

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：52101

研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）

研究期間：2018～2023

課題番号：16K21749

研究課題名（和文）染色体自身が制御する分裂期の分子機構と、その機能破綻による疾患誘導機序の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms by which chromosomes regulate mitotic cell division and its relevance to causing human diseases

研究代表者

横山 英樹（Yokoyama, Hideki）

茨城工業高等専門学校・国際創造工学科・准教授

研究者番号：60397908

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 43,300,000円

研究成果の概要（和文）：独自に同定した細胞分裂に関わりうる蛋白質群を機能解明した。ロスムンド・トムソン症候群の原因タンパク質RECQL4が微小管に結合でき紡錘体中央への染色体整列に必要なことを発見。RECQL4を発現しない患者細胞の染色体整列異常も検出、それが疾患の原因となりうると提案。クロマチンリモデリング複合体中のVPS72が分裂後の細胞核形成に必須なことを発見。具体的に、分裂後VPS72が染色体に結合しヒストンバリエーションH2AZを染色体に取り込むことが小さく機能的な核を再形成するのに必須であることを解明。分裂に必要なと知られるSART1が、紡錘体極に局在し中心小体周辺物質を集積して紡錘体形成に寄与することを発見。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロスムンド・トムソン症候群の原因タンパク質RECQL4の新たな機能と、疾患の誘導メカニズムを提案することができた。また細胞分裂などの過程に比べて十分に研究されていない核の再形成に、VPS72依存的なH2AZの取り込みが重要であることを解明できた。さらにSART1のこれまでに例のない局在の仕方（SART1キャップ）と紡錘体極の成熟での機能を発見。これらの時期・場所特異的な機能はin vitroやヒト培養細胞に加えて、カエル卵抽出液を使った再構成系を用いたからこそ得られた成果である。今後これらの知見や研究ツールを用いて、研究分野また当研究室でのさらなる研究の展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：RECQL4 is mutated in Rothmund Thomson syndrome, characterized by cancer susceptibility. We find RECQL4 is a microtubule-associated protein (MAP) required for chromosome alignment to the metaphase plate. We detect that the patient cells, lacking RECQL4 protein, show chromosome misalignment, proposing that the chromosome misalignment may be the cause of the disease. We also find VPS72, one of the chromatin-remodeling complex proteins, is essential for postmitotic nuclear re-assembly. Mechanistically, VPS72 binds to postmitotic chromatin and incorporate a histone variant H2AZ on chromatin that enables to assemble compact and functional nuclei. SART1 is previously shown to be important for pre-mRNA splicing and mitotic progression, but the mitotic role of SART1 have not been characterized in detail. We identify SART1 is also a MAP localizing uniquely to spindle poles. We show SART1 mechanistically recruits pericentriolar material proteins and contributes to spindle pole assembly.

研究分野：細胞生物学、生化学

キーワード：細胞骨格・運動 分裂期 紡錘体 染色体分配 疾患誘導機序

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 染色体が自らの娘細胞への正確な分配や細胞分裂を制御するという観点から研究代表者は、新しいアフィニティ精製法を開発し、有糸分裂期にかかわりうる 168 の蛋白質を同定した。その内の 3 分子の解析で、それが分裂期の未知の分子機構を解明する極めて優れた情報源であることを証明していた。残りの分子群を解析すれば、分裂期の未知の分子機構を網羅的かつ独創的に明らかにできると考えられた。

(2) 同定分子中約 10 個は疾患に関わるものであるが、その通常の機能や病気に至る機構が明らかでなかった。それらの分子機能を解明すれば、疾患の誘導機序を明らかにできる可能性があった。

2. 研究の目的

そこで本研究では独創的に同定した未公開の残りの分子群を解析して、紡錘体形成機構をはじめとして分裂期の分子機構を網羅的に理解しようとした。疾患原因蛋白質については分裂期における通常の機能と共に、その機能異常が疾患を誘導する機序の解明をめざした。

3. 研究の方法

(1) 選抜した同定蛋白質の組換え蛋白質を作って *in vitro* で微小管結合アッセイを行い、微小管に直接結合する MAP を実験的に同定する。組換え蛋白質に対する抗体を作り、免疫染色でその蛋白質が微小管から成る紡錘体などに局在するか調べる。

(2) 抗体を用いてカエル卵抽出液から目的蛋白質を除き、細胞周期の再構成反応を行う。間期と M 期を分けて解析できる強みを活かし、分子の M 期における時期特異的機能を明らかにする。

(3) さらに卵抽出液で可能な種々のアッセイを行い、分子が働く場所を特定する。培養細胞を使った RNAi 実験で、分子機能がヒトでも保存されることを検証し、新しい M 期の分子機構の発見を完了する。

(4) 疾患原因蛋白質については患者由来の細胞も使い、同定した分裂期機能の異常が疾患を誘導する原因であるかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) ロスマンド・トムソン症候群の原因タンパク質 RECQL4 が *in vitro* で微小管に結合する能力をもち、ヒト培養細胞やカエル卵抽出液において RECQL4 が紡錘体微小管に局在することを発見。同培養細胞や卵抽出液系より RECQL4 を除くと、紡錘体形成には異常がないものの、染色体が紡錘体中央に整列しなくなった。さらに紡錘体を微小管脱重合剤の nocodazole で処理したところ RECQL4 を除いた紡錘体微小管が優先的に消失した。以上の結果は、RECQL4 が微小管に結合し染色体整列のために働くという全く新しい機能を解明した。

さらに、RECQL4 を発現しないロスマンド・トムソン症候群の患者細胞も染色体整列異常を示すことを明らかにした。この染色体整列異常が、同疾患の細胞で見られる aneuploid (染色体数異常) の原因になっている可能性があると考えられた。

(2) 細胞分裂の進行、特に分裂後の細胞核の再形成に関与するタンパク質を同定するため、同定タンパク質ではないが、染色体を制御するクロマチンリモデリング複合体の構成タンパク質群をヒト培養細胞より RNAi 法で除いた。ノックダウンにより顕著な核形成の遅れが見られた VPS72 について、抗体を作成し、カエル卵抽出液から VPS72 を除いて再構成反応を行なった。通常のコmpactで機能的な核が形成されず、大きく DNA も複製できない構造体となった。VPS72 はヒストンバリエントの H2AZ と結合することが知られているが、VPS72 を卵抽出液から除くと H2AZ が核に取り込まれなくなることを明らかにできた。

さらに H2AZ を直接卵抽出液から除くと、VPS72 を除いた時と同様に大きく機能しない異常な核が形成された。以上より、VPS72 が染色体に結合し H2AZ を染色体に取り込むことが分裂後の核形成に必須であることを解明した

(3) pre-mRNA スプライシングへの関与が示された SART1 は一方で、ヒト細胞からノックダウンすると細胞分裂の進行阻害を示していた。SART1 が分裂期進行において直接の働くのか、pre-mRNA スプライシングを介して間接的に働くのかは不明だった。我々は、SART1 が *in vitro* で直接微小管に結合する能力を有し、ヒト培養細胞においては紡錘体の極に局在することを明らかにした (図 1)。特に分裂中期 (Metaphase) には紡錘体極の最末端に中心体を覆うように結合するため、これまでに確認されていないこの構造を SART1 キャップと名付けた。さらに SART1 の N 末端が微小管結合ドメインであることを *in vitro* で見つけ、実際にヒト細胞でのレスキュー実験で N 末端が紡錘体形成に必須であることを証明した。一方でカエル卵抽出液から抗体を用いて SART1 を除去したところ紡錘体の極がまとまらない異常を検出。この異常は DNA ビーズが誘導する中心体なしの紡錘体形成においても見られたため、SART1 は中心体自身の形成ではなく、中心小体周辺物質 (Pericentriolar Material) の集積に必要なことを明らかにした。以上の結果より、SART1 が微小管結合タンパク質として紡錘体形成に直接機能することを発見。SART1 は紡錘体極に SART1 キャップとして特異的に局在し、中心小体周辺物質の集積により紡錘体形成に寄与することがわかった。

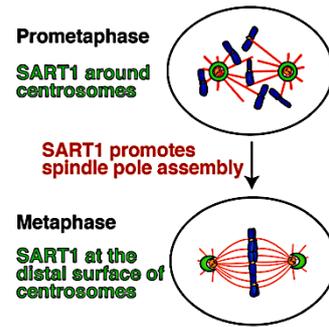


図1 A unique localization of SART1 to the SART1 cap in metaphase

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yokoyama Hideki, Moreno-Andr?s Daniel, Takizawa Kaoru, Chu Zhenzhen, Scheufen Anja, Funabashi Tsumugi, Ma Jian, Antonin Wolfram, Gruss Oliver J., Haramoto Yoshikazu	4. 巻 -
2. 論文標題 SART1 localizes to spindle poles forming a SART1 cap and promotes spindle pole assembly	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.10.27.564116	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Moreno-Andr?s Daniel, Yokoyama Hideki, Scheufen Anja, Holzer Guillaume, Lue Hongqi, Schellhaus Anna Katharina, Weberruss Marion, Takagi Masatoshi, Antonin Wolfram	4. 巻 9
2. 論文標題 VPS72/YL1-Mediated H2A.Z Deposition Is Required for Nuclear Reassembly after Mitosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9071702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yokoyama Hideki, Takizawa Kaoru, Ma Jian, Moreno-Andr?s Daniel, Antonin Wolfram, Haramoto Yoshikazu	4. 巻 -
2. 論文標題 SART1 localizes to spindle poles forming a SART1 cap and promotes centrosome and spindle assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Research Square	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21203/rs.3.rs-126500/v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yokoyama Hideki, Moreno-Andres Daniel, Astrinidis Susanne A, Hao Yuqing, Weberruss Marion, Schellhaus Anna K, Lue Hongqi, Haramoto Yoshikazu, Gruss Oliver J, Antonin Wolfram	4. 巻 2
2. 論文標題 Chromosome alignment maintenance requires the MAP RECQL4, mutated in the Rothmund?Thomson syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201800120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201800120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小川 健, 西野 日菜, 横山 英樹
2. 発表標題 NOC4Lは紡錘体の二極性形成と分裂の進行に関わる
3. 学会等名 日本化学会関東支部茨城地区研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 寛大, 西野 日菜, 横山 英樹
2. 発表標題 PABPN1は紡錘体の二極化を保証する
3. 学会等名 日本化学会関東支部茨城地区研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 抗体様タンパク質による細胞内タンパク質分解法の開発
2. 発表標題 武藤 将正, 横山 英樹
3. 学会等名 日本化学会関東支部茨城地区研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梶間 睦生, 船橋 紬, 横山 英樹
2. 発表標題 SART1 の N 末端微小管結合ドメインが紡錘体形成に必要
3. 学会等名 日本化学会関東支部茨城地区研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山英樹、船橋紬
2. 発表標題 SART1は紡錘体極の最末端に局在、中心体マトリックスタンパク質を集積させ極を形成する
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 遠藤愛実、武藤将正、横山英樹
2. 発表標題 無細胞タンパク質分解系を用いた遺伝子として扱える人工抗体様タンパク質の開発
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横山英樹
2. 発表標題 カエル卵抽出液を使って細胞核の形成機構に迫る：Histone H2A.Zの役割
3. 学会等名 日本ツメガエル研究会首都圏支部研究集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山英樹
2. 発表標題 VPS72によるH2A.Zのクロマチンへのローディングは分裂後の核形成と機能に必須である
3. 学会等名 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山英樹
2. 発表標題 カエル卵抽出液を使った細胞周期研究：早老症原因遺伝子RECQL4の機能
3. 学会等名 日本ツメガエル研究会首都圏支部研究集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Yokoyama
2. 発表標題 Mitotic chromosome congression requires RECQL4, mutated in Rothmund-Thomson syndrome
3. 学会等名 International Xenopus Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	瀧澤 薫 (Takiizawa Kaoru)		
研究協力者	馬 堅 (Ma Jian)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	アーヘン大学	ボン大学	マックスプランク研究所	