

機関番号：32689

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770008

研究課題名（和文） セントロメア領域のクロマチン構造基盤の解析

研究課題名（英文） Analyses of centromeric chromatin structure

## 研究代表者

立和名 博昭（TACHIWANA HIROAKI）

早稲田大学・理工学術院・次席研究員

研究者番号：70546382

研究成果の概要（和文）：ゲノム DNA は、遺伝情報を担う重要な物質である。細胞の分裂に伴い、ゲノム DNA は正確に継承されなくてはならない。そのため、S 期で複製され倍加したゲノム DNA を、2 つの娘細胞に均等に分配する機構が存在する。この均等分配機構の詳細は明らかとなっていないが、ゲノム DNA 上の領域であるセントロメア領域が重要な役割を果たしている。セントロメア領域のクロマチン構造が、セントロメア領域の機能発現に重要であると考えられている。本研究では、セントロメア領域に形成されるクロマチンの構造の解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Genomic DNA is duplicated during S phase, and is equally divided into two daughter cells during M phase. The detail mechanism of equal chromosome segregation is unknown. Centromeres are distinct regions in the chromosome, and plays important roles in chromosome segregation and centromeric chromatin is necessary to function. In this study, centromeric chromatin structure was analyzed.

## 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	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：クロマチン

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：クロマチン、ヌクレオソーム、セントロメア、CENP-A、CENP-B、染色体

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム DNA は、遺伝情報を保持している重要な物質である。そのため、細胞分裂に伴い正確に継承されないといけない。S 期で複製され倍加したゲノム DNA は、M 期に凝縮した染色体を形成し、二つの娘細胞に均等に分配される。この倍加および均等分配機構の存在により、遺伝情報は細胞分裂を経ても失われることはない。

染色体の均等分配は、両極から伸びてきた紡錘糸が染色体上に集積しているキネトコア複合体と結合し、引っ張ることによってなされる。キネトコア複合体が集積するゲノム DNA 上の領域をセントロメアと呼ぶ。セントロメア領域には、特異的なタンパク質が局在してい

ることが知られており、これらのタンパク質が局在することにより、他の領域と区別され独自の機能を持っていると考えられている。また、セントロメア領域上に形成される特徴的なクロマチン構造が、セントロメア領域の形成および維持に重要であると考えられている。

真核生物のゲノム DNA は、クロマチン構造を形成している。クロマチンは、ヌクレオソームと呼ばれる四種類のヒストン（H2A、H2B、H3 および H4）各二分子からなるヒストン八量体に DNA が結合した複合体を基本単位として、これらが数珠上に連なった構造体である。これまでの研究により、セントロメア領域には他の領域とは異なる特徴的なクロマチン構造が形成されており、このクロ

マチン構造は目印となり、セントロメア特異的なタンパク質が集積すると考えられている。このセントロメア領域の特徴的なクロマチン構造の形成に中止的な役割を担っている因子が、ヒストン H3 バリエーションである CENP-A である。これまでの解析により、CENP-A は、セントロメア領域に特異的に局在し、他のヒストン H4、H2A、H2B と共にヌクレオソームを形成していることが明らかとなっている。CENP-A ヌクレオソーム自体の構造が特徴的であると考えられ、解析が進められてきた。様々な研究結果より、CENP-A ヌクレオソームの立体構造について、5つのモデルが提案され、議論されている。しかし、これまでに CENP-A ヌクレオソームの立体構造は明らかとなっていなかった。また、CENP-A ヌクレオソームより高次の階層の構造も明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

セントロメア領域の形成される特徴的なクロマチン構造の解析を通して、セントロメア領域の形成および維持機構を解明することを目的とした。

具体的な解析対象は、ヒトの CENP-A ヌクレオソームおよび CENP-B が結合した CENP-A ヌクレオソーム複合体とした。上述したように CENP-A ヌクレオソームは、セントロメア領域のクロマチン形成に必須の基本構造単位である。CENP-B は、セントロメア領域に特異的に局在する DNA 結合タンパク質である。ヒトの場合、CENP-B は、セントロメア領域に繰り返し存在する 17 塩基対の CENP-B box に特異的に結合することが知られている。また、CENP-B は CENP-A ヌクレオソーム中の CENP-B box にも結合できることが明らかとなっている。このことから、CENP-B が結合した CENP-A ヌクレオソーム複合体は、CENP-A ヌクレオソームの次の階層の高次構造であると考えた。

## 3. 研究の方法

四種類のヒストン (H2A、H2B、CENP-A および H4) をリコンビナントタンパク質として個別に発現・精製を行った。精製したヒストンを用いて、ヒストン八量体を再構成し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにて精製した。ヌクレオソームの再構成に用いる DNA は、プラスミドにクローニングを行ったものを、大腸菌を用いて大量に増幅した後に、酵素等を用いて調製した。精製したヒストン八量体および DNA を用いて、塩透析法により CENP-A ヌクレオソームの試験管内再構成を行った。再構成した CENP-A ヌクレオソームを分取用電気泳動装置によって精製した

後に、結晶化を行い、単結晶が得られた。得られた単結晶に、大型放射光施設 SPring-8 にて、X線を照射し、回折波のデータを収集した。収集した回折データから、分子置換法により電子密度マップを求め、CENP-A ヌクレオソームの立体構造を決定した。決定した立体構造をもとに、構造解析を行った。

CENP-A ヌクレオソームの次の階層の高次構造として、CENP-B が結合した CENP-A ヌクレオソーム複合体の再構成を行った。CENP-B は、1-129 番目のアミノ酸領域において CENP-B box と結合することが明らかとなっている。そのため、1-129 番目の欠失変異体 CENP-B (CENP-B DBD) をリコンビナントタンパク質として、発現・精製を行った。精製した CENP-B DBD および CENP-A ヌクレオソームを用いて、CENP-B DBD が結合した CENP-A ヌクレオソーム複合体を再構成した。

## 4. 研究成果

### (1) CENP-A ヌクレオソーム

X線結晶構造解析の結果、CENP-A ヌクレオソームはヒストン八量体 (H2A/H2B/CENP-A/H4)<sub>2</sub> に DNA が左巻きに結合した構造を形成していることが明らかとなった。また、CENP-A ヌクレオソームの全体構造は、通常の H3 ヌクレオソームと同様であることが分かった。

明らかにした CENP-A ヌクレオソームに特異的な構造は、ヒストン複合体に結合した DNA の長さであった。通常の H3 ヌクレオソームの場合、145-147 塩基対の DNA が安定的にヒストン八量体に結合している。CENP-A ヌクレオソームの場合は、147 塩基対の DNA を用いたにも関わらず、121 塩基対のみがヒストン八量体に安定に結合していることが明らかとなった。このことは、CENP-A ヌクレオソームの両端の DNA が非常に運動性の高い領域であるということを示唆していた。エキソヌクレアーゼを用いた生化学的解析および X線小角散乱法を用いた物理化学的な解析により、水溶液中での CENP-A ヌクレオソームの両端の DNA の運動性を検証した。その結果、いずれの解析においても、CENP-A ヌクレオソームの方が H3 ヌクレオソームより、両端の DNA の運動性が高いことが明らかとなった。

ヌクレオソームの両端の DNA の方向性は、隣のヌクレオソームの 3次元位置に影響を与える。そのため、CENP-A ヌクレオソームは、周辺のクロマチン構造を変換していることが考えられた。この性質により、CENP-A はセントロメア領域の特徴的なクロマチン構造形成に機能している可能性が考えられる。

(2) CENP-B DBD が結合した CENP-A スクレオソーム複合体  
CENP-B box を含む DNA を用いて CENP-A スクレオソームを再構成し、精製を行った。精製した CENP-DBD と CENP-A スクレオソームを、試験管内で反応させることで、複合体の形成を試した。しかし、形成される複合体の割合は少なく、多くが凝集体を形成することが明らかとなった。凝集体の形成を抑制し、複合体の形成を促す目的で、様々な酸性タンパク質を反応系に加えて、複合体の形成効率を検討した。その結果、ヒストンシヤペロンである Nap1 存在下において、凝集体の形成を抑制し、効率よく CENP-B DBD が結合した CENP-A スクレオソーム複合体が形成されることが明らかとなった。この反応における Nap1 の作用機序について、さらなる解析を行った。その結果、Nap1 は CENP-B box 以外の領域に非特異的に結合した CENP-B を DNA から解離させる活性を持つことが明らかとなった。さらに、Nap1 過剰かつ低塩濃度下の条件において、Nap1 は CENP-B box に結合した CENP-B DBD を解離させる活性を持つことが明らかとなった。

細胞内での Nap1 と CENP-B の相互作用を、人口染色体をもつ培養細胞を用いて行った。Nap1 を人口染色体のセントロメア領域に強制的に局在させ、その領域に局在している CENP-B DBD の量を免疫染色法により検討した。その結果、Nap1 がセントロメア領域に局在することで、CENP-B のシグナルが優位に減少することが明らかとなった。この結果から、細胞内においても Nap1 と CENP-B は相互作用していることが明らかとなった。

Nap1 を用いることにより、効率よく CENP-B DBD が結合した CENP-A スクレオソーム複合体の再構成することが可能になった。本方法を用いて、CENP-B DBD が結合した CENP-A スクレオソーム複合体を大量に再構成し、分取用電気泳動装置により精製を行い、結晶化を行った。

##### 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 5 件)

(1) Structural Analysis of the Hexasome, Lacking One Histone H2A/H2B Dimer from the Conventional Nucleosome.

Arimura Y, Tachiwana H, Oda T, Sato M, Kurumizaka H.

Biochemistry. 2012, Vol. 51, pp. 3302-3309.

doi: 10.1021/bi300129b

査読：有

(2) Comparison between the CENP-A and

histone H3 structures in nucleosomes.

Tachiwana H, Kagawa W, Kurumizaka H.

Nucleus. 2012, Vol. 3, pp. 6-11.

doi:10.4161/nucl.18372

査読：有

(3) Comprehensive structural analysis of mutant nucleosomes containing lysine to glutamine (KQ) substitutions in the H3 and H4 histone-fold domains.

Iwasaki W, Tachiwana H, Kawaguchi K, Shibata T, Kagawa W, Kurumizaka H.

Biochemistry. 2011, Vol. 50, pp. 7822-7832.

doi:10.1021/bi201021h

査読：有

(4) Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A.

Tachiwana H, Kagawa W, Shiga T, Osakabe A, Miya Y, Saito K, Hayashi-Takanaka Y, Oda T, Sato M, Park SY, Kimura H, Kurumizaka H.

Nature. 2011, Vol. 476, pp. 232-235.

doi: 10.1038/nature10258.

査読：有

(5) Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants.

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

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2011, Vol. 67, pp. 578-583.

doi:10.1107/S0907444911014818

査読：有

[学会発表] (計 5 件、その他 19 件)

(1) 立和名 博昭, CENP-A スクレオソームの高次クロマチン構造に与える影響、第 29 回染色体ワークショップ、2012 年 1 月 26 日、ホテルニュー水戸屋 (宮城県)

(2) H. Tachiwana, Crystal structure and biochemical property of the human centromere specific nucleosome, 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

(3) H. Tachiwana, Instability and structural property of a human testis-specific histone H3T nucleosome, SRB/WCRB conferences, 2011 年 10 月 13 日、Cairns Convention Centre (ケアンズ、オーストラリア)

(4) 立和名 博昭, セントロメア特異的なスクレオソームの構造・生化学・細胞生物学的解析、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、国立京都国際会館 (京都府)

(5) H. Tachiwana, The structural and biochemical analyses of centromere specific nucleosome, EMBO conference series, 2011年6月4日、EMBL Advanced Training Centre (ハイデルベルグ、ドイツ)

〔図書〕(計2件)

(1) 著者：Hiroaki Tachiwana, Wataru Kagawa, Hitoshi Kurumizaka、出版社：JASRI、書名：SPRING-8 Research Frontiers 2010、総ページ：196ページ、18-19ページ担当

(2) 著者：平尾一郎、出版社：羊土社、書名：実験医学別冊 目的別で見る核酸実験の原理とプロトコール、総ページ：263ページ、97-101ページ担当

〔その他〕

(1) ライフサイエンス 新着論文レビューにて、CENP-Aヌクレオソームの立体構造を決定した研究成果の紹介を行った。

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/3262>

(2) CENP-Aヌクレオソームの立体構造を決定した研究成果について、記者会見を行い、以下の報道がなされた。

・ヒト染色体の中心構造を詳細に解明、日本経済新聞、2011.07.13

・染色体中心部の謎に迫る=たんぱく複合体の構造解明—がん研究進展に期待・早稲田大学など、[asahi.com](http://asahi.com)、2011.07.11

・染色体の構造解明、早稲田大学教授らDNAゆるく巻き付く、47NEWS 共同通信、2011.07.12

・早稲田大学 染色体セントロメアの立体構造を世界初解明、化学工業日報、2011.07.11

・人の染色体 早稲田大学、中心構造詳細にダウン症など解明に道、日経産業新聞、2011.07.12

## 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・次席研究員

研究者番号：70546382

### (2) 研究分担者

該当者なし

### (3) 連携研究者

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)

明星大学・理工学部・准教授

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

柴田 武彦 (SHIBATA TAKEHIKO)

理化学研究所・主任研究員

研究者番号：70087550

舛本 寛 (MASUMOTO HIROSHI)

(財)かずさDNA研究所・室長

研究者番号：70229384

大関 淳一郎 (OHZEKI JUN-ICHIROU)

(財)かずさDNA研究所・研究員

研究者番号：30514088

### (4) 研究協力者

越阪部 晃永 (OSAKABE AKIHISA)

早稲田大学・先進理工学部・助手

堀越 直樹 (HORIKOSHI NAOKI)

早稲田大学・大学院先進理工学研究科・

博士2年

有村 泰宏 (ARIMURA YASUHIRO)

早稲田大学・大学院先進理工学研究科・

博士1年

宮 優太 (MIYA YUTA)

早稲田大学・大学院先進理工学研究科・

修士2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2年