

クロマチンの動態制御に重要なヒストン
H2A.Z ヌクレオソームの構造解析

**Structural analysis of the H2A.Z
nucleosomes involved in chromatin dynamics**

2014 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

電気・情報生命専攻 構造生物学研究

堀越 直樹

Naoki HORIKOSHI

目次

略語一覧	5
第 1 章 序論	
1-1 真核生物における DNA の核内収納機構	6
1-2 クロマチン構造の動態制御	6
1-3 ヒストンの翻訳後修飾	8
1-4 ヒストンバリエント	10
1-4 ヒストン H2A.Z	11
1-5 本研究について	13
第 2 章 スクレオソームの再構成および溶液構造の解析	
2-1 序	16
2-2 材料と実験方法	
2-2-1 ヒストン H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の精製	16
2-2-2 ヒストン H2A、H2B、H4 の精製	18
2-2-3 ヒストン H3.1 の精製	18
2-2-4 ヒストン 8 量体の再構成	20
2-2-5 DNA の調製	21
2-2-6 スクレオソームの再構成	24
2-2-7 動的光散乱解析によるスクレオソームの分子径の測定	25

2-3 結果と考察

2-3-1 ヒストン H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の精製.....	26
2-3-2 ヒストン H2B、H3.1、H4 の精製.....	28
2-3-3 ヒストン 8 量体の再構成.....	30
2-3-4 DNA の精製.....	30
2-3-5 ヌクレオソームの再構成.....	33
2-3-6 動的光散乱法を用いた H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの分子 径測定.....	35

第 3 章 H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの X 線結晶 構造解析

3-1 序.....	37
3-2 材料と実験方法	
3-2-1 H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの大量調製.....	38
3-2-2 H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの結晶化.....	38
3-2-3 H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの X 線回折実験.....	38
3-2-4 H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの構造精密化.....	39
3-2-5 ヌクレオソームの構造比較.....	40
3-2-6 H2A.Z.1、H2A.Z.2、および H2A の温度因子の比較.....	40
3-3 結果と考察	
3-3-1 H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの大量調製.....	42
3-3-2 H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの結晶化.....	42

3-3-3	H2A.Z.1およびH2A.Z.2を含むヌクレオソームの構造決定	45
3-3-4	H2A.Z.1、H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの構造解析	50
3-3-4-1	H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームと H2A ヌクレオソームとの構造比較	50
3-3-4-2	H2A.Z.1 ヌクレオソームと H2A.Z.2 ヌクレオソームとの構造比較	52

第 4 章 H2A.Z.1、H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの生化学的解析 および細胞生物学的解析

4-1	序.....	56
4-2	材料と実験方法	
4-2-1	H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2Aを含むヌクレオソームを用いた塩耐性試験	56
4-2-2	GFP 融合 H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2A、H2A.Z.1 S38T、H2A.Z.2 T38S を恒常的に発現する HeLa 細胞株の樹立	57
4-2-3	Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP).....	57
4-3	結果と考察	
4-3-1	H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2A を含むヌクレオソームの塩耐性試験	58
4-3-2	GFP-H2A.Z.1、GFP-H2A.Z.2、GFP-H2A の細胞内動態解析	60
4-3-3	GFP-H2A.Z.1 S38T、GFP-H2A.Z.2 T38Sの細胞内動態解析	62

第 5 章 総合討論

5-1	H2A.Z によるクロマチン動態制御	66
5-2	H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の機能差異	68

5-3 今後の展望	70
引用文献.....	72
謝辞	85
研究業績	86

略語一覽

BSA	:	bovine serum albumin
CBB	:	Coomassie Brilliant Blue
DTT	:	dithiothreitol
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid
IPTG	:	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
Ni-NTA	:	nickel-nitrilotriacetic acid
OD	:	optical density
PAGE	:	polyacrylamide gel electrophoresis
PMSF	:	phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
Tris	:	Tris hydroxymethyl aminomethane
PEG	:	polyethylene glycol

第 1 章 序論

1-1. 真核生物における DNA の核内収納機構

遺伝情報を担うヒトゲノム DNA はおよそ 60 億塩基対からなり、その長さは約 2 m にも及ぶ。この DNA が直径 10 μm 程度の細胞核に収納されている。細胞が生存するためには、このような細胞核内環境において DNA の転写、複製、修復、組換えなどのさまざまな DNA 代謝が正確に行われなければならない。真核生物のゲノム DNA は、核内タンパク質と結合し、高次に折り畳まれたクロマチン構造を形成している (1)。細胞核内におけるクロマチン構造には、密に凝集したヘテロクロマチン領域と脱凝縮したユークロマチン領域が存在する (2)。ヘテロクロマチン領域では DNA の転写が抑制され、ユークロマチン領域では活性化されることが知られており、このことからクロマチン構造と DNA 代謝の機能発現制御は密接に関わると考えられる (3,4)。クロマチンの最小機能単位は、4 種類のヒストンタンパク質(H2A、H2B、H3、H4)が 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体に、146 塩基対の DNA が左巻きに 1.65 回転巻き付いたヌクレオソームと呼ばれる円盤状の構造体である (5) (Figure 1)。このヌクレオソームがリンカーDNA によって数珠状につながり、ヌクレオソーム同士が相互作用することで高次クロマチン構造を形成して核内に収納されている。

1-2. クロマチン構造の動態制御

上述したように、真核生物のゲノム DNA は、ヌクレオソームを基本単位とするクロマチン構造を形成して核内に収納されている。近年の報告で、クロマチン構造はおよそ 10^6 塩基対単位でドメインを形成しており、転写をはじめとするさまざまな DNA 代謝が行われる際には、そのドメインのクロマチン高次構造がダイナミックに変動すること

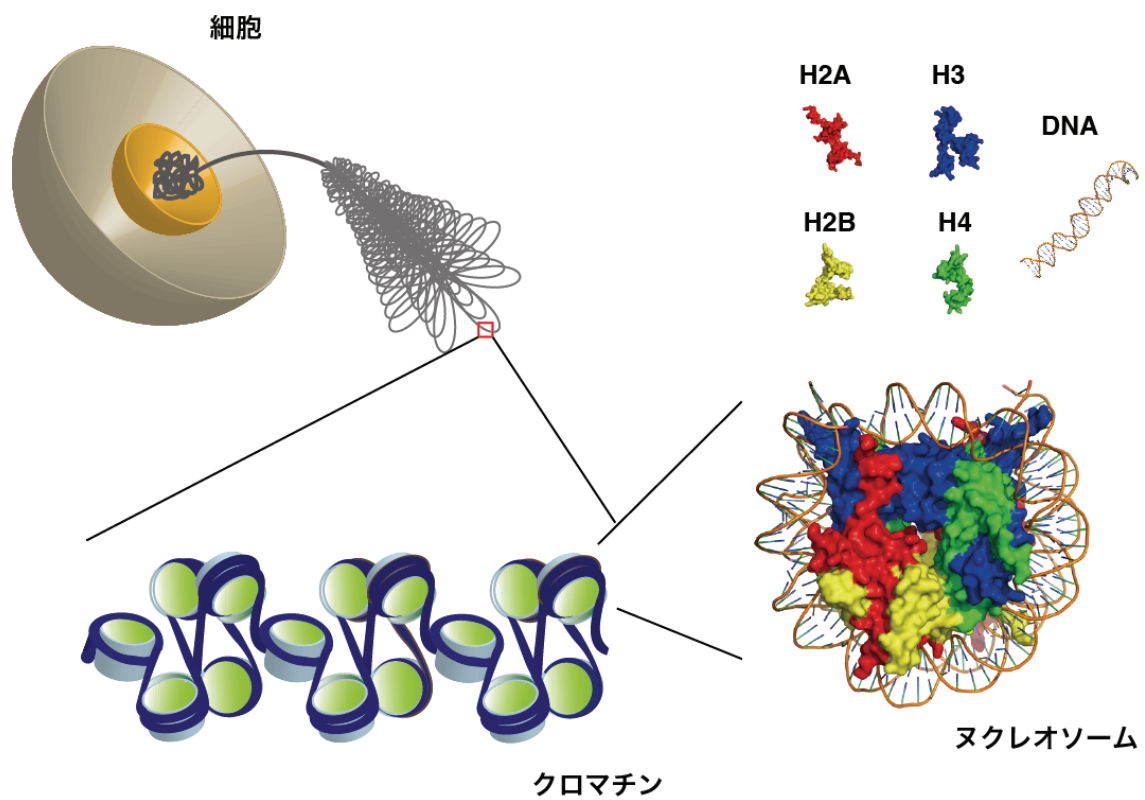


Figure 1. 細胞核内におけるクロマチン構造とヌクレオソーム

細胞核、クロマチン構造、ヌクレオソームおよびヒストンの模式図。ヌクレオソーム構造はヒトヒストンを含むヌクレオソームの立体構造 (PDB code: 3AFA)。

が示唆されている (6)。高次に折り畳まれたクロマチン構造は、DNA の機能発現に対して阻害的に働くため、DNA 代謝が正常に行われるためには、クロマチン構造の動態制御は必要不可欠である。クロマチンの高次構造変化を引き起こす要因として、DNA のメチル化、ヒストンの翻訳後修飾、ヒストンバリエントのクロマチンへの取り込み、ヒストンシャペロン、クロマチンリモデリング複合体などが挙げられる (7-11)。これらの要因は、ヌクレオソームにおけるヒストン-DNA 間の相互作用、ヒストン-ヒストン間の相互作用、さらにはヌクレオソーム-ヌクレオソーム間の相互作用を変化させ、クロマチンの高次構造変動を誘起していると考えられている。近年の技術革新によって、ゲノムワイドでの DNA のメチル化、ヒストンの翻訳後修飾、ヒストンバリエントの局在パターンなどが解析され、これらの要因は協調的に制御されていることが明らかになってきている (12)。このように、クロマチン構造は DNA を核内に収納する静的な役割だけでなく、さまざまな要因によって動的に構造変化し、DNA の機能発現制御を行っていると考えられている。

1-3. ヒストンの翻訳後修飾

クロマチン構造変化の要因のひとつにヒストンの翻訳後修飾がある。すべてのヒストンタンパク質は、N 末端および C 末端に構造を持たない *intrinsic disorder* (ID) 領域と複数の α -helix から構成されるヒストンコア領域から構成されている (Figure 2)。ヒストンの翻訳後修飾には、メチル化、アセチル化、ユビキチン化、SUMO 化、リン酸化、シトルリン化、クロトニル化などが報告されており、その多くは、ID 領域における翻訳後修飾である (8,13-18)。ID 領域への翻訳後修飾は、さまざまな DNA 代謝に関わるタンパク質のクロマチンへの結合や、クロマチン中でのヌクレオソーム-ヌクレオソーム

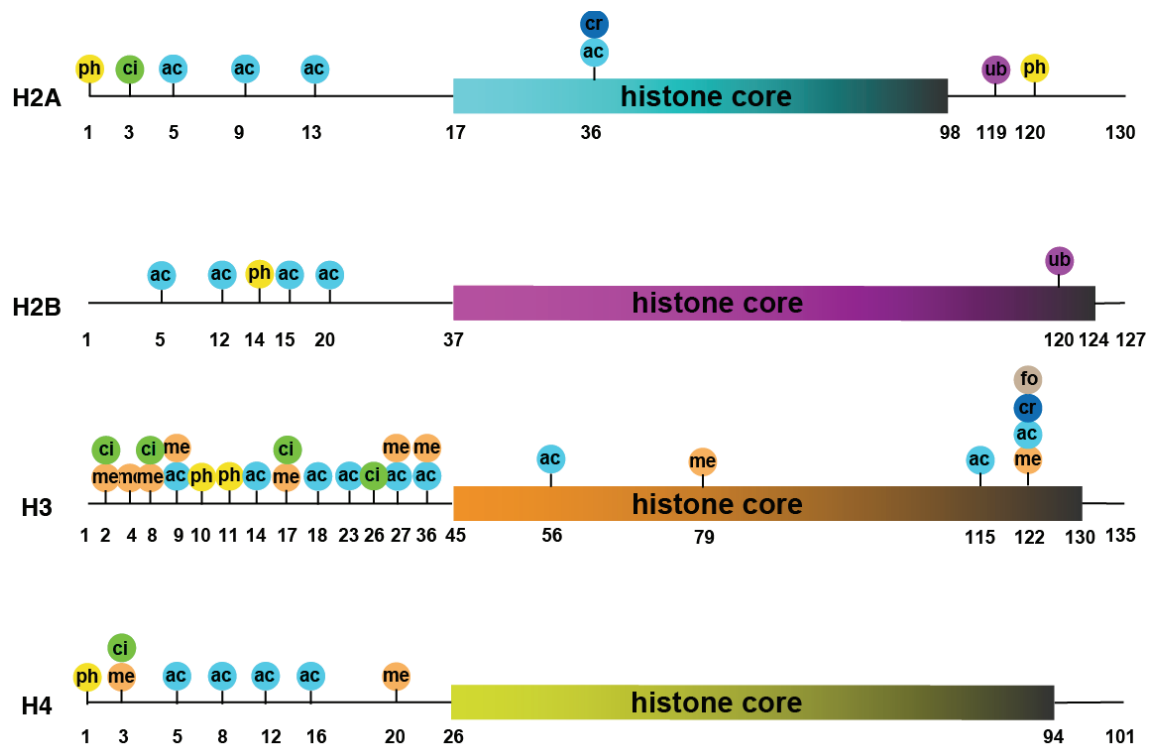


Figure 2. 主なヒストンの翻訳後修飾

ヒストン H2A、H2B、H3、H4 の 1 次構造。各ヒストンは、N 末端および C 末端のテール領域と、ヒストンコア領域から構成される。現在までに報告されているヒストンの翻訳後修飾を示した。

ph: リン酸化、me: メチル化、ac: アセチル化、ci: シトルリン化、fo: ホルミル化、cr: クロトニル化、ub: ユビキチン化。

ム間の相互作用に重要であると考えられており、これまで多くの研究が行われてきた(19-21)。しかし近年の研究によって、ヒストンコア領域における翻訳後修飾が DNA の転写をはじめとするさまざまな DNA 代謝に重要であることが報告された(12,22)。このことから、ヒストンコア領域における翻訳後修飾が直接的にクロマチン構造に影響を及ぼすことが考えられる(23,24)。代表的なヒストンの翻訳後修飾には、ヌクレオソームが密に凝集したヘテロクロマチン形成に深く関与する H3 K9 のメチル化および H3 K27 のメチル化、クロマチンが脱凝縮したユークロマチン形成に関与する H3 K4 メチル化および H3 K9 のアセチル化などがある。さらに、ヒストンバリエントが特異的な翻訳後修飾を受けることが報告されており、非常に複雑な制御によって高次のクロマチン構造が形成され则认为られている(25-27)。このようにヒストンの翻訳後修飾は、クロマチン構造変化や DNA 代謝機構を理解する上で非常に重要であると考えられているため、現在もヒストンの翻訳後修飾に関して多くの研究が行われている。

1-4. ヒストンバリエント

ヌクレオソームに含まれる 4 種類のヒストンのうち H2A、H2B、H3 には、アミノ酸相同性が高く、また遺伝子座が異なるヒストンバリエントが多数存在することが報告されている(28)。現在までにゲノム配列上で発見されているヒトにおけるヒストンバリエントは、H2A バリエントとして H2A type 1-C、H2A type 1-B/E、H2A type 1、H2A type 1-A、H2A type 1-D、H2A type 1-H、H2A.J、H2A.J、H2A type 2-A、H2A type 2-B、H2A type 2-C、H2A type 3、H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2A.X、H2A.B.1、H2A.B.2、macroH2A.1、macroH2A.2、H2B バリエントとして H2B type 1-B、H2B type 1-D、H2B type 1-C/E/F/G/I、H2B type 1-H、H2B type 1-J、H2B type 1-K、H2B type 1-L、

H2B type 1-M、H2B type 1-N、H2B type 1-O、H2B type 2-E、H2B type 2-F、H2B type 3-B、H2B type F-M、TSH2B、H2BFWT、H3 バリエーションとして H3.1、H3.2、H3.3、H3T、H3.5、CENP-A、H3.X、H3.Y などが報告されており、H4 バリエーションは存在しない。細胞内で mRNA が最も発現しているヒストンバリエーションを **conventional histone** として、他のヒストンバリエーションとのアミノ酸相同性を示した (Table 1)。細胞生物学的解析によって、ヒストンバリエーションの組織特異的、あるいは細胞周期依存的な発現やクロマチン上の局在などが明らかになってきている (26,29-31)。具体的には、DNA 複製依存的に発現する H3.1 や H3.2、精巣特異的な TSH2B や H3T、G1 期に発現しセントロメアに局在する CENP-A、遺伝子の転写開始点近傍に多く局在する H2A.Z や H3.3、不活性 X 染色体上に濃縮された macro H2A、DNA 二重鎖切断損傷依存的にリン酸化を受ける H2A.X などが挙げられる。ヒストンバリエーションは特定のクロマチン領域に取り込まれることにより、周辺のクロマチン構造のダイナミクスに重要であると考えられている。しかし、各ヒストンバリエーションによるクロマチン動態制御機構は未だほとんど明らかになっていない。

1-5. ヒストン H2A.Z

ヒストン H2A バリエーションのひとつである H2A.Z は、酵母からヒトまで高度に保存されているヒストンバリエーションである (32)。*Tetrahymena thermophila*、*Mus musculus*、*Drosophilla melanogaster*、および *Xenopus leavis* などにおいて H2A.Z は必須の遺伝子である。*Mus musculus*、*Drosophilla melanogaster*、あるいは *Xenopus leavis* における H2A.Z 遺伝子を破壊すると、発生過程での異常によって致死となる (33-35)。一方、*Saccharomyces cerevisiae* や *Schizosaccharomyces pombe* において H2A.Z 遺伝

Table 1. ヒトにおけるヒストンバリエーション

Histone variant	Homology to conventional histone
H2A type 1-C	-
H2A type 1-B/E	99%
H2A type 1	99%
H2A type 1-A	94%
H2A type 1-D	99%
H2A type 1-H	99%
H2A.J	93%
H2A.j	96%
H2A type 2-A	98%
H2A type 2-B	95%
H2A type 2-C	97%
H2A type 3	99%
H2A.Z.1	64%
H2A.Z.2	64%
H2A.X	94%
H2A.B.1	48%
H2A.B.2	48%
macroH2A.1	31%
macroH2A.2	31%
H2B type 1-K	-
H2B type 1-B	97%
H2B type 1-C/E/F/G/I	99%
H2B type 1-D	98%
H2B type 1-H	98%
H2B type 1-J	99%
H2B type 1-L	98%
H2B type 1-M	96%
H2B type 1-N	98%
H2B type 1-O	98%
H2B type 2-E	98%
H2B type 2-F	92%
H2B type 3-B	94%
H2B type F-M	34%
H2BFWT	46%
TSH2B	85%
H3.1	-
H3.2	99%
H3.3	96%
H3T	97%
H3.5	93%
CENP-A	50%
H3.X	79%
H3.Y	79%
H4	-

子を破壊すると、野生型と比較して細胞の増殖速度が低下するものの、細胞死には至らない (36,37)。このことは、H2A.Z が生物種によって異なる機能を有することを示唆している (38)。ヒトや酵母においては、H2A.Z (Htz1)が遺伝子の転写開始点近傍に多く局在することが報告されている (39-44)。このことから、H2A.Z が遺伝子発現制御に関わっていることは示唆されているが、遺伝子発現制御における H2A.Z の役割は全く明らかになっていない。また、H2A.Z は DNA 損傷に応答して損傷部位に集積することも報告されている (45,46)。さらに、H2A.Z は発生初期において必須の因子であることも報告されている (47)。このように、さまざまな細胞内の過程において H2A.Z は重要な機能を果たしている。

また、脊椎動物において *H2A.Z* 遺伝子には isoform として *H2A.Z.1 (H2AFZ)*、*H2A.Z.2 (H2AFV)*が存在することが報告されている(35)。ヒト H2A.Z.1 と H2A.Z.2 は 3 アミノ酸異なり、細胞生物学的解析から H2A.Z.1 と H2A.Z.2 は、アセチル化修飾の違いがあることが示唆されている (48)。さらに、H2A.Z.2 にはスプライシングバリエントとして、H2A.Z.2.1、H2A.Z.2.2、H2A.Z.2.3、H2A.Z.2.4、H2A.Z.2.5 が存在する (49,50)。また、H2A.Z.1 の遺伝子を破壊した細胞核をマウスの初期胚に導入すると、胚性致死となることが報告されている(35)。このことは、H2A.Z.1 の機能を H2A.Z.2 が相補しないということを示しており、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 は異なる機能を有することが示唆されるが、それらの機能の違いは全く明らかになっていない。

1-6. 本研究について

近年の研究によって、H2A.Z が DNA の転写や修復など、さまざまな DNA 代謝に関わる重要なヒストンバリエントであることが示されている。H2A.Z がクロマチンに取

り込まれることでクロマチン構造変化が誘起され、DNA の機能発現が制御されていると考えられているが、H2A.Z によるクロマチンの動態制御機構は全く明らかになっていない。また、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 がそれぞれどのような機能を有するかについても明らかになっていない。本研究では、クロマチン動態制御における H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の機能発現基盤を明らかにするために、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの立体構造の解明、および物理的性質を解析することを研究目的とした。これらの解析結果から、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームによるクロマチンの動態制御機構について考察した。

本論文における各章の要約を以下に示す。第二章では、まず各ヒストンの精製方法、精製したヒストンを用いたヒストン複合体の再構成方法、DNA の精製方法、ヒストン 8 量体と DNA を用いたヌクレオソームの再構成方法について述べた。さらに、再構成した H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームを用いて、溶液状態での構造を解析した。

