

セントロメア機能制御系の構築を軸にしたゲノム伝達操作技術の開発

●高橋 考太

久留米大学 分子生命科学研究所 細胞工学研究部門

〈研究の目的と進め方〉

本研究は、細胞周期と染色体の研究に先導的な役割を果たしてきた分裂酵母を用いた分子遺伝学的アプローチにより、染色体がどのようにして娘細胞に均等に分配されるのか、その分子基盤を解明することを目的とする。特にこの均等分配過程に中心的な役割を果たすと考えられる、セントロメア領域のヌクレオソームのみに存在するヒストンH3バリエーションCENP-Aの局在化機構に焦点を絞って研究を進める。我々が見いだしたCENP-Aの局在化因子Mis6、およびCENP-Aヌクレオソームのリモデリング因子Ams2の属する複合体構成と制御ネットワークを解明することにより、将来的には、染色体の挙動を人為的に操作する技術を開発したい。

〈研究開始時の研究計画〉

2001年度

- 1) セントロメアクロマチンの詳細な構造解析に向け、分裂酵母セントロメア領域へのin vivoフットプリント法の適用とそれを用いた分裂期欠損変異細胞中のセントロメアクロマチンの構造解析を行う。
- 2) ヒストンの分子遺伝学を確立するため、まず分裂酵母ヒストンH3、H4遺伝子の多重破壊株を作成する。
- 3) CENP-Aと遺伝的に相互作用する因子の解析に着手、今年度は特にCENP-A温度感受性変異株の多コピーサプレッサーAms2の機能解析に焦点を絞る。

2002年度

CENP-Aのセントロメア局在活性とMis6およびGATAファクターAms2の関わりについてデータをブラッシュアップし論文にして公表する。

- 1) CENP-Aの局在化にAms2とMis6が関わっているかどうかを検討する。
- 2) Ams2が直接セントロメアに結合している可能性についてChIP法およびゲルシフト法で検討する。
- 3) Ams2結合によるセントロメアクロマチンの構造変化を調べるために、in vivoフットプリント法のセントロメア領域への適用を検討する。

〈研究期間の成果〉

2001年度

- 1) 反復配列に富む分裂酵母セントロメア領域内でユニークPCRプライマーを選定、球菌ヌクレアーゼ消化クロマチンサンプルに対してフットプリンティングを行い、実験系を立ち上げた。
- 2) ゲノム中3コピー存在するヒストンH3、H4遺伝子を異なるマーカー遺伝子で置き換え、それぞれがゲノム上1コピーになった多重破壊株を作成。ヒストンH2B遺伝子の温度感受性変異株も取得。
- 3) セントロメアのクロマチン構造は一度崩壊しても、細胞周期に依存せず速やかに再構築できることを示唆するデータを得た。これはCENP-Aの融通性のあるローディング機構に依存している可能性がある。またそのローデ

ィング制御に関わる転写因子として新規のGATA因子Ams2を同定。Ams2は転写因子でありながらセントロメアDNAにも結合し機能していることを示した。

2002年度

当初の予定通りAms2の論文を公表することができた。またMis6の遺伝的相互作用因子の同定について大きな進展があった。

- 1) CENP-Aの局在には少なくとも2つの遺伝的物理的に異なったパスウェイが存在し、Ams2によるセントロメアヌクレオソームのリモデリングとMis6によるCENP-Aの捕捉もしくは安定化が必要らしいことがわかった。
- 2) ChIP法によりAms2はCENP-Aの局在化しているセントロメア中央コア領域に結合していることがわかった。さらにこの領域内のGATAをコアにする配列に特異的に結合していることをゲルシフト法で明らかにした。
- 3) Ams2が細胞周期に依存してタンパク量およびその修飾状況を制御されているGATAファクターであることを示唆するデータを得た。
- 4) Mis6温度感受性変異の多コピーサプレッサー遺伝子のスクリーニングを開始し、新規セントロメア遺伝子Mix1を分離した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

CENP-Aの制御因子の研究は世界的にも我々の研究グループが常に最先端でリードしている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

2001年度

1)のフットプリンティングに技術的な問題を抱えている。DNAサンプルの純度の問題と思われる。詳細な解析にはさらに技術的なブラッシュアップが必要。他の課題は順調に進展。

2002年度

3)の研究課題については、進展が遅れた。2002年度は研究代表者が久留米大学に移動し新しい研究室を発足させたため、In vivoフットプリント法のセントロメア領域への適用に必要な種々の機器のセットアップが間に合わなかった。バイオイメージング解析装置などの高額備品の整備は現在も見通しがついておらず、3)の研究課題についてはしばらく見合わせざるを得ない。研究費獲得による備品整備が次年度の重要課題である。他の課題については順調に進展、予想以上の成果を得た。特にMix1の同定については、そのポテンシャルなヒトホモログの存在が示唆されていて興味深い結果となった。

〈今後の課題〉

2001年度

3)のAms2とCENP-Aのローディングに関しては現在論文を投稿準備中。データのブラッシュアップを計り早期の発表を目指す。Ams2の転写因子としてのターゲットの

同定、セントロメア結合の生理的意義、それらの機能的関連について検討する。

1)、2)については、計画に沿って基本的解析技術の開発をさらに進める。研究代表者は平成14年4月1日より久留米大学分子生命科学研究所に新しい研究グループを発足させる。現在順調に進行中の研究を引き継ぎ滞りなく遂行させるために、まとまった複数年の助成が必要。

2002年度

Mis6については分裂酵母からその複合体を精製し、その構成因子を網羅的に同定することを目指す。また遺伝的相互作用因子として同定したMix1の機能解析を進める。どういうメカニズムでMis6変異を相補するのか、Mis6複合体に含まれるのかを検討する。Mix1にはポテンシャルなヒトホモログも存在するようなので、これが機能的ホモログであるかどうかを検討する。

Ams2はセントロメアに結合するGATA転写因子である可能性が高い。セントロメアで転写因子が何をしているのか、それがCENP-Aの局在化にどのようなレベルで影響するのかを調べる。またAms2下流のターゲット遺伝子の同定、ならびにその修飾制御の生理的意義を明らかにすることが重要と考えているので、これらの解析に必要な株やプラスミドなどの基本的材料を構築する。

発表論文 (0303292140) の要旨

分裂酵母セントロメア特異的ヒストンH3バリエーションcnp1変異の多コピーサプレッサー遺伝子としてヒストンH4および新規GATA転写因子型zinc fingerタンパク質Ams2をクローン化した。ams2破壊株ではCnp1のセントロメア局在が顕著に低下、M期における常染色体の高頻度脱落により、極めて深刻な生育遅延が起こる。ヒストンH4もしくはCnp1の増量でこの生育遅延が大部分相補されることから、Ams2はセントロメアクロマチン形成にヌクレオソームレベルで関与する制御因子である可能性が示唆された。面白いことに、野生株細胞中においてもAms2をectopicに増量するだけで、局在能を失ったcnp1変異タンパク質をセントロメアへ細胞周期非依存的に再ローディングすることができることを発見した。Ams2は染色体が倍加するG1/SからG2初期にかけて増量しクロマチン領域に局在する。またAms2がCnp1の結合するセントロメア中央領域に存在するGATAコア配列に強く結合することも明らかにした。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文／プロシーディング

1. 0303292140

Chen, ES., Saitoh, S., Yanagida, M., and Takahashi, K., A cell cycle-regulated GATA factor promotes centromeric localization of CENP-A in fission yeast, *Molecular Cell*, 11, 175-187 (2003).

2) データベース／ソフトウェア

なし

3) 特許など

なし

4) その他顕著なもの

なし