

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 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22657002

研究課題名（和文）

テロメアがセントロメアを創成する可能性の追究

研究課題名（英文）

Experimental investigation on the origination of centromeres from telomeres

研究代表者

石井 浩二郎（ISHII KOJIRO）

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授

研究者番号：40360276

研究成果の概要（和文）：

セントロメアとテロメアはともに染色体の安定維持に働く特殊ゲノム領域であり、染色体進化において両者はしばしば連動して変化している。本研究ではそのようなセントロメアとテロメアの複合変化の関係性について実験解析を行った。その結果、セントロメア不全をきっかけとして起こる新規セントロメア創成（ネオセントロメア形成）は、線状染色体の末端としてのテロメア領域の存在を必要とし、テロメアヘテロクロマチンなどを介して起こることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Centromeres and telomeres are the two specialized chromatin domains both serving for stable chromosome inheritance. Intriguingly, their location and functionality often change simultaneously in the course of chromosome evolution. We experimentally analyzed such an interrelationship, if any, between centromeres and telomeres. We found that *de novo* centromere formation stimulated by centromere dysfunction requires the telomere as a domain located at the end of chromosomes, which is mediated by telomeric heterochromatin and the other factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	570,000	3,470,000

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：ゲノム、テロメア、セントロメア、染色体

1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体が原核生物から進化する初期的過程において、セントロメアはテロメアから派生したとする主張が一部の研究者より成されている。確かにマウスや犬、牛、羊などが示すテロセントリック染色体（セン

トロメアがテロメアに隣接する染色体）の構築は、セントロメアとテロメアの間に何らかの関連性がある可能性を想起させる。しかし現存するセントロメア構造領域とテロメア構造領域の間では、そこが反復DNA配列に富み、ヘテロクロマチンが付随する、といっ

た概容における類似点以上には具体的な共通性がほとんど見出されない。果たして両者は本当に同じ起源なのか、真偽ははっきりとしていないのが研究開始当初の背景であった。

近年、テロメア近傍配列でのセントロメア様配列の存在が複数の生物で発見・報告され、セントロメアのテロメア起源説を支持する証拠として取り上げられている。しかし、そもそも現存生物のゲノムDNA解析からは、セントロメアとテロメアの関係性についてはあくまでもその傍証しか得ることができない。そもそも染色体構築の変遷過程の分子機構を証明することは容易ではない。

私たちはこれまでに分裂酵母染色体のセントロメアを誘導的に破壊する実験系を構築し、そのような致死的な遺伝子操作からの低頻度の復帰変異として、新規セントロメア機能（ネオセントロメア）がテロメアのごく近傍に形成された株か、セントロメア破壊染色体がテロメアを通じて他の正常染色体と融合した株を、再現性よく取得することに成功してきた (Ishii et al. (2008) Science)。特にネオセントロメアがテロメア近傍に形成される現象は、見かけ上前述のセントロメアのテロメアからの派生を模倣し、その優れた研究モデルになる。また、セントロメア破壊は本来テロメアによって抑制されているはずの染色体末端融合も誘発し、生物進化に見られるセントロメア変動とテロメアの機能変化の連動が実験室レベルで再現されているといえる。本研究ではそのような細胞が自律的に示す染色体変化を誘導実験によって再現し、その背景の機構について分子生物学的に解剖することを目指した。

