

染色体分配に必須なセントロメアの形成機構の解明

Molecular mechanisms for centromere formation

課題番号：17H06167

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（4行以内）

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ことが目的である。我々は、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。本研究では、これまで得られた研究成果をベースに、遺伝学、細胞生物学、ゲノム生物学、構造生物学を用いてセントロメアの形成機構の解明を目指す。

研究分野：ゲノム動態学

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

生物が生命を維持するためには、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・増殖される必要がある。染色体の分配過程に異常が生じると、染色体構造や染色体数が変化して（染色体不安定化）、細胞に対する悪影響が生じる。したがって、染色体の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。

セントロメアに関する研究は、長い歴史と蓄積された成果があるものの、セントロメアを構成するタンパク質が同定されたのが、約十年前であり、それが分子レベルでどのように集合して巨大複合体を構成するのか未知な点が多い。

2. 研究の目的

そこで本研究では、セントロメア巨大複合体の形成機構を明らかにする目的で、代表者の深川らがこれまで推進してきたセントロメアに関する基礎研究をベースに、それをさらに発展させて、セントロメアの分子基盤の理解を目指す。

3. 研究の方法

大きく以下3つの計画を平行に行っている。
D) 細胞周期に依存したセントロメア構成タンパク質ネットワークの理解

セントロメアを構成するタンパク質群は、安定でなく、細胞周期の進行に伴い動的に、タンパク質間の相互作用ネットワークが変化していることを、我々は、見出している。

本研究では、どのようにそのネットワークが変化しているのか、その分子基盤を明らかにする。具体的には、セントロメアタンパク質のリン酸化に注目し、リン酸化を通じたネットワーク制御の実体を明らかにする。

II) セントロメアが形成されるゲノム基盤の理解

深川らは、反復配列を含まないネオセントロメアを活用して、セントロメアに特異的なヒストン修飾を同定してきた。本研究では、セントロメアが形成されるために必要なゲノム基盤を理解するために、セントロメアのエピジェネティック情報や、それらがどのようにセントロメア形成に関与しているのかを明らかにする。

III) 電子顕微鏡を活用したセントロメアタンパク質複合体の構造基盤の理解

セントロメア複合体の動的基盤を理解するためには、*in vitro* で再構成したスナップショットの原子構造の情報は、きわめて重要である。本研究では、セントロメアの複合体構造について、クライオ電子顕微鏡を用いて解析する。

4. これまでの成果

I) 細胞周期に依存したセントロメア構成タンパク質ネットワークの理解

CENP-C の各ドメインの局在性を評価した結果、ニワトリ CENP-C の N 末端領域 (aa 601-864) は、M 期にのみ特異的にセントロメアに局在することが判明した。次にその N 末端領域中に CENP-C の M 期特異的な局在を制御する配列を探索した結果、651 番目のス

レオニンが CDK1 によりリン酸化され、このリン酸化が、M 期特異的なセントロメア局在をコントロールしていることを明らかにできた。また、内在性の CENP-C と 651 番目のスレオニンをアラニンに置換した CENP-C_T651A へ置き換えた DT40 細胞を作成し、このリン酸化の重要性を培養細胞内でも示すことができた。これらの内容は J. Cell Biol. (Watanabe et al. J. Cell Biol., 2019)に発表した。

CCAN タンパク質による微小管結合タンパク質複合体である Ndc80 複合体がのリクルート機構の解明を試み、Ndc80 複合体は、主に CENP-T によってリクルートされ、CENP-C 側には少量の Ndc80 複合体が局在していることが明らかになった。これらの内容は Nature Cell Biol. (Hara et al. Nature Cell Biol., 2018)に発表した。

II) セントロメアが形成されるゲノム基盤の理解

KNL2 という CENP-A のセントロメアの取り込みに重要な働きを担うタンパク質に CENP-C に似たドメインがあることを見出した。その領域を欠損させたタンパク質を発現させた細胞を用いて解析した結果、KNL2 が CENP-C に似たドメインを介してセントロメア上に存在する古い CENP-A と結合してセントロメアに存在し、新しい CENP-A の取り込みの目印になっていることを見出した。この結果は、Dev. Cell (Hori et al. Dev. Cell, 2017)に発表した。また、セントロメアの位置が動くこと (Hori et al. J. Cell Biol., 2017)や、反復配列のないセントロメアでは、セントロメアが遠く離れたヘテロクロマチン領域と遠距離の相互作用することなどを 4C、Hi-C などのゲノム解析手法を用いて明らかにして発表した (Nishimura et al. J. Cell Biol., 2019)。

III) 電子顕微鏡を活用したセントロメアタンパク質複合体の構造基盤の理解

CENP-A を含むヌクレオソームと CENP-C や CENP-N の複合体構造の解析についてクライオ電子顕微鏡を活用して行い、CENP-C を含む CENP-A ヌクレオソームの構造を 4.2Å の解像度で決定した (論文投稿準備中)。

5. 今後の計画

上記 3 つの研究計画は、順調に進んでおり、計画通りに研究を遂行する。特に I) 細胞周期に依存したセントロメア構成タンパク質ネットワークの理解 などについては、当初の目標の研究は終了したが、さらに研究をすすめ、当初の目標を超える成果を目指したい。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Reito Watanabe, 他 5 名, and Tatsuo Fukagawa. "CDK1-mediated CENP-C

phosphorylation modulates CENP-A binding and mitotic kinetochore localization."

J. Cell Biol. 218, 4042-4062 (2019).

2. Masatoshi Hara, and Tatsuo Fukagawa. "Centromere maintenance during DNA replication.."

Nature Cell Biol. 21, 669-671 (2019).

3. Yasuhiro Arimura, 他 4 名, Tatsuo Fukagawa, and Hitoshi Kurumizaka. "The CENP-A centromere targeting domain facilitates H4K20 monomethylation in the nucleosome by structural polymorphisms."

Nature Commun. 10, 576 (2019).

4. Kohei Nishimura, 他 3 名, and Tatsuo Fukagawa. "3D genomic architecture reveals that neocentromeres associate with heterochromatin regions."

J. Cell Biol. 218, 4042-4062 (2019).

5. Masatoshi Hara, 他 3 名, and Tatsuo Fukagawa. "Multiple phosphorylations control recruitment of the KMN network onto kinetochores."

Nature Cell Biol. 20, 1378-1388 (2018).

6. Masatoshi Hara, and Tatsuo Fukagawa. "Kinetochore assembly and disassembly during mitotic entry and exit."

Curr Opin. Cell Biol. 562, 73-81 (2018).

7. Tetsuya Hori, 他 6 名, and Tatsuo Fukagawa. "Association of M18BP1/KNL2 with CENP-A Nucleosome Is Essential for Centromere Formation in Non-mammalian Vertebrates."

Dev. Cell 42, 181-189 (2017).

8. Kohei Nishimura, and Tatsuo Fukagawa.

"An efficient method to generate conditional knockout cell lines for essential genes by combination of auxin-inducible degron tag and CRISPR/Cas9."

Chromosome Res. 25, 253-260 (2017).

9. Giulia Vargiu, 他 3 名, Tatsuo Fukagawa, and William C. Earnshaw. "Stepwise unfolding supports a subunit model for vertebrate kinetochores."

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 114, 3133-3138 (2017).

7. ホームページ等

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