

論文審査の結果の要旨

氏名 田中 祥徳

CENP-B は、真核生物においてセントロメア特異的なクロマチン構造が形成される上で、中心的な役割を果たすタンパク質の一つである。セントロメア特異的なクロマチン構造が形成される際には、その領域のヌクレオソームは規則正しくパッキングされ、高次に凝縮した構造を形成することが明らかになっており、CENP-B は、このヌクレオソームのパッキングに関与することが示唆されている。本論文では、ヒト CENP-B の構造生物学的解析および生化学的解析を行い、CENP-B のセントロメア特異的クロマチンが形成される分子機構の研究を行っている。

第 2 章では CENP-B とその認識 DNA との複合体の構造について述べている。ヒト CENP-B は、全長 599 アミノ酸からなるタンパク質であり、そのうちアミノ末端側 129 残基(CENP-B₁₋₁₂₉)は、CENP-B box と呼ばれる DNA 配列に、特異的に結合する活性を持っている。ところが、この CENP-B₁₋₁₂₉ は、単体で可溶性のタンパク質として大量精製するのは困難であり、また、溶液中でもほとんどの CENP-B₁₋₁₂₉ 分子が速やかに沈殿を形成してしまうことから、構造解析が困難であると考えられていた。論文提出者は、まずこの CENP-B₁₋₁₂₉ を変性状態で可溶化して大量精製を行っている。そして、その CENP-B₁₋₁₂₉ を変性条件下で CENP-B box DNA と混合したのちに巻き戻すことによって、非常に安定な CENP-B₁₋₁₂₉/CENP-B box DNA 複合体を再構成している。また、その複合体をさらに精製して、優れた単結晶を作成している。そして、DNA 部位にヨウ素修飾を導入した重原子置換体を持ちいて、重原子同型置換法を持ちいた X 線結晶構

造解析により CENP-B₁₋₁₂₉/CENP-B box DNA 複合体の立体構造を決定している。その結果、CENP-B₁₋₁₂₉ はそれぞれヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフをもつ二つのドメインが連結された構造からなることが明らかになった。また、CENP-B₁₋₁₂₉ の結合によって CENP-B box は約 60 度の湾曲構造を形成することが明らかになった。これらの知見から、論文提出者は、CENP-B は DNA を湾曲させることによってその近傍のヌクレオソームをポジショニングさせるのであろうという仮説を提案している。

第 3 章では、その CENP-B がヌクレオソームをどのような位置にポジショニングさせるのかについて、生化学的に解析している。ヌクレオソームは四種類のヒストンタンパク質に DNA が巻きついた構造から形成されているが、セントロメア領域では、ヌクレオソームは通常のヒストンタンパク質だけではなく、ヒストン H3 のバリエーションである CENP-A を含んでいると考えられている。論文提出者は、まず、ヒストンタンパク質および CENP-A を全てリコンビナントタンパク質として精製している。そして、それらのタンパク質およびセントロメア DNA を用いて、通常のヌクレオソームおよび CENP-A を含むヌクレオソームを再構成する系を確立している。そして、CENP-B₁₋₁₂₉ の存在下でそれらのヌクレオソームを再構成し、ゲルシフトアッセイ法により解析している。その結果、CENP-B₁₋₁₂₉ はヌクレオソームのコア部分の DNA に直接結合していることが明らかになった。また、DNase I フットプリンティング法による解析、および MNase によるヌクレオソームコアのマッピング解析の結果、CENP-B₁₋₁₂₉ の結合によってヌクレオソーム DNA の回転的な向きは変化しないが、その並進的な位置が一箇所の特定の位置へとポジショニングを受けることが明らかになった。この知見に基づいて、論文提出者は、CENP-B₁₋₁₂₉ が結合した状態のヌクレオソームの構造モデルを提案している。

なお、本論文は、東京大学大学院理学部の横山茂之教授、深井周也君、幾田まりさん、岩原淳二君、早稲田大学理工学部の胡桃坂仁志助教授、東京工業大学大学院生命理工学研究科の濡木理教授、藤田保健衛生大学総合医科学研究所の岡崎恒子教授、および理化学研究所の河口真一基礎科学特別研究員との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。