

学位論文

構成学的手法によるセントロメアクロマチンの形成・維持機構
に関する因子の同定と解析

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

庄野 暢晃

目次

主論文

構成学的手法によるセントロメアクロマチンの形成・維持機構に関する因子の同定と解析

要旨	2
序論	4
結果	7
考察	16
材料と方法	21
謝辞	26
引用文献	27
Figure & Table	35

副論文

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

参考論文

Nap1 regulates proper CENP-B binding to nucleosomes.

Epigenetic engineering shows that a human centromere resists silencing mediated by H3K27me3/K9me3.

要旨：

セントロメアは遺伝情報の安定な継承に関する染色体上の機能領域である。分裂期染色体のセントロメア領域には 100 種類を超えるタンパク質因子が集合する。セントロメアの外側にはキネトコアと呼ばれる構造体が形成され、微小管との相互作用により姉妹染色分体を娘細胞へと正確に分配する。

ヒトセントロメアは、 α -サテライト（アルフォイド）と呼ばれる巨大な繰り返し DNA 領域に形成され、ここにはセントロメア特異的なクロマチンが集合する。セントロメアクロマチンは、ヒストン H3 バリエーションである CENP-A を含んだヌクレオソームからなり、これがセントロメア／キネトコアタンパク質群の集合の基盤となる。この CENP-A ヌクレオソームは、通常のヒストン H3 を含むヌクレオソームとは異なり、DNA 複製時には補充されず、集合量が半減したまま分裂期に入り、分裂期が終了する G1 初期に補充される。

Mis18 複合体 (Mis18 α / Mis18 β / M18BP1) を含むいくつかの因子と CENP-A 特異的ヒストンシャペロンである HJURP が、この CENP-A ヌクレオソームの補充に関することが報告されている。さらに、これらの G1 初期における CENP-A の補充に関する因子に加えて、補充された CENP-A の安定化を行うと考えられる MgcRacGAP やリモデリング因子 RSF1 なども報告されている。

また、近年の研究によって、クロマチン状態も CENP-A 集合に影響することが示されている。これまでに、テトラサイクリンオペレーター (tetO) 配列を挿入した合成アルフォイド DNA (alphoid^{tetO}) を培養細胞に導入することにより、CENP-A が集合し、機能的なセントロメアを獲得したヒト人工染色体 (alphoid^{tetO}-HAC) が開発されている。さらに、導入 alphoid^{tetO} が染色体腕の異所的部位に挿入され、CENP-A がこの部位に集合していない細胞株も作成されている。これらの alphoid^{tetO}-HAC や挿入された異所的部位にテトラサイクリンリプレッサー (tetR) 融合タンパク質をテザリングすることにより、CENP-A 集合維持に関するクロマチン状態が調べられた。その結果、ヒストンメチル化酵素のテザリングによるヒストン H3 の 9 番目のリジンのトリメチル化 (H3K9me3) を介したヘテロクロマチンの誘導は、HAC セントロメアへの CENP-A 集合を劇的に減少させることが明らかにされた。対照的に、転写を活性化するヒストンアセチル化酵素である p300 や PCAF の触媒ドメインのテザリングは HAC 上、および異所的挿入部位で、HA タグ付き CENP-A の集合を引き起こすことが報告されている。

一方、これまでに多くのセントロメア／キネトコア因子が報告されているが、それらの因子や多様なクロマチンの修飾状態が CENP-A 集合に対してどのように関するかについては十分には解明が進んでいない。そこで、本研究では多様なセントロメア／キネトコア因子およびクロマチン修飾因子のテトラサイクリンリプレッサー (tetR) 融合タンパク質をテザリングすることにより、HAC セントロメア上での CENP-A 集合の増減に与える影響について解析した。この解析によって、セントロメア上の CENP-A 集合を増加させる因子が多数同定された。さらに、同様の実

験を CENP-A 集合のない異所的挿入部位上でも行い、新規に CENP-A 集合を引き起こす因子も多数同定した。最終的に、これらの解析の結果から CENP-A 集合に影響を与える因子を4つのクラスに分類した。このクラス分けは CENP-A 集合に関する分子機構の大筋を明らかにすると共に、クロマチン修飾やヒストン交換反応の関りについての今後の機能解析の指針となると期待される。

興味深いことに、本研究により、KMN network と呼ばれるキネトコア構造形成に重要な因子群が異所的部位上に新規 CENP-A 集合を引き起こすクラスに分類された。この結果は、キネトコア集合と CENP-A 集合の結びつきを強く示唆している。このメカニズムを調べた結果、これらのキネトコア構成因子が CENP-C を集合させ、さらに CENP-C が Mis18 複合体の構成因子である M18BP1 を集合させることで新規 CENP-A 集合を引き起こすことが明らかになった。さらに、CENP-I も同様に M18BP1 を集合させる結果が得られ、CENP-C の下流で CENP-I も M18BP1 の集合を補強していることを発見した。これらの本研究から、CENP-C と CENP-I はセントロメアの「機能」に必要なキネトコア集合とセントロメアの維持／記憶に必要な CENP-A クロマチンの集合（「エピジェネティクス」）を結びつける要となる因子であることが示された。

序論：

セントロメアは、染色体の分配に必須な、DNA とタンパク質の複合体であり、この領域には 100 種類を超えるタンパク質因子が集合すると考えられている (Cheeseman and Desai, 2008; Santaguida and Musacchio, 2009)。分裂期セントロメアには、キネトコアを構成するタンパク質群が集合し、紡錘体微小管との相互作用を制御して、染色体の均等分配を行う (Figure 1A)。

ヒトセントロメアは、高度反復 DNA 配列である α -サテライト (アルフォイド) DNA 上に形成される。アルフォイド DNA の巨大領域には、セントロメア特異的なヒストン H3 バリエントである CENP-A を含んだヌクレオソームからなるセントロメアクロマチンが集合する (Allshire and Karpen, 2008; Earnshaw and Rothfield, 1985)。ところが同じアルフォイド DNA の反復単位からなる巨大領域には、9 番目のリジンがトリメチル化したヒストン H3 (H3K9me3) ヌクレオソームからなるヘテロクロマチンも集合する (Sullivan and Karpen, 2004) (Figure 1A)。このように同一の繰り返し単位からなるアルフォイド DNA 領域にどのようなメカニズムで異なるクロマチン構造が集合維持されているのかは不明である。セントロメアクロマチン上には、interphase centromere complex (ICEN) (Izuta et al., 2006; Obuse et al., 2004) や constitutive centromere associated network (CCAN) (Basilico et al., 2014; Cheeseman and Desai, 2008; Foltz et al., 2006; Gascoigne et al., 2011; Hori et al., 2008; Okada et al., 2006) と呼ばれる因子群が集合し、キネトコアの土台となるインナーキネトコアを形成する (Gascoigne et al., 2011; Hori et al., 2008; Hori et al., 2013; Nishino et al., 2013; Przewloka et al., 2011; Rago et al., 2015) (Figure 1A)。CCAN 因子の中で、CENP-C (Saitoh et al., 1992) と CENP-T は分裂期において、キネトコア集合の中心的役割を担う。CENP-C は CENP-A ヌクレオソームと直接結合する (Carroll et al., 2010; Kato et al., 2013)。CENP-C は Mis12 複合体をリクルート (集合誘導) し、これを介して NDC80 複合体をリクルートする (Cheeseman et al., 2006; Petrovic et al., 2010; Przewloka et al., 2011; Screpanti et al., 2011)。また、CENP-T も別経路で NDC80 複合体をリクルートする (Schleiffer et al., 2012)。KNL1/Mis12 複合体/NDC80 複合体からなる KMN network は分裂期に形成されるアウターキネトコアにおいて微小管結合を行う構造体である (Cheeseman et al., 2006; DeLuca et al., 2006)。さらに、KMN network には微小管との結合の制御やチェックポイント (Spindle assembly checkpoint) に関する因子群が集合し、正確な染色体分配の進行を調整する (Figure 1A)。

これらのインナーやアウターのキネトコア構成因子の集合の起点となる CENP-A ヌクレオソームの集合機構には驚くべき点が多い。通常のヒストン H3 ヌクレオソームとは異なり CENP-A ヌクレオソームは DNA 複製の際に補充されず、したがって S 期終了後は DNA (染色体) 当たりの CENP-A 量は半減し、分裂期が完了するまで補充されない (Jansen et al., 2007)。これまでに、

Mis18 複合体 (Mis18 α /Mis18 β /M18BP1) と CENP-A 特異的ヒストンシャペロンである HJURP がこの CENP-A ヌクレオソームの補充に関わっていることが知られている (Barnhart et al., 2011; Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009; Fujita et al., 2007; Hayashi et al., 2004; Shuaib et al., 2010) (Figure 1B)。これらの因子の中で、M18BP1 は CENP-C と相互作用することが報告されている (Dambacher et al., 2012; Moree et al., 2011)。さらに、Mis18 複合体は HJURP の集合に関わることが報告されている (Barnhart et al., 2011; Wang et al., 2014)。これらの G1 初期における CENP-A の補充に関する因子に加えて、Remodeling and Spacing Factor 1 (RSF1) (Perpelescu et al., 2009) および small GTPase である MgcRacGAP (Lagana et al., 2010) は G1 中期から後期において、新たに集合した CENP-A の安定化を行うことが報告されている (Figure 1B)。さらに最近、アルフォイド DNA 中に存在する CENP-B box 配列に結合する CENP-B も CENP-A ヌクレオソームと相互作用することにより、CENP-A を安定化することが報告されている (Fachinetti et al., 2015; Fujita et al., 2015)。

また、近年の研究によって、クロマチン状態も CENP-A 集合に影響することが示されている。所属研究室は、合成アルフォイド DNA リピートをヒト培養細胞に導入することで、機能的なセントロメアを獲得し、宿主染色体と独立に分配、維持されるヒト人工染色体 (HAC) 形成が、CENP-B のアルフォイド DNA への結合依存的に起こることを明らかにしている (Ikeno et al., 1998; Ohzeki et al., 2002; Okada et al., 2007; Okamoto et al., 2007)。HAC 上には CENP-A および他のセントロメアタンパク質 (CENP-C、CENP-E) が集合することと、分裂期に宿主染色体と同様の挙動を示すことが確認されている (Masumoto et al., 1998; Tsuduki et al., 2006)。所属研究室では、さらに、アルフォイド DNA にテトラサイクリンオペレーター (tetO) 配列を組み込んだ合成アルフォイド DNA (alphoid^{tet0}) を用いて、tetO を含んだ HAC (alphoid^{tet0}-HAC) を作成した (Nakano et al., 2008)。tetO 配列に結合するテトラサイクリンリプレッサー (tetR) を用いることで、alphoid^{tet0}-HAC に任意の因子をテザリングすることができ、このシステムを利用して CENP-A 集合維持に関するクロマチン状態が調べられた。tetR-SD^{Kid-1} 融合タンパク質 (tTS)、KAP1 (tTS によりリクルートされる転写抑制因子)、およびヒストンメチル化酵素 Suv39h1 のテザリングによる H3K9me3 ヘテロクロマチンの誘導は、いずれも alphoid^{tet0}-HAC 上の CENP-A 集合を劇的に減少させた (Cardinale et al., 2009; Nakano et al., 2008; Ohzeki et al., 2012)。また、脱メチル化酵素 LSD1 のテザリングによる、転写に関連した修飾である H3K4me2 の除去も CENP-A 集合を減少させた (Bergmann et al., 2011)。対照的に、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) である p300、PCAF の触媒ドメインのテザリングは alphoid^{tet0}-HAC 上、および染色体腕部への異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位上に、同時に発現させた HA タグ付き CENP-A の集合を引き起こした (Ohzeki et al., 2012)。このように、ヒストン修飾因子のテザリングを用いた研究により、CENP-A

集合が下地となるクロマチンの転写活性化とヘテロクロマチン化のバランスで制御されているという重要なメカニズムが明らかにされているが、さらに多くのヒストン修飾の関りについての解析も望まれる。

また、これまでに多くの因子 (CCAN、ICEN など) が生化学的分画と質量分析によってセントロメアクロマチンに共局在することが示されているが、これらの方法で見つかった多くの因子が CENP-A 集合にも寄与するのかどうか、或いは、どのように関るのかについては不明なままである。そこで、本研究では、セントロメアクロマチンの形成・維持機構の全体像の解明を目指し、これら多数のセントロメア/キネトコア構成因子およびクロマチン関連因子と CENP-A 集合経路との関わりについて解析した (Figure 1B)。そのために、テザリング法による構成学的手法を利用し、これらの因子が HAC セントロメア上の CENP-A 集合を変化させる能力、および、染色体腕部の異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位上に新規に CENP-A を集合させる能力を評価した。これらの解析によって、調べた因子を CENP-A 集合への影響から 4 つのクラスに分類した。驚くべきことに、アウターキネトコア構成因子である KMN network 因子のテザリングは異所的部位上に新規 CENP-A 集合を引き起こした。この CENP-A の集合は、KMN network 因子により CENP-C がリクルートされることに依存しており、CENP-C が M18BP1 をリクルートすることで新規 CENP-A 集合を促進していることが判明した。さらに、CENP-I も同様に M18BP1 をリクルートすることが可能であり、その活性によって、CENP-C の下流でセントロメアへの M18BP1 集合を補強する経路が存在することを発見した。これらの本研究の成果により、CENP-C と CENP-I は KMN network を介したアウターキネトコア集合とエピジェネティックなセントロメアの記憶としての CENP-A クロマチンの集合とを結びつける要となる因子であることが示された。

結果：

HAC セントロメア上の CENP-A 集合を増加・減少させる因子の同定

本研究では CENP-A 集合を制御する因子を明らかにするために、宿主染色体と同様に CENP-A クロマチンが集合するセントロメア機能を獲得したヒト人工染色体 $\text{alphoid}^{\text{tet}0}$ -HAC (Figure 2A) (HeLa-HAC-2-4 : Ohzeki et al., 2012) を用いて、構成学的手法であるテザリング解析を行った。各因子の CENP-A 集合に対する効果を調べるために様々な tetR-EYFP 融合タンパク質を HAC にテザリングし、HAC 上の免疫染色された CENP-A シグナルを定量する方法を考えた (Figure 2B and C)。コントロールとして、正の制御因子として CENP-A 特異的シャペロンである HJURP および負の制御因子として H3K9 メチル化酵素である Suv39h1 を tetR-EYFP 融合タンパク質としてテザリングした (Figure 3A)。tetR-EYFP のみ (Alone) と比較して、tetR-EYFP-HJURP あるいは tetR-EYFP-Suv39h1 のテザリングは HAC 上の CENP-A シグナルを有意に増加、あるいは減少させた (Figure 3B)。この HAC 上の CENP-A 集合レベルの変化は ChIP-qPCR (クロマチン免疫沈降および定量 PCR) 解析においても確かめられた (Figure 3C)。

次に、多数のセントロメア/キネトコア因子を tetR-EYFP 融合タンパク質として、 $\text{alphoid}^{\text{tet}0}$ -HAC を用いて同様の実験を行った (Figure 4A and B)。CENP-C、CENP-I、CENP-N、CENP-T および、キネトコアの構造因子である KMN network の構成因子のテザリングは HAC 上の CENP-A 集合レベルを増加させた。CENP-A ヌクレオソームの安定化に関することが報告されている MgcRacGAP と CENP-B のテザリングでも同様の結果が得られた (Fachinetti et al., 2015; Fujita et al., 2015; Lagana et al., 2010)。このように、多くのセントロメア/キネトコア因子が HAC 上の CENP-A 集合を正に制御することがわかった。Mis18 複合体は CENP-A 集合のためのセントロメアの前処理 (プライミングと呼ばれる) に関することが示唆されている (Fujita et al., 2007)。興味深いことに、M18BP1 のテザリングは HAC 上の CENP-A 集合レベルを増加させたが、Mis18 α と Mis18 β のテザリングではそのような効果は観察されなかった。

クロマチン修飾因子を用いた実験の結果では (Figure 4B)、ヒストンメチル化酵素である Suv39h1、SETDB1 のような転写サイレンサーのテザリングは過去の報告と同様に HAC 上の CENP-A シグナルを有意に減少させた (Cardinale et al., 2009; Nakano et al., 2008; Ohzeki et al., 2012)。同様に、HDAC1、HDAC2、SIRT1、SIRT2 といったヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) (Hassig and Schreiber, 1997) のテザリングでもいずれの場合でも HAC 上の CENP-A シグナルを減少させた。対照的に、H3K4 のヒストンメチル化酵素である MLL (Dou et al., 2005) のテザリングは HAC 上の CENP-A 集合レベルを増加させた。これまでの研究で、H3K4me2 修飾の減少は HAC 上の CENP-A 集合を低下させることが報告されており (Bergmann et al., 2011)、今回、H3K4me2 修飾が CENP-A 集合を正に制御することが実際に示された。一方、HAT である MYST1、MYST2、MYST3、MYST4、

HAT1、PCAF、p300 のテザリングでは HAC セントロメア上の CENP-A 集合レベルは有意に変化しなかった。

これらの実験により、多数のセントロメア/キネトコア因子が HAC セントロメア上の CENP-A 集合を正に制御することが明らかとなった。さらに、これまで報告されていない HDAC による結果を含め、多種のヘテロクロマチン化因子が HAC セントロメア上の CENP-A 集合を負に制御することが確かめられた。

新規 CENP-A 集合を引き起こす因子の同定

alphoid^{tet0}-HAC 上のセントロメアの CENP-A 集合を正に制御する因子の中で、CENP-A シャペロンである HJURP は染色体腕部上の非セントロメア部位にテザリングした場合には新規 CENP-A 集合を引き起こすことがこれまでに報告されている (Barnhart et al., 2011; Bassett et al., 2012; Ohzeki et al., 2012)。そこで、次の解析として、ヘテロクロマチンで覆われた染色体腕部上の非セントロメアである異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位 (HeLa-Int-03; Ohzeki et al., 2012) に tetR-EYFP 融合タンパク質をテザリングすることで、新規 CENP-A 集合が引き起こされるかどうかを調べた (Figure 5A and B)。

コントロールとして、tetR-EYFP-Alone あるいは tetR-EYFP-Suv39h1 のテザリングは新規 CENP-A 集合を引き起こさなかったが、期待された通り、tetR-EYFP-HJURP のテザリングは 86% の細胞で新規 CENP-A 集合を引き起こした (Figure 5C)。さらに他の tetR-EYFP 融合タンパク質でも解析を行った結果、CENP-C、CENP-I のテザリングは異所的部位に強力な新規 CENP-A 集合を引き起こした (Figure 6A and C)。このような HJURP あるいは CENP-C テザリングによる CENP-A 集合では、分裂期にはこの異所的部位への膨大な数の微小管の束が結合することが観察された。このことは、異所的部位に誘導された CENP-A クロマチン上にキネトコア構成因子が集合しキネトコアとして機能することを示唆している (Figure 6B)。このヒト細胞 (HeLa) を用いた CENP-C の結果は、ニワトリの DT40 細胞を用いて、CENP-C テザリングにより機能的なセントロメア形成を行った報告と一致する (Hori et al., 2013)。興味深いことに、今回の実験により、これらの他に、アウターキネトコアの KMN network 構成因子のテザリングも異所的部位に強力な新規 CENP-A 集合を引き起こすことが明らかとなった (Figure 6A and C)。これらの因子と対照的に、CENP-B、CENP-T、CENP-N、MgcRacGAP、MLL は、いずれも alphoid^{tet0}-HAC のセントロメア上では CENP-A 集合を増加させた因子であるが、ヘテロクロマチン的な異所的部位への新規 CENP-A 集合は引き起こせなかった (Figure 4B; Figure 6A and C)。また、Mis18 複合体は CENP-A 集合に関する因子であるが、Mis18 α 、Mis18 β 、M18BP1 のいずれのテザリングでも異所的部位に有意な新規 CENP-A 集合を引き起こせなかった (Figure 6C)。

上記の実験はいずれも異所的alphoid^{tet0}挿入部位上の内在性CENP-Aの集合を観察している。これに対して、同じ実験をHaloタグ付きのCENP-A (Halo-CENP-A) プラスミドのコトランスフェクションによるCENP-Aの発現条件の下で行った場合には、注目すべき異なる結果が得られた (Figure 7A and B)。Halo-CENP-Aの発現条件下ではtetR-EYFP-HJURPのテザリングによる異所的部位での新規CENP-A集合率を100%の細胞にまで増進した。このHalo-CENP-Aの発現はtetR-EYFP-AloneあるいはtetR-EYFP-Suv39h1のテザリングによってCENP-A集合を引き起こすには不十分 (1-2%) であった (Ohzeki et al., 2012) (Figure 7B)。しかしながら、Halo-CENP-Aの発現によって、CENP-H、RSF1、SSRP1、Mis18 α 、Mis18 β 、M18BP1、HATであるMYST1、MYST2、MYST3、MYST4、HAT1、PCAF、p300などの多くの因子が強力にCENP-A集合を引き起こすようになることがわかった (Figure 7A and B)。RSF1、SSRP1およびHATは一般的なクロマチンリモデリングやヒストン交換因子であるため (LeRoy, 1998)、これらの因子が通常のヒストンH3集合も引き起こす可能性が考えられる。そこで、Halo-CENP-AのかわりにHalo-H3.1 (DNA複製依存的に集合するヒストンH3) あるいはHalo-H3.3 (DNA複製非依存的に集合するヒストンH3) プラスミドをコトランスフェクションして同様の実験を行った (Figure 8)。CENP-A、ヒストンH3.1 (複製依存)、ヒストンH3.3 (転写依存) それぞれの特異的ヒストンシャペロンであるtetR-EYFP-HJURP、tetR-EYFP-CHAF1A、tetR-EYFP-DAXX (Drane et al., 2010; Foltz et al., 2009; Kaufman et al., 1995)のテザリングは異所的部位上に、それぞれ100%の細胞でHalo-CENP-A、83%の細胞でHalo-H3.1、87%の細胞でHalo-H3.3の強力な集合をもたらした (Figure 8A)。これらのデータは、この異所的部位でのテザリングアッセイにおいて、それぞれのシャペロンの各ヒストンH3バリエーションに対する特異性が十分に維持されていることを示す極めて重要な結果である。

Halo-CENP-Aの発現でCENP-A集合を引き起こしたほとんどの因子は異所的部位に高いレベルのHalo-H3.3集合も引き起こした (Figure 8B)。興味深いことに、tetR-EYFP-Mis18 α / β も30-40%の細胞でH3.3集合を引き起こした。したがって、このクラスの因子の異所的部位へのテザリングによるHalo-CENP-A集合とHalo-H3.3集合には、ヒストン交換/集合反応のかかわる共通のメカニズムが関わっている可能性が高い。

CENP-A集合へ影響を与える因子のクラス分け

これら3通りのCENP-A集合に対する解析によって、調べた因子を4つのクラスに分類することができた (Figure 9)。

- ・ クラス I は、HAC 上の内在性 CENP-A の集合を増加させ、異所的部位でも新規 CENP-A 集合を引き起こす因子である。CENP-C、CENP-I、KNL1、Mis12、NDC80 がこのクラスに属する。

HJURP に関しては、シャペロンとして CENP-A と直接結合するという際立った性質が知られているため、クラス I から除いた。

- クラス II は、HAC セントロメア上の内在性 CENP-A 集合を増加させるが、異所的部位へのテザリングでは、CENP-A を発現した場合でも新規 CENP-A 集合を効率よく引き起こさない因子である。MgcRacGAP、CENP-N、CENP-T、MLL、CENP-B がこのクラスに属する。
- クラス III は、異所的部位へのテザリングで、CENP-A の発現によって効率的な新規 CENP-A 集合 (>=20%) を引き起こすようになる因子である。M18BP1、Mis18 α 、Mis18 β 、CENP-H、SKA1、RSF1、SSRP1、MYST1、MYST2、MYST3、MYST4、HAT1、PCAF、p300、G9a がこのクラスに属する。
- クラス IV は、HAC 上の内在性 CENP-A 集合を減少させ、CENP-A を発現した場合でも異所的部位へのテザリングでも新規 CENP-A 集合を引き起こさない因子である。Suv39h1、SETDB1、HDAC1、HDAC2、SIRT1、SIRT2 がこのクラスに属する。転写サイレンシングに関する因子のほとんどがクラス IV に分類された。

