

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24年6月4日現在

機関番号：63801
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22770177
 研究課題名（和文） セントロメアに特異的なクロマチン形成におけるRSF複合体の役割
 研究課題名（英文） Functional role of the RSF complex in establishment of centromere-specific chromatin
 研究代表者
 ペルペレスク マリネラ (PERPELESCU MARINELA)
 国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・特任研究員
 研究者番号：50568102

研究成果の概要（和文）：

これまで、研究代表者は、クロマチンリモデリング因子RSF複合体が、セントロメアに特異的なクロマチン形成に関わることを見いだしてきた。本研究では、RSF複合体のセントロメアへの局在化機構、RSF複合体とCENP-Aとの関連、あるいは、RSF複合体と他のセントロメアタンパク質との関連について明らかにすることを目指した。RSF-FLAGを発現するヒトおよびニワトリ細胞株を作成して、RSFと共沈降してくる因子の同定および共沈降してくるDNAの解析を行った。RSFと共沈降するDNAは、CENP-Aと共沈降するDNA同じピークであった。また、RSF複合体と共沈降してくるタンパク質因子の解析の結果、クロマチンリモデリング因子であるFACTが同定できた。FACTのノックアウト細胞で、RSFの局在が失われることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Previously, I found that the RSF complex transiently interacts with CENP-A and acts in CENP-A incorporation into centromeres. Therefore, I wanted to determine 1) how the RSF complex targets the centromere, 2) which are the synergic factors that help the RSF complex in the stable retention of CENP-A chromatin and 3) how the RSF complex is involved in kinetochore assembly. To address these questions, I performed anti-FLAG chromatin immunoprecipitation of DT40 cells stably expressing FLAG-Rsf-I and found that RSF-associated DNA distributes along the genome, but a specific sharp peak overlaps the peak of the CENP-A-associated DNA. In addition, I found that the RSF complex mainly interacts with the FACT complex, which is another chromatin remodeling complex that we also spotted at centromere and found that interacts with CENP-A. I demonstrated that the Rsf1 amount was reduced in cells with knockout of FACTp80 (SSRP1).

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、分子生物学

キーワード：セントロメア・クロマチン・CENP-A・RSF・細胞周期・DT40 細胞・染色体分配・免疫沈降

1. 研究開始当初の背景

生物の生命維持には、染色体が安定に保持・増殖されなければならない。染色体分配のような基本的な生体反応に狂いが生じると染色体の異数化、がん化など細胞に対する悪影響が生じる。したがって、染色体複製や分配の正確な分子機構を解明することは、生物学における本質的な課題の一つである。本研究では、染色体分配を司るセントロメアに焦点を当て、セントロメアの形成機構についての明らかにすることを目標としている。

セントロメアの形成には、そこに存在するDNAの塩基配列によって決定されるわけではない。塩基配列に無関係に場所が決定されるが、一旦決まった場所は次世代に受け継がれると言う一種のエピジェネティックな分子機構が働いている。塩基配列に代わってセントロメアの場所決定に関わる因子（エピジェネティックマーカー）は、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 である。CENP-A はヒストン H3 に代わって、セントロメア領域のヌクレオソームに取り込まれると考えられている (Perpelescu and Fukagawa, *Chromosoma*, 2011)。セントロメアの構築には、CENP-A の取り込みを中心としたセントロメアに特異的なクロマチン構造の形成が重要なステップである。しかしながら、CENP-A がどのようにセントロメア領域のヌクレオソームに取り込まれ、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関わるのか不明な点も多い。これらを明らかにする目的で、これまで、代表者は、CENP-A に含まれるクロマチンの解析を行ってきた。具体的には、CENP-A を含むヌクレオソームを可溶化して得られる CENP-A を含むクロマチンに含まれる因子の網羅的な解析を行ってきた (Obuse

et al., *Gene to Cells*, 2004)。ここで同定した因子に含まれるクロマチンリモデリング因子である RSF 複合体について、詳細に機能解析を行い、RSF 複合体が、CENP-A のセントロメア領域のヌクレオソームへの取り込みに重要であることを発表してきた (Perpelescu et al., *J. Cell Biol.*, 2009)。本研究は、その成果を基盤として行った。

2. 研究の目的

これまで、代表者が得てきた知見を基盤として、本研究では、セントロメアに特異的なクロマチン構造の構築における RSF 複合体のより詳細な機能を知ることが大きな目的である。RSF 複合体は、クロマチンリモデリング因子として知られているが、特にセントロメアにおける本複合体の機能解析に焦点を当てた。

具体的には、

- 1) RSF 複合体のセントロメアへの局在化機構、
- 2) RSF 複合体と CENP-A との関連、
- 3) RSF 複合体と他のセントロメアタンパク質との関連について明らかにすることを目指す。この点が明らかになれば、セントロメアに特異的なクロマチン構造の実体も明らかにできると期待される。

3. 研究の方法

RSF 複合体の一つの因子である RSF1 と FLAG タグを融合したタンパク質を発現するようなプラスミドコンストラクトを作成して、これをヒトおよびニワトリ細胞株へ導入して、RSF1-FLAG を安定に発現するヒトおよびニワトリ細胞株を作成する。その細胞を大量に培養して、G1 期に同調してクロマチン画分を濃縮する。クロマチン画分の調製は、細胞核を分離した後、マイクロソームヌクレアーゼ

で緩やかに DNA を切断して可溶性画分を得るといった標準的な方法で行う。また、ランダム培養の細胞からも同様にクロマチン画分を得る。これらのクロマチンの分画を用いて抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を用いて、RSF 複合体と共沈降してくる因子を回収する。その免疫沈降物を SDS-PAGE に展開し、特異的に沈降していることを確認した後、それらの因子について質量分析機を用いてアミノ酸配列を同定する。得られた因子のうち、興味深い因子については、詳細な機能解析を行う。

具体的には、これらの因子の抗体を作成して細胞内局在を解析する。特に、セントロメアにおける RSF や CENP-A との共局在の有無を確認する。さらに、固定細胞だけでなく、ライブセルイメージングにおいても、このタンパク質の局在を解析する。特に、細胞周期の進行に伴う局在変化に注目する。また、更なる機能解析として、これら因子についてニワトリ DT40 細胞を用いたノックアウト細胞を樹立して、その表現型を解析する。表現型の解析としては、細胞増殖の有無、細胞周期の進行などを確認する。さらに、これらノックアウト細胞中において、RSF 複合体や各種セントロメアタンパク質の局在解析を行う。また、CENP-A の取り込み効率の有無なども解析する。

ノックアウト細胞で示唆される結果などは、組み換えタンパク質などを作成し、生化学的な解析も併せて行う。これらの解析を通じて、これらの因子と RSF 複合体や CENP-A との関連を明らかにできる。

上の研究計画では、主に RSF 複合体と共沈降してくるタンパク質に注目している。しかし、RSF 複合体は、クロマチン分画へ存在しているので、同時に DNA を含んでいると予想される。そこで、抗 FLAG 抗体による免疫沈降後、沈降物をフェノール処理することによって、タンパク質を除き、DNA を抽出する。抽出された DNA 試料を、次世代シーケンサーに供する。得られた全 DNA 情報をニワトリの全ゲノム情報へマッピングしてどのような領域の DNA が濃縮されているかについて解析

を行う。代表者の所属する研究室では、すでに同様の研究手法を用いて、CENP-A と共沈降してくる DNA の解析を行っている (Shang et al., *Genome Res.*, 2010)。その結果、ニワトリ染色体の中には、反復配列を含まない DNA がセントロメアとなっている染色体が複数あることを見いだしている。この特徴を活用して、RSF 複合体と共沈降する DNA が、セントロメア領域に多いのか、クロマチンの上で CENP-A と協調しているのかについて、明らかにできる。

4. 研究成果

RSF 複合体と共沈降してくるタンパク質因子について質量分析機で解析した結果 (Perpelescu and Fukagawa, *Chromosoma*, 2011)、クロマチンリモデリング因子である FACT が同定できた。FACT は、通常の免疫染色では細胞核全体に局在しているが、ある種の抽出を行うとセントロメア領域に多く存在することを、代表者の所属する研究室では発表している (Okada et al., *Mol. Biol. Cell*, 2009)。この結果を確認した後、より詳細な細胞内局在を明らかにする目的で、生細胞観察を行った。その結果、非常に短い時期に FACT と RSF 複合体が共局在する様子が観察できた。

FACT のコンディショナルノックアウト細胞を用いて、細胞周期の進行を調べたが、M 期に特異的な影響はでていなかった。しかし、CENP-A の取り込み効率が低下することは確認した。FACT をノックアウトした後に RSF 複合体の局在を解析した結果、RSF 複合体の細胞核内での局在が失われることが判明した。この結果は、FACT と RSF 複合体が協調して機能していることを示唆するデータである。今後は、RSF 複合体と FACT がどのように協調して、CENP-A の局在に関わるかについて、生化学的手法や細胞生物学的手法を用いて明らかにしたい。具体的には、CENP-A ヌクレオソームの再構成系における RSF 複合体の影響などを解析する予定である。さらに、RSF 複合体のノックアウト細胞を樹立して、FACT

の局在や、CENP-A の取り込み活性を解析する必要があると考えている。

RSF 複合体と共沈降してくる DNA を次世代シーケンサーで解析した後、ニワトリの全ゲノム DNA ヘマッピングを行った。RSF 複合体は、クロマチン全体で機能すると予想していたので、このような解析を行った場合に複数のピークがでることが予想され、セントロメア領域に特異的なピークを示すかどうかについては、不明であった。しかし予想に反して、RSF 複合体と結合する DNA のピークは、CENP-A と相互作用する DNA をマッピングして得られたピークと一致することが判明した。特に、ニワトリの Z 染色体は、30kb 程度の非反復配列領域に CENP-A のピークがあり、その領域が機能的なセントロメアであることは、示されている (Shang et al., Genome Res., 2010)。本研究で得られた Z 染色体における RSF 複合体と結合している DNA のマッピングのデータは、CENP-A と結合する DNA と完全に一致していた。このことは、RSF 複合体がセントロメア領域のクロマチン構築に直接的に関与していることを示す結果である。今後は、RSF 複合体や FACT のノックアウト細胞あるいは、セントロメアタンパク質のノックアウト細胞において同様の解析を行い、RSF 複合体のセントロメア領域のクロマチンへの局在化機構の詳細を明らかにする予定である。

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 1 件)

①. Perpelescu, Marinela, and Fukagawa, Tatsuo, The ABCs of CENPs. **Chromosoma** 120, (査読有), 425-446 (2011).
DOI:10.1007/s00412-011-0330-0

[学会発表] (計 1 件)

①. Perpelescu, Marinela, CENTROMERE

CHROMATIN REMODELING - A COOPERATIVE WORK、仙台市、2012/1/25～26、第 29 回染色体ワークショップ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ペルペレスク マリネラ
(PERPELESCU MARINELA)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・特任
研究員

研究者番号：50568102

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し