

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07317

研究課題名(和文) ZfatによるセントロメアノンコーディングRNA転写制御機構とガンとの関連の解明

研究課題名(英文) Zfat-regulated non-coding RNA transcription at the centromeres and relationship to cancer.

研究代表者

石倉 周平 (Ishikura, Shuhei)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：40336631

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)：均等な染色体分配に必須の染色体領域であるセントロメアにおいて、ノンコーディングRNA(ncRNA)の転写がその機能維持に重要であるが、その制御機構については不明であった。本研究課題では、核に局在する転写因子であるZfatがセントロメアに結合し、アセチル化酵素KAT2Bをリクルートし、ヒストンH4リジン8のアセチル化(H4K8ac)レベルを上昇させること、H4K8acにプロモドメインタンパク質BRD4が結合すること、BRD4により活性化されたRNAポリメラーゼIIがセントロメアからのncRNAの転写を行うことを明らかにし、ZfatによるセントロメアncRNAの転写制御機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不活性なクロマチン領域だと考えられていたセントロメアからncRNAが転写されていることが明らかにされて以降、セントロメアの機能および形成過程におけるncRNAの重要性が報告されてきた。しかしながら、その転写制御機構については全く不明であった。また、セントロメアの機能異常とガンとの関連性が報告されているが、その分子メカニズムについても不明であった。本研究により、Zfatによるセントロメアにおける転写制御機構が明らかになり、ZfatがセントロメアncRNA転写に必須の因子として世界で初めて同定された。今後、Zfatが関係するセントロメアの機能異常とガンとの関連性が明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The centromere is an essential chromosomal structure for faithful chromosome segregation during cell division. No protein-coding genes exist at the centromeres, but centromeric DNA is actively transcribed into non-coding RNA (ncRNA). This centromeric transcription and its ncRNA products play important roles in centromere functions. However, there is limited understanding regarding the regulation of this process at the molecular level. Here, we report crucial roles of the nuclear zinc-finger protein Zfat in centromeric ncRNA transcription. Zfat specifically binds to 8-bp DNA sequences at the centromere, named the Zfat box. Zfat specifically induces acetylation of lysine 8 in histone H4 (H4K8ac) at the centromere by recruiting the histone acetyltransferase KAT2B. The KAT2B-catalyzed H4K8ac at the centromere functions as a binding-site for the bromodomain-containing protein BRD4, which stimulates RNA polymerase II-dependent ncRNA transcription.

研究分野：細胞生物学

キーワード：セントロメア ノンコーディングRNA ヒストンアセチル化 ZFAT CENP-B DAXX BRD4 KAT2B

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が分裂する際には、複製された染色体が娘細胞へ均等に分配されなければならない。不均等な染色体分配が起こると、染色体数が正常とは異なる「異数性」の原因となる。異数性は細胞のガン化およびガンの悪性化の引き金になると考えられている。実際、多くのガン細胞において染色体分配の異常が高頻度で観察されている。従って、染色体分配の分子メカニズムを明らかにすることは基礎生物学および医学の両面から非常に重要である。

分裂期の姉妹染色体上に形成されたキネトコアに細胞の両極にある中心子から伸びた紡錘糸が結合し、姉妹染色体は各娘細胞へ均等に分配される。キネトコアが形成される染色体領域であるセントロメアは細胞分裂時の染色体の均等分配において中心的な役割を担っている。多くの哺乳動物において、セントロメアは種特異的な反復 DNA 配列によって構成されているが、セントロメアは DNA 配列に依存し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。セントロメアを定義するエピジェネティックマーカーの一つがセントロメアに特異的に存在するヒストン H3 のバリエーションである centromere protein A (CENP-A) である。しかしながら、CENP-A を含むヌクレオソームがどのように特定の染色体領域に取り込まれ、セントロメアが形成されるのか? また確立されたセントロメアが細胞分裂や分化を経てどのように維持されるのか? など、セントロメアの形成・維持の分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。また、セントロメアは反復 DNA 配列で構成されているために、転座・欠失などの染色体異常が生じやすい脆弱な染色体領域であり、セントロメアの機能不全がガンの発生・進展に深く関与することが知られている。

2. 研究の目的

セントロメアはヘテロクロマチン構造をとり、不活性な染色体領域であると、これまで考えられてきたが、近年、セントロメアからノンコーディング RNA (ncRNA) が転写されていることが明らかにされた。セントロメアにおける転写および産生された ncRNA は、CENP-A のセントロメアへのローディングやキネトコアの機能制御に重要な役割を担っていると考えられている。また、セントロメア ncRNA を過剰発現させることにより染色体分配に異常が生じることや、セントロメアにおける過剰な転写によりセントロメアの不活化が起きることも報告されている。実際、様々なガン細胞においてセントロメア ncRNA の過剰発現が認められており、セントロメア ncRNA の転写制御における異常が、ガンの発症・進展と関連がある可能性が示唆されている。従って、セントロメアにおける ncRNA の転写は厳密な制御を受けていると考えられているが、関与する転写因子など、セントロメアにおける ncRNA 転写の制御メカニズムは分かっていない。

我々が独自に同定した転写制御因子である Zfat(Zinc-Finger protein with AT-hook)は、核に局在し、高度に保存された 18 個の Zn フィンガードメインと 1 個の AT-hook ドメインを有する分子量 190 kDa のタンパク質である。我々は、Zfat がセントロメアに結合し、ncRNA の転写を制御する可能性を見出した。本研究では、セントロメア ncRNA の Zfat による転写制御の分子メカニズムを解明し、その異常とガンとの関連性を明らかにすることを目的とする。

3 . 研究の方法

Zfat のセントロメアへの結合

恒常的に HA-Zfat を発現した HEK293 細胞を作成し、抗 HA 抗体を用いた ChIP-Seq 解析を行い、Zfat のセントロメアへの結合について検討する。

セントロメア ncRNA 転写の Zfat による制御の分子メカニズム

Zfat のセントロメア ncRNA 転写への関与について検討するために、HA-Zfat 過剰発現のセントロメア ncRNA レベルへの影響について、RNA-Seq 解析により検討する。さらに、Zfat によるセントロメア ncRNA 転写制御の分子メカニズムを明らかにするために、各種ヒストン修飾に対する抗体を用いて、Zfat 過剰発現によるセントロメアにおけるヒストン修飾レベルへの影響について細胞免疫染色法により検討する。また、Zfat によるヒストンアセチル化酵素のセントロメアへのリクルートについて検討するために、各種ヒストンアセチル化酵素に対する抗体を用いた細胞免疫染色法により検討し、Zfat によるセントロメア ncRNA 転写制御の分子メカニズムを明らかにする。

Zfat によるセントロメア ncRNA 転写制御の機能的意義

siRNA を用いて Zfat をノックダウンした細胞において、抗 α -Tubulin 抗体を用いた細胞免疫染色法を用いて、Zfat 発現抑制による spindle morphology への影響を明らかにする。

Zfat によるセントロメア ncRNA 転写制御の破綻とガンとの関連

卵巣ガン細胞株 SK-OV-3 細胞、膵ガン細胞株 Capan-1 細胞、B 細胞リンパ腫細胞株 Daudi 細胞において、Zfat 遺伝子の変異の有無、Zfat 発現レベル、セントロメア ncRNA 発現レベルについて検討する。さらに、Zfat の過剰発現・ノックアウトの、細胞増殖 (WST8 染色) 細胞周期の進行 (BrdU 取り込み) および染色体分離 (チューブリンに対する細胞免疫染色) への影響について検討する。また、ガンにおいて高頻度で見つかった Arg174 と Arg474 に変異を導入した Zfat を発現させ、細胞増殖・染色体分配・セントロメア ncRNA の発現レベルへの影響について検討する。さらに、CRISPR-Cas9 を用いて、内在性 Zfat の Arg174 および Arg474 に変異を導入後、ヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を調べる。

4 . 研究成果

Zfat のセントロメアへの結合

ヒトゲノム DNA における Zfat の結合領域を同定するために、HA-Zfat を HEK293 細胞に発現させ、抗 HA 抗体を用いて ChIP-Seq 解析を行ったところ、セントロメア領域に Zfat の結合が認められた。Zfat は全染色体のセントロメアに結合したが、その結合レベルは染色体ごとに異なった。

Zfat とセントロメアタンパク質 CENP-B との共局在について、細胞免疫染色法により検討したところ、両者の共局在が認められたことから、Zfat がセントロメア DNA に結合していることが明らかになった。

Zfat によるセントロメア ncRNA 転写制御

セントロメアから ncRNA が転写されていることが明らかにされていたが、その制御メカニズムについては全く不明であった。HA-Zfat 過剰発現細胞において、RNA-seq 解析を行ったところ、特定の染色体のセントロメアにおいて、ncRNA レベルが上昇していることが明らかになった (Figure 1)。Zfat 過剰発現によるセントロメア ncRNA レベルへの影響は、各染色体ごとに異なっていたことから、Zfat は特定の染色体のセントロメアにおいて、ncRNA の転写制御に関与していると考えられた。

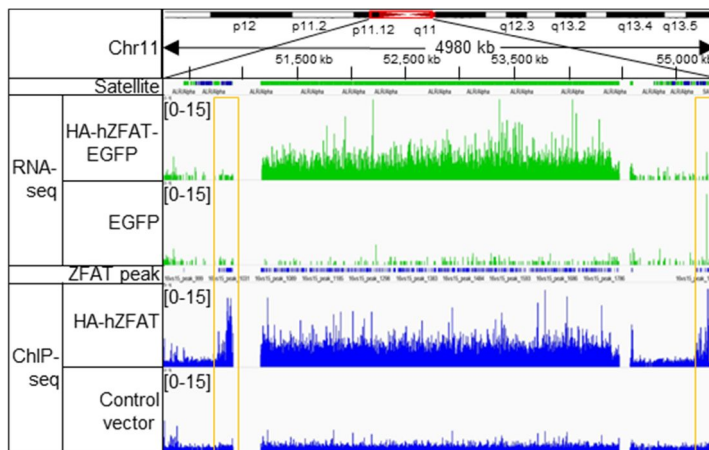


Figure 1. Combined results of the RNA-seq analysis of HT1080 cells expressing HA-hZFAT-EGFP or EGFP, and the ChIP-seq analysis of hZFAT in HEK293 cells transfected with HA-hZFAT expression vector or control vector, at the α -satellite DNA region of the chromosome 11.

Zfat によるセントロメア ncRNA 転写制御の分子メカニズム

マウス Zfat の解析により、Zfat がヒストンアセチル化の制御に関与している可能性が示唆されていたので、Zfat 過剰発現のセントロメアにおけるヒストンアセチル化レベルへの影響について細胞免疫染色法により検討したところ、ヒストン H4 の Lys8 のアセチル化の Foci 形成が、Zfat 過剰発現によりセントロメアにおいて誘導されることが

明らかになった。

さらに、Zfat と各ヒストンアセチル化酵素との共局在について検討したところ、Zfat 過剰発現により、ヒストンアセチル化酵素 KAT2B の Foci 形成が、Zfat 過剰発現によりセントロメアにおいて誘導されることが明らかになった。

アセチル化ヒストンに結合するタンパク質として、プロモドメインタンパク質 BRD タンパク質が知られている。そこで、Zfat 過剰発現による BRD タンパク質局在に対する影響について検討したところ、プロモドメインタンパク質 BRD4 の Foci の形成が、Zfat 過剰発現によりセントロメアにおいて誘導されることが明らかになった。

以上より、Zfat がセントロメアに結合し、ヒストンアセチル化酵素である KAT2B をセントロメアにリクルートし、KAT2B によりセントロメアに誘導されたヒストン H4 Lys8 のアセチル化にプロモドメインタンパク質である BRD4 が結合することにより、セントロメア ncRNA の転写が活性化されることが明らかになった (Figure 2)。

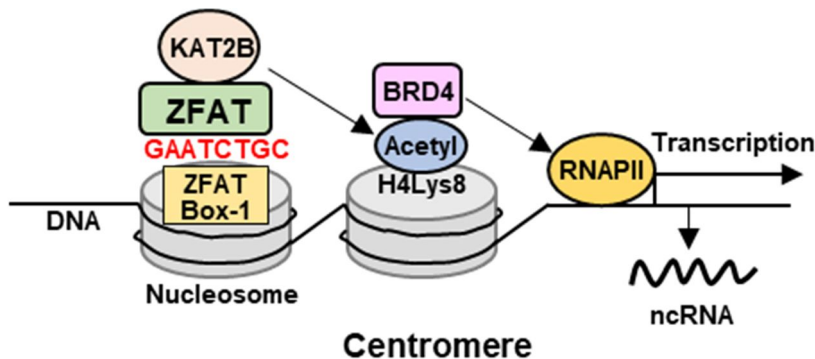


Figure 2. Model of ZFAT-regulated centromeric ncRNA transcription through the KAT2B-H4K8ac-BRD4 axis.

Zfat によるセントロメア ncRNA 転写制御の意義

セントロメアにおける ncRNA の転写が、セントロメアの形成や機能維持に重要な役割を担っていると示唆されているが、その意義については不明な点が多く残されている。siRNA による Zfat 発現抑制の spindle morphology への影響を検討したところ、Zfat 発現抑制により、異常な mitotic spindle morphology を示す細胞の割合が有意に増加した。従って、Zfat によるセントロメア ncRNA 転写制御が、セントロメアの機能維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

本研究により、Zfat によるセントロメア ncRNA 転写制御の分子メカニズムが明らかになった。しかしながら、Zfat の発現異常によるセントロメア ncRNA 転写制御異常とガンとの関連性については十分に検討することができなかった。今後は、本研究をさらに発展させ、セントロメア ncRNA 転写制御の異常とガンとの関連を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shuheishi Ishikura, Kazuhiko Nakabayashi, Masayoshi Nagai, Toshiyuki Tsunoda, Senji Shirasawa	4. 巻 48(19)
2. 論文標題 ZFAT binds to centromeres to control noncoding RNA transcription through the KAT2B-H4K8ac-BRD4 axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 10848-10866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa815	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 Shuheishi Ishikura Masayoshi Nagai Toshiyuki Tsunoda Kensuke Nishi Yoko Tanaka Midori Koyanagi Senji Shirasawa	4. 巻 122(6)
2. 論文標題 The transcriptional regulator Zfat is essential for maintenance and differentiation of the adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 626-638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.29890	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 Shuheishi Ishikura, Kazumasa Yoshida, Sayuri Hashimoto, Kazuhiko Nakabayashi, Toshiyuki Tsunoda, Senji Shirasawa	4. 巻 297(4)
2. 論文標題 CENP-B promotes the centromeric localization of ZFAT to control transcription of noncoding RNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101213	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 Shuheishi Ishikura, Kazumasa Yoshida, Toshiyuki Tsunoda, Senji Shirasawa	4. 巻 298(11)
2. 論文標題 Death domain-associated protein DAXX regulates non-coding RNA transcription at the centromere through the transcription regulator ZFAT	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102528	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石倉 周平、吉田 和真、白澤 専二
2. 発表標題 DAXXはZFATを介してセントロメアにおけるノンコーディングRNAの転写を制御する
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022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
---------	---------