

クロマチンリモデラーによる
セントロメアクロマチン境界の制御機構

常峰 悟

目次

| | |
|--|----|
| 要旨 | 3 |
| 第一章 序論 | 4 |
| 1-1 真核生物の染色体 | 5 |
| 1-2 セントロメアのクロマチン構造 | 6 |
| 1-3 クロマチンリモデラー | 7 |
| 1-4 セントロメアにおけるクロマチンリモデラーの機能 | 8 |
| 1-5 クロマチンリモデラーによる異所的CENP-Aの形成阻止 | 9 |
| 1-6 分裂酵母のセントロメア | 9 |
| 1-7 本研究の目的 | 10 |
| 第二章 材料と方法 | 11 |
| 2-1 分裂酵母株、培地および培養条件 | 12 |
| 2-2 抗体 | 12 |
| 2-3 蛍光顕微鏡観察 | 12 |
| 2-4 ウェスタンブロッティング | 12 |
| 2-5 MNaseによるクロマチン構造解析 | 13 |
| 2-6 クロマチン免疫沈降法 | 13 |
| 2-7 定量PCR | 14 |
| 2-8 次世代シーケンサーによるChIP-seq解析 | 14 |
| 2-9 RNA抽出および逆転写反応 | 15 |
| 表1 使用した株 | 16 |
| 表2 使用したプライマー | 18 |
| 第三章 結果 | 20 |
| 3-1 Sfh1はCENP-BホモログAbp1と相互作用する | 21 |
| 3-2 <i>sfh1-13</i> 株は染色体分配異常を示す | 22 |
| 3-3 <i>sfh1-13</i> 変異はセントロメアヘテロクロマチンに影響しない | 22 |

| | | |
|------|---|----|
| 3-4 | <i>sfh1-13</i> 変異株はCENP-Aの過剰発現下で生育遅延を示す | 23 |
| 3-5 | <i>sfh1-13</i> 変異はCENP-A ^{Cnp1} 関連遺伝子の発現に影響しない | 24 |
| 3-6 | RSCはCENP-A ^{Cnp1} の局在領域を制限する | 25 |
| 3-7 | ペリセントロメア領域の異所的CENP-Aはキネトコアタンパク質を集積させる | 27 |
| 3-8 | ペリセントロメア領域の異所的CENP-A ^{Cnp1} はキネトコアを異常拡張させる | 29 |
| 3-9 | <i>sfh1-13</i> 変異による異所的CENP-A ^{Cnp1} の拡大はセントロメア領域内に制限される | 30 |
| 3-10 | <i>sfh1-13</i> 変異株におけるHDACの欠失はCENP-Aの異所的局在を解消する | 32 |
| 3-11 | 異所的CENP-Aの解消はSnf21の局在量増加によるものではない | 34 |
| 3-12 | 異所的CENP-Aの解消は染色体分配異常を部分的に回復させる | 35 |
| 3-13 | RSCはセントロメアの境界領域にNDRの形成を誘導する | 35 |
| 3-14 | RSCはtRNA遺伝子上において不完全なヌクレオソームの形成を抑制する | 37 |
| 3-15 | RSCは境界領域において異所的CENP-A ^{Cnp1} の形成を抑制する | 38 |
| 3-16 | 境界領域における活発な転写反応はRSCの機能を代替する | 40 |
| 3-17 | 境界領域の転写反応は染色体分配異常を部分的に回復させる | 42 |
| | | |
| 第四章 | 考察 | 44 |
| 4-1 | RSCはセントロメア領域内で異所的CENP-A局在を制限する | 45 |
| 4-2 | セントロメア領域外へのCENP-Aの異所的局在は起こりにくい | 46 |
| 4-3 | RSCはNDRを誘導してセントロメアクロマチンの境界を形成する | 46 |
| 4-4 | RSCとTFIIICは境界領域において別々の境界形成因子として並立して機能する | 47 |
| 4-5 | 異所的CENP-Aはキネトコアを異常拡張させ染色体分配異常の原因になる | 50 |
| 4-6 | クロマチンリモデラーは種を越えてセントロメアの機能ドメインを制御している | 51 |
| | | |
| 文献 | | 53 |
| 謝辞 | | 61 |

要旨

セントロメアは染色体を正確に分配するうえで最も重要な染色体機能ドメインである。分裂酵母のセントロメアは、中心となる配列 *cnt* と、これを挟むように位置する逆向き配列である *imr*、およびその外側に位置する反復配列 *otr* から構成されている。*cnt*、*imr* からなる内側領域には、ヒストン H3 のセントロメア特異的なバリエーションの CENP-A (分裂酵母ホモログ Cnp1) で規定される CENP-A^{Cnp1} クロマチンが形成される。一方、*otr* からなる外側領域には、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化 (H3K9me) とそれを認識して結合するヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) で規定されるヘテロクロマチンが形成される。この異なるクロマチン構造の境界は、*imr* 内に存在する tRNA 遺伝子のクラスター近傍に位置することが知られていたが、その形成メカニズムは不明のままであった。

クロマチンリモデラーは、ヌクレオソームを形成する、解体する、動かすなどの機能を持ち、クロマチン関連の多くのプロセスで重要な役割を果たしている。本研究では、クロマチンリモデラーの 1 つ RSC (Remodeling the Structure of Chromatin) のサブユニットである *sfh1* 遺伝子の変異体の機能解析により、この変異体では CENP-A^{Cnp1} が近接するヘテロクロマチン領域に異所的に局在するようになった結果、染色体の安定性が低下することを明らかにした。CENP-A^{Cnp1} の異所的局在は、他のヘテロクロマチン領域では起こらないので、CENP-A^{Cnp1} はセントロメアの中央領域からペリセントロメア領域へ拡張すること、RSC がこの拡張に対するバリアとして機能することが推測された。更なる解析の結果、RSC は境界領域において CENP-A^{Cnp1} の異所的局在を抑えることでヌクレオソーム欠失領域 (NDR, Nucleosome-Depleted Region) の形成を誘導することを明らかにした。加えて、ヒストンの交換反応が活発に起こる転写活性遺伝子を *sfh1* 変異株の境界に挿入することで、異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在が解消すること、染色体の安定性が回復することを明らかにした。この結果から、RSC は CENP-A^{Cnp1} クロマチンとヘテロクロマチンの境界領域において CENP-A^{Cnp1} を排除して NDR の形成を誘導することで、ペリセントロメア領域における CENP-A^{Cnp1} の異所的形成を阻止していることが示された。

境界領域の NDR が、CENP-A^{Cnp1} クロマチンとヘテロクロマチンとを分離するバリアとして機能していることはこれまでの研究で示唆されていたが、その形成に関わる因子は報告されておらず、不明な点が多くあった。本研究により、RSC が CENP-A^{Cnp1} のペリセントロメア領域への拡張を防ぐ因子であることが初めて明らかになった。この結果は、クロマチンリモデラーの機能、およびクロマチンドメインの分布やその大きさを制御するメカニズムへの理解を深めることにつながる。

第一章

序論

1-1 真核生物の染色体

生命の持つ遺伝情報の本体は DNA である。真核生物は、自身の細胞の大きさと比べて、長大な DNA を持つ。このため、DNA は高度に折り畳まれ、核内に染色体として収納されている。この収納機構は、必要な遺伝情報を必要な時に必要な分だけ取り出すために、高度に組織化されている。この高度な組織化を支えているのが、染色体の階層構造である。染色体は大きく①ヌクレオソーム、②クロマチン、③機能ドメインの 3 つの階層に構造的に分類できる。

核内において、DNA はそのままの姿で存在しているわけではなく、ヒストンと呼ばれるタンパク質 8 量体に巻き付いた状態で存在している。この構造はヌクレオソームと呼ばれ、染色体構造の最小単位として扱われる。ヒストン 8 量体は、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 タンパク質の各 2 分子ずつで形成されており、全体として塩基性を示す。そのため、酸性を示す DNA が巻き付きやすいと考えられている。各ヒストンタンパク質の C 末領域はヒストンフォールドと呼ばれる構造をとり、各ヒストンタンパク質間及びヒストン 8 量体と DNA との相互作用に寄与する。一方、N 末領域は外側へ露出しておりアセチル化、メチル化、リン酸化など様々な化学修飾を受け、遺伝子発現や高次構造の形成に寄与することが明らかになっている。このヒストンの化学修飾は、ヒストンコードと呼ばれる遺伝情報の 1 つとして捉えられており、エピジェネティクスの根幹を成すものである。また、ヒストンタンパク質には様々な変異体（バリエント）が知られており、それらもヒストンコードとして考えられている。

間期の核を電子顕微鏡で観察すると、核膜の周囲と核小体の近くに濃く見える部分と、内側に広く分散して明るく見える部分とに分かれる。前者をヘテロクロマチン、後者をユークロマチンと呼び、それぞれヌクレオソームが密な領域とそうではない領域であることがその実態であった¹。研究の進展により、それぞれのクロマチンは特徴的な機能やヒストンコードを持つことが明らかになった。ヘテロクロマチンは、転写反応が不活性な領域で、ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基のメチル化 (H3K9me) や 27 番目のリシン残基のメチル化 (H3K27me) などのヒストン修飾やアセチル化レベルの低いヒストンで特徴付けられる。一方、ユークロマチンは、転写反応が活性な領域で、ヒストン H3 の 4 番目のリシン残基のメチル化 (H3K4me) やアセチル化レベルの高いヒストンで特徴付けられる。それぞれのクロマチンは、転写活性レベルを調節することで生命現象に広く影響を与えている。また、クロマチンの構造自体が生命現象に対して機能的役割を担っていることも知られている。代表的なものに、染色体分配に関わるセントロメアや染色体の末端を保護するテロメアがあり、これらは機能ドメインと呼ばれる。加えて、これらが形成される染色体領域の DNA は、多くの場合、リピート配列であるという興味深い事実も明らかになっている。

このように、染色体は階層構造を持ち、なおかつ各構造間で相互に関係性を保ちながら、遺伝情報の高度な組織化を実現している。

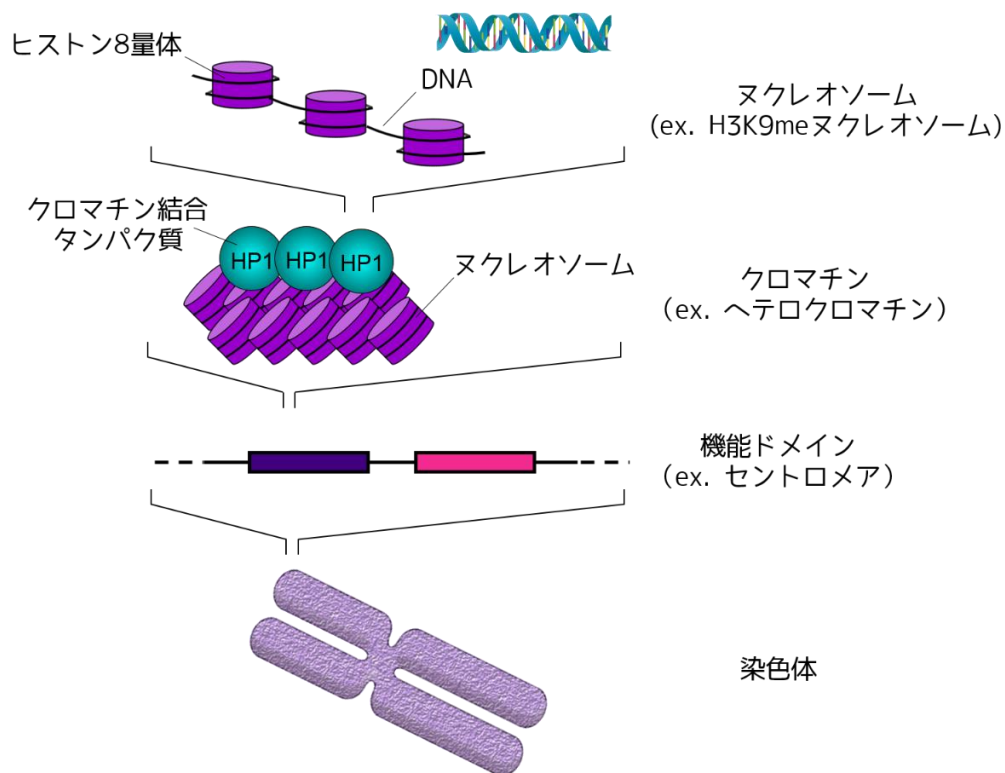


図 1-1 染色体の階層構造

染色体は、上位から機能ドメイン、クロマチン、ヌクレオソームという 3 つの構造から階層的に構築されている。DNA と染色体のイラストは Togo TV (<https://togotv.dbcls.jp/>) より引用した。

1-2 セントロメアのクロマチン構造

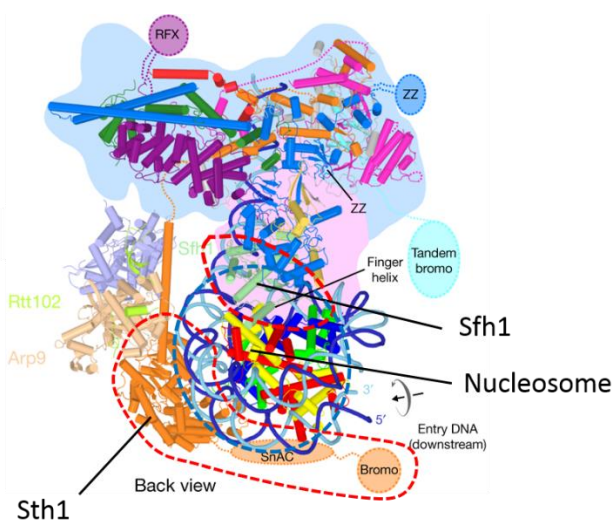
セントロメアは、キネトコアが形成される染色体領域で、その機能は正確な染色体分配のために極めて重要である。セントロメア中央領域のヌクレオソームは、ヒストン H3 のセントロメア特異的なバリエーションである CENP-A を含んでおり、この CENP-A を含むクロマチン (CENP-A クロマチン) がキネトコア形成のためのプラットフォームとなる^{2,3}。CENP-A クロマチンは通常ヘテロクロマチンと近接している。セントロメアに近接するヘテロクロマチンは H3K9me とその結合タンパク質であるヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) の存在によって定義され、セントロメアの姉妹染色分体の接着に重要であるとされている⁴。多くの真核生物では、1 本の染色体に 1 つのセントロメアが存在し、その位置や大きさはエピジェネティックに制御されている²。セントロメアの位置や大きさが正しく制御されないと、そこに形成されるキネトコアが機能不全を起こして染色体分配の異常を引き起こす。染色体分配の乱れは細胞の死や異常増殖を引き起こし、老化やがんをはじめとする疾病の原因となる^{5,6}。従って、CENP-A がセントロメア領域に正確に局在することは、セントロメアを持つ生物にとって非常に重要である。しかし、これまでの研究で、CENP-A のセントロメアへの局在機構はある程度明らかにされているが⁷、その位置や範囲を制御する機構はま

だほとんど明らかでない。

1-3 クロマチンリモデラー

クロマチンリモデラーは、ATPase 活性を有する触媒サブユニットを中心とした複合体で、ヌクレオソームの配置を変化させること（リモデリング）でクロマチン構造を制御している。特に、転写開始点近傍においてリモデリングにより生じたヌクレオソーム欠失領域（NDR, Nucleosome-Depleted Region）に基本転写因子群が結合し、転写活性が促進されることはよく知られている⁸⁻¹¹。クロマチンリモデラーは ATPase 触媒サブユニットの種類により SWI/SNF-type、INO80-type、ISWI-type、CHD-type の4つのファミリーに分類され、これらは酵母からヒトまで進化的に保存されている。それぞれのリモデラーはヌクレオソームを形成する、解体する、動かすことでクロマチン構造を部分的に改変する機能を持つが、これらの機能はしばしば重複している¹²。

酵母では、SWI/SNF-type のファミリーに属する RSC (Remodeling the Structure of Chromatin) が転写制御をはじめ、キネトコア機能^{13,14}、姉妹染色分体結合¹⁵⁻¹⁷、DNA 修復¹⁸⁻²⁰などの重要な生命現象において機能することが示されている。最近、複数の研究グループからクライオ電子顕微鏡を用いた出芽酵母 RSC の解析報告があり、その立体構造やヌクレオソームをリモデリングする機構の一端が明らかになっている²¹⁻²⁴。それらによると、RSC は 10 数個のサブユニットから構成されており、ATPase 触媒サブユニットの Sth1 と必須サブユニットの Sfh1 がヌクレオソームを挟むように結合してヒストン 8 量体を DNA 上でスライドさせる²¹⁻²³。また、遺伝子のプロモーターにおいて、従来 NDR と考えられてきた領域には特殊な構造を有する“壊れやすい”ヌクレオソーム (FN, Fragile Nucleosome) が存在し、これを RSC が積極的にリモデリングしていることが示されている^{25,26}。現在のところ FN の生物学的役割は不明だが、ヒストン修飾やヒストンバリエーションと同じように、エピジェネティック情報を担うヒストンコードであるのかもしれない。



| <i>S. pombe</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>H. Sapiens</i> |
|-----------------|----------------------|-------------------|
| Snf21 | Sth1 | BRG1 |
| Sfh1 | Sfh1 | SNF5 |
| Ssr1, Ssr2 | Rsc8 | BAF170, BAF155 |
| Ssr3 | Rsc6 | BAF60a or BAF60b |
| Ssr4 | | |
| Arp42 | | BAF53 |
| Arp9 | Arp9 | |
| | Arp7 | |
| | | Actin |
| Rsc1 | Rsc1 or Rsc2 | BAF180 |
| Rsc4 | Rsc4 | |
| Rsc9 | Rsc9 | |
| Rsc58 | Rsc58 | |
| Rsc7 | Rsc7 | |

図 1-2 ヌクレオソームをリモデリングする RSC

(左) クライオ電子顕微鏡により解析されたヌクレオソームをリモデリングしている RSC の立体構造図。ATPase 触媒サブユニットの Sth1 と必須サブユニットの Sfh1 (赤点線内) によって、ヌクレオソーム (青点線内) が挟まれている。(右) 各生物種における RSC を構成するサブユニットの比較表。分裂酵母における必須遺伝子とそれに対応するホモログを赤字で示した。(Wagner, FR. *et al. Nature* (2020) 579 と Monahan, BJ. *et al. Nature Structural & Molecular Biology* (2008) 15 を参考にし作図した。)

1-4 セントロメアにおけるクロマチンリモデラーの機能

クロマチンリモデラーは、セントロメアのクロマチン構造を制御することが知られている。ヒトの細胞では、SWI/SNF-type のファミリーに属する RSF (Remodeling and Spacing Factor) がセントロメア領域における CENP-A の局在を維持するのに必要であることが示されている²⁷。加えて、RSF は、セントロメア領域のヒストンのアセチル化やリン酸化に関係し、姉妹染色分体のセントロメア接着を維持するのに必要なシュゴシンのセントロメア局在も制御している²⁸。また、CHD-type の CHD1 のノックダウンにより CENP-A の局在が損なわれるという報告もある²⁹。出芽酵母では、RSC がセントロメア周辺のヌクレオソームの配置を制御しており、これが正常な染色体分配に必要であることが示されている¹⁴。また、INO80 は、セントロメア領域への H2A.Z の異所的局在を防ぐことで正常なセントロメア構造を維持し、倍数体の形成を防いでいる³⁰。分裂酵母においても、CHD-type のファミリーに属する Hrp1 が、セントロメア領域のヒストン H4 のアセチル化を抑えることで、CENP-A^{Cnp1} の局在を維持することに関係している³¹。また、分裂酵母 INO80 は、セントロメア領域の転写を促進することでヒストン H3 の排除をうながし、CENP-A^{Cnp1} が局在しやすい環境を整える役割を担っている^{32,33}。このように、同じタイプのリモデラーであっても、生物種によってその働き方は微妙に異なる。これらの知見から、一般的にクロマチンリモデラーは、CENP-A のセントロメアへの局在を安定に維持する機能を担っていると考える。

CENP-A クロマチンにおけるクロマチンリモデラーの機能が明白である一方で、ヘテロクロマチンにおける機能は判然としない。マウスの細胞では、SWI/SNF の ATPase 触媒サブユニットである Brg1 の欠失が、ペリセントロメア領域に形成されたヘテロクロマチンドメインの核内における特異的配置を消失させ、染色体分配異常を引き起こすことが報告されている³⁴。ヘテロクロマチン領域のヒストンの脱アセチル化を行う NuRD 複合体 (Nucleosome Remodeling and Deacetylase) は CHD-type の ATPase 触媒サブユニットを有しており、分裂酵母では H3K36 のメチル化酵素 Set2 と協調してペリセントロメア領域の転写抑制に関与している³⁵。また、分裂酵母 RSC は、姉妹染色分体の接着を維持するコヒーシンのサブユニットである Rad21 のペリセントロメア領域における局在維持に関与

している³⁶。このように、ヘテロクロマチンにおいてもクロマチンリモデラーは何らかの機能を果たしていることが示唆されており、今後の研究展開が期待される。

1-5 クロマチンリモデラーによる異所的 CENP-A の形成阻止

いくつかのクロマチンリモデラーは、非セントロメア領域への異所的な CENP-A の局在化を阻止することが報告されている。出芽酵母では、SWI/SNF のサブユニットである *snf2* 遺伝子の欠損によって、CENP-A^{Cse4} が染色体腕部に異所的に分布するようになることが示されている³⁷。ショウジョウバエでは、ISWI-type のファミリーに属する CHRAC (CHRomatin Accessibility Complex) のサブユニットの CHRAC14 のノックダウンにより、非セントロメア領域への異所的な CENP-A の局在化が引き起こされることが示されている³⁸。興味深いことに、どちらの場合においても染色体の安定性が低下していることが確認されている^{37,38}。これは、非セントロメア領域への CENP-A の局在化により異所的なキネトコアの形成が誘導され、これが染色体分配を攪乱させることが原因であると考えられている³⁹。

1-6 分裂酵母のセントロメア

分裂酵母ゲノムは 3 本の染色体から構成され、それぞれの染色体は 35~110 kbp ほどの大きさのセントロメアを持つ。間期のセントロメアは、核内に点在するのではなく、核膜近傍で SPB (Spindle Pole Body) と共にクラスターを形成している⁴⁰。

分裂酵母のセントロメアは、中心となる配列 *cnt* (center region) と、これを挟むように位置する逆向き配列である *imr* (inner most repeat)、およびその外側に位置する反復配列 *otr* (outer repeat) から構成されている。*cnt*、*imr* からなる内側領域には、CENP-A^{Cnp1} で規定される CENP-A^{Cnp1} クロマチンが形成される。一方、*otr* からなる外側領域には、H3K9me とそれを認識して結合する HP1^{Swi6} で規定されるヘテロクロマチンが形成される。この異なるクロマチン構造の境界は、*imr* 内に存在する tRNA 遺伝子のクラスター近傍に位置することが知られているが、その形成メカニズムについては不明な点が多い。

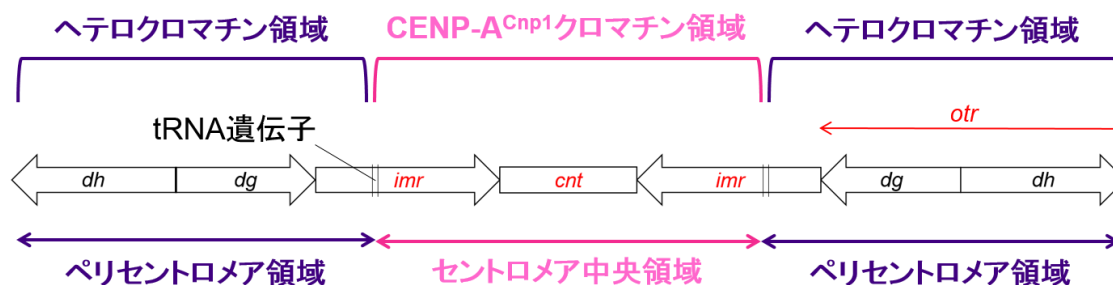


図 1-3 分裂酵母のセントロメア

分裂酵母のセントロメアは非リピート配列の *cnt* とリピート配列の *imr*、*otr* の各 DNA 配列から構成されている。*otr* 配列は 2 つのリピート配列 (*dg*、*dh*) から構成される。*imr* 配列内にコードされている tRNA 遺伝子を境界にして、内側の DNA 配列上に CENP-A^{Cnp1} クロマチン、外側にヘテロクロマチンが形成される。本論文では、前者をセントロメア中央領域 (または中央領域)、後者をペリセントロメア領域と呼ぶ。

1-7 本研究の目的

分裂酵母を用いた先行研究により、RSC の ATPase 触媒サブユニットである *Snf21* や必須サブユニットである *Sfh1* の変異株では染色体の安定性が低下することが観察されており^{36,41}、RSC がセントロメアで機能することが予想されていたがその詳細は不明であった。そこで本研究では、RSC がセントロメアにおいて担う機能についての示唆を得ることを目的とした。

第二章

材料と方法

2-1 分裂酵母株、培地および培養条件

本研究に用いた分裂酵母株は(表 1)に示す。分裂酵母の完全培地として YES を、最小培地として EMM2 を用いた。分裂酵母の遺伝学的実験操作は報告されている方法⁴²を参照した。細胞の培養は、特に指定しない場合は 30°Cで行った。*sfh1*、*snf21* 及び *sfc3* 遺伝子の温度感受性変異株の培養は、30°Cで培養した後、36°Cで 8 時間培養することで変異タンパク質を不活化した。遺伝子欠失株やタンパク質に tag を付加した株は、PCR 断片を用いた組換え法⁴³で作製した。

2-2 抗体

Sfh1 の検出にはウサギの抗 *Sfh1* ポリクローナル抗体を使用した³⁶。CENP-A^{Cnp1} の検出にはウサギの抗 CENP-A^{Cnp1} ポリクローナル抗体を使用した⁴⁴。H3K9me の検出にはマウスの抗 H3K9me モノクローナル抗体⁴⁵を使用した。ヒストン H3 に対する抗体は (ab1791/Abcam) を、H3K9ac に対する抗体は抗 H3K9ac モノクローナル抗体⁴⁶ を、H3K14ac に対する抗体は (7G8/Millipore) を、RNAP2 の CTD に対する抗体は (4H8/Millipore) を、HA に対する抗体は (12CA5/Roche) を、Myc に対する抗体は (4A6/Millipore) を、FLAG に対する抗体は (M2/Sigma) を、GFP に対する抗体は (clones 7.1 and 13.1/Roche) 使用した。

2-3 蛍光顕微鏡観察

細胞内における GFP、DsRed-tag を付加したタンパク質の蛍光は、ZEISS Axio Imager M1 (CARL ZEISS) を用いて観察し、デジタル画像として取り込んだ。蛍光スポットの大きさは、ImageJ ソフトウェアを用いて定量した。微小管の免疫染色は報告されている方法^{47,48}に従い、1 次抗体には抗 TAT1 抗体 (当研究室ストック) を、2 次抗体には Alexa Fluor 488 が付加されたウサギの抗 IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen) を使用した。

2-4 ウェスタンブロッティング

分裂酵母の細胞抽出液は以下のように調製した。10ml の YES 液体培地中に各株を植菌して培養した細胞を滅菌水で洗浄して集菌した。Lysis buffer (50 mM HEPES [pH 7.5], 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 and 0.1% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (0.35 µg/ml benzamidine, 0.7 µg/ml pepstatin and 0.5 µg/ml leupeptin)) に懸濁した後、細胞をジルコニアビーズで破碎して細胞抽出液を調製した。細胞の破碎にはマルチビーズショッカー (安井器械) を用いた。遠心後の上清を可溶性画分として SDS-PAGE

に供した。SDS-PAGE を行なった後、PVDF メンブレンに転写した。転写終了後のメンブレンを 5% スキムミルクでブロッキングした。1 次抗体を加えて 2 時間反応させた後、2 次抗体 (HRP conjugated anti-Mouse IgG/GE Healthcare) を反応させた。反応後に ECL キット (Immobilon/Millipore) を用いて検出を行った。

2-5 MNase 消化によるクロマチン構造解析

下記の変更点以外は、基本的に報告されている方法^{49,50}に従った。1% ホルムアルデヒドで固定した細胞の細胞壁を、Sorbitol/Tris buffer (1 M sorbitol, 50 mM Tris [pH 7.4], 10 mM β -mercaptoethanol) 中で、0.5 mg/ml Zymolyase 20T により消化した。細胞壁が消化されたスフェロプラストを、NP buffer (1 M sorbitol, 50 mM NaCl, 10 mM Tris [pH 7.4], 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0.75% NP-40, 1 mM β -mercaptoethanol, 0.5 mM spermidine, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (0.35 μ g/ml benzamidine, 0.7 μ g/ml pepstatin and 0.5 μ g/ml leupeptin)) 中で、10U/ml MNase (Takara Bio)により 37°Cで 20 分間処理した。RNase A と proteinase K で処理した後、フェノール/クロロホルム抽出により DNA を精製した。モノヌクレオソーム DNA (約 150 bp) は、2% アガロースゲル電気泳動で分離して精製後、定量 PCR に供した。

2-6 クロマチン免疫沈降法 (ChIP, Chromatin Immunoprecipitation)

基本的に報告されている方法⁴⁵に従った。20ml の YES 液体培地中に各株を植菌して培養し (1×10^7 cells/ml)、1% ホルムアルデヒドを加えて更に 20 分間培養し、細胞の架橋を行った。その後、2.5 M グリシンを終濃度 125 mM になるように加え、室温で 5 分間静置させ、集菌した。以後の作業は氷上で行った。細胞ペレットを PBS で 2 回洗浄後、250 μ l の氷冷した Lysis buffer (50 mM HEPES-KOH [pH 7.5], 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (0.35 μ g/ml benzamidine, 0.7 μ g/ml pepstatin and 0.5 μ g/ml leupeptin)) に懸濁し、ジルコニアビーズ (Biospec 0.5mm) をチューブの体積の半分になるように加えた。マルチビーズショッカー (安井器械) で細胞を破碎し、細胞懸濁液を 2ml まで Lysis buffer でスケールアップした。その後、超音波破碎装置 (Bioruptor UCD-250/CosmoBio) を用いて (強さ : H、ON/OFF : 1 秒/2 秒、合計 12 分) の条件で処理し、クロマチン断片の長さを 500bp から 1 kb 程度にして、可溶性画分を回収した。Lysis buffer で洗浄した DynaBeads (Invitrogen) と 1 次抗体を 4°Cで 2 時間ローテーションを行い結合させた。そこに、さきほどの可溶性画分を加え、4°Cで 2 時間ローテーションを行った。クロマチン断片-抗体-磁気ビーズの複合体は、マグネティックチューブスタンド (DynaMag 2/Invitrogen) を用いて回収した。この複合体を Lysis buffer、Lysis/NaCl buffer (50 mM HEPES-KOH [pH 7.5], 500 mM NaCl, 1 mM EDTA,

1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (0.35 µg/ml benzamidine, 0.7 µg/ml pepstatin and 0.5 µg/ml leupeptin)), Wash buffer (10 mM Tris [pH 8.0], 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (0.35 µg/ml benzamidine, 0.7 µg/ml pepstatin and 0.5 µg/ml leupeptin)) の3つのバッファーで2回ずつ洗浄し、最後に TE buffer で1回洗浄し、10µg/ml RNase A を加えた 100µL の TE buffer に懸濁した。37°Cで30分インキュベーションした後、0.1% SDS を100µL、5mg/mL Proteinase K を2.5µL 加えて45°Cで1時間インキュベーションし、65°Cで18時間インキュベーションすることで脱クロスリンク操作とした。その後フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿により DNA を精製し、TE に懸濁した。得られた DNA は定量的 PCR に供した。

2-7 定量 PCR (qPCR, quantitative PCR)

SYBR Dye を含む PCR 反応を、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio)を用いて行った。使用したプライマーは(表2)に示す。qPCRの結果を示す各グラフにおいて、エラーバーは標準偏差(S.D.)を示しており独立した実験(n=3)から算出された。

MNase-qPCRの結果は、目的のサイトにおける、インプット DNA に対する MNase 処理で消化されなかった DNA の割合 (MNase protection % = MNase-treated DNA / MNase-untreated DNA) を内部標準サイトである *act1*⁺の転写終結点における MNase protection % で正規化した “Relative MNase protection” として示した。

Snf21-Myc を除く全ての ChIP-qPCR の結果は、目的のサイトにおける、インプット DNA に対する免疫沈降した DNA の割合 (IP % = IPed DNA / Input DNA) を内部標準サイトである *act1*⁺遺伝子座における IP % で正規化した “Fold enrichment over *act1*” として示した。Snf21-Myc (図3-10) に関しては、*sfh1-13* 変異が *act1*⁺遺伝子座における Snf21 の局在に影響を与えるため、これを内部標準サイトとして使用することができない。そのため、Snf21-Myc の ChIP-qPCR の結果は、Myc-tag を付加していない陰性対照株の IP % で正規化した “Fold enrichment relative to *untagged*” として示した。

2-8 次世代シーケンサーによる ChIP-seq 解析

500ml の YES 液体培地中に各株を植菌して培養し (1×10⁷ cells/ml)、2-6 と同様に処理した。Illumina プラットフォーム用の DNA サンプルは、メーカーのプロトコルに従って調製し、Illumina HiSeq 2000 システムで解析した (シングルエンド、36bp)。配列決定されたリードは、BWA⁵¹ を用いて分裂酵母のリファレンスゲノム (972 株) 上にマッピングし、SAMtools⁵² を用いて処理した。複数の位置にマッピングするリードについては、ランダムに1つの位置を割り当てた。R-statistical environment (<http://www.R-project.org>) を用いて、

MACS⁵³ で生成した wiggle 形式のファイル (ステップサイズ : 10 bp) から IP/WCE 比を算出した。生成された wig ファイルは、Integrative Genomics Viewer⁵⁴ で可視化した。なお、実験の繰り返しは行わなかった。

2-9 RNA 抽出および逆転写反応

10ml の YES 液体培地中に各株を植菌して培養し (1×10^7 cells/ml)、集菌した後に 10ml の PBS で洗浄した。細胞ペレットを 1% SDS と酸性フェノールを含む緩衝液に懸濁させた。液体窒素で凍結した後 65°C で 1 時間インキュベーションする凍結融解処理により、RNA を抽出した。1 μ g の RNA に対し、1 U の DNase I を処理しゲノム DNA を除いた。オリゴ dT プライマーまたは配列特異的なプライマーと逆転写酵素の反応バッファーを加えて、90°C から 52°C まで温度を徐々に下げながらプライマーのアニーリングを行った後、逆転写酵素 (Primescript Reverse Transcriptase/Takara Bio) を加えて 42°C で 60 分間の反応を行った。

(表 1)

本研究で用いた分裂酵母株とその遺伝型を以下に示す。

| Name | Genotype |
|---------|---|
| TP5A | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18</i> |
| NP29 | <i>h², leu1-32, ura4-D18, his2, abp1-9xmyc-3xHA</i> |
| NK39 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, sfh1-13-ura4</i> |
| CHE587 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, Δclr4::hphMX6</i> |
| CHE491 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE493 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, sfh1-13-ura4, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE890 | <i>h⁻, leu1-32, snf21-36, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE896 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, Δrcs1::natMX6, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE897 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, Δrsc4::natMX6, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE478 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, cnp3-13myc-kanMX6</i> |
| CHE479 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, sfh1-13-ura4, cnp3-13myc-kanMX6</i> |
| CHE349 | <i>h⁺, ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E, imr1R(NcoI)::ura4⁺, mis6-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE350 | <i>h⁺, ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E, imr1R(NcoI)::ura4⁺, sfh1-13-LEU2, mis6-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE369 | <i>h⁺, ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E, imr1R(NcoI)::ura4⁺, mis16-8myc-KanMX6</i> |
| CHE371 | <i>h⁺, ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E, imr1R(NcoI)::ura4⁺, sfh1-13, mis16-8myc-KanMX6</i> |
| CHE425 | <i>h⁺, ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E, otr1R(Sph1)::ura4⁺, scm3-5FLAG-natMX6</i> |
| CHE426 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E, otr1R(Sph1)::ura4⁺, sfh1-13, scm3-5FLAG-natMX6</i> |
| FY29134 | <i>h⁻, ade6-M216, leu1-32, lys1-131, sad1⁺::DsRed-LEU2, cnp1::NATr-Pcnp1-GFP-cnp1⁺</i> |
| CHE1027 | <i>h⁻, ade6-M216, leu1-32, lys1-131, sad1⁺::DsRed-LEU2, cnp1::NATr-Pcnp1-GFP-cnp1⁺, kanMX6-sfh1-13</i> |
| CHE968 | <i>h⁺, ade6-M210, leu1-32, lys1-?, ura4-D18, cnp1::NATr-Pcnp1-GFP-cnp1⁺</i> |
| CHE1096 | <i>h⁺, ade6-?, leu1-32, lys1?, ura4-D18, sfh1-13-LEU2, cnp1::NATr-Pcnp1-GFP-cnp1⁺</i> |
| CHE1097 | <i>h⁺, ade6-M210, leu1-32, lys1-?, ura4-D18, cnp1::NATr-Pcnp1-GFP-cnp1⁺, Δclr4::hphMX6</i> |

| Name | Genotype |
|---------|---|
| CHE1098 | <i>h⁻, ade6-?, leu1-32, lys1-?, ura4-D18, sfh1-13-LEU2, cnp1::NATr-Pcnp1-GFP-cnp1⁺, Δclr4::hphMX6</i> |
| CHE677 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, Δclr3::kanMX6</i> |
| CHE678 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, sfh1-13-ura4, Δclr3::kanMX6</i> |
| CHE892 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, Δclr3::kanMX6, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE893 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, sfh1-13-ura4, Δclr3::kanMX6, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE418 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, snf21-13myc-kanMX6</i> |
| CHE445 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, sfh1-13-ura4, snf21-13myc-kanMX6</i> |
| CHE453 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, Δclr3::hphMX6, snf21-13myc-kanMX6</i> |
| CHE452 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, sfh1-13-ura4, Δclr3::hphMX6, snf21-13myc-kanMX6</i> |
| FY520 | <i>h⁺, Ch16 (ade6-M216, m23::ura4+-Tel72), ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E</i> |
| NK88 | <i>h[?], Ch16 (ade6-M216, m23::ura4+-Tel72), ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E, sfh1-13-LEU2</i> |
| CHE838 | <i>h⁺, Ch16 (ade6-M216, m23::ura4+-Tel72), ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E, Δclr3::kanMX6</i> |
| CHE839 | <i>h[?], Ch16 (ade6-M216, m23::ura4+-Tel72), ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E, sfh1-13-LEU2, Δclr3::kanMX6</i> |
| CHE1066 | <i>h⁺, ade6-?, leu1-32, sfc3-1, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE926 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E, imr1R(aeHindIII)::ura4⁺, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE927 | <i>h⁺, ade6-M210, leu1-32, ura4-DS/E, imr1L(aeHindIII)::ura4⁺, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE948 | <i>h⁻, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his2-?, imr1R(aeHindIII)::ura4⁺, sfh1-13-LEU2, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE949 | <i>h⁺, leu1-32, ura4-DS/E, imr1L(aeHindIII)::ura4⁺, sfh1-13-LEU2, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE989 | <i>h⁺, ade6-DN/N, leu1-32, ura4-DS/E, imr1L(Nco)::ura4⁺, otr1R(Sph1)::ade6⁺, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |
| CHE990 | <i>h⁺, ade6-DN/N, leu1-32, ura4-DS/E, imr1L(Nco)::ura4⁺, otr1R(Sph1)::ade6⁺, natMX6-sfh1-13, cnp1-5FLAG-kanMX6</i> |

(表 2)

本研究で用いたプライマーとその用途を以下に示す。

| Name | Sequence | used for |
|-----------|----------------------------|----------|
| cnp1 Fw | AGCCTGGAGATCCTATTCCA | RT-PCR |
| cnp1 Rv | GGCTACAAATTCTGAAGATATC | RT-PCR |
| ccp1 Fw | CTCGCAAACCTAGAGCAAGA | RT-PCR |
| ccp1 Rv | GCTTCCAGAACTACTACCCA | RT-PCR |
| cnp3 Fw | GGAAGATGAAGGAACCGCTG | RT-PCR |
| cnp3 Rv | ATCATCCTTGGGCGTAGAGG | RT-PCR |
| mis6 Fw | AGCTCGTCATATTCGCTTGAAGA | RT-PCR |
| mis6 Rv | GCTTTTAAGAACGGCCGCAA | RT-PCR |
| mis15 Fw | TGCCTTAGGAGCATGGCAA | RT-PCR |
| mis15 Rv | GTGCTATCCGCAATGAGGGA | RT-PCR |
| mis16 Fw | TCGCTACCATGGGAGAAGGA | RT-PCR |
| mis16 Rv | TGGCCCTTCAAACTGCTTG | RT-PCR |
| mis17 Fw | AGGCTGTCATCTCTCGACTCA | RT-PCR |
| mis17 Rv | AGCAATTCGCTCTTCAGGGG | RT-PCR |
| mis18 Fw | ACGGAAACTAGTCATTCGGGC | RT-PCR |
| mis18 Rv | AACCCAAGCATTAGAATCACCAAC | RT-PCR |
| scm3 Fw | ACAGATCAGCGTGGTTTGGAT | RT-PCR |
| scm3 Rv | AGGGTTCCTTCTTCTCGGTG | RT-PCR |
| RevCev Fw | CCTCCTGGATATCCTTTGTAA | RT-PCR |
| RevCen Rv | TGGA CTCTTTGCCTCATAC | RT-PCR |
| dh Fw | GGCATTACGAAACATAGCG | RT-PCR |
| dh Rv | CTCTCATCTCGACTCGCTTG | RT-PCR |
| cnt Fw | CCTACTATATTGCAAGTCAAAGTTGG | ChIP |
| cnt Rv | ACGTGATAATACCGCTTAACTGG | ChIP |
| dg Fw | CCATCACCACTTTTCATCTCC | ChIP |
| dg Rv | CAGGATACCTAGACGCACAA | ChIP |
| dh Fw | TGAATCGTGTTACTCAACCC | ChIP |
| dh Rv | CGAAACTTTCAGATCTCGCC | ChIP |
| lys1-L Fw | CCGATGCAAGCTTCTCCAAA | ChIP |
| lys1-L Rv | GCATCTTGGACTAACGTGGA | ChIP |
| lys1-R Fw | GTCTCTCAGACCATCGTTCA | ChIP |
| lys1-R Rv | CGAACATTTGACACTCTCCG | ChIP |
| per1 Fw | ATCGGTTCAAAGCCAAATGCT | ChIP |

| Name | Sequence | used for |
|-------------------|--------------------------|---------------|
| per1 Rv | CGAAGTCCCGTGTCTAAATC | ChIP |
| IRC Fw | CTAATATAGGCGGCAGAG | ChIP |
| IRC Rv | GATGGGTAGGGTTGTTAGCC | ChIP |
| act1 Fw | TCCAACCGTGAGAAGATGAC | ChIP, RT-PCR, |
| act1 Rv | TGTGGGTAACACCATCACCA | ChIP, RT-PCR, |
| act1 TTS Fw | GACATTGGTATGATTAGTGTTT | MNase |
| act1 TTS Rv | TGGATTTGTTTATACAGAGAGG | MNase |
| imr1-i Fw | GGTTTTGGTTTTCTTCCCAG | ChIP, MNase |
| imr1-i Rv | AGCGAAAACCTTTTGATGGAGAG | ChIP, MNase |
| imr1-ii Fw | TAAATTATCGCAGCCTTTCAA | ChIP, MNase |
| imr1-ii Rv | CCATGACGGATGCTTAGTTCA | ChIP, MNase |
| imr1-iii Fw | ACAGATGAGTAGCGTAGCTG | ChIP, MNase |
| imr1-iii Rv | TGAAGCTTTTAGATGAACGC | ChIP, MNase |
| imr1-iv Fw | ATATTCTTACGCTAAAATAACAAT | ChIP, MNase |
| imr1-iv Rv | TTCTCATGAATTTAGAGATTTCAA | ChIP, MNase |
| imr1-v Fw | TGTGTTTGCCATCTTACAATTCA | ChIP, MNase |
| imr1-v Rv | GACTCAATGTAATTTAGAAGCTG | ChIP, MNase |
| SPATRAGLU.04 Fw | GAACTAAGCATCCGTCATGG | MNase |
| SPATRAGLU.04 Rv | AATTAATAAACTTCTCCGTCAG | MNase |
| SPATRANAALA.05 Fw | CTAAAATAACAATTAGGGCATG | MNase |
| SPATRANAALA.05 Rv | ATTTGGACAAGCCAGAACTC | MNase |
| ura4 Fw | GCTTCTTGGGCTCATATCAC | RT-PCR |
| ura4 Rv | CTTCTCAAACCATTCTAAGG | RT-PCR |
| dh1L Fw | CACAAAGTCACAATTGTGATCT | ChIP |
| dh1L Rv | TAAAGTGATGGCAGATATTGCA | ChIP |
| imr3 Fw | TTGTTGCCGCACTTGATG | ChIP |
| imr3 Rv | TCATGCATACATTACCGATCTACC | ChIP |
| fbp1 Fw | GTCGAACGGATGCTGCAAAC | ChIP |
| fbp1 Rv | GGTACCTACACTAACACCGG | ChIP |

