

論文の内容の要旨

論文題目 ヒトセントロメア局在タンパク質 CENP-B の構造解析および機能解析

氏名 田中 祥徳

DNA は生物の遺伝情報が書き込まれている本体である。ところが、一つの細胞内の DNA は、ヒトの場合全長約 2 m と大変長い。そのため、通常 DNA は、四種類のコアヒストンタンパク質 (H2A, H2B, H3, H4) に巻きついたヌクレオソームと呼ばれるビーズ状の構造を形成し、折りたたまれて収納されている。細胞分裂時には、それらのヌクレオソームはさらに高次に凝縮され、最終的には染色体とよばれる構造となる。セントロメアは、細胞分裂時にこれらの染色体を正確に分配させる機能を持つ染色体領域の一つであり、この領域に異常が起こると染色体の正常な分配が阻害される。

このセントロメア機能に関与するタンパク質や DNA などの因子について、これまでに数多くの解析が行われ、セントロメア領域には凝縮した特異的なクロマチン構造が形成され、それがキネトコア形成の基盤となっているということが示唆されている。哺乳類のセントロメア DNA の多くは反復配列を持っており、ヒトでは α -サテライト DNA とよばれる約 171 塩基対の DNA を基本単位とする繰り返し配列がセントロメア領域に分布している。そして α -サテライト DNA リピートの一回分の長さの DNA がコアヒストンタンパク質に巻きついて一個のヌクレオソーム構造を形成していると推測されている。前述したセントロメア特異的なクロマチン構造は、 α -サテライト DNA を含んだヌクレオソームと、様々なセントロメア局在タンパク質群との複合体を基本とし、それをさらに凝縮させることによって形成されていると考えられている。

セントロメア局在タンパク質として、これまでにヒトでは CENP-A、CENP-B などのタンパク質が同定されている。CENP-A はその C 末端側 約 2/3 の部分に、ヒストン H3 のそれと 62% の高い相同性をも

つ領域があり、セントロメア特異的なヒストン H3 のバリエーションであると推定されている。一方、CENP-B は、これまで発見されたセントロメア局在タンパク質の中では唯一配列特異的な DNA 結合活性を示すタンパク質である。セントロメア領域の α -サテライト DNA リピート中には、一回おきに CENP-B box と呼ばれる 17 塩基対の配列が出現する。CENP-B は N 末端側に DNA 結合領域をもっており、CENP-B box に配列特異的に結合する。

そして CENP-B の結合が、ヌクレオソームのポジショニングを誘起することが報告され、このことは CENP-B がセントロメア特異的なクロマチンの形成において重要な役割を果たしていることを示唆した。また、CENP-B は二量体形成ドメインも持っており、その二量体形成活性もセントロメア領域の DNA の凝縮に関わっていると考えられている。さらに最近、CENP-B box が *de novo* のセントロメア形成において必須であることが報告された。これらのことから、CENP-B および CENP-B box はセントロメアの機能に重要な役割を果たすと考えられる。そこで本研究ではセントロメアの構築メカニズムと機能を明らかにする目的で、CENP-B に着目し、CENP-B の DNA 結合領域 (N 末端側 129 残基、以下 CENP-B₁₋₁₂₉) と CENP-B box を含む DNA との複合体について X 線結晶構造解析を行った。さらに、CENP-B₁₋₁₂₉ の存在下で再構成したヌクレオソームについて生化学的解析を行った。

まず、CENP-B₁₋₁₂₉ と CENP-B box DNA との複合体の X 線結晶構造解析を行った。CENP-B₁₋₁₂₉ は変性状態で精製し、CENP-B box DNA と混合した。そして、CENP-B₁₋₁₂₉ の変性状態からの巻き戻しと同時に、DNA との複合体の再構成を行った。得られた複合体について結晶化をおこない、シンクロトロン放射光施設 (SPring-8) において、X 線回折データを収集し、その分子構造を 2.5 Å 分解能で決定した。CENP-B₁₋₁₂₉ と CENP-B box DNA との複合体の全体構造を図 1 に示す。CENP-B₁₋₁₂₉ は helix-turn-helix モチーフを含むドメインが二つ連なった構造から構成されており、DNA は CENP-B₁₋₁₂₉ の結合によって全体で約 60 度曲がっていることが明らかになった。さらに詳しく解析を行った結果、DNA は二箇所でキック構造を形成しており、このような CENP-B の DNA への結合様式は、これまでの DNA 結合タンパク質にはないものであった。

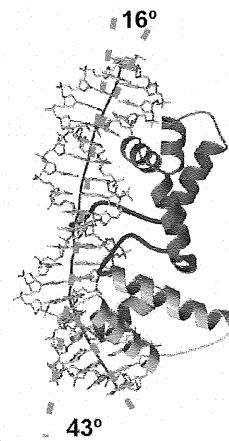


図 1 CENP-B₁₋₁₂₉/CENP-B box DNA 複合体の分子構造

さらにこの CENP-B と DNA との複合体が形成する特殊な構造が、セントロメア特異的なクロマチンの構築においてどのような役割を果たしているかを明らかにする目的で、ヌクレオソームおよびセントロメア特異的なヌクレオソームと CENP-B₁₋₁₂₉ との相互作用について生化学的解析を行った。

