

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26711001

研究課題名(和文)リン酸化および脱リン酸化酵素によるシュゴシンのセントロメア局在化制御機構の解明

研究課題名(英文) Studying molecular mechanisms of centromeric localization of Shugoshin

研究代表者

川島 茂裕 (Kawashima, Shigehiro)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任講師

研究者番号：40508115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：シュゴシンは真核生物において高度に保存された染色体結合タンパク質であり、染色体分配、染色体構造、遺伝子発現など様々な染色体制御に関与している。シュゴシンの機能にはその染色体局在が必要であり、申請者はこれまでに、増殖する酵母細胞及びヒト培養細胞において、シュゴシンの染色体局在にはBub1キナーゼによるヒストンH2Aのリン酸化が必須であることを示してきた。本研究では、シュゴシンの染色体局在機構に関して二つの新たな知見を見出した。一つは、H2Aのマロニル化がシュゴシンの染色体局在を抑制すること。もう一つは、低グルコース環境下ではBub1とリン酸化H2Aに依存しない染色体局在機構が存在することである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目したシュゴシンタンパク質は染色体分配、染色体構造、遺伝子発現など様々な染色体制御に関与しており、酵母からヒトまで真核生物において広く保存されたタンパク質である。ヒトにおいて染色体の制御に異常が生じるとがんなどの疾患に繋がると考えられるため、本研究で明らかになった新たな生物学的知見は、将来的にがんなどの疾患の理解及び治療に繋がる可能性が期待されるため、学術的意義及び社会的意義のいずれも高い研究成果であると言える。

研究成果の概要(英文)：Shugoshin family proteins are involved in various aspects of chromatin regulations, such as chromosome segregation, chromatin structure, and gene expression. In growing yeast and mammalian cells, C-terminal phosphorylation of histone H2A by Bub1 kinase is essential for the localization of Shugoshin proteins to chromatin. In this study, I have revealed two new insight about chromatin localization of Shugoshin. First, I showed that malonylation of histone H2A at lysine 119 inhibits Bub1-dependent H2A phosphorylation and chromosomal localization of shugoshin proteins. Second, I found Bub1 kinase- and H2A phosphorylation-independent regulation of Shugoshin proteins under glucose-restricted conditions.

研究分野：染色体動態、酵母遺伝学

キーワード：染色体 シュゴシン リン酸化 セントロメア サブテロメア 酵母

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の運び手である染色体は、DNA 合成期(S 期)において複製され、その結果できた 2 つの姉妹染色分体がペアを形成する。細胞は分裂期(M 期)において、これらの染色分体の組み合わせをひとつも間違えずに、2 つの娘細胞に均等に分配しなくてはならない。なぜなら、染色体の過不足は、細胞に遺伝子発現のバランスや増殖の制御を失わせ、その結果、細胞は死に至るか、あるいは生き残ってもがん細胞となる可能性が高いからである。また、ダウン症、ターナー病、クラインフェルター病といった先天性の病気は、生殖細胞における染色体分配の失敗が原因となって引き起こされることが知られている。このように、染色体分配の制御機構を理解することは、細胞がどのようにして遺伝情報を受け継ぐかという生物学的な問題を明らかにするのみならず、医学的にも大きな意義を持つ。

シュゴシン(Shugoshin)は、2004 年に分裂酵母を用いた遺伝学的スクリーニングにより同定された、体細胞分裂および減数分裂における正確な染色体分配に必須なタンパク質である。シュゴシンは酵母からヒトまで真核生物において広く保存された染色体結合タンパク質であり、その後の申請者らの研究により、シュゴシンは以下に示す 2 つの機能をセントロメアにおいて行うことにより、がんの特徴である染色体数異常を防ぐことが明らかになった：(1) 脱リン酸化酵素 PP2A をセントロメア領域へと局在化させることにより姉妹動原体間の接着を保護する、(2) リン酸化酵素 Aurora B をセントロメア領域へと局在させることにより二方向性結合を確立する。分裂酵母においては、二つのシュゴシンパラログ Sgo1 と Sgo2 が存在しており、Sgo1 が(1)の機能を、Sgo2 が(2)の機能をそれぞれ果たしている。さらに、Sgo2 は間期においても染色体上の特にサブテロメア領域に局在化し、染色体構造、遺伝子発現、および DNA 複製タイミングに寄与している。このようにシュゴシンは染色体上で様々な働きをしているわけだが、シュゴシンがこれらの機能を果たすためには、自身のセントロメア局在が必須である。申請者らは 2010 年にリン酸化酵素 Bub1 がクロマチンの主な構成因子であるヒストン H2A をリン酸化することによりシュゴシンをセントロメアへと局在化させることを世界に先駆けて見出した。さらにマウス精母細胞およびヒト培養細胞を用いた研究から、Bub1 による H2A リン酸化を介したシュゴシンの局在制御は、分裂酵母からヒトまで真核生物において広く保存された根源的な機構であることも明らかになった(*Kawashima et al. Science (2010)*)。しかし一方で、シュゴシンの染色体局在化機構は H2A のリン酸化制御だけでは十分説明できない。例えば、分裂酵母においては、H2A のリン酸化は染色体全体で起きているのに対し、シュゴシン Sgo2 はサブテロメア領域にのみ局在化する。さらに、間期にサブテロメア領域に局在化していた Sgo2 は分裂期になるとセントロメア領域へと局在を移すが、その分子機構は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究ではシュゴシンの染色体局在化機構を明らかにすることを目的とした。特に、以下に示す(1)および(2)について重点的に研究を行った。

(1) 分裂酵母 Sgo2 は間期においてサブテロメア領域に、分裂期においてセントロメア領域に局在化し機能を果たす。増殖している分裂酵母細胞において、Sgo2 の染色体局在(サブテロメア領域、セントロメア領域いずれも)にはリン酸化酵素 Bub1 によるヒストン H2A のリン酸化が必須であることが明らかになっている。Bub1 はヒストン H2A の C 末テールに存在する 121 番目のセリン残基(ヒトでは 120 番目のリジン残基)をリン酸化する。興味深いことに、リン酸化サイトの二つ前に存在する 119 番目のリジン残基(K119)には出芽酵母細胞でマロニル化修飾を受けることが報告されていた。そこで、このマロニル化修飾が、シュゴシンの染色体局在化にどのような影響を与えるのかについて理解することを目的に研究を行った。

(2) (1)の研究の過程においてシュゴシンの染色体局在化について予想外の結果を得た。すなわち、申請者はこれまでに対数増殖期の細胞において、Bub1 キナーゼによるヒストン H2A のリン酸化がシュゴシンの染色体局在化に必須であることを見出してきたが、意外な事に、静止期の細胞においては Bub1 および H2A のリン酸化がなくても Sgo2 が染色体に局在化できることを見出した。そこで、この分子機構について理解することを目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 出芽酵母および分裂酵母をもちいて、マロニル化の負電荷を模倣した K119 のアスパラギン酸およびグルタミン酸変異体を作製し、その表現型を詳細に解析した。特に、シュゴシンの染色体局在がどのように変化するかについて調べた。また、ヒストン H2A の C 末テールの 119 番目のリジン残基がマロニル化されたペプチドを合成し、in vitro における解析を行うことにより、このマロニル化修飾が Bub1 による H2A のリン酸化、もしくはシュゴシンのリン酸化 H2A への結合にどのように関与しているかを調べた。

(2) 分裂酵母において Sgo2 の C 末に GFP タグを付加した株を用いて、Sgo2 の染色体局在を詳細に調べた。特に、bub1 破壊株や、ヒストン H2A の 121 番目のセリン残基がアラニンに変異した株(h2A-S121A 株)において、静止期になると Sgo2 が染色体上に局在化することがわかった。そこで、クロマチン免疫沈降法(ChIP)を用いて、染色体のどの領域に結合しているのかを調べた。

た。また、静止期における Sgo2 の染色体局在に必要な因子、または Sgo2 のドメインを探索した。さらに、静止期になるとグルコースなどの栄養源が枯渇することに着目して、低グルコース環境下において Sgo2 の染色体局在化が Bub1 および H2A のリン酸化に依存しているかどうか調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 出芽酵母および分裂酵母をもちいて、マロニル化の負電荷を模倣した K119 のアスパラギン酸 (K119D) およびグルタミン酸 (K119E) 変異体を作製した。また、コントロールとして、リジンの正電荷を保ったままとなるアルギニン (K119R) 変異体も作製して、シュゴシンの染色体局在を蛍光顕微鏡を用いて解析した。出芽酵母は一つのシュゴシン Sgo1 を、分裂酵母は二つのシュゴシン Sgo1 と Sgo2 を持つが、いずれのシュゴシンの染色体局在も K119D および K119E 変異体ではほぼ消失していた (図 1)。一方で、K119KR 変異体ではほとんど異常は見られなかった。これらの結果から、ヒストン H2A の K119 はシュゴシンの染色体局在にとって重要な残基であり、このリジン残基のマロニル化は、シュゴシンの染色体局在を抑制することが示唆された。

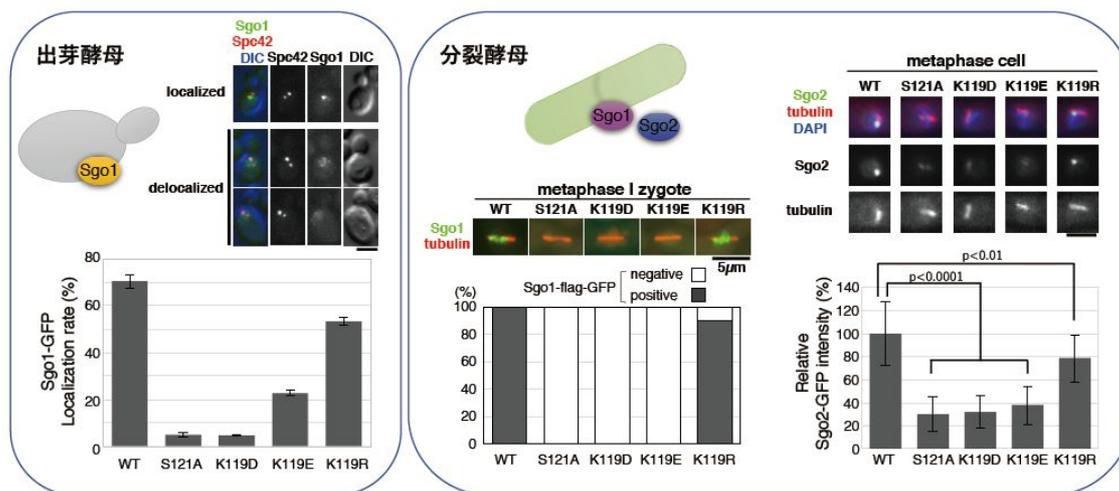


図 1 : H2A-K119変異体におけるシュゴシンの染色体局在

次に、ヒストン H2A の C 末テールの 119 番目のリジン残基がマロニル化されたペプチドを合成し、in vitro における解析を行った (図 2)。分裂酵母 Bub1 のキナーゼドメイン (SpBub1C) を精製し、H2A ペプチドを基質にリン酸化実験を行ったところ、K119 が修飾されていない H2A ペプチドは効率よくリン酸化されたのに対し、K119 がマロニル化された H2A ペプチドはほとんどリン酸化されなかった。この結果から、K119 のマロニル化は Bub1 による H2A のリン酸化を抑制することが明らかとなった。

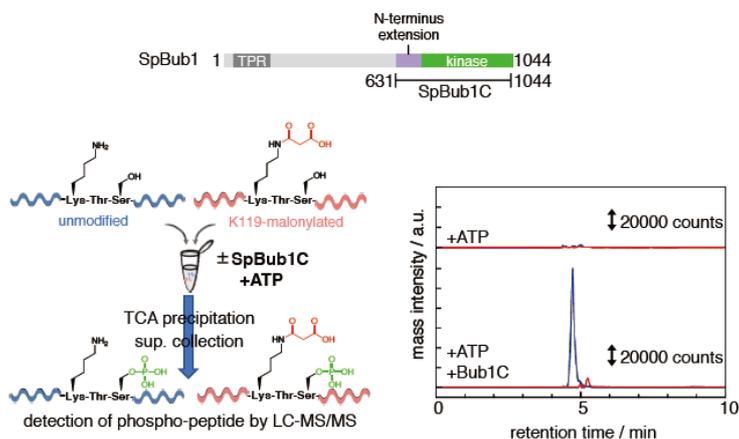
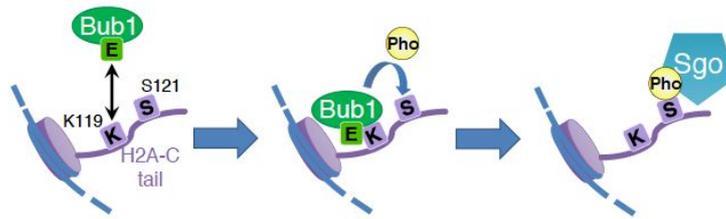


図 2 : K119のマロニル化はBub1によるH2Aのリン酸化を抑制する

この抑制機構を調べるために、H2A ペプチドと Bub1 の間の相互作用を調べた。その結果、Bub1 と K119 がマロニル化された H2A ペプチドとの相互作用は、K119 が修飾されていない H2A ペプチドと比べて顕著に低下していることがわかった。さらに、Bub1 の基質認識領域に存在する 929 番目のグルタミン酸 (E929) をアルギニンに変異すると Bub1 と H2A の相互作用は顕著に弱くなることを見出した。これらの結果から、Bub1 は E929 を介して H2A の K119 と相互作用することで H2A を基質として認識し、121 番目のセリン残基をリン酸化し、K119 のマロニル化は Bub1 と H2A 間の相互作用を阻害するために、H2A のリン酸化およびシュゴシンの染色体局在化を抑制すると結論づけた (図 3)。

**K119が修飾されてない時**



**K119がマロニル化されている時**

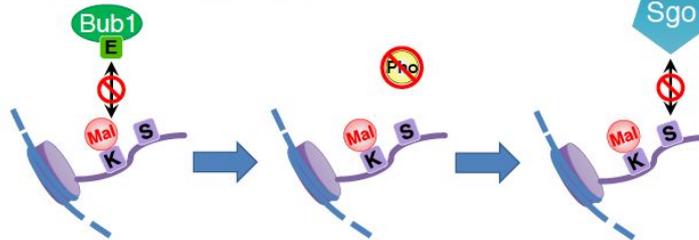


図3：K119を介したBub1によるH2Aリン酸化機構のモデル

(2) 申請者はこれまでに対数増殖期の細胞において、Bub1 キナーゼによるヒストン H2A のリン酸化がシュゴシンの染色体局在化に必須であることを見出してきた。例えば、Sgo2 の C 末に GFP タグを付加した株を用いて、Sgo2 の染色体局在を観察すると、1 点から 3 点のドット状のシグナルを示し、これらのシグナルは間期におけるサブテロメア領域の局在を示すが、これらのドットは *bub1* 破壊株では消失する (図 4)。しかし、分裂酵母をそのまま培養しながら Sgo2-GFP の観察を続けて行くと、培養液の OD が 1.5 を過ぎたあたりから *bub1* 破壊株においても Sgo2-GFP のドットが見え始め、細胞の増殖が停止し静止期になると、ほぼ全ての細胞において明確な Sgo2-GFP のドットが観察されることを見出した (図 4)。

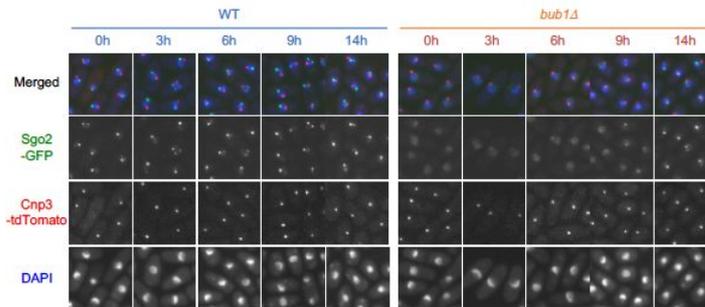


図4：Sgo2は静止期においてBub1がなくても局在化する

クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を用いて、静止期において Bub1 非依存的に染色体のどの領域に結合しているのか調べた (図 5)。これまでの報告通り、対数増殖期では Sgo2 はサブテロメア領域に濃縮しており、*bub1* 破壊株や *h2a-S121A* 変異株ではその局在は消失していた。一方で、静止期においては、*bub1* 破壊株や *h2a-S121A* 変異株においても野生型とほとんど同程度 Sgo2 がサブテロメア領域に濃縮していた。この結果から、Sgo2 は静止期において Bub1 による H2A のリン酸化がなくてもサブテロメアに局在化できるようになると結論づけた。静止期における Sgo2 の染色体局在に必要な因子、または Sgo2 のドメインを探索した結果、ヒストンメチル化酵素 Set2 が必要であること、及び Sgo2 の N 末に存在するコイルドコイル領域が必要であることがわかった。一方で、リン酸化 H2A に直接結合することが知られている Sgo2 の塩基性領域は必要なかった。

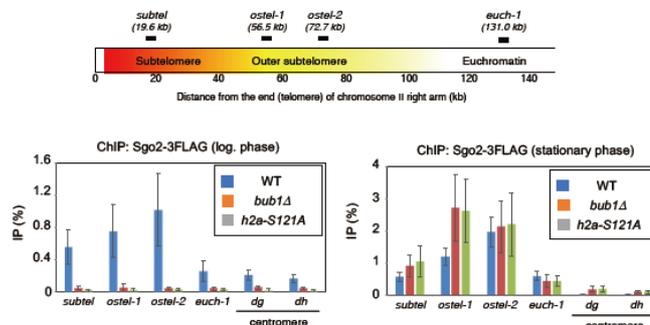


図5：Sgo2の染色体局在のChIP解析

さらに、静止期になるとグルコースなどの栄養源が枯渇することに注目して、低グルコース環境下において Sgo2 の染色体局在化が Bub1 による H2A のリン酸化に依存しているか調べた。分裂酵母を培養する際、通常は 2%グルコースを含む培地を用いるが、低グルコース培地としては 0.08%グルコースを含むものを用いた。先行研究において、0.08%グルコースを含む培地に移すと、細胞は数時間細胞周期を停止するものの、その後は 2%グルコース時とほとんど同じスピードで増殖することが示されている。野生株および *bub1* 破壊株を低グルコース培地で培養して対数増殖期における Sgo2-GFP のシグナルを調べたところ、*bub1* 破壊株においても Sgo2-GFP が染色体上に局在化していることを見出した。これらの結果から、Sgo2 は低グルコース環境下においては、Bub1 による H2A のリン酸化に依存せずに染色体へと局在化すると結論付けた。

