

ヘキサソームおよび H2A.B ヌクレオソーム  
の構造と機能に関する研究

Structural and functional studies of  
hexasome and H2A.B nucleosome

2015 年 2 月

有村 泰宏

Yasuhiro ARIMURA

ヘキサソームおよび H2A.B ヌクレオソーム  
の構造と機能に関する研究

Structural and functional studies of  
hexasome and H2A.B nucleosome

2015 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

有村 泰宏

Yasuhiro ARIMURA

# 目次

略語一覧 .....	4
<b>第 1 章 序論 .....</b>	<b>5</b>
1-1 真核生物のゲノム DNA とクロマチン .....	5
1-2 クロマチンとヌクレオソーム .....	6
1-3 ヌクレオソームの構造 .....	7
1-4 ヒストンの組成や配置の異なるヌクレオソーム .....	11
1-5 ヒストンバリエント .....	14
1-6 ヌクレオソームと DNA の複製・修復 .....	19
1-7 本研究について .....	21
<b>第 2 章 実験方法 .....</b>	<b>23</b>
2-1 ヒトのリコンビナントヒストンの発現と精製 .....	23
2-2 ヒストン複合体の再構成と精製 .....	25
2-3 ヌクレオソーム DNA の調製 .....	26
2-4 ヌクレオソームの試験管内再構成および精製 .....	28
2-4-1 193 塩基対の DNA を含むオクタソームおよびヘキサソームの 精製 .....	28
2-4-2 112 塩基対の DNA を含むヘキサソームの再構成および精製 .....	29
2-4-3 146 塩基対より短い DNA を用いたヌクレオソームの形成効率 試験 .....	30

2-4-4 145 塩基対の DNA を用いた H2A.B ヌクレオソームの再構成と 精製.....	3 0
2-5 動的光散乱解析 .....	3 1
2-5-1 193 塩基対の DNA を含むヘキサソームおよびオクタソームの 動的光散乱解析.....	3 1
2-5-2 H2A オクタソームおよび H2A.B オクタソームの動的光散乱解析.....	3 1
2-6 MNase を用いた試験 .....	3 1
2-7 X 線小角散乱解析.....	3 2
2-7-1 ヘキサソームの X 線小角散乱解析 .....	3 2
2-7-2 H2A.B ヌクレオソームの X 線小角散乱解析.....	3 3
2-8 DNA 損傷導入時の H2A.B の細胞内局在解析.....	3 3

### 第 3 章 ヘキサソームの生化学的解析および構造生物学的解析 3 6

3-1 序 .....	3 6
3-2 193 塩基対の DNA を含むヘキサソームの試験管内再構成および精製.....	3 6
3-3 ヘキサソームを構成する DNA の塩基長の解析 .....	3 9
3-4 動的光散乱法によるヘキサソームの粒子径測定.....	4 2
3-5 X 線小角散乱によるヘキサソームの構造解析.....	4 6
3-6 第 3 章まとめ .....	4 9



<b>第4章 H2A.B を含むヌクレオソームの生化学的解析および</b>	
<b>構造生物学的解析 .....</b>	<b>5 3</b>
4-1 序 .....	5 3
4-2 DNA 損傷に対する H2A.B の細胞内動態解析.....	5 4
4-3 146 塩基対以下の短い DNA を用いたヌクレオソーム形成効率試験.....	5 7
4-4 145 塩基対の DNA および H2A.B を含むヌクレオソームの試験管内	
再構成 .....	6 3
4-5 H2A.B を含むヌクレオソームの動的散乱解析.....	6 5
4-6 X 線小角散乱による H2A.B を含むヌクレオソームの構造解析.....	6 5
4-7 第4章まとめ .....	7 0
<b>第5章 総合討論 .....</b>	<b>7 2</b>
5-1 ヘキサソームの構造と生物学的意義 .....	7 2
5-2 ヘキサソームの機能の理解に向けた今後の展開 .....	7 3
5-3 H2A.B を含むヌクレオソームの生物学的意義.....	7 5
5-4 H2A.B を含むヌクレオソームの構造.....	7 6
5-5 H2A.B を含むヌクレオソームの機能の理解に向けた今後の展開.....	7 7
5-6 多種多様なヌクレオソームとその機能 .....	7 9
引用文献 .....	8 2
謝辞 .....	1 0 0
研究業績 .....	1 0 1

## 略語一覽

$\alpha$ -sat	:	$\alpha$ - satellite
bp	:	Base pair
CBB	:	Coomassie Brilliant Blue
DLS	:	Dynamic Light Scattering
$D_{\max}$	:	Maximum inter-atomic distance
DNA	:	Deoxyribonucleic acid
DTT	:	Dithiothreitol
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	:	Ethidium bromide
FRAP	:	Fluorescence Recovery after Photobleaching
MNase	:	Micrococcal Nuclease
PAGE	:	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCNA	:	Proliferating cell nuclear antigen
PDB	:	Protein Data Bank
$R_g$	:	Radius of gyration
RNA	:	Ribonucleic acid
RNAP II	:	RNA polymerase II
SANS	:	Small angle neutron scattering
SAXS	:	Small angle X-ray scattering

## 第 1 章 序論

### 1-1. 真核生物のゲノム DNA とクロマチン

DNA は現存のほぼ全ての生物種において遺伝情報の担体として機能している。生物を構築する細胞のそれぞれが、ゲノム DNA の塩基配列を RNA に転写し、さらに合成された RNA の一部の塩基配列を翻訳し、タンパク質を合成することで、ゲノム DNA に保存された遺伝情報を読み出して利用している。真核生物では、ゲノム DNA はクロマチンと呼ばれる DNA-タンパク質複合体として存在している。多細胞生物においては、適切な組織で、適切な時期に、適切な遺伝子が読み取られて発現することで、各々の細胞がそれぞれの役割を果たしている。このような DNA の適切な機能発現の制御に、クロマチンが重要な機能を担っていると考えられている (Li et al., 2007; Luger et al., 2012)。

クロマチンはゲノム上のさまざまな領域で異なった構造形態で存在しており、高等真核細胞の間期核の DNA を染色して観察すると、濃く染色されるヘテロクロマチンとよばれる部分と、薄く染色されるユークロマチンとよばれる部分の 2 種類のクロマチン形態が存在することが観察される。ヘテロクロマチンは高度に凝縮したクロマチン形態を形成しているが、一方で、ユークロマチンは凝集度の低いクロマチン形態を形成している。ショウジョウバエにおいて、染色体の逆位によってヘテロクロマチン領域の近傍に転座した遺伝子が、単一の個体中で細胞ごとにモザイク状に発現する *position effect variegation* (PEV) という現象が発見されて以降、クロマチン構造と遺伝子発現の関係が議論されるようになった (Muller, 1930; Henikoff, 1990)。これらの解析の結果、全般的にヘテロクロマチン領域内に含まれる遺伝子は転写が抑制される傾向にあり、対照的に

ユークロマチン領域内に含まれる遺伝子は転写が活性化される傾向にあることが明らかになった (Henikoff, 1990; Beisel and Paro, 2011)。またヘテロクロマチンにも様々な種類が存在し、転写制御の他に特殊な機能を付加されたものもある。このような例として、染色体末端の保護を担うテロメアのヘテロクロマチンや、動原体形成を誘導するセントロメアのヘテロクロマチンなどが挙げられる (Karpen and Spradling, 1992; Ahmad and Golic, 1998; Lo et al., 2001; Beisel and Paro, 2011)。このように、クロマチン構造はゲノム DNA の各領域において転写抑制や促進、さらにはテロメアやセントロメアのような特異的な染色体機能領域の確立に寄与している。

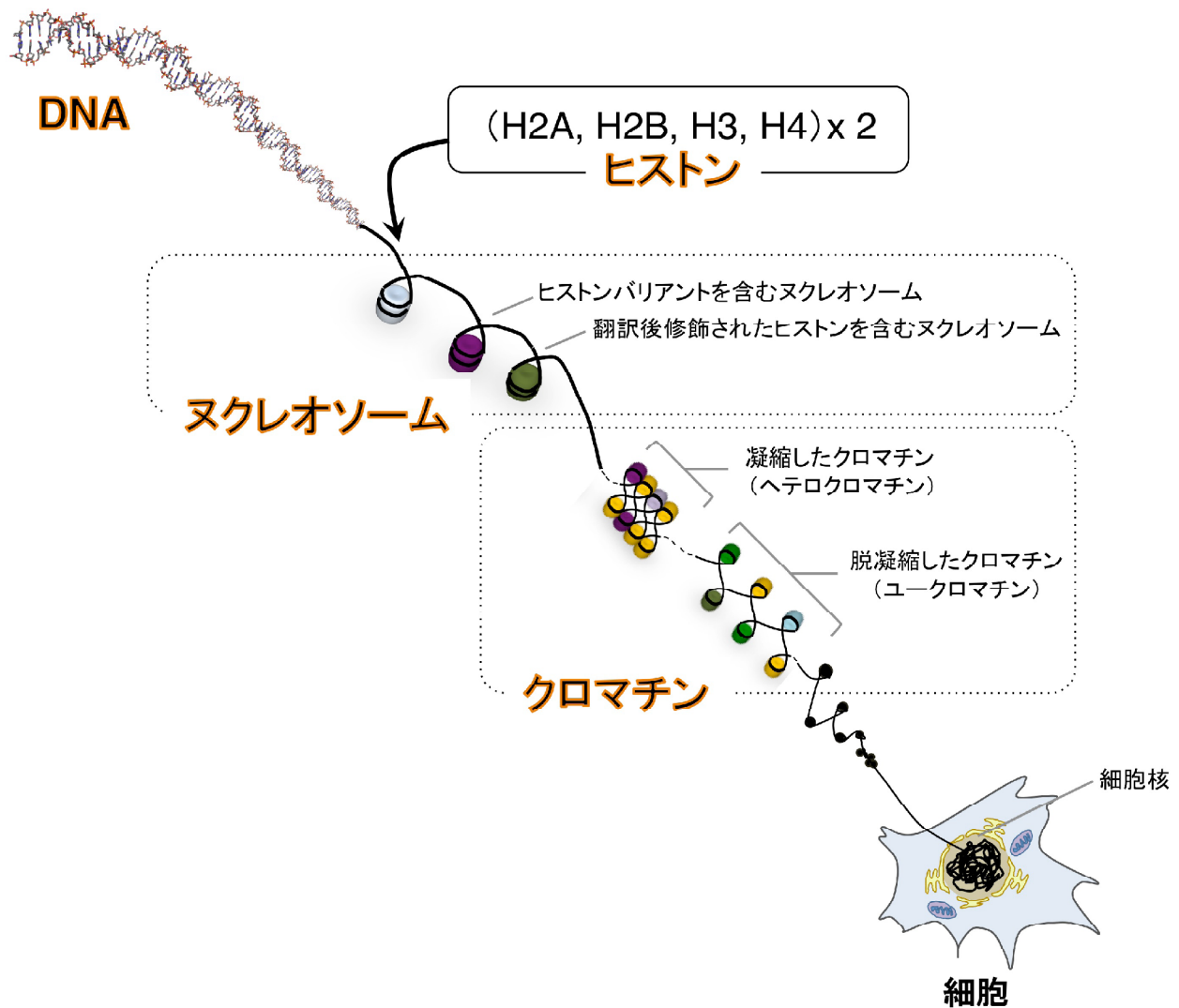
## 1-2. クロマチンとヌクレオソーム

クロマチンの基本構造単位はヌクレオソームであり、ヌクレオソームは 145-147 塩基対の DNA が、4 種類のヒストンタンパク質 (H2A、H2B、H3 および H4) 各 2 分子ずつから形成されるヒストン八量体に巻き付いた構造である (Kornberg, 1974; Noll, 1974; Olins, A. and Olins, D., 1974; Luger et al., 1997)。ヒトの場合、ゲノム DNA 上の全域に平均 192 塩基対に一つの割合でヌクレオソームが連なって形成されている (Gaffney, 2012)。各ヒストンには、アミノ酸類似性の高い、ヒストンバリエーションとよばれるヒストンの相同体が存在することが知られている (Talbert et al., 2012; Maze et al. 2014)。また、各ヒストンには様々な翻訳後修飾が導入される (Li et al., 2007; Suganuma and Workman, 2011; Tessarz and Kouzarides, 2014)。ヌクレオソームにヒストンバリエーションが含まれることや、ヒストンに翻訳後修飾が導入されることで、多種多様なヌクレオソームを形成

することが可能となっている。各種のヒストンバリエーションや翻訳後修飾は、ゲノム DNA 上でそれぞれ異なる局在パターンを示し、遺伝子のプロモーター領域や転写が活性化された遺伝子本体、転写抑制された遺伝子本体、テロメアやセントロメアといった特化した機能を有する領域など、様々な DNA 配列上で、それぞれが使い分けられている (Barski et al., 2007; Goldberg et al., 2010; Palmer et al., 1987; Maze et al., 2014) (図 1)。さらにヌクレオソームの中には、ヒストンの構成が通常とは異なり、六量体のヒストン複合体から構成されるヘキサソームや十四量体のヒストン複合体から構成されるオーバーラッピングダイヌクレオソームなどが存在し、このようなヌクレオソームが転写活性化などの核内イベントに伴って形成されることが示唆されている (Baer and Rhodes 1983; Engholm et al., 2009; Cole et al., 2014; Rhee et al., 2014)。このような、ヒストンバリエーションや翻訳後修飾を含んだヌクレオソーム、およびヒストン構成が通常と異なるヌクレオソームがゲノム DNA 上に形成されることで、ヘテロクロマチンやユークロマチンなどの凝縮度や転写活性化度の異なるクロマチンや、テロメアやセントロメアのように特化した機能を有するクロマチンなどを、ゲノム DNA 上の特定の領域上に構築することが可能になると考えられている (Luger et al. 2012) (図 1)。

### 1-3. ヌクレオソームの構造

1997 年にアフリカツメガエルのヌクレオソームの原子分解能での立体構造が Luger 博士らの X 線結晶構造解析によって発表されて以降、ヒトやニワトリ、ハエなど異なる生物種のヌクレオソームや、ヒストンバリエーションを含むヌクレオ