同じクラスに属する因子は同様の局在（クラス I のセントロメア／キネトコア因子）や活性（クラス III の HAT、クラス IV のヒストンメチル化酵素、HDAC）を持っており、同じクラスに属する因子は CENP-A 集合に対して同様の経路で関わっていると考えられる。

CENP-C は新規 CENP-A 集合に重要な因子である

クラス分け (Figure 9) にある通り、クラス I は、異所的部位にテザリングにより、Halo-CENP-A の発現に依存せず新規 CENP-A 集合を引き起こすことができた。興味深いことに、全てのクラス I 因子はキネトコア構造形成に関する因子である (Cheeseman et al., 2006; Nishihashi et al., 2002; Okada et al., 2006)。このことはキネトコアと新規 CENP-A 集合の間に何らかの結び付きがあることを強く示唆している。

この結び付きについてさらに調べるために、さらに多くのキネトコアおよび CCAN 構成因子について、異所的 alphoid^{tel0} 挿入部位にテザリングした場合に、新規 CENP-A 集合を引き起こす活性があるかどうかを調べた。興味深いことに、この追加アッセイにおいて、KMN network の構成因子はいずれも新規 CENP-A 集合を引き起こした (Figure 10A and B)。これらのキネトコアの構造形成に関する因子とは対照的に、スピンドル集合チェックポイントを介してキネトコアの機能制御に関する ZWINT、BubR1、PP1 γ 、SKA1 (Hanisch et al., 2006) は新規 CENP-A 集合を引き起こさなかった (Figure 10B)。

全てのクラス I に分類された因子は CCAN および KMN network の構成因子であり、互いに相互作用が報告されている (Screpanti et al., 2011)。そこで、クラス I 因子は、共通の因子のり

クルートを介して新規 CENP-A 集合を引き起こす可能性について考えた。tetR-EYFP-NSL1 あるいは tetR-EYFP-Mis12 はどちらも Mis12 複合体の構成因子であり、KMN network および CENP-C と相互作用することが期待される (Petrovic et al., 2010; Screpanti et al., 2011)。これらの欠失変異体を用いた実験により、CENP-C との相互作用を失った NSL1、Mis12 の欠失変異体は新規 CENP-A 集合を引き起こす能力も欠損することが明らかになった (Figure 11A and B)。CENP-A 集合が起これば CENP-A との相互作用から二次的に CENP-C 集合が引き起こされる可能性もある。そこで、新規集合する CENP-A を介して起こりうる二次的な CENP-C 集合を最小限に抑えるため、CENP-A を siRNA によりノックダウンした条件下で実験を行い、NSL1 と Mis12 が CENP-C と相互作用することを確認した (Figure 11C-F; このように CENP-A は多くの因子の二次的集合を引き起こす可能性があるため、Figure 12、13、15、17 でも CENP-A ノックダウン下での実験を行なった)。これらの結果から、tetR-EYFP-NSL1、tetR-EYFP-Mis12 によって CENP-C がリクルートされ、この CENP-C が異所的部位に新規 CENP-A 集合を引き起こしたと考えられる。

さらに、CENP-A ノックダウン条件下において、全てのクラス I 因子は異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位へのテザリングによって CENP-C をリクルートする活性があることを確認した (Figure 12A-C)。この実験によって、クラス I 因子のテザリングによる CENP-C リクルート効率と新規 CENP-A 集合活性の間に強い相関があることが明らかになった (Figure 12D)。これらの結果は、キネトコア形成が起こると CENP-C の集合を引き起こし、この CENP-C が新規 CENP-A 集合を引き起こす重要な因子であることを示している。

また、興味深いことに、tetR-EYFP 融合クラス I 因子のテザリングによってリクルートされた CENP-C はドキシサイクリンの添加によって tetR-EYFP 融合タンパク質が解離した後も siRNA により CENP-A 集合の起こらない異所的部位でも、その結合を維持していた (Figure 13)。このような性質はクラス I 因子のテザリング実験 (Figure 12C) において、24 時間後から 48 時間後にかけて CENP-C の顕著な蓄積の増加を引き起こしたと考えられる。このような CENP-C 自体によるクロマチンへの結合が、更なる新規 CENP-A 集合を促進している可能性が示唆された。

CENP-C と CENP-I はどちらも新規 CENP-A 集合を引き起こす

次に、CENP-C が新規 CENP-A 集合に必須であるかどうかを調べるために、CENP-C をノックダウンした細胞で異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位に主要なクラス I 因子をテザリングする実験を行なった (Figure 14)。CENP-C ノックダウンはスピンドルチェック機構による分裂期停止を引き起こす (Fukagawa and Brown, 1997)。そこで、この分裂期停止を解除するためにチェックポイントに関する MAD2 と CENP-C のダブルノックダウンを行った (Choi et al., 2011) (Figure 14A-D)。また、CENP-C ノックダウンによって、新規 CENP-A 集合の基質になると考えられる可溶性 (クロ

マチンに取り込まれていない画分)の CENP-A 量が減少していないことを確認した (Figure 14E)。この条件下で、CENP-A シャペロンである HJURP のテザリングによる新規 CENP-A 集合は全く減少しなかった (Figure 14F)。対照的に、KMN network の構成因子のテザリングによる新規 CENP-A 集合は CENP-C ノックダウンにより劇的に減少したことから、これらの因子は CENP-C を介して新規 CENP-A 集合を引き起こすことが判明した。興味深いことに、CENP-I テザリングによる新規 CENP-A 集合もある程度減少したが、有意な CENP-A 集合能が残存した (Figure 14F)。このことは CENP-I が CENP-C とは独立に新規 CENP-A 集合を引き起こすことを示唆している。しかし、新規 CENP-A 集合に対して、CENP-I と CENP-C の働きは同等ではなく、CENP-I ノックダウンでは KMN network 構成因子のテザリングによる異所的部位への新規 CENP-A 集合に対して減少効果を示さなかった (Figure 14A-F)。したがって、CENP-C と CENP-I が新規 CENP-A 集合を引き起こす活性を持つ因子であり、KMN network 構成因子は CENP-C を介して新規 CENP-A 集合を引き起こすことが明らかとなった。

CENP-C と CENP-I は独立に M18BP1 をリクルートする

これまでの結果をまとめると、CENP-C と CENP-I は新規 CENP-A 集合を促進する因子をそれぞれ独立にリクルートすると考えられる。M18BP1 は CENP-C と相互作用することが報告されており (Dambacher et al., 2012; Moree et al., 2011)、Mis18 複合体は G1 初期におけるセントロメアへの新規合成された CENP-A の集合に関与している (Fujita et al., 2007)。そこで、CENP-C と CENP-I のテザリングが Halo-Mis18 α 、Halo-Mis18 β あるいは Halo-M18BP1 を異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位にリクルートするかどうかについて調べた (Figure 15A-C)。期待された通り、CENP-C テザリングにより 100%の細胞で Halo-M18BP1 がリクルートされた。驚くべきことに、CENP-I テザリングによっても、98%の細胞で Halo-M18BP1 がリクルートされた。この CENP-C テザリングによる Halo-M18BP1 のリクルートは CENP-I の siRNA ノックダウン条件下において減少しなかった。同様に、CENP-I テザリングによる Halo-M18BP1 リクルートも CENP-C の siRNA ノックダウン条件下においても減少しなかった (Figure 15D)。このことから、CENP-C と CENP-I は独立に M18BP1 をリクルートできることが明らかとなった。

次に、M18BP1 が CENP-A リクルートに必須であるかどうかを調べるために、siRNA による M18BP1 ノックダウン条件下において、tetR-EYFP 融合クラス I 因子のテザリングによる新規 CENP-A 集合を調べた (Figure 15E-H)。重要な点として、このノックダウンによって、可溶性の CENP-A 量 (クロマチンに取り込まれていない CENP-A 画分) と HJURP のテザリングによる新規 CENP-A 集合活性は減少しなかった。対照的に、クラス I 因子のテザリングでは新規 CENP-A 集合の劇的な減少が観察された (Figure 15H)。これらの結果から、CENP-C と CENP-I は M18BP1 リクルート

を介して新規 CENP-A 集合を引き起こしていることが明らかとなった。

CENP-C は CENP-I を介した経路を含む、複数の経路で新規 CENP-A 集合を引き起こす

CENP-C は CENP-I と強力に相互作用する (Figure 12B and C)。したがって、CENP-C は CENP-I リクルートを介した経路でも新規 CENP-A 集合を引き起こすことができると予想される。そこで、CENP-C と CENP-I の新規 CENP-A 集合における役割をさらに調べるために、CENP-C のこれまでに知られている機能的なドメインを参考に tetR-EYFP 融合 CENP-C 各種ドメインを用意して実験を行った (Carroll et al., 2010; Screpanti et al., 2011; Suzuki et al., 2004; Trazzi et al., 2009) (Figure 16A)。その結果、ドメイン II (72-425 aa)、III (426-537 aa)、VI と VII の融合ドメイン (VI+VII) (760-943 aa) のテザリングはそれぞれ異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位上へのテザリングで新規 CENP-A 集合に十分であることがわかった (Figure 16B and C)。

次に、これらのドメインが CENP-I または M18BP1 をリクルートするかどうかについて調べた (Figure 17A-C)。ドメイン II またはドメイン VI+VII のテザリングはそれぞれ、100%の細胞で Halo-CENP-I または Halo-M18BP1 をリクルートした。CENP-C ドメイン II と CENP-I (H, I, K, M) の相互作用はこれまでの *in vitro* 解析の報告と一致しており (Klare et al., 2015)、CENP-C の C 末と M18BP1 の相互作用もこれまでの報告と一致する (Dambacher et al., 2012)。ドメイン II のテザリングでは 75%の細胞で Halo-M18BP1 もリクルートしており、このドメイン II の M18BP1 の集合活性は CENP-I を介していると考えられる。また、CENP-C ドメイン I (1-71 aa) と Mis12 複合体の構成因子である NSL1 との相互作用を示す結果も確認しており (Figure 17B and C)、これまでの *in vitro* 解析による報告と一致している (Screpanti et al., 2011)。

さらに、様々な CENP-C ドメインによる新規 CENP-A 集合における CENP-I と M18BP1 の関わりを調べるために、CENP-I と M18BP1 の siRNA ノックダウン条件下において新規 CENP-A 集合を調べた (Figure 17D)。CENP-I ノックダウンは、CENP-C ドメイン II による異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位への新規 CENP-A 集合を大幅に減少させたが、全長の CENP-C あるいはドメイン VI+VII のテザリングにおいては影響しなかった。M18BP1 ノックダウンはいずれの融合構築のテザリングにおいても新規 CENP-A 集合を劇的に減少させた。意外にも、ドメイン III による新規 CENP-A 集合はこのドメインが弱くしかリクルートしていなかった M18BP1 に依存していた (Figure 17C and D)。このドメイン III による CENP-A ナクレオソームへの結合は CENP-A ナクレオソームを安定化することが最近報告されている (Falk et al., 2015; Kato et al., 2013)。そこで、このドメイン III の点変異 (R522A) を構築し実験に用いた。その結果、CENP-A ナクレオソーム結合活性はドメイン III による異所的部位への新規 CENP-A 集合に必要なことを確認した (Figure 17E)。したがって、CENP-C ドメイン III による CENP-A リクルートは M18BP1 との弱い相互作用

のみに単純に依存しているわけではない。これらの結果をまとめると、CENP-C は少なくとも二つの M18BP1 リクルート経路、すなわち、ドメイン II による CENP-I リクルートを介する経路、および C 末ドメインを介した直接的な経路、によって新規 CENP-A 集合を引き起こすことができると考えられる (Figure 17F)。

新規合成された CENP-A のセントロメア集合は CENP-C を必要とし、CENP-I を介して補強される

テザリング実験から得られた結論が天然の染色体セントロメアでの CENP-A 集合にも当てはまるかどうかを調べるために、まず、CENP-C と CENP-I のキネトコア集合の相互依存性を調べた。テザリングに依る解析結果を反映して、セントロメアでの CENP-I 集合レベルは CENP-C ノックダウン条件下において劇的に減少した。対照的に、セントロメアでの CENP-C 集合レベルは siCENP-I トランスフェクションの 72 時間後においても影響を受けていなかった (Figure 18A and B)。

次に、CENP-C と CENP-I が M18BP1 のセントロメア集合に必要なかどうかを調べるために、CRISPR/Cas を介したゲノム編集により内在性の M18BP1 遺伝子座の下流に Halo タグを挿入した M18BP1-Halo 融合遺伝子を作成した (HeLa-Int-03 M18BP1-Halo 細胞)。HeLa-Int-03 M18BP1-Halo 細胞を用いて、CENP-C と CENP-I の両タンパク質をノックダウンした。M18BP1 は分裂終期から G1 初期にかけてセントロメアに集合することが知られており (Fujita et al., 2007)。そこで、この実験では、染色体分配後に娘細胞間に残るミッドボディの α -tubulin を挟んで対になった細胞を指標に G1 初期の細胞を同定して観察した。CENP-C または CENP-I のノックダウンはどちらも、コントロールと比較して、セントロメアでの M18BP1-Halo シグナルの有意な (それぞれ 42% または 66% への) 減少を引き起こした (Figure 19A and B)。

最後に、G1 初期にセントロメアに補充される CENP-A に対する影響を調べるために、SNAP タグ付き CENP-A を安定発現する HeLa-Int-03 SNAP-CENP-A 細胞を用いて CENP-C および CENP-I のノックダウン条件下で、G1 初期における新規合成された CENP-A のセントロメア集合を調べた。quench-chase-pulse ラベリングを用いて既に発現している CENP-A の SNAP タグが蛍光リガンドと結合しないようにベンジルグアニンリガンドで処理した後、新規合成された SNAP-CENP-A は TMR 蛍光標識したリガンドで検出した (Jansen et al., 2007) (Figure 19C)。CENP-C または CENP-I ノックダウン条件下において、セントロメアでの新規合成された SNAP-CENP-A シグナルはコントロールと比較して、有意に (それぞれ 44% または 75% に) 減少した (Figure 19D and E)。セントロメアへの CENP-I 集合は CENP-C に依存していることは既に示した。そこでこれらの解析結果を総合すると、CENP-I の役割は、CENP-C 自身による M18BP1 リクルートと平行して、CENP-C

との相互作用を介して M18BP1 リクルートを補強し、CENP-A のセントロメアへの集合をより増強することであると考えられる。

考察：

本研究ではセントロメアと染色体腕上の異所的部位での多様なセントロメア/キネトコア因子およびクロマチン修飾因子の CENP-A 集合における役割を調べるためにテザリングによる構成学的手法を用いて解析を進めた。その結果、CENP-A 集合に影響する 4 つの因子群（クラス I～IV）を明らかにした。

クラス I 因子は CENP-C と CENP-I を介して M18BP1 をリクルートする

クラス I 因子は異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位上の内在性 CENP-A の新規集合を引き起こすことができた。CENP-C、CENP-I と微小管に結合するキネトコア側因子である KMN network の構成因子の殆どはこのクラスに分類された (Figure 9)。対照的に、細胞周期を通してセントロメアに局在する多くのセントロメアクロマチンに近い構成因子は、CENP-L と CENP-O の弱い活性を除いて、ヘテロクロマチンで覆われている異所的部位に有意な CENP-A 集合を引き起こさなかった (Figure 10B)。

KMN ネットワークの構成因子のテザリングは異所的部位への CENP-C 集合を引き起こした。一方、CENP-C の局在に必要な CENP-A ヌクレオソームの DNA 当たりの総量は DNA 複製を経ると半減し、分裂期が終了するまで減少したままである。CENP-A ノックダウン下でも KMN network との相互作用により CENP-C がリクルートされることを示した本解析結果は、CENP-A ヌクレオソームが減少したセントロメアでも、一旦キネトコアが形成されれば今度はキネトコア側から CENP-C の再集合や局在の維持を強化している可能性を示唆している (Figure 20)。

CENP-C と CENP-I はクラス I 因子のテザリングによる新規 CENP-A 集合を担う因子であった。さらに、CENP-C における 3 つのドメイン（ドメイン I (72-425 aa)、ドメイン III (426-537aa)、ドメイン VI+VII (760-943 aa)）は新規 CENP-A 集合を各ドメインだけで引き起こすことができた (Figure 16)。これらのドメインによる新規 CENP-A 集合は M18BP1 に依存していた (Figure 17)。M18BP1 は CENP-A シャペロンである HJURP のリクルートに関ることが報告されている Mis18 複合体の構成因子である (Fujita et al., 2007)。アフリカツメガエルにおいて CENP-C の C 末がこの M18BP1 と直接相互作用することが報告されており (Moree et al., 2011)、C 末のドメイン VI+VII も直接 M18BP1 と相互作用することで新規 CENP-A 集合を引き起こしていると考えられる (Figure 17C)。一方、本研究ではドメイン II も CENP-I を介して別経路で M18BP1 をリクルートでき (Figure 15 and 17)、新規 CENP-A 集合経路は M18BP1 のリクルートに収束することが明らかとなった。このことは、全てのクラス I 因子のテザリングによる新規 CENP-A 集合が M18BP1 に依存するという結果 (Figure 15H) とも整合性がある。

クラス II 因子は CENP-A 集合を促進する活性を助ける

クラス II 因子は HAC セントロメア上では CENP-A 集合を増加させるが、ヘテロクロマチンで覆われた異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位上では有意な新規 CENP-A 集合を引き起こさなかった (Figure 9)。これらの因子は HAC セントロメア上ではセントロメアに存在する、CENP-A 集合を促進する活性と協調して働く因子であると考えられる。クラス II は、Mis18 複合体や HJURP などの CENP-A 集合に直接関する因子をリクルートするのではなく、CENP-A ヌクレオソームやこの集合に関する因子の安定性、集合量あるいは活性を高める因子を含む可能性が考えられる。

MgcRacGAP と CENP-B は CENP-A ヌクレオソームを安定化することが報告されている (Fachinetti et al., 2015; Fujita et al., 2015; Lagana et al., 2010)。したがって、これらの因子のテザリングはセントロメアとして機能している HAC 上では新たに集合してくる CENP-A ヌクレオソームを安定化することにより CENP-A 集合を増加させたが、セントロメアではない異所的部位上では CENP-A ヌクレオソームが集合してこないため効果を発揮できなかったと予想される (Figure 20)。

また、これまでに所属研究室では、CENP-B の活性はクロマチンの状態に依存し、染色体腕部の異所的 alphoid DNA 挿入部位上のヘテロクロマチン化を促進する一方で、細胞に導入された裸の DNA 上では新規 CENP-A 集合を促進することを報告している (Okada et al., 2007)。このことは CENP-B が HAC セントロメア上では CENP-A ヌクレオソームを安定化させることに加え、クロマチン状態により新たな CENP-A の取り込みも促進している可能性を示唆している。

クラス III 因子はヒストン交換を促進するクロマチン状態を形成すると考えられる

クラス III 因子は CENP-A を発現することによって異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位上に強力に新規 CENP-A 集合を引き起こした (Figure 9)。本研究で調べた全てのヒストンアセチル化酵素 HAT がこのクラスに分類された。これまでに所属研究室では、一時的なヒストン H3 のアセチル化が G1 初期にセントロメアで起こり、Suv39h1 テザリングによってこの活性を阻害すると、HAC 上の CENP-A 集合が減少することを明らかにした (Ohzeki et al., 2012)。SSRP1 や RSF1 などの転写に関する一般的なヒストンシャペロン (LeRoy, 1998) もこのクラス III に分類された。SSRP1 や RSF1 も、セントロメアにも局在することが示されている (Chen et al., 2015; Okada et al., 2009; Perpelescu et al., 2009)。SSRP1 は RNA ポリメラーゼや DNA ポリメラーゼの通過前にヒストンを除去し、転写あるいは複製の後に再び取り込むことによりヒストン交換を促進する FACT (Facilitates chromatin transcription) の構成因子である (Belotserkovskaya et al., 2003; Formosa, 2013)。

これらはヒストン H3 により構成される通常のクロマチン上での作用であり、クラス III 因子

はセントロメア特異的な CENP-A だけでなく通常のヒストン H3 の集合を促進する可能性が考えられたため、Halo-H3.1、Halo-H3.3 を用いた実験を行った。ヒストン H3 のバリエーションである H3.1 は DNA 複製時にクロマチンに取り込まれるのに対し、H3.3 はクロマチンリモデリングおよび DNA 複製非依存的な転写とカップルしたヒストン交換によって取り込まれる (Gurard-Levin et al., 2014; Tagami et al., 2004; Wirbelauer et al., 2005)。興味深いことに、異所的部位へのクラス III 因子のテザリングによって、ヒストン H3.1 の集合は効率的に引き起こさない因子が多かったのに対し、ヒストン H3.3 と CENP-A の集合はほとんどの因子で共通して引き起こされた。したがって、CENP-A 取り込みもクロマチンリモデリングや転写とカップルしたメカニズムを利用している可能性が高い。これらのことから、クラス III 因子は、ヒストン交換を促進するクロマチン状態に変えることで発現された CENP-A やヒストン H3.3 をクロマチン上のヒストンと置き換えていると考えられる (Figure 20)。実際に、CENP-A とヒストン H3.3 の関連について、ヒストン H3.3 は G1 初期のヒト細胞において、後に CENP-A が補充される部位に存在する可能性が示唆されており、今回の結果からもヒストン H3.3 から CENP-A への置き換え反応が起こっていることが予想される (Dunleavy et al., 2011)。

Mis18 複合体、CENP-H、SKA1 などの因子はセントロメア/キネトコア特異的な因子であり、上記のクラス III 因子のようにクロマチン状態を確立する直接的な機能を持つことは知られていない。したがって、これらの因子は上記のような一般的なクロマチン因子をリクルートすることで CENP-A 集合を促進している可能性がある。これまで、SSRP1 や RSF1 などの一般的なクロマチン因子がどのようにセントロメアに集合し機能するかは十分に理解されていないが、クラス III に属するセントロメア/キネトコア因子が、そのメカニズム解明の端緒になると期待できる。

クラス IV 因子は転写の抑制を介して CENP-A 集合を阻害すると考えられる

クラス IV 因子は HAC 上の CENP-A 集合を減少させ、且つ、異所的部位でも新規 CENP-A 集合を引き起こさない因子である (Figure 9)。転写サイレンシング (ヘテロクロマチン化) に関するヒストンメチル化酵素と HDAC の多くはこのクラスに属する。クラス III 因子がクロマチンのオープン化とヒストン交換を引き起こすのに対して、クラス IV 因子はヘテロクロマチン形成とヒストン交換の抑制を介して HAC 上の CENP-A 取り込みを阻害すると考えられる (Figure 20)。

本研究によって HDAC は HAC 上の CENP-A 集合を減少させることがわかった。一方、これまで所属研究室では、HDAC の阻害剤であるトリコスタチン A 処理は異所的部位上のヘテロクロマチンを解除して、CENP-A 集合を増加させ、機能的なセントロメア形成を促進することを明らかにしている (Nakano et al., 2003; Okamoto et al., 2007)。これら結果は HDAC によるヘテロ

クロマチン化が CENP-A 集合に抑制的に働くことを、ヘテロクロマチンの促進と解除の両面の結果から明確に示している。今回の研究の結果はセントロメア形成とヘテロクロマチン形成（転写サイレンシングなど）が互いに拮抗してバランスを保つという、これまでの我々の考えを強く支持するものである (Bergmann et al., 2012; Ohzeki et al., 2012; Ohzeki et al., 2015; Okada et al., 2007)。

セントロメアでの CENP-A 集合におけるクラス I、II、III 因子の関係

上記のクラス II 因子とクラス III 因子の議論から、CENP-A を正しくセントロメアに集合・維持させるためには、Mis18 複合体を介して CENP-A 分子がセントロメア上へリクルートされる経路に加え、クラス III 因子による、クロマチン上のヒストンとの一般的な交換反応による CENP-A のヌクレオソーム化、その後のクラス II 因子による、取り込まれた CENP-A ヌクレオソームの安定化も必要であると考えられる (Figure 20)。実際、クラス II 因子の CENP-N、MgcRacGAP、クラス III 因子の SSRP1、RSF1 などの因子がセントロメアでの CENP-A 集合に必要であることは報告されている (Carroll et al., 2009; Lagana et al., 2010; Okada et al., 2009; Perpelescu et al., 2009)。また、クラス I 因子である CENP-C と CENP-I は、それぞれクラス II 因子である CENP-B とクラス III 因子である CENP-H と相互作用することが示されている (Okada et al., 2006; Suzuki et al., 2004) (Figure 20)。したがって、CENP-C と CENP-I を含むクラス I 因子は M18BP1 を介して CENP-A 分子をリクルートするだけでなく、上述のように、交換反応によるヌクレオソーム化（クラス III）と CENP-A ヌクレオソームの安定化（クラス II）にこれらの活性も活用していると考えられる。今後、下流因子の解析により、これらの機能の繋がりが明らかにされる可能性がある。

M18BP1 活性は CENP-C と CENP-I に依存する

M18BP1 は CENP-C と CENP-I による新規 CENP-A 集合に必要であった (Figure 15)。したがって、M18BP1 をテザリングすることで、新規 CENP-A 集合における CENP-C と CENP-I の必要性を回避できると期待される。意外なことに、tetR-EYFP-M18BP1 のテザリングそのものは異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位上の内在性 CENP-A の新規集合を引き起こさなかった (Figure 9)。このことは CENP-C、CENP-I あるいはこれらとの相互作用因子が M18BP1 活性の制御や強化に関っている可能性を示唆している。実際、M18BP1 テザリングは CENP-C と CENP-I が既に集合している HAC セントロメア上においては内在性 CENP-A 集合を増加させた (Figure 9)。今後の研究で、CENP-C や CENP-I の下流因子が M18BP1 のリン酸化 (McKinley and Cheeseman, 2014; Silva et al., 2012) や他の修飾による制御に関るかどうかを明らかにする必要がある。

CENP-C と CENP-I の序列は種間で微妙に異なる

ニワトリの細胞 (DT40) では、CENP-C のセントロメア局在は CENP-I に依存し (Nishihashi et al., 2002)、新規合成された CENP-A のセントロメアへの集合は CENP-C よりも、むしろ CENP-I に依存することが報告されている (Okada et al., 2006)。一方、本研究によって、ヒトの細胞 (HeLa) では、CENP-I のセントロメア集合が CENP-C に依存し、CENP-I は CENP-C の下流で M18BP1 集合を介して、新規合成された CENP-A 集合を増進する役割を持つことが明らかになった (Figure 18 and 19)。このことは、CENP-C と CENP-I はともにヒトとニワトリでセントロメアのエピジェネティクスに必要な保存された因子ではあるが、これらの種間では、これら 2 つの因子の序列は微妙に異なっていることを示している。

CENP-C と CENP-I はセントロメアの「機能」と「エピジェネティクス」を協調させる

CENP-C は酵母から高等真核生物まで広く保存されているが (Przewloka et al., 2011; Talbert et al., 2004)、染色体全体にキネトコアが形成されるホロセントロメアを持ついくつかの昆虫 (チョウ、ガ、カメムシ、シラミ、ハサミムシ、トンボ) では CENP-A 遺伝子が欠損されていることが明らかにされており、CENP-A 遺伝子が欠損すると CENP-C 遺伝子も存在していない。このことは、CENP-C の保存された主要な機能は CENP-A ヌクレオソームの認識であることを示している (Drinneberg et al., 2014)。一方、本研究では、テザリング実験から、CENP-C は新規 CENP-A 集合とキネトコア集合の両反応を引き起こせることがわかった。したがって、CENP-C は CENP-A ヌクレオソームに結合することでキネトコア構成因子の集合を促進し、一旦キネトコアが形成されれば今度は CENP-C の集合を介して CENP-A 分子の集合を促進することになる (Figure 20)。また、CENP-C による CENP-A 集合を増強する CENP-I はキネトコア機能にも重要であり (Basilico et al., 2014; Cheeseman et al., 2008; Hori et al., 2003; Nishihashi et al., 2002)、実際に、CENP-I ノックダウンによる分裂期停止が観察された (Figure 14A)。したがって、CENP-C と CENP-I による補強は、セントロメアの「機能」に必要なキネトコアの集合とセントロメアの維持/記憶に必要な CENP-A の集合「エピジェネティクス」という正確な遺伝情報の継承に必要な 2 つの重要なメカニズムを繋ぐ要として機能していると結論づけることが可能である (Figure 20)。

材料と方法：

細胞培養

ヒト子宮頸癌細胞由来である HeLa の各細胞株は Dulbecco' s modified Eagle' s medium (Nacalai Tesque) に 10% FBS を付加し 37°C、5% CO₂ 下で培養した。

Halo タグおよび tetR-EYFP 融合タンパク質発現プラスミド

Halo タグ融合タンパク質発現には Flexi Halo タグクローンベクター (Kazusa DNA research institute) を用いた (Table 2)。それぞれの遺伝子は Halo タグの C 末側にクローニングされている。tetR-EYFP-Alone、HJURP、Suv39h1、Mis18 α を発現する pJET3-IH、pJET3-HJURP-IH、pJET3-Suv39h1-IH、pJET3-Mis18 α -IHは (Ohzeki et al., 2012) に記述されている。pJET3-IH シリーズのベクターは pJTI™Fast DEST Gateway® vector (Invitrogen) を改変して作成された。このプラスミドは attB サイトを持ち、pJTI™ PhiC31 Int vector (インテグラーゼ発現ベクター) が発現する PhiC31 インテグラーゼによって、ヒトゲノム中の偽 attP サイトと組み換えを起こし、効率的に安定発現株を得ることができる (Jump-in integration system : Life Technology)。pJET3-IHはプロモーターとして elongation factor-1 (EF1) プロモーターを持ち、その下流に TetR-EYFP (Nakano et al., 2008)、Internal Ribosomal Entry Site (IRES) と Hygromycin 耐性遺伝子がクローニングされている。tetR-EYFP 融合タンパク質の各遺伝子は Halo タグクローンから制限酵素で切り出した、あるいは PCR で増幅後、制限酵素で切断した断片を pJET3-IH の EYFP と IRES の間にある PacI と NotI あるいは XhoI と NotI 切断サイトの間に組み込まれている。

細胞株

HeLa-HAC-2-4 は HeLa-HAC-R5 (Ohzeki et al., 2012) 由来の株である。tetR-EYFP-Alone、HJURP、Suv39h1 を安定発現する HeLa-HAC-2-4 tetR-EYFP-Alone、tetR-EYFP-HJURP、tetR-EYFP-Suv39h1 株はそれぞれの pJET3 プラスミドを HeLa-HAC-2-4 に導入し、Jump-in integration system (Life Technology) を用いてインテグレーションさせ、tetR/tet0 結合を阻害するドキシサイクリン 1 μ g/ml、Hygromycin B (和光) 200 μ g/ml、G418 (和光) 400 μ g/ml 下で 2 週間選択し、ポリクローナル株を作成した。SNAP-CENP-A を安定発現する HeLa-Int-03 SNAP-CENP-A 株は pJET3 を元にして作成した SNAP-CENP-A 発現プラスミドを HeLa-Int-03 に Jump-in integration system を用いて導入し、Blasticidin S (和光) 2 μ g/ml 下で選択し、シングルクローン株を作成した。M18BP1-Halo を安定発現する HeLa-Int-03 M18BP1-Halo は M18BP1 遺伝子の下流に CRISPR/Cas ゲノム編集によって Halo タグを融合することで作成した。M18BP1

遺伝子座の AAATGAGAAAATATGATTCC および TGCTTTATGGTAAAAATCCC を標的とするペアの一本鎖ガイド RNA 発現プラスミドを作成した。M18BP1 遺伝子座の 5' と 3' ホモロジーアームはそれぞれ以下のプライマーセットにより PCR を行い作成した：(5' -CTCTAGAGGATCCCCGAGCATGTACTTCAAACCTGCC と 5' -TGCAGAATCAGAGTTCGAAAAATAATAATC) および(5' -GTTTGTATTTTCAACTGGAGTACATG と 5' -GCCAGTGAATTCGAGTATGTCAAGTTTCAAAACATAACAAGC)。一本鎖ガイド RNA 発現プラスミド、ホモロジーアーム内に Halo タグと Puromycin 耐性遺伝子を持つドナーベクター、Cas9 nickase mutant (D10A) 発現プラスミドを HeLa-Int-03 にコトランスフェクションし、Puromycin (和光) 0.4 μ g/ml で選択して、シングルクローン株を作成した。

トランスフェクション

プラスミドのトランスフェクションには FuGENE HD (Promega)、siRNA のトランスフェクションには Lipofectamin 2000 (Invitrogen) を用いた。siRNAs は効果を高めるために 10 時間の間隔で 2 回トランスフェクションした。引き続きプラスミドをトランスフェクションする場合は、最初の siRNA トランスフェクションから 24 時間後に行った。M18BP1 の siRNA 配列は (Fujita et al., 2007) を参照し、Ambion 社でカスタム合成した。CENP-A (s2908)、CENP-C (s2912)、CENP-I (s5375)、MAD2 (s8393) および Control (AM4635) の siRNA は Ambion 社から入手した。

間接蛍光抗体法

カバーガラス上に生えた細胞を 2.6%ホルマリン/PBS 中で室温 5 分間固定した。2% BSA、0.1% Triton X-100/PBS で室温 30 分間ブロッキングし、一次抗体で室温 1 時間インキュベートし、0.1% Triton X-100/PBS で 2 回洗い、二次抗体で室温 1 時間処理した。本研究で用いた抗体は Table 1 に示す。DNA は DAPI を用いて染色した。

Halo タグ、SNAP タグの標識

Halo 融合タンパク質の染色では、Halo タグ融合タンパク質を発現する細胞を固定前に 2nM Halo-tag TMR Ligand (Promega) を培地に 12 時間添加して標識した。SNAP-CENP-A の染色では、細胞を固定の 24 時間前から 1 μ M SNAP-cell-Block (NEB) を培地に加えて、発現している SNAP-CENP-A をブロックし、固定の 9 時間前に 3 回培地交換し、除去した。固定 2 時間前に 0.6 μ M SNAP-Cell TMR-Star (NEB) を培地に加えて新たに発現した SNAP-CENP-A を標識し、30 分前に 3 回培地交換した後、固定した。

M 期染色体スプレッドおよび間接蛍光・FISH

M期染色体スプレッドの調整では、培地に 350nM の TN-16 (WAKO; (Kitagawa et al., 1995)) を加えて 6 時間インキュベートし、M 期細胞をピペッティングにより集め、低張液 (20mM Tris pH7.4、1mM EGTA and 40mM KCl) 中で、10 分間氷上でインキュベートした後、Cytospin3 (Shandon) を用いてカバーガラス上にスプレッドした。1.8%ホルマリン/0.1% triton X-100/PBS 中で室温 5 分間固定した後、間接蛍光抗体法は前述の手順で行った。1.8%ホルマリン/0.1% triton X-100/PBS で再び固定し、これを 125mM Glycine、0.5% Triton X-100/PBS 中で室温 5 分間クエンチした後、メタノール酢酸 (メタノール : 酢酸=3:1) 中で室温 10 分間処理後、乾燥させた。次に、73°C の 2×SSC (300mM NaCl、342mM Sodium Citrate pH7.0) で 3 分加熱、73°C の 70% ホルムアミド/2×SSC で 3 分間 DNA を変性、4°C の 70%エタノールで 2 分間急冷し、室温の 100% エタノールで 2 分×2 回処理し、乾燥させた。プローブ溶液をホルムアミドで希釈して Digoxigenin 標識 BAC プローブ 1ng/μl とし 73°C 3 分間変性させた後、同量の 20% デキストランサルフェート、2×デンハルト/4×SSC を加えて、氷水中で急冷して 2 分間静置。この溶液 18μl をパラフィルムに乗せ、細胞が接着したカバーガラスを被せて、37°C で一晩インキュベート。2×SSC でリンス、37°C の 50% ホルムアミド/2×SSC で 7 分、37°C の 2×SSC で 7 分、5% スキムミルク/2×SSC で室温 30 分、2×SSC でリンス、Rhodamine 標識抗 Digoxigenin 抗体 (Roche : 1% スキムミルク/2×SSC で 1/200 に希釈) を 36μl ずつカバーガラスに乗せ、室温で 1 時間静置。2×SSC でリンス、0.5μg/ml DAPI/2×SSC で室温 3 分、2×SSC で 2 回リンス。最後に、カバーガラスを、VECTASHIELD を用いてスライドガラス上にマウントした。

蛍光顕微鏡観察

定量解析では、共焦点スキャンユニット CSU-X1 (Yokogawa)、iXon3 DU897E-CS0 camera (Andor)、Objective Plan-Apochromat 100×/1.46 oil lens (Zeiss) を取り付けた Axio Observer. Z1 (Zeiss) と Andor iQ2 software (Andor) を用いて、核全体にわたる Z-stack 画像を 0.22μm の間隔で取得した。その他の画像については、LSM700 scanning module、Objective Plan-Apochromat 63×/1.46 oil lens (Zeiss) を取り付けた Axio Observer. Z1 (Zeiss) と ZEN 2009 software (Zeiss) を用いて Z-stack 画像を 0.38μm 間隔で取得した。示された画像は異所的 alphoid^{tet0} 挿入部位あるいは核全体にわたる複数のスライスの maximum intensity projection である。カウントアッセイでは、上記と同様の顕微鏡条件下で、間期の細胞において目視可能な異所的部位のシグナルをカウントした。

画像の定量

定量には ImageJ (National Institutes of Health) を用いた。CSU を用いた撮影では画像の

外側に行く程、試料に照射される光量が減少し、シグナルが弱くなる。この光学系によるシグナルの不均一性は、単一の蛍光画像として Halo-tag TMR Ligand 溶液を撮影した画像を用いて補正した。HAC を用いた解析 (Figure 2-4) では、同じ核内の $\text{alphoid}^{\text{tet0}}$ -HAC と宿主セントロメアの CENP-A シグナルを計測し、HAC 上の CENP-A シグナルを宿主セントロメアの平均の CENP-A シグナルで標準化した (Figure 2C)。宿主セントロメアの解析 (Figure 18 and 19) では、同じ核内のセントロメアシグナル (ドット状に見えるシグナルをセントロメアとした) の合計とセントロメアの数とを計測し、平均のシグナルを算出した。

ウェスタンブロッティングと細胞分画

全細胞抽出液は細胞をスクレイパーで回収し、50U/ml Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis (Thermo)、0.1% NP40/PBS で室温 5 分間処理した後、Laemmli sample buffer (Bio-Rad) で溶解させて調整した。サンプルは Mini-PROTEAN TGX precast gels (Bio-Rad) を用いて SDS-PAGE を行い、Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad) を用いて転写した。メンブレンを 3% BSA、0.1% Tween 20/PBS で 1 時間ブロッキングし、一次抗体 (1% BSA、0.1% Tween 20/PBS) で 4°C 一晩処理した。0.1% Tween 20/PBS で各 10 分 3 回洗い、二次抗体 (1% skim milk/0.1% Tween 20/PBS) で室温 1 時間処理後、0.1% Tween 20/PBS で各 10 分 3 回洗い、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo) を用いて検出した。本研究で使用した抗体は Table 1 に示す。細胞分画では、細胞をスクレイパーで回収し、氷冷 lysis buffer (3.75 mM Tris pH 7.5、20 mM KCl、0.5 mM EDTA、0.5 mM DTT、0.05 mM spermidine、0.125 mM spermine、0.1% NP40、1/100 当量 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) に懸濁して、G27 針を付けたシリンジを 20 往復通して破碎した。1.5M NaCl/lysis buffer を 1/4 当量加えて素早く混和し、氷上に 30 分静置後、4°C 12000g で 10 分遠心して上清とペレットに分画した。上清には Laemmli sample buffer を加えた。ペレットは PBS で一度洗い、Laemmli sample buffer で溶解させた後、Bioruptor (Cosmo Bio) でソニケーションした。

ChIP-qPCR (クロマチン免疫沈降および定量 PCR) 解析

HeLa-HAC-2-4 tetR-EYFP-Alone、tetR-EYFP-HJURP、tetR-EYFP-Suv39h1 株を tetR/tet0 結合を阻害するドキシサイクリン (1 μ g/ml) の有無の条件下で 4 日間培養し、トリプシン処理して回収した。0.5%ホルマリン/PBS で室温 10 分間固定し、125mM グリシンで 5 分間クエンチした。以後、氷上または 4°C で処理。sonication buffer (10mM Tris-HCl、1mM EDTA、0.5mM DTT、0.05% SDS、1/100 当量 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)) に置換し、Bioruptor (Cosmo Bio) を用いて DNA の平均サイズが ~500bp になるようにソニケーションを行った。15000rpm 10 分遠

心し、上清を可溶化クロマチン input として用い、各抗体を付加した Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG (Life Technologies) を用い、ChIP buffer (10mM Tris、 275mM NaCl、 0.5mM EDTA、 0.25mM DTT、 0.5% TritonX-100、 0.05% SDS、 2.5% Glycerol、 1/100 当量 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)) 中で 4°C 一晚免疫沈降を行った。本研究で用いた抗体は Table 1 に示す。2 × ChIP buffer で 3 回洗い、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて DNA を回収した。リアルタイム PCR には以下のプライマーセットを用いた。alphoid^{tet0} : tetOF (5' -CTCTTTTGTGGAATCTGCAAGTG) と tetOR (5' -TCTATCACTGATAGGAGAGCTCT)、21 番染色体 alphoid DNA 11-mer (21-I alphoid) : 21alpF (5' -CTAGACAGAAGCCCTCTCAG) と 21alpR (5' -GGGAAGACATCCCTTTTCACC)、Satellite 2 : Sat2F (5' -GGAATCATCGCATAGAATCGAATGG) と Sat2R (5' -CATTCGAGTCCGTGGATTATCC)。

謝辞：

研究活動においてさまざまな面から支援して下さった舂本寛先生、ならびにかずさ DNA 研究所細胞工学研究室の皆様へ感謝致します。また、名古屋大学での所属先を引き受けて下さった本間道夫先生、ならびに分子第 4 講座の皆様、研究および論文執筆に際して有益な助言をしていただいたエジンバラ大学の William C. Earnshaw 先生ならびに Nuno M. C. Martins 博士、多数の Halotag cDNA クローンを提供して下さったかずさ DNA 研究所の長瀬隆弘博士、顕微鏡実験などでお世話になった東京工業大学の木村宏先生、CENP-A 抗体を作成、提供して下さったモノクローナル抗体研究所の野崎直仁博士へ感謝致します。

引用文献：

Allshire, R. C. and Karpen, G. H. (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* **9**, 923-37.

Barnhart, M. C., Kuich, P. H., Stellfox, M. E., Ward, J. A., Bassett, E. A., Black, B. E. and Foltz, D. R. (2011). HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. *J Cell Biol* **194**, 229-43.

Basilico, F., Maffini, S., Weir, J. R., Prumbaum, D., Rojas, A. M., Zimniak, T., De Antoni, A., Jeganathan, S., Voss, B., van Gerwen, S. et al. (2014). The pseudo GTPase CENP-M drives human kinetochore assembly. *Elife* **3**, e02978.

Bassett, E. A., DeNizio, J., Barnhart-Dailey, M. C., Panchenko, T., Sekulic, N., Rogers, D. J., Foltz, D. R. and Black, B. E. (2012). HJURP uses distinct CENP-A surfaces to recognize and to stabilize CENP-A/histone H4 for centromere assembly. *Dev Cell* **22**, 749-62.

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V., Orphanides, G., Studitsky, V. and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* **301**, 1090-1093.

Bergmann, J. H., Jakubsche, J. N., Martins, N. M., Kagansky, A., Nakano, M., Kimura, H., Kelly, D. A., Turner, B. M., Masumoto, H., Larionov, V. et al. (2012). Epigenetic engineering: histone H3K9 acetylation is compatible with kinetochore structure and function. *J Cell Sci* **125**, 411-21.

Bergmann, J. H., Rodriguez, M. G., Martins, N. M., Kimura, H., Kelly, D. A., Masumoto, H., Larionov, V., Jansen, L. E. and Earnshaw, W. C. (2011). Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO J* **30**, 328-40.

Cardinale, S., Bergmann, J. H., Kelly, D. A., Nakano, M., Valdivia, M. M., Kimura, H., Masumoto, H., Larionov, V. and Earnshaw, W. C. (2009). Hierarchical inactivation of a synthetic human kinetochore by a chromatin modifier. *Mol Biol Cell* **20**, 4194-4204.

Carroll, C. W., Milks, K. J. and Straight, A. F. (2010). Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J Cell Biol* **189**, 1143-55.

Carroll, C. W., Silva, M. C., Godek, K. M., Jansen, L. E. and Straight, A. F. (2009). Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N. *Nat Cell Biol* **11**, 896-902.

Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M. and Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* **127**, 983–97.

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

Cheeseman, I. M., Hori, T., Fukagawa, T. and Desai, A. (2008). KNL1 and the CENP-H/I/K complex coordinately direct kinetochore assembly in vertebrates. *Mol Biol Cell* **19**, 587–594.

Chen, C. C., Bowers, S., Lipinszki, Z., Palladino, J., Trusiak, S., Bettini, E., Rosin, L., Przewloka, M. R., Glover, D. M., O’Neill, R. J. et al. (2015). Establishment of Centromeric Chromatin by the CENP-A Assembly Factor CAL1 Requires FACT-Mediated Transcription. *Dev Cell* **34**, 73–84.

Choi, H. J., Fukui, M. and Zhu, B. T. (2011). Role of cyclin B1/Cdc2 up-regulation in the development of mitotic prometaphase arrest in human breast cancer cells treated with nocodazole. *PLoS One* **6**, e24312.

Dambacher, S., Deng, W., Hahn, M., Sadic, D., Frohlich, 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**, 101–10.

DeLuca, J. G., Gall, W. E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A. and Salmon, E. D. (2006). Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell* **127**, 969–82.

Dou, Y., Milne, T. A., Tackett, A. J., Smith, E. R., Fukuda, A., Wysocka, J., Allis, C. D., Chait, B. T., Hess, J. L. and Roeder, R. G. (2005). Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* **121**, 873–85.

Drane, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M. and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev* **24**, 1253–65.

Drinneberg, I. A., deYoung, D., Henikoff, S. and Malik, H. S. (2014). Recurrent loss of CenH3 is associated with independent transitions to holocentricity in insects. *Elife* **3**, e03676.

Dunleavy, E. M., Almouzni, G. and Karpen, G. H. (2011). H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G(1) phase. *Nucleus*

2, 146-57.

Dunleavy, E. M., Roche, D., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y. and Almouzni-Pettinotti, G. (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* **137**, 485-97.

Earnshaw, W. C. and Rothfield, N. (1985). Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* **91**, 313-21.

Fachinetti, D., Han, J. S., McMahon, M. A., Ly, P., Abdullah, A., Wong, A. J. and Cleveland, D. W. (2015). DNA Sequence-Specific Binding of CENP-B Enhances the Fidelity of Human Centromere Function. *Dev Cell* **33**, 314-27.

Falk, S. J., Guo, L. Y., Sekulic, N., Smoak, E. M., Mani, T., Logsdon, G. A., Gupta, K., Jansen, L. E., Van Duyne, G. D., Vinogradov, S. A. et al. (2015). Chromosomes. CENP-C reshapes and stabilizes CENP-A nucleosomes at the centromere. *Science* **348**, 699-703.

Foltz, D. R., Jansen, L. E., Bailey, A. O., Yates, J. R., 3rd, Bassett, E. A., Wood, S., Black, B. E. and Cleveland, D. W. (2009). Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* **137**, 472-84.

Foltz, D. R., Jansen, L. E., Black, B. E., Bailey, A. O., Yates, J. R., 3rd and Cleveland, D. W. (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol* **8**, 458-69.

Formosa, T. (2013). The role of FACT in making and breaking nucleosomes. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 247-55.

Fujita, R., Otake, K., Arimura, Y., Horikoshi, N., Miya, Y., Shiga, T., Osakabe, A., Tachiwana, H., Ohzeki, J. I., Larionov, V. et al. (2015). Stable complex formation of CENP-B with the CENP-A nucleosome. *Nucleic Acids Res* **43**, 4909-22.

Fujita, Y., Hayashi, T., Kiyomitsu, T., Toyoda, Y., Kokubu, A., Obuse, C. and Yanagida, M. (2007). Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1. *Dev Cell* **12**, 17-30.

Fukagawa, T. and Brown, W. R. (1997). Efficient conditional mutation of the vertebrate CENP-C gene. *Hum Mol Genet* **6**, 2301-2308.

Gascoigne, K. E., Takeuchi, K., Suzuki, A., Hori, T., Fukagawa, T. and Cheeseman, I. M. (2011). Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the

requirement for CENP-A nucleosomes. *Cell* **145**, 410-22.

Gurard-Levin, Z. A., Quivy, J. P. and Almouzni, G. (2014). Histone chaperones: assisting histone traffic and nucleosome dynamics. *Annu Rev Biochem* **83**, 487-517.

Hanisch, A., Sillje, H. H. and Nigg, E. A. (2006). Timely anaphase onset requires a novel spindle and kinetochore complex comprising Skal and Ska2. *EMBO J* **25**, 5504-15.

Hassig, C. A. and Schreiber, S. L. (1997). Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr Opin Chem Biol* **1**, 300-8.

Hayashi, T., Fujita, Y., Iwasaki, O., Adachi, Y., Takahashi, K. and Yanagida, M. (2004). Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell* **118**, 715-29.

Hori, T., Amano, M., Suzuki, A., Backer, C. B., Welburn, J. P., Dong, Y., McEwen, B. F., Shang, W. H., Suzuki, E., Okawa, K. et al. (2008). CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell* **135**, 1039-52.

Hori, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Kimura, H. and Fukagawa, T. (2003). Dynamic behavior of Nuf2-Hec1 complex that localizes to the centrosome and centromere and is essential for mitotic progression in vertebrate cells. *J Cell Sci* **116**, 3347-62.

Hori, T., Shang, W. H., Takeuchi, K. and Fukagawa, T. (2013). The CCAN recruits CENP-A to the centromere and forms the structural core for kinetochore assembly. *J Cell Biol* **200**, 45-60.

Ikeno, M., Grimes, B., Okazaki, T., Nakano, M., Saitoh, K., Hoshino, H., McGill, N. I., Cooke, H. and Masumoto, H. (1998). Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat Biotechnol* **16**, 431-9.

Izuta, H., Ikeno, M., Suzuki, N., Tomonaga, T., Nozaki, N., Obuse, C., Kisu, Y., Goshima, N., Nomura, F., Nomura, N. et al. (2006). Comprehensive analysis of the ICEN (Interphase Centromere Complex) components enriched in the CENP-A chromatin of human cells. *Genes Cells* **11**, 673-84.

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

Kato, H., Jiang, J., Zhou, B. R., Rozendaal, M., Feng, H., Ghirlando, R., Xiao, T. S., Straight, A. F. and Bai, Y. (2013). A conserved mechanism for centromeric nucleosome recognition by centromere protein CENP-C. *Science* **340**, 1110-3.

Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Kessler, N. and Stillman, B. (1995). The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* **81**, 1105-14.

Kitagawa, K., Masumoto, H., Ikeda, M. and Okazaki, T. (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.

Klare, K., Weir, J. R., Basilico, F., Zimniak, T., Massimiliano, L., Ludwigs, N., Herzog, F. and Musacchio, A. (2015). CENP-C is a blueprint for constitutive centromere-associated network assembly within human kinetochores. *J Cell Biol*.

Lagana, A., Dorn, J. F., De Rop, V., Ladouceur, A. M., Maddox, A. S. and Maddox, P. S. (2010). A small GTPase molecular switch regulates epigenetic centromere maintenance by stabilizing newly incorporated CENP-A. *Nat Cell Biol* **12**, 1186-93.

LeRoy, G. (1998). Requirement of RSF and FACT for Transcription of Chromatin Templates in Vitro. *Science* **282**, 1900-1904.

Masumoto, H., Ikeno, M., Nakano, M., Okazaki, T., Grimes, B., Cooke, H. and Suzuki, N. (1998). Assay of centromere function using a human artificial chromosome. *Chromosoma* **107**, 406-16.

McKinley, K. L. and Cheeseman, I. M. (2014). Polo-like kinase 1 licenses CENP-A deposition at centromeres. *Cell* **158**, 397-411.

Moree, B., Meyer, C. B., Fuller, C. J. and Straight, A. F. (2011). CENP-C recruits M18BP1 to centromeres to promote CENP-A chromatin assembly. *J Cell Biol* **194**, 855-71.

Nakano, M., Cardinale, S., Noskov, V. N., Gassmann, R., Vagnarelli, P., Kandels-Lewis, S., Larionov, V., Earnshaw, W. C. and Masumoto, H. (2008). Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Dev Cell* **14**, 507-22.

Nakano, M., Okamoto, Y., Ohzeki, J. and Masumoto, H. (2003). Epigenetic assembly of centromeric chromatin at ectopic alpha-satellite sites on human chromosomes.

J Cell Sci **116**, 4021-34.

Nishihashi, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Ikemura, T., Regnier, V., Dodson, H., Earnshaw, W. C. and Fukagawa, T. (2002). CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells. *Dev Cell* **2**, 463-76.

Nishino, T., Rago, F., Hori, T., Tomii, K., Cheeseman, I. M. and Fukagawa, T. (2013). CENP-T provides a structural platform for outer kinetochore assembly. *EMBO J* **32**, 424-36.

Obuse, C., Yang, H., Nozaki, N., Goto, S., Okazaki, T. and Yoda, K. (2004). Proteomics analysis of the centromere complex from HeLa interphase cells: UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB-1) is a component of the CEN-complex, while BMI-1 is transiently co-localized with the centromeric region in interphase. *Genes Cells* **9**, 105-20.

Ohzeki, J., Bergmann, J. H., Kouprina, N., Noskov, V. N., Nakano, M., Kimura, H., Earnshaw, W. C., Larionov, V. and Masumoto, H. (2012). Breaking the HAC Barrier: histone H3K9 acetyl/methyl balance regulates CENP-A assembly. *EMBO J* **31**, 2391-402.

Ohzeki, J., Larionov, V., Earnshaw, W. C. and Masumoto, H. (2015). Genetic and epigenetic regulation of centromeres: a look at HAC formation. *Chromosome Res* **23**, 87-103.

Ohzeki, J., Nakano, M., Okada, T. and Masumoto, H. (2002). CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *J Cell Biol* **159**, 765-75.

Okada, M., Cheeseman, I. M., Hori, T., Okawa, K., McLeod, I. X., Yates, J. R., 3rd, Desai, A. and Fukagawa, T. (2006). The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat Cell Biol* **8**, 446-57.

Okada, M., Okawa, K., Isobe, T. and Fukagawa, T. (2009). CENP-H-containing complex facilitates centromere deposition of CENP-A in cooperation with FACT and CHD1. *Mol Biol Cell* **20**, 3986-95.

Okada, T., Ohzeki, J., Nakano, M., Yoda, K., Brinkley, W. R., Larionov, V. and Masumoto, H. (2007). CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell* **131**, 1287-300.

Okamoto, Y., Nakano, M., Ohzeki, J., Larionov, V. and Masumoto, H.

(2007). A minimal CENP-A core is required for nucleation and maintenance of a functional human centromere. *EMBO J* **26**, 1279-91.

Perpelescu, M., Nozaki, N., Obuse, C., Yang, H. and Yoda, K. (2009). Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex. *J Cell Biol* **185**, 397-407.

Petrovic, A., Pasqualato, S., Dube, P., Krenn, V., Santaguida, S., Cittaro, D., Monzani, S., Massimiliano, L., Keller, J., Tarricone, A. et al. (2010). The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochore assembly. *J Cell Biol* **190**, 835-52.

Przewloka, M. R., Venkei, Z., Bolanos-Garcia, V. M., Debski, J., Dadlez, M. and Glover, D. M. (2011). CENP-C is a structural platform for kinetochore assembly. *Curr Biol* **21**, 399-405.

Rago, F., Gascoigne, K. E. and Cheeseman, I. M. (2015). Distinct organization and regulation of the outer kinetochore KMN network downstream of CENP-C and CENP-T. *Curr Biol* **25**, 671-7.

Saitoh, H., Tomkiel, J., Cooke, C. A., Ratrie, H., 3rd., Maurer, M., Rothfield, N. F. and Earnshaw, W. C. (1992). CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell* **70**, 115-125.

Santaguida, S. and Musacchio, A. (2009). The life and miracles of kinetochores. *EMBO J* **28**, 2511-31.

Schleiffer, A., Maier, M., Litos, G., Lampert, F., Hornung, P., Mechtler, K. and Westermann, S. (2012). CENP-T proteins are conserved centromere receptors of the Ndc80 complex. *Nat Cell Biol* **14**, 604-613.

Screpanti, E., Antoni, A. D., Alushin, G. M., Petrovic, A., Melis, T., Nogales, E. and Musacchio, A. (2011). Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr Biol* **21**, 391-398.

Shuaib, M., Ouararhni, K., Dimitrov, S. and Hamiche, A. (2010). HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1349-54.

Silva, M. C., Bodor, D. L., Stellfox, M. E., Martins, N. M., Hochegger, H., Foltz, D. R. and Jansen, L. E. (2012). Cdk activity couples epigenetic centromere inheritance to cell cycle progression. *Dev Cell* **22**, 52-63.

Sullivan, B. A. and Karpen, G. H. (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., Nakano, M., Nozaki, N., Egashira, S., Okazaki, T. and Masumoto, H. (2004). CENP-B interacts with CENP-C domains containing Mif2 regions responsible for centromere localization. *J Biol Chem* **279**, 5934–46.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**, 51–61.

Talbert, P. B., Bryson, T. D. and Henikoff, S. (2004). Adaptive evolution of centromere proteins in plants and animals. *Journal of Biology* **3**, 18.

Trazzi, S., Perini, G., Bernardoni, R., Zoli, M., Reese, J. C., Musacchio, A. and Della Valle, G. (2009). The C-terminal domain of CENP-C displays multiple and critical functions for mammalian centromere formation. *PLoS One* **4**, e5832.

Tsuduku, T., Nakano, M., Yasuoka, N., Yamazaki, S., Okada, T., Okamoto, Y. and Masumoto, H. (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**, 7682–95.

Wang, J., Liu, X., Dou, Z., Chen, L., Jiang, H., Fu, C., Fu, G., Liu, D., Zhang, J., Zhu, T. et al. (2014). Mitotic regulator Mis18beta interacts with and specifies the centromeric assembly of molecular chaperone holliday junction recognition protein (HJURP). *J Biol Chem* **289**, 8326–36.

Wirbelauer, C., Bell, O. and Schubeler, D. (2005). Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias. *Genes Dev* **19**, 1761–1766.

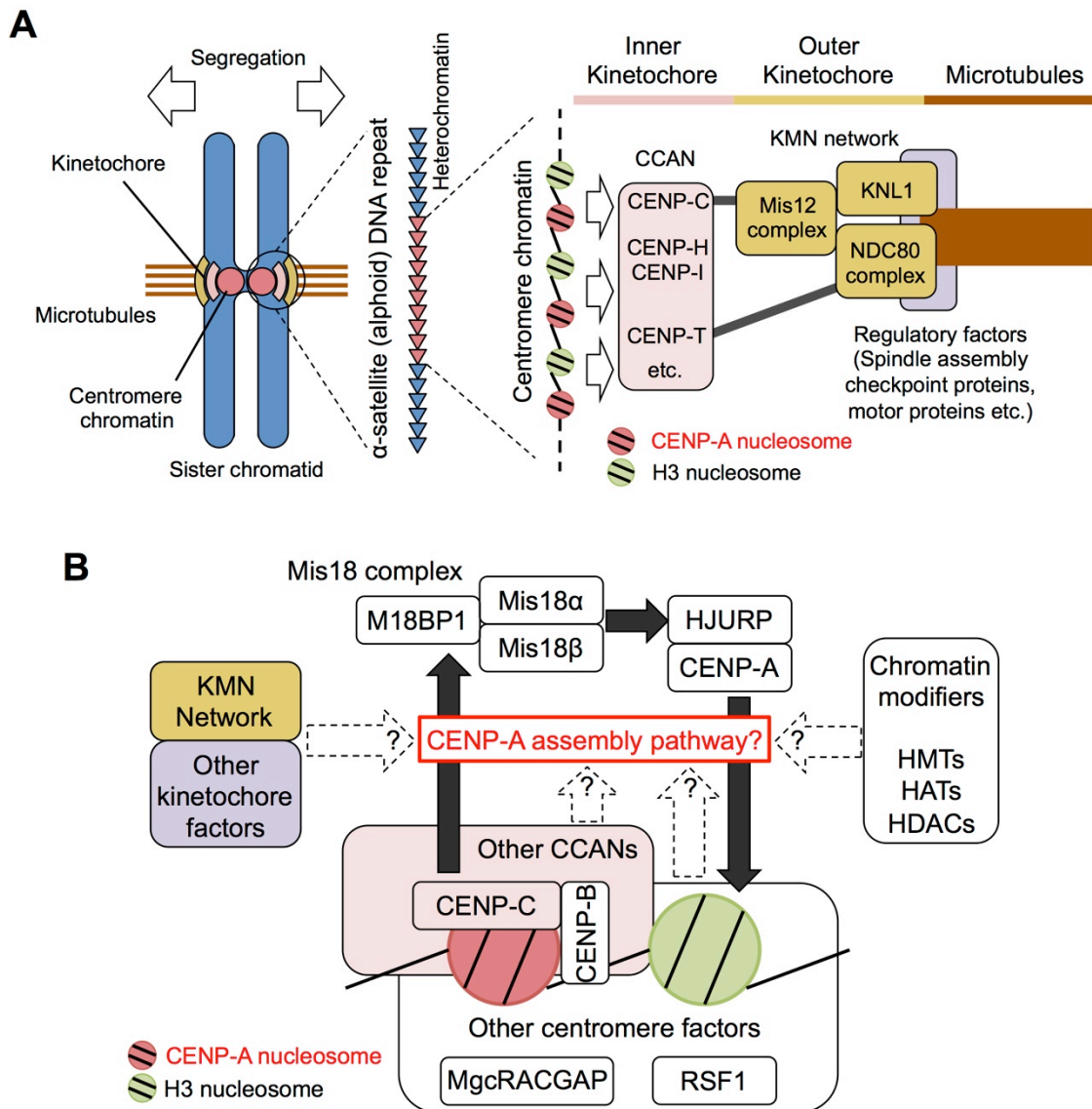


Figure 1. セントロメア/キネトコア集合の概略と本研究の狙い

(A) セントロメアは α -satellite (aphoid) DNA リピート上に形成される。CENP-A ヌクレオソームを含む CENP-A クロマチンには細胞周期を通して CCAN が集合し、インナーキネトコアを形成する。分裂期には KMN network を中心としたアウターキネトコアが集合して微小管と結合し、正確な染色体分配を行う。(B) CENP-A 集合経路の概略と本研究の狙い。これまでに CENP-A 集合に関ることが報告されている因子以外にも多数の因子がセントロメア/キネトコアに存在する。また、数種のクロマチン修飾も CENP-A 集合に影響することが知られている。実際にそれらの因子が CENP-A 集合に寄与するかどうか、さらにはどのような機序で作用するかを調べることでセントロメアクロマチンの形成・維持機構を解明する。

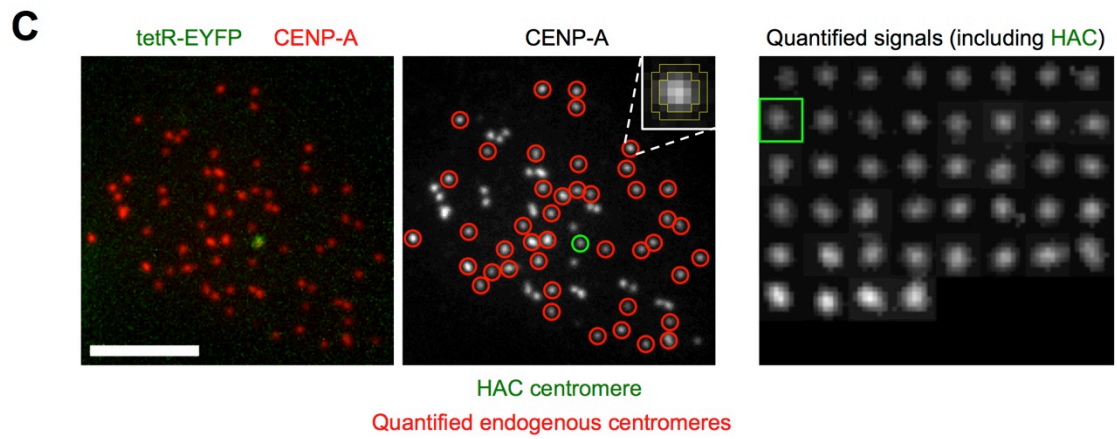
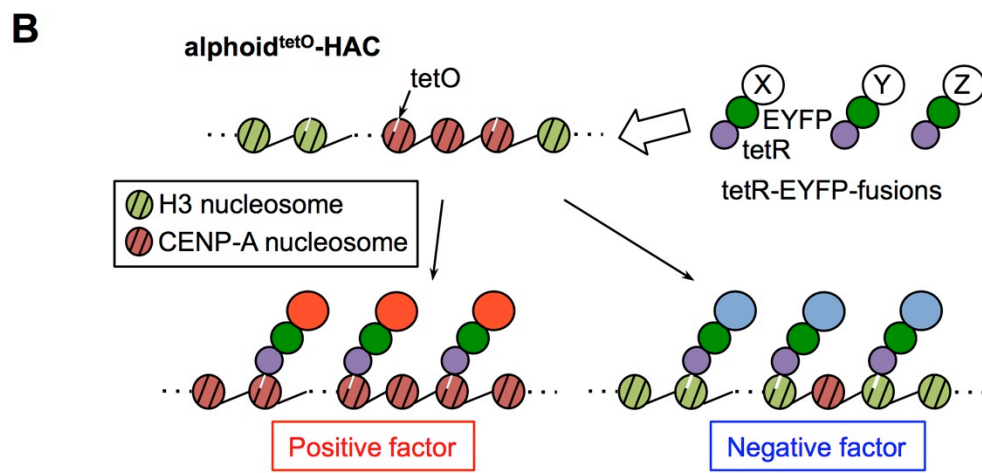
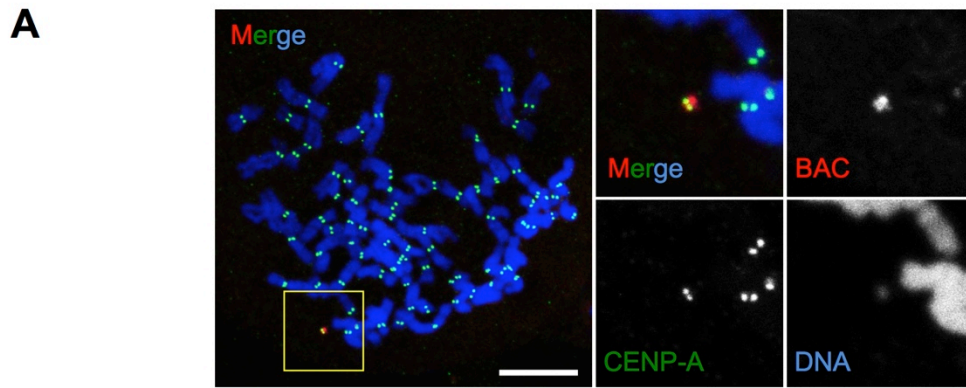


Figure 2. HAC 上でのテザリングシステムを用いた CENP-A 集合定量アッセイ

(A) $\text{alphoid}^{\text{tet}0}$ -HAC を保持する HeLa 細胞 (HeLa-HAC-2-4) の代表的な画像。分裂期の細胞をカバーガラス上にスプレッドし、DAPI (青)、抗 CENP-A 抗体 (緑) および BAC DNA プローブ (赤) (Ohzeki et al., 2012) で染色した。黄色い線で囲まれた部位の拡大画像が右側に示されている。バーのサイズは $10\mu\text{m}$ を表す。(B) $\text{alphoid}^{\text{tet}0}$ -HAC 上での tetR 融合タンパク質/ $\text{alphoid}^{\text{tet}0}$ テザリングシステムの概要。(C) HAC 上の CENP-A シグナルの定量法。tetR-EYFP をトランスフェクションした HeLa-HAC-2-4 細胞の代表的な画像を示す。バーのサイズは $5\mu\text{m}$ を表す。HAC 上の CENP-A シグナルは EYFP シグナルによって特定される (緑の円)。そして、定量に適した宿主セントロメア (近すぎる、大きすぎる、あるいは小さすぎるシグナルを除去) を選び出し (赤い円)、それぞれの直径 5 ピクセル以内の CENP-A シグナルを、周辺ピクセルのバックグラウンドを差し引いて算出した (中央の画像の右上にある拡大画像)。HAC 上の CENP-A シグナルは宿主セントロメアの平均のシグナルで割り、標準化した。HAC を含め、定量されたシグナルを強度順に右側のパネルに示す。緑の四角は HAC のセントロメアを示す。

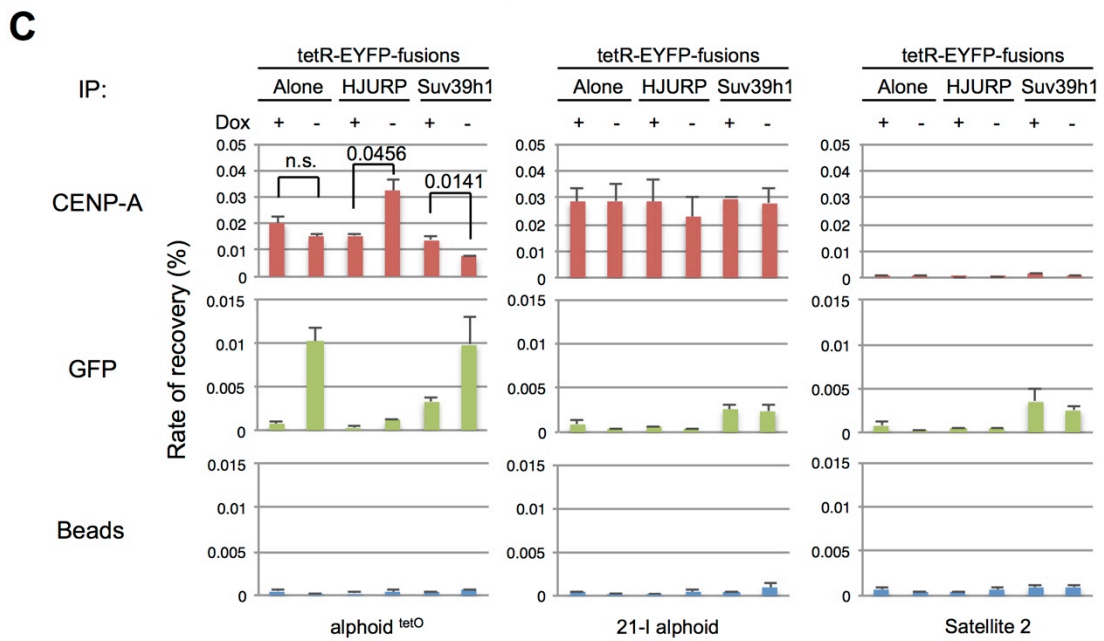
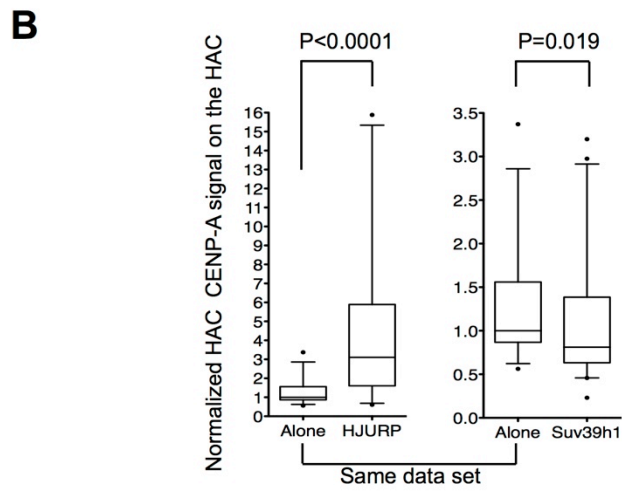
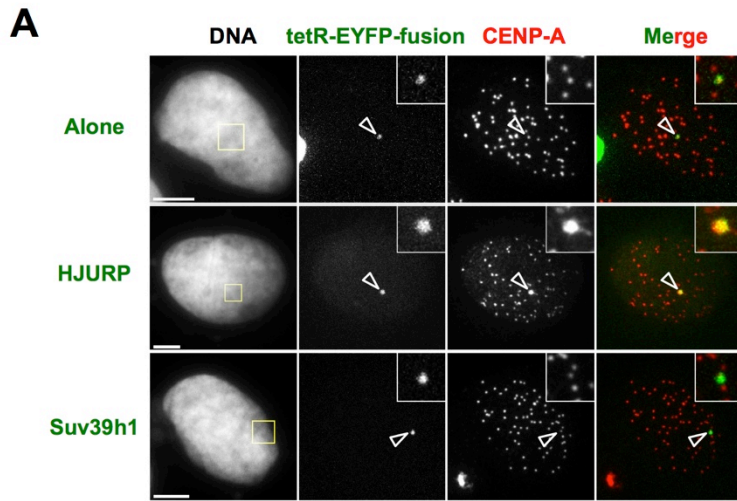


Figure 3. HAC へのテザリングと定量アッセイにより CENP-A 集合に対する正の制御と負の制御を評価できる

(A) tetR-EYFP のみ (Alone)、tetR-EYFP-HJURP、tetR-EYFP-Suv39h1 (緑) をトランスフェクションした HeLa-HAC-2-4 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 48 時間後に DAPI および抗 CENP-A 抗体 (赤) で染色した。矢頭は HAC を示す。バーのサイズは 5 μ m を表す。(B) HAC 上の CENP-A シグナルをトランスフェクション 48 時間後に定量した。コントロール (Alone) の中央値に対する相対値を箱ひげ図 (箱は 25-75%、ひげは 5-95% の範囲を表す) で示している。P 値は Mann-Whitney 検定により求めた。(C) tetR-EYFP のみ (Alone)、tetR-EYFP-HJURP、tetR-EYFP-Suv39h1 を安定発現する HeLa-HAC-2-4 細胞をドキシサイクリン (Dox) 有無の条件下で 4 日間培養して回収した (Dox は tetO/tetR の結合を阻害する)。ChIP アッセイは抗 CENP-A 抗体、抗 GFP 抗体およびビーズのみで行った。回収された DNA の qPCR を示されたプライマーを用いて行った。エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す (N=3)。P 値は t 検定を用いて求めた (n. s. : 有意差無し)。

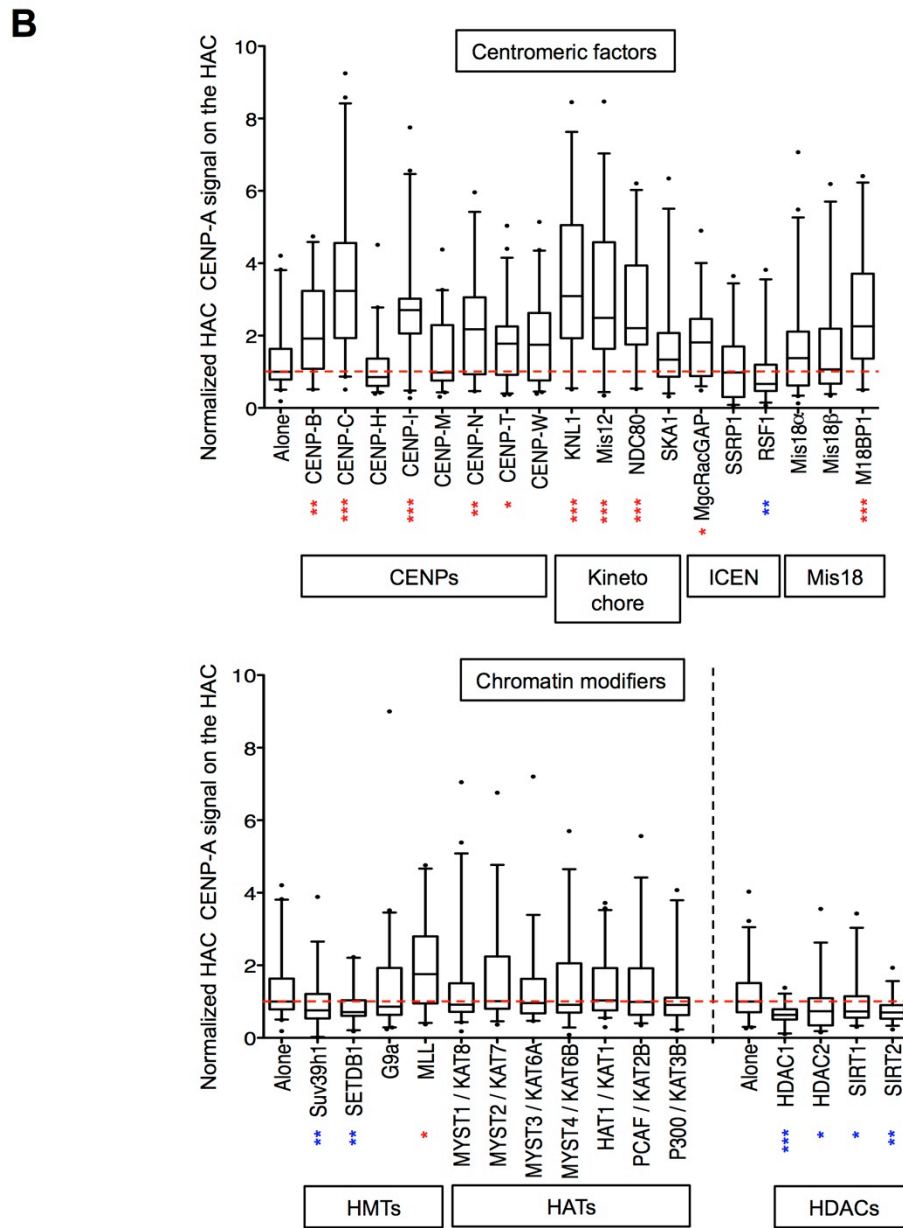
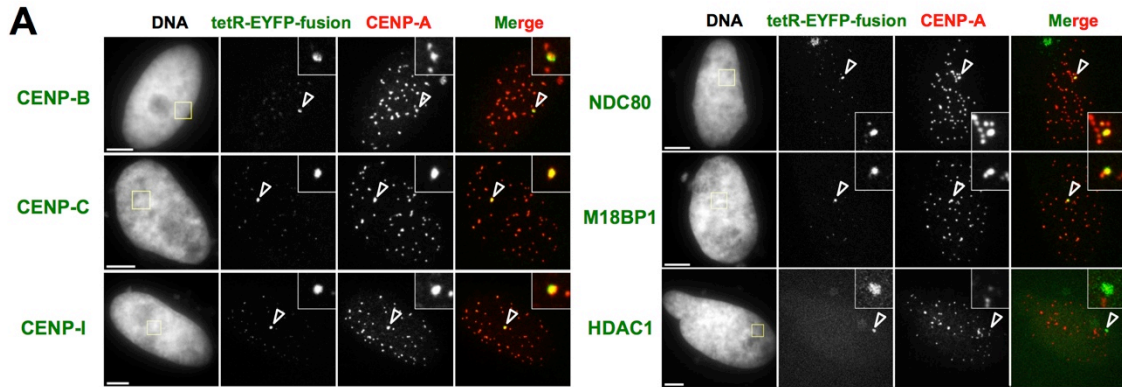
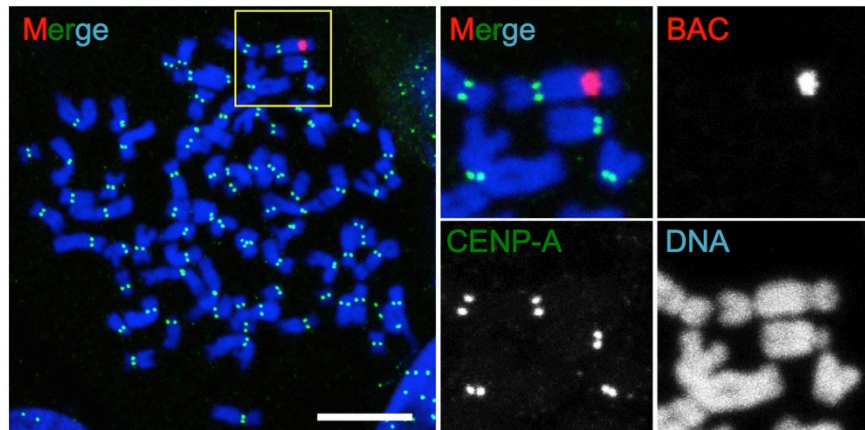


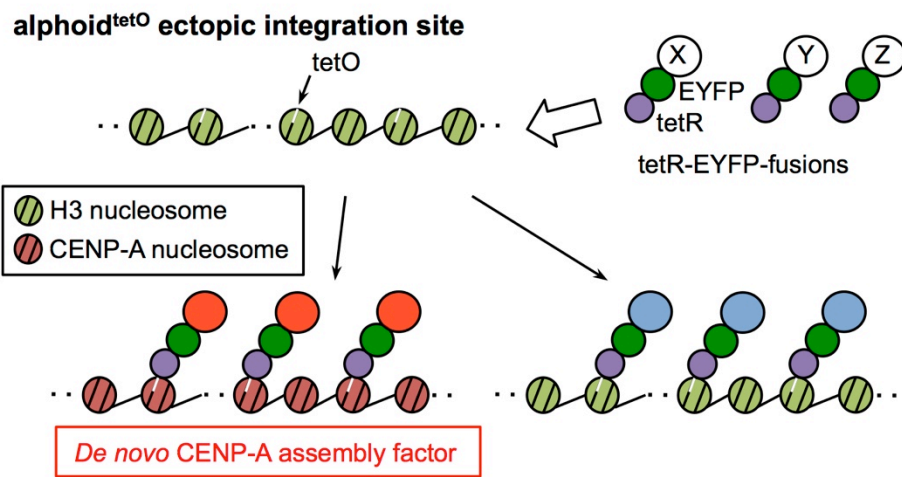
Figure 4. HAC セントロメア上の CENP-A 集合を正・負に制御する因子の同定

(A)示された tetR-EYFP 融合タンパク質 (緑) をトランスフェクションした HeLa-HAC-2-4 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 48 時間後に DAPI および抗 CENP-A 抗体 (赤) で染色した。矢頭は HAC を示す。バーのサイズは 5 μ m を表す。(B)HAC 上の CENP-A シグナルをトランスフェクション 48 時間後に定量した。コントロール (Alone) の中央値に対する相対値を箱ひげ図 (箱は 25-75%、ひげは 5-95%の範囲を表す) で示している。アスタリスクはコントロール (Alone) に対する有意差 (赤 : 増加 青 : 減少) を表す。*: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001 (Mann-Whitney 検定) (n=23-49 細胞)。

A



B



C

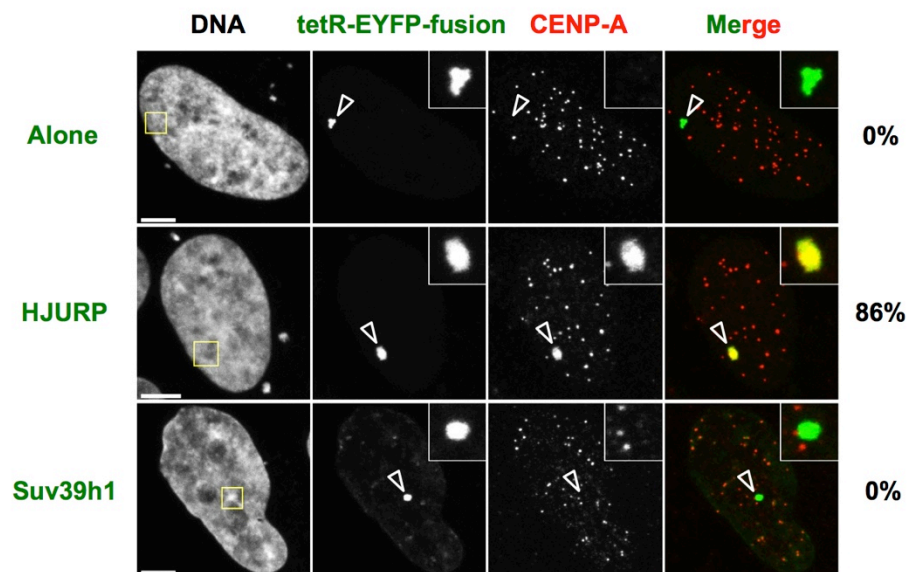
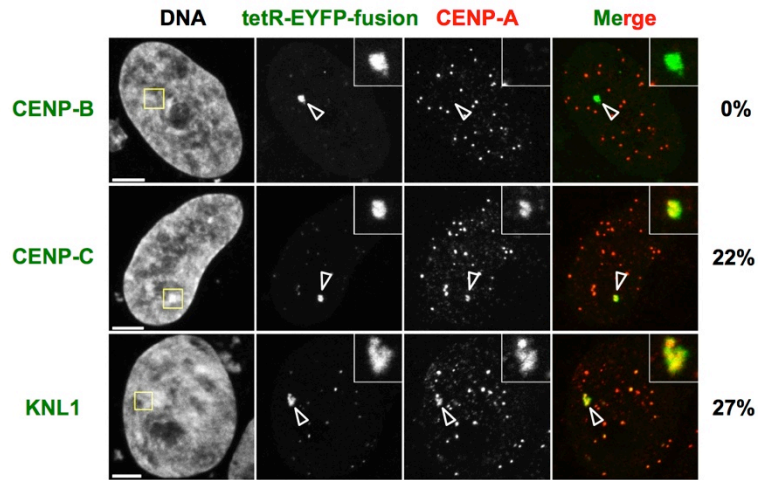


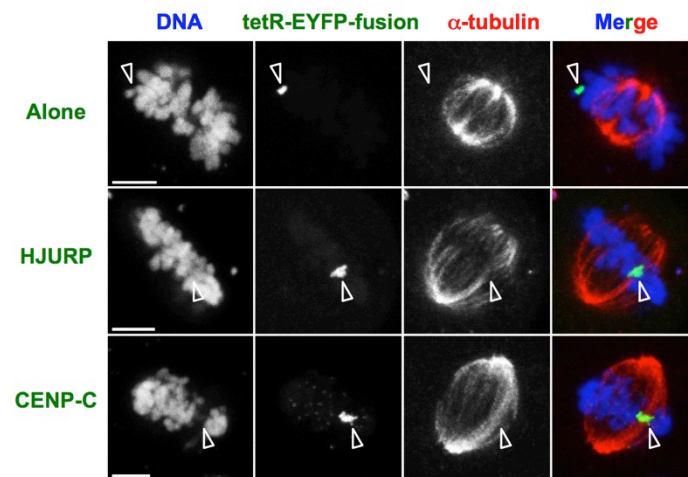
Figure 5. 異所的 $\text{alphoid}^{\text{tet0}}$ 挿入部位上でのテザリングシステムを用いた新規 CENP-A 集合アッセイ

(A) 異所的 $\text{alphoid}^{\text{tet0}}$ 挿入部位を保持する HeLa 細胞 (HeLa-Int-03) の代表的な画像。分裂期の細胞をカバーガラス上にスプレッドし、DAPI (青)、抗 CENP-A 抗体 (緑) および BAC DNA プローブ (赤) (Ohzeki et al., 2012) で染色した。黄色い線で囲まれた部位の拡大画像が右側に示されている。バーのサイズは $10\mu\text{m}$ を表す。(B) 異所的 $\text{alphoid}^{\text{tet0}}$ 挿入部位上での tetR 融合タンパク質/ $\text{alphoid}^{\text{tet0}}$ テザリングシステムの概要。(C) 示された tetR-EYFP 融合タンパク質 (緑) をトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 48 時間後に DAPI および抗 CENP-A 抗体 (赤) で染色した。異所的部位上 (矢頭) の新規 CENP-A 集合の頻度を画像の右側に示した。バーのサイズは $5\mu\text{m}$ を表す。

A



B



C

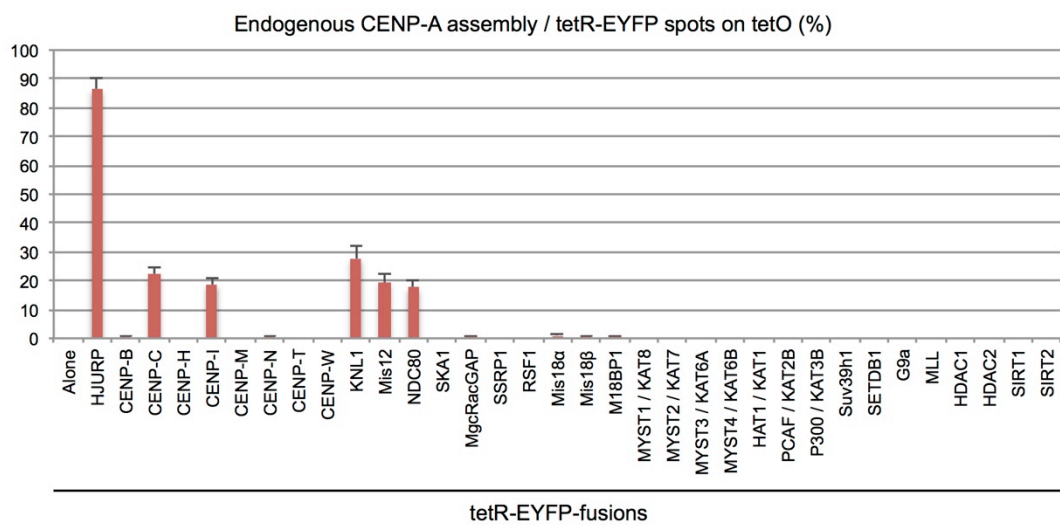


Figure 6. 新規 CENP-A 集合を引き起こす因子の同定

(A) 示された tetR-EYFP 融合タンパク質 (緑) をトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 48 時間後に DAPI および抗 CENP-A 抗体 (赤) で染色した。異所的部位上 (矢頭) の新規 CENP-A 集合の頻度を画像の右側に示した。バーのサイズは $5\mu\text{m}$ を表す。(B) tetR-EYFP-Alone、tetR-EYFP-CENP-C、tetR-EYFP-HJURP (緑) をトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 48 時間後に DAPI および抗 α -tubulin 抗体 (赤) で染色した。矢頭は異所的部位を示す。バーのサイズは $5\mu\text{m}$ を表す。(C) トランスフェクション 48 時間後における異所的部位上の新規 CENP-A 集合の頻度。tetR-EYFP スポット上の CENP-A シグナルを各サンプルでカウントした (n=100 細胞)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。

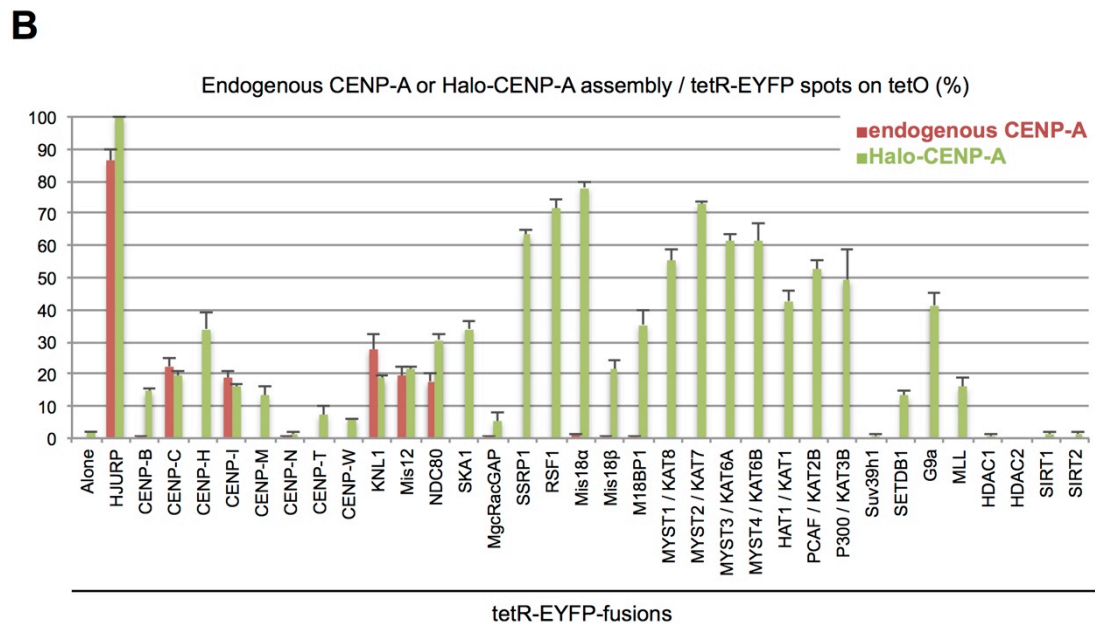
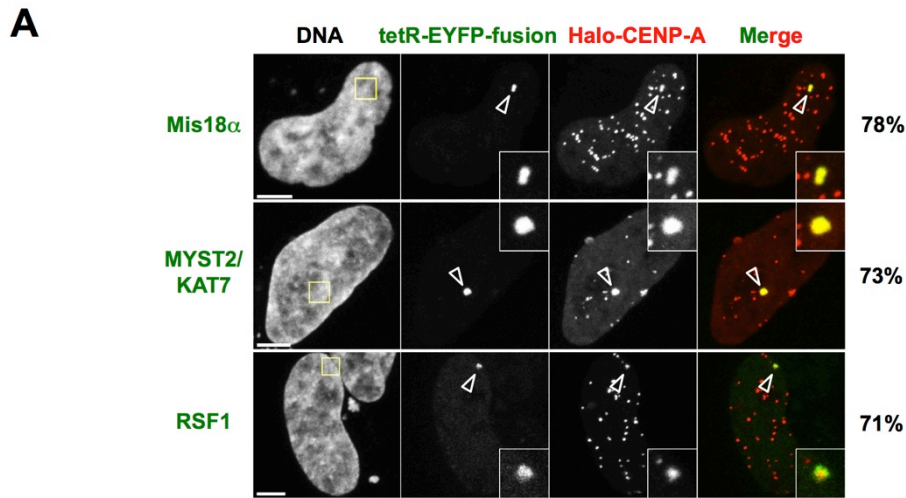
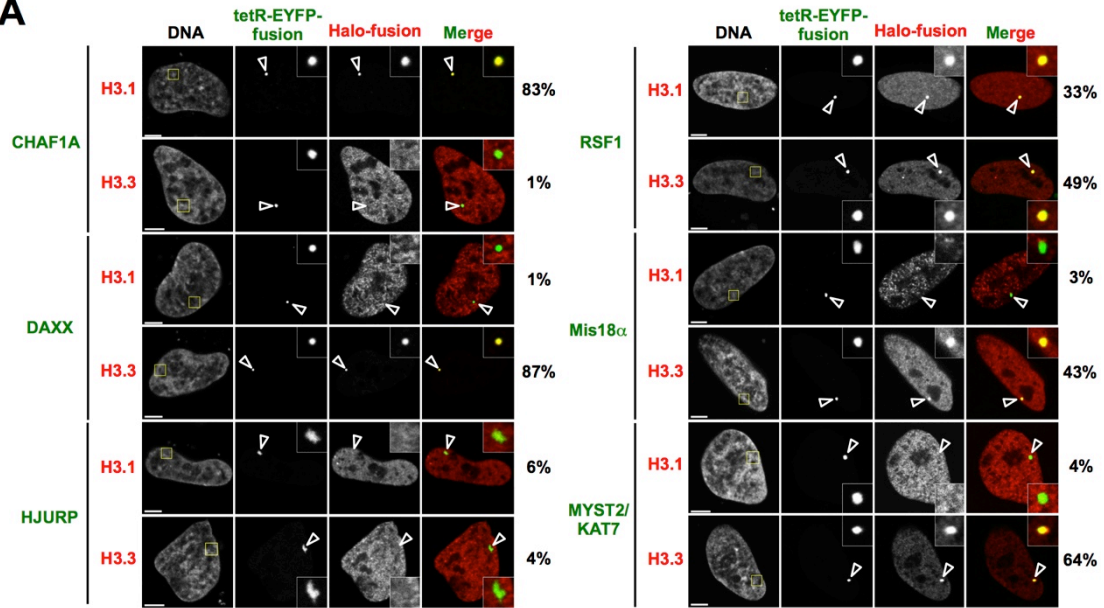


Figure 7. Halo-CENP-A 発現アシストにより新規 CENP-A 集合を引き起こす因子の同定
 (A)示された tetR-EYFP 融合タンパク質 (緑) と Halo-CENP-A (赤) をコトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 48 時間後に DAPI および Halo-tag TMR ligand (赤) で染色した。異所的部位上 (矢頭) の新規 CENP-A 集合の頻度を画像の右側に示した。バーのサイズは 5 μ m を表す。(B)トランスフェクション 48 または 24 時間後における異所的部位上の内在性 CENP-A(Figure 6C と同一)または Halo-CENP-A 集合の頻度。tetR-EYFP スポット上の CENP-A または Halo-CENP-A シグナルを各サンプルでカウントした (n=100 細胞(内在性 CENP-A)または 50 細胞 (Halo-CENP-A))。エラーバーは SEM を表す (N=3)。

A



B

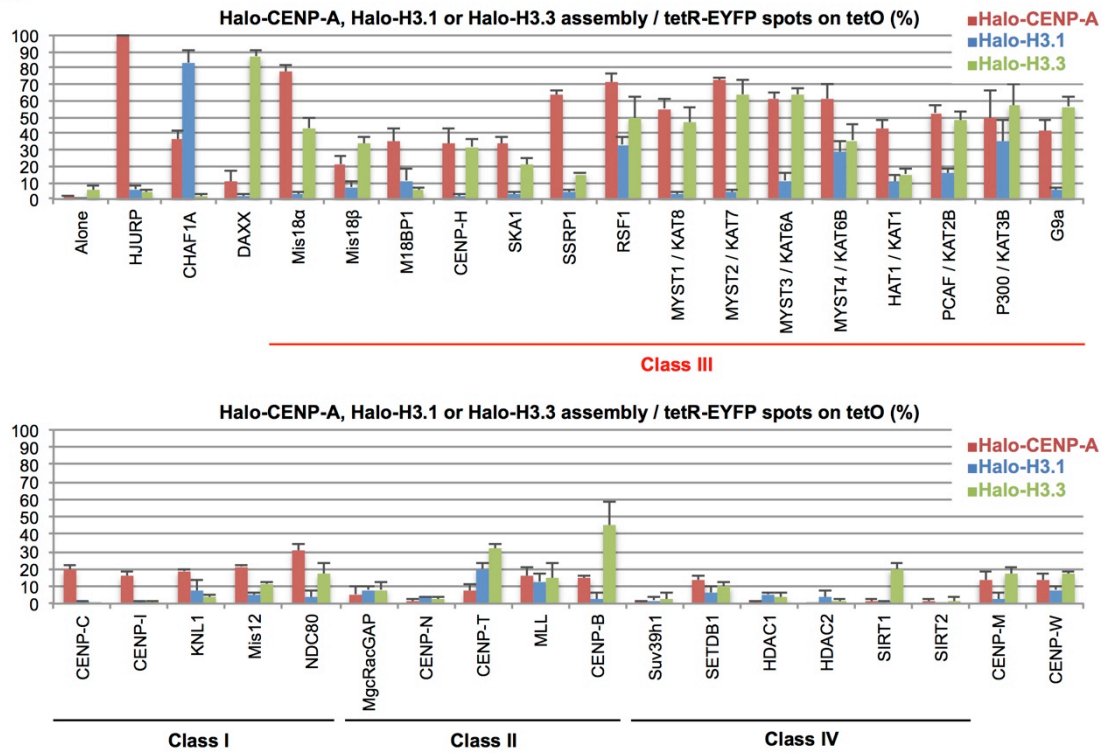


Figure 8. 異所的部位上に Halo-H3.1、Halo-H3.3 集合を引き起こす因子の同定

(A)示された tetR-EYFP 融合タンパク質 (緑) と Halo-H3.1 または Halo-H3.3 (赤) をコトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 48 時間後に DAPI および Halo-tag TMR ligand (赤) で染色した。異所的部位上 (矢頭) の Halo-H3.1 または Halo-H3.3 集合の頻度を画像の右側に示した。バーのサイズは 5 μ m を表す。(B) トランスフェクション 24 時間後における異所的部位上の Halo-CENP-A (Figure 7B と同一)、Halo-H3.1、Halo-H3.3 集合の頻度。グラフの下に示された各因子のクラス分けについては Figure 9 に示してある。tetR-EYFP スポット上の Halo-CENP-A、Halo-H3.1、Halo-H3.3 シグナルを各サンプルでカウントした (n=50 細胞)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。

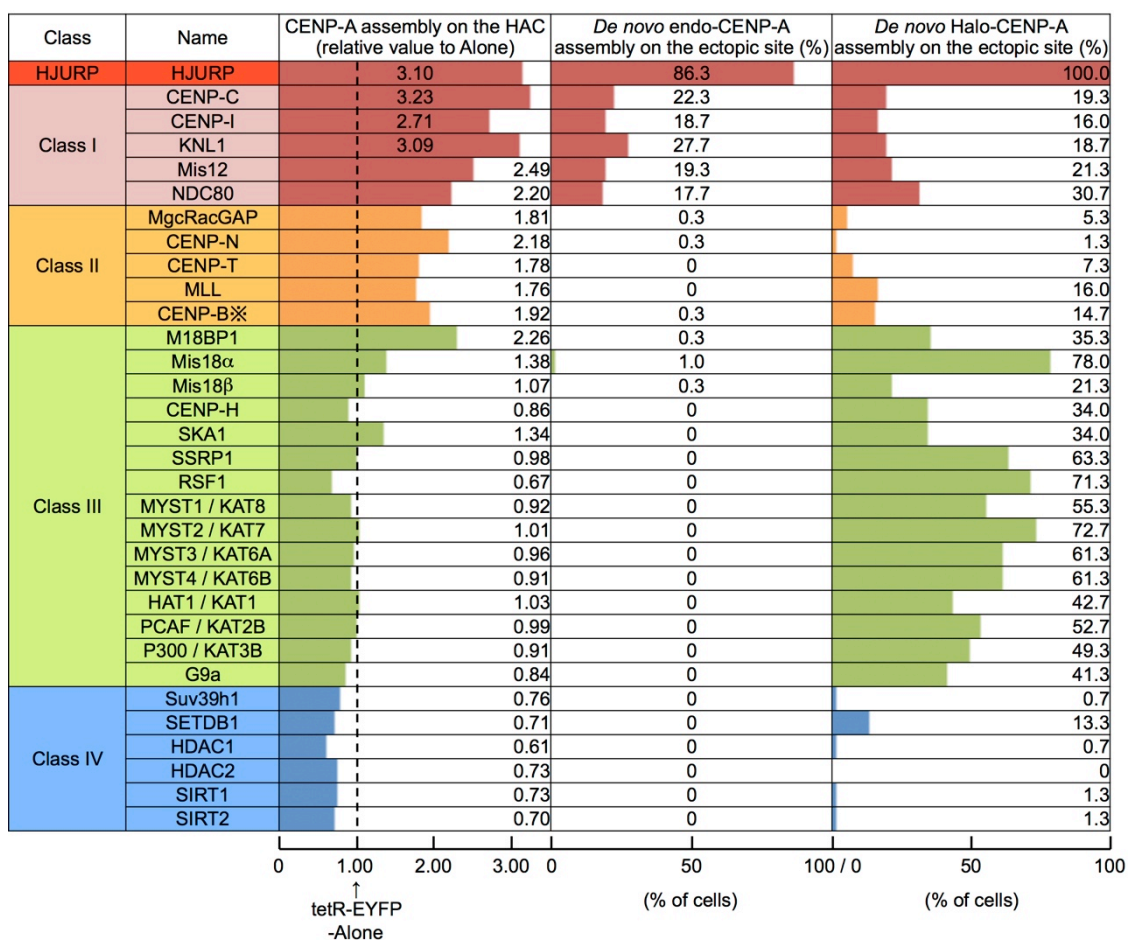
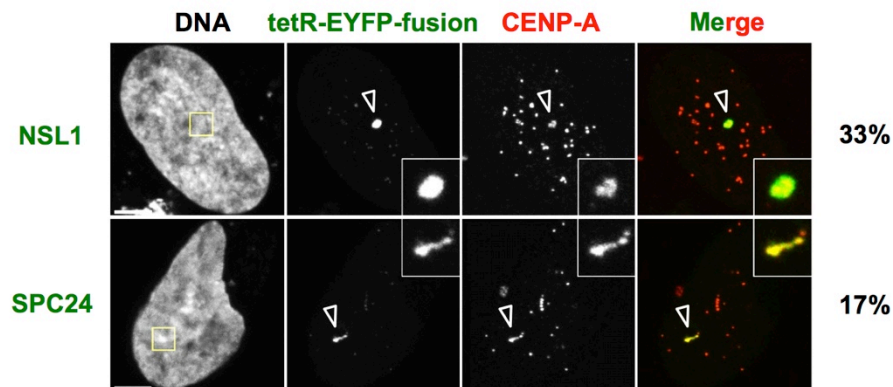
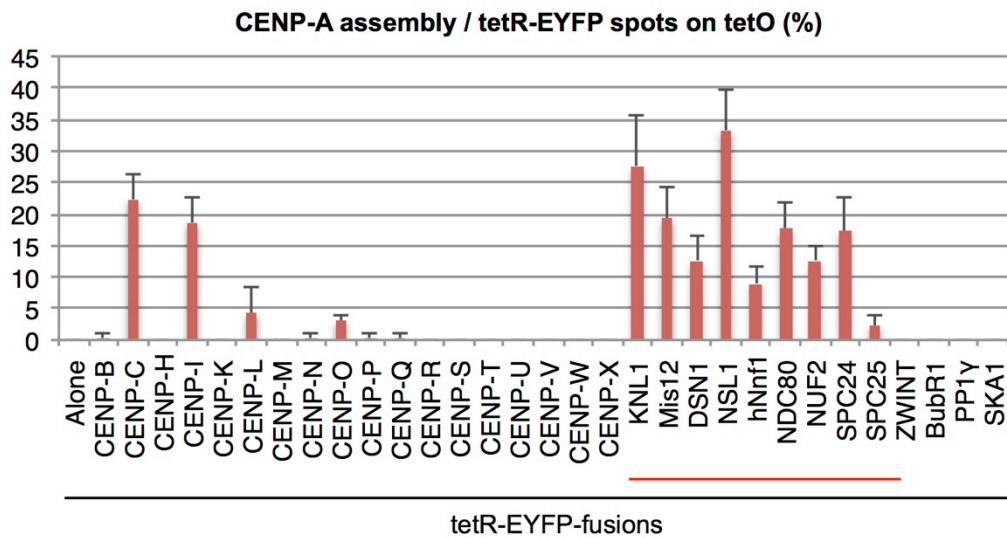


Figure 9. 解析した因子のクラス分け

一列目の数値はコントロール (tetR-EYFP-Alone) に対する HAC セントロメア上の CENP-A シグナルの中央値の比を示している (Figure 4B)。二列目または三列目の数値は異所的部位上での内在性 CENP-A または Halo-CENP-A 集合の頻度を示している (Figure 7B)。なお、HAC および異所的部位上には CENP-B の認識配列である CENP-B box があるため、内在性の CENP-B も結合している (※) (Ohzeki et al., 2012; (Ohzeki et al., 2002)。

A**B****Figure 10. キネトコア構造因子は新規 CENP-A 集合を引き起こす**

(A) tetR-EYFP-NSL1 または tetR-EYFP-SPC24 (緑) をトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 48 時間後に DAPI および抗 CENP-A 抗体 (赤) で染色した。異所的部位上 (矢頭) の新規 CENP-A 集合の頻度を画像の右側に示した。バーのサイズは 5 μ m を表す。(B) 異所的部位上の新規 CENP-A 集合の頻度。tetR-EYFP スポット上の CENP-A シグナルをトランスフェクション 48 時間後に固定された各サンプルにおいてカウントした (n=100 細胞)。赤線は KMN network 因子を示す。Figure 5C のデータも比較のために含めている。エラーバーは SEM を表す (N=3)。

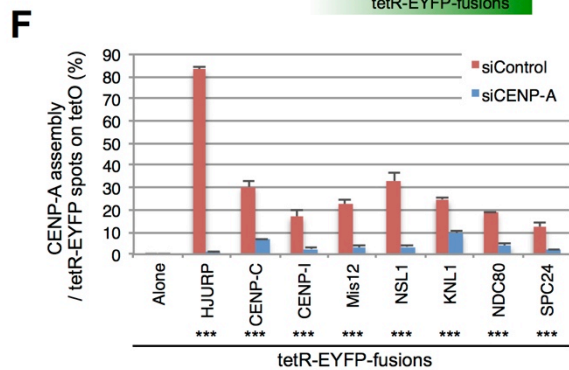
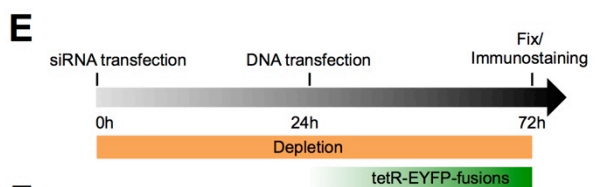
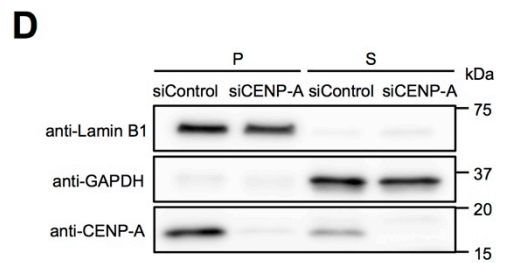
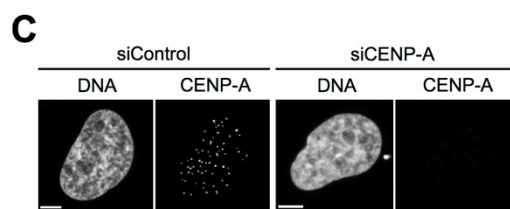
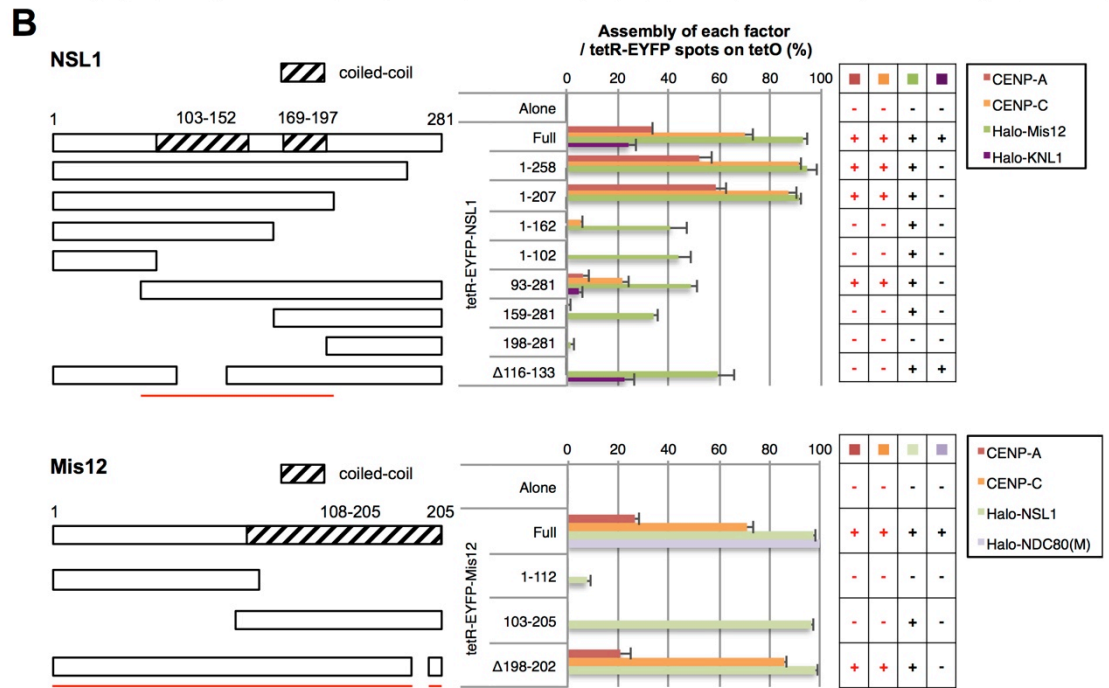
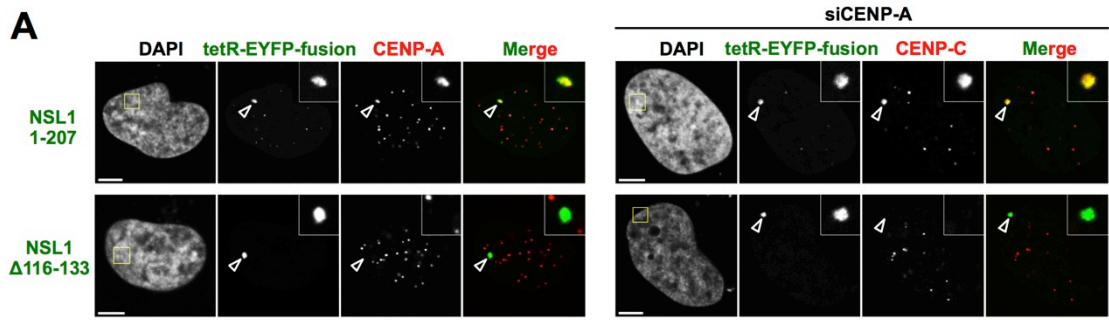
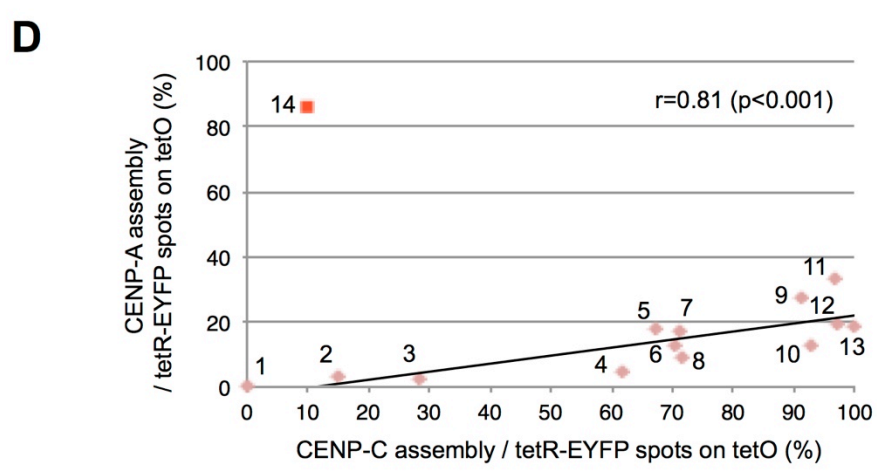
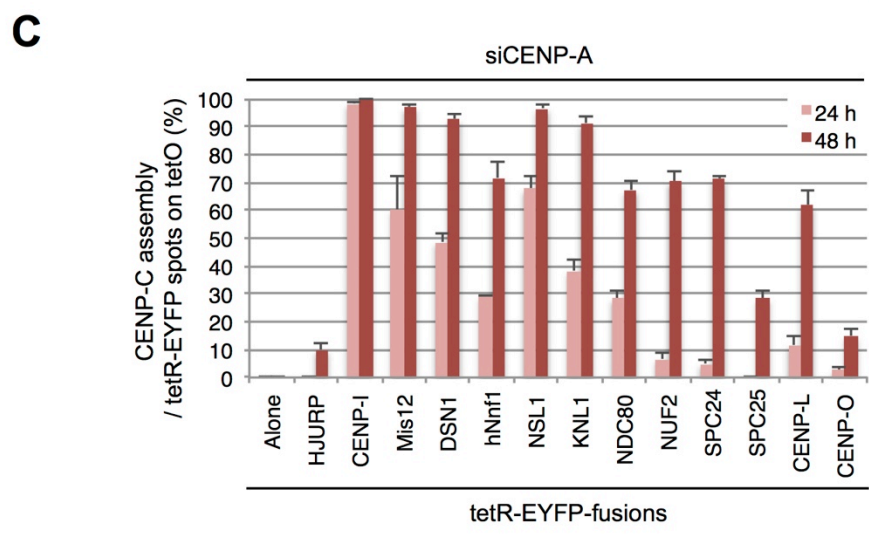
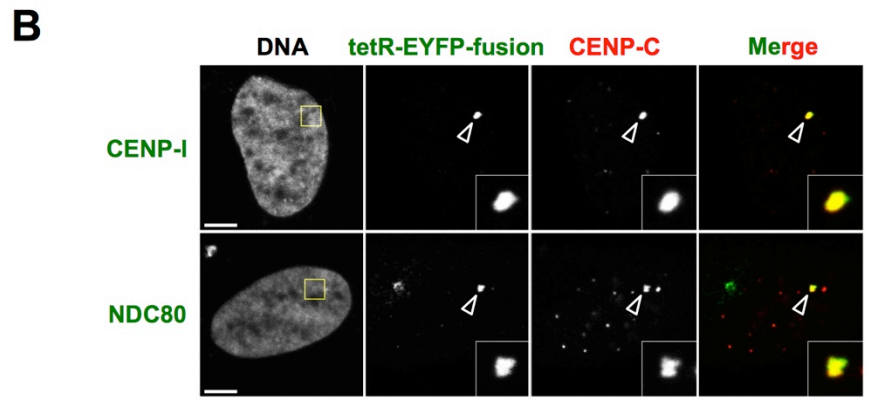
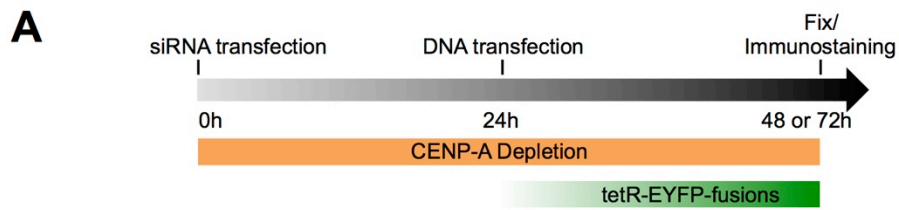


Figure 11. 新規 CENP-A 集合は CENP-C リクルートと関係がある

(A) 示された tetR-EYFP-NSL1 欠失変異体 (緑) をトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 48 または 24 時間後に DAPI および抗 CENP-A 抗体または抗 CENP-C 抗体 (赤) で染色した。CENP-C 集合はプラスミドトランスフェクションの前に siCENP-A のトランスフェクションによるノックダウンを行った条件下で観察した。矢頭は異所的部位を示す。バーのサイズは 5 μ m を表す。(B) 異所的部位上の新規 CENP-A、CENP-C および各 Halo 融合タンパク質の集合。テザリングした欠失変異体は左側に示されている。比較的高いコイルドコイルスコア (COILS: http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html を用いて計算した) を示したドメインを斜線で示した。赤線は新規 CENP-A 集合に必要な領域を示す。CENP-A の観察を除いて、プラスミドトランスフェクションの前に siCENP-A トランスフェクションを行っている。tetR-EYFP スポット上の CENP-A、CENP-C および Halo 融合タンパク質のシグナルをトランスフェクション 48 時間後 (CENP-A) または 24 時間後 (CENP-C および Halo 融合タンパク質) に固定した各サンプルにおいてカウントした (CENP-A、CENP-C: n=100 細胞 各 Halo 融合タンパク質: n=50 細胞、ただし、Halo-NDC80 は間期の細胞ではほとんど観察されないため、分裂期の 5 細胞をカウントした)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。(補足: In vitro 再構成を用いた以前の報告では NSL1 の C 末が KNL1 と相互作用することが示され、一方で、NSL1 の C 末欠損変異体は他の Mis12 構成因子とともに Mis12 複合体を再構成できることが報告されている (Petrovic et al., 2010)。同様に、この in vivo 実験においても、NSL1 の C 末欠失変異体 (1-207 aa など) は KNL1 をリクルートせず Mis12 をリクルートした。加えて、これらの Mis12 との相互作用ドメインを含んだ C 末欠損変異体が KNL1 なしで CENP-C および CENP-A をリクルートできることが、この実験により示された。)(C) 示された siRNA をトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な写真。細胞をトランスフェクション 72 時間後に DAPI および抗 CENP-A 抗体で染色した。バーのサイズは 5 μ m を表す。(D) 染色体画分 (P) と可溶性画分 (S) の CENP-A 量をウェスタンブロッティングにより、抗 Lamin B1 (P のローディングコントロール)、抗 GAPDH (S のローディングコントロール) および抗 CENP-A 抗体を用いて解析した。siRNA トランスフェクション 72 時間後に細胞を回収して分画を行った。(E) 実験 F のタイムテーブル。HeLa-Int-03 に、始めに siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に tetR-EYFP 融合タンパク質発現ベクターをトランスフェクションした。細胞を固定後、DAPI および抗 CENP-A 抗体で染色した。(F) 各 siRNA トランスフェクション後の異所的部位上の新規 CENP-A 集合の頻度。tetR-EYFP スポット上の CENP-A シグナルをプラスミドトランスフェクション 48 時間後に固定した各サンプルでカウントした (n=100 細胞)。アスタリスクは示された siRNA 間での有意差を表す。***: P<0.001 (Fisher の正確検定)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Alone	CENP-O	SPC25	CENP-L	NDC80	NUF2	SPC24	hNnf1	KNL1	DSN1	NSL1	Mis12	CENP-I	HJURP

Figure 12. クラス I 因子は CENP-C をリクルートし、その活性は新規 CENP-A 集合活性と強く相関する

(A) 実験 (B) と (C) のタイムテーブル。HeLa-Int-03 に、始めに siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に tetR-EYFP 融合タンパク質発現ベクターをトランスフェクションした。細胞を固定後、DAPI および抗 CENP-C 抗体で染色した。(B) 示された tetR-EYFP 融合タンパク質 (緑) をトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をプラスミドトランスフェクション 48 時間後に DAPI および抗 CENP-C 抗体 (赤) で染色した。矢頭は異所的部位を示す。バーのサイズは 5 μ m を表す。(C) 異所的部位上の CENP-C 集合の頻度。tetR-EYFP スポット上の CENP-A シグナルをプラスミドトランスフェクション 24 または 48 時間後に固定された各サンプルにおいてカウントした (n=100 細胞)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。(D) 新規 CENP-A 集合 (Figure 10B) と CENP-C 集合 (Figure 12C; 48h) の相関関係。グラフ中の数字に対応する tetR-EYFP 融合タンパク質をグラフの下に示した。相関係数 (r) と P 値は tetR-EYFP-HJURP を除いて計算し、グラフ中に示した。

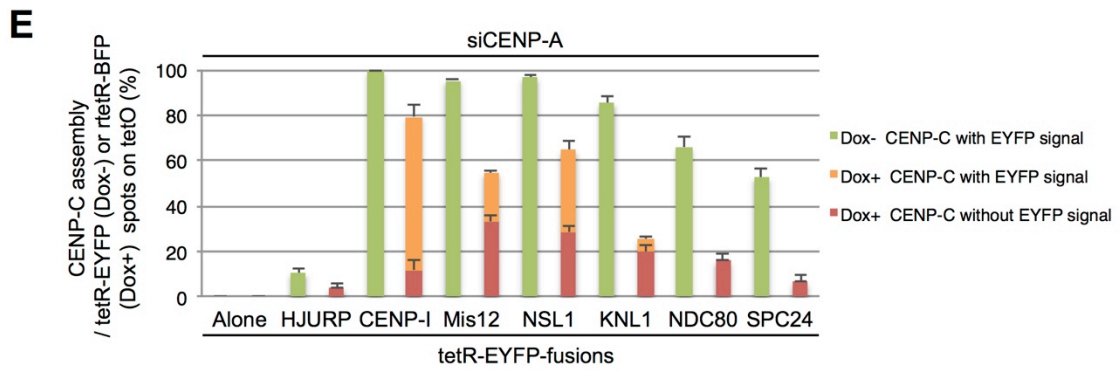
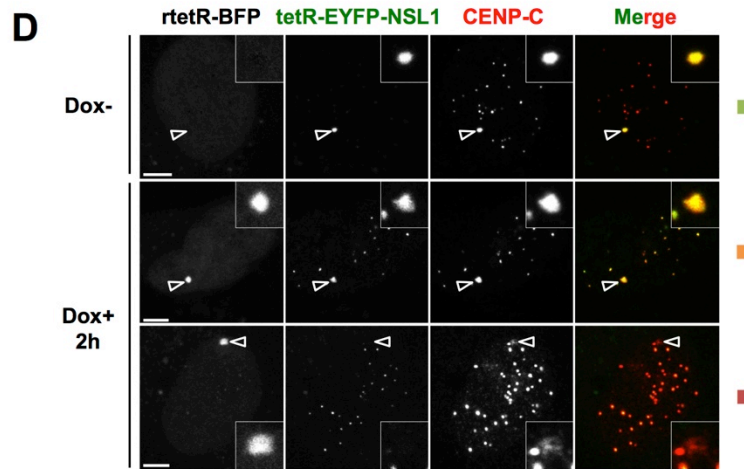
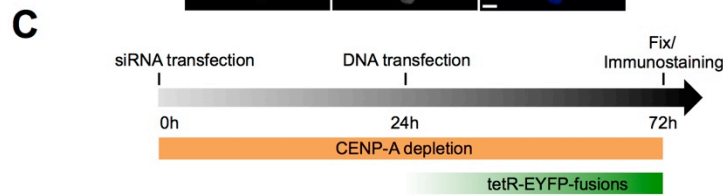
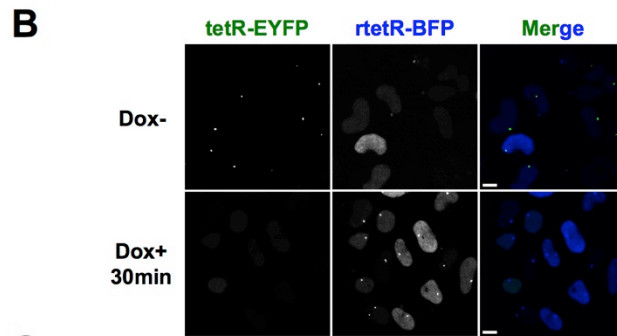
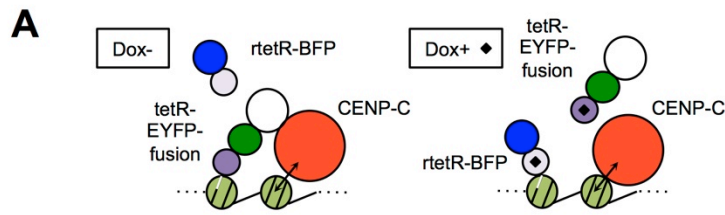


Figure 13. CENP-C は CENP-A 非存在下でクロマチンへの結合を保持できる

(A)クロマチンに結合した CENP-C の検出の概略。ドキシサイクリン (Dox) による tetR-EYFP 融合タンパク質の解離後、CENP-C のクロマチン結合が保持されるかどうかを調べる。revers tetR (rtetR) は通常の tetR と異なり、Dox 処理により tet0 に結合する。(B)tetR-EYFP(緑)と rtetR-BFP(青)をコトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な写真。細胞はトランスフェクション 48 時間後の固定の 30 分前より Dox の有無で処理された。tetR-EYFP は Dox 処理 30 分で解離する。バーのサイズは 10 μ m を表す。(C)実験(D)と(E)のタイムテーブル。(D)siCENP-A トランスフェクション後に tetR-EYFP-NSL1 (緑) と rtetR-BFP (青) をコトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をプラスミドトランスフェクション 48 時間後に DAPI および抗 CENP-C 抗体 (赤) で染色した。細胞は固定の 2 時間前に Dox の有無で処理した。矢頭は異所的部位を示す。画像の右側に示した色分けは (E) のグラフに対応する。バーのサイズは 5 μ m を表す。(E)異所的部位上の CENP-C 集合の頻度。siCENP-A トランスフェクション後に、示された tetR-EYFP 融合タンパク質と rtetR-BFP をコトランスフェクションした。tetR-EYFP スポット上 (Dox-) または rtetR-BFP スポット上 (Dox+) の CENP-C シグナルをプラスミドトランスフェクション 48 時間後に固定された各サンプルにおいてカウントした (n=50 細胞)。Dox 存在下では、EYFP と CENP-C シグナル両方を示すものと CENP-C シグナルのみを示すものの 2 種類のスポットが存在した。エラーバーは SEM を表す (N=3)。

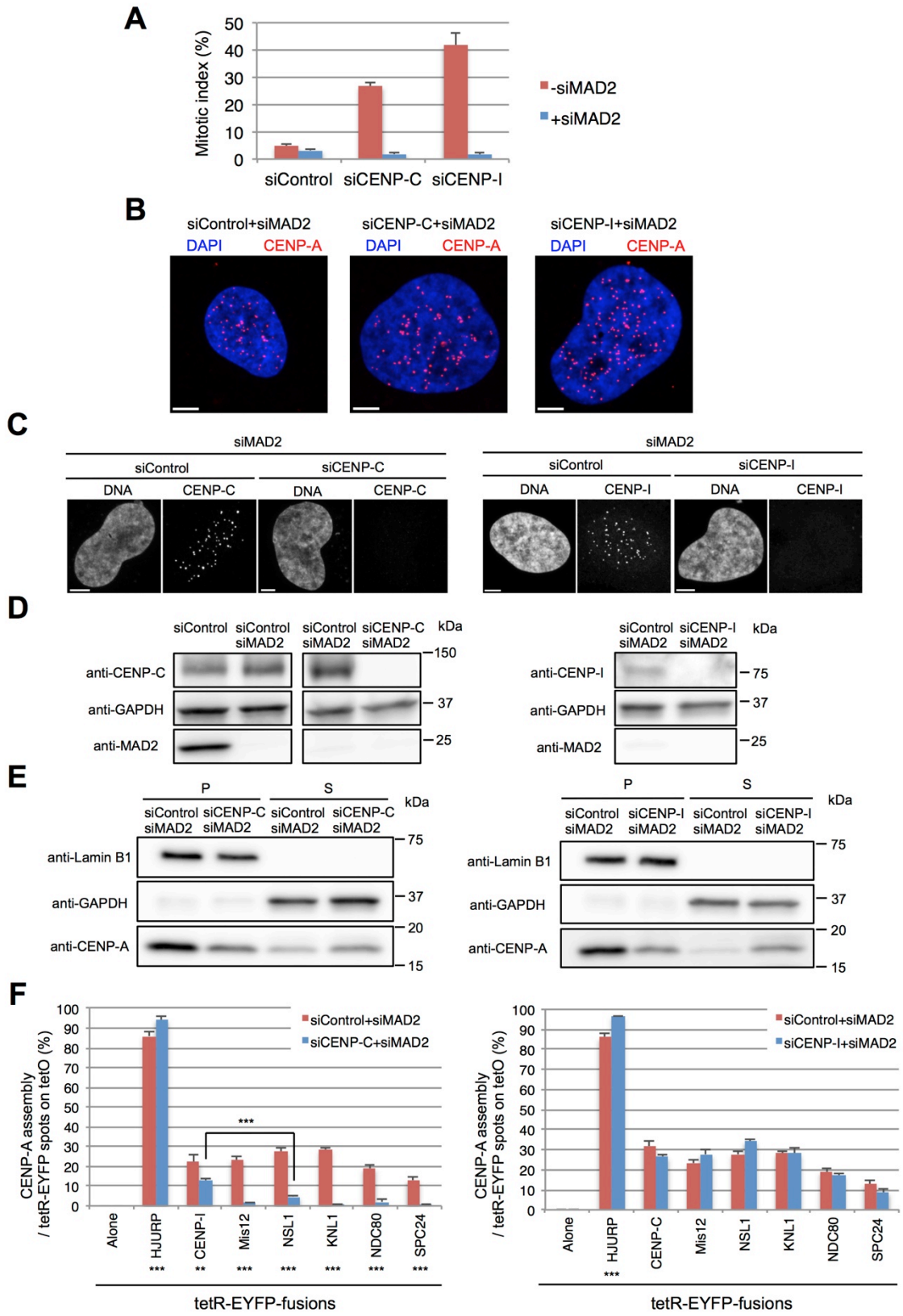


Figure 14. KMN network 因子による新規 CENP-A 集合は CENP-C を必要とするが、CENP-I は独立に新規 CENP-A 集合を引き起こせる。

(A)MAD2 ノックダウンは CENP-C および CENP-I ノックダウンによる分裂期アレストを抑制する。HeLa-Int-03 に、示された siRNA をトランスフェクションした。細胞はトランスフェクション 72 時間後に固定した。グラフは各サンプルでカウントされた分裂期の割合を示す (n=200 細胞)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。(B)siMAD2 と siControl、siCENP-C、siCENP-I をコトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 72 時間後に DAPI (青) および抗 CENP-A 抗体 (赤) で染色した。siMAD2 と siCENP-C または siCENP-I をコトランスフェクションした細胞ではアレストが解除されて、そのまま分裂期を通過したと予想される巨大な核が頻繁に観察された。バーのサイズは 5 μ m を表す。(C)示された siRNA をコトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 72 時間後に DAPI および抗 CENP-C または抗 CENP-I 抗体で染色した。バーのサイズは 5 μ m を表す。(D)MAD2、CENP-C および CENP-I の発現量をウェスタンブロッティングにより抗 GAPDH(ローディングコントロール)、抗 MAD2、抗 CENP-C および抗 CENP-I 抗体を用いて解析した。siRNA トランスフェクション 72 時間後に細胞を回収した。(E)染色体画分 (P) と可溶性画分 (S) の CENP-A 量をウェスタンブロッティングにより抗 Lamin B1(P のローディングコントロール)、抗 GAPDH(S のローディングコントロール)および抗 CENP-A 抗体を用いて解析した。siRNA トランスフェクション 72 時間後に細胞を回収して分画を行った。(F)各 siRNA トランスフェクション後の異所的部位上の新規 CENP-A 集合の頻度。示された tetR-EYFP 融合タンパク質は siRNA トランスフェクション後にトランスフェクションされた。tetR-EYFP スポット上の CENP-A シグナルをプラスミドトランスフェクション 48 時間後 (siRNA トランスフェクションの 72 時間後) に固定した各サンプルにおいてカウントした (n=100 細胞)。両グラフの siControl+siMAD2 のデータは同一である。アスタリスクは示された tetR-EYFP 融合タンパク質間あるいは siRNA 間での有意差を表す。**: P<0.01 ***: P<0.001 (Fisher の正確検定)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。

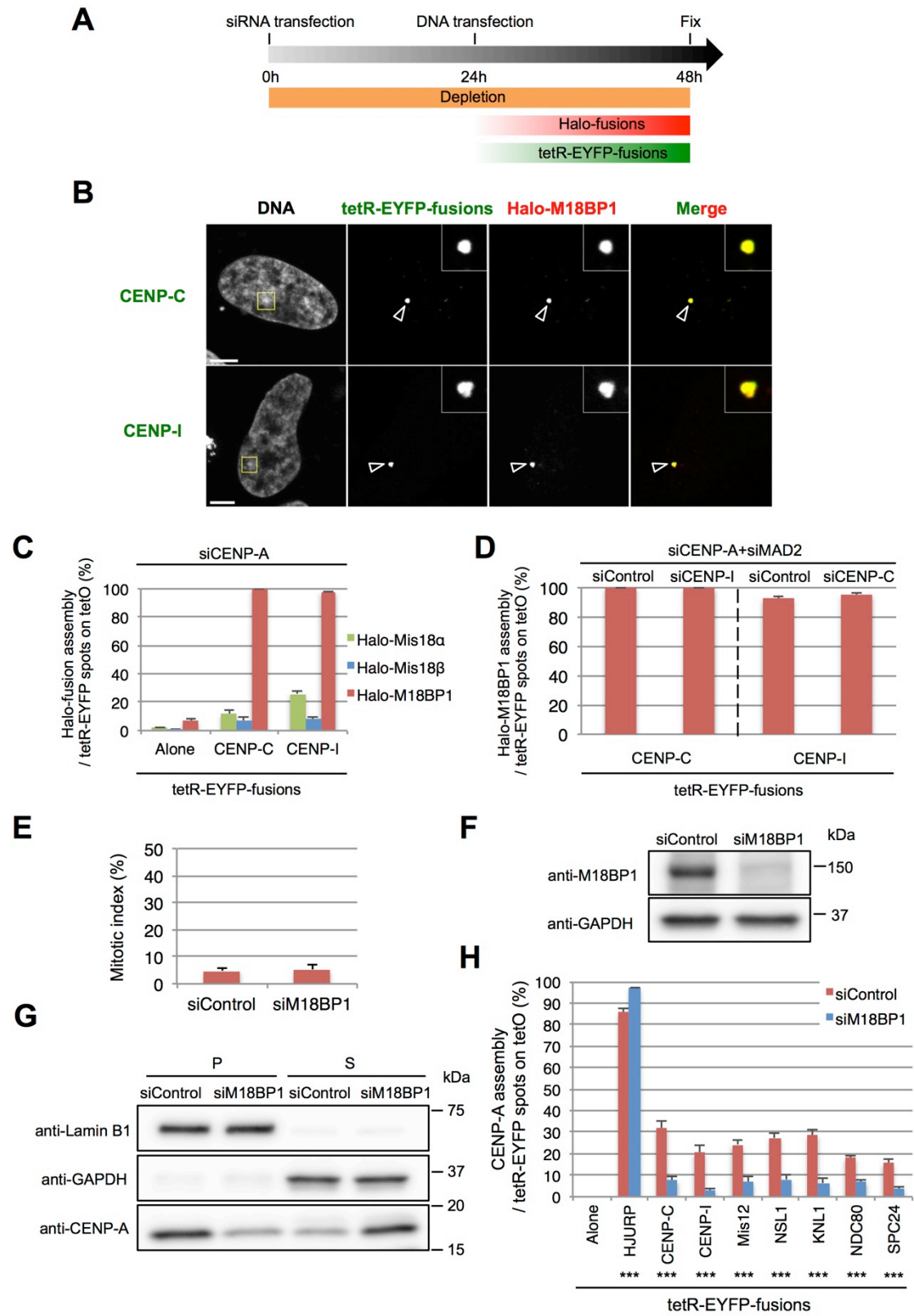


Figure 15. CENP-C と CENP-I は独立に M18BP1 をリクルートする

(A)実験(B)-(D)のタイムテーブル。HeLa-Int-03 に始めに siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に Halo 融合タンパク質および tetR-EYFP 融合タンパク質発現ベクターをコトランスフェクションした。(B) tetR-EYFP-CENP-C または CENP-I (緑) および Halo-M18BP1 (赤) をコトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をプラスミドトランスフェクション 24 時間後に DAPI および Halo-tag TMR Ligand (赤) で染色した。矢頭は異所的部位を示す。バーのサイズは 5 μ m を表す。(C) 異所的部位上の各 Halo 融合タンパク質集合の頻度。tetR-EYFP スポット上の Halo 融合タンパク質のシグナルをプラスミドトランスフェクション 24 時間後に固定した各サンプルにおいてカウントした (n=50)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。(D) 示された siRNA トランスフェクション条件下での異所的部位上の Halo-M18BP1 集合の頻度。tetR-EYFP スポット上の Halo 融合タンパク質のシグナルをプラスミドトランスフェクション 24 時間後に固定した各サンプルにおいてカウントした (n=50)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。(E) HeLa-Int-03 に siControl および siM18BP1 をトランスフェクションした。細胞はトランスフェクション 72 時間後に固定した。グラフは各サンプルでカウントされた分裂期の割合を示す (n=200 細胞)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。M18BP1 ノックダウンは分裂期アレストを引き起こさなかった。(F) M18BP1 発現量をウェスタンブロッティングにより抗 GAPDH(ローディングコントロール)および抗 M18BP1 抗体を用いて解析した。siRNA トランスフェクション 72 時間後に細胞を回収した。(G) 染色体画分 (P) と可溶性画分 (S) の CENP-A 量をウェスタンブロッティングにより抗 Lamin B1(P のローディングコントロール)、抗 GAPDH(S のローディングコントロール)および抗 CENP-A 抗体を用いて解析した。siRNA トランスフェクション 72 時間後に細胞を回収して分画を行った。(H) 各 siRNA トランスフェクション後の異所的部位上の新規 CENP-A 集合の頻度。示された tetR-EYFP 融合タンパク質は siRNA トランスフェクション後にトランスフェクションされた。tetR-EYFP スポット上の CENP-A シグナルをプラスミドトランスフェクション 48 時間後 (siRNA トランスフェクションの 72 時間後) に固定した各サンプルにおいてカウントした (n=100 細胞)。アスタリスクは示された siRNA 間での有意差を表す。***: P<0.001 (Fisher の正確検定)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。

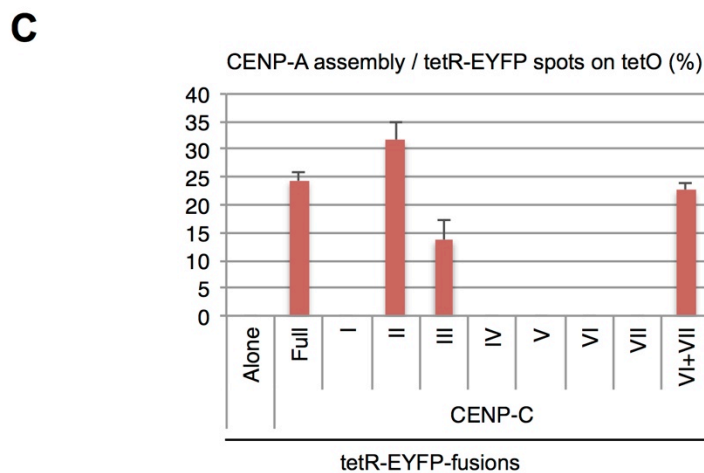
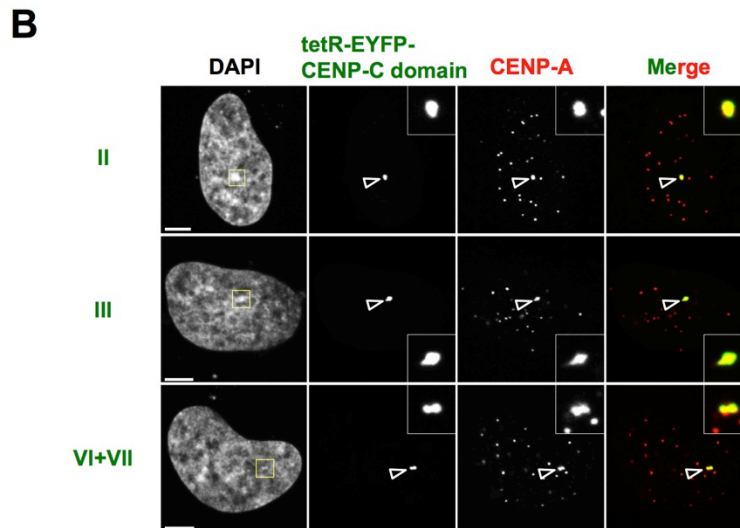
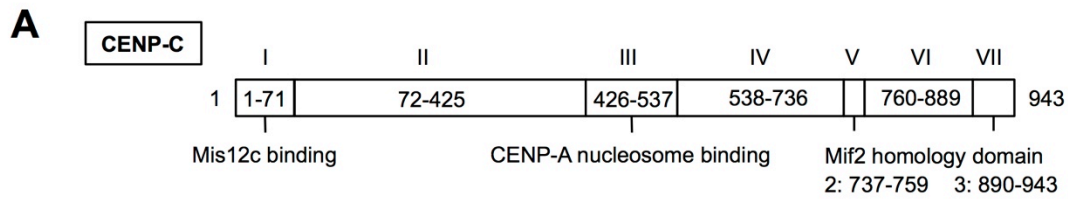


Figure 16. 新規 CENP-A 集合を引き起こす CENP-C ドメインの同定

(A) CENP-C ドメインと報告された機能の概略。出芽酵母のホモログである Mif2 と相同性の高い領域が C 末に 2 ヶ所ある。(B) 示された tetR-EYFP-CENP-C ドメイン (緑) をトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 48 時間後に DAPI および抗 CENP-A 抗体 (赤) で染色した。矢頭は異所的部位を示す。バーのサイズは 5 μ m を表す。(C) 異所的部位上の新規 CENP-A 集合の頻度。tetR-EYFP スポット上の CENP-A シグナルをトランスフェクション 48 時間後に固定された各サンプルにおいてカウントした (n=100 細胞)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。

