

染色体分配の制御機構の解明

—染色体分配の制御機構の解明—



深川 竜郎

国立遺伝学研究所 助教授

1. 私が知りたかったこと

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 (図 1)。

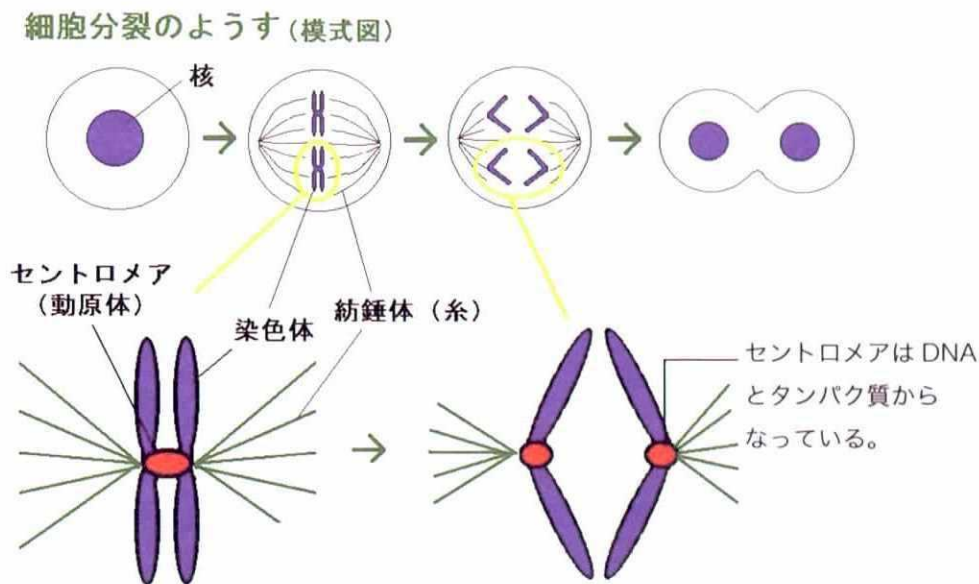


図1. 細胞分裂の模式図。セントロメアは、染色体分配に必須である。

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の不可欠な研究である。我々は、染色体分配に本質的な役割を担うセントロメアの分子構築機構と細胞周期進行制御に関わるセントロメアの機能についての研究を行なうことによって、染色体分配の分子機構を知ることが目的として研究を進めた。ニワトリ B 細胞由来の DT40 細胞をモデル細胞として、セントロメア形成に重要なインナーセントロメアタンパク質

群の分子構築や、細胞周期の進行を制御すると予想される一過的にセントロメアに局在するタンパク質群にも注目して研究を行なった。また、ヒト染色体を保有する DT40 細胞を樹立して、セントロメア DNA の意義についても研究を行った。

2. 研究の狙い

我々は、下に示すように 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とプロテオミックスを用いた新規セントロメアタンパク質の同定という 2 つの計画を平行して研究を進める。さらに、当初の計画では予定していなかったが、世界の動きのなかでの「セントロメアと RNAi マシーナリーとの関係」が注目を受けているため、我々のグループの特徴をいかし、緊急プロジェクトとして小型化染色体を用いて、セントロメアと RNAi マシーナリーとの関係を明らかにすることを目指す。

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。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う。

2) プロテオミックスおよび 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

着目する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。さらに、1) の実験と融合させて、新規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したいと考えている。

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、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 細胞を樹立している。この DT40 細胞を対象にして、RNAi マシナリーに関与する Dicer 遺伝子の条件的ノックアウト細胞を樹立する。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。

3. 結果

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 と 2) で同定した新規セントロメアタンパク質群である。それぞれの表現型解析について特徴を以下にのべる。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 NDC80 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 NDC80 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性であるため、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。ノックアウト解析から、CENP-I は、CENP-H と協調して

CENP-C の局在の関わる
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、これまでのノ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、
図 2))。

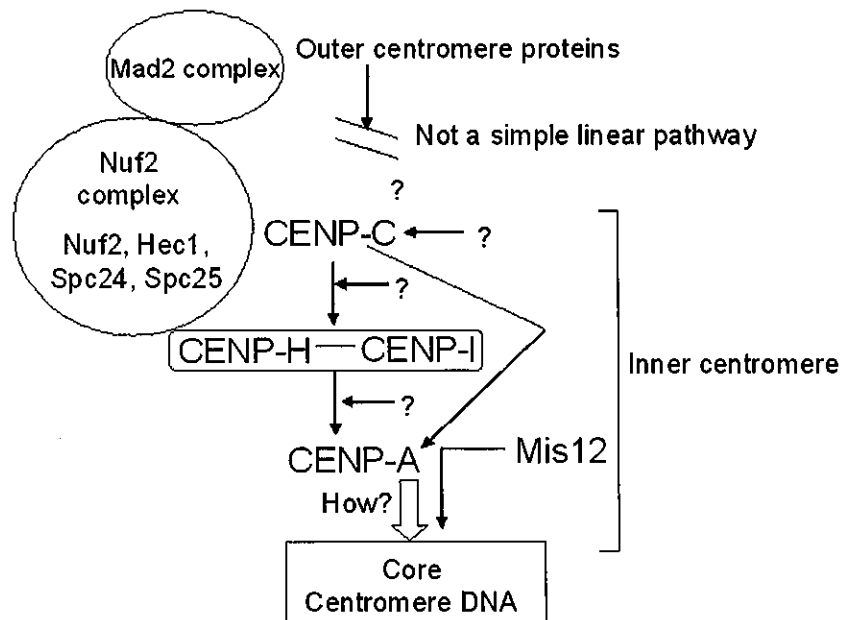


図2. 高等動物のセントロメア形成に関わる分子機構。さきがけ研究によって、CENP-Hを含む複合体にも複数のタンパク質が存在することがわかってきた。

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

Nuf2-GFP および NDC80-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、両遺伝子のダブルノ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、複数の新規セントロメアタンパク質を同定できた。

3) RNAi マシーナリーとセントロメア形成との関連説明

我々は、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 細胞を樹立している (EMBO J., 2002)。また、ヒト 21 番染色体を保持する DT40 細胞も樹立している。この 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

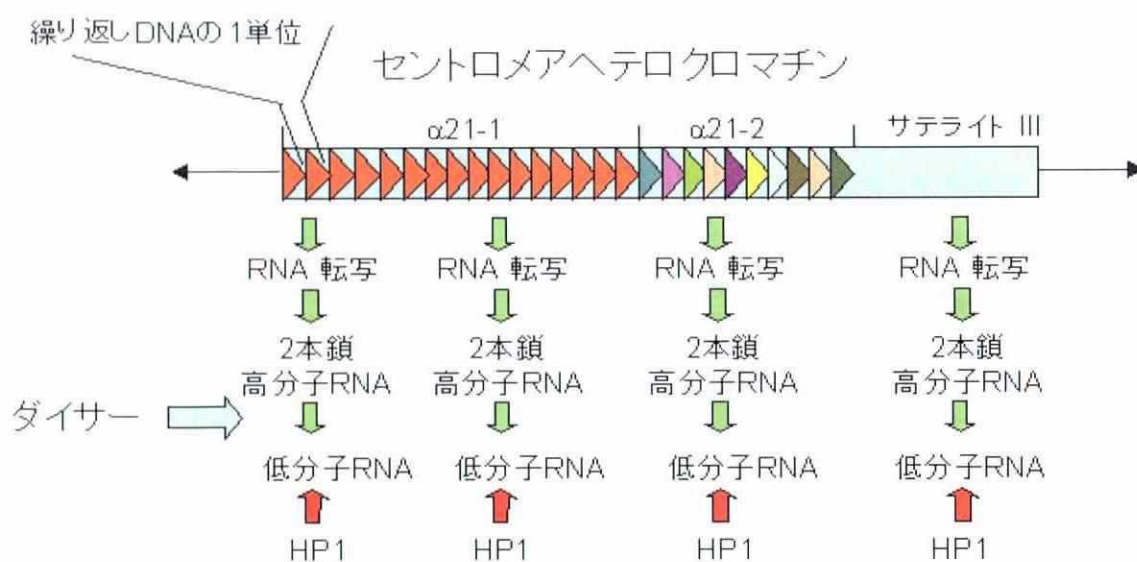


図3. ヒト21番染色体セントロメアの構成図。
繰り返し配列からのRNAがDicerによって分解される。

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、図 3)。現在、このノックアウト細胞を用いてヒト 21 番染色体の網羅的な発現解析を開始している。

参考文献

1. **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* (2004) Vol. 6, 784-791. & Cover.
2. **Tatsuo Fukagawa** "Assembly of kinetochores in vertebrate cells." *Experimental Cell Research* (2004) Vol. 296, 21-27.
3. 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* (2003) Vol. 116, 3347-3362.
4. Jenny M. Spence, Ricky Critcher, Tom A. Ebersole, Manuel Valdivia, William C. Earnshaw, **Tatsuo Fukagawa**, and Christine J. Farr "Co-localisation of Centromere Activity, Proteins and a Topoisomerase II within a subdomain of the major human X α -satellite array." *The EMBO Journal* (2002) Vol. 21, 5269-5280.
5. 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* (2002) Vol. 2, 463-476.