

令和元年6月11日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15041

研究課題名(和文) 間期核内におけるセントロメアの三次元ゲノム構造の解明

研究課題名(英文) 3D structural analysis of centromere in vertebrate cells

研究代表者

西村 浩平 (NISHIMURA, Kohei)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：80582709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリDT40細胞を用いてゲノム間相互作用解析4C-seqを行なった。これにより、間期核内におけるセントロメアの特殊な構造が明らかとなった。また我々は通常とは別の位置にセントロメアが形成されているネオセントロメア株や標的とするタンパク質を短時間のうちに分解除去することが可能なAuxin Inducible Degron法を用いてこのセントロメアにおけるゲノム間相互作用に関わる因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報を担う染色体の正確な分配は、細胞増殖に不可欠な現象であり、生命の基本原則とも言える。染色体分配の要となるキネトコア(動原体)はタンパク質の巨大複合体として染色体上のセントロメアDNA上に形成される。一方、セントロメア領域は、分裂期のみならず間期の核内でも特殊な構造と機能を有すると長く考えられてきたが、解析の困難さから間期のセントロメアの構造に関する知見は乏しかった。申請者はニワトリの細胞を用いることによって、間期核内におけるセントロメアの特殊な構造を検出することに成功した。この発見は間期細胞におけるセントロメアの役割解明に非常に重要なステップとなると期待される。

研究成果の概要(英文)：We carried out 4C-seq analysis of chicken DT40 cells. 4C-seq analysis showed some features of centromere region in interphase nuclei. In addition, we identified some factors that are involved in the centromere structure by using neocentromere forming cells and Auxin inducible Degron system in chicken DT40 cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：セントロメア 4C-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分裂期の真核細胞のキネトコア形成領域（セントロメア）は、ゲノム DNA 配列によってではなく、エピジェネティックな機構によって規定される。この過程における鍵因子はセントロメアに特異的なヒストン CENP-A と考えられている。キネトコアは、CENP-A を含むヌクレオソーム周辺に、Constitutive Centromere Associated Network proteins (CCAN) などの多数のタンパク質が集合することで形成される。本研究では、キネトコア構成成分の CENP-A と CCAN が間期のセントロメアにも存在している点に注目した。脊椎動物の間期の細胞の核内でセントロメア領域が特異的な三次元構造をとっている可能性は古くから指摘されていたが、その実体とそれを構築する分子機構は不明のままであった。

2. 研究の目的

遺伝情報を担う染色体の正確な分配は、細胞増殖に不可欠な現象であり、生命の基本原則とも言える。染色体分配の要となるキネトコア（動原体）はタンパク質の巨大複合体として染色体上のセントロメア DNA 上に形成される。一方、セントロメア領域は、分裂期のみならず間期の核内でも特殊な構造と機能を有すると長く考えられてきたが、解析の困難さから間期のセントロメアの構造に関する知見は乏しい。最近、申請者は、ニワトリ DT40 細胞を用いて、間期核のセントロメアに特異的に相互作用するゲノム領域を検出することに成功した。この成功が本研究課題の端緒となっている。本研究では、高精度ゲノム三次元構造解析手法（4C 法と Hi-C 法）に申請者が独自に開発したタンパク質除去技術オーキシングロン法（AID 法）を組み合わせることにより、脊椎動物の間期の核内におけるセントロメアに特異的なゲノム三次元構造実体を明らかにし、この構造形成に関与する因子群を同定することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、これまで困難であったセントロメアにおけるゲノム解析に挑戦し、間期の細胞核内におけるセントロメア三次元構造を 4C 法を用いて明らかにするとともに、その構築に関わる分子メカニズムを理解する。所属研究室で確立されたネオセントロメア保有細胞を用いて 4C 法によるゲノムワイドな解析を行い、セントロメア領域と非セントロメア領域のプロファイルを比較することでセントロメアゲノムの三次元構造の特徴を把握する。また、すでに確立した高度な細胞同調システムを適用して細胞周期特異的なセントロメア三次元構造の変化を追跡する。次いで、申請者が開発したオーキシングロン法（AID 法）を駆使して、セントロメアタンパク質の除去による影響を詳細に解析することにより、セントロメア構造の構築に必須な因子の同定を行う。これらの一連の解析を通して、セントロメアに特異的なゲノム三次元構造の実体を解明する。

4. 研究成果

真核細胞のセントロメア領域は、エピジェネティックな機構によって規定され、エピジェネティックマーカーの一つとして、セントロメア特異的なヒストン CENP-A が知られている。細胞分裂期には、CENP-A を含むヌクレオソーム上に、多数のキネトコアタンパク質が集合することで巨大なキネトコア複合体が形成される。一方、本研究では、間期においても、キネトコア形成の足場となる CENP-A と Constitutive Centromere Associated Network (CCAN) が既にセントロメアに集合している点に注目している。脊椎動物細胞の間期の核内でセントロメア領域が特殊な三次元構造およびゲノム配置をとっている可能性は古くから指摘されてきた。しかし、多くの脊椎動物の染色体では高度に保存された反復配列がセントロメア領域に存在しているため、間期核のセントロメア領域の実体とそれを構築する分子機構は不明のままであった。

当研究室では、ニワトリ DT40 細胞を用いて、人為的なセントロメア除去により、新たな位置にセントロメア（ネオセントロメア）を形成させる技術を確認している（Shang et al., *Dev Cell*, 2013）。申請者は、ネオセントロメアには反復配列がないことを利用して、この DT40 細胞の間期核を対象としたゲノムワイド解析（4C 法）を行うことで、間期核内のセントロメアに特異的な相互作用部位の同定に成功した。（Nishimura et al., *J Cell Biol*, 2018）。その結果、(1) セントロメア領域は特定のヘテロクロマチン領域と相互作用していること、(2) 異なった染色体のセントロメア同士での相互作用があるという 2 つの特徴を見出すことができた（図 1）。

