

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：82508

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770203

研究課題名（和文）人工セントロメア DNA を利用した、新規クロマチン制御因子の探索

研究課題名（英文）Development of the assay system for chromatin regulatory factors using modified centromere DNA.

研究代表者

大関 淳一郎（OHZEKI JUNICHIROU）（財）かずさ DNA 研究所

研究者番号：30514088

研究成果の概要（和文）：生物の DNA 情報は、細胞増殖の際に正確に複製され、染色体として各細胞に分配される必要がある。染色体の分配には、セントロメアという機能構造が必須であるが、その形成機構はよくわかっていない。そこで、セントロメア領域の DNA 配列を人工的に作製し、この上に様々な蛋白質を結合させる実験を行った。その結果、蛋白質修飾酵素のひとつであるヒストンアセチル化酵素を誘導すると、セントロメア構造形成が起こることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：During the cell proliferation, chromosomes, integral of our DNA information, are needed to be replicated and segregated to each divided daughter cell, correctly. A functional DNA/protein complex named centromere is responsible for chromosome segregation. However, the mechanisms, how centromere structure is organized, is yet unknown. Then, we created the artificial centromere DNA sequence containing a specific protein binding site, and tethered several kinds of chromatin related protein candidates through this binding site. As a result, we found that a kind of protein modification enzyme, histone acetyltransferase, can induce de novo centromere formation on the centromere DNA sequence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：細胞生物学、染色体

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：セントロメア、キネトコア、ヒト人工染色体、クロマチン、アルフォイド DNA

1. 研究開始当初の背景

高等真核生物の持つゲノム DNA は、ヒストンやその他の DNA 結合性蛋白質とともに、クロマチン構造を構成している。このクロマチン構造には、単純に DNA を折り畳むだけでなく、遺伝子発現を制御したり、染色体分配装置などの機能構造を形成する働きもある。近

年、クロマチン構造を変換する因子や、ヒストンのメチル化、アセチル化などに関わる修飾酵素が相次いで発見されており、ヒストンの修飾状態などが遺伝子発現制御や染色体の維持、分配機能などに深く関わっていることが明らかにされつつある。これらの生命機能の制御機構の一端が見えて来たことで、ク

ロマチン構造研究の重要性が再認識され、様々な生命現象をクロマチン構造変換や修飾状況の違いによって説明しようという動きが、世界的に拡大していた。

セントロメアクロマチンは、染色体の分配、維持に必須な機能構造である。この機能が阻害されると、染色体数の異常に伴う疾患や、細胞のがん化などが引き起こされるなど、細胞や生命機能に重篤な障害が現れる。この制御機構を知ることは、これらの障害を防ぐ上でも非常に重要である。

セントロメアクロマチンは、CENP-A と呼ばれるヒストン H3 バリエーションが、通常のヒストン H3 と入れ替わった特殊な構造を取っている。この CENP-A は、すべての真核生物で保存され、セントロメア機能構造の形成に必須である。

ヒトのセントロメアは、アルフォイド DNA と呼ばれる高頻度反復配列上に形成されている。我々のこれまでの研究から、このアルフォイド DNA をヒト培養細胞 HT1080 に導入すると、この上に CENP-A を含んだセントロメアクロマチンが形成され、導入 DNA は新規の染色体として安定維持されることがわかっている。この新規形成される染色体を、我々はヒト人工染色体 (Human Artificial Chromosome; HAC) と呼んでいる。

我々はこれまでに、試験管内で人工的に数十 kb 単位の人工アルフォイド DNA を作成する技術を開発し、アルフォイド DNA の長さや、この中に含まれる CENP-B ボックスと呼ばれる配列が CENP-A 集合に必須であることを証明した。さらに、アルフォイド DNA 中に TetO (Tet Operator) と呼ばれる TetR (Tet Repressor) 蛋白質の結合配列を埋め込み、この TetO を含んだアルフォイド DNA (tetO アルフォイド DNA) 上に、TetR と融合させた任意の蛋白質の集合を誘導できるシステムも構築した。

このシステムを用いて HAC を作製し、この HAC 上に人工的な転写抑制因子 (tTS) を誘導した場合、セントロメア構造が乱され、HAC の安定性が著しく低下することもわかってきていた。

2. 研究の目的

以上の背景から、セントロメアのクロマチン構造は、単純な DNA 情報だけでは成立せず、周囲のクロマチン構造との相関関係も含めて機能していると考えられた。このような、セントロメア機能とクロマチン構造変換のつながりを理解することは、生物が如何にして染色体分配を制御しているかの理解につながるとともに、HAC の制御などの、人工的な染色体分配制御にも繋がる重要性を持っている。

我々は、クロマチン構造を操作することで、セントロメア機能の不活性化が起こるとするならば、不活性化されたセントロメア DNA を活性化するようなクロマチン構造変換機構も存在するのではないかと考えた。

そこでまず、TetO アルフォイド DNA 上に候補となるクロマチン蛋白質を結合させたときに、セントロメア化の指標となる CENP-A 蛋白質の集合が誘導されるかどうかの検証を、最初の目的とした。

3. 研究の方法

上述の TetO アルフォイド DNA をヒト培養細胞に導入し、これが宿主染色体上に挿入された細胞を得た。そして、この中から、TetO アルフォイド DNA がセントロメアとして不活性化されている状態 (CENP-A 集合が見られない状態) にある株を単離した。

この挿入サイト上に、TetR を介して複数の候補となるクロマチン制御因子を結合誘導 (テザリング) し、CENP-A の集合が起こるかどうかを調べたところ、ヒストンアセチル化酵素 (p300、PCAF) のほか、テロフェイズから G1 期にかけてセントロメアに一過的に集合してくる蛋白質 (Mis18 α 、HJURP) などによって、TetO アルフォイド DNA 上に新規に CENP-A 集合が誘導されることがわかってきた。そこで、RNAi などの手法を用いてこれらの因子の相関を調べたところ、Mis18 α はアセチル化酵素の上流、HJURP はその下流で働く可能性が示唆された。

一方、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) をメチル化する酵素である Suv39h1 を、tetO アルフォイド DNA から作成した HAC 上にテザリングすると、HAC 上のセントロメアへの CENP-A の新規取り込みが抑制されることもわかって来た。H3K9 のメチル化は、この上へのアセチル化と両立できないため、この残基へのアセチル化とメチル化のバランスにより、CENP-A 集合が制御されている可能性が示唆された。

次に、CENP-A 集合の誘導により、実際にセントロメア構造が形成されるかを確認したところ、tetO アルフォイド DNA 上に、CENP-C、CENP-E、CENP-I、CENP-T など多くのセントロメア構成蛋白質の集合が誘導されること、また、分裂期には微小管の結合が起こることが確認された。

さらに、これまでアルフォイド DNA 上の H3K9 のメチル化活性が強く、HAC 形成が起こらないとされていた、HeLa、U2OS などのヒト培養細胞株においても、tetO アルフォイド DNA 導入時に CENP-A 集合因子のテザリングを行うことで、この上に機能するセントロメア構造が形成され、HAC 形成が起こることもわかった。また、この HAC の維持には継続的な CENP-A 集合因子のテザリングは必要なかった。

たことから、セントロメア構造がひとたび確立されれば、これを自律的に維持する機構があることもわかってきた。

このようなセントロメア形成に関わる因子は、上述のもの以外にも、まだ数多く存在することが予想される。そこで、これら未知の因子の探索をより迅速、簡便に行えるようにするため、かずさ DNA 研究所の持つ Halo タグ融合ヒト cDNA ライブラリーから発現させた蛋白質を、間接的に tet0 アルフォイド DNA 上にテザリングする方法の開発も進めた。現在、発現させた Halo タグ融合蛋白質の tet0 アルフォイド DNA 上への集合誘導までは可能となっている。

また、上記の tet0 アルフォイド DNA への任意の蛋白質のテザリング実験系は、指標を CENP-A から別の因子に変えることで、ヘテロクロマチン化、ユウクロマチン化などに関わる因子の探索にも応用可能である。そこで、HP 1、hPC2 などの、ヘテロクロマチン構造上に集合する蛋白質を検出も含め、これらの指標の集合レベルを定量的に評価する実験系の開発も進めている。

4. 研究成果

本研究では、CENP-A 集合を正に制御する因子として、ヒストンアセチル化酵素 (p300、PCAF)、ならびに hMis18 α 、HJURP などの複数の因子を同定し、これらの因子が CENP-A 集合を介して、染色体分配装置であるセントロメア構造の形成も誘導できることを明らかにした。さらに、これらの知見を活かして、これまで人工染色体形成の起こらなかったヒト培養細胞株でも、上記因子の結合誘導により新規形成が可能になることも示し、ヒト人工染色体ベクターの応用の幅を広げることが出来た。

この成果の国内外における位置づけとしては、我々が論文公表したのとはほぼ同時期に、CENP-A 集合を異所的に誘導する手法、ならびに、CENP-A 集合により他のセントロメア蛋白質集合も誘導されるという内容の論文が、相次いで公表されている。このような競争的な状況においても、我々の研究成果は、(1)CENP-A 集合を介して誘導したセントロメア構造が、ヒト人工染色体の上で機能し、何十世代もの細胞分裂を経ても、安定に維持されていることを示した点、(2)アセチル化/メチル化というクロマチン構造制御のバランスによって CENP-A 集合が制御されることを示した点において新規性が高い。

この他に、今回のクロマチン制御因子の評価系を拡張し、応用への目処が立つところまでは進展した。このシステムの拡張により、単純にセントロメア構造形成を評価するだけではなく、その因子がヘテロクロマチン、もしくはユウクロマチンも誘導するかという、多角的、包括的な解析を、より速やかに行うことができると期待している。

ン、もしくはユウクロマチンも誘導するかという、多角的、包括的な解析を、より速やかに行うことができると期待している。

最後に、ヒト人工染色体ベクターは、宿主染色体に組み込まれないため、細胞の持つ DNA 情報を傷つけずに、遺伝子発現を行うことが出来る。この性質は、細胞の分化段階の制御や、遺伝子治療などにも有用である。今回我々が開発した技術を活用して、クロマチン構造の制御機構を明らかにしてゆくとともに、ヒト人工染色体の実用化に向けた研究とも結びつけ、発展させて行きたい。

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 1 件)

- ①. J. Ohzeki, J.H. Bergmann, N. Kouprina, V. Noskov, M. Nakano, H. Kimura, W.C. Earnshaw, V. Larionov and H. Masumoto, Breaking the HAC Barrier: Histone H3K9 acetyl/methyl balance regulates CENP-A assembly, The EMBO Journal、査読有、31 巻、2012、2391-2042、DOI: 10.1038/emboj.2012.82.

[学会発表] (計 6 件)

- ①. 大関淳一郎、アルフォイド DNA 上のクロマチン修飾バランスは、新規セントロメア形成を正と負に制御する、第 9 回 核ダイナミクス研究会、2010 年 5 月 28 日、ラフォーレ修善寺 (静岡県)
- ②. 大関淳一郎、Modifications of histone H3K9 regulate de novo kinetochore assembly in human cells、第 33 回 分子生物学会年会、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ③. 大関淳一郎、セントロメア機能発現のためのクロマチン制御機構、第 28 回 染色体ワークショップ、2011 年 1 月 12 日、コンベンションホール瑠璃光 (石川県)
- ④. 大関淳一郎、セントロメア機能発現のためのクロマチン制御機構、第 2 回 高次クロマチン研究会、2011 年 8 月 10 日、蒲郡荘 (愛知県)
- ⑤. 大関淳一郎、Breaking the HAC barrier by operating a histone H3K9 acetyl/methyl switch、第 34 回 分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑥. 大関淳一郎、Exploring of centromere acetylation mechanism using tet0-alphoid system、第 29 回 染色体ワークショップ、2012 年 1 月 26 日、ホテルニュー水戸屋 (宮城県)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：A method for positively or negatively regulating the assembly of newly synthesized CENP-A to exogenous alphoid DNA containing CENP-B boxes in mammalian cell lines

発明者：H. Masumoto, J. Ohzeki, V. Larionov, W. C. Earnshaw

権利者：Kazusa DNA research institute

種類：US Provisional Application

番号：No. 61/562, 825

出願年月日：2011 年 11 月 22 日

国内外の別：国外

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大関 淳一郎 (OHZEKI JUNICHIROU)

かずさ DNA 研究所（ヒトゲノム研究部）

細胞工学研究室 研究員

研究者番号：30514088

(2) 研究協力者

舛本 寛 (MASUMOTO HIROSHI)

かずさ DNA 研究所（ヒトゲノム研究部）

細胞工学研究室 室長

研究者番号：70229384

長瀬隆弘 (NAGASE TAKAHIRO)

かずさ DNA 研究所（産業基盤開発研究部）

遺伝子応用技術研究室 室長

研究者番号：10211442