

染色体工学を用いたセントロメアを中心とするゲノム構築原理の解明

●深川 竜郎

国立遺伝学研究所分子遺伝研究系

＜研究の目的と進め方＞

ゲノム研究の急速な進展に伴い、多くの生物種の全ゲノム情報が明らかにされてきている。ゲノム配列が解読された後は、比較ゲノム学的視点から生物進化や発生システムのメカニズムを解明することに加えて、ゲノムそのものが構築される原理を解明することが重要となる。

我々は複雑なゲノム構築原理の内、ゲノム分配機構に焦点を当て染色体工学的な手法を用いて、高等脊椎動物のセントロメアの形成機構の解明を進めている。出芽酵母を除く多くの真核生物のセントロメア領域には繰り返しDNAが存在しているが、種間でその相同性は低い。一方ゲノム配列の蓄積により、基本的なセントロメアタンパク質は広範な種間で相同性を保持していることが明らかになってきた。「どのようにセントロメアが形成され機能するのか？」の解明を本特定研究で目指した。我々は、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、セントロメアタンパク質の解析を行っている。本特定研究では、複数のセントロメアタンパク質の系統的ノックアウトを行った。また、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も目指した。さらに、セントロメア形成におけるDNA配列の重要性を解析する目的で、セントロメアDNAおよびセントロメアから転写される可能性のあるRNAに関する研究をヒト-ニワトリハイブリッド細胞を用いて行った。

高等動物で解析が遅れていたセントロメア形成機構に関する研究を体系的に行う一連の研究は、ゲノム分配を中心とするゲノム構築原理の理解を深めることにつながる。

＜研究開始時の研究計画＞

セントロメアは、DNAと複数のタンパク質から構成されている。酵母の系を用いてのセントロメアの研究において、ある程度の理解が進んでいるが、高等動物の実験系でセントロメアDNAとタンパク質を体系的に解析した研究例は少ない。また、酵母のセントロメアタンパク質の高等動物でのカウンターパートは、配列比較から容易に見つからず、高等動物独自の解析系が必要である。我々は、ニワトリのDT40細胞のシステムを用いた染色体工学的手法によって、セントロメアDNAと複数のタンパク質群の解析を体系的に進める。具体的に扱うタンパク質や研究開始時における具体的な実験計画を以下に示す。

- 1) セントロメアタンパク質CENP-Cに関する研究として、ERシステムを用いた条件変異株や、温度感受性変異株を作成して、それらの表現型を解析する。
- 2) ショウジョウバエで染色体不安定性を引き起こすZW10の高等動物ホモログを同定して、ZW10ノックアウト細胞を作成してその表現型を解析する。また、ZW10と相互作用する因子の解析もあわせて行う。
- 3) CENP-Hはマウスでセントロメアに局在するタンパク質として同定されたが、その機能については不明であ

った。我々はTETシステムを応用してCENP-Hの条件的ノックアウトDT40細胞株を作成する。さらに、その表現型を詳細に解析して、セントロメア形成におけるCENP-Hの役割について理解を深める。

- 4) Mis6は分裂酵母で、CENP-Aのコネクター分子として報告されていたが、高等脊椎動物でその相同遺伝子の存在は知られていなかった。我々はニワトリの相同遺伝子を同定して、その細胞内局在を解析する。また、そのタンパク質がセントロメアへ局在する場合には、上記3)のCENP-Hと同様に、条件的ノックアウトDT40細胞株を作成する。さらに、その表現型を詳細に解析して、セントロメア形成におけるこのタンパク質の役割について理解を深める。
- 5) 上記のCENP-A、-C、-HおよびMis6 (CENP-I)は細胞周期を通じてセントロメアに局在する構成的セントロメアタンパク質である。これらの因子に加えて、細胞分裂期に一過的にセントロメアへ局在するタンパク質も存在して、これらのセントロメア形成における機能の解析も重要な課題である。本特定研究では、一過的にセントロメアへ局在するタンパク質であるNuf2およびNuf2と結合する因子に注目してそれらの条件的ノックアウト細胞の作成と表現型解析を行う。
- 6) セントロメア特異的ヒストンバリエーションであるCENP-Aの条件的ノックアウト細胞の作成と表現型の解析を行う。特に、CENP-AとCENP-CやCENP-Hとの関連についての解析を進める。
- 7) 上記のセントロメアタンパク質群の解析は、極めて重要であるが、まだ配列未同定のセントロメアタンパク質が存在することが予想される。したがって、M期染色体の濃縮とプロテオミックスによる新規セントロメアタンパク質の同定および、同定分子についての機能解析を行う予定である。
- 8) ヒト染色体や人工染色体を含むヒト-ニワトリハイブリッド細胞を用いてセントロメアDNAの構造解析を行う。具体的には、ヒトX染色体由来の小型化染色体を作成して、そのセントロメア構造を解析する。また、セントロメア構造がよく解析されているヒト21番染色体を保有するハイブリッド細胞を作成する。このハイブリッド細胞を活用してRNAiマシーナリーに関わるDicerのノックアウト細胞を作成して「RNAiマシーナリーとセントロメア構築との関連」の解明を目指す。

