別紙４

報告番号	※　甲　第　　号

主　論　文　の　要　旨

論 文 題 目　セントロメアタンパク質 CENP-B が関わる反復 DNA のクロマチン制御機構の解析

氏　　名　大竹　興一郎

論　文　内　容　の　要　旨

セントロメアは染色体分配において必須な役割を担うゲノム上の機能部位である。セントロメアのヌクレオソームには、この領域特異的なヒストン H3 バリアントである CENP-A が含まれることが明らかにされている。CENP-A クロマチンは、100 を超える多くのセントロメアタンパク質の集合に直接関わるエピジェネティックなキーマーカーである。

セントロメア上のヒストン修飾状態は、CENP-A の集合に重要な役割を果たしている。ヒストン H3 の Lys4 と Lys36 のメチル化は CENP-A クロマチン周辺部で検出される。H3K4me2 は CENP-A デポジッション因子 HJURP の集合に関与しており、周囲のヘテロクロマチンのセントロメアへの広がりを抑えている。ヒトセントロメアでは、CENP-A は、alpha-satellite DNA (alphoid DNA: 以下アルフォイド DNA)と呼ばれる繰り返し配列からなる巨大領域の一部に集合している。CENP-A クロマチンに隣接する satellite DNA 領域(ペリセントロメア)のほとんどは、Suv39h1 による H3K9me3 化やこれらと相互作用する HP1 が集合したヘテロクロマチンによって占められている。ヘテロクロマチンは、細胞分裂時の姉妹染色分体間の接着を最後まで維持することで染色体安定分配に関与することが報告されている。このように、セントロメアクロマチンとヘテロクロマチンは共に、正確な染色体分配には必要である。

後生動物における唯一のセントロメア配列特異的な結合タンパク質として知られている CENP-B は、その N 末端側の DNA binding domain(DBD)を介して、ヒトではアルフォイド DNA の繰り返し配列中に出現する 17bp の CENP-B box 配列に結合する。アルフォイド DNA をヒト線維肉腫細胞 HT1080 へ導入すると、細胞分裂において宿主染色体と同様に分配・維持されるヒト人工染色体(HAC)が形成される。しかしながら、CENP-B はすでに確立されているセントロメアの維持には必ずしも必要ではない。Y 染色体のアルフォイド DNA やネオセントロメアでは、CENP-B や CENP-B box は検出されない。更に、CENP-B ノックアウトマウスは少なくとも 1 世代は生存可能である。

近年の研究から、CENP-B は、その N 末端 DBD で CENP-A ヌクレオソームと、C 末端側の領域で CENP-C と相互作用することでキネトコア構造の安定化を助けることが明らかとなった。それゆえ、CENP-B は新規セントロメア形成だけではなく、セントロメアの維持においても重要な働きを持つと考えられる。CENP-A に関わる機能とは対照的に、CENP-B はヘテロクロマチン化も促進する。

ヒトアルフォイド DNA が染色体腕部に挿入された CENP-B ノックアウト MEF 細胞では、CENP-B の発現により、Suv39h1 を介してアルフォイド DNA 上の H3K9 のメチル化を増加させた。

tetR 結合配列 tetO を挿入し人工合成したアルフォイド DNA(alphoid^{tetO})からなる HAC(alphoid^{tetO}-HAC)を使った研究では、tetR 融合ヘテロクロマチン関連因子の HAC へのテザリングは、人工染色体上の CENP-A 集合を阻害することが明らかにされた。このように、CENP-B は、CENP-A クロマチンと更にこれとは対立するヘテロクロマチンのいずれのクロマチン状態をも同じアルフォイド DNA 上の長い領域内にエピジェネティックに集合させることが可能である。しかし、このような “双方向性” のクロマチン状態が CENP-B によってどのように形成されるかについての基本的なメカニズムは不明なままである。

本研究では、先ず、CENP-B の機能を解明するために、相互作用の有無を蛍光顕微鏡観察に基づく解析(FMIT assay)により、各 CENP-B のサブドメインによってクロマチン上へ集合するタンパク質の同定を進めた。その結果、ヘテロクロマチン化を促進する Suv39h1(Closed)だけではなく、新たに Open クロマチン関連の因子やセントロメアタンパク質など、多くの因子の集合が CENP-B の酸性領域を介して促進されることが明らかとなった。同定因子の一つ、H3K36 メチル基転移酵素 ASH1L は、HeLa 細胞内の alphoid^{tetO}-HAC への tethering で CENP-A 集合量を増加させた。また、ノックダウンではアルフォイド DNA 上のヘテロクロマチン集合が増加し、CENP-A 集合が減少した。更に、HT1080 細胞でのノックダウンでは導入されたアルフォイド DNA 上の CENP-A の新規集合レベルが減少した。ASH1L は、アルフォイド DNA 上への開いたクロマチン状態の形成を促進し、過剰なヘテロクロマチン化を回避することによって、CENP-A 集合に対して許容的な状態を作りだす因子と考えられる。一方、HP1 は HAC 上の CENP-A 集合を減少させた。つまり、CENP-B は、CENP-A 集合に対し逆の効果を持つ因子を、その酸性領域を介してアルフォイド DNA 上に集合させていることが明らかとなった。興味深いことに、ASH1L と HP1 は相互に排他的な集合を示し、セントロメア上でこれらの因子の集合を偏らせることは染色体分配の安定性を低下させた。

本研究で得られた結果から、CENP-B の結合はアルフォイド DNA 上に異なる性質の因子を複数集合させることにより、“双方向性” のクロマチン状態を作り出していることが明らかとなった。