

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 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：2012～2015

課題番号：24370003

研究課題名(和文)新規DNA領域におけるセントロメア機能確立の分子機序

研究課題名(英文)Molecular mechanism of functional centromere establishment at novel DNA region

研究代表者

石井 浩二郎 (ISHII, Kojiro)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：40360276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：セントロメアが新規DNA領域に配列無関係に確立できる帰納的な証明はあるが、過去にさかのぼることは難しく、機能の新生確立の分子機序はこれまでほとんど理解されていない。そのため私たちは、新規領域に形成されながら機能不完全である新生セントロメアが世代を経ると再現性よく機能正常型に成熟する分裂酵母実験系の現象について詳細解析した。その結果、機能不完全な新生セントロメアではセントロメア特異的ヒストンCENP-AとそのシャペロンScm3の結合が不十分であり、それが機能成熟では回復すること、その回復は隣接ヘテロクロマチンと染色体位置効果によるヒストンH2A.Zの減少が原因であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although centromere establishment at the novel DNA region without any sequence specificity has been proven inductively, its mechanism has been poorly elucidated molecularly due to the difficulty in the retrospective analysis. Therefore, we investigated the molecular mechanism of a phenomenon in the fission yeast experimental system in which a functionally-insufficient neocentromere, or the new-born centromere at ectopic position, gets matured in generations reproducibly. Our results indicated that functional insufficiency of the neocentromere comes from the poor association of centromere-specific histone CENP-A and its molecular chaperone Scm3, which is recovered upon maturation, and the recovery is attributable to the paucity of histone H2A.Z caused by the heterochromatin adjacency and/or the chromosomal position effect.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム 染色体 セントロメア キネトコア

1. 研究開始当初の背景

セントロメアは、微小管との相互作用を通して染色体の安定な継承を担う重要な DNA 領域であるが、驚いたことにその領域は DNA 配列によって規定されていない。むしろ、領域のアイデンティティは CENP-A (セントロメア特異的ヒストン) のようなセントロメア固有のタンパク質に担われていると考えられている。この DNA 配列にとらわれないセントロメア領域の特性は、結果的にセントロメアの染色体上の位置取りやセントロメア DNA 配列に生物種間で多様な変化を生み出し、生物種分岐の一つの大きな原動力になっていると考察されている (Malik and Henikoff (2009) Cell)。しかしながら、セントロメアが果たすべき本質的な細胞機能は極めて複雑かつ精巧なものであり、その新規な再構成が容易に達成されるとは考えにくい。機能性を十分に備えた成熟セントロメアは、そもそも新しい DNA 配列上でいったいどうやって確立されるのだろうか？セントロメアの構造基盤と制御機構の研究はどんどんと進展しているにも関わらず、この問いに対する答えは不明瞭なまま残されて続いていた。

このような研究立ち遅れの一因として、解析対象アッセイ系の乏しさが挙げられる。その点私たちは、分裂酵母染色体のセントロメアを誘導的に破壊する実験系をこれまでに構築しており、そのような致死状況の中から低頻度に自然発生する復帰変異として、新規 DNA 領域における新たなセントロメア機能 (ネオセントロメア) 形成を実験室レベルで再現することに成功していた (Ishii et al. (2008) Science)。本研究では、このセントロメアの新規確立に特化した実験系を利用して、新しいセントロメアにおける分子動態と機能変化をリアルタイムで詳細に解析し、これまでは実験的な介入が困難であった新規 DNA 領域でのセントロメア機能確立の分子機序について解明を進めることを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、セントロメアが新たに新規 DNA 配列上に *de novo* に形成されるにあたり、どのようにして複雑なセントロメアの高次機能性を獲得していくのか、その分子機序の解明を目的とした。

セントロメアの機能性として、そもそも体細胞分裂で正常なセントロメアが果たすべき細胞機能は主に次の6つに大別される：1) 複製された姉妹染色分体同士の合着 [cohesion]、2) スピンドル微小管との適切な結合 [attachment]、3) 微小管に沿った染色体の移動運動 [movement]、4) 細胞分裂極に適合した姉妹動原体の二方向性の確立 [bi-orientation]、5) 間違った動原体微小管結合の訂正 [correction]、6) 二方向性の全ての染色体での確立の監視 [checkpoint] (図 1 参照)。

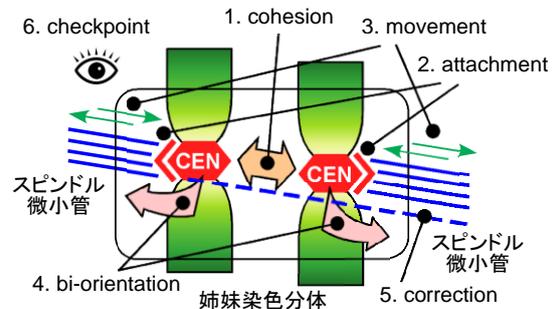


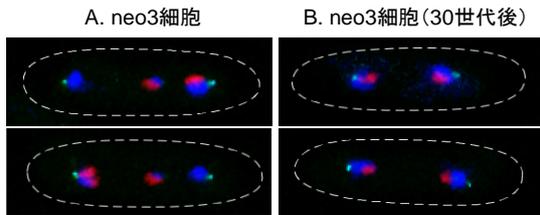
図 1 セントロメアに必要なとされる機能要素

このうち、2) attachment と 3) movement はセントロメア機能の根幹を成す要素であり、セントロメアのアイデンティティを担うタンパク質群が一つの領域に集積した段階で自律的に成立すると考えられるが、1) cohesion、4) bi-orientation、5) correction、6) checkpoint の機能達成には、セントロメアタンパク質群に加えて cohesin 複合体や aurora キナーゼ、Mad2 タンパク質など、セントロメアに付随したアクセサリタンパク質の働きが重要となる。これらのアクセサリタンパク質はそれぞれ、固有のターゲッティング機構を介して適切にセントロメアに集積し、効率よく離散することが機能性の前提になっている。セントロメア領域が刷新された場合に、各ターゲッティング機構はどんな仕組みで新たな領域を標的として認識するようになり、そのためにはどのような領域条件が必要になるのかについて解析することにした。

また、特に 1) cohesion、4) bi-orientation、5) correction に関しては、その機能がいずれもヘテロクロマチン構造と深く関わっていることが知られている。ヘテロクロマチンはネオセントロメア形成に必須ではないが、その形成頻度には影響を与えることが判明していた (Ishii et al. (2008) Science)。本研究では、エピジェネティックなヘテロクロマチン構造がセントロメア機能確立に対して果たす寄与、さらにはその分子背景に想定される細胞核高次構築の影響についても研究を進めることとした。

3. 研究の方法

これまでの私たちの解析で、分裂酵母 3 番染色体セントロメア破壊の復帰変異として得られたネオセントロメアはどれも、1 番や 2 番で得られたものと違ってセントロメア機能が不完全であり、細胞は生育するものの 3 番特異的な染色体分配欠損が高頻度に発生していることが判明していた (図 2A)。そのような 3 番ネオセントロメアの機能不全はその後 30 世代程度の増殖を経た細胞では自然に解消されており、3 番染色体も通常の染色体と同様に正確に分配されるようになっていた (図 2B)。本研究では、特にこの 3 番染色体ネオセントロメアについて、当初の機能不完全な状態で樹立されている要素と、30 世



青: DNA、赤: 3番染色体マーカー、緑: スピンドル極
図2 3番染色体ネオセントロメア(neo3)の動態

代を経て正常機能が確立された要素に関して分子構造を比較解析し、その間に起こった変化を解明する。まずはクロマチン免疫沈降とマイクロアレイを組み合わせた ChIP-chip 解析を各因子に対して行い、さらに定量 PCR 解析による確認も組み合わせて、30 世代の前と後のネオセントロメアにおける各因子の変化の有無を調べた。変化の実体が把握された場合には、得られた結論を裏付けるような細胞表現型を確認するとともに、変化を生む要因についてもその表現型をもとにして解析することを計画した。さらに、変化の過程を細胞培養の時系列で克明に追跡し、分子変動のリアルタイムな解析を目指した。また、そのような変化を人為的に誘導することで同様の機能正常化が起きるかについても検討を加えた。

一方、ネオセントロメアを担っているゲノム DNA 配列には変化が生じていないかについても検証を行った。生物進化の過程では、当初は新しい DNA 領域に異所的に形成されたネオセントロメアが、反復 DNA 配列などを獲得することによって、さらに進化的に安定なセントロメアへと変化することが提唱されている (Ventura et al. (2007) Science)。私たちの実験系においてもそのような過程が再現されていないか、ゲノム DNA 配列に着目した解析も行った。そのために、30 世代の前と後のネオセントロメア領域約 40kb のゲノム DNA 断片を gap-repair 法や長鎖 PCR 法を用いてクローン化し、その配列決定を行って変化の有無を確認した。配列に変化が生じていた場合には、その原因についても考察し、実験的な検証を加えることを計画した。

4. 研究成果

(1) 3番染色体ネオセントロメアの示す欠損の解明

まずは機能正常化する前の 3 番染色体ネオセントロメア($\Delta cen3\text{-NC}$)の特徴を解析した。セントロメア機能が最も顕著に発揮される染色体分配に着目して細胞観察を行った。その結果、1) cohesion、4) bi-orientation、5) correction、6) checkpoint の 4 点の欠陥が原因と考えられるラギング染色体表現型が高頻度で観察された (図 3)。ラギング染色体はそのほとんど全てが 3 番染色体によるものであった。それはヘテロクロマチン欠損を引き起こす $\Delta clr4$ 株の表現型と類似しているが、その頻度は $\Delta cen3\text{-NC}$ 株の方がはるかに高く

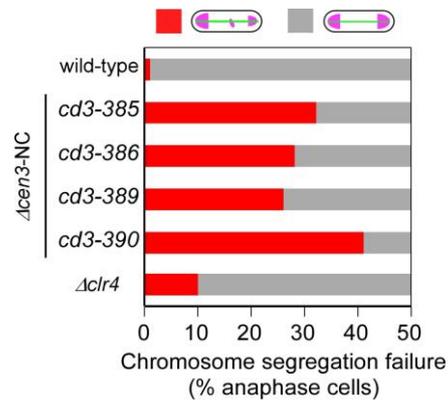


図3 染色体分配の失敗頻度

(図 3)、それが一つの染色体に起因していることを考慮すると、 $\Delta cen3\text{-NC}$ の示す欠損はヘテロクロマチンの非隣接のみでは説明できないと結論づけた。

次いで、3 番染色体ネオセントロメアに集積するタンパク質因子について解析した。その結果、セントロメア本来の構成タンパク質 CENP-C、CENP-T、Mis6、Mis12 には顕著な違いがないが、CENP-A の結合量が減少していることを見出した (図 4)。CENP-A のローディングに関与する因子として Mis6/Sim4 複合体、Mis16/Mis18 複合体と Scm3 シャペロンが知られているが、その中で Scm3 シャペロンの集積が顕著に阻害されていることを見出した (図 4)。従って、セントロメアが

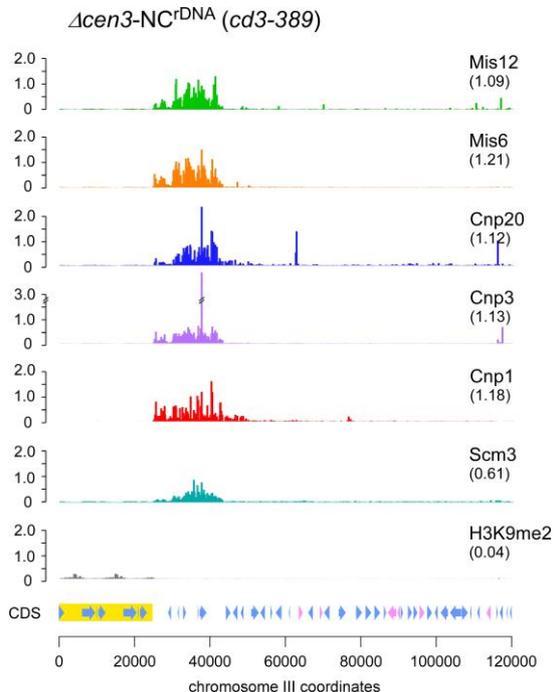


図4 蛋白質因子の neo3 への集積 (黄色: rDNA)

本来果たす機能要素のいずれかが不能というよりも、セントロメア構造のエピジェネティックに安定した継承自体に問題があり、それがラギング染色体を生み出している要因であると結論づけた。

(2) ネオセントロメアを担っているゲノム

DNA 配列の変動の検討

まずはネオセントロメアを形成しているゲノム DNA 領域のクローン化を行って、本当にネオセントロメアが DNA 配列変動とは無関係か検討した。そのために、1 番染色体に形成されたネオセントロメア 2 種 (*Acen1-NC*) と 3 番染色体に形成されたネオセントロメア 2 種 (*Acen3-NC*) のゲノムを相同組換えでクローン化する gap-repair 実験を行い、その DNA 配列を決定した。その結果、分裂酵母野生型で決定されたゲノム配列から 1 塩基の変化もないことが証明された。私たちのアッセイ系で得られたネオセントロメアは DNA 配列とは無関係な正真正銘のネオセントロメアであると結論づけられた。

次いで機能正常化した 30 世代後のネオセントロメアではゲノム DNA 配列の変化が起きているか、長鎖 PCR 法によってゲノム配列を増幅し、そのシーケンス解析を行うことで検証した。その結果、ネオセントロメアを形成しているゲノム DNA 19,250 塩基対ではネオセントロメアの機能性が変化する前後において 1 塩基の変化も伴っていないことを明らかにした。一方で、ネオセントロメア形成領域に隣接する rDNA 反復配列のコピー数に大きな変動があり、極端に rDNA が短縮化していることをパルスフィールドゲル電気泳動によって見出した。

(3) 3 番染色体ネオセントロメアの機能改善とヘテロクロマチンの関連解明

機能正常化したネオセントロメアで見られる隣接 rDNA リピートの反復回数の極端な現象が、ネオセントロメア自身に分子的にどのような変化を生み出しているか解析した。まずは、CENP-A および Scm3 の十分な集積を確認した (図 5)。さらに正常化したネオ

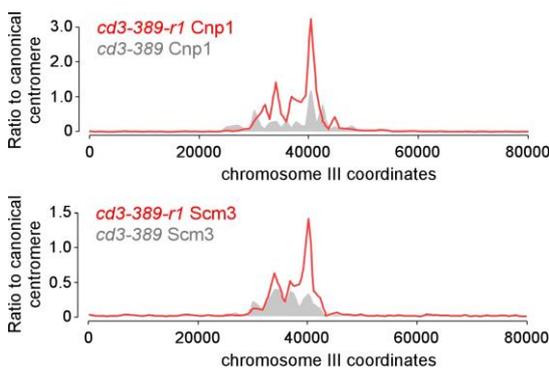


図 5 機能改善 neo3 への CENP-A(Cnp1) と Scm3 の十分な集積 (赤線)

セントロメア近傍で特異的にヘテロクロマチンが増幅されていることを確認した。しかしながら、Swi6 や H3-K9Me 修飾酵素の変異導入によってヘテロクロマチンの欠損を引き起こしてもネオセントロメアは元の不完全状態にまで低下することはなかった。一方で、人為的ヘテロクロマチンのネオセントロメアへの付加実験を行ったところ、ヘテロク

ロマチン付加は不完全なネオセントロメアの機能正常化を生み出すことが判明した。さらにこの場合には、ヘテロクロマチンの欠損導入はネオセントロメアの機能性を元の不完全なものに低下させた。従って、rDNA リピートの減少によるヘテロクロマチン因子以外の関与が自然発生的なネオセントロメア機能正常化には考えられる。

(4) セントロメア機能改善の分子要因

分裂酵母 3 番染色体に形成された不完全なネオセントロメアとその後 30 世代の細胞増殖を経て正常機能が確立されたセントロメアの間では、DNA 配列に変化はないが、ヒストン H2A のバリエーションである H2A.Z の存在量に違いがあることが判明した。そもそもセントロメアや機能十分な *Acen1-NC* では H2A.Z の存在量は少ないが、*Acen3-NC* では H2A.Z が残されたままである (図 6)。隣接

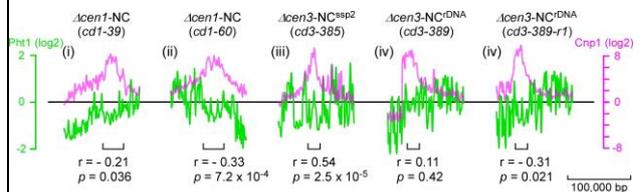


図 6 CENP-A(Cnp1、マゼンタ)と H2A.Z(Pht1、緑)の各ネオセントロメアにおける分布量

rDNA 反復配列の短縮化やヘテロクロマチンの隣接は、そのような H2A.Z の残存を解消し、CENP-A と逆相関を示すようになっていた (図 6)。また、H2A.Z の染色体上での局所的な排除を担うタンパク質である Msc1 を欠損させると、ネオセントロメア形成は完全に阻害されることも見出した。H2A.Z の存在量のみがネオセントロメア形成を支配する十分条件であるかどうかは現時点では不明であるが、少なくともネオセントロメアを形成し、それを安定なものに成熟させる要因として、H2A.Z の排除が必要条件であることは示された。

(5) エピジェネティックなクロマチン環境を作り出す機構の解析

ネオセントロメアやセントロメアにおいて、H2A.Z が減少する原因としては、染色体の核内配置が影響している可能性が高く考えられる。核膜係留タンパク質である Bqt4 の部分断片と DNA 結合タンパク質 LacI を融合し、LacI の標的配列 lacO が反復挿入された染色体遺伝子座での H2A.Z の存在量を解析した結果、このような染色体の核膜周辺への人為的な移動は、H2A.Z の減少と遺伝子発現の緩やかな低下を生み出すことが判明した。

そのような人為的な染色体移動がネオセントロメア形成に与える影響は技術的な問題で未解明であり、今後明らかにされる必要がある。しかし、*Acen1-NC* の形成部位である染色体末端の核内配置を変化させる *Aclr3*

変異株では $\Delta cen1-NC$ の形成能が著しく低下することも見出され、染色体の核内配置が寄与する可能性が示唆された。

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 7 件)

- ① Sanki Tashiro, Tetsuya Handa, Atsushi Matsuda, Takuto Ban, Toru Takigawa, Kazumi Miyasato, Kojiro Ishii, Kazuto Kugou, Kunihiro Ohta, Yasushi Hiraoka, Hisao Masukata & Junko Kanoh: Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. *Nature Communications*、査読有、7, 10393 (2016)、doi: 10.1038/ncomms10393
 - ② Kazufumi Hosoda, Soichiro Tsuda, Kohmei Kadowaki, Yutaka Nakamura, Tadashi Nakano & Kojiro Ishii: Population-reaction model and microbial experimental ecosystems for understanding hierarchical dynamics of ecosystems. *Biosystems*、査読有、140, 28-34 (2016)、doi: 10.1016/j.biosystems.2015.12.005.
 - ③ Yuko Ohno, Yuki Ogiyama, Yoshino Kubota, Takuya Kubo & Kojiro Ishii: Acentric chromosome ends are prone to fusion with functional chromosome ends through a homology-directed rearrangement. *Nucleic Acids Research*、査読有、44, 232-244 (2016)、doi: 10.1093/nar/gkv997
 - ④ Teppei Kitagawa, Kojiro Ishii, Kojiro Takeda & Tomohiro Matsumoto: The 19S proteasome subunit Rpt3 regulates distribution of CENP-A by associating with centromeric chromatin. *Nature Communications*、査読有、5, 3597 (2014)、doi: 10.1038/nsmb.2697
 - ⑤ Yuki Ogiyama, Yuko Ohno, Yoshino Kubota & Kojiro Ishii: Epigenetically induced paucity of histone H2A. Z stabilizes fission-yeast ectopic centromeres. *Nature Structural & Molecular Biology*、査読有、20, 1397-1406 (2013)、doi: 10.1038/nsmb.2697
 - ⑥ Tadashi Nakano, Kazufumi Hosoda, Yutaka Nakamura & Kojiro Ishii: A biologically-inspired intrabody nanonetwork: design considerations. *Proceedings of the 8th International Conference on Body Area Networks*、査読有、484-487 (2013)、doi: 10.4108/icst.bodynets.2013.253511
 - ⑦ Yuki Ogiyama & Kojiro Ishii: The smooth and stable operation of centromeres. *Genes & Genetic Systems*、査読有、87, 63-73 (2012)、doi: 10.1266/ggs.87.63
- [学会発表] (計 19 件)
- ① 石井浩二郎: 染色体の異数性が生み出す細胞変化、新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム、2016年2月8日~2016年2月9日、一橋講堂学術総合センター(東京都千代田区)
 - ② 荻山友貴、久保田佳乃、浅川東彦、平岡泰、石井浩二郎: 新生(ネオ)セントロメアの減数分裂、第33回染色体ワークショップ、2016年1月12日~2016年1月14日、松島一の坊(宮城県宮城郡松島町)
 - ③ 石井浩二郎: セントロメアの異所的確立と世代を越えた維持、第38回日本分子生物学会年会、2015年12月1日~2015年12月4日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
 - ④ 荻山友貴、久保田佳乃、浅川東彦、平岡泰、石井浩二郎: 減数分裂におけるネオセントロメアの機能性とヘテロクロマチンの寄与、第23回DNA複製・組換え修復ワークショップ研究会、2015年10月19日~2015年10月21日、焼津グランドホテル(静岡県焼津市)
 - ⑤ Kojiro Ishii: Immediate cellular response to chromosomal aneuploidy, Gordon Research Conference: Chromosome Dynamics、2015年6月28日~2015年7月3日、Waterville Valley (USA)
 - ⑥ Yuko Ohno, Yoshino Kubota, Kojiro Ishii: Immediate cellular response to chromosomal aneuploidy, The eighth international fission yeast meeting、2015年6月21日~2015年6月26日、生田神社会館(兵庫県神戸市)
 - ⑦ 石井浩二郎: 体細胞分裂期にエピジェネティックに形成されたネオセントロメアの減数分裂期の機能性、第9回日本エピジェネティクス研究会年会、2015年5月25日~2015年5月26日、一橋講堂学術総合センター(東京都千代田区)
 - ⑧ Yuki Ogiyama, Haruhiko Asakawa, Yasushi Hiraoka, Kojiro Ishii: Meiotic behaviors of neocentromeres, EMBO Workshop: Dynamic kinetochore、2015年5月18日~2015年5月21日、Copenhagen (Denmark)
 - ⑨ Kojiro Ishii: Immediate cellular response to chromosomal aneuploidy, 4D Nucleome 2014、2014年12月17日~2014年12月20日、安芸グランドホテル(広島県廿日市市)

