

令和元年6月7日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04747

研究課題名(和文) セントロメア機能調節の細胞高次機能への連係と次世代人工染色体の開発

研究課題名(英文) Centromere modulation coordinating with higher order cellular functions and development of a next generation human artificial chromosome

研究代表者

舛本 寛 (Masumoto, Hiroshi)

公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・室長

研究者番号：70229384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト人工染色体(HAC)には、各種機能クロマチンが新規集合し染色体として維持される。本研究では、合成DNAからなるHACを用いセントロメア機能形成とヘテロクロマチン集合とのバランス調節のメカニズム解明を目指した。セントロメアクロマチン形成に必須なMis18複合体によりヒストンアセチル化酵素(KAT7)が呼び込まれ、セントロメアとヘテロクロマチンの集合バランスや機能維持に関わることを明らかにした。更に各種合成アルフォイドDNAを組み合わせ、両社の集合バランスを調節可能な次世代型HACを開発し、これまで単一の合成アルフォイドDNAでは低下していた人工染色体形成活性を大幅に向上させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体機能制御の乱れは、細胞死や老化、異常増殖を引き起こすが、その詳細は未解明のままである。ヒト人工染色体では、細胞へ導入した裸のDNA上に機能するクロマチンが新規形成され、染色体として自律的に維持される。本研究では、このヒト人工染色体と構成学的手法を組み合わせ、染色体分配に関わるセントロメア機能形成とヘテロクロマチン集合のバランス調節機構の解明を進めた。本研究により染色体分配機構の異常へ繋がるメカニズムの解明が進み細胞死や老化、異常増殖への原因解明が期待される。次世代型人工染色体の開発は遺伝子治療や物質生産を目指した巨大DNA断片導入用ベクターとしても高い利用価値が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：On a human artificial chromosome (HAC), various functional chromatins are newly assembled and maintained as an autonomous extra chromosome. In this study, we aimed to elucidate mechanism of the balance control between functional centromere formation and heterochromatin assembly using HAC system composed of synthetic repetitive DNAs. We have revealed that histone acetyl transferase (KAT7) is recruited by the Mis18 complex which is essential for the centromere chromatin assembly, and is also involved in the assembly balance and functional maintenance between centromere and heterochromatin. Furthermore, by combining various synthetic repetitive DNAs, we have developed next-generation HACs that can regulate the assembly balance of both chromatins, and have significantly improved the artificial chromosome formation activity which had been reduced with a single synthetic repetitive DNA.

研究分野：分子生物学

キーワード：セントロメア ヘテロクロマチン 人工染色体 CENP-A ヒストン交換 クロマチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖、発生・分化、生殖、老化などの生命現象はゲノムの正常な機能に支えられ、これには複製・分配・組換え・修復・クロマチンなどの染色体基本機能の厳格な制御が必須である。これら基本制御に乱れが生じると細胞死や異常増殖を引き起こし、癌、老化や疾病の原因となる。このうち染色体分配に関わるセントロメアでは、ヒストン H3 のバリエーションである CENP-A を含むクロマチンが集合し、これを足場に 100 を越える因子群が集合して、その外側部にキネトコア構造が形成される。キネトコアでは微小管との相互作用により染色体の動きを制御する。また、セントロメア内部領域ではヘテロクロマチンが集合し、姉妹染色分体の接着 (コヒージョン)・分離を制御する。セントロメア機能形成に関わる個々の構成因子に関しては、分子遺伝学、生化学的解析手法を駆使して解明が進みつつある。しかし、ヒトを含む哺乳類のセントロメアでは、同一反復 DNA からなる巨大領域に CENP-A クロマチンと共にヘテロクロマチンも集合する。更に、エピジェネティックな制御や反復 DNA 解析に伴う技術的困難さなどに阻まれ、不明な点が多く残されたままであった。本研究代表者はヒト染色体セントロメアに由来する反復 DNA 配列 (アルフォイド DNA) をヒト培養細胞 HT1080 へ導入し、安定に分配維持されるヒト人工染色体 (HAC) を形成させ (Ikeno et al. Nature Biotech, 1998)、CENP-B タンパクが結合することで CENP-A クロマチン形成とヘテロクロマチン化によるセントロメア不活性化の両反応を引き起こされることを明らかにした (Okada et al. Cell, 2007)。更に本研究代表者らは、反復単位中に tet オペレーター配列 (tetO) を組み込んだ合成反復配列から人工染色体 (tetO-HAC) を作製することにも成功し、tet リプレッサー (tetR)-各種融合タンパクを人工染色体セントロメアへ直接結合させ、クロマチン集合バランスを操作する方法を確立した (Nakano et al, Dev Cell, 2008)。この tetO-HAC と任意の tetR-融合タンパク質を用いることで、複雑で解析が困難なセントロメア・キネトコアの集合機構やエピジェネティックなクロマチン構造の変換機構の解析が可能となった。一方、セントロメアとヘテロクロマチンの細胞高次調節機能への関連性についてもこれまでにいくつか報告されている。ヒト胎児由来の初代細胞 TIG3 では、細胞老化に伴いセントロメアクロマチンが低下しヘテロクロマチンが大幅に増強される (Maehara et al. MCB, 2010)。Dicer ノックアウト ES 細胞ではヘテロクロマチンの消失と共に細胞はその分化能を失う (Kanellopoulou et al. Genes Dev, 2005)。Suv39h1/2 ダブルノックアウトでは H3K9me3 修飾が大幅に減少し、マウスはある程度発生は進むが癌を多発する (Peters et al. Cell, 2001)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、このヒト人工染色体と tetO 配列/各種 tetR 融合タンパクを用いた構成的手法を組み合わせて、染色体分配に関わるセントロメア機能形成の全容解明とヘテロクロマチン集合とのバランス調節のメカニズム解明を目指した。更に、これらセントロメアとヘテロクロマチンの集合バランスによりゲノム機能がどのように影響を受け、細胞高次調節機能の異常に繋がるのか、その連係メカニズム解明に迫ると共に、これらの知見を利用してバランスを個別に調節できる次世代型人工染色体の開発を目指した。

3. 研究の方法

上述のように、セントロメアとヘテロクロマチンの集合バランスを調節している因子は細胞老化や分化段階と連係して変動している可能性が極めて高い。そこで、本研究計画では、以下の研究を進めた。(1) セントロメア機能形成の調節因子の解明: セントロメア機能構造体の集合メカニズムの全体像を明らかにする。これまでに tetO-HAC/異所的挿入部位と tetR 融合タンパクを用いて多種多様な因子の CENP-A クロマチン集合への関わりについて検定するシステムをすでに構築している。かずさ cDNA ライブラリーから CENP-A クロマチンの集合を調節する因子をスクリーニングする。(2) クロマチン集合バランス調節因子と細胞高次機能への連係機構: 集合バランスを攪乱し、ゲノム反復 DNA 上のクロマチン構造がどのように変動して細胞高次機能へ影響を与えるのか、そのメカニズムの解明に迫る。(3) クロマチン集合バランスを調節可能な次世代人工染色体の開発: tetO 配列や lacO を挿入した合成アルフォイド DNA の伸長合成 (60kb, 120kb) 進め、セントロメアとヘテロクロマチンの両集合バランスを tetR/lacI 融合タンパクでそれぞれ個別に調節可能な次世代型人工染色体の開発を進める。

4. 研究成果

(1) セントロメア機能形成の調節因子の解明:

セントロメア機能集合の核となる CENP-A クロマチンの集合調節因子の選別を進めた。人工染色体上にかずさ cDNA ライブラリーからの各種融合タンパクを結合させ、CENP-A シグナルの増加/減少させる因子を多数得た。CENP-B は正にも負にもセントロメア機能を調節可能であり、CENP-B がクロマチン上に集合させる因子を調べた結果、ヘテロクロマチン側の調節因子である Sub39h1、HP1 と共にオープンクロマチン側のヒストン H3K36me2/3 化修飾酵素等を含む多数因子を同定した。特に、Sub39h1、HP1 とヒストン H3K36me2/3 化修飾酵素は CENP-B の結合に依存して反復 DNA 上のクロマチン集合バランスの調節に関与すること、これら因子のノッ

クダウンや過剰発現によるクロマチン集合バランスの攪乱は染色体分配異常を引き起こすこと等を明らかにした (Otake et al 投稿中)

(2) クロマチン集合バランス調節と細胞高次機能への関係機構の解明:

CENP-A クロマチンの補充に必須な Mis18 複合体 (M18BP1/Mis18a/Mis18b) と相互作用する因子の検索を進めた結果、Mis18 複合体は CENP-A シャペロン HJURP とヒストンアセチル化酵素 KAT7 を同時に集合させることを発見した (図1)。更に、KAT7 によるクロマチンのアセチル化によりリモデリング因子 RSF1 が集合することを明らかにした。RSF1 は、KAT7 によりアセチル化されたヒストンの交換反応を促進することで、セントロメアクロマチン領域へのヘテロクロマチンの侵入をくい止め、HJURP による CENP-A クロマチンの新規補充反応を促進することも明らかにした (Ohzeki et al Dev Cell 2016)。このように、アセチル化の関わるヒストン交換反応と CENP-A の新規集合が関係して起こることで、反復 DNA 上のセントロメアコア領域へのヘテロクロマチンの侵入を防ぎセントロメアクロマチンを維持するバランス制御機構が存在することを明らかにした (図1: Ohzeki et al Curr Opin Cell Biol 2018)。

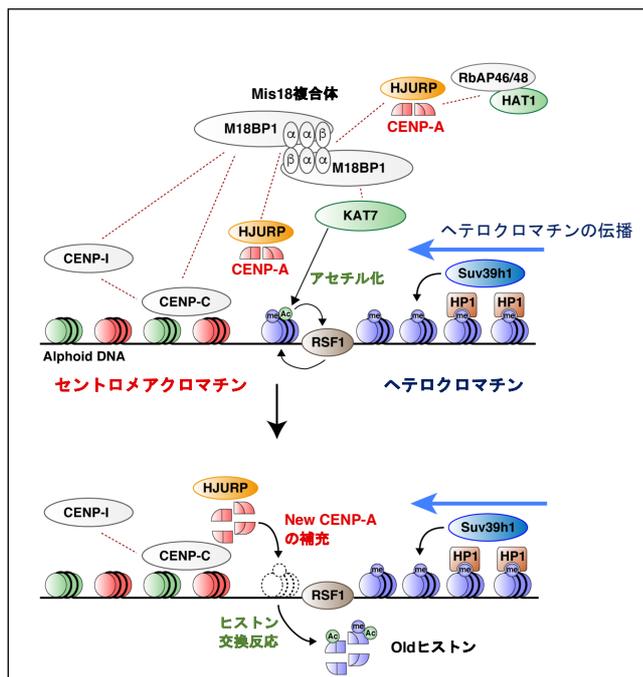


図1. セントロメアクロマチンの新規補充機構

(3) クロマチン集合バランスを調節可能な次世代型人工染色体の開発:

クロマチン集合バランスをオープン側に偏らせるとセントロメア形成は促進されるが、逆にヘテロクロマチン因子の結合はセントロメア機能形成を阻害する。一方でヘテロクロマチンは染色分体のコヒージョン維持の制御に関わり、人工染色体や染色体分配機能には必要である。そこで、次世代型人工染色体構築の基盤となる tet0 と lac0 をそれぞれ挿入した 60kb の合成反復 DNA を作製し、これらを組み合わせた 120kb の各種長鎖合成反復 DNA をそれぞれ細胞へ導入し、まず、人工染色体形成が可能であるかどうかについて検定した。その結果、それぞれ組み合わせから多様な安定性を示す人工染色体が構築できた。このように、セントロメアとヘテロクロマチンの両集合バランスを tetR/LacI 融合タンパクでそれぞれ個別に調節可能な次世代型人工染色体を開発した。また、tetO 配列や lacO を挿入した各種合成アルフォイド DNA を組み合わせ、これまで単一の合成アルフォイド DNA を用いた場合には低下していた人工染色体形成活性を大幅に向上させることに成功した (Okazaki et al 準備中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Ohzeki J, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H*: De novo formation and epigenetic maintenance of centromere chromatin. Curr Opin Cell Biol. 2019 Jan 14;58:15-25. doi: 10.1016/j.ceb.2018.12.004.
- ② Kouprina N, Petrov N, Molina O, Liskovych M, Pesenti E, Ohzeki J, Masumoto H, Earnshaw WC, and Larionov V.: Human Artificial Chromosome with Regulated Centromere: A Tool for Genome and Cancer Studies ACS Synth. Biol., 2018 Aug 16. 7 (9), pp 1974–1989, 2018 doi: 10.1021/acssynbio.8b00230.
- ③ Lee HS, Carmena M, Liskovych M, Peat E, Kim JH, Oshimura M, Masumoto H, Teulade-Fichou MP, Pommier Y, Earnshaw WC, Larionov V, Kouprina N.: Systematic Analysis of Compounds Specifically Targeting Telomeres and Telomerase for Clinical Implications in Cancer Therapy. Cancer Res. 2018 Nov 1;78(21):6282-6296. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0894.
- ④ Lee NCO, Kim JH, Petrov NS, Lee HS, Masumoto H, Earnshaw WC, Larionov V, Kouprina N.: Method to Assemble Genomic DNA Fragments or Genes on Human Artificial Chromosome with

Regulated Kinetochores Using a Multi-Integrase System. *ACS Synth Biol.* 2018 Jan 19;7(1):63-74. doi: 10.1021/acssynbio.7b00209.

- ⑤ Pesenti E, Kouprina N, Liskovych M, Aurich-Costa J, Larionov V, **Masumoto H**, Earnshaw WC, Molina O.: Generation of a Synthetic Human Chromosome with Two Centromeric Domains for Advanced Epigenetic Engineering Studies. *ACS Synth Biol.* 2018 Apr 20;7(4):1116-1130. doi: 10.1021/acssynbio.8b00018.
- ⑥ Molina O, Kouprina N, **Masumoto H**, Larionov V, Earnshaw WC. Human artificial chromosomes to study centromere assembly and function. *Chromosoma*, 2017 Oct;126(5):559-575. doi: 10.1007/s00412-017-0633-x.
- ⑦ Molina O, Vargiu G, Abad MA, Zhiteneva A, Jeyaprakash AA, **Masumoto H**, Kouprina N, Larionov V, *Earnshaw WC: Epigenetic engineering reveals a balance between histone modifications and transcription in kinetochores maintenance. *Nat Commun.* 7: 13334. (2016) doi: 10.1038/ncomms13334.
- ⑧ Booth DG, Beckett AJ, Molina O, Samejima I, **Masumoto H**, Kouprina N, Larionov V, Prior IA, *Earnshaw WC: 3D-CLEM Reveals that a Major Portion of Mitotic Chromosomes Is Not Chromatin. *Mol Cell.* 64(4): 790-802. (2016) doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.009.
- ⑨ **Kugou K**, Hirai H, **Masumoto H*** and Koga A*.: Formation of functional CENP-B boxes at diverse locations in repeat units of centromeric DNA in New World monkeys. *Scientific Report*, Jun 13;6:27833. (2016) doi: 10.1038/srep27833.
- ⑩ **Ohzeki J**, Shono N, **Otake K**, Martins NMC, **Kugou K**, Kimura H, Nagase T, Larionov V, Earnshaw WC, **Masumoto H***: KAT7/HBO1/MYST2 regulates CENP-A chromatin assembly by antagonizing Suv39h1-mediated centromere inactivation. *Developmental Cell*, Jun 6;37(5): 413-427. (2016) doi: 10.1016/j.devcel.2016.05.006.

[学会発表] (計 8 件)

- ① **Masumoto H**: De novo establishment and epigenetic maintenance of centromere chromatin on alpha-satellite DNA, The 2018 "Centromere Biology" Gordon Research Conference, 2018年7月29日 - 8月3日、Mount Snow, West Dover, VT, USA、
- ② **Masumoto H**: Development of Human Artificial Chromosomes and Chromatin Manipulation Technologies, 岡崎フラグメント不連続 DNA 複製モデル 50周年記念国際シンポジウム, 2018年12月17日、名古屋大学
- ③ **Masumoto H**: "Establishment and epigenetic maintenance of centromere chromatin on alpha-satellite DNA", The Future of Biomedicine 2017 conference at the Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, 9/10-9/15 (2017)
- ④ **Masumoto H**: "Establishment and epigenetic maintenance of centromere chromatin on alpha-satellite DNA", The 32th International Radiation Biology Center Symposium "Growing Edge of Radiation Biology, from principles to applications", Kyoto, September 1 and 2 (2016)
- ⑤ **舛本寛**: セントロメア反復 DNA への CENP-A クロマチンとヘテロクロマチンの集合機構、染色体研究の最前線 2019、2019年3月8日 - 19日、がん研究所
- ⑥ **舛本寛**: セントロメア反復 DNA への CENP-A クロマチンとヘテロクロマチンの集合機構、染色体研究の最前線 2018、2018年3月15日 - 16日、東京工業大学
- ⑦ **舛本寛**: セントロメアとヘテロクロマチンはどうやって反復 DNA に維持されているのか? 第5回ヒストンバリエーション研究会、2018年2月10日、首都大学東京
- ⑧ **舛本寛**: セントロメアへの CENP-A クロマチンとヘテロクロマチンの集合機構、第4回「クロマチン・デコーディング」研究会、阪大、2017年1月16 -18日 (招待口演) (

[図書] (計 3 件)

- ① **大関淳一郎**、**舛本寛**: ヒト人工染色体を用いたセントロメア機能獲得のエピゲノム制御解析 (2017) バイオサイエンスとインダストリー (B&I), Vol. 75. バイオインダストリー協会, pp. 304-309.
- ② **久郷和人**、**大竹興一郎**、**舛本寛**: CENP-B によるセントロメアのエピジェネティクス制御への関わり (2017) *Medical Science Digest*, Vol. 43. ニューサイエンス社, pp. 629-632.
- ③ **大関淳一郎**、**舛本寛**: ヒストンアセチル化酵素 KAT7 はヘテロクロマチンの拡大からセントロメアを守る (2016) ライフサイエンス新着論文レビュー: 6月27日 DOI: 10.7875/first.author.2016.066

[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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kazusa.or.jp/laboratories/advanced-department/chromosome-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：岡崎孝映、大関淳一郎、久郷和人

ローマ字氏名：Okazaki Kouei、Ohzeki Junichirou、Kugou Kazuto

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。