

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03236

研究課題名（和文）ゲノム分配を保障するセントロメアクロマチン構造の構築・変換メカニズム

研究課題名（英文）Establishment and dynamics of the centromere chromatin, which ensure the faithful genome inheritance

研究代表者

堀 哲也（Hori, Tetsuya）

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：70550078

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：染色体分配に必須なCENP-Aのアミノ酸残基を同定し、このアミノ酸残基がCENP-AシャペロンHJURPとの正しい結合に必要であることを明らかにした。また、CENP-A導入に機能するKNL2のセントロメアへの局在に必須なアミノ酸残基を構造生物学的に明らかにした。さらに、染色体への異所局在化実験から、CENP-CとHJURPの結合に依存したCENP-A導入の仕組みが存在する可能性を示した。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 found a critical CENP-A residue essential for faithful chromosome segregation. Moreover, we demonstrated that this residue was required for the proper complex formation with the CENP-A specific chaperon HJURP. Based on the structural analyses, we identified several contact sites of KNL2 to make a complex with CENP-A nucleosome, which was essential for the KNL2 localization and function. Furthermore, the artificial ectopic tethering assays indicated the additional CENP-A loading pathway depending on the CENP-C interaction with HJURP. These findings may provide insight into developing an anti-cancer drug utilizing centromeric chromatin modulation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：セントロメア クロマチン エピジェネティクス 細胞周期

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命活動の根源である遺伝子の発現は、全ゲノム DNA が収納されている核内のクロマチン構造により高度に組織化された仕組みで制御されている。この高次機能を次世代細胞へ正確に伝達することは生命活動の維持・継承に必須な過程である。この過程は、ゲノムの高次機能を収納した「染色体」の正確な複製と分配によって保障される。動原体は染色体の分配過程において重要な役割を担う巨大なタンパク質複合体であり、染色体上の一箇所に規定されたセントロメアと呼ばれる領域に形成される。これまでの研究代表者らの研究により、動原体を構成する主要なタンパク質構成因子のうち2種の因子 (CENP-T, CENP-C) が DNA と微小管の双方に直接結合する活性を持つことが明らかとなった。これら因子が、セントロメア DNA と微小管を橋渡しして、染色体分配の中心として機能している。しかし、これら2種の因子とともに、微小管の牽引力に耐えうるクロマチンの構造が細胞内でどのように構築されているかについては、不明な点が多い。また、正確な染色体分配を保障するためには、動原体が形成されるセントロメア領域の場所は安定に保たれる必要がある。この特殊領域は DNA の配列情報に依存しないエピジェネティックな仕組みによって規定される。その主要なマーカーである CENP-A がセントロメア領域へ導入される時、セントロメア領域のクロマチンがどのように準備され、新規の CENP-A が導入されるのか、その詳細な制御の仕組みは不明である。M 期における染色体分配とその直後の G1 期に行われるセントロメアの位置情報の伝達の2過程は、セントロメアの機能とその維持に関わる本質的な過程であり、その2過程を正しく遂行するための基盤となるクロマチン構造の解明は、セントロメア機能の制御の仕組みを理解するための重要な課題である。

2. 研究の目的

ゲノム情報の伝達に必須な染色体分配を司るセントロメア機能とその機能維持に関わるセントロメア領域のクロマチン構造には不明な点が多い。本研究では、細胞周期の進行におけるセントロメアクロマチンの構造の違いとその構築の仕組みを解析し、これまで未知だった細胞周期に依存したセントロメアクロマチン構造の形成と制御の実体を明らかにすることを目指す。本研究から、これまで未解明であった細胞周期特有なセントロメアクロマチン構造とその生物学的な意義が明らかとなる。

3. 研究の方法

セントロメア機能を保障するために必須なクロマチン構造の実体およびその構築の仕組みを明らかにするため、主にニワトリ DT40 細胞を利用し研究を進めた。具体的には、薬剤を利用した細胞周期の同調法により、セントロメアのクロマチン構造が更新される G1 期を中心に、SNAP アッセイ法を適用し、各種セントロメア関連因子の改変細胞を用いてセントロメアマーカー CENP-A が導入される過程と必須な因子について解析した。さらに、DT40 細胞で樹立した LacO-LacI システムによる染色体への異所局在化法を利用し、遺伝学および細胞生物学的手法によ

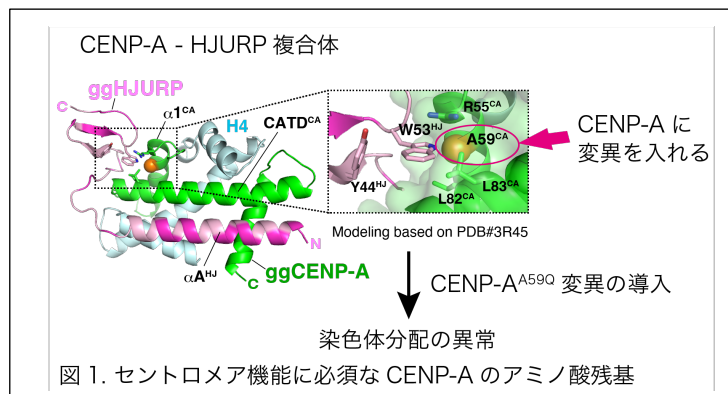
り CENP-A の導入活性を持つ因子とその導入の仕組みについて解析を行った。また、Capture-C 法により、各種クロマチン関連因子の変異細胞株を使用して、細胞核内におけるセントロメア周辺のクロマチンの3次元構造を比較解析した。

4. 研究成果

ニワトリ DT40 細胞を用いた網羅的な変異体解析を行い、染色体分配に必須な CENP-A のアミノ酸残基を同定した。このアミノ酸残基は、CENP-A シャペロン HJURP との正しい結合に必須であることが分かった (1, *Cell Rep.*, 2020)。また、CENP-A の導入に重要なライセンス因子 KNL2 について、セントロメアへの局在化に必須なアミノ酸残基を構造生物学的に明らかにした (2, *EMBO J.*, 2023)。さらに、LacO-LacI システムによる異所局在化実験により、CENP-A の導入過程で機能する因子について解析し、KNL2 に依存しない CENP-A 導入の仕組みが存在する可能性を示した(3)。エジンバラ大学との共同研究により、セントロメア周辺のクロマチンの3次元構造を解析し、細胞周期の間期から M 期にかけて生じる特有な構造の形成と変換と、その過程に関与するクロマチン因子について明らかにした(4)。

(1) セントロメア機能に必須な CENP-A のアミノ酸残基の同定

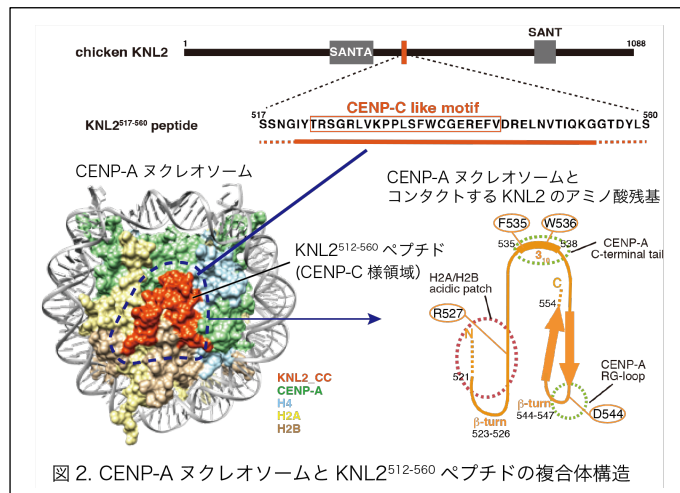
セントロメアの位置決定で鍵を握る CENP-A を対象として、ニワトリ細胞を利用した網羅的な変異体解析を行った。その結果、CENP-A の 59 番目のアラニン(A59) が、染色体分配に必須なアミノ酸であることを発見した



(図 1)。この A59 に相当するアミノ酸は、ヒトを含む他の脊椎動物の CNEP-A にも広く存在し、進化的にも重要なアミノ酸であることが強く示唆された。さらに、CENP-A と結合して機能を補助するシャペロンタンパク質 HJURP 内に、生物種によって数が異なる特有なアルギニン残基が存在し、前述の A59 との協調作用によって CENP-A と HJURP との結合の強さが変動することが分かった。この結果は、生物種で異なる CENP-A の機能調節の可能性を示唆する知見である。CENP-A は抗がん剤の重要なターゲットであり、本研究で発見した必須アミノ酸残基を中心とした分子レベルの理解が進むことで、染色体分配の異常で発症する「がん」や染色体疾患の治療に向けた創薬開発の促進が期待される。上記成果について、1 報の論文発表を行い (*Cell Rep.*, 2020)、3 件の学会発表を行った。

(2) KNL2 タンパク質複合体のセントロメア局在化の仕組み

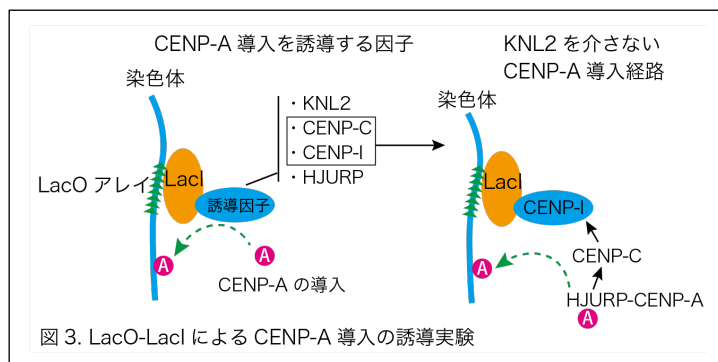
KNL2 タンパク質は既存の CENP-A ヌクレオソームと結合することでセントロメアに局在する。そして、セントロメアに局在した KNL2 を含む複合体は新規の CENP-A の導入を促す装置として機能する。そのため、KNL2 が既存の CENP-A ヌクレオソームと結合する仕組みの解明は、セントロメアクロマチンの構築を理解する



ための重要な課題である。そこで、KNL2 の部分ペプチドと再構成 CENP-A ヌクレオソームを試験管内で結合させ、形成した複合体をクライオ電子顕微鏡による構造解析に供した。その結果、KNL2 の CENP-C 様領域内に CENP-A ヌクレオソームとの結合に必須な複数のアミノ酸残基が存在することが分かった (図 2)。細胞生物学的な解析から、いずれのアミノ酸残基も KNL2 のセントロメアへの局在化および機能に必須であることが明らかとなった。今後、KNL2 のセントロメアへの局在化とともに、本研究の過程で示唆された「KNL2 タンパク質が担うセントロメアクロマチンの構築過程における機能」の解明を中心に研究を進める計画である。上記成果について、1 報の論文発表を行った (*EMBO J.*, 2023)。

(3) セントロメアのエピジェネティックマークを導入する仕組み

これまでセントロメアのエピジェネティックマークである CENP-A の導入は、KNL2 を介した経路で行われると考えられていた。また、LacO-LacI システムによる染色体上への異所局在化実験により、CENP-A の導入を誘



導する活性を持つ因子が、ニワトリ細胞では少なくとも 4 種存在することが分かっていた。そこで、LacO-LacI システムによる異所局在化実験と遺伝学的手法を利用し、これら因子が CENP-A の導入を誘導する仕組みを解析した (図 3)。その結果、この内の 2 種の因子 CENP-C、-I は、既知の KNL2 を介した経路に依存せず、CENP-A の導入を誘導することが明らかとなった。さらに、遺伝学的な解析と生化学的な解析を行ったところ、この 2 種の因子による CENP-A の導入は、CENP-C に依存した HJURP (CENP-A のシャペロンタンパク質) のクロマチンへのリクルートにより生じていることが分かった (図 3)。今後、CENP-C と HJURP の相互作用の仕組みについて解析を進めると共に、CENP-C を起点とした CENP-A の導入の仕組みが、通常のセントロメアクロマチン上でも同様に機能しているのか、について研究を進める計画である。上記成果につ

