

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02461

研究課題名（和文）セントロメアクロマチンの”コンパクトさ”を形作る機構とその意義

研究課題名（英文）Mechanisms establishing higher-order structure of centromeric chromatin

研究代表者

原 昌稔（Hara, Masatoshi）

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：30565099

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脊椎動物細胞におけるセントロメアクロマチン構造を形成する分子機構の解明を目指した。そのために、ニワトリDT40細胞を用いて、セントロメア領域のクロマチン構造を定量的に評価する系を構築した。それにより、キネトコアタンパク質CENP-Cの自己多量体化が、セントロメア領域のクロマチン高次構造形成に重要であること、および正確な染色体分配に必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セントロメアがユニークなクロマチン構造をとることは、古くからの観察により示唆されていたが、その実態やクロマチン構造形成を制御するは不明だった。本研究では、塩基配列レベルでセントロメアクロマチン構造を解析することで、その構造を形成する分子機構を見出した。この知見は、セントロメア構造形成制御の解明に重要だけでなく、キネトコア形成および正確な染色体分配を支える分子基盤の理解にも貢献するものとなった。

研究成果の概要（英文）：To understand the mechanisms underlying centromeric chromatin structure formation in vertebrate cells, we developed a way to evaluate chromatin structure within a centromeric region in chicken DT40 cells quantitatively. Using the method, we found that the unique high-order structure of centromeric chromatin requires self-oligomerization of kinetochore protein CENP-C, which is crucial to accurate chromosome segregation.

研究分野：分子生物学

キーワード：セントロメア クロマチン キネトコア 染色体分配

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

クロマチンは、DNA とタンパク質の複合体であり、ゲノム DNA を折りたたむことで、核内コンパートメントのような大きな構造から、局所的な小さな構造まで多層的な構造を形成する。これらのクロマチン構造は、遺伝子発現や DNA 複製などの、ゲノム DNA の機能制御に重要である。そのため、クロマチン構造とその制御の解明は、ゲノム DNA の機能制御の理解に欠かすことができない。

セントロメアは、細胞分裂に際した正確な染色体分配に必須な、特殊なゲノム領域である。このセントロメアは、自身のクロマチン上にキネトコアタンパク質複合体をリクルートし、染色体と紡錘体微小管との結合を確立する。それにより、正確な染色体分配が保障される。セントロメアクロマチンは、セントロメアに特異的なヒストン H3 バリエーションである CENP-A を含むヌクレオソーム (CENP-A ヌクレオソーム) が、通常のヒストン H3 を含む H3 ヌクレオソームの間に点在するというような一次構造をとる。これまでに、古典的な電子顕微鏡観察により、セントロメア領域がユニークな 3 次元クロマチン構造をとる可能性が示唆されているが、その分子実体は不明である。そのため、「脊椎動物細胞のセントロメアクロマチン構造がどのように形成され、どのように制御されるのか？ また、その特異的な構造が染色体分配機能とどのように関連するのか？」という問いは、解明される課題として残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、セントロメアが形づくる特殊なクロマチン構造と染色体分配機能との関連を理解するために、クロマチンの局所的な凝集度を定量的に評価できる系を確立する。それにより、セントロメアがコンパクトなクロマチン構造をとることを示す。さらに、セントロメアクロマチン構造を形成される仕組みやその制御機構を解明するとともに、それらの生理的意義を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでに、脊椎動物細胞のセントロメアクロマチン構造の理解が進まなかった大きな理由は、ヒトを含む多くの動物のセントロメア領域はリピーター DNA 配列によって構成されているためである。そのため、塩基配列レベルでそのクロマチン構造を解析することは困難であった。一方、ニワトリ DT40 細胞の Z 染色体内在性セントロメア領域は、非リピーター DNA 配列を持つ。この特徴と 3CqPCR 法を組み合わせることで、セントロメア領域内の 2 点の結合頻度を定量的に測定する系を構築する (セントロメア 3CqPCR)。次に、セントロメア 3CqPCR を用いて、キネトコアタンパク質 CENP-C が、セントロメアクロマチン構造の形成に関与することを明らかにする。そのために、CENP-C ノックアウト細胞のセントロメアクロマチン構造を解析する。CENP-C は進化的に保存された複数の機能ドメインを持つ。これらを欠損させた各種 CENP-C 変異体を DT40 細胞に発現させ、セントロメアクロマチン構造を解析することで、CENP-C がどのようにセントロメア構造形成を制御するかを明らかにする。また、リコンビナントタンパク質を用いた試験管内再構成系による解析を行うことで、CENP-C によるセントロメアクロマチン構造制御の分子機構を理解する。CENP-C 変異体細胞の解析や、試験管内再構成系から得られた結果をもとに、CENP-C 変異体を作製し DT40 細胞に発現させる。その細胞でキネトコア形成や染色体分配を調べることによって、CENP-C によるセントロメアクロマチン制御の生理的意義を明らかにする。

### 4. 研究成果

3C-TaqMan qPCR 法を用いたセントロメアクロマチン構造を定量的解析法の確立のために、まず、異所的セントロメア (ネオセントロメア) を持つニワトリ DT40 細胞を用いて条件検討を行った。申請者の所属研究室は、ニワトリ DT40 細胞の Z 染色体の腕部に、安定したネオセントロメアを保持する細胞株 (ネオセントロメア細胞) を樹立していた。この細胞のネオセントロメア領域は、ユニークな DNA 配列を持っている。そのため、野生型細胞をコントロールとして用いることで、そのゲノム領域がセントロメアになっている時となっていない時で、クロマチン構造を比較することが可能である。まず、このセントロメア細胞と野生型細胞を用いて、3C-TaqMan qPCR 法を最適化した (セントロメア 3CqPCR)。その結果、ネオセントロメアが形成されたクロマチン特異的な 3C シグナルを検出することができた。これによりネオセントロメア領域内 (30 kb) の -5 kb ほど離れた 2 点の結合頻度を定量的かつ再現性良く測定することが可能となった。さらに、ネオセントロメア細胞から CENP-C を除去し、セントロメア 3CqPCR したところ、CENP-C がネオセントロメア構造の形成に必須であることが明らかとなった。次に、内在性セントロメアのクロマチン構造形成に CENP-C が必要かを調べた。ニワトリ DT40 細胞の Z 染色体の内在性セントロメア領域は、非リピーター DNA 配列を持っており、セントロメア 3CqPCR が可能である。この Z 染色体の内在性セントロメア領域に対するセントロメア 3CqPCR を最適化し、そのクロマチン構造を解析したところ、ネオセントロメアと同様に、内在性セントロメアのクロマチン構造形成にも CENP-C が必要であった。

CENP-C がどのようにセントロメアクロマチン構造形成に関与するかを調べるために、CENP-C のドメイン欠損変異体を細胞内に発現させ、Z 染色体の内在性セントロメアに対してセントロメア 3CqPCR を行った。すると、CENP-C タンパク質の中央領域にある CCAN-binding domain (CBD) と C 末端領域にある Cupin domain が、セントロメアクロマチン構造に必要であった。CBD は、CCAN とよばれるキネトコアタンパク質複合体と結合する領域である。一方、Cupin domain は、自己会合し CENP-C の多量体形成を誘導する領域である。ニワトリ CENP-C Cupin domain の自己多量体化メカニズムは結晶構造解析から明らかになっていた。そこで、Cupin domain の多量体化を特異的に阻害する CENP-C 変異体を細胞に発現させたところ、セントロメアクロマチン構造形成が阻害された。さらにリコンビナントタンパク質を用いた解析により、Cupin domain による CENP-C の多量体化が、CBD を介した CCAN との結合を促進することが見出された。CCAN はセントロメアクロマチンと直接結合することを考えると、以上の結果は CENP-C の Cupin domain を介した自己多量体化が CCAN のクラスター化を引き起こすことによって、セントロメア領域のユニークなクロマチン高次構造形成をもたらすことが示唆された。さらに CENP-C の多量体化はキネトコア構築や正確な染色体分配にも必須であった。CENP-C の Cupin domain を介した自己多量体化は、セントロメア・キネトコア構造形成の中心として機能すると言える。

本研究は、ニワトリ DT40 細胞の利点を活かし、セントロメア領域のユニークなクロマチン構造を定量的に解析することにより、セントロメアクロマチン構造形成のメカニズムを明らかにした。また、本研究結果は、長年不明であったキネトコアタンパク質 CENP-C の本質的な機能が、多量体化による CCAN のクラスター化およびセントロメアクロマチン構造形成であることも示唆しており、我々の遺伝情報が次世代へと継承される分子機構の理解に向けて大きな意義のあるものとなった。

本研究では、セントロメアクロマチン構造も細胞周期の分裂期と間期とで異なることが示唆された。また、CENP-C 多量体構造が細胞周期進行に依存して変化する可能性を示唆する結果も得ている。今後、細胞周期の進行にともなった CENP-C 構造制御を解析することで、細胞周期依存的なセントロメアクロマチンの動的な制御およびそのメカニズムが明らかになることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takenoshita Yusuke, Hara Masatoshi, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Recruitment of two Ndc80 complexes via the CENP-T pathway is sufficient for kinetochore functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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/s41467-022-28403-8	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 -

1. 著者名 Watanabe Reito, Hirano Yasuhiro, Hara Masatoshi, Hiraoka Yasushi, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 30
2. 論文標題 Mobility of kinetochore proteins measured by FRAP analysis in living cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chromosome Research	6. 最初と最後の頁 43 ~ 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10577-021-09678-x	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 Hara Masatoshi, Ariyoshi Mariko, Sano Tomoki, Nozawa Ryu-Suke, Shinkai Soya, Onami Shuichi, Jansen Isabelle, Hirota Toru, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 83
2. 論文標題 Centromere/kinetochore is assembled through CENP-C oligomerization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 2188 ~ 2205.e13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2023.05.023	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

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 原 昌稔
2. 発表標題 キネトコア構成タンパク質CENP-Cの機能ドメイン解析
3. 学会等名 第1回 細胞分裂研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 昌稔、有吉 真理子、佐野 智基、野澤 竜介、新海 創也、大浪 修一、Isabelle Jansen、広田 亨、深川 竜郎
2. 発表標題 CENP-Cの自己多量体化はセントロメアクロマチンおよびキネトコアの形成に必須である
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹之下 憂祐、有吉 真理子、原 昌稔、深川 竜郎
2. 発表標題 CENP-T-Mis12C結合の分子基盤
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miao Jiahang, Hara Masatoshi, Heather R. Keys, Su Kuan-Chung, Iain M. Cheeseman, Fukagawa Tatsuo
2. 発表標題 The CRISPR screening identifies genes which are genetically related to CENP-C
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kong Weixia, Masatoshi Hara, Yasuhiro Hirano, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 The role of the N-terminal conserved region of human CENP-C during mitotic progression
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳永 夕莉香、奥村 和弘、磯貝 恵理子、原 昌稔、深川 竜郎、若林 雄一
2. 発表標題 Cenp-c ex2-4はDMBA/TPA多段階皮膚発がんモデルにおいて腫瘍形成を促進する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 昌稔、有吉 真里子、深川 竜郎
2. 発表標題 CENP-CのCupinドメインを介した多量体化はその機能に必須である
3. 学会等名 第39回 染色体ワークショップ・第39回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masatoshi Hara, Masakazu Hashimoto, Mami Nakagawa, Hiroshi Sasaki, Toshihiko Fujimori, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 Kinetochores dynamics in the early embryonic development
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 原 昌稔
2. 発表標題 セントロメアタンパク質CENP-Cの多量体化によるセントロメアクロマチン構造制御
3. 学会等名 第16回 日本エピジェネティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原 昌稔、橋本 昌和、中川 真美、佐々木 洋、藤森 俊彦、深川 竜郎
2. 発表標題 マウス初期発生過程における染色体分配機構の変化
3. 学会等名 新学術領域研究『全能性プログラム』若手勉強会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原 昌稔
2. 発表標題 正確な染色体分配を支える分子基盤
3. 学会等名 第2回 細胞分裂研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masatoshi Hara, Weixia Kong, Yuich Wakabayashi, Masakazu Hashimoto, Hiroshi Sasaki, Toshihiko Fujimori, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 The CENP-C-KMN Interaction Functions as a Safeguard for Accurate Chromosome Segregation
3. 学会等名 Cell Bio2023 ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原昌稔、孔維霞、繆嘉航、若林雄一、橋本昌和、佐々木洋、藤森俊彦、深川竜郎
2. 発表標題 マウスを用いたCENP-C機能ドメイン解析
3. 学会等名 第41 回染色体ワークショップ・第22 回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Weixia Kong, Masatoshi Hara, Yasuhiro Hirano, Yuichi Wakabayashi, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 The mammalian CENP-C N-terminus is required for CENP-C function and maintenance of genome stability
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jiahang Miao, Masatoshi Hara, Heather R. Keys, Kuan-Chung Su, Iain M. Cheeseman, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 The CRISPR screening identifies genes which are genetically related to CENP-C
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Takenoshita, Mariko Ariyoshi, Masatoshi Hara, Reiko Nakagawa, and Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 The molecular mechanism of the CENP-T-Mis12C interaction
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹之下 憂祐、有吉 真理子、原 昌稔、深川 竜郎
2. 発表標題 分裂期キネトコア形成の分子機構
3. 学会等名 第41 回染色体ワークショップ・第22 回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2024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			
米国	Whitehead institute			
ドイツ	Abberior Instruments GmbH			