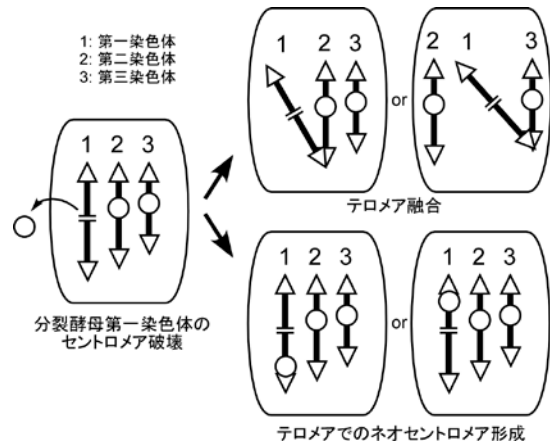
2. 研究の目的

セントロメアとテロメアはともに染色体の安定維持に働く特殊ゲノム領域だが、通常の生育環境において互いの間には機能的な関連はほとんど見出されない。しかし生物種分岐を決定づけるような様々な染色体進化では両者はしばしば連動して変化している。このようなセントロメアとテロメアの複合変化は、生物進化のみならず種々の染色体病の発生にも重大な鍵を握る。本研究では、特にセントロメアの不全をきっかけとして起こる染色体再編成を実験的に再現して、その反応にテロメアが果たす役割を解き明かし、テロメアは新規のセントロメア形成を直接的に促す潜在能力をもつ可能性について追究することを目的とした。これによって、セントロメアとテロメアが連動する染色体変化の形成機構の解明が期待された。

3. 研究の方法

私たちはこれまでに分裂酵母第一染色体

のセントロメアを破壊するアッセイ系を樹立していた。そのアッセイ系は、テロメアでのネオセントロメア形成とテロメア融合という、テロメアに関与した二つの染色体再編成を復帰変異として生み出すことが判明している (下図参照)。そこで、テロメアを完



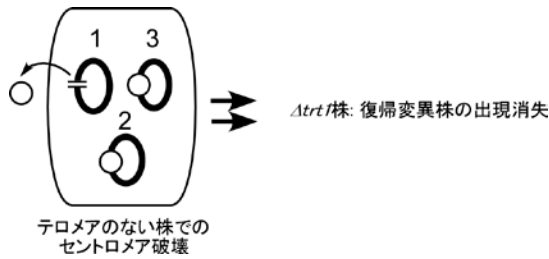
全に欠失して染色体が環状化した分裂酵母株を用いて同様のセントロメア破壊実験を行い、その復帰変異の解析を行った。染色体の環状化のために、テロメラーゼ trt1 の遺伝子欠損と、テロメア保護タンパク質 pot1 の遺伝子欠損の双方を用いた。両遺伝子欠損株とも、致死的なテロメア領域の短縮化を引き起こすが、その致死性は染色体の環状化によって相補されることが知られている。環状化前のテロメア短縮化の度合いに応じて、染色体環状化部位には数種類のバリエーションが存在することが知られている。本研究では、そのそれぞれについてセントロメア破壊を行い、おのおの得られる結果を親株の示す性質と関連づけて、テロメアが染色体変化に果たす役割を考察した。また、部位特異的組換え酵素を用いて第一染色体の任意の部位での環状化を作り出した上でセントロメア破壊を行い、trt1 破壊株や pot1 破壊株でのセントロメア破壊結果と比較した。

4. 研究成果

(1) trt1 破壊株でのセントロメア破壊

まずは trt1 遺伝子が破壊され、その結果染色体が環状化してしまった株を用いて、セントロメア破壊アッセイをその第一染色体に導入した株を作成した。染色体環状化株では染色体はテロメアを欠くため、これまで直鎖状の染色体で得られていたテロメアを巡る染色体変化とは異なる変化を介した復帰変異株が生まれる可能性がある。しかし、もしもセントロメアはテロメアから創成されているのであれば、復帰変異株は全く出現しない可能性も考えられる。そして実際にセントロメア破壊誘導を試みた結果、復帰変異株は全く獲得されないという最終結論が得ら

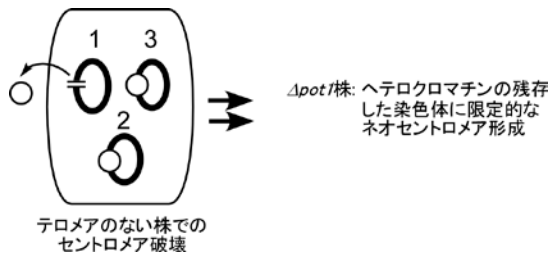
れた（下図参照）。この実験により、テロメ



ア末端に存この実験により、テロメア末端に存在するシス DNA 配列ではなく、染色体の末端そのものが新規セントロメア創成を促す条件となっている可能性が示唆された。

(2) pot1 破壊株でのセントロメア破壊

一方、テロメア保護タンパク質 pot1 の遺伝子欠損による環状化株でのセントロメア破壊は、テロメラーゼ trt1 の遺伝子欠損による環状化株でのセントロメア破壊と少し異なる結果を生み出した。すなわち、頻度は低いが復帰変異株は得られ、そのネオセントロメア形成領域を解析したところ、それは環状化した末端部位形成されていた。さらにネオセントロメア形成部位の近傍のクロマチン構造を ChIP 実験により解析した結果、ネオセントロメアは環状染色体上に残存するヘテロクロマチン構造と隣接するかたちで形成されていることが判明した（下図参照）。



従って、染色体末端そのものが単純に新規セントロメア創成を促しているのではなく、テロメア領域に形成されるヘテロクロマチン構造が染色体末端構造と協調してセントロメア新規形成に機能している可能性が示唆された。実際、セントロメア破壊に用いた pot1 遺伝子欠損株では、融合した旧染色体末端領域にヘテロクロマチン形成を促す DNA 配列が残存していることも確認している。

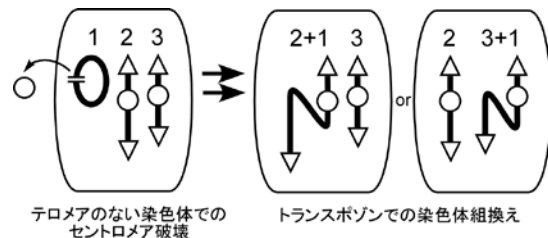
(3) 人為的環状化染色体でのセントロメア破壊実験

従って、ヘテロクロマチン構造がセントロメア破壊を行った環状染色体の旧テロメア領域に残存し、それが低頻度の新規セントロメア形成を積極的に支えた可能性が考えられる。この結果より、次にヘテロクロマチン配列を完全に欠如した環状化染色体の作製

を試みた。この実験では pot1 遺伝子欠損は用いず、部位特異的組換え酵素を使って直接的に染色体を任意の部位で環状化させることを試みた。加えてこの株では、残りの染色体は線状のままであり、セントロメア破壊を行う染色体のみが環状化される。もしもテロメアの存在がシスに新規セントロメア形成に寄与しているのであれば、この株でも trt1 遺伝子欠損株や pot1 遺伝子欠損株と同様に新規セントロメア形成は大きく不能となることが予想されるが、もしもテロメアという存在がトランスに新規セントロメア形成を促しているのであれば、この株では線状染色体に正常なテロメアが残るため、新規セントロメア形成が見られることが期待された。しかしながら、この株では新規セントロメア形成は全く見られなかった。すなわち、テロメアの新規セントロメア形成への寄与はシスに働く効果であり、しかもそれはヘテロクロマチン構造に依存していることが示唆された。

しかしながら、このような人為的環状化染色体でのセントロメア破壊はこれまでに無かった染色体再編成サバイバーを生み出した。それらは染色体の本数が3本から2本に減少する再編成によって生き延びていた。環状化染色体であるので、染色体末端融合は考えられず、実際第二染色体、第三染色体の末端部分は変化なしに存在し続けていることを確認した。その代わりに、染色体内部で再編成が生じていることをパルスフィールドゲル電気泳動により確認した。環状化染色体が線状の第二染色体、第三染色体に組み込まれたものと考えられる。

最後にその組換え部位の検索を行った。相同配列による組換えが可能性として最も高く、その候補としてはトランスポゾン配列が考えられるため、inverse PCR によってトランスポゾン配列を介した染色体間組換えの可能性を検討したところ、得られたサバイバーのほぼ全てでトランスポゾンでの組換えが認められた（下図参照）。分裂酵母には各



染色体上に Tf2 という不活性型のトランスポゾンが計 13 コピー散在して存在するが、ここで得られたトランスポゾン組換えは、特定のトランスポゾンに特異的ではなく、様々なトランスポゾン間で万遍なく得られた。従って、セントロメア破壊はトランスポゾン間

の組換えを偏り無く亢進させ、それがこの人為的環状化型染色体をもつ細胞での新たな生き残りサバイバーの出現を生んだものと考えられる。これはトランスポゾンがセントロメア破壊に生理的に応答していることを表す。今後はこのような生物進化にも深く関わるトランスポゾン応答の原因およびその仕組みを明らかにしていきたいと考える。

