

がん細胞で見いだされた特殊なヌクレオソームの構造解析 Structural analysis of the unique nucleosome in the cancer cell

有村泰宏¹, 堀越直樹¹, 田口裕之¹, 胡桃坂仁志^{1,*}

¹早稲田大学先端生命医科学センター 〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2

1 はじめに

真核生物のゲノム DNA はタンパク質と結合し、クロマチンと呼ばれる構造体を形成する。転写、複製、修復、組換えなどの DNA の機能発現は、クロマチンの構造変換を介して制御されている。このようなクロマチンの構造変換およびその動態制御は、遺伝情報の発現、維持、継承に必須であると考えられている。クロマチンは、4 種類のヒストン (H2A、H2B、H3、H4) が 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体と DNA から構成されるヌクレオソームが連なって構築される高次構造体である。各ヒストンにはアミノ酸相同性が高く、ヌクレオソームを形成することが可能な、ヒストンバリエントと呼ばれるタンパク質がそれぞれ存在する。それぞれのヒストンバリエントは特定のクロマチン領域に取り込まれ、遺伝情報の発現、維持、継承においてバリエント特異的な機能を果たすと考えられている。ヒストン H3 のバリエントである CENP-A は、セントロメアと呼ばれる特定のゲノム領域に CENP-A を 2 分子含むヌクレオソーム (CENP-A ヌクレオソーム) を形成し、このヌクレオソームがセントロメアタンパク質集積の基点となることで動原体形成を主導する。

近年、がん細胞において、CENP-A が高発現することで、セントロメア以外の領域に CENP-A が取り込まれて CENP-A と H3.3 を 1 分子ずつ含むヌクレオソーム (CENP-A/H3.3 ヌクレオソーム) が形成されることが明らかになった[参考文献 1]。CENP-A/H3.3 ヌクレオソームは、転写因子の結合を阻害することなどによって、がんの悪性化に関与することが示唆されている[参考文献 1]。しかし、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームの構造および性質が明らかでないために、このヌクレオソームによるがん悪性化メカニズムの詳細は不明瞭であった。そこで本研究では、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームを試験管内で再構成し、X 線結晶構造解析及び生化学的解析を行なった。本成果は *Scientific Reports* 誌に掲載された[成果 1]。

2 実験

まず、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームを再構成するために、各種ヒストン(H2A、H2B、CENP-A、His-SUMO-H3.3、H4)をリコンビナントタンパク質として精製した。精製した各ヒストンを用いて、ヒストン

8 量体を再構成し、146 塩基対の DNA と混合して、塩透析法により CENP-A/H3.3 ヌクレオソームを再構成した。精製した CENP-A/H3.3 ヌクレオソームを用いて結晶化を行い、単結晶を得た。得られた単結晶を用いて、PF BL-17A にて X 線回折データを収集し、立体構造を決定した。また、生化学的解析によって CENP-A/H3.3 ヌクレオソームの性質を明らかにした。

3 結果および考察

本研究によって初めて CENP-A/H3.3 ヌクレオソームを高純度に単離精製する系を確立した。CENP-A/H3.3 ヌクレオソームの構造的特性を明らかにするために、X 線結晶構造解析を行った。まず、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームの単結晶を作製した。得られた単結晶を用いて、PF BL-17A にて X 線回折像を収集し、*HKL2000* によって 2.67 Å の分解能でデータ処理を行った。次に、既知の通常型ヌクレオソーム構造 (PDB code: 2CV5) を用いて、分子置換法によって位相決定を行った。最後に、*PHENIX* によって構造の精密化を行い、立体構造を決定した。CENP-A/H3.3 ヌクレオソームと CENP-A ヌクレオソームおよび H3.3 ヌクレオソームとの構造比較を行った結果、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームは CENP-A ヌクレオソームと H3.3 ヌクレオソームの構造的特徴を 1 つのヌクレオソームの中にそれぞれ保存していることが明らかとなった。具体的には、CENP-A に接触した DNA 領域は、H3.3 に接触した DNA 領域に比べて電子密度が弱く、CENP-A ヌクレオソームの構造的特徴である高いフレキシビリティを有していた (図 1) [参考文献 2]。さらに、生化学的解析からも、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームは CENP-A ヌクレオソームの特徴を保存しており、セントロメアタンパク質を集積する基点と成り得ることが示唆された。また、熱耐性試験を用いた構造安定性解析の結果、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームは CENP-A ヌクレオソームより著しく安定であることが明らかとなった。これらのことから、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームは、一度取り込まれたクロマチン領域に安定に保持されて、この領域にセントロメアタンパク質の異常集積を引き起こすことで、先行研究において報告されていたような転写因子の結合阻害の原因となることが考えられた。

4 まとめ

ヒストンバリエントがクロマチンに適切に取り込まれることは、染色体の維持に重要である。しかしヒストンバリエントの発現異常によって引き起こされる発がんやがんの悪性化のメカニズムは明らかになっていなかった。本研究では、CENP-A が過剰発現したがん細胞でみられた特殊なヌクレオソーム“CENP-A/H3.3 ヌクレオソーム”の高純度精製系を確立し、CENP-A/H3.3 の立体構造を初めて明らかにした。

X 線結晶構造解析および生化学的解析によって得られた知見から、CENP-A が過剰発現したがん細胞において不適切な領域に形成される CENP-A/H3.3 ヌクレオソームは、一度取り込まれた領域に安定に保持されて、セントロメアタンパク質の異常集積を引き起こす事が示唆された。このことが、先行研究において報告されていた CENP-A/H3.3 ヌクレオソーム形成による転写因子の結合阻害の原因となり、発がんやがんの悪性化を引き起こすと考えられる。本研究は CENP-A/H3.3 ヌクレオソームによるがん悪性化のメカニズムを構造生物学的解析及び生化学的解析によって提唱した初めての知見である。

謝辞

X 線回折データの収集にあたり、ご協力くださった PF のスタッフの方々に深くお礼申し上げます。

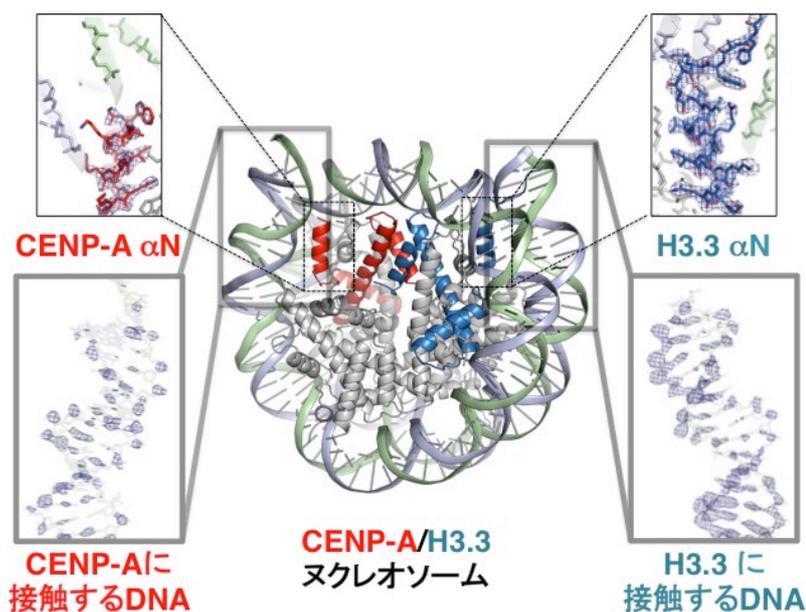
参考文献

- [1] N. Lacoste *et al.*, *Mol. Cell.* **53**:631-644 (2014).
- [2] H. Tachiwana *et al.*, *Nature* **476**, 232-235 (2011).

成果

- 1. Y. Arimura *et al.*, *Scientific Report* **4**:7115 (2014).

* kurumizaka@waseda.jp



(図1)