まず、5 種類のヒストンタンパク質 (H2A, H2B, H3, H4, CENP-A) をリコンビナントタンパク質として大腸菌内で発現させ、それぞれを精製した。そして、H2A, H2B, H3, H4 と α -サテライト配列を含む DNA (satellite-4 DNA; 186 塩基対) から通常のヌクレオソーム (H3 ヌクレオソーム) を、また H2A, H2B,

CENP-A, H4 と satellite-4 DNA からセントロメア特異的ヌクレオソーム (CENP-A ヌクレオソーム)を、それぞれ塩透析法により試験管内で再構成することを試みた。それらのサンプルについてゲルシフトアッセイ法による解析を行った結果、H3 ヌクレオソームおよび CENP-A ヌクレオソームに対応するバンドが観察された (図 2, lane 2, lane 4)。次に、これらのサンプルについて Micrococcal nuclease (以下 MNase) での限定分解による解析を行った。その結果、双方のサンプルについてコアヒストンに巻きついた DNA が約 146 塩基対の断片として残り (図 3A)、両方のヌクレオソームが正しく形成されていること

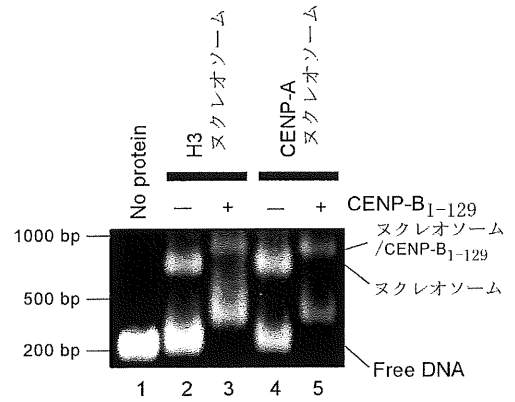


図2 ヌクレオソームのゲルシフト法による解析
 レーン1: DNAのみ
 レーン2: H3 ヌクレオソーム
 レーン3: CENP-B₁₋₁₂₉の存在下で再構成したH3 ヌクレオソーム
 レーン4: CENP-A ヌクレオソーム
 レーン5: CENP-B₁₋₁₂₉の存在下で再構成したCENP-A ヌクレオソーム

が確認できた。

次に、CENP-B₁₋₁₂₉ の存在下で上記の二種類のヌクレオソームを同様に再構成し、ゲルシフトアッセイ法による解析を行った。その結果、CENP-B₁₋₁₂₉ を加えることによってヌクレオソームよりもさらに泳動度の小さなバンドが観察された (図 2, lane 3, lane 5)。また、先ほどと同様にサンプルを MNase で処理して解析した結果、CENP-B₁₋₁₂₉ を加えない場合と同様に約 146 塩基対の DNA 断片が残った (図 3B)。解析に用いた DNA は中央部に CENP-B box を持つため、どのような 146 塩基対の配列を考えた場合も必ず CENP-B box が含まれる (図 5B)。これらのことから、この場合は CENP-B₁₋₁₂₉ はヌクレオソームコアを形成

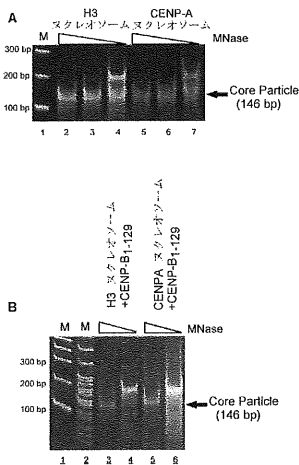


図3 Micrococcal nucleaseによる解析
 再構成したサンプルをMicrococcal nuclease (MNase) で限定分解し、それぞれを電気泳動した。
 (A) CENP-B₁₋₁₂₉を含まない状態で再構成したヌクレオソームをMNase処理したもの
 (B) CENP-B₁₋₁₂₉の存在下で再構成したヌクレオソームをMNase処理したもの

している DNA に直接結合していると考えられる。

このことを確認するために、ここで再構成した四種類のヌクレオソームについて Deoxyribonuclease I (DNase I) を用いてフットプリント法による解析を行った。その結果、四種類のサンプル全てにおいて、10 塩基対間隔でバンドの強弱パターンが観察された (図 4)。これは、ヌクレオソームのフットプリント法による解析において典型的に観察されるものである。また、CENP-B box の周辺で DNase I による切断が弱くなっており、CENP-B₁₋₁₂₉ がヌクレオソームに結合していることを確認できた (図 4, lane 4, lane 6)。

