

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:染色体動態の時空間制御技術の開発

### 2 研究者氏名:高橋 考太

研究員:高山 優子(研究期間 H15.4.1~H16.3.31)

### 3 研究のねらい:

細胞周期と染色体研究に先導的役割を果たしてきた分裂酵母をモデル生物にして、染色体動態の時空間制御技術の開発を推進する。そのために主として二つの異なった研究アプローチをとる。ひとつはこれまで我々のグループで研究の蓄積があるセントロメアクロマチン構築の分子基盤を、セントロメア特異的ヒストン CENP-A の局在化機構に焦点を絞って推進する。第二のアプローチとして、細胞活動(特に染色体の時空間動態)に条件的にリバーシブルな変化を付与することのできる遺伝子変異の選択的取得戦略を確立する。これらの方法により、将来的には細胞周期進行に伴う染色体動態のタイムプログラムを統一的に理解し、ヒト人工染色体の制御技術や癌悪性化に関与する異数体生成を阻止する技術開発に資することを目標にしている。

### 4 研究成果:

研究助成を受けた期間中、当初の研究計画に沿って、主として以下の7つの項目について研究を行った。第一のアプローチであるセントロメアクロマチン構築の分子基盤解明については、予想以上の満足できる結果を得た。研究目標に掲げた CENP-A の局在機構だけでなく、新たにスピンドル形成チェックポイント制御に中心的役割を果たす Mad2 蛋白質の局在制御についても多くの知見を得ることができた。その研究結果の一部は、研究期間内に論文として公表したかあるいは現在投稿中である。残りの結果の多くについては、現時点でまだここに公表できる状態にはないが、今後 1-2 年のうちに論文の形にまとめることが可能と考えている。第二のアプローチであるゲノム改変によって細胞に新たな制御特性を与える手法の開発については、当初の研究計画通りには全く進まなかった。1 年あまり条件検討などの試行錯誤を繰り返したが、条件的リバーシブル変異の効率的な取得手法の改善がみられず研究進展の見込みがたたなかったので、大幅な研究方針の転換を行った。すなわち効率的かつ確実なゲノム改変技術の開発を新たに試み、分裂酵母のゲノム構造を大幅に改変する手法を確立した。このようにして取得した多くのゲノム改変分裂酵母株は、新たな制御特性を有する有用酵母を産出する技術基盤になる可能性があり、今後さらに技術開発を進めていきたい。

### スピンドル形成チェックポイント Mad2 蛋白質のキネトコア局在制御と Mis6 および Nuf2 複合体の機能関連

分裂酵母 Mis6 セントロメアコア結合蛋白質は染色体均等分配に必須で、セントロメア特異的ヒストン H3 バリエント CENP-A のセントロメア局在過程に関与している。*mis6-302* 変異株では、M 期において染色体の不均等分配を誘発するにもかかわらず、スピンドルチェックポイントは発動せず、細胞周期が進行、様々な染色体構成を持つ異数体を生成して致死となる。これらの変異におけるチェックポイント異常の原因を、Mad2 経路および Bub1 経路の二つのスピンドルチェックポイントについて調べた結果、Mad2 経路に特異的な異常を持つことがわかった。Bub1 経路は姉妹セントロメア間の張力を、Mad2 経路はスピンドル微小管との結合をモニターしていると考えられている。これら遺伝子変異では、Bub1 経路で認識される染色体分配異常が頻出するにもかかわらず、それらは Mad2 経路では検出されない。蛍光ラベルしたこれらチェックポイント蛋白質の挙動を各セントロメア構成蛋白質遺伝子変異株中でライブ観察する系を立ち上げ、網羅的解析を行った結果、Mis6-Sim4 複合体と Nuf2-Hec1 複合体が協調的に Mad2 蛋白質のセントロメア局在を制御していることがわかった。また実際、*mis6-302* 変異株では、Mad2 依存的スピンドル微小管結合チェックポイントが機能していないこともわかった。Mad2 と Mis6 の物理的相互作用を検出、Mis6 の進化的に保存された N 末側ドメインが、M 期微小管構造と相互作用することを明らかにした (Saitoh et al., MBC, 2005)。以上の結果は、Mis6 複合体が、セントロメア特異的ヒストン CENP-A と微小管結合チェックポイント因子 Mad2 の局在制御を行っていること、これらが属する異なった制御系 (S 期のセントロメアクロマチン構築および M 期のスピンドル微小管結合) が Mis6 複合体を介して何らかの機能連関を持つ可能性を示唆しており、非常に興味深い研究成果である。

### スピンドル形成チェックポイント Mad2 蛋白質のキネトコア局在制御と Bub1 張力チェックポイント経路および DASH 複合体の機能関連

DASH 複合体はリング状分子構造をとって微小管上を滑り、微小管の + 端 (キネトコア側) に強い親和性を持つことが出芽酵母で報告されている興味深いセントロメア蛋白質である。我々は、Mis12 セントロメア複合体の構成因子のひとつ Nnf1 の温度感受性変異 *nnf1-495* を単離し機能解析を行っていたが、その過程で *nnf1-495* の多コピーサプレッサーとして分裂酵母 DASH 複合体の構成因子 Dad2 を取得した。Dad2 は M 期の前中期と中期で異なる特徴的なスピンドル局在およびセントロメア局在を示すことがわかった。また Dad2 は実際にセントロメア中央領域に結合し、そのセントロメア局在には Mad2 結合に必須な Mis6 および Nuf2 複合体が必須であることがわかった。そこで DASH 複合体と Mad2 および Bub1 の局在依存性を調べたところ、Mad2 のセントロメア局在が Bub1 および Dad2 の二重破壊株で全く見られなくなることが判明した。これは微小管結合チェックポイント Mad2 の局在が、ある遺伝的バックグラウンドでは Bub1 張力チェックポイントにより制御

されていることを示唆しており、極めて重要な発見である。Bub1 張力チェックポイントと Mad2 局在の関連をさらに探るために、姉妹染色分体間の接着が特異的に阻害される遺伝的バックグラウンドで分裂後期促進複合体 APC/C を不活化し、微小管は二極結合しているが姉妹キネトコア間に張力が発生しない状態をつくりだし、Mad2 局在と Bub1 の遺伝的関係を調べた。その結果、微小管の二極結合が起こっても張力が発生しない状況では、Mad2 はセントロメアに局在し続けること、その局在維持には Bub1 が必須であることがわかった。さらに Bub1 破壊株で M 期に薬剤処理で微小管構造を完全に破壊すると、Mad2 がセントロメア局在すること、この遺伝的バックグラウンドで微小管構造の崩壊を Mad2 に伝達しているシグナル系に Dad2 が必要であることを見いだした。以上の結果は、これまで未解明であった微小管結合から張力発生を経て APC/C にいたるスピンドル形成チェックポイント(SAC)情報伝達を分子的に理解する上で、Mad2 のセントロメア局在が DASH 依存的な微小管結合シグナルと Bub1 依存的な張力シグナルの双方で二重に制御され、SAC 情報伝達に中心的役割を果たしていることを示唆している (Kobayashi, Saitoh et al., 投稿準備中)。

#### セントロメアコア蛋白質 Mis6 の結合因子 Sim4/Mix1 の同定とそのヒトホモログ MORE の機能解析

*mis6-302* 温度感受性変異の多コピーサプレッサースクリーニングを行い、新規セントロメア蛋白質 Sim4/Mix1 を分離、染色体分配に必須な細胞周期を通じてセントロメア局在する Mis6 の結合パートナーであることを示した。ヒト Mis6 ホモログとして CENP-I が報告されているが、Mis6 と複合体を作る Sim4/Mix1 については明確なヒトホモログが同定されていなかった。そこでホモロジー検索を行い、ヒト Sim4/Mix1 ホモログの候補として CENP-H および新規蛋白質 MORE を見いだした。ヒト MORE cDNA をクローン化し、細胞周期を通じてセントロソームに存在することを示した。CENP-H は Sim4 のヒトセントロメアホモログ、MORE はヒトセントロソームホモログなのかもしれない。GFP-Histone H2B 発現および Tubulin-YFP 発現 HeLa 細胞株に対し、RNAi による MORE ノックダウンをおこない、ライブ観察を行ったところ、多くの細胞で微小管構造の異常が観察され、M 期に多極を形成するものやスピンドル微小管のセントロソーム近傍でのバンドリングが崩れているものなどがみられた。これらの結果は MORE がセントロソーム機能に関わることを強く示唆している。さらに two hybrid スクリーニングにより、MORE と直接結合する機能関連蛋白質の探索を試みたところ、セントロメアおよびセントロソームの双方に局在化し M 期制御に必須なヒト蛋白質を 2 つ同定した (Kobayashi et al., 未発表)。これらのうちのひとつは Sim4/Mix1 のヒトセントロメアホモログと考えられる CENP-H と相互作用する。現在、論文公表に向けて MORE、CENP-H と two hybrid スクリーニングにより同定された結合因子の機能関連を解析中である。

#### 新規セントロメア蛋白質の同定とセントロメアヌクレオソームのアセチル化修飾に関連する HDAC

## 同定の試み

*mis6-302* 変異株と全く同じ表現型を示す温度感受性変異株をスクリーニングし、Sim4/Mix1 以外にも多くの新規セントロメア蛋白質を同定した (Hayashi et al., Cell, 2004, Kobayashi et al., 未発表)。セントロメア領域のヒストンは通常、低アセチル化状態を維持しているが、Mis6 や CENP-A の局在に与する *mis16* 変異株中では高アセチル化状態に変換していた。さらに *mis6-302* 変異株はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤である TSA に超感受性を示す。Mis6 の機能不全とセントロメア領域のヒストンアセチル化修飾との関連を探るため、分裂酵母に複数存在する HDAC 遺伝子との遺伝的相互作用を検討することにより、Mis6 と特定の HDAC との機能関連を調べた。これまでに *mis6-302* 変異と準許容温度下で破壊株が合成致死性を示す HDAC を同定した。興味深いことに、二重変異株は高頻度の染色体分配異常を示した (Masuda et al., 未発表)。

## セントロメア結合型 GATA 転写因子 Ams2 の関連制御遺伝子の同定および分解経路の分子基盤

分裂酵母 CENP-A の温度感受性変異株 *cnp1-1* は M 期に染色体の不均等分配を起こし致死となる。その多コピーサプレッサー遺伝子として GATA 転写因子をコードする *ams2* 遺伝子をクローン化した。*ams2* 遺伝子を破壊しても致死とはならないが、染色体分配異常を頻出し、CENP-A のセントロメア局在が特異的に減少することが明らかとなった (Chen et al., Mol. Cell, 2003)。Ams2 蛋白質は G1/S 期にのみ存在し、核クロマチンに局在化する細胞周期依存的に制御されることもわかった。またこの制御は転写と蛋白質分解の両方でており、Ams2 蛋白質は細胞周期 S 期の後半にリン酸化され、ポリユビキチン化されて 26S プロテアソーム依存的に分解制御されることを見出した。Ams2 の段階的欠失体の作成と解析により、Ams2 のリン酸化およびユビキチン化部位の限定および NLS 配列の同定を行い、この領域部位特異的変異体の作成を推進した。英国がん研究所の登田隆博士との共同研究により、Ams2 の分解に関わる上流制御因子の同定にも成功した (Takayama et al, 未発表)。さらに、Ams2 の S 期における下流の転写ターゲット遺伝子を同定する目的で、情報通信研究機構の近重祐次博士および平岡泰博士との共同研究を実施し、Ams2 の破壊株および 1 コピー余分に遺伝子増量した株を作成してその遺伝子発現パターンを DNA マイクロアレイ解析で検討した。複数の候補ターゲット遺伝子を同定、Ams2 が転写抑制している一連の遺伝子群の制御ネットワークを解析した (Takayama et al., 投稿準備中)。

## セントロメア特異的ヒストン H3 バリエント CENP-A の細胞周期依存的局在化機構

*ams2* 遺伝子を破壊すると、コアヒストン遺伝子の S 期特異的な転写活性化が起こらず、それに伴って CENP-A の S 期以降のセントロメア局在が阻害されることを見出した。驚いたことに局在異常を示した CENP-A 分子は G2 期後期になると再びセントロメアへローディングされ、次の M 期の染色体分配はほぼ正常に起こることがわかった。G2 期の長さを遺伝子変異で短くしてみると、

CENP-A の再ローディングが阻害され Ams2 破壊株は M 期で染色体分配異常を示し致死となったことから、G2 期は CENP-A のローディングのバックアップ期として働いている可能性がある (Takayama et al., 投稿中)。細胞周期を通して恒常的セントロメア局在を示す CENP-A 分子だが、異なったローディング経路を使ってダイナミックな局在制御を受けていることがわかった (Takahashi et al., Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005)。このように染色体分配が起こる細胞周期 M 期に入る前の間期に、CENP-A を再ローディングする隠れた活性があり、セントロメアクロマチンを再形成する機会がもうけられていることは、染色体が持つ可塑的性質の重要な生理機能の一例であろう。本研究成果において、スピンドル形成チェックポイントと並んで、細胞が異数化することを未然に阻止するシステムのひとつを見いだすことができたと考えている。

#### 大規模ゲノム改変技術の開発

分裂酵母の染色体の大規模改変を誘導する実験系の構築に成功し、癌悪性化の過程で生成するようなカリオタイプの変化した株を分裂酵母で再現性よく取得できるようになった。これはこれまで解析が困難であった染色体の可塑性に関する実験的研究を可能にする。現在この系は、情報通信研究機構の平岡泰・近重祐次両博士との共同研究でゲノミクス解析にも展開させている。

#### 5 自己評価:

研究者は、平成 14 年 4 月 1 日付けで久留米大学分子生命科学研究所において研究室運営をスタートさせる機会を得た。しかし前勤務先からはほとんど自前の研究機器を持ち合わせていない状態での単身の移籍で、研究補助員 1 名とのたった 2 人での船出だった。身軽な移動だった反面、ほとんど共通機器のない小さな研究所なので、最初の数ヶ月間は何もない研究室で全く実験らしい実験もできない状態に落ちいってしまった。不安だらけの研究室運営をスタートさせてから現在までの期間は、ちょうどこのさがけのサポートをいただいた時期に重なる。それまで 1 年毎更新の研究費しかない中、このさがけは 3 年間の複数年グラントで、研究室立ち上げにあたり物心両面において大変助かった。現在では、必要な研究機器がほとんど揃い、研究室メンバーも 11 名に増え、基本的な研究環境を整備し終えることができた。この間、当初の計画通りには必ずしも研究は進まなかったが、予想外の展開から多くの実りある研究成果が生まれ、当初の研究目的は十分達成したのではないかと感じている。多くの研究結果について、さがけ終了時までに論文発表の形に持っていけなかったことは反省材料であるが、研究室立ち上げに要した時間を考え合わせると、これが現時点でのベストを尽くした結果であった。地方の研究所で学生がなかなか入ってこないという状況の中、博士研究員や研究補助員を雇用して教育し戦力に育てるという貴重な体験もできた。また研究をスタートさせた時に、実は自分の中で不鮮明であった大まかな研究の方向性がこの 3 年間でクリアに設定できたこと、またその研究推進のためのハードおよびソフ

ト両面の下地が研究室内にできあがったことが、最も大きな成果であり財産になった。

## 6 研究総括の見解:

染色体の分配の分子機構の解明は、細胞生物学のもっとも中核的な基本課題であり、当該研究者はこれに正面から挑戦した。実験の場を移動したことから当初その深刻な影響が懸念された。しかし、それを見事にクリアした能力は高く評価できる。これにより、研究者としての自覚を高め、大きな成長を実現、未来への展開を確実にした。今後の大きな発展を期待してよい。また、本課題は研究者も述べているように発癌機構の解明へと繋がっている。その重要性を指摘しておきたい。たとえば、細胞の癌化がカリオタイプの異常な変化を必ず伴っていることは昔からよく知られているが、その重要な生物学的意味は未解決のまま現在に至っている。

## 7 主な論文等:

論文(論文 8 報、総説等 9 報)

1. Chen ES, Saitoh S, Yanagida M, Takahashi K. A cell cycle-regulated GATA factor promotes centromeric localization of CENP-A in fission yeast. *Molecular Cell*, 11; 175-187, 2003.
2. Chen ES, Yanagida M, Takahashi K. Does a GATA factor make a bed for centromeric nucleosomes? *Cell Cycle*, 12; 277-278, 2003.
3. Hayashi T, Fujita Y, Iwasaki O, Adachi Y, Takahashi K, Yanagida M. Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell*, 118; 715-729, 2004.
4. Takahashi K, Takayama Y, Masuda F, Kobayashi Y, Saitoh S. Two distinct pathways responsible for the loading of CENP-A to centromeres in the fission yeast cell cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360; 595-607, 2005.
5. Saitoh S, Ishii K, Kobayashi Y, Takahashi K. Spindle checkpoint signaling requires the Mis6 kinetochore subcomplex, which interacts with Mad2 and mitotic spindles. *Molecular Biology of the Cell*, 16; 3666-3677, 2005.

招待講演(8 件)

1. Kohta Takahashi, Two distinct pathways responsible for centromere localization of CENP-A in fission yeast. The 3rd international fission yeast meeting, San Diego, 2004 年 8 月 24 日 - 29 日
2. Kohta Takahashi, Two distinct cell cycle phases responsible for centromere localization of CENP-A in fission yeast. The Royal Society discussion meeting on chromosome segregation,

London, 2004 年 9 月 27 日－28 日

3. 高橋考太, セントロメア特異的ヒストン CENP-A の局在化機構, 日本分子生物学会第 5 回春季シンポジウム「新しい研究視野の提示」, 新潟, 2005 年 5 月 20 日－21 日
4. Kohta Takahashi, Backup reloading of centromeric histone CENP-A during gap phase prior to mitosis, The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Symposium, Biology of Centromeres, Omiya, 2005 年 6 月 15 日－17 日
5. 高橋考太, セントロメア機能破綻が引き起こす染色体分配異常, 第 28 回日本分子生物学会年会シンポジウム「細胞周期の制御と癌化の接点」, 福岡, 2005 年 12 月 7 日－10 日