

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440190

研究課題名(和文) 染色体安定性を保障するセントロメア形成に必要なヒストン修飾機構

研究課題名(英文) Mechanism of histone modification, which is essential for the centromere formation and contributes to maintenance of chromosome stability

研究代表者

堀 哲也 (HORI, Tetsuya)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：70550078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：動原体構築を制御する仕組みの解明を目的として、セントロメア領域に特異的なヒストン修飾を同定し、その役割について解析を行なった。網羅的なChIP-seq解析を行い、H4K20のモノメチル化修飾(H4K20me1)がセントロメアに存在することを発見し、この修飾が機能的な動原体構築に必須であることを明らかにした。また、H4K5とH4K12のアセチル化修飾(H4K5ac, H4K12ac)が、クロマチンに導入される前のCENP-A-ヒストンH4複合体に特異的に入ることを発見し、これら修飾がCENP-Aのセントロメア領域への正確な取り込み過程に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanism of kinetochore assembly, we tried to identify centromere-specific histone modifications and examined their significance on the centromere function. We used ChIP-seq analysis to examine centromere-specific histone modifications at chicken centromeres, which lack highly repetitive sequences. We found that H4K20 monomethylation (H4K20me1) is enriched at centromeres. We conclude that H4K20me1 modification of CENP-A nucleosomes contributes to functional kinetochore assembly. We also found that H4K5 and H4K12 acetylation (H4K5ac, H4K12ac) primarily occur within the pre-nucleosomal CENP-A-H4 complex, before centromere deposition. Based on the genetic and biochemical analyses, we conclude that H4K5ac and H4K12ac facilitate efficient CENP-A deposition into centromeres.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：セントロメア ヒストン修飾 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

染色体分配に重要な働きを担う動原体は、複数のタンパク質で構成された巨大な構造体であり、染色体上のセントロメアと呼ばれるゲノム領域に形成される。セントロメア領域は、DNA 一次配列によっては規定されていないが、連続した細胞分裂の過程を通じて、その領域情報は維持されている。DNA 一次配列によって規定されていないことから、その領域のクロマチン内に存在するエピジェネティックな情報が動原体の維持・継承に関与していると考えられている。また、セントロメアのクロマチン領域には、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 が存在し、動原体の形成・維持に関わるエピジェネティックマーカーと考えられている (Chromosome Res., 2012)。しかしながら、CENP-A の存在のみでは機能的な動原体は構築できず (J. Cell Sci., 2001)、クロマチン領域の規定から機能的な動原体形成に至る分子的なメカニズムについては不明な点が多い。我々は、ニワトリ DT40 細胞を用いた染色体工学的手法を活用して本来のセントロメアを特定の染色体から除去後、代わりにセントロメア関連タンパク質を異所局在させることにより、人工動原体を誘導することに成功した (J. Cell Biol., 2013)。この研究から、動原体タンパク質は微小管との結合に直接関与する因子群と特異的なクロマチン構築に関与する因子群で構成されていることを明らかにした。また、この研究と平行して、染色体工学技術を活用して DT40 細胞内で新規セントロメア (ネオセントロメア) を実験的に誘導することにも成功し (Dev. Cell, 2013)、このネオセントロメアを保持する細胞株を用いた実験から、セントロメア領域に特異的なヒストン修飾を複数見出した。本研究では、ニワトリ DT40 細胞を用いた細胞生化学的手法、遺伝子改変技術および染色体工学技術を活用し、代表者らが新たに見出したセントロメア領域に特異的なヒストン修飾が、どのように動原体の構築過程で機能するかを明らかにする。本研究を行なうことで、動原体の構築過程におけるヒストン修飾の役割や制御機構が明らかとなり、動原体構築を制御する新規概念の発見が期待される。

2. 研究の目的

遺伝情報は安定に次世代細胞へ維持・継承されることが必須であり、その過程において動原体は重要な役割を担う。動原体が形成されるセントロメアのゲノム領域には、ヒストン H3 のバリエーションである CENP-A が存在し、セントロメアに特異的なクロマチン領域を規定していると考えられている。しかし、機能的な動原体の形成に至る詳しい分子メカニズムは、明らかになっていない点が多い。本研究では、ニワトリ DT40 細胞を用いた細胞生化学的手法、遺伝子改変技術および染色体工学技術を活用し、セントロメアに特異的な

クロマチン構造の規定から機能的な動原体形成に至る分子的なメカニズムの解明を目指す。特に、代表者らが見出したセントロメア領域に特異的なヒストン修飾が、動原体形成過程で機能するメカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

代表者らは、染色体工学技術を活用して細胞内に実験的にネオセントロメア誘導することに成功し (Dev. Cell, 2013)、この細胞株を用いた実験によりセントロメア領域に特異的な複数のヒストン修飾を新たに見出した。本研究では、動原体の構築過程でこれらヒストン修飾が機能するメカニズムやその意義の解明を目指し、(1) クロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーによる解析 (ChIP-seq) によるセントロメア特異的なヒストン修飾の詳細なプロファイルの解析、(2) 細胞生化学的方法によるセントロメア特異的なヒストン修飾の分子基盤の解析、(3) 遺伝学的手法によるセントロメア領域に特異的なヒストン修飾が導入される意義の解明、(4) セントロメア領域に特異的なヒストン修飾を導入する因子の同定、を中心に研究を行なった。

4. 研究成果

ニワトリ DT40 細胞を用いて、反復配列を持たないセントロメアおよび実験的に誘導したネオセントロメアを対象として、各種ヒストン修飾抗体を利用した網羅的な ChIP-seq 解析を行い、セントロメア領域に特異的なヒストン修飾を複数見出した。これらヒストン修飾がセントロメアクロマチン形成および動原体構築の過程において重要な機能を担っていることを明らかにした (Nature Commun., 2016; Dev Cell, 2014)。また、これらヒストン修飾が導入されるメカニズムについて、修飾を導入する酵素の同定および修飾酵素の遺伝子破壊株を用いた遺伝学的な解析を行った。これら知見は、将来的にヒストン修飾を標的とした抗がん剤などの新規薬剤開発研究への応用が期待される。

(1) セントロメア領域に特異的な H4K20me1 修飾の同定と機能解析

ニワトリ DT40 細胞を用いて、反復配列を持たないセントロメアおよびネオセントロメアを対象として、各種ヒストン修飾抗体を利用した網羅的 ChIP-seq 解析を行ない、セントロメア特異的なヒストン修飾「ヒストン H4 の 20 番目のリジン残基のモノメチル化

(H4K20me1)」を発見した。この H4K20me1 修飾について、ChIP-seq プロファイルの比較解析を行ったところ、セントロメア特異的なヒストンである CENP-A とピークパターンが一致する結果を得た。さらに、生化学的解析を行った結果、細胞周期の G1 期初期に CENP-A がクロマチンに取り込まれた後、CENP-A ヌクレオソーム内の H4K20 が速やかにモノメチル

化されることが明らかとなった。この H4K20me1 修飾の役割を解析するため、H4K20me1 修飾をセントロメア領域から特異的に除去できる実験法を開発した。まず、H4K20me1 修飾の脱メチル化酵素 (PHF8) とセントロメアタンパク質 CENP-U との融合タンパク質を発現させ、セントロメア領域へ特異的に局在させた。その結果、セントロメア領域から特異的に H4K20me1 修飾を除去することに成功した。セントロメア領域から H4K20me1 修飾を除去した細胞では、動原体を構成するタンパク質である CENP-H および CENP-T の局在が阻害され、機能的な動原体の形成が進まず、染色体分配の異常が生じた。これらの結果から、「H4K20me1 修飾は、セントロメア領域に取り込まれた後、機能的な動原体を形成する分子スイッチとして機能する」というモデルを提出した(図 1、Dev. Cell,

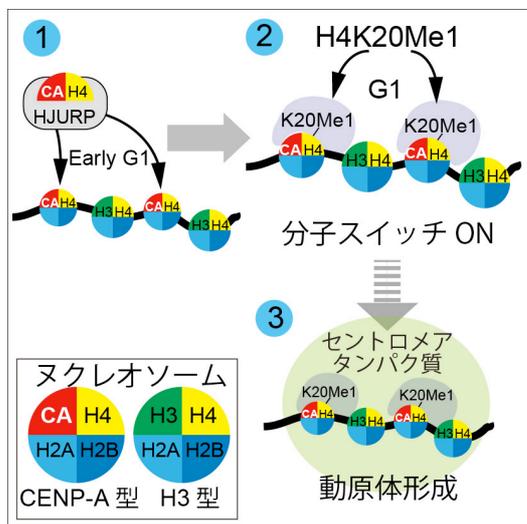


図 1、H4K20me1 修飾による機能的な動原体形成のモデル

2014)。この成果は国際的にも高く評価され、掲載誌の表紙に選ばれた。また、Nature Rev. MCB 誌に Research Highlights としても取り上げられた。H4K20me1 修飾の導入に關与が示唆されたモノメチル化修飾酵素 (HMTx) について、ニワトリ DT40 細胞を用いて条件的遺伝子破壊株を樹立した。HMTx の遺伝子破壊を行った結果、セントロメア領域の H4K20me1 修飾が著しく減少したことから、HMTx がセントロメア領域の H4K20me1 修飾を導入する酵素であることが明らかとなった。今後、セントロメア領域への H4K20me1 修飾の導入メカニズムの解明に向け、HMTx とセントロメア関連タンパク質との相互作用を中心に解析を進める計画である。

(2) セントロメア領域に存在する H4K5ac および H4K12ac 修飾の同定と機能解析
 (1)と同様に、ニワトリ DT40 細胞を用いた網羅的 ChIP-seq 解析により、CENP-A ピークと

一致するセントロメアに特異的な 2 種のヒストン修飾「ヒストン H4 の 5 番目、12 番目のリジン残基のアセチル化 (H4K5ac, H4K12ac)」を見出した。生化学的解析を行った結果、これら修飾は、主にクロマチンへ取り込まれる前の CENP-A-ヒストン H4 複合体に導入される修飾であることが明らかとなった。その生物学的意義を明らかにすることを目的に、遺伝学および細胞生物学的解析を行った。まず、ヒストン H4 の 5 番目、12 番目のリジン残基にアルギニン変異を導入し、アセチル化修飾を阻害する実験を行ったところ、セントロメア領域への CENP-A の効率的な取り込みが阻害された。さらに、これら修飾を導入するアセチル化酵素複合体 (RbAp48-Hat1) を同定し、その構成因子 RbAp48 の遺伝子破壊を行ったところ、セントロメア領域への CENP-A の取り込みが阻害された。これら結果から、CENP-A-ヒストン H4 複合体に導入される H4K5ac, H4K12ac 修飾は、セントロメア領域への CENP-A の取り込み過程に必須な修飾であると結論し、報告した(図 2、Nature Commun., 2016)。

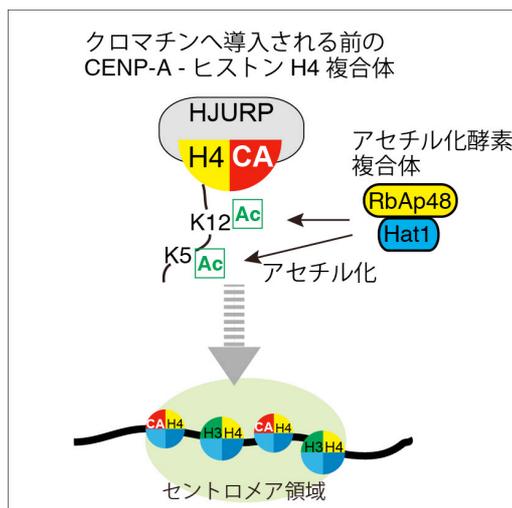


図 2、H4K5ac, H4K12ac は、セントロメアへの正確な CENP-A の取り込み過程に必須な修飾

今後、これら H4K5ac, H4K12ac 修飾の構造基盤の解明に向け、試験管内における相互作用実験を中心に解析を進める計画である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Hori, T., Kagawa, N., Toyoda, A., Fujiyama, A., Misu, S., Monma, N., Makino, F., Ikee, K., and Fukagawa, T., "Constitutive centromere-associated network (CCAN) controls centromere drift in vertebrate cells", J. Cell Biol. 216, 2017, 101-113. 査読有り DOI: 10.1083/jcb.201605001.
- ② Shang, W.-H., Hori, T., Westhorpe, F., Godek, K., Toyoda, A., Misu, S., Monma,

- N., Ikeo, K., Carroll, C., Takami, Y., Fujiyama, A., Kimura, H., Straight, A., Fukagawa, T., "Acetylation of histone H4 Lysine 5 and 12 is required for CENP-A deposition into centromeres.", *Nature Communications* 7, 2016, 13465. 査読有り
DOI: 10.1038/ncomms13465.
- ③ Abe, T., Kawasumi, R., Arakawa, H., Hori, T., Shirahige, K., Losada, A., Fukagawa, T., Branzei, D., "Chromatin determinants of the inner-centromere rely on replication factors with functions that impart cohesion.", *Oncotarget* 7, 2016, 67934-67947. 査読有り
DOI: 10.18632/oncotarget.11982.
- ④ Kusakabe, M., Oku, H., Matsuda, R., Hori, T., Muto, A., Igarashi, K., Fukagawa, T., Harata, M., "Genetic complementation analysis showed distinct contributions of the N-terminal tail of H2A.Z to epigenetic regulations.", *Genes Cells* 21, 2016, 122-35. 査読有り
DOI: 10.1111/gtc.12327.
- ⑤ Furuta, M., Hori, T., Fukagawa, T., "Chromatin binding of RCC1 during mitosis is important for its nuclear localization in interphase.", *Molecular Biology of the Cell* 27, 2016, 371-81. 査読有り
DOI: 10.1091/mbc.E15-07-0497.
- ⑥ Samejima, I., Spanos, C., Alves, F.L., Hori, T., Perpelescu, M., Zou, J., Rappsilber, J., Fukagawa, T., Earnshaw, W.C., "Whole-proteome genetic analysis of dependencies in assembly of a vertebrate kinetochore.", *J. Cell Biol.* 211, 2015, 1141-1156. 査読有り
DOI: 10.1083/jcb.201508072.
- ⑦ Nagpal, H., Hori, T., Furukawa, A., Sugase, K., Osakabe, A., Kurumizaka, H., Fukagawa, T., "Dynamic changes in CCAN organization through CENP-C during cell-cycle progression.", *Molecular Biology of the Cell* 26, 2015, 3768-3776. 査読有り
DOI: 10.1091/mbc.E15-07-0531.
- ⑧ Perpelescu, M., Hori, T., Toyoda, A., Misu, S., Monma, N., Ikeo, K., Obuse, C., Fujiyama, A., Fukagawa, T., "HJURP is involved in the expansion of centromeric chromatin.", *Molecular Biology of the Cell* 26, 2015, 2742-54. 査読有り
DOI: 10.1091/mbc.E15-02-0094.
- ⑨ Hori, T. (12人中1番目), "Histone H4 Lys 20 Monomethylation of the CENP-A Nucleosome Is Essential for Kinetochore Assembly.", *Dev. Cell* 29, 2014, 740-749. 査読有り
DOI: 10.1016/j.devcel.2014.05.001.
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 堀 哲也, "セントロメアクロマチンの維持メカニズム", 2017, 1/11~13, 第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会, かずさアカデミアホール (千葉県木更津市)
- ② Hori, T., "Dynamic Epigenetic Drift of Vertebrate Centromere", 2016, 11/30~12/02, 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ③ 西村浩平, "ネオセントロメア形成領域における染色体3D構造", 2016, 11/30~12/02, 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ④ 牧野文信, "クライオ電顕によるCENP-H複合体の構造解析" 2016, 11/30~12/02, 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑤ Hara, M., "Regulation of the kinetochore protein network", 2016, 11/30~12/02, 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑥ Hori, T., "Dynamic Centromere Drift in Vertebrate Cells", 2016, 7/21~25, The 12th International Congress of Cell Biology, プラハ (チェコ)
- ⑦ Hori, T., "Centromere Chromatin Dynamics in the Vertebrate Cells", 2015, 12/01~04, 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会合同大会, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
- ⑧ Nagpal, H., "Dynamic change of CCAN organization during the cell cycle", 2015, 12/01~04, 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会合同大会, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
- ⑨ 浅野有美, "ニワトリにおけるゲノムワイドなエピジェネティックスリプログラミング", 2015, 12/01~04, 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会合同大会, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
- ⑩ 堀 哲也, "人工セントロメアを創ると分かるセントロメアの形成メカニズム", 2015, 11/12~13, 「細胞を創る」研究会 8.0, 大阪大学銀杏会館 (大阪府吹田市)
- ⑪ Hori, T., "Chromatin Dynamics of Vertebrate Centromere", 2015, 8/23~26, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路夢舞台 (兵庫県淡路市)

- ⑫ Hori, T., "H4K20me1 of the CENP-A nucleosome is essential for centromere formation", 2014, 11/25～27, 第37回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑬ Hori, T., "Molecular switch for kinetochore assembly", 2014, 9/17～19, 第86回日本遺伝学会大会, 長浜バイオ大学 (滋賀県長浜市)
- ⑭ Hori, T., "H4K20me1 of the CENP-A nucleosome is essential for kinetochore assembly", 2014, 7/27～8/01, Gordon research conference on centromere biology, ボストン (アメリカ)

[その他]

ホームページ等

- ① 大阪大学生命機能研究科 研究成果
「セントロメアは動くことができる」
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/events/achievement/hori-fukagawa-20161209/>
- ② 大阪大学生命機能研究科 研究成果
「遺伝子が次世代へ伝わるメカニズムを解明 - 遺伝子伝達異常を防ぐ抗がん剤開発に期待 -」
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/events/achievement/shang-fukagawa-20161104/>
- ③ 大阪大学生命機能研究科 研究成果
「セントロメアタンパク質の細胞周期におけるダイナミックな構成変化」
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/events/achievement/nagpal-fukagawa-20150909/>
- ④ 国立遺伝学研究所 プレスリリース
「染色体のセントロメア形成に関わる分子スイッチを発見」
<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/1468/1527.html>
- ⑤ 国立遺伝学研究所 Close-up! インタビュー
「染色体の「眼」に、仕上げのひと筆 - セントロメア形成のスイッチとなるヒストン修飾を発見」
<http://www.nig.ac.jp/section/intindex/1531.html>
- ⑥ Hori et al. *Developmental Cell*, 2014
の成果について、掲載誌の表紙に取り上げられた。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 哲也 (HORI Tetsuya)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号：70550078