



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。  
 テレビ・ラジオ・インターネット: 日本時間 平成 26 年 6 月 24 日(火)午前 2 時  
 新聞: 日本時間 平成 26 年 6 月 24 日(火)朝刊

## 染色体のセントロメア形成に関わる分子スイッチを発見

### <本研究成果のポイント>

- 染色体のセントロメアが形成されるために必須の分子スイッチを発見した。
- この分子スイッチは、染色体を構成するタンパク質のひとつである、H4 という種類のヒストンに特別な修飾が加わることであった。
- セントロメアは染色体分配に必須であり、セントロメア形成のしくみは、各種遺伝性疾患の解明・治療につながる重要な成果である。

### <概要>

DNA を運ぶ染色体は、細胞分裂のたびに新たな細胞へと正確に分配されていきます。染色体分配に異常がおこると、細胞に様々な問題がおきます。がんを始めとする各種遺伝性疾患の多くは、染色体の分配不全が原因でおきています。したがって、染色体分配についての研究は、基礎生物学の知識探求としてだけでなく、医科学的にも重要な課題です。

この染色体分配に重要な働きを担うのがセントロメアです。セントロメアは染色体の中央部に存在し、染色体が引っ張られるための足場として働いています(図 1)。正確な染色体分配がおこるためには、染色体のある一カ所にセントロメアが形成されなければなりません。しかしながら、セントロメアはどのように形成されるのかと言うメカニズムは不明であり、世界中の研究者が熱心に探究してきました。

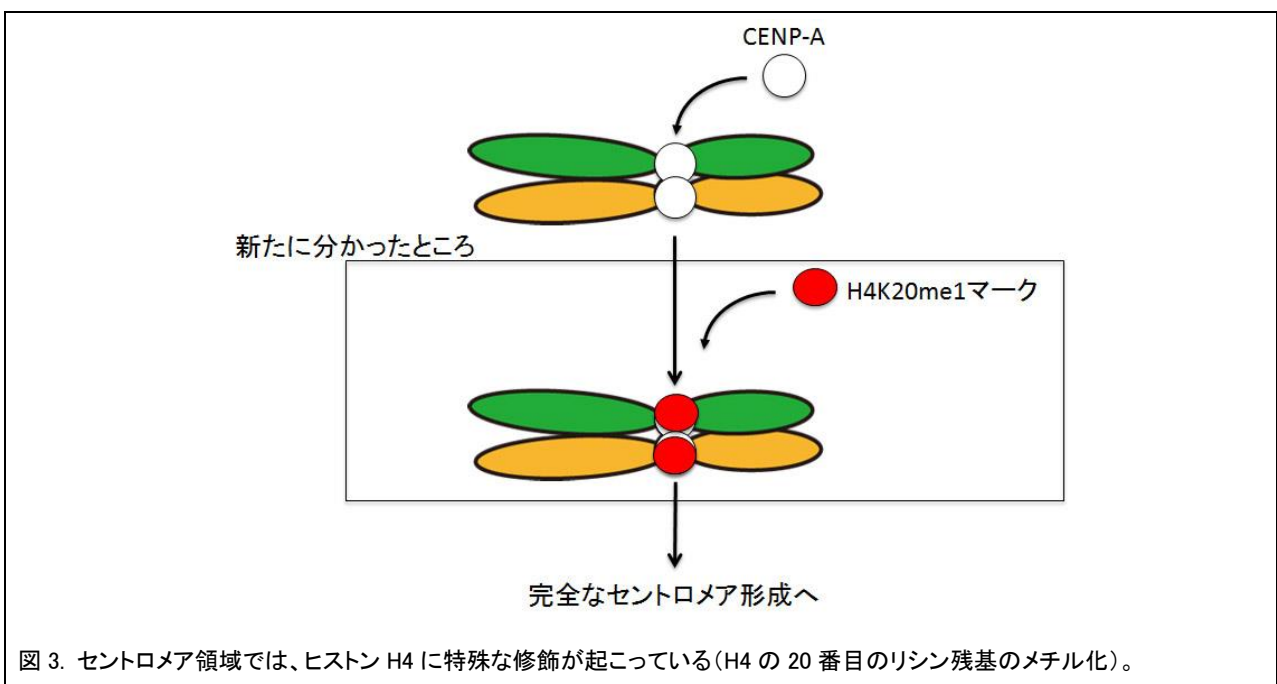
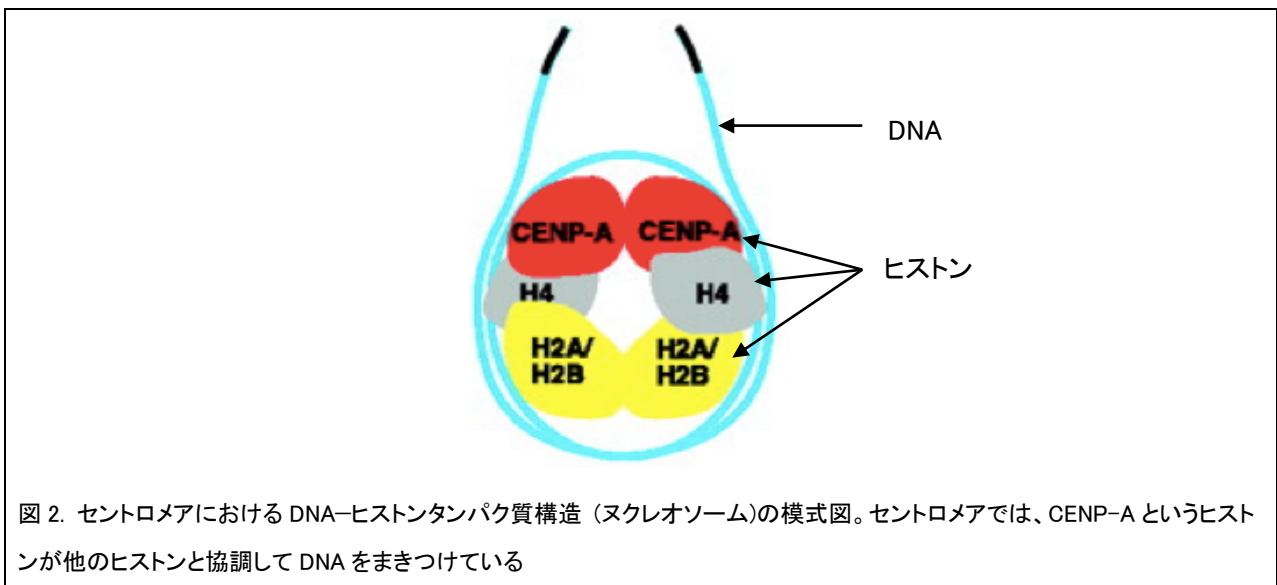
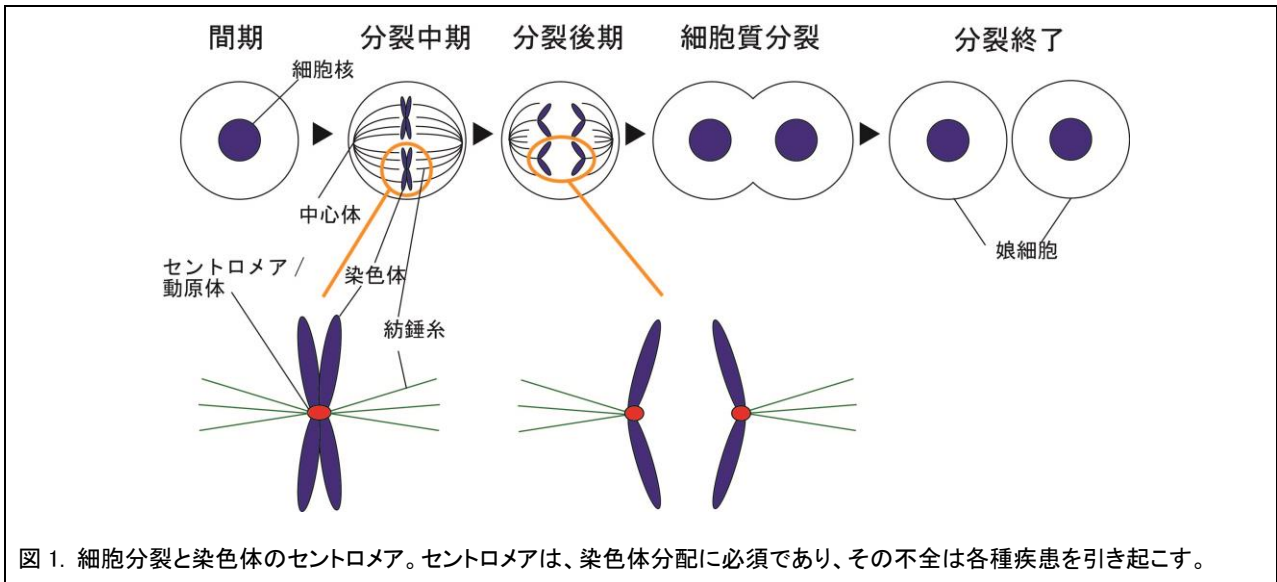
これまでにわかっていたことは、長いひも状の DNA が巻き付くヒストン(図 2)というタンパク質の特徴が、セントロメア形成に大きく関わっているということです。つまり、DNA は 8 個のヒストンに巻き付いていますが、そのうちの一部に「CENP-A」というヒストンが含まれていると、そこにセントロメアが形成されます。

しかし、単純に CENP-A が存在するだけでは、セントロメアは形成できません。そこで、我々は、CENP-A を活性化する分子スイッチが存在するのではないかと予想しました。

今回の実験で我々が明らかにしたのは、この分子スイッチです。我々は詳細な解析を行った結果、DNA が巻き付くヒストンとして CENP-A が取り込まれた後、残りのヒストンのうちの H4 という種類のヒストンに特別な修飾が加わると、セントロメア形成が起こることを明らかにしました。この特別な修飾とは、ヒストン H4 の 20 番目のリシン(Lys)残基がメチル化されることです(図 3)。

セントロメア形成の分子スイッチを発見できたのは、高精度のゲノム解析や染色体工学を活用した技術開発によります。これらの実験により、この分子スイッチがセントロメア形成に必須であることを証明できました。

この分子スイッチを操作することによって、将来的にはがんをはじめとする染色体分配不全が原因でおこる各種遺伝性疾患の解明・治療も可能になると考えています。



本研究は、日本時間平成 26 年 6 月 24 日午前 2 時(日本時間)に、米国科学誌 *Developmental Cell* (デベロップメンタルセル)に掲載され、研究内容は本号の表紙として紹介されています。

論文 : Histone H4 Lys 20 mono-methylation of the CENP-A nucleosome is essential for kinetochore assembly

著者 : Tetsuya Hori, Wei-Hao Shang, Atsushi Toyoda, Sadahiko Misu, Norikazu Monma, Kazuho Ikeo, Oscar Molina, Giulia Vargiu, Asao Fujiyama, Hiroshi Kimura, William C. Earnshaw, and Tatsuo Fukagawa  
堀哲也 (遺伝研助教)、Wei-Hao Shang (遺伝研研究員)が同等筆頭著者で、深川竜郎 (遺伝研教授)が責任著者

## <研究の詳細>

セントロメアは、ゲノム DNA の分配において重要な働きを担う染色体上の領域です (図 1)。脊椎動物のセントロメア領域は、DNA の配列情報によらない後天的 (エピジェネティック) な分子機構で規定されていることがわかっています。現在、その分子機構解明の鍵とみなされているのが、セントロメアに特異的に存在するヒストンである CENP-A です。

確かに、セントロメア領域を規定するエピジェネティックな目印として、CENP-A は重要です。しかし、CENP-A の存在だけでは形成機構を説明しきれないこともわかっています。CENP-A がヒストンとして取り込まれた後に、他のタンパク質の集合を促すような分子スイッチが存在する可能性があります。これまで、その存在は不明のままでした。

今回、我々は、セントロメア形成に関わる分子スイッチを探索し、それがヒストン H4 の 20 番目のリシン(Lys) 残基のメチル化であることを明らかにしました。

### ◆ 通常のセントロメアの DNA 解析は困難である

セントロメアの DNA を解析するのは、容易ではありません。なぜなら、セントロメアを構成する DNA が存在するゲノム領域は、反復配列が繰り返され、非常に長大だからです。100~200 塩基の配列を 1 つの単位として、この配列が何 Mb(百万塩基)の長さにわたり何回も繰り返されています。同じ配列が繰り返されていると、そのうちのどこにセントロメアにとって重要な DNA 配列が存在するのかを特定するのが非常に難しくなります。このような事情から、一般的に、ゲノム配列情報のデータベースから、セントロメア DNA の情報は除かれています。

DNA は一般に、ヒストンと呼ばれるタンパク質に巻き付いており (図 2)、ヒストンがどんな修飾を受けているかは、遺伝子の塩基配列の情報と同様に非常に重要な遺伝情報といわれています。このヒストン修飾を調べる際には、次世代シーケンサーを利用して、タンパク質 (抗体) が結合する DNA 配列を同定する手法 (ChIP-seq 法) が近年一般的によく用いられています。この手法は、あるタンパク質が存在するゲノム領域を特定するためには大変有用ですが、セントロメアのゲノム解析では役立ちません。なぜなら、セントロメアに結合するタンパク質に対する抗体を対象として ChIP-seq 法を行うと、反復配列の DNA が回収されますが、ゲノム上の正確な位置を特定することができないからです。したがって、セントロメア領域のヒストン修飾に関する情報を得ることも困難でした。

### ◆ ニワトリには反復配列を持たないセントロメアがある

セントロメアの DNA 解析を難しくしているこのような反復配列の問題を避けるため、我々は、ニワトリをモデル生物に用いました。これまでの我々の解析から、ある種のニワトリ染色体には反復配列が含まれないことを見いだしています (Shang et al., *Genome Res*, 2010)。また、人工的にセントロメアを作り出すことのできる実験系の確立にも成功しており、その実験系を用いて、反復配列のないセントロメアを作成することができました (Shang et al., *Dev. Cell*, 2013)。そこで、今回の研究では、このニワトリの実験系を用いて、反復配列のないセントロメアを対象として研究を行うことにより、セントロメアに特異的なヒストン修飾を探索することができました。

◆ セントロメアには H4K20me1 修飾が存在する

20 種類程度の各種ヒストン修飾に対する抗体を用いて、ChIP-seq 法を行い、セントロメアに特異的なヒストン修飾を探索しました。その結果、セントロメア領域のヒストン H4 は、20 番目の Lys 残基がメチル化された状態 (H4K20me1) であることを発見しました (図 3、図 4)。

その根拠は、まず、ヒストン H4 の 20 番目の Lys 残基のメチル化 (H4K20me1) を認識する抗体での ChIP-seq のプロファイルと、CENP-A のプロファイルが極めて類似していたことです (図 4)。つまり、H4K20me1 修飾が見られるゲノム領域と CENP-A の結合するゲノム領域がほぼ一致します。CENP-A は、セントロメア領域に必須と考えられているヒストンタンパク質です。

また、この抗体を用いて免疫染色を行うと、ニワトリ細胞だけでなくヒト細胞においても、反復配列を含むすべてのセントロメアで、H4K20me1 のシグナルが検出されることから、この結論が支持されます。

これまで、H4K20me1 修飾は、転写に関わることが知られており、実際に我々の研究においても、セントロメア領域以外の各種遺伝子領域に H4K20me1 修飾は濃縮されていました。しかしながら、これら各種遺伝子領域では、CENP-A の濃縮は観察されませんでした。また、セントロメア以外に存在している少量の CENP-A には、H4K20me1 修飾は見られませんでした。つまり、セントロメアとして機能するためには、CENP-A が存在してなおかつ H4K20me1 修飾が起きることが必須であることが示唆されました。

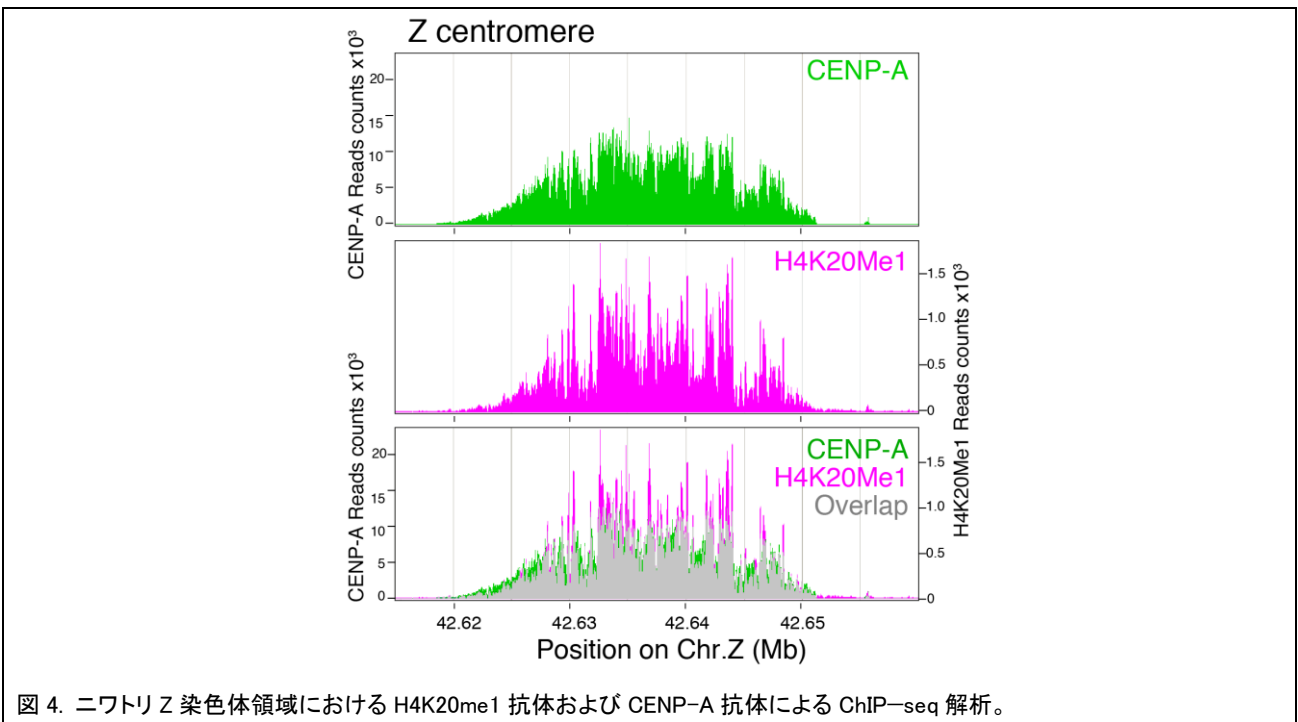


図 4. ニワトリ Z 染色体領域における H4K20me1 抗体および CENP-A 抗体による ChIP-seq 解析。

◆ H4K20me1 修飾は CENP-A ヌクレオソームで起きる

ヒストンは 8 個がひとまとまりとなり、それに DNA が巻き付いています (ヌクレオソーム: DNA とヒストンタンパク質複合体、図 2)。この 8 個のヒストンは、H2A、H2B、H3、H4 の 4 種類のヒストンが 2 つずつで構成されます。CENP-A は、ヒストン H3 の一種であり、ヒストン H3 の代わりに取りこまれます。これまでの研究から、CENP-A はセントロメア領域に必須ですが、セントロメア領域はこの CENP-A 型ヌクレオソームのみで占められているのではなく、H3 型のヌクレオソームも存在することが示唆されています。したがって、セントロメア領域で検出された H4K20me1 修飾は、H3 型のヌクレオソームの H4 で起きているのか、それとも CENP-A 型ヌクレオソームの H4 で起きているかどうかを解析することは極めて重要と考えられます。我々は生化学的手法を用いて解析した結果、H4K20me1 修飾は、CENP-A を含んだヌクレオソームで主に起きることを明らかにすることができました。

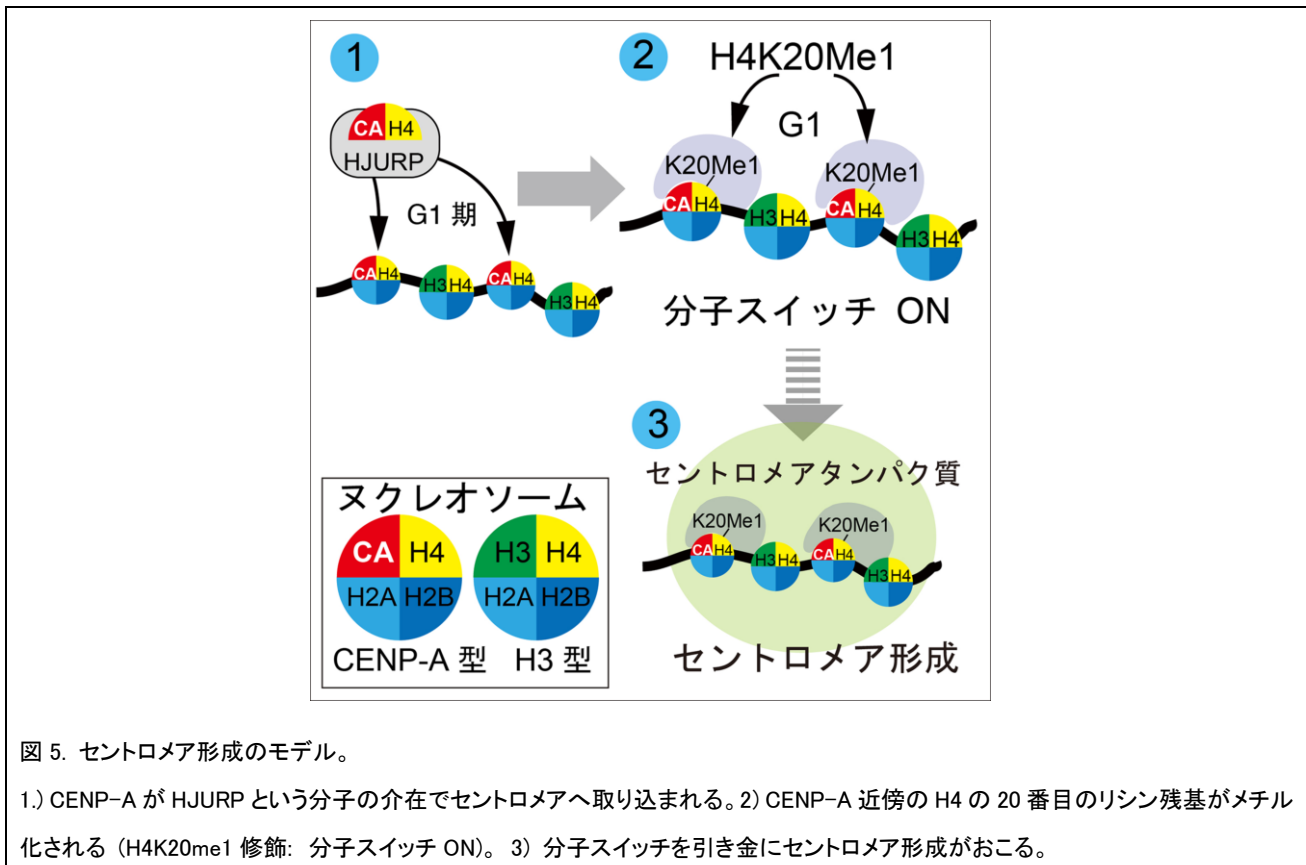


◆ H4K20me1 修飾はセントロメア形成に必須である

最後に、この H4K20me1 修飾がセントロメア形成にどのように関わるかを解析しました。これを調べるため、セントロメア領域の H4K20me1 修飾がおきなくなるようにできる実験法を開発しました。染色体工学を活用した実験方法によって、H4K20me1 修飾の脱メチル化酵素をセントロメア領域に特異的に配置させました。その結果、セントロメア領域の H4K20me1 修飾を特異的になくすことに成功しました。

セントロメア領域で H4K20me1 修飾が起きない細胞では、セントロメア形成の目印となる CENP-A は存在しました。しかし、セントロメア上に構築される構造体(キネトコア)のタンパク質である CENP-H や CENP-T (Hori et al., 2008, Cell) が局在しなくなることがわかりました。CENP-H や CENP-T が存在しないとセントロメアの機能が失われ、細胞分裂時の染色体の分配に異常が生じる例が多数観察されました。この実験により、H4K20me1 修飾は、機能的なセントロメア形成に必須であると結論できました。

これらの実験結果から考察し、「セントロメア領域に CENP-A が取り込まれた後にすぐに CENP-A 型ヌクレオソームの H4 の 20 番目の Lys 残基がメチル化される。そして、このメチル化が分子スイッチとして働き、CENP-T や CENP-H の集合を促して機能的なセントロメアが形成される」というモデルが提出できます(図 5)。



セントロメアの形成に CENP-A が重要であることは、多くの研究グループによりすでに指摘されていますが、CENP-A が取り込まれるだけではセントロメア形成には十分ではありません。これでは、画竜点睛を欠き、重要な仕上げの一筆が足りないのです(図 6: Dev Cell 誌の表紙)。H4K20me1 という分子スイッチがオンになると、はじめて、セントロメア形成が起こることを、今回の論文で明らかにすることができました。

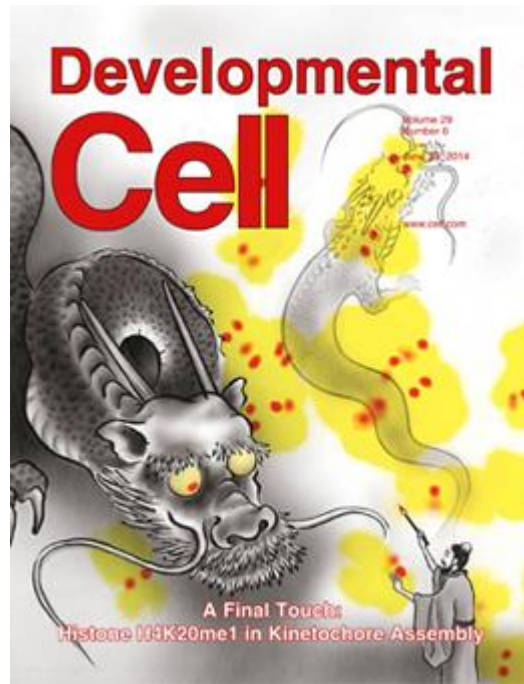


図 6. 今回の掲載誌の表紙。画家がキャンバスにむけて竜の絵を書いている。目に最後の一笔をいれると竜がキャンバスからとびだす。このコンセプトは、H4K20me1 による分子スイッチによりセントロメア形成が達成されるというコンセプトと類似している。

#### <研究体制と支援>

今回の研究は、遺伝研セルイノベーションプロジェクト（池尾 Group）、ROIS 融合プロジェクト（藤山 Group）、大阪大学 木村 Group、エジンバラ大学 Earnshaw Group との共同研究で行われました。

この研究は、科学研究費補助金基盤研究（S）、JST 戦略的創造研究推進事業さきがけの支援により行われました。

#### <問い合わせ先>

国立遺伝学研究所 分子遺伝研究系 分子遺伝研究部門 教授 深川竜郎（ふかがわ たつお）

国立遺伝学研究所 広報 室長 鈴木睦昭（すずき むつあき）