

令和元年6月10日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07279

研究課題名(和文) 真核生物CENP-TWSX複合体のDNA認識機構解明

研究課題名(英文) DNA recognition of eukaryotic CENP-TWSX complex

研究代表者

西野 達哉 (Tatsuya, Nishino)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・准教授

研究者番号：50533155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：複製された姉妹染色分体は細胞分裂時に娘細胞へと正確に分配される。CENP-TWSXは染色体結合に関与するヒストンフォールドを有するが、その結合はヒストンと異なることが知られている。本研究ではCENP-TWSX複合体によるDNA結合の詳細に迫るため、生化学、構造生物学的解析を行った。ニワトリおよび好熱性真核生物よりCENP-TWSX複合体を調整し、解析を行った。様々な長さの二重鎖DNAと結晶化を行い、構造解析に成功した。その結合様式はヒストンが形成するヌクレオソームとは異なり、DNA上に等間隔に並んでいた。この結果はこれまでに観測されたラダー状の結合様式を反映していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体の分配はすべての細胞が増殖する過程で行われ、その異常はがん化や遺伝病につながる。染色体分配では染色体上に結合する動原体タンパク質複合体が関与するが、その詳細は不明なことが多い。本研究では動原体構成因子CENP-TWSX複合体のDNA結合機構に迫るため、生化学、構造生物学的に解析した。その結果、CENP-SX複合体がDNAと結合している様子を原子分解能で解析することに成功した。二重鎖DNAを複数のCENP-SX複合体が取り巻き、お互いに協調して結合していた。この結合様式はヌクレオソームとは全く異なり、これにより染色体分配機構が正常に遂行されると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Replicated sister chromatids are correctly distributed to daughter cells during cell division. CENP-TWSX binds to chromatin as well as microtubule-binding protein, and plays an important role in chromosome segregation but the details are unknown. In particular, DNA binding mode differs from the histone. In this study, we conducted biochemical and structural analysis to understand its details. The CENP-TWSX complex was prepared from chicken and thermophilic eukaryotes and analyzed. After trial of many different length of DNA, crystal structure of the CENP-SX complex and DNA was determined. CENP-SX bound to DNA and spaced evenly on DNA which is different from the nucleosome. This binding reflects the ladder-like binding mode observed before.

研究分野：構造生物学、染色体工学、生化学、

キーワード：キネトコア複合体 DNA結合タンパク質 ヒストン様フォールド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CENP-TWSX 複合体は CCAN(構成的セントロメア局在ネットワーク)に属するキネトコア構成因子で、細胞周期を通じて染色体セントロメア領域に存在する(Hori et al., Cell 2008)。細胞分裂期には核膜崩壊、サイクリン依存的キナーゼ活性上昇により CENP-T のリン酸化が起こり、微小管結合因子 Ndc80 複合体がキネトコアに局在する(Gascoigne et al., Cell 2011)。CENP-TWSX 複合体は染色体セントロメアに存在するエピジェネティックマーカー、CENP-A ヌクレオソームによりセントロメア局在するがその詳細は不明である(Okada et al., NCB 2006)。これまでの解析で CENP-T のヒストンフォールドが重要であることが示されているものの、どのように機能するか明確でない。

2. 研究の目的

CENP-TWSX 複合体はヒストンと異なる結合様式であるが、どのように DNA 結合するか明確でない。さらに CENP-S, CENP-X, CENP-T, CENP-W のどの領域が DNA 結合し、超らせん活性を引き起こすかも不明である。本研究の目的は CENP-TWSX 複合体がどのように DNA を認識するかを解明することにある。

3. 研究の方法

CENP-TWSX 複合体の DNA 認識機構の解明のため、生化学および構造生物学的手法により研究を行う。立体構造より推測される DNA 結合経路に存在するアミノ酸に変異を導入し、DNA の経路を特定する。このような変異体解析と並行して DNA の特異性を解析する。ヌクレオソームの結晶構造解析においては結合する DNA の塩基配列およびその長さが重要で、安定な結合 DNA の同定が高分解能立体構造決定に必須であった。そこで塩基配列や長さの異なる DNA との結合を生化学的に解析し、CENP-TWSX-DNA 複合体結晶化と立体構造解析を行う CENP-TW、CENP-SX、CENP-TWSX、いずれも DNA と複合体を形成できるが、その性質は驚く程異なっている。ゲルシフト法により、DNA との複合体を比較すると CENP-TW は凝集体、CENP-SX はラダー上のパターン、CENP-TWSX はスミアに近い複合体を形成する。長さの特異性については、CENP-SX は約 50 bp、CENP-TWSX は 80-100 bp で概ね一本のシフトバンドを形成していた。(Nishino et al., Cell 2012) ゲルシフト法と並行して申請者はゲルろ過による CENP-SX 複合体と DNA の結合実験により結合比を求めることに成功し、複合体を精製、結晶化することが可能になった。さらに蛋白質と DNA の結合において重要となるのはアフィニティー解析である。申請者は蛍光色素を導入した二重鎖 DNA と非修飾の CENP-TW や CENP-SX 複合体との相互作用を偏光蛍光法により測定し、少量(nM オーダー)のサンプル量で解離定数を求めることに成功した。その結果、43bp の二重鎖蛍光標識 DNA に対して CENP-TW の解離定数 $KD=40nM$ 、CENP-SX は解離定数 $KD=48nM$ であった。蛍光標識 DNA はオリゴ DNA 合成時にオプション追加する。

4. 研究成果

1年目の研究成果

ニワトリ由来の CENP-TWSX 複合体の解析を行った。CENP-TWSX 複合体を大量に調整し、DNA との結合実験と結晶化実験を遂行した。ヌクレオソームの結晶構造に使用された Widom601 配列をベースに DNA 鎖長の異なる合成オリゴ DNA を複数作成し、結晶化を試みた。CENP-TWSX 複合体と DNA の複合体結晶と思われるものが得られたものの回折能が悪く、さらなる結晶化条件の改善や DNA コンストラクトの改善を行う必要がある。CENP-TWSX 複合体に加えて DNA 修復時に働く FANCM/CENP-SX 複合体の発現精製を行なった。その結果、組換え FANCM/CENP-SX 複合体を精製することに成功した。さらにニワトリ由来の CENP-TWSX 複合体の解析に加えて、熱安定性の高い好熱性真核生物由来の CENP-TWSX 複合体の構造機能解析を開始した。好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* 由来の CENP-T, CENP-W, CENP-S, CENP-X をクローニングした。CENP-TW 複合体および CENP-SX 複合体を大腸菌の共発現ベクターに組み込み、タンパク質複合体の大量発現を行なった。その結果、組換え CENP-TW 複合体の発現が確認できた。

2年目の研究成果

昨年度発現精製した FANCM/CENP-SX 複合体の結晶化を行なった。FANCM/CENP-SX 複合体単独では二種類の結晶が作成でき、放射光施設にて X 線回折測定を行ったところ、それぞれ FANCM/CENP-SX 複合体と CENP-SX 複合体であることが判明した。さらに FANCM/CENP-SX 複合体と複数の二重鎖 DNA の共結晶化を試みた結果、幾つかのコンストラクトで結晶を作成することができた。結晶化条件をさらに検討した結果、結晶サイズが X 線照射可能な大きさまで成長した。放射光施設にて X 線を照射した結果、3.5 分解能の回折データを取得でき、FANCM/CENP-SX 複合体に結合している DNA の電子密度が観測できた。

3年目の研究成果

好熱性真核生物由来の CENP-TWSX 複合体発現と FANCM-CENP-SX 複合体と DNA の共結晶化を行なった。好熱性真核生物由来の CENP-TWSX 複合体発現では MBP(マルトース結合タンパク質)との融合タンパク質として発現した際に発現量と可溶性が向上し、複合体を精製することができた。一方、結晶化については使用する二重鎖 DNA の長さや末端の形状(平滑/突出)を試したところ、突出末端を使用した際に結晶の回折能が向上した。分子置換法により位相決定を行ったところ、FANCM は結晶中に存在せず、CENP-SX 複合体と DNA が結合していることがわかった。興味深いこ

