この CENP-C Ala 変異体置換細胞では、細胞増殖速度や染色体分配到に明らかな影響が見られなかった。しかしながら、この期待に反する結果は次のような理由によると考えられた。CENP-C の M 期での重要な役割の一つは、KMN ネットワークを CCAN 上へリクルートし、セントロメアと微小管との橋渡しをすることである。我々はもう一つの CCAN 因子である CENP-T も KMN ネットワークをリクルートできることを明らかにしていた。そのため、もし CENP-C とセントロメアとの結合が Ala 変異により阻害されていたとしても、CENP-T による KMN ネットワークのリクルートがセントロメアと微小管の橋渡しに十分であるために、細胞増殖や染色体分配への CENP-C Ala 変異による影響が見られないのではないかと考えた。この可能性を回避するために、CCAN 上への KMN ネットワークのリクルートが、CENP-C のみに依存している変異体細胞株 (CENP-C 依存細胞) を樹立した。その細胞において、CENP-C の C-term にある Cdk1 サイトを Ala へ置換し、

細胞の増殖を調べると、Ala 置換により、CENP-C 依存細胞の生存が著しく減少した。この結果は、M 期において、CENP-C がセントロメアと KMN ネットワークとを橋渡しして機能的なキネトコアを形成するために、CENP-C の Cdk1 によるリン酸化が必要であることを示唆している。

これらの結果は、M 期に CENP-C C-term が Cdk1 によりリン酸化されると、CENP-C が、おそらく CENP-A ナクレオソームとの結合を介してセントロメアと結合すること、およびこの M 期における CCAN 内の CENP-C のセントロメア結合様式変化が、CENP-C に依存した染色体分配に必須であることを示唆している。このことは、CCAN 内でその因子が結合ネットワークを細胞周期依存的に動的に変化しており、それがキネトコアの機能に重要であるという新たな概念を提示していると言える。本研究で得られた知見は、CCAN の動的結合ネットワーク制御の分子基盤の理解に向けて重要な足がかりになると期待できる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Hara M, Lourido S, Petrova B, Lou HJ, Stetina Von JR, Kashevsky H, Turk BE, Orr-Weaver TL. 2018. Identification of PNG kinase substrates uncovers interactions with the translational repressor TRAL in the oocyte-to-embryo transition. *Elife* 7: 360.

DOI: 10.7554/eLife.33150

査読有

Hara M, Fukagawa T. 2018. Kinetochores assembly and disassembly during mitotic entry and exit. *Current Opinion in Cell Biology* 52: 73-81.

DOI: 10.1016/j.ceb.2018.02.005

査読有

Hara M, Fukagawa T. 2017. Critical Foundation of the Kinetochores: The Constitutive Centromere-Associated Network (CCAN). *Prog Mol Subcell Biol* 56: 29-57.

DOI: 10.1007/978-3-319-58592-5\_2

査読有

Hara M, Petrova B, Orr-Weaver TL. 2017. Control of PNG kinase, a key regulator of mRNA translation, is coupled to meiosis completion at egg activation. *Elife* 6: 1285.

DOI: 10.1007/978-3-319-58592-5\_2

査読有

Hori T, Shang W-H, Hara M, Ariyoshi M, Arimura Y, Fujita R, Kurumizaka H, Fukagawa T. 2017. Association of M18BP1/KNL2 with CENP-A Nucleosome Is Essential for Centromere Formation in

Non-mammalian Vertebrates. Dev Cell  
42: 181-189.e3.  
DOI: 10.1016/j.devcel.2017.06.019  
査読有

〔学会発表〕(計 5件)

Eri Kakizono, Analysis of domains of CENP-C in kinetochore formation, 第40回日本分子生物学会年会 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

Masatoshi Hara, Dynamically switching protein interaction networks during M-phase progression in vertebrate kinetochores, ASCB|EMBO 2017 Meeting, 2017, Pennsylvania Convention Center, (Philadelphia, PA USA)

渡邊 励人, 細胞周期に依存したセントロメアタンパク質の配置変化の分子機構とその役割, 日本遺伝学会第89回大会, 2017, 岡山大学 (岡山県岡山市)

原 昌稔, キネトコアタンパク質の結合ネットワークの再考, 第69回日本細胞生物学会大会, 2017, 仙台国際センター (宮城県仙台市)

原 昌稔, キネトコアタンパク質ネットワークの制御, 第39回日本分子生物学会年会, 2016, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学・生命機能研究科 深川研究室

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/fukagawa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 昌稔 (HARA, Masatoshi)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号: 30565099

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし