

CENP-A 転写変動がセントロメア形成に与える影響

帝京大学 理工学部 バイオサイエンス学科
高山 優子

1. 目的

染色体不安定性による染色体数の変化は、癌化やダウン症などの疾患に直結する現象である。そのため、細胞には染色体を安定に維持するための染色体分配監督機構が備わっている。染色体分配において最も注目されるセントロメア領域では、ヒストンバリエントCENP-Aとヒストンがセントロメア特異的なヌクレオソームを形成しており、CENP-Aの異常などによりセントロメア機能が失われると、異数体細胞が出現することが知られている。私はこれまでの研究から、CENP-Aがセントロメアに局在するためには、セントロメアヌクレオソームを作るCENP-Aとヒストンの供給バランスが重要であることを見出している。残念ながら、現在までCENP-Aの供給メカニズムについての報告はほとんどない。そこで、CENP-A転写変動がセントロメアヌクレオソーム形成に与える影響を解析することを目的にし、染色体分配監督機構の分子解明を目指すことを目的とする。

私はこれまで、分裂酵母を研究材料に CENP-A のセントロメア局在化機構について研究を進めてきた。分裂酵母 Ams2 は、コアヒストン転写因子であり、S 期のヒストン転写活性化に必須な因子である (Takayama and Takahashi, NAR, 2007)。Ams2 遺伝子欠失細胞では、CENP-A が S 期にセントロメアから消失する。正常細胞では、複製された DNA を保護するために必要なヒストンの合成が S 期に増加するが、Ams2 遺伝子欠失細胞では S 期にヒストン転写が起こらず、ヒストン供給がアンバランスになり CENP-A がセントロメア局在できないことがわかった (Takayama et al., MBC, 2008)。この結果は、CENP-A のセントロメア局在には、セントロメアヌクレオソームを作るための CENP-A とヒストンの供給バランスが重要であることを示唆している。また、分裂酵母コアヒストン転写制御について世界に先駆けて詳細に解析してきた (Takayama et al. Dev. Cell, 2010)。ヒストン遺伝子の転写リズムが狂うと、ヌクレオソーム形成が正しく行われず、セントロメアに通常は存在しないヌクレオソームが挿入されるために染色体分配異常による細胞死を引き起こすことがわかった。このように、ヌクレオソームを形成するヒストンの転写は、その異常が細胞の生死にかかわるがゆえに、厳密にコントロールされている。しかし、ヒストンバリエントである CENP-A の転写制御はこれまでに報告がほとんどない。なぜなら、多くの研究が CENP-A を含む動原体タンパク質複合体を研究ターゲットにしており、それらタンパク質を作る「転写」のステップに焦点を当てた研究がなされていないためである。

そこで本研究では、CENP-A 転写変動がセントロメアヌクレオソーム形成に与える影響を明らかにすることを目的としている。

2. 方法

(1) CENP-A プロモーターの人為的改変によるセントロメア構造への影響

(1-1) プロモーター改変型CENP-A遺伝子をもつ細胞株の作成

恒常発現型CENP-Aは、培地中のチアミン有無により発現のON/OFFが可能なnmtプロモーター、細胞周期依存型はG1期 (CENP-A遺伝子)・S期 (ヒストン遺伝子)・G2期 (Spd1遺伝子)・M期 (Plol1遺伝子) プロモーターをN末側にGFPを融合させたCENP-A遺伝子上流に導入した。これらのプロモーター改変型CENP-A遺伝子は、CENP-A温度感受性変異株 (*cnp1-1*) のLys1座位に挿入し、サザンブロット法により正確にゲノムに挿入されていることを確認した。

(1-2) プロモーター改変型CENP-Aの細胞増殖に対する影響

プロモーター改変型CENP-A細胞株とCENP-A遺伝子破壊株と掛け合わせ、四分子解析を行った。

(1-3) プロモーター改変型CENP-Aのセントロメア構造への影響

細胞周期依存型CENP-A細胞株はEMM2培地中26°Cで培養し、メタノールで固定した。恒常発現型CENP-A細胞株はチアミンを添加したEMM2培地中26°Cで終夜培養し、細胞を回収・洗浄後、チアミンなしのEMM2培地中26°Cで26時間培養することでCENP-Aを発現させ、メタノール固定を行

った。固定した細胞はPBSで洗浄後、DAPI染色液と混合して蛍光顕微鏡観察(Leica)を行った。

(2) CENP-A 転写制御に関わる因子の同定

(2-1) 細胞周期特異的 cDNA ライブラリーの調製

cdc25-22 温度感受性変異株は、高温条件下 (36°C) 培養により G2 後期に細胞周期を停止し、低温下 (26°C) に戻すことで細胞周期を同調的に進行させることができる。その特性を用いて、36°C で 3 時間の培養により G2 後期に同調後、26°C に培養液を戻し細胞周期を進行させた。20 分間隔で細胞を回収し、RNA 調製および隔壁形成率の計測を行った。隔壁形成率を細胞周期の目安とし、G2 後期～S 期初期までの RNA 試料から SMART cDNA synthesis(Clontech)用いて cDNA ライブラリーを作成した。

(2-2) Yeast one-hybrid を用いてのスクリーニング

CENP-A プロモーター領域には、細胞周期依存的に発現制御される配列 (MluI box) が存在する。そこで、Yeast one Hybrid 用の Bait には MluI box を持つプロモーターと持たない 2 種類を Aureobasidin A 耐性遺伝子上流に挿入した。ライブラリースクリーニングでは、Matchmaker Gold Yeast One-Hybrid library screening system(Clontech)に従い SD-Leu 150 ng/ml Aureobasidin A のプレート上 30°C で培養し、増殖した細胞を 1 次スクリーニング陽性細胞とした。2 次スクリーニングには、SD-Leu 200 ng/ml Aureobasidin A プレートを用いた。

3. 結果 研究成果

(1) CENP-A プロモーターの人為的改変によるセントロメア構造への影響

(1-1) プロモーター改変型 CENP-A 遺伝子をもつ細胞株の作成

CENP-A 遺伝子のプロモーターを恒常発現型、および細胞周期依存型 (G1 期・S 期・G2 期・M 期) に置換した細胞株を作製した。CENP-A 遺伝子は増殖に必須であるため、CENP-A 座位には温度感受性変異型を持たせておき、栄養要求性マーカーである *Lys1* 座位にプロモーター置換型 CENP-A を導入した。また、プロモーターを変化させた CENP-A の挙動がわかるように N 末側に GFP を融合させた。このように作成した細胞株はゲノム上に 2 コピーの CENP-A 遺伝子を持つが、高温条件下 (33°C) では CENP-A 座位に存在する温度感受性変異遺伝子は機能しないため、プロモーター置換型のみ解析が可能である。プロモーター置換型 CENP-A が致死の場合は、低温条件下 (26°C) で生育させることでプロモーター置換型の CENP-A の挙動を解析することが可能である。

プロモーター置換型 CENP-A が転写されていることを確認するために、RT-qPCR を行った。細胞周期依存型では多少発現量にばらつきはあるが、作成したすべてのプロモーター改変型 CENP-A 細胞株において GFP-CENP-A の mRNA を確認できた。次に、タンパク質が発現しているかを確認するために Western blot 解析を行った。CENP-A タンパク質は細胞内の存在量が少ないために Western blot 解析で確認することができなかったが、蛍光顕微鏡観察ではすべての細胞株で GFP シグナルが確認できる (1-3 参照) ことから、プロモーター置換型 CENP-A タンパク質は合成されていると考えている。

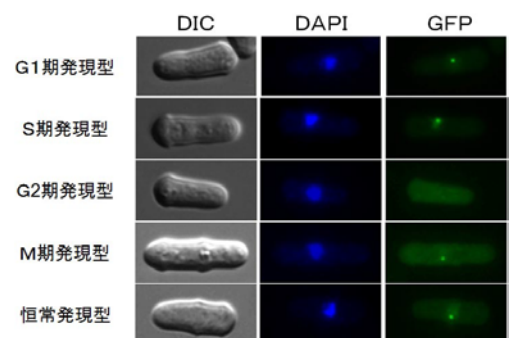
(1-2) プロモーター改変型 CENP-A の細胞増殖に対する影響

(1-1) で作成したプロモーター改変型細胞株を、低温条件下 (26°C) ・高温条件下 (33°C) で細胞培養を行った。低温条件下では、恒常発現型・細胞周期依存型どちらも生育可能であった。しかし、高温条件下では G2 期転写型のみ細胞増殖することができなかった。この実験では、CENP-A 座位に CENP-A 温度感受性変異遺伝子が存在しているため、CENP-A 座位の遺伝子を欠失しプロモーター改変型 CENP-A のみ持つ細胞株の取得を試みた。恒常発現型・G1 期・S 期・M 期転写型は、CENP-A 座位欠失型の二重変異株が取得できたが、G2 期転写型と CENP-A 座位欠失型を両方持つ遺伝型を取得することができなかった。これらの結果は、G2 期転写型 CENP-A は正常に機能できないことを示唆している。

(1-3) プロモーター改変型 CENP-A のセントロメア構造への影響

(1-1) で作成したプロモーター改変型 CENP-A には、機能に影響しない N 末側に GFP を導入してあるため、改変型 CENP-A の細胞内局在を観察することが可能である。