**図 1. 真核生物のゲノムDNAとクロマチンのモデル図。**

遺伝情報の担体であるゲノムDNAは、ヌクレオソームが連なったクロマチンとよばれる高次構造を形成して細胞核内に収納されている。ヌクレオソームにヒストンバリエントが含まれることや、ヒストンに翻訳後修飾が導入されることで、ゲノムDNA上には多種多様なヌクレオソームが形成されている。これらのヌクレオソームがゲノムDNA上の各領域でそれぞれ使い分けられることで、ヘテロクロマチンやユークロマチンなどの凝縮度や転写レベルの異なるクロマチンや、テロメアやセントロメアのように特化した機能を有するクロマチンなどを構築することが可能になると考えられている(DNAのスティック図はPDB ID: 3AFAのものを編集)。

ソーム、DNA の種類の異なるヌクレオソーム、ヌクレオソーム結合タンパク質との複合体など、様々なヌクレオソームの立体構造が X 線結晶解析によって明らかにされてきた (Luger et al., 1997; Tan et al., 2011; Kurumizaka et al., 2013)。これまでに X 線結晶構造が報告されたヌクレオソームは、CENP-A ヌクレオソームを除いて、非常に類似した構造であり、145-147 塩基対の DNA が 4 種類のヒストンタンパク質を各 2 分子ずつ含むヒストン八量体に巻き付いた構造を形成している (Tachiwana et al., 2011; Tan et al., 2011; Kurumizaka et al., 2013) (図 2A)。各ヒストンの N 末端側と H2A の C 末端には、“ヒストンテール領域” とよばれる領域が存在し、この領域の大部分は定まった構造を持たず、X 線結晶構造解析によって構造決定することが出来ない (図 2A, 図 2B)。さらに各ヒストンは中央部分にヒストンフォールドドメインとよばれる 3 つの $\alpha$ -ヘリックスからなるドメインを有し、この領域を介して H2A と H2B、および H3 と H4 がそれぞれ hand-shake モチーフとよばれるモチーフを形成してヘテロ二量体として結合している (図 2B, 図 2C)。ヌクレオソームの構造中では 145 塩基対のヌクレオソーム DNA の中央に 2 つの H3-H4 複合体が結合し、その外側に H2A-H2B 複合体が 1 つずつ結合している (図 2A, 図 2C)。生体内において、ゲノム DNA 上にヒストンを導入してヌクレオソームを形成する活性および、ヒストンを取り除いてヌクレオソーム構造を解消する活性は、ヒストンシャペロンやクロマチンリモデリング因子といったタンパク質もしくはタンパク質複合体によって触媒される。ヒストンシャペロンやクロマチンリモデリング因子によるヒストンの結合は、H2A-H2B 複合体もしくは H3-H4 複体の単位で行われており、ゲノム DNA 上においてヌクレオソームが形成される場合やヌクレオソ

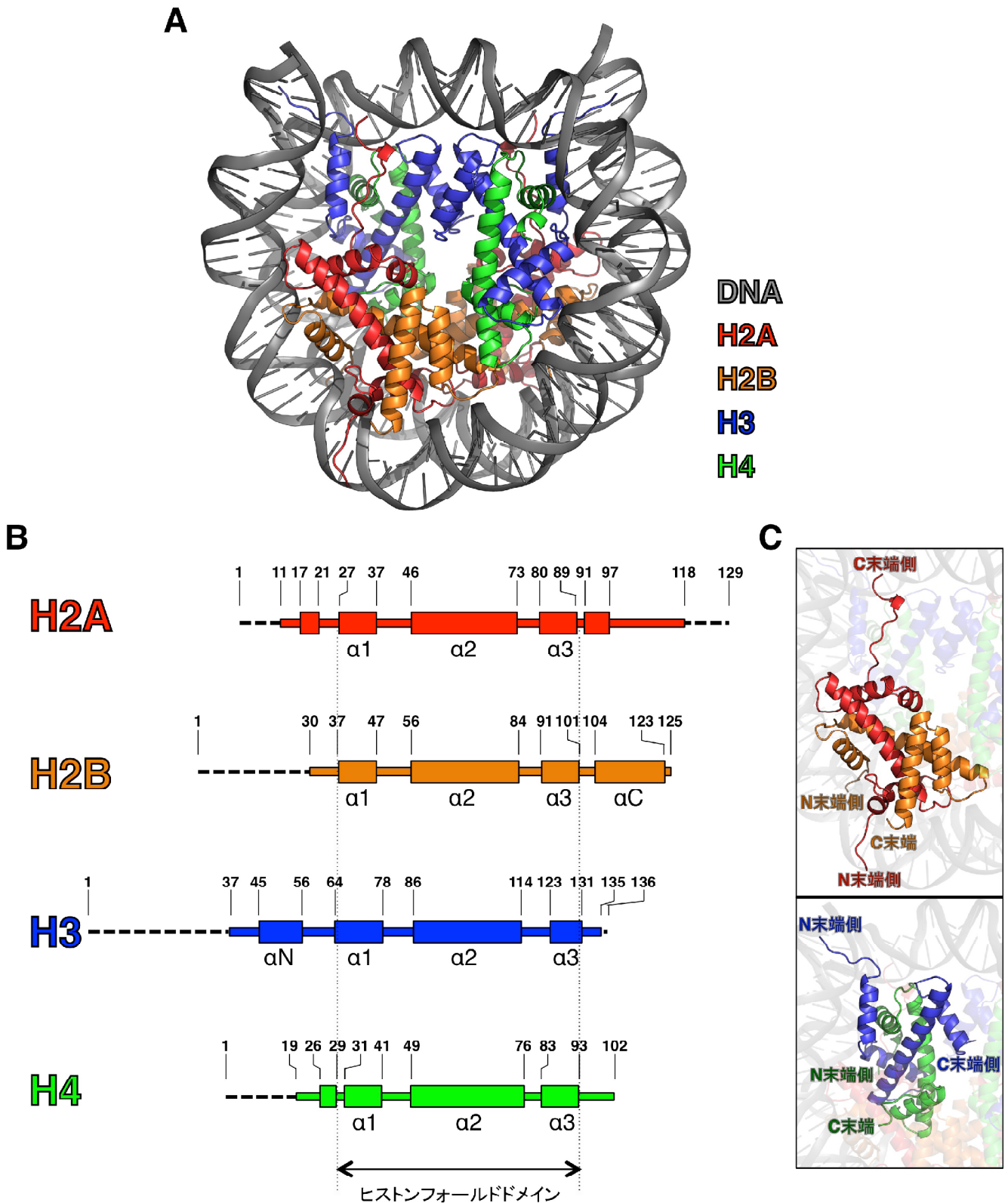


図 2. ヒストン8量体からなるヌクレオソームの立体構造とヒストンの構造。

(A) ヒトのヌクレオソームの立体構造(PDB ID: 3AFA)をリボン図で示した。

(B) 各ヒストンの二次構造。色付きの実線はX線結晶構造解析によって構造が決定している領域、破線は構造が揺らぎやすいためX線結晶構造解析によって構造決定されていない領域、長方形は $\alpha$ -ヘリックス構造、上部の数字はアミノ酸番号をそれぞれ示している。

(C) ヌクレオソーム構造中のH2A-H2B複合体(上段)およびH3-H4複合体(下段)。H2AとH2B、H3とH4はそれぞれヒストンフォールドドメインを介してヘテロ2量体を形成している。

