

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月1日現在

染色体分配を制御するセントロメアの分子基盤の解明
Molecular architecture of vertebrate centromeres

課題番号：25221106

深川 竜郎 (FUKAGAWA TATSUO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授



研究の概要 生物の生命維持維持機構の理解のためには、生命の設計図である染色体が、正確に分配されるための分子メカニズムを解明する必要がある。我々は、これまで動物細胞を対象として、染色体分配に必須なセントロメアに関する基礎研究を進めてきた。そこで、本研究では、これまで得られた研究成果をベースに、セントロメアの分子基盤の解明や細胞分裂の制御におけるセントロメア機能の解明を目指した研究を行う。

研究分野：遺伝・染色体動態

キーワード：染色体再編・維持、染色体構築・機能・分配、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

生物の生命維持には、ゲノム情報を包括する構造体である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と言った細胞に対する悪影響が生じる（染色体不安定化）。したがって、染色体分配が正確に遂行されるために必要な分子機構を解明することは、遺伝学における本質的かつ重要な課題の一つである。また、染色体不安定化を引き起こす染色体分配機能の異常は、がんの悪性を推し進める原動力であり、染色体分配の分子機構の解明は発がん機構の理解にも、多に貢献すると考えられている。したがって、染色体分配の分子機構の解明を目指した研究は基礎生物学研究に裏付けられた医科学研究として、国内外から高い注目を受けている。

2. 研究の目的

研究代表者の深川は、これまでに、高等動物の染色体分配機構に必須なセントロメア構造の形成機構や細胞周期制御におけるセントロメア機能の解明を目指した研究を精力的に行ってきた（Nature Cell Biol., 2006; Cell, 2008; J. Cell. Biol., 2009; 2011; Cell, 2011; 2012）。特に、世界に先駆けての新規セントロメア構成因子の同定や、各種ノックアウト細胞の表現型解析を通じたセントロメア構成因子の機能解析を進めてきた。本研究では、深川らがこれまでに推進してきたセントロメアに関する基礎研究をベースとして、セントロメアの分子基盤の解明

を目的としている。

3. 研究の方法

具体的には、I) 染色体工学を活用したセントロメアの形成機構の解明、II) セントロメア構成タンパク質の試験管内再構成、III) セントロメアタンパク質複合体の原子レベルでの構造基盤の解明の3課題の研究を平行して進める。以上の研究の成果がこれまでの知識に加わることによって、染色体分配を制御するセントロメア構造の分子基盤がより明らかになると期待される。

4. これまでの成果

I) 染色体工学を活用したセントロメアの形成機構の解明

本研究では、Cre-LoxP のシステムを活用して、実験的にセントロメア領域を取り除き、その状態でも生育し得る細胞を取得することで、ネオセントロメアを持つ細胞の作出を目指した。その結果、約130種のネオセントロメアを保有する細胞の取得に成功した (Shang et al., Dev. Cell, 2013)。さらに、ネオセントロメアの詳細を ChIP-seq などで解析した。

バクテリアの LacI-LacO の系を活用して、各種セントロメアタンパク質を非セントロメア領域である LacO に異所局在化させ、本来のセントロメアを Cre-LoxP のシステムで取り除き、LacO 領域に人工動原体を作ること成功した (Hori et al., J. Cell Biol., 2013; Fukagawa et al., Dev. Cell, 2014)。

25年度に確立したネオセントロメアを作成する実験系を活用してセントロメアに特異的なエピジェネティックマーカーの探索

を試みた。その結果、セントロメアのヌクレオソーム中のヒストン H4 の 20 番目のリジンがモノメチル化 (H4K20me1 化) されることを見いだした (Hori et al., *Dev Cell*, 2014)。またこの H4K20me1 化をセントロメア特異的に減少させる実験系を開発して、このメチル化が CENP-T や CENP-H のセントロメア局在に必須であり、動原体形成に重要な働きを担っていること示した。

II) セントロメア構成タンパク質の試験管内再構成

セントロメアの形成機構を理解するための最終的なゴールは、試験管内で機能的なセントロメア複合体を再構成することである。そのためには各サブ複合体の試験管内再構成から始める必要がある。これまで幾つかのサブ複合体の再構成に成功しているが、本研究では、CENP-T-W-S-X 複合体と CENP-A を含むダイヌクレオソームとの再構成を試み成功した (Takeuchi et al., *Nucl. Acids Res.*, 2014)。再構成された複合体は、電子顕微鏡によって球状の構造が確認できた。

また、CENP-T の N 末端側と Ndc80 複合体の再構成を目指し、完全長あるいは適切な長さの CENP-T N 末端ペプチドを調製して CENP-T-Ndc80 複合体の再構成に成功した (Nishino et al., *EMBO J.*, 2013)。

CENP-L と -N がヘテロ 2 量体を形成することがわかり、CENP-L-N ヘテロ 2 量体の精製に成功した。さらに、CENP-L-N ヘテロ 2 量体と CENP-C との複合体の再構成に成功した (Nagpal et al. *Mol. Biol. Cell*, 2015)。この成果は、より大きな複合体の再構成への大きな手がかりとなる。

III) セントロメアタンパク質複合体の原子レベルでの構造基盤の解明

上記 II) の研究過程で、高度に精製されたタンパク質複合体が調製できる。それらの生化学的な解析と平行して、原子レベルでの構造決定を同時に試みている。はじめに、CENP-T-Ndc80 複合体の構造解析に着手し、CENP-T の 72 番目と 88 番目のセリンをアスパラギン酸へ置換した CENP-T_{72D82D} と Ndc80 複合体の Sps24-Spc25 部分を再構成してその結晶を得ることに成功した。結晶を X 線構造解析した結果、高解像度の構造を得ることに成功した (Nishino et al., *EMBO J.*, 2013)。

CENP-L-N と CENP-C の結合状態について NMR 解析を行い、CENP-C の結合部位が同定できた (Nagpal et al., *Mol. Biol. Cell*, 2015)。この解析では、CENP-C の 166-224 アミノ酸領域が間期特異的に CENP-L-N と結合することを見出し、その結合は、細胞分裂期には失われることも明らかにできた。

5. 今後の計画

実験的にネオセントロメアを樹立すること、および人工的な動原体を作成することを目標とし、それを達成したので、次の 2 点を

行う。a) ネオセントロメアを活用したヒストン修飾の同定とその意義の解明 b) 人工動原体を活用した動原体形成の分子機構の解明。

セントロメア再構成の計画では、CENP-C-Mis12 複合体あるいは、CENP-H 複合体の再構成を目指す。生化学的な特性の解析に加えて、光ピンセットなどを活用した生物物理的な実験も行う。

CENP-C-Mis12 複合体、あるいは CENP-H 複合体が再構成できれば、それらの構造解析を目指したい。X 線結晶構造解析に加えて、電子顕微鏡を用いた構造解析を目指す。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Harsh Nagpal, 他 4 名, and Tatsuo Fukagawa. "Dynamic changes in the CCAN organization through CENP-C during cell-cycle progression."

Mol. Biol. Cell 26, 3768-3776 (2015).

2. Marinela Perpelescu, 他 7 名, and Tatsuo Fukagawa. "HJURP is involved in the expansion of centromeric chromatin."

Mol. Biol. Cell 26, 2742-2754 (2015).

3. Tatsuo Fukagawa, and William C. Earnshaw. "The centromere: chromatin foundation for the kinetochore machinery."

Dev. Cell 30, 496-508 (2014).

4. Tetsuya Hori, 他 10 名, and Tatsuo Fukagawa. "Meiosis-specific cohesin mediates homolog recognition in mouse spermatocytes." Histone H4 Lys 20 mono-methylation of the CENP-A nucleosome is essential for kinetochore assembly." *Dev. Cell* 29, 740-749 (2014).

5. Kozo Takeuchi, 他 7 名, and Tatsuo Fukagawa. "The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA."

Nucl. Acids Res. 42, 1644-1655 (2014).

6. Wei-Hao Shang, 他 11 名, and Tatsuo Fukagawa. "Chromosome Engineering Allows the Efficient Isolation of Vertebrate Neocentromeres." *Dev. Cell* 24, 635-648 (2013).

7. Tatsuya Nishino, 他 4 名, and Tatsuo Fukagawa. "CENP-T provides a structural platform for outer kinetochore assembly."

EMBO J. 32, 424-436 (2013).

8. Tetsuya Hori, Wei-Hao Shang, Kozo Takeuchi, and Tatsuo Fukagawa. "The CCAN recruits CENP-A to the centromere and forms the structural core for kinetochore assembly."

J. Cell Biol. 200, 45-60 (2013).

ホームページ等

http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/fukagawa/index_j.html