(1-2) の結果から、G2 期転写型 CENP-A は機能を失っていることが示唆された。この機能不全の原因を調べるために GFP-CENP-A の細胞内局在を確認した。分裂酵母 CENP-A はセントロメア特異的に局在化するために、核内に GFP シグナルが 1 点確認できる (Takayama et al, MBC, 2008)。恒常発現型・G1 期・S 期・M 期転写型は、核内に 1 点の GFP シグナルが観察された。しかし、G2 期転写型では特徴的なセントロメアシグナルは観察されなかった (図参照)。この



結果は、G2期転写型CENP-Aは機能部位であるセントロメアに局在できないことを示しており、転写のタイミングによりCENP-Aのセントロメア局在に影響が出ることがわかった。

(2) CENP-A 転写制御に関わる因子の同定

(2-1) 細胞周期特異的 cDNA ライブラリーの調製

CENP-A は G1 期に転写されるため、転写制御する因子は G1 期にもっとも発現していると考えられる。そのためスクリーニングには、G1 期細胞の RNA から作成したライブラリーを使用することが効果的と考えた。そこで、*cde25-22* 温度感受性変異株を用いて細胞の同調培養を行い、各細胞周期の細胞から RNA を調製した。隔壁形成率を細胞周期の目安とし、G2 後期～S 初期までの RNA 試料を用いて cDNA ライブラリーの作成を作製し、以下のスクリーニングに使用した。

(2-2) Yeast one-hybrid を用いてのスクリーニング

CENP-A プロモーター領域には、細胞周期依存的に発現制御する配列 (MluI box) を含んでいる。そこで、MluI box を持つプロモーターと持たない 2 種類の配列を Bait に用いて、Yeast one-hybrid 法を行った。このシステムでは、タンパク質が Bait に結合すると Aureobasidin A に抵抗性を示す。約 16000 種類の細胞をスクリーニングし、Aureobasidin A に抵抗性を示す細胞を 1700 個得た。これは全スクリーニングの約 9% に当たり、偽陽性も含まれていると考えている。現在、偽陽性を除くために高濃度の Aureobasidin A に抵抗性を示す細胞の選択を行っている。この 2 次スクリーニング陽性細胞からプラスミドを回収し、再度 yeast One-Hybrid 用細胞に導入し、Aureobasidin A 耐性を示すかどうか検討していく予定である。

4. 考察 まとめ

CENP-A はセントロメアの identity を決める重要な分子であり、CENP-A とタンパク質相互作用する分子はこれまで多く見つかってきており、動原体を構成する因子が解明されつつある。しかし、CENP-A タンパク質を作るうえで重要な転写レベルの研究報告は現在までほとんどない。そこで本研究では CENP-A の転写調節機構の解明を目指し、①人為的改変による転写時期の変化と②CENP-A 転写因子の同定を試みた。

①人為的改変による転写時期の変化

分裂酵母の CENP-A 遺伝子は、G1 期に転写されることが報告されている (Takahashi et al, Science, 2000)。このような CENP-A の転写時期が重要であるかを調べるため、恒常発現型・S 期・G2 期・M 期に発現させるようにプロモーターを改変した細胞を作製した。興味深いことに、G2 期に転写を変化させた CENP-A のみ細胞増殖することができず、G2 期に転写させた CENP-A がセントロメアに局在できないことが原因であることがわかった。このように、CENP-A の転写時期と機能に関連があることを明らかにできた。CENP-A のセントロメア局在には、シャペロンである Scm3 が必要であることが報告されており、今後は Scm3 のシャペロン活性と CENP-A の転写時期の関連について検討していきたい。

②CENP-A 転写因子の同定

CENP-A プロモーターを bait にした Yeast one-hybrid は、1 次スクリーニングの段階である。現在は、得られた候補遺伝子の 2 次スクリーニングを進めており、順次遺伝子同定に進める予定である。

5. 発表論文、参考文献

Takayama, Y., and Takahashi, K. (2007). Differential regulation of repeated histone genes during the fission yeast cell cycle. *Nucleic Acids Res* 35, 3223-3237.

Takayama, Y., Sato, H., Saitoh, S., Ogiyama, Y., Masuda, F., and Takahashi, K. (2008). Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast. *Mol Biol Cell* 19, 682-690.

Takayama, Y., Mamnun, Y. M., Trickey, M., Dhut, S., Masuda, F., Yamano, H., Toda, T., and Saitoh, S. (2010). Hsk1- and SCF^{Pof3}-dependent proteolysis of *S. pombe* Ams2 ensures histone homeostasis and centromere function. *Dev Cell* 18, 385-396.

Takahashi, K., Chen, E. S., and Yanagida, M. (2000). Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science* 288, 2215-2219