

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 年度～2009 年度

課題番号：17013084

研究課題名（和文）染色体安定性を保障する分子機構の解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism for faithful chromosome segregation

研究代表者

深川 竜郎 (FUKAGAWA TATSUO)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授

研究者番号：60321600

研究成果の概要（和文）：発がん要因のひとつに動原体不全があるが、これまで、どのような分子が動原体機能や構成に関わっているか不明であった。本特定領域研究では、20 種類程度の動原体構成因子を新しく同定してその分子集合過程を明らかにできた。がん細胞において、同定した動原体構成因子の発現異常も確認できており、がん治療における有力な標的分子候補が同定できたことを意味している。

研究成果の概要（英文）：Faithful chromosome segregation during mitosis is essential for the accurate transmission of genetic material. To facilitate this, each replicated sister chromatid assembles a kinetochore on centromeric DNA which forms a dynamic interface with microtubules from the mitotic spindle. Dysfunction of the kinetochore leads cancer. However, molecular mechanism by which the kinetochore is formed, is still unclear. In this study, we have identified more than 20 molecules, which localize to the kinetochore and characterized each molecule.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	9,700,000	0	9,700,000
2006 年度	9,700,000	0	9,700,000
2007 年度	9,700,000	0	9,700,000
2008 年度	20,500,000	0	20,500,000
2009 年度	10,700,000	0	10,700,000
総計	60,300,000	0	60,300,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：癌、ゲノム、遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

細胞周期の過程において、染色体が正確に複製、分配されて安定に次世代細胞へと受け継がれていくことは、生物にとって最も基本的な性質である。染色体分配機構の異常が遺伝情報の不正確な伝達を導き、細胞の「がん化」

などを引き起こす。したがって、染色体複製や分配の分子機構を解明することは、染色体の不安定性の要因を明らかにしてがんの重要な特性を理解できる。細胞分裂の過程において、紡錘体が結合する染色体の特殊領域はセントロメアと呼ばれる。セントロメアは単

なる紡錘体の付着領域としての機能だけでなく、細胞周期進行の制御にも関わっている。細胞分裂の際、紡錘体に異常がある細胞や、紡錘体とセントロメアが適正に結合していない細胞では、一時的に細胞周期の進行が停止する。紡錘体チェックポイントと呼ばれる細胞機能であるが、いくつものセントロメア構成タンパク質がチェックポイント機能に関与しているという報告がある。セントロメアの異常を原因とする染色体不安定性に関する知見を得ることは、基礎生物学的見地に裏づけられた新しいがん化機構の解明の研究につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、ヒト人工染色体とニワトリ DT40 細胞を融合したユニークな実験系を用いて、セントロメアの機能解析を行ってきた。本特定領域研究を開始する前までに得られた知見を基礎にして、本特定領域研究においても染色体分配機構の理解に向けたセントロメアの分子構築の解明と細胞周期進行制御に関わるセントロメア機能を解析することを目的とした。特に、年々蓄積するゲノム情報を利用したプロテオミクス解析を駆使してセントロメア構築に中心的役割を担うタンパク質群の同定を行い、それらの系統的な機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 研究代表者らは、本研究を開始する前までに CENP-A をはじめとしてセントロメア構築に関わる CENP-C, -H, -I のノックアウト株を世界に先駆けて樹立してきた(EMBO J., 1999; 2001; Dev. Cell, 2001; 2002; J. Cell Sci., 2003)。その研究過程で、各種セントロメアタンパク質の発現を tag 付き融合タンパク質の発現に完全に置き換えた DT40 細胞を樹立している。これら細胞株の核抽出液から抗 tag 抗体を用いた免疫沈降法によってセントロメアコア複合体の精製を行ってきた。本研究でも、この実験を精力的に行う。精製物については、Lc-Ms/Ms 法を用いてアミノ酸配列を決定する。タンパク質が同定できた後は、それらタンパク質と GFP 融合タンパク質を細胞内に発現させて、細胞周期に依存したこれらタンパク質の細胞内局在を明らかにする。

