

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06611

研究課題名（和文）三次元ゲノム構造解析による核内セントロメア構造分子基盤とその役割の解明

研究課題名（英文）3D structural analysis of centromere in vertebrate cells

研究代表者

西村 浩平（Nishimura, Kohei）

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：80582709

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らは、ニワトリDT40細胞を用いて、反復配列のないセントロメアを利用し、間期核のセントロメアに特異的に相互作用するゲノム領域を検出することに成功した。この成功が本研究課題の端緒となっている。本研究の目的は、脊椎動物の間期の核内におけるセントロメアに特異的な三次元ゲノム配置の分子基盤とその役割の解明である。手法としては、上記の成果をベースとして、申請者らが独自に開発したタンパク質除去技術オーキシンドェグロン法（AID法）に高精度ゲノム三次元構造解析手法（4C法とHi-C法）を組み合わせることで、間期核内においてセントロメアが結合ロックの境界線として機能していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、技術的な問題により、これまで解明できなかった間期核内におけるセントロメアの構造配置について、その特徴の一端を解明することができた。この成果は、ニワトリDT40細胞を用いたネオセントロメア保有株、自身が開発したAID法による標的タンパク質分解、そして、ゲノム間相互作用解析Hi-Cの3つの手法を組み合わせることで達成された。今回発見された、セントロメアを境界とするゲノム構造が、どのようなメカニズムによって形成されているかは未だ不明だが、これまで注目されてこなかった間期細胞核内におけるセントロメアの機能解明に向けて、貢献する研究であると考えている。

研究成果の概要（英文）：We successfully detected genome regions that specifically interact with centromeres in interphase nuclei using centromeres without repetitive sequences and the chicken DT40 cell line. This success served as a starting point for this research project. The aim of this study is to elucidate the molecular basis and role of the specific three-dimensional genome organization of centromeres in the nuclei of vertebrates during interphase. The applicants combined their previously achieved results with a protein removal technique they developed, the Auxin-Inducible Degron system (AID), with high-precision genome three-dimensional structural analysis methods (4C and Hi-C) to find that centromeres function as boundaries for binding locks in interphase nuclei.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：オーキシシン AID法 セントロメア DT40 ネオセントロメア セントロメアタンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞のセントロメア領域は、エピジェネティックな機構によって規定され、エピジェネティックマーカーの一つとして、セントロメア特異的なヒストン CENP-A が知られている。細胞分裂期には、CENP-A を含むヌクレオソーム上に、多数のキネトコアタンパク質が集合することで巨大なキネトコア複合体が形成される。一方、本研究では、間期においても、キネトコア形成の足場となる CENP-A と Constitutive Centromere Associated Network (CCAN) が既にセントロメアに集合している点に注目している。脊椎動物細胞の間期の核内でセントロメア領域が特殊な三次元構造およびゲノム配置をとっている可能性は古くから指摘されてきた。しかし、多くの脊椎動物の染色体では高度に保存された反復配列がセントロメア領域に存在しているため、間期核のセントロメア領域の実体とそれを構築する分子機構は不明のままであった。

### 2. 研究の目的

当研究室では、ニワトリ DT40 細胞を用いて、人為的なセントロメア除去により、新たな位置にセントロメア(ネオセントロメア)を形成させる技術を確立している(Shang et al., *Dev Cell*, 2013)。申請者は、ネオセントロメアには反復配列がないことを利用して、この DT40 細胞の間期核を対象としたゲノムワイド解析を行うことで、間期核内のセントロメアに特異的な相互作用部位の同定に成功した(Nishimura et al., *J Cell Biol*, 2018)。その結果、(1) セントロメア領域は特定のヘテロクロマチン領域と相互作用していること、(2) 異なった染色体のセントロメア同士での相互作用があるという2つの特徴を見出すことができた。この成果から、セントロメアは、間期核内において周囲の環境との関わり合いの中から独自のゲノム配置を形成しているというアイデアが浮上した。本研究では、これまで未解明であった、間期の核内におけるセントロメアの実態と役割はどのようなものであるかという問いに挑戦する。間期の核内でのセントロメア構造が、細胞分裂期のキネトコア形成にも密接に関与している可能性も検討し、ひいては、染色体分配の分子機構解明の一助になることを期待している。

### 3. 研究の方法

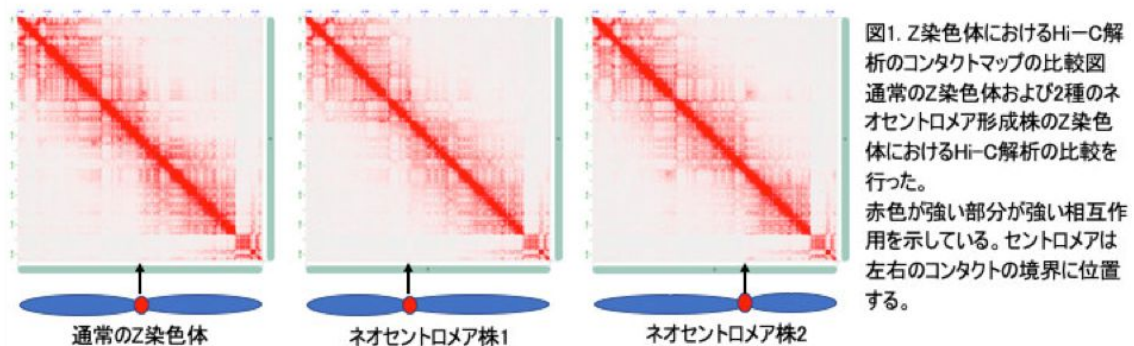
本研究の目的は、間期の核内におけるセントロメアに特有な三次元ゲノム配置の分子基盤とその役割の解明である。間期核セントロメアの知見を乏しくしているもう一つの要因が、研究手法にある。本研究目的の達成のためには、セントロメアを構成する個々のタンパク質のノックアウト細胞の樹立が有効であるが、これらのタンパク質の多くは必須因子であるため、単純なノックアウト細胞の樹立は期待できない。申請者は、以前、タンパク質を速やかにかつ条件的に分解する技術(AID法と命名)を開発した(Nishimura et al., *Nature Methods*, 2009)。AID法は、標的タンパク質の短時間での分解・除去が可能であることから、セントロメアタンパク質の条件的ノックダウンには最適な系である。申請者は、ニワトリ DT40 細胞の AID ノックダウン株を、CRISPR/Cas9 法を応用して簡便に作製する方法を既に構築している(Nishimura and Fukagawa, *Chromosome Res*, 2017)。予備実験では、セントロメア因子 CENP-H の AID ノックダウン株を用いて、間期核内のセントロメアとヘテロクロマチン領域との結合が低下することを見出した(Nishimura et al., *J Cell Biol*, 2018)。この成果は、AID法と4C解析の組み合わせが有効で

あることを証明している。このように申請者が独自に開発・改良してきた方法とゲノムワイド解析技術 (Hi-C 法や 4C 法など) の組み合わせ、そして、反復配列をもたないネオセントロメア保有細胞 (Shang et al., *Dev Cell*, 2013) があって初めてこの未解決課題への挑戦が可能となる。

#### 4. 研究成果

##### A. 間期核内においてセントロメアは染色体間の結合ブロックの境界を形成する。

Z 染色体においてネオセントロメアが形成されているニワトリ DT40 細胞株を複数種用いて、間期核内の核内高次構造を Hi-C 解析により解析したところ、染色体内に形成される結合ブロックがネオセントロメアを境界として、形成されていることが明らかとなった(図 1)。セントロメア領域には分裂期にキネトコアという巨大なタンパク質複合体が形成されるため、染色体における結合ブロックの境界として働くことは考えられるが、染色体が長いひも状のクロマチンを形成している間期核内においてもセントロメアが結合ブロックの境界として機能していることが明らかとなった。



##### B. セントロメアや核構造形成因子の分解によって、この境界構造は変化しない。

セントロメアによって形成される間期核内境界構造はネオセントロメア形成位置と一致していた。このネオセントロメア領域の DNA 配列はすべて異なっているため、DNA 配列情報により、この境界構造が形成されたとは考えにくい。そのため、間期にセントロメアに局在し、セントロメアを特徴づけている因子群がセントロメアの境界構造をつくりだしていると考え、これらのセントロメア構成因子を AID 法により、分解除去する株を作製し、セントロメア因子の分解により、セントロメアの境界構造が変化するかを Hi-C によって確認した。実験に先立ち、染色体構造に大きな影響を持つコヒーシンのサブユニットの一つである Rad21 のノックダウン細胞株を作製し、Rad21 のノックダウン時にセントロメア境界構造がどのように変化するかを解析した。Rad21 のノックダウンは近位のクロマチン構造を破壊することが知られており、本実験においても同様の結果が得られた(図 2 右)。一方で、今回発見された、セントロメアを境界とする結合ブロックについては Rad21 のノックダウンによっても変化は見られなかった(図 2)

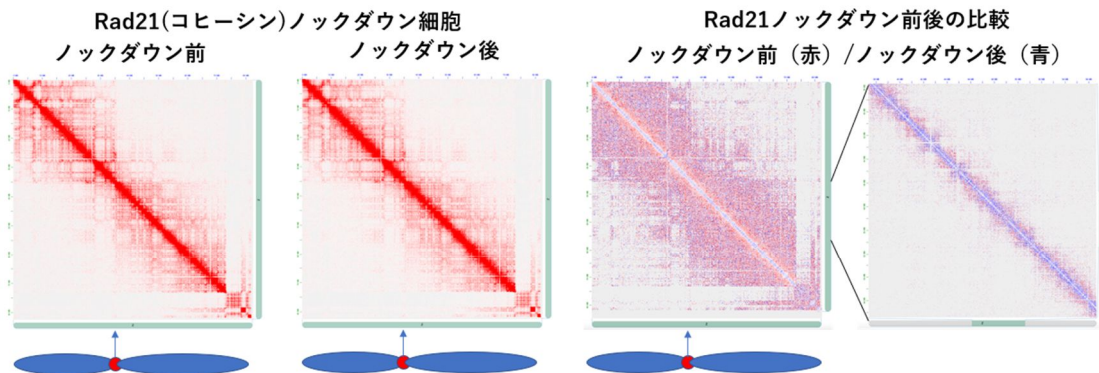


図2.コヒーシサブユニットであるRad21のノックダウンによって、近位のクロマチン構造は破壊されるが、セントロメアを境界とする結合ブロック構造は変化しない。Rad21ノックダウン前、そして、後の細胞のHi-C解析（左側）。赤色の強い部分が強い相互作用を示す。Rad21ノックダウン前後のHi-C解析比較。ノックダウン前を赤色、ノックダウン後を青色で示している。Rad21のノックダウンにより、近位の結合が弱まり近い位置の結合が増えている。

次にセントロメアに局在する主要なセントロメアタンパク質である CENP-A, CENP-C, CENP-H, CENP-T を標的としてノックダウン細胞の作製を行った。樹立したノックダウン細胞を用いて Hi-C 解析を行ったところ、これらのセントロメア因子の分解を誘導してもセントロメアによる境界構造は依然として残ったままであった(図3)

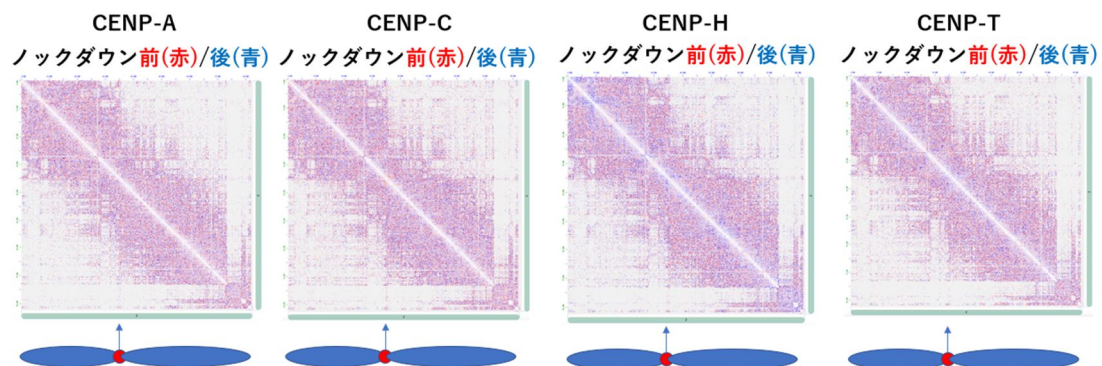


図3.セントロメアに局在するセントロメアタンパク質CENP-A, CENP-C, CENP-HおよびCENP-Tをノックダウンしても、セントロメアを境界とする結合ブロック構造は変化しない。セントロメアタンパク質ノックダウン前後のHi-C解析比較。ノックダウン前を赤色、ノックダウン後を青色で示している。

以上の結果から、次の3つの可能性が考えられた。 セントロメアの境界構造は出来上がってしまった後はセントロメア因子を必要としない。 セントロメアの境界構造は複数のセントロメア因子によってリダントに維持されている。つまり、1つのセントロメアタンパク質がなくなっても他のセントロメア因子によって維持される。 今回使用した AID 法によるノックダウンが不十分であり、セントロメア因子を除去しきれなかったため、セントロメアの特徴が維持されてしまった。

### C. 高感受性 AID 法の開発

セントロメア因子をより効率的に除去するためには従来型の AID 法を超える分解除去系が必要となる。そのため、名古屋大学 ITBM 研究所において開発された高感受性の合成オーキシンと TIR1 変異体とのペアに注目した。このペアは天然のオーキシン-TIR1 のペアと比較して、10000 倍も高い結合力を示しており、このペアを用いた AID 法は従来型の者と比べてより高い分解除去効率を示すことが期待された。そのため、名古屋大学 ITBM 研究所と共同研究を行い、合成オーキ



シンとTIR1変異体を用いた高感受性AID法すなわち、Super-sensitive AID systemを完成させた(図4)。

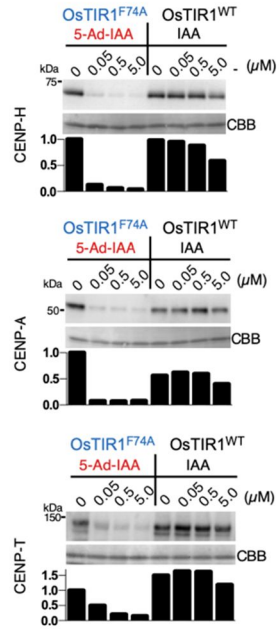
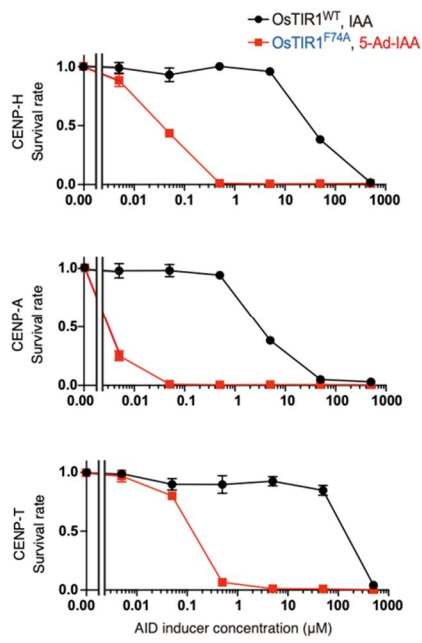


図4. 従来型AID法とssAID法との比較

セントロメアに局在するCENP-H, CENP-A, CENP-Tに対して、従来型のAID法およびssAID法によるデグロン細胞を樹立した。ssAID細胞株は分解誘導剤である5-Ad-IAAに対して高い感受性を示し、従来型の分解誘導剤であるIAAの1/1000の濃度で分解誘導が可能であった(右)。また、細胞増殖停止の表現型解析においても上記と同様の結果が得られている(左)。以上の結果はssAID法の高い分解除去効率を示している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kohei Nishimura, Tatsuo Fukagawa	4. 巻 -
2. 論文標題 A Simple Method to Generate Super-sensitive AID (ssAID)-based Conditional Knockouts using CRISPR-based Gene Knockout in Various Vertebrate Cell Lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Protocol	6. 最初と最後の頁 e4092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.4092.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kohei Nishimura, Tatsuo Fukagawa	4. 巻 -
2. 論文標題 A Simple Method that Combines CRISPR and AID to Quickly Generate Conditional Knockouts for Essential Genes in Various Vertebrate Cell Lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in molecular biology	6. 最初と最後の頁 109-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1720-5_6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tokuko Haraguchi, Takako Koujin, Tomoko Shindo, Kriye Bilir, Hiroko Osakada, Kohei Nishimura, Yasuhiro Hirano, Haruhiko Asakawa, Chie Mori, Shouhei Kobayashi, Yasushi Okada, Yuji Chikashige, Tatsuo Fukagawa, Shinsuke Shibata, Yasushi Hiraoka	4. 巻 5(1):78
2. 論文標題 Transfected plasmid DNA is incorporated into the nucleus via nuclear envelope reformation at telophase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communication Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03021-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kohei Nishimura, Ryotaro Yamada, Shinya Hagihara, Rie Iwasaki, Naoyuki Uchida, Takumi Kamura, Koji Takahashi, Keiko U Torii, Tatsuo Fukagawa	4. 巻 48
2. 論文標題 A super-sensitive auxin-inducible degron system with an engineered auxin-TIR1 pair.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic acids research	6. 最初と最後の頁 e108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tetsuya Hori , JingHui Cao , Kohei Nishimura , Mariko Ariyoshi , Yasuhiro Arimura , Hitoshi Kurumizaka , Tatsuo Fukagawa	4. 巻 33
2. 論文標題 Essentiality of CENP-A Depends on Its Binding Mode to HJURP.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 108388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fabrizio Villa , Ryo Fujisawa , Johanna Ainsworth , Kohei Nishimura , Michael Lie-A-Ling , Georges Lacaud , Karim Pm Labib	4. 巻 5
2. 論文標題 CUL2LRR1 , TRAIIP and p97 control CMG helicase disassembly in the mammalian cell cycle.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e52164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202052164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kohei Nishimura, Ryotaro Yamada, Shinya Hagihara, Rie Iwasaki, Naoyuki Uchida, Takumi Kamura, Koji Takahashi, Keiko U. Torii, Tatsuo Fukagawa	4. 巻 -
2. 論文標題 A super sensitive auxin-inducible degron system with an engineered auxin-TIR1 pair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.01.20.912113	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西村浩平
2. 発表標題 改良型オーキシンと受容体を用いた高感度タンパク質分解法
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei Nishimura
2. 発表標題 A super-sensitive Auxin Inducible Degron (ssAID) system for conditional knockdown in various vertebrate cell lines
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei Nishimura
2. 発表標題 A super-sensitive Auxin-Inducible Degron (ssAID) system for conditional knockdown in various vertebrate cell lines
3. 学会等名 2nd Webinar on Nucleic Acid and CRISPR (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福原佳乃、中島優希、角房直哉、佐藤綾人、打田直行、小原圭介、嘉村巧、西村 浩平
2. 発表標題 Auxin Inducible Degron (AID) 株を利用したオーキシン分子のスクリーニング
3. 学会等名 第62回日本植物整理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei Nishimura , Ryotaro Yamada , Shinya Hagihara , Rie Iwasaki , Naoyuki Uchida , Takumi Kamura , Koji Takahashi , Keiko U Torii , Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 A super-sensitive Auxin-Inducible Degron system for conditional knockdown in various vertebrate cell lines
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 西村浩平, 堀哲也, 豊田敦, 古宮正隆, 伊藤武彦, 深川竜郎
2. 発表標題 脊椎動物細胞におけるセントロメアの3次元構造解析
3. 学会等名 日本遺伝学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------