

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870038

研究課題名（和文）セントロメア領域に特異的なヌクレオソームの結晶構造解析

研究課題名（英文） The structural analysis of centromere specific nucleosome

研究代表者

立和名 博昭 (TACHIWANA HIROAKI)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：70546382

研究成果の概要（和文）：本研究では、真核生物のセントロメア領域の主要な構成因子であるヒストン H3 バリエーション CENP-A を含むヌクレオソームの立体構造を明らかにした。本構造解析により CENP-A ヌクレオソームは各二分子のヒストン CENP-A、H4、H2A および H2B からなるヒストン八量体に DNA が左巻きに結合していることが明らかとなった。また CENP-A ヌクレオソームでは、ヒストン八量体に安定に結合している DNA の長さが H3 ヌクレオソームと比べ約 26 塩基対短いことが分かった。この知見より、CENP-A ヌクレオソームが、セントロメア領域に特異的な DNA 結合タンパク質のセントロメア領域への集積や、セントロメア領域に特徴的な高次クロマチン構造の形成に関与していることが示唆された。また、CENP-A の loop1 領域のアミノ酸が CENP-A のセントロメア領域への安定的な局在に重要であることも構造生物学および細胞生物学的解析により明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In eukaryotes, genomic DNA is duplicated during S phase, and is equally divided into two daughter cells during M phase. Centromere, which is one of the distinct regions in chromosome, plays important roles in this division. Centromere formation is necessary for chromosome segregation. But, it is not known how centromere region is formed and distinguished from other region. Some proteins, which localize specifically at centromere region, are identified. CENP-A, a histone H3 variant, also localizes specifically at centromere region. CENP-A is assembled into the chromatin of centromeres and is thought to generate unique chromatin features. In this study, we performed structural analysis of the CENP-A nucleosome and determined crystal structure of CENP-A nucleosome by X-ray crystallography. Determined structure revealed that CENP-A nucleosome contains two each of histones H2A, H2B, H4 and CENP-A and DNA is wrapped around histone octamer in a left-hand orientation. Surprisingly, only 121 bp of DNA are visible and 13 bp from both ends of DNA are flexible in the CENP-A-nucleosome. Structural comparison of the CENP-A and H3-nucleosomes revealed that the loop1 region of CENP-A is different from canonical H3 because of insertion of two extra amino acid residues. *In vivo* analysis revealed these amino acids are important to retain CENP-A at centromere region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：クロマチン

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：クロマチン、セントロメア、ヌクレオソーム、ヒストン、ヒストンバリエーション

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム DNA は、S 期において複製され、M 期に2つの娘細胞に均等に分配される。この均等分配を可能にしているゲノム DNA 上の領域として、セントロメア領域が存在する。遺伝学的解析および細胞生物学的解析により、セントロメア領域の形成および維持に中心的な役割を果たしているタンパク質として、ヒストン H3 バリエーション CENP-A が同定されている。CENP-A は他のヒストン H2A、H2B および H4 と複合体を形成し、セントロメア領域中のヌクレオソームに取り込まれている。CENP-A を含むヌクレオソーム (CENP-A ヌクレオソーム) の特徴的な立体構造によりセントロメア領域が形成されると考えられている。様々な解析結果に基づいて、CENP-A ヌクレオソームの立体構造には、幾つかのモデルが提唱されている。通常のヌクレオソームと同様に各2分子のヒストン CENP-A、H4、H2A および H2B からなるヒストン八量体に DNA が左巻きに結合したヌクレオソームモデル、各1分子のヒストン四量体に DNA が左巻きに結合したヘミソームモデル、DNA がヒストン四量体に右巻きに結合した右巻きヘミソームモデルなどがその代表である。しかし、これらのモデルのいずれが正しいかおよび CENP-A ヌクレオソームが、どのようにしてセントロメア領域の形成および維持に機能しているかは明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

セントロメア領域の形成および維持機構の解明を、CENP-A ヌクレオソームの立体構造解析を通して行うことを研究の目的とした。

3. 研究の方法

CENP-A ヌクレオソームを試験管内にて再構成するために、4種類のヒストン CENP-A、H4、H2A および H2B をリコンビナントタンパク質として発現・精製した。精製したヒストンを用いて、試験管内においてヒストン八量体を再構成した。ヌクレオソームの形成に用いる DNA は、大腸菌内において大量に増幅したものから調製した。これらヒストン八量体と DNA を用いて、塩透析法によりヌクレオソームを再構成した。再構成したヌクレオソームを電気泳動法により精製した後に、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。大型放射光施設 SPring-8 にて、得られた結晶に X 線を照射し、回折波のデータを収集した。収集した回折波のデータから、CENP-A ヌクレオソームの立体構造を 3.6 Å の分解能で決定した。さらに、溶液中での CENP-A ヌクレオソームの構造解析を行う目的で、SPring-8 にて X 線小角散乱解析も行っ

た。また、得られた構造を解析し、CENP-A に特徴的な領域 (loop1) を同定した。同定した loop1 に変異を導入した変異体 CENP-A を培養細胞内で発現させ、その機能を解析した。

4. 研究成果

(1) CENP-A ヌクレオソームの全体構造

本研究により決定した CENP-A ヌクレオソームの立体構造は、各2分子のヒストン八量体に DNA が左巻きに結合したヌクレオソーム構造であった。これまでに議論の対象となっていた各1分子のヒストン四量体からなるヘミソームモデルとは異なることを示した。

(2) CENP-A ヌクレオソーム中の DNA 構造

CENP-A ヌクレオソームと H3 ヌクレオソームの構造上の大きな違いの一つとして、ヒストン複合体に安定に結合している DNA の長さが異なることが本研究より明らかとなった。結晶構造中の CENP-A ヌクレオソームでは、ヒストン八量体に安定に結合している DNA は 121 塩基対であった。通常のヌクレオソームでは 146-147 塩基対が安定にヒストン複合体に結合していることから、CENP-A ヌクレオソームでは両端の 13 塩基対が非常にフレキシブルになっていることが明らかとなった (図 1)。溶液中においても CENP-A ヌクレオソーム中の両端の DNA がフレキシブルになっていることは、X 線小角散乱解析および種々の生化学的解析からも示した。この CENP-A ヌクレオソームに特徴的な性質は、セントロメア領域に特異的な高次クロマチン構造の形成にも寄与していることが考えられ、セントロメア領域に特異的な DNA 結合タンパク質がセントロメア領域の DNA に結合しやすいクロマチン構造を提供している可能性を示していた。今後、CENP-A ヌクレオソームを含む高次クロマチン構造の解析が重要である。

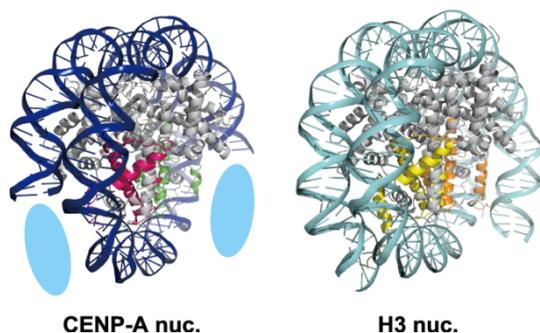
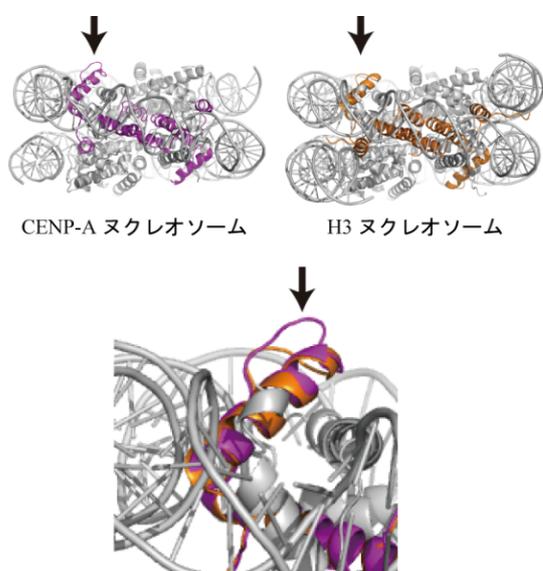


図 1. CENP-A ヌクレオソーム (左) と H3 ヌクレオソーム (右) の立体構造

(3) CENP-A の loop1 の解析

CENP-A には H3 と比べ 2 アミノ酸の挿入が loop1 領域に存在する。構造解析の結果、この挿入のある loop1 領域はヌクレオソームの外側に突出していることが明らかとなり、他の因子がこの loop1 領域を認識して結合していることが考えられた (図 2)。そこで CENP-A に特異的に挿入されている 2 アミノ酸を欠失させた変異体 CENP-A を培養細胞内で強制発現させ、loop1 領域の機能解析を行った。その結果、この変異体は、発現した後に一旦はセントロメア領域に局在するが、時間経過とともにセントロメア領域から排除されることが分かった。これらのことから CENP-A の loop1 領域は CENP-A の安定的なセントロメア領域への局在に関与している



重ね合わせ
ことが明らかとなった。

図 2. CENP-A ヌクレオソームと H3 ヌクレオソームの loop1 領域 (矢印) の比較

(4) 今後の展望

上述した通り、セントロメア領域の構築および維持機構の全容解明には、CENP-A ヌクレオソームを含む高次クロマチン構造の解析が必須である。変異体等を用いて解析すると共に CENP-A ヌクレオソームを含むポリヌクレオソームを再構成して構造解析をすることが重要である。また、CENP-A の loop1 領域に結合するタンパク質の存在が想定されるが、このタンパク質を同定することも重要な課題である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

i. 発表者 ii. 論文標題 iii. 雑誌名 iv. 査読の有無 v. 巻 vi. 発行年 vii. ページ

① i. Tachiwana H, Osakabe A, Shiga T, Miya Y, Kimura H, Kagawa W, Kurumizaka H.

ii. Crystal Structures of Human Nucleosomes Containing Major Histone H3 Variants

iii. Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. iv. 査読有 v. 67 vi. 2011 vii. 578-583.

② i. Horikoshi N, Tachiwana H, Saito K, Osakabe A, Sato M, Yamada M, Akashi S, Nishimura Y, Kagawa W, Kurumizaka H.

ii. Structural and biochemical analyses of the human PAD4 variant encoded by a functional haplotype gene.

iii. Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. iv. 査読有 v. 67 vi. 2011 vii. 112-118.

③ i. Shimoyama S, Nagadoi A, Tachiwana H, Yamada M, Sato M, Kurumizaka H, Nishimura Y, Akashi S.

ii. Deimination stabilizes histone H2A/H2B dimers as revealed by electrospray ionization mass spectrometry.

iii. J. Mass Spectrom. iv. 査読有 v. 45 vi. 2010 vii. 900-908.

④ i. Tachiwana H, Kagawa W, Osakabe A, Kawaguchi K, Shiga T, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Kurumizaka H.

ii. Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T.

iii. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. iv. 査読有 v. 107 vi. 2010 vii. 10454-10459.

⑤ i. Osakabe A, Tachiwana H, Matsunaga T, Shiga T, Nozawa RS, Obuse C, Kurumizaka H.

ii. Nucleosome formation activity of human somatic nuclear autoantigenic sperm protein (sNASP).

iii. J. Biol. Chem. iv. 査読有 v. 285 vi. 2010 vii. 11913-11921.

[学会発表] (計 5 件)

i. 発表者 ii. 発表標題 iii. 学会名 iv. 発表年月 v. 発表場所

① i. 立和名博昭 ii. The Crystal Structure of Centromere Specific Nucleosome

iii. Physicochemical Field for Genetic Activities
iv. 2011 年 1 月 v. 淡路島

② i. 立和名博昭 ii. ヒストン H3 バリエント CENP-A を含むヌクレオソームの X 線結晶

構造解析 iii. 第28回染色体ワークショップ
iv. 2011年1月 v. 加賀

③ i. 立和名博昭 ii. セントロメア領域に特異的なヌクレオソームの X 線結晶構造解析
iii. 第33回日本分子生物学会年会 iv. 2010年12月 v. 神戸

④ i. 立和名博昭 ii. セントロメア特異的な CENP-A ヌクレオソームの生化学的解析 iii. 第27回染色体ワークショップ iv. 2010年1月 v. 御殿場

⑤ i. 立和名博昭 ii. セントロメア特異的 H3 バリエント CENP-A を含むヌクレオソームの構造解析 iii. 第32回日本分子生物学会年会 iv. 2009年12月 v. 横浜

〔図書〕(計1件)

i. 著者名 ii. 出版社 iii. 書名 iv. 発行年
v. 総ページ数(共著の場合は最初と最後の頁)

i. 編集=平岡泰、原田昌彦、木村宏、田代聡
ii. 羊土社 iii. 実験医学増刊「細胞核-遺伝情報制御と疾患」 iv. 2009年 v. 116-122 ページ担当

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立和名 博昭 (TACHIWANA HIROAKI)
早稲田大学・理工学術院・助教
研究者番号：70546382

(2) 研究協力者

胡桃坂 仁志 (KURUMIZAKA HITOSHI)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：80300870

香川 亘 (KAGAWA WATARU)
早稲田大学・理工学術院・助教
研究者番号：70415123

木村 宏 (KIMURA HIROSHI)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号：30241392

朴 三用 (PARK SAM-YONG)
横浜市立大学・教授
研究者番号：20291932

佐藤 衛 (SATO MAMORU)
横浜市立大学・教授
研究者番号：60170784

志賀 達也 (SHIGA TATSUYA)
早稲田大学・大学院先進理工学研究科・
修士2年

越阪部 晃永 (OSAKABE AKIHISA)
早稲田大学・大学院先進理工学研究科・
博士3年

宮 優太 (MIYA YUTA)
早稲田大学・大学院先進理工学研究科・
修士1年

松本 亮平 (MATSUMOTO RYOHEI)
早稲田大学・大学院先進理工学研究科・
修士1年

有村 泰宏 (ARIMURA YASUHIRO)
早稲田大学・大学院先進理工学研究科・
修士2年

堀越 直樹 (HORIKOSHI NAOKI)
早稲田大学・大学院先進理工学研究科・
博士1年