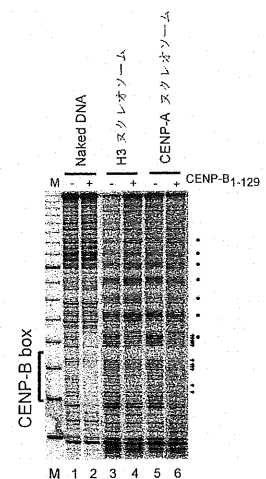


図4 DNase I フットプリンティング法による解析
 レーン1: DNA (186塩基対)のみをDNase Iで切断したもの
 レーン2: DNA/CENP-B₁₋₁₂₉を切断したもの
 レーン3: H3 ヌクレオソームを切断したもの
 レーン4: H3 ヌクレオソーム/CENP-B₁₋₁₂₉を切断したもの
 レーン5: CENP-A ヌクレオソームを切断したもの
 レーン6: CENP-A ヌクレオソーム/CENP-B₁₋₁₂₉を切断したもの
 図中の黒丸は10塩基対間隔でみられるラダーの位置を、また黒三角はCENP-B₁₋₁₂₉の結合によってDNase Iの切断が弱くなっている位置を示す。

そこで次に、CENP-B₁₋₁₂₉の結合によって、ヌクレオソームコアが形成される位置に変化が起こるか否かを調べるため、マッピング解析を行った。その結果、四種類のヌクレオソームのコアは主に二つの位置(それぞれ position A、position B とした)を占めるということが明らかになった(図 5A)。定量解析を行った結果、H3 の CENP-A への置換はヌクレオソームのポジショニングに影響を与えないが(図 5C)、CENP-B₁₋₁₂₉が CENP-B box に結合することによって、H3 ヌクレオソームおよび CENP-A ヌクレオソームが position A へとポジショニングを受けることがわかった(図 5C)。従って、 α -サテライト DNA リピート上に規則正しくヌクレオソームが並んだ構造を形成するには、CENP-A ではなく主に CENP-B がその役割を担っていることが考えられる。

この結果をもとに、CENP-B₁₋₁₂₉の結合によって、ヌクレオソームコアが position A に配置される場合の構造モデルを提案した(図 6)。CENP-Bの結合によって湾曲する CENP-B box DNA の構造は、セントロメア特異的なヌクレオソームをポジショニングさせる際に何らかの都合の良い働きをする構造である可能性がある。

さらに、satellite-4 DNA 内の CENP-B box の位置を動かした変異型 satellite-4 DNA を用いて CENP-B₁₋₁₂₉/DNA 複合体を再構成して解析したところ、satellite-4 DNA の CENP-B box 以外の部分が何らかの intrinsic な構造を形成しているらしいということがわかった。この構造もセントロメア領域におけるクロマチン構造形成に寄与している可能性がある。

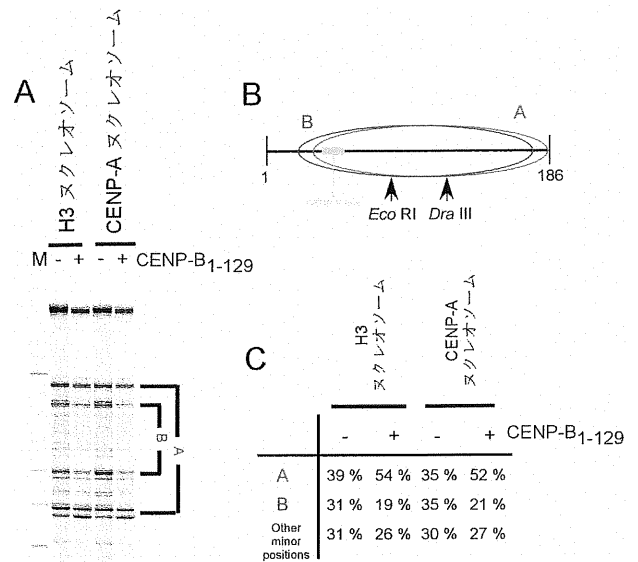


図5 ヌクレオソームのポジジョンのマッピング
(A) ヌクレオソームコア粒子を形成する146塩基対の断片を制限酵素で切断し泳動した。
(B) (A)の結果をもとに決定した主なポジジョンA, Bの位置を今回用いたDNA (186塩基対)上に示した。
(C) ヌクレオソームがそれぞれの位置を占める割合を定量解析した結果。

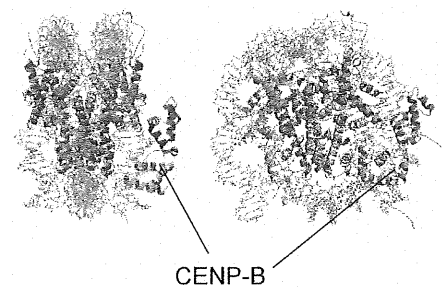


図6 ヌクレオソームコア上に結合している CENP-B₁₋₁₂₉