

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06485

研究課題名(和文) セントロメア崩壊：その機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of centromere disassembly

研究代表者

松本 智裕 (Matsumoto, Tomohiro)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80212223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：発生、分化、ストレス応答の重要な局面において、セントロメアクロマチンから大部分のCenp-A ヒストンが除去される現象(以下、セントロメア崩壊とよぶ)が、広い生物種にわたり報告されているが、その分子機序は明確ではない。本提案では、分裂酵母を研究対象として、主にセントロメアクロマチンからCenp-A を除去する分子機序を解析した。先に同定したCdc48-Ufd1-Npl4複合体を人為的にミニ染色体Ch16のセントロメアに誘導すると、Ch16のセントロメアから特異的にCenp-A が除去されることで、セントロメア活性が低下し、一部の細胞で、Ch16が脱落することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Cdc48-Ufd1-Npl4複合体が、直接的な作用により、セントロメアクロマチンからCenp-A を除去することを確認した。Cdc48-Ufd1-Npl4複合体を人為的に特定の染色体のセントロメアに誘導することで、その染色体の脱落を引き起こすことができることを示した。この手法を応用することで、染色体の異数性を解消し、ダウン症など染色体の異数性に起因する疾病・がんの根本療法を開発できる可能性を見出した。また、効果的な育種法の開発など他分野への波及効果も大きい。

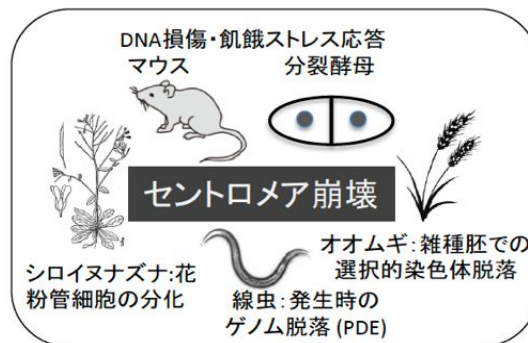
研究成果の概要(英文)：CENP-A is sometimes massively eliminated from the centromeric chromatin in development, differentiation and stress response. The process is called “centromere disassembly”, though the mechanism underlying is unknown. In this study with fission yeast as the model organism, we have focused on the Cdc48 complex and shown that when it was recruited to the centromere of an artificial chromosome, ch16, it removed CENP-A from the centromeric chromatin of ch16 and induced chromosome loss of ch16. The result suggests that the Cdc48 complex may be involved in “centromere disassembly” in other organisms.

研究分野：染色体生物学

キーワード：セントロメア CENP-A 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷、栄養源枯渇などに対するストレス応答において、セントロメアクロマチンに特異的に存在する Cenp-A ヒストンの大部分が除去される現象がマウスで見いだされている (Sci Rep.7: 42520, 2017)。また、シロイヌナズナの花粉管細胞でも同様の現象が報告されている (PNAS 111, 16166, 2014)。ここでは、セントロメアクロマチンから大部分の Cenp-A ヒストンが除去される現象をセントロメア崩壊とよぶ。右図に示すように、セントロメア崩壊は広く真核生物に見られる現象である。オオムギの異種交配による雑種胚では、いずれかの種の選択的な染色体の脱落が起こる。これに先立ち、脱落する染色体ではセントロメア崩壊がおこる (Nature 464, 615, 2010, Annu. Rev. Plant Biol. 67, 421, 2016)。初期発生の段階で、一部の細胞のゲノム DNA が部分的に取り除かれる現象 (PDE: programmed DNA elimination) が、報告されている (Curr. Opin. Genet. Dev. 27, 26, 2014)。ホロセントリック(染色体の全長にわたり動原体を形成する)染色体をもつ線虫の一種では、4細胞期胚の2つの細胞で PDE が起こる。この際、取り除かれるゲノム領域でセントロメア崩壊がおこり、その結果、この領域は有糸分裂期に赤道面に取り残される (Cell Reports 16, 2308, 2016)。また、申請者らは、分裂酵母の窒素源枯渇後6時間でセントロメア崩壊が起こることを見出した。セントロメア崩壊の生物学的意義は未だ明確ではない。ストレス存在下のセントロメア崩壊については、セントロメアを不活化することにより、不適切な細胞分裂を抑制するセーフガードであると推測されている (Sci Rep.7: 42520, 2017)。



大部分のセントロメア崩壊について、その分子機序は不明である。唯一、シロイヌナズナの花粉管細胞でおこるセントロメア崩壊には、Cdc48 を主体とするタンパク質複合体が関与することが遺伝学的に示されているが (PNAS 111, 16166, 2014) この複合体の直接的な関与は未だに示されていない。Cdc48 のホモ 6 量体は、2 種の蛋白質 (Ufd1 と Npl4) と結合し、ミスフォールド蛋白質を分解する ERAD (ER associated degradation) に機能するばかりでなく、近年では、オーロラキナーゼや Cdt1 をクロマチンから除去する UDEC (Ubiquitin-dependent extraction from chromatin) に機能することが報告されている。Cenp-A は、UDEC に類似の機能によりクロマチンから除去されるものと推察される。申請者らは、分裂酵母の通常生育時に Cenp-A ヒストンの分布を調節するメカニズムの解明に取り組んできた。その結果、セントロメアの過剰な Cenp-A ヒストンを除去する機構として Cdc48 六量体をベースとする複合体 (Cdc48-Ufd1-Npl4) を同定した。

2. 研究の目的

2-1. Cdc48 六量体をベースとする複合体 (Cdc48-Ufd1-Npl4) に主眼を置き、この複合体の Cenp-A 除去過程に対する直接的な作用を確認する。

2-2. この複合体をセントロメアへ誘導する因子、時期特異的に活性化する因子を同定し、窒素源枯渇時にセントロメア崩壊を誘導する仕組みを解明する。

3. 研究の方法

3-1. セントロメア崩壊の人為的誘導. 本研究では、生育に不要なミニ染色体 Ch16 を標的として、Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体の誘導による Cenp-A の除去効率を検討する。ミニ染色体 Ch16 のセントロメアの中心領域に Lac0 配列を挿入する。また、Cdc48 複合体のサブユニット Ufd1 に LacI を融合したもの (Ufd14-LacI) を条件的に発現できるプロモーター (nmt1) の制御下におく。この系において、Ufd1-LacI 発現時に特異的に、1) Cdc48 複合体がミニ染色体のセントロメアクロマチンに高度に集積、2) ミニ染色体のセントロメアの Cenp-A 量 (ChIP 法により測定) が大きく減少、さらに、3) ミニ染色体の脱落頻度が上昇すれば、Cdc48 複合体が直接的に作用して、セントロメアの Cenp-A を除去することを明確に示すことができる。

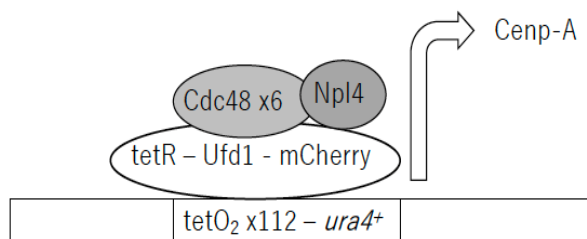
3-2. Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体の制御因子の解析. Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体の Cenp-A 除去活性は、培養条件により変動することが予想される (通常生育時は Cenp-A の適性分布維持のための基底レベルであり、Cenp-A を高発現することにより上昇、さらに 窒素源飢餓時にはセントロメア崩壊を引き起こすまでに上昇) Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体の活性制御因子を同定・解析

し、セントロメア崩壊の分子機序を解明したい。方法 . 上記 、 、 の培養から、Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体を単離し (Ufd1 に GFP タグを施し、抗 GFP 抗体による免疫沈降による) いずれかの培養条件に特異的に見出せる結合因子 (あるいは翻訳後修飾) を質量分析により同定する。この生化学的アプローチに加え、必要に応じて遺伝学的アプローチも試みる。すなわち、Cenp-A の除去活性が低い変異体 (*ufd1-73*、あるいは *cdc48-353*) のセントロメア中心部に *ura4* 遺伝子を挿入 (高密度に存在する Cenp-A の影響で、*ura4* 遺伝子は発現しない) した株を用いる。ゲノム DNA ライブラリーを導入し、Cenp-A の除去活性の回復により、*ura4* 遺伝子の発現が復帰する形質転換体を単離し、当該遺伝子をクローニングする。

4 . 研究成果

4-1. セントロメア崩壊の人為的誘導.

本計画の申請時には、LacO-LacI 系の利用を考えたが、系の構築に要する労力を考慮の上、同等の機能をもつ tetO-tetR 系に変更した (右図)。tetR-Ufd1-mCherry を高発現した際に限り、ch16 のセントロメア領域に Cdc48 が集積することを確認した。なお、Npl4 については未確認ではあるが、先行研究により、Cdc48 は、Ufd1-Npl4 と複合体を形成することが知られている。また、tetR-Ufd1-mCherry を高発現することにより、ch16 のセントロメア領域の Cenp-A が通常の 70 %程度にまで減少し、さらに ch16 の脱落頻度が 10 倍に上昇することを確認できた。これらの結果は、Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体が直接的な作用によりセントロメアのクロマチンから Cenp-A を取り除く活性があること、さらに、Cenp-A を失ったセントロメアが、その機能を失うことで、ch16 が脱落したことを示唆する。



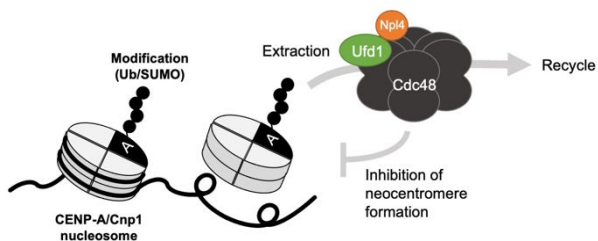
Ch16のセントロメア領域

また、tetR-Ufd1-mCherry を高発現することにより、ch16 のセントロメア領域の Cenp-A が通常の 70 %程度にまで減少し、さらに ch16 の脱落頻度が 10 倍に上昇することを確認できた。これらの結果は、Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体が直接的な作用によりセントロメアのクロマチンから Cenp-A を取り除く活性があること、さらに、Cenp-A を失ったセントロメアが、その機能を失うことで、ch16 が脱落したことを示唆する。

4-2. Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体の制御因子の解析.

窒素源枯渇前後のセントロメアを Cenp-A に GFP タグを施した融合タンパク質の局在として観察した。メタノールで固定した細胞の Cenp-A-GFP のシグナルを観察したところ、窒素源枯渇後の Cenp-A シグナルが窒素源枯渇前に比べて顕著に減少することがわかった。栄養源にตอบสนองして細胞増殖を制御するシグナル伝達経路として TORC1 経路が知られている。この経路に関わる因子 Tsc2 の遺伝子破壊株は、窒素源枯渇への応答が遅延する。*tsc2* 遺伝子破壊株で窒素源枯渇後の Cenp-A のシグナルを観察したところ、WT に比べて Cenp-A シグナルが強いことがわかった。そこで、セントロメアの Cenp-A 量を ChIP 法でも観察したところ、窒素源枯渇前に比べて枯渇後の WT のセントロメアの Cenp-A 量はわずかに減少していた。しかし、*tsc2* 遺伝子破壊株と WT との比較において、窒素源枯渇後の Cenp-A 量は顕微鏡観察ほど顕著な差は見られなかった。顕微鏡観察と ChIP 法での結果に違いが見られたことから、窒素源枯渇時のセントロメア崩壊の検証は、ChIP 法に絞って詳細に見ていく必要がある。

シロイヌナズナの花粉細胞において SUMO 化された CenH3/CENP-A を Cdc48 複合体が取り除くとの報告がある。出芽酵母においても Cse4/CENP-A が SUMO 化されるとの報告がある。SUMO 化された Cse4/CENP-A は STUb1 である Slx5 によって Ub 化され、分解制御を受けることによってセントロメア以外への取り込み (mislocalization) の抑制機構が働いていると考えられている。分裂酵母の Ufd1 の基質としてよく知られているのが DNA 修復因子である。損傷部位に集まってきた DNA 修復因子は、SUMO E3 リガーゼや STUbLs によって修飾 (SUMO 化/Ub 化) を受け、それを Ufd1 が認識してクロマチンから除去する働きがあると報告されている。これらの報告から、分裂酵母の Cenp-A も SUMO 化を受け、それが指標となり Cdc48-Ufd1 複合体によって除去されるのではないかと考えた (右図)。そこで、*ufd1* 変異株で Cenp-A 過剰発現時に複数点見られる Cenp-A シグナルが SUMO と一致するのかを顕微鏡で観察した。Cenp-A の代わりに Cenp-A と共同存在する Cenp-C-mCherry と SUMO-GFP のシグナルを観察したところ、複数点見られる Cenp-C-mCherry シグナルが SUMO-GFP と一致することがわかった。このことから、分裂酵母においてもおそらく Cnp1 は SUMO 化などの修飾を受けているものと予想する。細胞内に過剰量 Cenp-A が存在した場合、STUbLs や SUMO E3 ligase によって SUMO 化/Ub 化を受けることによって、クロマチン上に存在する Cdc48-Ufd1 複合体が速やかに認識し、修飾された Cnp1 ヌクレオソームを積極的に取り除いているのではないかと考えている。



4-3. その他. 本研究の実施中に、セントロメアの Cenp-A の量 (すなわちセントロメアのサイズ) は、細胞のサイズに相関するのではないかと着想した。この仮説を検証するため、細胞サイズが小さい変異体 (*wee1-50*) でのセントロメアのサイズと動原体の挙動を観察した。その結果、セントロメアのサイズは、野生型と比較して有意な差はないものの、紡錘系と動原体との相互作用に変調があることを見出した。

本研究により、Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体が、直接的な作用により、セントロメアクロマチンから Cenp-A を除去することを確認できたことが最大の収穫であった。Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体を人為的に特定の染色体のセントロメアに誘導することで、その染色体の脱落を引き起こすことができることを示した。この手法を応用することで、染色体の異数性を解消し、ダウン症など染色体の異数性に起因する疾病・がんの根本療法を開発できる可能性を示すことが出来た。また、効果的な育種法の開発など他分野への波及効果も大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	中瀬 由起子 (Nakase Yukiko) (80402923)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

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