

機関番号：37104

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770009

研究課題名 (和文) 分裂酵母の新規セントロメア形成系の構築と形成関連因子の解明

研究課題名 (英文) Construction of system and analysis of related factors for de novo centromere formation in fission yeast

研究代表者

佐藤 浩 (SATO HIROSHI)

久留米大学・分子生命科学研究所・助教

研究者番号：00421313

研究成果の概要 (和文)：分裂酵母の 2 本の染色体末端を結合させた融合染色体は、染色体分配に必要なセントロメアの一方が機能的に不活性化する。この融合染色体の活性のあるセントロメアを配列特異的組換え酵素を用いて破壊し、不活性セントロメアのみとすることで、新規セントロメアの形成実験系を構築した。この実験系と遺伝子破壊株を用いた解析から、ヘテロクロマチンやヒストンの脱アセチル化がセントロメア活性化抑制に関与することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Artificial fused chromosome containing two centromeres were converted into a stable monocentric chromosome by functionally inactivating one centromere in fission yeast. We developed a method to generate de novo centromere from the fused chromosome on which the active centromere was deleted by site-directed recombination and only inactive centromere was contained. The analysis using this system in mutant strains indicated that the heterochromatin and deacetylation of histone prevent revival of the inactivated centromere.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：セントロメア、染色体、分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの生物では、染色体上に一箇所のセントロメア領域が存在し、細胞分裂期に染色体の均等分離に必要な動原体が形成されます。動原体はセントロメア DNA と多くのタンパク質の複合体で構成されていますが、セントロメアの塩基配列は真核生物間を通し

て相同性がほとんど見られません。一方で動原体タンパク質は多くが保存されています。生物間で異なる配列上にどのような仕組みで共通する動原体が形成されるのかについては不明のままです。

(2) ヒトの本来セントロメアとは無関係な

染色体領域が、セントロメアとして機能しているネオセントロメアの解析から、セントロメアの形成には塩基配列以上にエピジェネティック (epigenetic) な機構が重要であることが示唆されています。

(3) セントロメアは染色体の分離に必要なとともに、複数のセントロメアの存在は、染色体の欠損や切断の原因となります。しかしながら、染色体上にセントロメアが一個しか形成されないよう調節する機構はほとんど分かっていません。

2. 研究の目的

(1) 不明な点の多いセントロメアの形成機構を染色体の構造改変を利用して明らかにする。

(2) 新規のセントロメアを作製させる実験系を構築する。

(3) この実験系を用いて染色体分配に必要なセントロメア・動原体複合体が、どのような分子機構によって新規に形成されるのか、ならびに形成の調節機構解明を目的としています。

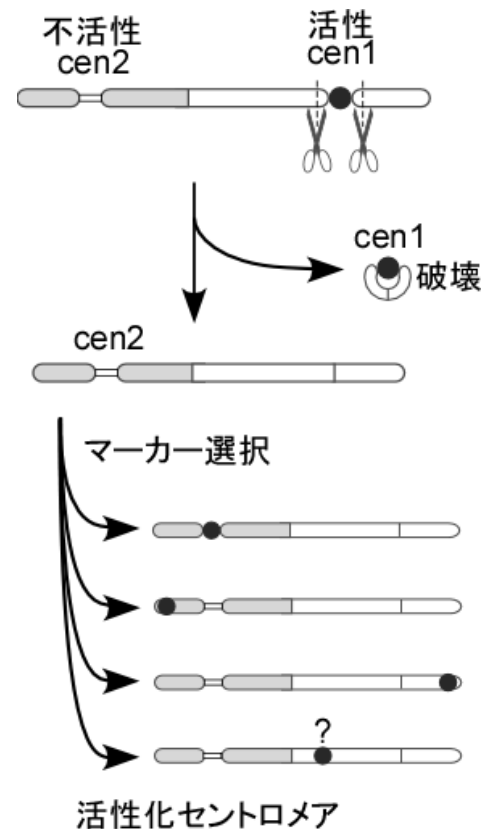
3. 研究の方法

(1) 分裂酵母の1番染色体と2番染色体の2本の染色体末端を結合した融合染色体(シュードダイセントリック染色体)は、セントロメア配列を2つ持ちながら、どちらか一方のセントロメアが機能的に不活性化することで生存することをみいだした。そこで、このシュードダイセントリック染色体を用い、活性のあるセントロメアをCre/loxP組換えを用いて破壊した(図1)。

本実験では1番染色体のセントロメア(cen1)が活性化しており、2番染色体のセントロメア(cen2)が不活性化した株を使用した。セントロメアの破壊は以前の報告をもとに、cen1の両側近傍にloxP配列を挿入し、Creリコンビナーゼをプラスミドにより発現した。組換えによりセントロメアが破壊された株は、組換え部分のカナマイシン耐性遺伝子の発現が誘導され、さらにウラシル要求性になるように菌株を設計することで、セントロメア破壊株が選択された。これにより活性のあるセントロメアを持たない染色体保有株がどのようにして生き残るか、どのようにして新規セントロメアが形成されるのかを解析した。

(2) 遺伝子破壊株を用い同様のセントロメア破壊実験を行い、その際の生存株の出現頻度、クロマチン免疫沈降法により新規セントロメアの形成領域の解析を行い、セントロメアの形成、および調節がどのような機構であ

るかを調べた。



4. 研究成果

(1) 本研究では、分裂酵母を用いてシュードダイセントリック染色体から、新規のセントロメア構築を実験的に再現できる系を確立した。これまで、セントロメアの再構成実験は、人工染色体などの短い染色体(プラスミドなど)で、セントロメアのDNA配列も完全に本来と同一のものでは行われていませんでした。

本実験では本来のDNA配列を持つセントロメアを使用し、テロメアや複製起点なども本来の染色体同様に持つ長い染色体を用いることによって、より自然に近い状態でのセントロメアの形成、調節が観察できるようになった画期的な実験系が構築できた。

さらに我々の以前行った、ダイセントリック形成によるセントロメア不活性化の研究結果と合わせて、領域的なセントロメアを持つ染色体において、完全なセントロメアの活性化および不活性化を行える実験系が構築できた。このような実験系はほとんど例がなく、セントロメアの解析を行う上で非常に有用である。ヒトのシュードダイセントリック染

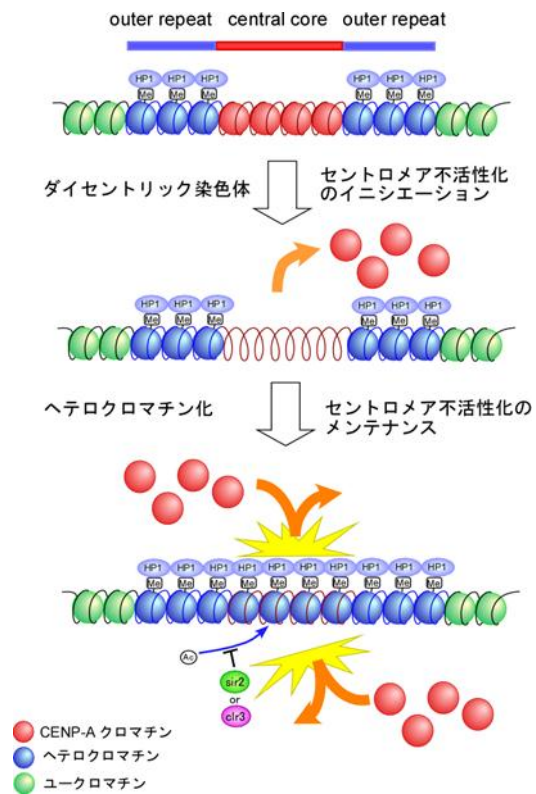
染色体において、2つのセントロメアの間で活性と不活性のスイッチングの報告があり、同一染色体上にセントロメアが1つだけ形成されるような調節機構の存在が示唆される。本実験系はこの調節機構の解明を行うよい実験系であり、現在解析を進めている。

(2)本実験系を用いた解析から、シュードダイセントリック染色体の活性のあるセントロメアを破壊しても、不活性化したセントロメアが再活性化することはなかった。その代わりに、ほとんどの株においてテロメア近傍に新たなセントロメア活性を示す領域(ネオセントロメア)が形成された。このことから、不活性化したセントロメアは何らかの再活性化の抑制を受けていることが考えられた。

(3)シュードダイセントリック染色体の不活性化したセントロメア領域は、本来のセントロメアとはクロマチン構造が異なり、セントロメア領域全体がヘテロクロマチン化されている。そこで、このヘテロクロマチンがセントロメアの再活性化抑制に関与しているのではないかと考えて、ヘテロクロマチンができない変異株($\Delta clr4$, $\Delta swi6$)における実験を行った。この結果、不活性化したセントロメアの再活性化が観察された。このことから、ヘテロクロマチン化がセントロメアの再活性化の抑制に関与していることが示された。

(4)さらに不活性化したヘテロクロマチン領域はヒストンが脱アセチル化していることがChIP解析により明らかとなった。そのためヒストンの脱アセチル化酵素の破壊株 $\Delta sir2$, $\Delta clr3$ において同様のセントロメア破壊、再活性化実験を行ったところ、どちらの株においても高頻度で不活性化セントロメアの再活性化が観察された。このことから、セントロメア再活性化の抑制にはヒストンの脱アセチル化が関わる事が示唆された。ヒストンのアセチル化状態がセントロメアの活性化に必要なのか、ヘテロクロマチン化とこのヒストンアセチル化のセントロメア形成における関係は非常に興味を持たれるところである。(図2)

(5)本研究と以前の解析により、セントロメアの不活性化機構には活性のあるセントロメアの不活性化と不活性化したセントロメアの再活性化抑制の2段階のステップが存在することを初めて明らかにしました。それぞれの制御機構は異なることが考えられ、セントロメアが染色体上で一カ所に制限されるエピジェネティックな調節機構の解明が今後期待されます。



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)

[学会発表] (計5件)

① 佐藤 浩

Epigenetic centromere inactivation consists of two steps: kinetochore disassembly and subsequent heterochromatinization
International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (GENOFIELD2011) 2011年1月25日 淡路夢舞台国際会議場

② 佐藤 浩

ヘテロクロマチンによる不活性化セントロメアの再活性化抑制
第28回染色体ワークショップ 2011年1月12日 石川県

③ 佐藤 浩

Heterochromatin suppresses kinetochore reassembly on epigenetically inactivated centromeres

BMB2010 2010年12月7日 神戸ポートアイ
ランド

④ 佐藤 浩
染色体構造改変によるセントロメア制御機
構の解析
第28回 YEAST WORKSHOP 2010年11月12日
福山

⑤佐藤 浩
Epigenetic and genetic centromere
inactivation in a dicentric chromosome
The Fifth International Fission Yeast
Meeting 2009年10月 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 浩 (SATO HIROSHI)
久留米大学・分子生命科学研究所・助教
研究者番号：00421313

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし