特集:観て考える、考えて観る―細胞内オルガネラの空間構造変化

ヒト人工染色体から見た染色体制御機構

舛本 寛,岡田晃明

ヒトセントロメア領域に由来する反復 DNA 配列を細胞へ導入し,宿主染色体に組込ま れることなく安定に複製され,細胞分裂時に本来の染色体と同じメカニズムで分配され る,このような人工染色体を新規形成させることはヒト及びマウスの一部の培養細胞で実 際に可能である.この人工染色体により哺乳類細胞でもセントロメア構造形成機構や染色 体,クロマチンの基本制御のメカニズムを細胞内で限定された DNA 配列をもとに解析す ることが可能になった.人工染色体を用いたクロマチン構造解析から,同じ DNA 配列上 にセントロメアからヘテロクロマチン構造まで異なる機能を持つクロマチン構造がダイナ ミックに形成される興味深い結果も得られ始めた.

1. セントロメアの機能構造と構成タンパク質因子群

細胞分裂の過程で染色体の分配制御に関わるのがセント ロメアである. セントロメアは M 期染色体のくびれ部分 (一次狭窄)に位置し、それぞれの染色分体のセントロメ ア外側部に沿ってキネトコアと呼ばれる層状構造体が形成 される (図1). ここに紡錘体の微小管が結合する. キネ トコアは、内層には CENP-A、-B、-C、-H、hMis6 (CENP-I), CENP-K~-U などが分布し^{1,2)}, その外層には CENP-F, キネシン (CENP-E),ダイニンなどの微小管モーター機能 に関わるタンパク質が分布することが示されており、微小 管との相互作用により染色体の動きを制御する構造体であ る³. キネトコアの最外層には Mad2 や BubR1 などの分裂 期チェックポイントタンパク質も集合し, 分裂中期にすべ ての染色体が分裂赤道面に並ぶまで、各姉妹染色分体の分 離や細胞周期の分裂後期への移行を阻害している. キネト コアと微小管が相互作用し染色体が全て赤道面に並ぶとこ のチェックが解除され、セントロメアの内側で最後まで維

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻(〒464-8602 名古屋市千種区不老町) 持されていた姉妹染色分体接着因子コヒーシンが分解され て各染色分体が一斉に分離する.セントロメア外側のキネ トコアは微小管との相互作用を検知し染色体移動の力を作 り出し,セントロメア内部では両キネトコアからの張力を 感知してコヒーシン分解のタイミングをコントロールす る.このようにセントロメアの外側と内側での機能が協調 してチェックポイント機構により制御されることで,ヒト では46本ある染色体は二つの娘細胞へと均等に分配され る.

もっとも単純なセントロメア構造を維持していると考え られている出芽酵母でも 65 種を超えるタンパク質因子が セントロメアに集積して複合機能領域を形成していると考 えられており、これらのうちの多くはヒトでも保存されて いる4. これらタンパク質因子群の中でもセントロメア特 異的ヒストン H3 である CENP-A は酵母からヒトまで保存 されており, CENP-A 遺伝子のノックアウトや RNAi を用 いたノックダウンにより他の多くのセントロメア・キネト コアタンパク質のセントロメアへの集合が検出できなくな ることから、セントロメア構造形成において特に重要視さ れている (図 1)^{5,6)}.機能するセントロメアを構成する因 子がどのような順序で集合するのかについては,プロテオ ミクスと RNAi を用いた解析により一部で解析が進んでき ている^{1,2,7,8}. 最近になり, CENP-A は DNA の複製に直接 依存せずに G₁ 初期にセントロメアに補充され,この補充 \mathcal{C} \mathcal{L} \mathcal{L} , CENP-H, -I, RbAp 48, hMis 16, hMis 18 α , β ,

Chromosome assembly controls: a perspective from the observation of human artificial chromosomes

Hiroshi Masumoto and Teruaki Okada (Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464–8602, Japan)



全ての正常なヒト染色体ではセントロメアは高度反復配列のαサテライト(アルフォイド)DNA 領域に 形成維持されている.セントロメアの両外側部にはキネトコア構造が形成され微小管との相互作用で染色 体の動力を作り出し、セントロメアの内部にはヘテロクロマチン構造が形成され姉妹染色分体の接着分離 のタイミングをコントロールする.

hMis18BP 等が関わっていることが明らかになってきた(図 6)^{1,9,10,11)}.ところがセントロメア集合の決め手となる CENP-A クロマチンはセントロメアの何を識別してこの部 位に集合・維持されているのかについては不明な点が多く 残されたままである.他のヒストンと同様に CENP-A 自 体には特異的 DNA 結合活性は見つかっていない¹²⁾.

セントロメア DNA はセントロメアを決める情報を 保持しているのか?

セントロメアの DNA 配列は生物種ごとに大幅に異な る.酵母では、出芽酵母と分裂酵母の間でも、セントロメ アとして機能する DNA 配列や構造は大幅に異なる.とこ ろが同じ種内に限って見れば染色体の違いにかかわらず類 似の DNA 構造や配列がセントロメアの下地を形成してい る.どちらの酵母でも裸のセントロメア DNA をそれぞれ の種の細胞へ導入すると新たに機能するセントロメア構造 を形成する能力がある^{13,14)}.これを用いて実用的な酵母の 人工染色体 (YAC) が構築された (図 2).正常なヒトの 全ての染色体セントロメア領域には約 170bp の反復単位が 繰り返す α サテライト (アルフォイド) DNA のファミリー が分布している (図 1, 3A).アルフォイド DNA ファミ リーの分布と上記セントロメアタンパク質群の分布が重な る観察結果から¹⁵⁾,アルフォイド DNA のセントロメア機 能への関与が示唆されてきた.染色体末端を保護するテロ メア配列を染色体へ挿入するとその部分で末端を形成し染 色体切断を引き起こす.この方法を利用してミニ染色体の 構築が試みられた(図2:ミニ染色体)¹⁶⁾.安定維持される ミニ染色体には必ずアルフォイド DNA が含まれていた. しかしこの方法ではこれ以外の配列がセントロメア機能に 関わっているかどうかについては完全には証明できていな い.

ヒト 21 番染色体セントロメア DNA 領域には性質の異 なる二つの巨大アルフォイド DNA 領域, α 21-I(I型)と α 21-II(II型)が隣接して存在する(図3A)¹⁵⁾.このうち α 21-I は, 171 bpのアルフォイド基本単位が 11 回繰り返 す高次繰り返し単位を形成し,この高次繰り返し単位がさ らに均一に繰り返し約 1.3メガ塩基対(Mbp)の領域を形 成している. α 21-I は,セントロメア構成タンパク質の一 つ CENP-B の結合配列(CENP-B box)も高頻度で出現す る(図3A). α 21-II は多様性に富むアルフォイド基本単位 を中心に構成され,CENP-B box は検出されない.それぞ れの 70kb-100kbのアルフォイド配列を酵母人工染色体



図2 酵母人工染色体(YAC)とヒト人工染色体(HAC)構造の模式図 ヒト人工染色体は、天然の染色体にテロメア配列(TEL)を挿入させて染色体断片化を繰り返し作成したミ ニ染色体タイプのものと、セントロメア(CEN)、TEL、各種遺伝子を線状のYAC 或いは環状のBAC(大腸 菌人工染色体)ベクターへ組込んだ後このDNA をヒト培養細胞へ導入し作成したタイプのものの2種類が 存在する.

(YAC) ベクター (図 2) ヘクローン化し、この YAC DNA をヒト培養細胞(HT1080)へ導入し,形質転換細胞が得 られた(図 3A). I型アルフォイド(α21-I) DNA を導入 した株では、導入 DNA 分子が 30 コピー前後増幅し末端 同士で1本のDNAとしてつながり、非選択培地での長期 培養でも安定に複製・分配維持されるヒト人工染色体が高 頻度で形成された^{17,18)}.この人工染色体上には CENP-A, -B, -C, -E等が集合し機能するセントロメア構造が形成 されていた (図 3A).ところが II 型アルフォイド (α21-II) DNA では、人工染色体は形成されず、導入 DNA は宿主 染色体へ挿入され、セントロメアタンパク質の集合は起こ らなかった (図 3A). ヒトでも機能する複雑なセントロメ ア構造が I 型アルフォイド DNA 配列に依存して新規に形 成されるメカニズムが確かに存在する.これまでに, BAC 等の環状ベクターにクローン化しても,5番,17番, 21番,X染色体に由来するI型アルフォイド DNA 配列は セントロメア機能構造や人工染色体を形成する能力がある

が¹⁹⁾, CENP-B box に変異を導入した合成 I 型アルフォイ ド DNA, CENP-B box を含まない II 型アルフォイド DNA や Y 染色体アルフォイド DNA にはこの能力は検出されて いない^{20,21)}. それでは, CENP-B box を含む I 型アルフォ イド DNA 配列の存在はセントロメア機能に1:1で対応 しているのか? 次に述べる現象から, ヒト細胞では答え は no である.

3. セントロメアのエピジェネティックな現象

セントロメアにはエピジェネティックな現象も知られて いる.染色体同士が末端で融合した場合,融合染色体上に セントロメアが2個生じることになる.このうち片方のセ ントロメア機能がI型アルフォイド DNA や CENP-B が存 在しても不活性化する現象が報告されている²²⁾.さらに驚 くのは断片化により本来のセントロメア領域から分断され た染色体腕断片上に,ごく希に CENP-B 以外のほとんど のセントロメアタンパク質成分が集合し機能するセントロ 2008年 3月〕



図3 ヒト21番染色体及びマウス染色体セントロメアの DNA 構造とヒト人工染色体の構築を示した模式図 (A)ヒト21番染色体セントロメア領域には I 型と II 型の二つのアルフォイド領域(α21-Iとα21-II)が存在する.α21-I 由来 YAC を導入して得られた形質転換細胞株中に CENP-A, -B, -C, -E が集合しセントロメア機能を持つヒト人工染色体が高い効率で形 成された^{I7,180}.(B)マウス染色体セントロメア領域にはマイナーとメジャーの2種類のサテライト DNA が存在する.マイナーサ テライト DNA はセントロメア機能タンパク質の分布と一致し、メジャーサテライト DNA はヘテロクロマチンの分布と一致す る.CENP-B 結合配列(CENP-B box)はマイナーサテライト DNA とヒト I 型アルフォイド DNA にのみ保存されている.ヒト I 型アルフォイド(α21-I:緑)をマウス胎児線維芽細胞に導入しても、セントロメア機能を保持する人工染色体を形成する.マ ウスマイナーサテライト DNA(赤).

メアを作り出す「ネオセントロメア」の現象も発見されて いることである²³⁾.このような現象の発見により,セント ロメア構造や機能維持にはエピジェネティックなクロマチ ン構造の変換や維持機構が関わっていることが示唆されて いる.しかし,クロマチン構造だけに依存してしまえばセ ントロメア機能も必要以上に変化する可能性も否定できな い.実際に CENP-A を過剰発現するとセントロメアに限 らず染色体腕全体に分布するようになる²⁴⁾.さらに CENP-A クロマチンが特定遺伝子上に集合すると,ヒストン H3 修飾に依存する遺伝子の発現制御に微妙な影響が生じる可 能性は否定できない.また,一旦セントロメアの部位がネ オセントロメアにより染色体の違う部位にずれてしまう と,減数分裂での組換え機構に問題が生じる.減数分裂で の組換え機構が抑制されない限り、ネオセントロメアを持 つ個体と元のセントロメアを持つ個体との交配では、2個 セントロメアを持つ染色体やセントロメアのない染色体の 出現が頻発することになる.セントロメアのない染色体の 出現が頻発することになる.セントロメアをゲノムの特定 部位にリンクさせることには、このような異常を生じさせ ない利点がある.種ごとに違うセントロメア DNA 配列も 同じ種内に限って見れば染色体の違いにかかわらず類似の DNA 構造や配列がセントロメアの下地を形成しているこ とや、酵母やヒトのセントロメア DNA 配列には新規にセ ントロメア構造を集合させる能力があることを考慮する と、それぞれの種はセントロメア構造とセントロメア DNA をリンクさせる方法を独自に進化させてきたと考え るのが妥当である.

4. ヒト人工染色体のセントロメア機能

導入 DNA の単純繰り返しからなるヒト人工染色体は細胞分裂の過程で安定維持されているが,本来の染色体と同じ分配様式で維持されているのだろうか?

個々のヒト人工染色体の細胞分裂当たりの安定性は多少 幅があり 98.4-99.9% である. Lac オペレーター配列をヒ ト人工染色体ベクターに組込み GFP-Lac リプレッサーの 結合を標識として用い、ヒト人工染色体の分配過程が蛍光 顕微鏡下で連続観察された²⁵⁾. 天然のヒト染色体と同様に 人工染色体は:1) 分裂前中期に紡錘体赤道面に並ぶ.2) 分裂中期には両極からのびる紡錘糸との相互作用による張 カバランスを保つメカニズムを有する.3)分裂後期への 移行に伴って他の染色体と同じタイミングで姉妹人工染色 分体の分離(コヒージョンの解除)が起こる.4)他の染 色体分体と同じ速度でそれぞれの紡錘体極に向かって移動 するモーター機能を保持する.5)核膜再形成時にそれぞ れの姉妹核に取り込まれる. これらは現在考えられている セントロメアとしての機能のほぼ全てを人工染色体が有し ていることを意味し、導入アルフォイド YAC/BAC DNA の単純繰り返し構造上にこれらの機能を満たすセントロメ ア・キネトコアタンパク質群が自律的に集積可能であるこ とを示している.残念ながら、このGFP人工染色体の生 細胞での観察からは、1.6-0.1%の希な脱落がどのように して起こるかは解明できていない.

5. ヒト人工染色体と天然染色体セントロメアの クロマチン構造

ヒト人工染色体クロマチン構造を解析した研究から, CENP-A クロマチンがアルフォイド DNA 上へ優先的に集 合し、この領域にキネトコアが形成されることが分かった (図 4A: 70kb アルフォイド HAC). 右ベクターアームの 薬剤耐性マーカー遺伝子上にはアセチル化ヒストン H3 が 集合するユークロマチンが形成され、転写単位を持たない 左ベクターアーム側にはヘテロクロマチンタンパク質(ト リメチル化ヒストンH3-K9;H3K9me3やHP1α)が集合 していた26) 最近のヒトの染色体のセントロメアクロマチ ン構造解析から、CENP-AはI型アルフォイドDNA 全域 に均一に集合しているのではなく, CENP-A の集合領域 (CENP-A クラスターと略す)とヒストンH3の集合領域 (H3 クラスターと略す)が混在した構造になっていること も明らかにされた(図1)27.しかし均一に繰り返す反復 DNA 領域にどのようなメカニズムでこのように違うクロ マチンのクラスターが混在するようになるのかは不明なま まである.クロマチン免疫沈降法 (ChIP) によるクロマ チン構造の解析結果は、導入アルフォイド YAC DNA が 数10コピー繋がった構造からなる人工染色体も、アル

フォイド DNA 上の CENP-A クラスターがベクターアーム 上の H3 クラスターで分断される構造になっていることを 示唆している²⁸. 実際にファイバー状に引き延ばした人工 染色体の蛍光抗体観察では CENP-A がクラスター状に点 在しており²⁹, この考え方を支持している. つまり天然の ヒト染色体と人工染色体のセントロメアクロマチン構造は 結果的には驚くほど一致していることになる(図 1, 4A). このようなエピジェネティックなクロマチンの集合メカニ ズム解明にも人工染色体は威力を発揮する.

人工染色体前駆体アルフォイド YAC の左ベクターアー ムへ転写可能な第2の遺伝子マーカーを挿入すると、人工 染色体形成能が失われた(図4A:70kbアルフォイド HAC). しかし、第2の遺伝子マーカーからの転写活性は CENP-Aの集合に対して負に作用することはなかった²⁶⁾. 分裂酵母ではヘテロクロマチンタンパク質 HP1 (Swi6) は 姉妹染色分体接着因子コヒーシンと直接相互作用可能であ る³⁰⁾.マウスでもヘテロクロマチンは姉妹染色分体の接着 維持に必要である³¹⁾.人工染色体でも姉妹染色分体の接着 維持機構は機能しているが,両ベクターアームに転写単位 を挿入し、ユークロマチンが両アームに形成された場合は アルフォイド配列上への CENP-A/キネトコアの集合は促 進できても、ヘテロクロマチンの集合とは両立できなかっ たものと考えられる。このことから人工染色体形成にはセ ントロメア形成と同時にヘテロクロマチン形成も起こる必 要性のあることが示唆された.

セントロメア機能に必須な CENP-A クラスターの 最小単位

機能に必須な CENP-A クラスターにはどの程度のサイ ズが必要であるのかについて、人工染色体前駆体 YAC の 挿入アルフォイド DNA のサイズを変化させて調べられ た³²⁾. その結果, 30kb アルフォイド YAC からはセントロ メア機能を保持する HAC が形成されるが、10kb アルフォ イドYACからはHACが形成されないこと.また、30kb アルフォイド YAC から形成された HAC の CENP-A はア ルフォイド DNA から左ベクター配列上へ必ず数 kb 分は み出して(図4A:30kbアルフォイドHAC)分布してい ることも明らかになった. 10kb アルフォイド YAC を細胞 へ導入すると宿主染色体へ挿入されてしまい、この挿入部 は高レベルの H3K9me3 で覆われて, CENP-A は集合でき ない(図4A:10kbアルフォイドYAC挿入部). ところが ヒストンデアセチラーゼ阻害剤 (トリコスタチン A:TSA) で細胞を処理すると、10kb アルフォイド DNA 挿入部から H3K9me3のレベルは低下して一過的な CENP-A 集合が起 こること、このように10kbと短いCENP-Aクロマチンの 集合ではセントロメア機能を獲得できないこと、さらに TSA を除いて培養を続けると、CENP-A クロマチンは失わ



