

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：63801
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～ 2012
 課題番号：22570008
 研究課題名（和文） セントロメアに特異的なクロマチン構造を形成するために必要な分子複合体の機能解明
 研究課題名（英文） Characterization of the protein complex, which is required for the chromatin establishment at the centromere
 研究代表者
 堀 哲也 (HORI TETSUYA)
 国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・助教
 研究者番号：70550078

研究成果の概要（和文）：セントロメアクロマチン構造の解明を目的として、クロマチン免疫沈降実験と高感度質量分析により CENP-T/CENP-W クロマチン結合タンパク質群を同定した。これらのタンパク質の 1 つ Eaf6 は、ヒストンアセチル化酵素と相互作用し、セントロメアに局在することを明らかにした。Eaf6 遺伝子破壊株を用いた SILAC 法により、Eaf6 欠損時に複数のセントロメアタンパク質の局在が減少する結果を得た。この結果は、Eaf6 に依存して生じるアセチル化がセントロメア構築に関与する可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：To examine the chromatin structure in centromere region, we tried to identify proteins that associate with the CENP-T/CENP-W complex based on high sensitive Mass Spectrometry combined with the immunoprecipitation. We identified a protein Eaf6 and we confirmed that this localized to the centromeres. We also identified a histone acetyltransferase as an Eaf6-interacting protein. To examine function of Eaf6, we established an Eaf6-conditional knockout cell line and found that localization of several centromere proteins were abolished in Eaf6-deficient cells based on SILAC analysis, indicating that the Eaf6 complex might be required for chromatin architecture of centromeres through the acetyltransferase activity of the Eaf6 complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：染色体

1. 研究開始当初の背景

染色体分配に重要な働きを担うセントロメアの形成機構の理解は、基礎生物学的に重要な課題であるが、不明な点が数多くある。多くの生物種では、セントロメアを形成する領域にタンデムな反復配列が存在することが

報告されている。その一方で、本来セントロメアでない領域が何らかの活性化をうけてセントロメア化する現象も知られている（ネオセントロメア現象）。ネオセントロメアを形成する DNA には、特徴的な配列が見い出されていないため、セントロメアは DNA の一

次情報に依らないエピジェネティックな分子機構によって形成されると考えられている。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 は、セントロメア形成に関与する有力なエピジェネティックマーカーの一つであり、CENP-A を中心としてセントロメア領域のクロマチンは形成されていると考えられている。しかし、CENP-A のみで、セントロメア領域に特異的なクロマチン構造を形成することが出来ないのも事実である。そのため、CENP-A 以外にセントロメア特異的なクロマチン構造の形成に必須な因子の存在が示唆されている。そこで、本研究計画では、研究代表者が見出した、CENP-A を含まないセントロメア領域クロマチン構造の形成メカニズムを明らかにすることを目的とする。特に、セントロメア領域クロマチン構造の形成に関与する分子の詳細を明らかにし、その機能を解明することを目的とする。研究代表者が独自に発見した結果に基づいて、セントロメアに特異的なクロマチン構造の形成機構を詳細に解析することで、染色体分配制御の分子メカニズムの理解に大きく貢献するものと期待される。

2. 研究の目的

正確な染色体分配に必須なセントロメアは、通常、染色体上の一カ所にのみ形成される。しかしながら、どのようにセントロメア領域が規定されるのかは不明な点が多い。研究代表者らは、セントロメア DNA に直接結合する CENP-T/CENP-W 複合体の同定に成功し、この発見をきっかけに、CENP-T/CENP-W 複合体が結合する CENP-A を含まないセントロメアクロマチンの重要性を明らかにした (Cell, 2008)。これまでの予備的な解析から、この複合体が集合するクロマチン領域に、クロマチンリモデリング複合体を含む複数のタンパク質 (CENP-T/CENP-W chromatin associated proteins; TW-chrop) が存在していることを見出している。本研究計画では、これらの TW-chrop がセントロメア領域でどのように機能し、セントロメアに特異的なクロマチン構造の形成にどのように働くのかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

セントロメアに特異的なクロマチン構造の形成に関与する分子複合体の特定と機能解明を行う。研究代表者らは、セントロメア DNA に結合する CENP-T/CENP-W 複合体の同定と機能解析を行い (Cell, 2008)、その研究を基礎として予備的な解析を行った結果、CENP-T/CENP-W 複合体が結合するクロマチンから、クロマチンリモデリング因子を含む複数のタンパク質 (TW-chrop) を新たに発見した。本研究では、I) セントロメアに特異

的なクロマチンに結合するタンパク質の特定とその複合体構成の解明、II) 遺伝学的手法による TW-chrop の機能解析、III) セントロメアに特異的なクロマチン形成における TW-chrop の役割の解明、IV) セントロメアに特異的なクロマチン構造の形成に必須なタンパク質の生物活性の実体解明、を中心に研究を行った。

4. 研究成果

CENP-T/CENP-W 複合体が結合する CENP-A 近傍のクロマチン構造の実体解明を目指して、CENP-T/CENP-W 複合体をベイトとして、ニワトリ DT40 細胞からクロマチン免疫沈降実験を行い、複数の TW-chrop を見出し、セントロメア機能との関連を示唆するタンパク質の特定を行った。さらにそれらがセントロメアに特異的なクロマチン構造形成にどのように働くのかについて解析を行った。

(1) 各 TW-chrop のニワトリ DT40 細胞内における局在解析

各 TW-chrop と GFP タンパク質を融合し、ニワトリ DT40 細胞に導入して細胞内局在を網羅的に観察した。その結果、TW-chrop の一つである Eaf6 タンパク質がセントロメアに局在することを明らかにした。

(2) Eaf6 タンパク質複合体の精製および同定

FLAG タグ融合型 Eaf6 を発現する DT40 細胞株を樹立した。その細胞株の全細胞抽出液から FLAG タグ特異抗体ビーズを用いた共免疫沈降により Eaf6 タンパク質複合体を精製し、高感度質量分析に供した。その結果、ヒストンアセチル化酵素を含む Eaf6 タンパク質複合体因子の同定に成功した。

(3) TW-chrop の遺伝子破壊 DT40 細胞株の作製

TW-chrop の細胞における機能解析を目指し、ニワトリ DT40 細胞において Eaf6 遺伝子破壊株の作製を行った。その結果、Eaf6 遺伝子破壊 DT40 細胞株は致死性を示した。

(4) 遺伝子破壊 DT40 細胞株を利用した Eaf6 の機能解析

Eaf6 遺伝子破壊株 DT40 細胞株を利用し、Eaf6 欠損時における各種セントロメアタンパク質、およびセントロメア機能に与える影響を解析した。これまで、SILAC 法 (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) により複数のセントロメアタンパク質の局在が減少する結果を得ている。この結果から、Eaf6 に依存して生じるセントロメア領域のアセチル化がセントロメア機能に関与する可能性が示唆された。

(5) Eaf6 タンパク質の異所局在による機能解析

Eaf6-LacI 融合タンパク質を作製し、染色体の任意の場所に LacO 配列を挿入した DT40 細胞

胞へ導入を行った。この細胞株を使用し、

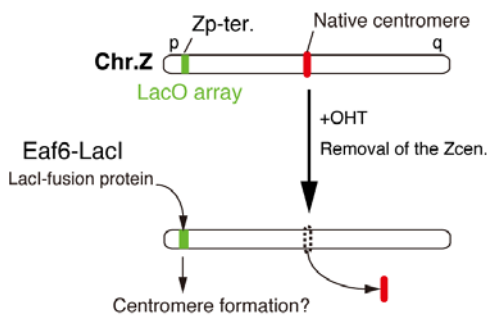


図1、異所局在によるセントロメア形成の誘導

LacO-LacI 実験系により Eaf6 を異所局在化させ、その異所局在に依存したセントロメアクロマチン誘導活性の検証に向けた準備を行った (図1)。今後、クロマチンのアセチル化修飾、構造変換のセントロメア形成における意義の解明を目指した研究を展開する計画である。

(6) セントロメアに特異的なクロマチン形成における TW-chrop の役割の解明

各種セントロメアタンパク質を染色体の任意の場所へ異所局在化させ、セントロメア特有なヒストンバリエントである CENP-A の取り込みを指標に、セントロメアクロマチン誘導活性の検証を行った。その結果、CENP-C、CENP-I および HJURP の異所局在によって CENP-A の取り込みを伴った完全なセントロメアが誘導されることを見出し、論文発表した (図2、J. C. B., 2013)。今後、セントロメアクロマチン誘導における Eaf6 等の TW-chrop の役割解明に向け、TW-chrop と上記タンパク質の相互作用を中心に解析を進める計画である。

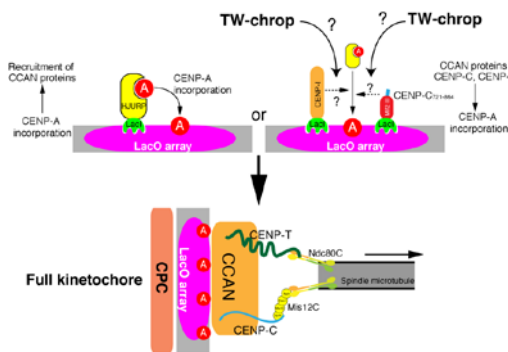


図2、異所局在によるセントロメア形成モデル

今後、セントロメアクロマチン誘導における Eaf6 等の TW-chrop の役割解明に向け、TW-chrop と上記タンパク質の相互作用を中心に解析を進める計画である。

(7) セントロメアに特異的なクロマチン構造の形成に必須なタンパク質の生物活性の表体解明

セントロメア DNA に結合する CENP-T-W-S-X

ヘテロ 4 両体を再構成し、ダイヌクレオソームとの相互作用を解析した。その結果、CENP-T ヘテロ 4 量体は 100bp サイズのリンカー DNA を有すダイヌクレオソームと優先的に結合することが分かった (投稿中)。今後、TW-chrop のセントロメアクロマチン構築における活性検証に向け、TW-chrop と上記複合体を利用した試験管内再構成実験を進める計画である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Shang WH, Hori T, Martins NMC, Toyoda A, Misu S, Monma N, Hiratani I, Maeshima K, Ikeo K, Fujiyama A, Kimura H, Earnshaw WC, Fukagawa T “Chromosome engineering allows the efficient isolation of vertebrate neocentromeres.” *Dev. Cell* 24, 2013, 635-648. 査読有り
DOI: 10.1016/j.devcel.2013.02.009.
- ② Osakabe A, Tachiwana H, Takaku M, Hori T, Obuse C, Kimura H, Fukagawa T, Kurumizaka H “Vertebrate Spt2 is a novel nucleolar histone chaperone that assists in ribosomal DNA transcription.” *J. Cell Sci.* 126, 2013, 1323-1332. 査読有り
DOI: 10.1242/jcs.112623.
- ③ Nishino T, Rago F, Hori T, Tomii K, Cheeseman IM, Fukagawa T “CENP-T provides a structural platform for outer kinetochore assembly.” *EMBO J.* 32, 2013, 424-36. 査読有り
DOI: 10.1038/emboj.2012.348.
- ④ Hori T, Shang WH, Takeuchi K, Fukagawa T “The CCAN recruits CENP-A to the centromere and forms the structural core for kinetochore assembly.” *J. Cell Biol.* 200, 2013, 45-60. 査読有り
DOI: 10.1083/jcb.201210106.
- ⑤ Hori T, Fukagawa T “Establishment of the vertebrate kinetochores.” *Chromosome Res.* 20, 2012, 547-561. 査読有り
DOI: 10.1007/s10577-012-9289-9.
- ⑥ Ohfuchi ME, Hori T, Tanabe H, Kitamura H, Matsuda R, Tone S, Hozak P, Habermann FA, Hase J, Cremer C, Fukagawa T, Harata M “The actin family member Arp6 and the histone variant H2A.Z are required for spatial positioning of chromatin in chicken cell nuclei.” *J. Cell Sci.* 125, 2012, 3739-3743. 査読有り

- DOI: 10.1242/jcs.103903.
- ⑦ Nishino T, Takeuchi K, Gascoigne, KT, Suzuki A, **Hori T**, Oyama T, Morikawa K, Cheeseman IM, Fukagawa T
“CENP-T-W-S-X Forms a Unique Centromeric Chromatin Structure with a Histone-like Fold.” *Cell* 148, 2012, 487-501. 査読有り
DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.061.
- ⑧ Gascoigne KT, Takeuchi K, Suzuki A, **Hori T**, Fukagawa T, Cheeseman IM
“Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes.” *Cell* 145, 2011, 410-422. 査読有り
DOI: 10.1016/j.cell.2011.03.031.
- ⑨ Suzuki A, **Hori T**, Nishino T, Usukura J, Miyagi A, Morikawa K, Fukagawa T
“Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins.” *J. Cell Biol.* 193, 2011, 125-140. 査読有り
DOI: 10.1083/jcb.201012050.
- ⑩ Schmidt JC, Kiyomitsu T, **Hori T**, Backer, CB, Fukagawa T, Cheeseman, IM “Aurora B kinase controls the targeting of the Astrin-SKAP complex to bioriented kinetochores.” *J. Cell Biol.* 191, 2010, 269-280. 査読有り
DOI: 10.1083/jcb.201006129.
- ⑪ Shang WH, **Hori T**, Toyoda A, Kato J, Pendorf K, Sakakibara Y, Fujiyama A, Fukagawa T “Chickens possess centromeres with both extended tandem repeats and short non-tandem-repetitive sequences.” *Genome Res.* 20, 2010, 1219-1228. 査読有り
DOI: 10.1101/gr.106245.110.
- ⑫ Ribeiro SA, Vagnarelli P, Dong Y, **Hori T**, McEwen BF, Fukagawa T, Flors C, Earnshaw WC “A super-resolution map of the vertebrate kinetochore.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107, 2010, 10484-10489. 査読有り
DOI: 10.1073/pnas.1002325107.
- ⑬ Matsuda R, **Hori T**, Kitamura H, Takeuchi K, Fukagawa T, Harata M
“Identification and characterization of the two isoforms of the vertebrate H2A.Z histone variant.” *Nucleic Acids Res.*, 38, 2010, 4263-4273. 査読有り
DOI: 10.1093/nar/gkq171.
- ⑭ Johnston K, Joglekar A, **Hori T**, Suzuki A, Fukagawa T, Salmon ED “Vertebrate kinetochore protein architecture: protein copy number.” *J. Cell Biol.*, 189, 2010, 927-943. 査読有り
DOI: 10.1083/jcb.200912022.
- [学会発表] (計 20 件)
- ① Takeuchi, K. “The Histone-fold CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA” **52th ASCB Annual Meeting**, San Francisco (USA), 2012, 12/15~19.
- ② 越阪部晃永 “新規ヒストン相互作用因子 hsSpt2 の核小体クロマチンダイナミクスにおける機能” **第 85 回日本生化学会大会**, 福岡市, 2012, 12/14~16.
- ③ 堀 哲也 “人工動原体の作出からあきらかになるセントロメアの形成メカニズム” **第 35 回日本分子生物学会年会**, 福岡市, 2012, 12/11~14.
- ④ **Hori, T.** “Ectopic Localization of CCAN proteins induces centromere formation in vertebrate cells” **EMBO Workshop**, Barcelona (Spain), 2012, 10/1~5.
- ⑤ 西野達哉 “新規セントロメア特異的ヒストン様複合体 CENP-TWSX の構造機能解析” **第 12 回日本蛋白質科学会年会**, 名古屋市, 2012, 6/20~22.
- ⑥ Fukagawa T. “Molecular architecture of vertebrate kinetochores” **The Cell Cycle Meeting**, New York (USA), 2012, 5/15~19.
- ⑦ Osakabe, A. “Histone chaperone activity of a novel histone interacting factor SPT2” **第 34 回日本分子生物学会年会**, 横浜市, 2011, 12/13~16.
- ⑧ **Hori, T.** “Ectopic localization of CCAN proteins induces centromere formation in vertebrate cells” **第 34 回日本分子生物学会年会**, 横浜市, 2011, 12/13~16.
- ⑨ Kitamura, H. “Interaction between the actin-related protein Arp6 and nuclear myosin I and their contribution to the nuclear” **第 34 回日本分子生物学会年会**, 横浜市, 2011, 12/13~16.
- ⑩ 竹内康造 “CENP-T-W-S-X 複合体は、動原体タンパク質群の集合機構に重要な役割を担う” **第 34 回日本分子生物学会年会**, 横浜市, 2011, 12/13~16.
- ⑪ Nishino, T. “Structural cell biochemistry of a novel histone fold vertebrate kinetochore complex: CENP-TW and CENP-SX form a heterotetramer” **51th ASCB Annual Meeting**, Denver (USA), 2011, 12/3~6.
- ⑫ **Hori, T.** “Unique Feature of Chicken Centromere DNA and Engineering of Centromere Using DT40 Cells” **50th ASCB**

Annual Meeting, Philadelphia (USA), 2010, 12/11~15.

- ⑬ Suzuki, A “Stretched Distribution of Inner Kinetochores Occurs Dependent on Tension from Spindle Microtubules”
50th ASCB Annual Meeting, Philadelphia (USA), 2010, 12/11~15.
- ⑭ 越阪部晃永 “新規ヒストン結合因子ヒト SPT2 の DNA 損傷修復における機能解析” **BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会**, 神戸市, 2010, 12/7~10.
- ⑮ 竹内康造 “DNA 結合活性を有する CCAN タンパク質群の機能解析” **BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会**, 神戸市, 2010, 12/7~10.
- ⑯ 香川尚子 “遺伝子欠損マウスを用いた CENP-0 複合体の機能解析” **BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会**, 神戸市, 2010, 12/7~10.
- ⑰ 北村大志 “細胞核内のクロマチン空間配置におけるアクチン関連タンパク質 Arp6 の機能解析” **BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会**, 神戸市, 2010, 12/7~10.
- ⑱ 越阪部晃永 “新規ヒストン結合因子ヒト SPT2 の DNA 損傷修復における機能解析” **BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会**, 神戸市, 2010, 12/7~10.
- ⑲ 松田 涼 “遺伝子破壊細胞によるヒストンバリエント H2A.Z アイソフォームの機能解析” **BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会**, 神戸市, 2010, 12/7~10.
- ⑳ Shang, W.H. “Creation of chromosomes containing neocentromere in chicken DT40 cells” **BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会**, 神戸市, 2010, 12/7~10.

[その他]

ホームページ等

国立遺伝学研究所 研究成果

(http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights.html?research_tags=2013)

国立遺伝学研究所 分子遺伝研究部門
ニュース

(http://www.nig.ac.jp/labs/MolGene/news_j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 哲也 (HORI TETSUYA)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・
助教

研究者番号：70550078

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し