

研究課題別評価

1 研究課題名:染色体分配の制御機構の解明

2 研究者氏名:深川 竜郎

研究員:西橋 藍 (研究期間:H13.12.1 ~ H14.6.30)

野上 正弘 (研究期間:H14.1.1 ~ H17.3.31)

堀 哲也 (研究期間:H14.4.1 ~ H17.3.31)

3 研究の狙い:

生物が生命を維持するためには、全ゲノム情報を包括する構造体である染色体は安定に保持・増殖されなければならない。正常な細胞では、ほぼ決まった時間周期で染色体の複製と分配が正確に行われる。染色体の複製・分配といった基本的な生体反応に狂いが生じると染色体の異数化、がん化など細胞に対する悪影響が生じる。したがって、染色体複製や分配機構を解明することは、複雑な細胞システムを理解するために不可欠である。細胞周期の S 期で複製された染色体は、M 期では両極から伸びた紡錘体に捕えられ、娘細胞へと分配される。この際、紡錘体が結合する染色体の特殊構造はセントロメアと呼ばれている。染色体分配の制御機構を解明するためには、セントロメアに関する研究は極めて重要であり、本研究では、セントロメアの形成機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、哺乳類細胞の数十から数百倍の頻度で相同組換えを起こすニワトリの DT40 細胞の実験系を用いて、以下の 3 課題に取り組んだ。1) DT40 細胞を用いたセントロメアタンパク質の系統的ノックアウト解析 本計画は、さきがけ研究を始める以前から継続的に行ってきた研究である。さきがけ研究においても、各種セントロメアタンパク質のノックアウト解析と表現型解析を通じてセントロメアの形成機構についての知見を得ることを目指した。また、下記の 2) の計画で得られた新規タンパク質のノックアウト解析も行った。2) プロテオミクスおよび DNA データベースを用いた新規セントロメアタンパク質の同定とその機能解析 いくつかのセントロメアタンパク質にタグを融合させたタンパク質を発現させて、免疫沈降を行うことで、セントロメアタンパク質複合体を得ることを目指した。新規のセントロメアタンパク質が同定できれば、1) の計画にあるように、そのタンパク質のノックアウト解析を通じて、セントロメア機能に関して新しい制御機構を明らかにできると考えられる。3) RNAi マシーナリーとセントロメア形成との関連解明 我々は、以前よりヒト染色体をニワトリ細胞へ移行させる技術を確立していた。その手法を用いて分子レベルの詳細な構造が明らかになったヒト染色体由来の人工染色体を保持する DT40 細胞を複数種類樹立している。このうち、ヒト 21 番染色体を保持する DT40 細胞を対象にして、RNAi マシーナリー - に関与する Dicer 遺伝子の条件的ノックアウト細胞を樹立して、Dicer の発現が失われた細胞で、ヒト人工染色体のセントロメア領域からの RNA 転写やセントロメア形成の関わる影響を解析することを目指した。

4 研究成果:

(1) DT40 細胞を用いたセントロメアタンパク質の系統的ノックアウト解析

さきがけ研究において、我々がノックアウトしたセントロメアタンパク質は、CENP-A、CENP-I、Nuf2、NDC80 (Hec1) と下記の 2) の計画で同定した新規セントロメアタンパク質群である。CENP-A のノックアウト細胞の解析の結果、細胞分裂時期のみならず、間期にも異常が生じることが明らかになった。また、明らかな分配異常が観察された。また、CENP-A 欠損細胞で、CENP-C、-H、-I の局在異常が認められた (論文投稿中)。Nuf2 および Hec1 のノックアウト細胞は、約 450 分の細胞分裂の遅延が起きた後、次の細胞周期に進行することなく死滅した。Nuf2 の欠損した染色体のセントロメアにも CENP-C や CENP-H は存在していた。また、Nuf2 が Mad2 と直接結合することが明らかになったが、ノックアウト細胞で BubR1 の局在異常は認められなかった。Nuf2 および Hec1 の

欠損細胞における細胞分裂遅延は、チェックポイント依存的であるため、BubR1 の活性化がその要因の一つであると考えられた。さらに、京都大学の木村博士の協力を得て、FRAP 実験を行い Nuf2 は間期ではダイナミックな挙動であるが、分裂期では非常に安定した構造をとることが明らかになった (J. Cell Sci., 2003)。CENP-I は、分裂酵母の Mis6 ホモログとして我々が同定、命名したタンパク質である。ロックアウト解析から、CENP-I は、CENP-H と協調して CENP-C の局在に関わることが明らかになった。また、分裂酵母の Mis6 とは異なり、CENP-A の局在には影響を与えなかった (Dev. Cell, 2002)。なお、これまでのロックアウト解析の結果をまとめて、国際雑誌の総説に、現時点のセントロメア形成に関するモデルを発表した (Exp. Cell Res., 2004; Mol. Cell. Biol., 2005)。

(2) プロテオミクスおよび DNA データベースを用いた新規セントロメアタンパク質の同定とその機能解析

Nuf2-GFP および Hec1-GFP が発現している細胞からシクロース密度勾配遠心法と免疫沈降実験から、複合体を形成すると予想される複数のバンドが得られた。コアの複合体は 4.3S の沈降度であった。LC-MS/MS の質量分析システムを用いてペプチドの配列情報を得た。Km23 と呼ぶ新規タンパク質が得られた。km23 と呼ぶタンパク質がセントロメアに局在することを明らかにした。さらに、Km23 と配列の良く似たもう一つの遺伝子が存在することが分かった。最近、両遺伝子のダブルロックアウト細胞が樹立でき、表現型の解析を開始している。また、CENP-H-GFP および CENP-I-GFP 発現する細胞を用いてプロテオミクス解析を行い、5 種類の新規セントロメアタンパク質を同定できた。CENP-H ロックアウト細胞において、それら新規タンパク質のセントロメア局在は失われた (論文準備中)。

(3) RNAi マシーナリーとセントロメア形成との関連解明

我々は、ヒト染色体由来の人工染色体をニワトリ細胞へ移行する技術確立して各種ヒト染色体を保持する DT40 細胞を樹立している (EMBO J., 2002)。そのうちヒト 21 番染色体を保持する DT40 細胞を対象にして、RNAi マシーナリー - に関与する Dicer 遺伝子の条件的ロックアウト細胞を樹立した。Dicer の発現が失われた細胞では、DT40 細胞に保持されたヒト染色体の反復配列からの転写が確認された。表現型を解析した結果、Dicer の発現が失われた細胞では、姉妹染色分体の接着に異常が起こることが判明した。また、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 が過剰発現してその局在が変化していた。CENP-A や -C などのセントロメアタンパク質に異常は起きていなかった。これらの結果は、高等脊椎動物においても、RNAi マシーナリーがヘテロクロマチンの形成に関わっていることを示唆している (Nature Cell Biol., 2004)。

5 自己評価:

ゲノムの一次配列が決定されたポストゲノム時代には、ゲノム情報そのものが如何にして次世代細胞へ伝えられるかを研究することが極めて重要になると考えられる。そこで、我々はゲノム分配機構の視点から高等動物のセントロメア形成機構の研究に取り組んだ。はじめに、逆遺伝学的手法を用いてセントロメアに局在する複数のセントロメアタンパク質のロックアウト細胞のコレクションを作ることを試みた。一見、単純な研究のように見えるが、高等動物のセントロメアを理解するためには欠かせないステップであり、ロックアウト細胞という研究材料は関連研究者によって共有できる財産になる。さきかけ研究を開始する前から取り組んでいた計画であるが、さきかけ研究の間にも着実な成果を挙げたと評価できる。さらに、プロテオミクスの手法で新規セントロメアタンパク質の同定も試みた。研究開始当初は、ニワトリゲノムの配列が未決定であったこととタンパク質の精製技術が未熟であったため進行が遅れた。しかしながら、2004 年に入り技術の向上とニワトリのゲノム配列が大量に決定されたことに伴い、複数種類の新規セントロメアタンパク質を同定できた。これらの機能解析は大変興味深く今後、力をいれて解析を急ぐ予定である。最後に、ヒト染

色体を保有するニワトリ細胞を用いて RNAi マシーナリーと染色体分配の関係を解析した。分裂酵母を対象として RNAi マシーナリーとセントロメアヘテロクロマチンとの関連は指摘されていたが、技術的な困難さから高等動物の実験系では研究が遅れていた。それを、我々独自の系で解析できた点は、大きな収穫であったと考えている。プロジェクト全体としては、複数の計画を同時進行で進めることを試みた。これはポストドク参加型のプロジェクトではじめて可能になる試みであり、多くに点を学んだ。個々の解析での反省点は多々あるが、全体的には、グループ研究という利点を用いての研究推進により、個人研究以上の成果は挙げたと信じている。

6 研究総括の見解:

セントロメアを中心とする視座からの挑戦であり、ポストゲノム期に入った現在、本研究領域での競争は激しくなりつつある。その中で、着実に成果を上げてきたことを評価したい。今後の展開に注目している。

7 主な論文等:

論文・総説

1. Yoshikazu Mikami, Tetsuya Hori, Hiroshi Kimura, and Tatsuo Fukagawa
"Functional region of CENP-H interacts with Nuf2 complex, which functions as a connector between the inner and outer kinetochores."
Molecular and Cellular Biology in press (2005)
2. Tomoko Motohashi, Tsukasa Shimojima, Tatsuo Fukagawa,
Katsumi Maenaka, and Enoch Y. Park .
"Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus bacmid system."
Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 326, 564-569 (2005)
3. Tatsuo Fukagawa, Masahiro Nogami, Mitsuko Yoshikawa, Masashi Ikeno, Tuneko Okazaki, Yasunari Takami, Tatsuo Nakayama, and Mituso Oshimura
"Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells."
Nature Cell Biology Vol. 6, 784-791 & Cover (2004)
4. Tatsuo Fukagawa
"Centromere DNA, proteins and kinetochore assembly in vertebrate cells."
Chromosome Research Vol. 12, 557-567 (2004)
5. Tatsuo Fukagawa
"Assembly of kinetochores in vertebrate cells."
Experimental Cell Research Vol. 296, 21-27 (2004)
6. V. Regnier, J. Novelli, T. Fukagawa, P. Vagnarelli, W. Brown
"Characterization of chicken CENP-A and comparative sequence analysis of vertebrate centromere-specific histone H3-like proteins."
Gene Vol. 316, 39-46 (2003)
6. Tetsuya Hori, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Hiroshi Kimura, and Tatsuo Fukagawa
"Dynamic behavior of Nuf2-Hec1 complex that localizes to the centrosome and centromere and is essential for mitotic progression in vertebrate cells."
Journal of Cell Science Vol. 116, 3347-3362 (2003)
7. Jenny M. Spence, Ricky Critcher, Tom A. Ebersole, Manuel Valdivia, William C. Eranshaw, Tatsuo Fukagawa, and Christine J. Farr
"Co-localisation of Centromere Activity, Proteins and a Topoisomerase II within a subdomain of the major human X -satellite array. "

- The EMBO Journal Vol. 21, 5269-5280 (2002)
8. Tomoko Hayashi, Masayuki Seki, Daisuke Maeda, Wensheng Wang, Yoh-ichi Kawabe, Takahiko Seki, Hisato Saitoh, Tatsuo Fukagawa, Hideki Yagi, and Takemi Enomoto " Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells." Experimental Cell Research Vol. 280, 212-221 (2002)
 10. Mizuki Ohno, Tatsuo Fukagawa, Jeremy S. Lee, and Toshimichi Ikemura "Triplex-forming DNAs in the human interphase nucleus visualized in situ by polypurine/polypyrimidine DNA probes and antitriplex antibodies." Chromosoma Vol. 111, 201-213 (2002)
 11. Ai Nishihashi, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Toshimichi Ikemura, Vinciane Regnier, Helen Dodson, William C. Earnshaw, and Tatsuo Fukagawa "CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells." Developmental Cell Vol. 2, 463-476 (2002)
 12. 深川 竜郎
「高等脊椎動物のセントロメアタンパク質の集合と機能発現」
細胞核のダイナミクス (竹安邦夫 / 米田悦啓編シュプリンガー・フェアラーク東京) (2004) pp149-158.
 13. 深川 竜郎
「染色体構造と機能に関わるエピジェネティクス」
わかる実験医学シリーズ「注目のエピジェネティクスがわかる」押村光雄編 (2004) 80-87.
 14. 深川 竜郎
「高等脊椎動物のセントロメア構築と機能発現」
医学のあゆみ (2004) Vol. 208, 793-798.
 15. 深川 竜郎
「セントロメア特異的なクロマチン構造」
生体の科学(2003) Vol. 54, 179-184.
 16. 深川 竜郎
「染色体分配に必須な構造: 動原体」
細胞工学(2003) Vol. 22, 267-271.
 17. 深川 竜郎
「動物細胞の M 期での動態の可視化」
遺伝子医学 (2003) Vol. 7, 96-100.

受賞

平成 14 年 日本遺伝学会奨励賞受賞

招待講演

1. 深川 竜郎, 堀哲也, 野上正弘, 三上剛和, 岡田聖裕
「ゲノム安定性を保障するセントロメアの機能構築」
ワークショップ「染色体ダイナミクスとゲノム維持」日本分子生物学会, 神戸, 2004 年 12 月
2. Tatsuo Fukagawa
"Formation of kinetochores and heterochromatin structures in vertebrate cells."
The 21st Radiation Biology Center International Symposium, Kyoto, October (2004).
3. Tatsuo Fukagawa
"Formation of kinetochores and heterochromatin structures in vertebrate cells."
The 15th International Chromosome Conference, London, September (2004).

4. 深川竜郎
「高等動物染色体セントロメアの機能構築」
シンポジウム「細胞核のアイデンティティ」日本分子生物学会、神戸、2003年12月
5. Tatsuo Fukagawa
“Functional Analysis of the Centromere Protein Complex.”
The 9th Japanese-Germany Workshop on Carcinogenesis, Essen, Germany, Sep. (2003).
6. 深川竜郎
「高等動物染色体セントロメア領域のクロマチン収納メカニズム」
シンポジウム「クロマチン機能の基本相：遺伝情報の収納／とりだし／廃棄の分子メカニズム」
日本分子生物学会、横浜、2002年12月。
7. 深川竜郎
「ゲノム安定性を保証する分子機構ー特にセントロメアを中心として」
シンポジウム「ゲノムダイナミクスと発がん」日本がん学会、東京、2002年10月。
8. 深川竜郎
「DT40細胞を用いた染色体分配の研究」
哺乳動物遺伝学研究会、千歳、2002年6月。
9. 深川竜郎
「DT40細胞を用いたセントロメア・クロマチンの解析」
ワークショップ「クロマチン編成・再編成の生物機能」、日本細胞生物学会、横浜、2002年5月。

口頭発表

Tatsuo Fukagawa

Kinetochore assembly and formation of heterochromatin structures in vertebrate cells. CSHL meeting on Dynamic organization of nuclear function, Cold Spring Harbor, New York, October, 2004.

他 20件