

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20247019

研究課題名(和文) ヒト人工染色体を用いた染色体基本機能の解析と次世代人工染色体の開発

研究課題名(英文) The analysis of basic chromosomal functions using human artificial chromosomes (HACs) and the development of novel HACs.

研究代表者

舛本 寛 (MASUMOTO HIROSHI)

財団法人かずさDNA研究所・ヒトゲノム研究部・室長

研究者番号：70229384

研究成果の概要(和文)：ヒト人工染色体(HAC)上に組込んだDNA配列に各種融合タンパク質を結合させ、人為的にクロマチン集合バランスを変換可能な次世代人工染色体の開発に成功した。この人工染色体に、転写抑制因子(tTS)やヒストンメチル化酵素 Suv39 を結合させヘテロクロマチンを過剰にするとセントロメア/キネトコア機能が破壊され、細胞から脱落することを証明した。一方、ヒストンアセチル化酵素 HAT の結合は、セントロメア構成因子の集合を促進することを発見し、セントロメアにおけるクロマチン集合バランスの重要性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel human artificial chromosome (HAC) system to investigate the epigenetic state of chromatin by applying a fusion-protein tethering system. We found that altering the HAC centromere chromatin to a more heterochromatic with the tTS transcription silencer or histone methyl transferase (Suv39h) caused mis-segregation of the HAC by losing kinetochore structure. Otherwise, histone acetyl transferase (HAT) fusions enhanced hyper-assembly of kinetochore components, indicating that a dynamic counterbalance is essential for mammalian kinetochore assembly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,313,217	1,893,966	8,207,183
2009年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
年度			
総計	22,813,217	6,843,966	29,657,183

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝学、染色体、分配、セントロメア、人工染色体、クロマチン、エピジェネティクス、ヘテロクロマチン

1. 研究開始当初の背景

ゲノム機能の発現は、細胞増殖、発生・分化、生殖、老化などの生命現象に直接作用する。そのためそれぞれの染色体上には、ゲノムDNAを複製・分配・転写・維持するための染色体基本機能が備わっている。このうち染色体分配機能に関わるセントロメアに関して

は、酵母を中心に分子遺伝学、生化学的解析手法を駆使して飛躍的に解明が進んだ。しかし、哺乳類ではクロマチン構造のエピジェネティックなサイレント化(ヘテロクロマチン化)による影響、数メガベースにも及ぶ巨大繰り返しDNA解析の技術的困難さなどに阻まれ、不明な点が多く残されたままであった。

哺乳類セントロメアではこの巨大反復 DNA 領域に申請当時でも 50 種以上にのぼるセントロメア・キネトコアタンパク質が集合することが次第に明らかになり（現在では 100 種以上）、解析は容易ではなかった。本研究代表者はヒト 21 番染色体セントロメア DNA の構造解析をベースにこの領域由来反復 DNA 配列（アルフォイド DNA）をヒトやマウスの培養細胞へ導入して、安定に分配維持されるヒト人工染色体（HAC）を形成させることに既に成功していた（Ikeno, et al. Nat. Biotech. 1998; Okada et al. Cell 2007）。このヒト人工染色体には本来の染色体と同等の染色体分配機能（セントロメア機能）や複製機構が備わっていることも明らかにした（Tsuduki et al. MCB 2006）。現在でも染色体基本機能解析は酵母の系にほぼ独占されており、哺乳類ではノックアウトマウス、RNAi を用いた個々の遺伝子機能の解析にとどまっている。哺乳類細胞でも大腸菌人工染色体（BAC）や酵母人工染色体（YAC）のように人工染色体を駆使した機能構造解析が可能になれば、染色体基本機能の基礎研究やゲノム情報の医学、生命工学への応用に多大な発展をもたらすことが期待される。