(2) 得られた新規タンパク質に関しては、研究代表者が得意とするノックアウトの手法を用いて機能解析を行う。作成した条件的ノックアウト細胞については、制限条件下で、細胞増殖の有無、細胞周期の進行や小型化染色体の安定性、微小管タンパク質や紡錘体チェックポイントタンパク質の異常、特殊顕微鏡装置を用いた生細胞観察、他のセントロメアタンパク質の細胞内局在等を解析する。特

に、あるタンパク質のノックアウト株をそれ以外のタンパク質に対する抗体で免疫染色することによってセントロメアへ集合するタンパク質群の集合過程が明らかにできる。我々は、これまでの複数のノックアウト実験で CENP-C のセントロメアへの集合には CENP-H と CENP-I が必要であることを発表した (EMBO J., 1999; EMBO J., 2001; Dev. Cell, 2002)。これらの研究結果に本計画の研究で得られる結果を合わせることによって、より詳細なセントロメアの形成機構が明らかになると予想される。また、同定したタンパク質の発現異常ががん細胞内で起きている可能性についても解析する。

## 4. 研究成果

染色体が安定に次世代細胞へ伝達される分子機構を明らかにする目的で、染色体分配に重要な働きを担うセントロメアの機能解析を行なった。2005 年度には、生化学的手法と年々蓄積するゲノム情報を利用したプロテオミクスの手法を併用して、7 種類のセントロメア蛋白質の同定に成功した。

2006 年度には、2005 年度の結果を発展させる目的でセントロメア蛋白質の同定を進めた結果、2005 年度の結果も併せて CENP-H を含む 13 種類のタンパク質からなる巨大複合体 (CENP-H/I 複合体) がセントロメアに存在することを明らかにできた。遺伝子ノックアウト法を用いて個々の蛋白質の機能解析を行い染色体安定性に必須であることを明らかにした。

2007 年度には、CENP-H/I 複合体の機能解析を進める目的で、培養細胞での解析に加えて、生化学的再構成実験を開始した。これまで、5 種類の蛋白質での試験管内再構成に成功した。また、がん細胞で本複合体蛋白質が過剰発現しているデータも得た。

2008 年度には、同定したセントロメアタンパク質複合体と染色体安定性と関連を解明する目的で CENP-H/I 複合体のサブクラスである CENP-O 複合体解析をすすめた。CENP-O 複合体が PLK によってリン酸化され、紡錘体障害からの回復に重要な働きを担っていることを明らかにした。また、これらの蛋白質を正常細胞に過剰発現させると、紡錘系の結合以上が起き細胞が多核化することが判明した。

2009 年度には、CENP-H/I 複合体と相互作用する CENP-T/W 複合体の同定に成功した。さらに本複合体の DNA 結合活性を有しがん細胞での過剰発現していることを明らかにした。さらに、新規のセントロメア複合体として CENP-S/X 複合体の同定にも成功した。

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 24 件)

1. Okada, M., Okawa, K., Isobe, T., and Fukagawa, T. (2009). CENP-H-containing complex facilitates centromere deposition of CENP-A in cooperation with FACT and CHD1.

*Mol Biol Cell* 20, 3986-3995. (査読有)

2. Amano, M., Suzuki, A., Hori, T., Backer, C., Okawa, K., Cheeseman, I. M., and Fukagawa, T. (2009). The CENP-S complex is essential for the stable assembly of outer kinetochore structure.

*J Cell Biol* 186, 173-182. (査読有)

3. Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T., and Kanemaki, M. (2009). An auxin-based degron system for the rapid deletion of proteins in non-plant cells.

*Nat Methods* 6, 917-922. (査読有)

4. Hori, T., Amano, M., Suzuki, A., Backer, C., Welburn, J.P., Dong, Y., McEwen, B.F., Shang, W.H., Suzuki, E., Okawa, K., Cheeseman, I.M., and Fukagawa, T. (2008). CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore.

*Cell* 135, 1039-1052. (査読有)

5. Hori, T., Okada, M., Maenaka, K., and Fukagawa, T. (2008). CENP-O-class proteins form a stable complex and are required for proper kinetochore function.

*Mol Biol Cell* 19, 843-854. (査読有)

6. Cheeseman, I.M., Hori, T., Fukagawa, T., and Desai, A. (2008). KNL1 and CENP-H/I/K complex coordinately direct kinetochore assembly in vertebrates.

*Mol Biol Cell* 19, 587-594. (査読有)

7. Kwon, M.S., Hori, T., Okada, M., and Fukagawa, T. (2007). CENP-C is involved in chromosome segregation, mitotic checkpoint function and kinetochore assembly.

*Mol Biol Cell* 18, 2155-2168. (査読有)

8. Okada, M., Cheeseman, I.M., Hori, T., Okawa, K., McLeod, I.X., Yates III, J.R., Desai, A., and Fukagawa, T. (2006). The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres.

*Nat Cell Biol* 8, 446-457. (査読有)

9. Kline, S., Cheeseman, I.M., Hori, T., Fukagawa, T., and Desai, A. (2006). The Human Mis12 Complex is Required for

Kinetochore Assembly and Proper Chromosome Segregation.

*J Cell Biol* 173, 9-17. (査読有)

10. Minoshima, Y., Hori, T., Okada, M., Kimura, H., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Bao, Y.C., Kawashima, T., Kitamura, T., and Fukagawa, T. (2005). The Constitutive Centromere Component CENP-50 is Required for Recovery from Spindle damage.

*Mol Cell Biol* 25, 10315-10328. (査読有)

11. Mikami, Y., Hori, T., Kimura, H., and Fukagawa, T. (2005) Functional region of CENP-H interacts with Nuf2 complex, which functions as a connector between the inner and outer kinetochores.

*Mol Cell Biol* 25, 1958-1970. (査読有)

[学会発表] (計 30 件)

1. Fukagawa, T. Molecular architecture of the vertebrate kinetochore. 第 3 2 回日本分子生物学会シンポジウム講演、2009 年 12 月、横浜

2. 深川竜郎 セントロメアを形成するために必要なヌクレオソーム構造 第 8 2 回日本生化学会シンポジウム講演、2009 年 10 月、神戸

3. 招待講演 Fukagawa, T. Molecular architecture of the vertebrate constitutive centromere associated network. The 17th International Chromosome Conference, Boone, NC, USA. (June 25, 2009)

4. 招待講演 Fukagawa, T. Molecular architecture of the vertebrate constitutive centromere associated network. EMBO workshop on Chromosome segregation: Centromeres & Kinetochores, Archachon, France. (September 28, 2008)

[図書] (計 6 件)

1. 深川竜郎 染色体分配に必要な動原体の分子構築 実験医学 Vol. 27、2732-2739、(2009).

2. 深川竜郎 染色体分配に必要なキネトコア構造の分子構築 遺伝 Vol. 63、71-78、(2009).

3. 堀哲也、深川竜郎 セントロメアでのクロマチン構造の形成に必要なヒストンバリエントと DNA 結合蛋白質 核酸 酵素 Vol. 54、1276-1283、(2009).

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称: セントロメア局在タンパク質

発明者: 天野美保、堀 哲也、深川竜郎

権利者：情報・システム研究機構  
種類：特許  
番号：特願 2008-039526  
出願年月日：2008年2月21日  
国内外の別：国内

〔その他〕

2008年12月にCell誌に論文が発表された際には、静岡新聞、日経産業新聞、科学新聞などで報道された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

深川 竜郎 (FUKAGAWA TATSUO)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授

研究者番号：60321600