とに隣り合う CENP-SX 複合体同士は特異的な相互作用により等間隔で配置されていた。このことは我々が以前ゲルシフト法による DNA 結合解析時に観察したラダー状の複合体を反映していると考えられる。今後は生化学的解析ならびに細胞生物学的解析を行い、CENP-SX 複合体と DNA によって形成されるラダー状構造の意味を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Biochemical and Structural Analysis of Kinetochore Histone-Fold Complexes.
Nishino T, Fukagawa T
Methods Mol Biol. 1413:135-46 (2016) (査読有)

〔学会発表〕(計 55 件)

2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ

日時 2017 年 3 月 14 日(火)-15 日(水) 会場 つくば国際会議場 エポカルつくば
伊藤翔、西野達哉 ニワトリ由来の FANCM-CENP-SX の X 線結晶構造解析
池田聡人、西野達哉 好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* を用いた染色体分配を促進する Separase の構造解析
杉田紗織、西野達哉 好熱性真菌由来 FANCM 組み換えタンパク質の発現精製過程における最適条件探索
佐久間佳織、西野達哉 ヒト HP1 の構造機能解析

第 5 回タンパク質相互作用研究会 日時 2018 年 3 月 28 日(火)-30 日(木)

西野達哉 好熱性真核生物の朝明
池田聡人、西野達哉 切っても切れない Separase と〇〇の関係
伊藤翔、西野達哉 タンパク質 DNA 複合体の結晶化とクライオ条件
小野村章伍、西野達哉 好熱性真菌 HP1 タンパク質の構造機能解析
佐久間佳織、西野達哉 ヒト HP1 の構造機能解析

BIC2017

日時 2017 年 12 月 2 日(土) 10 時 30 分_17 時 会場 東京電機大学東京千住キャンパス
口頭発表 伊藤翔、西野達哉 二重鎖 DNA 切断修復にかかわる FANCM/CENP-SX と DNA の複合体結晶構造解析
ポスター発表
池田聡人、西野達哉 高等脊椎動物特異的セントロメア関連タンパク質 CENP-R の構造機能解析
伊藤翔、西野達哉 二重鎖 DNA 切断修復にかかわる FANCM/CENP-SX と DNA の複合体結晶構造解析
佐久間佳織、西野達哉 ヒト HP1 の機能構造解析
佐藤優美佳、西野達哉 真核生物の DNA 複製と組換え修復に関する MCM-BP の構造機能解析
高野且次、西野達哉 好熱性真菌由来 PIK1 の機能と構造解析
菱沼大幹、西野達哉 ニワトリ由来 CENP-TWSX 複合体と DNA の構造機能解析
藤井裕史、西野達哉 植物 RNA サイレンシング増幅機構に関する SDE5 の構造機能解析
横山幸治、西野達哉 好熱性真菌(*Chaetomium thermophilum*)由来 Cth CENP T-W-S-X の機能解析
渡辺悠斗、西野達哉 アウターキネトコア構成因子 CthNdc80 複合体の再構成と構造機能解析

2017 年度量子ビームサイエンスフェスタ

日時 2018 年 3 月 2 日(土)-3 日(日)
会場 茨城県立県民文化センター
ポスター発表
藤井裕史、西野達哉 植物 RNA サイレンシング増幅機構に関する SDE5 の構造機能解析
Ueno Misato, Tatsuya Nishino, Construction of *Chaetomium thermophilum* GST expression vector
中林開人、西野達哉 好熱性 DNA ポリメラーゼ サブユニットの構造解析

第 6 回タンパク質相互作用研究会 日時 2018 年 3 月 27 日(火)-29 日(木)

口頭発表
西野達哉 好熱性生物由来タンパク質の構造生物学とツール開発
小野村章伍、西野達哉 FANCM の構造解析に向けた蛋白質可溶性の試み
藤井 裕史、西野達哉 tasiRNA 生成経路に関する SDE5 の機能構造解析
伊藤 翔、西野達哉 FANCM/CENP-SX/DNA 複合体の構造機能解析