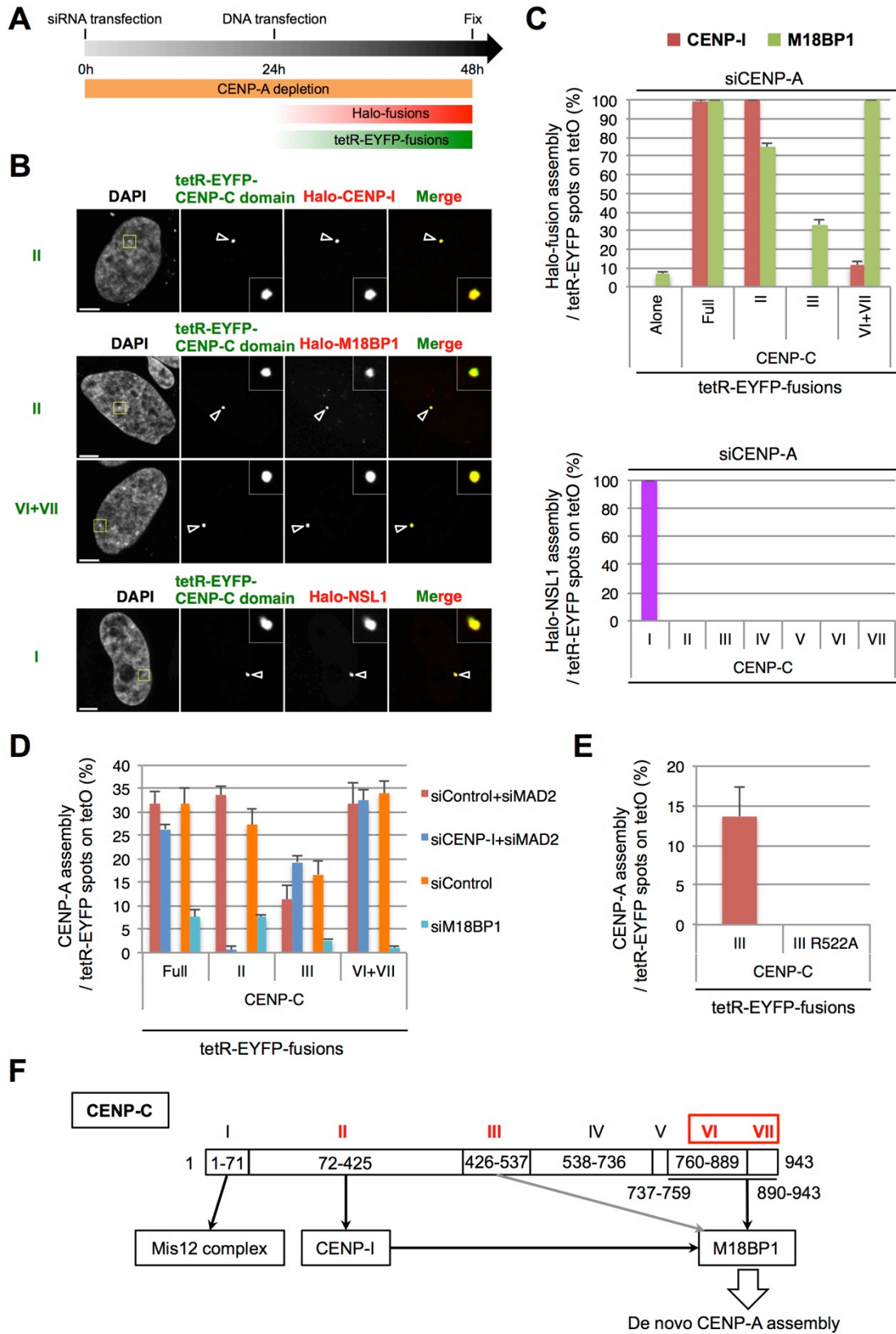


Figure 17. CENP-C は CENP-I を介した経路を含む、複数の経路で新規 CENP-A 集合を引き起こす

(A)実験(B)および(C)のタイムテーブル。HeLa-Int-03 に始めに siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に Halo 融合タンパク質および tetR-EYFP 融合タンパク質発現ベクターをコトランスフェクションした。(B) siCENP-A トランスフェクション後に、示された tetR-EYFP 融合タンパク質 (緑) および Halo 融合タンパク質 (赤) をコトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をプラスミドトランスフェクション 24 時間後に DAPI および Halo-tag TMR Ligand (赤) で染色した。矢頭は異所的部位を示す。バーのサイズは 5 μ m を表す。(C) 異所的部位上の各 Halo 融合タンパク質集合の頻度。tetR-EYFP スポット上の Halo 融合タンパク質のシグナルをプラスミドトランスフェクション 24 時間後に固定した各サンプルにおいてカウントした (n=50)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。(D) 各 siRNA トランスフェクション後の異所的部位上の新規 CENP-A 集合の頻度。示された tetR-EYFP 融合タンパク質は siRNA トランスフェクション後にトランスフェクションされた。tetR-EYFP スポット上の CENP-A シグナルをプラスミドトランスフェクション 48 時間後 (siRNA トランスフェクションの 72 時間後) に固定した各サンプルにおいてカウントした (n=100 細胞)。エラーバーは SEM を表す (N=3)。(E) HeLa-Int-03 細胞に tetR-EYFP-CENP-C ドメイン III または、その CENP-A スクレオソーム結合を失わせる R522A 変異体 (Carroll et al., 2010) をトランスフェクションした。tetR-EYFP スポット上の CENP-A シグナルをトランスフェクション 48 時間後に固定した各サンプルにおいてカウントした (n=100 細胞)。ドメイン III のデータは Figure 15C と同一。エラーバーは SEM を表す (N=3)。(F) CENP-C からリクルートされる因子と新規 CENP-A 集合経路のまとめ。赤いローマ数字は新規 CENP-A 集合に十分なドメインを示す。

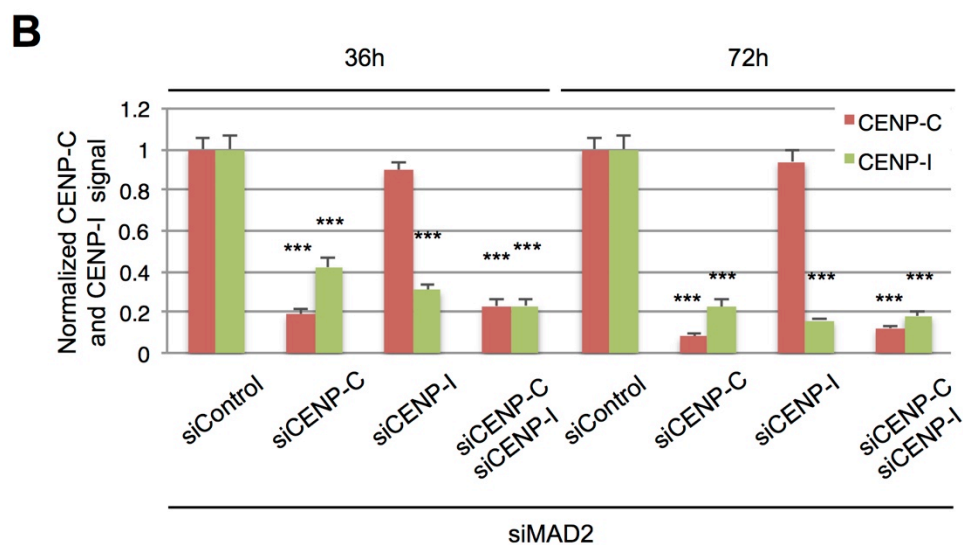
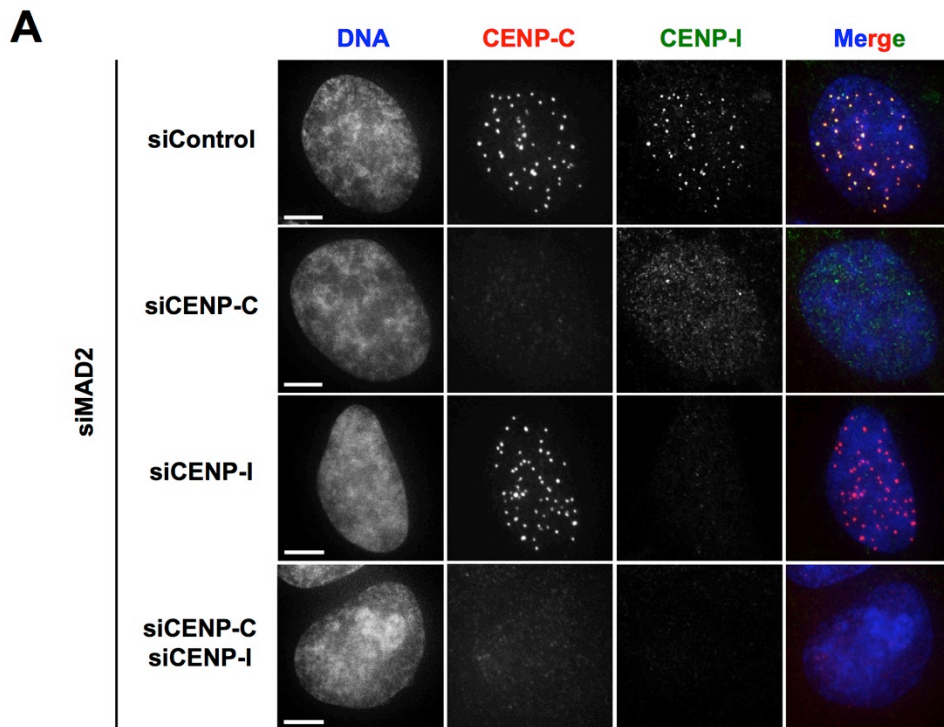


Figure 18. CENP-C と CENP-I 集合の相互依存性

(A) 示された siRNA をコトランスフェクションした HeLa-Int-03 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 72 時間後に DAPI (青)、抗 CENP-C 抗体 (赤)、抗 CENP-I 抗体 (緑) で染色した。バーのサイズは 5 μ m を表す。(B) siRNA トランスフェクション 36 または 72 時間後の各サンプルにおける CENP-C および CENP-I の点状シグナル量 (siControl を 1 として標準化した)。アスタリスクは siControl との有意差を表す。エラーバーは SEM を表す (n=39~48 細胞)。

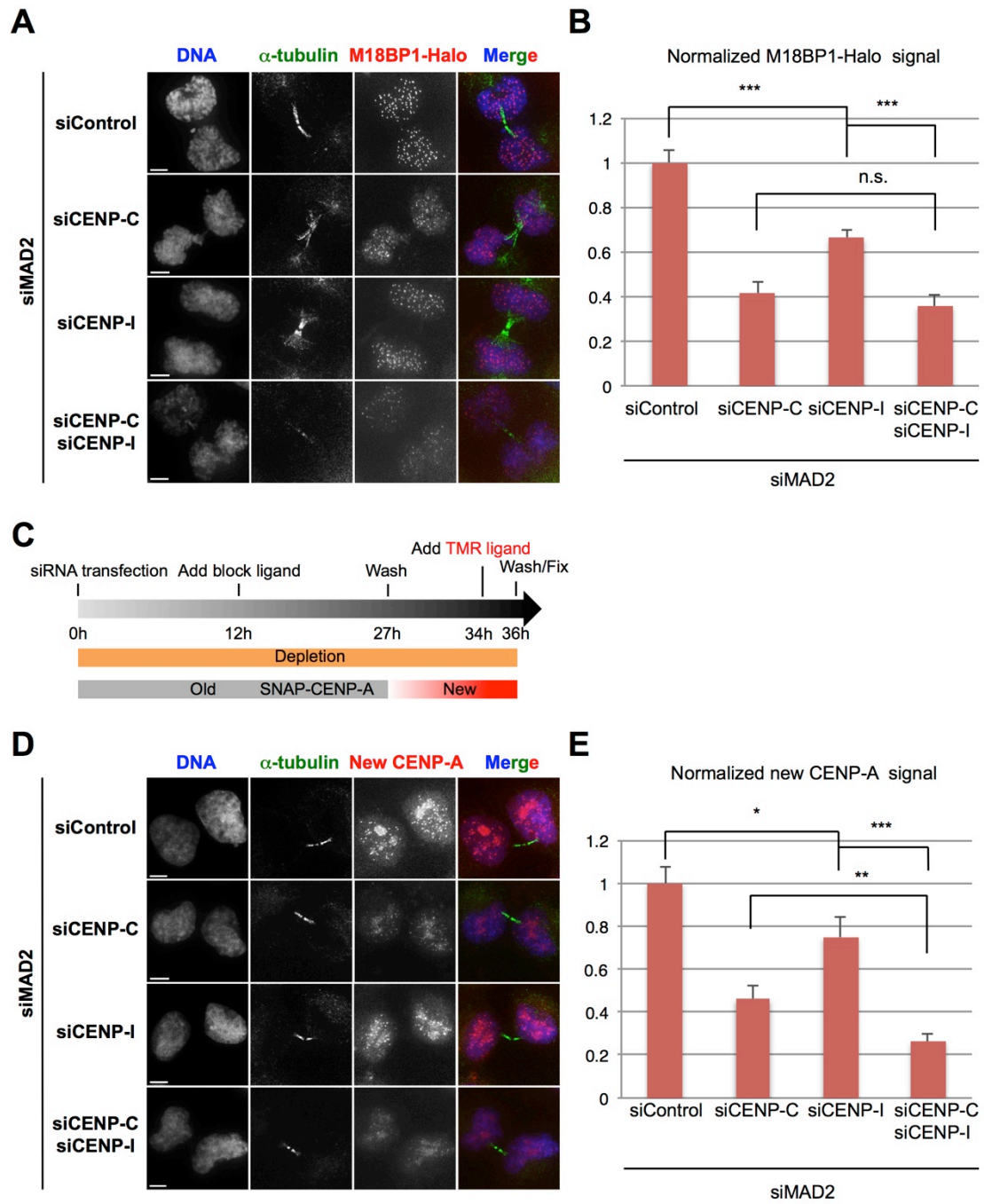


Figure 19. 新規合成された CENP-A のセントロメア集合は CENP-C を必要とし、CENP-I を介して補強される

(A) 示された siRNA をコトランスフェクションした HeLa-Int-03 M18BP1-Halo 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 36 時間後に DAPI (青)、抗 α -tubulin 抗体 (緑) および Halo-tag TMR Ligand (赤) で染色した。バーのサイズは 5 μ m を表す。(B) siRNA トランスフェクション 36 時間後の各サンプルにおける M18BP1-Halo の点状シグナル量 (siControl を 1 として標準化した)。アスタリスクは有意差を表す。n. s. : 有意差無し ***: $P < 0.001$ (Mann-Whitney 検定)。エラーバーは SEM を表す (n=49~50 細胞)。(C) 実験 (D) と (E) のタイムテーブル。固定の 9 時間前までに発現していた CENP-A は非蛍光のブロックリガンドによりクエンチされ、新たに発現した SNAP-CENP-A が SNAP TMR Ligand によって蛍光ラベルされた。(D) 示された siRNA をコトランスフェクションした HeLa-Int-03 SNAP-CENP-A 細胞の代表的な画像。細胞をトランスフェクション 36 時間後に DAPI (青)、抗 α -tubulin 抗体 (緑) および SNAP TMR Ligand (赤) で染色した。バーのサイズは 5 μ m を表す。(E) siRNA トランスフェクション 36 時間後の各サンプルにおける新規合成された CENP-A の点状シグナル量 (siControl を 1 として標準化した)。アスタリスクは有意差を表す。*: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$ (Mann-Whitney 検定)。エラーバーは SEM を表す (n=43~48 細胞)。

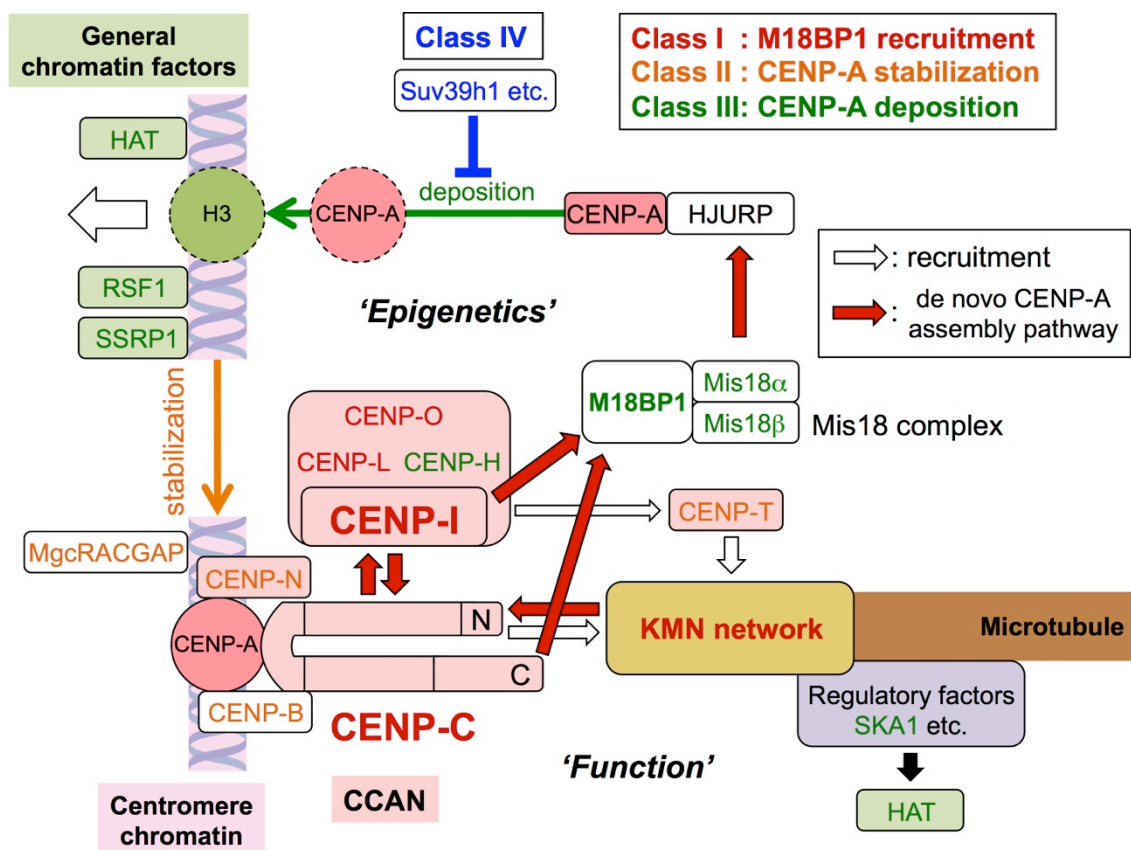


Figure 20. CENP-C と CENP-I はセントロメアの「機能」と「エピジェネティクス」を協調させる

矢印は本研究および、これまでの報告から示唆されるリクルートを表し、特に赤色の矢印は本研究で観察された新規 CENP-A 集合に関わる経路である。KMN network は CENP-C を介して新規 CENP-A 集合を引き起こす。CENP-L、CENP-O も CENP-C をリクルートすることから (Figure 12C)、CENP-C に比較的近い相互作用を持つ因子と考えられる。CENP-H は CENP-I と複合体を形成することが知られている (Okada et al., 2006)。一方、CENP-B、CENP-N および CENP-C の 426-537 aa は CENP-A ニュクレオソームと相互作用することが示されている (Carroll et al., 2010; Carroll et al., 2009; Fachinetti et al., 2015; Fujita et al., 2015)。また、アウターキネトコアにおいて HAT とキネトコアの制御因子との相互作用も報告されている (Choi et al., 2009)。CENP-C の N 末 (1-71 aa) は Mis12 複合体を介してキネトコアを集合させ (機能)、C 末 (760-943 aa) は M18BP1 を介して新規合成された CENP-A を集合させる (エピジェネティクス)。CENP-C の 72-425 aa と相互作用する CENP-I は両経路を補助する (CENP-I とキネトコア機能との関わりについては CENP-H/I/K/M 複合体が CENP-T/W 複合体と相互作用することが報告されている (Basilico et al., 2014))。加えて、本研究で分類した各クラスの予想される機能も CENP-A 集合に関わっている (考察を参照)。

Table 1. Antibodies used in this study

Antibodies	Catalog number	Antibody produced in	Usage (Dilution)
anti-CENP-A (A1) (Ohzeki et al., 2002)	None	Mouse	Immuno-staining (1µg/ml), ChIP (5µg/IP)
anti-CENP-A (6F2) (Kind gift of Kinya Yoda)	None	Rat	WB (1/10000)
anti-CENP-C	MBL, PD030	Guinea pig	Immuno-staining (1/2000), WB (1/10000)
anti-CENP-I	MBL, PD032	Rat	Immuno-staining (1/500), WB (1/5000)
anti-M18BP1	Novus Biologicals, NBP1-47290	Rabbit	WB (1/20000)
anti-MAD2	BD Transduction Laboratories, 610679	Mouse	WB (1/10000)
anti-GFP	Roche, 11814460001	Mouse	ChIP (2µg/IP)
anti-α-tubulin	Abcam, ab6160	Rat	Immuno-staining (1/10000)
anti-Lamin B1	MBL, PM064	Rabbit	WB (1/100000)
anti-GAPDH HRP-conjugate	Abcam, ab9484	Goat	WB (1/200000)
anti-mouse IgG HRP-conjugate	Bio-rad, #170-6516	Goat	WB (1/20000)
anti-rabbit IgG HRP-conjugate	Bio-rad, #170-6515	Goat	WB (1/20000)
anti-rat IgG HRP-conjugate	Santa Cruz, sc-2065	Goat	WB (1/20000)
anti-guinea pig IgG HRP-conjugated	Santa Cruz, sc-2438	Goat	WB (1/20000)
anti-mouse IgG Alexa Fluor 594-conjugate	life technologies, A-11032	Goat	Immuno-staining (1/1000)
anti-rat IgG Alexa Fluor 488-conjugate	life technologies, A-11006	Goat	Immuno-staining (1/1000)
anti-rat IgG Alexa Fluor 594-conjugate	life technologies, A-11007	Goat	Immuno-staining (1/1000)
anti-guinea pig IgG DyLight 594-conjugate	Abcam, ab96961	Goat	Immuno-staining (1/500)

Table 2. Halotag clones used in this study (<http://www.kazusa.or.jp/kop/dsearch-e/>)

Gene	Halotag ID	Gene	Halotag ID
<i>BUBR1</i>	FHC01224	<i>M18BP1</i>	FHC11044
<i>CENP-A</i>	FHC20935	<i>MgcRacGAP</i>	FHC00237
<i>CENP-B</i>	FHC04528	<i>Mis12</i>	FHC05998
<i>CENP-C</i>	FHC31044	<i>Mis18α</i>	FHC27152
<i>CENP-H</i>	FHC08778	<i>Mis18β</i>	FHC25353
<i>CENP-I</i>	FHC27442	<i>MLL</i>	FHC28075
<i>CENP-K</i>	FHC08244	<i>MYST1 / KAT8</i>	FHC02573
<i>CENP-L</i>	FHC27730	<i>MYST2 / KAT7</i>	FHC06090
<i>CENP-M</i>	FHC04530	<i>MYST3 / KAT6A</i>	FHC03163
<i>CENP-N</i>	FHC25780	<i>MYST4 / KAT6B</i>	FHC00523
<i>CENP-O</i>	FHC11101	<i>NDC80</i>	FHC11680
<i>CENP-P</i>	FHC07629	<i>NSL1</i>	FHC08313
<i>CENP-Q</i>	FHC22647	<i>NUF2</i>	FHC09932
<i>CENP-R</i>	FHC10461	<i>p300</i>	FHC01787
<i>CENP-S</i>	FHC20070	<i>PCAF</i>	FHC11610
<i>CENP-T</i>	FHC29798	<i>PP1γ</i>	FHC10941
<i>CENP-U</i>	FHC12708	<i>RSF1</i>	FHC11761
<i>CENP-V</i>	※	<i>SETDB1</i>	FHC00393
<i>CENP-W</i>	FHC29198	<i>SIRT1</i>	FHC23876
<i>CENP-X</i>	FHC11911	<i>SIRT2</i>	FHC07770
<i>DSN1</i>	FHC26999	<i>SKA1</i>	※
<i>G9a</i>	FHC04861	<i>SPC24</i>	FHC30795
<i>HAT1</i>	FHC21224	<i>SPC25</i>	FHC07566
<i>HDAC1</i>	FHC02563	<i>SSRP1</i>	FHC08219
<i>HDAC2</i>	FHC05328	<i>ZWINT</i>	FHC23857
<i>KNL1</i>	FHC11088		

※: Unregistered at present