

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 20 年度博士課程 入学  
氏 名 本田 貴史  
指導教員名 渡邊 嘉典

論文題目 分裂期染色体インナーセントロメアの形成機構に関する研究

### 1. 序論

全ての生物にとって染色体を正しく分配することは遺伝情報を次世代に正確に伝える上で非常に重要である。ヒトでは、体細胞分裂での染色体分配の誤りは細胞の癌化の、また減数分裂での誤りは先天性遺伝疾患の原因となることが知られている。したがって、染色体分配の分子メカニズムの理解は医学的見地からも大きな意味を持つ。

細胞周期の S 期に複製された染色体は、コヒーシンと呼ばれるタンパク質複合体によって接着される。分裂期に進行すると、染色体腕部のコヒーシンは Plk1 キナーゼによるリン酸化に依存して除かれ、姉妹染色分体はセントロメア（染色体の長腕と短腕が交差する部位）に残存したコヒーシンによって接着を維持される。この接着により、細胞が姉妹染色分体を分配すべきペアとして認識することが可能になる。シュゴシンは分裂期に姉妹動原体の間のインナーセントロメアと呼ばれる領域に局在して、コヒーシンの解離を防ぐ因子として知られている。分裂中期になるとスピンドル微小管が姉妹動原体を反対方向から捕らえること（二方向性結合）で染色体が整列する。この二方向性結合の達成には、頻繁に起きる間違った結合を修正する必要がある、この修正の過程に Aurora B キナーゼ、

INCENP、Borealin、Survivin から構成される複合体（CPC）が重要な役割を果たしている。CPC はシュゴシンと相互作用することでインナーセントロメアに局在することが示唆されている。

このようにインナーセントロメアは染色体分配に必須の「姉妹染色分体接着の制御」および「微小管-動原体結合の修正」が行われる非常に重要な染色体ドメインであるが、それがいかにして形成されるのか明らかにされていない。本研究はシュゴシンおよび CPC のインナーセントロメアへの局在化機構を明らかにすることで、インナーセントロメアを規定する分子メカニズムを解明することを目的とした。

## 2. Bub1 による H2A-T120 のリン酸化はシュゴシンのインナーセントロメア局在を促進する

シュゴシンのインナーセントロメア局在は動原体に局在するキナーゼ Bub1 に依存することが知られており、当研究室の川島により分裂酵母 Bub1 がヒストン H2A (Ser121 残基) を基質とすることが示された。私はヒト細胞におけるこのリン酸化の保存性と生理的意義について解析を行った。

まず、*in vitro* でヒトにおいても Bub1 が H2A の分裂酵母 Ser121 残基に相当する Thr120 残基をリン酸化することを確認した。このリン酸化の細胞周期を通じた制御を調べたところ、H2A-T120 のリン酸化は Bub1 の局在に依存して分裂期特異的にセントロメア領域で起きていることが明らかになった。次に、この H2A のリン酸化がシュゴシンの局在を制御する可能性を検討するために、H2A-T120 のリン酸化を特異的に認識する抗体を分裂期細胞にインジェクションしたところ、シュゴシンのインナーセントロメアへの集積が失われた。したがって、ヒトの細胞においても Bub1 が H2A-T120 のリン酸化を介してシュゴシンの局在を制御することが明らかになった。また、Bub1 とヒストン H2B の融合タンパク質を発現させたところ、この融合タンパク質は染色体全体に取り込まれ、本来セントロメアでのみ起こる H2A-T120 のリン酸化が染色体全体で起きた。それに従い、シュゴシンも染色体全長にわたって局在したことから、H2A-T120 のリン酸化がシュゴシンの局在を制御することが確認された。次に、H2A-T120 のリン酸化によるシュゴシンの局在制御の分子機構を明らかにするために、*in vitro* pull-down アッセイによりヒストンとシュゴシンの相互作用を検討したところ、シュゴシンは保存された SGO モチーフと呼ばれる部分で、H2A-T120 のリン酸化に依存してヌクレオソームと直接結合することが明らかになった。このリン酸化による相互作用の促進は H2A タンパク質単独では観察されなかったことから、シュゴシンはリン酸化 H2A を含むクロマチンとヌクレオソーム単位で相互作用していることが示唆された。

## 3. Haspin による H3-T3 のリン酸化は CPC のインナーセントロメア局在を促進する

CPC の機能を阻害した細胞では間違った微小管-動原体結合が修正されずに残るため、染

染色体の整列異常が観察される。分裂期キナーゼ Haspin はヒストン H3 の Thr3 残基をリン酸化するキナーゼであり、Haspin の RNAi によっても CPC 阻害細胞と類似した染色体の整列異常が起こることが報告されていた。この表現型の類似性から Haspin が CPC の局在制御因子である可能性を疑い検証した。

まず、Haspin の RNAi を行い CPC の局在を観察すると、期待通りインナーセントロメアへの局在が失われていた。Haspin による H3-T3 のリン酸化は分裂前中期にインナーセントロメアで強く見られ、CPC と共局在することから、Thr3 残基をリン酸化された H3 が CPC と相互作用することにより CPC の局在を制御する可能性が考えられた。そこで、*in vitro* pull-down アッセイにより H3 と CPC の相互作用を調べたところ、CPC サブユニットの一つ Survivin が Haspin による H3-T3 のリン酸化に依存して H3 と結合することが明らかになった。CPC のインナーセントロメア局在に必要な Survivin の BIR ドメインに変異を導入することによりリン酸化 H3 との相互作用が失われたことから、BIR ドメインがリン酸化 H3 の認識を行うと考えられる。重要なことに、*in vitro* でリン酸化 H3 と結合できない変異型 Survivin は、細胞内でインナーセントロメアに局在できなかった。さらに、Haspin の過剰発現により染色体全体で H3-T3 のリン酸化が起こる状況を作り出すと、CPC も染色体全体に広がった。以上の結果から、Haspin による H3-T3 のリン酸化が H3 と Survivin の相互作用を促進することで、CPC をインナーセントロメアへ局在化させることが明らかになった。

また、解析の過程で Haspin による H3-T3 のリン酸化がコヒーシんに依存していることを見出した。実際、H3-T3 のリン酸化は、コヒーシスが染色体全長に存在する分裂前期には染色体全長で見られ、コヒーシスがセントロメアにのみ存在する分裂前中期にはセントロメアに限定される。CPC は分裂前期には染色体全体に局在し、分裂中期にかけてインナーセントロメアへと局在を変化させることが知られている。本研究結果によって、CPC のインナーセントロメアへの局在化機構のみならず、前期から中期にかけての局在変化の分子機構を明らかにすることができた。

#### 4. インナーセントロメアは H2A-T120 と H3-T3 のリン酸化が同時に起こる染色体領域に形成される

CPC のインナーセントロメア局在はシュゴシンとの相互作用に依存することが知られていることから、CPC とシュゴシンは複合体としてインナーセントロメアに局在していると考えられる。Bub1 による H2A リン酸化がシュゴシンに認識され、Haspin による H3 のリン酸化が CPC に認識されるというここまでの解析結果を併せて考えると、CPC のインナーセントロメアへの局在（インナーセントロメアの形成）は 2 種類のヒストンのリン酸化修飾によって制御されることができると考えることができる。2 つのヒストン修飾がインナーセントロメアを規定する分子機構を明らかにするために、リン酸化 H2A-T120、リン酸化 H3-T3 および CPC の局在位置を詳細に比較した。リン酸化 H2A-T120 が姉妹動原体ペアを繋ぐように伸

びたシグナルとして観察されたのに対し、リン酸化 H3-T3 はリン酸化 H2A-T120 と直交するように姉妹染色分体間に観察された。興味深いことに CPC は 2 つのリン酸化が同時に起こる染色体領域に局在していた。これは、シュゴシンと CPC が複合体として 2 つのリン酸化ヒストンを同時に認識しているために、両リン酸化が起きた領域だけに局在化したと考えることができる。以上より、H2A-T120 および H3-T3 のリン酸化が同時に起こる染色体領域にインナーセントロメアが形成されることが示唆された。

## 5. 総括

本研究では、Bub1 がヒストン H2A の Thr120 残基をリン酸化することを見出し、リン酸化を受けた H2A がシュゴシンと相互作用することでシュゴシンのインナーセントロメア局在を促進することを明らかにした。また、Haspin によって Thr3 残基をリン酸化された H3 が、CPC サブユニットの一つ Survivin と相互作用することで CPC をインナーセントロメアへ局在化させることが明らかになった。さらに CPC が H2A-T120 と H3-T3 のリン酸化が同時に起こる染色体領域に局在するという観察から、インナーセントロメアがこれら 2 つのリン酸化ヒストンによって規定されていることを提唱した。

本研究は染色体分配という極めて根本的な生命現象の分子レベルでの理解に貢献するものであり、癌など染色体分配の異常に起因する疾患の発生機序の理解にも繋がることが期待される。

### 発表論文

Kawashima, S.A., Yamagishi, Y.\*, Honda, T.\*, Ishiguro, K., and Watanabe, Y. (2010). Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science* 327, 172-177. (\*同等貢献)

Yamagishi, Y.\*, Honda, T.\*, Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010). Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* 330, 239-243. (\*同等貢献)