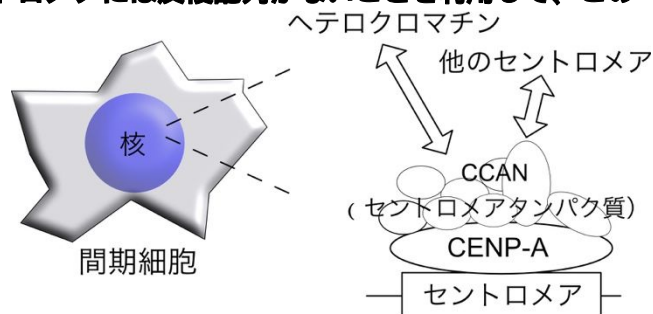


図 1. セントロメアの核内構造のモデル

間期核セントロメアの知見を乏しくしているもう一つの要因が、研究手法にある。本研究目的の達成のためには、セントロメアを構成する個々のタンパク質のノックアウト細胞の樹立が有効であるが、これらのタンパク質の多くは必須因子であるため、単純なノックアウト細胞の樹立は期待できない。申請者は、以前、タンパク質を速やかにかつ条件的に分解する技術（AID 法と命名）を開発した（Nishimura et al., *Nature Methods*, 2009）。AID 法は、標的タンパク質の短時間での分解・除去が可能であることから、セントロメアタンパク質の条件的ノックダウンには最適な系である。申請者は、ニワトリ DT40 細胞の AID ノックダウン株を、CRISPR/Cas9 法を応用して簡便に作製する方法を既に構築している（Nishimura and Fukagawa, *Chromosome Res*, 2017）。本研究では、セントロメア因子 CENP-C あるいは CENP-H の AID ノックダウン株を作成し、それぞれの因子を細胞内からノックダウンした際に、セントロメアの持つ閥内構造がどのように変化するかを 4C 法を用いて解析した。すると、CENP-H をノックダウンした時のみ、間期核内のセントロメアとヘテロクロマチン領域との結合が低下することが明らかとなった（Nishimura et al., *J Cell Biol*, 2018）（図 2）。この成果は、AID 法と 4C 解析の組み合わせが有効であることを証明するとともに、セントロメアの核内構造を構築する上で CENP-H が大きな役割を果たしていることを強く示唆する結果となっている。今後は Hi-C などを含めより巨視的な視野からセントロメアの構造を解析するとともに閥内構造構築においてセントロメアが果たす役割についても、解析を進めていく予定である。

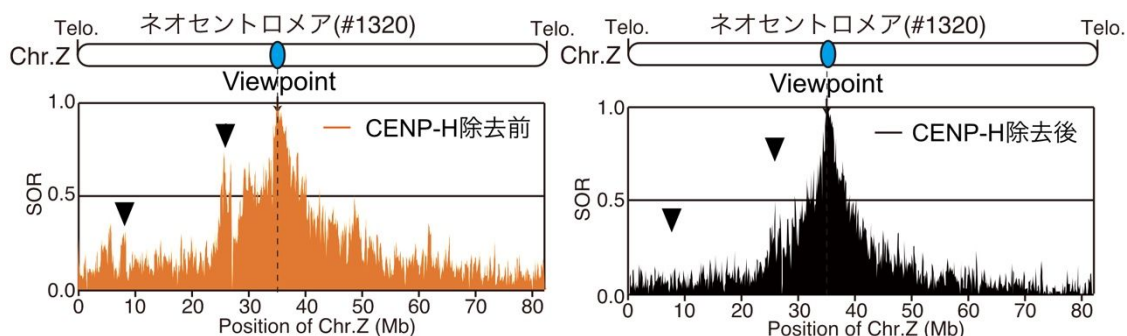


図 2. セントロメアタンパク質 CENP-H を AID 法によりノックダウンした際の 4C 解析結果
CENP-H のノックダウンによりセントロメアと矢印部位の相互作用が顕著に減少している（右）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

3D genomic architecture reveals that neocentromeres associate with heterochromatin regions.
Nishimura K, Hori T, Komiya M, Itoh T, Fukagawa T
The Journal of cell biology 218(1) 134-149 2019 年 1 月, 査読有

〔学会発表〕（計 5 件）

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
西村浩平
第 36 回 染色体ワークショップ 2019 年 1 月 24 日 宝塚

3D structural analysis of neo-centromere region in vertebrate cells.
Kohei Nishimura, Tetsuya Hori, Masataka Komiya, Takehiko Itoh and Tatsuo Fukagawa
ASCB/EMBO 2018 meeting, San Diego 2018 年 12 月 11 日

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
西村浩平, 堀哲也, 古宮正隆, 伊藤武彦, 深川竜郎
日本分子生物学会年会プログラム・要旨集(Web) 41st ROMBUNNO.1P 0213 (WEB ONLY) 2018 年 横浜

ネオセントロメアの解析より明らかになったセントロメア領域のゲノム 3D 構造実態
西村浩平, 堀哲也, 古宮正隆, 伊藤武彦, 深川竜郎
生命科学系学会合同年次学会 (第 40 回 日本分子生物学会年会) 2017 年 12 月 9 日 神戸

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
古宮正隆, 西村浩平, 堀哲也, 深川竜郎, 伊藤武彦
生命科学系学会合同年次学会 (第 40 回 日本分子生物学会年会) 2017 年 12 月 9 日 神戸