＜研究期間の成果＞

- 1) CENP-Cに関する研究として、ERシステムを用いた条件変異株を作成した。また、温度感受性変異株の作成を試み、4種類の変異株の単離に成功した。温度感受性変異株は34℃で通常に生育するが、43℃では温度移行後24h以内に80%の細胞が死滅した。ERシステムを用いた条件変異株変異株では、多くの細胞がM期で異常を示した後死滅したが、間期に死滅する細胞も観察された。温度感受性変異株では、M期の異常よりはG1/S期で増殖を停止して死滅した。これは、CENP-C

- はG1/SとM期で機能するが、温度感受性変異はG1/S期特異的な変異であることを示唆している (Nucl. Acid. Res., Fukagawa et al., 2001, 登録番号 0110311426)。
- 2) ZW10遺伝子はショウジョウバエで染色体不安定性を引き起こす変異体の原因遺伝子として単離され、M期にセントロメアに局在することが知られている。また、変異体の姉妹染色分体は微小管の重合阻害剤であるコルセミドの処理により分離してしまうことから、チェックポイントタンパク質の可能性も示唆されている。しかしながら、ショウジョウバエの変異体は蛹で致死となるため、詳細な細胞遺伝学的な研究は遅れていた。我々は、ZW10に対する抗体を作成してその細胞内局在を明らかにした (Okamura et al., Gene, 2001, 登録番号 0110311442)。また、テトラサイクリン (TET) の遺伝子発現制御システムを応用してZW10の条件的ノックアウト株を作成して、ZW10がチェックポイントタンパク質であることを示唆するデータを得た。さらにZW10と相互作用するZW250のノックアウト株を作成して、本株が紡錘体チェックポイントに関連することを見いだした。
 - 3) 新規セントロメアタンパク質CENP-Hを同定し、構成的なセントロメアタンパク質であることを示した。CENP-Hの条件的ノックアウト株を作成し、表現型を解析したところ、強い細胞分裂期遅延を起こした。さらに、CENP-HがCENP-Cのセントロメアの局在に必須の働きを行っていることを明らかにした (EMBO J., Fukagawa et al., 2001, 登録番号 0110311416)。
 - 4) 分裂酵母で、CENP-Aのコネクター分子として報告されていたMis6の高等脊椎動物でその相同遺伝子の存在を見いだした。抗体を作成して、その局在を調べた結果、細胞周期を通じてセントロメアへ局在することが明らかになった。そこで、本タンパク質をCENP-Iと呼んだ。次に、CENP-I/Mis6の条件的ノックアウト細胞を樹立して、ノックアウト細胞の詳細な表現型を解析した。ノックアウト細胞はシビアな細胞分裂期遅延を起こした。生細胞観察から、800分程度の遅延をおこすことが判明した。また、CENP-Iのノックアウト細胞では、CENP-Aのセントロメア局在が観察されたが、CENP-CおよびCENP-Hのセントロメア局在が失われた (Dev. Cell, Nishihashi et al., 2002, 登録番号 0204151604)。以上のことから、CENP-Iは、セントロメア形成に本質的な働きを担うタンパク質であると結論した。
 - 5) 細胞分裂期に一過的にセントロメアへ局在するNuf2およびHec1をニワトリ細胞から同定した。次にNuf2および、Nuf2と相互作用するセントロメアタンパク質Hec1のノックアウト株を作成した。両ノックアウト細胞株の表現系解析から、いずれの株も約450分の細胞分裂遅延を起こした後死滅することが分かった。Nuf2およびHec1の欠損した染色体のセントロメアにはCENP-C、-H、-Iが存在していた。一方CENP-HやCENP-Iのノックアウト株においてNuf2やHec1の量が減少していた。また、Hec1は細胞周期チェックポイントタンパク質であるMad2と結合していることが分かった。しかしながら、両ノックアウト細胞でBubR1の局在異常は認められなかった。さらに、FRAP実験を行いNuf2およびHec1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。これらの結果は、Nuf2複合体は、インナーセントロメアと安定した構造をとってチェックポイントタンパク質が働く「場」を提供していることを示している (J. Cell Sci., Hori et al., 2003, 登録番号 0403051759; Mol. Cell. Biol., Mikami et al., 2005 未登録)。
 - 6) セントロメアの形成は、DNAの一次配列よりは、クロマチン構造が重要な働きを担うことが、示唆されてきた。その中心的な役割を担うタンパク質がセントロメア特異的ヒストン分子であるCENP-Aである。我々は、複数種類のセントロメアタンパク質を研究してきたが、CENP-Aとの関わりについての解析が遅れていた。そこで、CENP-Aのニワトリホモログを同定してその機能解析にも着手した (Gene, Regnier et al., 2003, 登録番号 0403051820)。ニワトリでCENP-Aを同定後、DT40細胞を用いてCENP-Aの条件的ノックアウト細胞を作成して、表現型解析を行なった。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、CENP-A欠損細胞で、CENP-C、-H、-Iの局在異常が認められた。CENP-Aのノックアウト細胞でBubR1というタンパク質の局在が失われた。CENP-Aのノックアウト株では、最初に紡錘体チェックポイント機構の活性化が起きて、細胞周期がM期で遅延した後、分裂後期に入っていくことから、CENP-Aはチェックポイントの「活性化」より「維持」に影響を与えると結論した (Mol. Cell. Biol., Regnier et al., 2005, 未登録)。
 - 7) はじめに、Nuf2のかわりにNuf2-GFPを、Hec1のかわりにHec1-GFPを発現するDT40細胞を樹立した。これらの細胞から抗GFP抗体ビーズを用いた免疫沈降を行い、Nuf2およびHec1と結合する複合体の精製を行った。タンパク質複合体をSDS-PAGEで解析して得られたバンドをLC-MS/MSを用いたプロテオミクス解析することによって未同定のセントロメアタンパク質を得た。なお、LC-MS/MS解析は奈良先端大 (現京都大学) の小布施博士および神戸大の吉野博士との協力によって成果が得られた。Spc24、Spc25に加えてKm23a、bと呼ぶタンパク質を新しく得ることができた。Km23aおよびbは、細胞分裂期にセントロメアへ局在することが明らかになった。また、2004年度の後半から、CENP-HおよびCENP-Iと結合するタンパク質群の精製を試みた。本特定領域の研究期間の間には、これらタンパク質の同定や機能解析には至らなかったが、継続してこの研究課題については、解析を続けており、今後の課題である。
 - 8) ヒトX染色体からテロメア切断法を用いて小型染色体を作成してDT40細胞へ移行させた。DT40細胞内で、セントロメア領域の構造解析を細胞遺伝学的手法とパルスフィールド電気泳動法を用いた分子生物学的手法を併用して行った。それらの結果、CENP-CおよびCENP-Hタンパク質の結合する領域は長い繰り返し配列のうち100kb以内の決まった場所に限定されること、またその領域はDNAトポイソメラーゼIIの結合領域と一致することが明らかになった (EMBO J., Spence et al., 2002, 登録番号 0302151246)。
- また、セントロメアDNAの一次構造がよく解析されているヒト21番染色体を保持するDT40細胞を構築した。このハイブリッド細胞を対象にして、RNAiマシーナリーに参与する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、ヒト21番染色体のセントロメア領域からのRNA転写が確認できた。また、ゆるやかな細胞分裂遅延が観察された。CENP-AやCENP-Cといった構成的なセントロメアタンパ

ク質の異常は観察されなかったが、ヘテロクロマチンタンパク質の異常な局在が見いだされた。高等動物において、RNAiマシーナリーがヘテロクロマチン構築に関わっていることが示唆された (Nature Cell Biol., Fukagawa et al., 2004, 未登録)。

上記1)から8)の研究を通じて、現時点でのセントロメア形成におけるモデルを以下の総説のなかで提出することができた (Exp. Cell Res., Fukagawa, 2004, 登録番号0601251018; Chromosome Res. Fukagawa, 2004, 登録番号0601251022)。まだ、解析が終了していない複数のセントロメアタンパク質があるが、研究の方向性としては正しく、後5年の研究で高等動物のセントロメア形成に関する理解が深まると予想される。我々の研究は、この分野の理解に一定の貢献をしたと自己評価できる。

