

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07501

研究課題名(和文) 動原体構築に必須な細胞周期に依存したセントロメアクロマチン形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cell cycle-dependent regulation for centromere chromatin establishment, which is essential for the kinetochore formation in vertebrate cells.

研究代表者

堀 哲也 (Hori, Tetsuya)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：70550078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリDT40細胞を用いて、CENP-Aの取り込み過程において重要なライセンシング因子KNL2がCENP-Aと直接相互作用することを見だし、セントロメアの位置が細胞周期のG1期に安定に維持継承されるモデルを提出した。細胞周期の間期の細胞核内におけるセントロメアクロマチンの3次元相互作用を4C-seq法により明らかにした。また、セントロメア特有なH4K20me1修飾がCENP-Aヌクレオソームに導入される構造的基盤について明らかにした。これら知見は将来的に、クロマチン構築の制御を対象とした抗がん剤などの新規薬剤開発研究への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報の継承に重要な、細胞核内のセントロメアのクロマチンの形成の仕組みと、その安定維持を保證するメカニズムの一端を明らかにした。これら成果は、細胞の遺伝情報の伝播の仕組みを解明する鍵となる知見として期待される。さらに将来的には、これら成果を活用した抗がん剤などの新規薬剤開発研究への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that KNL2, a member of the Mis18 complex, was essential for the stable inheritance of the centromere position at G1-phase through direct binding to CENP-A nucleosome to deposit new CENP-A in chicken DT40 cells. We revealed the 3D architecture of the interphase genome, including the centromeres by systematic 4C-seq analysis using DT40 cell lines. Based on structural and genetic analyses, we conclude that a CENP-A-mediated structural polymorphism facilitated the preferential H4K20 monomethylation in centromeric nucleosomes. These findings may provide insight into developing an anti-cancer drug utilizing chromatin modulation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：セントロメア ヒストン修飾 エピジェネティクス 細胞周期 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

染色体分配において中心的な働きを担う動原体は、複数のタンパク質で構成される巨大な構造体である。動原体は染色体上のセントロメアと呼ばれるゲノム領域中に形成され、セントロメアの位置情報は細胞分裂を経ても維持されている。セントロメア領域の位置情報は DNA の一次配列によっては規定されず、その領域のクロマチンに存在するエピジェネティックな情報によって、維持・継承されると考えられている。ヒトを含む脊椎動物では、セントロメアのクロマチン領域には、セントロメアに特異的なヒストン H3 のバリエーションである CENP-A が存在し、セントロメア領域の位置情報に関与するエピジェネティックマーカーと考えられている。しかしながら、CENP-A の存在のみでは機能的な動原体構築は起こらず [J. Cell Sci., 114 (2001) 3529-3542]、セントロメア領域の位置の規定から動原体構築に至る分子メカニズムについては不明な点が多い。我々は、ニワトリ DT40 細胞を用いた染色体工学技術を活用して、DT40 細胞内で新規セントロメア (ネオセントロメア) を実験的に誘導することに成功している [Dev. Cell, 24 (2013) 635-648]。このネオセントロメアを保持する細胞株を利用して、セントロメア領域に特異的なヒストン修飾を複数見出し、それらの機能解析を行った。細胞生物学および生化学的な解析により、H4K5ac, H4K12ac は CENP-A がセントロメア領域に正確に取り込まれる過程に必須な修飾であること [Nature Commun., 7, (2016) 13465]、H4K20me1 は動原体構築に関与する修飾であることを明らかにした [Dev. Cell, 29 (2014) 740-749]。このようなセントロメアのクロマチン修飾に関する研究と並行して、我々は、動原体構成タンパク質 CENP-C が、セントロメア領域のクロマチンへ局在する様式が細胞分裂期と間期で異なり、この細胞周期の進行に伴う変換が機能的な動原体の形成に重要であることを示した [Mol. Biol. Cell, 26 (2015) 3768-3776]。この知見は、セントロメアに特異的なクロマチン構造が細胞周期依存的に変換する可能性とその動原体形成における重要性を示唆している。しかしながら、細胞周期の進行に伴い、セントロメアに特異的なクロマチンが経時的にどのように構築されていくかという点に着目した研究報告はほとんど無く、その分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究により、細胞周期に依存したセントロメアクロマチン形成の分子基盤が明らかとなり、セントロメアを介した染色体分配機構を制御する新規概念の発見が期待される。

### 2. 研究の目的

染色体が正確に分配される過程で中心的な働きを担う動原体は、特異的なクロマチン構造を持つセントロメアと呼ばれるゲノム領域中に形成される。しかし、動原体の形成に必須なクロマチン構造の実体については、明らかになっていない点が多い。本研究では、ニワトリ DT40 細胞を用いた細胞遺伝学的手法を活用し、セントロメアに特異的なクロマチン構造の分子基盤とそれが構築される分子メカニズムの解明を目指す。特に、細胞周期に依存したセントロメアに特異的なヒストンマークおよびクロマチン構築因子の同定を行い、それらを通じてセントロメアクロマチンの構築と維持の分子メカニズムの解明を目指す。本研究成果から、セントロメアを介した染色体分配機構が理解できる。

### 3. 研究の方法

代表者らは、これまで染色体工学技術により、動物細胞内で実験的にネオセントロメアを保持する細胞株の取得に成功し、さらにセントロメア機能に必須な複数のヒストン修飾を発見した。本研究では、ネオセントロメア細胞株を利用して、細胞周期の進行に依存したセントロメアクロマチン形成およびセントロメアのエピジェネティクスを制御する分子メカニズムの解明を目指し、(1) 細胞周期の G1 期に特有な、セントロメア領域の維持に必須なエピジェネティック制御の仕組みの解明、(2) 細胞周期の間期に特有な、セントロメアクロマチンの細胞核内 3 次元相互作用の解析、(3) セントロメア領域に特異的な修飾の導入の構造生物学と遺伝学的な解析、を中心に研究を行なった。

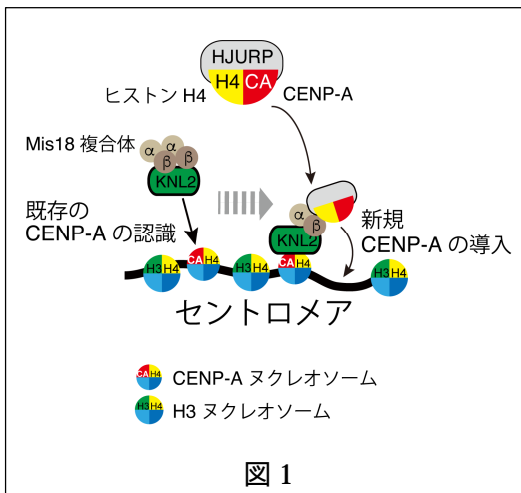
### 4. 研究成果

ニワトリ DT40 細胞を用いて、CENP-A の取り込み過程において重要なライセンス因子 KNL2 の機能ドメインを明らかにし、「クロマチンに既に存在する CENP-A の近傍に新規 CENP-A を供給することで、セントロメアの位置が安定に継承される」とするモデルを提出した (Dev. Cell, 2017)。ネオセントロメアを保持する細胞株を使用して、間期の細胞核内におけるセントロメアクロマチンの 3 次元相互作用を 4C-seq 法により明らかにした (J. Cell Biol., 2018)。また、構造生物学と遺伝学的な解析から、特有な H4K20me1 修飾が CENP-A ナクレオソームに導入される構造的基盤について明らかにした (Nature Commun., 2019)。これら知見は将来的に、クロマチン構築の制御を対象とした抗がん剤などの新規薬剤開発研究への応用が期待される。

#### (1) セントロメア領域のエピジェネティック制御の仕組みの解明

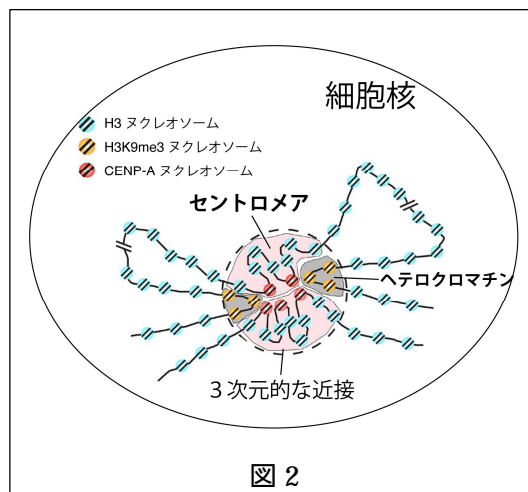
セントロメア領域の決定は、CENP-A をはじめとするクロマチンタンパク質によるエピジェネティックな制御が必須である。その領域は、世代を超えてその位置が安定に維持されることから、特別なエピジェネティック制御の仕組みがあると考えられている。CENP-A の取り込み過程において重要なライセンス因子である KNL2 複合体に注目し、特にその構成因子である

KNL2 タンパク質を対象に、ニワトリ DT40 細胞を利用した遺伝学的および生化学的手法による機能解析を行なった。その結果、ニワトリでは KNL2 タンパク質が、既にクロマチンに導入されている CENP-A ヌクレオソームを細胞周期の G1 期に直接認識してセントロメアに局在することが明らかとなった。そして、その局在位置の近傍に新規の CENP-A を導入することで、極めて安定にセントロメア領域の位置が継承される、とするモデルを提出した (図 1) (*Dev. Cell*, 2017)。今後、KNL2 複合体の局在と新規 CENP-A の導入の分子メカニズムの解明に向け、KNL2 と CENP-A ヌクレオソームとの複合体構造およびその相互作用の形成の仕組みを中心に解析を進める計画である。



### (2) セントロメアクロマチンの細胞核内 3 次元相互作用の解析

ニワトリ DT40 細胞で樹立したネオセントロメア細胞株を使用し、セントロメアクロマチンの細胞核内における 3 次元相互作用を 4C-seq 解析法により調べた。解析の結果、間期細胞核内でネオセントロメアが形成されるとそのゲノム領域は、1 次配列上は遠く離れたゲノム上のヘテロクロマチン領域と相互作用を生じるようになることを発見し、報告した (図 2) (*J. Cell Biol.*, 2018)。解析対象としたネオセントロメア領域には、これまでの研究からヘテロクロマチン構造は存在しないことが分かっている。一般的なモデル生物種では、セントロメア領域には高度に反復した DNA 配列が存在し、そのゲノム領域には動原体構築に必須なセントロメアに特有なクロマチンに加えて、周辺領域にヘテロクロマチン構造 (ペリセントロメアヘテロクロマチン) が伴う。ペリセントロメアヘテロクロマチン構造を持たないネオセントロメアが、別の染色体領域のヘテロクロマチンと相互作用することによってペリセントロメア機能を補い、セントロメアクロマチン構造の安定維持に寄与している可能性も考えられる。今後、セントロメアクロマチン構築におけるヘテロクロマチンとの相互作用の意義の解明に向け、細胞周期の進行に依存したヘテロクロマチン因子とセントロメア関連タンパク質との相互作用の有無およびその仕組みの解明を中心に解析を進める計画である。



### (3) セントロメア領域に特有な修飾が導入される構造基盤の解析

これまでの、CENP-A ヌクレオソーム内の H4K20me1 修飾は動原体構築のトリガーとして重要なヒストン修飾であることを報告していたが、その修飾の導入メカニズムについては不明な点が多かった。試験管内で再構成した H3 ヌクレオソームおよびヒト CENP-A (H3<sup>CATD</sup>) を含むヌクレオソームの X 線結晶構造解析を行い両者の構造を比較した結果、CENP-A 特有なアミノ酸残基 (V76, K77) が H4K20me1 修飾の導入に有利なアミノ酸であることが示唆された。そこで、ニワトリ DT40 細胞を使用して、上記アミノ酸に相当する部位の変異細胞株を作成し、定量的 ChIP-seq 解析である Spike-in ChIP-seq を行い、H4K20me1 修飾の導入効率を比較解析した。その結果、細胞内においても同様に CENP-A 特有なアミノ酸残基が H4K20me1 修飾の導入を促進していることを明らかにして、「ヒストンの構造的な特徴によりエピジェネティック修飾の導入を制御する」という新規な仕組みの存在を示した (*Nature Commun.*, 2019)。しかし、今回発見した構造的な特性のみでは、セントロメア領域への H4K20me1 修飾の特異的な導入を完全には説明できない。今後、H4K20me1 修飾の導入を制御する鍵となる因子とその分子メカニズムの解明に向け、セントロメア関連タンパク質の存在と H4K20me1 修飾の導入との関係を中心に解析を進める計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hori Tetsuya, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 389
2. 論文標題 Artificial generation of centromeres and kinetochores to understand their structure and function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111898 ~ 111898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.111898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takizawa Yoshimasa, Ho Cheng-Han, Tachiwana Hiroaki, Matsunami Hideyuki, Kobayashi Wataru, Suzuki Midori, Arimura Yasuhiro, Hori Tetsuya, Fukagawa Tatsuo, Ohi Melanie D., Wolf Matthias, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Cryo-EM Structures of Centromeric Tri-nucleosomes Containing a Central CENP-A Nucleosome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 44 ~ 53.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2019.10.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 堀 哲也, 深川 竜郎	4. 巻 52
2. 論文標題 染色体分配に必須なセントロメアのクロマチン構造	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 342-347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arimura Yasuhiro, Tachiwana Hiroaki, Takagi Hiroki, Hori Tetsuya, Kimura Hiroshi, Fukagawa Tatsuo, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 The CENP-A centromere targeting domain facilitates H4K20 monomethylation in the nucleosome by structural polymorphism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08314-x	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 -

1. 著者名 Nishimura Kohei, Komiya Masataka, Hori Tetsuya, Itoh Takehiko, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 218
2. 論文標題 3D genomic architecture reveals that neocentromeres associate with heterochromatin regions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 134-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201805003	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 -

1. 著者名 Hara Masatoshi, Ariyoshi Mariko, Okumura Ei-ichi, Hori Tetsuya, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 20
2. 論文標題 Multiple phosphorylations control recruitment of the KMN network onto kinetochores	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1378-1388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-018-0230-0	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 -

1. 著者名 Hori Tetsuya, Shang Wei-Hao, Hara Masatoshi, Ariyoshi Mariko, Arimura Yasuhiro, Fujita Risa, Kurumizaka Hitoshi, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Association of M18BP1/KNL2 with CENP-A Nucleosome Is Essential for Centromere Formation in Non-mammalian Vertebrates	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 181 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2017.06.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Tetsuya Hori, Jinghui Cao, Yasuhiro Arimura, Kohei Nishimura, Mariko Ariyoshi, Atsushi Toyoda, Sadahiko Misu, Kazuho Ikeo, Hitoshi Kurumizaka, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 Essentiality of CENP-A conserved motif depends on CATD binding mode to HJURP
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jinghui Cao, Yasuhiro Arimura, Mariko Ariyoshi, Hitoshi Kurumizaka, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 Interaction mode between CENP-A and HJURP in vitro
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Hori, Jinghui Cao, Yasuhiro Arimura, Kohei Nishimura, Mariko Ariyoshi, Hitoshi Kurumizaka, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 Essentiality of CENP-A depends on its binding mode to HJURP
3. 学会等名 ASCB   EMBO 2019 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 浩平, 堀 哲也, 豊田 敦, 古宮 正隆, 伊藤 武彦, 深川 竜郎
2. 発表標題 脊椎動物細胞におけるセントロメアの3次元構造解析
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 浩平, 堀 哲也, 古宮 正隆, 伊藤 武彦, 深川 竜郎
2. 発表標題 4C解析による核内セントロメア構造 分子基盤とその役割の解明
3. 学会等名 第36回染色体ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	堀 哲也, 曹 静暉, 西村 浩平, 有村 泰宏, 有吉 真理子, 豊田 敦, 三須 定彦, 池尾 一穂, 胡桃坂 仁志, 深川 竜郎
2. 発表標題	セントロメア機能を制御するエピジェネティックメカニズム
3. 学会等名	第41回日本分子生物学会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Tetsuya Hori, Jinghuish Cao, Yasuhiro Arimura, Kohei Nishimura, Mariko Ariyoshi, Atsushi Toyoda, Sadahiko Misu, Kazuho Ikeo, Hitoshi Kurumizaka, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題	Epigenetic regulation for functional centromere formation in Vertebrate Cells
3. 学会等名	ASCB   EMBO 2018 Meeting (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	西村 浩平, 堀 哲也, 古宮 正隆, 伊藤 武彦, 深川 竜郎
2. 発表標題	ネオセントロメアから迫るセントロメア領域における染色体構造の解析
3. 学会等名	第41回日本分子生物学会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Kohei Nishimura, Tetsuya Hori, Masataka Komiya, Takehiko Itoh, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題	3D structural analysis of neo-centromere region in vertebrate cells.
3. 学会等名	ASCB   EMBO 2018 Meeting (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 Masatoshi Hara, Mariko Ariyoshi, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 Dynamics of CCAN-KMN interaction in vertebrate kinetochore during mitotic progression
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mariko Ariyoshi, Fumiaki Makino, Tomoki Sano, Reito Watanabe, Yasuhiro Arimura, Masatoshi Hara, Hitoshi Kurumizaka, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 Molecular dissection of CENP-A nucleosome recognition by CENP-C
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 Epigenetics and Kinetochore assembly in Vertebrate Cells
3. 学会等名 EMBO Workshop "Dynamic kinetochore" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kohei Nishimura, Tetsuya Hori, Masataka Komiya, Takehiko Itoh, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 3D genome organization in centromeres
3. 学会等名 EMBO Workshop "Dynamic kinetochore" (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 堀 哲也, 豊田 敦, 三須 定彦, 池尾 一穂, 深川 竜郎
2. 発表標題 セントロメア機能に必要なエピジェネティック機構
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村 浩平, 堀 哲也, 古宮 正隆, 伊藤 武彦, 深川 竜郎
2. 発表標題 ネオセントロメアの解析により明らかになったセントロメア領域のゲノム3D構造の実体
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古宮 正隆, 西村 浩平, 堀 哲也, 深川 竜郎, 伊藤 武彦
2. 発表標題 4C-Seqを用いたネオセントロメア形成に伴う染色体高次構造変化の解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高木 大輝, 立和名 博昭, 有村 泰宏, 堀 哲也, 深川 竜郎, 胡桃坂 仁志
2. 発表標題 ヒストンH3バリエーションCENP-AのCATDドメインはヌクレオソーム中のH4K20のモノメチル化を促進する
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

染色体の分配のしくみに、鍵となる新たな分子の働きを発見  
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/events/achievement/fukagawa-20181113/>  
細胞核内におけるセントロメア領域の立体的配置を解明  
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/events/achievement/fukagawa-20181105/>  
染色体の分配装置が形成される仕組みを解明  
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/events/achievement/hori-fukagawa-20170725/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----