

Title	Assembly of Additional Heterochromatin Distinct from Centromere/Kinetochore Chromatin is Required for de novo Human Artificial Chromosome Formation
Author(s)	中島, 大
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46351
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	中島大
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19864 号
学位授与年月日	平成 17 年 12 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科先端応用医学専攻
学位論文名	Assembly of Additional Heterochromatin Distinct from Centromere/ Kinetochore Chromatin is Required for de novo Human Artificial Chromosome Formation (セントロメア・クロマチンと共に構造の異なるヘテロクロマチンの集 合が、新規ヒト人工染色体形成に必要なである)
論文審査委員	(主査) 教授 金田 安史 (副査) 教授 花岡 文雄 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

ヒトの分裂期染色体の一次狭窄部に位置するセントロメアは、171 bp の均一な繰り返し配列である alphoid DNA が数 Mb に及ぶ繰り返し構造をとっている。その両外側部に沿って、M 期姉妹染色体の娘細胞への均等分配に必須なキネトコア構造を形成する。Alphoid DNA の繰り返しの一部をクローニングした YAC や BAC をヒト培養細胞へ導入すると、導入 DNA がタンデムに数十コピーつながった人工染色体 (HAC) が形成され、宿主染色体から独立して安定に維持される。しかし、alphoid DNA 中の CENP-B 結合配列を持たない Y 染色体由来配列や変異アルフォイドを用いた場合には HAC が形成されないことから、CENP-B 結合配列が新規セントロメア構造形成に重要な働きをしていることが示唆されている。

CENP-B 結合配列を持つ alphoid DNA を組み込んだ YAC や BAC が、HAC を形成せず宿主染色体内へ挿入されてしまった細胞でも、セントロメア構造タンパク群 (CENPs) の集合が一定割合 (10-30%) で観察される。このような状態で、脱アセチル化酵素阻害剤 TSA による処理やマーカー遺伝子に対する長期薬剤選択を行うと、挿入 alphoid DNA 領域に対する CENPs の集合が上昇し、この領域を含む染色体断片が切り出されてミニ染色体を形成し維持されることが明らかになった。このことは、alphoid DNA の存在だけではなく周辺の配列の転写の活性化及びクロマチン構造の変化が機能的なセントロメア形成に影響を与えることを示唆している。そこで、今回アルフォイド配列をクローニングするベクター部分を改変し、マーカー遺伝子の転写活性を変化させることで、転写活性のもたらすクロマチン構造が新規 HAC 形成に与える影響を調べた。

〔 方法ならびに成績 〕

70 kb の alphoid DNA の両側にマーカー遺伝子を挿入した BAC を構築し、ヒトセントロメア配列末端の直鎖状にした後ヒト培養細胞 HT1080 へ導入した。右アーム上には、プロモーターを含む bsr 遺伝子を共通に持つのに対し、左アーム上には、1) β geo 遺伝子のみ、2) CMV プロモーターを β geo 遺伝子上流に付加、3) 2) の構築領域両端に insulator

配列を配置したもの、の3種類を構築した。薬剤 blastocidine S もしくは G418 耐性株を解析した結果、1) の構築のみ HAC の形成が起きた。また、 β geo 遺伝子転写の方向にも依存しなかった。これらの導入 DNA が宿主染色体内へ挿入された場合、HAC 形成能に関わらず CENP タンパクの集合が観察された。さらに、2) の構築の染色体挿入株 (K031 株) に G418 に寄る選択圧をかけたところ、挿入 DNA に対する CENPs の集合が上昇し、さらにミニ染色体が高頻度で形成された。この時 β geo 遺伝子の転写活性上昇に加えヒストンのアセチル化状態が上昇していた。このことは、活性のあるセントロメア形成及び HAC 形成は、転写活性によって直接には阻害されないことを示唆している。

染色体の安定性や分配にも関与しているヘテロクロマチンは、転写の活性化された領域にみられるユークロマチンは一般的に相反した性質を持つ。HAC 保有株、ミニ染色体高頻度保有株、宿主染色体挿入株を用いて、ヘテロクロマチン状態の指標であるトリメチル化ヒストン H3-K9 の分布をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により解析した。転写活性が常に存在する右アーム領域ではすべての株で低 H3 メチル化状態なのに対し、左アーム領域では BS/G418 の薬剤選択のミニ染色体高頻度保有株のみ低メチル化状態で、この領域で β geo 転写の見られない挿入株や HAC 株では高メチル化状態を示していた。alphoid 領域は比較的低メチル化状態であったが転写領域よりは高い状態を示したことから、一部はヘテロクロマチン化していると考えられる。同様に抗 CENP-A 抗体を用いて ChIP 解析したところ、Alphoid 領域では CENP-A は HAC 株やミニ染色体株でより高い集合を、それ以外のアーム領域では低 CENP-A 状態を示した。

さらに、ヘテロクロマチンタンパクである HP1 α の局在を間接蛍光抗体 FISH 法及び ChIP で解析した結果、HAC や再形成ミニ染色体では宿主染色体と同様 M 期染色体のセントロメア領域のコヒージョン領域にはみられたが、染色体挿入部位では観察されなかった。同様に、広く M 期進行の制御に関わる Aurora B の局在も HP1 α と同様な傾向を示した。

[総 括]

今回、同じ alphoid 配列を用いたにも関わらず、転写活性化領域を導入 DNA 上に広くとるような構築では、HAC 形成が失われてしまった。一方で、宿主染色体内挿入部位におけるセントロメア・タンパクの集合は転写活性化により上昇した。これらの結果は一見矛盾しているが、転写の活性化が直接セントロメア形成を阻害するのではなく、独立した染色体として機能するのに必要な他の構造形成を阻害しているとするれば説明できる。

今回の解析で、ヘテロクロマチンの形成が HAC の形成に重要な要因であることを示唆する結果を得た。今までにヘテロクロマチンの形成が染色体の安定性や姉妹染色分体のコヒージョンに関与していることが知られている。導入 DNA 上で転写活性化により十分なヘテロクロマチン領域が形成されないと、セントロメアの機能に必須な CENPs の集合が導入 DNA 上においても安定な HAC 形成までは至らないと考えられる。

人工染色体は、染色体機能の解析に加え、遺伝子治療や長期発現ベクターとしての応用利用も期待される。これまで、alphoid DNA の性質や導入する長さが新規 HAC 形成に影響を与えていることが分かっていたが、周辺のクロマチン構造の違いによっても HAC 形成効率に影響を与えることが今研究より明らかになった。従って、構築に用いる配列が全体のクロマチン構造に与える影響を考慮し明らかにしていくことが、次世代の人工染色体ベクターの開発に必要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ヒトセントロメア配列の一部 (70 kb アルフォイド配列) を含む naked DNA を培養細胞へ導入し、de novo にヒトの染色体機能を構築する技術を用いて、染色体分配機能に必要な構造を探索する研究を行った。今回の研究では、導入 DNA 上の転写の活性状態の違いをもたせることで、人工染色体 (HAC) の形成効率に差が生じ、アルフォイド配列以外のベクター領域が活性遺伝子で占められた場合形成がみられなくなった。これまで新規 HAC 形成は、用いるアルフォイド配列の種類によってそのような形成効率に影響を及ぼすことは知られていた。しかし、今回のようにア

ルフォイド配列は同じであることから、転写活性によりクロマチン構造の獲得に差が生じたと考えられた。そこで、免疫染色-FISH法やクロマチン免疫沈降法を用いて、必要なクロマチン構造を明らかにしていった結果、HP1 α 等で構成されるヘテロクロマチン構造が必要であることが示唆された。ヘテロクロマチンは、染色体構造の安定に寄与している他、染色体分配時のセントロメア領域のコヒージョン機能にも関わっていることから、naked DNAから染色体を形成する過程で、キネトコア構造に加えヘテロクロマチン構造の獲得も必要であるといえる。

以上のように、この研究は染色体構築機構の解明の手がかりをあたえるものであり、医学博士の学位として十分価値あるものと認められる。