- ⑩ 石井浩二郎: 染色体異数性に対する初期応答、第32回染色体ワークショップ、2014年12月15日～2014年12月17日、安芸グランドホテル（広島県廿日市市）
- ⑪ 石井浩二郎: 染色体異数性の初期応答、日本遺伝学会第86回大会、2014年9月17日～2014年9月19日、長浜バイオ大学（滋賀県長浜市）
- ⑫ 石井浩二郎: 分裂酵母を用いた自発的な染色体再編成機構の解析、第22回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、2013年11月20日～2013年11月22日、ホテルニュー水戸屋（宮城県仙台市）
- ⑬ 石井浩二郎: セントロメアの欠損に付随した染色体編成のダイナミクス、国立遺伝学研究所研究会「染色体DNAの安定維持の分子メカニズム」、2013年9月27日～2013年9月28日、国立遺伝学研究所（静岡県三島市）
- ⑭ 大野悠子、久保田佳乃、石井浩二郎: 機能欠損染色体が生み出す細胞応答、日本遺伝学会第85回大会、2013年9月19日～2013年9月21日、慶応大学（神奈川県横浜市）
- ⑮ Kojiro Ishii: Chromosomal reorganizations after centromere dysfunction、International Symposium “Message from Yeast to Epigenetics”、2013年9月2日～2013年9月4日、グランディア芳泉（福井県あわら市）
- ⑯ 荻山友貴、大野悠子、久保田佳乃、石井浩二郎: 新規セントロメア形成におけるヒストンバリエントの働き、第30回染色体ワークショップ、2012年12月19日～2012年12月21日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）
- ⑰ 荻山友貴、大野悠子、久保田佳乃、石井浩二郎: 異所的に形成されたセントロメアを安定化するヒストンバリエントの再編成、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月19日～2012年12月21日、淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）
- ⑱ 石井浩二郎: ネオセントロメア形成の分子機構、日本遺伝学会第84回大会、2012年9月24日～2012年9月26日、九州大学（福岡県福岡市）
- ⑲ 石井浩二郎: 染色体の編成が変わる仕組みを酵母で探る、第20回酵母合同シンポジウム、2012年9月6日～2012年9月7日、京都大学（京都府宇治市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/ishii/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 浩二郎 (ISHII, Kojiro)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授
研究者番号：40360276

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし