

研究報告書

「セントロメアを規定する新規エピジェネティックマーカーの探索と 同定」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 堀 哲也

1. 研究のねらい

生物が正確な染色体分配を遂行するためには、微小管が結合する染色体の特殊構造であるセントロメアが重要な働きを担う。セントロメアがゲノム上のどこにどのように形成されるのかについて解明することは、基礎生物学の基本命題の一つである。高等動物ではこれまで、16種類の CCAN と呼ばれるセントロメアタンパク質群が、我々の研究室を含めた内外のグループから報告され、これらが協調してセントロメア構築に関与すると考えられている。しかし、何を目印にして、これらセントロメアタンパク質がセントロメア領域へ集合しているのかについては、未だ不明な点が多い。多くの生物種のセントロメア領域を対象として、ゲノム DNA 配列が解析された結果、多くの生物においてタンデムな反復 DNA 配列が存在することが報告されている。しかし、反復配列自身は生物間で保存性がないことが分かっている。また、本来セントロメアでない領域が、何らかの活性化を受けてセントロメア化する現象(ネオセントロメア現象)も知られている。ネオセントロメアの DNA 情報からは、特異的な配列が見いだされていないことから、セントロメアは DNA の一次情報に依らないエピジェネティックな分子機構によって形成されると考えられている。これまでの内外の研究から、セントロメアに特異的に存在するヒストンバリエーションである CENP-A が有力なエピジェネティックマーカーの一つであると考えられている。ところが、CENP-A の存在だけではセントロメアに特異的なクロマチンを形成することができないため、他のエピジェネティックマーカーの存在が示唆される。本研究では、セントロメアを規定する目印(エピジェネティックマーカー)を同定し、セントロメアを規定するために必要なクロマチン構造の実体を明らかにすることを目標とする。新規エピジェネティックマーカーの発見は、本研究分野のブレークスルーになると考えている。さらに、本研究の成果を基礎に、将来的には抗がん剤などの新規薬剤開発研究に応用できる可能性があり、医科学的な視点からも重要な課題であると考えられる。また、試験管内で人工セントロメアを再構成する技術開発への応用も期待される。このような新技術は、iPS 細胞の作成等には欠かせない「安全で安定した遺伝子デリバリーシステムの開発」にもつながると考えられ、社会に対する波及効果も極めて高いと考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、セントロメアを規定する新規エピジェネティックマーカーの同定と、セントロメアのクロマチン構造の実体を明らかにすることを目標に、テーマ A,B,C を軸に研究を遂行した。その結果、セントロメア形成と機能獲得の仕組みの一端が明らかになった。

研究テーマ A) 「ネオセントロメアの誘導とセントロメア形成メカニズムの解明」

ニワトリ DT40 細胞を利用したセントロメアを除去するシステムを改変し、実験的にネオセントロメアを誘導し、取得することに成功した。取得したネオセントロメアは、本来のセントロメアとほぼ同等の機能を持ち、安定に維持されることが分かった。また、ネオセントロメアは DNA 配列に依存しないメカニズムで形成されると考えられた。さらに、ネオセントロメア細胞を用いた ChIP-Seq 解析により、セントロメア形成に依存して出現する数種のヒストン修飾を新たに見いだした。これらヒストン修飾がセントロメアを規定するエピジェネティックマークとして、動原体の構築過程で機能する可能性が示唆され、これらの知見は将来的に抗がん剤などの新規薬剤開発研究に応用できると期待される。

研究テーマ B) 「人工セントロメアの誘導とセントロメアタンパク質の役割の解明」

(A)のシステムを改変して、本来のセントロメア除去した染色体上に各種セントロメア関連タンパク質を異所局在させ、人工セントロメアを任意の場所に誘導できるシステムを構築した。このシステムにより、2つのタイプの人工セントロメアの誘導に成功した。この研究から、CCAN はセントロメアに特有なクロマチン構造の形成を促す機能と、微小管結合を担うアウターキネトコアの形成を促す機能を同時に持つ複合体であることが分かった。

研究テーマ C) 「試験管内再構成によるセントロメアクロマチン構造の実態解明」

セントロメア DNA と直接結合する CENP-T は生化学的解析から、特有な CENP-T-W-S-X ヘテロ 4 量体を形成することが示唆された。そこで、ヘテロ 4 量体を試験管内で再構成し、X 線結晶構造解析を行った結果、CENP-T-W-S-X ヘテロ 4 量体はヒストン様構造を形成することが明らかとなった。さらに、CENP-T ヘテロ 4 量体は、プラスミド DNA に正のスーパーコイルを導入する活性があることを見いだした。

(2) 詳細

研究テーマ A) 「ネオセントロメアの誘導とセントロメア形成メカニズムの解明」

セントロメアがどのように形成されるのかを解析するにあたって、*de novo* セントロメア形成を実験的に誘導できる系の構築は極めて有効である。自然界では、本来セントロメアではない領域がセントロメア化するネオセントロメア現象が報告されている。この現象のメカニズムは不明だが、おそらく染色体の再編によるセントロメアの欠損がトリガーとなっていると考えられている。これまで、我々の研究グループは、ニワトリ DT40 細胞を用いた染色体工学技術により、特定の染色体からセントロメアを除去するシステムを構築していた。そこで、このセントロメアを除去するシステムを利用し、さらに 2 種の薬剤選択マーカーを導入することにより、セントロメアを失った細胞集団から生存細胞(サバイバー)の取得を試みた。セントロメアの除去を行なうと、大部分の細胞は染色体分配異常を起こし致死となるが、約 30 万細胞に 1 細胞の確率でサバイバーを取得することに成功した。得られたサバイバーの内、93% の細胞でネオセントロ

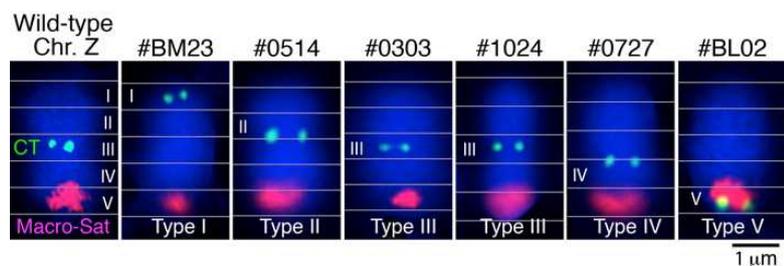


図 1、ニワトリ Z 染色体上に誘導されたネオセントロメア
CT: セントロメアタンパク質 CENP-T、Macro-Sat: Z 染色体サテライトトリピート配列

メアの形成が確認され(図 1)、約 7%の細胞で他の染色体とのテロメア融合が確認された。高等動物細胞を用いて、実験的にネオセントロメアを誘導した報告はこれまで無く、本研究によりネオセントロメアを誘導する技術を世界に先駆け開発することに成功した。取得したネオセントロメアは、本来のセントロメアとほぼ同等の機能を持ち、安定に維持されることが分かった。また、ネオセントロメアが形成された DNA 配列を調べたところ、少なくとも GC 含量、反復配列あるいはトランスポゾン等の存在比率について共通した有為な特徴は見いだされておらず、「ネオセントロメアは DNA 配列に依存しないメカニズムで形成された」、と考えられた。これらの結果は、現在、提唱されている「セントロメアは DNA の一次情報に依らないエピジェネティックな分子機構によって形成される」というモデルを支持する結果であった(Shang, Hori, et al. Dev. Cell, 2013)。さらに、ネオセントロメア細胞を用いた ChIP-Seq 解析により、セントロメア形成に依存して出現する数種のヒストン修飾を新たに見いだした(未発表)。これらヒストン修飾がセントロメアを規定するエピジェネティックマークとして動原体の構築過程で機能する可能性が示唆され、これら知見は将来的に抗がん剤などの新規薬剤開発研究に応用できると期待される。

研究テーマ B) 「人工セントロメアの誘導とセントロメアタンパク質の役割の解明」

(A)で構築したネオセントロメア誘導システムをさらに改変して、本来のセントロメアを取り除いた染色体上に、各種セントロメア関連タンパク質を異所局在させ、人工セントロメアを任意の場所に誘導できるシステムを構築した(図 2)。異所局在は、Z 染色体の短腕側の非セントロメア領域に約 10kb の LacO リピート配列を導入し、その LacO 配列上へ LacI 融合型タンパク質を特異的に結合させる手法を用いた。

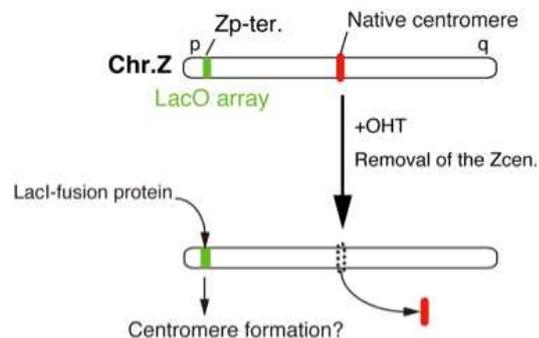


図 2、異所局在によるセントロメア形成の誘導

この異所局在システムを用いて、各種セントロメア構成タンパク質を異所局在させセントロメアの誘導を試みたところ、複数の人工セントロメアの誘導に成功した。人工セントロメアを保有する細胞株は、いずれも安定に増殖したが、興味深いことに、これらは 2 種の異なるタイプ的人工セントロメアへ分類できることが分かった。1つ目のタイプは、CENP-A シャペロンである HJURP や、CENP-I、CENP-C あるいは CENP-C の C 末(721-864aa)により誘導されたセントロメアであり、いずれも CENP-A および恒常的セントロメアタンパク質群(CCAN)を全て含む完全なセントロメアであった(図 3)。HJURP、CENP-I、CENP-C により、CENP-A の取り込みが誘導され、その後幾つかのステップを経た後に完全なセントロメア

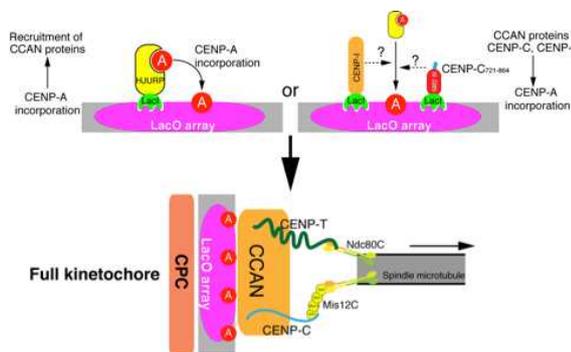


図 3、異所局在によるセントロメア形成モデル(A)

が形成されたと推察している。一方、CENP-T の N 末 (1-530aa) および CENP-C の N 末 (1-643aa) からは、全く異なるタイプの人工セントロメアが誘導された (図 4)。この 2 番目のタイプの人工セントロメアは、通常のセントロメア形成に必須な CENP-A および CCAN が全く存在しないアウターキネトコアのみのセントロメアであることが明らかとなった (Hori, et al., J.Cell Biol., 2013)。さらに構造解析の結果も合わせ、

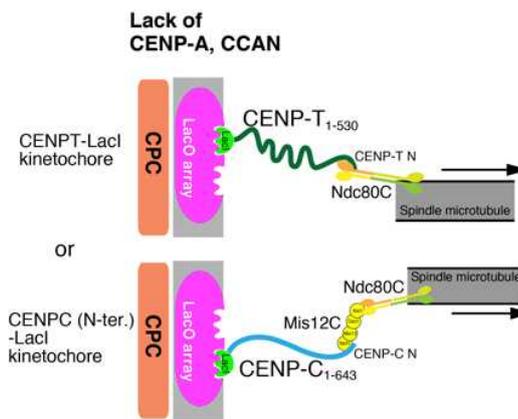


図 4、異所局在によるセントロメア形成モデル (B)

CENP-T の N 末および CENP-C の N 末は、アウターキネトコア形成の基盤となり、セントロメアに特有なクロマチン構造形成をバイパスしてセントロメア機能を獲得できるドメインであることを明らかにした (Gascoigne, et al., Cell, 2011; Hori, et al., J.Cell Biol., 2013; Nishino, et al., EMBO J., 2013)。以上の解析から、CCAN はセントロメアに特有なクロマチン構造の形成を促す機能と、微小管結合を担うアウターキネトコアの形成を促す機能を同時に持つ複合体であると考えられた (Hori, et al., J.Cell Biol., 2013)。これまでのところ、HJURP、CENP-I、CENP-C により完全なセントロメアが誘導されるメカニズムは不明だが、その分子レベルの仕組みの解明はセントロメアクロマチン形成を理解する上で重要な糸口になると考えており、今後の重要な研究課題である。

研究テーマ C) 「試験管内再構成によるセントロメアクロマチン構造の実態解明」

これまで我々の研究グループは、セントロメアを構成する複数のタンパク質を同定し、遺伝学および生化学的な機能解析を行ってきた。その過程でセントロメア DNA と直接結合する CENP-T 複合体の同定に成功していた (Hori, et al., Cell, 2008)。まず、CENP-T 複合体の全構成因子を明らかにするために、共免疫沈降実験によりニワトリ DT40 細胞から CENP-T 複合体を精製し、高感度質量分析およびゲル濾過解析を行なった。その結果、CENP-T はセントロメアタンパク質 CENP-W、-S、-X とともに特有な CENP-T-W-S-X ヘテロ 4 量体を形成することが示唆された。そこで、試験管内で CENP-T-W-S-X ヘテロ 4 量体を再構成し、X 線結晶構造解析を行った。この解析の結果、CENP-T-W-S-X ヘテロ 4 量体はヒストン様構造を形成することが明らかとなった (Nishino, et al., Cell, 2012)。また、生化学的解析から、約 100bp の DNA と結合することも明らかにした (Nishino, et al., Cell, 2012)。次に、リコンビナント CENP-T ヘテロ 4 量体を利用して、DNA との結合様式の解析を DNA スーパーコイルアッセイにより行った。その結果、CENP-T ヘテロ 4 量体は正のスーパーコイルをプラスミド DNA に導入する活性があることを見いだした。通常、一般的なヒストン 8 量体は、プラスミド DNA 上にヌクレオソームを形成し、負のスーパーコイルを導入することが知られている。この DNA スーパーコイルアッセイから、CENP-T ヘテロ 4 量体は一般的なヒストンとは異なった様式で DNA と結合することが明らかとなり、現在、この特有な DNA との結合様式がセントロメア特異的なクロマチン構築へ関与している可能性を想定している (Takeuchi, et al., Nuc. Acids Res., 2014)。

3. 今後の展開

研究テーマ A)

セントロメア領域のヒストン修飾に関しては、各種モデル生物を利用した実験系により幾つかの報告がなされているが、高度に反復したDNA配列の存在のため、セントロメアが構築される領域の詳細な解析例は少ない。本さきがけ研究で取得することに成功したニワトリのネオセントロメアを保有する細胞株は、セントロメア特有なヒストン修飾の解析を行なうことのできる優れた系である。そこで、各種ヒストン修飾抗体を利用して、今後、網羅的にChIP-Seq解析を行ない、セントロメア形成と関連するヒストン修飾を同定する計画である。既に、セントロメア形成に依存して修飾が入るヒストン修飾が数種見いだされており、この研究手法の有効性は確認済みである。同定したヒストン修飾について、セントロメアクロマチン構築およびセントロメア形成への関与を中心に解析を進め、その生物学的意義の解明を目指す。

研究テーマ B)

各種セントロメア関連タンパク質を異所局在させることで、複数種の人工セントロメアを作出することに成功した。しかし、HJURPや、CENP-I、CENP-Cによって、どのようにCENP-AおよびCCANを全て含む完全なセントロメアの誘導に至るのか詳細は未だ不明である。HJURPは、CENP-Aシャペロンであることから、CENP-Aをクロマチンに導入することにより、セントロメアクロマチン形成の初期過程に働く重要な因子であると考えられている。一方、CENP-C、CENP-Iは、CENP-Aを含むセントロメアクロマチンに集合する下流の因子であると考えられており、本実験によりセントロメアが誘導された事実は、極めて興味深い結果である。今後、CENP-C、CENP-Iと相互作用する因子の探索および各々の部分ペプチドを利用したセントロメア誘導活性の検定実験を行なう計画である。上記計画により機能ドメインを見いだした後、HJURPとの相互作用も含めた機能の関連性についても解析を進め、セントロメアクロマチン形成の仕組みを分子レベルで解明することを目指す。

研究テーマ C)

これまでの研究から「セントロメアには、CENP-AヌクレオソームとCENP-T複合体が結合するH3クロマチンとで構成される特有なクロマチン構造が存在している」というモデルを想定している。生化学的実験により細胞から精製したCENP-Aを含むポリヌクレオソームには、H3タイプのヌクレオソームが一定の割合で含まれることを既に確認しており、上記モデルに矛盾しない。また研究テーマ(A)により、セントロメア形成と関連するヒストン修飾も見いだしている。そこで、試験管内における生化学的解析を行うことを目指し、各種ヒストンバリエント、および修飾ヒストンを含むヌクレオソームの再構成を行なう。さらに、これらヌクレオソームを用いて、試験管内ライゲーション反応により様々な種類のポリヌクレオソームの作製にも挑戦する。セントロメアDNAに直接結合するCENP-T複合体を含むセントロメアクロマチンの実態解明を目指し、上記の各種再構成ヌクレオソームと、CENP-Tヘテロ4量体および各種セントロメアタンパク質との相互作用ならびに構造解析を中心に研究を展開する計画である。

4. 評価

(1) 自己評価

これまで研究の対象となってきたモデル生物種の多くは、セントロメア領域が巨大なサテライト型反復DNA配列で構成されていることから、セントロメアが構築される領域のクロマチン構造等の詳細な解析は極めて困難であった。本さがけ研究において、独自に発見した反復配列を持たないニワトリのセントロメア領域を対象として、染色体工学技術によりネオセントロメアを培養細胞内で誘導する実験系の開発に成功した(Shang, Hori et al., Dev. Cell, 2013)。この手法で取得したネオセントロメアを保持する細胞株を利用して、セントロメアを規定するエピジェネティックマークの候補と考えられる複数のヒストン修飾の同定に至った。この発見は、将来的に抗がん剤などの新規薬剤開発研究への応用も期待されることから、染色体研究分野のみならず、医科学的な視点からも注目を受ける成果であると言える。また、染色体の任意の場所に人工セントロメアを作出する技術の開発にも成功し(Hori, et al., J.Cell Biol., 2013)、セントロメア形成と機能獲得の仕組みの一端を明らかにして、染色体分配メカニズムの理解に大きく貢献した。本研究成果は、将来的に試験管内で人工セントロメアを再構成する技術開発への応用も期待される。さらに、iPS細胞の作成等に欠かせない「安全で安定した遺伝子デリバリーシステムの開発」にも貢献すると思われることから、社会に対する波及効果は高いと考えられる。以上のことから、当初計画した研究目標に照らして、本さがけ研究において期待した成果が得られたといえる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ニワトリ DT40 細胞を用い、染色体工学技術を利用してネオセントロメアを誘導する技術を確立した。一つは、セントロメアを人為的に欠損させた細胞集団からネオセントロメア細胞を得る方法である。この手法で得たネオセントロメアの解析から、セントロメアの形成は、DNA配列に依存しない特異なエピジェネティックなメカニズムで制御される可能性を示した。一方、これと並行してセントロメア構成タンパク質を異所局在させることで、人工的に任意の場所にセントロメアを誘導できるシステムの構築にも成功した。また、試験管内再構成によりセントロメアクロマチン構造の解明も試みた。

高等動物を用いた系で、ネオセントロメアを誘導する染色体工学技術を世界にさがけ開発することに成功し、いままで謎に包まれていた染色体のセントロメアの解明が一挙に進むことが期待される。今後セントロメア領域特異的ヒストン修飾のセントロメア形成及び維持における役割、CENP-A がエピジェネティックマークとしてセントロメア形成・維持において重要な役割をもつ点など、セントロメアを規定し、活性なセントロメアを形成する仕組みの解明に向け、さらに研究を深めることを期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

研究テーマA

1. Shang W.H., **Hori T. (同等筆頭著者)**, Martins N.M., Toyoda A., Misu S., Monma N., Hiratani I.,

Maeshima K., Ikeo K., Fujiyama A., Kimura H., Earnshaw W.C., Fukagawa T., "Chromosome Engineering Allows the Efficient Isolation of Vertebrate Neocentromeres." *Developmental Cell* (2013) **24**, 635–648.

研究テーマB

1. Hori T., Shang W.H., Takeuchi K., Fukagawa T., "The CCAN recruits CENP-A to the centromere and forms the structural core for kinetochore assembly." *The Journal of Cell Biology* (2013) **200**, 45–60.
2. Hori T., Fukagawa T., "Establishment of the vertebrate kinetochores." *Chromosome Research* (2012) **20**, 547–561.
3. Gascoigne K.E., Takeuchi K., Suzuki A., Hori T., Fukagawa T., Cheeseman I.M., "Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes." *Cell* (2011) **145**, 410–422.
4. Suzuki A., Hori T., Nishino T., Usukura J., Miyagi A., Morikawa K., Fukagawa T., "Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins." *The Journal of Cell Biology* (2011) **193**, 125–140.
5. Schmidt J.C., Kiyomitsu T., Hori T., Backer C.B., Fukagawa T., Cheeseman I.M., "Aurora B kinase controls the targeting of the Astrin-SKAP complex to bioriented kinetochores." *The Journal of Cell Biology* (2010) **191**, 269–280.

研究テーマC

1. Takeuchi K., Nishino T., Mayanagi K., Horikoshi N., Osakabe A., Tachiwana H., Hori T., Kurumizaka H., Fukagawa T., "The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA." *Nucleic Acids Research* (2014) **42**, 1644–1655.
2. Osakabe A., Tachiwana H., Takaku M., Hori T., Obuse C., Kimura H., Fukagawa T., Kurumizaka H., "Vertebrate Spt2 is a novel nucleolar histone chaperone that assists in ribosomal DNA transcription." *Journal of Cell Science* (2013) **126**, 1323–1332.
3. Nishino T., Rago F., Hori T., Tomii K., Cheeseman I.M., Fukagawa T., "CENP-T provides a structural platform for outer kinetochore assembly." *The EMBO Journal* (2013) **32**, 424–436.
4. Nishino T., Takeuchi K., Gascoigne K.E., Suzuki A., Hori T., Oyama T., Morikawa K., Cheeseman I.M., Fukagawa T., "CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold." *Cell* (2012) **148**, 487–501.
5. Ohfuchi Maruyama E., Hori T., Tanabe H., Kitamura H., Matsuda R., Tone S., Hozak P., Habermann F.A., Hase Jv., Cremer C., Fukagawa T., Harata M., "The actin family member Arp6 and the histone variant H2A.Z are required for spatial positioning of chromatin in chicken cell nuclei." *Journal of Cell Science* (2012) **125**, 3739–3743.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. Hori, T. “The size of centromere is controlled by coordination of centromere proteins” **ASCB Annual Meeting**, New Orleans (USA), 2013, 12/14～18.
2. 堀 哲也 “人工動原体の作出からあきらかになるセントロメアの形成メカニズム” 第35回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2012, 12/11～14. (口頭発表)
3. Hori, T. “Ectopic Localization of CCAN proteins induces centromere formation in vertebrate cells” **EMBO Workshop**, Barcelona (Spain), 2012, 10/1～5.
4. Hori, T. “Ectopic localization of CCAN proteins induces centromere formation in vertebrate cells” 第34回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2011, 12/13～16. (口頭発表)
5. Hori, T. “Unique Feature of Chicken Centromere DNA and Engineering of Centromere Using DT40 Cells” **50th ASCB Annual Meeting**, Philadelphia (USA), 2010, 12/11～15.

プレスリリース

1. 染色体工学の新たな幕開け！ 高等動物のセントロメア作製に成功(2013年3月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/1170/1200.html>)
2. キネトコアに存在する新規のヒストン様構造(2012年2月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/992/999.html>)

国立遺伝学研究所 研究成果

1. CENP-T はリン酸化依存的に外部動原体に結合する(2013年1月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/1170/1178.html>)
2. 人工動原体を安定に保持する細胞の作出(2012年12月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/992/1156.html>)
3. 人工的に動原体をつくる(2011年4月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/986/227.html>)
4. 微小管からの張力によって動原体が伸びる(2011年4月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/986/131.html>)