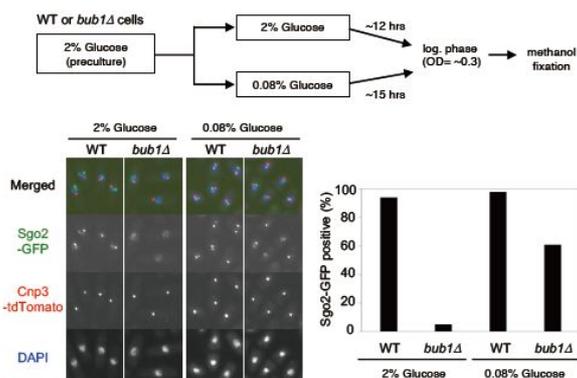


図 6：低グルコース下におけるBub1非依存的なSgo2の染色体局在

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Kobayashi Y, [Kawashima SA](#). Bub1 kinase- and H2A phosphorylation-independent regulation of Shugoshin proteins under glucose-restricted conditions. *Scientific Reports*, 9:2826 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-39479-6
2. Chen Z, Suzuki H, Kobayashi Y, Wang AC, DiMaio F, [Kawashima SA](#), Walz T, & Kapoor TM. Structural Insights into Mdn1, an Essential AAA Protein Required for Ribosome Biogenesis. *Cell*, 175, 822-834 (2018). DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.015
3. Ishiguro T, Tanabe K, Kobayashi Y, Mizumoto S, Kanai M, [Kawashima SA](#). Malonylation of histone H2A at lysine 119 inhibits Bub1-dependent H2A phosphorylation and chromosomal localization of shugoshin proteins. *Scientific Reports*, 8:7671 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-26114-z
4. [Kawashima SA](#), Chen Z, Aoi Y, Patgiri A, Kobayashi Y, Nurse P, Kapoor TM\*. Potent, Reversible, and Specific Chemical Inhibitors of Eukaryotic Ribosome Biogenesis. *Cell*, 167(2):512-524 (2016). DOI: 10.1016/j.cell.2016.08.070
5. Aoi Y, [Kawashima SA](#), Simanis V, Yamamoto M, Sato M. Optimization of the analogue-sensitive Cdc2/Cdk1 mutant by in vivo selection eliminates physiological limitations to its use in cell cycle analysis. *Open Biology*, 4(7) (2014). DOI: 10.1098/rsob.140063

〔学会発表〕(計 6 件)

1. [川島茂裕](#)、小林由紀、「Bub1 および H2A リン酸化に依存しないシュゴシンの染色体局在化」『第 36 回染色体ワークショップ第 17 回核ダイナミクス研究会』、2019 年
2. [川島茂裕](#)、小林由紀、「Bub1 および H2A リン酸化に依存しないシュゴシンの染色体局在化機構」『酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会』、2018 年
3. [川島茂裕](#)、石黒伸茂、田辺佳奈、小林由紀、水本真介、金井求、「ヒストン H2A リジン 119 番のマロニル化は Bub1 による H2A リン酸化及びシュゴシンタンパク質の染色体局在化を阻害する」『第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会』、2018 年

4. 川島茂裕、小林由紀、「Bub1 キナーゼによるヒストン H2A のリン酸化はグルコース制限下におけるシュゴシンの染色体局在には必要ない」『2017 年度生命科学系学会合同年次大会』、2017 年

5. 川島茂裕、青井勇樹、Zhen Chen、Tarun M. Kapoor 「薬剤感受性分裂酵母を用いた化学遺伝学スクリーニングによるリボソーム生合成を標的にした新規低分子阻害剤の同定」『日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会』、2017 年

6. 川島茂裕、Zhen Chen、青井勇樹、小林由紀、Paul Nurse、Tarun M. Kapoor、「リボソーム生合成に必須な AAA+タンパク質ミダシンの特異的かつ可逆的低分子阻害剤の発見」『第 39 回日本分子生物学会年会』、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：特になし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者なし

(2)研究協力者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。