

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：63801
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011 ～ 2012
課題番号：23770128
研究課題名（和文）脊椎動物キネトコア複合体 CENP-T/W および CENP-S/X の構造生物学
研究課題名（英文）Structural biology of the vertebrate kinetochore complex CENP-T/W and CENP-S/X complexes
研究代表者 西野 達哉 (NISHINO TATSUYA) 国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・助教 研究者番号：50533155

研究成果の概要（和文）：真核生物キネト コアは染色体セントロメア領域に形成され、細胞分裂時に染色体と微小管を連結する。本研究課題は CENP-TW と CENP-SX の 構造と機能に迫るため、X 線結晶構造解析、DNA 結合および相互作用について解析した。その結果、CENP-TW と CENP-SX は どちらもヒストンフォールドを有していた。立体構造は互いに酷似し、CENP-TWSX 複 合体を形成した。CENP-TWSX 複合体はヘテロ 4 量体で、独特な DNA 結合特異性を有していた。本解析より CENP-TWSX 複 合体がセントロメアにおいて固有のクロマチンを形成する事がわかった。

研究成果の概要（英文）：In eukaryotes, kinetochore is built at the centromeric region of chromosomes and they connect chromosome and microtubules during cell division. To understand the molecular mechanisms, we analyzed CENP-SX and CENP-TW complexes. Both were similar to histones but they were more similar to each other. They formed a stable CENP-TWSX tetramer. Biochemical analysis of CENP-TWSX tetramer revealed that its DNA binding property is different from that of CENP-TW or CENP-SX. These analyses suggest that CENP-TWSX complex forms a unique chromatin at eukaryotic centromere.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞分裂時において、複製された二本の姉妹染色分体はそれぞれ正確に娘細胞へと分配される。このためには、両極から伸長してくる動原体微小管と姉妹染色分体が正確に連結する事が必須である。キネトコア構造はこの連結に関わる染色体上の複合体で、種をこえて保存された蛋白質複合体によって、染色体上のセントロメア DNA 領域に形成される。最近のプロテオミクス解析よりその構成因子はほぼ明らかになっており、100 を超え

る因子が同定されている。申請者の所属する国立遺伝学研究所深川研究室では遺伝的改変が容易なニワトリ DT40 細胞を使ったキネトコア複合体研究を精力的に行っており、これまでに新規キネトコア因子を多数同定してきた (Okada et al., NCB, 2006, Hori et al., Cell, 2008, Amano et al., JCB, 2009)。今後はこれらの構成因子が、どのように複雑なキネトコア構造体を形成するのかを解明することが重要になってくる。

キネトコア構造は特定の遺伝子配列の上で

形成されるわけではなく、エピジェネティックな分子機構によって形成される。まず最初に、セントロメア領域に特異的なヒストンバリエーション CENP-A を含むヌクレオゾームが配置され、セントロメアマーカースとして機能する。しかし、CENP-A ヌクレオゾーム単独では機能的なキネトコアは形成されない。ここで重要な役割を果たすのが CENP-T/W 複合体である (Hori et al., Cell 2008)。CENP-T、CENP-W 共にヒストンフォールドを有して複合体を形成し、セントロメア領域のクロマチンと結合する。興味深いことに、このクロマチン中で CENP-T/W は、CENP-A ヌクレオゾームと直接結合しておらず、直近の H3 ヌクレオゾームと相互作用していた。このことから、CENP-T/W 複合体は CENP-A とは独立にセントロメアマーカースとして機能していると考えられる。また、CENP-T/W は他のキネトコア蛋白質と結合し、キネトコア形成にも関わっている。一方、CENP-S/X 複合体はセントロメアに局在し、正常なキネトコア複合体形成、特に Ndc80 複合体を含むアウトターキネトコアプレート形成に関与する (Amano et al., JCB 2009)。CENP-S、CENP-X 共にヒストンフォールドを有して複合体を形成し、セントロメア DNA に結合すると考えられているが詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

細胞分裂時の染色体分配に必須な役割を担うキネトコア複合体は、その不全が癌や遺伝病と密接に関係するなど、その重要性が近年注目されている。しかしながら、複合体形成に関する分子機構はいまだ謎に包まれている。本研究の目的は脊椎動物のキネトコア複合体の立体構造解析を通じて、複合体形成に関する詳細な作用機序を原子レベルで明らかにする事にある。脊椎動物のキネトコアは 100 以上の因子より構成されるが、中でも染色体に近接する CENP-T/W 複合体および CENP-S/X 複合体は、申請者が所属する研究室において近年同定され、現在も細胞生物学的、生化学的な解析が精力的に行われている。申請者は両複合体の蛋白質単独の結晶化に成功しており、今後構造決定及び機能解析により、脊椎動物のキネトコア複合体の構造と機能の更なる理解に貢献できる。

## 3. 研究の方法

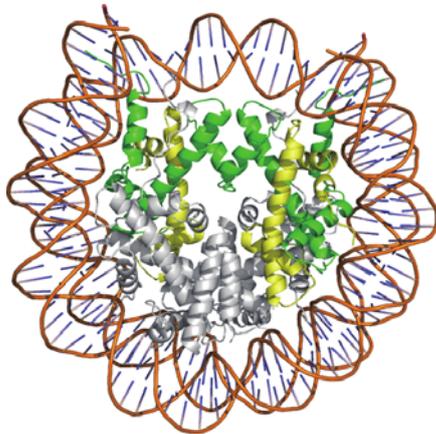
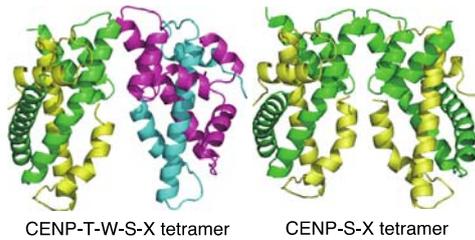
研究の方法は構造生物学、生化学、細胞生物学的な手法を組み合わせた。まず CENP-T/W および CENP-S/X 複合体の大量発現系によりそれぞれ結晶化を行い、新規位相決定を行う

ためにセレンメチオニン誘導蛋白質を作製した。SPring8 放射光施設においてセレン原子の異常分散法により位相決定し、立体構造を得る事ができた。CENP-TWSX 複合体の解析はまず CENP-TWSX 複合体の結晶を作製し、立体構造を分子置換法により決定した。CENP-TWSX 複合体の生化学的解析は相互作用をゲル濾過クロマトグラフィー、DNA 結合はゲルシフト法により解析した。細胞生物学的解析はニワトリ DT40 細胞を使って細胞内キネトコア蛋白質のセントロメア局在を間接蛍光法により測定した。

## 4. 研究成果

初年度は CENP-TW 及び CENP-SX の結晶構造を決定した。立体構造解析の結果、CENP-TW は 2 量体、CENP-SX は 4 量体であった。CENP-TW および CENP-SX はどちらもヒストンフォールドであった。興味深い事に CENP-SX と CENP-TW の立体構造を比較すると 4 量体形成に関わるアミノ酸残基が CENP-T においても存在した。この事から CENP-SX と CENP-TW が相互作用する可能性が考えられた。実際両蛋白質複合体を混合すると、安定な複合体を形成した。4 量体の界面に存在するアミノ酸に変異を導入すると複合体形成が阻害された。この複合体の詳細を原子レベルで明らかにするため、結晶化を行った。その結果、二つの異なる結晶系に属する結晶を得る事に成功した。CENP-SX および CENP-TW の立体構造を使って分子置換法により構造解析したところ、二つの結晶はいずれも CENP-TWSX ヘテロ 4 量体で、CENP-S と CENP-T が相互作用していた。生化学的解析より CENP-TWSX ヘテロ 4 量体は CENP-TW や CENP-SX と異なる蛋白質-DNA 複合体を形成していた。また CENP-TW, SX, TWSX とともに DNA にスーパーコイルを導入する活性があり、ヒストン同様ヌクレオゾーム様構造を形成する事がわかった。細胞生物学的解析によりヘテロ 4 量体が形成できない細胞では正常なキネトコアが形成できない事がわかった。以上の結果により脊椎動物において CENP-TWSX 複合体がユニークなクロマチンを形成し、キネトコア構造形成に重要な役割を果たす事が明らかになった (Nishino et al., Cell 2013)。

(図 1) CENP-TWSX 4 量体(上左), CENP-SX(上右)およびヌクレオゾーム結晶構造(下)比較, それぞれの構造は重ね合わせより向きをそろえた。CENP-S は緑、CENP-X は黄、CENP-T はマゼンタ、CENP-W はシアン。ヌクレオゾームはヒストン H3 (緑) / H4 (黄) 4 量体をハイライトした。



nucleosome (H3-H4 tetramer highlighted)

次年度はCENP-TWSXのDNA結合モードについて詳細に解析した。

まず長さの異なる二重鎖DNAを多数調製し、DNA結合能を調べたところCENP-SXは50-60bpにおいて明確なシフトバンドが形成された。一方、CENP-TWSXはこの長さでは明確なバンドを形成せず80-100bpにて明確なシフトバンドを形成した。DNA結合能をさらに調べる目的で、ヌクレオゾームが二つならんだようなダイヌクレオゾームを調製しDNA結合能を調べた。その結果、ヌクレオゾーム間のリンカーDNAの長さが25bpでは明確なシフトバンドが形成されなかったが、100bpでは明確なシフトバンドを形成した。ヌクレオゾームテンプレートは通常H3ヌクレオゾームおよびセントロメア特異的CENP-Aヌクレオゾームどちらも同様に結合した。

100bp上におけるCENP-TWSXシフトバンドの構成因子を解析したところ、CENP-TWSXが2分子ずつ存在し、オクタマーとして結合していた。CENP-TWSXはヒストン様蛋白質で、ヒストン同様DNAに超らせんを誘発する事が以前の解析よりわかっている。今回さらに超らせんの方向を調べたところ、CENP-TWや-SXは負の超らせんを誘発するのに対してCENP-TWSXは正の超らせんを誘発していた。この結果はセントロメアにおけるCENP-TWSXのユニークな性質を示していると考えられ、今後の解析が待たれるところである。以上の結果より脊椎動物においてCENP-TWSX複合体がユニークなクロマチンを形成し、キネトコア構造形成に重要な役割を果たす事が明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Nishino T, Rago F, Hori T, Tomii K, Cheeseman IM, Fukagawa T. “CENP-T provides a structural platform for outer kinetochore assembly.” *EMBO J.* 32, 2013, 424-36. 査読有り  
DOI: 10.1038/emboj.2012.348.
- ② 西野達哉 “真核生物キネトコア複合体 CENP-TWSX の調製、結晶化と立体構造解析” *蛋白質科学会アーカイブ*, E070, 2013, 1-11. 査読有り  
[http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Structure/Kinet\\_01/Kinet\\_01\\_01.html](http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Structure/Kinet_01/Kinet_01_01.html)
- ③ 西野達哉, 深川竜郎 “セントロメアの形成に必要な CENP-T-W-S-X の構造解析” *SPring8 利用者情報*, 18, 2013, 8-13. 査読無し  
<http://user.spring8.or.jp/sp8info/?p=23551>
- ④ 西野達哉, 深川竜郎 “セントロメア領域に特異的なクロマチン構造” *遺伝*, 66, 2012, 552-558. 査読無し
- ⑤ Nishino T, Takeuchi K, Gascoigne, KT, Suzuki A, Hori T, Oyama T, Morikawa K, Cheeseman IM, Fukagawa T  
“CENP-T-W-S-X Forms a Unique Centromeric Chromatin Structure with a Histone-like Fold.” *Cell* 148, 2012, 487-501. 査読有り  
DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.061.
- ⑥ Suzuki A, Hori T, Nishino T, Usukura J, Miyagi A, Morikawa K, Fukagawa T.  
“Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins.” *J. Cell Biol.* 193, 2011, 125-140. 査読有り  
DOI: 10.1083/jcb.201012050.

[学会発表] (計15件)

- ① Takeuchi, K. “The Histone-fold CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA” **52th ASCB Annual Meeting**, San Francisco (USA), 2012, 12/15~19.
- ② 西野達哉 “Structural biology of eukaryotic chromosome segregation machineries” **第85回日本生化学会大会**,

- 福岡市, 2012, 12/14~16.
- ③ 西野達哉 “真核生物染色体分配装置の構造生物学” 2012年度 PERI/BERI OBOG 会, 東京都, 2012, 11/16.
- ④ 西野達哉 “真核生物キネトコア複合体 CENP-T 天然変性領域の構造生物学的解析” 天然変性蛋白質計算科学セミナー, 御殿場市, 2012, 10/30~11/1.
- ⑤ Nishino, T. “Vertebrate kinetochore structure and function” **Kim Nasmyth Symposium**, Oxford (UK), 2012, 10/20
- ⑥ 西野達哉 “Structural cell biology of chromosome segregation machinery” 第 71 回日本癌学会年会, 札幌市, 2012, 9/19~21.
- ⑦ Nishino, T. “Structure and functional analysis of CENP-T” **Jacques Monod Conference**, Roscoff (USA), 2012, 9/5~9.
- ⑧ Nishino, T. “Structural cell biochemistry of a novel histone fold vertebrate kinetochore complex: CENP-TW and CENP-SX form a heterotetramer” **12<sup>th</sup> HFSP Awardees meeting**, テグ市 (韓国), 2012, 7/1~4.
- ⑨ 西野達哉 “新規セントロメア特異的ヒストン様複合体 CENP-TWSX の構造機能解析” 第 12 回日本蛋白質科学会, 名古屋市, 2012, 6/20~22.
- ⑩ 西野達哉 “Elucidation of CCAN involved in eukaryotic chromosome segregation” **NIG retreat**, 箱根町, 2012, 4/24~25.
- ⑪ 西野達哉 “真核生物キネトコア構成因子 CENP-TWSX 複合体の構造と機能” 第 29 回染色体ワークショップ, 仙台市, 2012, 1/25~26.
- ⑫ Nishino, T. “Structural cell biochemistry of a novel histone fold vertebrate kinetochore complex: CENP-TW and CENP-SX form a heterotetramer” **51th ASCB Annual Meeting**, Colorado (USA), 2011, 12/3~6.
- ⑬ 西野達哉 “脊椎動物キネトコア因子 CENP-TWSX の構造と機能” 第 5 回構造エピゲノムワークショップ, 横浜市, 2011, 9/20.
- ⑭ Nishino, T. “Structural cell biochemistry of a novel histone fold vertebrate kinetochore complex” **Gorden Research Conferences : Chromosome Dynamics**, Vermont (USA),

2011, 7/11~15.

- ⑮ 西野達哉 “脊椎動物動原体構成因子 CENP-S/ X, CENP-T/ W 複合体の構造細胞生化学と溶液動態解析” 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 吹田市, 2011, 6/7~9.

[その他]

ホームページ等

国立遺伝学研究所 研究成果

([http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights.html?research\\_tags=2013](http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights.html?research_tags=2013))

国立遺伝学研究所 分子遺伝研究部門 ニュース

([http://www.nig.ac.jp/labs/MolGene/news\\_j.html](http://www.nig.ac.jp/labs/MolGene/news_j.html))

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西野達哉 (NISHINO TATSUYA )

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・助教

研究者番号 : 50533155

### (2) 研究分担者 無し

### (3) 連携研究者 無し