

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22125004

研究課題名（和文）ゲノム伝達のための染色体構造と機能の世代を越えたアダプテーション

研究課題名（英文）Adaptation in the structure and function of the chromosomes that ensures genome transmission across generations

研究代表者

石井 浩二郎 (ISHII, Kojiro)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授

研究者番号：40360276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 58,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ゲノム伝達機能の破綻に対応したアダプテーション現象を実験的に再現することに成功している分裂酵母染色体モデルを活用し、そこで起こる染色体再編成の分子機構の詳細な解明を試みるとともに、それらが世代を越えて一つの生物種内に固定される仕組みについてのシステム的な理解を得ることを目指した。その結果私たちは、染色体末端は柔軟で適応的なゲノム維持機構に有利であることと、新規セントロメアは多段階反応で多様かつ柔軟に新たなクロマチン領域に確立されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Here we investigated the molecular mechanisms of chromosomal reorganization occurred to our previously-developed model chromosome system in fission yeast that recapitulates the spontaneous adaptation response toward a collapse of genome transmission function in the chromosomes. Through this study, we uncovered that the eukaryotic chromosomal termini are generally advantageous in producing flexible and adaptive chromosomal responses to achieve preservation of entire genome contents, and that the centromeres are newly established at ectopic positions in a stepwise manner allowing diverse and elastic ways of their functional maturation to fit to the local chromosomal environment.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム 染色体 セントロメア テロメア

## 1. 研究開始当初の背景

染色体は世代を越えてゲノムを伝達するために働く高次情報機能複合体である。その営みは極めて頑強であり、染色体の大規模な構造変化を原因としたゲノム伝達機能の破綻が生じて、染色体は自らの大胆かつ柔軟な再編成によって一定の頻度でゲノム伝達機能の回復を導き出し、その再編成ゲノムを次世代に伝達・継承していくことが判明している。例えば二つの染色体間で末端融合が起こり、ひとつの染色体上に二箇所のセントロメアが生じた場合、それはゲノムの安定伝達を妨げる致命的な染色体構造変化となりうるが、そのような染色体では低頻度ながら一方のセントロメアの不活性化反応が起こり、結果として染色体本数の減少を伴いながらゲノム伝達機能を回復していく。また、染色体腕部の切断や染色体からのセントロメア脱落によって無動原体染色体が生じた場合、やはり低頻度ながら、その染色体上の新規 DNA 領域におけるセントロメア形成や、機能を維持する染色体との末端融合が発生し、それによってゲノム伝達機能を回復させる大胆な適応応答が見られる。それらは生物進化の過程において染色体に繰り返された深遠な反応であり、種分岐にも関わる一方で、細胞の癌化やゲノム病の発症にも関与する重大な現象である。しかしながら、適切な研究モデルが欠如しているために、これまで十分な理解が得られてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゲノム伝達機能の破綻に対応したアダプテーション現象を実験的に再現することに成功している分裂酵母染色体モデルを活用し、そのような染色体再編成の分子機構の解明を試みるとともに、それらが世代を越えて一つの生物種内に固定される仕組みについて体系的な理解を得ることを目指した。具体的には、1) セントロメア欠損染色体に適応して起こる染色体末端融合機構、2) 新規 DNA 領域に形成されたセントロメアの安定維持のために周辺クロマチン環境に起こる染色体適応、3) 体細胞分裂期に形成された新規セントロメアが初めて遂行する減数分裂での機能性と生物種分岐に至る適応過程、の3つの課題について、その解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) セントロメア欠損染色体に適応して起こる染色体末端融合機構の解明

まずはセントロメアを欠失した機能破綻染色体(セントロメア欠損染色体)に起こる染色体末端融合に関して、それが機能破綻染色体の生成に伴って生じる適応反応であるのか、主に末端融合配列の解析と、遺伝子変異株における染色体末端融合の頻度変動を解析することで明らかにした。これまで、低頻度で確率的に生じるテロメア欠損が染色

体末端融合の主原因で、それは非相同末端結合(NHEJ)を介して生成されることが示されていたが、本研究ではそのようなNHEJ依存的な融合反応以外に、相同組換え反応(HR)が関与している可能性について検討した。

### (2) 新規 DNA 領域に形成されたセントロメアの安定維持のために周辺クロマチン環境に起こる染色体適応の解明

また、これまでの解析で、セントロメア欠損染色体上に形成された新規セントロメアのうち、第三染色体上に形成されたものは機能不十分であり、それが30世代ほど継代されるなかで機能確立していくことが判明しており、本研究では、その確立過程を分子的に解析した。セントロメアをエピジェネティックに規定することが知られているヒストンH3バリエーションCENP-Aや、その他の動原体因子のゲノム上での分布を、機能確立前と確立後のクロマチン免疫沈降実験で比較し、機能変化の原因を探った。また、そのようなセントロメアは新規DNA領域にエピジェネティックに形成されるため、周辺クロマチン環境に起こるエピジェネティックな変化が機能確立と対応しているかについても解析した。関与が示唆された動原体因子やエピジェネティック変化については、それらの遺伝子変異やその人為的なエピジェネティック変化誘導が新規セントロメアの機能に与える影響について検討した。

### (3) 体細胞分裂期に形成された新規セントロメアが初めて遂行する減数分裂での機能性と生物種分岐に至る適応過程の解明

さらに、セントロメア欠損染色体上での新規セントロメア形成を接合型が細胞分裂ごとに変化する $h^{90}$ 株で行わせ、そうして得られた新規セントロメア樹立細胞を減数分裂サイクルに誘導することで、新規セントロメアが初めて指揮することになる減数分裂の過程を詳細に解析した。4つの胞子形成、各胞子の生存能、減数第一分裂での染色体還元分配と減数第二分裂での染色体均等分配、セントロメア近傍で特異的に見られる交叉型組換えの抑制、などについて様々な新規セントロメア形成株で顕微鏡観察と胞子四分子解析を組み合わせて解析を進めた。また、減数分裂特異的な動原体因子の新規セントロメアへの集積をクロマチン免疫沈降をもしいて解析した。さらには、紡錘体チェックポイント機構の依存性や進化的な競争過程での各セントロメアの安定性を、生細胞顕微鏡観察と胞子四分子解析を組み合わせて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) セントロメア欠損染色体に適応して起こる染色体末端融合機構の解明

染色体の末端を規定するテロメアは反復

配列に基づく比較的不安定な動的クロマチン構造である。そのため、テロメア欠損が低頻度で確立的に生じ、NHEJを介した染色体末端融合を引き起こしていることが知られていた。そのような危険性があるにも関わらず、真核生物染色体が末端を有する直鎖状の形態をとり続ける理由は十分に理解されていない。私たちは、19のセントロメア欠損染色体末端融合株で、その融合部位や融合DNA配列を決定した。その結果、セントロメアを欠失した染色体のほとんどがNHEJではなくHRを通じて積極的に他の染色体の末端と融合する可能性を見出した(図1)。さらに、遺伝子変異導入によりNHEJやHRの既知経路への依存性を解析した結果、用いられているHRは非標準的な新規経路である可能性が明らかとなった。末端融合株では、融合末端のみならず染色体末端が全般的に不安定化しており、その不安定はrad51の欠損によって亢進した(図1)。rad51欠損はセントロメア欠損染色体末端融合株の出現頻度も促進しており、セントロメア欠損染色体が染色体末端を不安定化させるようなRad51拮抗HR経路を促進させ、それが新規末端融合染色体の出現を誘起していると結論づけた(図1、Ohno et al., 論文リバイス中)直鎖状の染色体は柔軟で適応的なゲノム維持機構を遂行させるのに有利な形態であり、実際にそのような反応を介する染色体再編成促進機構が存在している可能性が示唆された。

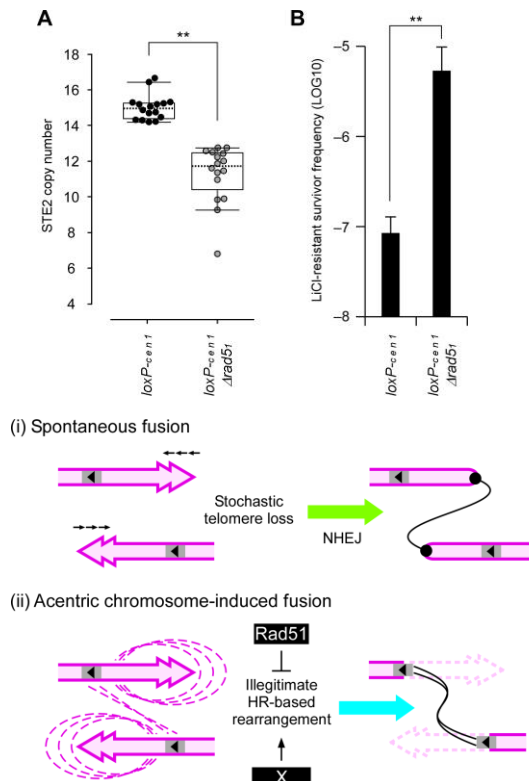


図1. 2種類の染色体末端融合とそのHR依存性

(2) 新規DNA領域に形成されたセントロメアの安定維持のために周辺クロマチン環

境に起こる染色体適応の解明

第一、第二染色体上に形成される新規セントロメアは、全てサブテロメアのヘテロクロマチンに隣接するように形成されていたが、第三染色体で見出された新規セントロメアは、主要なヘテロクロマチンに隣接しないかたちで染色体腕部に形成されていた(図2)。

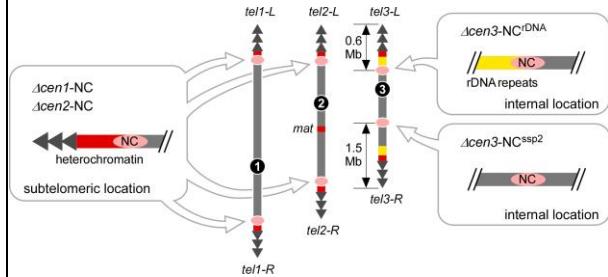


図2. 新規セントロメア (NC) の染色体配置

しかし、第三染色体に形成された新規セントロメアはCENP-Aの集積程度が低く、それはCENP-Aに特異的なヒストンシャペロンScm3の集積不全が原因であった(図3)。その観

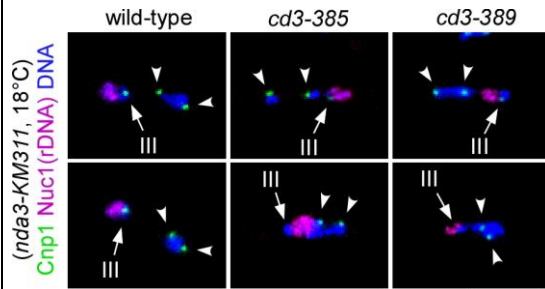


図3. 3セントロメア領域への異なるCENP-A集積

察結果と合致するとおり、第三染色体の新規セントロメアは不安定で、機能的にも未熟であった。しかし30世代の継代を経るとそのセントロメア機能は成熟し、CENP-A量も回復していた。成熟した新規セントロメアは染色体末端領域に移動しており、それが当初新規セントロメア領域に含まれていたヒストンバリエントH2A.Zの排除を引き起こしたために機能成熟が生じたことが判明した。人為的に染色体転座を作り出しても同様の効果が見出され、さらには染色体末端領域でのH2A.Z排除を担う酵素Msc1を欠損させると新規セントロメアは不全になることを見出した(図4)。以上より、新規セントロメアの形成領域にエピジェネティックに含まれるH2A.Z量が、CENP-AシャペロンScm3を介した安定的なセントロメア継承を調節していると結論づけた(Ogiyama et al., NSMB 2013)。興味深いことに、H2A.Zが存在してCENP-Aが安定に維持できない領域でもCENP-Aを介したセントロメア機能が全く生じないわけではなく、不安定ながらも染色体を維持する新規セントロメア機能は形成される。最終的に安定したゲノム伝達と維持が可能となる染色体形態を作り出す以前に、細胞は一時的にでも染色体を維持する仕組みをもち、多様で

柔軟な染色体編成適応を可能にする頑強なシステムとなっていることが示唆された。

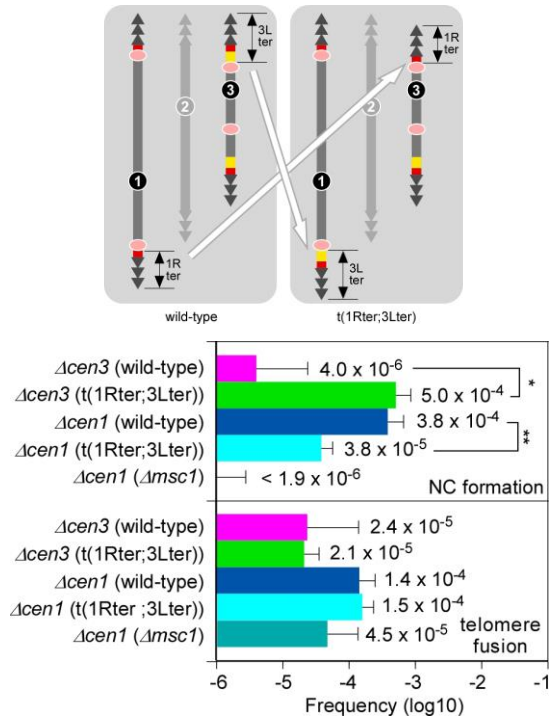


図4. 転座と  $\Delta msc1$  変異の NC 定着に対する影響

(3) 体細胞分裂期に形成された新規セントロメアが初めて遂行する減数分裂での機能性と生物種分岐に至る適応過程の解明

さらには、異所に移動した新規セントロメアが減数分裂を通じて安定的に機能することは生殖隔離と生物種分岐に必要とこれまで考えられてきているが、実験室レベルでエピジェネティックに誘導できることが証明されている新規セントロメアが、本当に進化的に安定したセントロメアになり得るのかは理解されてこなかった。今回私たちは、実験室で誘導した新規セントロメアが減数分裂でも安定に機能することを証明し、異所でも十分に機能適応していることを明らかにした。そのためにはヘテロクロマチンの隣接

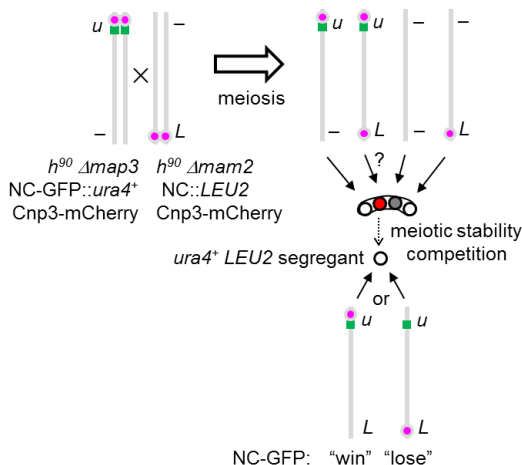


図5. 減数分裂期セントロメア定着競争アッセイ

が重要な役割を示しており、ヘテロクロマチンの隣接を欠く新規セントロメアは、それ自体は安定であっても、ヘテロクロマチンを隣接するセントロメアとの減数分裂での競争には敗北し、進化的には定着しなかった (図5、Ogiyama et al., 投稿準備中)。機能的には必須でないにもかかわらず、多くの生物種においてセントロメアには隣接ヘテロクロマチンが付随している理由はこれまで不明であったが、今回の結果によって説明できるものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Teppei Kitagawa, Kojiro Ishii, Kojiro Takeda & Tomohiro Matsumoto: The 19S proteasome subunit Rpt3 regulates distribution of CENP-A by associating with centromeric chromatin. *Nature Communications*, 査読有, 5, 3597 (2014), doi: 10.1038/nsgb.2697
- ② Yuki Ogiyama, Yuko Ohno, Yoshino Kubota & Kojiro Ishii: Epigenetically induced paucity of histone H2A.Z stabilizes fission-yeast ectopic centromeres. *Nature Structural & Molecular Biology*, 査読有, 20, 1397-1406 (2013), doi: 10.1038/nsgb.2697
- ③ Tadashi Nakano, Kazufumi Hosoda, Yutaka Nakamura & Kojiro Ishii: A biologically-inspired intrabody nanonetwork: design considerations. *Proceedings of the 8th International Conference on Body Area Networks*, 査読有, 484-487 (2013), doi: 10.4108/icst.bodynets.2013.253511
- ④ Yuki Ogiyama & Kojiro Ishii: The smooth and stable operation of centromeres. *Genes & Genetic Systems*, 査読有, 87, 63-73 (2012), doi: 10.1266/ggs.87.63
- ⑤ Yuki Ogiyama, Saeko Soejima, Fumie Masuda, Kohta Takahashi & Kojiro Ishii: Telomere-engaged chromosome reorganization after centromere deletion in fission yeast. *Advances in Chromosome Sciences*, 査読無, 3, 76-78 (2010), <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BB17466250>

[学会発表] (計 26 件)

- ① Kojiro Ishii: Immediate cellular response to chromosomal aneuploidy, 4D Nucleome 2014, 2014年12月17日~2014年12月20日, 安芸グランドホテル (広島県廿日市市)

- ② 石井浩二郎: 染色体異数性に対する初期応答、第32回染色体ワークショップ、2014年12月15日～2014年12月17日、安芸グランドホテル（広島県廿日市市）
- ③ 石井浩二郎: 染色体異数性の初期応答、日本遺伝学会第86回大会、2014年9月17日～2014年9月19日、長浜バイオ大学（滋賀県長浜市）
- ④ 石井浩二郎: 分裂酵母を用いた自発的な染色体再編成機構の解析、第22回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、2013年11月20日～2013年11月22日、ホテルニュー水戸屋（宮城県仙台市）
- ⑤ 石井浩二郎: セントロメアの欠損に付随した染色体編成のダイナミクス、国立遺伝学研究所研究会「染色体DNAの安定維持の分子メカニズム」、2013年9月27日～2013年9月28日、国立遺伝学研究所（静岡県三島市）
- ⑥ 大野悠子、久保田佳乃、石井浩二郎: 機能欠損染色体が生み出す細胞応答、日本遺伝学会第85回大会、2013年9月19日～2013年9月21日、慶応大学（神奈川県横浜市）
- ⑦ Kojiro Ishii: Chromosomal reorganizations after centromere dysfunction、International Symposium “Message from Yeast to Epigenetics”、2013年9月2日～2013年9月4日、グランディア芳泉（福井県あわら市）
- ⑧ 荻山友貴、大野悠子、久保田佳乃、石井浩二郎: 新規セントロメア形成におけるヒストンバリエントの働き、第30回染色体ワークショップ、2012年12月19日～2012年12月21日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）
- ⑨ 荻山友貴、大野悠子、久保田佳乃、石井浩二郎: 異所的に形成されたセントロメアを安定化するヒストンバリエントの再編成、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月19日～2012年12月21日、淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）
- ⑩ 石井浩二郎: ネオセントロメア形成の分子機構、日本遺伝学会第84回大会、2012年9月24日～2012年9月26日、九州大学（福岡県福岡市）
- ⑪ 石井浩二郎: 染色体の編成が変わる仕組みを酵母で探る、第20回酵母合同シンポジウム、2012年9月6日～2012年9月7日、京都大学（京都府宇治市）
- ⑫ 石井浩二郎: Ectopic centromere formation is completed with neighboring heterochromatin、第29回染色体ワークショップ、2012年1月25日～2012年1月27日、ホテルニュー水戸屋（宮城県仙台市）
- ⑬ 石井浩二郎: Chromosomal reorganizations provoked by centromere dysfunction、第34回日本

分子生物学会年会、2011年12月13日～2011年12月16日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

- ⑭ 石井浩二郎: 染色体高次機能構築の制御機構、日本遺伝学会第83回大会、京都、2011年9月20日～2011年9月22日、京都大学（京都府京都市）
- ⑮ 石井浩二郎: 染色体編成はどうやって変化するのか？、第23回高遠シンポジウム、2011年8月25日～2011年8月26日、高遠さくらホテル（長野県伊那市）
- ⑯ Kojiro Ishii: Spontaneous chromosome reorganizations after centromere dysfunction、The 6th International Fission Yeast Meeting、2011年6月25日～2011年7月2日、Boston (USA)
- ⑰ Kojiro Ishii: Spontaneous reorganization of acentric chromosomes、The 6th UK Japan Cell Cycle Workshop、2011年4月10日～2011年4月14日、Windermere (UK)
- ⑱ Kojiro Ishii, Yuki Ogiyama, Yuko Ohno, Saeko Soejima, Hiroshi Kimura: Spontaneous reorganization of acentric chromosome、International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities、2011年1月24日～2011年1月26日、淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）
- ⑲ 荻山友貴、石井浩二郎: テロメアとセントロメアに導かれる染色体再編成、第33回日本分子生物学会年会（BMB2010）、神戸、2010年12月7日～2010年12月10日、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）
- ⑳ 石井浩二郎: セントロメア欠失にともなう染色体再編成の分子機序、大阪大学蛋白質研究所セミナー、2010年11月19日～2010年11月20日、大阪大学（大阪府吹田市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/ishii/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 浩二郎 (ISHII Kojiro)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授  
研究者番号：40360276

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし