

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

名古屋大学大学院 理学研究科 (生命理学専攻)

大竹 興一郎

目次

主論文

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

要旨	．．．	3
序論	．．．	4
結果	．．．	7
考察	．．．	17
材料と方法	．．．	21
謝辞	．．．	25
引用文献	．．．	26
Figure	．．．	39

副論文

CENP-B creates alternative epigenetic chromatin states permissive for CENP-A or heterochromatin assembly

参考論文

Human artificial chromosome: Chromatin assembly mechanisms and CENP-B

KAT7/HBO1/MYST2 Regulates CENP-A Chromatin Assembly by Antagonizing Suv39h1-Mediated Centromere Inactivation

CENP-C and CENP-I are key connecting factors for kinetochore and CENP-A assembly

Stable complex formation of CENP-B with the CENP-A nucleosome

Identification of novel α -n-methylation of CENP-B that regulates its binding to the centromeric DNA

Nap1 regulates proper CENP-B binding to nucleosomes

要旨：

CENP-B タンパク質は、ヒト染色体セントロメア領域の反復配列である α -satellite DNA（アルフォイド DNA）中の 17bp モチーフ CENP-B box に結合する。CENP-B は、CENP-A スクレオソームおよび CENP-C との相互作用を介してキネトコア構造の安定的な維持に働く。細胞にトランスフェクトしたアルフォイド DNA への CENP-B の結合は、その DNA 上へ、CENP-A クロマチンの新規集合、機能的なセントロメア/キネトコアの新規形成、およびそれに続くヒト人工染色体（HAC）の形成を促進する。一方、CENP-B は、アルフォイド DNA の染色体腕部への異所的挿入部位では、Suv39h1 を介してヒストン H3 リジン 9 トリメチル化（H3K9me3 化；いわゆるヘテロクロマチン化修飾）を促進する。ところが、セントロメアクロマチン領域への過剰なヘテロクロマチンの侵入は、CENP-A の集合に対して抑制的に作用する。これまで、このような異なるクロマチン状態の形成を CENP-B がどのように制御するかについては不明であった。本研究では、CENP-B の酸性ドメインがヒストンシャペロンやヘテロクロマチン因子である Suv39h1 と HP1 を含む多くのクロマチン修飾因子とともに、H3K36 メチル基転移酵素 ASH1L を集合させることを明らかにした。ASH1L は、アルフォイド DNA 上で CENP-A 集合に許容的な開かれたクロマチン状態を促進した。これらの結果は、CENP-B は CENP-A 集合に対し抑制的、あるいは促進的なヒストン修飾酵素のいずれの集合に対しても中核となっていること示している。細胞へ導入されたアルフォイド DNA への結合によって、CENP-B は、その DNA 結合ドメインだけでなく、酸性ドメインでも CENP-A の新規集合を促進することを本研究では示した。したがって、CENP-B は、アルフォイド DNA 上での CENP-A 集合、またはヘテロクロマチン形成の両方の集合バランスを調節していると考えられる。

序論：

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 バリエーションである CENP-A が含まれることが明らかにされている (Earnshaw and Rothfield, 1985; Palmer et al., 1987; Black and Cleveland, 2011)。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 (CCAN, ICEN やキネトコア構成因子 (Foltz et al., 2006; Izuta et al., 2006; Okada et al., 2006; Allshire and Karpen, 2008; Cheeseman and Desai, 2008; Fukagawa and Earnshaw, 2014; Westhorpe and Straight, 2015; Musacchio and Desai, 2017) 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。CENP-A ヌクレオソームは、CENP-C (Carroll et al., 2010; Fachinetti et al., 2013) および CENP-N (Guo et al., 2017) を含む他の CCAN コンポーネントとの相互作用によって安定化される。

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 (Bergmann et al. 2011; Shang et al., 2016)。ヒストン H3 の Lys4 と Lys36 のメチル化 (H3K4me, H3K36me) は CENP-A クロマチン周辺部で検出される (Sullivan and Karpen, 2004; Bergmann et al., 2011; Bailey et al., 2016)。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 (Molina et al., 2016)。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 (Willard and waye, 1987)。セントロメア 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 化やこの Suv39h1 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 (Sullivan and Karpen, 2004)。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 (Peters et al., 2001; Grewal and jia, 2007)。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 (Earnshaw et al., 1987a) は、その N 末端側の DNA binding domain (DBD) を介して (Pluta et al., 1992; Muro et al., 1992; Kitagawa et al., 1995)、ヒトではアルフォイド DNA、マウスでは minor satellite 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 (Masumoto et al., 1989)。

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(Harrington et al., 1997; Ikeno et al., 1998、Tsuduki et al., 2006)。CENP-B box に変異を入れたアルフォイド DNA では、HAC の形成は起こらない(Ohzeki et al., 2002)。マウス胚性線維芽細胞(MEF)で CENP-B 遺伝子をノックアウトすることにより、アルフォイド DNA を導入しても新規 CENP-A 集合や HAC 形成は起こらなくなった(Okada et al., 2007)。対照的に、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(Masumoto et al., 1989; Earnshaw et al., 1991)や染色体再編成に伴い染色体腕部に異所的に稀に形成されるネオセントロメアでは(du Sart et al., 1997; Alonso et al., 2003)、CENP-B や CENP-B box は検出されない。更に、驚くべきことに 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(Kapoor et al., 1998; Hudson et al., 1998; Perez-Castro et al., 1998)。

近年の研究は、CENP-B がセントロメア機能とその維持に必須ではないことの説明可能な理由を示している。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(Suzuki et al., 2004; Fachinetti et al., 2015; Fujita, Otake et al., 2015)。また、CENP-C はヌクレオソーム中の CENP-A の C 末端尾部に結合する(Carroll et al., 2010; Fachinetti et al., 2013)。このことから一旦形成されてしまえば、CENP-C/CENP-A の直接的な相互作用は、CENP-B の必要性をバイパス可能にする。一方、CENP-B が失われている状態において、CENP-A の C 末端尾部への変異の導入は、CENP-C のセントロメアへの繋がりが失われることになり、染色体分配機能を乱すことが報告されている(Fachinetti et al., 2015; Hoffmann et al., 2016)。それゆえ、CENP-B は新規セントロメア形成だけでなく、セントロメアの維持においてもそのバックアップとして重要な働きを持つと考えられる。

CENP-A 集合とその安定化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 遺伝子ノックアウト MEF 細胞は、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(Okada et al., 2007)。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(Nakano et al., 2008; Cardinale et al., 2009; Ohzaki et al., 2012; Shono et al., 2015; Martins et al., 2016)。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、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 や HP1 (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の集合を CENP-B が促進することを明らかにした。同定因子の一つ、H3K36 メチル基転移酵素 ASH1L は HeLa 細胞内の HAC 上で CENP-A 集合量を増加させ、HT1080 細胞へ導入されたアルフォイド DNA 上では新規 CENP-A 集合を促進した。更に、ASH1L の枯渇は、HeLa 細胞のセントロメアアルフォイド DNA 上のヘテロクロマチン集合を増加させ、CENP-A 集合を減少させた。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出す因子と考えられる。

結果：

CENP-B 結合によりアルフォイド DNA のクロマチンに集合する因子の探索

アルフォイド DNA 上に CENP-B 結合依存的に集合する因子は、双方向性クロマチン形成に関与している可能性が考えられる。本研究では、蛍光顕微鏡に基づく相互作用トラップ (FMIT) アッセイ (Shono et al., 2015; Ohzeki et al., 2016) を用いて、HeLa-Int-03 CENP-B KO 細胞株の異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位(**Figure 1 A, B, C and D**)への tetR-EYFP-CENP-B テザリングによって集合するセントロメアタンパク質およびヒストン修飾因子の同定を行った。この手法によって、興味のあるタンパク質(Protein of Interest: P.O.I)の異所的挿入部位への集合をトランスフェクション後 1~2 日で検出することができる(**Figure 2 A**)。最初に、Bait として tetR-EYFP-CENP-B 全長、Prey として Halo-tag 融合タンパク質のかずさ cDNA ライブラリーを使用して、異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位に集合する因子についてスクリーニングを行った(**Figure 2 B, C and D**)。この分析は、CENP-B(Full)テザリングが、これまでに明らかにされているセントロメアタンパク質(CENP-A、CENP-C および CENP-B⁵⁴¹⁻⁵⁹⁹(dimer domain))、ヘテロクロマチン関連因子 Suv39h1 を異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位に集合させることを確認した(**Figure 1 E and 2 A**) (Kitagawa et al., 1995; Suzuki et al., 2004; Okada et al., 2007; Fujita et al., 2015)。上記のタンパク質に加えて、CENP-B は様々なヒストン修飾因子(ASH1L、NSD1、MLL、JMJD2D、JMJD3、JHDM1D、CENP-35)、ヒストン H3.3 シャペロン (DAXX)、ヒストンシャペロン集合因子 (Mis18BP1)、およびヘテロクロマチンタンパク質 (HP1s) を異所的挿入部位へ集合させた。これらを、双方向性クロマチンのエピジェネティックな制御に関わる候補とした。

HAC セントロメアを用いた内在性 CENP-A の集合に対する同定因子の評価

次に、Figure 2 で得られた各候補が、セントロメア CENP-A レベルを増加または減少の影響を与えるかどうかで評価した。以前の研究で、alphoid^{tetO}-HAC 上セントロメアの CENP-A レベルは、CENP-A デポジッション因子(例：HJURP)、CENP-A ヌクレオソーム安定化因子、および CENP-C と相互作用するキネトコアタンパク質をテザリングすることによって増加することが示された (Shono et al., 2015)。逆に、ヘテロクロマチン因子 (例：Suv39h1) のテザリングは CENP-A レベルを低下させた。そこで本研究では、同定因子が alphoid^{tetO}-HAC (HeLa-HAC-2-4) 上の CENP-A レベルに影響するかを評価した(**Figure 3 A and B**)。tetR-EYFP 融合の全長 ASH1L および NSD1 発現プラスミドを細胞へトランスフェクションしても EYFP 蛍光は検出されなかった。そこで、ASH1L および NSD1 では SET ドメイン (C 末端側) および残りの N 末端領域を含む領

域の二つに分けて検定した。tetR-EYFP 融合 ASH1L¹⁹⁰¹⁻²⁹⁶⁴ のテザリングのみが、*alphoid^{tetO}*-HAC 上の内在性 CENP-A シグナルを増強した (**Figure 3 C and D**)。以前に報告されたように、HJURP の結合は HAC 上の CENP-A シグナルを増加させ、逆に、ヘテロクロマチン因子、HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ および Suv39h1 は CENP-A を減少させた (Shono et al., 2015; Martins et al., 2016)。MLL テザリングは以前に CENP-A 集合を増加させることが示され (Shono et al., 2015)、MLL による H3K4me2 化は HJURP を介して CENP-A アセンブリに関与していることが示されている (Bergmann et al., 2011)。しかしながら、本研究では、H3K4me2, me3 のレベルは HT1080 細胞へ導入されたアルフォイド DNA において、CENP-B 結合に依存的ではなかった (**Figure 12 B and C**)。したがって、本研究では CENP-A を増加させる ASH1L と減少させる HP1 に解析の焦点を当てた。

CENP-B 酸性ドメインは ASH1L, HP1 そして多くの他の因子の集合を促進する

次に、初期スクリーニングで同定された各因子の集合に CENP-B のどの領域が関与しているかを調べるために、tetR-EYFP-CENP-B ドメインを Bait として、FMIT アッセイを行った。以前の研究と一致して、Halo-CENP-A、Halo-CENP-C、または Halo-CENP-B⁵⁴¹⁻⁵⁹⁹ は、tetR-EYFP-CENP-B¹⁻¹⁵⁹、tetR-EYFP-CENP-B⁴⁰³⁻⁵⁵⁶ または tetR-EYFP-CENP-B⁵⁴¹⁻⁵⁹⁹ によって、それぞれ異所的 *alphoid^{tetO}* DNA 挿入部位に集合した。(**Figure 4 A, B, C and 5 A**)。Halo-ASH1L および Halo-HP1 β は、CENP-B 酸性ドメイン (tetR-EYFP-CENP-B⁴⁰³⁻⁵⁵⁶) によって、tetR-EYFP-CENP-B^{Full} と同様の効率で、最も効果的に集合した (**Figure 4 C, D and E**)。興味深いことに、CENP-B¹⁻¹⁵⁶ との相互作用が既に明らかにされている CENP-A (Fujita, Otake et al., 2015) 以外の因子、CENP-A 集合に関わる因子 Mis18BP1、ヒストン H3.3 シャペロン DAXX (Drane et al., 2010)、ヘテロクロマチン関連因子 (Suv39h1, HP1 α/γ)、クロマチン関連因子 (H3K4 ジメチラーゼ MLL および H3K36 メチルトランスフェラーゼ ASH1L および NSD1) および他の因子はすべて、CENP-B 酸性ドメイン (tetR-EYFP-CENP-B⁴⁰³⁻⁵⁵⁶) によって集合した。

特異的抗体を用いた免疫染色および ChIP 解析により、内因性 ASH1L および HP1 β が tetR-EYFP-CENP-B^{Full} および tetR-EYFP-CENP-B⁴⁰³⁻⁵⁵⁶ テザリングによって異所的挿入部へ集合することが確認された (**Figure 5 B**)。したがって、CENP-B のテザリングによるこれらの因子の集合は、Halo-tag 融合 Bait タンパク質としての過剰発現の影響を無視できる。

次に、Bait として tetR-EYFP-CENP-B⁴⁰³⁻⁵⁵⁶ を、Prey として Halo-ASH1L 欠失シリーズを用いた、FMIT アッセイによって、アルフォイド DNA 上への

CENP-B 依存的局在に ASH1L のどのドメインが必要であるか同定をおこなった。CENP-B⁴⁰³⁻⁵⁵⁶ がテザリングされた異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位での Halo-ASH1L 欠損シリーズの集合頻度は、それぞれ約 8% (ASH1L¹⁻⁸²⁴)、約 77% (ASH1L⁸⁰⁰⁻¹⁹⁰⁰)、および約 3% (ASH1L¹⁹⁰¹⁻²⁹⁶⁴) であった。したがって、AT-hook domain を含む ASH1L⁸⁰⁰⁻¹⁹⁰⁰ 領域が、CENP-B⁴⁰³⁻⁵⁵⁶ 依存的 ASH1L 集合に中心的な役割を果たしていることが解った (**Figure 5 C**)。Bait と Prey の逆の組み合わせでは、Halo-CENP-B¹⁶⁰⁻⁵⁵⁶ の集合は、ASH1L¹⁻¹⁹⁰⁰ テザリングでのみ観察されたが、逆の組み合わせよりも弱いシグナルであった (約 26%) (data not shown)。従って、ASH1L は、その AT-hook を含む領域を介して CENP-B 酸性ドメインによってアルフォイド DNA に集合することが判明した。

CENP-B はアルフォイド DNA への ASH1L と HP1 β の局在を促進する

ASH1L は、H3K36 をメチル化する Trithorax (Trx) group protein であり、そして Polycomb (Pc) group protein を含む条件的ヘテロクロマチン (H3K27 メチル化を媒介とする遺伝子サイレンシング) とは相互排他的であると報告されている (Schuettengruber et al., 2007; Miyazaki et al., 2013)。セントロメアでの ASH1L 局在と機能は報告されていないが、H3K36me2/3 はセントロメア領域に存在することは報告されている (Bergmann et al., 2011; Bailey et al., 2016)。

そこで、内因性 ASH1L および HP1 β が CENP-B 結合に依存的にセントロメアに局在するかどうかについて、CENP-B 遺伝子 WT または KO の HeLa-Int-03 細胞に対して、抗 ASH1L または抗 HP1 抗体と、抗 CENP-A 抗体を用いて調べた。HP1 β はセントロメア周辺ペリセントロメアを含む広い領域に分布しており、CENP や CCAN のようなスポットとしては局在していない。そこで、セントロメアにおける ASH1L および HP1 β の蛍光強度の分布をマッピングするために、Figure 6 A に示す解析法(定量法)を開発した。CENP-A 蛍光の中心にあるピクセルから半径 11 ピクセルまでの領域全体で、ASH1L および HP1 β の蛍光強度をピクセルごとに定量化し、それを 1 次元に統合した。これを、1 細胞当たり 45 のセントロメア CENP-A シグナルに対して行った。ASH1L と HP1 β の蛍光強度の分布は両者とも CENP-B WT 細胞の CENP-A 近傍領域で有意に高かった。しかし、この局在化の勾配は、CENP-B KO 細胞では失われた (**Figure 6 B, C and D**)。

次に、免疫染色と ChIP 解析により、内在性 ASH1L 及び HP1 β は、HeLa-Int-03 細胞の異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位 (セントロメア機能なし) に CENP-B 依存的に集合することを示した (**Figure 7 B and C**)。ChIP 解析では、ASH1L の回収率は、CENP-B WT 細胞と比較して、CENP-B KO 細胞では 21

番染色体セントロメアで 75%、または異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位で 80% 減少した (**Figure 6 G**)。同様に、HP1 β の回収率はセントロメアで 53%、異所的挿入部位で 47%減少した。CENP-B KO 細胞では、ASH1L と HP1 β の総タンパク質量に有意な減少は検出されなかった (**Figure 7 A**)。したがって、アルフォイド DNA 上での ASH1L と HP1 β の集合には CENP-B の結合が必要であることが判明した。

免疫染色による解析において (**Figure 6 B, C and D**)、ASH1L と HP1 β が各細胞のセントロメアの周囲に均一には分布していないことが示された。そこで、CENP-B、ASH1L、HP1 β を三重染色し、Figure 6 A の方法で分析したところ、セントロメア領域で HP1 β の蛍光が強い細胞では ASH1L の蛍光は弱かった。逆に、ASH1L 蛍光がセントロメア領域で強い細胞では、HP1 β 蛍光は弱かった (**Figure 6 E and F**)。ASH1L と HP1 β のセントロメアへの局在は相互に排他的であることが示唆された。

ASH1L と HP1 β の集合は相互に排他的な性質を示す

本研究では、CENP-B 酸性ドメイン(403-556)が異所的アルフォイド DNA 挿入部位に ASH1L および HP1 の両方を集合させ(**Figure 4**)、内在性セントロメアにおいても CENP-B が ASH1L および HP1 の両方を集合させることを示した (**Figure 6**)。しかしながら、それら 2 つの因子の、CENP-A クロマチン集合への関わりは逆の性質を示した (**Figure 3**)。そこで、次の解析では ASH1L または HP1 β の結合がもう一方の集合に、あるいはセントロメア機能にどのように影響するかを焦点を当てた。

最初に、異所的アルフォイド DNA 挿入部位でのヒストン H3 修飾状態に対する ASH1L テザリングの効果を、ChIP 解析により確認した。tetR-EYFP-ASH1L テザリングにより、H3K36me2/3 は、実際に異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位で増加したが、H3K9me3 と H3K27me2 は減少した (**Figure 8 A**)。つまり、ASH1L テザリングにより、H3K36me2/3 と、H3K9me3 または H3K27me2 は逆の相関関係を示した。HP1 は H3K9me3 に結合することが知られている。

