

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651047

研究課題名(和文) 損傷修復における Cenp-A と HJURP の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of Cenp-A and HJURP at damage sites

研究代表者

松本 智裕 (Matsumoto, Tomohiro)

京都大学・放射線生物研究センター・教授

研究者番号：80212223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要(和文)：セントロメアに特異的に取り込まれる Cenp-A が、DNA の損傷部位にも一過的に存在することが報告されている。申請者らが単離した変異体 (rpt3-1) では、Cenp-A がより広範囲に、高密度にセントロメア領域に取り込まれ、セントロメア領域のサイレンシング(転写抑制)が亢進することを発見した。また、この変異体は DNA 損傷誘導処理に対しても高い感受性を示した。Rpt3 タンパク質は Cenp-A を適切な時期にクロマチンから除去することによりゲノム構造を維持するものと考えられる。これらの成果の一部は、Nature Communications に発表された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that Cenp-A, a centromere-specific histone, is also found transiently at DNA damage sites. We isolated a mutant, rpt3-1, in which distribution of Cenp-A is abnormal. Interestingly, the mutant is sensitive to DNA damaging agent. These results would suggest that Rpt3 is responsible for removal of Cenp-A from chromatin at proper timing. A part of these results will be published in Nature Communications.

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：ゲノム生物学

キーワード：Cenp-A クロマチン プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景:

セントロメアクロマチンの際立った特徴は、ヒストン H3 のバリエーションである Cenp-A を含むことである。セントロメアクロマチンは、有糸分裂期に構築される動原体の基礎的構造をなすと考えられる。セントロメア領域 (すなわち Cenp-A が取り込まれるクロマチン領域) の大きさも、そこにおける Cenp-A ヌクレオソームの密度、Cenp-A ヌクレオソームと H3 ヌクレオソームとの比率は、厳密な制御を受けている。

セントロメア領域が異常に拡大すれば、そこに構築される動原体も肥大し、異常な紡錘系接続 (たとえば merotelic attachment) の原因ともなり得る。また、ヌクレオソームの過密な存在は、動原体領域のクロマチンの適切な弾性を損ない、その結果、紡錘系接続にもなって発生する張力を察知するスピンドルチェックポイントの機能に支障を来す可能性がある。Cenp-A ヌクレオソームが H3 ヌクレオソームに置き換わることで、ヒストン H3 のメチル化に依存したヘテロクロマチン形成を阻害することも予想される。Cenp-A の分布制御の破綻は、動原体機能、ヘテロクロマチン形成、転写活性等に異常を来す。セントロメアにおいて Cenp-A ヌクレオソームが適切に分布するためには、Cenp-A ヌクレオソームの取込み機構のみではなく、過剰な Cenp-A ヌクレオソームの排出機構も必要であると推測できる。

一方、最近の研究により、種々の培養細胞 (ヒトあるいはマウス由来) において、マイクロレーザーにより DNA 損傷を導入したゲノム領域に、Cenp-A が取り込まれることが見出された。また制限酵素 Sce-I の発現による二重鎖切断部位でも同様の観察がなされた。この取り込みは損傷導入後、早いもので一分、平均で5分以内に起こる。

Cenp-A が取り込まれる部位は、リン酸化 H2AX が focus を形成する部位と一致したが、機能的にはヒストン H2AX に非依存的である。また、取込みは、損傷を non-homologous end joining により修復する為の因子の存在下で効率が高い。この取込みが起こる際の、他のヒストンタンパク質の動態は明らかでないが、単に Cenp-A が損傷部位のクロマチンに結合する、あるいは損傷部位で除去されたヒストン H3 に代わって Cenp-A が取り込まれるといった可能性がある。Cenp-A の発現レベルを上げることにより、細胞の放射線に対する耐性が高まることから、Cenp-A が損傷修復に機能するものと考えられている。しかしながら、具体的な分子機能は不明である。

2. 研究の目的:

ヒストン H3 の派生体である Cenp-A は、セントロメア DNA と直接相互作用をして、有糸分裂期に形成される動原体クロマチンの構築ブロックとして機能する。分裂酵母では数十キロベース、さらに多細胞生物では数メ

ガベースにわたりセントロメアが定義されており、Cenp-A はこの領域に限定的に存在する。分裂酵母、ショウジョウバエ、ヒトのセントロメアには種々の反復配列が含まれている。また Cenp-A をセントロメアに誘導する際に、ホリデージャンクション結合性タンパク質 (HJURP、分裂酵母 Scm3) が必須であるが、作用機序の理解は極めて限定的である。

本研究は、Cenp-A と HJURP が協調作用により、セントロメアのクロマチン構築にも損傷修復にも機能するという仮説に基づく。この仮説を支持するエビデンスを収集するとともに、損傷部位での Cenp-A の存在意義、セントロメアのクロマチン構築にも損傷修復にも必要とされる Cenp-A と HJURP の分子機能に迫る。また、損傷部位における Cenp-A の分子機能についての知見を得たい。

3. 研究の方法:

24年度: HJURP のホリデージャンクション結合能は示されているが、損傷修復での機能は未だ示されていない。24年度は分裂酵母をモデル系として、主に遺伝学的手法による研究を進める。まず HJURP の分裂酵母相同体 Scm3 が損傷修復に機能する可能性を検討する。また、Cenp-A の損傷修復過程での機能を解析するツールとなる放射線高感受性の Cenp-A 変異体の単離を試みる。

25年度: 主にヒト培養細胞を用いる。Cenp-A の損傷部位への誘導は我々も追試に成功しているが、この誘導が HJURP-依存的であるか否かは不明である。この点を検討するとともに、前年度に単離予定の分裂酵母 *cnp1-rad* 変異体に相当するヒト Cenp-A 変異体を作成し、その挙動を、放射線応答と有糸分裂期の染色体分配に着目して観察する。

4. 研究成果:

分裂酵母モデル系において、Cenp-A の高発現により生育遅延を起こすもの、あるいはゲノム損傷誘発剤に高感受性を示すものを単離し、一部はその変異部位も同定できた。大変興味深いことに、そのような変異の一つ (*rpt3-1*) はプロテアソームのサブユニットの一つである Rpt3 タンパク質をコードすることを見いだした。さらに、この変異体では、セントロメアへの Cenp-A の取込みが亢進することを示した。その結果、染色体の不安定化し、さらにセントロメア領域における遺伝子サイレンシングが通常よりも強度に起こることも示した。

Rpt3 を含むタンパク質複合体 (おそらく 19S proteasome) が 20S proteasome とは独立にヒストンシャペロン様の活性を発揮することが知られている。おそらく、セントロメアにおける Cenp-A の分布調節にも、類似の機能が関与するものと推測する。このような活性は、損傷部位において修復が完了した後、

Cenp-A を取り除く際にも必要であると考えられる。また、変異を導入した Cenp-A を条件的に発現できるライブラリーを作製し、表現型解析を可能にした。さらに Cenp-A に緑色蛍光タンパク質を融合させ、細胞内で観察できるアッセイ系も確立した。

本研究の開始後、ヒト培養細胞の損傷部位における Cenp-A の取込み現象は、Cenp-A を高発現したときのみ起こる可能性が指摘された。すなわち、生理的条件下にあっては、Cenp-A とその関連因子の機能関連は、損傷修復に関与しないことが示唆され、これに関わる研究の推進に疑義がもたれた。このため、本研究の後半では、分裂酵母モデル系における *rpt3-1* 変異体の解析に精力的に取り組み、以下の結果を得た；

1) *rpt3-1* 変異体では、セントロメアへの Cenp-A の取込みが亢進するが、細胞内における Cenp-A のレベルは野生型株と同等である。すなわち、取込みの上昇の原因は、Cenp-A の分布制御の破綻である。

2) *rpt3-1* 変異体で観察される染色体の不安定性は、ヒストン H3 の高発現により改善された。すなわち、セントロメアに Cenp-A が過剰に取込まれることが、染色体の不安定性の原因であることを示した。

3) Rpt3 タンパク質がセントロメアクロマチンと結合することを確認し、さらに変異型 Rpt3-1 タンパク質では、この活性が著しく低下していることを示した。

4) Rpt3 タンパク質を含むプロテアソーム複合体は核膜にアンカーされるが、*rpt3-1* 変異体ではプロテアソーム複合体は核膜から解離して存在する。この結果は、セントロメアにおける Cenp-A の分布制御には、プロテアソームが核膜に存在することが重要であることを示唆する。

5) プロテアソーム複合体を核膜にアンカーする Cut8 タンパク質を欠損する細胞内において、*rpt3-1* 変異体と同様の表現型を確認した。すなわち、セントロメアへの Cenp-A の取込み亢進と、セントロメア領域における遺伝子サイレンシングの増強である。

さらに、Cut8 タンパク質のプロテアソームとの結合部位のみを高発現することで、Cut8 タンパク質とプロテアソームとの相互作用を阻害した。この結果、プロテアソームは核膜から解離し、セントロメアへの Cenp-A の取込み亢進と、セントロメア領域における遺伝子サイレンシングの増強が観察された。この実験により、Cut8 タンパク質を欠損する細胞の表現型（セントロメアへの Cenp-A の取込み亢進と、セントロメア領域における遺伝子サイレンシングの増強）は、プロテアソームの核膜からの解離が原因であって、Cut8 タンパク質の他の機能（細胞周期制御など）の欠損ではないことを示すことができた。

上記 1～5 の結果は、プロテアソーム（あるいはその一部）が、セントロメアクロマチンと結合し、Cenp-A の分布を制御することを

示唆する。このような活性は、セントロメア / 動原体の位置を厳密に規定することで、セントロメアの移動（centromere repositioning）や、染色体腕部におけるセントロメア生成（neocentromere）を防止するものと考えられる。

興味深いことに、*rpt3-1* 変異体とプロテアソーム複合体を核膜にアンカーする Cut8 タンパク質を欠損する変異体は、DNA 損傷誘導剤に対して高い感受性を示す。核膜に存在するプロテアソームが、DNA の損傷修復過程において重要な機能を果たすものと予想される。

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 1 件)

Tepei Kitagawa, Kojiro Ishii, Kojiro Takeda and Tomohiro Matsumoto. The 19S proteasome subunit Rpt3 regulates distribution of CENP-A by associating with centromeric chromatin.

Nature Communications (in press)

〔学会発表〕(計 1 件)

北川哲平、石井浩二郎、田岡万悟、磯辺俊明、松本智裕、「19S プロテアソームは Cut8 依存的にセントロメアに結合し CENP-A の取り込みを限定する」第 31 回染色体ワークショップ、2012 年 12 月 19 日～2012 年 12 月 21 日、淡路夢舞台国際会議場にて。

〔図書〕(計 件)

該当なし

〔産業財産権〕該当なし

出願状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者：松本智裕
(京都大学放射線生物研究センター)

研究者番号：80212223

(2) 研究分担者：該当なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者：該当なし
()

研究者番号：