

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06061

研究課題名(和文) ペリセントロメアを特異的にヘテロクロマチン化する新規のメカニズム

研究課題名(英文) Novel mechanism of pericentromere-specific heterochromatin formation

研究代表者

太田 信哉 (Ohta, Shinya)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：00631194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：セントロメアが正常な機能を維持するためには、セントロメア周縁領域<ペリセントロメア>がヘテロクロマチン状態を維持することが必要である。私たちは、機能未知タンパク質ZNF518が、CENP-B依存的にペリセントロメアに導入されることを見出した。さらに、ZNF518がCENP-Bやヘテロクロマチンタンパク質HP1、及びヒストンメチル化酵素G9aと、独立に相互作用することを発見した。以上の結果から、ペリセントロメアに結合したCENP-Bにより導入されたZNF518タンパク質が関与するプロセスを経て、HP1やG9を介して、この領域がヘテロクロマチン化されるという新しい分子機構のモデルが提唱できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ペリセントロメア領域のヘテロクロマチン化に関して、新しい分子機構のモデルが提唱するものである。セントロメアがその機能を維持する機構については不明な点が多く、本成果は、どのように世代間で染色体が維持され伝播するのか、その機構の全容を解明の一端を担うことができた点において意義があり、その機構は細胞の癌化などの疾患への機序と密接に関わっている。今後は、セントロメアや染色体全体の安定性とその破綻によって引き起こされる疾患の本質的な理解へ貢献を目指す。

研究成果の概要(英文)：Centromere/kinetochore is essential for proper segregation of the genome during mitosis. It has been indicated that precise heterochromatinization at pericentromeric alpha-satellites is required for maintenance of centromere function. Currently our proteomics has indicated chromosomal association of uncharacterized protein, ZNF518. Therefore we verified this hypothesis observing localization of GFP fusion and found its pericentromere localization with satellite DNA binding protein CENP-B dependent manner. Also GFP localization tracking with various truncated ZNF518 shows two essential domains for the pericentromere localization. A fluorescence microscopy-based interaction-trap assay on human chromosomes suggests these two domains are independent CENP-B or HP1 interacting domains. Since G9a histone methyltransferase interaction of ZNF518 has been reported, we suppose that ZNF518 protein is involved in CENP-B dependent pericentromeric heterochromatinization.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体 セントロメア ヘテロクロマチン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂では、2つの娘細胞へ均等に染色体を分配するために、染色体上の特殊な構造 <キネトコア> に紡錘体が結合する。そのキネトコアを形成する染色体の領域がセントロメア (コアセントロメア) である。ゆえに、セントロメアの異常は染色体分配の異常に直結し、それによって引き起こされる不正確な細胞分裂は、ガンや血液疾患等に至る要因となる。セントロメアは数千~数万の 171bp ほどからなる反復配列 < $\alpha$  サテライト> で構成されている。セントロメアがその機能を維持するためには、セントロメア周縁領域<ペリセントロメア>が正確にヘテロクロマチン状態を維持することが必要であると近年指摘されている。このペリセントロメア領域のヘテロクロマチンによりセントロメアは他から隔離され、分裂期のキネトコア形成等を司る特別な領域となる。ヘテロクロマチンとは、非常に凝縮したクロマチン構造となっており、これまでに、ヘテロクロマチンを形成するヌクレオソームのヒストンには特異的な翻訳後修飾が見出されている。とくに、The trimethylation of histone H3 lysine 9 (H3K9me3)は、ヘテロクロマチン特異的タンパク質 HP1 が認識し、結合する分子であることが報告されている。ヘテロクロマチンに結合した HP1 は、ヒストンメチル化活性のある SUV39H と結合することができる。つまり、ヘテロクロマチン化したペリセントロメアにはこの HP1 を介して SUV39H をリクルートし、ペリセントロメアのヘテロクロマチンを維持するメカニズムが示されている。しかし、このモデルでは、*de novo* にペリセントロメアをヘテロクロマチン化させるメカニズムを説明できない。一方で、SUV39h1 が major satellite RNA に結合することも示されていることから、それを介したセントロメアへの集合モデルも示されている。しかし、satellite 配列からなるセントロメアの中で、どのようにしてペリセントロメアの satellite 配列を認識しているのかは強く示されていない。すなわち、このペリセントロメ領域のヘテロクロマチン化機構に関しては、セントロメア機能に必須であるにも関わらず、合理的な説明が果たされていない。また、セントロメアを構成する  $\alpha$  サテライトのサブクラスの中には、17mer のペリセントロメア領域特異的 DNA 結合タンパク質である CENP-B が結合する配列、B-box 配列をコードするものがある。CENP-B は、CENP-A や CENP-C などとともに非常に早い段階で見出されたタンパク質であるにもかかわらず、その機能については不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

私たちの分裂期染色体プロテオームの解析により見出した機能未知タンパク質 ZNF518 が、細胞周期を通してペリセントロメアに局在していることを明らかにしており、本研究では ZNF518 のペリセントロメアの局在がどのような機構によるものか、また、ZNF518 の局在がペリセントロメア機能にどのように関与しているのか、その生物学的意義を見出すことを目的として研究を進めた。

### 3. 研究の方法

- (1) 複数の ZNF518 の変異体を作成し、それらの GFP 融合タンパク質のペリセントロメアへの局在を検証した。これにより、ZNF518 のペリセントロメア局在に必要なドメインを決定した。
- (2) HP1 $\alpha$ 、HP1 $\beta$ 、HP1 $\gamma$  のノックアウトあるいはそれらの二重ノックアウトを作成し、HP1 の非存在下でどのように ZNF518 のペリセントロメアへの局在が変化するか観察した。これにより、ZNF518 のペリセントロメア局在に HP1 がどのように関与しているのかを考察した。
- (3) CENP-B のコンディショナルノックアウトを作成し、CENP-B の ON と OFF でどのように ZNF518 のペリセントロメアへの局在が変化するか観察した。これにより、ZNF518 のペリセントロメア局在に CENP-B がどのように関与しているのかを考察した。
- (4) (1) の ZNF518 の変異体と HP1 あるいは CENP-B との *in vivo* での相互作用を Fluorescence Microscopy-based Interaction-Trap (FMIT) 法 (Ohzeki et al., 2016) を用いて検証した。これにより、ZNF518 が CENP-B あるいは HP1 と相互作用するドメインを決定した。
- (5) ZNF518 と HP1 を精製し、それらの相互作用を試験管内で再構築し確認した。これにより (4) で決定した相互作用ドメインが *in vitro* でも機能することを示した。
- (6) (1) の ZNF518 の変異体とヒストンメチル化酵素 G9a との *in vivo* での相互作用を FMIT 法を用いて検証した。これにより、ZNF518 が G9a と相互作用するドメインを決定した。

### 4. 研究成果

- (1) 複数の ZNF518B 欠失変異体を GFP 融合タンパク質の形でヒト培養細胞内で発現させたところ C 末端の領域を含む変異体に、ペリセントロメアの局在活性が見られた (図 1A、B)。この領域には PxVxL というアミノ酸配列が保存されている。この配列は以前に HP1 結合ドメインとして、他のタンパク質で同定されている配列であった。そこで、この配列に変異を導入

したところ、ペリセントロメアへの局在が著しく低下した(図 1A、B)。一方で、この保存された PxVxL を欠失させた変異体でも、弱いながらもセントロメアへの局在活性が見られたことから、私たちは、ZNF518 は HP1 との相互作用を介したペリセントロメアへの局在機構と、全く異なる独立した第 2 の機構でペリセントロメアへ局在していると結論した。

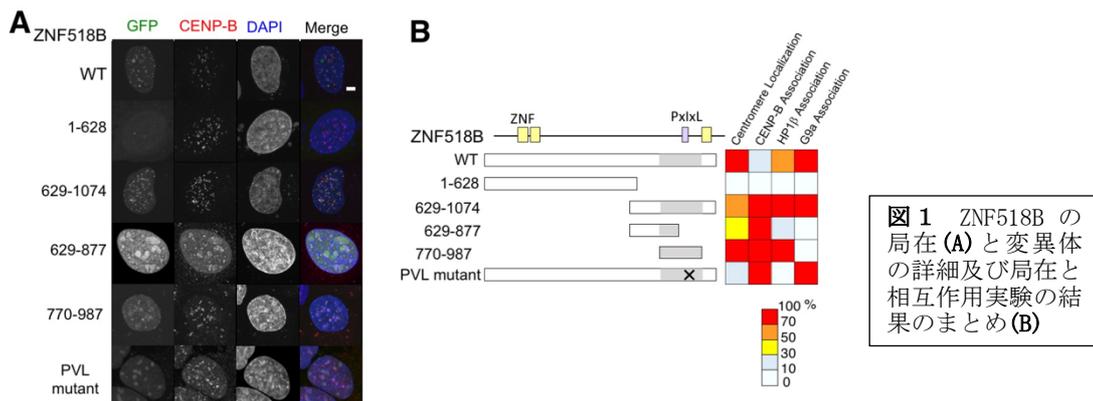


図 1 ZNF518B の局在 (A) と変異体の詳細及び局在と相互作用実験の結果のまとめ (B)

- (2) HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$ , HP1 $\gamma$ のノックアウト細胞を作成し、それぞれの HP1 の非存在下で GFP-ZNF518B のペリセントロメアへの局在を観察したところ、すべてのノックアウトで同程度ペリセントロメアへの局在が観察された。一方で、3 種類の HP1 全てのノックアウトは致死であるため、3 種類の HP1 のうちの任意の 2 種類にノックアウトを導入すると、ペリセントロメアへの局在が低下した。この事実から、私たちは ZNF518 のペリセントロメアへの局在は HP1 の量に依存していると結論した。また、作成した HP1 ノックアウトを用いて、分裂期における AuroraB キナーゼの活性化に HP1 $\alpha$ が重要であることを示した (Ruppert et al., 2018)。
- (3) オーキシン・デグロン法を用いて、CENP-B の条件付きノックアウト細胞を作成した。これにより、CENP-B の存在下と非存在下での ZNF518 の局在を観察すると同時に、ZNF518 がペリセントロメアに局在したのちに CENP-B が消失した場合の ZNF518 の挙動も観察できた。この実験から、CENP-B 非存在下では、ZNF518 はペリセントロメアには局在しないことが分かった。また、ペリセントロメアに局在する ZNF518 も CENP-B の消失と同時にペリセントロメアがから離脱することが分かった。つまり、ZNF518 の第 2 のペリセントロメア局在機構とは、CENP-B との直接的な相互作用である可能性が示唆された。
- (4) これまでの、示唆が正しいか否かを検証するために、ZNF518 と CENP-B あるいは HP1 との相互作用を FMIT 法によって確認できた。さらに、ZNF518 と HP1 の相互作用は、ZNF518 に保存された PxVxL ドメインに変異を導入すると顕著に低下した(図 1B)。さらに、PxVxL ドメインを含まない変異体は HP1 との相互作用が見られなかった(図 1B)。一方で、ZNF518 と CENP-B との相互作用は、C 末端の保存された領域をもつ全ての変異体に見られた(図 1B)。注目すべきは、HP1 と相互作用しない PxVxL ドメインを含まない変異体についても CENP-B との相互作用が観察された点である(図 1B)。この事実から、ZNF518 は接近した 2 つのドメインでそれぞれ独立に CENP-B と HP1 に相互作用をしていることが示唆された。私たちはこの 2 つのドメインの存在こそが、ZNF518 の 2 つのペリセントロメア局在を担っていると結論づけた。
- (5) 大腸菌で発現させ、精製した His<sub>6</sub>-MBP-ZNF518 (770-987) 融合タンパク質と His<sub>6</sub>-GST-HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$ あるいは HP1 $\gamma$ 融合タンパク質とを用いた *in vitro pull down* 法により相互作用を試験管内で確認した。この実験から ZNF518B と HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$ あるいは HP1 $\gamma$ とがそれぞれ同程度の強さで相互作用をすることが示された。
- (6) ZNF518 の変異体とヒストンメチル化酵素 G9a との *in vivo* での相互作用を FMIT 法を用いて検証したところ、ZNF518 と G9a が *in vivo* で相互作用を示すこと、ZNF518 に保存された C 末端の Zinc Finger モチーフが ZNF518 と G9a の相互作用には必須であることが分かった(図 1B)。以上の結果を統合し、ペリセントロメアに CENP-B が結合し、次いで CENP-B により導入された両 AIRI タンパク質が関与するプロセスを経て、HP1 や G9a がペリセントロメアに配置され、この領域がヘテロクロマチン化されるという新しい分子機構のモデルを提唱する。

#### 引用文献

Ohzeki, J., Shono, N., Otake, K., Martins, N.M.C., Kugou, K., Kimura, H., Nagase, T., Larionov, V., Earnshaw, W.C., and Masumoto, H. (2016). KAT7/HBO1/MYST2 Regulates CENP-A Chromatin Assembly by Antagonizing Suv39h1-Mediated Centromere Inactivation. *Developmental Cell* 37, 413–427.

Ruppert, J.G., Samejima, K., Platani, M., Molina, O., Kimura, H., Jeyaprakash, A.A., Ohta, S., and Earnshaw, W.C. (2018). HP1 $\alpha$  targets the chromosomal passenger complex for activation at heterochromatin before mitotic entry. *EMBO J* 37, e97677.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ohta Shinya, Taniguchi Takako, Sato Nobuko, Hamada Mayako, Taniguchi Hisaaki, Rappsilber Juri	4. 巻 18
2. 論文標題 Quantitative Proteomics of the Mitotic Chromosome Scaffold Reveals the Association of BAZ1B with Chromosomal Axes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Proteomics	6. 最初と最後の頁 169 ~ 181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/mcp.RA118.000923	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shinya Ohta
2. 発表標題 Proteomics analysis of mitotic chromosomes with using nano Random Forest
3. 学会等名 The Korean Human Proteome Organization Annual International Proteomics Conference 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 信哉
2. 発表標題 ZNF518 proteins are involved in CENP-B dependent pericentromeric heterochromatinization
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田 信哉
2. 発表標題 ZNF518によるCENP-B依存的なペロセントロメア特異的ヘテロクロマチン化メカニズム
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田 信哉、野間 健一
2. 発表標題 AIRIを介した新規ペリセントロメアヘテロクロマチン化機構
3. 学会等名 第6回 北海道大学・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2020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			
英国	University of Edinburgh			
ドイツ	Technische University Berlin			