次に、tetR-EYFP-HP1 β 、tetR-EYFP-ASH1L をテザリングした異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位上の内在性 ASH1L、または HP1 β の集合を観察した。内在性 HP1 β あるいは ASH1L の集合は、tetR-EYFP-ASH1L あるいは tetR-EYFP-HP1 β テザリングによってそれぞれ減少した (内因性 ASH1L または HP1 β は約 80%減少した (**Figure 8 B, C and D**))。この結果は、ASH1L または HP1 β 集合は相互に排他的であることを示している。

次に、ASH1L または HP1 β の偏った集合がセントロメア機能に及ぼす影響について調べた。tetR-EYFP-ASH1L または tetR-EYFP-HP1 β をテザリングし

た alphoid^{tetO} HAC の染色体安定性を細胞核あたりの EYFP シグナル（人工染色体の数）をカウントすることによって評価した（**Figure 8 E**）。コントロールである tetR-EYFP-Alone のテザリングにより、1 週間の細胞分裂を通して、8%未満の核が HAC シグナルを喪失し（HAC=0）、83%以上の核が核あたり 1 コピーの EYFP-HAC シグナル（HAC=1）を維持した。しかしながら、tetR-EYFP-HP1 β テザリングにより、28.8%の核が HAC シグナルを失い、そして tetR-EYFP-ASH1L テザリングにより、より劇的に 47.1%の核が HAC シグナルを失った。したがって、これらの結果は、HAC 上の ASH1L あるいは HP1 β への偏った集合は実際にセントロメア機能に強く影響することを明確に示している。

ASH1L ノックダウン細胞におけるヘテロクロマチン因子の過剰発現は染色体の安定性を低下させる

ChIP 解析により、ASH1L の枯渇が HeLa 細胞のアルフォイド DNA のクロマチン状態に影響を与えるかどうかを調べた。ASH1L の siRNA 処理により、細胞全体の ASH1L レベルは 3.9%に減少した（**Figure 9 B**）。ASH1L の枯渇によって、21 番染色体アルフォイド DNA と異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位上の ASH1L の回収率は、両者とも大幅に減少した（それぞれ約 69%と 79%）（**Figure 9 A**）。ヒストン H3 修飾では、H3K36me2/3 レベルの有意な減少と、H3K9me3 および H3K27me2 レベルの増加が検出された。したがって、ASH1L(枯渇)ノックダウンは、**Figure 8 A** での ASH1L テザリングの効果とは反対の結果を示したことから、示唆される ASH1L の効果は一貫していた。興味深いことに、ASH1L をノックダウンした HeLa 細胞の 21 番染色体アルフォイド DNA から、CENP-A の検出量は、27%有意に減少した。

次に、ASH1L ノックダウンと、ヘテロクロマチンタンパク質の過剰発現により、ASH1L と HP1 β の集合のバランスを乱すことによる宿主染色体への影響を調べることにした。HeLa 細胞を用いて、宿主染色体の分配機能の乱れについて、微小核/分配遅滞染色体をカウントすることによって確認した（**Figure 9 C and D**）。siRNA トランスフェクションの 5 日後に、Halo tag 融合のヘテロクロマチンタンパク質発現プラスミド（HP α , β , γ または Suv39h1）を細胞にトランスフェクとした。コントロールである siScr では、各 Halo tag ヘテロクロマチンタンパク質の過剰発現によって、微小核と分配遅滞染色体シグナルの比率は有意に増加しなかった（Halo-Alone;4.6%, Halo-HP1 α ;4.1%, Halo-HP1 β ;4.2%, Halo-HP1 γ ;4.6%, and Halo-Suv39h1;4.5%）。一方、ASH1L をノックダウンするだけでも（Halo-tag-Alone 過剰発現）、微小核の頻度が約 2 倍に増加した（約 8.4%）。さらに、Halo tag 融合ヘテロクロマチンタンパク質の過剰発現は、微小核頻度を約 3 倍に有意に増加させた（Halo-HP1 α ;13.2%, Halo-

HP1 β ;11.6%, Halo-HP1 γ ;14.1%, and Halo-Suv39h1;13.2%)。CENP-B ノックダウンでは、微小核頻度は Halo-tag-Alone 過剰発現によって約 1.3 倍に有意に増加した(6.3%)が、Halo-tag ヘテロクロマチンタンパク質の過剰発現によってさらなる増加はなかった。これらの結果は、ASH1L の非存在下では、ヘテロクロマチン因子の増強によるクロマチン集合バランスの不均衡が染色体の安定性に有意な影響を及ぼすことを示唆している。一方、CENP-B の非存在下（ヘテロクロマチン集合能力が欠如している状態）では、ヘテロクロマチンを過剰にセントロメアに集合させる足場がないことで、ヘテロクロマチン因子を増強しても染色体の安定性に影響を及ぼさなかったと考えられる(**Figure 9 D**)。これらすべての結果は、ASH1L が CENP-B 結合クロマチンに対して HP1 およびヘテロクロマチン因子の過剰な集合を抑制するための活性を有し、逆に、HP1 が ASH1L の過剰な集合を抑制するための活性を有することを示唆している。これらの機能は、ASH1L または HP1/ヘテロクロマチンの偏った集合によるクロマチン環境の乱れを防いでいると考えられる。以上により、CENP-B とこれらの因子の集合は、アルフォイド DNA 上への「双方向性」のエピジェネティックなクロマチン集合バランスを作り出すことによって、正確な染色体分離機能を調節していることが示唆された(**Figure 15**)。

CENP-B 酸性ドメインは H3.3 の集合を促進する

H3.3 は、DNA 複製後の CENP-A 補充における重要なプレースホルダーとして機能するが、ペリセントロメアヘテロクロマチンの維持にも重要である(Dunleavy et al., 2011; Muller and Almouzni, 2017)。最近の研究では、CENP-B が H3.3 の集合を促進することが報告されている(Shono et al., 2015; Morozov et al., 2017)。しかしながら、CENP-B のどのドメインが関与しているのかは不明である。以前の研究で、異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位へのヒストンシャペロンのテザリングが、それらの機能に従った効果を発揮することを示した(Ohzeki et al., 2012; Shono et al., 2015)。したがって、我々は、HeLa-Int-03 CENP-B KO 細胞において、H3.3 集合のための CENP-B ドメインの同定を FMIT アッセイによって試みた。tetR-EYFP-Alone のテザリングでは、異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位上に Halo 融合 CENP-A, H3.1 および H3.3 の集合はほとんど検出されなかった(核全体のバックグラウンドと同レベル)。しかしながら、tetR-EYFP 融合の各ヒストンシャペロン、HJURP, CHAF1A, DAXX のテザリングは、異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位上に、関連するタグ付きヒストンを優先的に集合させた (**Fig.10 A** and Shono et al., 2015)。CENP-B(Full)テザリングは、異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位に、Halo-CENP-A および-H3.3 の両方の集合を促進した(**Fig. 10 A and B**)。次に、Halo 融合ヒストンの集合が CENP-B のどのドメイ

ンによるものか調べた。Halo-CENP-A が CENP-B¹⁻¹⁵⁹ によって最も集合したのは、このドメインと CENP-A ヌクレオソームとの直接的相互作用(Fujita, Otake et al., 2015)によるものを反映しているが、Halo-H3.3 は酸性ドメインである CENP-B⁴⁰³⁻⁵⁵⁶ のテザリングで最も効率よく集合した。これらの結果は、CENP-B 酸性ドメインが、アルフォイド DNA 上での H3.3 集合を促進することを示唆している。

CENP-B は HT1080 細胞へ導入されたアルフォイド DNA 上のヒストン H3 のメチル化レベルに影響を与える

ここまでの本研究によって、HeLa 細胞を使用し、アルフォイド DNA 上の CENP-B 依存的 ASH1L 及び HP1 β 集合のバランスについて示してきた。一方、これまでの研究では、ヒト線維肉腫細胞 HT1080 を使用して、導入されたアルフォイド DNA を用いた de novo HAC 形成および de novo CENP-A 集合を指標に、CENP-B の機能についての解析がなされてきた。また、当研究グループにより、HeLa 細胞では de novo HAC 形成は起こらないこと、HT1080 細胞は、HeLa 細胞よりも、アルフォイド DNA 上にはるかに弱いヘテロクロマチン集合活性を示すことを報告している (Ohzeki et al., 2012)。そこで本研究では、HT1080 細胞に導入されたアルフォイド DNA 上の CENP-B 依存的なヒストン修飾バランスについて調べた。予備実験において、ChIP-qPCR によってトランスフェクションの 2 週間後に HT1080 細胞に導入された Wild type CENP-B box alphoid^{tetO} DNA (CENP-B が結合できる) 上に、強力な CENP-A 及び CENP-B 集合活性が検出された (**Figure 11 A**)。一方、Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA (CENP-B が結合しない) では、CENP-A、CENP-B いずれの集合も検出されなかった。次に、高感度な ChIP/competitive PCR 解析を用いて、導入初期の Wild type あるいは mutant の CENP-B box alphoid^{tetO} DNA 上への CENP-A クロマチン形成と、それに並行した CENP-B 依存的 H3 修飾状態について解析した (Ohzeki et al., 2002; Okada et al., 2007)。Competitive PCR は、Wild type と Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA の存在比を PCR による増幅後でも極めて正確に比較することが可能である (**Figure 12 A**)。

導入後 4 日で、CENP-A の相対的な集合は Wild type CENP-B box alphoid^{tetO} DNA 側に偏って検出された (**Figure 12 B and C**)。トランスフェクションの 1 週間後に、CENP-C 集合もまた、wild type CENP-B box alphoid^{tetO} DNA 側で検出された。この解析において、導入後 4 日目の CENP-A 集合が検出し始める早期に、Wild type CENP-B box alphoid^{tetO} DNA 側で H3K36me2 および H3K36me3 の集合が検出された。導入の 1 ~ 2 週間後には、より緩やかではあるが、H3K27 のアセチル化集合もまた検出された。H3K36 のメチル化と相互排他的であると

報告されている H3K27me2 および H3K27me3(Yuan et al., 2011)の相対的集合は、導入の 1~2 週間後に、mutant CENP-B box 側で検出された。これらの結果は、CENP-B 依存的なヒストンメチル化状態の変化が、H3K27me2/3 よりも H3K36me2/3 で CENP-A 集合が検出し始める早い時期に起こることを示している。いくつかの脱メチル化酵素も Figure 2 で同定されたことから、これらの変化にはメチル化だけでなく脱メチル化も連動する可能性もある。これらの結果は、アルフォイド DNA 上への ASH1L の集合、あるいは同様の因子の集合に、CENP-B の存在を必要とすることを説明可能にしている。実際、HT1080 細胞でもセントロメアにおける ASH1L の局在を確認し (Figure 11 B)、トランスフェクトされたアルフォイド DNA 上で、Wild type CENP-B box 側での ASH1L の優的な集合は少なくとも 2~4 週間続いていた (Figure 11 C and D)。

CENP-B 酸性ドメインと DNA 結合ドメインとともに HT1080 細胞に導入されたアルフォイド DNA 上に CENP-A を新規に集合させる

Figure 4 の結果は、CENP-B 酸性ドメインが、ASH1L を含む様々な因子をアルフォイド DNA 方ヘリクルートすることを示している。そこで、de novo CENP-A 集合への酸性ドメインの関与を調べた。CENP-B が de novo セントロメア形成を促進するメカニズムを解析するため、トランスフェクトされたアルフォイド DNA 上での CENP-A クロマチン形成に関与する CENP-B ドメインの特定を試みた。しかしながら、CENP-B DNA binding domain (DBD)は、CENP-B box に結合するために必須であり、これに加えて、CENP-B DBD は CENP-A ヌクレオソームと相互作用して新規 CENP-A 集合を誘導する(Okada et al., 2007; Fujita et al., 2015)。このため、この解析は非常に複雑なものとなる。

そこで、CENP-B DBD/CENP-B box の結合をバイパスするため、tetO 配列を含む alphoid^{tetO} DNA に tetR 融合 CENP-B をテザリングさせた。Wild type CENP-B box、あるいは、Mutant CENP-B box の BAC は、tetR-EYFP-Alone(control)、tetR-EYFP-CENP-B 安定発現 HT1080 細胞へ、ドキシサイクリン(Dox)の有無の条件で導入した(Dox +; no tethering; Dox -; tethering) (Figure 13 A)。CENP-A 集合は、Wild type CENP-B box alphoid^{tetO} DNA 上では、Dox の有無に関係なく、tetR-EYFP-Alone、tetR-EYFP-CENP-B の両発現細胞において検出された。この CENP-A 集合活性は、内因性 CENP-B の DBD と CENP-B box 間の結合を反映している。

対照的に、Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA 上では、Dox が有る条件では、CENP-A 集合は tetR-EYFP-Alone, tetR-EYFP-CENP-B、どちらの細胞でも検出されなかった。しかしながら、Dox が無い条件(tetR が tetO に結合する)では、CENP-B と CENP-A の集合は、tetR-EYFP-CENP-B 発現細胞でのみ検出

された(**Figure 13 A**)。この結果は、tetR/tetO 結合を介した alphoid^{tetO} DNA への CENP-B のテザリングは、新規 CENP-A 集合における CENP-B box の必要性をバイパス出来ることを示している。

次に、個々の CENP-B サブドメインのテザリングにより、CENP-A 集合活性の評価を行なった。Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA を、tetR-EYFP 融合の CENP-B 欠損シリーズ発現細胞株に導入した。顕著な CENP-A 集合は、DBD と酸性ドメイン(403-556)を含む tetR-CENP-B 構築を発現する細胞で検出された(**Figure 13 B**)。tetR-CENP-B dimer domain テザリングで CENP-A 集合は低い有意に検出された。これは、内在性の全長の CENP-B と tetR-CENP-B dimer domain の相互作用によるものと説明できる(**Figure 2 A and D**) (Kitagawa et al., 1995)。このように、CENP-B の DNA 結合ドメインと、酸性ドメインではより強く、共に、導入 alphoid^{tetO} DNA 上に新規 CENP-A 集合を促進することができた。

導入 Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA 上への CENP-B テザリングによる CENP-A 集合が機能的なセントロメアを誘導できるかを HAC 形成実験によって確認した。Dox 無しの条件において、tetR-EYFP-CENP-B(full)を発現する HT1080 細胞株へ Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA を導入して得られた 34 株の形質転換株のうち 2 株で、HAC 形成が確認された(5.9%) (**Figure 13 C**)。これとは対照的に、ドキシサイクリンの存在下では、同様に Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA を導入した 39 の形質転換株で HAC は検出されなかった。一方、tetR-EYFP-CENP-B DNA 結合ドメイン(1-159)と酸性ドメイン(403-556)の発現細胞では Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA を導入して得られた形質転換株 40 株と 36 株、それぞれ解析しても HAC 形成は確認出来なかった。このように、Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA の tetO を介した tetR-EYFP-CENP-B 全長のテザリングは、セントロメア形成のための CENP-A 集合を維持させるための能力を保持し HAC 形成にまで至るが、N 末端の DBD や酸性ドメインのどちらか一方だけではこの活性は十分では無く、CENP-B 全長と同様の効率では HAC 形成にまで至らなかった。どちらかのドメインだけでも機能的なセントロメアを極めて低効率でも形成する能力を持っているかどうかまで判断するには、さらなる分析が必要となる。

ASH1L が、導入された alphoid^{tetO} DNA 上で CENP-B の DBD 以外の酸性ドメイン依存的に新規 CENP-A 集合に関与しているかどうかを調べるために、tetR-EYFP-CENP-B⁴⁰³⁻⁵⁵⁶ を安定的に発現する HT1080 細胞で ASH1L をノックダウンし、Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA 上の CENP-A 集合を ChIP-qPCR によって定量した。導入された mutant alphoid^{tetO} DNA 上の新規 CENP-A 集合および、H3K36 メチル化のレベルは、ASH1L ノックダウン細胞において

有意に減少した (**Figure 14 B**)。 siASH1L によって ASH1L 量は siScr の 6.3% まで ASH1L が減少しているが、内在総 CENP-A レベルには、有意な変化は検出されなかった (**Figure 14 A**)。これらの結果は、HT1080 に導入されたアルフォイド DNA 上での CENP-B 酸性ドメインを介した新規 CENP-A 集合についても ASH1L が関与していることを示している。

考察：

CENP-B は、セントロメア活性およびキネトコア集合に大きな影響を伴う、「open」または「closed」なクロマチン状態のいずれかをアルフォイド DNA 上に作り出すことができる注目すべきタンパク質である。本研究では、2つの独立した CENP-B ドメイン、N 末端 DNA 結合ドメイン(DBD)と酸性ドメインが、導入アルフォイド DNA 上への新規 CENP-A 集合を引き起こすことを示した。CENP-B 酸性ドメイン (aa 403-556 –Earnshaw, 1987b) は、H3K36 メチル化酵素トランスフェラーゼ ASH1L(open)、HP1(closed)および H3.3 の集合を促進し、それらによって、CENP-A 集合または交換に適したオープンクロマチン状態を誘導する。つまり、酸性ドメインが関与する CENP-A 集合のメカニズムは、CENP-A と直接相互作用する DBD によるもの (Fujita, Otake et al. 2016) とはまったく異なっている。重要なことは、両方の domain を含むフルサイズの CENP-B はこれらの活性を保持しているが、DBD または酸性ドメインのいずれか単独では機能的セントロメア、HAC 形成を効率的に誘導することができなかったことである (Figure 13 C)。

CENP-B 結合によって誘導される機能的に拮抗するヒストン修飾

所属する研究グループでは以前に、CENP-B が、MEF 細胞株の染色体腕部の異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位上で Suv39h1 を介して H3K9 メチル化を促進することを報告した (Okada et al., 2007)。今回、CENP-B 結合が、ヒト HeLa 細胞株の異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位と内在性セントロメアの両方で H3K9 のメチル化と、Suv39h1, HP1 の集合を促進することを確認した。重要な点として、CENP-B が誘導するヘテロクロマチン形成は、細胞へ外から導入したアルフォイド DNA 上の CENP-A および CENP-C 集合より遅い時期に確立されるということである (Ohzeki et al., 2012)。注目すべきことに、活発な転写にも関連するマークである H3K36 メチル化は、アルフォイド DNA 上にも検出され、CENP-A や CENP-B の集合と同じ初期のタイミングで生じている。本解析の結果は、ASH1L および、または HP1 が CENP-B 酸性ドメインを介して、相互に排他的かつダイナミックにアルフォイド DNA 上に集合し、そのバランスがセントロメア機能を維持するために重要な「双方向性」のエピジェネティックなクロマチン修飾状態を作り出すことを示している (Figure 15)。

CENP-B box への CENP-B 結合は、転写不活性なクロマチンと関連性のある DNA メチル化によって阻害される (Tanaka et al., 2005; Okada et al., 2007)。セントロメアのクロマチン状態は、細胞周期、分化、細胞老化によってもダイナミックに変化する可能性がある。HeLa 細胞の Suv39h1 の発現レベルと染色体上の H3K9me3 レベルは、HT1080 細胞よりもはるかに高い (Ohzeki et al., 2012)。

興味深いことに、セントロメアにおける CENP-B の集合レベルは、細胞種や細胞老化の進行によって変化する。その上、HP1 によるセントロメア上のヘテロクロマチン形成と、CENP-A の集合量のバランスは、細胞が老化するにつれ、同じヒト胚性線維芽細胞株においてさえも変化する (Maehara et al., 2010)。

これら相互排他的な”open”および”closed”なクロマチン因子は、長大なアルフォイド DNA 反復配列の異なるサブ領域に分布する可能性がある。実際、セントロメアクロマチンを形成するアルフォイド DNA のサブ領域は、同じ 17 番染色体の相同染色体間でも異なる場合があることが示されている (Maloney et al., 2012)。アルフォイド DNA のサブ領域のクロマチン状態をマッピングすることは、非常に反復的な DNA の性質のために解析が困難である。しかしながら、セントロメアクロマチンの状態とキネトコア集合の間の相関関係を理解するためには、特定の反復 DNA 構造への CENP-B 結合が、異なった機能的クロマチン形成を促進するメカニズムを明らかにすることが重要であるだろう。

CENP-B 酸性ドメインは、双方向クロマチン「スイッチ」を作り出す

本研究のスクリーニングにより、CENP-B 酸性ドメインによってクロマチン上に集合する多数の因子が同定された (CENP-A は DBD によって集合するという点で他の因子と異なる)。酸性ドメインはどのようにそのような様々な因子を集合させるのか？ CENP-B の酸性ドメインがクロマチン構造を緩めることで、ヒストンと相互作用するタンパク質のアクセスを容易にする可能性が以前から提起されていた (Earnshaw, 1987b)。多くのヒストンシャペロンは酸性に富む領域を有しており、これらについての研究は、酸性領域が塩基性のヒストンと相互作用することが、ヒストンと DNA の適切な会合を促進するために重要であると提案している (Tyler, 2002)。実際、ヒストンシャペロン FACT は、その酸性ドメインとヒストンとの間の相互作用によってヌクレオソーム構造に影響を与える (Tsunaka et al., 2016)。

本研究では、CENP-B 酸性ドメインがアルフォイド DNA 上に H3.3 の集合を促進することを明らかにした (**Figure 10**)。これはヒストン交換反応に許容的なクロマチン状態が生じていることを示唆している (Shono et al., 2015; Morozov et al., 2017; and **Figure 14**)。これは、In vitro において、ポリグルタミン酸の添加が、単離精製されたヒストンと DNA からのヌクレオソーム形成を促進することができたという以前の研究とも一致している (Stein et al., 1979)。本研究では、CENP-B の酸性ドメインが作り出すこのようなヌクレオソーム、あるいはクロマチン構造が、様々なクロマチン関連因子の集合の標的になると考えている (**Figure 4 C**)。クロマチン構造の変更に加えて、さまざまなクロマチン関連因子のターゲティングには、酸性ドメインとの直接的な相互作用も含まれる

可能性も考えられる。今後の研究では、構造解析によって CENP-B 酸性ドメインと相互作用タンパク質間のマッピングが重要となるだろう。

CENP-B 酸性ドメインによって誘導されるクロマチン修飾は、構造変化を促進し、アルフォイド DNA クロマチンの「双方向」状態を効果的に作り出すと考えられる。CENP-B は、ASH1L およびその他のセントロメア関連タンパク質をリクルートさせるか、ヒストンを H3.3 などに置き換えることにより、CENP-A の集合を促進することができる。H3.3 は、CENP-A 集合の重要なプレースホルダーであることが示唆されているが、同時に、ヘテロクロマチンの維持にも重要である (Dunleavy et al., 2011; Shono et al., 2015; Müller and Almouzni, 2017)。CENP-B は、Suv39h1 と HP1 をリクルートすることにより、非セントロメア領域 (エピジェネティックな CENP-A マークがない、異所的アルフォイド DNA 挿入部位またはセントロメア周辺のペリセントロメアなど) でのヘテロクロマチン化を促進する。これらの結果は、おそらく CENP-B DBD が CENP-A ヌクレオソームと相互作用するため、CENP-B が機能的セントロメアの有無に応じて (CENP-A クロマチンが既にその場に存在するかしないかに応じて) その活性を切り替えることができると考えられる (Figure 15)。

H3.3 局在は、転写活性クロマチンで特に顕著であると報告されている (Mito et al., 2005)。セントロメア転写は有糸分裂中においても低レベルで生じている (Chan et al., 2012; Molina et al., 2016)。この転写はセントロメア機能および形成にとって重要であり (Wong et al., 2007; Quenet and Dalal, 2014; Rosic et al., 2014; Chen et al., 2015; Molina et al., 2016; McNulty et al., 2017; Bobkov et al., 2018)、H3K27 の過剰なメチル化は転写および CENP-A 集成の両方を阻害する (Martins et al., 2016)。この転写が CENP-B クロマチン「スイッチ」の方向を決定している可能性はある。

CENP-B 酸性ドメインによる ASH1L 集合の下流の H3K36 メチル化、および H3.3 集合は、転写活性およびその後の CENP-A 集合を促進する可能性がある。あるいは、H3K36me2/me3 は、基本的には転写の下流で生じるので、別の機構によって促進されるセントロメアの転写が、キネトコア集合およびその安定性に必要な open なクロマチンを作り出すための CENP-B とその関連因子との間の相互作用を促進する可能性もある。CENP-B と RNA ポリメラーゼ II 機構との間の未知の機能的相互作用が、CENP-B が双方向的なヘテロクロマチン状態あるいは転写活性クロマチン状態を促進する中心的な役割を担っている可能性もある。

本研究では、CENP-B は、CENP-A および CENP-C と相互作用するだけでなく、ヒストン修飾因子をリクルートすることによって、CENP-A クロマチンの集合を調節すると結論づけた。将来の研究では、異なる性質のクロマチン状態

に関連するヒストン修飾が長いアルフォイド DNA のサブ領域でどのように相互作用するか、更に、この双方向性クロマチンの「スイッチ」が CENP-B およびその他のセントロメア特異的な要因によってどのように制御されるか、について調べていく必要があるだろう。

材料と方法：

細胞培養

ヒト線維肉腫由来の HT1080、ヒト子宮頸癌由来の HeLa の各細胞株は、Dulbecco's Modified Eagle's medium (Wako; 043-30085)に 10% FBS を付加し 37°C、5% CO₂ 下で培養した。tetR 融合タンパク質を tetO から乖離させるために、ドキシサイクリンを 1ng/μl の濃度で培地に添加し、上記の条件で培養した。

トランスフェクション

トランスフェクションでは、プラスミドには FuGENE HD (Promega; E2312)を、siRNA には Lpofectamine2000 (ThermoFisher;11668027)を用いた。siRNA オリゴは、ThermoFisher の Silencer® select siRNAs を用いた。各オリゴは、CENP-B(s2909)、ASH1L(s31702)、siScr(ネガティブコントロール) (4390844)を使用した。

細胞株

HeLa-HAC-2-4 (alphoid^{tetO} HAC を含む) および HeLa-Int-03 (異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位を含む) は (Shono et al., 2015; Ohzeki et al., 2012, 2016) で用いられた株である。tetR-EYFP-Alone、tetR-EYFP-CENP-B (Full、1-556、1-405、1-159、160-556、403-556、126-403、または 541-599) を安定して発現する HT1080 由来株、tetR-EYFP-Alone、tetR-EYFP-CENP-B (Full、1-159、126-403、403-556、541-599) を発現する HeLa 由来株は、それぞれの tetR-EYFP 融合遺伝子を発現する pJET3 プラスミド、および Phi-C31 インテグラーゼの発現 pJTIPhiC31 プラスミド (Jump-in Integration System (Life Technologies)) を使用して確立された。HeLa-Int-03-CENP-B ノックアウト細胞株は CRISPR/Cas9 システムによって確立された。CENP-B 遺伝子のノックアウトのために、pJ4IB-Cas9 および pU6CR-CENP-B (CENP-B 遺伝子 (5'-GAAGAACAAGCGCGCCATCC) に対する Cas9 タンパク質およびガイド RNA の発現) ベクターを構築し、これらのベクターを HeLa にコトランスフェクトした。単離された単一クローンにおいて、すべての対立遺伝子での CENP-B 遺伝子の欠失は、MiSeq シーケンサー (イルミナ) を使用したゲノム PCR 産物の配列決定によって確認した。

免疫染色と Halo 融合タンパク質のラベリング

細胞はあらかじめ、カバーガラス上にて培養しておいた。アセトン固定法；細胞は、-20°Cで冷やした 80%アセトンに浸し、-20°Cで 10 分静置する。その後、素早くドライヤーで乾燥させた。ホルマリン固定法；細胞は、2.5%ホルムアミ

ド (Wako; 063-04815) に浸し、室温 10 分間静置した。ホルマリン固定細胞は、0.5% TritonX-100/PBS に室温 5 分間浸し、膜透過処理を行い、その後、125mM Glycine/PBS に室温 5 分間浸しクエンチングした。固定された細胞は、2% BSA/PBS に室温 10 分間浸し、ブロッキングを行った。細胞は、一次抗体、及び、二次抗体に 37°C、各 1 時間静置する。抗原抗体反応後は、0.05% Triton X-100/PBS で 3 回洗浄した。DNA は DAPI/PBS にて 37°C室温 5 分間静置し、染色した。Halo tag のラベリングのために、10nM Halo-TMR-Ligand (Promega; G8251)存在下の培地で細胞を培養した。

M 期染色体スプレッドと間接蛍光 FISH

M 期染色体スプレッドは、HT1080 tetR-EYFP-CENP-B N21 細胞株 (Figure 12) を 350 nM TN-16 培地中で 3 時間処理した (Kitagawa et al., 1995)。有糸分裂期の細胞をピペッティングで回収し、低張液(0.075 M KCl)に懸濁し、氷上で 10 分間静置した後、Cytospin3 (Shandon) を用いてスライドガラス上にスプレッドした。スプレッドされた染色体の間接蛍光 FISH は、まず、免疫染色の欄に前述したホルマリン固定方に準じて免疫染色を行った。PBS で 3 回洗い、再度、ホルマリン固定を行った。メタノール酢酸(メタノール：酢酸=3:1)中で室温 15 分間処理後、100%エタノールに 3 分間浸したのち、ドライヤー(冷風)で素早く、完全に乾燥させた。次に、73°Cの 2xSSC (300mM NaCl, 342mM Sodium Citrate pH7.0)に 3 分間、73°Cの 70%ホルムアミド/2xSSC に 3 分間で DNA を変性させ、4°Cの 70%エタノールに 3 分間、4°Cの 100%エタノールに 10 分間浸した後、ドライヤー(冷風)で素早く乾燥させた。Probe solution (ホルムアミドで Digoxigenin 標識 BAC プロブを 1ng/μl に希釈)と、FISH solution (20%デキストランサルフェート、2x デンハルツ/4xSSC)を同量、73°Cで 10 分間処理した後混ぜ、この溶液 20μl をパラフィルムの上に滴下し、その上に、スプレッドサンプルを被せ、37°Cで一晩静置する。37°Cの 2xSSC で 7 分間、37°Cの 50%ホルムアミド/2xSSC で 7 分間を 2 回、37°Cの 2xSSC で 7 分間、室温の 4xSSC で 5 分間リンスする。室温の 5%スキムミルク/4xSSC でブロッキングし、4xSSC で 5 分間リンスした後、Rhodamine 標識抗 Digoxigenin 抗体(Roche: 0.5%スキムミルク/4xSSC で 100 倍希釈)を 60μl 滴下し、室温で 1 時間静置。0.5μg/ml DAPI/4xSSC で室温 3 分間静置し、4xSSC で 2 回リンス。VECTASHIELD を滴下し、カバーガラスを被せ封入した。

顕微鏡観察と画像イメージの定量

HAC 上の CENP-A の定量解析 (Figure 4) では、CSU-X1(Yokogawa)共焦点スキャナーユニットを備えた Axio Observer.Z1 顕微鏡 (Zeiss) で、核全体を

カバーするように 0.22 μm の間隔で Z スタック画像を取得した。iXon3 DU897E-CS0 カメラ (Andor)、および Andor iQ2 ソフトウェア (Andor) を使用した Plan-Apochromat 100x / 1.46 オイルレンズ (Zeiss)。取得した画像の定量解析は、Shono et al., 2015 に従った。その他の細胞画像は、LSM700 スキャンモジュールと Objective Plan-Apochromat 63x / 1.46 オイルレンズ (Zeiss) を備えた Axio Observer.Z1 (Zeiss) で、ZEN 2009 ソフトウェア (Zeiss) を使用して取得した。Figure 7 の定量解析では、Z スタック画像を 0.36 μm の間隔で、合計 5.4 μm の深さで取得した。シグナル強度は、Fiji ソフトウェアを使用して Z スタック maximum intensity projection の画像から定量対象のスポット周辺の 22x22 ピクセル領域の各ピクセルについて取得した (Schindelin et al., 2012)。x 軸と y 軸に関して対称な位置にあるピクセル強度を合計することで、同じ距離の統合されたピクセル強度を平均化した。

ChIP 解析と定量 PCR 法あるいは競合的 PCR 法

ChIP 解析は、Fujita et al., 2015 に記述した方法に、一部変更を加えて実行した。細胞をトリプシン処理し、15ml チューブに回収し遠心し、PBS で 1 回リンスした後、1.0%ホルムアルデヒド (Sigma; F8775) で 25°C、15 分間固定し、最終濃度 125mM になるよう Glycine を加えクエンチングした。氷冷した固定後、細胞をソニケーションバッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 mM EDTA、0.5x 濃度の cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail (以下 PIC) (SIGMA-ALDRICH; 5056489001)、1mM DTT、40 μM MG132 および 0.02%SDS) に懸濁した。Bioruptor (Cosmo Bio; UCD-300) でレベル H、30 秒のオン/オフ間隔で 30~40 分間、超音波処理した。超音波処理後、可溶画分を、等量の IP バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、300 mM NaCl、0.5 mM EDTA、0.5x 濃度 PIC、40 μM MG132、1 mM DTT、0.05%SDS、1% Triton X-100、および 5% グリセロール) で希釈し IP の Input とした。抗体を結合させた Dynabeads-ProteinG (Life Technologies; 10003D) または ProteinG セファロース 4Fast (GEヘルスケア; 17061801) を使用して免疫沈降を行った。免疫沈降した画分を IP バッファーで 3 回洗浄した後、Beads を、Elution buffer (50mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM EDTA、0.5% SDS、150mM NaCl、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA (ThermoFisher; EN0531)) 80 μl に懸濁し 37°C で 1 時間、その後、20 μl の ProK buffer (10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、1mg/ml Proteinase K (SIGMA-ALDRICH; 3115836001)) を加え 55°C で 2 時間、その後、65°C で 12 時間~16 時間処理し、DNA / タンパク質の固定を変性させた。ChIP DNA は、MinElute PCR purification kit (QIAGEN) を使用して精製した。精製 DNA は、SYBR Premix EX taqII (Takara Bio; RR820S) および以下のプライマーセットを使用したリア

リアルタイム PCR によって定量化した。alphoid^{tetO} DNA : tetOF (5'-CTCTTTTTTGTGGAATCTGCAAGTG-3') および、tetOR(5'-TCTATCACTGATAGGGAGAGCTCT-3')、21 番染色体 Alphoid DNA 11mer: 21alpF (5'-CTAGACAGAAGCCCTCTCAG-3') および、21alpR (5'-GGGAAGACATTCCCTTTTTCACC-3') (Ohzeki et al., 2012)、5SrDNA: 5SrDNA-F1(5'-CCGGACCCCAAAGGCGCACGCTGG-3') および 5SrDNA-R1(5'-TGGCTGGCGTCTGTGGCACCCGCT-3') (Nakano et al., 2003)。競合的 PCR 法では、増幅した DNA を EcoRV で消化し、2.5%アガロースゲルで電気泳動を行った (Okada et al., 2007)。

ウエスタンブロッティング

ASH1L 以外のタンパク質の検出は、Shono et al., 2015 に記述されている方法に従った。ASH1L については、一部変更を加えて実行した。ASH1L タンパク質を分離および検出するために、Multi GellImini 5 (CosmoBio; 443138) を使用して全細胞抽出物を SDS-PAGE し、Trans-Blot Turbo Transfer Pack (BioRad) を用いて転写した。HiMark™Pre-StainedProtein Standard (ThermoFisher; LC5699) を分子量マーカーとして使用した。

謝辞：

研究活動においてさまざまな面から支援してくださった舩本寛先生、ならびに、かずさ DNA 研究所染色体工学研究室の皆様にご感謝いたします。また、名古屋大学において博士論文発表の機会を与えてくださった本間道夫先生、研究及び論文執筆に際し助言をしていただいたエジンバラ大学の William C. Earnshaw 先生、多数の Halo tag cDNA クローンを提供してくださったかずさ DNA 研究所の長瀬隆弘博士ならびに山川央博士、各種 Histone 抗体の作成、提供してくださった東京工業大学の木村宏先生、モノクローナル抗体研究所の野崎直仁博士にご感謝いたします。

引用文献

Allshire, R.C., and G.H. Karpen. 2008. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat. Rev. Genet.* 9:923–937.

Alonso, A., R. Mahmood, S. Li, F. Cheung, K. Yoda, and P.E. Warburton. 2003. Genomic microarray analysis reveals distinct locations for the CENP-A binding domains in three human chromosome 13q32 neocentromeres. *Hum. Mol. Genet.* 12:2711–2721.

Bailey, A.O., T. Panchenko, J. Shabanowitz, S.M. Lehman, D.L. Bai, D.F. Hunt, B.E. Black, and D.R. Foltz. 2016. Identification of the post-translational modifications present in centromeric chromatin. *Mol. Cell. Proteomics.* 15:918–931.

Bergmann, J.H., M.G. Rodríguez, N.M.C. Martins, H. Kimura, D.A. Kelly, H. Masumoto, V. Larionov, L.E. Jansen, and W.C. Earnshaw. 2011. Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO Journal.* 30:328–340.

Black, B.E., and D.W. Cleveland. 2011. Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-A nucleosomes. *Cell.* 144:471–479.

Bobkov, G.O.M., N. Gilbert, and P. Heun. 2018. Centromere transcription allows CENP-A to transit from chromatin association to stable incorporation. *J. Cell Biol.* 1–20.

Cardinale, S., J.H. Bergmann, D. Kelly, M. Nakano, M.M. Valdivia, H. Kimura, H. Masumoto, V. Larionov, and W.C. Earnshaw. 2009. Hierarchical inactivation of a synthetic human kinetochore by a chromatin modifier. *Mol. Boil. Cell.* 19:4194–4204.

Carroll, C.W., K.J. Milks, and A.F. Straight. 2010. Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J. Cell Biol.* 189:1143–1155.

Catania, S., A.L. Pidoux, and R.C. Allshire. 2015. Sequence features and transcriptional stalling within centromere DNA promote establishment of CENP-A chromatin. *PLoS Genet.* 11:e1004986.

Chan, F.L., O.J. Marshall, R. Saffery, B.W. Kim, E. Earle, K.H. Choo, and L.H. Wong. 2012. Active transcription and essential role of RNA polymerase II at the centromere during mitosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 109:1979–1984.

Cheeseman, I.M., and A. Desai. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:33–46.

Chen, C.C., S. Bowers, Z. Lipinszki, J. Palladino, S. Trusiak, E. Bettini, L. Rosin, M.R. Przewloka, D.M. Glover, R.J. O'Neill, and B.G. Mellone. 2015. Establishment of centromeric chromatin by the CENP-A assembly factor CAL1 requires FACT-mediated transcription. *Dev. Cell.* 34:73–84.

Dambacher, S., Deng, W., Hahn, M., Sadic, D., Fröhlich, J., Nuber, A., Hoischen, C., Diekmann, S., Leonhardt, H. and Schotta, G. 2012. CENP-C

facilitates the recruitment of M18BP1 to centromeric chromatin. *Nucleus*. 3, 101-110.

Drané, P., K. Ouararhni, A. Depaux, M. Shuaib, and A. Hamiche. 2010. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev*. 24:1253–1265.

Dunleavy, E.M., D. Roche, H. Tagami, N. Lacoste, D. Ray-Gallet, Y. Nakamura, Y. Daigo, Y. Nakatani, and G. Almouzni. 2009. HJURP Is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell*. 137: 485-497.

Dunleavy, E.M., G. Almouzni, and G.H. Karpen. 2011. H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G₁ phase. *Nucleus*. 2:146–157.

du Sart, D., M.R. Cancilla, E. Earle, J.I. Mao, R. Saffery, K.M. Tainton, P. Kalitsis, J. Martyn, A.E. Barry, and K.H. Choo. 1997. A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nat. Genet*. 16:144–153.

Earnshaw, W.C., and N. Rothfield. 1985. Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma*. 91:313–321.

Earnshaw, W.C., K.F. Sullivan, P.S. Machlin, C.A. Cooke, D.A. Kaiser, T.D. Pollard, N.F. Rothfield, and D.W. Cleveland. 1987a. Molecular cloning of cDNA

for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *J. Cell Biol.* 104:817–829.

Earnshaw, W.C. 1987b. Anionic regions in nuclear proteins. *J. Cell Biol.* 105:1479–1482.

Earnshaw, W.C., R.L. Bernat, C.A. Cooke, and N.F. Rothfield. 1991. Role of the centromere/kinetochore in cell cycle control. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 56:675–685.

Fachinetti, D., H.D. Folco, Y. Nechemia-Arbely, L.P. Valente, K. Nguyen, A.J. Wong, Q. Zhu, A.J. Holland, A. Desai, L.E. Jansen, and D.W. Cleveland. 2013. A two-step mechanism for epigenetic specification of centromere identity and function. *Nat. Cell Biol.* 15:1056–1066.

Fachinetti, D., J.S. Han, M.A. McMahon, P. Ly, A. Abdullah, A.J. Wong, and D.W. Cleveland. 2015. DNA sequence-specific binding of CENP-B enhances the fidelity of human centromere function. *Dev. Cell.* 33:314–327.

Foltz, D.R., L.E. Jansen, B.E. Black, A.O. Bailey, J.R. Yates, and D.W. Cleveland. 2006. The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat. Cell Biol.* 8:458–469.

Foltz, D.R., L.E. Jansen, A.O. Bailey, J.R. Yates III, E.A. Bassett, S. Wood, B.E. Black, and D.W. Cleveland. 2009. Centromere-specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell.* 137: 472-484

Fujita, R., K. Otake, Y. Arimura, N. Horikoshi, Y. Miya, T. Shiga, A. Osakabe, H. Tachiwana, J. Ohzeki, V. Larionov, H. Masumoto, and H. Kurumizaka. 2015. Stable complex formation of CENP-B with the CENP-A nucleosome. *Nucleic Acids Res.* 43:4909–4922.

Fujita, Y., T. Hayashi, T. Kiyomitsu, Y. Toyoda, A. Kokubu, C. Obuse, and M. Yanagida. 2007. Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18 α , hMis18 β , and M18BP1. *Dev. Cell.* 12:17–30.

Fukagawa, T., and W.C. Earnshaw. 2014. The centromere: chromatin foundation for the kinetochore machinery. *Dev. Cell.* 30:496–508.

Grewal, S.I.S., and S. Jia. 2007. Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* 8:35–46.

Guo, L.Y., P.K. Allu, L. Zandarashvili, K.L. McKinley, N. Sekulic, J.M. Dawicki-McKenna, D. Fachinetti, G.A. Logsdon, R.M. Jamiolkowski, D.W. Cleveland, I.M. Cheeseman, B.E. Black. 2017. Centromeres are maintained by fastening CENP-A to DNA and directing an arginine anchor-dependent nucleosome transition. *Nat. Commun.* 8:15775

Harrington, J.J., G.V. Bokkelen, R.W. Mays, K. Gustashaw, and H.F. Willard. 1997. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat. Genet.* 15:345–355.

Hoffmann, S., M. Dumont, V. Barra, P. Ly, Y. Nechemia-Arbely, M.A. McMahon, S. Hervé, D.W. Cleveland, and D. Fachinetti. 2016. CENP-A is dispensable for

mitotic centromere function after initial centromere/kinetochore assembly. *Cell Rep.* 17:2394–2404.

Hudson, D.F., K.J. Fowler, E. Earle, R. Saffery, P. Kalitsis, H. Trowell, J. Hill, N.G. Wreford, D.M. de Kretser, M.R. Cancilla, E. Howman, L. Hii, S.M. Cutts, D.V. Irvine, and K.H. Choo. 1998. Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights. *J. Cell Biol.* 141:309–319.

Ikeno, M., B. Grimes, T. Okazaki, M. Nakano, K. Saitoh, H. Hoshino, N.I. McGill, H. Cooke, and H. Masumoto. 1998. Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat. biotechnol.* 16:431–439.

Izuta, H., M. Ikeno, N. Suzuki, T. Tomonaga, N. Nozaki, C. Obuse, Y. Kisu, N. Goshima, F. Nomura, N. Nomura, and K. Yoda. 2006. Comprehensive analysis of the ICEN (Interphase Centromere Complex) components enriched in the CENP-A chromatin of human cells. *Genes Cells.* 11:673–684.

Jansen, L.E., B.E. Black, D.R. Foltz, and D.W. Cleveland. 2007. Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J. Cell Biol.* 176:795–805.

Kapoor, M., R. Montes de Oca Luna, G. Liu, G. Lozano, C. Cummings, M. Mancini, I. Ouspenski, B.R. Brinkley, and G.S. May. 1998. The *cenpB* gene is not essential in mice. *Chromosoma.* 107:570–576.

Kitagawa, K., H. Masumoto, M. Ikeda, and T. Okazaki. 1995. Analysis of protein-DNA and protein-protein interactions of centromere protein B (CENP-B)

and properties of the DNA-CENP-B complex in the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 15:1602–1612.

Lacoste, N., A. Woolfe, H. Tachiwana, A. Garea, T. Barth, S. Cantaloube, H. Kurumizaka, A. Imhof, and G. Almouzni. 2014. Mislocalization of the centromeric histone variant CenH3/CENP-A in human cells depends on the chaperone DAXX. *Mol. Cell.* 53:631–644.

Maehara, K., K. Takahashi, and S. Saitoh. 2010. CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol. Cell. Biol.* 30:2090–2104.

Maloney, K.A., L.L. Sullivan, J.E. Matheny, E.D. Strome, S.L. Merrett, A. Ferris, and B.A. Sullivan. 2012. Functional epialleles at an endogenous human centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:13704–13709.

Martins, N.M.C., J.H. Bergmann, N. Shono, H. Kimura, V. Larionov, H. Masumoto, and W.C. Earnshaw. 2016. Epigenetic engineering shows that a human centromere resists silencing mediated by H3K27me3/K9me3. *Mol. Biol. Cell.* 27:177–196.

Masumoto, H., H. Masukata, Y. Muro, N. Nozaki, and T. Okazaki. 1989. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J. Cell Biol.* 109:1963–1973.

McNulty, S.M., L.L. Sullivan, and B.A. Sullivan. 2017. Human centromeres produce chromosome-specific and array-specific alpha satellite transcripts that are complexed with CENP-A and CENP-C. *Dev. Cell.* 42:226–240.

Mito, Y., J.G. Henikoff, and S. Henikoff. 2005. Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat. Genet.* 37:1090–1097.–

Miyazaki, H., K. Higashimoto, Y. Yada, T.A. Endo, J. Sharif, T. Komori, M. Matsuda, Y. Koseki, M. Nakayama, H. Soejima, H. Handa, H. Koseki, S. Hirose, and K. Nishioka. 2013. Ash1l methylates lys36 of histone H3 independently of transcriptional elongation to counteract polycomb silencing. *PLoS Genet.* 9:e1003897.

Molina, O., G. Vargiu, M.A. Abad, A. Zhiteneva, A.A. Jeyaprasath, H. Masumoto, N. Kouprina, V. Larionov, and W.C. Earnshaw. 2016. Epigenetic engineering reveals a balance between histone modifications and transcription in kinetochore maintenance. *Nat. Commun.* 7:13334.

Moree, B., C.B. Meyer, C.J. Fuller, and A.F. Straight. 2011. CENP-C recruits M18BP1 to centromeres to promote CENP-A chromatin assembly. *J. Cell Biol.* 194:855–871.

Morozov, V.M., S. Giovannazzi, and A.M. Ishov. 2017. CENP-B protects centromere chromatin integrity by facilitating histone deposition via the H3.3-specific chaperone Daxx. *Epigenetics Chromatin.* 10:1–18.

Müller, S., and G. Almouzni. 2017. Chromatin dynamics during the cell cycle at centromeres. *Nat. Rev. Genet.* 18:192–208.

Muro, Y., H. Masumoto, K. Yoda, N. Nozaki, M. Ohashi, and T. Okazaki. 1992. Centromere protein B assembles human centromeric alpha-satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box. *J. Cell Biol.* 116:585–596.

Musacchio, A., and A. Desai. 2017. A molecular view of kinetochore assembly and function. *Biol (Basel)*. 6:E5.

Nakano, M., S. Cardinale, V.N. Noskov, R. Gassmann, P. Vagnarelli, S. Kandels-Lewis, V. Larionov, W.C. Earnshaw, and H. Masumoto. 2008. Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Dev. Cell.* 14:507–522.

Ohzeki, J., M. Nakano, T. Okada, and H. Masumoto. 2002. CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *J. Cell Biol.* 159:765–775.

Ohzeki, J., J.H. Bergmann, N. Kouprina, V.N. Noskov, M. Nakano, H. Kimura, W.C. Earnshaw, V. Larionov, and H. Masumoto. 2012. Breaking the HAC barrier: histone H3K9 acetyl/methyl balance regulates CENP-A assembly. *EMBO J.* 31:2391–2402.

Ohzeki, J., N. Shono, K. Otake, N.M.C. Martins, K. Kugou, H. Kimura, T. Nagase, V. Larionov, W.C. Earnshaw, and H. Masumoto. 2016.

KAT7/HBO1/MYST2 regulates CENP-A chromatin assembly by antagonizing Suv39h1-mediated centromere inactivation. *Dev. Cell.* 37:413–427.

Okada, M., I.M. Cheeseman, T. Hori, K. Okawa, I.X. McLeod, J.R. Yates, A. Desai, and T. Fukagawa. 2006. The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat. Cell Biol.* 8:446–457.

Okada, T., J. Ohzeki, M. Nakano, K. Yoda, W.R. Brinkley, V. Larionov, and H. Masumoto. 2007. CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell.* 131:1287–1300.

Palmer, D.K., K. O'Day, M.H. Wener, B.S. Andrews, and R.L. Margolis. 1987. A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J. Cell Biol.* 104:805–815.

Perez-Castro, A.V, F.L. Shamanski, J.J. Meneses, T.L. Lovato, K.G. Vogel, R.K. Moyzis, and R. Pedersen. 1998. Centromeric protein B null mice are viable with no apparent abnormalities. *Dev. Biol.* 201:135–143.

Peters, A.H.F.M., D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schöfer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia, and T. Jenuwein. 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell.* 107:323–337.

Pluta, A.F., N. Saitoh, I. Goldberg, and W.C. Earnshaw. 1992. Identification of a subdomain of CENP-B that is necessary and sufficient for localization to the human centromere. *J. Cell Biol.* 116:1081–1093.

Pluta, A.F., W.C. Earnshaw, and I.G. Goldberg. 1998. Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death. *J. Cell Sci.* 111:2029–2041.

Quénet, D., and Y. Dalal. 2014. A long non-coding RNA is required for targeting centromeric protein A to the human centromere. *eLife*. 3:e03254.

Rošić, S., F. Köhler, and S. Erhardt. 2014. Repetitive centromeric satellite RNA is essential for kinetochore formation and cell division. *J. Cell Biol.* 207:335–349.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I, Frise, E, Kaynig, V, Longair, M, Pietzsch, T, Preibisch, S, Rueden, C, Saalfeld, S, Schmid, B, Tinevez, J.Y, White, D.J, Hartenstein, V, Eliceiri, K, Tomancak, P, and A. Cardona. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. 9(7):676-82.

Schuettengruber, B., D. Chourrout, M. Vervoort, B. Leblanc, and G. Cavalli. 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*. 128:735–745.

Shang, W.H., T. Hori, F.G. Westhorpe, K.M. Godek, A. Toyoda, S. Misu, N. Monma, K. Ikeo, C.W. Carroll, Y. Takami, A. Fujiyama, H. Kimura, A.F. Straight,

and T. Fukagawa. 2016. Acetylation of histone H4 lysine 5 and 12 is required for CENP-A deposition into centromeres. *Nat. Commun.* 7:13465.

Shono, N., J. Ohzeki, K. Otake, N.M.C. Martins, T. Nagase, H. Kimura, V. Larionov, W.C. Earnshaw, and H. Masumoto. 2015. CENP-C and CENP-I are key connecting factors for kinetochore and CENP-A assembly. *J. Cell Sci.* 128:4572–4587.

Stein, A., J.P. Whitlock, and M. Bina. 1979. Acidic polypeptides can assemble both histones and chromatin in vitro at physiological ionic strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:5000–5004.

Sullivan, B.A., and G.H. Karpen. 2004. Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:1076–1083.

Suzuki, N., M. Nakano, N. Nozaki, S.I. Egashira, T. Okazaki, and H. Masumoto. 2004. CENP-B interacts with CENP-C domains containing Mif2 regions responsible for centromere localization. *J. Biol. Chem.* 279:5934–5946.

Tanaka, Y., H. Kurumizaka, and S. Yokoyama. 2005. CpG methylation of the CENP-B box reduces human CENP-B binding. *FEBS J.* 272:282–289.

Tsuduki, T., M. Nakano, N. Yasuoka, S. Yamazaki, T. Okada, Y. Okamoto, and H. Masumoto. 2006. An artificially constructed de novo human chromosome behaves almost identically to its natural counterpart during metaphase and anaphase in living cells. *Mol. Cell. Biol.* 26:7682–7695.

- Tsunaka, Y., Y. Fujiwara, T. Oyama, S. Hirose, and K. Morikawa. 2016. Integrated molecular mechanism directing nucleosome reorganization by human FACT. *Genes Dev.* 30:673–686.
- Tyler, J.K. 2002. Chromatin assembly. cooperation between histone chaperones and ATP-dependent nucleosome remodeling machines. *European J. Biochem.* 269:2268–2274.
- Westhorpe, F.G., and A.F. Straight. 2015. The centromere: epigenetic control of chromosome segregation during mitosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7:1–25.
- Willard, H.F., and J.S. Waye. 1987. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet.* 3:192–198.
- Wong, L.H., K.H. Brettingham-Moore, L. Chan, J.M. Quach, M.A. Anderson, E.L. Northrop, R. Hannan, R. Saffery, M.L. Shaw, E. Williams, and K.H. Choo. 2007. Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res.* 17:1146–1160.
- Yuan, W., M. Xu, C. Huang, N. Liu, S. Chen, and B. Zhu. 2011. H3K36 methylation antagonizes PRC2-mediated H3K27 methylation. *J. Biol. Chem.* 286:7983–7989.

Figure 1

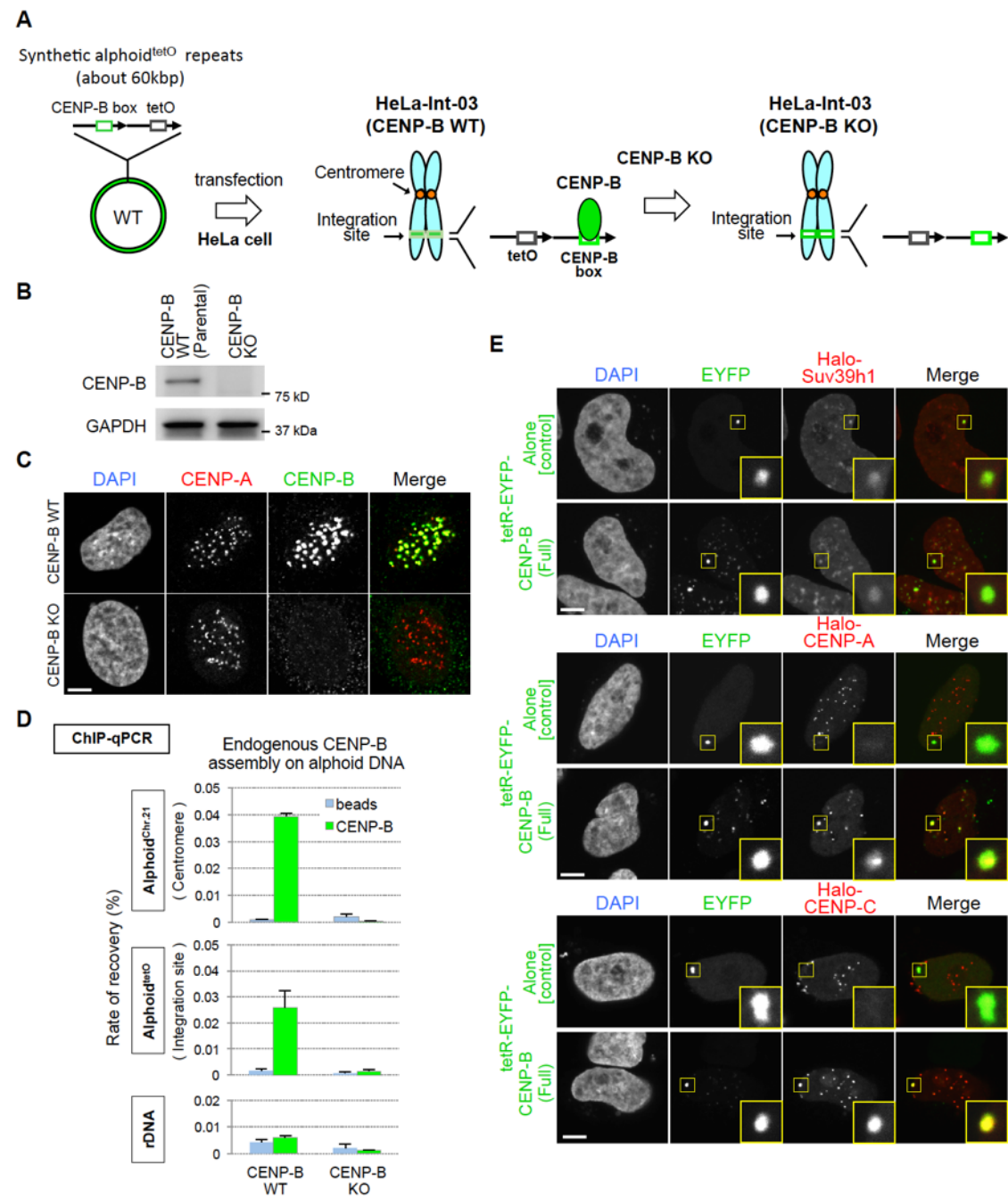


Figure 1

CENP-B 依存的に異所的 Alphoid^{tetO} DNA 挿入部位に集合するタンパク質のスクリーニングのための FMIT アッセイの有効性評価

(A) HeLa-Int-03 細胞株の概略図。HeLa-Int-03 には、tetO および CENP-B box 配列を含む合成 alphoid^{tetO} DNA 反復配列の異所的挿入部位がある。この細胞株は、以前の研究 (Ohzeki et al., 2012) において確立された。CENP-B 遺伝子は CRISPR/Cas9 システムによってノックアウトされた。CENP-B WT および KO は、それぞれ CENP-B 遺伝子の野生型およびノックアウトを示している。

(B、C and D) HeLa-Int-03 における CENP-B 遺伝子のノックアウトは、CENP-B タンパク質に対する抗体を使用した (B) イムノブロットイング、(C) 免疫染色、(D) ChIP-定量 PCR 法によって確認された。(C) スケールバーは 5 μ m を示す。(D) ChIP 後の回収 DNA は、alphoid^{tetO}、alphoid^{chr.21}、および rDNA (リボソーム DNA) に対するプライマーセットを使用したリアルタイム PCR によって定量化した。回収率は IP/Input (%) を表している。結果は平均 \pm S.E.M. (実験回数 n = 3)。(E) HeLa-Int-03 CENP-B KO 株を使用した FMIT アッセイにおける alphoid^{tetO} 上の Halo-Suv39h1、-CENP-A および-CENP-C の tetR-EYFP-CENP-B 依存的集合の代表的な画像。黄色の四角は、alphoid^{tetO} DNA 上の tetR-EYFP 融合タンパク質のスポット (緑) を示しています。スケールバーは 5 μ m を示す。

Figure 2

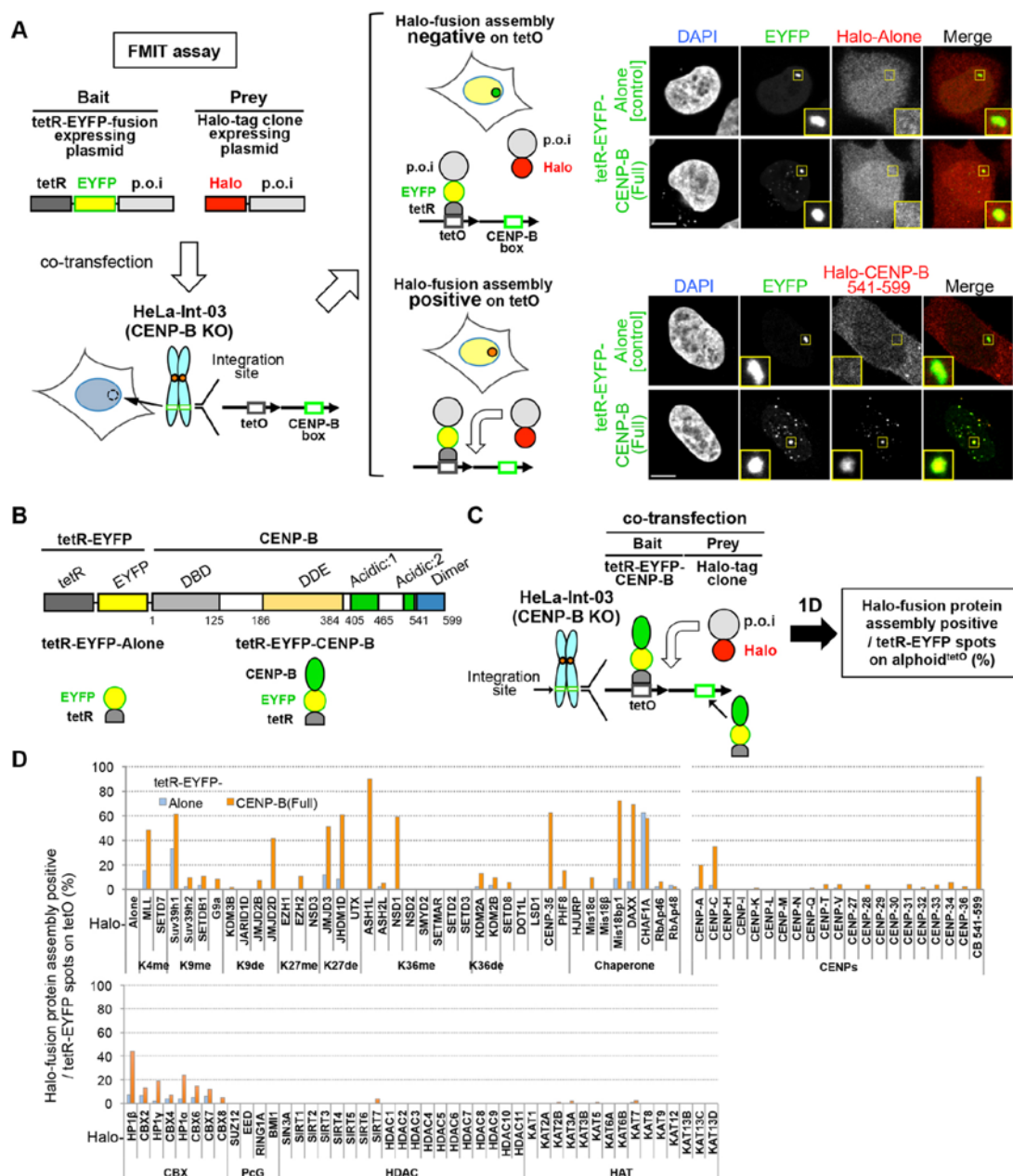


Figure 2

CENP-B 依存的に異所的 Alphoid^{tetO} DNA に集合するタンパク質の FMIT アッセイを使用したスクリーニング

(A) FMIT アッセイの実験デザイン。Bait(tetR-EYFP 融合タンパク質)または Prey(Halo 融合タンパク質)を発現するプラスミドを、CENP-B KO HeLa-Int-03 細胞株にコトランスフェクトする。EYFP シグナルと Halo-TMR リガンドシグナルの共局在は (黄色い四角)、Bait と Prey の相互作用が存在する場合、あるいは、Prey が Bait によって誘発される alphoid^{tetO} DNA クロマチン上の変化を認識して集合する場合に検出することができる。ネガティブコントロールの例 (Prey の集合無し)と、ポジティブコントロールの例 (Prey の集合有り)は、それぞれ右上のパネルと右下のパネルに示されている。ポジティブコントロールの場合、tetR-EYFP-CENP-B (Full) は Halo-CENP-B dimer domain (541-599) を集合する。黄色の四角は、alphoid^{tetO} DNA サイト上の tetR-EYFP 融合タンパク質のスポット (緑)を示している。スケールバーは 5 μ m を表す。(B) Bait (tetR-EYFP-CENP-B とそのネガティブコントロールとなる tetR-EYFP-Alone) の構造の概略図。DBD; DNA 結合ドメイン、DDE; DDE スーパーファミリーエンドヌクレアーゼドメイン、Acidic1,2; 酸性ドメイン 1、2、Dimer ; 二量体ドメイン。(C) tetR-EYFP-CENP-B テザリングにより異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位へ集合するタンパク質の探索。Bait または Prey の発現プラスミドを HeLa-Int-03 CENP-B KO 細胞株にコトランスフェクトした。トランスフェクションの 1 日後に細胞を固定した。50 を超える細胞を解析し、各 Prey における Halo ポジティブな EYFP スポットの頻度を計算した。tetR-EYFP-CENP-B は、tetO だけでなく CENP-B ボックスにも結合する。(D) 異所的 alphoid^{tetO} 挿入部位における、CENP-B 非依存的 (Bait; tetR-EYFP-Alone、青色のバー) および CENP-B 依存的 (Bait; tetR-EYFP-CENP-B、オレンジ色のバー) な Halo tag 融合 (Prey) のヒストン修飾因子、ヒストンシャペロン、CENP、ヘテロクロマチンタンパク質の集合は、それらの共局在を示す細胞の頻度 (%) として評価し、表した。K4me、K9me、K27me、および K36me は、H3 の各 lysin に対する methyltransferase を示す。K9de、K27de、および K36de は、H3 lysin de-methylase を示す。

Figure 3

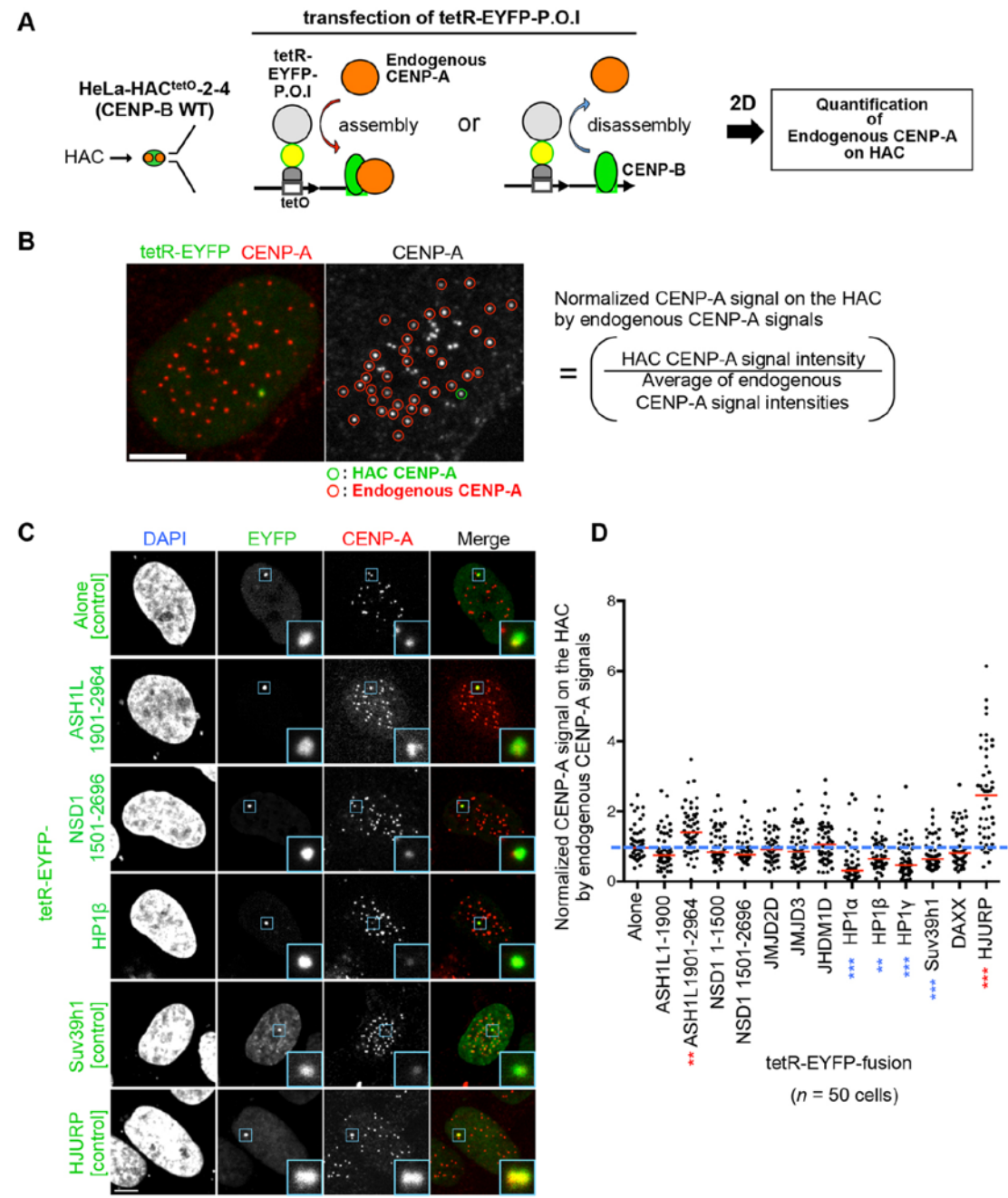


Figure 3

Alphoid^{tetO}-HAC へのテザリングと CENP-A 集合の増減の定量を指標とした因子の評価

(A) Alphoid^{tetO} HAC 上の CENP-A 集合の定量化の概略図。Alphoid^{tetO} HAC を含む HeLa 細胞株 (HeLa-HAC^{tetO}-2-4) に tetR-EYFP 融合タンパク質発現プラスミドをトランスフェクトし、その 2 日後に固定し抗 CENP-A 抗体で免疫染色した。赤と青の矢印は、tetR-EYFP 融合テザリングによる内因性 CENP-A (集合または乖離) への影響を示している。(B) HAC での CENP-A 集合の定量化の例。tetR-EYFP-Alone プラスミドをトランスフェクトされた HeLa-HAC^{tetO}-2-4 細胞を抗 CENP-A 抗体で染色した。スケールバーは 5 μ m を示す。Shono et al., 2015 に記載されている手法に従い、定量化のために、HAC (緑の円) の CENP-A シグナル強度は、内因性セントロメア (赤丸) の CENP-A の平均シグナル強度によって標準化された。(C and D) 同定因子のテザリングされた HAC 上の CENP-A 集合の定量化。定量アッセイの代表的な画像例を左のパネルに示した (青い四角は HAC を示す)。スケールバーは 5 μ m を示す。各アッセイについて 50 個の細胞を解析した。赤い線は中央値を示す。青い破線は、コントロール (tetR-EYFP-Alone) の中央値を示している。コントロールに対する有意差は、赤いアスタリスク (増加)、青いアスタリスク (減少) で表されている。** P < 0.01; ***P < 0.001 (Mann-Whitney 検定)。

Figure 4

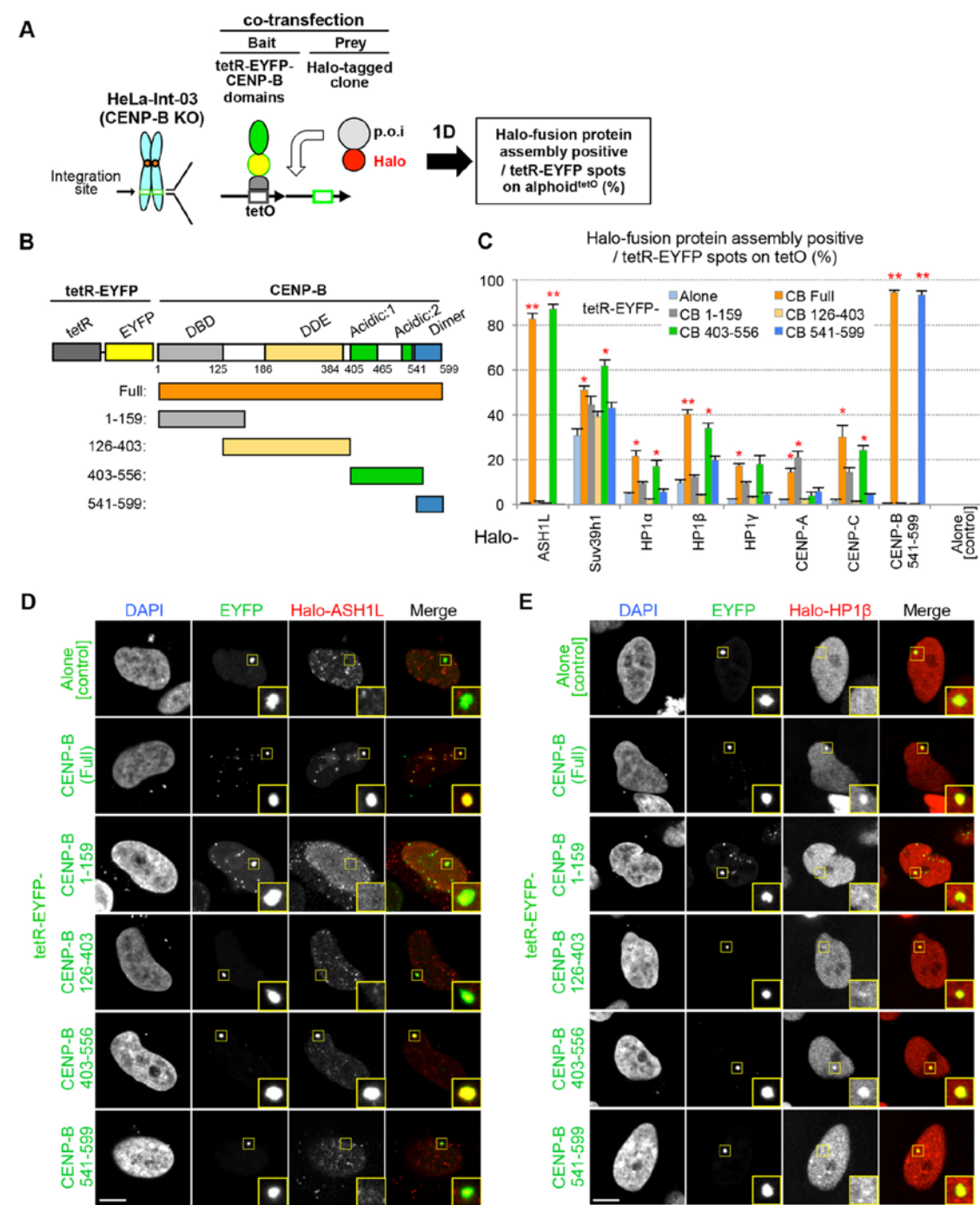


Figure 4

FMIT アッセイによる ASH1L と HP1 を集合する CENP-B ドメインの同定

(A and B) (A) FMIT アッセイの概略図および、(B) 解析に用いた tetR-EYFP-CENP-B シリーズ(Bait)。(C) 異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位における Halo 融合タンパク質(Prey)の集合の頻度。 tetR-EYFP-CENP-B シリーズ、tetR-EYFP-Alone、および Halo-tag クローン (Halo 融合遺伝子) 発現プラスミドを HeLa Int-03 CENP-B KO 細胞株にコトランスフェクトした。各アッセイで Halo 集合ポジティブな EYFP 蛍光スポットの頻度を取得するために、50 を超える細胞をカウントした。結果は平均±S.E.M. (実験回数 n=3 実験)。tetR-EYFP-Alone (t 検定、両側) に対する P 値は、アスタリスクで示した *p<0.05、**p<0.01。

(D and E) FMIT アッセイにおける Halo-ASH1L (D) および-HP1 β (E) 集合の代表的な画像。細胞は DAPI と Halo-TMR リガンドで染色した。黄色の四角は、異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位の tetR-EYFP-タンパク質のスポット(緑)を示している。スケールバーは 5 μ m を示す。

Figure 5

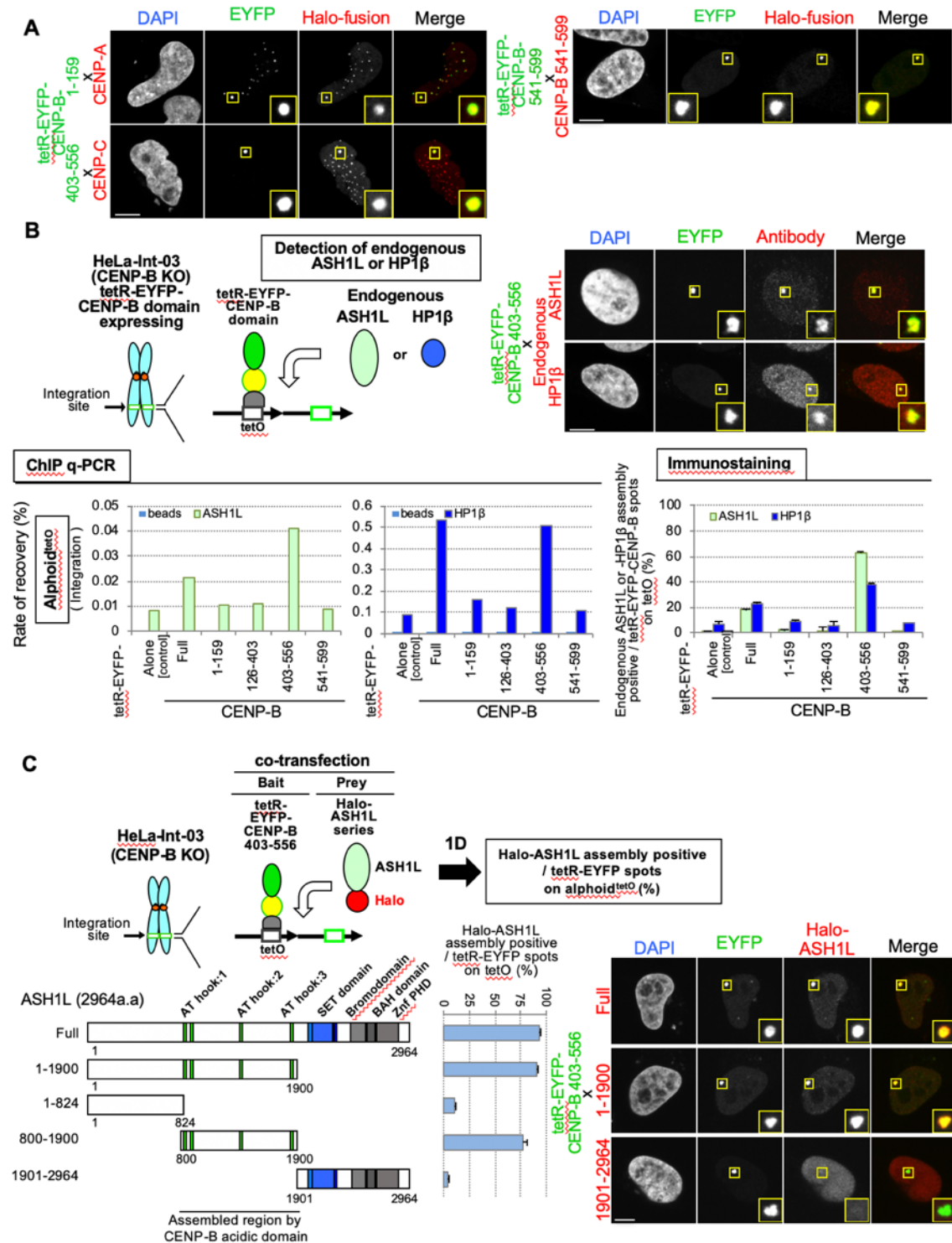


Figure 5

Figure 4 に関連する FMIT アッセイ

(A) Figure 4 C の FMIT アッセイにおいて、tetR-EYFP-CENP-B¹⁻¹⁵⁹ と Halo-CENP-A (左上)、tetR-EYFP-CENP-B⁴⁰³⁻⁵⁵⁶ と Halo-CENP-C (左下)、tetR-EYFP-CENP-B⁵⁴¹⁻⁵⁹⁹ と Halo-CENP-B⁵⁴¹⁻⁵⁹⁹ (右) の組み合わせの発現プラスミドをコトランスフェクトした細胞の代表的な画像。細胞は DAPI と Halo-TMR リガンドで染色した。黄色の四角は、異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位の tetR-EYFP-タンパク質スポット (緑) を示している。スケールバーは 5 μ m を示す。(B) 内在性 ASH1L および HP1 β の CENP-B 依存性的集合の検証。tetR-EYFP-Alone または -CENP-B ドメインシリーズを発現する HeLa-Int-03 CENP-B KO 細胞を、免疫染色したうえで顕微鏡観察 (右上のパネルと右下グラフ (実験回数 n=3)) および ChIP-定量 PCR アッセイ (実験回数 n=1) によって解析した (左下のパネル)。免疫染色サンプルは、細胞を DAPI、抗 ASH1L または -HP1 β 抗体 (赤) で染色した。黄色の四角は、異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位の tetR-EYFP-Alone と、tetR-EYFP-CENP-B ドメインのスポット (緑) を示している。スケールバーは 5 μ m を示す。各アッセイでの集合の頻度を得るために、100 を超える細胞をカウントした (右下のパネル)。結果は平均 \pm S.E.M. (実験回数 n=3)。(C) CENP-B 酸性ドメインテザリングによって集合する ASH1L の領域の同定。FMIT アッセイ (上) とテストした ASH1L タンパク質のドメイン (左下) の概略図。(下位中央) トランスフェクションの 24 時間後の異所的 alphoid^{tetO} 挿入部位での Halo-ASH1L 集合の頻度。各アッセイで 50 を超える細胞をカウントした。結果は平均 \pm S.E.M. (実験回数 n=3)。右下; tetR-EYFP-CENP-B⁴⁰³⁻⁵⁵⁶ 発現プラスミドと Halo-ASH1L シリーズ発現プラスミドのコトランスフェクションされた細胞の代表的な画像。黄色の四角は、異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位の tetR-EYFP-タンパク質のスポット (緑) を示している。スケールバーは 5 μ m を示す。

Figure 6

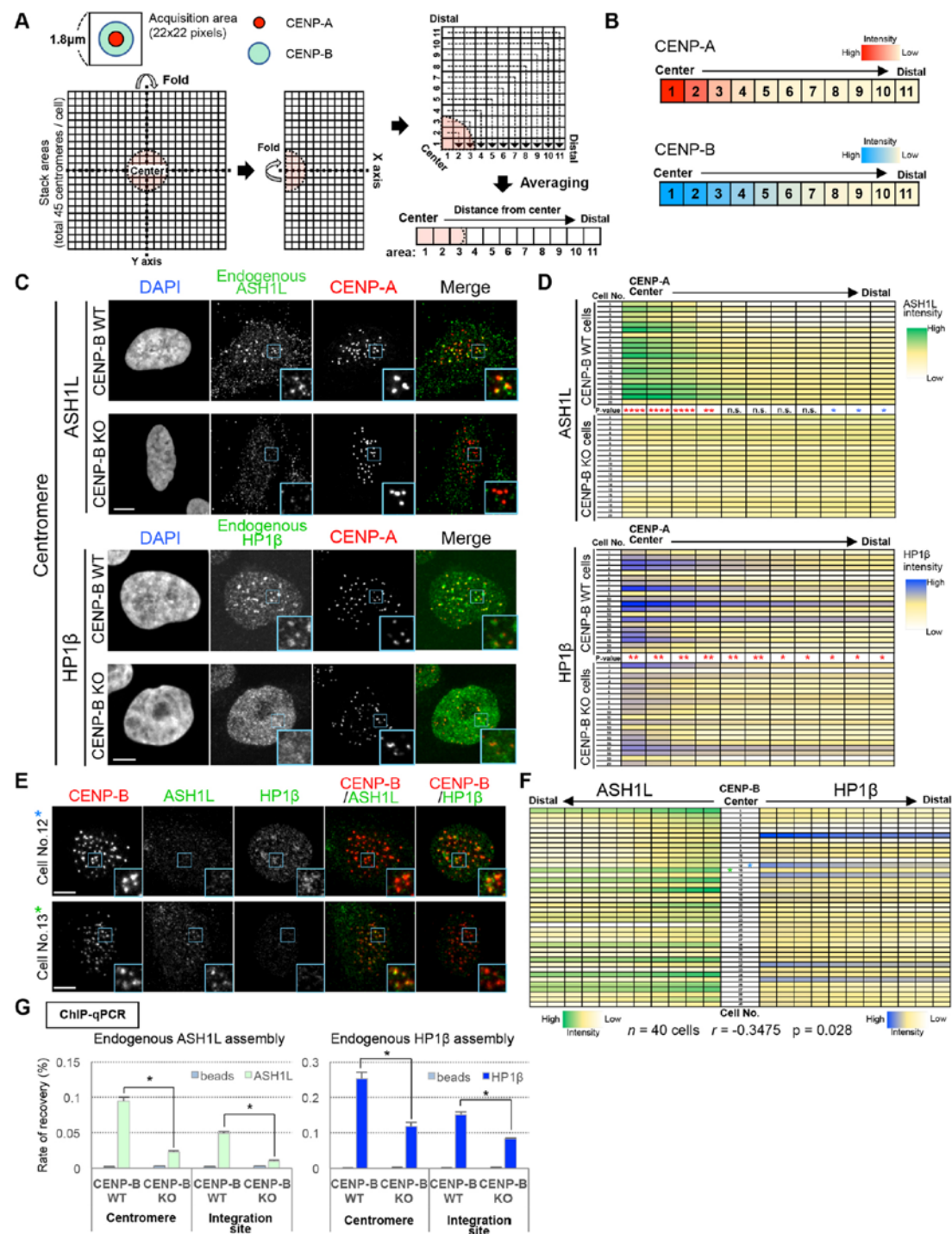


Figure 6

ASH1L および HP1 β のアルフォイド DNA への CENP-B 依存的局在

(A) ピクセル中心から遠位 11 ピクセルまでの範囲の解析対象のタンパク質 (CENP-A や CENP-B など) の蛍光強度の分布を定量化し、各セルを統合した (材料と方法の顕微鏡観察と画像イメージの定量を参照)。(B) 蛍光強度の分布の例。

CENP-A または CENP-B の蛍光スポットは、(A) で説明した方法で 20 個の細胞において各 45 または 40 スポット/細胞で解析した。20 個の細胞の定量化された蛍光強度は、距離ごとに平均し、ヒートマップとして示した。蛍光強度のインジケータは右側に表示した。(C and D) セントロメアにおける内因性 ASH1L と HP1 β の検出。CENP-B WT または KO の HeLa-Int-03 細胞株は、DAPI、抗 CENP-A、および抗 ASH1L または抗 HP1 β 抗体を使って染色した。(C) 染色された細胞の代表的な画像例。抗 CENP-A 抗体、抗 ASH1L または HP1 β 抗体は、それぞれ赤色、緑色で表されている。セントロメアの例として、青い四角の領域を拡大して表示した。スケールバーは 5 μ m を示す。(D) CENP-A スポット周辺の ASH1L および HP1 β の蛍光強度プロファイルのヒートマップ。蛍光強度は (A) に従って定量化した。各細胞株について 20 個の細胞を分析した (45 セントロメア/細胞)。ヒートマップの右側に蛍光強度のインジケータを表示した。P 値は、WT と KO の間の各領域の有意差を示します。**** P < 0.0001; *** P < 0.0005; ** P < 0.001; * P < 0.005; n.s.: 有意差無し (Mann-Whitney 検定; 赤: WT > KO、青: WT < KO)。(E and F) 細胞を抗 CENP-B 抗体 (二次抗体: Alexa Fluor 405)、抗 ASH1L 抗体 (二次抗体: Alexa Fluor 594) および抗 HP1 β 抗体 (二次抗体: Alexa Fluor 488) で染色した。(E) 染色細胞の代表的な画像例。

(F) の細胞 No.12 および細胞 No.13 を表示している。CENP-B (赤)、ASH1L (緑)、HP1 β (緑)。セントロメアの例として、青い四角の領域を拡大した。スケールバーは 5 μ m を示す。(F) CENP-B スポット周辺の ASH1L および HP1 β の蛍光強度プロファイルのヒートマップ。40 個の細胞を解析した (40 個の CENP-B スポット/細胞)。蛍光強度は (A) に従って定量化した。CENP-B 周辺の ASH1L と HP1 β の分布の関係は、(D) で有意差が検出されたピクセル領域の総蛍光強度によって評価された。つまり、ASH1L のピクセル領域 1~4 と HP1 β のピクセル領域 1~11 となる (Spearman の順位相関係数: 相関係数は r で示した)。

(G) ChIP アッセイによるセントロメア (Alphoid^{Chr.21}) および挿入部位 (Alphoid^{tetO}) での内因性 ASH1L または HP1 β 集合の定量化。結果は平均 \pm S.E.M. (実験回数 $n = 3$)。P 値 (t 検定、両側) はアスタリスクで示した。* $p < 0.05$ 。

Figure 7

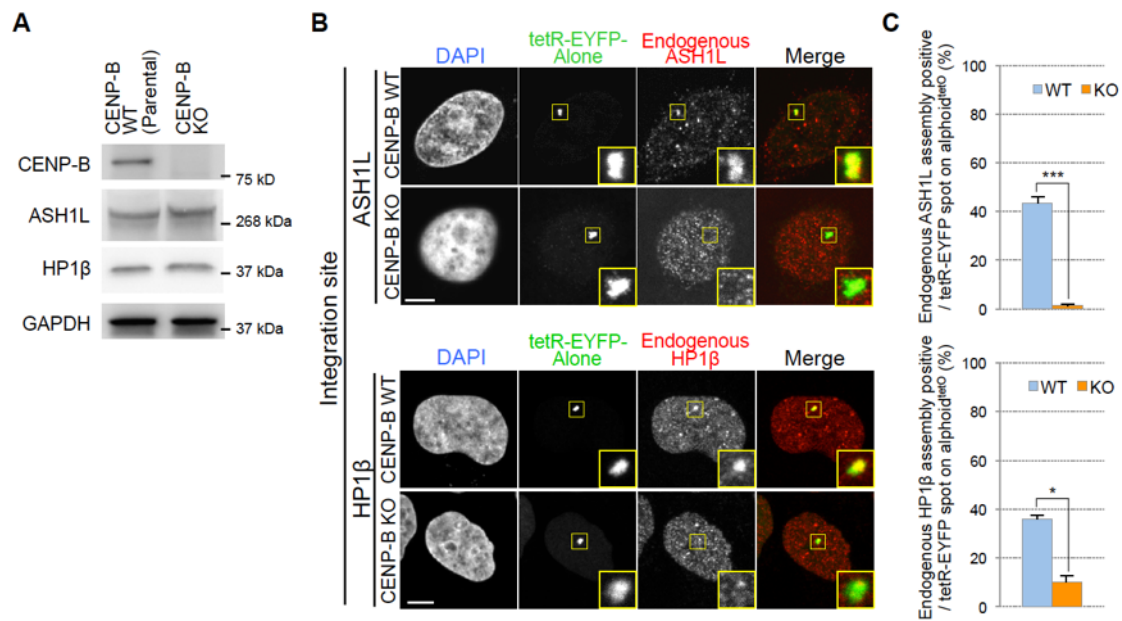


Figure 7

異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位での内在性 ASH1L 及び HP1 の CENP-B 依存的局在

(A) CENP-B WT および CENP-B KO 細胞株における ASH1L および HP1β のウェスタンブロッティング解析。使用した抗体は左側に示した。(B and C) 異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位での内在性 ASH1L または HP1β の検出。tetR-EYFP-Alone 発現プラスミドを CENP-B WT または KO の HeLa-Int-03 細胞株にトランスフェクトした。(B) 細胞を DAPI および抗 ASH1L または抗 HP1β 抗体 (赤) で染色した。黄色の四角は、alphoid^{tetO} DNA 上の tetR-EYFP-タンパク質のスポット (緑) を示している。スケールバーは 5μm を示す。(C) 異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位での内在性 ASH1L または HP1β の集合を示した細胞の頻度。50 個を超える細胞の EYFP スポット上の内在性因子のシグナルをカウントした。結果は平均±S.E.M. (実験回数 n=3 実験)。P 値 (t 検定、両側) はアスタリスクで示した。* p < 0.05、*** p < 0.005

Figure 8

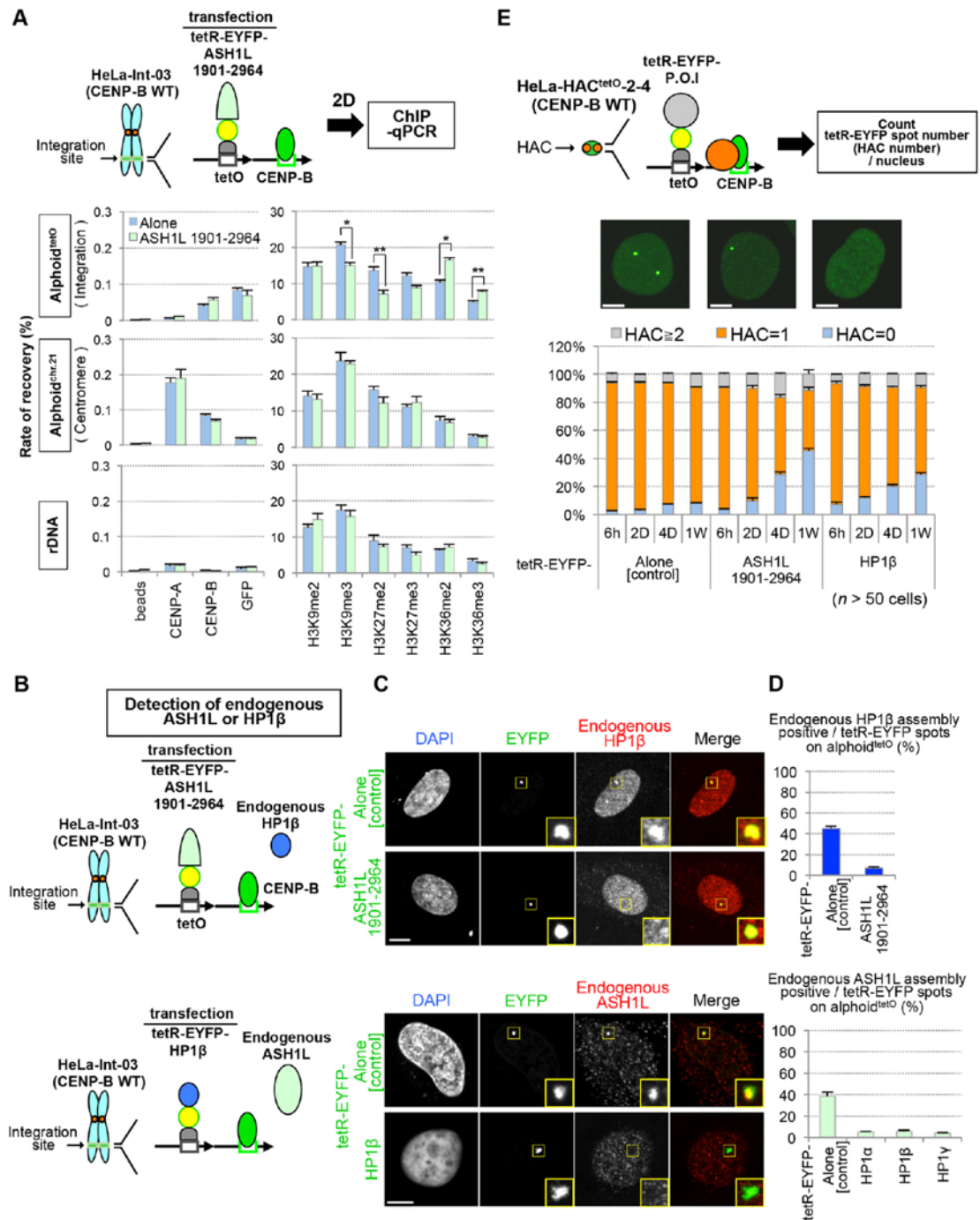


Figure 8

Alphoid DNA 上における ASH1L と HP1 の相互排他的な集合

(A) ASH1L テザリングが促進するヒストン修飾状態。tetR-EYFP-Alone または tetR-EYFP-ASH1L¹⁹⁰¹⁻²⁹⁶⁴ 発現プラスミドを HeLa-Int-03 細胞にトランスフェクトした。ChIP 解析のため、トランスフェクションの 2 日後に細胞を固定した。グラフに記載されている抗体によって免疫沈降されたクロマチンは、定量 PCR 法によって定量化された。結果は平均±S.E.M. (実験回数 n=3)。P 値 (t 検定、両側) はアスタリスクで示した。* p < 0.05; ** p < 0.01 (B、C and D) ASH1L または HP1s テザリングによる異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位での内因性 HP1 β または ASH1L 量への影響。(B) アッセイの概略図。(C) このアッセイの代表的な画像。細胞を DAPI および抗 ASH1L または抗 HP1 β 抗体 (赤) で染色した。黄色の四角は、alphoid^{tetO} DNA 上の tetR-EYFP-タンパク質のスポット (緑) を示している。スケールバーは 5 μ m を示す。(D) tetR-EYFP-ASH1L¹⁹⁰¹⁻²⁹⁶⁴ または -HP1 β 発現プラスミドのトランスフェクション 1 日後の異所的 alphoid^{tetO} DNA 挿入部位における内因性 HP1 β または ASH1L 集合を示した細胞の頻度。各アッセイで 100 を超える細胞をカウントした。結果は平均±S.E.M. (実験回数 n=3)。(E) ASH1L または HP1 β テザリングが染色体 (HAC) の安定性におよぼす影響。HAC は tetR-EYFP の蛍光スポットとして視覚化された。tetR-EYFP 融合タンパク質発現 alphoid^{tetO}-HAC 保有細胞は、最初、ドキシサイクリンの存在下で (テザリングなし) 培養された。次に、ドキシサイクリンを洗い流すことによって、tetR-EYFP 融合タンパク質を HAC にテザリングした。ドキシサイクリン洗浄後 (6h-1W)、経時的に細胞を固定、観察した。HAC は tetR-EYFP 蛍光のスポットの数としてカウントされた。灰色、オレンジ色、または青色のバーは、それぞれ HAC 保有数 ≥ 2 、=1、または 0、の細胞の頻度を示す。EYFP 蛍光検出可能な 50 以上の細胞を各アッセイで解析した。結果は平均±S.E.M. (実験回数 n=3)。スケールバーは 5 μ m を示す。

Figure 9

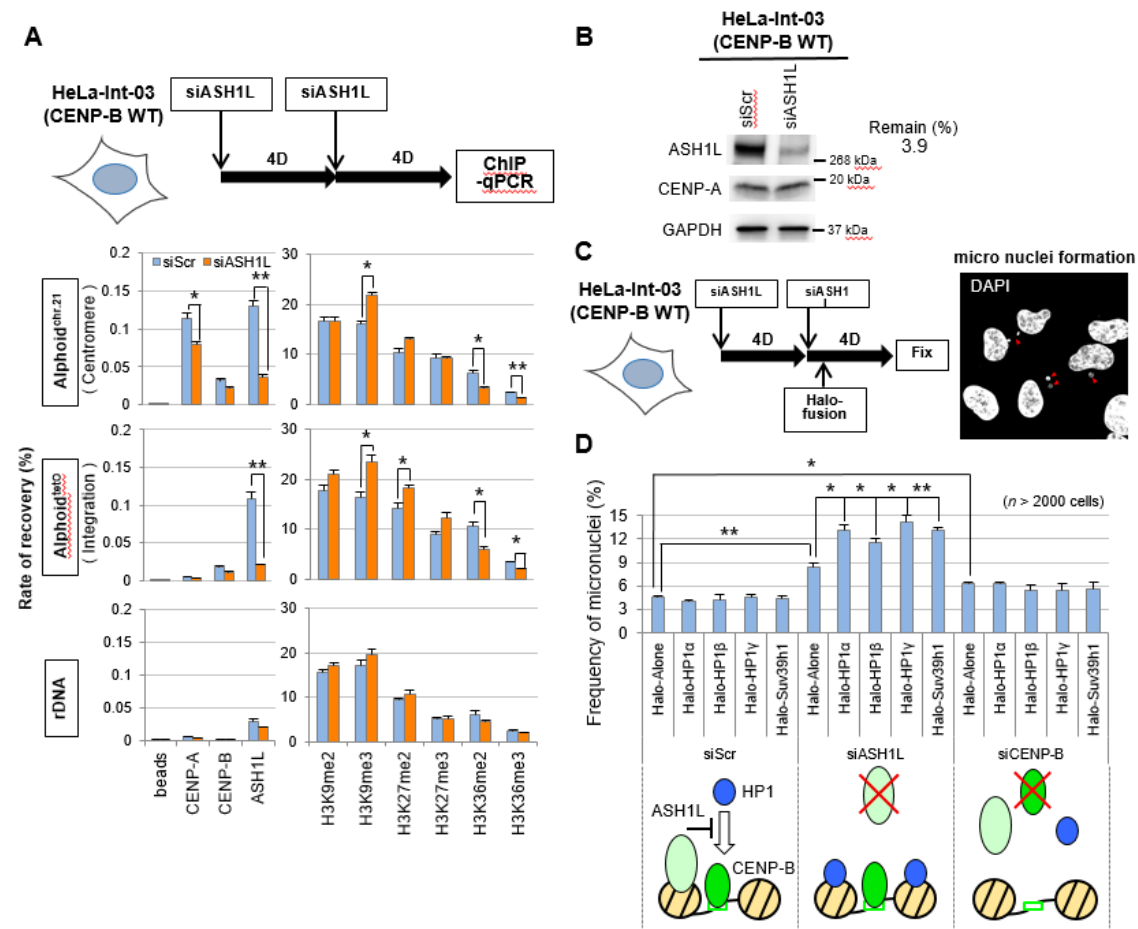


Figure 9

セントロメアにおける ASH1L 機能の評価

(A) ASH1L ノックダウン細胞の ChIP アッセイ

siASH1L、または siScr(コントロール)を HeLa-Int-03 細胞に 2 回 (細胞回収の 8 日前と 4 日前に) トランスフェクションした。結果は平均±S.E.M. (実験回数 n=3)。P 値 (t 検定、両側) はアスタリスクで示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

(B) ウェスタンブロッティングによる (A) で使用された細胞における ASH1L ノックダウンレベルの評価。使用抗体は左側に記載。右側に記載されている ASH1L ノックダウンレベルは、全細胞抽出液の希釈系列から計算した (Figure 14)。総タンパク質量は GAPDH 発現レベルで補正した。(C and D) ASH1L/HP1s バランスの乱れは、微小核形成の頻度を増加させる。HeLa-Int-03 細胞に siRNA (siScr、siASH1L または siCENP-B) および Halo 融合タンパク質発現プラスミドをトランスフェクションした。プラスミドのトランスフェクションは、最初の siRNA トランスフェクションから 5 日後に行った。細胞を DAPI で染色し、微小核形成についてカウントした。赤い矢印は微小核を示す。合計 2000 を超える細胞を各アッセイでカウントした。結果は平均±S.E.M. (実験回数 n=3)。P 値 (t 検定、両側) はアスタリスクで示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。下のモデル図は、この実験におけるセントロメア alphoid DNA 上のタンパク質の作用を表している。

Figure 10

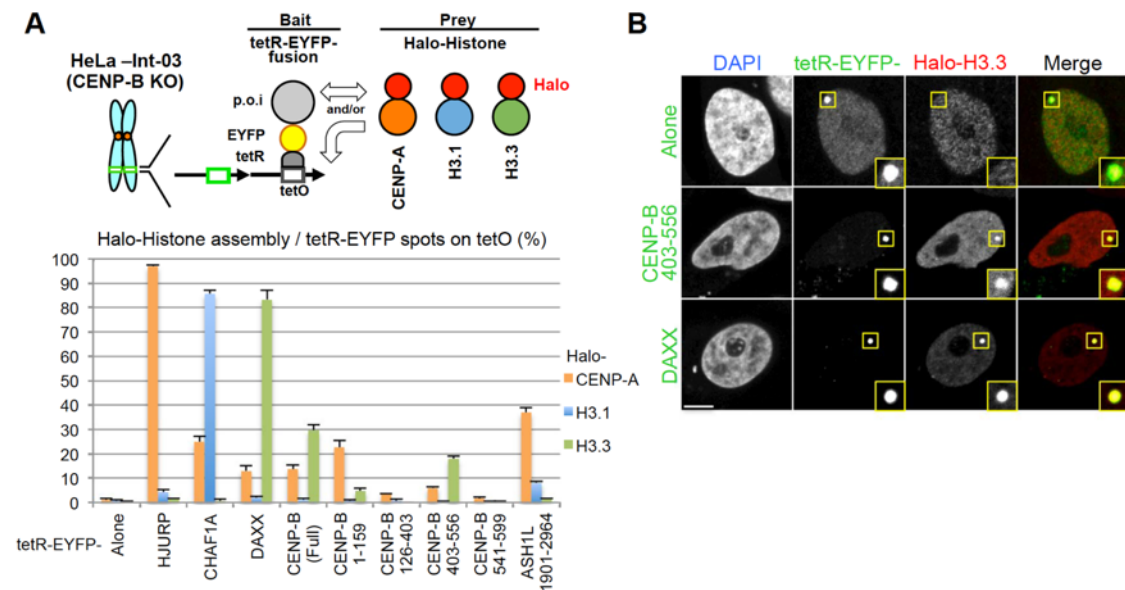


Figure10

CENP-B 酸性ドメインは Halo-H3.3 集合を促進する

(A) (上部) 実験の概略図。(下部) 異所的 $\text{alphoid}^{\text{tetO}}$ DNA 挿入部位において Halo-CENP-A、-H3.1、または-H3.3 集合を示した細胞の頻度。tetR-EYFP 融合タンパク質(Bait)と Halo-Histone 発現プラスミド(pre)は、HeLa-Int-03 CENP-B KO 細胞へコトランスフェクションされ、その 24 時間後に固定した。各アッセイで Halo 集合ポジティブな EYFP 蛍光スポットの頻度を取得するために 50 個の細胞を解析した。結果は平均 \pm S.E.M. (実験回数 $n=3$)。 (B)このアッセイの代表的な画像。細胞は DAPI と Halo-TMR リガンドで染色した。黄色の四角は、異所的 $\text{alphoid}^{\text{tetO}}$ DNA 挿入部位の tetR-EYFP-タンパク質のスポット (緑)を示している。スケールバーは 5 μm を示す。

Figure 11

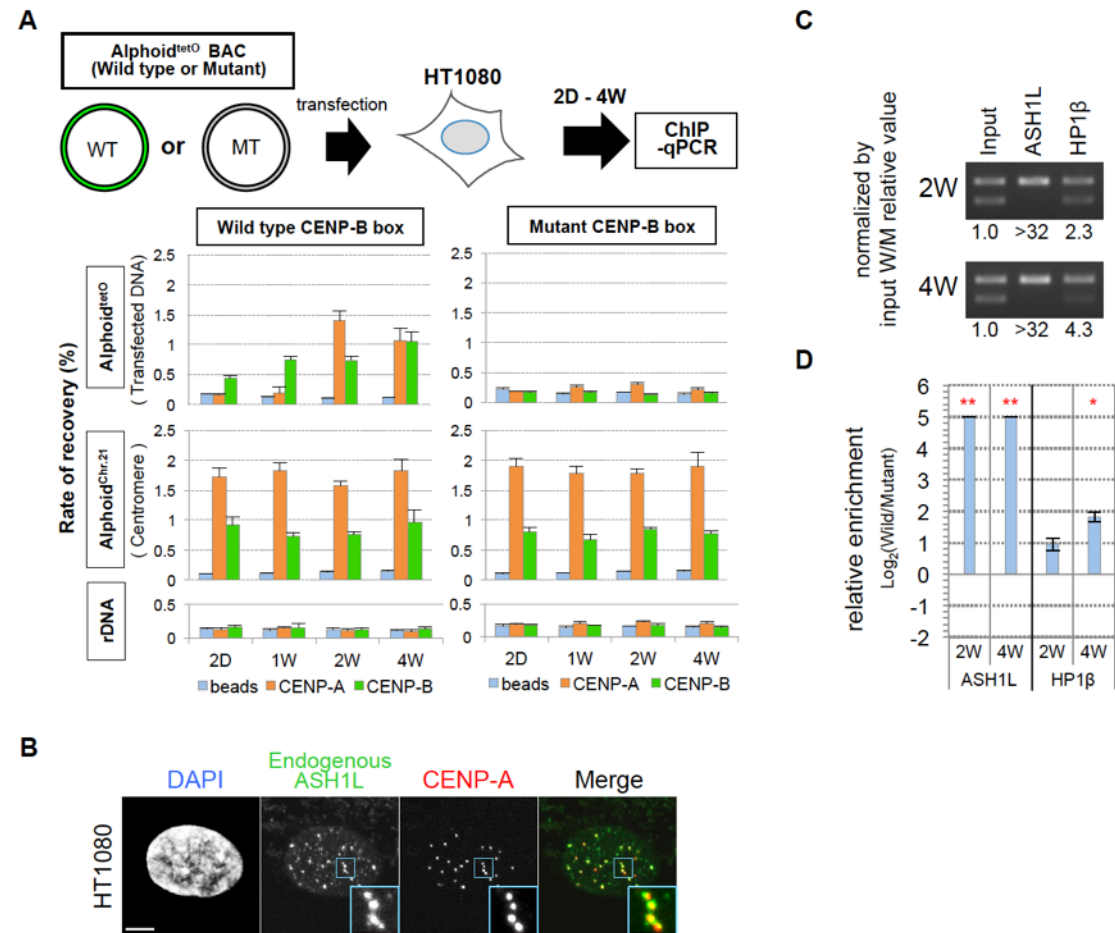


Figure 11

HT1080 細胞における CENP-B 依存的な CENP-A, ASH1L および HP1 β の新規集合

(A) HT1080 に導入された alphoid^{tetO} DNA 上の CENP-B 依存的 CENP-A の新規集合。上部パネル; 当アッセイの概略図。Wild type または Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA を HT1080 細胞に個別にトランスフェクトした。下部パネル; ChIP アッセイは、抗 CENP-A 抗体、抗 CENP-B 抗体を使用して行われた (“beads”は抗体無し)。結果は平均 \pm S.E.M. (実験回数 n=3)。(B) HT1080 細胞のセントロメアにける内因性 ASH1L の検出。Figure 6 と同様に、細胞を抗 ASH1L(緑)と抗 CENP-A 抗体(赤)で染色した。スケールバーは 5 μ m を示す。

(C and D) ASH1L および HP1 β は、CENP-B の結合に応じて、導入された alphoid^{tetO} DNA 上で集合が検出された。ASH1L および HP1 β は、Figure 12 に記載されている ChIP および競合的 PCR によって解析された。トランスフェクションの 2 週間 (2W) および 4 週間 (4W) 後、細胞は抗 ASH1L または抗 HP1 β 抗体で解析された。結果は平均 \pm S.E.M. (実験回数 n = 3)。P 値 (t 検定、両側) はアスタリスクで示した。* p < 0.05、** p < 0.01。赤いアスタリスクは、0 < WT/MT (log2 base)を示す。

Figure 12

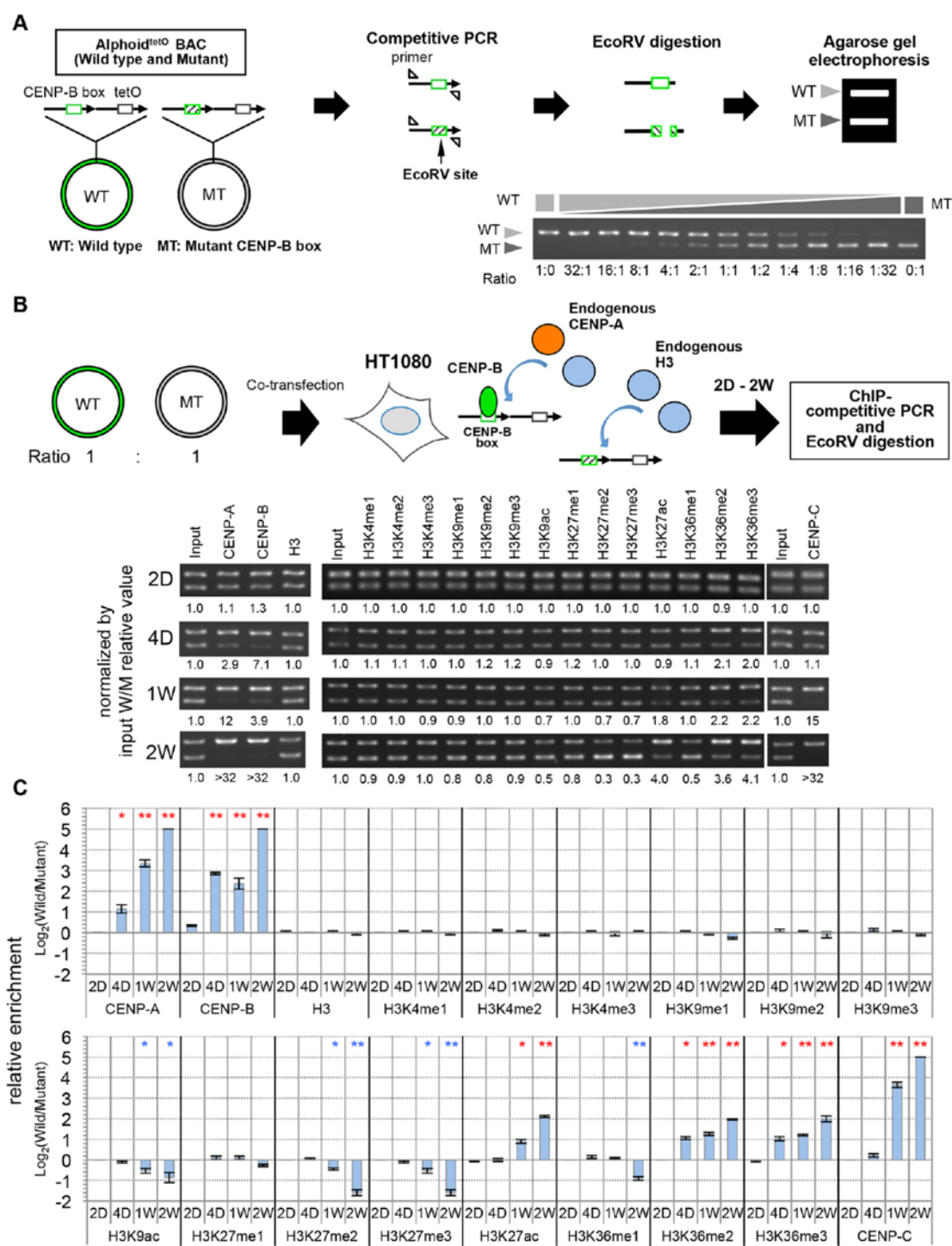


Figure 12

導入されたアルフォイド DNA に対する CENP-B 依存性ヒストン修飾の検出

ChIP アッセイと競合的 PCR による、導入された $\text{alphoid}^{\text{tetO}}$ DNA 上における CENP-B 結合が誘導するヒストン H3 修飾。(A) 競合的 PCR の Wild type/Mutant 比率の指標。Wild type および Mutant CENP-B box $\text{alphoid}^{\text{tetO}}$ DNA を指定の比率で混合し、 $\text{alphoid}^{\text{tetO}}$ DNA 特異的プライマーセットを使用した PCR によって増幅した。PCR 産物は初期比を維持しながら増幅され、EcoRV で消化した後、アガロースゲル電気泳動で解析された。明るい灰色の矢印と暗い灰色の矢印は、それぞれ wild type と mutant CENP-B box $\text{alphoid}^{\text{tetO}}$ DNA からの PCR フラグメントを示している。(B) 上部パネル; ChIP アッセイと競合的 PCR の概略図。HT1080 細胞へは、Wild type と Mutant の両方の CENP-B box $\text{alphoid}^{\text{tetO}}$ DNA をコトランスフェクトした。下部パネル; CENP-B 依存的なヒストン集合。トランスフェクションの 2 日 (2D)、4 日 (4D)、1 週間 (1W)、および 2 週間 (2W) 後、細胞を抗 CENP-A、抗 CENP-B、抗 CENP-C、抗ヒストン H3 および各抗修飾 H3 抗体を用いて、ChIP を行い、競合的 PCR で解析した。Wild type と Mutant CENP-B box $\text{alphoid}^{\text{tetO}}$ DNA の相対的な回収値をゲル画像の下に示した。(C) 回収された $\text{alphoid}^{\text{tetO}}$ DNA (Wild type /Mutant CENP-B box) の相対的な回収値は、log2 ベースでグラフとして表した。結果は平均 \pm S.E.M. (実験回収 $n=3$)。P 値 (t 検定、両側) はアスタリスクで示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。赤または青は、それぞれ $0 < \text{または } 0 > \text{WT/MT}(\log_2 \text{ base})$ を示している。

Figure 13

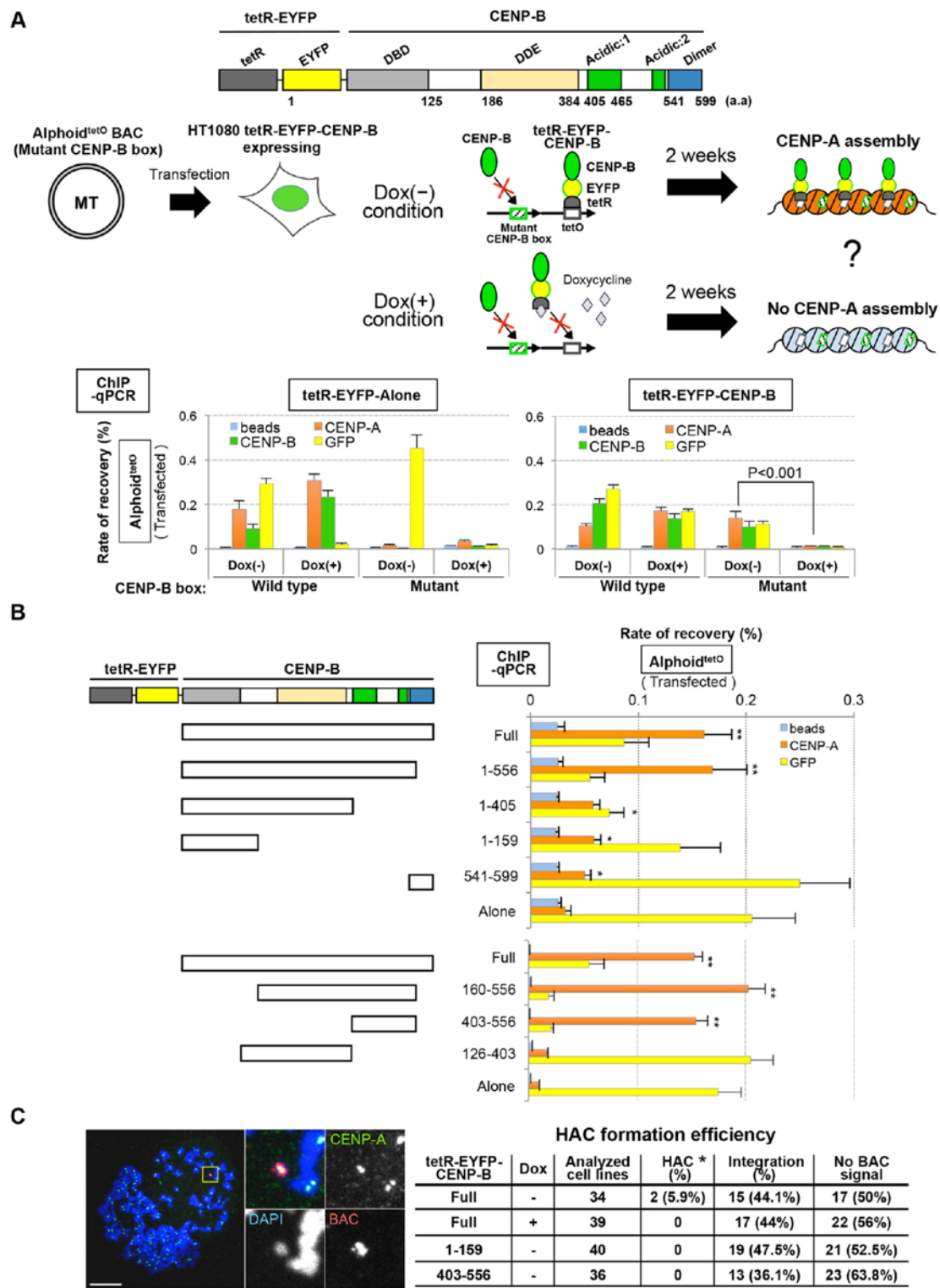


Figure 13

CENP-A の新規集合に関わる CENP-B のドメインの同定

(A) tetR-EYFP-CENP-B テザリングの機能検証。(上部) tetR-EYFP-CENP-B 構築の図。(中央部) tetR-EYFP-CENP-B の実験デザインと期待される効果の概略図。(下部) tetR-EYFP-CENP-B または tetR-EYFP-Alone (ネガティブコントロール) のテザリングによる alphoid^{tetO} DNA 上への CENP-A 集合効果。細胞は、トランスフェクション後 2 週間 (2W) の間、ドキシサイクリン (Dox) の存在下(+)または非存在下(-)で培養された。トランスフェクションされた alphoid^{tetO} DNA 上における、tetR-EYFP 融合タンパク質、CENP-A および CENP-B の濃縮は、抗 GFP、抗 CENP-A および抗 CENP-B 抗体を用いて、ChIP-qPCR 解析によって検出された。ネガティブコントロール用の抗体なし、オレンジ;抗 CENP-A 抗体、緑色;抗 CENP-B 抗体、黄色;EYFP の抗 GFP 抗体。結果は平均 \pm S.E.M. (実験回数 $n = 3$)。P 値 (t 検定、両側) は図中に示した。(B) de novo CENP-A 集合を促進する CENP-B ドメインの同定。左側;用いられた tetR-EYFP-CENP-B ドメインシリーズの概略図。右側;各 CENP-B ドメインの CENP-A 集合活性は、Dox の非存在下で ChIP-qPCR によって検出された。結果は平均 \pm S.E.M. (実験回数 $n=3$)。P 値 (t 検定、両側) はアスタリスクで示した。* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$ 。(C) HT1080 tetR-EYFP-CENP-B 発現細胞株における mutant CENP-B box alphoid^{tetO} BAC DNA への CENP-B シリーズテザリングによる HAC 形成実験。左側;得られた HAC 株の M 期染色体を DAPI (青)、抗 CENP-A 抗体 (緑)、および BAC FISH プローブ (赤) で染色した。スケールバーは 10 μ m を示す。右側;この実験における HAC 形成効率の結果を示す。Mutant CENP-B box alphoid^{tetO} BAC DNA を、ドキシサイクリンの存在下または非存在下で、各 tetR-EYFP 融合タンパク質を安定発現する HT1080 細胞株にトランスフェクトした。「Analyzed cell lines」は、G418 の選択の下で単離された細胞のコロニーを表す。導入された BAC DNA は、BAC プローブを使用した FISH によって解析された。BAC DNA は、宿主染色体 (HAC) から独立、または宿主染色体の一部 (挿入部位) として検出された。2 つの HAC 細胞株 (#1 および #32) が得られました。HAC シグナルは、細胞の 92.3% (#1) および 90% (#32) で、細胞あたり 1 つの HAC として検出されました ($n > 20$ 細胞)。これら 2 つの HAC 細胞株の宿主染色体には BAC シグナルは観察されなかった。

Figure 14

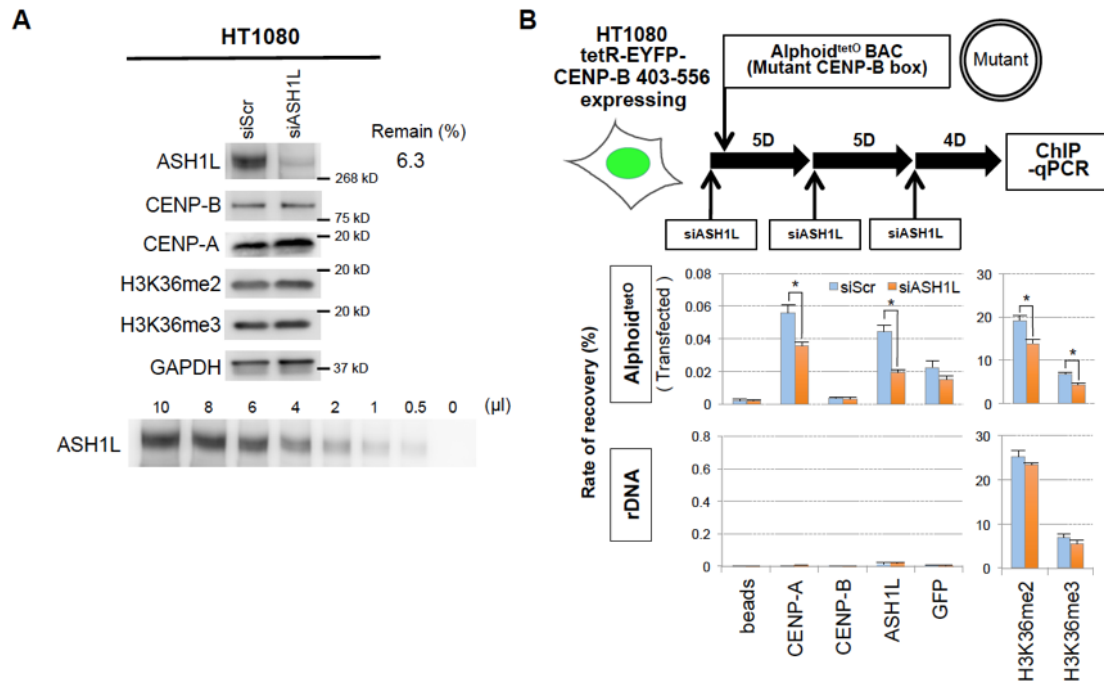


Figure 14

導入 Alphoid DNA 上の CENP-A の新規集合は、ASH1L ノックダウンによって減少した

(A) ASH1L ノックダウンによるタンパク質発現レベルへの影響。HT1080 細胞は、最初の siRNA のトランスフェクションから 2 週間後に回収された。各タンパク質レベルは、左に示した抗体を使用したウエスタンブロッティングによって検出された。ASH1L のノックダウンレベルは、全細胞抽出液の希釈系列から算出した。GAPDH (内在性コントロール)。(B) 導入された mutant CENP-B box alphoid^{tetO} DNA 上の CENP-A の新規集合の ChIP アッセイによる定量化。ChIP アッセイは、以下に示す抗体を使用し行われた (“beads”は抗体なし)。回収された DNA は、alphoid^{tetO} DNA および rDNA 用のプライマーセットを使用した定量 PCR によって定量化された。結果は平均±S.E.M. (実験回数 n=3)。P 値 (t 検定、両側) はアスタリスクで示した。* p < 0.05。

Figure 15

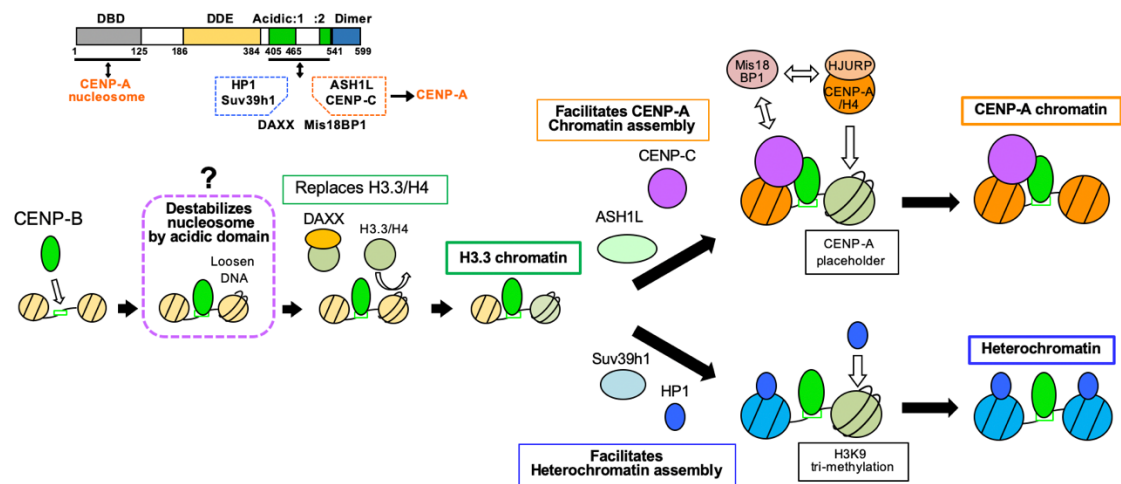


Figure 15

CENP-B の効果のモデル図

矢印は、これまでの報告から示唆されるリクルートを表している。上部; CENP-B の各ドメインと、それらを介して集合するタンパク質および CENP-A 集合との関係。下部; CENP-B 結合によって促進される alphoid DNA のクロマチン状態。CENP-B 酸性ドメインは、アルフォイド DNA の H3.3 集合を促進した (Figure 10)。H3.3 ヌクレオソームは、DNA 複製とともに半減した CENP-A ヌクレオソームのための、Placeholder となっている (Dunleavy et al., 2011)。また、H3.3 は Heterochromatin の維持にも重要である (Muller and Almouzni, 2017)。CENP-B は、DBD を介した CENP-A ヌクレオソームとの、および酸性ドメインを介した CENP-C との相互作用により、キネトコア構造を安定化する (Suzuki et al., 2004; Fachinetti et al., 2015; Fujita, Otake et al., 2015)。CENP-C は Mis18BP1 と相互作用し、Mis18BP1 複合体は HJURP/CENP-A 複合体をリクルートする (Fujita et al., 2007; Moree et al., 2011; Dambacher et al., 2012)。さらに、アルフォイド DNA 上の Mis18BP1 集合は、CENP-B 酸性ドメインによって促進された (Figure 4)。CENP-B は、DBD と酸性ドメインの両方を介して CENP-A 集合の有利なクロマチン状態を促進することが示唆された。セントロメアでの ASH1L 集合は、CENP-B 酸性ドメインによって促進された。ASH1L には、CENP-A 集合を促進する活性が検出された (Figure 3)。同様に、HP1, Suv39H1 の集合も、CENP-B 酸性ドメインによって促進された。しかしながら、それらは、CENP-A 集合を抑制する活性を示めた。