第三章では、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの結晶化、および X 線結晶構造解析を行った。構造解析の結果明らかになった、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の構造的特徴について詳細に記述した。

第四章では、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの生化学的解析、および生細胞における H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の動態解析を行った。生化学的解析の結果、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの構造安定性が、H2A を含むヌクレオソームよりも低いことが明らかになった。また、細胞内動態について解析した結果、H2A.Z.1 は H2A.Z.2 よりも細胞内動態が早いことが明らかになった。さらに、点変異体を用いた動態解析によって、X 線結晶構造解析から明らかとなった H2A.Z.1 と

H2A.Z.2 の構造差異が、細胞内動態における H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の違いの原因であることを明らかにした。

第五章では、第三章、第四章で示した研究結果を総括し、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームによるクロマチン動態制御機構、および H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の機能差異について考察した。

2 章 ヌクレオソームの再構成および溶液構造の解析

2-1. 序

ヒト H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの機能構造解析をするためには、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームを高純度に調製する必要がある。これまで行われてきたヌクレオソーム調製の多くは、細胞核内からヌクレオソームを単離する手法で行われてきた。しかし、細胞核内に含まれるヌクレオソームには、さまざまなヒストンバリエントや翻訳後修飾を受けたヒストンを含むヌクレオソームが混在しており、その中から目的のヒストンを含むヌクレオソームのみを単離精製するのは非常に困難である。

そこで本研究では、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質として精製した、ヒトのヒストンタンパク質を用いてヌクレオソームを再構成した。本章では、ヌクレオソームの試験管内再構成法について記述し、さらに再構成したヌクレオソームの溶液状態での構造について解析した。

2-2. 材料と実験方法

2-2-1. ヒストン H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の精製

ヒストン H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の精製は、我々の先行論文 (51)を参考にした。まず H2A.Z.1 および H2A.Z.2 遺伝子を含むプラスミド pH2A.Z.1、pH2A.Z.2 を大腸菌株 BL21 (DE3)に導入した。pH2A.Z.1 および pH2A.Z.2 は、H2A.Z.1 遺伝子および H2A.Z.2 遺伝子上流に hexa-histidine tag (His-tag) および Thrombin protease 認識配列が付加されており、ampicillin 耐性マーカーを有する。BL21 (DE3)とプラスミドを混合し氷上で30 分間静置した。その後、42°Cで 45 秒間静置し、SOC 培地 (tripton, yeast extract,

NaCl, MgCl₂, MgSO₄, glucose)を加え回復培養を行った。回復培養後、100 µg/ml の ampicillin を含む LB 寒天培地に植菌し、37℃で一晩静置した。pH2A.Z.1 および pH2A.Z.2が導入された大腸菌のコロニーを5 LのLB培地に植菌し、最終濃度 50 µg/ml の ampicillin 存在下にて 37℃で約 24 時間振盪培養した。次に培養した大腸菌を 6,810 ×*g*で4℃にて10分間遠心することで分離した。集菌した大腸菌を 50 ml の buffer A [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 1 mM PMSF, 5% glycerol]に懸濁し、超音波式ホモジナイザー VP-30S (TAITEC)を用いて超音波破碎を行った。超音波破碎後、サンプルを 39,191×*g*で4℃にて15分間遠心分離した。分離した沈殿物を buffer B [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 7 M guanidine hydrochloride, 5% glycerol]に溶解し、変性条件下で超音波破碎を行った。サンプルを 4℃で一晩ゆっくりと混合させることで封入体に変性し、ヒストンが可溶化した。次に、39,191×*g*で15分間遠心分離し、上清を 2 ml の Ni-NTA agarose (Qiagen)と混合して、4℃で1時間ゆっくりと混合させることで、Ni-NTA agarose に hexa-histidine tag 融合 H2A.Z.1 (His-H2A.Z.1)および H2A.Z.2 (His-H2A.Z.2)を結合させた。サンプルを 1,000×*g*で4℃にて10分間遠心分離した後、エコノカラム (Bio-Rad)に充填した。カラムに充填した Ni-NTA agarose を流速 1 ml/min で 100 ml の buffer C [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 5% glycerol, 5 mM imidazole]で洗浄した後、50 ml ずつの buffer C および buffer D [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 5% glycerol, 500 mM imidazole]を用いて、5～500 mM imidazole の直線的な濃度勾配により His-H2A.Z.1 および His-H2A.Z.2 を溶出した。His-H2A.Z.1 および His-H2A.Z.2 の溶出画分を 16% SDS-PAGE により分析した。His-H2A.Z.1 および His-H2A.Z.2 を含む画分を回収し、3 L の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer に対して透析した。透析後、サンプルの濃度測定を行い、1 mg のサン

プルに対して 1 unit の Thrombin protease (Roche)を加え、室温で 3 時間ゆっくりと混合させながら His-tag を切断した。その後、16% SDS-PAGE によって His-tag の切断を確認した。さらに Mono S 10/100 カラムクロマトグラフィー (GE Healthcare Life Sciences)によって精製を行った。まず、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer に溶解した H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を Mono S カラムに吸着させ、10 ml の buffer E [20 mM sodium acetate (pH 5.2), 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol]で洗浄し、80 ml ずつの buffer E と buffer F [20 mM sodium acetate (pH 5.2), 0.8 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol]を用いて、200~800 mM NaCl の直線的な濃度勾配により H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を溶出した。H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の溶出画分を 16% SDS-PAGE により分析した。H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含む画分を回収し、3 L の超純水に対して 4 回透析後、凍結乾燥を行った。

2-2-2. ヒストン H2A、H2B、H4 の精製

H2A、H2B の遺伝子を含むプラスミド pH2A、pH2B を大腸菌株 BL21 (DE3)に導入した。また、H4 の遺伝子を含むプラスミド pH4 を大腸菌株 JM109 (DE3)に導入した。pH2A、pH2B、pH4 は、遺伝子上流に hexa-histidine tag (His-tag)および Thrombin protease 認識配列が付加されており、ampicillin 耐性マーカーを有する。大腸菌へのプラスミド導入からタンパク質精製は、2-2-1 に記した H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の精製方法と同様の方法で行った。

2-2-3. ヒストン H3.1 の精製

まず、H3.1 の遺伝子を含むプラスミド pH3.1 を大腸菌株 BL21 (DE3)に導入した。

BL21 (DE3)とプラスミドを混合し氷上で30 分間静置した。その後、42℃で 45 秒間静置し、SOC 培地を加え回復培養を行った。回復培養後、100 $\mu\text{g/ml}$ の ampicillin を含む LB 寒天培地に植菌し、37℃で一晩静置した。pH2A.Z.1 および pH2A.Z.2 が導入された大腸菌のコロニーを 5 L の LB 培地に植菌し、最終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ の ampicillin 存在下にて 37℃で約 24 時間振盪培養した。次に培養した大腸菌を $6,810\times g$ 、4℃で 10 分間遠心することで分離した。集菌した大腸菌を 50 ml の buffer A [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 1 mM PMSF, 5% glycerol]に懸濁し、超音波式ホモジナイザー VP-30S (TAITEC)を用いて超音波破碎を行った。超音波破碎後、サンプルを $39,191\times g$ で 15 分間遠心分離した。大腸菌内でヒストンを発現させると、ヒストンは大腸菌によって封入体と呼ばれる凝集体となり沈殿する。沈殿物に対して 50 ml の buffer A を加え溶解し、超音波破碎を行うことで沈殿物に含まれる大腸菌由来の可溶性タンパクをさらに可溶化した。超音波破碎後、サンプルを $39,191\times g$ 、4℃で 15 分間遠心分離した。分離した沈殿物を buffer B [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 7M guanidine hydrochloride, 5% glycerol]に溶解し、変性条件下で超音波破碎を行った。サンプルを 4℃で一晩ゆっくりと混合させることで封入体の変性し、ヒストンが可溶化した。次に、 $39,191\times g$ で 15 分間遠心分離し、上清を Ni-NTA agarose (Qiagen)と混合して、4℃で 1 時間ゆっくりと混合させることで、Ni-NTA agarose に hexa-histidine tag 融合 H3.1 (His-H3.1)を結合させた。サンプルを $1,000\times g$ 、4℃で 10 分間遠心分離した後、エコノカラム (Bio-Rad)に充填した。流速 1 ml/min で buffer C [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 5% glycerol, 5 mM imidazole]で洗浄した後、buffer C および buffer D [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 5% glycerol, 500 mM imidazole]を用いて、5～500 mM imidazole の直線的な濃度勾配により His-H3.1 を溶出した。His-H3.1 の溶出

画分を 16% SDS-PAGE により分析した。His-H3.1 を含む画分を回収し、3 L の buffer G [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM 2-mercaptoethanol] に対して透析した。ヒストン H3.1 を構成するアミノ酸には cysteine が含まれ、H3.1 がジスルフィド結合によって自己会合してしまう。そこで還元剤を加えることで、ジスルフィド結合形成を阻害した。透析後、サンプルの濃度測定を行い、1 mg のサンプルに対して 1 unit の Thrombin protease (Roche)を加え、室温で 3 時間ゆっくりと混合させて His-tag を切断した。その後、16% SDS-PAGE によって His-tag の切断を確認した。さらに Mono S 10/100 カラムクロマトグラフィー (GE Healthcare Life Sciences)によって精製を行った。まず、buffer G に溶解した H3.1 を Mono S カラムに吸着させ、buffer E [20 mM sodium acetate (pH 5.2), 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol]で洗浄し、buffer E と buffer F [20 mM sodium acetate (pH 5.2), 0.8 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol]を用いて、200~800 mM NaCl の直線的な濃度勾配により H3.1 を溶出した。H3.1 の溶出画分を 16% SDS-PAGE により分析した。H3.1 を含む画分を回収し、3 L の 2 mM 2-mercaptoethanol に対して 4 回透析後、凍結乾燥を行った。

2-2-4. ヒストン 8 量体の再構成

精製したヒストン H2B、H3.1、H4 および H2A.Z.1 あるいは H2A.Z.2 を等モル比で混合し、ヒストンタンパク質の最終濃度が 1.5 mg/ml になるように Unfolding buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7 M guanidine hydrochloride, 20 mM 2-mercaptoethanol]を加え、4℃で 90 分間ゆっくりと混合させることでヒストンを変性させた (52)。次に、サンプルを 500 ml の refolding buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 M NaCl, 1

mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol]に対して4時間以上の透析を4回行った。その後、サンプルを HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences)ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて分画し、各画分を 16% SDS-PAGE により分析した。H2A、H2A.Z.1、あるいは H2A.Z.2 と、H2B、H3.1、H4 のバンド強度がおおよそ 1:1:1:1 となっているフラクションを回収し、Amicon Ultra 4 [molecular weight cut off (MWCO) : 30 kDa] (Millipore)を用いた限外ろ過によって濃縮し、4℃で保存した。

2-2-5. DNA の調製

ヌクレオソームの再構成に用いた DNA は、ヒトのセントロメア領域に見られるリピート配列である α -satellite DNA の一部を改変した 146 塩基対の回文配列である (5)。回文配列の半分に当たる 73 塩基対の DNA がタンデムに 16 個挿入された、pNUC146 プラスミドを大腸菌株 DH5 α に導入した。pNUC146 は、73 塩基対の直下に EcoRI site と、この上流および下流に EcoRV site が挿入されている。DH5 α と pNUC146 を混合し、氷上で30分間静置した。その後、42℃で45秒間静置し、100 μ g/ml の ampicillin を含む LB 寒天培地に植菌し、37℃で一晩静置した。形成されたコロニーのうち1つを回収し、5 ml の TB 培地 (tripton, yeast extract, glycerol, NaCl)で 37℃、3 時間振盪培養した。その後、100 ml の 2 \times TY 培地 (tripton, yeast extract, NaCl)に植菌し、37℃で4時間培養した。菌体を 1,580 $\times g$ で 10 分間遠心することで集菌し、20 ml の LB 培地で洗浄した後、8 L の TB 培地に植菌して、37℃で一晩振盪培養した。培養した大腸菌を 6,810 $\times g$ 、4℃で 10 分間遠心することで分離した。360 ml のアルカリ溶液 1 [25 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM glucose, 10 mM EDTA]を加え懸濁し、720 ml のアルカリ溶液 2 [0.2 N NaOH, 1% (W/V) SDS]を加えゆっくりと混合した後、20 分間氷上で静

置した。次に 1,260 ml のアルカリ溶液 3 [4 M potassium acetate, 2 N acetic acid]を加え激しく混合し、氷上で 20 分間静置した。その後、 $6,810 \times g$ 、 4°C で 10 分間遠心分離し、上清に対して 1,200 ml の 2-propanol を加え激しく混合した。室温で 1 時間静置した後、 4°C で $6,810 \times g$ 、30 分間遠心分離し、沈殿物を 1～2 時間自然乾燥させた後、20 ml の $\text{TE}_{10/50}$ [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0)]、および 13 mg の RNase を加え、 37°C で一晩静置した。翌日、総量 80 ml になるように $\text{TE}_{10/50}$ を加え激しく混合した後、 4°C で $4,670 \times g$ 、10 分間遠心分離した。上清に対して、40 ml の phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1)を加え激しく混合し、 4°C で $4,670 \times g$ 、10 分間遠心分離した。これを 4 回繰り返した後に、上清に対して 40 ml の chloroform: isoamyl alcohol (24: 1)を加え激しく混合し、 4°C で $4,670 \times g$ 、10 分間遠心分離した。上清に対して 12.4 ml の 5 M NaCl、30.8 ml の 40% polyethylene glycol 6000 (PEG 6000)を加え激しく混合した後、氷上で 30 分間静置し、 4°C にて $39,191 \times g$ で 20 分間遠心分離した (53)。沈殿物を 30 分間真空乾燥させ、20 ml の $\text{TE}_{10/0.1}$ [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA (pH 8.0)]に溶解した。サンプルの濃度測定を行い、EcoRV site の分子数を算出した。DNA の濃度は、光路長 1 cm のセルで測定した際に、波長 260 nm の吸光度が 1.0 であるとき 50 ng/ μl に相当する。1 nmol の EcoRV site に対して 15 unit の EcoRV を加え、 37°C で一晩静置した。EcoRV によって目的断片が切断されていることを確認するために、サンプルを 6%非変性ポリアクリルアミドゲルにより、 $0.2 \times \text{TBE}$ buffer [18 mM Tris, 18 mM boric acid, 0.4 mM EDTA]中で 150 V の条件下で 35 分間電気泳動することで分離した (以降、native-PAGE と記す)。プラスミドから目的断片が切断されていることを確認した後、ベクターDNA を除くために PEG 沈殿法を用いた。PEG 沈殿法は、polyethylene glycol の濃度依存的に、サイズの大きい DNA から

沈殿するという原理を用いた DNA の分離方法である (53)。25 ml のサンプルに対して、8.1 ml の 40% PEG 6000 と 5.5 ml の 5 M NaCl を加え激しく混合し、4℃にて $4,670 \times g$ で 10 分間遠心分離した。上清に対して、4 ml の 40% PEG 6000 を加え激しく混合し、4℃にて $4,670 \times g$ で 10 分間遠心分離した。上清を 6% native-PAGE により分析し、サンプルからベクター DNA が除かれていることを確認した。サンプルに対して、2.5 倍量の 100% ethanol、0.1 倍量の 3 M sodium acetate (pH 5.2) を加え激しく混合した後、氷上で 30 分間静置した。サンプルを 4℃にて $39,191 \times g$ で 30 分間遠心分離した。沈殿物に対して 80 ml の 70% ethanol を加え、4℃にて $39,191 \times g$ で 30 分間遠心分離した。沈殿物を 30 分間真空乾燥させ、8 ml の TE_{10/0.1} に溶解した。サンプルの濃度測定を行い、DNA 断片の分子数を算出した。1 nmol の DNA 断片に対して 2 unit の alkaline phosphatase (CIAP) を加え、37℃で一晩静置した。次に、CIAP 処理により DNA の末端が脱リン酸化されたことを確認するために、500 倍希釈したサンプル 10 μ l に 5 μ l の ligation high 溶液 (TOYOBO) を加え、16℃にて 2 時間静置した後、6% native-PAGE で分析した。サンプルに含まれる CIAP を不活化するために、100 μ l の 0.5 M EDTA を加え、65℃にて 30 分間静置した。その後、10 ml の phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) を加え激しく混合し、4℃で $4,670 \times g$ 、10 分間遠心分離した。次に上清に対して 10 ml の chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) を加え激しく混合し、4℃で $4,670 \times g$ 、10 分間遠心分離した。上清に対して、2.5 倍量の 100% ethanol、0.1 倍量の 3 M sodium acetate (pH 5.2) を加え激しく混合した後、氷上で 30 分間静置した。サンプルを 4℃にて $39,191 \times g$ で 30 分間遠心分離した。沈殿物に対して 80 ml の 70% ethanol を加え、4℃にて $39,191 \times g$ で 30 分間遠心分離した。沈殿物を 30 分間真空乾燥させ、8 ml の TE_{10/0.1} に溶解した。サンプルの濃度測定を行い、DNA 断片の分子数

を算出した。1 nmol の DNA 断片に対して 25 unit の EcoRI を加え、37°Cで一晩静置した。EcoRI による DNA の切断を 6% native-PAGE により確認した。その後、EcoRI によって切断された目的 DNA 断片と 12 塩基対の断片を分離精製するために、分取泳動装置 Prep Cell (Bio-Rad)を用いて精製した。まず、サンプルを Amicon Ultra 15 [MWCO: 10kDa]を用いて 1 ml まで限外ろ過による濃縮を行った後、10%非変性ポリアクリルアミドゲルにより、0.5×TBE buffer [45 mM Tris, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA]中で 10 W の条件下で Prep Cell を用いて精製した。サンプルは、TE_{10/0.1}を用いて流速 1.5 ml/min で溶出した。溶出したサンプルを 6% native-PAGE により分析し、目的の DNA 断片を含む画分を回収した。回収したサンプルを Amicon Ultra 15 [MWCO: 10 kDa]を用いて 8 ml まで限外ろ過による濃縮を行った。サンプルの濃度測定を行い、DNA 断片の分子数を算出した。1 nmol の DNA 断片に対して 1 unit の T4 ligase を加え、16°Cで一晩静置した。ライゲーションによって 146 塩基対の DNA 断片が形成されていることを 6% native-PAGE により確認した。その後、サンプルを DEAE カラムクロマトグラフィー (TOSOH)によって精製した。サンプルを DEAE カラムに吸着させ、10 ml の TE_{10/0.1} で洗浄後、0~600 mM NaCl の直線的濃度勾配により 146 塩基対の DNA 断片を溶出した。溶出したサンプルを 6% native-PAGE により分析し、146 塩基対の DNA 断片を含む画分を回収した。回収したサンプルを Amicon Ultra 15 [MWCO: 10 kDa]を用いて、8 ml まで限外ろ過によって濃縮し、最終精製物とした。

2-2-6. ヌクレオソームの再構成

再構成したヒストン 8 量体と 146 塩基対のヌクレオソーム用 DNA を用いて、2 M KCl 存在下で DNA の最終濃度が 0.8 mg/ml、かつヒストン 8 量体と DNA が 1.3 : 1 の比

になるように混合した。混合物を 400 ml の reconstitution high buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2 M KCl, 1 mM dithiothreitol] に対して透析し、1,600 ml の reconstitution low buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.25 M KCl, 1 mM dithiothreitol] を 0.8 ml/min の流速で攪拌しながら加え、同時に 0.8 ml/min の流速で溶液を排出した。この方法によって、徐々に透析外液の KCl 濃度を低下させることで、塩透析法によりヌクレオソームを再構成した (52)。再構成されたサンプル中には、ヒストンと DNA が非特異的に結合しているものが含まれる。この非特異的結合を解消するために 55°C で 2 時間静置した。その後、6% 非変性ポリアクリルアミドゲルにより、0.2×TBE buffer 中で 10 W の条件下で Prep Cell を用いて精製した。サンプルは、TCS (EDTA free) buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT] を用いて流速 1.5 ml/min で溶出した。溶出したサンプルを 6% native-PAGE により分析し、ヌクレオソームを含む画分を回収した。回収したサンプルを Amicon Ultra 4 [MWCO: 30 kDa] を用いて、100 µl まで限外ろ過によって濃縮し、最終精製物とした。

2-2-7. 動的光散乱解析によるヌクレオソームの分子径の測定

再構成した H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの分子径の測定を行うために Zetasizer Nano µV (Malvern) を用いた動的光散乱解析を行った。まず、0.6 mg/ml に調製した 5 µl の H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2A を含むヌクレオソームを 2,990 ×g で 10 分間、4°C で遠心した。各サンプル溶液のうち、3 µl を溶液上方から分取し、Zetasizer Nano µV によって 20°C で分子径の測定を行った。各ヌクレオソームについて 70~90 回の測定を行い、標準偏差を算出した。

2-3. 結果と考察

2-3-1. ヒストン H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の精製

ヒト H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの解析を行うにあたって、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質として発現、および精製を行った (Figure 3A)。まず、大腸菌 BL21 (DE3) で発現させた His-tag 融合ヒストン H2A.Z.1 (His-H2A.Z.1) および H2A.Z.2 (His-H2A.Z.2) を、変性条件下で Ni-NTA agarose カラムクロマトグラフィーによって粗精製した。溶出したサンプルを 16% SDS-PAGE により分析した (Figure 3B)。His-H2A.Z.1 の分子量は 15,716 Da であるが、実際の電気泳動度から算出される推定の分子量は 16,089 Da である、実際の分子量とわずかに異なることが分かった (Figure 3B)。SDS-PAGE において、タンパク質は陰イオン系界面活性剤である SDS によって変性し、さらに SDS がタンパク質表面にミセルを形成することでタンパク質は負に帯電する。これによって、タンパク質は正方向に電気泳動される。しかしタンパク質の等電点によっては、タンパク質の分子量と実際の電気泳動度が異なる場合がある。His-H2A.Z.1 の等電点は 10.73 である。このように、His-H2A.Z.1 は塩基性タンパク質であるため、正方向への電気泳動が阻害され、分子量と実際の電気泳動度が異なると考えられた。

次に His-H2A.Z.1 および His-H2A.Z.2 に含まれる His-tag を切断した。タンパク質の機能解析を行う上で、His-tag がそのタンパク質の活性に影響を与える場合があるためである。そこで、His-H2A.Z.1 および His-H2A.Z.2 に Thrombin protease (GE Healthcare Life Sciences) を加え、His-tag を切断した。His-tag が切断されていることを 16% SDS-PAGE によって分析した。その結果、Thrombin 添加前後においてバン

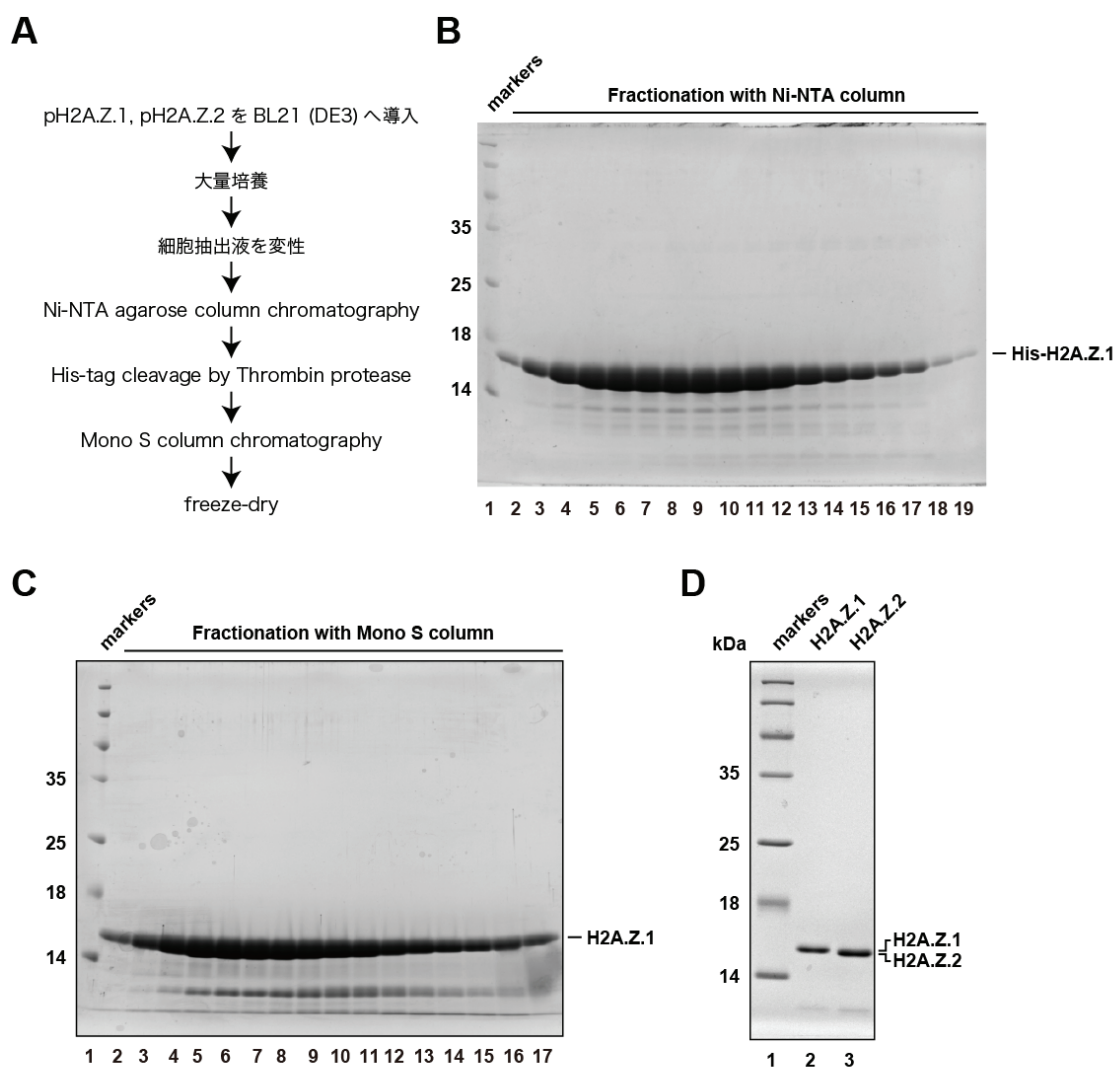


Figure 3. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の精製

(A) H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の精製過程。(B) His-H2A.Z.1 の Ni-NTA agarose column chromatography の結果。(C) H2A.Z.1 の Mono S column chromatography の結果。(D) H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の最終精製物を 16% SDS-PAGE で解析した。電気泳動後、ゲルを CBB で染色した。

ドシフトが観察されることから His-tag が切断されていることが確認された。さらに H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を精製するために Mono S カラムクロマトグラフィーを行った。Mono S カラムクロマトグラフィーによって分画したサンプルを 16% SDS-PAGE により分析した (Figure 3C)。分析の結果から、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を高純度を含む画分を回収することに成功し、これらを最終精製物とした (Figure 3D)。

2-3-2. ヒストン H2B、H3.1、H4 の精製

ヌクレオソームを再構成するに当たって、4 種類のヒストン (H2A.Z、H2B、H3、H4) が必要となる。そこでヒストン H2B、H3.1、H4 の精製を行った。まず、大腸菌で発現させた His-tag 融合ヒストン H2B (His-H2B)、H3.1 (His-H3.1)、および H4 (His-H4) を、変性条件下で Ni-NTA agarose カラムクロマトグラフィーによって粗精製した。溶出したサンプルを 16% SDS-PAGE により解析した。His-H2B、His-H3.1、および His-H4 の分子量もまた実際の電気泳動度と異なることが分かり、その原因は His-H2A.Z.1 および His-H2A.Z.2 と同様であると考えられた。次に His-H2B、His-H3.1、および His-H4 に含まれる His-tag を Thrombin protease によって切断した。His-tag が切断されていることを 16% SDS-PAGE によって解析した。解析の結果、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 と同様に Thrombin 添加前後においてバンドシフトが観察されることから、His-tag が切断されていることが確認された。さらに H2B、H3.1、および H4 を精製するために Mono S カラムクロマトグラフィーを行った。Mono S カラムクロマトグラフィーによって分画したサンプルを 16% SDS-PAGE により解析した。この結果から、H2B、H3.1、および H4 を高純度を含む画分を回収することに成功した (Figure 4)。

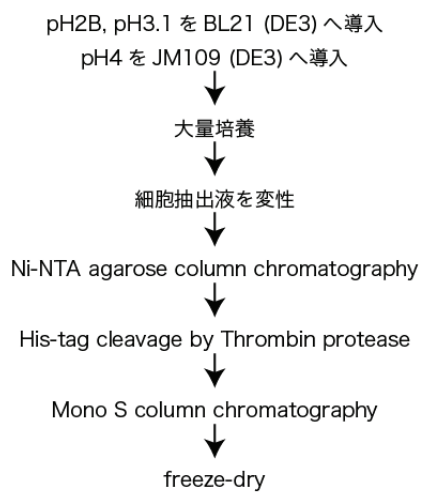
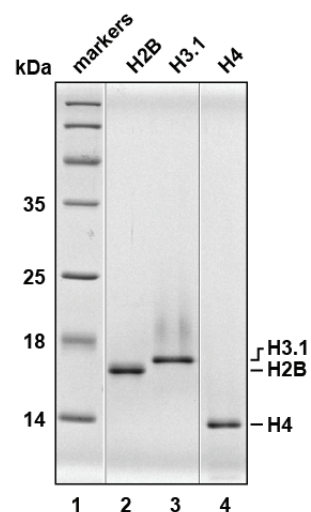
A**B**

Figure 4. ヒストン H2B、H3.1、H4 の精製

(A) H2B、H3.1、および H4 の精製法の模式図。(B) H2B、H3.1、および H4 の最終精製物を 16% SDS-PAGE で解析した。電気泳動後、ゲルを CBB で染色した。

2-3-3. ヒストン 8 量体の再構成

ヌクレオソームに含まれる各ヒストンは、2 分子の H2A/H2B ヘテロ 2 量体と 1 分子の H3.1/H4 ヘテロ 4 量体から構成されるヒストン 8 量体を形成している。ヒストン 8 量体を試験管内で再構成するにあたって、精製した各ヒストン H2B、H3.1、および H4 と H2A.Z.1、あるいは H2A.Z.2 を等モル比で混合した。再構成したサンプル中にはヒストン 8 量体の他に、H2A/H2B ヘテロ 2 量体や H3.1/H4 ヘテロ 4 量体などが含まれる。このサンプルからヒストン 8 量体を精製するために、HiLoad 16/60 Superdex 200 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて精製を行った。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって分画したサンプルを 16% SDS-PAGE によって解析した。解析の結果、各ヒストン 8 量体には、ヒストン H2B、H3.1、H4、および H2A.Z.1 あるいは H2A.Z.2 が 1:1:1:1 の割合で含まれていることが確認された (Figure 5B)。

2-3-4. DNA の精製

ヌクレオソーム再構成に用いた 146 塩基対の DNA は、ヒトの α -satellite DNA 由来の 73 塩基対が 2 分子結合した回文配列となっている (Figure 6A)。この 73 塩基対を含む cassette sequence が 24 個挿入されたプラスミド pNUC146 を導入した大腸菌を培養し、アルカリ法を用いて大量の pNUC146 を精製した (Figure 6B-D)。精製した pNUC146 を EcoRV (TaKaRa) で切断することで、73 塩基対を含む断片が得られた (Figure 6E lane2)。ベクターDNA を除去するために、2 段階の濃度の polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) (Nacalai Tesque) を用いて PEG 沈殿を行った。6% native-PAGE によって解析した結果、95% 以上のベクターDNA が除去されることが分かった (Figure 6E lane 3, 4)。1 段階目および 2 段階目の PEG 6000 の濃度は、それぞれ

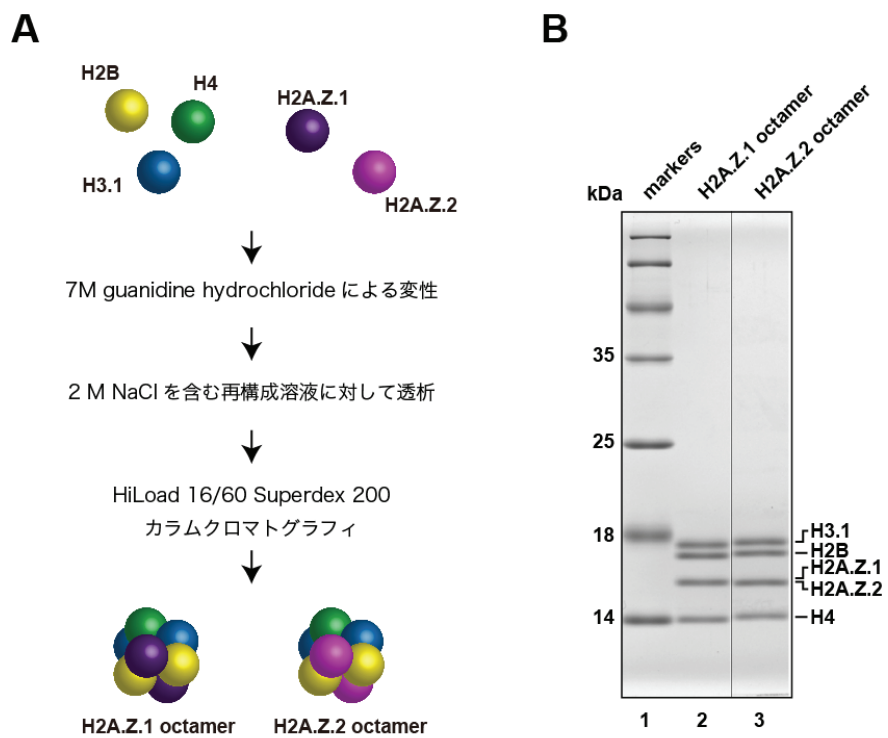


Figure 5. ヒストン 8 量体の再構成

(A) ヒストン 8 量体の試験管内再構成の模式図。(B) 再構成した H2A.Z.1 あるいは、H2A.Z.2 を含むヒストン 8 量体を 16% SDS-PAGE で解析した。電気泳動後、CBB を用いて染色した。

A

5'-ATCAATATCC ACCTGCAGAT TCTACCAAAA GTGTATTTGG AACTGCTCC ATCAAAAGGC ATGTTGAGCT GAATTCAGCT
3'-TAGTTATAGG TGGACGTCTA AGATGGTTTT CACATAAACC TTTGACGAGG TAGTTTTCCG TACAAGTCGA CTTAAGTCGA

GAACATGCCT TTTGATGGAG CAGTTTCCAA ATACACTTTT GGTAGAATCT GCAGGTGGAT ATTGAT-3'
CTTGTACGGA AACTACCTC GTCAAAGGTT TATGTGAAAA CCATCTTAGA CGTCCACCTA TAACTA-5'

B

cassette seuquence

5'-GGTACCAAGATCTGATATCATCAATATCCACCTGCAGATTCTACCAAAAGTGTATTGGAAGTCTCTCC
3'-CCATGGTTCTAGACTATAGTTATAGGTGGACGCTAAGATGGTTTTCACATAAACCTTTGACGAGGAGG

KpnI BglII EcoRV

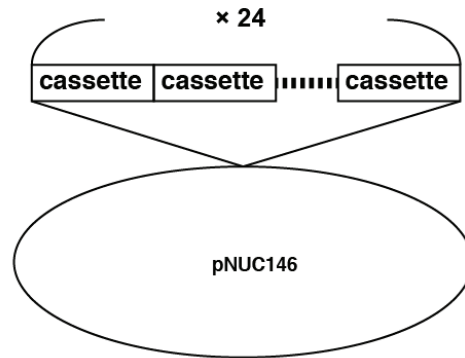
ATCAAAAGGCATGTTTCTAGCTGAATTCATGCGGGCCCTGATATCGGATCC-3'
TAGTTTTCCGTACAAGTCGACTTAAGTACGCCCCGGACTATAGCCTAGG-5'

EcoRI EcoRV BamHI

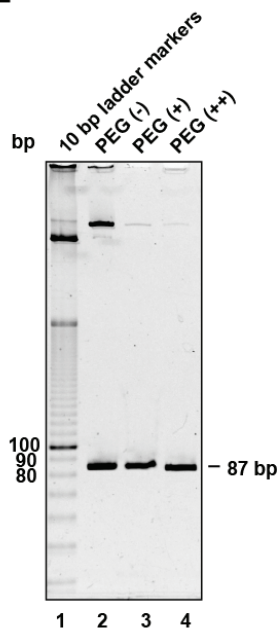
C

大腸菌 DH5α へ pNUC146 を導入
↓
培養
↓
プラスミド精製 (アルカリ法)
↓
EcoRV 処理 (87 塩基対)
↓
CIAP による 5' 末端の脱リン酸化
↓
EcoRI 処理 (70 塩基対 +3 塩基突出)
↓
セルフライゲーション (146 塩基対)

D



E



F

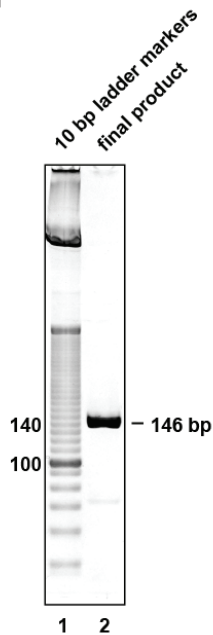


Figure 6. ヌクレオソーム用 DNA の精製
(A) ヌクレオソーム用 DNA の配列。(B) ヌクレオソーム用 DNA 配列を含む pNUC146 に挿入されたカセット配列。制限酵素配列をカラーで示した。
(C) ヌクレオソーム用 DNA の精製法の模式図。
(D) プラスミド pNUC146 のベクターマップ。
(E) プラスミド pNUC146 からのカセット配列の切り出し、およびベクターの除去を 6% native-PAGE で分析した。
(F) 最終精製物を 6% native-PAGE で分析した。。

れ 6.5%、8.5%であり、1 段階目でほとんどのベクターDNA が除去できていることが分かった。このことから、およそ 3,000 塩基対のベクターDNA と 73 塩基対を含む断片を分離する際の PEG 6000 の濃度は 6.5～8.5%が適切であることが分かった。次に、この断片が ligase によって結合しないように、脱リン酸化酵素 CIAP (TaKaRa)によって処理した。最後に、この断片を EcoRI (TaKaRa)で処理することによって 70 塩基対+3 塩基突出の断片が生成され、T4 ligase 溶液 (Nippon Gene)を用いてライゲーションさせることで、146 塩基対の断片を作製した (figure 6F)。

2-3-5. ヌクレオソームの再構成

再構成したヒストン 8 量体とヌクレオソーム用 DNA を混合し、塩透析法によってヌクレオソームの再構成した (Figure 7A)。再構成したサンプルには、ヌクレオソーム、ヌクレオソームから H2A/H2B が 1 分子解離したヘキサソーム、naked DNA、および DNA に非特異的にヒストンが結合したものが含まれる。そこでまず、ヒストンと DNA の非特異的結合を解消するためにサンプルを 55℃で 2 時間静置した。このサンプルを 6% native-PAGE によって分析した結果、naked DNA の他にヌクレオソームおよびヘキサソームのバンドが検出された (Figure 7B,C lane 1)。ヌクレオソームを高純度に精製するために分取泳動装置 Prep Cell (Bio-Rad)を用いた。Prep Cell は、サンプルを非変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ゲルから溶出された順にサンプルを分画することができる装置である。この装置を用いることにより、電気泳動度の異なる naked DNA、およびヘキサソームとヌクレオソームを分離することができる。さらに、サンプルが負極から正極へ電気泳動されるため、正に帯電したヒストンタンパク質を完全に分離することができる。Prep Cell によって分画したサンプルを 6% native-PAGE

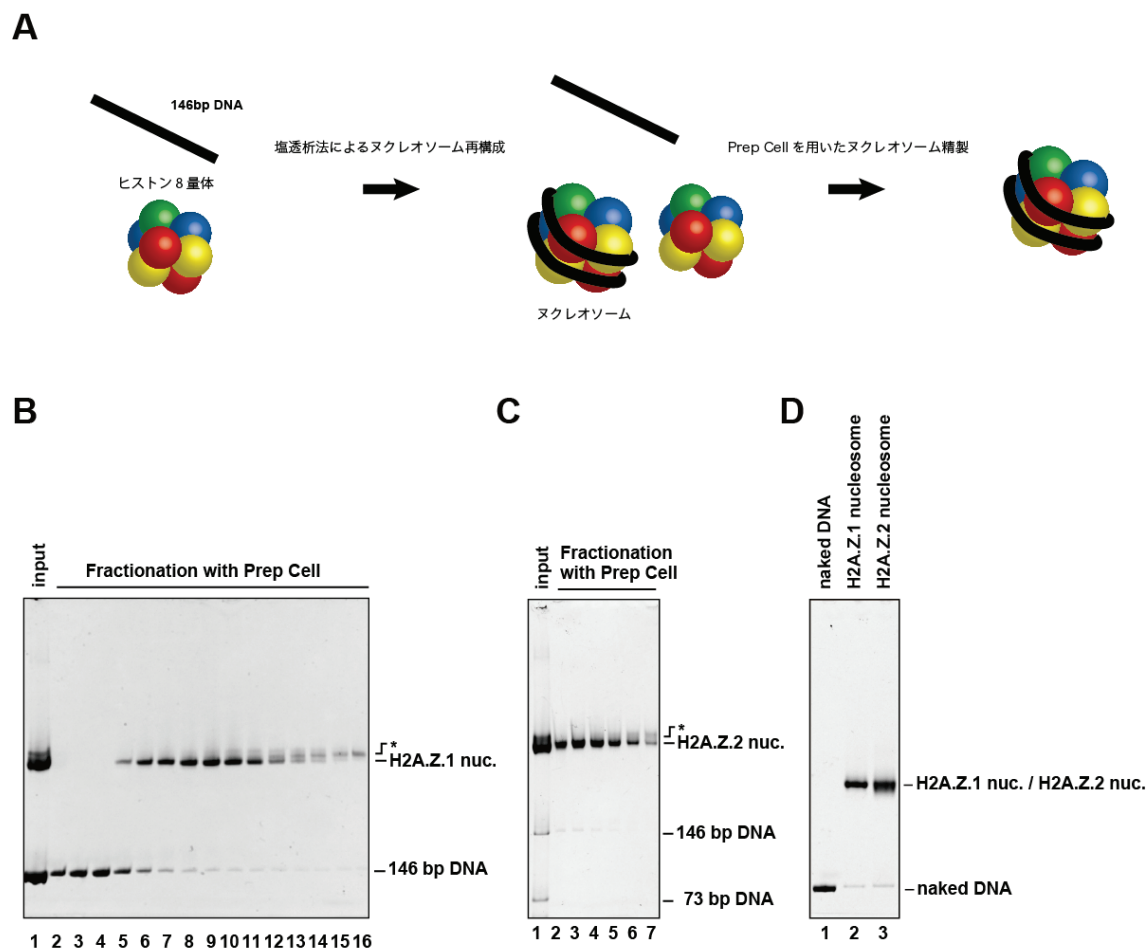


Figure 7. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの再構成

(A) ヌクレオソーム精製の模式図。(B) 再構成した H2A.Z.1 ヌクレオソームを含むサンプルを Prep Cell を用いて精製した。分画したサンプルを 6% native-PAGE で解析した。* で示すバンドはヘキサソーム。(C) 再構成した H2A.Z.2 ヌクレオソームを含むサンプルを Prep Cell を用いて精製した。分画したサンプルを 6% native-PAGE で解析した。(D) H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの最終精製物を 6% native-PAGE で解析した。

により分析した結果、ヌクレオソームを高純度を含む画分を分離することに成功した (Figure 7C)。

2-3-6. 動的光散乱法を用いた H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの分子径測定

再構成した H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの溶液中での構造を解析するために、動的光散乱法を用いた解析によるヌクレオソームの分子径の測定を行った (Figure 8A)。溶液中では、粒子が大きいほどそのブラウン運動は遅く、粒子が小さいほどブラウン運動は早い。動的光散乱法では、溶液中の粒子にレーザー光を照射し、粒子のブラウン運動に依存した散乱光を解析することで、溶液に含まれる粒子の粒子径を測定する。本実験において、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの比較対象として、通常のコルニク H2A を含むヌクレオソーム (54)を用いた。解析の結果、調製した各ヌクレオソームは単一のピークを示した (Figure 8B)。このことは、測定に用いたヌクレオソームが均一であることを示している。また、H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの分子径の分布が H2A.Z.1 や H2A を含むヌクレオソームと比較してわずかに広いことが分かった。このことから、溶液中において H2A.Z.2 を含むヌクレオソームは、わずかに運動性が高いことが示唆された。さらに、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの平均分子半径はそれぞれ 5.404、5.281 nm であり、H2A を含むヌクレオソームの平均分子半径は 5.394 nm であった (Figure 8C)。X 線結晶構造解析から、H2A を含むヌクレオソームの半径はおよそ 5.5 nm であり、今回測定によって得られた H2A を含むヌクレオソームの分子径と比べてほぼ同程度の値であることが分かった (50)。

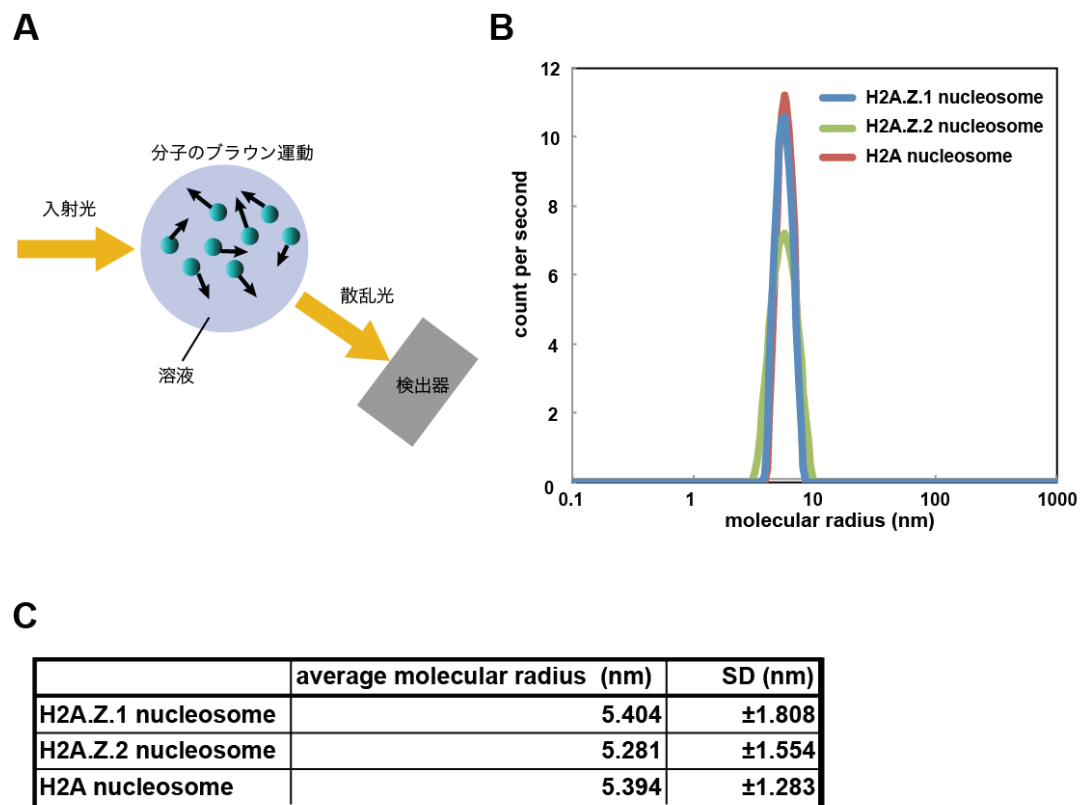


Figure 8. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの動的光散乱解析
 (A) 動的光散乱の概略図。(B) H2A.Z.1、H2A.Z.2、および H2A を含むヌクレオソームの動的光散乱解析による分子径測定結果。(C) H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2A を含むヌクレオソームの平均分子半径。70-90 回測定し、標準偏差を算出した。

3 章 H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの X 線結晶構造解析

3-1. 序

近年のゲノムワイドな局在解析によって、ヒストン H2A.Z が転写が活発な遺伝子の転写開始点近傍に局在することが報告されている (31)。このことから、H2A.Z が転写活性化に関与していることが強く示唆される。また、2009 年に異なる遺伝子座にコードされた *H2A.Z.1* (*H2AFZ*) および *H2A.Z.2* (*H2AFV*) が存在することが報告され、これまでの H2A.Z に関する多くの研究において、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の両者の性質を同時に観察していたことが明らかになった (47)。両者の機能差異に関する知見のひとつとして、マウスの *H2A.Z.1* 遺伝子を破壊すると胚性致死となることが報告されている (35)。このことは、H2A.Z.1 の機能を H2A.Z.2 が相補できないことを示しており、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 が異なる機能を有していることを示唆している。しかし、DNA の機能発現制御において両者がそれぞれどのような役割を担っているかについての知見は全くない。その原因のひとつとして、H2A.Z.2 の構造情報がないことが挙げられる。H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの立体構造を解明し、H2A や H2A.Z.1 を含むヌクレオソームとの構造差異を明らかにすることで、H2A.Z.2 の特徴的な性質の解明や機能の推定を行うことが期待される。

そこで本章では、ヒト H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの構造的特徴を明らかにするために、X 線結晶構造解析を行い、原子分解能で立体構造を解明した。本章では、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの大量調製、結晶化、X 線結晶構造解析、および H2A を含むヌクレオソームとの構造比較について論じた。

3-2. 材料と実験方法

3-2-1. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの大量調製

H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの精製方法は、2-2-6 で記述した通りである。Prep Cell を用いて精製したサンプルを、2.8~3.5 mg/ml になるように Amicon Ultra 4 [MWCO: 30kDa]を用いた限外濾過によって濃縮した。濃縮したサンプルをヌクレオソームの結晶化に適した 500 ml の CCS buffer [20 mM potassium cacodylate (pH 6.0), 1mM EDTA]に対して 2 回透析を行った (54)。

3-2-2. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの結晶化

2.8~3.5 mg/ml に調製した 1 μ l の H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームと、1 μ l の結晶化溶液 [20 mM Potassium cacodylate (pH 6.0), 90~95 mM MnCl₂, 50~70 mM KCl]をカバーガラス上で混合した。ただちにカバーガラスを 500 μ l のレザーバー溶液 [20 mM Potassium cacodylate (pH 6.0) , 55 mM MnCl₂, 35-45 mM KCl]が入った容器に被せ密封し、蒸気拡散法によって結晶化を行った (55)。およそ 1~2 週間程度で 500 μ m 程度の単結晶が得られた。得られた H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの結晶を不凍液 [20 mM Potassium cacodylate (pH 6.0), 55 mM MnCl₂, 35~45 mM KCl, 28% 2-methyl 2,4-pentandiol, 2% trehalose]に浸した後、およそ -180°Cの液体窒素中で保存した。

3-2-3. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの X 線回折実験

大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL38B1 および BL41XU において、

H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの単結晶をゴニオメーター上に乗せた。まず、任意の角度、および+90° の 2 角度から結晶に X 線を照射し、得られた X 線回折像を HKL2000 ソフトウェアを使用して、最も適当な結晶系、格子定数を推定し、かつ解析可能なデータであるかどうか調べた (57)。結晶系が $P2_12_12_1$ であること、および解析可能なデータであることが判明したことから、結晶を 0°~180°の範囲で 0.3°ずつ回転させながら X 線を照射し、合計 600 枚の X 線回折像を得た (Figure 11B,C)。得られた回折像を HKL2000 ソフトウェアを用いて処理した結果、H2A.Z.1、H2A.Z.2 を含むヌクレオソームについて、それぞれ 3.07、3.20 Å の分解能のデータを取得した。

3-2-4. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの構造精密化

Phaser ソフトウェアを用いて、分子置換法によって HKL2000 で処理した各回折点の位相決定を行った (59)。分子置換を行うにあたって、ヒト H2A を含むヌクレオソームの結晶構造 (PDB code: 3AFA) をモデル構造として使用した (54)。次に、PHENIX ソフトウェアを用いて構造の精密化を行った (60)。構造の精密化を行う上でモデル構造のバイアスを減らすために、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームと H2A を含むヌクレオソームの間で構造が大きく異なる領域である、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の L1 loop の周辺領域 (H2A.Z.1 S38~V43, H2A.Z.2 T38~V43) を初期構造モデルから除いて、構造の精密化を行った。rigid-body refinement を行った後、xyz-coordinate、real-space、individual B-factor、occupancy refinements、および COOT ソフトウェアを用いた手動でのモデル構築を繰り返し行った (61)。すべての精密化の過程で secondary-restraints、およびヌクレオソームに含まれるヒストン H2B、H3.1、H4、H2A.Z.1 あるいは H2A.Z.2 の各 2 分子ずつに対して noncrystallographic symmetry

(NCS) restraints を適用して精密化を行った。MolProbity プログラムを用いて H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームが正しい構造であることを検証し、これを最終構造とした (62)。X 線回折データの解析結果および構造精密化と最終構造における統計データのまとめを Table 2 に示した。本論文に示すすべての構造に関する図は、PyMOL を使用して作成した (63)。H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの原子座標および電子密度マップは、RCSB Protein Data Bank にそれぞれ 3WA9 および 3WAA の PDB code で登録した。

3-2-5. ヌクレオソームの構造比較

PyMOL ソフトウェアを用いて、H2A.Z.1 (PDB code: 3WA9)、H2A.Z.2 (PDB code: 3WAA)、H2A (PDB code: 3AFA)を含むヌクレオソームの立体構造を重ね合わせ、各ヌクレオソームに含まれる H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2A 分子の各アミノ酸における α 炭素の2点間距離を測定した。

3-2-6. H2A.Z.1、H2A.Z.2、および H2A の温度因子の比較

H2A.Z.1、H2A.Z.2、および H2A を含むヌクレオソームにおける各原子の揺らぎの大きさを調べるために、PHENIX ソフトウェアを用いて各原子の温度因子について解析を行った。温度因子の値は各原子の運動性の高さを示す。H2A.Z.1、H2A.Z.2、および H2A の各アミノ酸の α 炭素について温度因子をプロットした。

Table 2. Data collection and refinement statistics.

	H2A.Z.1 nucleosome	H2A.Z.2 nucleosome
Data collection		
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit-cell parameters (Å)	a = 104.90, b = 109.39, c = 181.76	a = 105.36, b = 109.84, c = 182.99
Resolution (Å)	50.0- 3.07(3.18- 3.07)	50.0- 3.20 (3.31- 3.20)
No. of reflections	2790970	1511021
No. of unique reflections	40613	35825
Completeness (%) ^a	99.8 (100)	98.3 (99.4)
R _{sym} (%) ^{a,b}	7.9 (48.9)	9.9 (49.4)
I/σ (I) ^a	12.3 (4.5)	9.3 (3.3)
multiplicity ^a	6.3 (5.9)	4.5 (4.4)
Refinement		
Resolution (Å)	39.0- 3.07	39.2- 3.20
R _{work} (%) ^c /R _{free} (%)	22.2 / 27.1	21.7 / 27.1
B factors (Å ²)		
Protein	45.5	72.3
DNA	101.5	124.8
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.008	0.009
Bond angles (°)	1.32	1.36
Ramachandran favored (%)	97.0	96.1
Ramachandran outliers (%)	0.0	0.0
PDB code	3WA9	3WAA

^a Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

$$^b R_{\text{sym}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_{\text{hkl},i} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_{\text{hkl},i}$$

$$^c R_{\text{work}} = \sum_{\text{hkl}} ||F_o| - |F_c|| / \sum_{\text{hkl}} |F_o|. R_{\text{free}} \text{ was calculated with 5\% of the data excluded from the refinement.}$$

3-3. 結果と考察

3-3-1. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの大量調製

H2A.Z.1、H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの X 線結晶構造解析を行うにあたって、各ヌクレオソームを高純度かつ大量に調製する必要がある。そこで、1 mg のヌクレオソーム用 DNA と 1.55 mg のヒストン 8 量体を用いて、塩透析法によってヌクレオソームを再構成した。再構成したヌクレオソームを 6% native-PAGE によって解析した結果、高純度のヌクレオソームが精製できていることが分かった (Figure 9A)。精製したヌクレオソームに 4 種類のヒストンが等モルで含まれていることを確かめる必要がある。そこで、精製したヌクレオソームを 16% SDS-PAGE によって解析した。その結果、調製したヌクレオソームに各ヒストンが 1: 1: 1: 1 の割合で含まれていることが確かめられた (Figure 9B)。

タンパク質の結晶化を行うためには、サンプルを高濃度に調製し、適切な溶液に溶解する必要がある。そこで、限外ろ過によってヌクレオソームを 3 mg/ml 程度まで濃縮し、CCS 溶液 [20 mM potassium cacodylate (pH 6.0), 1 mM EDTA] に対して透析して、最終精製物とした。

3-3-2. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの結晶化

H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの単結晶を作製するために、精製した H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームと結晶化溶液を等量ずつカバーガラス上で混合し (ドロップ溶液)、250 倍量のレザーバー溶液が入った容器に被せ密封した (Figure 10A)。レザーバー溶液に含まれる試薬濃度がドロップ溶液に含まれる試薬濃度よりも濃いために、レザーバー溶液およびドロップ溶液の濃度が平衡に達するまで、

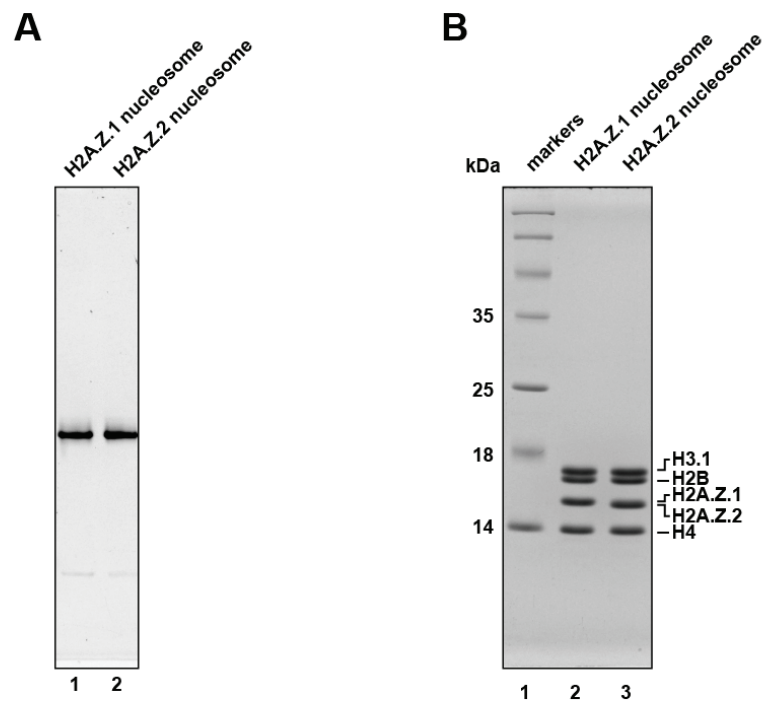


Figure 9. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの大量調製。

(A) 再構成した H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームを 6% native-PAGE で解析した。電気泳動後、ゲルを ethidium bromide を用いて染色した。(B) 再構成した H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームを 16% SDS-PAGE で解析した。電気泳動後、ゲルを CBB を用いて染色した。

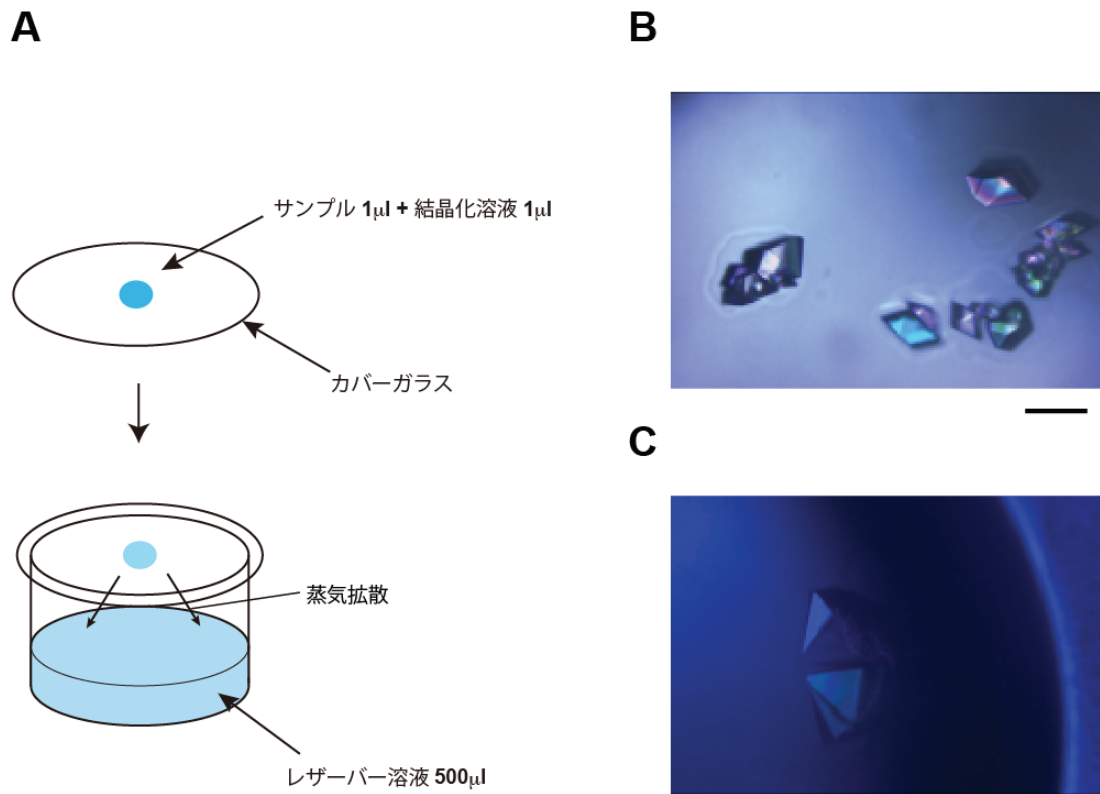


Figure 10. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの結晶化
 (A) ハンギングドロップ蒸気拡散法の模式図。(B) H2A.Z.1 を含むヌクレオソームの結晶。
 尺度は 10 μ m を示す。(C) H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの結晶。

ドロップ溶液が脱水する。この蒸気拡散法を用いてゆっくりとドロップ溶液中のタンパク濃度を上昇させ、結晶化を行った。およそ 1 ～ 2 週間程度で 500 μm 程度の単結晶が得られた (Figure 10B,C)。

3-3-3. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの構造決定

タンパク質の X 線結晶構造解析を行うためには、結晶化したタンパク質に高エネルギーの X 線を照射し回折像を得る必要がある (Figure 11A)。この高エネルギーの X 線に対するタンパク質のダメージを軽減するために、およそ -180°C の窒素気流を結晶に吹き付けながら X 線を照射する、低温 X 線回折実験法が確立している (56)。この方法を用いる場合、タンパク質結晶が -180°C で凍結しないように不凍液に浸し、X 線回折実験を行う。X 線回折実験は、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン、BL41XU および BL38B1 にて行った。H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの X 線回折像を HKL2000 ソフトウェア (57) を使用して解析した結果、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームについて、それぞれ 3.07、3.20 Å の分解能のデータが得られた (Figure 11B,C)。以降のデータ処理は、CCP4 プログラムを用いて行った (58)。

X 線結晶構造解析における問題点のひとつに位相問題がある。結晶に X 線を照射すると 2 次元の X 線回折像が得られる。X 線回折像に含まれる各回折点は、回折強度および反射角の情報を持つが位相情報を持たない。そこで、各回折点の位相情報を決定するためにさまざまな手法が確立されている。本実験では分子置換法によって回折点の位相決定を行った。分子置換法は、相同性の高い既知の立体構造から位相を決定する方法であり、本解析においては H2A を含むヌクレオソーム (PDB code: 3AFA) の立体構造を使用し、Phaser プログラムを用いて H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソ

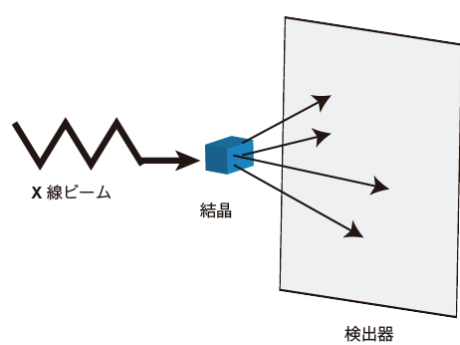
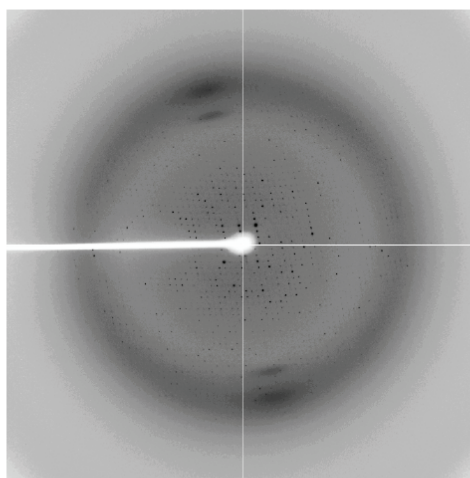
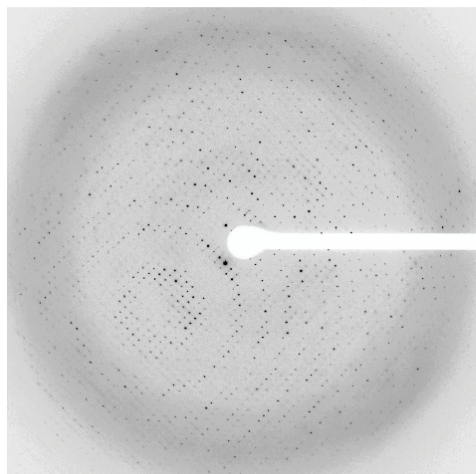
A**B****C**

Figure 11. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの結晶の X 線回折像
 (A) X 線回折の模式図。(B) H2A.Z.1 ヌクレオソームの結晶の X 線回折像。(C) H2A.Z.1 ヌクレオソームの結晶の X 線回折像。

ームの回折データの位相決定を行った (59)。正しく分子置換が行われたかどうか検証するために、分子置換によって得られた初期構造モデルの結晶中における配置を PyMOL ソフトウェアを用いて解析した (63)。解析の結果、隣り合うヌクレオソームが互いに衝突することなく配置していることが明らかとなり、このことから正しく分子置換が行われたと考えられた (Figure 12A)。

次に、立体構造中の各原子を正確に電子密度マップに当てはめるために、PHENIX ソフトウェアおよび COOT ソフトウェアを用いて構造の精密化を行った (60,61)。構造の精密化を行う上でモデル構造のバイアスを減らすために、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームと H2A を含むヌクレオソームの間で構造が大きく異なることが構造解析から明らかになった、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の L1 loop の周辺領域 (H2A.Z.1 S38~V43, H2A.Z.2 T38~V43) を、分子置換後に得られた初期構造モデルから除いて構造の精密化を行った。これによって、実験データから計算された電子密度がはっきりと観察され、正確なモデル構築が可能となった (Figure 12B)。アミノ酸の主鎖の構造は、Figure 12C に示すような 2 面角、 ϕ および ψ によって定義されている。タンパク質の 2 次構造である、 α -helix、 β -sheet、および loop 構造を形成するアミノ酸の ϕ および ψ の角度範囲は定められている。タンパク質を構成する各アミノ酸の ϕ および ψ を 2 次元にプロットしたものが Ramachandran plot と呼ばれる。H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームにを構成する各アミノ酸の Ramachandran plot において、逸脱したアミノ酸がないことを確認し (58)(Figure 12D)、これを最終構造とした (Figure 13A,B)。

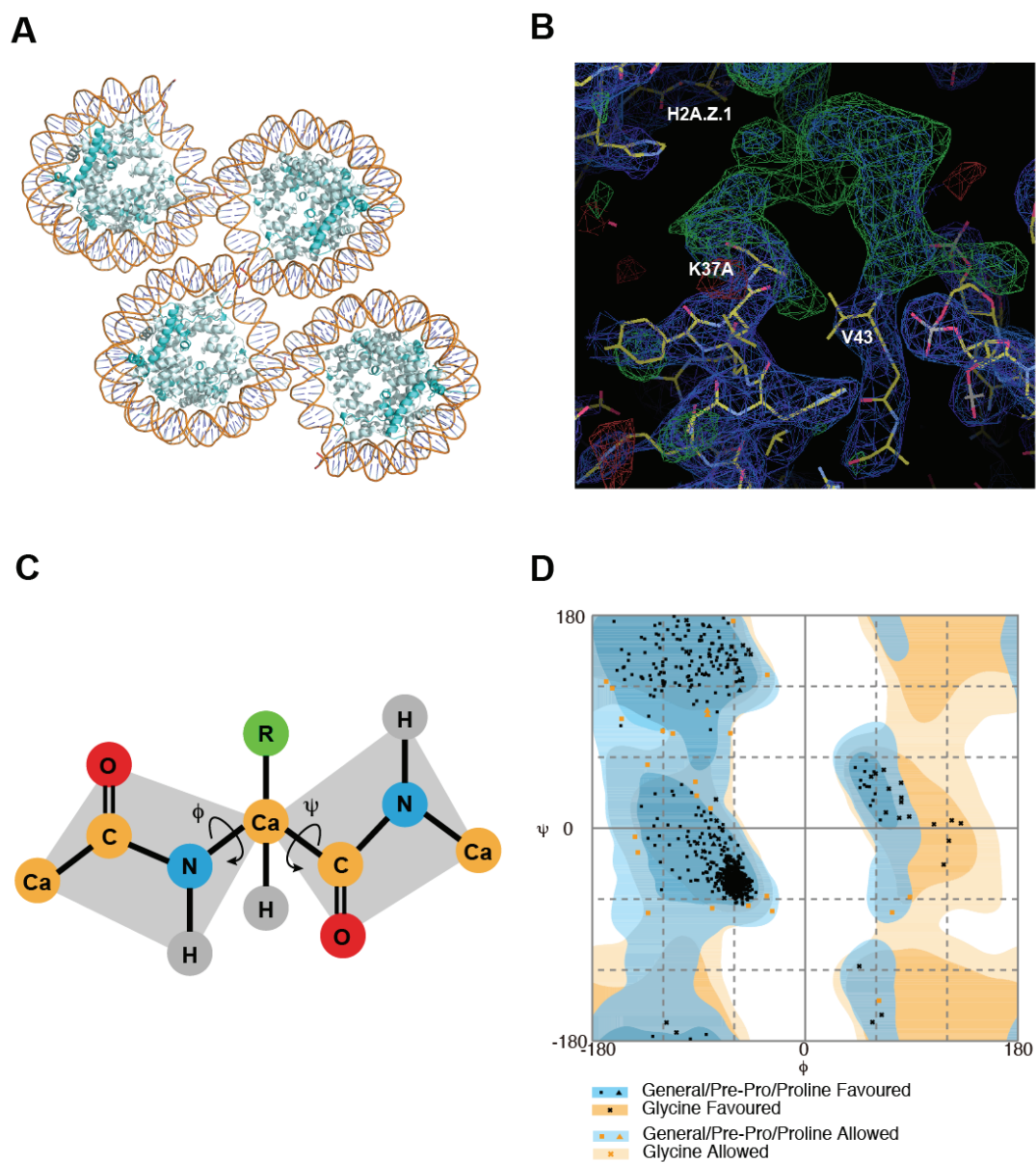


Figure 12. H2A.Z.1 を含むヌクレオソームの構造精密化

(A) H2A.Z.1 を含むヌクレオソームの結晶構造中での配向。(B) ヌクレオソームにおける H2A.Z.1 分子の L1 loop 領域の電子密度。電子密度マップは、2mFo-DFc を青色、mFo-DFc を緑色で示した。(C) アミノ酸における二面角の模式図。(D) H2A.Z.1 を含むヌクレオソームにおける各アミノ酸のラムチャンドランプロット。

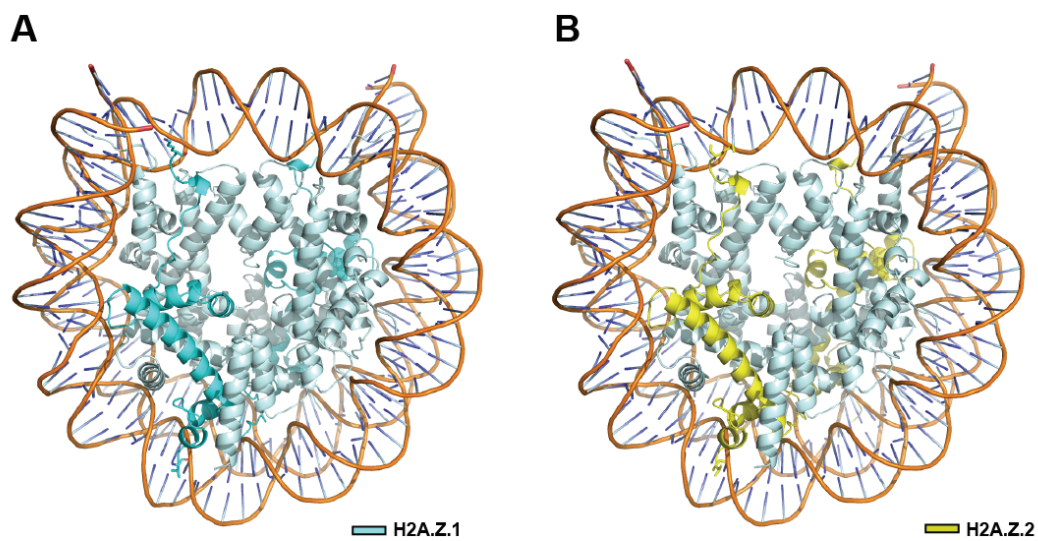


Figure 13. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの立体構造

(A) H2A.Z.1 を含むヌクレオソームの立体構造 (PDB code: 3WA9)。ヌクレオソーム中の H2A.Z.1 分子をシアンで示した。(B) H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの立体構造 (PDB code: 3WAA)。ヌクレオソーム中の H2A.Z.2 分子を黄色で示した。

3-3-4. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの構造解析

H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの構造的特徴を明らかにするために、H2A.Z.1、H2A.Z.2 および H2A を含むヌクレオソームの構造比較を行った。本項では、まず H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームと H2A を含むヌクレオソームの構造比較を行い、H2A.Z と H2A の構造差異について論じた。次に H2A.Z.1 と H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの構造比較を行い、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の間の構造差異について論じた。

3-3-4-1. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームと H2A ヌクレオソームとの構造比較

まず、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームと H2A を含むヌクレオソームの構造比較を行った。構造比較を行うために、H2A.Z.1、H2A.Z.2、および H2A を含むヌクレオソームの立体構造を PyMOL ソフトウェアを用いて重ね合わせ、H2A.Z.1 と H2A の各アミノ酸における α 炭素原子の 2 点間距離、および H2A.Z.2 と H2A の各アミノ酸における α 炭素原子の 2 点間距離を計算した。その結果、H2A.Z.1 ヌクレオソームと H2A ヌクレオソームの L1 loop 領域 (H2A.Z.1 R39~G47, H2A G37~G44) において、5 Å 程度の違いがみられた (Figure 14A,C)。同様にして、H2A.Z.2 ヌクレオソームと H2A ヌクレオソームの L1 loop 領域においても、6 Å 程度の違いが観察された (Figure 14B,D)。先行研究において、ヒストン H3T を含むヌクレオソームの X 線結晶構造解析の結果、1 Å 程度の構造変化がヌクレオソームの安定性に著しい影響を与えることが示されている (54)。このことから、H2A.Z.1、H2A.Z.2 と H2A の L1 loop における構造差異は非常に大きく、ヌクレオソームの性質に影響を及ぼすことが示唆さ

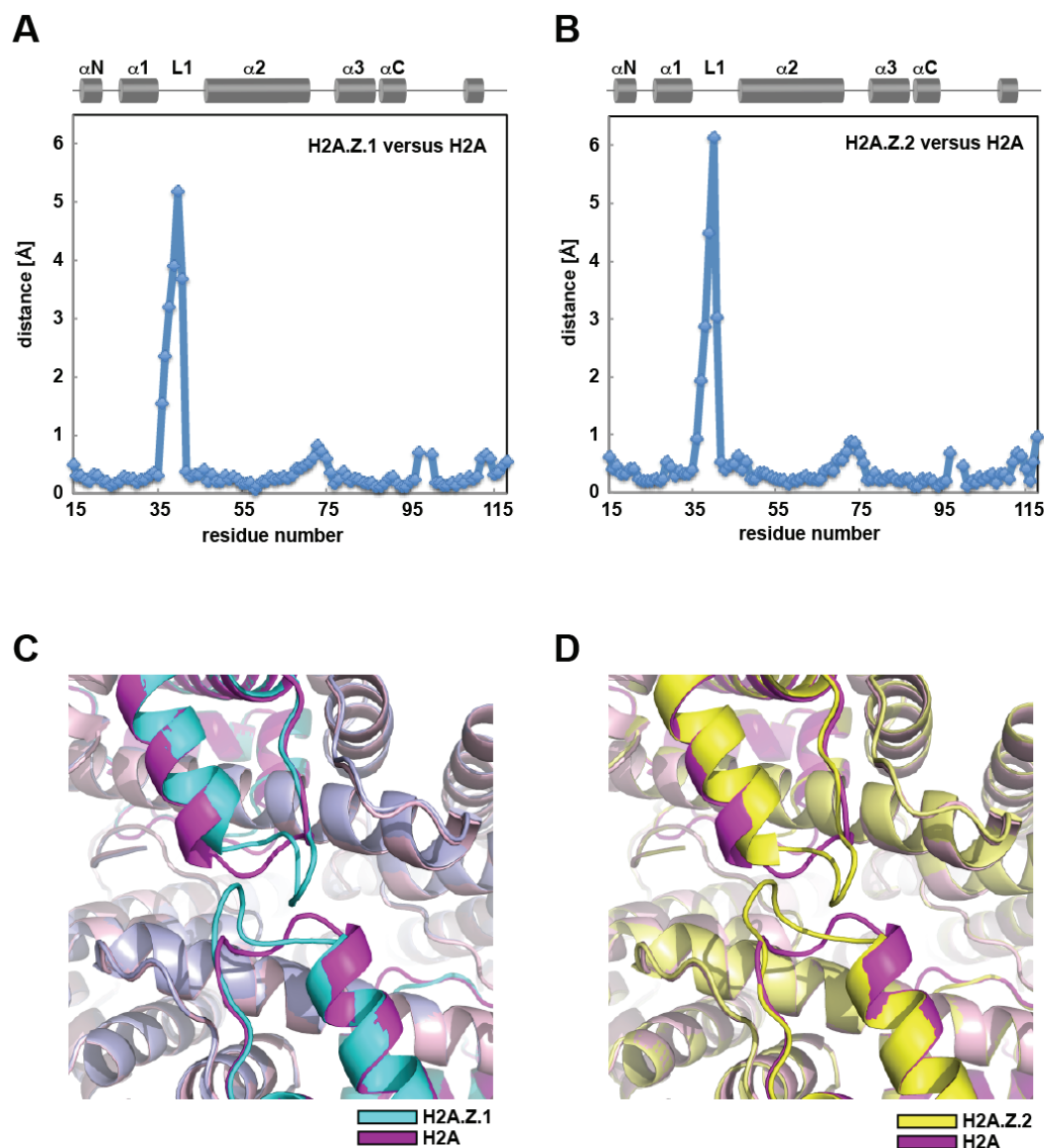


Figure 14. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームと H2A ヌクレオソームとの構造比較 (A) H2A.Z.1 ヌクレオソームと H2A ヌクレオソームの立体構造を重ね合わせた後、H2A.Z.1 および H2A 分子における各アミノ酸の α 炭素のずれをプロットした。(B) H2A.Z.2 ヌクレオソームと H2A ヌクレオソームの立体構造を重ね合わせた後、H2A.Z.2 および H2A 分子における各アミノ酸の α 炭素のずれをプロットした。(C) H2A.Z.1 ヌクレオソームと H2A ヌクレオソームの L1 loop 領域周辺の立体構造。H2A および H2A.Z.1 をそれぞれマゼンタとシアンで示した。(D) H2A.Z.2 ヌクレオソームと H2A ヌクレオソームの L1 loop 領域周辺の立体構造。H2A および H2A.Z.2 をそれぞれマゼンタと黄色で示した。

れた。

H2A.Z.1、H2A.Z.2 と H2A の L1 loop における構造差異についてさらに解析するために、各アミノ酸の C α について温度因子の比較を行った (Figure 15A-C)。温度因子とは、結晶構造中で各原子の揺らぎの大きさを数値化したものである。この値は結晶構造の分解能にも依存する。H2A.Z.1、H2A.Z.2、および H2A を含むヌクレオソームの分解能は、それぞれ 3.07、3.20、2.50 Å であった。H2A.Z.1、H2A.Z.2、および H2A の温度因子を比較した結果、H2A.Z.1、H2A.Z.2 の L1 loop 領域における温度因子が H2A の L1 loop 領域よりも顕著に高いことが明らかとなった (Figure 15A-C)。このことは、H2A.Z.1、H2A.Z.2 の L1 loop 領域の運動性が H2A と比較して高いことを示している。H2A.Z.2 における温度因子のバックグラウンドが H2A.Z.1 や H2A よりも高いのは、分解能が原因であると考えられた。さらに、この領域における電子密度を観察すると、H2A.Z.1、H2A.Z.2 における主鎖の電子密度は部分的に観察されず、側鎖の電子密度はほとんど観察されなかった (Figure 15D-E)。一方、H2A における電子密度は、側鎖を含めはっきりと観察される (Figure 15F)。結晶構造中において運動性が高く、決まった構造を形成していない場合に電子密度ははっきりと観察されない。このことから H2A.Z.1、H2A.Z.2 における L1 loop 領域は、H2A よりも運動性が高いことが明らかになった。

3-3-4-2. H2A.Z.1 ヌクレオソームと H2A.Z.2 ヌクレオソームとの構造比較

次に H2A.Z.1 ヌクレオソームと H2A.Z.2 ヌクレオソームの構造比較を行った。H2A.Z.1 と H2A.Z.2 のアミノ酸配列を比較すると、14 番目 (H2A.Z.1 では threonine,

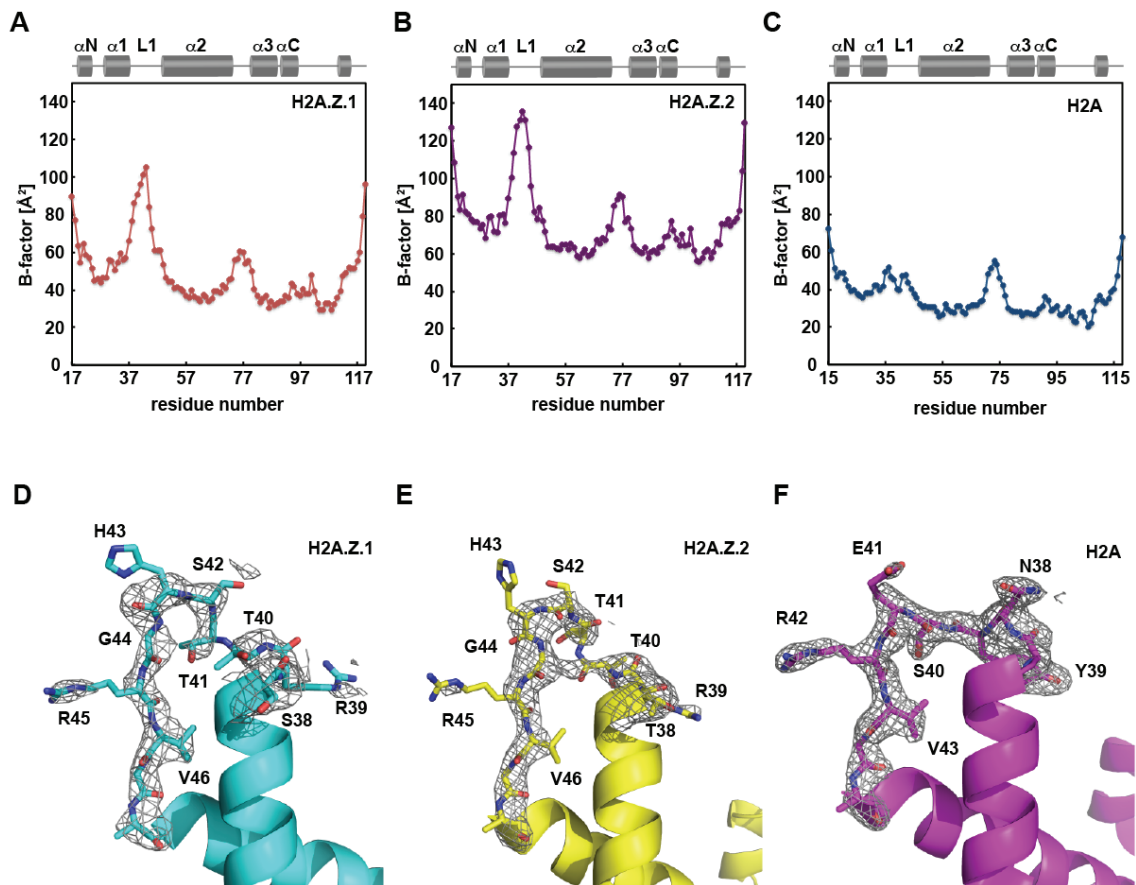


Figure 15. H2A.Z.1、H2A.Z.2、およびH2Aを含むヌクレオソームの温度因子

(A) H2A.Z.1 ヌクレオソーム中における H2A.Z.1 分子の α 炭素の温度因子をプロットした。(B) H2A.Z.2 ヌクレオソーム中における H2A.Z.2 分子の α 炭素の温度因子をプロットした。(C) H2A ヌクレオソーム中における H2A 分子の α 炭素の温度因子をプロットした。(D-F) H2A.Z.1、H2A.Z.2、および H2A の L1 loop 領域の電子密度をメッシュで表示した。

H2A.Z.2 では alanine)、38 番目 (H2A.Z.1 では serine、H2A.Z.2 では threonine)、127 番目 (H2A.Z.1 では valine、H2A.Z.2 では alanine)の 3 ヶ所が異なる (Figure 16A)。

14 番目と 127 番目は、構造をとらない N 末端、C 末端のテール領域における違いであるが、38 番目はヒストンコアにおける違いである。H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の各アミノ酸における α 炭素原子の 2 点間距離を計算した。その結果、H2A.Z.1 ヌクレオソームと H2A.Z.2 ヌクレオソームにおいて、L1 loop のアミノ酸配列は同じであるにもかかわらず、L1 loop 領域において 2 Å 程度の構造の違いがみられた (Figure 16B)。H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の 38 番目のアミノ酸は、L1 loop 直前の α 1 ヘリックス領域の C 末端に存在する。このことから、H2A.Z.1 S38 および H2A.Z.2 T38 が L1 loop の構造変化に影響を及ぼし、H2A.Z.1 ヌクレオソームと H2A.Z.2 ヌクレオソームとの構造差異の原因となっていることが考えられた (Figure 16C,D)。

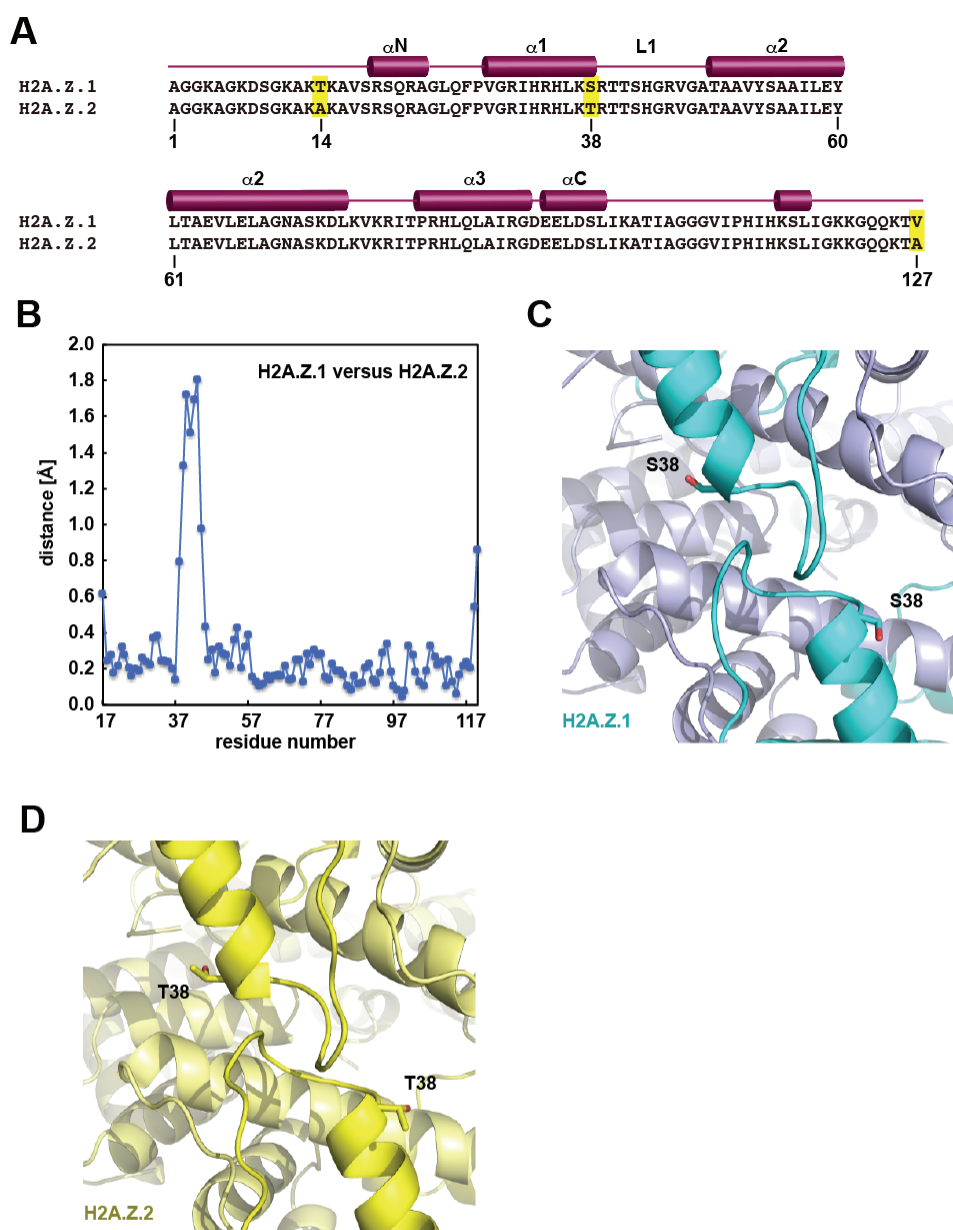


Figure 16. H2A.Z.1 と H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの構造比較

(A) H2A.Z.1 と H2A.Z.2 のアミノ酸配列比較。アミノ酸の異なる領域を黄色で示した。配列の上部に H2A.Z の 2 次構造を示した。円柱は α -helix 領域を、直線はループ領域を示す。(B) H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームを重ね合わせた後、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 分子の各アミノ酸の α 炭素の構造のずれをプロットした。(C) H2A.Z.1 ヌクレオソームの L1 loop 構造。H2A.Z.1 分子をシアンで示した。(D) H2A.Z.2 ヌクレオソームの L1 loop 構造。H2A.Z.2 分子を黄色で示した。

4 章 H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの生化学的解析および細胞生物学的解析

4-1. 序

これまでの先行研究で、H2A.Z を含むヌクレオソームは転写が活発な遺伝子のプロモーター領域に局在すること明らかとなっている。このことから、転写制御において H2A.Z が他の H2A バリエーションとは異なる性質を有することが示唆される。前章で述べたように、X 線結晶構造解析によって、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームは特徴的な立体構造を形成していることが明らかになった。そこで、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの立体構造における違いが物理的性質にどのような影響を及ぼすのかを調べるために、試験管内における各ヌクレオソームの安定性と、生細胞における H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の動態について解析した。さらに点変異体を用いた解析によって、X 線結晶構造解析から明らかとなった H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の構造差異がそれらの細胞内動態にどのような影響を与えるのかを調べた。

4-2. 材料と実験方法

4-2-1. H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2A を含むヌクレオソームを用いた塩耐性試験

800 ng の H2A.Z.1、H2A.Z.2、もしくは H2A を含むヌクレオソームを最終濃度 400、600、700、800 mM NaCl を含む 5 μ l の反応溶液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT] と混合し、55°C で 1 時間静置した。その後、各サンプルの NaCl 濃度を調整するために、400、200、100、0 mM NaCl を含む 5 μ l の反応溶液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% sucrose] を加え、6% native-PAGE

によって解析した (54)。電気泳動後、ゲルを ethidium bromide で 10 分間染色し、超純水で 15 分間脱色した後、LAS-4000 で観察した。

4-2-2. GFP 融合 H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2A、H2A.Z.1 S38T、H2A.Z.2 T38S を恒常的に発現する HeLa 細胞株の樹立

H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2A、H2A.Z.1 S38T、H2A.Z.2 T38S の遺伝子を pEGFP-C3 ベクターに挿入した pEGFP-C3-H2A.Z.1、pEGFP-C3-H2A.Z.2、pEGFP-C3-H2A、pEGFP-C3-H2A.Z.1 S38T、pEGFP-C3-H2A.Z.2 T38S を作製した。これらのプラスミドを Lipofactamine 2000 (Invitrogen)を用いて HeLa 細胞に導入した。抗生物質 G418 (Nacalai Tesque)を用いて、恒常的に GFP-H2A.Z.1、GFP-H2A.Z.2、GFP-H2A、GFP-H2A.Z.1 S38T、GFP-H2A.Z.2 T38S を発現する細胞株を選別した。各細胞株における GFP 融合ヒストンの発現レベルを調べるために、それぞれ約 200 個の細胞を蛍光顕微鏡 Ti-E (Nikon) を用いて観察し、蛍光強度を NIS ソフトウェアによって測定した。

4-2-3. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

GFP-H2A.Z.1、GFP-H2A.Z.2、GFP-H2A、GFP-H2A.Z.1 S38T、GFP-H2A.Z.2 T38S を同程度発現する HeLa 細胞株に、最終濃度が 100 µg/ml になるように cycloheximide を加え、30℃にて 30 分間静置した。細胞核の半分に 488 nm の Ar レーザーを照射することで GFP の蛍光を退色させ、レーザーを照射していない領域からの GFP 融合ヒストンの移動による蛍光回復を、共焦点顕微鏡 FV-1000 (Olympus)を用いて観察した (65)。画像は 5 分間隔で 3 時間撮影した。画像解析ソフトウェア *ImageJ* 1.46r を用い

て、レーザーを照射した領域と照射していない領域の蛍光強度を計測した (64)。レーザー照射後に新規に合成された GFP 融合の各ヒストンの蛍光を補正するために、バックグラウンドの蛍光強度を差し引いた後、レーザーを照射していない領域の蛍光強度に対するレーザーを照射した領域の蛍光強度をプロットした。

4-3. 実験結果と考察

4-3-1. H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2A を含むヌクレオソームの塩耐性試験

X 線結晶構造解析によって、H2A.Z.1、H2A.Z.2 を含むヌクレオソームは、H2A を含むヌクレオソーム (54)と比較して、L1 loop 領域の構造及び性質が異なっていることが明らかになった (Figure 14,15)。この構造的な差異がヌクレオソームの安定性に影響を及ぼす可能性が考えられたため、H2A.Z.1、H2A.Z.2、および H2A を含むヌクレオソームの構造安定性について解析を行った。本項では、まずヌクレオソームの安定性を解析するために塩耐性試験を行った。塩耐性試験は、ヌクレオソームに対して異なる濃度の塩を加え、DNA-ヒストン間のイオン結合を減少させることによって、ヌクレオソーム中での DNA-ヒストン結合の阻害を native-PAGE によって観察する手法である。各濃度の塩を加えたヌクレオソームを native-PAGE によって解析した。その結果、先行論文の結果 (54)と同様に H2A を含むヌクレオソームは、800 mM の塩濃度下においてもヌクレオソームに対応するバンドが観察され、ヌクレオソーム中での DNA-ヒストン結合が保持されていることが分かった(Figure 17B, lane 4)。一方、H2A.Z.1 を含むヌクレオソームは 700 mM の塩濃度まではヌクレオソームに対応するバンドが観察されるのに対し、800 mM の塩濃度下では、完全に消失していることが分かった (Figure

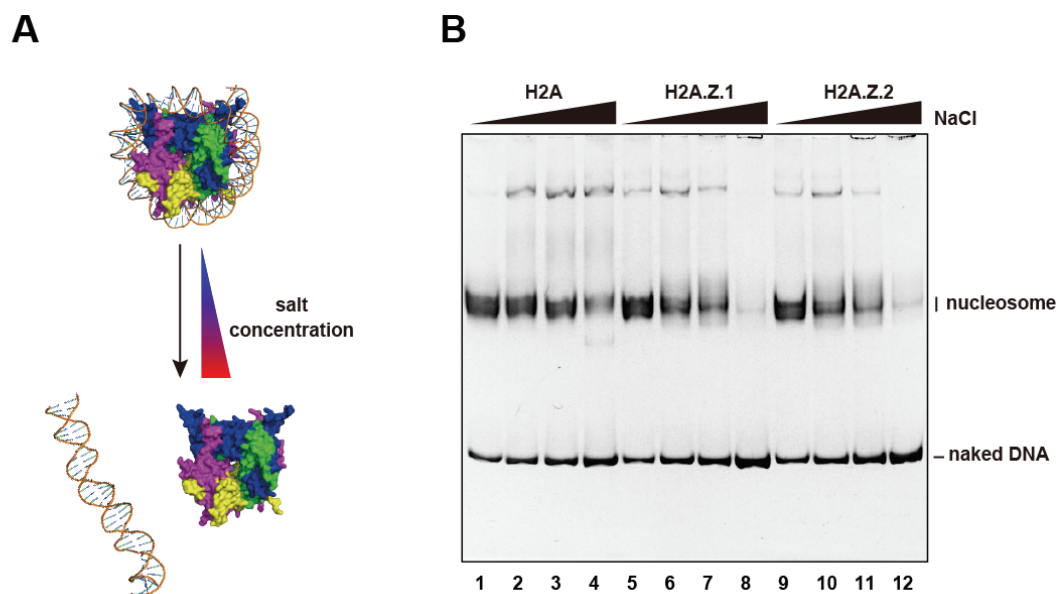


Figure 17. H2A.Z.1 と H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの塩耐性試験

(A) ヌクレオソームを用いた塩耐性試験の模式図。(B) H2A、H2A.Z.1、もしくはH2A.Z.2を含むヌクレオソームの塩耐性試験の結果。H2A、H2A.Z.1、もしくはH2A.Z.2を含むヌクレオソームを400 mM (lane 1, 5, 9)、600 mM (lane 2, 6, 10)、700 mM (lane 3, 7, 11)、800 mM (lane 3, 7, 11)の塩濃度条件下にて、55°Cで1時間静置した。6% native-PAGEで解析した後、ethyidium bromideで染色した。

17B lane 8)。H2A.Z.2を含むヌクレオソームについてもH2A.Z.1を含むヌクレオソームと同様に、700 mMの塩濃度まではヌクレオソーム中でのDNA-ヒストン結合が保持されるものの、800 mMの塩濃度下ではヌクレオソームの崩壊が観察された (Figure 17B lane 12)。以上の結果から、H2A.Z.1およびH2A.Z.2を含むヌクレオソームは、H2Aを含むヌクレオソームと比較して不安定なヌクレオソームを形成することが明らかになった。また、H2A.Z.1とH2A.Z.2を含むヌクレオソームの安定性は同程度であることが示された。このアッセイ系において、ヌクレオソームのバンドに含まれるものとして、ヒストン8量体を含むオクタソーム、H2A/H2Bが1分子解離したヘキサソーム、H2A/H2Bが2分子解離したテトラソームが混在している可能性が考えられた。今後、ヌクレオソームにおけるこれらの状態のうち、H2Aを含むヌクレオソームがどの状態で安定に保持されているかについて詳細に解析する必要がある。

4-3-2. GFP-H2A.Z.1、GFP-H2A.Z.2、GFP-H2Aの細胞内動態解析

前項の解析によって、試験管内においてH2A.Zヌクレオソームが不安定であることが明らかになったことから、次にH2A.Zヌクレオソームの細胞内での安定性について検討した。そのために、H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2Aの細胞核内における動態について解析を行った。まず、GFP融合のH2A.Z.1、H2A.Z.2、H2Aを恒常的に発現するHeLa細胞株を樹立した。共焦点顕微鏡を用いた観察によって、GFP融合の各ヒストンが核内に局在することが確認された (Figure 18A)。次に、Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)法によってH2A.Z.1、H2A.Z.2、およびH2Aの細胞内動態を解析した。FRAP法は、細胞核の半分に488 nmの波長のAr レーザーを照射することで

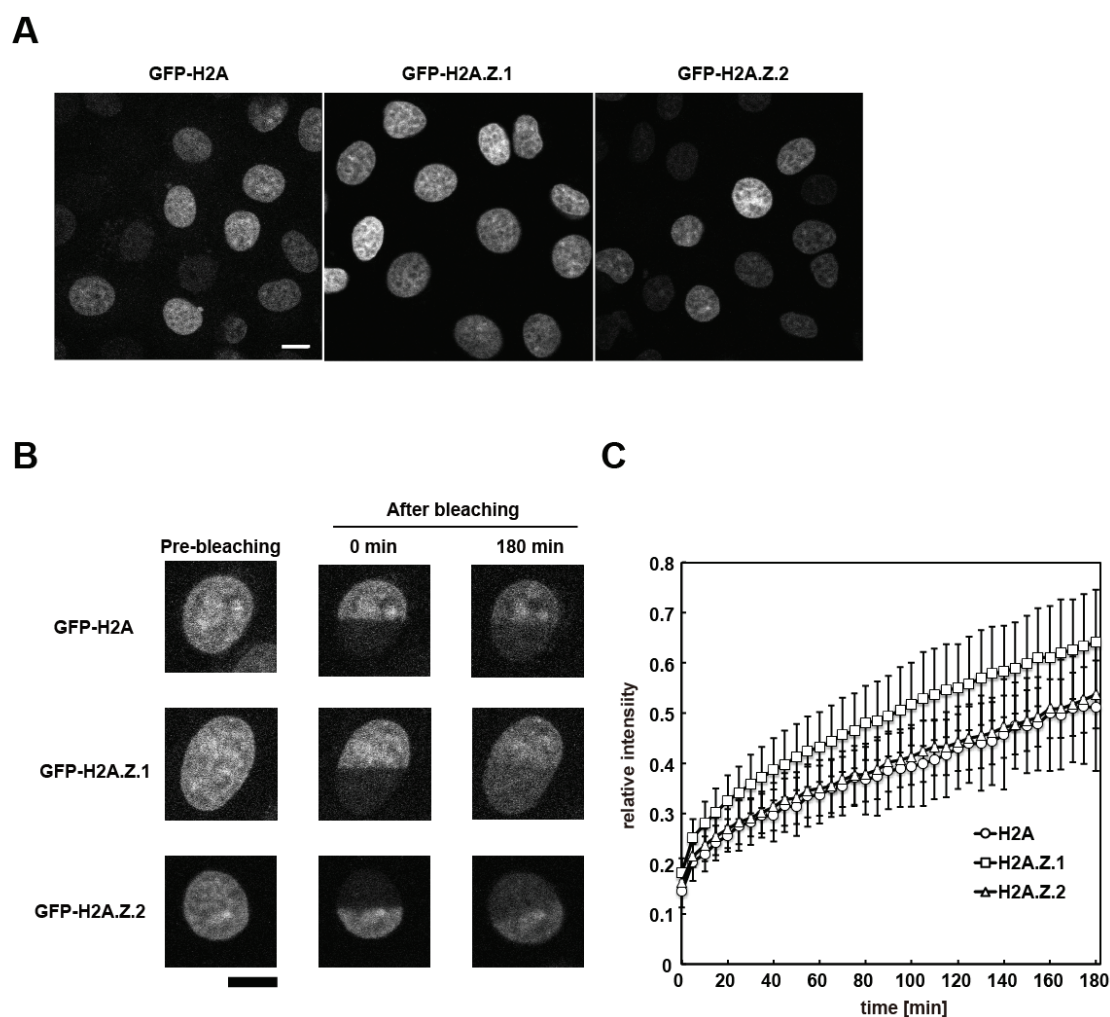


Figure 18. GFP-H2A.Z.1、GFP-H2A.Z.2、および GFP-H2A の細胞内動態解析

(A) GFP 融合ヒストン H2A、H2A.Z.1、H2A.Z.2 が細胞内において同程度発現していることが分かった。(B) FRAP 法によるヒストンの動態解析。レーザー照射前、照射直後、および照射後 180 分における GFP-H2A.Z.1、GFP-H2A.Z.2、GFP-H2A.Z.1 S38T、GFP-H2A.Z.2 T38S の細胞内局在を観察した。直線は 10 μ m を表す。(C) パネル B において、レーザーを照射した領域の蛍光強度を 5 分おきにプロットした。GFP-H2A.Z.1、GFP-H2A.Z.2、および GFP-H2A をそれぞれ白四角、白三角、白丸で示した。11~28 細胞について解析し、標準偏差 (SD) を算出した。

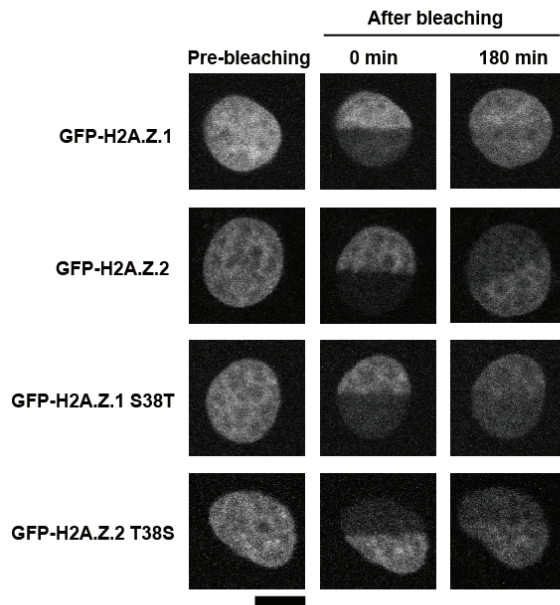
GFPによる蛍光を退色させ、レーザーを照射していない領域からの分子の移動を蛍光回復として解析する手法である (65)。先行研究によって、H2A/H2Bの細胞内動態はH3/H4と比較して早いことが報告されている (66)。このことは、細胞内においてH3/H4はクロマチンと安定に結合しており、H2A/H2Bはクロマチンとの結合および解離が比較的早いことを示している。このことから、ヌクレオソームの構造安定性とヒストンの細胞内動態には関連があると考えられた。そこで、H2A.Z.1、H2A.Z.2、およびH2Aの細胞内動態について解析を行った。実験の結果、H2A.Z.1の蛍光回復は、H2Aと比較してより早いことが明らかになった (Figure 18B,C)。興味深いことに、H2A.Z.1とH2A.Z.2を含むヌクレオソームの構造安定性が同程度であったにもかかわらず、H2A.Z.2の蛍光回復はH2A.Z.1よりも遅いことが明らかになった (Figure 18B,C)。このことから、ヒストンの細胞内動態には、ヌクレオソームの構造安定性だけでなく、他の核内タンパク質による制御もまた重要であることが考えられた。H2A.Z.1とH2A.Z.2は、異なるヒストンシャペロンやクロマチンリモデリング複合体によって、別々の細胞核内経路で制御されているのかもしれない。

4-3-3. GFP-H2A.Z.1 S38T、GFP-H2A.Z.2 T38S の細胞内動態解析

前項の解析によって、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の細胞内における動態が異なることが明らかになった。そこで 3 章における X 線結晶構造解析から明らかになった、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の L1 loop の構造差異とそれらの細胞内動態における違いとの関連について検討した。そのために、L1 loop の構造差異の原因として考えられるアミノ酸、

H2A.Z.1 S38 と H2A.Z.2 T38、を置換した H2A.Z.1 S38T 変異体および H2A.Z.2 T38S 変異体を HeLa 細胞内で恒常的に発現させ、FRAP 法による動態解析を行った。興味深いことに、H2A.Z.1 S38T 変異体は、H2A.Z.1 と比較して蛍光回復の速度が低下することが明らかとなった (Figure 19)。また H2A.Z.2 T38S 変異体は、H2A.Z.2 と比較して蛍光回復の速度が上昇することが分かった。これらのことから、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の L1 loop 領域は、それらの細胞核内における動態制御に重要な領域であることが明らかになった。しかし、変異体 H2A.Z.1 S38T および H2A.Z.2 T38S は、それぞれ H2A.Z.2 および H2A.Z.1 の細胞内動態と完全には一致しないことも分かった。H2A.Z.1 と H2A.Z.2 は 3 アミノ酸異なり、H2A.Z.1 S38 と H2A.Z.2 T38 の他に H2A.Z.1 T14 と H2A.Z.2 A14、および H2A.Z.1 V127 と H2A.Z.2 A127 のアミノ酸置換がある。この 2 アミノ酸は運動性が高く、結晶構造中では電子密度が観察されないテール領域に存在する (Figure 20)。したがって、これらのアミノ酸はヌクレオソームの構造安定性には影響を与えないと考えられるが、テール領域はクロマチン結合因子との相互作用に重要な領域であることから、このようなテール領域におけるアミノ酸置換は、ヒストン結合因子との相互作用を介して、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の細胞内動態に影響を及ぼすことが考えられた。

A



B

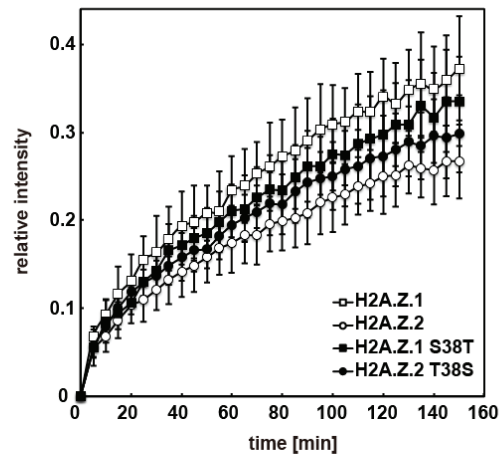


Figure 19. GFP-H2A.Z.1 S38T および GFP-H2A.Z.2 T38S の細胞内動態解析

(A) FRAP 法によるヒストンの動態解析。レーザー照射前、照射直後、および照射後 180 分における GFP-H2A.Z.1、GFP-H2A.Z.2、GFP-H2A.Z.1 S38T、GFP-H2A.Z.2 T38S の細胞内局在を観察した。直線は 10 μm を表す。(B) パネル A において、バックグラウンドの蛍光強度を差し引いた後、レーザーを照射した領域と照射していない領域の蛍光強度の比を 5 分おきにプロットした。GFP-H2A.Z.1、GFP-H2A.Z.2、GFP-H2A.Z.1 S38T、GFP-H2A.Z.2 T38S をそれぞれ白四角、白丸、黒四角、黒丸で示した。10~16 細胞について解析し、標準偏差 (SD) を算出した。

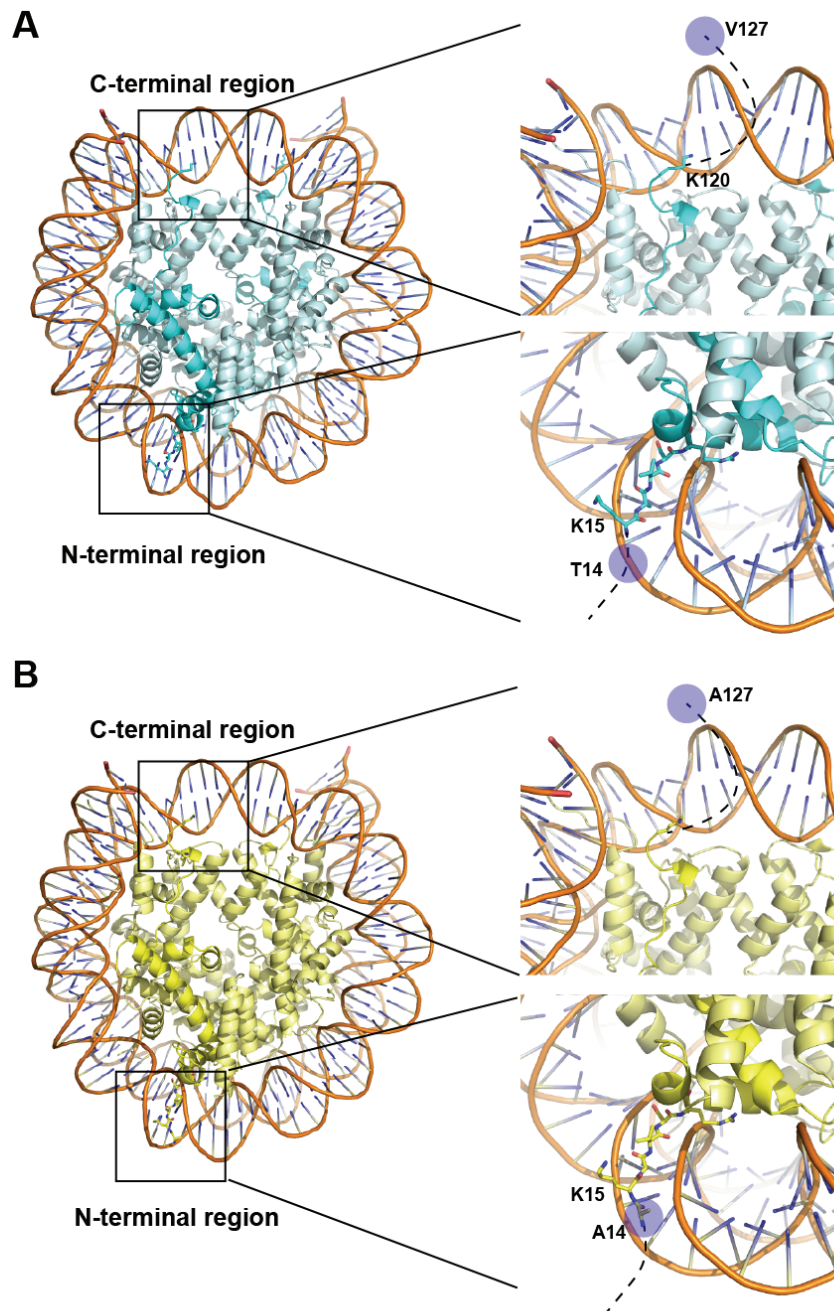


Figure 20. ヌクレオソーム中での H2A.Z.1 および H2A.Z.2 のテール領域

(A) H2A.Z.1 を含むヌクレオソームの立体構造 (PDB code: 3WA9)。四角で囲まれた領域の拡大図を右に示す。H2A.Z.1 分子の電子密度が観察されない領域を点線で示した。テール領域における、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 で異なるアミノ酸部位を青丸で示した。(B) H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの立体構造 (PDB code: 3WAA)。四角で囲まれた領域の拡大図を右に示す。H2A.Z.2 分子の電子密度が観察されない領域を点線で示した。テール領域における、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 で異なるアミノ酸部位を青丸で示した。

5 章 総合討論

5-1. H2A.Z によるクロマチン動態制御

近年のH2A.Zに関する研究によって、H2A.ZはDNAの転写や修復をはじめとするさまざまなDNAの機能に関わることが示唆されてきた。H2A.Zがクロマチンに取り込まれることで高次のクロマチン構造が変動し、DNAの機能が制御されると考えられているが、その詳細なメカニズムについては未だ明らかになっていない。そこで本研究では、H2A.Zによるクロマチンの動態制御機構の基盤を明らかにするために、H2A.Zの立体構造および物理的性質について解析を行った。X線結晶構造解析の結果、H2A.Z.1およびH2A.Z.2を含むヌクレオソームは、H2Aを含むヌクレオソームと比較してL1 loop領域に顕著な構造差異が観察され、さらにH2Aと比較してH2A.Z.1およびH2A.Z.2のL1 loop領域の運動性が高いことが明らかになった (Figure 14,15)。先行研究によって、H2Aバリエントのひとつである、macroH2A.1を含むヌクレオソームのL1 loop領域も特徴的な構造を形成していることが報告されている (67)。このことから、各H2AバリエントにおいてL1 loop領域は固有の構造を形成しており、この特徴的な構造が各H2Aバリエントの特異的な機能に重要であることが示唆された。

転写が活発な遺伝子の転写開始点から上流約200塩基対の領域には、ヌクレオソームが形成されない領域 “nucleosome free region (NFR)”が存在する (68-70)。NFR周辺のクロマチンは、クロマチンリモデリング複合体などによってダイナミックに構造変化し、その結果、RNAポリメラーゼを含む転写装置が効率的に集積すると考えられている (71-76)。H2A.ZはこのNFRの前後に局在することが報告されており、H2A.Zを含むヌクレオソームの構造的な特徴が転写開始点のマークになっていると考えられる (77-81)。そこで、H2A.Z.1およびH2A.Z.2を含むヌクレオソームの転写における特徴的

な性質を明らかにするために、試験管内で再構成したH2A.Z.1およびH2A.Z.2を含むヌクレオソームの構造安定性について検討した。その結果、H2A.Z.1およびH2A.Z.2を含むヌクレオソームは、H2Aを含むヌクレオソームと比較して不安定なヌクレオソームを形成することが明らかになった (Figure 17)。このことから、転写開始点近傍に局在するH2A.Zは、不安定なヌクレオソームを形成することで転写の活性化を制御していることが考えられた。そこで次に、H2A.Z.1およびH2A.Z.2を含むヌクレオソームの細胞内での安定性について検討した。GFP融合のH2A.Z.1およびH2A.Z.2を恒常的に発現させ、細胞内動態を観察した。その結果、H2A.Z.1の細胞内動態はH2Aと比較してより早いことが明らかになった (Figure 18B,C)。このことから、細胞内においてもH2A.Z.1を含むヌクレオソームの不安定性が、H2A.Z.1の動態に影響を及ぼしていることが示唆された。一方で、H2A.Z.2の細胞内動態はH2A.Z.1よりも遅いことが明らかになった (Figure 18B,C)。細胞内におけるヒストンの動態は、ヒストンシャペロンやクロマチンリモデリング複合体によって制御されている。これらの制御因子群はそれぞれのヒストンバリエントに特化していることが考えられているため、H2A.Z.1とH2A.Z.2は異なるヒストンシャペロンやクロマチンリモデリング複合体による制御を受けているのかもしれない。今後ヒストンバリエント特異的なヒストンシャペロンやクロマチンリモデリング複合体が同定されることで、ヒストンバリエントの機能発現のより詳細なメカニズム解明が期待される。また、転写開始点近傍のH2A.Zを含むヌクレオソームには、H3バリエントのひとつであるH3.3が存在することが報告されている (82)。このことから、H2A.ZとH3.3を含むヌクレオソームが細胞核内において特徴的な機能を発現していることが考えられる。試験管内でH3.3およびH2A.Z.1あるいはH2A.Z.2を含むヌクレオソームを再構成し、X線結晶構造解析と構造安定性試験を行うとH3.1およびH2A.Z.1あるいは

H2A.Z.2を含むヌクレオソームと顕著な違いは観察されなかった。このことから、H2A.ZとH3.3が核内で特異的な機能を発現しているとしたら、ヒストンの翻訳後修飾やその他の核内タンパク質が作用することで初めて転写開始点での機能を獲得するのかもしれない。

5-2. H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の機能差異

マウスにおいて、H2A.Z.1 をノックアウトすると胚性致死となることから、H2A.Z.2 は H2A.Z.1 の機能を相補しないことが明らかになった (35)。このことから、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 は異なる機能を有することが示唆されているが、それらの機能差異については全く明らかになっていない。本研究では、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの機能発現の基盤を解明するために、それぞれのヌクレオソームの結晶構造解析、安定性試験、および細胞内動態解析を行った。結晶構造解析の結果、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの立体構造中において、L1 loop に構造差異が観察された (Figure 16)。L1 loop 領域は、ヌクレオソーム中で唯一 2 分子の H2A.Z が相互作用している領域であり、さらに DNA と結合している領域のひとつであることから、この領域における構造差異は H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの性質を決定する重要な領域であると考えられた。

また、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 を含むヌクレオソームを用いて塩耐性試験を行った結果、H2A.Z.1 ヌクレオソームと H2A.Z.2 ヌクレオソームとの間の構造安定性に顕著な違いは観察されなかった。このことから、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 において L1 loop 領域に構造差異が観察されたが、この構造差異はヌクレオソームの構造安定性には影響を及ぼさないことが分かった。一方、驚いたことに H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の細胞内での動態は異

なることが明らかになった (Figure 18B,C)。細胞内動態における H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の違いが L1 loop の構造差異によるものかどうか調べるために、構造差異の原因のアミノ酸である H2A.Z.1 S38 と H2A.Z.2 T38 を置換した H2A.Z.1 S38T 変異体および H2A.Z.2 T38S 変異体の細胞内動態を観察した。その結果、H2A.Z.1 S38T 変異体は H2A.Z.1 よりも蛍光回復速度が低下し、H2A.Z.2 T38S 変異体は H2A.Z.2 よりも蛍光回復速度が上昇した (Figure 19)。このことから、H2A.Z の 38 番目のアミノ酸は H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の細胞内動態に重要であることが明らかになった。H2A.Z の 38 番目のアミノ酸に対応する H2A のアミノ酸は 36 番目のリジン (H2A K36)であり、この H2A K36 はアセチル化やクロトニル化を受けることが報告されている (8)。H2A.Z.1 S38 や H2A.Z.2 T38 の翻訳後修飾については未だ報告されていないが、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の細胞内動態の違いの原因として、L1 loop 領域の構造変化に加えて、翻訳後修飾やそれを認識する核内タンパク質の違いが考えられた。

これまでの H2A.Z に関する細胞生物学的解析の多くは、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 を区別していなかった。本研究において H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の細胞内動態が異なることが明らかになり、DNA の機能発現制御において H2A.Z.1 と H2A.Z.2 が異なる経路で働くことが示唆された。しかし、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の機能差異の詳細については未だ明らかになっていない。今後、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 のゲノム DNA 上での局在や、それらが制御する遺伝子群を解明すること、さらには H2A.Z.1 および H2A.Z.2 に特異的な相互作用因子を同定することで、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の機能が解明されと考えられる。

5-3. 今後の展望

近年のゲノムワイドの解析によって、転写が活発な遺伝子の転写開始点近傍には、H2A と H2A.Z を 1 分子ずつ含むヘテロなヌクレオソームが存在し、DNA の転写調節に重要であることが報告されている (83)。また先行研究によって、ヌクレオソーム中に H2A と H2A.Z が 1 分子ずつ含まれる場合、H2A および H2A.Z の L1 loop 同士が立体障害を起こすと考えられていた (84)。後に、細胞内および試験管内において H2A と H2A.Z を含むヘテロなヌクレオソームが形成されるという報告がなされたことから (83,85-87)、何らかの要因によってヘテロなヌクレオソームの構造形成が許容されるメカニズムが存在すると考えられる (Figure 21)。さらに近年、ヒストンバリエント、ヒストンの翻訳後修飾、および DNA のメチル化などが協調的にクロマチンの動態制御を担うことが明らかになってきた (88)。H2A.Z は、転写活性化のマーカであるトリメチル化された H3 の 4 番目のリジン、アセチル化された H3 の 9 番目のリジンとクロマチン上で共局在することがゲノミクス解析などによって明らかにされている。今後は、細胞内で形成される H2A と H2A.Z をヘテロに含むヌクレオソームや、H2A.Z と修飾ヒストンを含むヌクレオソームによるクロマチン動態制御機構について解析を行うことで、DNA の機能発現制御における H2A.Z のより詳細な機能解明が期待される。

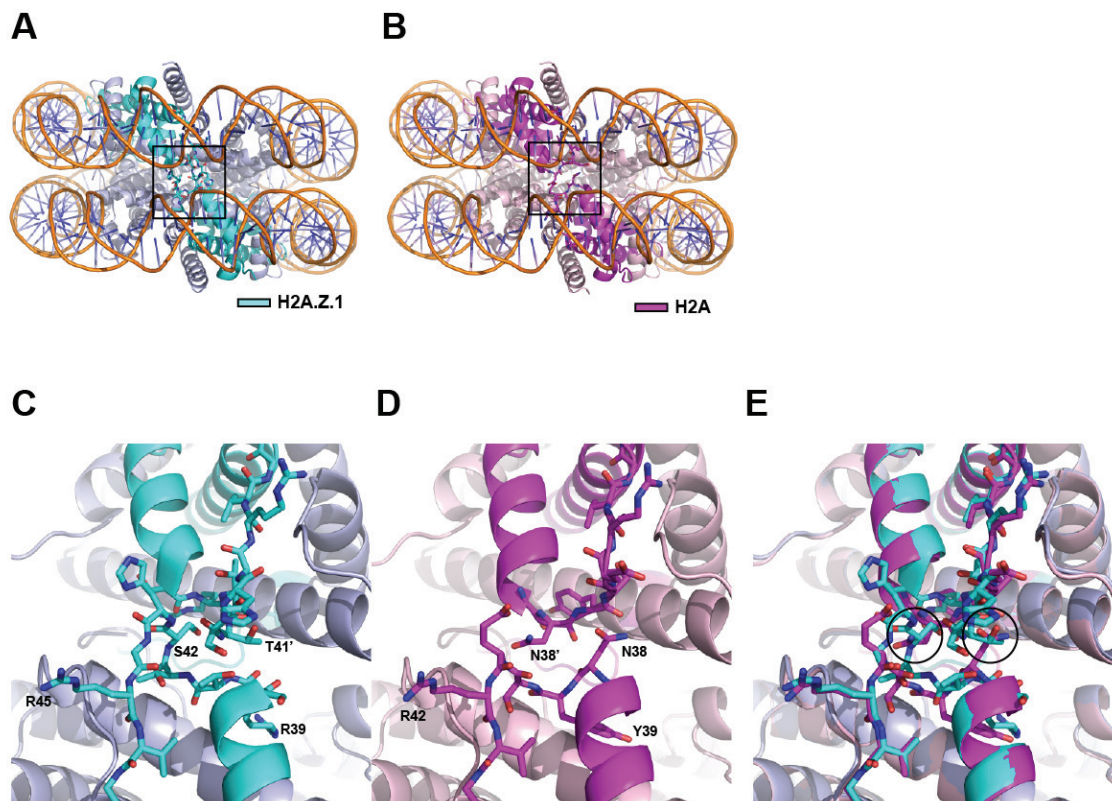


Figure 21. H2A と H2A.Z.1 を含むヌクレオソームの立体障害モデル

(A) H2A.Z.1 ヌクレオソームの立体構造 (PDB code: 3WA9)。四角で囲まれた領域は、H2A.Z.1 の L1 loop 周辺領域である。(B) H2A ヌクレオソームの立体構造 (PDB code: 3AFA)。四角で囲まれた領域は、H2A の L1 loop 周辺領域である。(C) H2A.Z.1 ヌクレオソームの立体構造中の L1 loop 領域の拡大図。(D) H2A ヌクレオソームの立体構造中の L1 loop 領域の拡大図。(E) H2A.Z.1 ヌクレオソームと H2A ヌクレオソームの重ね合わせ。立体障害が起こると予想される領域を丸で示した。

引用文献

1. Kornberg R.D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. (1974) *Science*, **184**, 868-871.
2. Heitz E. Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren. (1929) *Ber. der Deu. Bot. Ges.*, **47**, 274-284.
3. DNA replication and RNA transcription of euchromatic and heterochromatic chromosome regions during grasshopper meiosis. (1974) *Chromosoma*, 43-62.
4. Black JC, Whetstone JR. Chromatin landscape: methylation beyond transcription. (2011) *Epigenetics*, **6**, 9-15.
5. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. (1997) *Nature*, **389**, 251-260.
6. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. (2012) *Nature*, **485**, 376-380.
7. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. (1987) *Science*, **238**, 163-170.
8. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. (2011) *Cell*, **146**, 1016-1028.

9. Kurumizaka H, Horikoshi N, Tachiwana H, Kagawa W. Current progress on structural studies of nucleosomes containing histone H3 variants. (2013) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **23**, 109-115.
10. Elsässer SJ, Huang H, Lewis PW, Chin JW, Allis CD, Patel DJ. DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. (2012) *Nature*, **491**, 560-565.
11. Yen K, Vinayachandran V, Pugh BF. SWR-C and INO80 chromatin remodelers recognize nucleosome-free regions near +1 nucleosomes. (2013) *Cell*, **154**, 1246-1256.
12. Tropberger P, Pott S, Keller C, Kamieniarz-Gdula K, Caron M, Richter F, Li G, Mittler G, Liu ET, Bühler M, Margueron R, Schneider R. Regulation of transcription through acetylation of H3K122 on the lateral surface of the histone octamer. (2013) *Cell*, **152**, 859-872.
13. Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics*. (2010) *Epigenomics*, **2**, 657-669.
14. Ebert A, Lein S, Schotta G, Reuter G. Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. (2006) *Chromosome Res.*, **14**, 377-392.
15. Yuan G, Ma B, Yuan W, Zhang Z, Chen P, Ding X, Feng L, Shen X, Chen S, Li G, Zhu B. Histone H2A ubiquitination inhibits the enzymatic activity of H3 lysine 36 methyltransferases. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 30832-30842.

16. Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, Johnson ES, Berger SL. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 966-976.
17. Kawashima SA, Yamagishi Y, Honda T, Ishiguro K, Watanabe Y. Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. (2010) *Science*, **327**, 172-177.
18. Thompson PR, Fast W. Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? (2006) *ACS Chem. Biol.*, **1**, 433-441.
19. Xhemalce B, Kouzarides T. A chromodomain switch mediated by histone H3 Lys 4 acetylation regulates heterochromatin assembly. (2010) *Genes Dev.*, **24**, 647-652.
20. Kalashnikova AA, Porter-Goff ME, Muthurajan UM, Luger K, Hansen JC. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. (2013) *J. R. Soc. Interface*, **10**, 20121022.
21. Arita K, Isogai S, Oda T, Unoki M, Sugita K, Sekiyama N, Kuwata K, Hamamoto R, Tochio H, Sato M, Ariyoshi M, Shirakawa M. Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **109**, 12950-12955.

22. Watanabe S, Radman-Livaja M, Rando OJ, Peterson CL. A histone acetylation switch regulates H2A.Z deposition by the SWR-C remodeling enzyme. (2013) *Science*, **340**, 195-199.
23. Iwasaki W, Miya Y, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tachiwana H, Shibata T, Kagawa W, Kurumizaka H. Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. (2013) *FEBS Open Bio.*, **3**, 363-369.
24. Manohar M, Mooney AM, North JA, Nakkula RJ, Picking JW, Edon A, Fishel R, Poirier MG, Ottesen JJ. Acetylation of histone H3 at the nucleosome dyad alters DNA-histone binding. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 23312-23321.
25. Bailey AO, Panchenko T, Sathyan KM, Petkowski JJ, Pai PJ, Bai DL, Russell DH, Macara IG, Shabanowitz J, Hunt DF, Black BE, Foltz DR. Posttranslational modification of CENP-A influences the conformation of centromeric chromatin. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **110**, 11827-11832.
26. Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, Shiota H, Debernardi A, Héry P, Curtet S, Jamshidikia M, Barral S, Holota H, Bergon A, Lopez F, Guardiola P, Pernet K, Imbert J, Petosa C, Tan M, Zhao Y, Gérard M, Khochbin S. Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. (2013) *Genes Dev.*, **27**, 1680-1692.
27. Samel A, Cuomo A, Bonaldi T, Ehrenhofer-Murray AE. Methylation of CenH3 arginine 37 regulates kinetochore integrity and chromosome segregation. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **109**, 9029-9034.

28. Talbert PB, Ahmad K, Almouzni G, Ausió J, Berger F, Bhalla PL, Bonner WM, Cande WZ, Chadwick BP, Chan SW, Cross GA, Cui L, Dimitrov SI, Doenecke D, Eirin-López JM, Gorovsky MA, Hake SB, Hamkalo BA, Holec S, Jacobsen SE, Kamieniarz K, Khochbin S, Ladurner AG, Landsman D, Latham JA, Loppin B, Malik HS, Marzluff WF, Pehrson JR, Postberg J, Schneider R, Singh MB, Smith MM, Thompson E, Torres-Padilla ME, Tremethick DJ, Turner BM, Waterborg JH, Wollmann H, Yelagandula R, Zhu B, Henikoff S. (2012) A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics Chromatin*, **5**, e7.
29. Marzluff WF, Wagner EJ, Duronio RJ. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. (2008) *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 843-854.
30. Silva MC, Bodor DL, Stellfox ME, Martins NM, Hocheegger H, Foltz DR, Jansen LE. Cdk activity couples epigenetic centromere inheritance to cell cycle progression. (2012) *Dev. Cell*, **22**, 52-63.
31. Soboleva TA, Nekrasov M, Pahwa A, Williams R, Huttley GA, Tremethick DJ. A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 25-30.
32. Zlatanova J, Thakar A. H2A.Z: view from the top. (2008) *Structure*, **16**, 166-179.
33. van Daal A, Elgin SC. A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. (1992) *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 593-602.
34. Ridgway P, Brown KD, Rangasamy D, Svensson U, Tremethick DJ. Unique residues on the H2A.Z containing nucleosome surface are important for *Xenopus*

- laevis development. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 43815-43820.
35. Faast R, Thonglairoam V, Schulz TC, Beall J, Wells JR, Taylor H, Matthaei K, Rathjen PD, Tremethick DJ, Lyons I. Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 1183–1187.
 36. Jackson JD, Gorovsky MA. Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 3811-3816.
 37. Carr AM, Dorrington SM, Hindley J, Phear GA, Aves SJ, Nurse P. Analysis of a histone H2A variant from fission yeast: evidence for a role in chromosome stability. (1994) *Mol. Gen. Genet.*, **245**, 628-635.
 38. Bönisch C, Hake SB. Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? (2012) *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10719-10741.
 39. Bruce K, Myers FA, Mantouvalou E, Lefevre P, Greaves I, Bonifer C, Tremethick DJ, Thorne AW, Crane-Robinson C. The replacement histone H2A.Z in a hyperacetylated form is a feature of active genes in the chicken. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5633-5639.
 40. Albert I, Mavrich TN, Tomsho LP, Qi J, Zanton SJ, Schuster SC, Pugh BF. Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. (2007) *Nature*, **446**, 572-576.
 41. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. (2007) *Cell*, **129**, 823-837.

42. Zilberman D, Coleman-Derr D, Ballinger T, Henikoff S. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. (2008) *Nature*, **456**, 125-129.
43. Weber CM, Henikoff JG, Henikoff S. H2A.Z nucleosomes enriched over active genes are homotypic. (2010) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 1500-1507.
44. Valdés-Mora F, Song JZ, Statham AL, Strbenac D, Robinson MD, Nair SS, Patterson KI, Tremethick DJ, Stirzaker C, Clark SJ. Acetylation of H2A.Z is a key epigenetic modification associated with gene deregulation and epigenetic remodeling in cancer. (2012) *Genome Res.*, **22**, 307-321.
45. Xu Y, Ayrapetov MK, Xu C, Gursoy-Yuzugullu O, Hu Y, Price BD. Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. (2012) *Mol. Cell*, **48**, 723-33.
46. Adkins NL, Niu H, Sung P, Peterson CL. Nucleosome dynamics regulates DNA processing. (2013) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 836-842.
47. Eirín-López JM, González-Romero R, Dryhurst D, Ishibashi T, Ausió J. The evolutionary differentiation of two histone H2A.Z variants in chordates (H2A.Z-1 and H2A.Z-2) is mediated by a stepwise mutation process that affects three amino acid residues. (2009) *BMC Evol. Biol.*, **9**, e31.
48. Matsuda R, Hori T, Kitamura H, Takeuchi K, Fukagawa T, Harata M. Identification and characterization of the two isoforms of the vertebrate H2A.Z histone variant. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4263-4273.

49. Bönisch C, Schneider K, Pünzeler S, Wiedemann SM, Bielmeier C, Bocola M, Eberl HC, Kuegel W, Neumann J, Kremmer E, Leonhardt H, Mann M, Michaelis J, Schermelleh L, Hake SB. H2A.Z.2.2 is an alternatively spliced histone H2A.Z variant that causes severe nucleosome destabilization. (2012) *Nucleic Acids Res.*, **40**, 5951-5964.
50. Wratting D, Thistlethwaite A, Harris M, Zeef LA, Millar CB. A conserved function for the H2A.Z C terminus. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 19148-19157.
51. Horikoshi N, Tachiwana H, Saito K, Osakabe A, Sato M, Yamada M, Akashi S, Nishimura Y, Kagawa W, Kurumizaka K. Structural and biochemical analyses of the human PAD4 variant encoded by a functional haplotype gene. (2011) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **67**, 112-118
52. Tachiwana H, Osakabe A, Shiga T, Miya Y, Kimura H, Kagawa W, Kurumizaka H. Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. (2011) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **67**, 578-583.
53. Lis JT, Schleif R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. (1975) *Nucleic Acids Res.*, **2**, 383-389.
54. Tachiwana H, Kagawa W, Osakabe A, Kawaguchi K, Shiga T, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Kurumizaka H. Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **107**, 10454-10459.
55. Hanson BL, Alexander C, Harp JM, Bunick GJ. Preparation and crystallization of nucleosome core particle. (2004) *Methods Enzymol.* **375**, 44-62.

56. Juers DH, Matthews BW. Cryo-cooling in macromolecular crystallography: advantages, disadvantages and optimization. (2004) *Q. Rev. Biophys.*, **37**, 105-119.
57. Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. (1997) *Methods Enzymol.*, **276**, 307-326.
58. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AG, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Pottertton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS. Overview of the CCP4 suite and current developments. (2011) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **67**, 235-42.
59. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. and Read, R.J. Phaser crystallographic software. (2007) *J. Appl. Crystallogr.*, **40**, 658-674.
60. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. (2010) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 213-221.
61. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2126-2132.

62. Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. (2010) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 12-21.
63. The Molecular Graphics System; <http://pymol.sourceforge.net/>
64. W. Rasband; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
65. Kimura H. Histone dynamics in living cells revealed by photobleaching. (2005) *DNA Repair*, **28**, 939-950.
66. Kimura H, Cook PR. Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. (2001) *J. Cell Biol.*, **153**, 1341-1353.
67. Chakravarthy S, Gundimella SK, Caron C, Perche PY, Pehrson JR, Khochbin S, Luger K. Structural characterization of the histone variant macroH2A. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 7616-7624.
68. Saragosti S, Moyne G, Yaniv M. Absence of nucleosomes in a fraction of SV40 chromatin between the origin of replication and the region coding for the late leader RNA. (1980) *Cell*, **20**, 65-73.
69. Jakobovits EB, Bratosin S, Aloni Y. A nucleosome-free region in SV40 minichromosomes. (1980) *Nature*, **285**, 263-265.

70. Choder M, Bratosin S, Aloni Y. A direct analysis of transcribed minichromosomes: all transcribed SV40 minichromosomes have a nuclease-hypersensitive region within a nucleosome-free domain. (1984) *EMBO J.*, **3**, 2929-2936.
71. Rosin D, Hornung G, Tirosh I, Gispan A, Barkai N. Promoter nucleosome organization shapes the evolution of gene expression. (2012) *PLoS Genet.*, **8**, e1002579.
72. Yen K, Vinayachandran V, Batta K, Koerber RT, Pugh BF. Genome-wide nucleosome specificity and directionality of chromatin remodelers. (2012) *Cell*, **149**, 1461-1473.
73. Nock A, Ascano JM, Barrero MJ, Malik S. Mediator-regulated transcription through the +1 nucleosome. (2012) *Mol. Cell.*, **48**, 837-48.
74. Möbius W, Osberg B, Tsankov AM, Rando OJ, Gerland U. Toward a unified physical model of nucleosome patterns flanking transcription start sites. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **110**, 5719-5724.
75. Kumar Y, Bhargava P. A unique nucleosome arrangement, maintained actively by chromatin remodelers facilitates transcription of yeast tRNA genes. (2013) *BMC Genomics*, **14**, 402.
76. Byeon B, Wang W, Barski A, Ranallo RT, Bao K, Schones DE, Zhao K, Wu C, Wu WH. The ATP-dependent chromatin remodeling enzyme Fun30 represses transcription by sliding promoter-proximal nucleosomes. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 23182-23193.

77. Mavrich TN, Jiang C, Ioshikhes IP, Li X, Venters BJ, Zanton SJ, Tomsho LP, Qi J, Glaser RL, Schuster SC, Gilmour DS, Albert I, Pugh BF. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. (2008) *Nature*, **453**, 358-362.
78. Rach EA, Winter DR, Benjamin AM, Corcoran DL, Ni T, Zhu J, Ohler U. Transcription initiation patterns indicate divergent strategies for gene regulation at the chromatin level. (2011) *PLoS Genet.*, **7**, e1001274.
79. Tirosh I, Barkai N. Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. (2008) *Genome Res.*, **18**, 1084-1091.
80. Hartley PD, Madhani HD. Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. (2009) *Cell*, **137**, 445-458.
81. Ranjan A, Mizuguchi G, FitzGerald PC, Wei D, Wang F, Huang Y, Luk E, Woodcock CL, Wu C. Nucleosome-free region dominates histone acetylation in targeting SWR1 to promoters for H2A.Z replacement. (2013) *Cell*, **154**, 1232-1245.
82. Jin C, Zang C, Wei G, Cui K, Peng W, Zhao K, Felsenfeld G. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. (2009) *Nat. Genet.* **41**, 941-945.
83. Luk E, Ranjan A, Fitzgerald PC, Mizuguchi G, Huang Y, Wei D, Wu C. Stepwise histone replacement by SWR1 requires dual activation with histone H2A.Z and canonical nucleosome. (2010) *Cell*, **143**, 725-736.

84. Suto RK, Clarkson MJ, Tremethick DJ, Luger K. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1121-1124.
85. Viens A, Mechold U, Brouillard F, Gilbert C, Leclerc P, Ogryzko V. Analysis of human histone H2AZ deposition in vivo argues against its direct role in epigenetic templating mechanisms. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 5325-5335.
86. Chakravarthy S, Bao Y, Roberts VA, Tremethick D, Luger K. Structural Characterization of Histone H2A Variants. (2004) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **69**, 227-234.
87. Nekrasov M, Amrichova J, Parker BJ, Soboleva TA, Jack C, Williams R, Huttley GA, Tremethick DJ. Histone H2A.Z inheritance during the cell cycle and its impact on promoter organization and dynamics. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1076-1083.
88. Bártfai R, Hoeijmakers WA, Salcedo-Amaya AM, Smits AH, Janssen-Megens E, Kaan A, Treeck M, Gilberger TW, François KJ, Stunnenberg HG. H2A.Z demarcates intergenic regions of the plasmodium falciparum epigenome that are dynamically marked by H3K9ac and H3K4me3. (2010) *PLoS Pathog.*, **6**, e1001223.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文を作成するにあたり、貴重な御助言を賜りました早稲田大学理工学術院教授、胡桃坂仁志先生に心より御礼申し上げます。

細胞生物学的解析における多大なるお力添えと、論文を作成するにあたり貴重なご助言を賜りました、大阪大学准教授、木村宏先生並びに大阪大学、林-高中陽子博士に厚く御礼申し上げます。

X線結晶構造解析の基礎から様々なご指導を賜りました、明星大学准教授、香川亘先生並びに理化学研究所、岩崎わかな博士に厚く御礼申し上げます。

研究の基本的な操作を始め様々な御指導、御助言を頂きました、前早稲田大学理工学術院研究院講師、立和名博昭博士、高久誉大博士、両角佑一博士、早稲田大学理工学術院助教、越阪部晃永博士、並びに早稲田大学先進理工学部助手、佐藤浩一博士に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、様々な支援を頂きました胡桃坂研究室の皆様心より感謝致します。

最後に研究生生活を送る上で、常に多大なる支援をしてくれた家族に感謝致します。

研究業績

種 類 別	著者、題名、発表・発行掲載誌名、発表・発行年月
論文	<p>○<u>Naoki Horikoshi</u>, Koichi Sato, Keisuke Shimada, Yasuhiro Arimura, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Yoko Hayashi-Takanaka, Wakana Iwasaki, Wataru Kagawa, Masahiko Harata, Hiroshi Kimura and Hitoshi Kurumizaka. Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 69, pp2431-2439, 2013.</p> <p>○ <u>Naoki Horikoshi</u>, Hiroaki Tachiwana, Kengo Saito, Akihisa Osakabe, Mamoru Sato, Michiyuki Yamada, Satoko Akashi, Yoshifumi Nishimura, Wataru Kagawa and Hitoshi Kurumizaka. Structural and biochemical analyses of the human PAD4 variant encoded by a functional haplotype gene. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 67, pp112-118, 2011.</p> <p>○Hitoshi Kurumizaka, <u>Naoki Horikoshi</u>, Hiroaki Tachiwana and Wataru Kagawa. Current progress on structural studies of nucleosomes containing histone H3 variants. Current Opinion Structural Biology, 23, pp109-115, 2013.</p>
講演	<p>学会発表</p> <ul style="list-style-type: none"> ・国内学会（口頭発表） ○堀越直樹、立和名博昭、島田桂丞、香川亘、越阪部晃永、原田昌彦、胡桃坂仁志 Structural analysis of human nucleosomes containing H2A.Z-1 and H2A.Z-2 第34回日本分子生物学会、2011年12月 ・国内学会（ポスター発表） ○堀越直樹、立和名博昭、島田桂丞、香川亘、越阪部晃永、原田昌彦、木村宏、胡桃坂仁志 ヒト H2A.Z-1、H2A.Z-2 を含むヌクレオソームの生化学的および構造生物学的解析 第29回染色体ワークショップ、2012年1月 ・国内学会（口頭発表およびポスター発表） ○堀越直樹、立和名博昭、香川亘、越阪部晃永、原田昌彦、木村宏、胡桃坂仁志 ヌクレオソームにおけるヒストン H2A.Z バリエント交換機構の構造生物学的解析 第6回日本エピジェネティクス研究会年会、2012年5月

講演	<ul style="list-style-type: none"> ・国内学会（口頭発表およびポスター発表） ○堀越直樹、立和名博昭、香川亘、有村泰宏、越阪部晃永、島田桂丞、原田昌彦、木村宏、胡桃坂仁志 H2A.Zを含むヌクレオソームの構造生物学的および生化学的解析 第35回日本分子生物学会、2012年12月 ・国内学会（口頭発表） ○堀越直樹、立和名博昭、香川亘、越阪部晃永、有村泰宏、佐藤浩一、鯨井智也、田口裕之、島田桂丞、原田昌彦、木村宏、胡桃坂仁志 ヒト H2A.Zを含むヌクレオソームの機能解析 第30回染色体ワークショップ、第11回核ダイナミクス研究会、2012年12月 ・国内学会（口頭発表およびポスター発表） ○堀越直樹、佐藤浩一、立和名博昭、香川亘、有村泰宏、越阪部晃永、鯨井智也、田口裕之、島田桂丞、木村宏、胡桃坂仁志 ヒト H2A/H2A.Z.1を含むハイブリッドヌクレオソームの機能解析 第86回日本生化学会大会、2013年9月
著書	<p>実験医学別冊 核酸実験の原理とプロトコール、pp103-107 担当 羊土社、2011年6月</p>
受賞	<p>第6回日本エピジェネティクス研究会年会ポスター賞 第86回日本生化学会大会 鈴木紘一メモリアル賞</p>
その他	<p><論文></p> <p>Naoki Horikoshi, Yuichi Morozumi, Motoki Takaku, Yoshimasa Takizawa and Hitoshi Kurumizaka. Holliday junction-binding activity of human SPF45. Genes to Cells, 15, pp373-383, 2010.</p> <p>Motoki Takaku, Takashi Tsujita, Naoki Horikoshi, Yoshimasa Takizawa, Yong Qing, Kouji Hirota, Masae Ikura, Tsuyoshi Ikura, Shunichi Takeda and Hitoshi Kurumizaka. Purification of the Human SMN-GEMIN2 Complex and Assessment of Its Stimulation of RAD51-Mediated DNA Recombination Reactions. Biochemistry, 50, pp6797-6805, 2011.</p> <p>Teru Kanda, Naoki Horikoshi, Takayuki Murata, Daisuke Kawashima, Atsuko Sugimoto, Yohei Narita, Hitoshi Kurumizaka and Tatsuya Tsurumi. Interaction between basic residues of Epstein-Barr virus EBNA1 protein and cellular chromatin mediates viral plasmid maintenance. Journal of Biological Chemistry, 16, pp24189-24199, 2013.</p> <p>Wakana Iwasaki, Yuta Miya, Naoki Horikoshi, Akihisa Osakabe, Hiroyuki Taguchi, Hiroaki Tachiwana, Takehiko Shibata, Wataru Kagawa and Hitoshi Kurumizaka. Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. FEBS Open Bio, 3, pp363-369, 2013.</p>

その他	<p>< 論文 ></p> <p>Hiroshi Yokoyama, takahiro Yamashita, <u>Naoki Horikoshi</u>, Hitoshi Kurumizaka and Wataru Kagawa. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the secreted protein Athe_0614 from Caldicellulosiruptor bescii. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and crystallization communications, 69, pp438-40, 2013.</p> <p>Yuko Sato, Masanori Mukai, Jun Ueda, Michiko Muraki, Timothy J. Stasevich, <u>Naoki Horikoshi</u>, Tomoya Kujirai, Hiroaki Kita, Taisuke Kimura, Seiji Hira, Yasushi Okada, Yoko Hayashi-Takanaka, Chikashi Obuse, Hitoshi Kurumizaka, Atsuo Kawahara, Kazuo Yamagata, Naohito Nozaki and Hiroshi Kimura. Genetically encoded system to track histone modification in vivo. Scientific Reports, 3, Article number: 2436, 2013.</p>
-----	---