

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06084

研究課題名（和文）紡錘体微小管と染色体を連結する分子構造基盤の解明

研究課題名（英文）Structural basis for molecular architecture linking chromatin and spindle microtubule

研究代表者

有吉 真理子 (Ariyoshi, Mariko)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：80437243

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）：染色体分配は、セントロメアと呼ばれる特殊な染色体領域と、その領域に形成されるキネトコア（動原体）と呼ばれる多数のタンパク質からなる超分子構造体によって制御されている。CENP-CとCENP-Tは、分裂期におけるキネトコア形成の鍵を握るキネトコアタンパク質である。本研究では、CENP-CとCENP-Tが担う重要な分子間相互作用に着目し、クライオ電顕単粒子解析およびX線結晶構造解析法を用いて、そのインターフェースの立体構造を決定し、それらのリン酸化修飾によるスイッチング機構を明らかにした。可塑的なキネトコア形成とその機能的な意義を理解する上で重要な構造知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分裂時の染色体分配は遺伝情報の維持・継承を担う細胞機能である。染色体分配異常は、ゲノムの不安定化や細胞周期停止を引き起こし、細胞のがん化等、生物の生命活動に致命的な影響を与える。本研究では、主に構造生物学の手法を用いて、染色体分配を担う複雑なタンパク質複合体であるキネトコアの重要な分子会合面の原子レベルでの構造知見を得た。可塑的なキネトコア形成とその機能的な意義を理解するために、細胞周期と連動したリン酸化修飾がどのようにしてキネトコアタンパク質の会合を制御しているのか、その実体を原子レベルで明らかにした。得られた研究成果から、新規のキネトコア形成制御機構のモデルを提唱した。

研究成果の概要（英文）：Centromere is a genome region for equal chromosome segregation. The primary function of centromere is providing a platform for assembly of the super-protein complex, kinetochore during mitotic progression. CENP-C and CENP-T are kinetochore components linking between centromere and microtubules. In this research, the structure of the molecular interaction surface mediated by CENP-C or CENP-T, which is a key to kinetochore formation, was determined at atomic resolution using cryo-EM single particle analysis and X-ray crystallography. Our structural data have revealed the novel switching mechanism of the molecular interaction mode of CENP-C or CENP-T via cell cycle dependent phosphorylation. Our structural data provide new insights into the dynamic regulation of kinetochore formation tightly coupled with cell cycle.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体分配 セントロメア キネトコア CENP-A クライオ電顕 タンパク質複合体 X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

DNA 配列にコードされた遺伝情報は、染色体として核内に格納されており、細胞周期を経て次世代へと引き継がれる。細胞分裂の際、親細胞の染色体は正確に複製、倍加され、それぞれが娘細胞へ均等に分配される。この染色体分配を制御するのは、セントロメアと呼ばれる特殊な染色体領域と、その領域に形成されるキネトコア（動原体）と呼ばれる多数のタンパク質からなる超分子構造体である(図 1)。細胞分裂期において、姉妹染色体は両方の極から延びた紡錘体微小管にとらえられて、分離され、娘細胞へと運ばれる。この際、染色体と紡錘体微小管を連結する役割を果たすのがセントロメア上に形成されるキネトコアである。セントロメア/キネトコアの機能異常は、ゲノムの不安定化や細胞周期停止を引き起こし、生物の生命活動に致命的な影響を与える。

染色体分配におけるキネトコアを介した染色体と紡錘体微小管の連結は、細胞周期と厳密に同調しておこる。従って、染色体分配の分子機構を理解するためには、セントロメア/キネトコアを構成する多様なタンパク質がどのようにネットワークを形成し、細胞周期のタイミングを見極め、協調的に機能しているのかを理解することが不可欠である。研究開始当初、キネトコアのコアを形成するタンパク質因子の立体構造解析が進み、タンパク質の立体構造という観点からも、それぞれの機能ドメインの役割や分子間相互作用に関する理解が深まりつつあった (Pesenti et al., *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 2016)。しかしながら、それら知見の多くは、キネトコアのある一面の断片的な構造情報にとどまっていた。一方で、様々な細胞生物学的な知見と照らし合わせると、キネトコアには、動的な現象である染色体分配を制御するための複雑な構造可塑性が存在すると考えられる。すなわち、キネトコア構造を動的に制御する可塑的なタンパク質ネットワークがあると考えられるが、このような観点からの構造機能解析データは限られていた。申請者の所属研究室では、遺伝子

改変実験に有利なニワトリの DT40 細胞を用いて、キネトコアタンパク質の細胞内での機能解析を精力的に行っており、細胞周期と連動したリン酸化修飾によるキネトコアにおける分子会合制御の重要性を示唆する新規の知見が集積していた。このような独自の知見を踏まえ、可塑的なキネトコア形成とその機能的な意義を理解する上で、リン酸化修飾がどのようにしてキネトコアタンパク質間の相互作用を制御しているのか、その実

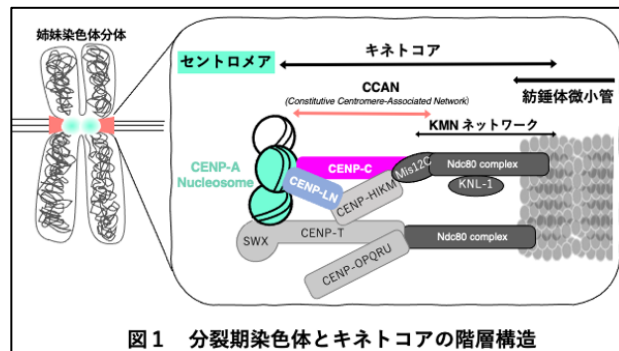


図 1 分裂期染色体とキネトコアの階層構造

体を原子レベルで明らかにすることが重要であると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

染色体分配を担うキネトコアは、2つの階層構造を持つ(図 1)。第一に、細胞周期を通して、常にセントロメア領域に会合している構成的セントロメア局在ネットワークタンパク質群 (CCAN) がキネトコアの足場を形成する [インナーキネトコア領域]。細胞分裂時には、その外側に、紡錘体微小管との直接結合する KMN ネットワークとよばれるタンパク質構造体が形成される [アウターキネトコア領域]。セントロメアとインナーキネトコア、そして、インナーキネトコアとアウターキネトコアの間の分子間相互作用が、染色体と紡錘体微小管という空間的に離れた作用点の状態変化を双方向に伝達するためのタンパク質ネットワークの要になる。しかし、その実体については不明な点が多く残されている。

CENP-C と CENP-T は、分裂期におけるキネトコア形成の鍵を握る CCAN タンパク質である。CENP-C は、セントロメア染色体に特異的なヒストン H3 のバリエーションである CENP-A を認識する。さらに、KMN ネットワークの構成因子である Mis12 複合体との直接の結合を介して、紡錘体微小管と結合する Ndc80 複合体をセントロメアにリクルートし、セントロメアと紡錘体微小管を橋渡しする。一方、CENP-T は、セントロメア領域の DNA に結合、それ自身のリン酸化状態に依存して、Ndc80 複合体に直接結合し、セントロメアと紡錘体微小管を連結する。すなわち、キネトコアには2つの染色体-紡錘体微小管連結経路 [CENP-C 経路と CENP-T 経路]が存在することを申請者の所属研究室では明らかにしていた(Hori et al., J. Cell Biol., 2013) (図 1)。CENP-C 経路を重視した機能解析が世界的には先行しているが、生体内においてこれら2つの経路が独立に機能しているのか、細胞内環境に応じて使い分ける制御機構があるのかなど、未だ不明な点が多い。本研究では、CENP-C 経路と CENP-T 経路における重要な分子間相互作用に着目し、構造生物学の視点から、それらのリン酸化修飾によるスイッチング機構を明らかにすることを目的とした。そのために、①分裂期特異的リン酸化による CENP-C のセントロメアへの結合制御 ② CENP-C 経路/CENP-T 経路における Ndc80 複合体インターフェースのリン酸化による調節、これら2つの項目について分子基盤研究を行なった。

3. 研究の方法

項目① 分裂期特異的リン酸化による CENP-C のセントロメアへの結合制御

所属研究室で行われたニワトリ DT40 細胞を用いた機能解析の結果から、CENP-C が分裂期特異的にリン酸化されること、また、そのリン酸化がセントロメアにおける CENP-A を含むヌクレオソーム (CENP-A ヌクレオソーム) との結合に必要なことがわかっていった。さらに、先行研究の結果から、同じく CCAN 因子の一つである CENP-N (図 1)が、CENP-C と同様に CENP-A ヌクレオソームに特異的に結合することが示されており、これら2つの CENP-A 結合因子が同時に CENP-A ヌクレオソームに結合できるというモデルが提唱されていた。

本研究項目では、ニワトリ由来の

CENP-A を含むヌクレオソームを *in vitro* で再構成し、生化学および構造生物学の手法を用いて、CENP-C の CENP-A ヌクレオソーム結合様式を解析した。CENP-C は、N 末領域に Mis12 複合体や他の CCAN 因子との結合部位を、C 末領域に CENP-A との

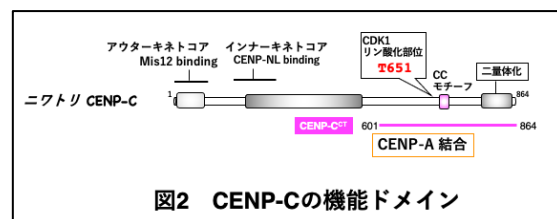


図2 CENP-Cの機能ドメイン

結合に必要な CENP-C モチーフ(CC モチーフ)および2量体化ドメインを有する (図 2)。さらに、所属研究室では CC モチーフの近傍にある Thr651 が分裂期特異的にリン酸化されることを独自に見出していた。ニワトリ DT40 細胞において、CENP-C の C 末領域 (CENP-C^{CT}: aa 601 - 864) のみで分裂期特異的なセントロメアへの局在が観察されていたので、この領域を用いて CENP-A ヌクレオソームとの結合を解析した。第一に、MBP (maltose binding protein) 融合 CENP-C^{CT} を組換えタンパク質として大腸菌内で発現、精製し、ヒトデの卵抽出液から精製した CDK1 を用いて、*in vitro* でリン酸化する系を確立した。得られた試料を用いて、CENP-A ヌクレオソームとの生化学的な結合実験を行った。リン酸化 CENP-C^{CT} と CENP-A ヌクレオソームの安定な複合体形成が確認されたので、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて、CENP-C^{CT}/CENP-A ヌクレオソーム複合体を精製、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM)による単粒子構造解析を行なった。さらに、CENP-N 存在下における CENP-C の CENP-A ヌクレオソームの結合を検証するために、CENP-N の CENP-A 結合領域を組換えタンパク質として精製し、CENP-C^{CT}/CENP-N/ CENP-A ヌクレオソーム複合体の Cryo-EM 単粒子解析を行った。

項目② CENP-C 経路/CENP-T 経路における Ndc80 複合体相互作用面のリン酸化による調節

アウトキネトコアの一部である Ndc80 複合体は、Ndc80、Nuf2、Spc24、Spc25 の 4 つのタンパク質から構成され、ダンベル型の構造を持ち、片側にインナーキネトコアとの会合ドメイン(Spc24/25)、反対側に紡錘体微小管との会合部位 (Ndc80/Nuf2)が存在する。一方、CENP-T は、その N 末端領域に約 20 アミノ酸残基からなる Ndc80 複合体結合モチーフを持っている(図 3)。これまでに CENP-T の Ndc80 結合モチーフと Ndc80 複合体のインナーキネトコア会合ドメインの結晶構造解析から、Ndc80 結合モチーフの細胞周期依存的リン酸化 (Cdk1 によるリン酸化) が Ndc80 複合体との結合に必須であることがわかっていた(Nishino *et al.*, *EMBO J.*, 2013)。また、Mis12 複合体の中にも CENP-T の Ndc80 結合モチーフに類似した配列が存在し、我々は、この領域も Cdk1 によってリン酸化されることを見いだしていた。このような実験結果に基づいて、Cdk1 のリン酸化によって、CENP-T 及び CENP-C/Mis12 複合体の Ndc80 複合体への結合が排他的に制御されるという、CENP-C 経路と CENP-T 経路の制御機構に関する新しい機能モデルが考えられた (図 3)。本項目では、このモデルを検証するため、蛍光偏光解消法を用いて、CENP-T および Mis12 複合体の Ndc80 複合体への結合を定量的に解析し、リン酸化の影響を検証した。実際の解析には、CENP-T および Mis12 複合体中のそれぞれの Ndc80 結合モチーフのみを含む合成ペプチドと Ndc80 複合体のインナーキネトコア会合ドメインである Spc24/25 のみを用いた。同様の試料を用いて、CENP-T と Spc24/25、Mi12 ペプチドと Spc24/25 複合体の共結晶化を行った。得られた結晶を用いて、複合体の結晶構造解析を行った。

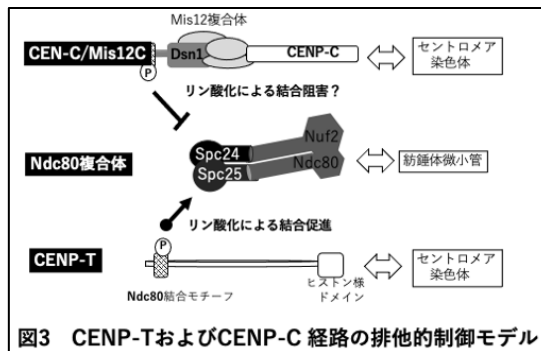


図3 CENP-TおよびCENP-C 経路の排他的制御モデル

図3) これまでに CENP-T の Ndc80 結合モチーフと Ndc80 複合体のインナーキネトコア会合ドメインの結晶構造解析から、Ndc80 結合モチーフの細胞周期依存的リン酸化 (Cdk1 によるリン酸化) が Ndc80 複合体との結合に必須であることがわかっていた(Nishino *et al.*, *EMBO J.*, 2013)。また、Mis12 複合体の中にも CENP-T の Ndc80 結合モチーフに類似した配列が存在し、我々は、この領域も Cdk1 によってリン酸化されることを見いだしていた。このような実験結果に基づいて、Cdk1 のリン酸化によって、CENP-T 及び CENP-C/Mis12 複合体の Ndc80 複合体への結合が排他的に制御されるという、CENP-C 経路と CENP-T 経路の制御機構に関する新しい機能モデルが考えられた (図 3)。本項目では、このモデルを検証するため、蛍光偏光解消法を用いて、CENP-T および Mis12 複合体の Ndc80 複合体への結合を定量的に解析し、リン酸化の影響を検証した。実際の解析には、CENP-T および Mis12 複合体中のそれぞれの Ndc80 結合モチーフのみを含む合成ペプチドと Ndc80 複合体のインナーキネトコア会合ドメインである Spc24/25 のみを用いた。同様の試料を用いて、CENP-T と Spc24/25、Mi12 ペプチドと Spc24/25 複合体の共結晶化を行った。得られた結晶を用いて、複合体の結晶構造解析を行った。

4. 研究成果

項目① 分裂期特異的リン酸化による CENP-C のセントロメアへの結合制御

1) リン酸化による CENP-C /CNEP-A ヌクレオソーム相互作用制御の構造基盤

リン酸化 CENP-C/CNEP-A ヌクレオソーム複合体の Cryo-EM 構造を 4.5 Å 分解能で決定した (図 4)。これまで CENP-C の CC モチーフが CENP-A ヌクレオソームの結合領域として同定されており、それ以外の領域は一定の構造を持たないと考えられていた。しかしながら、今回、得られたリン酸化 CENP-C/CNEP-A ヌクレオソーム複合体の Cryo-EM 構造から、CENP-A ヌクレオソームの結合に伴って、CENP-C の CC モチーフの上流側、下流側も含む領域 (aa 619-690) が一定の構造をとり、より安定な複合体形成に寄与することが新たにわかった。さらに興味深いことに、この CENP-A 結合型の CENP-C の構造は、Thr651 のリン酸化によって形成される分子内相互作用および CENP-C/ヒストン H2A 間の相互作用によって安定化されている様子が原子レベルで明らかになった。このような原子レベルでの構造知見は、染色体分配不全が原因で生じるがんに対するドラッグデザイン等に踏み込んだ研究の可能性につながる。

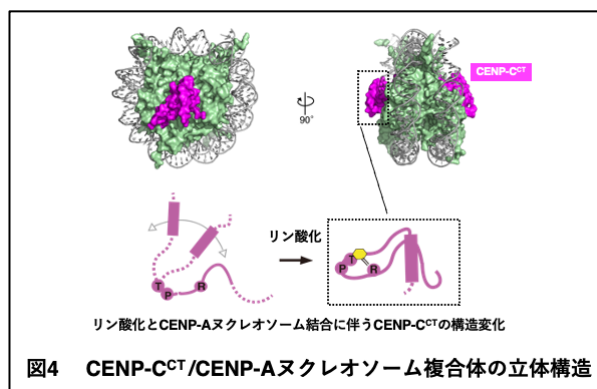
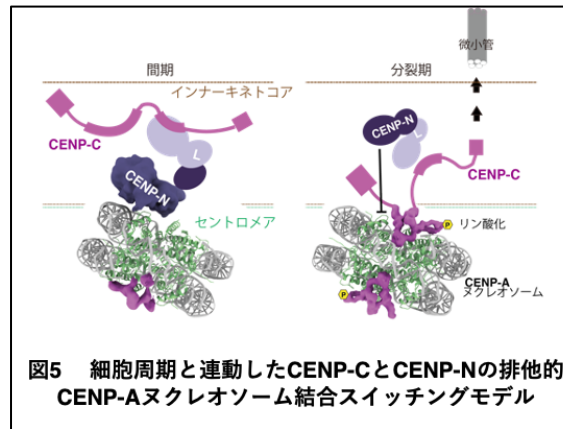


図4 CENP-C^{CT}/CENP-Aヌクレオソーム複合体の立体構造

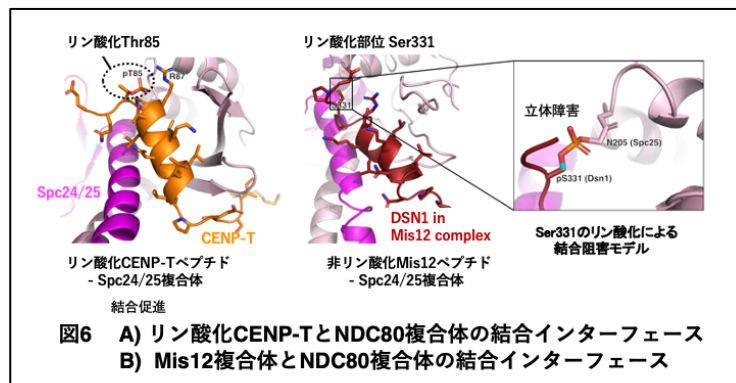
2) CENP-C と CENP-N の排他的な CENP-A スクレオソーム結合制御

CCAN には CENP-C と CENP-N、2つの CENP-A 結合因子が存在し、同時に CENP-A スクレオソームに結合するというモデルが提唱されていた。しかし、今回、CENP-C^{CT}/CENP-N/CENP-A スクレオソーム複合体および CENP-C CC モチーフペプチド/CENP-N/CENP-A スクレオソーム複合体の Cryo-EM の解析結果と生化学的な解析結果から、リン酸化 CENP-C の存在下では、CENP-N が CENP-A スクレオソームに結合できなくなることを示した。CENP-C のリン酸化は、細胞分裂期特異的に起こるため、細胞分裂期になると CENP-N が CENP-A スクレオソームから排除されという新規の機能モデルが示唆された(図 5)。この知見は、細胞周期と連動したキネトコア構造的に制御機構の一端を明らかにしたものであり、動的なキネトコア制御を対象としたさらなる研究の必要性を示している。



項目② CENP-C 経路/CENP-T 経路における Ndc80 複合体相互作用面のリン酸化による調節

蛍光変更解消法を用いて、Mis12 複合体および CENP-T の Ndc80 結合モチーフを含むペプチド(Mis12 ペプチド, CENP-T ペプチド)と Spc24/25 の結合実験を行った。Mis12 ペプチドと CENP-T ペプチドは類似のアミノ酸配列を持ち、CDK1 リン酸化酵素の標的部位 (CENP-T の Thr85, Mis12 複合体中の DSN1



の Ser331, 図 3)も保存されているにもかかわらず、CENP-T ペプチドの SPC24/25 への結合はリン酸化によって強められるのに対して、Mis12 ペプチドの結合はリン酸化によって阻害されることが示された。このリン酸化の影響の違いがどのようにもたらされるのか調べるために、i) リン酸化 CENP-T ペプチド-SPC24/25 複合体、および ii) 非リン酸化 Mis12 ペプチド-Spc24/25 複合体の結晶構造を 2.5 Å 分解能で決定した。リン酸化 CENP-T ペプチド-SPC24/25 複合体 (i) においては、リン酸化されたスレオニン側鎖が Spc24/25 との結合に直接関与していること、Spc24/25 結合型の CENP-T の構造を安定化している様子が明らかとなった。非リン酸化 Mis12 ペプチド-Spc24/25 複合体(ii)の結晶構造を見てみると、アミノ酸の類似性から予測された通り、CENP-T ペプチドと同じ Spc24/25 の分子表面に結合していた。しかしながら、リン酸化されるスレオニン残基の位置が 4 Å ほどシフトしていた。得られた非リン酸化 Mis12 ペプチドの構造に基づいて、CDK 1 によるリン酸化部位 Thr85 にリン酸基を付加したモデルを構築してみると、Mis12 ペプチドと Spc24/25 の結合表面を不安定化することが示唆された。CDK1 が分裂期特異的なリン酸化酵素であるため、分裂期では CENP-T を介した染色体-紡錘体微小管連結経路がより安定化され、CENP-C 経路は不安定化されると考えられる。細胞周期の進行に伴い、インナーキネトコアとアウターキネトコアの会合モードがダイナミックに制御されていることが示唆された。今後、得られた構造情報に基づき、このような結合モードのスイッチングの機能的な意義を培養細胞を用いた変異体解析や遺伝学的アプローチで検証していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe R, Hara M, Okumura EI, Herv S, Fachinetti D, Ariyoshi M, Fukagawa T	4. 巻 218
2. 論文標題 CDK1-mediated CENP-C phosphorylation modulates CENP-A binding and mitotic	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 4042-4062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.201907006.	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 Hara M, Ariyoshi M, Okumura EI, Hori T, Fukagawa T.	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 Nat Cell Biol	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 Ariyoshi Mariko, Makino Fumiaki, Watanabe Reito, Nakagawa Reiko, Kato Takayuki, Namba Keiichi, Arimura Yasuhiro, Fujita Risa, Kurumizaka Hitoshi, Okumura Ei ichi, Hara Masatoshi, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 40
2. 論文標題 Cryo EM structure of the CENP A nucleosome in complex with phosphorylated CENP C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e105671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020105671	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有吉真理子、佐野智基、原昌稔、深川竜郎
2. 発表標題 セントロメアタンパク質CENP-CのC-末端領域の構造機能解析
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 M. Ariyoshi
2. 発表標題 Molecular dissection of CENP-A recognition by CENP-C
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有吉真理子、牧野文昭、深川竜郎
2. 発表標題 CENP-Aヌクレオソーム-CENP-C タンパク質複合体から見えてきた染色体分配を支えるキネトコア複合体の動的制御
3. 学会等名 第39回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 M. Ariyoshi, F. Makino, R. Watanabe, M. Hara, T. Fukagawa
2. 発表標題 Structural basis for switching of binding modes of kinetochore proteins, CENP-C and CENP-N to the CENP-A nucleosome
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

定説を覆す！ 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/>

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

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