

研究題目 大型類人猿 StSat 配列の機能解析

研究組織

研究代表者：加納純子（大阪大学蛋白質研究所）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：大泉祐介（大阪大学蛋白質研究所）

藤井穂高（弘前大学医学系研究科）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

チンパンジーやゴリラなどは大型類人猿と呼ばれ、ヒトと進化的に最も近いと言われている。その理由は、ヒトと大型類人猿でゲノム DNA 配列を比較した時その違いがわずか数%以下だからである。しかし、両者には歩行の方法や言語の有無、寿命など様々な性質の違いがある。これらの違いをわずか数%の DNA 配列の違いだけで説明することは困難である。

実は両者の間には染色体構造の根本的な違いがある。細胞の核の中の染色体を G バンド染色

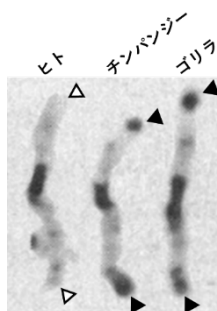


図 1. G バンド染色による染色体染色像

によって染めると、ヒトの染色体末端部分は濃く染まっていないのに対して (図 1△)、チンパンジー、ゴリラでは濃く染まっている (図 1▲)。したがって、大型類人猿はヒトにはない、特殊な染色体末端構造をもっていると考えられた (Yunis

1982)。

ヒトでは、染色体末端にテロメアと呼ばれる領域があり、テロメアに隣接してサブテロメアと呼ばれる領域が存在する。一方、大型類人猿ではテロメアとサブテロメアの間 Subterminal Satellite (StSat) と呼ばれる、32 bp 単位の繰り返し配列が存在している。この配列はヒトには全く存在しない、大型類人猿特有の配列である。そのため、大型類人猿特有の染色体末端構造は StSat によって形成されていると推測される。しかし、現在まで StSat 領域の詳細な染色体構造や細胞内機能は明らかになっていない。そこで本研究では、大型類人猿の StSat 領域における染色体高次構造と具体的な分子機能、特に隣接領域に与える影響を明らかにすることにより、ヒトと大型類人猿の違いをもたらす原因を探ることを目的とした (図 2)。

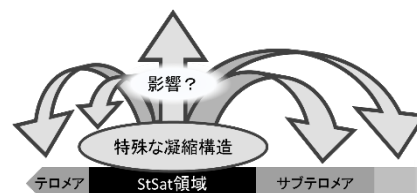


図 2. 大型類人猿の染色体末端構造

[1-2]研究の方法・経過

enChIP 法と PICh 法を用いて、チンパンジーの StSat 領域特異的に局在するタンパク質の同定を行った。enChIP 法では、dCas9-FLAG とガイド RNA の複合体が染色体上の StSat DNA 特異的に結合することで、StSat 領域を dCas9-FLAG によって標識する。細胞を固定し、超音波処理でゲノム DNA を断片化した後、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行うことで StSat 領域に存在するタンパク質や DNA をすべて回収する。先端酵素学研究所小迫英尊教授との共同研究により、質量分析により回収したタンパク質を同定した (図 3)。PICh 法では、細胞からクロマチンタンパク質を精製し、ビオチン

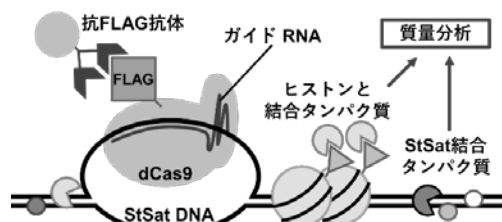


図 3. enChIP 法の概略図

修飾を付加した StSat-LNA プローブによって StSat DNA を含むクロマチンのみを標識する。その後、標識された StSat 領域のクロマチンのみを回収し、質量分析（小迫教授による）によりタンパク質を同定した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

表 1. StSat 結合タンパク質の候補(上位抜粋)

Name	Function	Enrichment	
		#1	#2
KRT13	Keratin, type I cytoskeletal 13	11,298	3,351
RPS25	40S ribosomal protein S25	5,029	3,117
RPS18	40S ribosomal protein S18	2,96	2,706
RPL5	60S ribosomal protein L5	2,099	1,425
U2AF1L4	Splicing factor U2AF 26 kDa subunit	2,095	1,702
ELAVL1	ELAV-like protein 1	1,997	2,264
HIST1H4; HIST2H4	Histone H4	1,992	1,685
SARNP	SAP domain-containing ribonucleoprotein	1,983	1,364
SERBP1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	1,95	1,8
EEF1D	Elongation factor 1-delta	1,904	1,611
HIST2H2AC	Histone H2A type 2-C	1,882	1,763
ACTN4	Alpha-actinin-4	1,85	1,873
RPS2	40S ribosomal protein S2	1,757	1,642
HIST1H1B	Histone H1.5	1,754	1,451
HIST1H1C	Histone H1.2	1,737	1,624
PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1	1,725	2,28

enChIP 法の結果、StSat 結合タンパク質の候補として以下のタンパク質が同定された(表 1)。その中でヒストン H1.2 に注目した。ヒストン H1.2 は、ヌクレオソームをつなぐリンカーDNA に結合して、染色体を凝縮させる働きを持つ。クロマチン免疫沈降の結果、StSat 領域においてヒストン H1.2 が効率よく検出されたことから、ヒストン H1.2 によって StSat 領域は凝縮した染色体構造を形成している可能性が示唆された(図 4)。また、ヒストン H1.2 は高度に凝縮した構造をとるセントロメアでも検出されたため、ヒストン H1.2 は凝縮した染色体構造に共通して存在するタンパク質だと考えられる。さらに、StSat に隣接するサブテロメア領域でもヒストン H1.2 が効率よく検出されたため、チンパンジーのサブテロメアは凝縮している可能性が示唆された。現在質量分析で同定された他のタンパク質について解析を進めている。

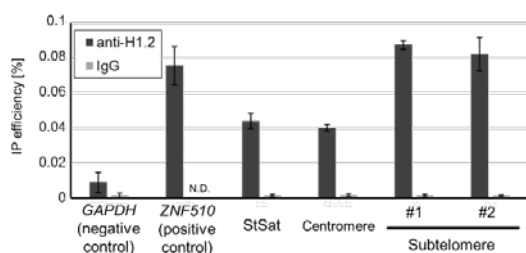


図 4. 抗ヒストン H1.2 抗体を用いた ChIP の結果

コントロール実験としてテロメアプローブを用いて、PICCh 法によって結合タンパク質の同定を行った結果、テロメア関連タンパク質が検出された(表 2 太字)。現在 StSat プローブを用

表 2. テロメア結合タンパク質の候補(上位抜粋)

Name	Function	# PSMs
HIST2H2BF	Histone H2B type 2-F	140
HIST1H2AJ, K	Histone H2A type 1-J	125
HIST2H2BE	Histone H2B type 2-E	124
HIST1H4	histone H4	109
TERF2IP	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	81
HIST1H2AA	Histone H2A type 1-A	74
TERF2	Telomeric repeat-binding factor 2	64
HIST1H1C	Histone H1.2	63
TERF1	telomeric repeat-binding factor 1	61
HIST1H1E	Histone H1.4	57
H3F3	histone H3.3	54
HIST1H1B	Histone H1.5	24
POT1	Protection of telomeres protein 1	19
KIF20B	Kinesin-like protein KIF20B	18
ACD	Adrenocortical dysplasia protein homolog	8
HRNR	Hornerin	7
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5

いた PICCh 法の条件検討を行っている。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

ヒトと大型類人猿の染色体末端構造・機能の違いの解明を目指す本研究は、“ヒトをヒトたらしめている原因はなにか?”という人類の大きな謎の解明に近づくことが大いに期待される。さらに、染色体末端の機能異常は、細胞のがん化や筋ジストロフィーなどの様々な疾患を引き起こすことが知られていることから、本研究はヒトの疾患の治療法の確立に貢献できると思われる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

- 1) 大泉祐介, 藤井穂高, 小迫英尊, 加納純子. 大型類人猿の特殊な染色体末端構造と機能. 第 37 回染色体ワークショップ・第 18 回核ダイナミクス研究会, 大阪, 12 月 22-24 日, 2019 年
- 2) 大泉祐介, 古賀章彦, 加納純子. 大型類人猿の特殊な染色体末端の構造と機能. 第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12 月 3-6 日, 2019 年
- 3) 大泉祐介, 加納純子. 大型類人猿の特殊な染色体末端構造. 第 1 回ヤポネシアゲノムくろうみミーティング, 兵庫, 9 月 24-25 日, 2019 年

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

enChIP において、免疫沈降効率はあまり高くなかったため、StSat 結合タンパク質を十分に回収できなかった可能性がある。今後は、PICCh 法により StSat 特異的なタンパク質を質量分析を用いて同定したい。