

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26252057

研究課題名(和文) 昆虫分散型動原体の形成と制御の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of formation and regulation of insect heliocentric chromosome

研究代表者

日下部 宜宏 (KUSAKABE, TAKAHIRO)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：30253595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,700,000円

研究成果の概要(和文)：鱗翅目昆虫は、分散型動原体と呼ばれる特異な染色体を持つことが知られている。本研究では、分散型動原体形成の分子基盤を明らかにするとともに、遺伝子ネットワーク解析から、新たに6つのカイコに特異な動原体遺伝子を見出した。またその成果と、複製関連遺伝子の解析結果をもとに、DNA複製因子と動原体タンパク質を結合させることで機能する初期型の人工染色体を合成した。一方、ゲノムワイドな遺伝子発現制御とクロマチン構造の分子基盤については、特に、ヒストンのアセチル化、脱アセチル化酵素に着目し、これら遺伝子について機能阻害実験などを行った結果、カイコでは、HDAC8が非常に重要な働きを担っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lepidopteran insects are known to have specific chromosomes called heliocentric chromosome having multiple centromeres along the entire length. In this study, we clarified the molecular basis of kinetochore formation of the heliocentric chromosome and newly found six centromere-related genes specific to silkworm using the gene network analysis. Based on these results and analysis on replication related genes, an artificial chromosome functioning by tethering DNA replication factor and kinetochore protein was synthesized. On the other hand, as for the genome-wide gene expression regulation and molecular basis of chromatin structure, we focused on histone acetylation and deacetylation enzymes, and performed gene knockdown on these genes. As a result, we found that HDAC 8 plays an important role in the silkworm.

研究分野：昆虫ゲノム科学

キーワード：分散型動原体 染色体 カイコ 遺伝子ネットワーク クロマチン構造

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂期における染色体の均等分配は、生命の連続性の維持に不可欠な現象である。局在型動原体と呼ばれる1染色体に1つの動原体が存在する生物種が一般的であり、稀に複数個の動原体を有する染色体が存在する。ところが、昆虫の中でも鱗翅目、毛翅目、半翅目は、1染色体に多数の動原体を有する分散型動原体と呼ばれる染色体を持つことが知られている。本来、染色体は遺伝子の格納容器であり、必要な時に適量の遺伝子の発現を維持する機構を備えている。一方で、染色体の厳密な分配や維持には、他の領域とは異なる機能に特化した構造が必要となる。ヘテロクロマチンに代表される特殊なクロマチン構造は、セントロメアやテロメアの認識、形成には有効であるが、遺伝子発現を維持するためには不都合である。真核生物の染色体が、いつ、どのようにして高度なセントロメアとテロメア制御機構を獲得したのかについては明らかではないが、その機能に強く関連するヘテロクロマチン化を構築する一方で、周辺領域の遺伝子発現を確保する調和のとれた制御機構を獲得してきたと考えられる。染色体の正確な分配には、幾つかの戦略が考えられる。1つは、セントロメア領域を限定し、その領域における動原体の形成とその機能を何重にも及ぶチェックとバックアップ機構により保証する方法である。ヒトの染色体がこれに当たり、1つのセントロメア領域と2つのテロメア領域がある。この場合、一部の領域を犠牲にすることで、遺伝子発現に影響を与える特殊構造を最小限に抑えることができるが、チェックとバックアップ機構に要するエネルギーは膨大であり、失敗は許されない。もう1つは、複数箇所のセントロメア領域を準備し、1カ所くらいの失敗は許容する方法である。この場合には、動原体形成に必要な特殊なクロマチン構造とこれに相反する遺伝子発現の確保という大きな

問題が残る。昆虫目の幾つかは、分散型動原体染色体を有しており、この特異構造は、染色体の機能発現や制御に甚大な影響を与えているにも関わらず、その構造と機能に関する研究は少ない。そのユニークな分子機構の理解は、遺伝子組換え昆虫の制御にも必須であるばかりでなく、人などの局在型動原体染色体の制御機構解明にも役立つことが期待される。

## 2. 研究の目的

分散型動原体染色体のエピジェネティクス、特に動原体形成の分子基盤とゲノムワイドな遺伝子発現の制御に関わるクロマチン構造の分子基盤及びその制御遺伝子ネットワークを明らかにし、これを局在型動原体と比較解析することにより、動原体形成のエッセンスを抽出することにある。さらに、その分子基盤を積極的に活用し、複製・転写・組換えを自由自在に制御可能な実用・基礎研究の両方のプラットフォームとなる人工染色体を構築する。また、本課題で構築を目指す遺伝子ネットワークモデリングは、染色体・クロマチン制御だけでなく、その他の生命現象に関わる遺伝子ネットワークモデルとしても活用できる事が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 分散型動原体の構造と機能

#### ① カイコ動原体タンパク質の同定

まず、他のモデル生物における動原体タンパク質の情報を元に、**Blast**を用いたホモロジー検索を行い、比較的種間で保存性の高い動原体遺伝子を同定した。その他の遺伝子は、生物種間での保存性が極めて低く、通常のデータベース検索では同定できなかったが、他の検索アルゴリズム (**PSI-BLAST**, **HMMER**) などを用いて候補遺伝子を推定し、カイコ培養細胞 **BmN4-SID1** を用いた **RNAi** 法により、これらが動原体形成に関わる遺伝子か否かを検証することで、新たに6個の動原体タンパク質を同定した。次に、質量分析計

を用いて動原体タンパク質の同定を試みた。HAタグをつけた既知動原体タンパク質を安定的に発現するカイコ培養細胞BmN4-SID1を作成後、CDC27遺伝子に対するdsRNAを細胞に添加し、培養細胞をM期の前中期～中期に停止させた。このような動原体タンパク質が複合体を形成している細胞を用いて、免疫沈降を行い単離したタンパク質複合体を質量分析計により解析した。さらに、カイコ培養細胞のRNA-seqデータから、「発現パターンが似ている遺伝子は、その機能が似ている可能性が高い」という予測に基づいて、既知動原体関連遺伝子と遺伝子発現プロファイルが類似している機能未知遺伝子を推定した。

## ② de novo動原体形成

コドンの最適化を行った不活性型Cas9 (dCas9)、およびカイコU6プロモーターにより改良型gRNA (Ma *et al.*, Nat Biotechnol., 2016) を発現するベクターを構築した。また、標的配列としては染色体上に多コピー存在するトランスポゾンターゲットとし、100コピー、1000コピー、10000コピー程度存在する配列を複数選んだ。これらの中から、U6プロモーターで効率よく発現させるために、RNA配列の5'末端がグアニン、PAM配列がNGGとなるようにさらに絞り込みを行った。さらに、CRISPRseek (Zhu *et al.*, PLoS One, 2014) などのソフトウェアを用いて、効率のよいgRNAを選定した。また、これらgRNAがカイコ培養細胞で効率よく働くかを蛍光タンパク質と融合したdCas9 (dCas9-mAG) を用いて解析した。

## (2) カイコ人工染色体

BmN4-SID1細胞を用いて、カイコ複製関連遺伝子38遺伝子をノックダウン後、フローサイトメトリー (FACS) により細胞周期解析を行い、S期に停止するかを解析した。また、GAL4-UASの系を利用し、複製関連タンパク質をプラスミドに局在させ、カイコ培養細胞内で、プラスミドを効率よく複製させるために

必要な遺伝子を同定するためのプラスミドを作製した。これらプラスミドをカイコ培養細胞に導入し、DNAを抽出後、DpnI処理を行いトランスフェクションされたDNAを消化し、その後PCRにより、培養細胞内で新たに複製されたプラスミドを検出した。さらに、上記プラスミドにLacO/LacI、TetO/TetRカセット、プラスミドを標識するための蛍光タンパクなどを挿入した。また、Insect two-hybrid system (Mon *et al.*, 2009) を用いて、複製関連因子の相互作用を解析した。

## (3) クロマチン修飾因子

他のモデル生物の配列情報を元に、Blastを用いたホモロジー検索を行い、その後それらの系統樹を作製して、カイコにおけるヒストンアセチル化、脱アセチル化酵素を同定した。これらすべての遺伝子について、BmN4-SID1細胞を用いてRNAiを行い、FACSを用いて細胞周期の変化、セルカウンターを用いて細胞増殖、顕微鏡観察により形態変化を解析した。BmN4-SID1細胞は、多重ノックダウンが可能であることから、2種類のdsRNAを細胞に添加し、レスキュー実験を行い遺伝的な相互作用を解析した。さらに、ノックダウン細胞のRNAをそれぞれ抽出後、次世代シーケンサーを用いて網羅的に遺伝子発現量の変化を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 分散型動原体の構造と機能

#### ① カイコ動原体タンパク質の同定

カイコ動原体タンパク質がどのようなタンパク質によって構成されているのかを調べ、他生物の遺伝子配列情報を元に 12 の遺伝子 (Cenp-N, L, M, I, K, Ndc80, Nuf2, Spc24, Spc25, Mis12, Dsn1, Nnf1) を同定した。それぞれの相互作用を調べた結果、Cenp-N/-L、Cenp-I/-K/-M、Ndc80/Nuf2/Spc24/Spc25、Mis12/Dsn1/Nnf1 がそれぞれサブコンプレックスを形成していた。また、プロテオミクス的手法を用いて、Mis12/Dsn1/Nnf1 複合体と相互作用する遺伝子 Kn11 を同定した。これ

ら遺伝子を RNAi によりノックダウンすると、その多くは分裂中期において染色体の赤道面上への整列に異常がみられ、その後、多くの細胞において核相の倍数化が観察された。Kn11 は、RNAi による機能阻害をおこなったが、ヒトや線虫とは大きく異なり、細胞周期や染色体動態には全く影響がなかった。CRISPR/Cas9 によりカイコ培養細胞で Kn11 のノックアウトも試みたが、RNAi の結果と同様であった。さらに、カイコ培養細胞における遺伝子ネットワークから、動原体形成に関与している可能性の高い機能未知遺伝子をリストアップし、それら遺伝子を RNAi によりノックダウンを行った。その結果、6 つの遺伝子 (No21, 37, 42, 99, 100, 107) において、染色体分離や動態、微小管形成に異常が見られた (図 1)。

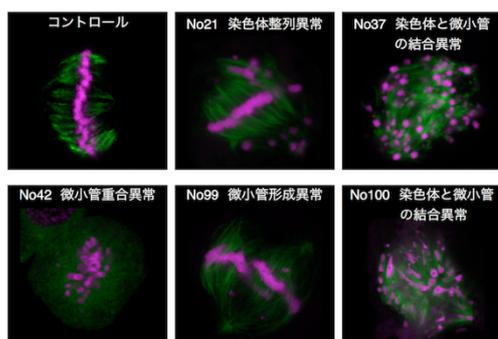


図1 ノックダウン後の染色体、微小管異常

中でも、No37 は、RNAi によりノックダウンすると、動原体形成に異常がみられ、細胞の赤道面において染色体の整列異常が観察された。そこで、既知の動原体タンパク質との相互作用を調べた結果、Spc24/Spc25、Mis12/Nnf1/Dsn1、Cenp-N と結合していた。昆虫型の分散型動原体を構成する遺伝子を同定することができただけでなく、動原体の屋台骨となる非常に重要な遺伝子を捉えることができた。

他の機能未知遺伝子については、2 つの遺伝子 (No21, 99) について解析を行った。どちらも RNAi によりノックダウンを行うと、染色体の分離に異常が見られた。No21 は、分裂中期に動原体とその周辺の紡錘体、後期以

降はミッドボディに局在していた。No99 は、分裂中期に染色体近傍の紡錘体に局在しており、相互作用するタンパク質を解析した結果、紡錘体内部における微小管形成に関わるタンパク質複合体であるオーグミンと相互作用していた。遺伝子ネットワークから選ばれた機能未知である遺伝子群の中から、染色体動態に関連する遺伝子も同定することができた。この戦略は、他の分野でも応用可能であり、未だ謎に包まれた名もなき遺伝子の機能解析に結びつく事が期待される。

## ② de novo 動原体形成

不活性型 Cas9 (dCas9) を用いて、動原体タンパク質をカイコゲノムの任意の位置に局在させる系を作製した。また、効率よく不活性型 Cas9 を染色体上に局在させるため、標的配列の設計方法の改良、guide RNA の変更を行った。詳細なカイコゲノム情報をもとに、カイコ染色体に低・中・高頻度で存在するトランスポゾン配列を選定し、それら配列の近傍における転写のアクティブな遺伝子の有無によりトランスポゾン配列のクラス分けを行なった。それらの中から、効率よく働く gRNA を同定した (図 2)。この実験系を用いることで、異所的なネオロメア形成、さらに、他のクロマチン修飾因子を染色体上の任意の場所に誘導することが可能である。

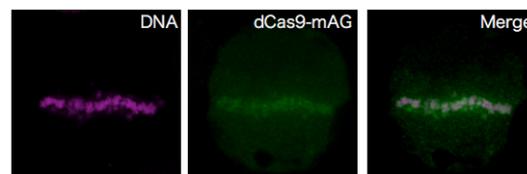


図2 dCas9の染色体への局在化

## (2) カイコ人工染色体

カイコ人工染色体の構築の第一段階として、プラスミドを効率よく培養細胞内で複製させることを目指した。まず、カイコ複製関連遺伝子 38 遺伝子について RNAi による遺伝子機能阻害解析を行い、カイコにおける DNA

複製に必須の遺伝子を同定した。その後、細胞内でプラスミドを効率よく複製開始させるために必要な遺伝子の探索を行い、Cdt1、Cdc6、Orc1 を同定した。Orc1 を含む複製起点認識複合体 (ORC) のうち、Orc2 と Orc3、Orc3 と Orc5 が相互作用していた。DNA 複製因子に加えて、動原体タンパク質をプラスミドに結合させることで、複製後のプラスミドを効率よく娘細胞に分配させるために、LacO/LacI、TetO/TetR の系を導入し人工染色体の骨格となるプラスミドの改良を行った (図 3)。

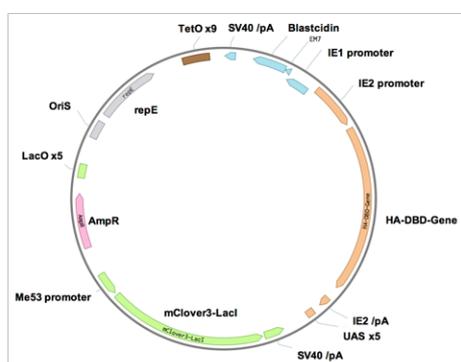


図3 人工染色体の骨格となるプラスミド

また、人工染色体のベースとなるバキュロウイルスについて、144 全遺伝子のプロモーターを単離し、活性を解析した。これら DNA 複製関連因子の結果は、人工染色体構築のために必要な基本情報となり、また、バキュロウイルス由来のプロモーターは、人工染色体からの遺伝子発現制御に非常に有用であると期待される。

### (3) クロマチン修飾因子

クロマチン修飾因子の中でも、ヒストンのアセチル化、脱アセチル化酵素に着目して実験を進めた。ヒストンアセチル化酵素 (HAT) を 17 種類、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を 11 種類、カイコより同定した。これら遺伝子について RNAi による機能阻害を行い、細胞周期、増殖、形態変化を解析した。RPD3、HDAC3、HDAC8、Tip60、TF2D、p300、Elp3 をノックダウンすると、著しい増殖阻害が見られた (図 4)。機能阻害実験において細胞周

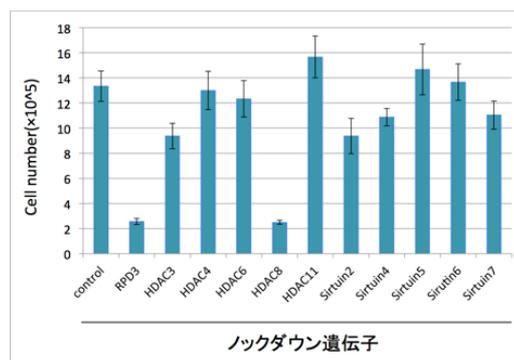


図4 HDAC遺伝子ノックダウンの細胞増殖への影響  
期に与える影響が大きかった HDAC、HAT については、遺伝子ノックダウン細胞のトランスクリプトーム解析を行い、その結果、RPD3、および HDAC8 をノックダウンした細胞において、多くの遺伝子の発現量が変動していた (RPD3 : 116 遺伝子, HDAC8 : 743 遺伝子)。カイコでは、他生物とは異なり HDAC8 が非常に重要な働きを担っていることが予想された。また、HDAC8 をノックダウンした際、転写量が有意に変化した遺伝子の中には、TCA サイクルや脂肪酸代謝に関わる遺伝子が多く含まれていた。さらに、RPD3、および HDAC8 をノックダウンした際の細胞増殖阻害をレスキューする HAT 遺伝子を探索したところ、RPD3 では pCAF (p300/CBP-Associated Factor)、HDAC8 では HBO1 (HAT bound to ORC1) が同定できた。これらの知見により、分散型動原体に適応したクロマチンのエピジェネティック制御の一端を明らかにすることができた。

### 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] (主要なもの以外の件数を含めた総件数 計 3 件)

1. Mon H, Lee JM, Sato M, Kusakabe T. Identification and functional analysis of outer kinetochore genes in the holocentric insect *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 86 1-8 (2017) 査読有 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.04.005>
2. Hino M, Morokuma D, Mon H, Lee JM, Kusakabe T. Characterization of the roles of DNA polymerases, clamp, and clamp

loaders during S-phase progression and cell cycle regulation in the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Biotechnology and Sericology 85 21-29 (2016) 査読有  
[https://doi.org/10.11416/jibs.85.2\\_021](https://doi.org/10.11416/jibs.85.2_021)

3. Sugahara R., Mon H., Lee JM., Shiotsuki T., Kusakabe T. Differential contribution of the Fanconi anemia-related proteins to repair of several types of DNA damage in cultured silkworm cells. FEBS Letters 558 3959-3963 (2014) 査読有  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.009>

[学会発表] (主要なもの以外の件数を含めた総件数 計 13 件)

1. 門 宏明、佐藤 昌直、李 在萬、日下部 宜宏 A novel DNA-binding protein essential for kinetochore formation in holocentric insect *Bombyx mori*. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017 年 12 月 神戸

2. Takumi Yano, Masato Hino, Tatsuke Tsuneyuki, Hiroaki Mon, Jae Man Lee and Takahiro Kusakabe, Comparative analysis of histone H1 variants in *Bombyx mori*. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2017 年 11 月 福岡市

3. Miho Tsuchioika, Hiroaki Mon, Jae Man Lee, Tsuneyuki Tatsuke, Takahiro Kusakabe, Functional Analysis of histone acetylation in *Bombyx mori*. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2017 年 11 月 福岡市

4. 日野 真人・門 宏明・李 在萬・日下部 宜宏 RNAi法とテザリング法を用いたカイコDNA複製関連因子の機能解析日本分子生物学会 2016年11月 横浜市

5. 土岡 美穂・門 宏明・李 在萬・田附 常幸・日下部 宜宏 カイコにおけるヒストンアセチル化修飾酵素の機能解析-I日本分子生物学会 2016年11月 横浜市

6. Masato Hino, Hiroaki Mon, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe, Screening of Silkworm DNA Replication Related Genes as an Inducer of DNA Synthesis in Episomal DNA. The 5th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology Feb. 2017 Bangkok, Thailand

7. Yoshiki Morifuji, Atsushi Masuda, Takumi Yano, Hiroaki Mon, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe, Analyses of the Roles of Silkworm Insulator Proteins BmCTCF and BmCP190 on Enhancer-Promoter Interaction

The 5th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology Feb. 2017 Bangkok, Thailand

8. Takumi Yano, Yoshiki Morifuji, Masato Hino, Tsuneyuki Tatsuke, Hiroaki Mon, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe Characterization of Histone H1 Variants in *Bombyx mori*. The 5th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology Feb. 2017 Bangkok, Thailand

9. Hiroaki MON, JaeMan LEE, Takahiro KUSAKABE, Novel kinetochore protein complex from silkworm holocentric chromosomes. 29th Annual Symposium of the Protein Society July 2015 BARCELONA, Spain

10. 門 宏明・李 在萬・日下部 宜宏 カイコ分散型動原体を構成するタンパク質の解析日本分子生物学会 2015 年 12 月 神戸市

11. Masato Hino, Hiroaki Mon, Li Zhu, Mami Yamashita, Kazuma Hirata, Dan Zheng, Jian Xu, Ming-Ming Ji, Daisuke Morokuma, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, Characterization of silkworm replication related proteins for making an artificial chromosome. The 4th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology April 2015 Busan, Korea

12. 日野 真人・門 宏明・徐 劍・祝 力・李 在萬・日下部 宜宏 カイコ複製関連遺伝子の網羅的ノックダウン解析日本蚕糸学会 2015年9月 札幌市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日下部 宜宏 (KUSAKABE TAKAHIRO)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：30253595

### (2) 研究分担者

佐藤 昌直 (SATO MASANA0)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：20517693

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし