

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K06048

研究課題名（和文）染色体分配を支えるキネトコアにおける動的な分子会合制御の構造基盤

研究課題名（英文）Structural basis for dynamic kinetochore assembly essential for chromosome segregation

研究代表者

有吉 真理子 (Ariyoshi, Mariko)

大阪大学・大学院生命機能研究科・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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：染色体分配は、染色体上のセントロメア領域に形成されるキネトコア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。本研究では、セントロメアという特殊な染色体領域を認識し、キネトコアにおける分子会合の足場となるCENP-Cタンパク質とKNL2タンパク質の構造機能解析を行った。第一に、クライオ電顕を用いた単粒子解析により、細胞周期依存的なニフトリKNL2タンパク質によるCENP-Aヌクレオソーム認識の構造基盤を明らかにし、新しい機能モデルを提唱した。第二に、CENP-Cが自己会合することを見出した。CENP-Cの自己会合がセントロメア構造の維持に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常な染色体分配を維持するためには、セントロメアに限定されたキネトコアの構築（空間的制御）および細胞周期と厳密に同調した染色体と紡錘体微小管の連結（時間的制御）が必要である。従って、染色体分配の分子機構を理解するためには、セントロメアおよび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必要がある。本研究の結果に基づいて提唱したCENP-CとKNL2に関する動的な機能モデルは、このような細胞周期と連動したキネトコア形成の動的制御機構の新しい概念として認められるものである。

研究成果の概要（英文）：Chromosome segregation is regulated by a supramolecular structure consisting of numerous proteins called kinetochores assembled in the centromere region on the chromosome. In this study, structural and functional properties of the CENP-C and KNL2 proteins, which play essential roles as scaffolds for molecular assembly in the functional kinetochore assembly, were investigated using biochemical and structural techniques. Firstly, using single-particle analysis with cryo-electron microscopy, we elucidated the structural basis of CENP-A nucleosome recognition by the cell cycle-dependent chicken KNL2 protein and proposed a new functional model. Secondly, we discovered that CENP-C undergoes high-order self-assembly. We demonstrated that self-assembly of CENP-C is crucial for maintaining centromere structure.

研究分野：構造生物学

キーワード：染色体分配 キネトコア セントロメア タンパク質複合体 ヌクレオソーム クライオ電顕 CENP-A

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂に伴う染色体分配は、遺伝情報の継承と生物の恒常性を担う極めて重要かつ動的な過程である。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。この染色体の均等分配は、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。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(図1)。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。

正常な染色体分配を維持するためには、1)セントロメアに限定されたキネトコアの構築(空間的制御)、2)細胞周期と厳密に同調した染色体と紡錘体微小管の連結(時間的制御)が必要である。従って、染色体分配の分子機構を理解するためには、セントロメアおよび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必要がある。このような細胞周期と連動したキネトコア形成の動的制御機構を理解することは、

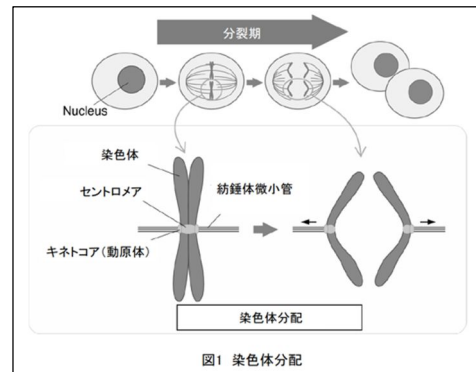


図1 染色体分配

は、染色体生物学における長期的かつ本質的な課題である。また、多くの生物種において、複数のキネトコアユニットがセントロメア上でクラスターを形成する。動的な染色体分配には、頑強性と可塑性を備えた高次のキネトコアのクラスター化が重要であると考えられているが、未だその分子レベルでの理解は不十分である。

このような状況を踏まえて、染色体分配の動的・時間的制御の分子機構を理解するためには、キネトコアの動的な分子会合制御やクラスター形成の構造基盤を明らかにすることが重要であると考えられる。本研究では、キネトコアのプラットフォームタンパク質としての機能を持つ CENP-C と KNL2 に着目し、これらタンパク質の分子認識機構や分子会合状態を原子レベルで可視化することによって、より深化した細胞内での機能解析が可能になると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

染色体分配を制御するクロマチン領域であるセントロメアは、ヒストン H3 バリエントである CENP-A を含むヌクレオソームによって規定される。すなわち、CENP-A ヌクレオソームを標的として、さまざまなキネトコアタンパク質がセントロメア上に会合し、機能的なキネトコアを形成する。セントロメア上に形成されるキネトコアは2つの階層構造を持つ(図2)。

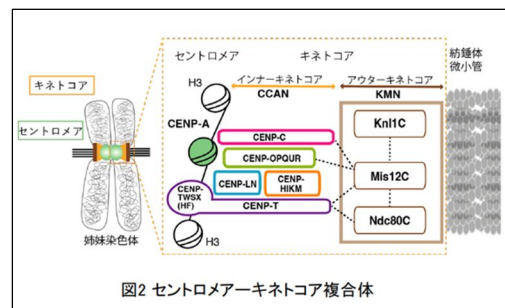


図2 セントロメア-キネトコア複合体

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。細胞分裂時には、その外側に紡錘体微小管と直接結合する KMN ネットワークと呼ばれるタンパク質構造体が形成される。本研究の開始直後、CCAN のコア複合体のクライオ電顕構造が報告され[1,2]、キネトコアの基本構造単位が明らかにされた。しかし、CENP-A ヌクレオソームを直接認識し、CCAN のプラットフォームとして機能するタンパク質、CENP-C

(centromere protein C)については断片的な構造情報を得るにとどまっていた。一方、本研究に先立ち、研究代表者は、CENP-Aヌクレオソームとリン酸化CENP-Cの複合体のクライオ電顕構造を決定していた[3]。この構造機能解析の結果に基づき、分裂期特異的なリン酸化によって、CENP-Cのセントロメア局在モードが制御され、CCANの分子会合状態が変化するという新規のモデルを提起した。さらに、研究代表者らが行ったニワトリDT40細胞を用いた先行研究から、CENP-CのCENP-A結合モチーフと類似の配列を有するKNL2(kinetochore null2)が間期特異的にCENP-Aヌクレオソームを認識することがわかっていた[4]。このような独自の知見に基づき、CENP-CとKNL2のCENP-Aヌクレオソームへの結合が相互排他的に細胞周期と連動して切り替わって、CCANの分子会合状態を制御しているのではないかと、という仮説を立てた。すでにCENP-CとCENP-Aヌクレオソームの複合体の構造知見は得られていたので[3]、この仮説の検証の第1歩として、構造生物学と細胞生物学的な手法を用いて、KNL2のCENP-Aヌクレオソーム認識の分子基盤研究を行った(項目1)。

一方、CENP-CはCENP-Aヌクレオソーム結合モチーフを含め、複数の機能ドメインを有する(図2)。これまでに研究代表者らはワトリCNEP-Cの変異体解析を行い、CENP-CのC-末端領域に存在するCupinドメインの機能的な重要性が示唆するデータを得ていた。このドメインを介した2量体化がCCANもしくはキネトコアのクラスター形成に関与しているのではないかと推測されたが、その実態は不明であった。このCENP-C Cupinドメインの機能的役割を理解するため、その構造機能解析を行った(項目2)。

3. 研究の方法

項目1 KNL2によるCENP-Aヌクレオソーム認識の分子基盤研究

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、ニワトリ由来KNL2のCENP-Aヌクレオソーム結合様式を解析した。KNL2はCENP-A取り込みを担うシャペロンをセントロメア上に呼び込んでくるMis18複合体の構成因子の一つであり、N末端領域にMis18複合体形成領域を持つ。さらに、進化的に保存されたSANTドメインとSANTAドメインに加えて、CENP-CのCENP-A結合領域であるCCモチーフと類似のモチーフ(CC-likeモチーフ)を有する。DT40細胞を用いた細胞内局在解析の結果などから、KNL2のセントロメア局在にはCC-likeモチーフが必要であることがわかっていた。そこで、このモチーフを含むKNL2フラグメントを組換えタンパク質として大腸菌内で発現、精製し、CENP-Aヌクレオソームとの結合実験を行った。CENP-Aヌクレオソームと安定に結合する最小領域を同定し、KNL2-CENP-Aヌクレオソーム複合体を精製し、クライオ電子顕微鏡(Cryo-EM)を用いた単粒子構造解析を行なった。さらに、CENP-CとKNL2のCENP-Aヌクレオソームの結合を比較するために、pull down競合実験を行った。

