

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	中川 千雅
学位授与の日付	平成27年3月31日	
論文名	Molecular behavior of HP1 $\alpha$ and CENP-A throughout the cell cycle in living cells (生細胞における細胞周期を通じた HP1 $\alpha$ と CENP-A の分子動態解析)	
論文審査委員	主査	杉本 憲治
	副査	乾 隆
	副査	谷森 紳治

## 論文要旨

### 序章

細胞は生物の基本単位であり、細胞が増殖するためには DNA を正確に複製し、2 個の娘細胞に均等に分配する必要がある。細胞周期とは、分裂から次の分裂までの一連の過程である。細胞周期は DNA 合成準備期の G1 期、DNA 合成期の S 期、分裂準備期の G2 期、分裂期の M 期に分けられる。細胞周期の各段階への移行は、細胞周期制御因子により調節されており、特定の段階の進行が完了していない場合には、次の段階への移行を遅らせるチェックポイントが存在する。細胞周期が正しく進行しない場合には、発生異常や癌等の重篤な疾患を発症することがある。このため、細胞周期の進行を特定のタンパク質を用いて可視化することや、そのタンパク質の局在や動態の変化を経時的に観察することが、生命現象の理解においては重要である。

細胞周期において、分裂期は有糸分裂や細胞質分裂等により時期の特定が容易であるが、間期(G1 期、S 期、G2 期)におけるそれぞれの時期の特定には、DNA 含量の測定やその時期に特異的な局在を示すタンパク質の観察等を必要とする。これまでのところ、1 種類のタンパク質の局在変化を観察するだけで容易に使用できる細胞周期全体

のマーカーは知られておらず、間期に局在が変化するタンパク質は細胞周期のマーカーとしての候補になり得る。そこで、第1章ではセントロメア周縁に局在するヘテロクロマチンタンパク質 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ )、第2章ではセントロメアタンパク質 A (CENP-A) と S 期のマーカーとして使用されるタンパク質 PCNA に注目し、間期における分子動態変化の過程を明らかにすることを目的とした。

## 第1章 マウス細胞における HP1 $\alpha$ の細胞周期を通じた局在の可視化とヘテロクロマチンドットの周期的な明滅

ヘテロクロマチンタンパク質 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ ) はヘテロクロマチンに局在するタンパク質である。ヘテロクロマチンでは、細胞周期の間期においても染色体のクロマチン構造が凝縮し、転写が不活性になっている。HP1 $\alpha$  には、進化的に保存されたクロモドメインとクロモシャドウドメインがある。クロモドメインでヒストン H3 のトリメチル化した 9 番目のリシンと結合し、クロモシャドウドメインでヒストンメチル化酵素の SUV39H1 と結合する。ヒストン H3 の 9 番目のリシンのメチル化は、転写を抑制することが知られている。HP1 $\alpha$  は G1 期は核でドット状に局在し、G2 期は核質で拡散していることが報告されている。このように、HP1 $\alpha$  は間期に局在が変化するので、生細胞での細胞周期進行マーカーとして使用できるかも知れないと考えた。そこで、細胞周期を通じた HP1 $\alpha$  の局在を可視化し、間期における分子動態変化の過程を明らかにすることにした。方法は、赤色蛍光タンパク質 DsRed に融合した HP1 $\alpha$  を安定発現するマウス C3H10T1/2 細胞を用いて、2 回の連続した細胞分裂間のライブイメージングを行った。

画像解析の結果、HP1 $\alpha$  の局在変化を指標として、細胞周期の間期を 4 つの Phase に分割できることが分かった。HP1 $\alpha$  は細胞分裂後に核でドットを形成し、その局在が維持された (Phase 1)。次に、HP1 $\alpha$  が核質で拡散し始めた (Phase 2)。それから、HP1 $\alpha$  の拡散が核の周縁まで進行し、ドットが識別できなくなった (Phase 3)。そして、核全体が一様の局在を示し (Phase 4)、2 回目の細胞分裂が開始した。次に、HP1 $\alpha$  の拡散の進行を調べるために、核質全体での蛍光強度を測定した。蛍光強度の増加率は、Phase 1 と比較すると Phase 2 では 3.8 倍に増加していた。Phase 3 では途中で減少した時期があったが、核のサイズがこの時期に大きくなっていたことが原因と考えられた。Phase 4 では変化しなかった。これらのことから、HP1 $\alpha$  の拡散の進行は、ドットが分解して核質に拡散していくのではなく、核質での発現量の増加によることが示唆された。

HP1 $\alpha$  の Phase 1 でのドット状の局在は、比較的小さいドットが多い細胞ではドット数が多く、比較的大きいドットが多い細胞ではドット数が少ないという特徴があった。また、同じ細胞から分裂した娘細胞同士ではドットのパターンが似ていた。しか

し、娘細胞同士でも各 Phase の開始時期や分裂間隔時間は異なり、由来に関わらず細胞ごとの違いが大きいことが分かった。そこで、14 個の細胞について細胞周期における Phase 1-4 の割合を調べた結果、細胞ごとに分裂間隔時間は異なるが、いずれの細胞においても細胞周期の中間付近に Phase 2 が位置し、後半から Phase 3 が始まり、2 回目の細胞分裂の直前に、Phase 4 が始まることが分かった。

次に、12 個のドットについて蛍光強度を測定した結果、いずれも Phase 2 の開始前後から蛍光強度が急に変化し周期的な明滅が始まった。ドットの周期的な明滅は、核質の蛍光強度が増加しドットが識別できなくなるまで継続して観察された。Phase 2 は間期の中間に位置し、この時期に HP1  $\alpha$  の局在が動的に変化することから、Phase 2 は S 期と重なっているのではないかと思われた。マウス細胞のライブイメージングでは、HP1  $\alpha$  のドットの明滅は容易に観察されることから、ドットの明滅を Phase 2 の視覚的な指標にすることができる。以上のことから、HP1  $\alpha$  は生細胞での細胞周期進行マーカーとして使用できる可能性があることが分かった。

## 第2章 ヒト細胞における CENP-A の細胞周期を通した局在の可視化とセントロメアでの DNA 複製

セントロメアタンパク質 A (CENP-A) はヒストン H3 のバリエーションで、セントロメアに局在するタンパク質である。セントロメアは、分裂期に動原体微小管が付着するキネトコア構造の部位の染色体領域として定義されている。通常のヌクレオソームのヒストン 8 量体は H2A、H2B、H3、H4 により構成されているが、セントロメアには、ヒストン H3 が CENP-A に置き換わっているヌクレオソーム領域があり、この CENP-A ヌクレオソームはセントロメア特異的に存在する。増殖細胞核抗原 (PCNA) は、DNA 複製装置の構成要素の 1 つである。DNA 複製時に PCNA は 3 量体を形成して 2 本鎖 DNA を取り囲み、ポリメラーゼ  $\delta$  やポリメラーゼ  $\epsilon$  の DNA への結合を促進させる。PCNA は S 期に DNA 複製中心に局在し、複製が進行するにつれて局在が変化することから、S 期のマーカーとしても使用される。

ヒトの CENP-A は G1 期にヒストンに取り込まれ、複数の細胞分裂を経ても安定である。そして、CENP-A は細胞周期を通してセントロメアのクロマチン領域に局在していると考えられている。近年、ショウジョウバエの CID (CENP-A) と PCNA の同時観察による細胞周期を通したライブイメージングが報告されたが、ヒトとショウジョウバエでは染色体数や、CENP-A がヒストンに取り込まれる時期が異なっており、ヒトの CENP-A の間期を通した局在や動態変化の過程は未だ明らかになっていない。そこで、細胞周期を通したヒトの CENP-A と PCNA の局在を同時に可視化し、PCNA の S 期の局在変化を指標として、間期における CENP-A の局在変化の過程を解明することとした。方法は、オレンジ蛍光タンパク質 mKO を融合した CENP-A と、緑色蛍光タンパク質 EGFP に融合

した PCNA を同時に安定発現するヒト HT1080 細胞を用いて、2 回の連続した細胞分裂間のライブイメージングを行った。

HT1080 細胞で安定発現させた EGFP-PCNA の局在は、early S 期は核小体を除く核で多数の細かいドット状に局在、mid S 期は主として核小体周縁と核膜周縁に局在、late S 期は核で少数の大きなドットが観察された。また、G1 期と G2 期は核で拡散し、核小体と推定される部位の局在が弱かった。これらの局在は、これまでに報告されている PCNA の局在と一致していることが確認できた。次に、細胞周期を通した mKO-CENP-A と EGFP-PCNA の同時撮影を高倍率で行った。細胞分裂後、PCNA は核と細胞質に局在したが、G1 期開始の 60 分後から核の局在が強まり、核の中で局在が弱い部位が観察された。この部位は early S 期での核小体部位と一致していた。mid S 期と late S 期は核小体部位が分かりにくかったが、G2 期は、G1 期と同様に核の中で局在が弱い部位が観察された。CENP-A は G1 期開始から 60 分以降は核の表面付近と PCNA の局在が弱い核小体部位に局在し、局在パターンは late G2 期までほとんど変化しないことが分かった。そこで、PCNA の局在で核小体部位が分かりにくかった mid S 期に注目し、CENP-A の識別可能な全てのドットを early G1 期までさかのぼって追跡した結果、核の表面付近や核小体に局在する CENP-A のドットは、それぞれの部位に局在し続けていた。また、mid S 期から late G2 期まで追跡した結果も同様であった。以上のことから、PCNA の局在変化を指標として S 期の開始と終了時期が確認でき、CENP-A のドットの局在パターンを指標として、S 期を通した PCNA の局在の核での相対的な位置を推定できることが分かった。

さらに、CENP-A の識別可能な全てのドットについて、PCNA との共局在解析を行った結果、大部分の CENP-A のドットは late S 期に核の表面付近と核小体で共局在し、一部の CENP-A のドットは mid S 期に核の表面付近で共局在した。early S 期には共局在が観察されなかった。これまでに、免疫蛍光染色法を用いた観察により、ヒト CENP-A に関連する DNA は mid S 期から late S 期に複製することが報告されているが、ライブイメージングを用いることにより、セントロメアでの DNA 複製を時空間的に可視化することができた。

## まとめ

マウス細胞において、HP1 $\alpha$  の局在変化を指標として間期を 4 つの Phase に分割することができ、生細胞での細胞周期進行マーカーとして使用できる可能性があることが分かった。また、ヒト細胞において、CENP-A の局在パターンを指標として、S 期のマーカーとして使用される PCNA の核内での局在が推定できることが明らかになった。これをもとにした解析により、セントロメアでの DNA は大部分が late S 期に核の表面付近と核小体で複製、一部は mid S 期に核の表面付近で複製することが示唆された。

## 審査結果の要旨

細胞周期は有糸分裂と細胞質分裂が行われる M 期、DNA 複製が行われる S 期、M 期の完了から S 期開始までの G1 期、S 期の完了から M 期開始までの G2 期の 4 つの期間に分けられている。従来、生細胞を用いた細胞周期の解析には主にセルソーターが用いられ、ある集団全体の細胞周期の割合が経時的に解析されてきた。しかし、測定時に細胞を分取するため、個々の細胞についての系譜解析や細胞周期に要する時間を計測できないという欠点があった。一方、可視化細胞を用いたライブセルイメージングでは個々の細胞の分裂する様子をリアルタイムで解析できるという特徴があるものの、細胞周期の各時期を生きたまま解析することは困難であった。当初、「増殖細胞核抗原」として見いだされた PCNA は、S 期に特徴的な局在を示すことから、現在、S 期の生細胞マーカーとして注目されている。本研究は、生きた細胞でのヘテロクロマチンタンパク質 HP1 $\alpha$  とセントロメアタンパク質 CENP-A についての細胞周期を通じた動態を解析し、ライブセルイメージングの新たな生細胞マーカーとしての有効性を検証したもので、以下の 2 章より構成される。

第一章では、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 $\alpha$  の動態解析を行っている。HP1 $\alpha$  は、マウス培養細胞の核内にて、細胞分裂の直後よりヘテロクロマチンドットを形成するが、分裂直前には核内に拡散する事が知られていたが、ライブセルイメージング技術を用い、細胞周期を通じてその動態を詳細に解析することで、S 期に相当する時期にヘテロクロマチンドットが周期的な明滅を繰り返す事、以後、徐々に核内に拡散する事を見いだした。また、ランダムに培養した細胞の解析により、分裂する細胞の間期ではヘテロクロマチンドットの明滅と消失が観察され、これを伴わない細胞は分裂を始めないことから、新たな細胞周期進行のマーカーとして利用できることを示した。

第二章では、セントロメアタンパク質 CENP-A の動態解析を行っている。CENP-A はセントロメア特異的なヒストン H3 タンパク質であり、分裂期の動原体クロマチンのみならず、間期においても動原体前駆体と呼ばれるセントロメア領域に局在することが知られていた。CENP-A を S 期マーカーである PCNA と同時に 2 色に可視化したヒト HT1080 細胞を用い、先と同様に、細胞周期を通じてその動態を解析し、G1 初期から G2 後期まで、その局在は殆ど変化せず、間期の核内で一定のテリトリーを持つ事を示した。さらに、親細胞と娘細胞での CENP-A の局在を比較し、少なくともこの細胞では細胞分裂の前後や娘細胞間で異なるものの、その局在は G1 初期で固定される事を見いだした。

以上、本研究では、ライブセルイメージング技術を用いて複数回の細胞分裂を追跡する事で、生きた細胞での細胞周期を通じたヘテロクロマチンタンパク質 HP1 $\alpha$  と

セントロメアタンパク質 CENP-A の動態を明らかにする事に成功した。また、ライブセルイメージング解析における細胞周期進行、並びに、細胞核内テリトリーという、新たな生細胞マーカーとして利用できることも示した。これら一連の成果は、今後益々発展するであろう生細胞解析に有用であり、応用生命科学のみならず、理学、薬学、医学などの関連分野の発展に大きく寄与することが期待される。よって、最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与する事を適当と認める。