



平成 25 年 3 月 22 日

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所

本件の取り扱いについては、下記の解禁時間以降でお願い申し上げます。

新聞 : 日本時間 平成 25 年 3 月 26 日(火)朝刊

テレビ・ラジオ・インターネット : 日本時間 平成 25 年 3 月 26 日(火)午前 2 時

染色体工学の新たな幕開け！ 高等動物のセントロメア作製に成功

生物学の教科書を書き換えるような根本的な発見が、染色体研究の分野で起こっています。長い間謎に包まれていた染色体のセントロメア(注 1)——その正体を明らかにしてきた国立遺伝学研究所の深川竜郎教授らのグループは、今回、セントロメアを人工的に作成する画期的な染色体改変技術を考案しました。分子生物学の基本的な技術として、医学や農学などの分野で今後大いに活用されると期待されます。

生命の設計図である遺伝子は、細胞分裂のたびに新たな細胞にきちんと受け継がれていきます。遺伝子を安全に次世代に「運ぶ」ことは、細胞の大切な仕事であり、細胞にはそのための精巧な仕組みが備わっています。その1つが、遺伝子を積み込む「乗り物」としての染色体と、染色体の中央部で、染色体の「運転手」としての役割を果たすセントロメアです。

ヒトの病気の研究から、運転手であるセントロメアが何らかの理由で働けなくなったときに、「控えの運転手」(ネオセントロメア)が現れるという珍しい現象が知られていました。そこで深川教授らは、ネオセントロメアを自在に作成する技術を開発し、それが染色体のどこに現れ、どのような性質を持つかを調べました。その結果、ネオセントロメアは、CENP-A(センプ A)というヒストタンパク質が含まれる染色体上の位置に作られること、今回作成したネオセントロメアが本来のセントロメアと遜色ない働きを果たすことがわかってきました。

今回の研究では、染色体が運ばれる機構(染色体分配)の基本的な仕組みが明らかになったことに加えて、染色体を改変する新しい技術をも考案しています。すなわち、既存のセントロメアを壊し、染色体の任意の位置に新しいセントロメアを作る技術です。今回は、ニワトリの培養細胞を実験に用いていますが、この原理は他の高等動物にも応用でき、例えば遺伝子デリバリーシステムなどに使用可能なヒト人工染色体の開発に利用されていくことでしょう。

本研究は、国立遺伝学研究所 分子遺伝研究部門の深川教授のグループを中心として行われ、情報・システム研究機構 新領域融合研究センター、国立遺伝学研究所 比較ゲノム解析研究室(藤山教授)、国立遺伝学研究所 生体高分子研究室(前島教授)、国立遺伝学研究所 セルイノベーションプロジェクト(池尾准教授)、大阪大学(木村准教授)、エジンバラ大学(Earnshaw 教授)との共同研究によって遂行されました。

本研究成果は、米国科学誌 *Developmental Cell* (3月25日号 予定) に掲載されます。

論文: Chromosome engineering allows the efficient isolation of vertebrate neocentromeres
(染色体工学によって効率的にネオセントロメアを作成できる)

著者: Wei-Hao Shang, Tetsuya Hori, Nuno M.C. Martins, Atsushi Toyoda, Sadahiko Misu, Norikazu Monma, Ichiro Hiratani, Kazuhiro Maeshima, Kazuho Ikeo, Asao Fujiyama, Hiroshi Kimura, William C. Earnshaw, and Tatsuo Fukagawa