いて、5件の学会発表を行い、論文投稿に向けて準備中である。

(4) 細胞周期進行に伴い変化するセントロメア周辺のクロマチン構造の解析

エジンバラ大学との共同研究により、動原体の構築に関与するセントロメアコアとその周辺のペリセントロメアを対象に、Capture-C法を適用して細胞核内のクロマチンの3次元構造の解析を行った。特に、細胞周期の間期からM期にかけての特有な構造の形成と変換について、さらにその過程に関与するクロマチン因子の機能について、細胞遺伝学的手法を組み合わせ解析を行った。その結果、セントロメアコアのクロマチンは2つのサブドメインで形成され、細胞周期のG2期からM期に移行する過程でサブドメインの形成はより明瞭になることが分かった。このサブドメインの形成の過程に、染色体の凝縮に機能するクロマチン因子であるコンデンシンが関与していること、姉妹染色体の接着に機能するコヒーシンが2つのサブドメイン間の接着にも関与する可能性を示した。上記成果について論文としてまとめ、現在、投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sridhar Shreyas, Hori Tetsuya, Nakagawa Reiko, Fukagawa Tatsuo, Sanyal Kaustuv	4. 巻 12
2. 論文標題 Bridgin connects the outer kinetochore to centromeric chromatin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-20161-9	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 該当する
1. 著者名 Martins Nuno M. C., Cisneros-Soberanis Fernanda, Pesenti Elisa, Kochanova Natalia Y., Shang Wei-Hao, Hori Tetsuya, Nagase Takahiro, Kimura Hiroshi, Larionov Vladimir, Masumoto Hiroshi, Fukagawa Tatsuo, Earnshaw William C.	4. 巻 133
2. 論文標題 H3K9me3 maintenance on a human artificial chromosome is required for segregation but not centromere epigenetic memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs242610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.242610	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 該当する
1. 著者名 Hori Tetsuya, Cao Jinghui, Nishimura Kohei, Ariyoshi Mariko, Arimura Yasuhiro, Kurumizaka Hitoshi, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 33
2. 論文標題 Essentiality of CENP-A Depends on Its Binding Mode to HJURP	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108388	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 堀哲也、深川竜郎	4. 巻 52
2. 論文標題 染色体分配到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 Jiang Honghui, Ariyoshi Mariko, Hori Tetsuya, Watanabe Reito, Makino Fumiaki, Namba Keiichi, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 42
2. 論文標題 The cryo-EM structure of the CENP-A nucleosome in complex with ggKNL2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e111965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022111965	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 堀哲也
2. 発表標題 セントロメアのクロマチン構造とエピジェネティックス
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曹静暉, 堀哲也, 深川竜郎
2. 発表標題 CENP-Iに依存するCENP-A導入経路の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

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 Evolutional diversity of CENP-A essential motif and its binding mode to HJURP
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jinghui Cao、Yasuhiro Arimura、Mariko Ariyoshi、Hitoshi Kurumizaka、Tetsuya Hori、Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 Biochemical analysis of interaction between CENP-A/H4 and HJURP
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀哲也
2. 発表標題 セントロメアのエピジェネティクスと進化
3. 学会等名 日本遺伝学会第92回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荻原望、高橋大輔、堀哲也、深川竜郎、原田昌彦
2. 発表標題 H2A.Zヒストンバリエントアイソフォーム間における酸化ストレス応答遺伝子EGR1転写制御機構の差異の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀哲也、曹静暉、深川竜郎
2. 発表標題 動原体タンパク質に依存したセントロメアの位置情報の書き込みメカニズム
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsuya Hori, Jinghui Cao, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 CCAN-dependent CENP-A assembly mechanism in vertebrate cells
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jinghui Cao, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 Analysis for the CENP-I dependent CENP-A incorporation into centromeres
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>細胞分裂に働く因子の新知見。鍵を握るヒト特有のアミノ酸 https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_results/papers/detail/1010 細胞分裂に働く因子の新知見。鍵を握るヒト特有のアミノ酸 https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2020/20201118_1 世界初！！クリプトコッカス独自の細胞分裂機構を解明 https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_results/papers/detail/1013 深川研究室・研究成果、多数の国内外メディアにて報道 https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/news/detail/689 深川研究室・研究成果からの画像、EMBOジャーナル3月号の表紙に選出 https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/news/detail/702</p>
--

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			
英国	エジンバラ大学			
米国	ハーバード大学			
米国	ロックフェラー大学			