

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06958

研究課題名(和文) セントロメアを染色体上の一カ所に調節する機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a mechanism to regulate centromere at one region on each chromosome

研究代表者

佐藤 浩 (Sato, Hiroshi)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：00421313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：セントロメアはエピジェネティックに形成が制御されているが、その分子機構は明らかになっていない。我々は染色体を融合させた分裂酵母を用い、この機構の解明を行った。融合染色体の不活性化セントロメアのクロマチンの解析から、セントロメア形成に関連が示唆されるヒストン修飾がヘテロクロマチン化により抑制されていることが示された。さらにCENP-Aのクロマチン取り込みを促進するような遺伝子の高発現による異常がヘテロクロマチンにより抑制される事をしめした。これらの結果から、ヘテロクロマチンは過剰なセントロメアの抑制に機能していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Centromere formation is epigenetically regulated so that one chromosome has one centromere, but the molecular mechanisms to limit the centromeres remain unclear. We attempted to understand the mechanisms by using fission yeast harboring fused two chromosomes. The analysis of chromatin revealed that histone H3 lysine 9 acetylation and histone H4 lysine 20 methylation that thought to induce the centromeric chromatin formation were suppressed by heterochromatin on the inactivated centromere. Furthermore, heterochromatin partially rescues defects caused by overexpression of the genes that mediate the loading of CENP-A, centromere specific histone H3 variant, into chromatin in the fission yeast harboring fused chromosome. These results suggested that the heterochromatin contribute to the restriction of excess centromeres formed on a chromosome.

研究分野：分子生物学

キーワード：セントロメア 染色体 ヒストン ヘテロクロマチン

1. 研究開始当初の背景

多くの生物では、染色体上の一箇所にセントロメア領域が存在し、細胞分裂期にその領域には染色体の均等分離に必要な動原体が形成される。セントロメアは短い反復配列の DNA と多くのタンパク質の複合体で構成されているが、セントロメア DNA の塩基配列は真核生物種間を通して相同性がほとんど見られない。一方で動原体タンパク質は多くが保存されており、これらタンパク質の局在化によってセントロメアが決定される。生物種間で異なる DNA 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、今なお不明な点が残されたままである。

さらに、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す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 DNA の塩基配列以上にエピジェネティックな要素が重要であることが示唆されている。本実験に使用した分裂酵母においても、染色体上の本来のセントロメアを破壊することで、ネオセントロメアがセントロメアに特徴的な DNA 配列を持たないテロメア近傍領域に形成されることが報告されている。

また、ヒト染色体異常疾患にみられる、転座が原因で起こる融合染色体では、2 つのセントロメアの一つがセントロメアとしての機能を失い、ひとつの機能するセントロメアのみを持つ染色体として維持される事が示されている。一方、人為的な染色体融合により生じたセントロメアを 2 つ持つ染色体(ダイセントリック染色体)においても、一方のセントロメアが動原体形成活性を失うことによる安定化や、さらには二つのセントロメア間における活性、不活性のスイッチングも観察されている。

これらの事象は、セントロメアの形成には動的に変化する可塑性が存在するとともに、染色体上にセントロメアに成る能力のある領域が数箇所存在していても、特定の一箇所以外の領域は何らかの制御の下に抑制されていることを示唆している。これまで出芽酵母において、セントロメアタンパク質のユビキチン化依存的分解がこの制御機構に寄与する報告があるが、分裂酵母を用いた我々の実験系において、ユビキチン化遺伝子の欠損変異株においてもセントロメアの抑制(セントロメア不活性化)は起こることから(未発表)、このタンパク質分解の機構がセントロメア形成制御機構の全てではないと考えられる。

セントロメアの数量制御機構の崩壊は細胞周期の停止、染色体の分断や不均等分離を引き起こすことから、正常な細胞増殖において必須の機構であると考えられるが、これらセントロメアの調節制御を行う分子機構はほとんど分かっていない。

我々は、セントロメアの調節制御機構を調べるために、染色体の構造改変技術を用いて、分裂酵母の 2 本の染色体の末端を融合させることでセントロメアを 2 つもつダイセントリック染色体の作製系を確立した。この融合染色体におけるセントロメアの状態や挙動の変化について解析を行い、次のような研究結果をすでに得ていた(Sato et al. Current Biology 2012)。(1) ダイセントリック染色体を形成した細胞のうち、生存できた大半の細胞の融合染色体は、染色体中の 2 領域にセントロメア DNA の配列を持つが、一方が動原体を形成する機能を失っていること(エピジェネティックな不活性化)を明らかにした。一部の細胞では、一方のセントロメアの DNA 配列が失われているものもあった。(2) 機能を失ったセントロメア領域はヘテロクロマチン化している。(3) セントロメアの不活性化過程には、活性のあるセントロメアの不活性化機構と、一度不活性化したセントロメアの再度の活性化を抑える 2 つの機構の存在が示唆された。

我々はこのように分裂酵母においても、セントロメアの活性が動的に変化する事を明らかにし、セントロメアの形成を抑制する機構にヒストンの脱アセチル化やヘテロクロマチン化が働くことを示唆していた。

2. 研究の目的

セントロメアは、染色体分配に必須の動原体が形成される染色体領域であり、前述のようにこの形成は塩基配列のみに依存しておらず可塑性が存在します。染色体上への過剰なセントロメア形成は、染色体の異常な分離の原因となることから、何らかの機構によりその形成が一カ所となるように調整されている事が示唆される。しかしながらこの機構はよく分かっておらず、セントロメアの数の調節機構を明らかにすることは、基礎生物学的に非常に重要本研究である。本研究ではゲノム配列が解読されているモデル生物であり分裂酵母を使用する。分裂酵母は遺伝子破壊など分子生物学的手法も十分に確立している。これまでの研究で構築した染色体融合などの染色体構造改変法や遺伝学的、分子生物学的解析により、余剰なセントロメアの形成抑制に関係する遺伝子やタンパク質の修飾を同定し、セントロメアが染色体上の一カ所に調節される分子機構の解明を試みる。

セントロメアの形成の中心には特異的なヌクレオソームがあることから、不活性化されたセントロメアのヒストン修飾やクロマチン構造などの解析、加えて染色体の構造改変、遺伝学的な解析を組み合わせ、余剰セントロメアの抑制機構を明らかにする。

分裂酵母のセントロメアの基本構造は、ヒトなどの高等真核生物と多くの部分が共通していることが分かっている。このことから、本研究の結果は細胞分裂の基礎的解析に留

まらず、ヒトの染色体分配異常の解明などにも繋がると考えられる。セントロメアの形成異常は癌の発生や進行に関係があり、染色体の切断や転移、さらには、セントロメア部位の移動は不妊の原因となる。これらのことから、本研究のセントロメアの制御機構の解明は、医学的にも重要な知見を提供できると期待される。

3. 研究の方法

(1) 不活性化セントロメアのクロマチンの解析

これまでの研究から、申請者は染色体を融合させることにより、一方のセントロメアがエピジェネティックに活性を失ったシュードダイセントリック染色体を作製している。さらに、不活性化したセントロメアの再活性化の抑制には、不活性セントロメア領域のヘテロクロマチン化やヒストンの脱アセチル化が関与している事を示している。このことからクロマチンの構成や修飾状態がセントロメアの形成を抑えるために重要であることが示唆されます。そこでこの不活性化セントロメアのクロマチンの詳細な解析を行い、不活性化に必要な因子を推定した。

不活性化状態のセントロメアのヒストン修飾の解析のためにクロマチン免疫沈降(ChIP)法を使用した。ホルマリン固定した核からクロマチンを精製、市販のヒストン修飾に対する抗体(ヒストン H2A K119 ユビキチン化、H2B K20 ユビキチン化、H3K27 トリメチル化、H3K9 ジメチル化、H3K9 トリメチル化、H3K79 トリメチル化、H3K36 トリメチル化、H3K9 アセチル化、H3K4 トリメチル化、H3K27 アセチル化、H3S10 リン酸化、H4K20 モノメチル化など)を用いて結合したクロマチンを分離した。そこに含まれる DNA をリアルタイム PCR によって定量することにより、不活性化セントロメアに結合しているヒストン修飾を解析した。

(2) ヒストン修飾等に関わる酵素の遺伝子破壊による解析

ヒストン修飾に関わる酵素をコードする遺伝子を、カナマイシン耐性遺伝子(Kan)やハイグロマイシン耐性遺伝子(hyg)に置き換えることにより破壊した。PCR 法によって増幅した破壊用のカセットの DNA 断片を、分裂酵母に形質転換し、遺伝子の破壊が起こった細胞は、使用した抗生物質耐性のマーカーを使い、抗生物質を入れた培地上で選択した。これらの細胞は最終的に PCR を用いて遺伝子破壊の確認を行った。

この実験には野生型の分裂酵母と 1 番 2 番染色体融合の起こった分裂酵母、さらにはヘテロクロマチンの形成に必要な *clr4* 遺伝子を破壊したそれぞれの分裂酵母を使用した。

(3) 遺伝子高発現実験

高発現することにより、セントロメアの活性化が不安定になる遺伝子を解析するために、コンディショナルに発現が誘導できる pREP1 プラスミドに遺伝子のクローニングを行った。セントロメアの構成タンパク質や CENP-A のシャペロンタンパク質などの遺伝子を PCR により増幅し、pREP1 プラスミドにクローニング、そのプラスミドを融合染色体を持つ分裂酵母に形質転換した。形質転換された細胞はクローニングした遺伝子の発現が抑制されるチアミン存在下で培養し、洗浄の後、チアミンを除いた培地に段階希釈によりスポットし、遺伝子発現が誘導された際の影響を観察した。

4. 研究成果

(1) 不活性化セントロメアのクロマチン解析

不活性化セントロメアのクロマチン状態解析のため、クロマチン免疫沈降法を用いて解析を行った。ヒストン H3 および H4 の複数箇所のアミノ酸に対するメチル化、アセチル化、リン酸化やヒストン H2 のユビキチン化抗体による免疫沈降実験を行い、活性と不活性のセントロメア間の結合を比較した。特徴的な結果を図 1 に示す。その結果、まず以前の我々の報告同様、融合染色体においてセントロメア特異的ヒストン H3 のパリアントである CENP-A (*cnp1*) は活性のあるセントロメア(今回の場合 1 番染色体のセントロメア、*cnt1*、*imr1*)にのみ検出され、一方でヘテロクロマチン特異的なヒストン H3K9me2 は不活性化セントロメア(2 番染色体のセントロメ

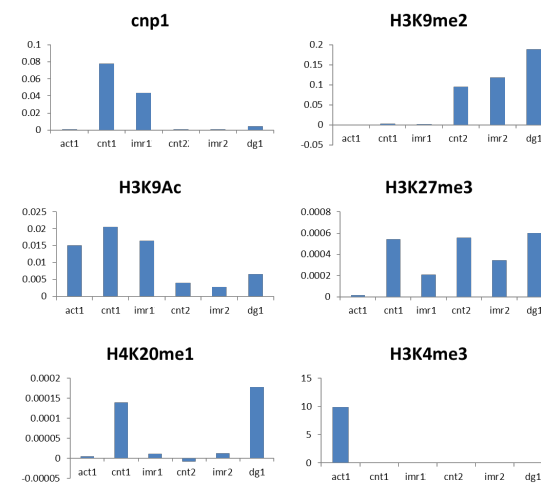


図1 不活性化セントロメアのChIPによるクロマチンの解析
cen1が活性、cen2が不活性化セントロメア

ア *cnt2*、*imr2*)にのみ観察され、1 番染色体のセントロメアには検出されなかった。一過的な抑制に関わるクロマチンに見られるヒストン H3 の 27 番目のリジンのメチル化 (H3K27me3) は活性不活性に関係なく両セントロメアに観察された。活性のあるクロマチンにみられるヒストン H3 の 4 番目のリジンのメチル化 (H3K4me3) は、活性のあるセントロメアにも不活性化セントロメアにも観

察されなかった。一方で活性化クロマチン修飾ヒストン H3 の 9 番目リジンのアセチル化 (H3K9Ac) は、活性のあるセントロメアにおいてのみ見られた。また、ヒストン H4 の 20 番目リジンのメチル化は活性化セントロメアのみに見られ、不活性化セントロメアには観察されなかった。

次に、ヘテロクロマチンの形成ができない、ヒストン H3K9 メチル化酵素 *clr4* 遺伝子を破壊して、クロマチンの修飾の変化を解析した (図 2)

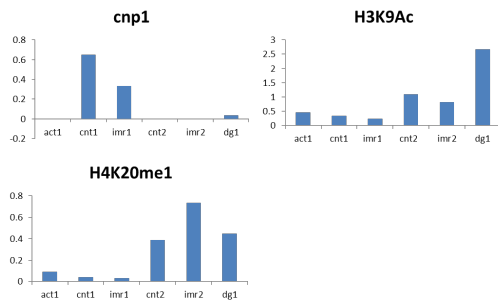


図2 ヘテロクロマチン破壊(Dclr4)におけるセントロメアのクロマチン

その結果、ヘテロクロマチンの破壊のみでは *cnp1* の局在に変化はなく、不活性化のセントロメアへの局在化も見られなかった。一方で、野生型のバックグラウンドで不活性化セントロメアにほとんど見られなかったヒストン H3K9Ac やヒストン H4K20me1 はヘテロクロマチン破壊株において、不活性化セントロメアに劇的な増加が観察された。

これまでに我々は、ヘテロクロマチンやヒストンの脱アセチル化酵素破壊株において、不活性化セントロメアの再活性化が起こりやすくなることを報告しており、このヘテロクロマチン破壊における H3K9Ac の上昇はその結果と一致する。またヒトやチキンにおいてセントロメアの形成に H4K20me1 が重要であることが報告されており、今回の結果はこれをサポートする。しかしながら、我々はこの H4K20me1 に関わるメチル化酵素の高発現や破壊実験を行ったが、融合染色体においてセントロメアの活性や細胞分裂に大きな変化は見られなかった。

(2) 融合染色体株の遺伝子破壊による解析

CENP-A のロードやシャペロンと考えられている遺伝子の破壊を行い、不活性化セントロメアに変化があるかどうかを調べることで、セントロメア局所的形成に関わる因子の解析を行った。被必須遺伝子である *hrp1* や *ams2*, *ccp1* などいくつかの遺伝子の破壊を行ったが、今回は融合染色体株において特異的に影響が現れるような結果は得られなかった。今後は必須タンパク質の温度感受性株などを作成し、解析を行うことが必要と考えられる。

(3) セントロメアタンパク質の高発現解析

セントロメアの構成タンパク質や CENP-A の局在に関連するシャペロンタンパク質等を融合染色体株において高発現することにより、セントロメアの調節機構がより顕著に観察できると考えて、*cnp1*(CENP-A)、*cnp3*(CENP-C)、*sim3*, *mis18*, *mis16*, *ams2*, *mis12*, *scm3*, *cnp20*(CENP-T)、*fta3*(CENP-H)などの遺伝子を高発現した。その結果、特に *cnp1* を始め *sim3* や *mis18* (結果は示さない) の高発現において (図 3)、野生型染色体で見られる増殖の阻害が、融合染色体を持つ株において部分的に回復された。*cnp1* の高発現により、このタンパク質がセントロメア以外のクロマチンに取り込まれ、セントロメアの形成異常を起こすことが知られていることから、融合染色体に行においては *cnp1* の異常な取り込み抑制が更新しているのかもしれない。

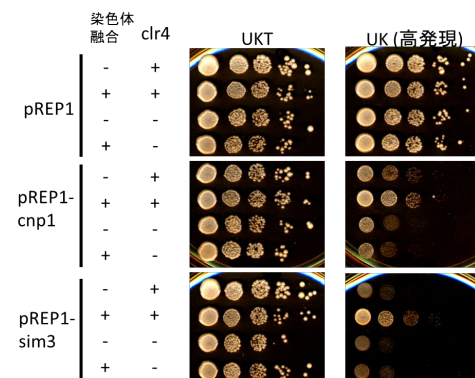


図3 融合染色体株における遺伝子の高発現とヘテロクロマチン変異

一方で、これらの融合染色体における増殖阻害の回復は、ヘテロクロマチン破壊株 (*clr4* 破壊株) において消失したことから、この *cnp1* の取り込み抑制にはヘテロクロマチンが機能していることが示唆される。

以前、我々はヘテロクロマチンがセントロメアの不活性化に必須ではないことを示していた。しかし今回の結果は、セントロメアになりやすい特徴的なクロマチン修飾をとる染色体上の領域が、ヘテロクロマチン化によりそのクロマチン状態を変化させられることで、セントロメア活性を持ちにくい状態に維持・制御されていることを示唆した。新たなセントロメアの形成抑制にはヘテロクロマチンは重要であると考えられ、今後このヘテロクロマチン化を調節する機構の解明が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 浩 (SATO, hiroshi)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：00421313

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()