

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18494

研究課題名(和文) 分裂期染色体分配を制御する新規キネトコアタンパク質の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of novel centromere/kinetochore proteins in mitosis

研究代表者

太田 信哉 (Ohta, Shinya)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・講師

研究者番号：00631194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：分裂期染色体のプロテオミクス解析より、機能未知タンパク質MKT4が分裂期においてセントロメアに局在することを見出した。機能解析からMKT4が微小管依存的にスピンドルチェックポイントに関与することが示唆された。加えて、MKT4は分裂前期に最も強くセントロメア局在を示し、後期にはセントロメアから離脱していることが示唆された。また、本研究過程で、機能未知タンパク質ZNF518Bが、細胞周期を通してセントロメアに局在することを見出した。ZNF518Bは、相同タンパク質ZNF518Aとともに、ペリセントロメアに局在するCENP-BとHP1に相互作用を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our proteomics analysis of mitotic chromosomes revealed that uncharacterized protein MKT4 localizes to centromere in mitosis. Functional analysis suggested the involvement of MKT4 in the mitotic spindle checkpoint depending on microtubules. Moreover MKT4 shows most strong kinetochore localization in prophase and disassociation by anaphase onset. In this study, we found another novel centromere protein ZNF518B which associates centromere through the cell cycle. ZNF518B and its homolog ZNF518A interact Heterochromatin protein 1 (HP1) and Centromere protein B (CENP-B), which associate pericentromere region in chromosomes.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体 分裂期 セントロメア 染色体分配 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

染色体を正確に複製、分配し、次世代細胞へと自身のゲノム情報を受け渡すことは、生物にとって最も重要な性質の一つである。その正確性は染色体上のタンパク質によって制御されており、それらの異常は染色体疾患やがん化につながる。これまで、その制御機構を理解するために、既知のタンパク質の機能解析が精力的に行われてきた。しかし、染色体凝縮や分配には、その全貌が未だ明らかでなく、どのようなタンパク質が関わっているのか分からない機構も存在する。そうした未知の部分に迫るためには、解明されていない新規の制御タンパク質の発見とその機能解析が必須である。そこで、分裂期染色体のタンパク質組成の決定を試み、4,027種類の染色体タンパク質を同定し、そのうち約10%が機能未知タンパク質であることを見出した。それらのいくつかを GFP との融合タンパク質の形で発現させ、セントロメア・キネトコアに局在するタンパク質 MKT4 (Mitotic Kinetochore Protein 4) 等を見出した。キネトコア (動原体) とは、分裂期にセントロメア上に形成され、スピンドル微小管と染色体とを繋ぎ、染色体整列や分配を司るタンパク質複合体である。本研究は、MKT4 等の機能を解明し、分裂期の染色体分配に関する理解を深めることを目的とするものである。

2. 研究の目的

MKT4 が分裂期のセントロメアにおいて担う機能を明らかにすることを目的として研究を進めた。さらに、本研究を進める過程で、セントロメアに局在する ZNF518B (Zinc Finger Protein 518B) と染色体軸索に局在する BAZ1B (Bromodomain Adjacent to Zinc Finger Domain 1B) を見出したので、これらのタンパク質も含めて、分裂期染色体分配を制御する新規セントロメア・キネトコア局在タンパク質の機能解明を試みた。このような、新規セントロメア・キネトコアタンパク質の存在を指摘するにとどまらず、その機能に迫る本研究のインパクトは極めて大きい。研究期間後も、セントロメアおよび染色体分配の全体像を理解する研究の発展にも期待できる。

3. 研究の方法

① キネトコアに局在する機能未知タンパク質 MKT4 を欠失させたノックアウト細胞をヒト HeLa 細胞より作成し、その表現型を観察した。一方で、MKT4 を安定的に過剰に発現する安定発現細胞も HeLa 細胞より作成し、その表現型を観察した。本研究では、ノコダゾールあるいはタキソールを添加した条件下での表現系も観察し、スピンドルチェックポイントへの MKT4 の関与も検討した。

② MKT4 とヒスチジンタグ融合タンパク質を大腸菌中で発現し、精製した。それをウサギに注入することで、抗 MKT4 抗体を作成し、それを用いた蛍光免疫染色により内在性 MKT4

の局在とその挙動を観察した。

③ HeLa 細胞より作成した GFP-MKT4 安定発現株をタキソールで分裂期に同調し、抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降により MKT4 と相互作用のあるタンパク質を同時に精製した。質量分析を用いることでそれらのタンパク質を同定した。

④ 機能未知タンパク質 ZNF518B と GFP との融合タンパク質の局在を蛍光免疫染色により観察した。また、同様の実験を種々のノックアウト細胞を作成し行うことで、ZNF518B の局在性を決定する因子を探索した。

⑤ ヒト細胞を用いて、ZNF518B と標的タンパク質との相互作用を検証できる細胞内 Two Hybrid 実験系を構築し、ZNF518B と CENP-B あるいは HP1 との相互作用を検証した。加えて、種々の ZNF518B 部分欠失変異体を作成し、同様の実験を実施することで、ZNF518B のタンパク質相互作用ドメインの決定を試みた。

⑥ ZNF518B の相同タンパク質 ZNF518A について、上記④、⑤と同様の実験を遂行し、ZNF518A と、ZNF518B の違いを明らかにし、作用機序における役割の違いを理解することを試みた。

⑦ BAZ1B ノックアウト細胞を作成し、分裂期前期における染色体凝縮の違いを野生型と比較した。その際に、CDK1 阻害剤 R0-3306 を添加すれば、G2 期で同調でき、阻害剤の除去により細胞は一斉に分裂期前期に進入させることが可能である。この技術を用いてノックアウト細胞における染色体凝縮の詳細を観察した。

4. 研究成果

① MKT4 ノックアウト細胞の観察から、MKT4 の欠失による分裂期での致命的な染色体分配の異常はこれまでに見出されていない。しかし、MKT4 の安定発現細胞にノコダゾールの添加による分裂期における同調を試みたところ、本細胞は分裂期での同調はせず、細胞死が誘導された。この結果は、MKT4 の過剰発現がスピンドルチェックポイントの異常を引き起こしていることを示唆する。一方で、MKT4 の安定発現細胞へのタキソールの添加では細胞死は誘導されず、分裂期における同調が確認された。すなわち、MKT4 によるスピンドルチェックポイントの異常は微小管依存的であることが示唆された。

② 大腸菌で発現後精製した MKT4 を用いてウサギより抗 MKT4 抗体を作成することに成功した。この MKT4 抗体を用いた蛍光免疫染色により、ヒト細胞において内在性の MKT4 は分裂期特異的なキネトコア局在性を示すことが分かった。加えて、興味深いことに MKT4 は分裂期の前期に最も強くキネトコア局在を示した (図 1)。分裂期前期では、核膜消失前であるため、MKT4 は間期においても核内に存在するはずである。実際に MKT4 抗体を用いた蛍光免

疫染色により、その事実は確認できた。しかし、間期にはセントロメア・キネトコアへの局在は示さない。このような挙動を示すキネトコア局在タンパク質はこれまでに例がない。すなわち、MKT4が分裂期進入後、最初にキネトコアに集合するタンパク質の一つであり、新規のキネトコア制御機構を担う可能性を示すものである。一方で、前述のMKT4ノックアウト細胞を用い同様にMKT4抗体による蛍光免疫染色を行ったところ、シグナルが観察されたことから、ヒトゲノムには、MKT4の相同タンパク質をコードする遺伝子が存在することも示唆された。

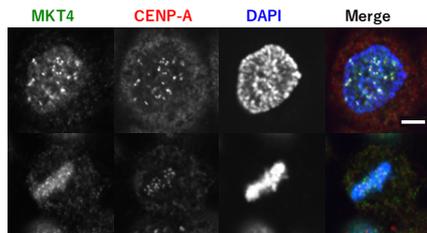


図1 分裂期前期(上)と中期(下)におけるMKT4の局在を示す。

③ タキソールで分裂期に同調したGFP-MKT4安定発現細胞よりGFP-MKT4とその相互作用タンパク質を免疫沈降により精製した。質量分析の結果からGFP-MKT4がチューブリンと非常に強く相互作用することが示唆された。この結果は、MKT4がキネトコアと微小管との接着に関与していることを示唆する。一方で、キネトコア構成タンパク質との相互作用が観察されなかったことから、今後キネトコアタンパク質の同定を可能とするように、免疫沈降における条件を検討する必要がある。それにより、MKT4がキネトコアにおいてどのような役割を担っているのかを理解できる。

④ 機能未知タンパク質ZNF518BとGFPとの融合タンパク質(GFP-ZNF518B)をヒト培養細胞内で発現させると、セントロメアへの局在を示した。さらに、他のセントロメアに局在するタンパク質に対する抗体を用いた蛍光免疫染色を同時に行うことで、CENP-BあるいはHP1と局在が完全に一致することが分かった(図2)。CENP-AあるいはCENP-Cとは、その局在が完全に一致しなかったことから、ZNF518Bはセントロメア周縁部のヘテロクロマチン領域であるペリセントロメアに局在すると結論づけた。また、上記CENP-Bのノックアウトにおいて、GFP-ZNF518Bの局在を観察することで、ZNF518BはCENP-B依存的にペリセントロメアに局在することも見出した。また、HP1はHP1 α 、HP1 β 、HP1 γ と3種類存在するが、そのうち2種類まではいかなる組み合わせでもノックアウト細胞を作成できた。3種類をノックアウトした細胞はこれまで作成に成功しておらず、我々は、それは致死であると結論している。そこで、作成した種々のHP1ノックアウト細胞において、GFP-ZNF518Bの局在

を観察した。その結果、GFP-ZNF518Bのペリセントロメアの局在はHP1に非依存的であることが分かった。

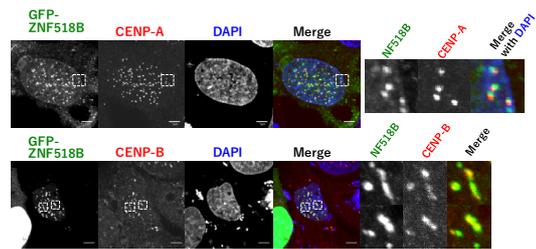


図2 GFP-ZNF518Bの局在とCENP-A(上)とCENP-B(下)の局在の比較。左にセントロメアの拡大写真を示す。

⑤ 細胞内Two Hybrid実験系により、ZNF518BはHP1 β とCENP-Bに相互作用があること示された。さらに、ZNF518Bの部分欠失タンパク質を解析することで、ZNF518BはC末端にあるPxVxLドメインと中間領域にあるドメインによりHP1 β に特異的に結合していることがわかった。このPxVxLドメインのみの部分タンパク質は非常に強く3種類全てのHP1(HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ)に結合する。一方で、中間領域にあるHP1結合ドメインはHP1 β への特異性が強いことが分かった。これらの結果は、ZNF518Bは2つのドメインでHP1 β への特異的相互作用を制御していることを示唆している。また、CENP-Bと相互作用を示すドメインもC末端にあるが、PxVxLドメインのみではCENP-Bと相互作用を示さないことから、ZNF518BとCENP-Bとの相互作用にはHP1が関与していないことが示唆された。

⑥ ヒトにはZNF518Bの相同タンパク質ZNF518Aが存在することを見出した。さらに、ZNF518AもZNF518Bと同様にCENP-B依存的にペリセントロメアに局在することが分かった。しかし、ZNF518Bと異なりHP1 β との特異的な相互作用はなく、CENP-Bとは弱い相互作用することが示唆された。

⑦ 分裂期での機能が未知なタンパク質BAZ1BとGFPとの融合タンパク質(GFP-BAZ1B)をヒト培養細胞内で発現させると、染色体軸索への局在を示した。さらに、BAZ1Bを欠失させたノックアウト細胞をヒトHeLa細胞より作成し、分裂期における表現型を観察した。具体的には、野生型とノックアウト細胞それぞれに、CDK1阻害剤RO-3306を添加し、20時間培養することで、細胞をG2期にて同調させ、阻害剤の除去30分後、ヒストンH3pS10抗体で蛍光疫染色し、その表現型を観察した。結果、ノックアウト細胞では、分裂期のマーカーになっているヒストンH3の10番目のセリンがリン酸化されているにもかかわらず、染色体の凝縮がみられない細胞(Early Prophase)が、野生型に比べ有意に増加していることが分かった。一方で、分裂期前期において、染色体の凝縮が完了している細胞(Late Prophase)が、減少していることがわ

かった (図3)。この結果から、分裂期前期において染色体凝縮のタイミングを制御する機構の一端を担っていることが示唆された。

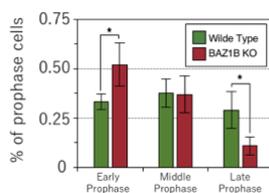


図3 同調した野生型と BAZ1B ノックアウト細胞の分裂期前期の分類を示す。

本研究結果から、染色体分配において重要な役割を担う場であるセントロメア・キネトコアに、新規タンパク質 MKT4 が存在し、スピンドルチェックポイントの一端を担っている可能性が示唆された。今後、MKT4 が担っていることが示唆された新規機構を明らかにすることで、正確な分裂期の制御に関する理解を深化させる。加えて、本研究過程で見出した、ZNF518 や BAZ1B が MKT4 とともにどのように染色体構造制御に関わっているのか、明らかにしていかななくてはならない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- Jan G. Ruppert, Kumiko Samejima, Melpomeni Platani, Oscar Molina, Hiroshi Kimura, A. Arockia Jeyaprakash, **Shinya Ohta**, and William C. Earnshaw
HP1 α targets the CPC for activation at heterochromatin before mitotic entry.
The EMBO Journal, 37(6): e97677, 2018.
doi:10.15252/embj.201797677 査読有
- Shinya Ohta**
Proteomics analysis understanding the regulation system of mitotic chromosome structure
Proteome Letters, 2(2): 59-67, 2017.
doi:10.14889/jpros.2.2_59 査読有
- Luis Fernando Montañó, **Shinya Ohta**, Georg Kustatscher, William C. Earnshaw, and Juri Rappsilber
Nano Random Forests to mine protein complexes and their relationships in quantitative proteomics data
Molecular Biology of the Cell, 28(5): 673-680, 2017.
doi:10.1091/mbc.E16-06-0370. 査読有
- *Shinya Ohta**, Michiko Kimura, Shunsuke Takagi, Iyo Toramoro, Yasushi Ishihama
Identification of mitosis-specific phosphorylation in mitotic chromosome-associated proteins
Journal of Proteome Research, 15(9): 3331-3341, 2016.
doi:10.1021/acs.jproteome.6b00512. 査読有
(*責任著者)

- *Shinya Ohta**, Luis Fernando Montañó, Flavia de Lima Alves, Hiromi Ogawa, Iyo Toramoto, Nobuko Sato, Ciaran G. Morrison, Shunichi Takeda, Damien F. Hudson, Juri Rappsilber and William C. Earnshaw.

Proteomics Analysis with a Nano Random Forest Approach Reveals Novel Functional Interactions Regulated by SMC Complexes on Mitotic Chromosomes.

Molecular Cellular Proteomics, 15(8): 2802-2818, 2016.

doi: 10.1074/mcp.M116.057885. 査読有 (*責任著者)

[学会発表] (計 5 件)

- 太田 信哉**
Quantitative proteomics revealed that BAZ1 proteins regulate the precious timing of chromosome condensation in early mitosis
第15回日本プロテオーム学会2017年会、シンポジウム「Basic biology (Mammal)」
大阪、2017年7月
 - 太田 信哉**
分裂期染色体のプロテオーム解析
第15回日本プロテオーム学会2017年会、奨励賞受賞講演
大阪、2017年7月
 - Shinya Ohta**
Quantitative proteomics revealed that BAZ1 proteins regulate the precious timing of chromosome condensation in early mitosis
SMC protein Workshop 2017
Yamagata, Japan, 2017
 - 太田 信哉**
定量プロテオミクスを用いた新規分裂期染色体軸索タンパク質の同定
日本遺伝学会 第88回大会
日本大学三島キャンパス(静岡県・三島市), 2016年9月7日
 - 太田 信哉**
定量プロテオミクスを用いた新規分裂期染色体軸索タンパク質の発見
第57回日本生化学会中国・四国支部例会
高知大学岡豊キャンパス(高知県・南国市), 2016年5月28日
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- 研究組織
(1) 研究代表者
太田 信哉 (Shinya, Ohta)

高知大学・教育研究部医療学系 基礎医学部
門・講師
研究者番号：00631194