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 2 件)

- ① 荻山友貴、石井浩二郎、The smooth and stable operation of centromeres, *Genes and Genetic Systems*, 査読あり、87 巻、2012 年、63-73
- ② 荻山友貴、副島朗子、増田史恵、高橋考太、石井浩二郎、Telomere-engaged chromosome reorganization after centromere deletion in fission yeast, *Advance in Chromosome Science*, 査読なし、3 巻、2010 年、76-78

[学会発表] (計 16 件)

- ① 石井浩二郎、新規セントロメア形成におけるヒストンバリエーションの働き、第 30 回染色体ワークショップ・第 11 回核ダイナミクス研究会、2012 年 12 月 19 日～2012 年 12 月 21 日、兵庫
- ② 石井浩二郎、異所的に形成されたセントロメアを安定化するヒストンバリエーションの再編成、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日、福岡
- ③ 石井浩二郎、ネオセントロメア形成の分子機構、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 24 日～2012 年 9 月 26 日、福岡
- ④ 石井浩二郎、染色体の編成が変わる仕組みを酵母で探る、第 20 回酵母合同シンポジウム、2012 年 9 月 6 日～2012 年 9 月 7 日、京都
- ⑤ 石井浩二郎、Ectopic centromere formation is completed with neighboring heterochromatin, 第 29 回染色体ワークショップ、2012 年 1 月 25 日～2012 年 1 月 27 日、宮城
- ⑥ 石井浩二郎、Chromosomal reorganizations provoked by centromere dysfunction, 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日～2011 年 12 月 16 日、横浜
- ⑦ 石井浩二郎、染色体高次機能構築の制御機構、日本遺伝学会第 83 回大会、2011 年 9 月 20 日～2011 年 9 月 22 日、京都
- ⑧ 石井浩二郎、ネオセントロメア形成の分

- 子基盤、日本遺伝学会第 83 回大会、2011 年 9 月 20 日～2011 年 9 月 22 日、京都
- ⑨ 石井浩二郎、染色体編成はどうやって変化するのか?、第 23 回高遠シンポジウム、2011 年 8 月 25 日～2011 年 8 月 26 日、長野
- ⑩ 石井浩二郎、Spontaneous chromosome reorganizations after centromere dysfunction, The 6th International Fission Yeast Meeting, 2011 年 6 月 25 日～2011 年 7 月 2 日、ボストン (米国)
- ⑪ 石井浩二郎、A molecular mechanism for de novo siRNA generation in fission yeast, The 16th Annual Meeting of the RNA Society, 2011 年 6 月 14 日～2011 年 6 月 18 日、京都
- ⑫ 石井浩二郎、Spontaneous reorganization of acentric chromosomes, The 6th UK Japan Cell Cycle Workshop, 2011 年 4 月 10 日～2011 年 4 月 14 日、ウィンダミア (英国)
- ⑬ 石井浩二郎、Spontaneous Reorganization of Acentric Chromosome, International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (GENOFIELD2011), 2011 年 1 月 24 日～2011 年 1 月 26 日、兵庫
- ⑭ 石井浩二郎、テロメアとセントロメアに導かれる染色体再編成、第 33 回日本分子生物学会年会 (BMB2010)、2010 年 12 月 7 日～2010 年 12 月 10 日、神戸
- ⑮ 石井浩二郎、セントロメア欠失にともなう染色体再編成の分子機序、大阪大学蛋白質研究所セミナー「ゲノム機能の記憶の成立機序とその制御」、2010 年 11 月 19 日～2010 年 11 月 20 日、大阪
- ⑯ 石井浩二郎、Chromosome reorganization after centromere dysfunction, HFSP Alumni Meeting, 2010 年 10 月 9 日、東京

[図書] (計 1 件)

- ① 石井浩二郎 (共訳)、培風館、エビジェネティクス、2010 年、311-339

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/ishii/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 浩二郎 (ISHII KOJIRO)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授

研究者番号：40360276

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし