

129. 染色体の異数性を防ぐクロマチン領域の構築原理の解析

立和名 博昭

*早稲田大学 大学院先進理工学研究科

Key words : 染色体, セントロメア, CENP-A

緒言

遺伝情報を担うゲノム DNA は、細胞分裂を繰り返しても正確に継承されなければならない。細胞周期の S 期で複製されたゲノム DNA は、M 期で染色体を形成する。さらに、M 期が進行していくと、染色体に両極から伸びてきた紡錘糸が結合し、それぞれを引っ張ることで二つの娘細胞に染色体は均等に分配される。この紡錘糸が結合するゲノム DNA 上の領域がセントロメア領域である。ゲノム DNA は、4 種類のヒストンタンパク質からなるヒストン複合体に DNA が巻き付いたヌクレオソーム構造を基本単位として、これらが数珠状に連なることで細胞核内に収納されている。この構造をクロマチン構造と呼ぶが、セントロメア領域の確立および維持には、特殊なクロマチン構造が必要だと考えられてきた。実際に、ヒストン H3 の亜種 (バリエーション) である CENP-A がセントロメア領域に特異的に局在しており、この CENP-A を含むヌクレオソームが形成されることにより、セントロメア領域の特殊なクロマチン構造がつけられると考えられていた。これまでに、私は CENP-A を含むヌクレオソームの立体構造を決定した。その結果、CENP-A を含むヌクレオソームは、その両端の DNA が安定的にヒストン複合体とは結合していないことが明らかとなった¹⁻³⁾。後の報告により、この性質は細胞内に形成されている CENP-A ヌクレオソームにおいても確認された^{4,5)}。ヌクレオソームの両端の DNA は、隣のヌクレオソームとつながるため、この配向は高次構造に影響を与えることが考えられた。さらに、セントロメア領域には CENP-A 以外にも必須なタンパク質群 (constitutive centromere associated network: CCAN) が存在しており^{6,7)}、これらのタンパク質群がセントロメア領域に局在する機構は明らかとなっていなかった。また、私は CCAN に含まれ CENP-A ヌクレオソームに直接結合することが明らかになっている CENP-C がクロマチン上に局在することで、CENP-A 非依存的にその他の CCAN が集積することを見出している⁸⁾。これらのことより、CENP-C は CENP-A を標的としてセントロメア領域に局在し、CENP-A 非依存的に下流のタンパク質の集積を促進する機能があると考えられた。つまり、CENP-A は CENP-C をセントロメア領域に局在させるための目印として機能しており、セントロメア領域に結合した CENP-C の機能により他のセントロメアタンパク質が集積する機構が想定された。そこで本研究では、CENP-C の機能を解析するために、CENP-C と相互作用する因子の探索を目的とした。現在までに、CENP-C と相互作用する因子の探索をする上で基質となる CENP-C が結合したクロマチンの調製を行ったので報告する。

方法、結果および考察

先行研究により、CENP-C はクロマチンに結合している時と結合していない時で相互作用因子が変わることが示唆されていた⁸⁾。本研究は、セントロメア領域の形成および維持機構における CENP-C の機能解析を目的としているため、クロマチンに結合した CENP-C の相互作用因子を同定する必要がある。そこで、クロマチンに結合した CENP-C を試験管内にて再構成するにあたり、細胞内の状態を反映した試料の調製を考えた。本研究では一つのヌクレオソームの両端に各一つのヌクレオソームが連なっているトリヌクレオソームを調製し、このトリヌクレオソームに CENP-C が結合したサンプルを基質とした。この基質を用いて、細胞抽出液から CENP-C に相互作用する因子を同定することを研究の目的とした。ヒトの場合、セントロメア領域の DNA は 171 塩基対の繰り返し配列となっており、ヌクレオソーム中のヒストンに結合している DNA が 146 塩基対であるため、ヌクレオソームとヌクレオソームの間の DNA (リン

*現所属：公益財団法人 がん研究会 がん研究所

カー DNA) の長さを 25 塩基対とした。また、ヌクレオソームを形成させる領域にはヌクレオソームのポジショニングシーケンスである 601 配列を用いた。3つの 601 配列が 25 塩基対のリンカー DNA によって連結した DNA を用いて、それぞれの 601 配列上に H3 を含むヌクレオソームもしくは CENP-A を含むヌクレオソームを配置したトリヌクレオソームの試験管内再構成を行った。しかし、長い DNA と 1 種類のヒストン複合体を用いて塩透析法により再構成する従来の方法では、複数種類のヒストン複合体からなるヌクレオソームが混在しているトリヌクレオソームを均一に再構成することは出来ない。そのため、CENP-A を含むヌクレオソームの両端に H3 を含むヌクレオソームが連なったトリヌクレオソームを高純度で調製するためには、新しい手法の確立が必要だった。そこで、以下に示す方法においてトリヌクレオソームを試験管内にて再構成する方法の確立を行った。これまでにモノヌクレオソームを高純度に精製する方法は確立していた。そこで、モノヌクレオソーム同士を DNA 連結酵素により結合させることで、トリヌクレオソームの再構成を試みた (図 1)。

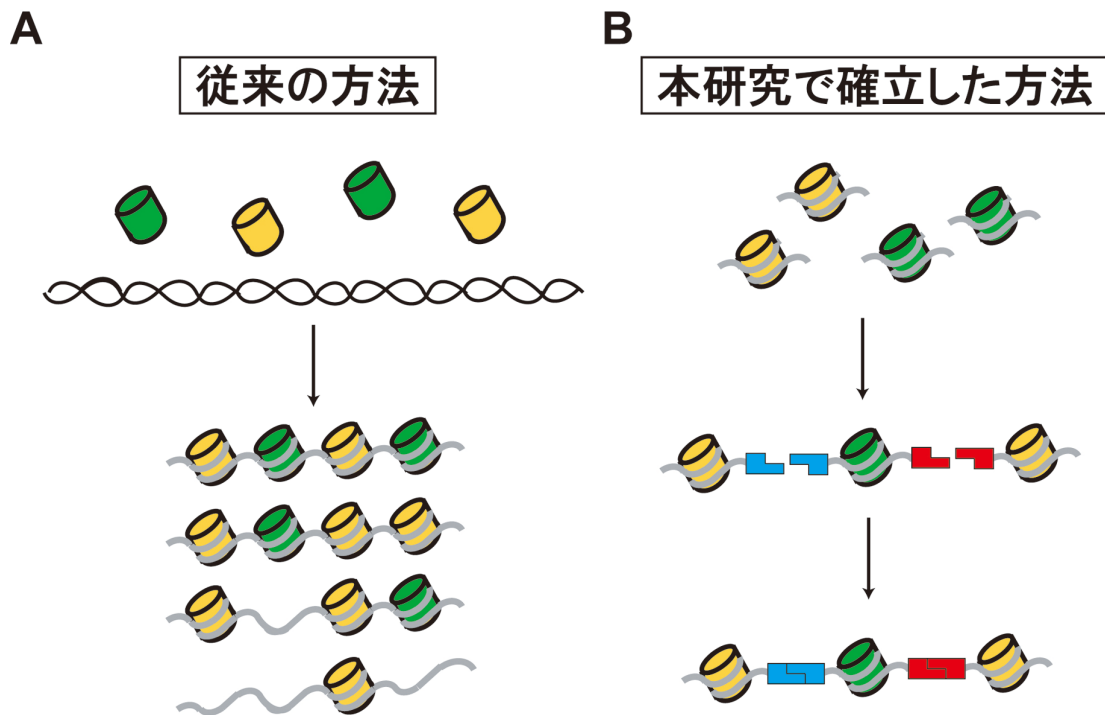


図 1. 任意のヒストンバリエントを含むヌクレオソームの試験管内再構成方法

A) 従来の塩透析法によるトリヌクレオソームの再構成方法。複数のヒストンバリエントからなるヒストン複合体を DNA と混ぜ、塩透析法によりトリヌクレオソームを再構成した場合、任意の場所に目的とするヒストンバリエントを含むヌクレオソームを配置したトリヌクレオソームを均一に調製することは難しい。

B) トリヌクレオソームの新しい再構成方法。これまでに確立されているモノヌクレオソームの試験管内再構成を行い、それぞれ端のヌクレオソーム、真ん中のヌクレオソームを調製する。再構成後に、モノヌクレオソームの精製を行う。この時に DNA の末端は、回文配列ではない突出末端にしておき、さらに異なる DNA 断片の配列とアニーリングできるような配列とする。精製した端および真ん中のモノヌクレオソームを混ぜ、DNA 連結酵素によりリンカー DNA を結合させ、トリヌクレオソームを再構成する。この方法を用いると、任意のヒストン複合体を任意の箇所に持つトリヌクレオソームの再構成が可能である。

最初に、基質となる DNA を 3 種類調製した。それぞれの DNA をプラスミドに挿入し、それを大腸菌に導入して増幅した。プラスミドを精製した後に、制限酵素を用いて目的 DNA 断片を切り出し、ポリエチレングリコールによる沈殿法、イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。両端のヌクレオソームに用いる DNA は、脱リン酸

化した平滑末端と回文配列になっていない突出末端を持つ。真ん中のヌクレオソームに用いる DNA は、回文配列になっていない突出末端を両方に持つ。これらの DNA は、突出末端の配列から一つの組み合わせでのみライゲーションされる。次に、ヒストン複合体の再構成を行った。ヒストン複合体は H3、H4、H2A および H2B からなる H3 八量体と CENP-A、H4、H2A および H2B からなる CENP-A 八量体の調製を以下の手順にて行った。まず、それぞれのヒストンを、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質として発現・精製を行った。精製した各ヒストンを等モル数になるように変性条件下で混合し、変性剤を透析により除くことでヒストン八量体を再構成した。そして、再構成したヒストン複合体をゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製を行った (図 2)。

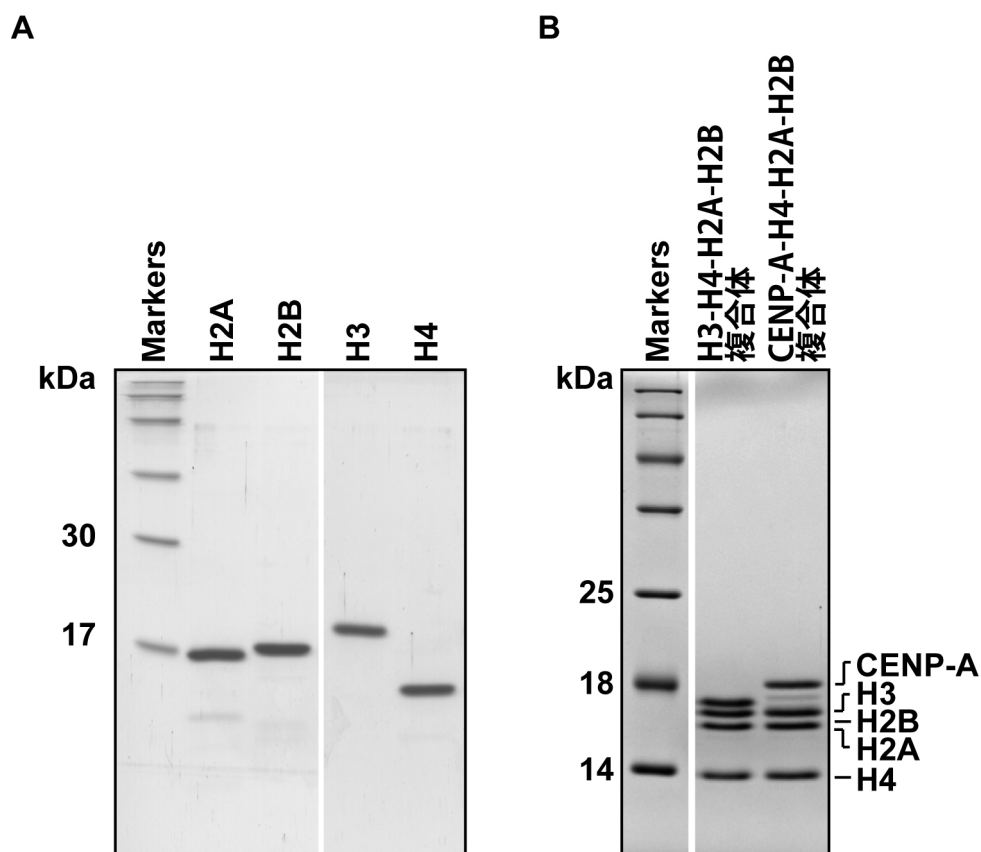


図 2. ヒストンの精製とヒストン複合体の調製

- A) 大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質として発現させたヒストン H2A、H2B、H3 および H4 を精製した。
- B) 精製したヒストンを用いて、H3-H4-H2A-H2B 八量体および CENP-A-H4-H2A-H2B 八量体を再構成した。

次に、精製した DNA とヒストン八量体を用いて、塩透析法によりモノヌクレオソームを再構成した。両端のヌクレオソームを再構成するために、H3 を含むヒストン八量体を用い、真ん中のヌクレオソームを再構成するために、CENP-A を含むヒストン八量体を用いた。その後、再構成したモノヌクレオソームを分取用電気泳動法により精製を行い、フリーのヒストン八量体と DNA を除去した。そして、両端のヌクレオソームと真ん中のヌクレオソームを等モル比となるように混合し、DNA 連結酵素を加え、リンカー DNA のライゲーションを行った。その結果、見事に H3 ヌクレオソーム-CENP-A ヌクレオソーム-H3 ヌクレオソームとつながっているトリヌクレオソームが試験管内において再構成できていることが確認された。そして、得られたトリヌクレオソームを分取用電気泳動により精製する方法も確立した。現在、このトリヌクレオソームに CENP-C を結合させた基質を作り、細胞抽出液から結合因子の同定を試みているところである。

本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 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. Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature*. 2011;476(7359):232-5. doi: 10.1038/nature10258. PubMed PMID: 21743476
- 2) Tachiwana H, Kagawa W, Kurumizaka H. Comparison between the CENP-A and histone H3 structures in nucleosomes. *Nucleus*. 2012;3(1):6-11. PubMed PMID: 22127263
- 3) Kono H, Shirayama K, Arimura Y, Tachiwana H, Kurumizaka H. Two arginine residues suppress the flexibility of nucleosomal DNA in the canonical nucleosome core. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120635. doi: 10.1371/journal.pone.0120635. PubMed PMID: 25786215
- 4) Roulland Y, Ouararhni K, Naidenov M, Ramos L, Shuaib M, Syed SH, Lone IN, Boopathi R, Fontaine E, Papai G, Tachiwana H, Gautier T, Skoufias D, Padmanabhan K, Bednar J, Kurumizaka H, Schultz P, Angelov D, Hamiche A, Dimitrov S. The Flexible Ends of CENP-A Nucleosome Are Required for Mitotic Fidelity. *Mol Cell*. 2016;63(4):674-85. doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.023. PubMed PMID: 27499292
- 5) Lacoste N, Woolfe A, Tachiwana H, Garea AV, Barth T, Cantaloube S, Kurumizaka H, Imhof A, Almouzni G. Mislocalization of the centromeric histone variant CenH3/CENP-A in human cells depends on the chaperone DAXX. *Mol Cell*. 2014;53(4):631-44. doi:10.1016/j.molcel.2014.01.018. PubMed PMID: 24530302
- 6) Tachiwana H, Miya Y, Shono N, Ohzeki J, Osakabe A, Otake K, Larionov V, Earnshaw WC, Kimura H, Masumoto H, Kurumizaka H. Nap1 regulates proper CENP-B binding to nucleosomes. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(5):2869-80. doi: 10.1093/nar/gks1464. PubMed PMID: 23325853
- 7) Takeuchi K, Nishino T, Mayanagi K, Horikoshi N, Osakabe A, Tachiwana H, Hori T, Kurumizaka H, Fukagawa T. The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(3):1644-55. doi: 10.1093/nar/gkt1124. PubMed PMID: 24234442
- 8) Tachiwana H, Müller S, Blümer J, Klare K, Musacchio A, Almouzni G. HJURP involvement in de novo CenH3(CENP-A) and CENP-C recruitment. *Cell Rep*. 2015;11(1):22-32. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.013. PubMed PMID: 25843710