第2回エピジェネティクス研究会

日時 2018年9月4日(火) 会場 九州大学生体防御医学研究所 本館1F会議室

口頭発表

西野達哉 染色体分配とDNA修復に関するタンパク質複合体の構造機能解析

Bio Inter Conference 2018

日時 2018年12月3日(月) 会場 東京理科大学葛飾キャンパス管理棟6階第会議室

口頭発表

小野村章伍、西野達哉 新規構造の解明を目指して~蛋白質可溶化のStrategy~

藤井裕史、吉川学、西野達哉 植物RNAサイレンシング増幅機構に関するSDE5の機能解析

ポスター発表

池田聡人、西野達哉 Vasohibin/SVBPの構造機能解析

伊藤翔、西野達哉 DNA修復にかかわるFANCM-CENP-SX複合体構造解析に向けてのコンストラクト作製

小野村章伍、西野達哉 新規構造の解明を目指して~蛋白質可溶化のStrategy~

佐藤優美佳、西野達哉 真核生物のDNA複製と組換え修復に関するMCM-BPの構造機能解析

菱沼大幹、西野達哉 キネトコアヒストンフォールド複合体ニトリCthCENP-S-X-T-W複合体とDNAの構造機能解析

藤井裕史、西野達哉 植物RNAサイレンシング増幅機構に関するSDE5の機能解析

横山幸治、西野達哉 ケタマカビ由来の染色体分配タンパク質(CthCENP-S-X-T-W)の発現条件検討

渡辺悠斗、西野達哉 アウターキネトコア複合体CthNdc80複合体の再構成と構造機能解析

佐中裕樹、西野達哉 好熱性細菌TT_C0609の構造機能解析に向けた培養条件検討

白濱辰也、西野達哉 Slx1-Slx4複合体とMus81-Eme1複合体の構造機能解析

深野安摩音、西野達哉 減数分裂機構に関するSpo11の構造機能解析に向けた培養条件検討

相澤秀、西野達哉 好熱性細菌TT_C0207のクローニングとタンパク質発現精製

浅野真穂、西野達哉 超好熱性古細菌PF0131のクローニングとタンパク質発現精製

浦田せいあ、西野達哉 好熱性細菌TT_C0215のクローニングとタンパク質発現精製

河路琢凶、西野達哉 ヒトZNF148のクローニングとタンパク質発現精製

指田悠馬、西野達哉 好熱性細菌TT_C1510のクローニングとタンパク質発現精製

鈴木浩斗、西野達哉 好熱性細菌TT_C1864のタンパク質発現精製と結晶構造解析

中島孝輔、西野達哉 好熱性細菌TT_C0928のクローニングとタンパク質発現精製

山口泰輝、西野達哉 好熱性細菌TT_C1169のクローニングとタンパク質発現精製

第14回Vasohibin研究会

日時 2019年2月16日(土) 会場 仙台 秋保温泉 ホテル華乃湯

口頭発表

池田聡人、西野達哉 Vasohibin/SVBPの構造機能解析

2018年度量子ビームサイエンスフェスタ

日時 2019年3月12日(火)-13日(水) 会場 つくば国際会議場 エポカルつくば

ポスター発表

伊藤翔、西野達哉 DNA修復にかかわるFANCM-CENP-SX複合体の構造解析に向けたコンストラクト作製

池田聡人、西野達哉 Vasohibin/SVBPの構造機能解析

鈴木浩斗、西野達哉 好熱性細菌TT_C1864のタンパク質発現精製と結晶構造解析

第7回タンパク質相互作用研究会

日時 2019年3月27日(水)-29日(金) 会場 高知県高知市「ホテル港屋」

口頭発表

西野達哉 西野研ナイトゼミ派生プロジェクト、GREB1Lの構造機能解析

池田聡人、西野達哉 Vasohibin/SVBPの構造機能解析

伊藤翔、西野達哉 DNA修復経路で働くFANCM-CENP-SX複合体の構造解析に向けて

佐中裕樹、西野達哉 シロイヌナズナ葉緑体内Holliday Junction解離酵素AtMoc1の構造機能解析

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://nishinotatsuya.wixsite.com/toppage>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。