

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07502

研究課題名(和文) 酵母とヒトに保存された環状染色体の安定性制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of the mechanism of regulation of circular chromosome stability conserved in yeast and human

研究代表者

上野 勝 (Ueno, Masaru)

広島大学・統合生命科学研究所(先)・准教授

研究者番号：90293597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの染色体は線状であるが、ある種のがんでは高頻度で環状染色体が見つかる。また、先天的に環状染色体を持つ遺伝病患者は、がんのリスクが高い。本研究では、分裂酵母とヒト培養細胞を用いて、環状染色体の安定性制御に関する新規遺伝子や新規薬物を発見し、その因子の機能解析を行った。まず、分裂酵母の環状染色体の維持にpki1が必要であることを発見した。また、クロモソームパッセンジャー複合体が、環状染色体の維持に必要であることを発見した。さらに、DNAダメージチェックポイントに関するタンパク質である9-1-1複合体が、DNA複製が阻害された時に環状染色体の維持に必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見つかった分裂酵母の環状染色体の維持に関する因子は、ヒトでも同様の機能があることが期待できる。その場合、本研究の成果を利用すると、a)環状染色体を安定化することで、環状染色体を持つ遺伝病患者のがんのリスクを軽減したり、b)環状染色体を不安定化することで、環状染色体を持つがん細胞を選択的に死滅させる新しい抗がん剤の開発につながる可能性があり、がんの予防や治療への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Ring chromosomes have association with some genetic disorders and cancers. In *Schizosaccharomyces pombe*, lack of Pot1 results in survivors with circular chromosomes. Therefore pot1 disruptant is suitable to study how cells with circular chromosomes survive and how circular chromosomes are maintained. Fission yeast Cut17/Bir1, Ark1, Pic1, and Nbl1 is a conserved chromosome passenger complex (CPC) functioning mainly throughout mitosis. We found that CPC is synthetically lethal in combination with pot1. We also obtained a novel pik1 mutant, pik1-1, which is synthetically lethal with pot1. We found that pik1-1 mutation does not affect chromosome circularization. Thus, our results suggest that pik1 is required for the maintenance of circular chromosomes. We also found that strains with circular chromosomes, due to loss of pot1, require the 9-1-1 complex for their growth in the presence of DNA replication inhibitor.

研究分野：分子生物学

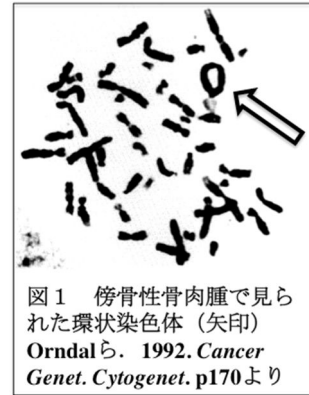
キーワード：テロメア 分裂酵母 ヒト細胞 環状染色体 抗癌剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 環状染色体の安定性制御の重要性

がんは加齢に伴って増える病気であり、日本は今後ますます高齢化が進むことから、がんの予防や治療に関する研究は必要不可欠である。ヒトの染色体は線状であるが、ある種のがんでは高い頻度(異型脂肪腫様腫瘍で 85%)で環状染色体が見つかる(Trombettaら、*Genes. Chromosomes. Cancer.* 2009)(図1)。環状染色体をもつがん細胞のみを選択的に死滅させることができれば、副作用の少ない抗がん剤が開発できる。また、先天的に環状染色体を持つ遺伝病患者も報告されている。これらの患者の環状染色体は不安定であり、環状染色体にがん抑制遺伝子がある場合、環状染色体を失うことで、がんのリスクが上昇する(Zirnら、*Clin. Genet.* 2012)。これらの患者の環状染色体を安定化することができれば、がんのリスクを軽減できる。そこで我々は、環状染色体の安定性に関する遺伝子や薬物を発見できれば、a) 環状染色体を安定化することで、環状染色体を持つ遺伝病患者のがんのリスクを軽減したり、b) 環状染色体を不安定化することで、環状染色体をもつがん細胞のみを選択的に死滅させる抗がん剤の開発につながるのではないかと考えた。



### 分裂酵母を用いた環状染色体研究の有用性と当研究室の優位性

分裂酵母は遺伝子改変が容易で、細胞の増殖が速いことから優れたモデル生物である。また分裂酵母の染色体維持に関するタンパク質の機能は、ヒトタンパク質の機能と似ていることが多いことから、分裂酵母を用いた研究で得られた知見は、ヒト染色体の研究に大きく貢献している。分裂酵母は真核生物であり、線状染色体を持つが、*pot1* 遺伝子破壊株は、3本の染色体が全て環状化する(Baumannら、*Science.* 2001)。当研究室は環状染色体を持つ分裂酵母の研究において、国内外での学会発表や論文発表による実績がある。たとえば当研究室は、環状染色体をもつ分裂酵母の生育に Rqh1 というヘリケースが必要であることを世界に先駆けて明らかにし、Rqh1 が姉妹染色分体間での組換え(交叉型組換え)を抑制することで、環状染色体の2量体形成を抑制することが重要であることを示した。このことから、ヒト環状染色体が不安定である理由の一つは、環状染色体の2量体形成であることが示唆された。そこで、これまでの当研究室の実績と経験を生かして分裂酵母の環状染色体に関する研究を進展させることで、環状染色体の安定性制御に関する新規遺伝子や新規薬物を複数発見できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

上記の背景から本研究では、分裂酵母とヒト培養細胞を用いて、以下の3つを明らかにすることにより、環状染色体の安定性制御に関する新規遺伝子の機能や薬物の作用機構を解明することを目的とした。

- (1) 分裂酵母の環状染色体の安定性制御に関する新規遺伝子や薬物候補の発見
- (2) (1) で発見した新規遺伝子の機能や薬物の作用機構の解明
- (3) (1) で発見した新規遺伝子のヒトホモログや薬物が、ヒトにおいても環状染色体の維持に関与するかどうかの解明

## 3. 研究の方法

本研究では、分裂酵母とヒト培養細胞を用いて、以下の3つの研究を行うことで、環状染色体の安定性制御に関する新規遺伝子や薬物を発見し、それらの遺伝子の機能や薬物の作用機構を解明した。

- (研究1) 分裂酵母の環状染色体安定性制御に関する新規遺伝子や薬物候補を発見する。
- (研究2) 研究1で発見した新規遺伝子の機能や薬物の作用機構を解明する。
- (研究3) 研究1で発見した新規遺伝子のヒトホモログや薬物が、ヒト培養細胞においても環状染色体の維持に関与するかどうかを明らかにする。

### **【(研究1) 分裂酵母の環状染色体安定性制御に関する新規遺伝子や薬物候補を発見する】**

(研究1-1) *pot1* 破壊株と合成致死になる遺伝子のスクリーニングとその原因遺伝子の同定  
分裂酵母の *pot1* 破壊株は、3本の染色体が全て環状化することから、*pot1* 破壊株と合成致死になる遺伝子は、環状染色体の維持に必要である可能性がある。そこで、本研究では *pot1* 破壊と合成致死になる新規遺伝子を探索した。

## 方法

pot1 発現プラスミドを持つ分裂酵母の pot1 破壊株を変異原処理することで、遺伝子変異株ライブラリーを作成し、この中から pot1 発現プラスミドを失ったときに、生育できなくなる株を取得する。次に、次世代シーケンサーにより、変異株の原因遺伝子候補を同定した。

(研究1-2) 分裂酵母の環状染色体安定性に影響を与える薬物とその標的蛋白質の探索

環状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害するが、線状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害しない薬物を探索した。

## 方法

環状染色体を持つ分裂酵母の pot1 破壊株を 96well プレートで培養し、文部科学省化学療法基盤支援活動の化学療法パイロットライブラリーなどを添加して、生育を阻害する化合物を探索する。次に、候補化合物が線状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害しないことを確認した。

【(研究2) (研究1)で発見した新規遺伝子の機能や薬物の作用機構を解析する】

(研究1-1)で得られた pot1 破壊と合成致死になる遺伝子の機能解析を行うことで、得られた遺伝子が環状染色体の維持に関与する機構を解明する。また、(研究1-2)で得られた環状染色体をもつ酵母を選択的に死滅させる薬物の作用機構を解析した。

(研究1-1)で同定した新規遺伝子 (geneX) が、環状染色体の維持に関与するかどうかを検証するために、geneX の温度感受性変異株を作成し、環状染色体を持つ酵母において、geneX の機能を低下させた時の生育や環状染色体の安定性を調べた。

(研究1-2)で同定した新規薬物の標的タンパク質の同定を試みた。

【(研究3) (研究1)で発見した新規遺伝子のヒトホモログや薬物が、ヒトにおいても環状染色体の維持に関与するかどうかを解析する】

(研究1)で発見した新規遺伝子のヒトホモログや薬物が、ヒトにおいても環状染色体の維持に関与するかどうかを解析するために、環状染色体を持つヒト細胞株の樹立を試みた。

## 方法

ヒト 20 番染色体が環状化した遺伝病患者由来の血液を静岡てんかん・神経医療センターから入手し、それを東京医科歯科大学難治疾患研究所バイオリソース支援室に送り、外部受託で EB ウイルスによる不死化を行った。不死化された細胞株が環状染色体をもつかどうかは、M 期染色体のギムザ染色や FISH 法で確認した。

## 4. 研究成果

(1) pot1 と合成致死になる因子として、フォスファチジルイノシトールキナーゼ遺伝子 pik1 を同定することに成功した (Biochem Biophys Res Commun. 2018. 496:1284-1290)。pik1 は、ゴルジ体で機能することが報告されていたが、染色体の維持に関与するかどうかは全くわかっていなかった。本研究では、pik1 の新しい変異株を取得することに成功し、pik1-1 と名付けた。この変異株は、pot1 と合成致死になるが、pot1 の機能を低下させても、末端融合には影響なかった。これらのことから、Pik1 が環状染色体の維持に関与することが示唆された。

(2) pot1 と cpc が合成致死であることを発見 (PLoS One. 2018. 13:e0190523)。cpc 複合体はクロモソームパッセンジャー複合体の略で、染色体の分配に関与することが報告されていた。本研究によって、cpc 複合体が環状染色体の維持に関与することが明らかになった。

(3) pot1 と 9-1-1 複合体が DNA 複製阻害剤で合成致死になることを発見。さらに fudr がチミジンキナーゼがない場合でも DNA 複製を阻害することを発見した (PLoS One. 2017. 12:e0187775)。9-1-1 複合体は Rad9 と Hus1、Rad1 からなる複合体で、DNA ダメージチェックポイントに関係するたんぱく質であるが、本研究によって環状染色体を持つ細胞で DNA 複製が阻害された時に、Rad9 が酵母の生存に必須であることを明らかにした。

(4) 分裂酵母の環状染色体安定性に影響を与える薬物とその標的蛋白質の探索環状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害するが、線状染色体を持つ分裂酵母の生育を阻害しない薬物として、JQ1 を発見した (論文作成中)。JQ1 は、ほ乳類における BRD2、BRD3、BRD4、および精巣特異的タンパク質 BRDT を含むプロモドメインの BET ファミリーの強力な阻害剤である。そこで、分裂酵母の BET ファミリータンパク質である bdf1 と bdf2 が環状染色体の維持に非有用かどうかを調べた。その結果、pot1 と bdf2 が合成致死であることを発見した。さらに分裂酵母 pot1 と bdf2 が合成致死になる機構を解析するために、bdf2 の温度感受性株を作成した。pot1 破壊株の

バックグラウンドで bdf2 の遺伝子にランダムに変異を導入し、25 度では、生育可能だが、36 度になると生育不能あるいは極端に生育が低下する pot1 bdf2 二重変異株を取得した。取得した二重変異株の表現型を詳細に解析した結果、pot1 bdf2 二重変異株は、細胞周期の進行が遅れることを発見した（論文作成中）。

（5）ヒト細胞については、環状染色体を持つ患者由来の血液細胞を不死化させたが、環状染色体を持った不死化細胞は得られなかった。この原因として、患者の細胞中の環状染色体を持つ頻度が少なかったことが考えられる。今後は、別の方法で環状染色体を持つヒト細胞の取得を試みる必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujiwara C, Muramatsu Y, Nishii M, Tokunaka K, Tahara H, Ueno M, Yamori T, Sugimoto Y, Seimiya H8	4. 巻 8
2. 論文標題 Cell-based chemical fingerprinting identifies telomeres and lamin A as modifiers of DNA damage response in cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-33139-x.	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 -
1. 著者名 Takaine M, Ueno M, Kitamura K, Imamura H, Yoshida S.	4. 巻 132
2. 論文標題 Reliable imaging of ATP in living budding and fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.230649.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito H, Sugawara T, Shinkai S, Mizukawa S, Kondo A, Senda H, Sawai K, Ito K, Suzuki S, Takaine M, Yoshida S, Imamura H, Kitamura K, Namba T, Tate SI, Ueno M	4. 巻 511
2. 論文標題 Spindle pole body movement is affected by glucose and ammonium chloride in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 820-825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.02.128.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shamim HM, Minami Y, Tanaka D, Ukimori S, Murray JM, Ueno M	4. 巻 12
2. 論文標題 Fission yeast strains with circular chromosomes require the 9-1-1 checkpoint complex for the viability in response to the anti-cancer drug 5-fluorodeoxyuridine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0187775	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 Sugihara A, Nguyen LC, Shamim HM, Iida T, Nakase M, Takegawa K, Senda M, Jida S, Ueno M.	4. 巻 496
2. 論文標題 Mutation in fission yeast phosphatidylinositol 4-kinase Pik1 is synthetically lethal with defect in telomere protection protein Pot1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1284-1290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1016/j.bbrc.2018.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Habib AGK, Sugiura K, Ueno M	4. 巻 13
2. 論文標題 Chromosome passenger complex is required for the survival of cells with ring chromosomes in fission yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0190523	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7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Masaru Ueno
2. 発表標題 Spindle pole body movement is affected by glucose concentration, medium, and DNA replication stress in fission yeast
3. 学会等名 FASEB Yeast Chromosome Biology and Cell Cycle (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野 勝
2. 発表標題 染色体パッセンジャー複合体は環状染色体の維持に必要である
3. 学会等名 日本農芸化学会 2018年度名古屋大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野 勝
2. 発表標題 染色体パッセンジャー複合体は環状染色体の維持に必要である
3. 学会等名 第35回 染色体ワークショップ・第16回 核ダイナミクス研究会 合同開催
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上野 勝
2. 発表標題 Analysis of chromosome stability and dynamics in fission yeast
3. 学会等名 The International Symposium on Biofunctional Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野 勝
2. 発表標題 Nucleolus dynamics is affected by different stresses and proteins that localize to nuclear membrane or telomere
3. 学会等名 10th International Pombe 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野 勝
2. 発表標題 Roles of telomere-tethering protein for the regulation of nuclear organization and dynamics
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野 勝
2. 発表標題 核構造や核動態の制御におけるテロメアテザリングタンパク質の役割
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>がん細胞に関連する環状染色体の維持に関わる新規因子を発見  <a href="https://www.hiroshima-u.ac.jp/adsm/news/43346">https://www.hiroshima-u.ac.jp/adsm/news/43346</a></p>
--

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