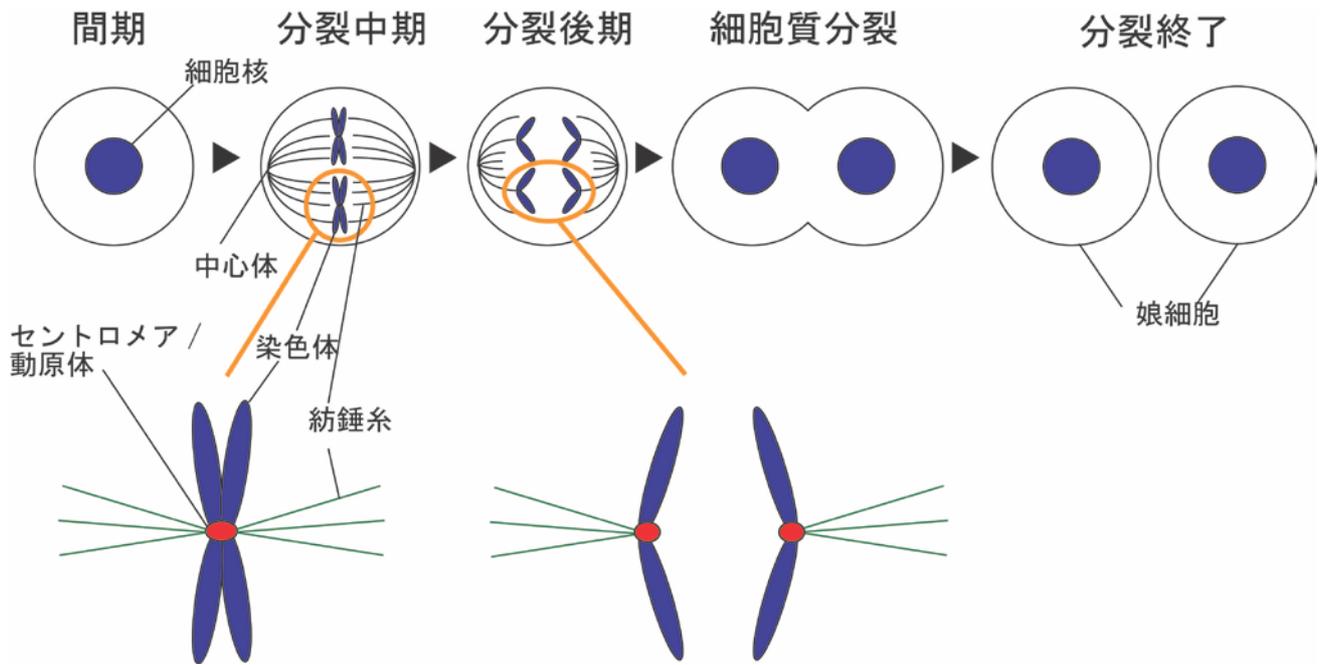


図 1: 細胞分裂と染色体のセントロメア

細胞分裂の分裂期には、染色体の中央部分にあるセントロメアに向かって線維(紡錘糸)が伸びてきて、染色体は両極に運ばれ、その結果、染色体の均等な分配が達成されます。この仕組みが障害されると、がんなどの病気が引き起こされます。セントロメア上で紡錘体と結合する構造体は、動原体ともよぶ。

<本研究成果のポイント>

- 脊椎動物の培養細胞 (DT40 細胞)を対象とし染色体工学的な手法を活用して、効率的にネオセントロメアを作出することに成功した。
- ネオセントロメアは、本来のセントロメアとほぼ同じ機能を有していた。
- 次世代シーケンサー解析によって、ネオセントロメアを高精度に解析することに成功し、今回解析した 18 種類のネオセントロメアの大きさはすべて約 40 kb であることが判明した。
- すべてのネオセントロメアには、セントロメアに特異的なヒストンである CENP-A が取り込まれていた。
- 通常なセントロメア近傍に存在するヘテロクロマチンのマーカーであるヒストン修飾 (H3K9me3)は、ネオセントロメアのまわりには存在していなかった。
- ネオセントロメアは、転写領域にも形成されたが、ネオセントロメア形成に伴い、その転写量は大きく抑制された。
- ネオセントロメア形成は、遅い DNA 複製領域を好む傾向にあることを明らかにした。
- ネオセントロメアは、本来のセントロメア近傍に効率的に形成される傾向にあったが、これは非セントロメア領域の CENP-A がセントロメアの近傍に少量取り込まれており、これがネオセントロメア形成の「種」となっていることを明らかにした。
- がんの原因と成る染色体不全に重要な基礎知識を与える研究である。

<研究の詳細>

生命は、両親のゲノム DNA がきっちり半分ずつ子へ受け継がれることで、次世代へ遺伝情報を伝達しています。私たちの個体も、一つの受精卵から細胞が分裂を繰り返し成長しています。細胞分裂がおこるたびに、ゲノムは等しく分配されなければなりません。細胞が分裂する時に、ゲノム DNA は染色体という構造をかたちづくり、倍加した染色体は、それぞれ、正確に子孫細胞へ均等に分配されます。この分配に異常が生じると、生殖細胞ではダウン症などの先天性遺伝子疾患が、体細胞ではがん化をはじめとする様々な病気を引き起こしてしまいます。こうした点から、ゲノム分配機構の解明は、生命現象の基盤解明のみならず、がん化をはじめとする疾患との関わりにおいて、重要な研究テーマになっています。

ゲノム分配に重要な働きを担う染色体上の領域が「セントロメア」です。セントロメア領域には、さまざまなタンパク質が集合し、動原体（上記 図 1）と呼ばれる構造を形成します。細胞の両極から伸びた紡錘糸が動原体と結合して染色体を引っ張ることによって、倍加した染色体は二つの娘細胞へ等しく分配されます。一本の染色体には、一カ所のセントロメア領域が存在することが均等な染色体分配のためには必要であり、通常セントロメア領域は世代を超えて同じ場所に存在しています。したがって、セントロメア領域となるためには、ある特異的な DNA 配列が存在すると以前は考えられていました。実際にセントロメア領域の DNA を解析すると、ヒトではアルファサテライト、マウスではマイナーサテライトと呼ばれる配列がすべての染色体に共通して存在しています。従って、これらサテライト配列の DNA 情報がセントロメア領域として必須であると思われていました。

ところが、オーストラリアの研究者が、発育不全症の患者の染色体を解析する過程で、その患者のある染色体にアルファサテライトを含まない、新しいセントロメア（ネオセントロメア）が存在していることを見いだしました。興味深いことに一旦できたネオセントロメア領域は、次世代の細胞でもセントロメア領域として機能していました。このことは、セントロメア領域は、特異的な DNA 配列によって規定されているのではなく、DNA 配列に依らない後天的なしくみ（エピジェネティクス: 注 2）によって規定されていることを示唆しています。では、いったい「どのような機構でセントロメア領域が規定されているのか？」という点は大きな疑問でした。最近の様々な研究によって、特別なヒストン（注 3）である CENP-A が目印となっているのではないかという説が有力となっています。

しかしながら、ネオセントロメアは、臨床研究から得られるサンプルであり、また極めて稀にしかみいだされないため、ネオセントロメアができる仕組みについては不明な点が数多くあります。脊椎動物のセントロメア領域が、エピジェネティクスで規定されているという可能性は示唆されてはいるものの、それを実験的には実証できてはいませんでした。今回、深川教授らのグループは、ニワトリの培養細胞を用いて染色体を人工的に改変し、ある条件でのみセントロメア領域を欠失させる実験系を開発しました（図 2）。本研究グループは、本来のセントロメア領域の両外側に LoxP と呼ばれる特殊な配列を配置させました。LoxP は、Cre 組み換え酵素と呼ばれる酵素によって特異的に組み換えを起こす配列です。LoxP をセントロメアの両脇に配置させた細胞で Cre 組み換え酵素をある条件下のみで発現させると、LoxP 間で組み換えが生じて、セントロメア配列を取り除くことができます。セントロメアがないと、染色体分配不全がおきて大抵の細胞は死滅してしまいます。本研究グループは、死滅してしまう細胞のなかから、特殊な遺伝学的なトリックを用いて、生存する細胞の単離を試みました。その結果、合計 136 種類の生存細胞の取得に成功しました。それらの細胞の染色体をすべて解析した結果、126 種類の細胞で、本来のセントロメア領域とは、異なる場所にネオセントロメアが形成されていることが明らかになりました。

染色体工学を用いたネオセントロメア作成法

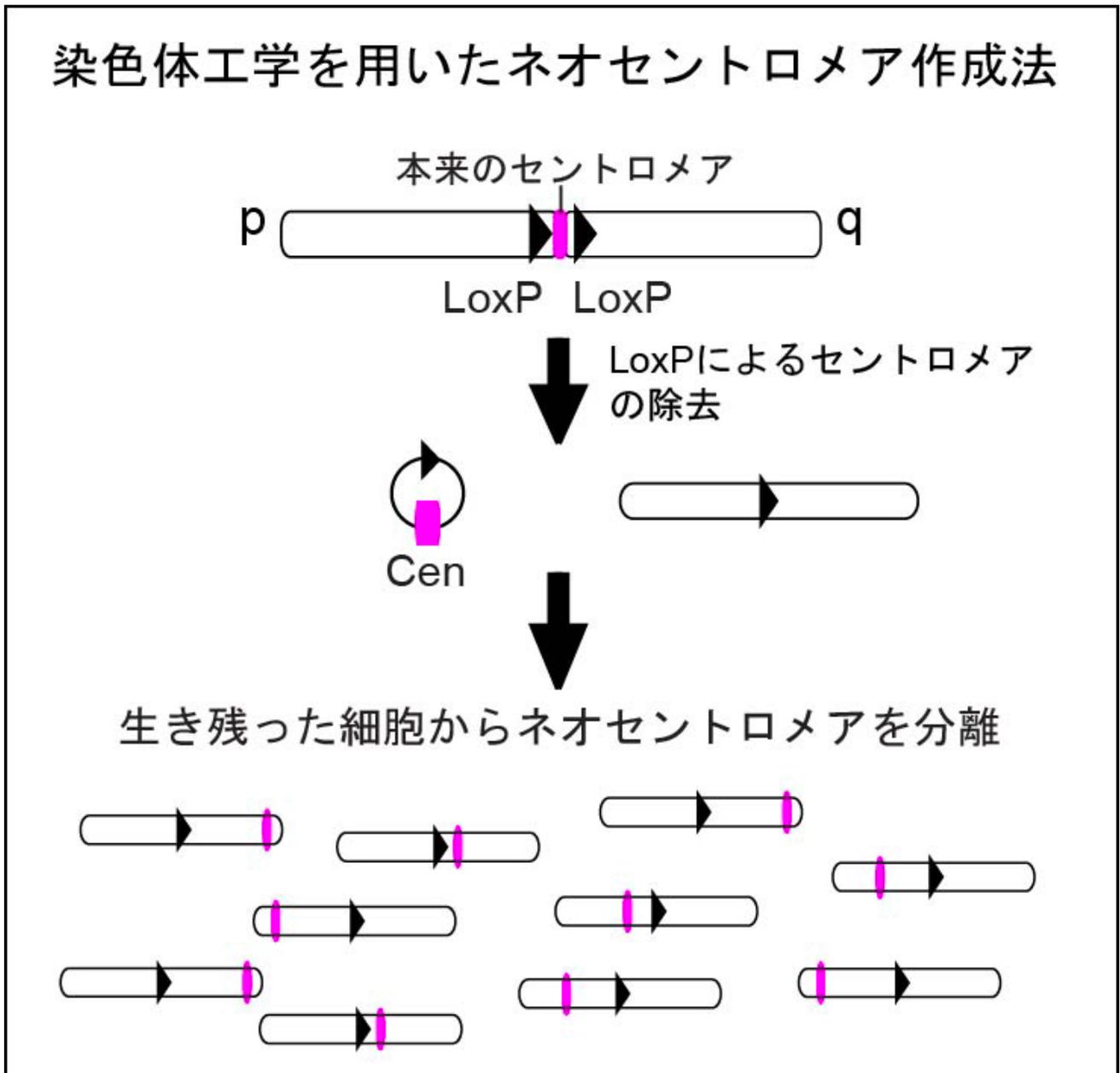


図2: 染色体工学を活用したネオセントロメアの作成方法。本来のセントロメア領域の両外側にLoxP配列を挿入する。LoxP間で組み換えがおこるように、ある条件下で特別な組み換え酵素を発現させて、本来のセントロメア領域を除去する。大抵の細胞は、セントロメアがないと死滅するが、遺伝学的トリックを用いて生存細胞を単離した。生存細胞の染色体を調べると90%以上の細胞でネオセントロメアが形成されていた。

グループは、ネオセントロメアが本来のセントロメアと機能的に同じであるかどうかを調べ、機能的にはほとんど同じであることを証明しました。また、ネオセントロメアの上にも通常のセントロメアと同様に、動原体構成タンパク質が集合していることも明らかにしました。

細胞遺伝学的な解析によって、本来のセントロメアと異なる場所にネオセントロメアができていることが明らかになりましたが、特異的なDNA配列上に存在しているかどうかは、詳細な配列解析を行わなければなりません。この配列解析には次世代シーケンサー（注4）を活用しました。具体的には、動原体構成タンパク質に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、一緒に落ちてくるDNAを次世代シーケンサーによって網羅的に解析するChIP-seq法（注5）によってネオセントロメア領域のDNA配列を解析しました。18種類のネオセントロメアのDNA配列を高精度で解析した結果、共通の特異的配列は見いだされませんでしたので、セントロメアはDNA配列に依らな

いエピジェネティックな仕組み（注 2）で決まっていることが実証できました。また、解析したすべてのネオセントロメアに CENP-A が存在しており、CENP-A がエピジェネティックな目印であることも示唆されました。さらに、18 種類のセントロメア領域の長さは 40 kb 程度であり、すべてのネオセントロメアでほぼ同じ大きさであることも判明しました。

一般にセントロメア領域は、転写などがおきないサイレントな領域として知られています。このようなサイレントな領域はヘテロクロマチンと呼ばれています。このヘテロクロマチンの目印は、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基がメチル化されることです。そこで、ネオセントロメア近傍のヒストン H3 のメチル化状態を調べました。その結果、ネオセントロメアの近傍ではヘテロクロマチン化していないことが明らかになりました。さらに、ネオセントロメアは、転写領域にも形成されることが明らかになり、ネオセントロメア形成にヘテロクロマチン化は必要ないという結論を得ました。ただし、転写が活発な領域にネオセントロメアが形成されると、転写が大きく抑えられることも同時に明らかになりました。

さらに、いくつかの生物では、セントロメア領域の DNA 複製タイミングが早期におき、これが動原体形成に重要であるという報告があったので、本研究グループはネオセントロメアができる前と後での DNA 複製タイミングについても解析を行いました。その結果、ネオセントロメアが形成されることによって、複製タイミングはむしろ遅れるという結果が得られました。この分子機構については、今回の研究では明らかにしていませんが、興味深い現象が発見できており、今後の解析が重要とグループは考えています。

今回の研究でグループが最も明らかにしたかったのは、「セントロメア領域になりやすい場所が存在するかどうか?」と言う点です。特異的な DNA 配列がセントロメア領域を規定しているわけでないことは、上述したとおりですが、ではどのような領域がセントロメアになるのでしょうか? グループは、本来のセントロメア領域を取り除いた後にできるネオセントロメアは、本来のセントロメア領域のごく近傍にできやすいことを見いだしました。その理由を詳細に解析した結果、セントロメアに特異的なヒストンである CENP-A が少ない量ながらも、非セントロメア領域にも存在していることを発見しました。非セントロメア領域の CENP-A は、本来のセントロメアが機能しているときは、セントロメア形成の「種」にはなりません。一旦本来のセントロメアの機能が失われると「種」と成って、ネオセントロメア形成の足場として働くことが判明しました。これは、染色体異常の原因を考えるうえで大変重要な知見であると言えます。

＜本研究の意義＞

正常なゲノムの分配は、生命維持にとって不可欠であり、ゲノム分配の失敗は染色体不安定を引き起こし、がんやダウン症など様々な疾患の原因となることが知られています。したがって、ゲノム分配の分子機構を解明することは、基礎生物学および医学の両側面から意義の高い研究であり、ゲノム分配において、中心的な働きを担うセントロメアに関する研究は極めて重要です。通常セントロメアは一本の染色体に一カ所ほぼ決まった領域に形成されますが、セントロメアが複数箇所形成されると、均等な染色体分配がおきずに、染色体不全を伴った疾患の原因となってしまいます。ところが、セントロメアができる機構に不明な点も多くありました。特に、本来と異なる場所にセントロメアができてしまう現象は、以前から知られてはいましたが、その原因については、よくわかっていませんでした。今回の研究では、染色体工学という人為的な方法で、本来と異なる場所に脊椎動物のセントロメアを作るという実験系を確立しており、大変画期的な研究です。また、実験的に作成したネオセントロメアを詳細に解析して、どのようにセントロメアができていくかという仕組みの一部を解明しており、染色体不全を伴う「がん」などの疾患研究の視点からは、意義の高い研究とすることができます。

加えて、セントロメアがエピジェネティックな機構でできるということも、実験的に証明したという点からも、大変意義深い研究です。近年、iPS細胞の研究をはじめとする再生医療の研究が盛んですが、遺伝情報の初期化の問題を考えると、エピジェネティックな情報を考慮に入れる必要があります。その視点から考えると、ゲノム領域に存在しているエピジェネティックな現象の解明は、さまざまな研究に基礎知識を与えます。

また、セントロメアを作成する技術とは、人工染色体の構築に応用できます。現在、医療で使われる遺伝子デリバリーシステムとしては、ウイルスベクターが有名です。しかしながら、ウイルスには様々な欠点もあり、染色体レベルでの遺伝子デリバリーシステムの構築が必要であると考えられています。人工染色体の構築には、セントロメアを人為的に形成させることが必須であり、今回の研究は、人工染色体の作成に応用可能です。また、農学、育種の分野においても、人工染色体の応用は期待されており、本研究の成果が活用できると考えられます。

<補足説明>

注1 セントロメア

細胞分裂時に紡錘糸が結合する染色体領域を指す。その領域に存在する DNA とタンパク質から構成される構造体（動原体）が、染色体分配の際に本質的な役割を担っている。

注2 エピジェネティクス

一般に、子孫に伝えられる遺伝情報の実体は DNA の一次配列である。仮に DNA の一次配列に変化がおり、その変化した遺伝情報が子孫へ伝わると、その変化に起因した変異が観察される。ところが、DNA の一次配列に変化がないにも関わらず、何らかの変異がおこる場合がある。これらの現象は、DNA や、DNA に結合するタンパク質の後天的な修飾により起こされる現象であるので、ジェネティクス(遺伝学)に対して、エピジェネティクスと呼ばれる。近年ではヒトゲノムの解読が完了した上、形質発現の調節機構にも研究の中心が移ってきており、エピジェネティクスが注目を集めるようになってきている。

注3 ヒストン

真核生物の染色体を構成する塩基性タンパク質であり、非常に長い分子である DNA を細胞核内に収納する役割を担っている。細胞核のなかで、DNA は、ヒストンと結合したかたちで存在している。

注4 次世代シーケンサー

スライドに固定された大量の磁気ビーズ上に増幅した DNA 断片を並列シーケンスする、革新的な遺伝子解析プラットフォーム。ヒトゲノム 3 ギガ(30 億)ベースをはるかに凌ぐシーケンス能力(スループット)により、ゲノム全般にわたるシーケンス解析を高速に行うことができる。あるタンパク質に結合する DNA を網羅的に解析する ChIP-seq 法等にも応用できる。

注5 ChIP-seq

DNA と相互作用するタンパク質をその抗体を用いて免疫沈降して、対象とするタンパク質とそのタンパク質と相互作用する DNA 複合体を回収する(クロマチン免疫沈降: ChIP)。その複合体から DNA を回収して、その DNA を次世代シーケンサーで解析することを、ChIP-seq とよぶ。エピジェネティクスの目印としては、ヒストンの修飾が有名であるが、あるヒストンの修飾抗体で ChIP-seq 解析をするとその修飾を受けているゲノム領域が明らかになる。各種のエピジェネティクスの目印をゲノム規模で明らかにする試みをエピゲノム計画とよび、ChIP-seq 解析は欠かせない技術である。

<問い合わせ先>

国立遺伝学研究所 分子遺伝研究部門 教授 深川 竜郎

ホームページ: http://www.nig.ac.jp/labs/MolGene/index_j.html

広報室 室長 鈴木 睦昭