2. 研究の目的

裸の DNA を細胞へ導入し、安定な染色体としての機能獲得に至る過程を完全に理解することは、哺乳類細胞では不明な点が多い複製、分配、転写制御などの染色体基本機能解明への具体的な手がかりになる。更にクロマチン構造のエピジェネティックなサイレント化（ヘテロクロマチン化）もこれら基本機能に密接に関わっている。既知の導入前駆体 DNA のみが重複化し、形成される de novo 人工染色体は、このようなクロマチン構造形成とエピジェネティックな変換機構の解明にも有力な武器となる。そこで本研究ではセントロメアや染色体基本機能が確立するメカニズムを明らかにするため、具体的には以下の 5 つの目標に焦点を絞り、人工染色体を用いて研究を進めた。(1) **セントロメア・キネトコア形成の機構解明**：アルフォイド DNA 配列上へセントロメア構造形成が起こるメカニズムについての詳細を、相互作用するタンパク因子側から順を追って明らかにする。(2) **染色体必須機能領域の解明**：染色体として安定維持されるためには、セントロメアではスピンドルマイクロチューブルと相互作用するキネトコア構造形成が起こると共に、染色分体接着を細胞分裂後期開始時まで維持させるコヒージョン機能も必要である。哺乳類細胞ではこのコヒージョン機能とヘテロクロマチンとの関連性には不明な点が多く残されたままである。そこで先ず人工染色体上ではどのようなメカニズムでヘテロクロマチ

ンが形成されるかについて明らかにする。(3) **クロマチン修飾機構のセントロメア機能への関与**：セントロメア・キネトコア機能とエピジェネティックなヒストン修飾機構との関連性について明らかにするために、各種ヒストン修飾酵素を結合させることにより人為的にクロマチン構造変換が可能な人工染色体を開発する。(4) **異所的セントロメア配列不活性化の機構解明**：2 つの染色体が融合するとどちらか一方のセントロメアが不活性化される現象が知られているが、そのメカニズムは不明なままである。このようなエピジェネティックなセントロメアでの不活性化や再活性化の制御メカニズムを明らかにする。(5) **次世代人工染色体開発**：人工染色体を哺乳類遺伝子導入ベクターとして発展させることは極めて重要な課題である。そこで、次世代人工染色体ベクターの開発を進める。

3. 研究の方法

(1) **セントロメア・キネトコア形成の機構解明**：人工染色体前駆体 DNA を細胞へ導入し、アルフォイド DNA 配列上へ新規ヒトおよびマウスセントロメア構造形成が起こるメカニズムを解析した。導入直後の DNA 上のクロマチン構造を解析できるクロマチン免疫沈降法（ChIP）を開発した。

(2) **染色体必須機能領域の解明**：人工染色体上でどのようなメカニズムでヘテロクロマチン領域が形成されるかについて明らかにするため、各種 ChIP 法を組み合わせ、人工染色体上の転写活性とクロマチン構造について調べた。

(3) **クロマチン修飾機構のセントロメア機能への関与**：テトラサイクリンオペレーター（tet0）配列を挿入したアルフォイド DNA（tet0-アルフォイド DNA）の長い反復配列を合成し、この合成反復配列をヒト HT1080 細胞へ導入して人工染色体（tet0-HAC）を作製した。各種ヒストン修飾酵素とテトラサイクリンリプレッサー（tetR）との融合タンパクを人工染色体の tet0 配列に結合させ、クロマチン構造変換を人為的に誘導可能な人工染色体システムを作製して調べた。

(4) **異所的セントロメア配列不活性化の機構解明**：tet0-アルフォイドの異所的染色体挿入部を保持した HeLa 細胞株を作製した。tet0-アルフォイドの異所的染色体挿入部のクロマチンの詳細な解析と共に、tet0/tetR-融合タンパク系を用いて異所的部位で新たなセントロメア形成を誘導可能かどうか調べた。

(5) **次世代人工染色体開発**：(1)-(4) で得られた成果を利用して脱落制御可能な次世代人工染色体ベクターを開発した。

4. 研究成果：

(1) セントロメア・キネトコア形成の機構解明：アルフォイド DNA 配列に依存した新規ヒトおよびマウスセントロメア構造形成について明らかにするため、細胞へ導入直後の DNA 上へのセントロメア特異的ヒストン H3 である CENP-A (セントロメアの機能マーカー) の集合を検出できる ChIP 法を開発して調べた。その結果、アルフォイド DNA へのセントロメ結合タンパク質 CENP-B の結合に依存して、導入 1-7 日で調べた全てのヒト・マウス細胞株で CENP-A クロマチンの集合が起ることが明らかになった。ところが 2-4 週間後に CENP-A クロマチンの安定性には細胞株ごとに差が生じ、多くの細胞で CENP-A クロマチンが大幅に減少して行くことが判明した。さらにそれぞれの細胞株の示す CENP-A クロマチンの安定性と人工染色体形成能との間に相関関係があることが判明し、クロマチン集合機構をより詳細に調べる必要性が生じた(研究(3)でより詳しく解析)。

(2) 染色体機能領域の解明：哺乳類細胞ではセントロメア機能とヘテロクロマチンとの関連性には不明な点が多く残されたままである。人工染色体形成と ChIP を組み合わせた解析により、転写活性とクロマチン構造について調べた。その結果、細胞へ導入直後に導入 DNA 上の遺伝子のプロモーター活性に依存して転写が開始され、この領域にヒストン H3K9 のアセチル化 (H3K9ac) 修飾や H3K4 のメチル化 (H3K4me3) 修飾を受けたクロマチンが集合し始めた。しかしその後その遺伝子の転写下流領域では H3K9me3 修飾 (ヘテロクロマチン化) が上昇し、ヘテロクロマチンが反復 DNA 上へ広がって行くことが明らかになった (Ohzeki et al. 投稿論文準備中)。さらに、人工染色体上には H3K4me2 クロマチンも集合する。この修飾は転写を許容するクロマチンであり、セントロメア集合を阻害しないが、このメチル化修飾をヒストン脱メチル化酵素 (LSD1) を用いて低下させると、転写活性の低下と共にセントロメアクロマチン (CENP-A) の集合阻害がおこることを明らかにした (論文 1)。

(3) クロマチン修飾機構のセントロメア機能への関与：天然の染色体セントロメアや人工染色体セントロメアでは、同じアルフォイド DNA 配列上にセントロメアクロマチンが集合する部分とさらにヘテロクロマチン (H3K9me3) が集合する部分も混在して分布している。セントロメア・キネトコア機能形成とエピジェネティックなヒストン修飾やクロマチン集合バランスとの関連性について明らかにすることを目標に、tet0 配列をアルフォイド DNA に組込んだ合成反復配列を

作製した。この合成反復配列をヒト HT1080 細胞へ導入し、安定な人工染色体 (tet0-HAC) を得ることに成功した (論文 5)。転写抑制因子 (tTS) やヒストンメチル化酵素 (Suv39) と tetR との融合タンパク質を人工染色体の tet0 配列に結合させ、人為的にクロマチン集合バランスをヘテロクロマチンに偏らせた場合にセントロメア機能がどのように影響を受けるかについて、ChIP 解析と蛍光顕微鏡による観察を行った。ヘテロクロマチン (H3K9me3) 側へクロマチン集合バランスを偏らせると、人工染色体セントロメアでは CENP-A クロマチンが大幅に減少し、キネトコア構造の維持が不可能になった (図 1)。

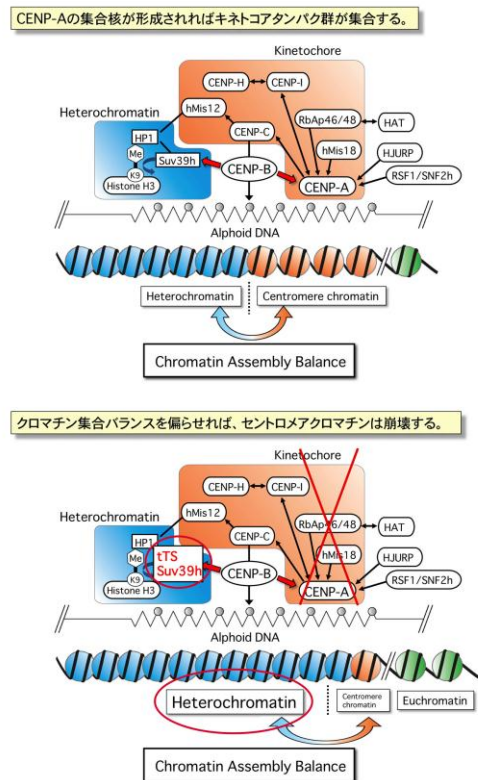


図 1. クロマチン構造変換が可能な人工染色体

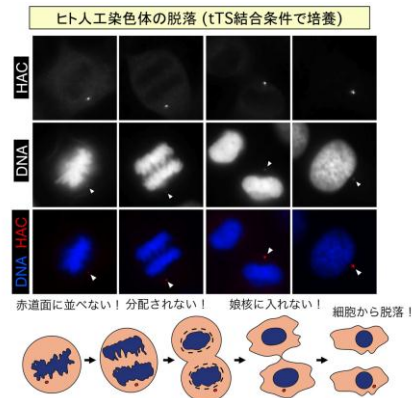


図 2. 過剰ヘテロクロマチンによる人工染色体の脱落

このような人工染色体は分配機能を失い、1-2 週間でほぼ完全に細胞からも脱落することが明らかになった (図 2)。これらの結果により、セントロメア機能構造は、ヘテロクロマチンとさらにこれと拮抗するクロマチンの集合バランスにより制御されていることを証明した (論文 3、論文 5)。

一方、細胞株による人工染色体形成能の違いから、HeLa などヘテロクロマチン形成活性の強い多くの細胞株では、アルフォイド DNA 上への一過的な CENP-A クロマチンの集合は起こるが、その後ヘテロクロマチンに置き換えられてしまうことを見いだした。そこで、ヘテロクロマチン形成に対して拮抗するヒストンアセチル化酵素 (HAT) との tetR 融合タンパク質を tet0-アルフォイドへ導入と同時に結合させると、H3K9ac 修飾の上昇と共に CENP-A クロマチンの集合が増加し、安定維持される人工染色体が形成されることを発見し、HAT による H3K9ac 化はセントロメア形成に対して促進的に作用することを明らかにした。また、この tet0/tetR システムを用いてクロマチン集合バランスを人為的に調節することで、これまで不可能であった細胞株でも人工染色体形成を可能にした。以上の結果により、セントロメア構造形成は、アルフォイド DNA 上で起こるヒストンアセチル化酵素 (HAT) とヒストンメチル化酵素 (Suv39) によるクロマチン集合バランスにより拮抗的に、且つダイナミックに制御されていることを証明した (Ohzeki et al. 論文投稿中)。

(4) 異所的セントロメア配列不活性化の機構解明：セントロメアがエピジェネティックに不活性化あるいは再活性化されるメカニズムを明らかにするため、HeLa 細胞を用いて tet0-アルフォイドが染色体腕の異所的部位へ挿入された細胞株を作製した。この tet0-アルフォイドの異所的挿入部のクロマチン構造の解析を行った結果、挿入部は高レベルのヘテロクロマチン (H3K9me3 修飾) に覆われ、セントロメアタンパク質群の集合も起こらず、セントロメアとして不活性化されていることが判明した。そこでヘテロクロマチン形成に対して拮抗するヒストンアセチル化酵素 (HAT) との tetR 融合タンパク質をこの異所的挿入部の tet0 配列に結合させて観察を行った。その結果、異所的不活性化部位では H3K9ac 修飾の上昇と CENP-A クロマチンの集合が引き起こされると共に、CENP-I、CENP-T、CENP-E など、キネトコア機能に必要なタンパク質群が集合して、セントロメアとして活性化されることが判明した。これらの結果は、セントロメアがエピジェネティックに不活性化あるいは再活性化される現象は、アルフォイド DNA 上でのクロマチン集合バランスがヒストン H3K9 のメチル化修飾か

アセチル化修飾かに偏る分子反応で説明可能であることを示している (Ohzeki et al. 論文投稿中)。この tet0/tetR を利用した人工染色体システムと挿入部位は、多様なセントロメアタンパク質群、クロマチン修飾酵素群、クロマチンリモデリング因子群等の一つ一つのタンパク機能と相互作用を、実際に染色体上で再現して解析できる優れたシステムである。

(5) 次世代人工染色体開発：人工染色体を哺乳類遺伝子導入ベクターとして発展させることは極めて重要な課題である。そこで、次世代人工染色体ベクターの開発を進めた。(3) で得られた成果を利用して脱落制御可能な人工染色体に loxP 組換え部位を挿入したベクターを開発した (論文 2)。さらに、(1)-(4) で得られた知見を利用してセントロメアとヘテロクロマチンを独立に集合制御可能な次世代人工染色体の開発を進めている。これら人工染色体には、染色体基本機能の基礎研究やゲノム情報の医学、生命工学への応用が期待される。

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. Bergmann J.H., Gomez M., Martins N.M.C., Kimura H., Kelly D.A., Masumoto H., Larionov V., Jansen L.E.T. and *Earnshaw W.C.: Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO J.*, 30: 328-340 (2011). 査読有り
2. Iida Y., Kim JH., Kazuki Y., Hoshiya H., Takiguchi M., Hayashi M., Erliandri I., Lee HS., Samoshkin A., Masumoto H., Earnshaw WC., Kouprina N., Larionov V., *Oshimura M.: Human Artificial Chromosome with a Conditional Centromere for Gene Delivery and Gene Expression, *DNA Res.* 17: 293-301 (2010). 査読有り
3. Cardinale S., Bergmann J.H., Kelly D., Nakano M., Valdivia M.M., Kimura H., Masumoto H., Larionov V., & *Earnshaw W.C. Hierarchical inactivation of a synthetic human kinetochore by a chromatin modifier. *Mol. Biol. Cell* 20: 4194-4204 (2009). 査読有り
4. Kim JH., Ebersole T., Kouprina N., Noskov V.N., Ohzeki J., Masumoto H., Mravinac B., Sullivan B.A., Pavlicek A., Dovat S., Pack S.D., Kwon YW., Flanagan P.T., Loukinov D., Lobanenkov V., & *Larionov V.: Human gamma-satellite DNA maintains open chromatin structure and protects a transgene from epigenetic silencing. *Genome Res.* 19:

- 533-544 (2009). 査読有り
5. Nakano M., Cardinale S., Noskov V.N., Gassmann R., Vagnarelli P., Kandels-Lewis S., Larionov V., Earnshaw W.C., & *Masumoto H.: Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Dev. Cell* 14: 507-522 (2008). 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

1. Masumoto H., Ohzeki J., Nakano M., et al. V.: A chromatin assembly balance determines the fate of de novo kinetochore or heterochromatin formation on satellite DNA. EMBO Workshop on Chromosome Segregation and Aneuploidy, Edinburgh, 19 - 23 June, 2010.
2. Masumoto H. A Dynamic Assembly Balance of Centromere Chromatin and Heterochromatin on Alpha-satellite DNA. The American Society of Human Genetics The 59th Annual Meeting, in The Invited Session "Epigenetics of human centromere formation", Honolulu, Hawaii, 20 Oct. 2009.
3. Masumoto H., Ohzeki J., Nakano M., Okada T., Larionov V., & Earnshaw W.C. Dynamic Assembly mechanism of Centromere Chromatin and Heterochromatin on Human Satellite DNA. The 24th Naito Conference on "Nuclear Dynamics and RNA [II]" 25 June, Sapporo, 2009
4. Masumoto H., et al. A Dynamic Assembly Balance of CENP-A Chromatin or Heterochromatin for Centromere Activity on Alpha-satellite Repeats. EMBO Workshop Chromosome Segregation: Centromeres and Kinetochores, Arcachon, Bordeaux, France, 28 Sept, 2008
5. Masumoto H., et al. Dynamic Assembly and Inactivation of Human Centromere on Satellite DNA "International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise, May 28, 2008
6. 舛本寛、中野めぐみ、大関淳一郎、他 セントロメア機能形成に関わるダイナミックなクロマチン集合バランス, 第31回日本分子生物学会年会、神戸、2008年12月8-12日
7. 舛本寛: コンディショナルセントロメアを持つ人工染色体, 第82回日本遺伝学会大会、札幌、2010年9月22日

[図書] (計 3 件)

1. *Masumoto H., Okada T., & Okamoto Y. Human Artificial Centromeres: *De novo* assembly of functional centromeres on human artificial chromosomes. in "The Kinetochore: from Molecular Discoveries to Cancer Therapy". Eds. De Wulf P., and Earnshaw W.C. **Springer Publ. New York** pp. 107-132 (2008). 査読あり
2. 中野めぐみ、舛本寛、染色体分配装置セントロメアの形成メカニズム、蛋白質核酸酵素: 54, 427-435, (2009)、査読無し
3. 舛本寛、岡田晃明、ヒト人工染色体から見

た染色体制御機構、生化学: 80: 200-209 (2008)、査読無し

[その他]

ホームページ等

http://www.kazusa.or.jp/j/laboratories/labo_cellengineering.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舛本 寛 (MASUMOTO HIROSHI)

(財団法人) かずさ DNA 研究所・室長

研究者番号: 70229384

(3) 連携研究者

中野 めぐみ (NAKANO MEGUMI)

(財団法人) かずさ DNA 研究所・研究員

研究者番号: 50542825

大関 淳一郎 (OHZEKI JUN-ICHIROU)

(財団法人) かずさ DNA 研究所・研究員

研究者番号: 30514088