図4 ヒト人工染色体(HAC)及びアルフォイド DNA の異所的染色体挿入部における ChIP によるクロマチン構造解析結果の模式図 (A) HAC では CENP-A クロマチンはアルフォイド DNA 上へ集合し,薬剤耐性遺伝子(bsr)の存在する右ベクターアームにはユー クロマチン(H3K9Ac)が集合し,左ベクターアームにはヘテロクロマチン(H3K9me3)が集合する.これらクロマチンの繰り返 し構造から人工染色体は形成される²⁶.30kb アルフォイド DNA からなる HAC では CENP-A クロマチンはアルフォイド DNA 上へ 集合後,YAC ベクター配列へはみ出して(矢印)セントロメア機能を持つ最小単位を形成する²⁰.10kb アルフォイド YAC の染色 体腕挿入部へは H3K9me3 の高レベルの集合が起こりヘテロクロマチンが形成される.(B) 240kb アルフォイド BAC は HAC を形成 することができるが,染色体挿入部位では H3K9me3 の高レベルの集合が起こる.(C) アルフォイド 11mer 単位中の5 個の CENP-B box のうち4 個まで変異型の CENP-B box に置き換えた配列では,CENP-A は,1 個の CENP-B box を含むアルフォイド DNA 上に は低レベルで集合できるが,このような部分的な CENP-A クロマチンは CENP-B box 変異型アルフォイド DNA 上へは有効に広が らず,セントロメア機能単位を形成できない.

れ再び高レベルの H3K9me3 で覆われてしまうこと,など が明らかになった.アルフォイド DNA のサイズを 240kb に長くしても HAC 形成効率は上がらなかった (図 4B). さらに,α21-I アルフォイド 11mer 単位中の 5 個の CENP-B box のうち 4 個まで変異型の CENP-B box に置き換えた 配列では 60kb のサイズでも人工染色体を形成できない(図 4C).その染色体挿入部位を解析すると,1 個の CENP-B box を含むアルフォイド DNA 上には低レベルではあるが CENP-A が集合できることが判明した.しかし,このよう な部分的な CENP-A クロマチンは CENP-B box 変異型アル フォイド DNA 上全体へは有効に広がらず,セントロメア 機能単位を形成できなかった.

これらの結果により, HAC 形成およびセントロメア形 成に必要なアルフォイド DNA の最小サイズは 30kb であ ること, 30kb より少し大きいサイズの CENP-A クラス ターがセントロメア単位のコアとして機能している可能性 が高いこと, CENP-B box の密度も CENP-A クラスター形 成に重要な要素であることなどが明らかとなった. CENP-



図5 (A)CENP-B box を含むヒトアルフォイド DNA をマウス胎児由来線維芽細胞へ導入すると安定に分配される 人工染色体形成が CENP-B 遺伝子の存在(+/+)に依存して形成される³³.(B)ChIP によるクロマチン構造 解析から,ヒトアルフォイド DNA を CENP-B 遺伝子ノックアウトマウス胎児由来線維芽細胞(-/-)へ導 入すると,CENP-B の発現,結合に依存して CENP-A クロマチンの集合が起こる.一方,マウス染色体ヘヒ トアルフォイド DNA が挿入された場合,CENP-A クロマチンもヘテロクロマチンも形成されないが,CENP-B の発現,結合に依存して高レベルの H3K9me3(ヘテロクロマチン)化がアルフォイド DNA 上で誘導され る.(C)全く同じ配列が続くサテライト DNA の巨大繰り返し領域内でも,CENP-B が高頻度で結合すると異 なるクロマチン構造(セントロメアクロマチン或いはヘテロクロマチン)をその状況に応じて形成すること が可能である.

B box に結合する因子である CENP-B の CENP-A 集合機構 への関わりがさらに重要性を増してきた.

CENP-B はサテライト DNA 上へのセントロメア機能 形成を調節する

CENP-BとCENP-B boxの相互作用はマウスセントロメ アの繰り返し配列であるマイナーサテライトDNA中にも 保存されている(図 3B).ところが、哺乳類では高度に保 存されているCENP-B遺伝子であるが、ノックアウトマ ウスは致死ではないことが報告された(ただし、ノックア ウトの雌は繁殖能力が低下する.)³⁵⁾.CENP-Bは染色体分 配機能に直接は関わっていないのだろうか? これは CENP-B boxは新規にセントロメア形成や人工染色体形成 が起こるためには必要であるとする人工染色体の形成実験 からの結果と大いに矛盾する.そこで、CENP-Bノックア ウトマウス胚線維芽細胞(MEF CENP-B-/-)株を用い

て CENP-B の機能解析が行われた (図 5A)³³⁾. CENP-B box を含んだヒト合成アルフォイド DNA を野生型マウス胚線 維芽細胞(CENP-B+/+)株へ導入すると、マウス細胞 でも異種セントロメア DNA 配列をベースに人工染色体形 成と機能的セントロメア形成が起こった(図3B, 5A). このアルフォイド DNA を CENP-B-/-株へ導入した場合 には人工染色体形成は起こらなかった.また細胞へ導入し た初期の段階でのアルフォイド DNA 上へのクロマチン構 造形成を ChIP 解析した結果, CENP-B-/-株ではプラス ミド導入により発現させた CENP-B のアルフォイド DNA への結合反応に依存して、マウス CENP-A の集合が回復 した (図 5B). 一方アルフォイド DNA が宿主染色体上に 挿入された部位においては、ヘテロクロマチン様修飾の H3K9me3 が CENP-B の結合に依存して大幅上昇した(図 5B). さらにヒストン H3-K9 へのメチル化修飾酵素である Suv39h1/2のダブルノックアウトマウス胚線維芽細胞



図6 (A)アルフォイド DNA への CENP-B の結合は,新規に CENP-A ク ロマチンを集合させセントロメア構造形成を促進する³⁴⁾. 一方で, 染色体へ挿入されたアルフォイド DNA に対して, CENP-B の結合 は H3K9me3 化を促進しヘテロクロマチン構造形成を行う. 機能す るセントロメアでは外側部のキネトコア構造と内側部のヘテロク ロマチン構造のバランスのとれたクロマチン構造形成が必要であ る. 二つの拮抗するクロマチン構造形成を促進する CENP-B の能 力は,導入 DNA 上での機能するセントロメア構造形成を新規に 誘導するために必要である. (B)しかし,一旦このようなセント ロメア,ヘテロクロマチンの構造が形成されると,CENP-B によ るゲノム DNA へのリンク機構が無い状態でも,クロマチン構造 の維持メカニズムにより,セントロメア,ヘテロクロマチン構造 は維持されていると考えられる.

(Suv39h dn)株を用いて解析した結果,Suv39h dn株にお けるアルフォイド DNA 挿入部のH3K9me3 レベルは大幅 に低下することが判明した.これらの結果は,CENP-B は、サテライト DNA 上へのCENP-A ヌクレオソームの集 合を促進し、セントロメア形成に対して正の制御に関わる とともに、一方では、H3K9me3 クロマチンを形成しセン トロメア形成に対して負に制御(不活性化)しヘテロクロ マチン化する機能があることを示している(図5B, 6A). このCENP-Bの拮抗する二つの機能は、サテライト DNA のセントロメアとしてのダイナミックな機能調節を説明可 能にし、セントロメアはこのようなクロマチン構造形成バ ランスの上に成り立っていることを示唆している(図5B, 6 A).

機能するセントロメアでは外側部のキネトコア構造と内 側部のヘテロクロマチン構造のバランスのとれたクロマチ ン構造形成が必要である.実際に人工染色体が形成された 場合,セントロメアクロマチンとヘテロクロマチンが両方 バランスよく形成されている(図3A,5B,C).CENP-B や CENP-B boxの存在しない条件では人工染色体は形成さ れないし,高レベルのヘテロクロマチンが集合することも なかった.二つの拮抗するクロマチン構造形成を促進する CENP-B の能力は,導入 DNA上での機能するセントロメ ア構造を新規にバランスよく形成するために必要であると 考えられる(図5B,C,6A).しかしながら,ノックアウ トマウスでもセントロメア機能が維持されていることを考 慮すると,一旦機能するセントロメア,ヘテロクロマチン の構造が形成されると,CENP-B が存在しない条件でも, クロマチン構造の維持メカニズムにより,セントロメア, ヘテロクロマチン構造は維持されているものと考えられる (図 6B).

8. セントロメア機能と CENP-A クロマチン集合機構

人工染色体を用いた解析から,GC含量 60% のプラス ミド由来 DNA に CENP-B box をつないで繰り返した合成 DNAには、CENP-B が結合しても CENP-A は集合できな い²⁰⁾. CENP-A ヌクレオソームの安定な集合にはクロマチ ン形成機構や CENP-B box 以外にも AT に富むアルフォイ ド配列中(AT 含量>60%)の何かも関わっている。前述 のようにセントロメアの DNA 配列は生物種ごとに大幅に 異なるが,唯一共通な点として,いずれもAT含量が 60%以上であることが挙げられる. CENP-Bと CENP-A との直接の分子間相互作用は検出できなかったことから, CENP-Bを介して別の因子が作用して CENP-A ヌクレオ ソームの集合を促進している可能性も存在する.また、同 ーアルフォイド配列上でも CENP-B の結合は, CENP-A の 集合促進あるいは H3K9me3 (ヘテロクロマチン)の集合 促進という拮抗するクロマチン構造をダイナミックに調節 していることが明らかになってきた. 遺伝子の on/off が クロマチンの構造変換により制御されるように、CENP-A ヌクレオソームが通常のヒストンH3 ヌクレオソームに置 き換えられる機構が確かに存在する. セントロメアがエピ ジェネティックに不活性化される現象はCENP-Bの調節 機能により説明可能になってきた. このようなセントロメ アの不活性化が、遺伝子の on/off について多様な制御が なされる動物細胞で見つかっている点も非常に興味深い.

セントロメア機能が CENP-A クロマチンの形成機構に 依存していることから起こるエピジェネティックな維持機 構と変化する可能性, CENP-A クロマチンと拮抗するヘテ ロクロマチンの集合,また種独自の DNA 配列に依存した セントロメアのゲノム DNA へのリンク機構(図 5B, 6A), これらのメカニズムが複雑に関与しながらセントロメアが 形成され,維持されていく.このこと自体が生物種の進化 と種の独立とも深く関わっているものと考えられる.

おわりに

筆者らは、すでに次世代の人工染色体としてテトラサイ クリンオペレーター配列(tet-O)をアルフォイド繰り返 し配列中に組込んだ人工染色体を構築し、テトラサイクリ ンリプレッサー(tet-R)融合タンパク質の結合によりクロ マチン構造をダイナミックに変化させセントロメア機能そ のものを変換させることに成功している。天然のヒトセン トロメアは巨大な反復配列中に形成維持されているため、 このようなダイナミックなクロマチン集合バランスの上に 成り立つセントロメアの解析には多大な困難を伴うが、こ のtet-O人工染色体システムはセントロメアやヘテロクロ マチンの集合バランスがどのような因子によって調節或い は影響を受けるかについて解析を進めるには極めて有効で ある.アルフォイド DNA への CENP-A 集合メカニズムの 解明は、導入 DNA 配列上へのセントロメアの集合活性を 高める方法開発へとつながる.導入 DNA へのヘテロクロ マチンの集合を限定して起こすことと、セントロメアや転 写可能なクロマチンの集合とが両立できれば、ヒト人工染 色体形成活性を大幅に高めることも可能となる.人工染色 体研究は染色体基本機能の研究そのものであり、この総和 でもある.これらの基本機能研究は遺伝子導入ベクターと しての実用性を備えた次世代人工染色体の開発にも直結す る.

文 献

- Okada, M., Cheeseman, I.M., Hori, T., Okawa, K., McLeod, I. X., Yates, J.R. 3rd, Desai, A., & Fukagawa, T. (2006) *Nat. Cell Biol.*, 8, 446–457.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E., Back, B.E., Bailey, A.O., Yates, J.R., 3rd & Cleveland, D.W. (2006) *Nat. Cell Biol.*, 8, 458–469.
- Maiato, H., DeLuca, J., Salmon, E.D., & Earnshaw, W.C. (2004) J. Cell Sci., 117, 5461–5477.
- Kitagawa, K. & Hieter, P. (2001) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2, 678–687.
- Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., Mac-Donald, A.C., Kalitsis, P., & Choo, K.H. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 1148–1153.
- Goshima, G., Kiyomitsu, T., Yoda, K., & Yanagida, M. (2003) J. Cell Biol., 160, 25–39.
- 7) Izuta, H., Ikeno, M., Suzuki, N., Tomonaga, T., Nozaki, N., Obuse, C., Kisu, Y., Goshima, N., Nomura, F., Nomura, N., & Yoda, K. (2006) *Genes Cells.*, 11, 673–684.
- Liu, S.T., Rattner, J.B., Jablonski, S.A., & Yen, T.J. (2006) J. Cell Biol., 175, 41–53.
- Furuyama, T., Dalal, Y., & Henikoff, S. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 6172–6177.
- Hayashi, T., Fujita, Y., Iwasaki, O., Adachi, Y., Takahashi, K., & Yanagida, M. (2004) *Cell*, 118, 715–729.
- Fujita, Y., Hayashi, T., Kiyomitsu, T., Toyoda, Y., Kokubu, A., Obuse, C., & Yanagida, M. (2007) *Dev. Cell*, 12, 17–30.
- 12) Black, B.E., Brock, M.A., Bédard, S., Woods, V.L. Jr, & Cleveland, D.W. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 5008–5013.
- Fitzgerald-Hayes, M., Clarke, L., & Carbon, J. (1982) Cell, 29, 235–244.
- 14) Hahnenberger, K.M., Baum, M.P., Polizzi, C.M., Carbon, J., & Clarke, L. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 577–581.
- 15) Ikeno, M., Masumoto, H., & Okazaki, T. (1994) Hum. Mol. Genet., 3, 1245–1257.
- 16) Heller, R., Brown, K.E., Burgtorf, C., & Brown, W.R. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7125–7130.
- 17) Ikeno, M., Grimes, B., Okazaki, T., Nakano, M., Saitoh, K., Hoshino, H., McGill, N.I., Cooke, H., & Masumoto, H. (1998) *Nat. Biotechnol.*, 16, 431–439.
- 18) Masumoto, H., Ikeno, M., Nakano, M., Okazaki, T., Grimes, B., Cooke, H., & Suzuki, N. (1998) *Chromosoma*, 107, 406– 416.
- 19) Ebersole, T.A., Ross, A., Clark, E., McGill, N., Schindelhauer, D., Cooke, H., & Grimes, B. (2000) *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1623–1631

- 20) Ohzeki, J., Nakano, M., Okada, T., & Masumoto, H. (2002) J. Cell Biol., 159, 765–775.
- 21) Grimes, B.R., Rhoades, A.A., & Willard, H.F. (2002) Mol. Ther., 5, 798–805.
- 22) Earnshaw, W.C., Ratrie, H. 3rd & Stetten, G. (1989) Chromosoma, 98, 1–12.
- 23) Warburton, P.E. (2004) Chromosome Res., 12, 617-626.
- 24) Van Hooser, A.A., Ouspenski, I.I., Gregson, H.C., Starr, D.A., Yen, T.J., Goldberg, M.L., Yokomori, K., Earnshaw, W.C., Sullivan, K.F., & Brinkley, B.R. (2001) J. Cell Sci., 114, 3529–3542.
- 25) Tsuduki, T., Nakano, M., Yasuoka, N., Yamazaki, S., Okada, T., Okamoto, Y., & Masumoto, H. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, 26, 7682–7695.
- 26) Nakashima, H., Nakano, M., Ohnishi, R., Hiraoka, Y., Kaneda, Y., Sugino, A., & Masumoto, H. (2005) J. Cell Sci., 118, 5885–5898.
- 27) Blower, M.D., Sullivan, B.A., & Karpen, G.H. (2002) Dev. Cell, 2, 319–330.

- 28) Nakano, M., Okamoto, Y., Ohzeki, J., & Masumoto, H. (2003) J. Cell Sci., 116, 4021–4034.
- 29) Lam, A.L., Boivin, C.D., Bonney, C.F., Rudd, M.K., & Sullivan, B.A. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 4186–4191.
- 30) Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S.I., & Watanabe, Y. (2002) *Nat. Cell Biol.*, 4, 89–93.
- 31) Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C., & Almouzni, G. (2004) J. Cell Biol., 166, 493–505.
- 32) Okamoto, Y., Nakano, M., Ohzeki, J., Larionov, V., & Masumoto, H. (2007) *EMBO J.*, 26, 1279–1291.
- 33) Okada, T., Ohzeki, J., Nakano, M., Yoda, K., Brinkly, B.R., Larionov, V., & Masumoto, H. (2007) *Cell*, **131**, 1287–1300.
- 34) Suzuki, N., Nakano, M., Nozaki, N., Egashira, S., Okazaki, T.,
 & Masumoto, H. (2004) J. Biol. Chem., 279, 5934–5946.
- 35) Fowler, K.J., Hudson, D.F., Salamonsen, L.A., Edmondson, S. R., Earle, E., Sibson, M.C., & Choo, K.H. (2000) *Genome Res.*, 10, 30–41.