

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82508

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770011

研究課題名(和文)クロマチン形成制御可能な次世代HACによる、セントロメア形成機構の解明

研究課題名(英文)The construction of multi-chromatin inducible human artificial chromosome (HAC)

研究代表者

中野 めぐみ(Nakano, Megumi)

公益財団法人かずさDNA研究所・細胞工学研究室・研究員

研究者番号：50542825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト染色体セントロメア領域の高頻度反復配列、アルフォイドDNA配列上には、複数の性質の異なるクロマチン構造が形成され、それぞれが染色体均等分配に重要な役割を果たしている。しかし、同じDNA配列上で異なるクロマチン構造が形成・制御されている機構については不明な点が多い。本研究では、これらのクロマチン形成を個別に誘導・制御するために、tet0またはlac0を導入した改変型アルフォイドDNAを作成し、tetR/lacIと各種クロマチン構造変換因子の融合タンパク質のリクルートによるクロマチン形成誘導系を構築した。

研究成果の概要(英文)：At the human centromere, various chromatins (e.g. centromere chromatin, heterochromatin) assemble on the highly repetitive DNA (alphoid DNA). It has been suggested that each chromatin is important for centromere functions, however, the accumulation mechanism of different chromatins on the same DNA and the mechanism of maintenance and regulation of centromere activity are still unknown. From the analyses of a human artificial chromosome (HAC) containing tetracycline operator (tet0), it has been suggested that the balance between various chromatins on centromere directly affected the centromere activity. To analyze the roles of chromatins in detail, we constructed another synthetic alphoid DNA containing lactose operator (lac0). On the tandem array of tet0 / lac0 centromere DNA, various chromatin modifications could be induced individually by the tethering of tetR- or lacI- fusion proteins.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝子・ゲノム動態

キーワード：セントロメア 人工染色体 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

(1) セントロメアは染色体の正確な分配に必須の機能構造である。近年の研究からセントロメア DNA に形成される性質の異なるクロマチン、セントロメアクロマチンとヘテロクロマチンがセントロメア機能に重要な役割を持つことが明らかになっている。セントロメアクロマチンは、分裂期染色体の移動・分配を担うキネトコア構造の基盤であり、ヒストン H3 バリエーションの 1 つ、CENP-A の集合により形成される。一方ヘテロクロマチンにはコヒーシオン蛋白質が集合し、分裂後期直前まで姉妹染色分体の接着を維持している。各クロマチンの形成因子や機能については解析が進められてきているが、同じ DNA 配列上に複数のクロマチンが集合し、セントロメアの構造形成や活性制御に至るメカニズムには、不明な点が多い。解析が困難な理由の一つに、高等真核生物のセントロメアが高頻度反復配列の巨大な領域であることが挙げられる。さらに、セントロメア構造は基本的にエピジェネティックに維持されるため、裸の DNA からクロマチン集合を経てセントロメア機能構造の形成に至る各段階を詳細に解析することはできない。申請者らは、ヒト人工染色体 (HAC) を用いてこれらの問題を克服し、セントロメア機能構造の形成メカニズムの解明を進めて来た。

(2) ヒトのセントロメア反復配列であるアルフォイド DNA をヒト培養細胞へ導入すると、セントロメア結合蛋白質 CENP-B 依存的に HAC が形成される (Ikeno et al, Nat Biotechnol, 1998; Okada et al, Cell, 2007)。HAC は導入した既知の DNA のみから形成され、宿主染色体と同等のセントロメア機能構造を持つ (Tsuduki et al, MCB, 2006)。さらに HAC は宿主染色体とは異なり、クロマチンが集合していない裸の DNA として細胞へ導入された時点から、セントロメア構造形成に至るまでの各段階を詳細に解析できる。申請者らの解析から、HAC のアルフォイド DNA 上にもセントロメアクロマチンとヘテロクロマチンが集合する、アルフォイド DNA 上での過剰なヘテロクロマチン集合はセントロメア形成を阻害する、機能するセントロメアのクロマチン集合バランスを人為的に乱すと、セントロメアが不活性化することが判った (Nakano et al, JCS, 2003; Nakano et al, Dev Cell 2008)。これらの結果から、アルフォイド DNA 上のセントロメアクロマチンとヘテロクロマチンは競合的に形成され、これらの集合バランスがセントロメア機能構造の形成・維持に重要であると示唆された。

(3) 申請者らはアルフォイド DNA の繰り返し単位の一部をテトラサイクリンオペレーター配列 (tetO) と入れ替えて tetO アルフォイド DNA (約 50 kb) を構築し、培養細胞に導入した。得られた tetO HAC には、テトラサイクリンリプレッサー (tetR) 融合蛋白質を特異的に結合できる。tetR と転写抑制因子の融合蛋白質により tetO HAC のアルフォイド DNA にヘテロクロマチンを過剰に誘導し、クロマチン集合バランスを乱した結果、HAC のセントロメアが不活性化された (Nakano et al, Dev Cell 2008)。これらの結果は、クロマチンの集合バランスがセントロメア機能に重要であること、さらに、その詳細な分子メカニズムの解明に、tetO HAC が有効であることを示している。

2. 研究の目的

染色体の均等分配を担うセントロメアでは、繰り返し配列上に複数の性質の異なるクロマチン構造が形成され、セントロメア機能に重要な役割を果たす。各クロマチン構造の形成因子や機能の解析は進められているが、どうやって同じ DNA 配列上に異なるクロマチン構造が形成されるのか、それらクロマチン構造がどのように影響し合っているのかは、不明な点が多い。ヒトセントロメア DNA を培養細胞へ導入して得られるヒト人工染色体 (Human Artificial Chromosome; HAC) は、宿主染色体セントロメアと同等の機能構造を持ち、安定に分配維持される。このような HAC は、巨大で複雑なヒトセントロメアのクロマチン構造と機能の解析にとって、非常に強力なツールである。申請者らの tetO HAC では、HAC 上のクロマチンを一種類に偏らせたり、任意のクロマチン構造を誘導した場合の、セントロメア機能への影響の解析に成功した。本研究では、複数のクロマチン構造形成を個別に誘導・制御可能な次世代の HAC を構築し、セントロメア DNA 上のクロマチン集合バランスが、セントロメア活性を制御する分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

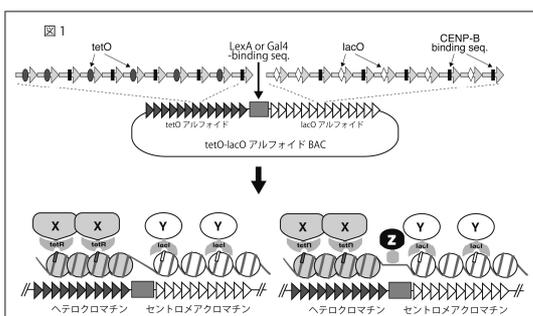
多様なクロマチン構造の誘導を制御できるアルフォイド DNA は、セントロメア機能構造形成と活性制御におけるクロマチン集合バランスの役割を解明するために威力を発揮する。申請者はすでに tetO 配列を含むアルフォイド DNA (tetO アルフォイド DNA) を用いて、クロマチン構造の変換がセントロメア機能に与える影響を明らかにして来た。本研究では、tetO アルフォイド DNA を改良して、

セントロメアクロマチンとヘテロクロマチンの集合バランスを能動的に操作できる系を確立し、セントロメア構造形成メカニズムにおけるクロマチン集合の役割を解析する。

(1) tet0 および lac0 アルフォイド BAC の構築：

アルフォイド DNA の繰り返し単位の一部をテトラサイクリンオペレーター (tet0) あるいはラクトースオペレーター (lac0) 配列と置換したものを (アルフォイド 11mer) を作成する。それぞれをライゲーションにより約 60kb まで伸長し、ベクター上で隣接させて tet0-lac0 アルフォイド DNA を構築する (図 1)。申請者は既に、21 番染色体のアルフォイド 11mer を約 60kb に伸長し、それから安定な HAC を得ている (Ohzeki et al, JCB, 2002)。

また、各アルフォイド DNA の間に組み換え配列 (loxP 等) を挿入しておき、必要に応じて第 3 の蛋白質結合配列 (LexA, Gal4 結合配列等) を組み入れる。lac0 アルフォイド DNA の lacI 結合能とセントロメア蛋白質集合活性は、ChIP (Chromatin Immunoprecipitation; Okada et al, Cell, 2007; Nakano et al, JCS, 2003) 解析により確認する。



(2) tetR および lacI 融合蛋白質発現ベクターの構築および発現株の樹立：

セントロメアクロマチン、ヘテロクロマチン両構造をそれぞれ誘導するために、セントロメア特異的ヒストン H3 バリエーションである CENP-A をリクルートする因子、ヘテロクロマチン蛋白質 (HP1)、各種ヒストン修飾因子 (メチル化酵素、アセチル化酵素) 等を tetR/lacI と融合した蛋白質の発現ベクターを構築する。得られたベクターを培養細胞に導入し安定発現株を樹立する。

(3) クロマチン集合バランス操作系での tet0-lac0 HAC 形成効率の解析：

(1) で得られた tet0-lac0 アルフォイド DNA を (2) で得られた融合蛋白質発現株へ導入する。各アルフォイド DNA は PCR で区別できるので、各クロマチンが予想通り誘導されているかは、ChIP と PCR 解析によって確認する。

クロマチン集合バランスの調節には、ドキシサイクリンや IPTG の添加量で tet0/lac0 配列と tetR/lacI 蛋白質の親和性を調節する、

それぞれ異なる長さの tet0/lac0 アルフォイド DNA を連結させ、集合するクロマチンの領域の長さを制限する、という方法を計画している。様々なクロマチン集合バランスと HAC の形成効率の相関を解析する。

4. 研究成果

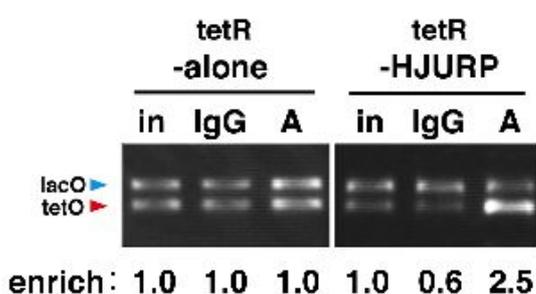
(1) tet0 および lac0 アルフォイド BAC の構築：まず、ヒト 21 番染色体アルフォイド DNA の繰り返し基本単位 (171bp) の一部をテトラサイクリンオペレーター (tet0) あるいはラクトースオペレーター (lac0) 配列と置換したものを人工合成によって作成した。また、各クロマチンの新規形成に重要な役割を果たす CENP-B タンパク質の機能解析を行う目的で、CENP-B の結合配列に変異を導入した tet0 アルフォイドおよび lac0 アルフォイドも同様に合成した。各合成アルフォイド DNA には、宿主染色体アルフォイド DNA と区別して qPCR による定量ができる、tet0 アルフォイドと lac0 アルフォイド、野生型 CENP-B 結合配列アルフォイドと変異型 CENP-B 結合配列アルフォイドの量比を competitive PCR により定量できるように塩基置換を導入した。これによって、各アルフォイド DNA 上のクロマチン構造を ChIP によりより詳細に解析することが可能である。これらの合成 DNA をライゲーションし、より高次の反復単位であるアルフォイド 11mer を作成した。さらにそれらを繰り返しタンデムライゲーションすることで伸長し、約 15kb の連続したアルフォイド DNA を構築した。

(2) tetR および lacI 融合蛋白質発現ベクターの構築：これまでの tet0 HAC を用いた解析から、CENP-A リクルート因子である HJURP、あるいはヒストンアセチル化酵素 (p300 HAT ドメイン、pCAF) のテザリングによって、セントロメアクロマチンが効率よく誘導されることがわかっている (Ohzeki et al, EMBO J, 2012)。また、ヒストンメチル化酵素 (Suv39h1) や転写抑制因子 (Kid-1 silencing domain) のテザリングはヘテロクロマチンを誘導する (Ohzeki et al, EMBO J, 2012; Nakano et al, Dev Cell 2008)。そこで、tetR あるいは lacI と EYFP あるいは mCherry、そして HJURP、p300 HAT domain、Suv39h1、Kid-1 SD のいずれかを融合したタンパク質を発現するウイルスベクターを構築し、これらの発現を蛍光シグナルの観察により確認した。また一部の融合タンパク質については、発現株を用いて実際にクロマチン構造を誘導する

活性を解析した(後述)。

(3) tetR/lacI 融合タンパク質のテザリングによる、クロマチン形成誘導の解析：
融合タンパク質の結合によって、構築した各種改変型アルフォイド DNA 上にクロマチン構造を誘導できるかどうかを解析した。約 15kb の tetO/lacO アルフォイド DNA 混合物を、tetR-EYFP-HJURP、lacI-EYFP-HJURP 発現細胞にそれぞれ導入し、導入アルフォイド DNA 上に形成されたクロマチン構造を ChIP と competitive PCR により定量解析した (図 2)。その結果、HJURP と tetR の融合タンパク質発現株では、tetR アルフォイド DNA に、lacI-HJURP の発現株では lacO アルフォイドに、CENP-A が特異的に集合していることがわかった。

図 2



in: input、IgG: normal IgG、A: CENP-A

申請者は、以上のように実験計画を進めた
が、改変型アルフォイド DNA の伸長の結果、
これまで明らかになっている、HAC 形成に
十分な長さ (30~60kb) のものを得ることが
できず、当初計画していた、クロマチン集
合バランス操作系での tetO-lacO HAC 形
成効率の解析を行うに至らなかった。しか
し、本研究において新たに構築した lacO
アルフォイド DNA はクロマチン誘導系
として十分に機能するものであり、また
このクロマチン構造が、高感度に検出可
能であることを明らかにした。本研究は
所属研究室の者に引き継がれている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kouprina N, Samoshkin A, Erliandri N, Nakano M, Lee HS, Fu H, Lida Y, Aladjem M, Oshimura M, Masumoto H, Earnshaw WC, Larionov V, Organization of synthetic alphoid DNA array in human artificial chromosome (HAC) with a conditional centromere. ACS Synth Biol. 2012, 1(12), 590 - 601

〔学会発表〕(計 1 件)

Nakano M, Ohzeki J, Otake K, Shono N, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H, The analyses of regulation and maintenance mechanisms of centromere structure with chromatin-alterable HAC system, 2012, 第 34 回日本分子生物学会年会、ポスター発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野めぐみ (NAKANO, Megumi)

(公財)かずさ DNA 研究所・ヒトゲノム研究部・細胞工学研究室・研究員

研究者番号: 50542825