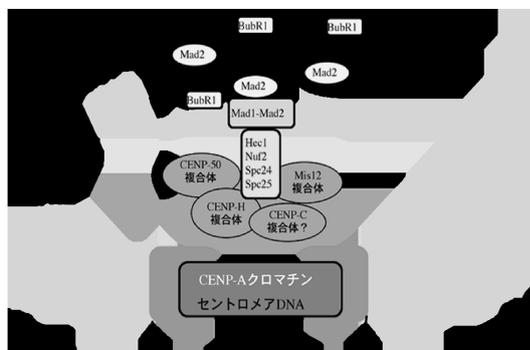


図 セントロメアを構成するタンパク質群。各複合体に複数のタンパク質が含まれていると思われる。セントロメア形成機構の理解にはこれらの因子のノックアウト解析と未知のタンパク質の同定が必須である。

〈国内外での成果の位置づけ〉

セントロメアの形成機構を理解するために、これまで酵母を用いた研究が広く行われてきた。数年前から、米国のKarpenらがハエを対象にした遺伝学解析から、ドイツのHymanらが線虫の大規模なRNAi実験から新しいセントロメアタンパク質の同定を目指している。高等動物では、1997年に我々のグループがセントロメアと人工染色体の研究にDT40細胞を適用して以来、英国のEarnshawらを含む国内外の複数のグループがDT40細胞を用いたセントロメア研究に着手している。オーストラリアのChooのグループが、マウスノックアウト法でいくつかのセントロメアタンパク質を解析しているが、胚性致死となるケースが多く、解析が深まっていない。我々はDT40細胞を用いての研究で着実に成果をあげてきており、世界をリードできる立場にあり、一連の研究は濃き内外から高く評価されており、その研究成果によって、国際染色体学会をはじめとする複数の国内外の学会から招待講演を依頼された。最近、ヒト培養細胞を対象としてRNAi実験が広く行われるようになり、セントロメア形成の理解にも適用されつつある。しかしながら、ノックアウトを中心とする遺伝学実験は変異株を作成した後、さまざまな応用が考えられRNAi法と比較して有利な点が数多くある。特に、人工染色体とDT40細胞を用いた「RNAiマシーナリーとセントロメア構築の関連解明」には遺伝子ノ

ックアウト法と人工染色体を駆使する我々の実験系が最適である。現実には、2004年に上記成果の8)をNature Cell Biol.誌へ論文発表したところ、この実験系のユニークさが、Nature Cell Biol.誌のNews & Viewsで大きく紹介された。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

5年間、公募班員という立場で本特定領域に参加して、毎年目標を定めてきた。年ごとに振り返ると達成できなかった課題は少しずつある。例えば、CENP-Aはヒストン様のタンパク質であるため、安定な構造をとっており、ノックアウトしてから特徴ある表現型が観察されるまで時間がかかる。そのため、表現型の解釈に様々な可能性が考えられ、多くの実験が必要であり解析が遅れた。そこで予定していた期間で研究が終わらなかったが、どうにか数年越しの研究で論文発表へこぎつけた。また、ZW10のノックアウト解析は一定の実験が終了したが、まだ解釈のできない表現型がでているため、現在でも論文発表へ至っていない。この課題に関しては、更なる実験が必要である。

プロテオミクス実験に関しても、当初ニワトリのゲノム解析が遅れていたため、ペプチドの同定に遅れをとったが、本特定領域が進行している最中に欧州と日本の共同グループからニワトリの全ゲノム配列が発表されたのを機に爆発的に新規セントロメアタンパク質を同定することができた。しかし、本特定領域が終了する2005年3月までにその機能解析へは至らなかった。しかしながら、大変重要な計画であり継続してこの計画は続けている。この特定領域終了後にも、プロテオミクスにより複数のタンパク質が同定でき、それらの機能解析が進むことが期待される。

〈今後の課題〉

我々のこれに関連する研究のゴールは、セントロメア形成機構を分子レベルで理解することにある。これまでの特定領域研究によって、我々のとっている研究手法すなわち「ニワトリDT40細胞やハイブリッド細胞を活用して、高等脊椎動物のセントロメア形成機構を解析する」という手法が有効であることが明らかになった。しかしながら、これまで解析したセントロメアタンパク質は10種類程度である。2003年に発表された出芽酵母のセントロメアに関する論文によると、出芽酵母のセントロメア構成タンパク質は、60種類程度存在する。高等脊椎動物のセントロメア構成タンパク質も構造の複雑さから判断すると60種類以上は存在すると予想される。現実には、本特定領域終了後に我々が行ったプロテオミクス解析でも10種類以上のセントロメアタンパク質が見いだされている。また、我々が同定したものと異なるタンパク質複合体の精製を、アメリカのグループ、名古屋大学のグループおよび京都大学のグループが行い、10種類以上のセントロメアタンパク質を同定している。我々は、本特定領域終了後も、自身で同定したタンパク質、および他のグループが同定したタンパク質問わずにDT40細胞を用いて系統的なノックアウト解析を進めている。これらの成果を総合的に判断してセントロメア形成の理解を深めることが今後の大きな課題である。また、プロテオミクス実験を繰り返して、更なるタンパク質同定も極めて重要な課題である。

我々は、ヒト染色体を保有するDT40細胞を用いてDicerのノックアウト細胞の樹立に成功した。セントロメアの形成機構の理解に本細胞を用いたが、この細胞の用

途はそれにとどまらない。RNAiマシーナリーとマイクロRNAとの関連などをゲノム規模で解析することは、大変興味深い。例えば、ヒト21番染色体を網羅するゲノムタイリングアレイを駆使することによって、RNAマシーナリーと関連するRNA分子の同定が可能になると思われる。今後の課題として大変興味深い。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 未登録

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* Vol. 25, 1958-1970 (2005)

2. 未登録

Vinciane Regnier, Paola Vagnarelli, Tatsuo Fukagawa, Tatiana Zejal, Elizabeth Burns, Didier Trouche, William Earnshaw, and William Brown "CENP-A depletion leads to impaired mitotic checkpoint maintenance in vertebrate cells." *Molecular and Cellular Biology* Vol. 25, 3967-3981 (2005)

3. 未登録

Tatsuo Fukagawa, Masahiro Nogami, Mitsuko Yoshikawa, Masashi Ikeno, Tuneko Okazaki, Yasunari Takami, Tatsuo Nakayama, and Mitsuo Oshimura "Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells." *Nature Cell Biology* Vol. 6, 784-791 & Cover (2004)

4. 0601251022

Tatsuo Fukagawa "Centromere DNA, proteins and kinetochore assembly in vertebrate cells." *Chromosome Research* Vol. 12, 557-567 (2004)

5. 0601251018

Tatsuo Fukagawa "Assembly of kinetochores in vertebrate cells." *Experimental Cell Research* Vol. 296, 21-27 (2004)

6. 登録番号 0403051820

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)

7. 登録番号 0403051759

Tetsuya Hori, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Hiroshi Kimura, and Tatsuo Fukagawa "Dynamic behavior of Nuf2-Hec1 complex that localizes to the centrosome is essential for mitotic progression in vertebrate cells." *Journal of Cell Science* Vol. 116, 3347-3362 (2003)

8. 登録番号 0302151246

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* Vol. 21, 5269-5280 (2002)

9. 登録番号 0302151257

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. 登録番号 0204151604

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)

11. 登録番号 0204151555

Eiichiro Sonoda, Takahiro Matsusaka, Ciaran Morrison, Paola Vagnarelli, Osamu Hoshi, Tatsuo Ushiki, Kuniharu Nojima, Tatsuo Fukagawa, Irene C. Waizenegger, Jan-Michael Peters, William C. Earnshaw, and Shunichi Takeda "Scc1/Rad21/MCD1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells." *Developmental Cell* Vol. 1, 759-770 & cover (2001)

12. 登録番号 0110311426

Tatsuo Fukagawa, Vinciane Regnier, and Toshimichi Ikemura "Creation and characterization of temperature-sensitive CENP-C mutants in vertebrate cells." *Nucleic Acids Research* Vol. 29, 3796-3803 (2001)

13. 登録番号 0110311416

Tatsuo Fukagawa, Yoshikazu Mikami, Ai Nishihashi, Vinciane Regnier, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Naoko Sugata, Kazuo Todokoro, William Brown, and Toshimichi Ikemura "CENP-H, a constitutive centromere component, is required for centromere targeting of CENP-C in vertebrate cells." *The EMBO Journal* Vol. 20, 4603-4617 (2001)

14. 登録番号 0110311442

Atsushi Okamura, Carlos Pendon, Manuel M. Valdivia, Toshimichi Ikemura, and Tatsuo Fukagawa "Gene Structure, chromosomal localization and immunolocalization of chicken centromere proteins CENP-C and ZW10." *Gene* Vol. 262, 283-290 (2001)

2) データベース

無し

3) 特許

無し

4) その他

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 深川竜郎 “染色体分配到に必須な構造：動原体” 細胞工学(2003) Vol. 22, 267-271.

6. 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.

7. Eiichiro Sonoda, Tatsuo Fukagawa, Aki Kitao, and Shunichi Takeda "Generation and Phenotype Analysis of Conditionally Inactivated Mutant cells" *International Congress Series, Elsevier Sciences* (2002) pp54-74.