

# 染色体動態の時空間制御技術の開発



高橋 考太

久留米大学 分子生命科学研究所

## 1. 私が知りたかったこと

遺伝情報の運搬を担う染色体は、細胞分裂ごとに子孫細胞に正確に均等分配されなくてはならない。同時にカリオタイプの大規模変動が進化の原動力になることも知られている。安定性と可塑性の両面を併せ持つ染色体の機能ダイナミクスを解き明かしたい。

## 2. 結果

### 紡錘体形成チェックポイント Mad2 蛋白質のキネトコア局在制御

紡錘体形成チェックポイント SAC は、ヒトから酵母まで真核細胞が共通に有する細胞周期進行の監視調節機構で、M 期に染色体を非常に高い精度で娘細胞に均等分配するために重要な役割を果たしている。SAC は紡錘体微小管のキネトコアとの結合状態を逐一モニターしており、それに異常が見つかった場合には、分裂後期促進因子 APC/C のユビキチンリガーゼ活性を負に制御することにより、M 期中期で細胞周期進行を一時的に停止させるシグナル系である。SAC シグナルの活性化については比較的多くの研究報告があり、キネトコアと紡錘体微小管の連結状態が Mad2・Mad1 経路を介して、姉妹キネトコア間の張力の有無が BubR1・Bub1 経路を介して、それぞれ APC/C に情報伝達されるというモデルが提唱されている。がん化した細胞株での SAC シグナル系の変異が多数報告されているが、これはその異常により細胞が異数化する頻度が上昇するためと考えられている。

我々は、SAC シグナルのメディエーター分子である Mad2 および Bub 1 が、微小管と適切に結合していないキネトコアにのみ局在化し、SAC シグナルを発生させる分子機構の解明を目指している。これまでの 3 年間の研究では、Mad2 のキネトコア局在化機構について以下の 2 つの成果をあげた。(1) Mad2 のキネトコア局在を協調的に制御するセ

セントロメア結合蛋白質複合体として、Mis6-Sim4 複合体と Nuf2-Hec1 複合体を同定した。また *mis6* 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ないこと、SAC が活性化したときのみに Mad2 と Mis6 が物理的に相互作用すること、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)。(2) Mad2 のキネトコア局在が、Bub1 および DASH 複合体の構成因子 Dad2 の二重破壊株で全く見られなくなることを発見した。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報告されているセントロメア蛋白質である。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 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 はキネトコ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 がキネトコア局在すること、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 (Kobayashi 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

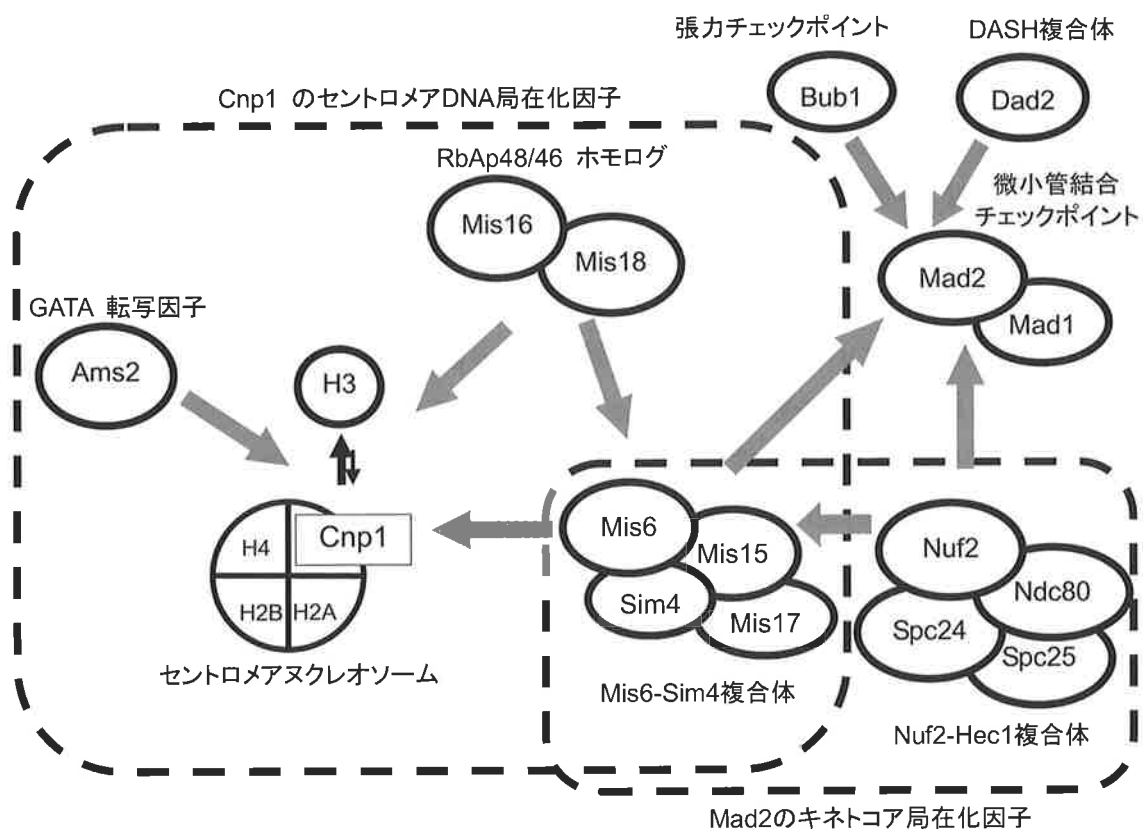
CENP-A はセントロメア特異的なヒストン H3 バリエントで、酵母からヒトまで進化的に保存されており、キネトコアのクロマチン形成と染色体の均等分配に必須の役割を果たしている。機能的なキネトコアクロマチンが形成される染色体領域には、セントロメア DNA 配列の有無にかかわらず常に CENP-A が局在化することから、CENP-A はセントロメアの identity を決定する因子の最有力候補と考えられている。我々は、分裂酵母の CENP-A ホモログ Cnp1 をクローン化し、その欠失によりキネトコア特異的なクロマチン構造が崩壊し、その結果、M 期に染色体の不均等分配がおこって大小異なった大きさの核を持つ異数体を生成して致死となることを示してきた。

分裂酵母 CENP-A の温度感受性変異株 *cnp1-1* 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 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。*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* 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)。

### 3. 考 察

分裂酵母遺伝学を駆使して、Mad2 および CENP-A のキネトコア局在機構の分子的解明 (図参照) を推進し、当初の目標に掲げた染色体分配の安定性とカリオタイプ変動の可塑性についての基本原理の一端を解き明かすことができた。今後はさらに分子的機能解明を進めるとともに、これらが進化的に保存された共通原理を構成しているのかを、ヒト培養細胞を用いた系で検証してゆく必要がある。Mad2 局在化機構の研究を通して、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ためのアウトラインを描くことができた。また Mad2 のキネトコア局在が、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 情報伝達において中心的役割を果たしていることが示唆された。さらに CENP-A の融通性のあるローディング機構の研究からは、染色体分配が起こる細胞周期 M 期に入る前の間期 (Gap 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が示唆された。これ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、紡錘体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例示することができたと考えている。



## 文献

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.

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.

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.