項目2 CENP-C Cupinドメインの構造機能解析

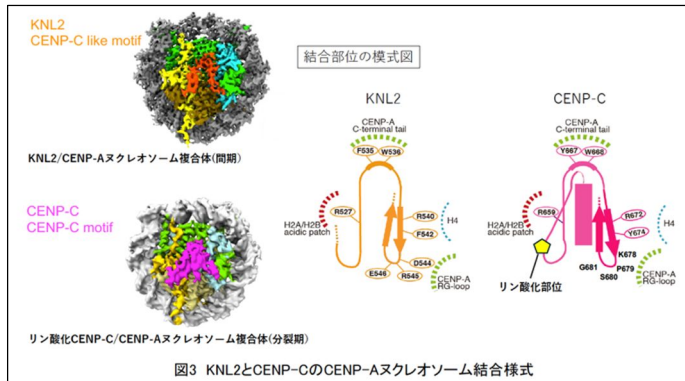
CENP-Cは、N末領域にKMNネットワークや他のCCAN因子との結合部位を、C末領域にCENP-Aとの結合に必要なCENP-Cモチーフ(CCモチーフ)および2量体を形成するCupinドメインを持つ。Cupinドメインを含むC-末端領域を大腸菌内で組み換えタンパク質として発現、精製し、結晶化を行った。結晶化のスクリーニング実験を行い、単結晶を得られたので、X線結晶解析法を用いて立体構造を決定した。得られた構造知見に基づいて、自己会合に関与するアミノ酸残基を同定し、変異体解析を行った。また、Blue Native PAGEを用いて、Cupinドメインの会合状態を調べた。

4. 研究成果

項目1 KNL2によるCENP-Aヌクレオソーム認識の構造基盤 [5]

CENP-Aヌクレオソーム/KNL2複合体のCryo-EM解析

先行研究から、ニワトリの DT40 細胞において、KNL2 は細胞周期を通じて常にセントロメアに局在すること、CC-like モチーフは間期における KNL2 のセントロメア局在に必要であることを示唆するデータを得ていた。ゲルシフトアッセイとバイオレイヤー干渉法を用いた CENP-A ヌクレオソームとの相互作用



解析の結果から、KNL2 は CC-like モチーフを介して、CENP-A ヌクレオソームと直接結合していることが示された。さらに CC-like モチーフを含む KNL2 フラグメントを用いて、CENP-A ヌクレオソームと KNL2 複合体の Cryo-EM 構造を 3.42 分解能で決定した (図 3; PDB entry 7Y7I)。CENP-C の CENP-A ヌクレオソーム結合領域である CC モチーフと同様に、KNL2 が CENP-A ヌクレオソームの特徴である CENP-A の C 末端テールと RG ループおよび H2A/H2B の酸性パッチを認識していることがわかった。得られた構造知見に基づき、CENP-A ヌクレオソームに結合できない KNL2 変異体をデザインした。これらの KNL2 変異体のセントロメア局在解析の結果から、間期においては、KNL2 は CENP-A ヌクレオソームとの結合を介してセントロメア局在するが、分裂期の局在は CENP-A に依存しないことがわかった。また、DT40 細胞を用いた新規 CENP-A の取り込み変異体解析の結果から、間期における CENP-A ヌクレオソームとの結合を介した KNL2 のセントロメア局在は、Mis18 複合体を介した新規 CENP-A 取り込みに必須であることが示された。

KNL2 と CENP-C の CENP-A ヌクレオソームへの競合的結合

今回の CENP-A ヌクレオソーム-KNL2 複合体の Cryo-EM 構造解析の結果、CENP-C と KNL2 の CENP-A ヌクレオソーム結合モードは保存されており (図 3) これら 2 つのタンパク質の CENP-A への結合は競合することが示唆された。実際に、GST-pull down 競合実験を行ったところ、KNL2 と CENP-A ヌクレオソームの結合は、CENP-C によって阻害されることが示された。さらに、この結合阻害は、非リン酸化 CENP-C よりもリン酸化 CENP-C で顕著に促進されることがわかった。すなわち、間期の細胞では、KNL2 が CENP-A ヌクレオソームに優位に結合しているが、分裂期に入って CENP-C がリン酸化されると CENP-A ヌクレオソーム上の KNL2 が CENP-C と置き換わることが示唆された。興味深いことに、DT40 細胞を用いた局在解析の結果から、分裂期における KNL2 のセントロメア局在は CENP-C に依存することが示唆された。

これらの結果に基づき、CENP-C と同様に KNL2 のセントロメア局在モードが細胞周期と連動して変化するという機能モデルを提唱した (図 4)。CENP-A ヌクレオソームおよび CENP-C などの CCAN タンパク質との結合を介して、KNL2 のセントロメア局在モードが変換すると考えられる。このような KNL2 の構造変化は、機能的なセントロメア・キネトコア分子会合体形成の動的な制御に関与することが示唆される。これらの知見は、KNL2 を含めた CCAN およびキネトコア構造の機能制御機構研究の進展につながるものである。

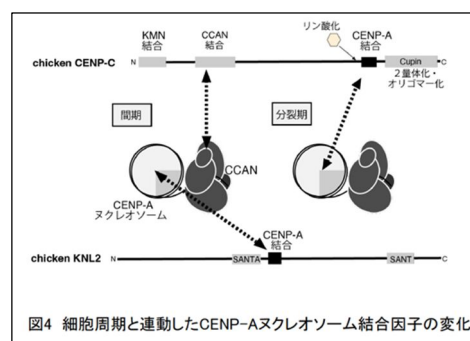


図4 細胞周期と連動したCENP-Aヌクレオソーム結合因子の変化

項目2 CENP-C Cupin ドメインの構造機能解析 [6]

ニワトリ由来の CENP-C Cupin ドメイン (ggCupin) 2 量体の結晶構造を 2.64 分解能で決定した (図 5; PDB entry 7X85)。ggCupin は、2 つの 2 量体形成面 (Dimer Interface1:DI1 と Dimer Interface2:DI2) によって安定なホモ 2 量体を形成していた。すでに報告されていた分裂酵母の CENP-C ホモログの Cupin ドメイン (spCupin) の 2 量体の結晶構造との比較を行ったところ、1 つの 2 量体形成

面, DI1 は両者で保存されていた。しかし, ggCupin が持つもう一つの 2 量体形成面, DI2(Dimer hook)は spCupin には存在しなかった。さらに, 結晶構造中, 分子間 β -シート形成を介した ggCupin 2 量体間の相互作用が観察された (図 6)。この相互作用を介して, ggCupin が自己会合する可能性が示唆された。興味深いことに, ggCupin の自己会合形成面は 2 量体形成面 DI2 の近傍にあり, spCupin には保存されていない領域に存在する。この自己会合形成を検証するため, Blue Native PAGE を用いて, ggCupin および spCupin の会合状態を調べた。その結果, ggCupin では 2 量体以上のオリゴマー形成が観察されたのに対して, spCupin ではそのようなオリゴマー形成は見られなかった。同定された自己会合形成面を壊すようなプロリン変異を導入すると *in vitro* でのオリゴマー形成は観察されなかった。アミノ酸配列の類似性や AlphaFold2 を用いた構造予測の結果から, ヒトやマウスの CENP-C Cupin も同様の自己会合形成能を有することが推測された。

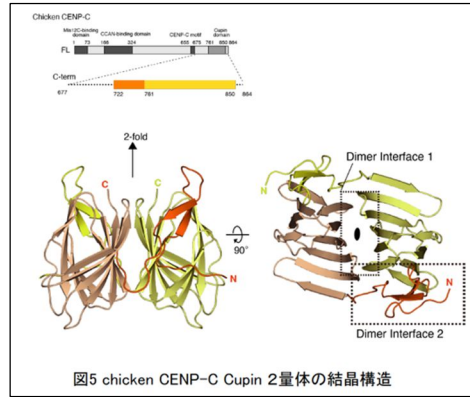


図5 chicken CENP-C Cupin 2量体の結晶構造

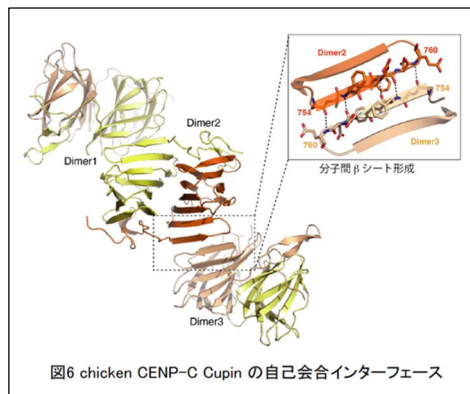


図6 chicken CENP-C Cupin の自己会合インターフェース

次に, ggCupin の自己会合が CENP-C の機能に必要なのかどうかを細胞生物学的な手法を用いて検証した。第一に, CENP-C オリゴマー形成変異体を発現させた CENP-C ノックアウトニワトリ DT40 細胞は正常に増殖できなくなった。また, ニワトリの CENP-C の Cupin ドメインを自己会合しない spCupin に置き換えた CENP-C 変異体でも同様の現象が見られた。すなわち, Cupin ドメインを介した自己会合はニワトリ CENP-C の機能に必須であると考えられる。分裂酵母のセントロメアはキネトコア結合サイトが一つしかない (point centromere)のに対して, 鶏などの脊椎動物のセントロメアには, 複数のキネトコア結合部位が存在し, クラスターを形成している (regional centromere)。今回得られた構造知見および生化学, 細胞生物学的解析の結果に基づき, CENP-C の Cupin ドメインを介した自己会合が, セントロメア上でのキネトコアのクラスター化を促進するという機能モデルを提唱した[6, 7]。

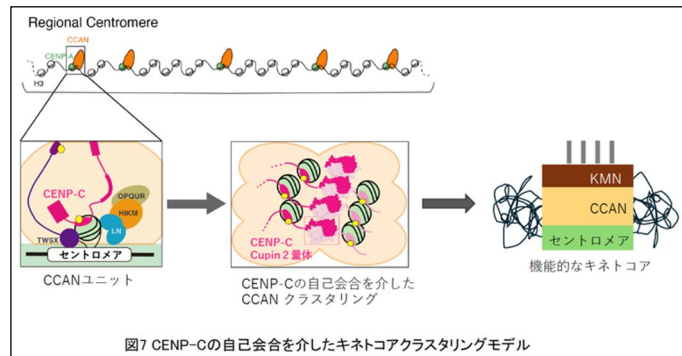


図7 CENP-Cの自己会合を介したキネトコアクラスタリングモデル

文献

- [1] McLaughlin SH and Barford D (2022) Structure of the human inner kinetochore bound to a centromeric CENP-A nucleosome. *Science*: eabn3810
- [2] Pesenti ME *et al* (2022) Structure of the human inner kinetochore CCAN complex and its significance for human centromere organization. *Mol Cell*
- [3] Ariyoshi M *et al* (2021) Cryo-EM structure of the CENP-A nucleosome in complex with phosphorylated CENP-C. *EMBO J*: e105671
- [4] Hori T *et al* (2017) Association of M18BP1/KNL2 with CENP-A Nucleosome Is Essential for Centromere Formation in Non-mammalian Vertebrates. *Dev Cell* 42: 181-189 e183
- [5] Jiang H *et al* (2023) The cryo-EM structure of the CENP-A nucleosome in complex with ggKNL2. *EMBO J* 42:e111965
- [6] Hara M *et al* (2023) Centromere/kinetochore is assembled through CENP-C oligomerization. *Mol Cell* 83:2188-2205
- [7] Ariyoshi M and Fukagawa T (2023) An updated view of the kinetochore architecture. *Trends in Genet* 39:941-953

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 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Cao Jinghui, Hori Tetsuya, Ariyoshi Mariko, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 137
2. 論文標題 Artificial tethering of constitutive centromere-associated network proteins induces CENP-A deposition without Knl2 in DT40 cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.261639	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, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 39
2. 論文標題 An updated view of the kinetochore architecture	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Trends in Genetics	6. 最初と最後の頁 941~953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tig.2023.09.003	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 Mahana Yutaka, Ariyoshi Mariko, Nozawa Ryu-Suke, Shibata Sachiko, Nagao Koji, Obuse Chikashi, Shirakawa Masahiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Structural evidence for protein-protein interaction between the non-canonical methyl-CpG-binding domain of SETDB proteins and C11orf46	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 304~315.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2023.12.001	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 Hara Masatoshi, Ariyoshi Mariko, Sano Tomoki, Nozawa Ryu-Suke, Shinkai Soya, Onami Shuichi, Jansen Isabelle, Hirota Toru, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 83
2. 論文標題 Centromere/kinetochore is assembled through CENP-C oligomerization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 2188~2205.e13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2023.05.023	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 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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hong Jiang, Mariko Ariyoshi, Reito Watanabe, Fumiaki Makino, Keiichi Namba, Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 The cryo-EM structure of the CENP-A nucleosome in complex with KNL2
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〕

-

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