第三章

結果

3-1 Sfh1 は CENP-B ホモログ Abp1 と相互作用する

所属研究室の前任者により、分裂酵母のヒト CENP-B ホモログである Abp1 に相互作用するタンパク質を同定するために、分裂酵母 cDNA ライブラリーを用いた Abp1 を bait とする酵母ツーハイブリッドスクリーニング (Y2H, Yeast Two-Hybrid) が行われた。このスクリーニングの結果、Abp1 と最も特異的な相互作用を示すタンパク質として、SWI/SNF-type のファミリーに属する RSC の必須サブユニットである Sfh1 が同定された³⁶。

Sfh1 は、Snf5 ドメインと GATA 型ジンクフィンガードメインという 2 つの特徴的な機能ドメインを持っている。Snf5 ドメインは、Snf5 ファミリータンパク質間で進化的に保存されており、タンパク質の中央部に位置している (図 3-1A)。一方、DNA 結合・タンパク質間相互作用ドメインであるジンクフィンガードメインは、分裂酵母にのみ存在する。Sfh1 は生育に必須のタンパク質であるため、その遺伝子の破壊株を作製することが出来ない。そこで、前任者により *sfh1* 遺伝子の全長を対象とした Error-prone PCR によって温度感受性変異株が作製され、*sfh1-7*、*-12* 及び *-13* 変異株が単離された³⁶。以降の実験で Sfh1 の機能解析を行う際は、最も強い表現型を示した *sfh1-13* 変異株を使用した。

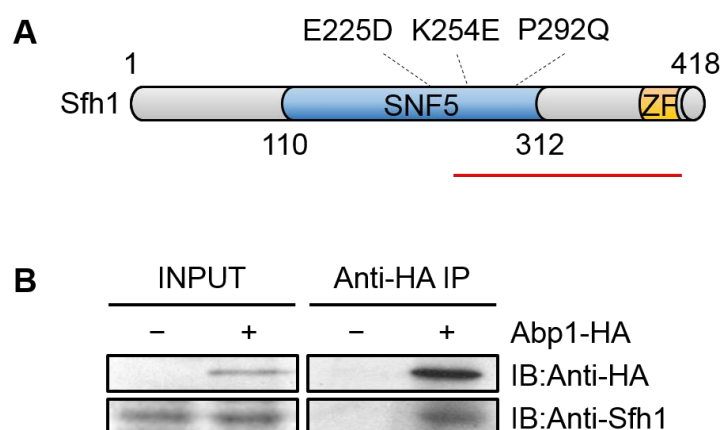


図 3-1 Sfh1 は CENP-B ホモログ Abp1 と相互作用する

A. Sfh1 の模式図。Sfh1 タンパク質は、中央領域に SNF5 ドメイン (青色) と C 末端領域にジンクフィンガードメイン (橙色) を持つ。*sfh1-13* 変異により、SNF5 ドメイン内に 3 か所のアミノ酸置換が起こる。横線 (赤) は、Abp1 タンパク質との強い相互作用がある領域を示す。**B.** Abp1 の C 末端に HA-tag を付加した株と付加していない株から調製した抽出液を抗 HA 抗体と反応させ免疫沈降した画分を、抗 Sfh1 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより分析した。

細胞内での相互作用を確認するため、Abp1 の C 末端に HA-tag を付加した株を作製し、抗 HA 抗体を用いた共免疫沈降を行った。陰性対照として、HA-tag を付加していない株に対しても同様の操作を行った。得られた免疫沈降物に対して、抗 Sfh1 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、HA-tag を付加した株でのみシグナルが検出された (図

3-1B)。また、前任者は *Sfh1* の部分欠失体を用いた Y2H により、特に C 末端領域 (アミノ酸 246-418) が *Abp1* と強く相互作用することを示している³⁶。これらの結果から、細胞内で *Abp1* は *Sfh1* の C 末端領域を介して相互作用していることが確認された。

3-2 *sfh1-13* 変異株は染色体分配異常を示す

abp1 の欠失変異体では、セントロメアの機能が低下しており、染色体分配異常が高頻度に観察されることが明らかになっている⁴⁵。また、一般的にそのような分裂酵母株は、微小管重合阻害剤である TBZ に対して感受性を示す⁵⁵。従って、*Abp1* との機能的関連が予想される *Sfh1* の変異体でも、同様の表現型を示すことが考えられた。

sfh1-13 変異株の染色体分配挙動を蛍光免疫染色で観察したところ、一部の染色体の分配が遅れる lagging chromosome の出現率が野生株では 0% (n = 107) であったのに対し、*sfh1-13* 変異株では 19% (n = 109) であったことから、変異株では染色体の安定性が損なわれていることが示された (図 3-2A)。次に、TBZ に対する感受性を観察したところ、感受性を示すことが既に報告されている RSC の ATPase 触媒サブユニットをコードする *snf21* 遺伝子の高温感受性変異株である *snf21-36* 変異株⁴¹ と同様に、*sfh1-13* 変異株も感受性を示した。一方、RSC の構成成分ではあるが生育に非必須な遺伝子である *rsc1* や *rsc4* の欠失変異株は感受性を示さなかった (図 3-2B)。*Snf21* および *Sfh1* は RSC がクロマチンリモデリング活性を発揮する際に中心的な役割を果たすことから²¹⁻²³、RSC の持つクロマチンリモデリング機能が染色体の安定性を保証するのに必要であることが示唆された。

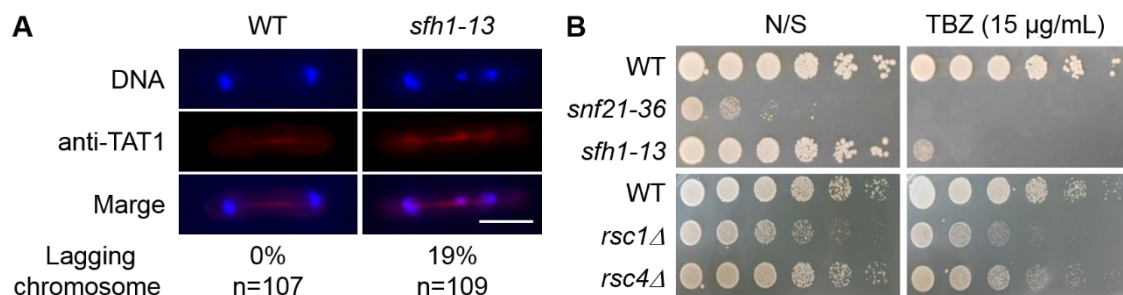


図 3-2 RSC 変異株は染色体分配異常を示す

A. 5mg/mL の TBZ 存在下で対数増殖期の細胞を、DAPI と抗 TAT1 抗体で染色し、それぞれ DNA と微小管を可視化した。数値はラギングクロモソームが観察された細胞の割合を示す。Scale bar 5mm

B. 各株の 10 倍希釈系列をそれぞれのプレートにスポットし、30°C で 3 日間培養した。(N/S: non selective)

3-3 *sfh1-13* 変異はセントロメアヘテロクロマチンに影響しない

セントロメア機能の低下は、多くの場合、セントロメアのクロマチン構造の変化を伴う⁵⁶

58. *abp1* 欠失変異体のセントロメアヘテロクロマチン領域では、H3K9/14 アセチル化 (H3K9/14ac) レベルの上昇と H3K9 メチル化 (H3K9me) レベル及びこれに結合する HP1^{Swi6} の減少が観察されている⁴⁵。 *sfh1-13* 変異株でも同様の変化が予想されるため、抗 H3K9me、H3K9ac 及び H3K14ac 抗体を用いた ChIP を行い、回収した DNA をリアルタイム PCR で定量した。予想に反して、*sfh1-13* 変異株のセントロメア領域では、野生株と比べて、H3K9me 及び H3K9/14ac レベルは変化が無くわずかな減少にとどまった (図 3-3)。以上の結果から、*sfh1-13* 変異がセントロメアのクロマチン構造に与える影響は *abp1* 欠失によるものとは異なることが示された。したがって、RSC は Abp1 のヘテロクロマチンでの機能には関与していないことになる。

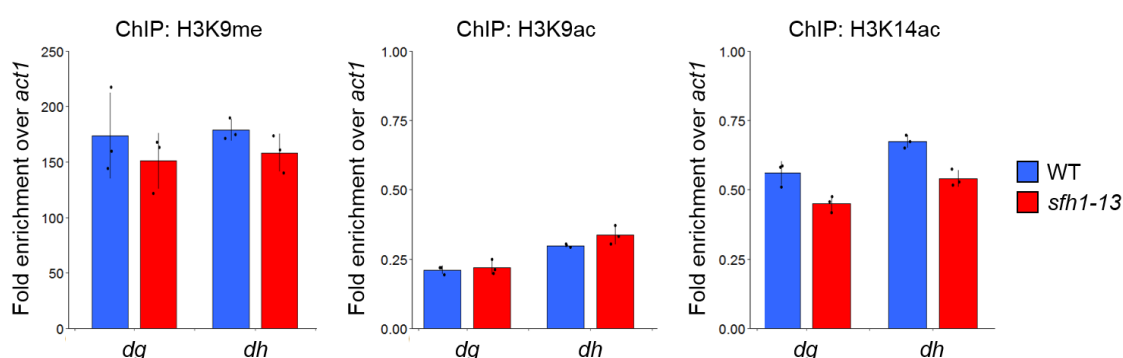


図 3-3 *sfh1-13* 変異はセントロメアのヘテロクロマチン構造に影響を与えない

抗 H3K9me、H3K9ac 及び H3K14ac 抗体を用いた ChIP を行い、各株のペリセントロメア領域 (*dg*、*dh*) における局在量をリアルタイム PCR で定量した。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験から算出した。

3-4 *sfh1-13* 変異株は CENP-A^{Cnp1} の過剰発現下で生育遅延を示す

セントロメアにヘテロクロマチンと共に形成される、CENP-A クロマチンは染色体分配に支配的な役割を果たす²。これまでの研究から、CENP-A^{Cnp1} の動態に影響を与える遺伝子の変異株は、CENP-A^{Cnp1} を過剰発現させた際に一過的に形成される異所的 CENP-A^{Cnp1} スクレオソームをゲノムから排除することが出来ず、結果として細胞の増殖が遅延または停止することが知られている⁵⁹⁻⁶¹。そこで我々は、*sfh1-13* 変異が CENP-A^{Cnp1} の動態に影響する可能性を検証することにした。発現量を調節できる *nmt1* 系プロモーターを用いて CENP-A^{Cnp1} を過剰発現させ、野生株および *sfh1-13* 変異株の細胞増殖への影響を調べた (図 3-4)。野生株の生育は、どの温度でも *nmt41* プロモーターから過剰発現させた CENP-A^{Cnp1} (*nmt41-cnp1*) の影響を受けなかった。しかし、*sfh1-13* 変異株は CENP-A^{Cnp1} (*nmt41-cnp1*) の発現により、半制限温度の 32°C で生育の遅延を示した。*nmt3* プロモーターからの CENP-A^{Cnp1} (*nmt3-cnp1*) の発現は、*nmt41-cnp1* よりも高い発現量を誘導するため、すべての温度で野生株の生育阻害を引き起こし、特に 32°C と 36°C でその影響が大きくなった。一方、

sfh1-13 変異株は 32°C で *nmt3-cnp1* と合成致死となった。これらの結果から、Sfh1 が CENP-A^{Cnp1} の動態に関わることが示唆された。

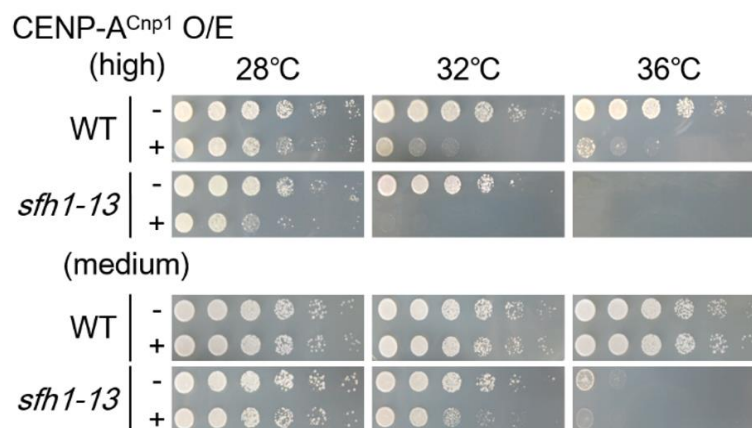


図 3-4 *sfh1-13* 変異株は CENP-A^{Cnp1} の過剰発現下で生育遅延を示す

CENP-A^{Cnp1} を高発現 (*nmt3-CENP-A^{cnp1}*) または中発現 (*nmt41-CENP-A^{cnp1}*) させた野生株 (WT) および *sfh1-13* 変異株の生育程度を、空ベクターを保有する細胞 (ー) と比較して示している。細胞は 28、32 及び 36°C (それぞれ *sfh1-13* 変異株の非制限温度、半制限温度、制限温度) で培養した。

3-5 *sfh1-13* 変異は CENP-A^{Cnp1} 関連遺伝子の発現に影響しない

RSC の機能不全は広範な遺伝子発現の変動を引き起こす⁶²。このため、*sfh1-13* 変異株が制限温度下で示す生育遅延は、CENP-A^{Cnp1} の動態への直接的な影響ではなく、CENP-A^{Cnp1} やこれに関係する遺伝子の発現変動による間接的な影響を反映した結果である可能性が考えられた。そこで CENP-A^{Cnp1} や CENP-A^{Cnp1} ヌクレオソームの形成に関係する遺伝子の発現量を RT-qPCR で確認したが、*sfh1-13* 変異株において、野生株と比べて、発現量の顕著な変動はなかった (図 3-5A)。次に、CENP-A^{Cnp1}-5FLAG を発現する野生株と *sfh1-13* 変異株を作製し、細胞内の CENP-A^{Cnp1} タンパク質を両者で比較した。抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、CENP-A^{Cnp1} タンパク質量に差は観られなかった (図 3-5B)。これらの結果から、Sfh1 が CENP-A^{Cnp1} の動態へ直接的に関与することが示唆された。

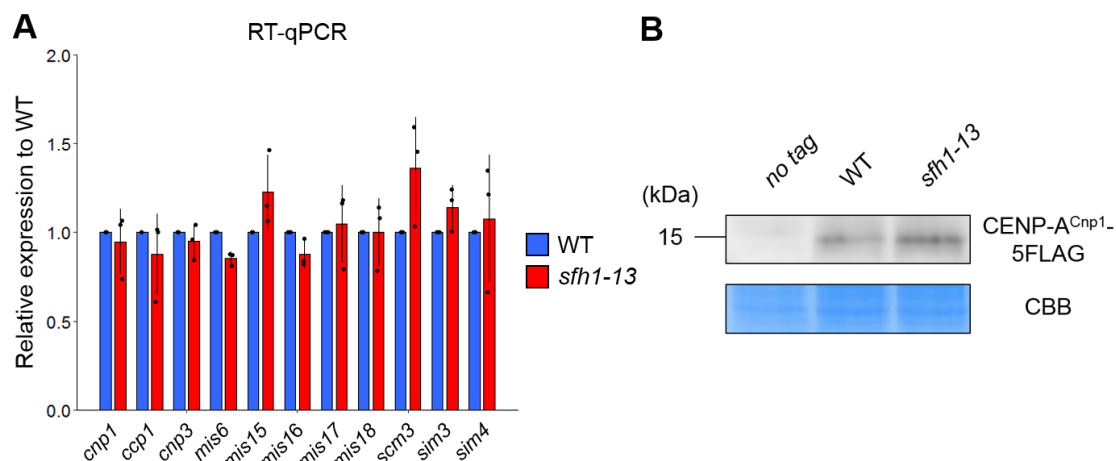


図 3-5 *sfh1-13* 変異は CENP-A^{Cnp1} 関連遺伝子の発現に影響しない

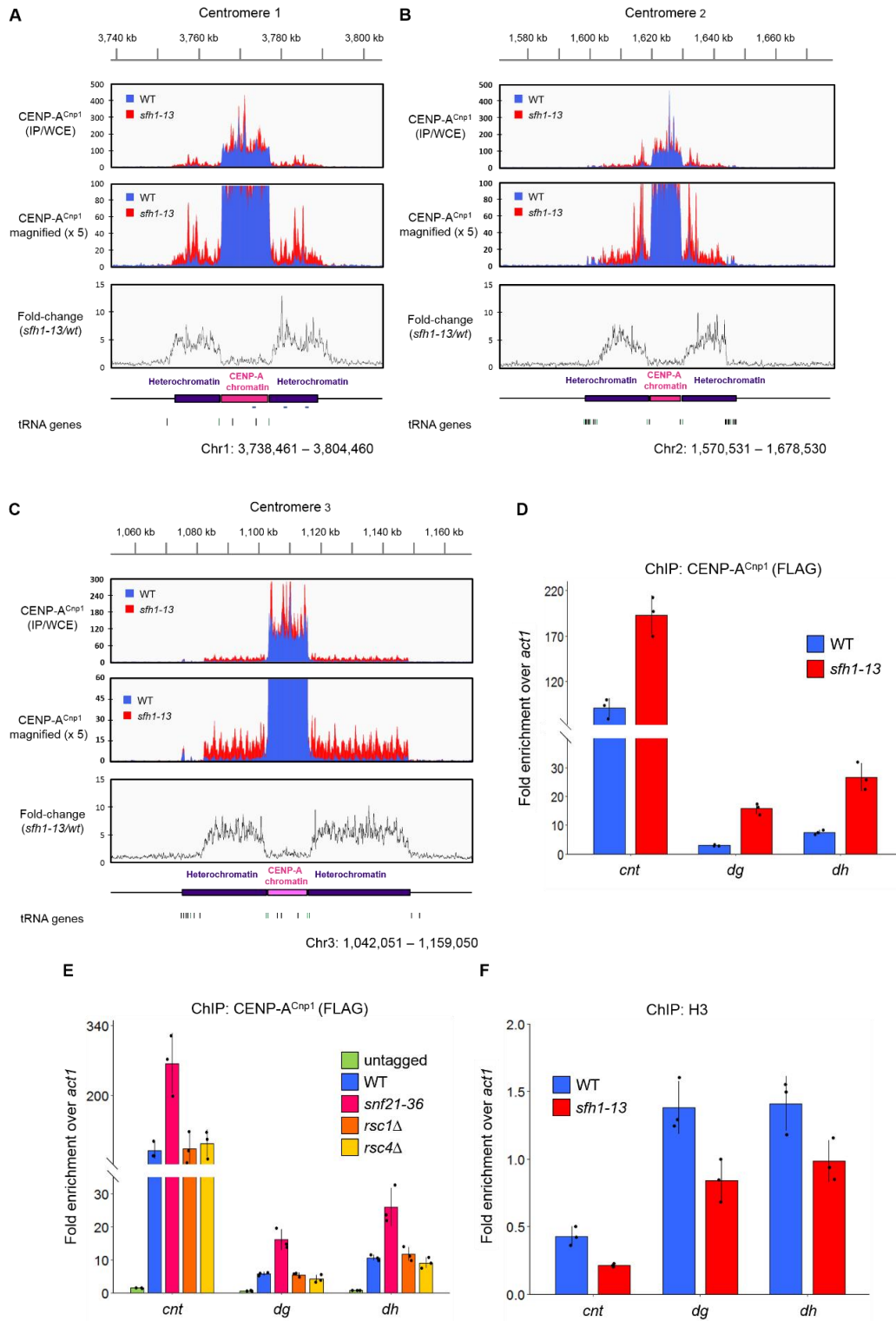
A. 各株から調製した RNA を使用して RT-qPCR を行い、野生株の発現と比較した *sfh1-13* 変異株での CENP-A^{Cnp1} 関連遺伝子の発現レベルを分析した。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験結果から算出した。**B.** CENP-A^{Cnp1}-FLAG を発現する野生株と *sfh1-13* 変異株及び FLAG タグなし株から調整した抽出液を、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより分析した。

3-6 RSC は CENP-A^{Cnp1} の局在領域を制限する

CENP-A^{Cnp1} は中央領域にのみ局在しているが⁶³、先行研究から *sfh1-13* 変異は同領域における CENP-A^{Cnp1} の局在に顕著な影響を与えないことが明らかになっている³⁶。また、CENP-A^{Cnp1} の動態に関与する遺伝子の変異株では、CENP-A^{Cnp1} の過剰発現下において、転写活性遺伝子やサブテロメアおよび rDNA などの非セントロメア領域へ CENP-A^{Cnp1} が異所的に局在することが知られている^{60,61,64}。これらの知見から、*sfh1-13* 変異によって非セントロメア領域に異所的 CENP-A^{Cnp1} ヌクレオソームの形成が誘導される可能性を考え、ゲノムワイドな CENP-A^{Cnp1} の局在を抗 CENP-A^{Cnp1} 抗体を用いた ChIP-seq 解析で検証することにした。以降の実験では、特に記載がない限り CENP-A^{Cnp1} の発現は生理的条件下で行われていることに注意されたい。

予想に反して、*sfh1-13* 変異株の非セントロメア領域では CENP-A^{Cnp1} の局在レベルに大きな変化は観られなかったが、通常局在が観られないペリセントロメア領域への異所的分布が見られた (図 3-6A-C)。以上の結果を ChIP-qPCR によって確認したところ、*sfh1-13* 変異株では野生株に比べて *cnt* で 1.4 倍、*dg* で 2.8 倍、*dh* で 2.5 倍の CENP-A^{Cnp1} の増加が観られた (図 3-6D)。また、CENP-A^{Cnp1}-5FLAG を発現する他の RSC 変異株を作製し抗 FLAG 抗体を用いて ChIP-qPCR を行ったところ、ATPase 触媒サブユニット *Snf21* の変異株 (*snf21-36*) で同じ変化が確認された (図 3-6E)。しかし、非必須なサブユニットである *Rsc1* や *Rsc4* の欠失変異体では CENP-A^{Cnp1} の増加は観られなかった (図 3-6E)。この結果

は、RSC がクロマチンリモデリング活性を發揮する際に中心的な役割を果たすサブユニットの変異体のみで TBZ への感受性が観察されたことと一致する (図 3-2B) これらの結果から、RSC がもつクロマチンリモデリング機能が CENP-A^{Cnp1} の局在領域を制限するのに必要とされることが示唆された。



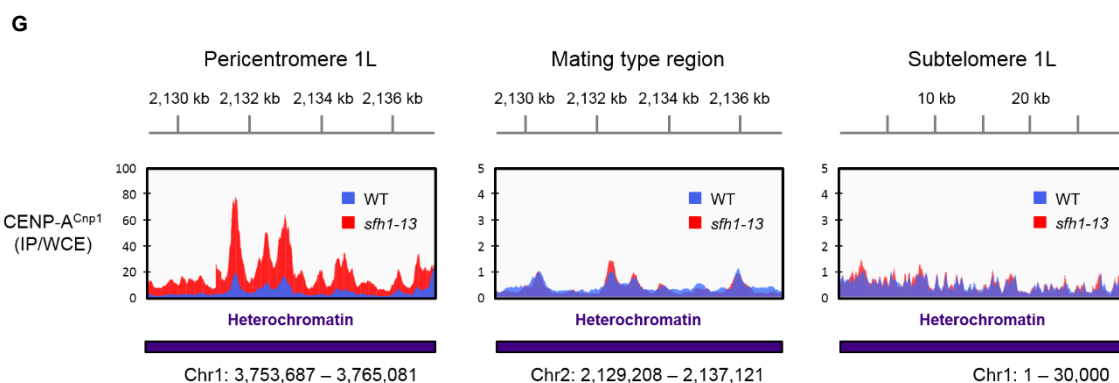


図 3-6 RSC の機能不全はペリセントロメア領域への CENP-A^{Cnp1} の異所的局在を引き起こす

A-C. 野生株と *sfh1-13* 変異株に対して抗 CENP-A^{Cnp1} 抗体を用いて行った ChIP-seq 解析の結果。

A: *cen1* 周辺、**B:** *cen2* 周辺、**C:** *cen3* 周辺の結果を示す。それぞれ上から、セントロメア周辺の CENP-A^{Cnp1} の分布、それを 5 倍拡大したもの、変異株での野生株に対する増加率を示している。一番下は、セントロメアクロマチン構造の模式図である。**D, E.** 各株に対して CENP-A^{Cnp1} の ChIP を行い、セントロメア領域における局在量をリアルタイム PCR で定量した。**F.** 各株に対してヒストン H3 の ChIP を行い、セントロメア領域における局在量をリアルタイム PCR で定量した。**G.** 野生株と *sfh1-13* 変異株の各ヘテロクロマチン領域における CENP-A^{Cnp1} の分布。左からペリセントロメア領域、性決定領域、サブテロメア領域の結果を示す。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験から算出した。

本来ペリセントロメア領域にはヘテロクロマチンが形成されており、これは H3K9me をもつヌクレオソームから構成されている⁶⁵。ペリセントロメア領域へ異所的に局在するようになった CENP-A^{Cnp1} はヒストン H3 と置き換わっているのか併存しているのかを確認するため、抗ヒストン H3 抗体を用いて ChIP-qPCR を行った。*sfh1-13* 変異株では野生株に比べて *cnt* で 0.5 倍、*dg* および *dh* で 0.3~0.4 倍程度のヒストン H3 の減少が観られた (図 3-6F)。同じ領域で行った H3K9me の ChIP-qPCR の結果 (図 3-3) と併せて考えると、*sfh1-13* 変異株のペリセントロメア領域ではヘテロクロマチン内のヒストン H3 の一部が CENP-A^{Cnp1} に置き換わっている可能性がある。

CENP-A が異所的に分布する際、しばしばセントロメア以外のヘテロクロマチン領域やその近傍に局在化することが知られている^{59,60,64,66}。同じことが *sfh1-13* 変異株で起こっているか確認してみたが、ヘテロクロマチンが形成される性決定領域とサブテロメアの CENP-A^{Cnp1} の局在レベルは野生株と同程度であった (図 3-6G)。この結果は、CENP-A^{Cnp1} の異所的な局在化が CENP-A^{Cnp1} クロマチンから離れたヘテロクロマチンでは起こらないことを示しており、RSC はセントロメア領域内で CENP-A^{Cnp1} の中央領域からの拡張を防いでいることを示唆している。

3-7 ペリセントロメア領域の異所的 CENP-A^{Cnp1} はキネトコアタンパク質を集積させる

CENP-Aヌクレオソームは、多数のキネトコアタンパク質を集積させるため、キネトコア形成のための基盤となる^{3,67}。これまでの研究で、異所的に分布したCENP-Aヌクレオソームは、その領域にキネトコアタンパク質をリクルートすることで、異所的なキネトコアの形成を誘導し染色体を不安定化させることが報告されている^{38,60,64,66}。

*sfh1-13*変異株でも、ペリセントロメア領域へ拡大したCENP-A^{Cnp1}が同じようにキネトコアタンパク質をリクルートしているのか確認するため、主要なキネトコアタンパク質であるCENP-C^{Cnp3}とRBBP4/7^{Mis16}のC末端にMyc-tagを、CENP-I^{Mis6}とHJURP^{Scm3}のC末端にFLAG-tagを付加した株を作製し、抗Myc抗体と抗FLAG抗体を用いてChIP-qPCRを行った。*sfh1-13*変異株では野生株に比べてCENP-C^{Cnp3}及びCENP-I^{Mis6}の局在量が*dg*および*dh*で2倍程度増加していた(図3-7A, B)。一方、RBBP4/7^{Mis16}及びHJURP^{Scm3}の局在量に変化は観られなかった(図3-7C, D)。また、いずれのタンパク質も*cnt*では顕著な変化は観られなかった(図3-7A-D)。これらの結果は、CENP-C^{Cnp3}及びCENP-I^{Mis6}の局在はCENP-A^{Cnp1}に依存し、RBBP4/7^{Mis16}及びHJURP^{Scm3}は依存しないというこれまでの報告と一致する⁶⁸⁻⁷⁰。以上のことから、*sfh1-13*変異によるCENP-A^{Cnp1}の局在領域の拡大はキネトコアドメインの拡大を引き起こしている可能性が考えられた。

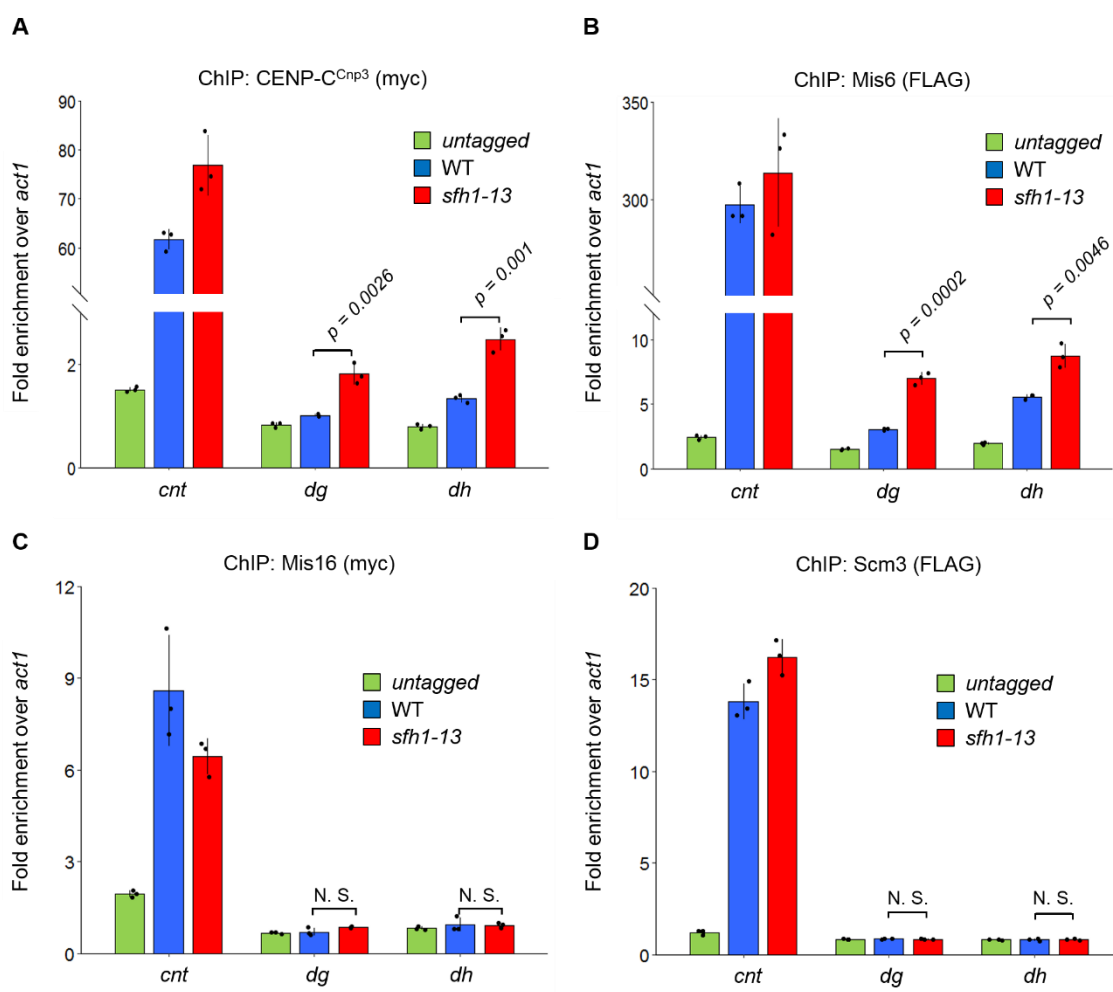


図 3-7 *sfh1-13* 変異株のペリセントロメア領域ではキネトコアタンパク質が集積する

A-D. **A:** CENP-C^{Cnp3}-Myc、**B:** CENP-I^{Mis6}-Myc **C:** RBBP4/7^{Mis16}-FLAG 及び **D:** HJURP^{Scm3}-FLAG を発現する各株に対して抗 Myc 又は抗 FLAG 抗体を用いた ChIP を行い、セントロメア領域における各タンパク質の局在量をリアルタイム PCR で定量した。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験から算出した。p 値は、paired t-test により算出した。N.S.; not significant

3-8 ペリセントロメア領域の異所的 CENP-A^{Cnp1} はキネトコアを異常拡張させる

キネトコアは、細胞周期を通じて常にセントロメアと会合しているインナーキネトコアと、分裂時にその外側に形成され微小管と直接結合するアウターキネトコアから構成される巨大な分子複合体である⁷¹。インナーキネトコアタンパク質である CENP-C^{Cnp3} 及び CENP-I^{Mis6} の ChIP-qPCR の結果から、*sfh1-13* 変異による CENP-A^{Cnp1} の局在領域の拡大はインナーキネトコアの拡大を引き起こすことが示唆されたが、アウターキネトコアに関しては不明であった。

そこで、セントロメアマーカーとして GFP-CENP-A^{Cnp1} とアウターキネトコアマーカーとして Sad1-DsRed を発現する野生株と *sfh1-13* 変異株を用いて、それぞれの細胞内局在を観察することにした。CENP-A^{Cnp1} と Sad1 の細胞内局在は、間期において、単一のスポットとして観察される^{63,72}。また、CENP-A^{Cnp1} の局在がペリセントロメア領域へ拡大した細胞では、核内における CENP-A^{Cnp1} の局在領域も拡大することが報告されている^{61,73}。野生株ではほぼ全ての細胞で単一の GFP-CENP-A^{Cnp1} スポットが観察されたが、*sfh1-13* 変異株ではいくつかの細胞で複数の GFP-CENP-A^{Cnp1} スポットが観察された (図 3-8A)。これらの細胞で観察された複数の GFP-CENP-A^{Cnp1} スポットのうち、Sad1-DsRed と共局在していないものは、セントロメアとは別の染色体領域に異所的にローディングした CENP-A^{Cnp1} の可能性がある (図 3-8A; 矢印)。しかし、複数のスポットが観察される細胞は少数 (3%) で、単一のスポットとして GFP-CENP-A^{Cnp1} が観察される細胞が多数 (97%) であった。この結果は、*sfh1-13* 変異株では CENP-A^{Cnp1} の非セントロメア領域へのローディングが起こりにくいことを示唆している。また、複数のスポットが観察される場合でもその数は 2-3 個であることが大半であった (94%)。このことから、Sad1-DsRed と共局在していない GFP-CENP-A^{Cnp1} スポットは、非セントロメア領域へ局在化したものではなく、セントロメアのクラスタリングが崩壊した個々のセントロメアである可能性も考えられる。

次に、野生株と *sfh1-13* 変異株の細胞内における GFP-CENP-A^{Cnp1} と Sad1-DsRed の単一スポットのサイズを計測した。その結果、*sfh1-13* 変異株の GFP-CENP-A^{Cnp1} スポットの平均サイズは野生株と比べて 1.1 倍、Sad1-DsRed は 1.4 倍と顕著な変化はなかった。しかし、変異株では、野生株の平均サイズより 1.5 倍以上大きいスポットを持つ細胞が、GFP-CENP-A^{Cnp1} でも Sad1-DsRed でも野生株と比べて 2.2 倍増加した (図 3-8B)。また、両ス

ポットサイズ共に野生株平均サイズの 1.5 倍以上になった細胞の割合は、野生株で 1%であったのに対し *sfh1-13* 変異株で 13%であった。

これら一連の結果は、*sfh1-13* 変異によりペリセントロメア領域に形成された異所的 CENP-A^{Cnp1} は、アウターキネトコアも含めた、機能的キネトコアの異常拡張を誘導することを示唆している。また、この異常拡張が *sfh1-13* 変異株における染色体分配異常の原因である可能性が考えられる。

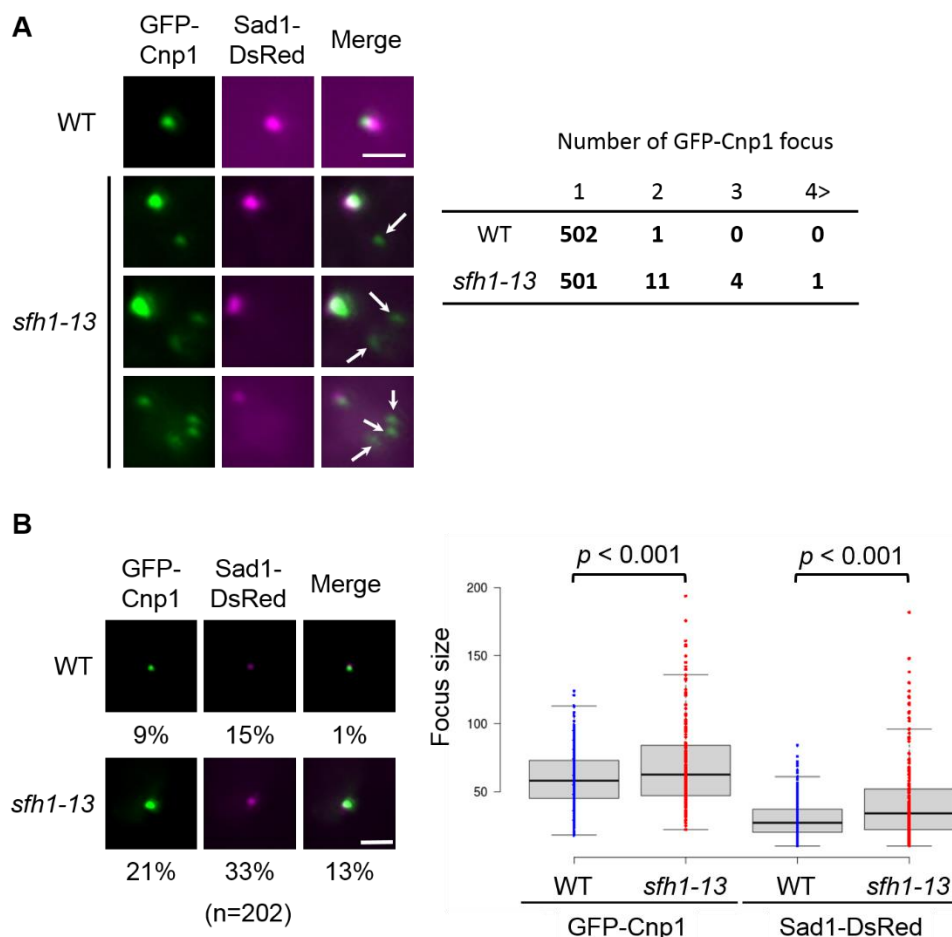


図 3-8 *sfh1-13* 変異はペリセントロメア領域へキネトコアを異常拡張させる

A. (左) GFP-Cnp1 と Sad1-DsRed を発現する野生株と *sfh1-13* 変異株の生細胞観察を行った。矢印は Sad1 と共局在していない Cnp1 スポットを示す。(右) 野生株と *sfh1-13* 変異株の細胞内における Cnp1 スポットの数を実数した **B.** (左) GFP-Cnp1 と Sad1-DsRed の単一スポット。画像下のそれぞれの数値は、平均サイズの 1.5 倍の大きさのスポットを持つ細胞の割合を示す。(右) スポットサイズの計測結果。単一の GFP-Cnp1 と Sad1-DsRed の大きさを計測した。Scale bar 2 μ m

3-9 *sfh1-13* 変異による異所的 CENP-A^{Cnp1} の拡大はセントロメア領域内に制限される

CENP-A^{Cnp1} の ChIP-seq の結果は、*sfh1-13* 変異による異所的 CENP-A^{Cnp1} の拡大がセン

トロメア領域内に制限されることを示唆するものであった (図 3-6A-C)。 *sfh1-13* 変異株の *cen1* 左末端における CENP-A^{Cnp1} の局在量を ChIP-qPCR で確認したところ、セントロメアヘテロクロマチン領域の末端を境界にして、局在量が急減した (図 3-9A)。この結果から、*sfh1-13* 変異による CENP-A^{Cnp1} の局在領域の拡大にはヘテロクロマチンの存在が要求されることが考えられた。実際に、ゲノム上から H3K9me が完全消失しヘテロクロマチンが形成されなくなる *clr4* 欠失変異との二重変異株 (*sfh1-13 clr4Δ*) に対して CENP-A^{Cnp1} の ChIP-qPCR を行ったところ、*sfh1-13* 変異株のペリセントロメア領域で観られた異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在が二重変異株では失われていた (図 3-9B)。

この *clr4* 欠失変異による異所的 CENP-A^{Cnp1} の解消により *sfh1-13* 変異株の染色体分配異常が回復している可能性が考えられたが、*sfh1-13 clr4Δ* 二重変異株で TBZ に対する感受性が回復することはなかった (図 3-9C)。

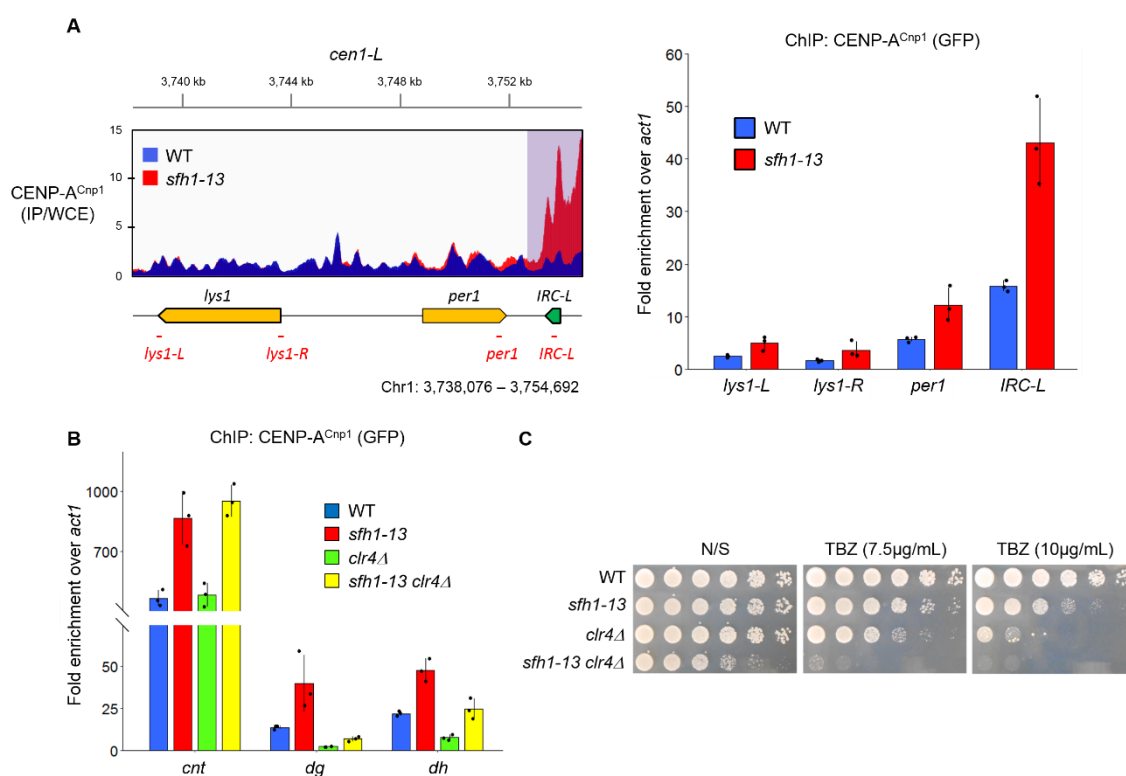


図 3-9 *sfh1-13* 変異による CENP-A^{Cnp1} の異所的局在にはヘテロクロマチンが要求される

A. 野生株と *sfh1-13* 変異株の *cen1* 左側末端領域における CENP-A^{Cnp1} の分布。下に周辺のゲノム構造を示した。横線 (赤) は定量 PCR のプライマーの位置、影 (紫) はヘテロクロマチン領域をそれぞれ示している。(左) GFP-CENP-A^{Cnp1} を発現する各株に対して抗 GFP 抗体を用いた ChIP を行い、*cen1* 左側領域周辺における CENP-A^{Cnp1} の局在量をリアルタイム PCR で定量した。(右) **B.** 各株に対して CENP-A^{Cnp1} の ChIP を行い、セントロメア領域における局在量をリアルタイム PCR で定量した。**C.** 各株の 10 倍希釈系列をそれぞれのプレートにスポットし、30°C で 3 日間培養した。(N/S: non selective)。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験から算出した。

これらの結果から、*sfh1-13* 変異による異所的 CENP-A^{Cnp1} の拡張にはヘテロクロマチンが必要であることが示された。必然的に CENP-A^{Cnp1} の局在はセントロメア領域内に制限される。ペリセントロメア領域のヘテロクロマチンはコヒーシンの集合を促進し、分裂期において姉妹染色分体の接着を維持することで染色体分配に重要な役割を果たす⁷⁴。したがって、ヘテロクロマチンが完全に消失する *clr4* 欠失変異は、単独で TBZ に対する強い感受性と染色体分配異常を示す⁷⁵。これにより、異所的 CENP-A^{Cnp1} の解消による染色体分配異常への影響を、ヘテロクロマチンの喪失による影響が打ち消してしまった可能性がある。

3-10 *sfh1-13* 変異株における HDAC の欠失は CENP-A^{Cnp1} の異所的局在を解消する

異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在に必要なヘテロクロマチンの特性を絞り込むため、ペリセントロメア領域のヒストンの低アセチル化に着目した。分裂酵母の NuRD 複合体である SHREC は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC, Histone DeAcetylase) Clr3 を含んでおり、ヘテロクロマチンにおけるヒストンのアセチル化レベルを低い状態に維持している⁷⁶。

Clr3 が *sfh1-13* 変異株のペリセントロメア領域のヘテロクロマチンに与える影響について調べるために、*clr3* 欠失変異株および二重変異株 (*sfh1-13 clr3Δ*) を作製し、抗 H3K14ac 抗体と抗 H3K9me 抗体を用いて ChIP-qPCR を行った。その結果、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株のペリセントロメア領域では、*clr3* 欠失変異株と同様に、H3K14ac レベルは上昇するものの H3K9me レベルの低下は軽度にとまっていた (図 3-10A)。また、ヒストンのアセチル化により惹起されるペリセントロメア領域の転写活性化も、*clr3* 欠失変異株と同様に、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株において確認された (図 3-10B)。以上の結果は、二重変異株のペリセントロメア領域では、ヘテロクロマチン構造がある程度保たれたまま、ヒストンのアセチル化レベルの上昇とそれに伴う転写の活性化が起きていることを示している。

次に、CENP-A^{Cnp1}-5FLAG を発現する *clr3* 欠失変異株および *sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株を作製し、抗 FLAG 抗体を用いて ChIP-qPCR を行った。その結果、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株と同じように、ペリセントロメア領域における異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在が *sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株で失われていた (図 3-10C)。これと一致するように、*sfh1-13* 変異株で観られた CENP-A^{Cnp1} (*nmt41-cnp1*) の過剰発現による生育の遅延が、二重変異株で部分的に回復していた (図 3-10C)。続いて、*clr3* 欠失変異による二次的影響を排除するため、野生株と *sfh1-13* 変異株を HDAC 阻害剤の TSA に曝露してペリセントロメア領域への影響を調べたところ、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株と同様に、H3K14ac レベルの上昇と異所的 CENP-A^{Cnp1} の解消が確認された (図 3-10D)。これらの結果は、*sfh1-13* 変異株のペリセントロメア領域における異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在には、ヘテロクロマチンそのものではなく、ヒストンの低アセチル化状態が必要であることを示唆する。

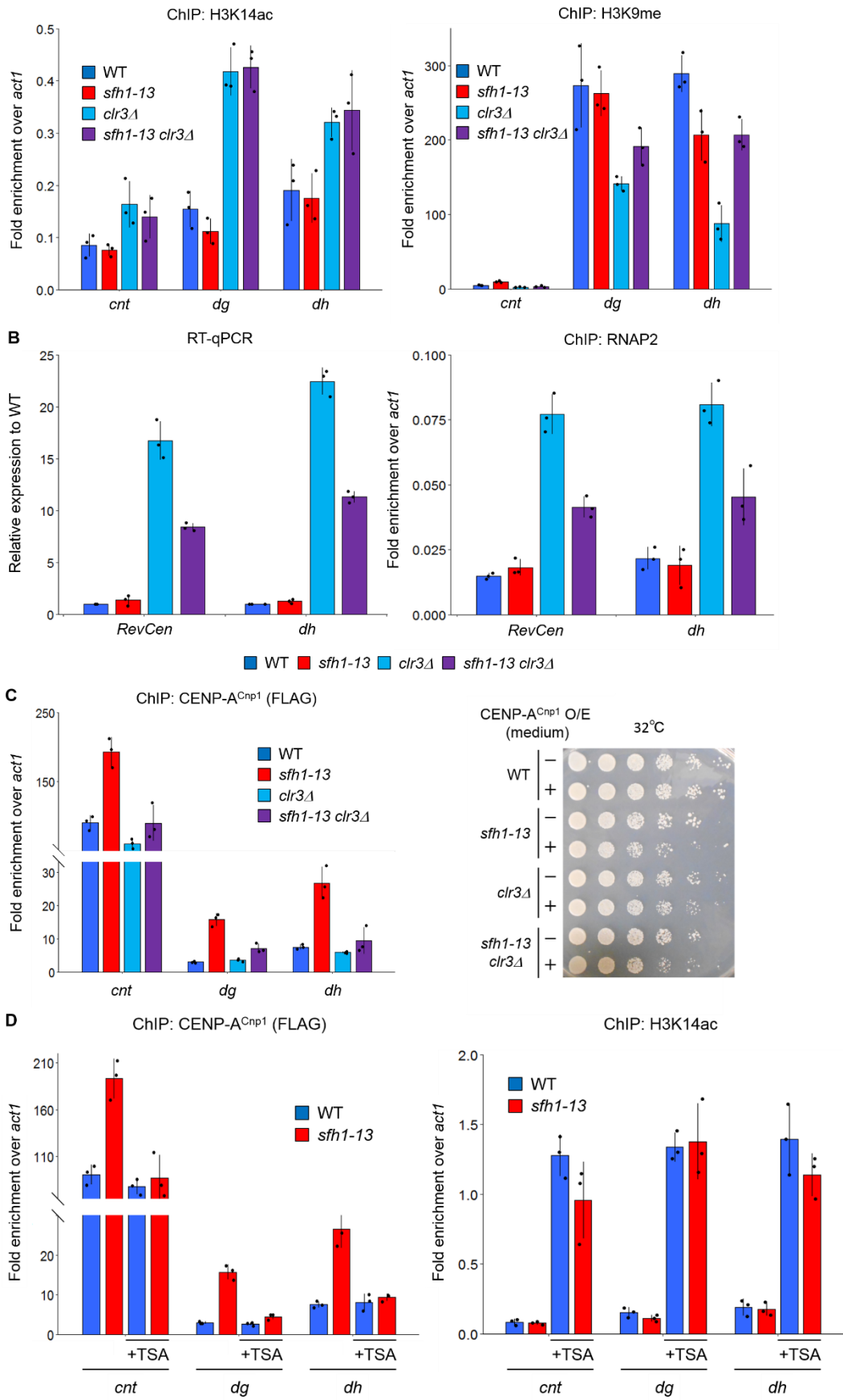


図 3-10 *sfh1-13* 変異株における HDAC の欠失は異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在を解消させる

A. 各株に対して H3K14ac 及び H3K9me の ChIP を行い、セントロメア領域における局在量をリアルタイム PCR で定量した。**B.** (左) 各株から調製した RNA を使用して RT-qPCR を行い、野生株と比較した各株の centromeric ncRNA の発現レベルを分析した。(右) 各株に対して RNAP2 の ChIP を行い、セントロメア領域における RNAP2 の局在量をリアルタイム PCR で定量した。**C.** CENP-A^{Cnp1} の ChIP を行い、セントロメア領域における CENP-A^{Cnp1} の局在量をリアルタイム PCR で定量した。(左) CENP-A^{Cnp1} を中発現 (*nmt41-CENP-A^{Cnp1}*) する各株の生育程度を、空ベクターを保有する細胞 (−) と比較した。各株の 10 倍希釈系列をプレートにスポットし、32°C で 6 日間培養した。**D.** 各株を TSA (5 µg/mL) に 8 時間暴露した後、CENP-A^{Cnp1} 及び H3K14ac の ChIP を行い、セントロメア領域における局在量をリアルタイム PCR で定量した。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験から算出した。

3-11 異所的 CENP-A^{Cnp1} の解消は Snf21 の局在量増加によるものではない

先行研究により、Snf21 をはじめとする複数の RSC サブユニットが H3K14ac に結合することが示されている^{18,77}。また、*clr3* の欠失変異により Snf21 のセントロメアへの局在量が上昇することが示されており、HDAC の活性が RSC のセントロメアへの局在を制限していることが示唆されていた⁷⁸。これらの報告から、Clr3 の欠損によって引き起こされた H3K14ac レベルの上昇により Snf21 の局在量が増加したことで、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株のペリセントロメア領域における異所的 CENP-A^{Cnp1} が解消された可能性が考えられた。この可能性を検証するために、Snf21 の C 末端に Myc-tag を付加した株を作製し、抗 Myc 抗体を用いて ChIP-qPCR を行った。先行研究の結果と同じく、*clr3* 欠失変異株のペリセントロメア領域では Snf21 の局在量の増加が確認された (図 3-11)。一方、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株では、*sfh1-13* 変異株と比較して、Snf21 の局在量に顕著な変化は観られなかった (図 3-11)。この結果から、*sfh1-13* 変異はヒストンのアセチル化による Snf21 のセントロメアへの局在を妨げており、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株における異所的 CENP-A^{Cnp1} の解消は Snf21 の局在量の増加によるものではないことが示唆された。

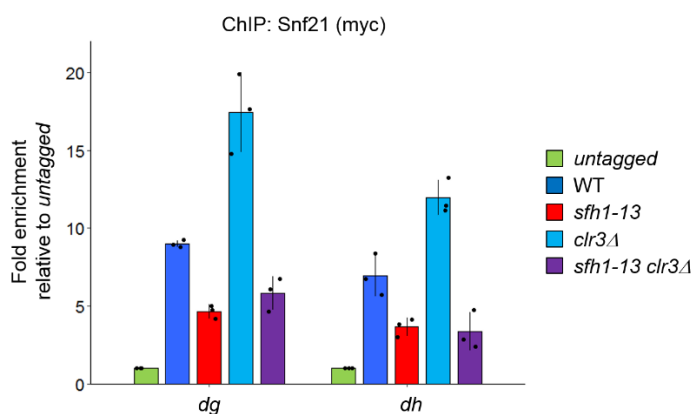


図 3-11 Snf21 は Snf21 のペリセントロメア領域への結合に必要とされる

各株に対して Snf21 の ChIP を行い、ペリセントロメア領域における局在量をリアルタイム PCR で定量した。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験から算出した

3-12 異所的 CENP-A^{Cnp1} の解消は染色体分配異常を部分的に回復させる

clr3 欠失変異による異所的 CENP-A^{Cnp1} の解消により *sfh1-13* 変異株の染色体分配異常が回復している可能性を考え、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株の TBZ に対する感受性を確認したところ、部分的な回復が観察された (図 3-12A)。また、TSA に曝露した *sfh1-13* 変異株でも TBZ 感受性の部分的回復が同じく観察された (図 3-12B)。これらの結果から、ペリセントロメア領域への異所的 CENP-A^{Cnp1} 局在の解消により、染色体分配異常が部分的に回復している可能性が考えられた。

次に、回復の程度を定量化するために人工染色体 (ミニクロモソーム) の喪失率を測定し、異所的 CENP-A^{Cnp1} 局在の解消が *sfh1-13* 変異株の染色体分配異常に与える影響を調べた。先行研究の結果と同じように³⁶、*sfh1-13* 変異株は野生株と比べてミニクロモソーム喪失率が 11.2 倍高かった (図 3-12C)。一方、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株のミニクロモソーム喪失率は、野生株よりは高いものの (3.9 倍)、*sfh1-13* 変異株と比べて低く抑えられていた (図 3-11C)。この結果は、異所的 CENP-A^{Cnp1} 局在の解消によって *sfh1-13* 変異株の染色体分配異常が部分的に回復したこと、言い換えれば異所的 CENP-A^{Cnp1} 局在が染色体異常を引き起こしていたことを示している。

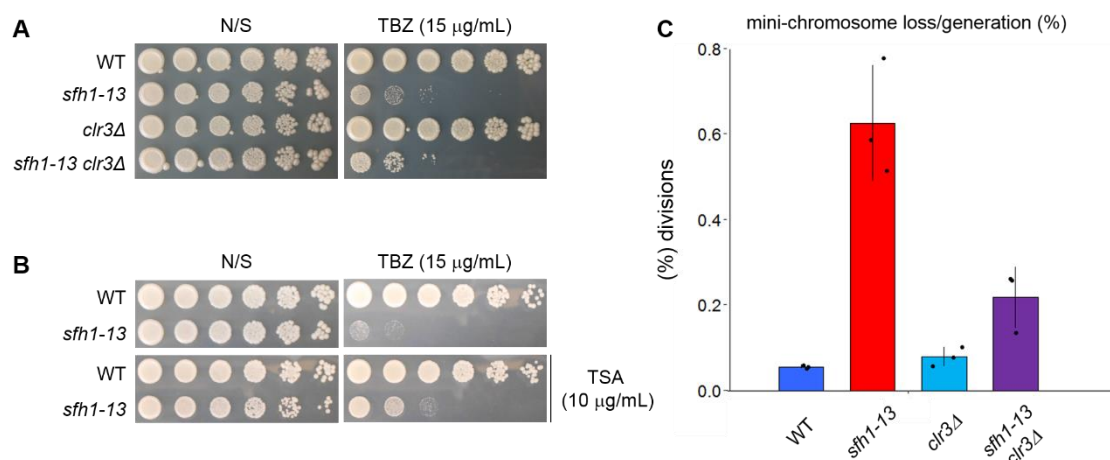


図 3-12 異所的 CENP-A^{Cnp1} の解消は染色体分配異常を部分的に回復させる

A, B. 各株の 10 倍希釈系列をそれぞれのプレートにスポットし、30°C で 3 日間培養した。(N/S: non selective) C. 各株を 36°C で 8 時間培養し、1 世代あたりのミニクロモソーム喪失率を算出した。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験から算出した。

3-13 RSC はセントロメアの境界領域に NDR の形成を誘導する

これまでの実験結果から、RSC はペリセントロメア領域における異所的な CENP-A^{Cnp1} の局在化を阻止することが示された。しかし、RSC がどのようにしてそれを阻止しているの

かは不明なままである。先行研究において、RSC は、セントロメア領域内において、CENP-A^{Cnp1} クロマチンとヘテロクロマチンとの境界に局在することが Snf21 の ChIP-seq により確認されている⁷⁹。また、*cen1* において Clr3 欠損下で RSC 依存的に誘導される NDR はこの境界の近傍に位置する⁷⁸。さらに、*sfh1-13* 変異株において異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在はペリセントロメア領域以外のヘテロクロマチンでは観られなかったため (図 3-6G)、この異所的 CENP-A^{Cnp1} は中央領域から境界領域を越えてペリセントロメア領域へ侵入したと考えられる。これらの知見から、RSC が境界領域で CENP-A^{Cnp1} のヘテロクロマチン領域への侵入を阻止していることが予想された。したがって、*sfh1-13* 変異が境界領域のクロマチン構造に与える影響を検討することにした。

RSC は、特に転写開始点近傍に NDR を形成し、転写制御に関与しているという報告から⁹⁻¹¹、セントロメアの境界領域でも同様に NDR の形成を誘導している可能性が考えられた。一般的に、ヌクレオソームの占有度が低い領域は、マイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase, Micrococcal Nuclease) への感受性が高いので、定量 PCR で得られるシグナルが相対的に低くなることが知られている (図 3-13A)。そこで、境界領域のヌクレオソームの占有度を MNase-qPCR 解析で検証することにした。占有度は、構成的に NDR であることが知られ、*sfh1-13* 変異株においても MNase への感受性が変化しない *act1+* の転写終結点 (図 3-13A; TTS, Transcription Termination Site) を内部標準とし、MNase 消化に対する相対的耐性度として算出した。*cen1* の CENP-A^{Cnp1} クロマチンからヘテロクロマチンにまたがる領域 (1.25 kb) に 5 か所のテストサイトを設定し (図 3-13B の i: CENP-A^{Cnp1} クロマチン領域、ii-iv: 境界領域、v: ヘテロクロマチン領域)、各株のクロマチンを MNase で処理した消化産物に対して定量 PCR を行った。その結果、野生株の部位 i と v では、*act1+* の

TTS に比べ 7 倍以上の MNase 耐性度が見られたが、境界の中間ゾーンに相当する部位 iii は、部位 i と v に比べ低い MNase 耐性度 (3.9 倍) を示した (表 3-1、図 3-13B)。また、tRNA 遺伝子に対応する部位 ii と iv は、*act1+* の TTS と同レベルの MNase 耐性度を

示した (表 3-1、図 3-13A, B)。これらの結果は、tRNA 遺伝子を含む境界領域ではヌクレオソームの占有度が低いという以前の報告と一致している^{50,78,80}。一方、*sfh1-13* 変異株では、MNase 耐性度が野生株と比べて全体的に少し高い傾向があり、特に境界領域で高い耐性度 (WT 比 2.4 倍) が観られた (表 3-1、図 3-13B の iii)。また、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株の境界領域における MNase 耐性度は、*sfh1-13* 変異株よりは低いものの、野生株と比べて依然高いままであった (表 3-1、図 3-13B の iii)。しかし、周辺領域では野生株と比べて顕著

表 3-1 各サイトにおける相対的 MNase 耐性度のまとめ

| | i | ii | iii | iv | v |
|----------------------|-------------------|-----------|------------------|-----------|------------------|
| WT | 7.1 | 0.5 | 3.9 | 0.9 | 7.5 |
| <i>sfh1-13</i> | 10.8 (1.5) | 0.7 (1.4) | 9.5 (2.4) | 1.0 (1.2) | 8.9 (1.2) |
| <i>clr3Δ</i> | 8.0 (1.1) | 0.4 (0.8) | 4.6 (1.2) | 1.0 (1.2) | 6.9 (0.9) |
| <i>sfh1-13 clr3Δ</i> | 9.3 (1.3) | 0.8 (1.4) | 6.5 (1.6) | 1.3 (1.6) | 7.9 (1.0) |

()内の数値は各サイトにおける WT の耐性度を 1 とした場合の値 WT との有差が 0.05 以下であった値を赤字で示した。

な差は観られなかった（表 3-1、図 3-13B の i 及び v）。

これらの結果から、RSC は特に境界領域においてヌクレオソームの占有度を低く維持している（すなわち NDR の形成を誘導している）こと、この働きは境界領域においては *Clr3* から部分的に独立していることが示唆された。

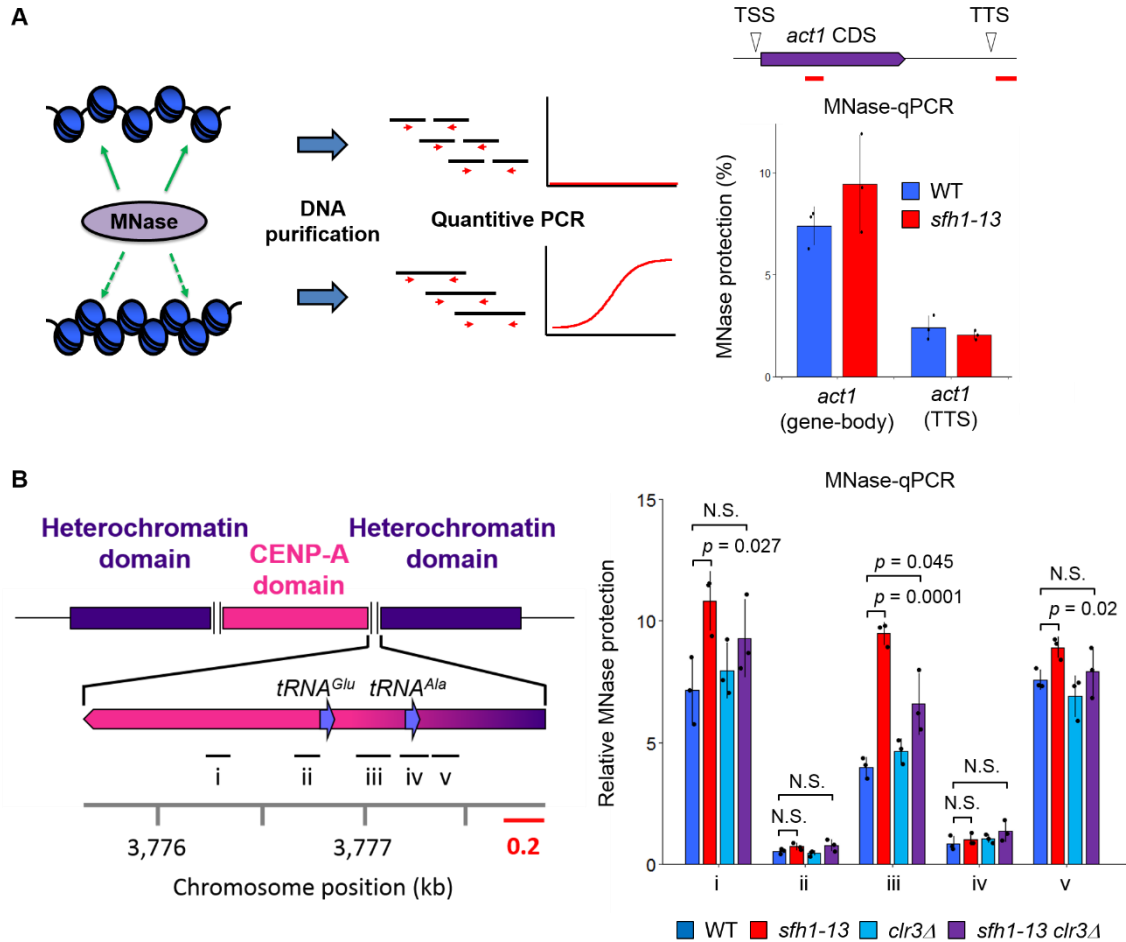


図 3-13 RSC はセントロメアの境界領域に NDR の形成を誘導する

A. (左) MNase-qPCR 解析の模式図。実線と点線の矢印は、それぞれ効率的な MNase 切断部位とそうでない部位を示している。定量 PCR に供する DNA は、MNase 処理したクロマチンから調製した。(右) 各株から調製した MNased DNA を用いて定量 PCR を行い、各株の *act1* 遺伝子座周辺の NDR レベルを定量した。上は *act1* 遺伝子座領域周辺の模式図。横線 (赤) はそれぞれプライマーの位置を示す。**B.** (左) *cen1* の境界領域の模式図。横線 (黒: i-v) はそれぞれプライマーの位置を示す。(右) 各株から調製した MNased DNA を用いて定量 PCR を行い、各株のセントロメア境界領域周辺における NDR レベルを定量した。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験から算出した。p 値は、paired t-test により算出した。N.S.; not significant

3-14 RSC は tRNA 遺伝子上において不完全なヌクレオソームの形成を抑制する

野生株の部位 i、iii 及び v では、*act1+* の TTS に比べ 4-7 倍程度の MNase 耐性度が見られた一方で、tRNA 遺伝子に対応する部位 ii と iv は、*act1+* の TTS と同レベルの MNase 耐性を示した (図 3-13B)。これらの部位は、CENP-A ヘミソーム⁸¹ や FN あるいはリモデリング途中のヌクレオソームなどの不完全なヌクレオソーム^{25,26,82} または RNA ポリメラーゼ III (RNAP III) やその転写因子 (TFIIIC) など⁸³ の非ヒストン複合体によって MNase 消化から保護された結果、通常の高ヌクレオソーム DNA (約 150 bp) より小さな DNA フラグメントが生成し定量 PCR のテンプレートにならなかった可能性がある。実際、この tRNA 遺伝子座からは、通常の高ヌクレオソーム DNA よりも短い DNA 断片 (<110 bp) が MNase の消化によって生成することが示されている⁸⁴。そこで、より短い DNA テンプレートを検出できるプライマーを用いて各株のクロマチンを MNase で処理した消化産物に対して定量 PCR を行ったところ、野生株と比べて、*sfh1-13* 株及び *sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株で tRNA 遺伝子座での MNase 耐性度が上昇していた (図 3-14)。この結果から、RSC は境界領域の tRNA 遺伝子座において不完全なヌクレオソームまたは非ヒストン複合体の形成を抑えている可能性が考えられる。

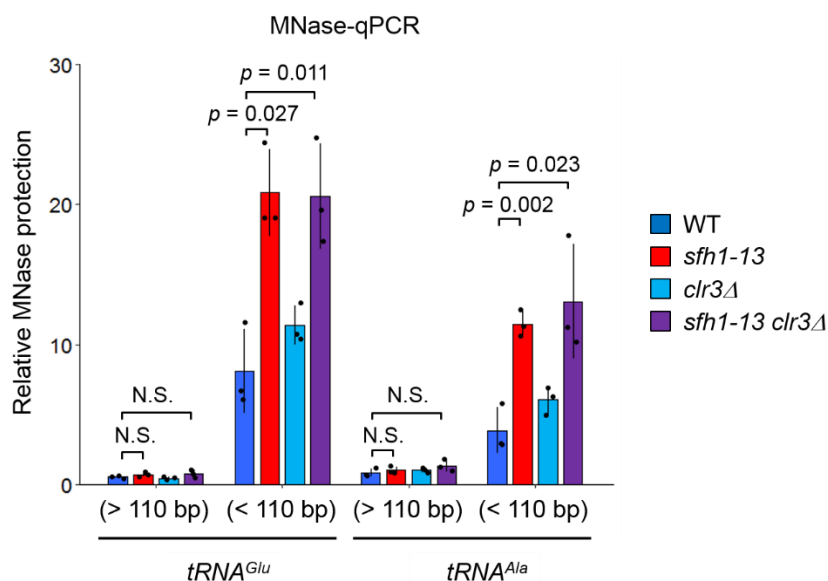


図 3-14 RSC は境界領域の tRNA 遺伝子上においても NDR の形成を誘導する

各株から調製した MNase 消化 DNA を用いて定量 PCR を行い、各株の境界領域内に位置する tRNA 遺伝子座における NDR レベルを定量した。横軸に示した数値は、用いたプライマーにより産出されるアンプリコンのサイズを示している。(> 110 bp) の結果は図 3-13B と同一である。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験から算出した。p 値は、paired t-test により算出した。N.S.; not significant

3-15 RSC は境界領域において異所的 CENP-A^{Cnp1} の形成を抑制する

上記の結果から、*sfh1-13* 変異株及び *sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株の境界領域における

MNase 耐性度の上昇は CENP-A^{Cnp1} の局在異常に起因するものであることが考えられた。そこで、CENP-A^{Cnp1}-5FLAG を発現する各株に対して抗 FLAG 抗体及び抗ヒストン H3 抗体を用いた ChIP-qPCR を行い、境界領域とその周辺の CENP-A^{Cnp1} とヒストン H3 の局在量を調べた。その結果、*sfh1-13* 変異株では、ペリセントロメア領域での結果と同じように、異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在化が境界領域とその周辺で観られたが、興味深いことに、境界領域においては *sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株でも *clr3Δ* 株より高い CENP-A^{Cnp1} の局在量を維持していた (図 3-15A, C)。この結果は、二重変異株の境界領域における MNase 耐性度が、野生株と比べて高かったことと一致しており (図 3-13B, 3-14)、境界領域ではヒストンのアセチル化による異所的 CENP-A^{Cnp1} 局在の解消が起こらないことを示唆している。一方で、ヒストン H3 は境界領域で、その周辺領域と比べて、局在量が減少していたものの、各株で顕著な差は観られなかった (図 3-15A) これらの結果から、RSC は境界領域において、ヒストン H3 ではなく、CENP-A^{Cnp1} の局在を阻止することで NDR の形成を誘導していることが示唆される。

これまでの研究により、tRNA 遺伝子は分裂酵母セントロメアの境界領域に存在し^{85,86}、セントロメアクロマチンの境界形成に関与していることが示されている^{87,88}。これらの知見と上記の結果から、*sfh1-13* 変異が tRNA 遺伝子の転写や RNAP III や TFIIC の結合に影響を与えた結果、ペリセントロメア領域への CENP-A^{Cnp1} の侵入が引き起こされた可能性が考えられた。TFIIC を構成するサブユニットの1つ Sfc3 は、tRNA 遺伝子プロモーターに結合し、その転写に必要であることが示されている⁸⁹。そこで、CENP-A^{Cnp1}-5FLAG を発現する *sfc3-1* 変異株を作製し、抗 FLAG 抗体及び抗ヒストン H3 抗体を用いた ChIP-qPCR を行って、境界領域において *sfh1-13* 変異株と同じような異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在が観られるのか検証した。しかし、*sfc3-1* 変異株の境界領域では、ヒストン H3 の局在量は野生株に比べて増加するものの、CENP-A^{Cnp1} の局在量の増加は観られなかった (図 3-15B)。この結果は、tRNA 遺伝子の転写や RNAPIII 関連複合体は、境界領域においてヒストン H3 の異所的局在を阻止しているが、CENP-A^{Cnp1} の局在阻止に関与していないことを示唆する。

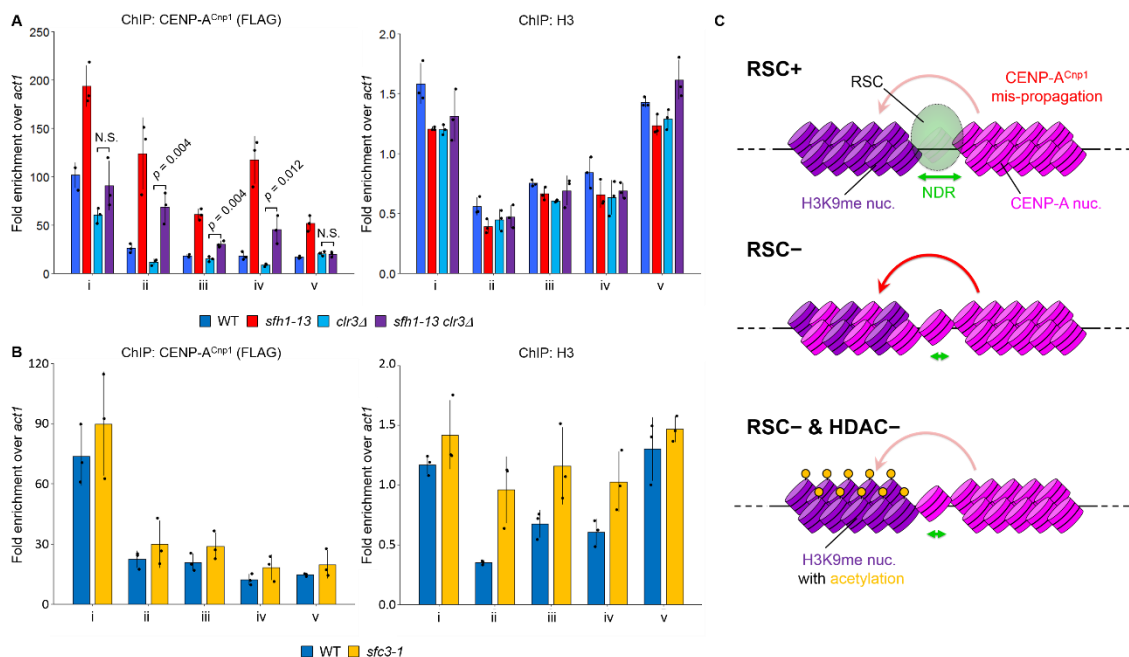


図 3-15 RSC は境界領域において異所的 CENP-A^{Cnp1} の形成を抑制する

A. 各株に対して CENP-A^{Cnp1} 及びヒストン H3 の ChIP を行い、境界領域における局在量をリアルタイム PCR で定量した。**B.** 各株に対して CENP-A^{Cnp1} 及びヒストン H3 の ChIP を行い、境界領域における局在量をリアルタイム PCR で定量した。**C.** 各株の境界領域におけるクロマチン構造のモデル図。**RSC+**: RSC は CENP-A^{Cnp1} クロマチンとヘテロクロマチンの境界で NDR の形成を誘導している。クロマチンドメインが分離されているので、CENP-A^{Cnp1} がヘテロクロマチンへ拡張出来ない。したがって、CENP-A^{Cnp1} のヘテロクロマチンへの異所的局在は起こらない。**RSC-**: RSC の機能不全により、境界領域に CENP-A^{Cnp1} が異所的に局在している。詳細なメカニズムは不明だが、CENP-A^{Cnp1} がヘテロクロマチンに拡張する。**RSC- & HDAC-**: HDAC の欠損により、ヘテロクロマチンでヒストンのアセチル化が起こる。CENP-A^{Cnp1} の異所的局在は境界領域では消失しないが、このアセチル化によってヘテロクロマチン領域では消失する。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験から算出した。p 値は、paired t-test により算出した。N.S.; not significant

3-16 境界領域における活発な転写反応は RSC の機能を代替する

上記の一連の結果から、RSC が CENP-A^{Cnp1} クロマチンとヘテロクロマチンの境界領域において CENP-A^{Cnp1} の異所的局在を抑えることで NDR の形成を誘導していることが境界の実態である可能性が考えられた。しかし、*cen1* において境界として働くことが示唆されている領域 (約 1.7 kbp) の欠失は致死的事であることが示されており^{88,90}、この領域の欠失による NDR の喪失が、*sfh1-13* 変異と同じように、ペリセントロメア領域への異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在を引き起こすのか検証することは出来なかった。近年の研究により、転写反応が染色体ドメインの形成に関与していることが明らかにされている⁹¹。特に、長い転写活性

領域は、局所的な染色体の脱凝集を促進することで空間的なギャップを形成し、隣接する染色体ドメインを物理的に分離する境界要素として有効であるというモデルが示されている(54)。そこで、*sfh1-13* 変異株のセントロメア境界領域に転写ユニットを導入すれば、これが NDR の働きを代替し、RSC の機能不全をバイパスすることで異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在が解消されるのではないかと考えた。

これを検証するために、*cen1* の左側または右側の境界領域内の tRNA^{Glu} と tRNA^{Ala} 遺伝子の間に *ura4⁺* 遺伝子が挿入された (*tRNA^{cen1L/R}::ura4⁺*)、CENP-A^{Cnp1}-5FLAG を発現する野生株および *sfh1-13* 変異株を作製した (図 3-16A)。また、転写反応の陰性対照株として、*tRNA^{cen1L}* 座位から 415 bp ヘテロクロマチン領域側に離れた *imr1L* 座位に *ura4⁺* が挿入した株も同時に作製した (*imr1L::ura4⁺*) (図 3-16A)。野生株において、各座位への挿入とも染色体分配には影響を与えないことが示されている⁹²。各座位からの *ura4⁺* の発現量を確認するために RT-qPCR を行ったところ、内在性座位からの *ura4⁺* の発現レベルと比べて、*tRNA^{cen1L/R}* 座位からは 50%程度の、*imr1L* 座位からは 10%程度の発現レベルを野生株と *sfh1-13* 変異株の両方で確認した (図 3-16B)。これは、*tRNA^{cen1L/R}* 座位に相当する部位 iii において、MNase への耐性度 (図 3-13B) や CENP-A^{Cnp1} やヒストン H3 の局在量 (図 3-15A) が境界周辺部位 (部位 i と v) と比べて低かったことと一致する。一方で、*imr1L* 座位からの発現レベルが低いのは、ヘテロクロマチンによる遺伝子サイレンシングの影響を反映している⁹²。

続いて、*sfh1-13* 変異株の各座位に挿入された *ura4⁺* の転写がペリセントロメア領域の異所的 CENP-A^{Cnp1} の局在に与える影響を調べた。*cen1* 左側の *dh* リピート (*dh1L*) を異所的 CENP-A^{Cnp1} 局在のテストサイト、*cen2* の *fbp1⁺* 遺伝子を陰性対照サイト、*cen3* のペリセントロメア領域 (*imr3*) を陽性対照サイトとしてそれぞれ設定した。*dh1L* プライマーは *cen1* 左側の *dh* リピートを特異的に検出し、他の *dh* リピートは検出しないように設計されている (図 3-16A)。野生株の *dh1L* における CENP-A^{Cnp1} の局在量は、左右どちらの境界領域に *ura4⁺* が挿入されていても、挿入されていない株と比べて顕著な差は観られなかった (図 3-16C の WT と WT *tRNA^{cen1L/R}::ura4⁺*)。一方、*sfh1-13* 変異株の *dh1L* における CENP-A^{Cnp1} の局在量は、従前の結果と同じく、増加していた (図 3-16C の *sfh1-13*)。しかし興味深いことに、左側の境界領域に *ura4⁺* が挿入された変異株では CENP-A^{Cnp1} の局在量が減少し (図 3-16C の *sfh1-13 tRNA^{cen1L}::ura4⁺*)、右側に挿入された変異株では減少しなかった (図 3-16C の *sfh1-13 tRNA^{cen1R}::ura4⁺*)。この結果は、境界領域に挿入された配列がペリセントロメア領域に与える影響は中央領域を越えて反対側にまでは及ばないことを示唆している。また、陽性・陰性対照サイトにおける CENP-A^{Cnp1} の局在量には変化がなかった (図 3-16C の *imr3* と *fbp1*)。一方、左側境界領域のすぐ外側に *ura4⁺* が挿入された変異株の *dh1L* では、境界領域内に挿入された株とは対照的に、CENP-A^{Cnp1} の局在量は減少しなかった (図 3-16C の *sfh1-13 imr1L::ura4⁺*)。これらの結果から、境界領域に挿入した配列からの高効率な転写反応は、境界における RSC の機能を代替し、ペリセントロメア領域へ

の異所的 CENP-A^{Cnp1} の侵入を阻止することが示された。

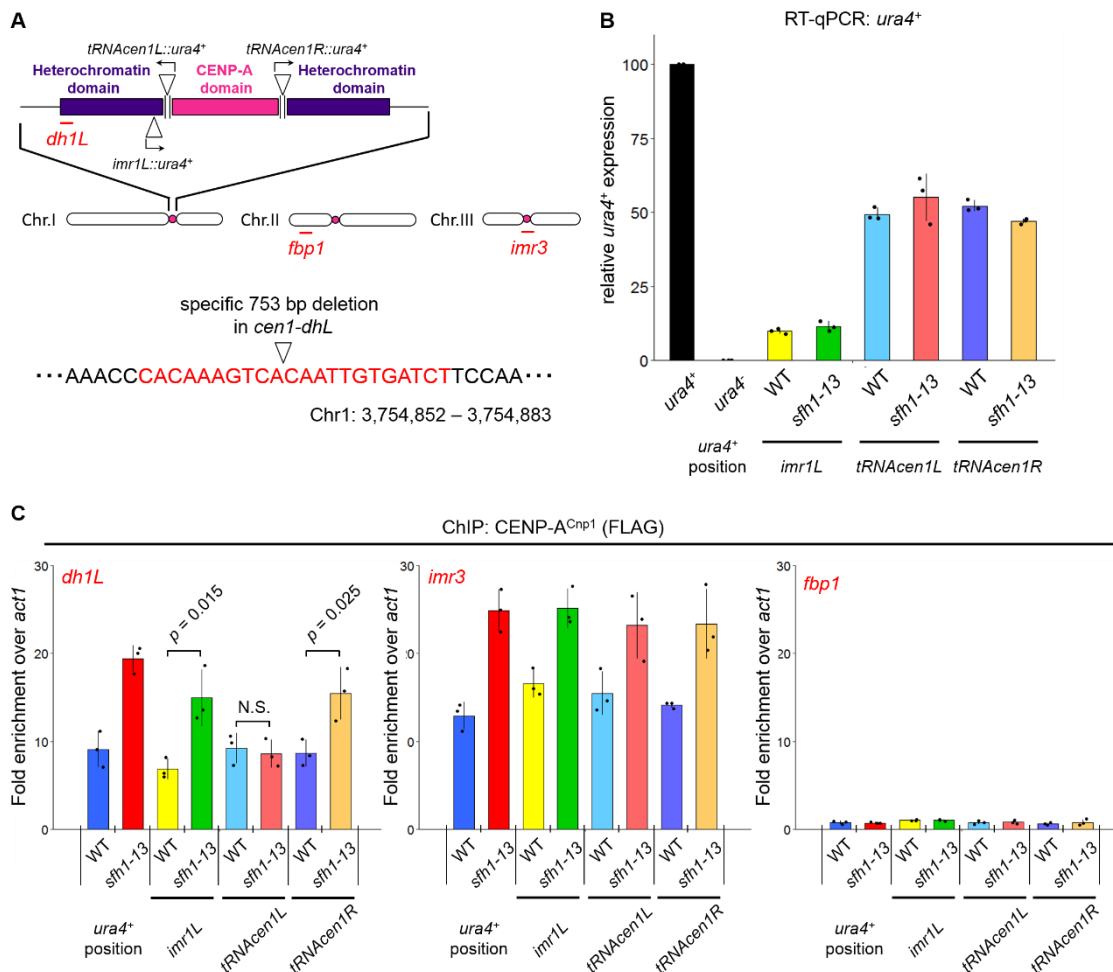


図 3-16 境界領域における転写反応は RSC の機能を代替する

A. (上) *cen1* における *ura4* 遺伝子の挿入位置とターゲットサイトの染色体上の位置。 *cen1* 模式図上の三角形は、 *ura4* 遺伝子の挿入箇所をそれぞれ示す。横線 (赤) はプライマーの位置をそれぞれ示す。(下) *dh1L* 特異的プライマーの設計箇所。 *cen1* 左側の *dh* リピートには特異的な欠失 (753 bp) がある。他の *dh* リピートがターゲットにならないように、欠失箇所にまたがるように (赤字) プライマーを設計した。 **B.** 各株から調製した RNA を使用して RT-qPCR を行い、各座位からの *ura4⁺* の発現レベルを内在性座位からの発現と比較した相対値として表した。 **C.** 各株に対して CENP-A^{Cnp1} の ChIP を行い、 *dh1L*、 *imr3* 及び *fbp1* における局在量をリアルタイム PCR で定量した。エラーバー (S.D.) は独立した 3 回の実験から算出した。 *p* 値は、paired t-test により算出した。 N.S.; not significant

3-17 境界領域の転写反応は染色体分配異常を部分的に回復させる

sfh1-13 変異株における Clr3 の欠損や TSA への曝露は、ペリセントロメア領域の異所的 CENP-A^{Cnp1} を解消し、染色体分配異常を部分的に回復させた (図 3-12A, B)。そこで、境界

領域内の転写反応による異所的 $CENP-A^{Cnp1}$ の解消によっても同じように染色体分配異常が回復するのかを調べた。各株の TBZ に対する感受性を確認したところ、野生株では $ura4^+$ の挿入の有無や位置にかかわらず、TBZ に対する感受性は観察されなかった (図 3-17)。一方、*sfh1-13* 変異体では、*tRNA^{cen1L}*:座位に $ura4^+$ が挿入された株のみで、TBZ に対する感受性が部分的に回復していた (図 3-17)。この結果と 3-12 での結果から、RSC の機能不全による $CENP-A^{Cnp1}$ クロマチンとヘテロクロマチンの分離不全は、染色体分配異常を引き起こすことが示唆された。

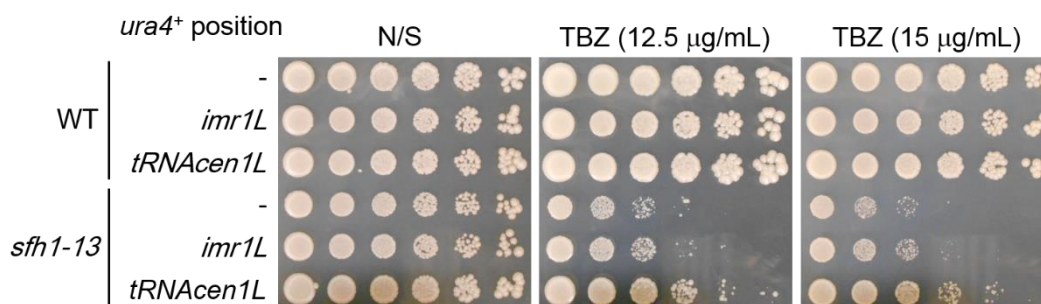


図 3-17 境界領域の転写反応は *sfh1-13* 変異株の TBZ 感受性を部分的に回復させる

各株の 10 倍希釈系列をそれぞれのプレートにスポットし、30°C で 3 日間培養した。N/S: non selective

第四章

考察

本研究では、クロマチン関連の多くのプロセスで重要な役割を果たしているクロマチンリモデラーの1つ、RSCの機能に着目し、分裂酵母を用いてRSCとセントロメア領域内のクロマチン境界形成との関係を遺伝学的・生化学的に解析した。その結果、RSCは境界領域においてCENP-A^{Cnp1}クロマチンがヘテロクロマチンへ侵入するのを防いでいること、また、このCENP-A^{Cnp1}の異常拡張が染色体分配異常を引き起こすことが明らかになった。さらなる解析から、RSCは境界領域においてCENP-A^{Cnp1}の異所的局在を抑えることでNDRの形成を誘導することでCENP-A^{Cnp1}クロマチンとヘテロクロマチンの境界を維持していることが示された。

4-1 RSCはセントロメア領域内で異所的CENP-A^{Cnp1}局在を制限する

本研究では、RSCの必須サブユニットSfh1の変異(*sfh1-13*)が、ペリセントロメア領域へのCENP-A^{Cnp1}の異所的局在を引き起こすことを見出した(図3-6A-D)。この異所的局在は、ゲノム上からヘテロクロマチンが完全に消失する*clr4*欠失変異との二重変異株において失われていた(図3-9B)。更に解析を進めたところ、ヘテロクロマチン内のヒストンのアセチル化レベルが低く抑えられていることが、CENP-A^{Cnp1}の局在に要求されることが明らかになった(図3-10C, D)。しかし、中央領域においてCENP-A^{Cnp1}の局在に必要とされるRBBP4/7^{Mis16}とHJURP^{Scm3}は、*sfh1-13*変異株のペリセントロメア領域では観察されなかったことから(図3-7C, D)、ペリセントロメア領域におけるCENP-A^{Cnp1}の局在化は、中央領域とは異なる様式で行われている可能性が考えられる。

これまでの研究でも、異所的CENP-Aの局在はヘテロクロマチンやその近傍で観察されることがいくつか報告されている^{38,60,61,64,66}。それらの領域がCENP-Aの局在に好ましい原因として、ヌクレオソームのターンオーバーが遅く、転写反応が不活性であることが考えられている⁶⁶。これは、ペリセントロメア領域のヌクレオソームターンオーバーや転写反応を活性化する*clr3*及び*clr4*欠失変異⁹³と*sfh1-13*変異との二重変異株において、同領域から異所的CENP-A^{Cnp1}が消失したことと一致する(図3-9B, 3-10C)また、中央領域へのCENP-A^{Cnp1}の局在化にMis16-Mis18複合体によるヒストンH4の脱アセチル化が関係するという報告から⁶⁹、CENP-A^{Cnp1}はヒストンのアセチル化レベルが高い領域へは局在化しにくいのかもかもしれない。一般的に、転写活性レベルとヒストンのアセチル化レベルには正の相関関係があるので、どちらの要因が異所的CENP-A^{Cnp1}の消失に主に関与しているのか判別するのは困難である。いずれにせよ、CENP-Aクロマチン領域と隣接し、どちらの性質も兼ね備えているペリセントロメア領域は、CENP-Aが局在するのに潜在的に適した領域であると考えられる。

一方で、性決定領域やサブテロメア領域のヘテロクロマチンでは異所的局在が観察されなかったことから(図3-6G)、RSCの機能不全下においてCENP-A^{Cnp1}は中央領域から近位のヘテロクロマチンへは侵入するが、セントロメア領域を越えて遠位にまでは拡がらな

いことが示唆された。したがって、RSC はセントロメア領域内で CENP-A^{Cnp1} の拡張を防いでいる可能性が考えられた。

4-2 セントロメア領域外への CENP-A^{Cnp1} の異所的局在は起こりにくい

sfh1-13 変異株の非セントロメア領域への異所的 CENP-A^{Cnp1} 局在は、性決定領域やサブテロメア領域も含め、観察されなかった (図 3-6G)。加えて、変異株において複数の GFP-CENP-A^{Cnp1} スポットが観察された細胞もごく少数であった (図 3-8A)。これらの結果は、非セントロメア領域への CENP-A^{Cnp1} の異所的局在化が起こりにくいことを示唆している。この原因として考えられるのは、生理条件下における CENP-A^{Cnp1} タンパク質の発現量が極めて少ないことである⁴²。実際、野生株において CENP-A^{Cnp1} タンパク質の発現量を増やすことで、サブテロメア領域への異所的 CENP-A^{Cnp1} 局在が観察されるようになる⁶⁴。また、がん細胞では非セントロメア領域への異所的 CENP-A 局在がしばしば観察されるが、これには CENP-A の過剰発現が必要とされる^{39,94,95}。したがって、*sfh1-13* 変異株でも CENP-A^{Cnp1} を過剰発現させれば、非セントロメア領域への異所的局在が引き起こされるかもしれない。実際、CENP-A^{Cnp1} の過剰発現は *sfh1-13* 変異株において生育遅延を引き起こした (図 3-4)。RSC の分布はセントロメア領域よりむしろ非セントロメア領域で観察されることから⁷⁹、この結果は、RSC は非セントロメア領域においても CENP-A^{Cnp1} の異所的局在化を阻止することを反映している可能性がある。しかし、生理発現下では、CENP-A^{Cnp1} が異所的に局在する可能性があるのは、あくまでセントロメア領域内に止まる可能性が高い。

4-3 RSC は NDR を誘導してセントロメアクロマチンの境界を形成する

これまで主に酵母を用いた研究から、RSC は転写開始点において NDR の形成を誘導し転写を活性化することが明らかになっている⁹⁻¹¹。また、RSC による NDR の形成は、転写のみならず、DNA 修復¹⁸⁻²⁰ やコヒーシンのローディング^{15,17,36} などにも寄与する。このように RSC は多様な生命現象において機能しているが、共通しているのはその作用点において RSC が NDR の形成を誘導することである。そこで、セントロメアにおいても、RSC が NDR の形成を誘導することで CENP-A^{Cnp1} の局在を制限している可能性が考えられた。

RSC がセントロメア領域で NDR の形成を誘導しているかを MNase-qPCR 解析で検証したところ、CENP-A^{Cnp1} クロマチンとヘテロクロマチンの境界領域において、その役割を果たしている可能性が高いことが示された (図 3-13B, 3-14)。これは、ChIP-seq によって *Snf21* の特異的局在が同領域で確認されていること⁷⁹ や RSC が *Clr3* 欠損下で同領域の近傍に NDR の形成を誘導すること⁷⁸ と一致している。

これまでの研究により、NDR は隣接するヌクレオソームを分離することで特定のクロマチンドメインの拡張を阻害することが報告されている⁹⁶。したがって、RSC が境界領域に

形成する NDR が CENP-A^{Cnp1} のヘテロクロマチン領域への侵入を阻止している可能性が考えられた。これを検証するため、*sfh1-13* 変異株の境界領域に *ura4⁺* 遺伝子を挿入し NDR の役割を代替させたところ、ペリセントロメア領域において CENP-A^{Cnp1} の異所的局在が解消された (図 3-16C)。この結果は、境界領域における転写反応は、NDR によるクロマチンドメインの分離作用を代替し、RSC の機能不全をバイパスすることを示している。したがって、RSC は境界領域に NDR の形成を誘導し、これがペリセントロメア領域への異所的な CENP-A^{Cnp1} の拡張を阻止していると結論付けられる。

興味深いことに、境界領域に形成された NDR は、RSC がヒストン H3 ではなく CENP-A^{Cnp1} を排除した結果によるものであった (図 3-15A)。境界領域では、野生株か変異株によらず、ヒストン H3 の局在量が少ないことから (図 3-15A)、この領域では CENP-A^{Cnp1} ヌクレオソームが潜在的に形成されやすいのかもしれない。加えて、SWI/SNF が CENP-A ヌクレオソームを H3 ヌクレオソームと同様にリモデリングすることが *in vitro* の実験で示されていることから⁹⁷、RSC がこの領域に形成される CENP-A^{Cnp1} ヌクレオソームを積極的にリモデリングすることで NDR を維持している可能性が考えられる。また、RSC との協調関係は不明であるが、Abp1 も境界領域において特異的な局在が観察されている^{98,99}。RSC は、DNA 結合タンパク質 Hmo1 と協調することで、ヌクレオソームを効率的にリモデリングするという報告¹⁰⁰ と併せて考えると、境界領域において RSC は Abp1 と協調することで CENP-A^{Cnp1} ヌクレオソームを効率的にリモデリングしているのかもしれない。

また、境界領域では Clr3 の欠損による異所的 CENP-A^{Cnp1} 局在の解消は起こらなかった (図 3-14A; *sfh1-13 clr3Δ*)。この結果は、同領域では RSC は Clr3 の機能とは無関係に CENP-A^{Cnp1} の増加を抑制していることを示している。あるいは、同領域には Clr3 の基質となるヒストン H3 が少ないため、ヒストンのアセチル化による影響が、周辺領域と比べて、限定的になった結果を反映している可能性もある。いずれにせよ、境界領域において、RSC は Clr3 の働きから独立して CENP-A^{Cnp1} の局在を制御していることを示すものである。

4-4 RSC と TFIIC は境界領域において別々の境界形成因子として並立して機能する

これまでの研究により、NDR は隣接するヌクレオソームを分離することで特定のクロマチン状態の拡張を阻止することが報告されている⁹⁶。出芽酵母では、ヌクレオソームの形成を妨げる CCGNN リピート配列とポリ(dA-dT)配列がともにヘテロクロマチンの拡張を阻止する¹⁰¹。さらに、ヒトの細胞でも、NDR が形成されることが知られている tRNA 遺伝子が、同様にヘテロクロマチンの拡張を抑えている¹⁰²。分裂酵母においても、tRNA 遺伝子はヘテロクロマチンの拡張を阻止しており、これには tRNA 遺伝子上に形成される TFIIC 複合体が関与している可能性がある^{83,103}。中央領域とペリセントロメア領域の境界にも tRNA 遺伝子が存在しており^{78,86,87}、その欠失は、CENP-A^{Cnp1} クロマチンへのヘテロクロマチンの拡張を誘発するが、CENP-A^{Cnp1} クロマチンへのヘテロクロマチンへの拡張は誘発しない⁸⁸。

これらの知見は、*sfc3-1* 変異株の境界領域において、ヒストン H3 の局在量は増加したが、CENP-A^{Cnp1} の局在量は増加しなかったことと一致する (図 3-15B)。また、この結果は、tRNA 遺伝子 (TFIIIC) はヘテロクロマチン (ヒストン H3 ナクレオソーム) の拡張に対するバリアとして機能するが、CENP-A^{Cnp1} クロマチンの拡張に対するバリアとしては機能しないことも示している。一方で、RSC の機能不全は CENP-A^{Cnp1} クロマチンの拡張を引き起こすが、ヘテロクロマチンを拡張させることはない。これらの結果は、TFIIIC と RSC とでは、境界領域の NDR 形成において排除する対象が異なることを示している (図 3-15A, B)。したがって、境界領域においては、RSC による CENP-A^{Cnp1} クロマチン拡張に対するバリアと、tRNA 遺伝子 (TFIIIC) によるヘテロクロマチン拡張に対するバリアとが並立して存在していると考えられる (図 4-1)。

ヘテロクロマチンは、ヒストンメチル化酵素 (HMT, Histone MethylTransferase) 自身が H3K9me を認識・結合し、隣接するヌクレオソームのヒストン H3 をメチル化することで拡張していくと考えられている。TFIIIC が形成される領域にはヒストン H3 ナクレオソームの NDR が形成されるため、HMT が隣接するヌクレオソームのヒストン H3 をメチル化することが出来ず、そこでヘテロクロマチンの拡張が停止すると考えられている¹⁰⁴。一方、CENP-A^{Cnp1} クロマチンについては、ヘテロクロマチンのような明確な拡張機構の存在は知られていない¹⁰⁵。しかし、ヘテロクロマチンと同様の拡張機構の存在を仮定すると、この領域に CENP-A^{Cnp1} ナクレオソームが形成されると、その拡張機構によってペリセントロメア領域へ異所的な分布が広がっていくのかもしれない (図 3-6A-C, 3-15A)。したがって、境界領域に誤って CENP-A^{Cnp1} ナクレオソームが形成された場合にはこれを取り除く機構が必要となる。RSC はこの役割を担っているのかもしれない。

いずれのクロマチンドメインにせよ、境界領域への構成ヌクレオソームの侵入を阻止することが、セントロメアのクロマチン構造維持に重要であると結論付けられる (図 4-1)。

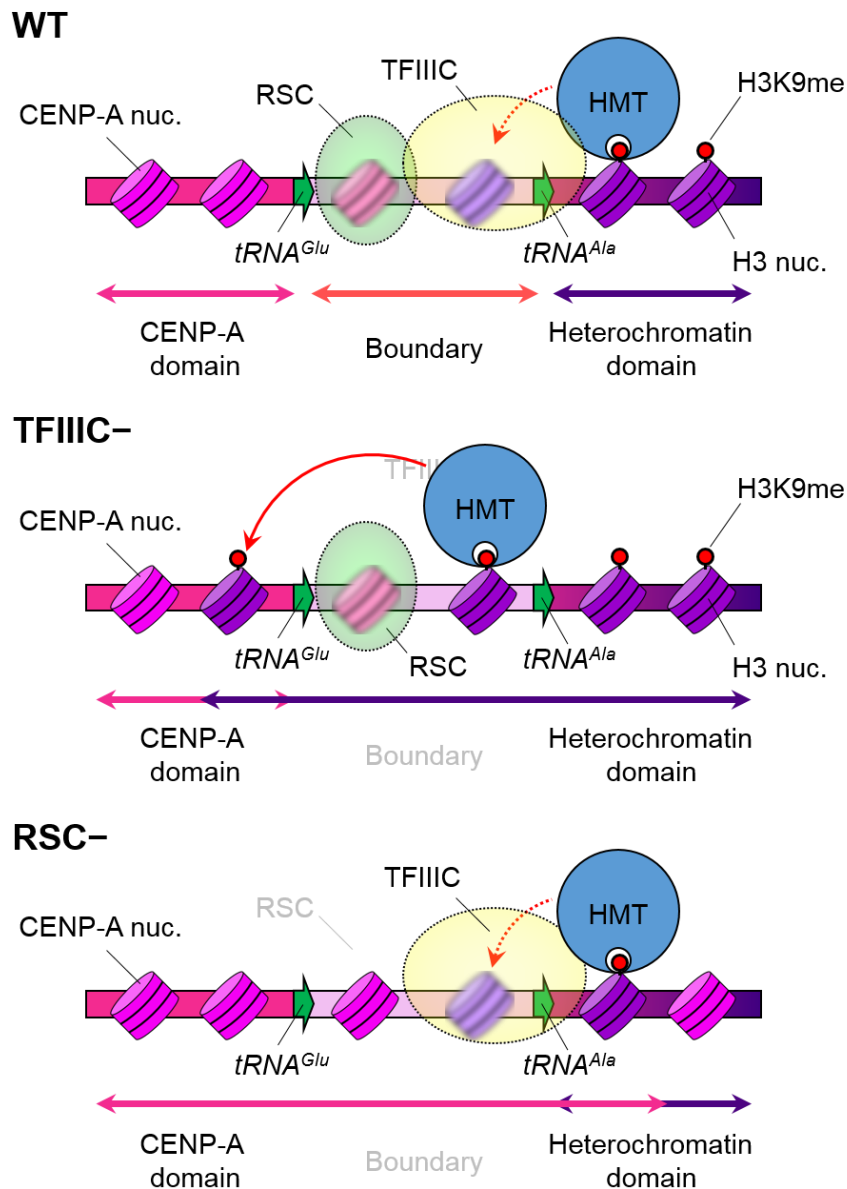


図 4-1 境界領域における 2 つの境界形成機構 TFIIC と RSC

各株におけるセントロメア境界領域の模式図。**WT**: TFIIC の結合領域下には NDR が形成されるため (半透明の H3 nuc.)、HMT が H3K9me 修飾を拡張できない。したがって、ヘテロクロマチンドメインの拡張が停止する。また、境界領域には CENP-A^{Cnp1}ヌクレオソームが形成されやすいため、RSC がリモデリングを行っている (半透明の CENP-A nuc.)。この状態で CENP-A クロマチンドメインの拡張も停止する。**TFIIC-**: TFIIC が結合していた領域に H3 ヌクレオソームが形成され、HMT により H3K9me 修飾を受ける。境界を越えた HMT が CENP-A クロマチンドメイン内のヒストン H3 にも H3K9me 修飾を行うようになり、ヘテロクロマチンドメインの拡張が進行する。一方、RSC による CENP-A^{Cnp1}ヌクレオソームのリモデリング反応は維持されているので、CENP-A クロマチンドメインの拡張は停止している。**RSC-**: RSC によるリモデリング反応が起こらなくなるの

で、境界領域に CENP-A^{Cnp1}ヌクレオソームが形成される。詳細なメカニズムは不明であるが、境界を越えた CENP-A クロマチンドメインはヘテロクロマチンドメインへ侵入し、拡張が進行する。一方、TFIIIC 結合領域下の NDR は維持されているので、ヘテロクロマチンドメインの拡張は停止している。

4-5 異所的 CENP-A^{Cnp1} はキネトコアを異常拡張させ染色体分配異常の原因になる

セントロメア領域におけるクロマチン構造の攪乱は、セントロメア機能の低下を招き、染色体分配異常を引き起こす。RSC の機能不全により引き起こされた、ペリセントロメア領域への CENP-A^{Cnp1} の異常拡張も、染色体分配異常を引き起こす可能性が考えられた。実際に、*sfh1-13* 変異株において lagging chromosome の出現率の増加と TBZ への感受性が観察されたことから (図 3-2A, B)、変異株では染色体の安定性が損なわれていることが明らかになった。また、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株において、TBZ への感受性の部分的回復やミニクロモソーム喪失率の減少が観察された (図 3-12A, C)。加えて、TSA に曝露された変異株や境界領域に *ura4⁺* 遺伝子が挿入された株においても同様の表現型が観察された (図 3-12B, 3-17)。これらの結果から、CENP-A^{Cnp1} のペリセントロメア領域への異所的局在は染色体分配異常を引き起こすことが示された (図 4-2)。この原因として、ペリセントロメア領域における異所的 CENP-A^{Cnp1} の形成に伴って、キネトコアが同領域上まで異常拡張したことが考えられる (図 3-7A, B、図 3-8B、図 4-2)。分裂期に微小管が結合するキネトコアは染色体分配において中心的な役割を担っており、そのサイズの変化は染色体分配に多大な影響を与えることが予想される。他の原因として、CENP-A^{Cnp1} の異常拡張がコヒーシンの局在に影響する可能性があることも考えられる。実際、*sfh1-13* 変異株のペリセントロメア領域において、コヒーシンのサブユニット Rad21 の局在量が減少することが確認されている³⁶。

興味深いことに、*sfh1-13 clr3Δ* 二重変異株と同様に CENP-A^{Cnp1} の異所的局在が解消した *sfh1-13 clr4Δ* 二重変異株では、TBZ への感受性の回復は観察されなかった (図 3-9B, C)。この結果は、染色体分配を安定に保つためには中央領域の CENP-A^{Cnp1} クロマチンだけでなく、ペリセントロメア領域のヘテロクロマチンも必要とされることを示している。実際、*Clr4* のみを欠失した株でも TBZ に対する感受性が観察されたが (図 3-9C)、これはペリセントロメア領域のヘテロクロマチンはコヒーシンの集合に必要とされるためである¹⁰⁶。

RSC の機能不全により、この異なる 2 つのクロマチンドメインが同じ領域に存在すると、染色体分配の安定性が損なわれてしまう (図 3-2, 3-6A-C)。これは、染色体分配における役割が CENP-A^{Cnp1} クロマチンとヘテロクロマチンとで異なるため、2 つクロマチンドメインが同じ領域に形成されてしまうとそれぞれの役割が干渉し合い染色体分配に支障を来すからかもしれない。以上の結果から、セントロメア内の異なる領域において CENP-A^{Cnp1} クロマチンとヘテロクロマチンがそれぞれ独立して存在することが、セントロメアが正常に機能する上で重要であることが考えられる。

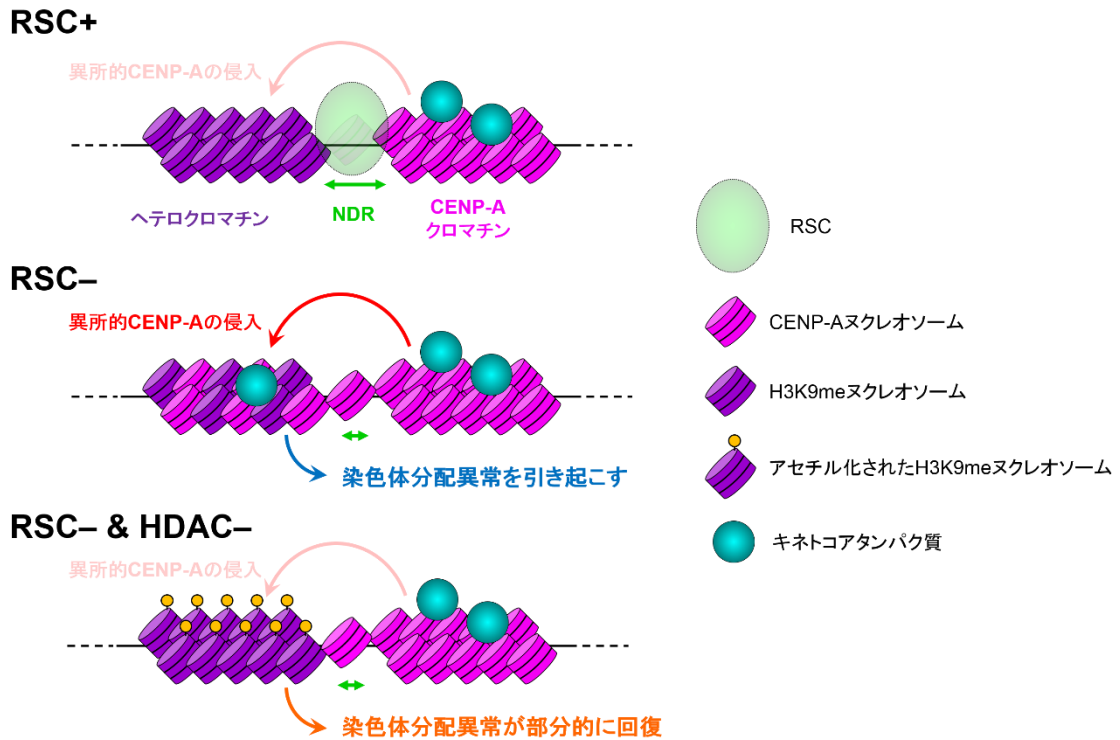


図 4-2 各株の境界領域周辺におけるクロマチン構造と染色体の安定性との関係

各株におけるセントロメア境界領域のクロマチン構造と染色体分配異常との関係。**RSC+**: 境界領域において RSC による CENP-A^{Cnp1} の排除が起こり NDR は維持されている。クロマチンドメインが分離されているので、CENP-A^{Cnp1} クロマチンのヘテロクロマチンへの異所的局在は起こらない。したがって、染色体分配は正常に行われる。**RSC-**: RSC の機能不全により、境界領域に CENP-A^{Cnp1} が異所的に局在することで、CENP-A^{Cnp1} クロマチンがヘテロクロマチンに拡張する。それと共にキネトコアの異常拡張が起こるので、染色体分配異常が引き起こされる。**RSC- & HDAC-**: HDAC の欠損により、ヘテロクロマチンでヒストンのアセチル化が起こる。CENP-A^{Cnp1} の異所的局在は境界領域では消失しないが、このアセチル化によってヘテロクロマチン領域では消失する。それに伴いキネトコアの異常拡張も解消するので、染色体分配異常が部分的に回復する。

4-6 クロマチンリモデラーは種を越えてセントロメアの機能ドメインを制御している

クロマチンリモデラーは、他の生物種でも、セントロメアクロマチンの制御にかかわっている。出芽酵母のセントロメアでも CENP-A^{Cse4} が局在する領域は SWI/SNF が形成を誘導する NDR で挟まれており、SWI/SNF のコアサブユニットである *snf2* 遺伝子の欠損により CENP-A^{Cse4} が非セントロメア領域に異所的に局在するようになることが示されている³⁷。出芽酵母のセントロメアは、ペリセントロメア領域のヘテロクロマチンを欠いているが、分裂酵母と同様にクロマチンリモデラーが境界領域に NDR の形成を誘導しているのは興味深い。哺乳類においても、ヒトの SWI/SNF-type のファミリーに属する RSF が、9 番目のリ

ジンがトリメチル化されたヒストン H3 をクロマチンから除去し CENP-A が局在できる余地を作り出すことで、セントロメア領域における安定な CENP-A の局在維持に寄与していることが示されている^{27,107}。このヒストンの交換反応には転写反応に関わる可能性があることは興味深い¹⁰⁷。また、マウスの SWI/SNF のコアサブユニットである Brg1 の欠失がペリセントロメア領域に形成されたヘテロクロマチンドメインの核内における特異的配置を消失させ染色体分配異常を引き起こすことが報告されており³⁴、クロマチンリモデラーがセントロメアのクロマチン構造の維持に寄与することは種を越えて保存されている。

ヒトの *sfh1* 遺伝子に相当する *SNF5* 遺伝子の変異は、急速進行性の発がんをもたらすことから、がん抑制因子であることが知られている^{108,109}。また、いくつかのがん細胞では CENP-A の異所的分布により非セントロメア領域にキネトコアの形成が誘導され、これが染色体の安定性を低下させていると考えられている^{39,95,110}。これらの知見に本研究の結果を加味すると、ヒトでの *SNF5* 遺伝子の機能喪失による発がんは CENP-A の異所的分布が原因の 1 つである可能性が考えられる。分裂酵母とヒトでは染色体ドメインの制御機構が同じであるとは必ずしもいえないが、クロマチンリモデラーが種を越えてセントロメアのクロマチン構造維持に寄与していることを考えると、理に合わない推測とは言えない。

本研究は、RSC が、セントロメアの境界領域に NDR の形成を誘導し CENP-A^{Cnp1} クロマチンのヘテロクロマチンへの拡張を阻止するクロマチンリモデラーであることを初めて明らかにした。RSC は、セントロメアを含むゲノム上に広く分布しており、他のクロマチンドメインの境界も RSC により同じメカニズムで形成されている可能性が考えられる。したがって、本研究は、クロマチンリモデラーの機能やクロマチンドメインの分布とその大きさを制御するメカニズムについての理解を深めることに寄与するものである。

参考文献

1. Oudet, P. Gross-Bellard M. & Chambon P. Electron Microscopic and Biochemical that Chromatin Structure Is a Repeating Unit. *Cell* **4**, 281–300 (1975).
2. Black, B. E. *et al.* Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature* **430**, 578–582 (2004).
3. De Rop, V., Padeganeh, A. & Maddox, P. S. CENP-A: The key player behind centromere identity, propagation, and kinetochore assembly. *Chromosoma* **121**, 527–538 (2012).
4. Cheeseman, I. M. & Desai, A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 33–46 (2008).
5. Fernandez-Capetillo, O. & Nussenzweig, A. Aging counts on chromosomes. *Nat. Genet.* **36**, 672–674 (2004).
6. Holland, A. J. & Cleveland, D. W. Boveri revisited: Chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 478–487 (2009).
7. Chen, C. C. & Mellone, B. G. Chromatin assembly: Journey to the CENter of the chromosome. *J. Cell Biol.* **214**, 13–24 (2016).
8. Cairns, B. R. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* **461**, 193–198 (2009).
9. Hartley, P. D. & Madhani, H. D. Mechanisms that Specify Promoter Nucleosome Location and Identity. *Cell* **137**, 445–458 (2009).
10. Parnell, T. J., Huff, J. T. & Cairns, B. R. RSC regulates nucleosome positioning at Pol II genes and density at Pol III genes. *EMBO J.* **27**, 100–110 (2008).
11. Genet, C. *et al.* A conserved role of the RSC chromatin remodeler in the establishment of nucleosome-depleted regions. *Curr. Genet.* **63**, 187–193 (2016).
12. Hota, S. K. & Bruneau, B. G. ATP-dependent chromatin remodeling during mammalian development. *Development* **143**, 2882–2897 (2016).
13. Cao, Y., Cairns, B. R., Kornberg, R. D. & Laurent, B. C. Sfh1p, a component of a novel chromatin-remodeling complex, is required for cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3323–3334 (1997).
14. Hsu, J.-M., Huang, J., Meluh, P. B. & Laurent, B. C. The yeast RSC chromatin-remodeling complex is required for kinetochore function in chromosome segregation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3202–3215 (2003).
15. Huang, J. & Laurent, B. C. A role for the RSC chromatin remodeler in regulating cohesion of sister chromatid arms. *Cell Cycle* **3**, 971–973 (2004).
16. Huang, J., Hsu, J. M. & Laurent, B. C. The RSC nucleosome-remodeling complex is

- required for cohesin's association with chromosome arms. *Mol. Cell* **13**, 739–750 (2004).
17. Muñoz, S., Minamino, M., Casas-Delucchi, C. S., Patel, H. & Uhlmann, F. A Role for Chromatin Remodeling in Cohesin Loading onto Chromosomes. *Mol. Cell* **74**, 664-673 (2019).
 18. Duan, M. R. & Smerdon, M. J. Histone H3 lysine 14 (H3K14) acetylation facilitates DNA repair in a positioned nucleosome by stabilizing the binding of the chromatin remodeler RSC (Remodels Structure of Chromatin). *J. Biol. Chem.* **289**, 8353–8363 (2014).
 19. Shim, E. Y., Ma, J.-L., Oum, J.-H., Yanez, Y. & Lee, S. E. The Yeast Chromatin Remodeler RSC Complex Facilitates End Joining Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3934–3944 (2005).
 20. Kent, N. A., Chambers, A. L. & Downs, J. A. Dual chromatin remodeling roles for RSC during DNA double strand break induction and repair at the yeast MAT locus. *J. Biol. Chem.* **282**, 27693–27701 (2007).
 21. Wagner, F. R. *et al.* Structure of SWI/SNF chromatin remodeller RSC bound to a nucleosome. *Nature* **579**, 448–451 (2020).
 22. Chen, Y. *et al.* Structure of the RSC complex bound to the nucleosome. *Science* **843**, 838–843 (2019).
 23. Patel, A. B. *et al.* Architecture of the chromatin remodeler RSC and insights into its nucleosome engagement. *Elife* 1–24 (2019).
 24. Baker, R. W. *et al.* Structural insights into assembly and function of the RSC chromatin remodeling complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **28**, (2021).
 25. Kubik, S. *et al.* Nucleosome Stability Distinguishes Two Different Promoter Types at All Protein-Coding Genes in Yeast. *Mol. Cell* **60**, 422–434 (2015).
 26. Brahma, S. & Henikoff, S. RSC-Associated Subnucleosomes Define MNase- Sensitive Promoters in Yeast. *Mol. Cell* **73**, 238-249 (2019).
 27. Perpelescu, M., Nozaki, N., Obuse, C., Yang, H. & Yoda, K. Active establishment of centromeric cenp-a chromatin by rsf complex. *J. Cell Biol.* **185**, 397–407 (2009).
 28. Lee, H. S. *et al.* The chromatin remodeler RSF1 controls centromeric histone modifications to coordinate chromosome segregation. *Nat. Commun.* **9**, 1–13 (2018).
 29. Okada, M., Okawa, K., Isobe, T. & Fukagawa, T. CENP-H – containing Complex Facilitates Centromere Deposition of CENP-A in Cooperation with FACT and CHD1. **20**, 3986–3995 (2009).
 30. Chambers, A. L. *et al.* The INO80 chromatin remodeling complex prevents polyploidy and maintains normal chromatin structure at centromeres. *Genes Dev.* **26**, 2590–2603 (2012).
 31. Walfridsson, J. *et al.* The CHD remodeling factor Hrp1 stimulates CENP-A loading to

- centromeres. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2868–2879 (2005).
32. Choi, E. S., Cheon, Y., Kang, K. & Lee, D. The Ino80 complex mediates epigenetic centromere propagation via active removal of histone H3. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
 33. Singh, P. P. *et al.* Hap2-Ino80-facilitated transcription promotes de novo establishment of CENP-A chromatin. *Genes Dev.* **34**, 226–238 (2020).
 34. Ryan J. Bourgo, H. S. *et al.* SWI/SNF Deficiency Results in Aberrant Chromatin Organization, Mitotic Failure, and Diminished Proliferative Capacity. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2673–2683 (2009).
 35. Creamer, K. M. *et al.* The Mi-2 homolog Mit1 actively positions nucleosomes within heterochromatin to suppress transcription. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 2046–61 (2014).
 36. Kotomura, N. *et al.* Sfh1, an essential component of the RSC chromatin remodeling complex, maintains genome integrity in fission yeast. *Genes to Cells* **23**, 738–752 (2018).
 37. Gikopoulos, T. *et al.* The SWI / SNF complex acts to constrain distribution of the centromeric histone variant Cse4 . *EMBO J.* **30**, 1919–27 (2011).
 38. Mathew, V. *et al.* The Histone-Fold Protein CHRAC14 Influences Chromatin Composition in Response to DNA Damage. *Cell Rep.* **7**, 321–330 (2014).
 39. Sharma, A. B., Dimitrov, S., Hamiche, A. & Van Dyck, E. Centromeric and ectopic assembly of CENP-A chromatin in health and cancer: old marks and new tracks. *Nucleic Acids Res.* **47**, 1051–1069 (2019).
 40. Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S. & Yanagida, M. Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J. Cell Biol.* **121**, 961–976 (1993).
 41. Yamada, K., Hirota, K., Mizuno, K.-I., Shibata, T. & Ohta, K. Essential roles of Snf21, a Swi2/Snf2 family chromatin remodeler, in fission yeast mitosis. *Genes Genet. Syst.* **83**, 361–372 (2008).
 42. Moreno, S., Klar, A. & Nurse, P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**, 795–823 (1991).
 43. Bähler, J. *et al.* Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943–951 (1998).
 44. Takayama, Y. *et al.* Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **19**, 682–90 (2008).
 45. Nakagawa, H. *et al.* Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications. *Genes Dev.* **16**, 1766–1778 (2002).
 46. Kimura, H., Hayashi-Takanaka, Y., Goto, Y., Takizawa, N. & Nozaki, N. The organization

- of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct. Funct.* **33**, 61–73 (2008).
47. Dohke, K. *et al.* Fission yeast chromatin assembly factor 1 assists in the replication-coupled maintenance of heterochromatin. *Genes to Cells* **13**, 1027–1043 (2008).
 48. Kawakami, K., Hayashi, A., Nakayama, J. I. & Murakami, Y. A novel RNAi protein, Dsh1, assembles RNAi machinery on chromatin to amplify heterochromatic siRNA. *Genes Dev.* **26**, 1811–1824 (2012).
 49. Lantermann, A., Stråfors, A., Fagerström-Billai, F., Korbér, P. & Ekwall, K. Genome-wide mapping of nucleosome positions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods* **48**, 218–225 (2009).
 50. Kato, H. *et al.* Spt6 prevents transcription-coupled loss of posttranslationally modified histone H3. *Sci. Rep.* **3**, 2186 (2013).
 51. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
 52. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
 53. Zhang, Y. *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* **9**, R137 (2008).
 54. Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* **14**, 178–192 (2013).
 55. Ekwall, K., Cranston, G. & Allshire, R. C. Fission yeast mutants that alleviate transcriptional silencing in centromeric flanking repeats and disrupt chromosome segregation. *Genetics* **153**, 1153–1169 (1999).
 56. Barra, V. & Fachinetti, D. The dark side of centromeres: types, causes and consequences of structural abnormalities implicating centromeric DNA. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
 57. Santaguida, S. & Musacchio, A. The life and miracles of kinetochores. *EMBO J.* **28**, 2511–2531 (2009).
 58. Scelfo, A. & Fachinetti, D. Keeping the centromere under control: A promising role for DNA methylation. *Cells* **8**, (2019).
 59. Gonzalez, M., He, H., Dong, Q., Sun, S. & Li, F. Ectopic centromere nucleation by CENP-A in fission yeast. *Genetics* **198**, 1433–1446 (2014).
 60. Choi, E. S. *et al.* Factors That Promote H3 Chromatin Integrity during Transcription Prevent Promiscuous Deposition of CENP-ACnp1 in Fission Yeast. *PLoS Genet.* **8**, (2012).

61. Kitagawa, T., Ishii, K., Takeda, K. & Matsumoto, T. The 19S proteasome subunit Rpt3 regulates distribution of CENP-A by associating with centromeric chromatin. *Nat. Commun.* **5**, 3597 (2014).
62. Monahan, B. J. *et al.* Fission yeast SWI/SNF and RSC complexes show compositional and functional differences from budding yeast. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8**, 873–880 (2008).
63. Takahashi, K., Chen, E. S. & Yanagida, M. Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science* **288**, 2215–2219 (2000).
64. Castillo, A. G. *et al.* Telomeric Repeats Facilitate CENP-ACnp1 Incorporation via Telomere Binding Proteins. *PLoS One* **8**, (2013).
65. Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. & Grewal, S. I. S. Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly. *Science* **292**, 110–113 (2001).
66. Olszak, A. M. *et al.* Heterochromatin boundaries are hotspots for de novo kinetochore formation. *Nat. Cell Biol.* **13**, 799–808 (2011).
67. McKinley, K. L. & Cheeseman, I. M. The molecular basis for centromere identity and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 16–29 (2016).
68. Tanaka, K., Chang, H. L., Kagami, A. & Watanabe, Y. Article CENP-C Functions as a Scaffold for Effectors with Essential Kinetochore Functions in Mitosis and Meiosis. *Dev. Cell* **17**, 334–343 (2009).
69. Hayashi, T. *et al.* Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell* **118**, 715–729 (2004).
70. Williams, J. S., Hayashi, T., Yanagida, M. & Russell, P. Fission Yeast Scm3 Mediates Stable Assembly of Cnp1/CENP-A into Centromeric Chromatin. *Mol. Cell* **33**, 287–298 (2009).
71. Lampert, F. & Westermann, S. A blueprint for kinetochores - New insights into the molecular mechanics of cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 407–412 (2011).
72. King, M. C., Drivas, T. G. & Blobel, G. A Network of Nuclear Envelope Membrane Proteins Linking Centromeres to Microtubules. *Cell* **134**, 427–438 (2008).
73. Gonzalez, M., He, H., Sun, S., Li, C. & Li, F. Cell cycle-dependent deposition of CENP-A requires the Dos1/2-Cdc20 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 606–11 (2013).
74. Verdaasdonk, J. S. & Bloom, K. Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 320–32 (2011).
75. Ekwall, K. *et al.* Mutations in the fission yeast silencing factors *clr4+* and *rik1+* disrupt the localisation of the chromo domain protein *Swi6p* and impair centromere function. *J. Cell Sci.* **109**, 2637–2648 (1996).
76. Sugiyama, T. *et al.* SHREC, an Effector Complex for Heterochromatic Transcriptional

- Silencing. *Cell* **128**, 491–504 (2007).
77. Wang, Y. *et al.* Histone H3 lysine 14 acetylation is required for activation of a DNA damage checkpoint in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **287**, 4386–4393 (2012).
 78. Garcia, J. F., Dumesic, P. A., Hartley, P. D., El-Samad, H. & Madhani, H. D. Combinatorial, site-specific requirement for heterochromatic silencing factors in the elimination of nucleosome-free regions. *Genes Dev.* **24**, 1758–1771 (2010).
 79. Lee, J. *et al.* Chromatin remodeller Fun30Fft3 induces nucleosome disassembly to facilitate RNA polymerase II elongation. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
 80. Moyle-Heyrman, G. *et al.* Chemical map of *Schizosaccharomyces pombe* reveals species-specific features in nucleosome positioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20158–20163 (2013).
 81. Henikoff, S. *et al.* The budding yeast Centromere DNA Element II wraps a stable Cse4 hemisome in either orientation in vivo. *Elife* **3**, 1–23 (2014).
 82. Biernat, E., Kinney, J., Dunlap, K., Rizza, C. & Govind, C. K. The RSC complex remodels nucleosomes in transcribed coding sequences and promotes transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **217**, (2021).
 83. Noma, K. ichi, Cam, H. P., Maraia, R. J. & Grewal, S. I. S. A Role for TFIIC Transcription Factor Complex in Genome Organization. *Cell* **125**, 859–872 (2006).
 84. Thakur, J., Talbert, P. B. & Henikoff, S. Inner kinetochore protein interactions with regional centromeres of fission yeast. *Genetics* **201**, 543–561 (2015).
 85. Takahashi, K., Murakami, S., Chikashige, Y., Niwa, O. & Yanagida, M. A large number of tRNA genes are symmetrically located in fission yeast centromeres. *J. Mol. Biol.* **218**, 13–17 (1991).
 86. Takahashi, K. *et al.* A low copy number central sequence with strict symmetry and unusual chromatin structure in fission yeast centromere. *Mol. Biol. Cell* **3**, 819–835 (1992).
 87. Partridge, J. F., Borgström, B. & Allshire, R. C. Distinct protein interaction domains and protein spreading in a complex centromere. *Genes Dev.* **14**, 783–791 (2000).
 88. Scott, K. C., Merrett, S. L. & Willard, H. F. A heterochromatin barrier partitions the fission yeast centromere into discrete chromatin domains. *Curr. Biol.* **16**, 119–129 (2006).
 89. Iwasaki, O., Tanaka, A., Tanizawa, H., Grewal, S. I. S. & Noma, K.-I. Centromeric localization of dispersed Pol III genes in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **21**, 254–65 (2010).
 90. Gaither, T. L., Merrett, S. L., Pun, M. J. & Scott, K. C. Centromeric Barrier Disruption Leads to Mitotic Defects in *Schizosaccharomyces pombe*. *G3 (Bethesda)*. **4**, 1–31 (2014).
 91. van Steensel, B. & Furlong, E. E. M. The role of transcription in shaping the spatial

- organization of the genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 327–337 (2019).
92. Allshire, R. C., Nimmo, E. R., Ekwall, K., Javerzat, J. P. & Cranston, G. Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev.* **9**, 218–233 (1995).
 93. Aygün, O., Mehta, S. & Grewal, S. I. S. HDAC-mediated suppression of histone turnover promotes epigenetic stability of heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 547–555 (2013).
 94. Amato, A., Schillaci, T., Lentini, L. & Di Leonardo, A. CENPA overexpression promotes genome instability in pRb-depleted human cells. *Mol. Cancer* **8**, 119 (2009).
 95. Athwal, R. K. *et al.* CENP-A nucleosomes localize to transcription factor hotspots and subtelomeric sites in human cancer cells. *Epigenetics and Chromatin* **8**, 1–23 (2015).
 96. Wang, J., Lawry, S. T., Cohen, A. L. & Jia, S. Chromosome boundary elements and regulation of heterochromatin spreading. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4841–4852 (2014).
 97. Shandilya, J. *et al.* Centromeric histone variant CENP-A represses acetylation-dependent chromatin transcription that is relieved by histone chaperone NPM1. *J. Biochem.* **156**, 221–227 (2014).
 98. Cam, H. P., Noma, K.-I., Ebina, H., Levin, H. L. & Grewal, S. I. S. Host genome surveillance for retrotransposons by transposon-derived proteins. *Nature* **451**, 431–436 (2008).
 99. Zaratiegui, M. *et al.* CENP-B preserves genome integrity at replication forks paused by retrotransposon LTR. *Nature* **469**, 112–115 (2011).
 100. Schlichter, A., Kasten, M. M., Parnell, T. J. & Cairns, B. R. Specialization of the chromatin remodeler RSC to mobilize partially-unwrapped nucleosomes. *Elife* **9**, 1–29 (2020).
 101. Bi, X., Yu, Q., Sandmeier, J. J. & Zou, Y. Formation of Boundaries of Transcriptionally Silent Chromatin by Nucleosome-Excluding Structures. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2118–2131 (2004).
 102. Raab, J. R. *et al.* Human tRNA genes function as chromatin insulators. *EMBO J.* **31**, 330–350 (2011).
 103. Scott, K. C., White, C. V. & Willard, H. F. An RNA polymerase III-dependent heterochromatin barrier at fission yeast centromere 1. *PLoS One* **2**, (2007).
 104. Allshire, R. C. & Madhani, H. D. Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 229–244 (2018).
 105. Sekulic, N. & Black, B. E. A reader for centromeric chromatin. *Nat. Cell Biol.* **11**, 793–5 (2009).
 106. Bernard, P. *et al.* Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*

- 294**, 2539–2542 (2001).
107. Ohzeki, J. ichirou *et al.* KAT7/HBO1/MYST2 Regulates CENP-A Chromatin Assembly by Antagonizing Suv39h1-Mediated Centromere Inactivation. *Dev. Cell* **37**, 413–427 (2016).
 108. Versteeg, I. *et al.* Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* **394**, 203–206 (1998).
 109. Wang, X., Haswell, J. R. & Roberts, C. W. M. Molecular pathways: SWI/SNF (BAF) complexes are frequently mutated in cancer-mechanisms and potential therapeutic insights. *Clin. Cancer Res.* **20**, 21–27 (2014).
 110. Arunkumar, G., Baek, S., Sturgill, D., Bui, M. & Dalal, Y. Oncogenic lncRNAs alter epigenetic memory at a fragile chromosomal site in human cancer cells. *Sci. Adv.* **8**, 1–17 (2022).

謝辞

本研究を行うにあたり、終始私の意思を尊重して下さった村上洋太先生に厚く御礼申し上げます。

抗 Cnp1 抗体を石井浩二郎博士から、抗 H3K9me 抗体を浦野健博士から、抗 H3K14ac 抗体を木村宏博士から分与して頂きました。セントロメア境界領域に *ura4+* が挿入された分裂酵母株および Cnp1 過剰発現プラスミドを Robin Allshire 博士から、*snf21-36* 変異株を太田邦史博士から分与して頂きました。次世代シーケンシングを鈴木穰博士に、次世代シーケンシングデータの解析サポートを加藤太陽博士に行って頂きました。本研究のさきがけとなる実験を中川浩実博士に行って頂きました。皆様のご協力に感謝申し上げます。

本研究について議論して下さいました高橋正行博士、高畑信也博士、佐藤勇太博士、浅沼高寛氏に感謝申し上げます。

最後に、私の自由を尊重し見守ってくれた家族と友人達に心から感謝します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

The chromatin remodeler RSC prevents ectopic CENP-A propagation into pericentromeric heterochromatin at the chromatin boundary

Satoru Tsunemine, Hiromi Nakagawa, Yutaka Suzuki and Yota Murakami

Nucleic Acids Research, Volume 50, Issue 19, 28 October 2022, Pages 10914-10928.