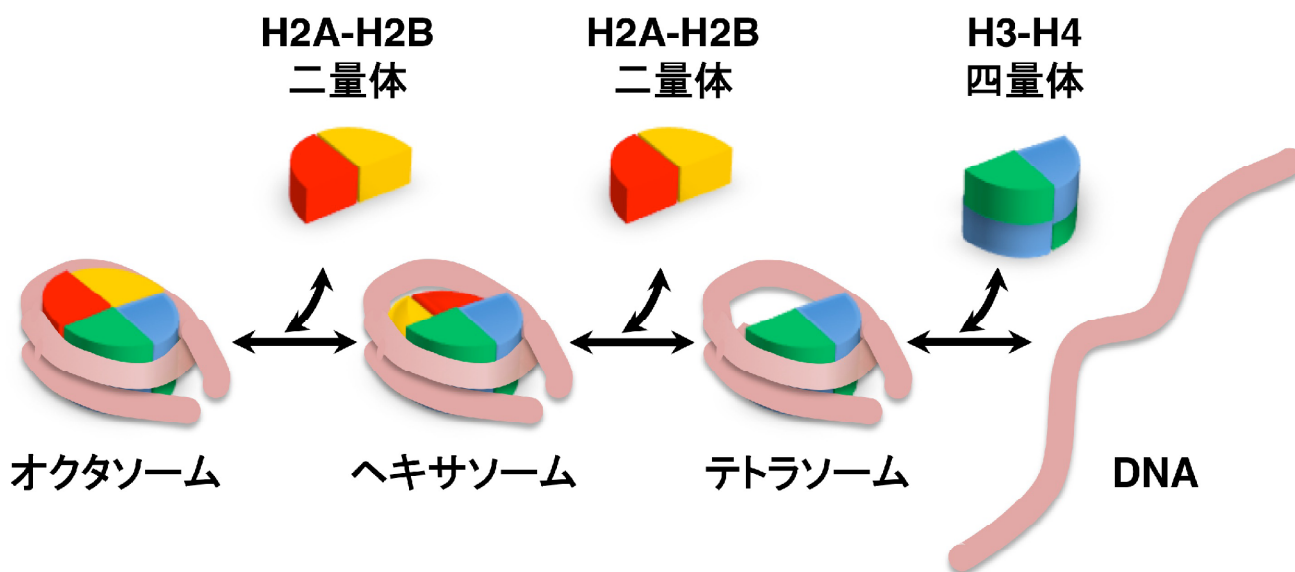


ーム構造が解消される場合には、H2A-H2B 複合体もしくは H3-H4 複合体の単位でヒストンが移動する (Das et al., 2010; Ransom et al., 2010)。

#### 1-4. ヒストンの組成や配置の異なるヌクレオソーム

生体内に存在するヌクレオソームの中には、ヒストンの組成や配置、DNA の巻き付く方向が、図 2A に示したような通常型のヌクレオソームとは異なるもの (サブヌクレオソーム) が存在すると考えられている。これらは通常型のヒストン八量体に DNA が左巻きに巻き付いたヌクレオソーム (オクタソーム) とは区別してよばれることもある。このようなサブヌクレオソームの例として、六量体のヒストン複合体に DNA が巻き付いた“ヘキサソーム”や、十四量体のヒストン複合体に DNA が巻き付いた“オーバーラッピングダイヌクレオソーム”などの存在が示唆されている (Lavelle and Prunell, 2007; Zlatanova et al., 2009)。ヘキサソームのヒストン六量体は 2 分子の H3 および H4 と、1 分子の H2A および H2B で構成され、オーバーラッピングダイヌクレオソームのヒストン十四量体は 4 分子の H3 および H4 と、3 分子の H2A および H2B で構成される。加えて、それぞれ 1 分子の H2A、H2B、H3 および H4 で構成される四量体のヒストン複合体に、DNA が、通常型のヌクレオソームとは逆の、右向きに巻き付いた“ヘミソーム”の存在も議論されている。しかし、これらのヌクレオソームは、細胞内において通常型のヌクレオソームとの区別が困難であるため、局在や機能を解析することが困難であり、試験管内において調製する際にも通常型のヌクレオソームが同時に形成されるために、単離が困難であり、これらに関連する解析はほとんど行われていない状況である。

本論文の第3章で主に扱うヘキサソームは、オクタソーム形成および、オクタソーム解離の中間体であり、DNAの転写・複製・修復といったDNA代謝の過程において形成されると考えられている（図3）（Lavelle and Prunell, 2007; Zlatanova et al., 2009）。特にヘキサソームと転写との関連性は古くから議論されており、1983年にBaer博士らによって、細胞核から調製したヌクレオソームおよびRNAポリメラーゼII（RNAPII）を混合すると、ヘキサソームとRNAPIIの複合体が形成され、この複合体には、転写が活性化された領域のDNAが優先的に取り込まれていることが報告された（Baer and Rhodes, 1983）。また、試験管内において、オクタソームを形成したDNAを鋳型としてRNAPIIによる転写反応を行った際には、オクタソームからH2A-H2Bが1組解離し、転写後の鋳型DNAにはヘキサソームが形成されていることが報告されている（Kireeva et al., 2002; Kulaeva et al., 2009）。加えて、同様の転写解析において、ヒストンシャペロンやクロマチンリモデリング因子を加えることで、ヘキサソームの形成に伴って転写が活性化することも報告されている（Belotserkovskaya et al., 2003; Kuryan et al., 2012）。HeLa細胞を用いたライブセルイメージング解析によって、H2Bは、H3やH4よりもクロマチンへの取り込みと解離のサイクルが早く、特に転写が活性化されたDNA上においてその傾向が顕著であることが示されている（Kimura and Cook, 2001）。さらに、ごく最近に、酵母を用いた解析により、転写が活性化された遺伝子配列上に結合するH2Bの量が転写の活性化に伴い、H4の半分程度まで減少することが示された（Cole et al., 2014）。これらの知見により、転写の過程におけるヘキサソームの形成が強く示唆されている。しかし、ヘキサソームの立体構造や物理的な性質は不明なままであり、ヘキサソ-



### 図 3. ヘキサソームの形成過程

ヘキサソームはそれぞれ2分子のH3およびH4と、それぞれ1分子のH2AおよびH2Bから形成される六量体のヒストン複合体にDNAが巻き付いたヌクレオソームである。ヘキサソームは通常型の八量体のヒストン複合体にDNAが巻き付いたヌクレオソーム(オクタソーム)からH2A-H2B複合体が1組脱落することや、それぞれ2分子のH3およびH4からなる四量体にDNAが巻き付いたヌクレオソーム(テトラソーム)にH2A-H2B複合体が1組結合することで形成される。生体内ではDNAの転写・複製・組換えといったDNA代謝の過程に伴ってこのようなヒストンの移動が盛んになり、ヘキサソームが形成されると考えられている。

ムによる転写の制御メカニズムの詳細は明らかになっていない。

## 1-5. ヒストンバリエーション

ヒストンバリエーションは主要型のヒストンとアミノ酸配列が数%から 50%程度異なるヒストンである。多くの生物種のゲノムにおいて、主要型ヒストンの遺伝子は多コピー存在しており、これらの遺伝子は細胞周期の S 期特異的に発現し、DNA の複製に伴ってゲノム DNA 上にヌクレオソームを形成する (Old and Woodland, 1984)。一方、ヒストンバリエーションの遺伝子は、ゲノム DNA 中に 1 もしくは 2 コピーがコードされており、細胞周期非依存的に発現する (Old and Woodland, 1984)。表 I にヒトの代表的なヒストンバリエーションについて示した。ヒストンバリエーションのうち、CENP-A (別名 CenH3) と H2A.Z に関しては酵母からヒトまで保存されており、その他は生物種特異的に存在している (Talbert et al., 2012)。ヒストンバリエーションには組織特異的な発現パターンを示すものも多く、H2A.B や TSH2B、H3T (別名 H3.4)、H3.5 は精巣特異的に発現し、H3.Y は脳の海馬特異的に発現することが報告されている (Ishibashi et al., 2010; Singleton et al., 2007; Witt et al., 1996; Schenk et al., 2011; Wiedemann et al., 2010)。さらに、ヒストンバリエーションの中には、ゲノム DNA 上の特定の領域にヌクレオソームを形成して、当該領域における転写活性の制御や、特殊な機能を持ったクロマチンの構築を先導するものも存在する (Maze et al., 2014)。H2A.Z および H3.3 は転写開始点近傍に集積して転写を正にも負にも制御し、CENP-A はセントロメアに局在しこの領域に動原体が形成されるための旗印として働き、動原体タンパク質を集積させる (Barski et al., 2007;

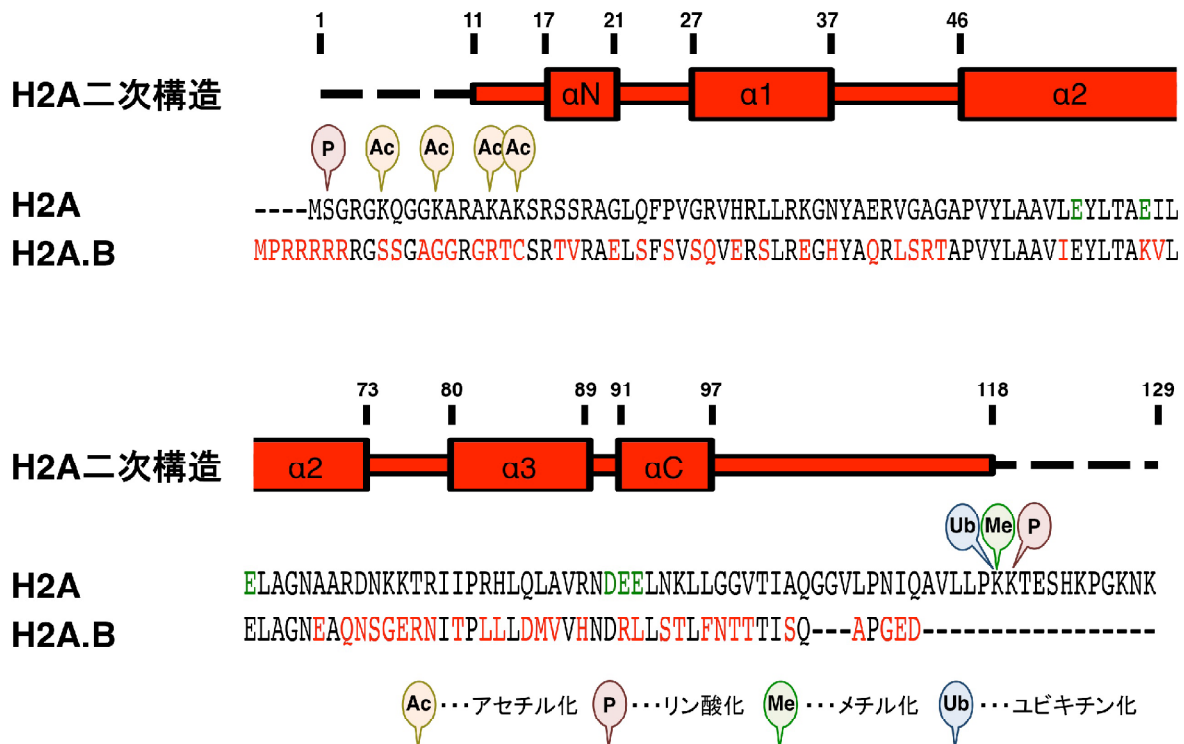
表 I. ヒトのヒストンバリエーションの種類

ヒストンファミリー	ヒストンバリエーション	生物種間での保存	ゲノムDNA上の局在 (組織特異発現)
H2A	H2A	真核生物共通	ゲノム全域
	H2A.B (H2A.Bbd)	哺乳類特異的	転写活性化領域
	mH2A (macroH2A)	有羊膜類特異的	不活性化X染色体
	H2A.X	後生動物特異的	ゲノム全域
	H2A.Z	真核生物共通	プロモーター、遺伝子領域、制御配列 セントロメア
H2B	H2B	真核生物共通	ゲノム全域
	H2BFWT	哺乳類特異的	テロメア (精巣)
	TSH2B	哺乳類特異的	ゲノム全域 (精巣)、テロメア (体細胞)
H3	H3.1	哺乳類特異的	ゲノム全域
	H3.2	動物特異的	ゲノム全域
	H3.3	真核生物共通	プロモーター、転写活性化領域、 セントロメア、テロメア
	H3T (H3.4)	哺乳類特異的	不明 (精巣)
	H3.5	ヒト科特異的	ユークロマチン (精巣)
	H3.X	霊長類特異的	ユークロマチン (脳)
	H3.Y	霊長類特異的	ユークロマチン (脳)
	CENP-A	真核生物共通	セントロメア
H4	H4	真核生物共通	ゲノム全域

((Boyarchuk et al., 2011) Table 1および(有村ら、2013)表1より引用・改変)

Chow et al., 2005; Mito et al., 2005; Palmer et al., 1987)。また、未だ機能は未知であるが、H2A.Bは転写が活性化された遺伝子上に集積し、mH2A.1（別名macroH2A.1）は不活性化されたX染色体上に局在することが報告されている（Tolstorukov et al., 2012; Ioudinkova et al., 2012; Costanzi et al., 1998）。このようにゲノムDNA上の特定の領域に形成されたヒストンバリエントを含むヌクレオソームは、それらの領域における転写調節や、セントロメアなどの機能領域の形成を先導し、遺伝子発現や細胞分裂を適切に行わせる働きをしている。

本論文の第4章で主に扱うH2A.B（もしくはH2A.Bbd）は哺乳類特異的なヒストンバリエントであり、ヒト培養細胞内でH2A.Bを発現させると、不活性化型X染色体（Barr-body）にのみ局在しないことからH2A.Bbd（Barr-body deficient）と当初名付けられた（Chadwick and Willard, 2001）。H2A.Bは主要型のH2Aと比較して、アミノ酸配列相同性が48%と、ヒストンバリエントの中で配列保存性が最も低く、H2Aにおいて、ヌクレオソーム-ヌクレオソーム間およびヌクレオソーム-タンパク質間の結合領域と考えられている、酸性パッチとよばれる部位を構成するアミノ酸が保存されておらず、H2Aにおいて翻訳後修飾が導入されるアミノ酸も保存されていない（図4）（Luger et al., 1997; Makde et al., 2010; Armache et al., 2011）。さらにH2A.Bは115残基のアミノ酸から構成されており、通常型のH2Aよりも15残基短くC末端側の配列を欠いている（図4）。一方で、H2A.BのN末端側には、H2Aには存在しない特徴的な配列が付加されている（図4）。H2A.Bはマウスとヒトに共通して、精巣での高発現が確認されており、哺乳類に共通して精巣特異的に機能すると考えられている（Ishibashi et al., 2010）。加えて、ヒトにおいては非ホジキン型



#### 図 4. H2A.Bのアミノ酸配列

H2AとH2A.Bのアミノ酸配列および、H2Aのヌクレオソーム中での二次構造。緑色はH2Aヌクレオソームにおいて酸性パッチを構成するアミノ酸を示す。吹き出しはH2Aヌクレオソームにおいて翻訳後修飾が導入されるアミノ酸を示す。赤色はH2A、H2A.B間で保存されていないアミノ酸を示す。

H2Aのα1およびα2の領域はH2A.Bにおいてもアミノ酸配列が保存されているが、この他の部分は保存性が低くなっており、H2Aにおいて酸性パッチを構成するアミノ酸や翻訳後修飾が導入されるアミノ酸も保存されていない。

リンパ腫において H2A.B が高発現していることが報告されている (Winkler et al., 2012)。2012 年に 2 つのグループによって、H2A.B を発現させた HeLa 細胞では、H2A.B がゲノム DNA 上の転写活性化された遺伝子上に局在することが報告された (Tolstorukov et al., 2012; Ioudinkova et al., 2012)。さらに、HeLa 細胞を用いたライブセルイメージング解析によって、H2A.B は H2A と比較して、クロマチンにおける取り込みと解離のサイクルが早いことが報告されており、このような性質は転写の活性化に寄与すると考えられている (Gautier et al., 2004)。また HeLa 細胞においては、H2A.B はスプライソソームと相互作用しており、H2A.B をノックダウンした細胞では異常なスプライシングを受けた mRNA が増加したことから、H2A.B ヌクレオソームはゲノム DNA 上にスプライソソームを結合させることで適切なスプライシングを保障していると推測されている (Tolstorukov et al., 2012)。ただし、HeLa 細胞においては H2A.B がほとんど発現しておらず、ノックダウン解析の意義を疑問視する意見もある (Bönisch and Hake, 2012)。また、H2A.B ヌクレオソームの構造的性質についての解析が報告されており、H2A.B ヌクレオソームはヒストン複合体と強固に結合する DNA が通常のヌクレオソームよりも短いことが示されている (Bao et al., 2004; Doyen et al., 2006; Tolstorukov et al., 2012)。このように H2A.B は転写が活性化した遺伝子上にヌクレオソームを形成し、ヒストン複合体と強固に結合する DNA が短い、特殊なヌクレオソーム構造を形成していると考えられている。しかし、H2A.B を含むヌクレオソームの生体内における機能と詳細な分子構造については未解明のままである。



## 1-6. ヌクレオソームと DNA の複製・修復

上述のように、サブヌクレオソームや、ヒストンバリエーションならびに翻訳後修飾を含むヌクレオソームなど、さまざまな種類のヌクレオソームがゲノム DNA 上のそれぞれ特定の位置に形成される。このことにより、上述のような特定のゲノム領域の転写や、セントロメアやテロメアのような特殊化された染色体領域の構築が制御されている。

ゲノム DNA が遺伝物質としての機能を果たすためには、DNA が複製されて次世代の細胞に継承されなければならない。また、DNA に書き込まれた情報を保持するためには、活性酸素や紫外線によって引き起こされる DNA 損傷を速やかに修復しなければならない。ヌクレオソームはこれら DNA 複製や修復の制御においても重要な役割を持つと考えられている (Groth et al., 2007)。

DNA 複製の過程においては、ゲノム DNA 量が倍加することに伴って、ヌクレオソームの量も倍加する必要がある。DNA 複製過程においては、ヌクレオソーム構造は DNA ポリメラーゼの進行方向前方で一度解消し、DNA からヒストンが解離する。その後、新生 DNA 上に速やかにヒストンが運ばれてくることによって、DNA ポリメラーゼの進行に伴ってヌクレオソームが再形成される

(Smith and Whitehouse, 2012 ; Alabert and Groth, 2012)。このため、DNA 複製の際には、ゲノム DNA 上でヒストンが解離と結合を繰り返してダイナミックに交換されており、転写の場合と同様に、特に H2A-H2B 複合体においてはこの傾向が顕著である (Kimura and Cook, 2001)。その際、複製前の親 DNA 鎖に結合していたヒストンおよび、新規に合成された S 期特異的に発現する主要型ヒストンが、2 本の娘 DNA 鎖上にヌクレオソームを再形成する (Old and Woodland,

1984 ; Sogo et al., 1986)。新規合成されたヒストンの複製フォークへの供給が滞ると、DNA 複製が停滞することが示されており、ヌクレオソームの形成は DNA 複製の適切な進行と密接に関与している (Mejlvang et al., 2014)。さらにゲノム DNA 上には DNA の複製起点が点在しており、この領域には、ヒストン H3 の 9 番目および 14 番目のリジン残基のアセチル化修飾や、H3.3 や H2A.Z といったヒストンバリエントが集積している (Lombraña et al., 2013)。ヒストンのアセチル化は複製起点から複製が開始されるタイミングを制御することが示されており、H3.3 や H2A.Z は活性化された複製起点に集積し機能していることが示唆されている (Vogelauer et al., 2002 ; Lombraña et al., 2013)。

DNA 損傷時においても、転写や複製の際と同様に、損傷ゲノム領域に取り込まれているヒストンは DNA 上で解離と結合を繰り返し、ダイナミックに交換されている (Ikura et al., 2007)。DNA 損傷領域においては、H2A.X にリン酸化修飾が導入されること、H2A および H2A.X にユビキチン化修飾が導入されることなどが報告されており、これらは DNA 修復を行うタンパク質が集積するための目印として働くと考えられている (Burma et al., 2001 ; Mailand et al., 2007 ; Groth et al., 2007)。さらに、DNA 損傷領域には、H2A.Z が集積するという報告もなされている (Xu et al., 2012)。

このように、DNA 複製や DNA 損傷修復の過程においては、転写の際と同様に、ヒストンが DNA 上で解離と再結合を繰り返し、ダイナミックなクロマチンの再編成が誘起されている。

## 1-7. 本研究について

本研究では、転写が活性化された領域に存在すると考えられている“ヘキサソーム”および“H2A.Bを含むヌクレオソーム”という2種類の特殊なヌクレオソームに着目し、試験管内で再構成したヌクレオソームの構造生物学的解析を中心に、これらの物理的性質、立体構造およびその機能についての解析を行った。

本論文では、まず第二章において本研究で用いた方法について述べる。ヌクレオソームの試験管内再構成法や、ヌクレオソーム再構成に用いたヒストンおよびDNAの調製などについて記す。

第三章ではヘキサソームの構造生物学的解析および生化学的解析を行った結果について記す。精製したヘキサソームとオクタソームを用いて、動的光散乱解析(DLS: Dynamic Light Scattering)および生化学的解析を行い、ヘキサソームは110-120塩基対のDNAがヒストン複合体と結合しており、オクタソームと比較して約30塩基対のDNAがヒストン複合体から解離して広がった構造を形成することを明らかにした。さらに、X線小角散乱(SAXS: Small Angle X-ray Scattering)法によって112塩基対のDNAを用いて調製したヘキサソームを測定し、ヘキサソームのコア粒子の構造はオクタソームと同様な円盤状であることを示した。

第四章ではヒストンバリエントH2A.Bの局在に関する細胞生物学的解析とH2A.Bヌクレオソームの構造生物学的および生化学的解析の結果について述べる。DNA損傷修復とH2A.Bの関連についてHeLa細胞を用いて解析し、DNA損傷導入後、直ちにH2A.Bが損傷領域に集積することを見いだした。試験管内

で H2A.B ヌクレオソームを再構成した結果、通常型の H2A ではオクタソームを形成できないような短い DNA に対しても H2A.B は安定にオクタソームを形成可能であることを明らかにした。さらに H2A.B ヌクレオソームの構造を動的散乱法および X 線小角散乱法によって解析し、H2A.B ヌクレオソームは H2A ヌクレオソームよりも DNA が広がった特殊な構造を形成していることが分かった。

第五章においては、これまでの知見と第三章、第四章で示した研究結果を総括し、ゲノム DNA の適切な機能発現制御における“ヘキサソーム”および“H2A.B ヌクレオソーム”の役割について考察する。さらに、細胞内に存在するこれらの特殊なヌクレオソームに関する研究の今後の展望について述べる。

## 第2章 実験方法

### 2-1. ヒトのリコンビナントヒストンの発現と精製

本研究で用いたヒトの各種ヒストン (H2A、H2A.B、H2B、H3.1、H4) は、大腸菌内でリコンビナントタンパク質として発現させた後に、精製した (Tanaka et al., 2004)。以下に詳細について示す。ヒストンの発現には、ヒトの H2A、H2A.B、H2B、H3.1 および H4 をコードする DNA 配列を挿入した pH2A、pH2B、pH3.1 および pH4 を使用した (Tanaka et al., 2004)。H2A.B の発現には、pH2A の H2A をコードする DNA 配列を H2A.B のものと置き換えた pH2A.B を使用した。これらのプラスミドは、発現したタンパク質の N 末端側に M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M- (下線部は thrombin 認識配列) が付加されるよう設計されており、His<sub>6</sub>-tag を利用した Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィー精製および、thrombin を利用した His<sub>6</sub>-tag 配列の切断が可能である。thrombin によって His<sub>6</sub>-tag を切断した各ヒストンの最終産物の N 末端側には G S H M- の 4 アミノ酸が付加されている。

H2A、H2B および H3.1 の発現は、大腸菌 BL21 (DE3) に pH2A、pH2B および pH3.1 をそれぞれ導入して行った。H2A.B の発現は、大腸菌 BL21 (DE3) codon plus RIL に pH2A.B を導入して行った。H4 の発現は、大腸菌 JM109 (DE3) に pH4 を導入して行った。それぞれのプラスミドを導入した大腸菌を 50 µg/mL の ampicillin を添加した LB 培地に植菌し、37°C の条件下で一晩震盪培養した。培養後の菌体を集菌し、A バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5% glycerol) に懸濁し、超音波破碎した。大腸菌体内で発現した各 His<sub>6</sub>-tag 融合ヒストンの大部分は不溶化しているため、

超音波破碎後の不溶性画分を遠心分離機によって分離し、B バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 7 M guanidine hydrochloride, 5% glycerol) によって変性状態にて各ヒストンを可溶化した。各 His<sub>6</sub>-tag 融合ヒストンを変性条件下で、His<sub>6</sub>-tag を利用した Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィー精製によって精製した。Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィー精製においては、可溶化した不溶性画分を Ni-NTA Agarose (Qiagen) に吸着させた後、C バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 6 M urea, 5 mM imidazole, 5% glycerol) によって、非特異的に Ni-NTA Agarose に吸着した共雑物を取り除き、C バッファーと D バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 6 M urea, 500 mM imidazole, 5% glycerol) を等量ずつ用いた濃度勾配溶出法によって imidazole 濃度を徐々に上昇させて各 His<sub>6</sub>-tag 融合ヒストンを溶出した。

H2A.B を除く各種ヒストンは、Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィー精製の後、thrombin によって His<sub>6</sub>-tag を切断し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって目的タンパク質のみを精製し、凍結乾燥して保存した。具体的には、Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィー精製における溶出液を E バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析し、非変性条件下で 1 U/ (1 mg His<sub>6</sub>-tagged protein) の thrombin protease (GE Healthcare) によって His<sub>6</sub>-tag を切断した。His<sub>6</sub>-tag を切断した各種ヒストンは、MonoS カラム (GE Healthcare) にて、低塩濃度の F バッファー (20 mM CH<sub>3</sub>COONa (pH 5.2), 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 6 M urea, 2 mM 2-mercaptoethanol) と高塩濃度の G バッファー (20 mM CH<sub>3</sub>COONa (pH 5.2),

0.6 M NaCl, 1 mM EDTA, 6 M urea, 2 mM 2-mercaptoethanol) を用いた濃度勾配溶出法によって精製した。MonoS カラムによる精製の後、ヒストンを含む溶出画分を 2 mM 2-mercaptoethanol 溶液に透析し、凍結乾燥した。凍結乾燥して得られた各種ヒストンの粉末は 4°C で保存した。

H2A.B は、Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィー精製の後、H2B とヒストン複合体 (H2A.B-H2B 複合体) を形成させ、その後 thrombin によって His<sub>6</sub>-tag を切断し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって H2A.B-H2B 複合体の状態に精製した (詳細は 2-2 に記す)。

## 2-2. ヒストン複合体の再構成と精製

次に、Tachiwana らによって報告された方法 (Tachiwana et al., 2010) に従って、ヌクレオソームの試験管内再構成に用いる H2A-H2B 二量体、H2A.B-H2B 二量体および H3.1-H4 四量体を試験管内で再構成し、精製した。H2A-H2B 二量体および H3.1-H4 四量体の再構成においては、凍結乾燥した H2A と H2B もしくは H3.1 と H4 を等モルずつ量りとり、タンパク質量が 1 mg/mL となるように H バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 7 M guanidine-HCl, 10 mM dithiothreitol) を加え、変性条件下で溶解した。H バッファーに溶解したヒストンを I バッファー (2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析し、H2A-H2B 二量体および H3.1-H4 四量体を再構成した。再構成した H2A-H2B 二量体および H3.1-H4 四量体は、I バッファーによって平衡化した Superdex 200 (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって分離・溶

出し、複合体画分を限外濾過によって濃縮した。精製後の H2A-H2B 二量体および H3.1-H4 四量体は液体窒素を用いて凍結した後に $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

H2A.B-H2B 二量体は、 $\text{Ni}^{2+}$ アフィニティークロマトグラフィー精製によって得られた D バッファーに溶解した His<sub>6</sub>-tag 融合 H2A.B と凍結乾燥した H2B を、タンパク質量が 1 mg/mL となるよう等モル比で混合し、一度 H バッファーに透析した後に、I バッファーに再度透析することで His<sub>6</sub>-tag 融合 H2A.B-H2B 二量体を再構成した。さらに、透析によって I バッファーの NaCl 濃度を 2 M から 1 M、1 M から 0.5 M、0.5 M から 0.25 M、0.25 M から 0.1 M と段階的に低下させた後に、1 U/ (1 mg His<sub>6</sub>-tagged protein) の thrombin protease (GE Healthcare) によって His<sub>6</sub>-tag を切断した。His<sub>6</sub>-tag を切断した H2A.B-H2B 二量体は、I バッファーで平衡化した Superdex 200 ゲルろ過クロマトグラフィーによって分離・溶出することで精製し、得られた複合体形成画分を限外濾過によって濃縮した。精製後の H2A.B-H2B 二量体は液体窒素を用いて凍結させた後に $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 2-3. ヌクレオソーム DNA の調製

本研究では 2 種類の DNA 配列を元に様々な長さの DNA 断片を調製して用いた。

1 種類目の DNA 配列は $\alpha$ -sat DNA とよばれる配列であり、この配列は Luger 博士らによって 1997 年に報告された、ヌクレオソームの X 線結晶構造解析に用いられた (Luger et al., 1997)。X 線結晶構造解析に用いられた $\alpha$ -sat DNA はヒトのセントロメア $\alpha$ -サテライト DNA を元にしてパリンδροミック (回文配列)



になるよう設計された 146 塩基対の DNA である。本研究においては、この 146 塩基対の DNA を元にして、図 13 A に示すように 142 塩基対、136 塩基対、130 塩基対、124 塩基対、116 塩基対および 112 塩基対の  $\alpha$ -sat DNA を設計した。

2 種類目の DNA 配列は **widom 601 DNA** (以下では **601 DNA** と表記する) 配列とよばれる DNA 配列であり、この配列は **Widom** 博士らのグループによって、ヌクレオソームを安定的に保持する配列として、**SELEX** (**S**ystematic **E**volution of **L**igands by **E**xponential enrichment) 法を用いて見出された

(Lowary and Widom, 1998)。601 DNA 上ではヌクレオソーム形成位置が一義的に決定されるため、試験管内でヌクレオソームを再構成する際に広く用いられている。**Widom** 博士らによって設計された **601 DNA** は 220 塩基対の配列であるが、この配列を元にして、145 塩基のヌクレオソーム形成配列の両側に 24 塩基対ずつのリンカーDNAを付加した 193 塩基対の **601 DNA** を設計して使用した。また、145 塩基対の **601 DNA** は、2010 年に報告された X 線結晶構造解析に用いられた配列を使用した (Vasudevan et al., 2010)。

これらの 9 種の DNA 配列は、目的 DNA 配列をタンデムに挿入したプラスミドを大腸菌体内で増幅させ、これらのプラスミドから目的配列 DNA を制限酵素で切り出すことで得ている (Dyer et al., 2004)。本研究に用いた 7 種の  $\alpha$ -sat DNA は、回文配列となっているため、プラスミドには目的配列の半分にあたる配列がタンデムに挿入されており、この DNA 断片を *EcoRV* 処理によってプラスミドから切り出した後、これらの DNA 断片の両末端の脱リン酸化、*EcoRI* 処理を行い、*EcoRI* 切断面でセルフライゲーションさせることで、パリンドロ

ミックな DNA 断片を得ている (Dyer et al., 2004)。本研究に用いた 2 種の 601 DNA は、プラスミド内に目的配列自体がタンデムに挿入されており、*EcoRV* で目的の DNA 断片をプラスミドから切り出し、目的 DNA を得ている。

## 2-4. ヌクレオソームの試験管内再構成および精製

2-2 に示した方法で精製したヒストン複合体と、2-3 に示した方法で調製した DNA 断片を用いて、塩透析法とよばれる方法を用いてヌクレオソームを試験管内で再構成した (Dyer et al., 2004; Tachiwana et al., 2010)。以下にそれぞれの実験の詳細について示す。

### 2-4-1. 193 塩基対の DNA を含むオクタソームおよびヘキサソームの精製

193 塩基対 (bp) の 601 DNA (240  $\mu\text{g}$ ) と H2A-H2B 複合体 (54-74  $\mu\text{g}$ )、H3.1-H4 複合体 (143  $\mu\text{g}$ ) を DNA 終濃度 0.65  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  になるように混合し、400 mL のバッファー J (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) に対して透析した。透析外液にバッファー K (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) を 0.8 mL/min で加えながら、攪拌された透析外液を 0.8 mL/min で排出することによって、透析外液の塩濃度を徐々に低下させることで、ヌクレオソームを再構成した。1600 mL のバッファー K を用いて透析外液を交換したのち、再度 400 mL のバッファー K に対してサンプルを透析した。55°C で 2 時間熱処理し、DNA とヒストンの非特異的な結合を解消させた後に、分取用電気泳動装置 Model 491 Prep Cell (Bio-Rad)

を用いて、非変性条件下におけるポリアクリルアミド電気泳動 (native PAGE) を行い、バッファーL (20 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol) に中にサンプルを溶出した。単離されたヘキサソームおよびオクタソームは限外濾過によって濃縮し、氷上保存した。精製後のヘキサソームおよびオクタソームは native PAGE によって純度を確認し、SDS-PAGE によって各ヒストンの組成を確認した。電気泳動後の SDS-PAGE ゲルは Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色し、LAS4000 (FUJI FILM) によって撮影した。バンド強度の計測は Multi Gauge ソフトウェア (FUJI FILM) を用いて行った。

#### 2-4-2. 112 塩基対の DNA を含むヘキサソームの再構成 および精製

112 塩基対の $\alpha$ -sat DNA (1000  $\mu$ g) との H2A-H2B 複合体 680  $\mu$ g、1100  $\mu$ g の H3.1-H4 複合体を DNA の終濃度が 0.65  $\mu$ g/ $\mu$ L になるよう混合し、2-4-1 と同様に塩透析法によってヌクレオソームを再構成した。再構成後のサンプル溶液中のヘキサソームのみを精製し、DNA とヒストンの非特異的な結合や、DNA と結合していないヒストン、ヒストンと結合していない DNA などの夾雑物を取り除くため、Prep Cell を用いて native PAGE を行い、ポリアクリルアミドゲルを通過したサンプルをバッファーL に溶出した。精製されたヘキサソームは限外濾過によって濃縮し、氷上保存した。

#### 2-4-3. 146 塩基対より短い DNA を用いたヌクレオソーム

## ムの形成効率試験

116 塩基対、124 塩基対、130 塩基対、136 塩基対、146 塩基対の $\alpha$ -sat DNA と H2A-H2B 二量体、および H3.1-H4 四量体もしくは、116 塩基対、124 塩基対、130 塩基対、136 塩基対、146 塩基対の $\alpha$ -sat DNA と H2A.B-H2B 二量体、および H3.1-H4 四量体を 1:2:2.6 のモル比 (DNA 終濃度 5.2  $\mu$ M) で混合し、2-4-1 と同様に塩透析法によってヌクレオソームを再構成した。再構成された DNA-ヒストン複合体を native PAGE によって解析した。124 塩基対の DNA を用いて再構成した産物に対して、Prep Cell を用いて native PAGE を行い、ポリアクリルアミドゲルを通過したサンプルをバッファーLに溶出した。精製された DNA-ヒストン複合体は限外濾過によって濃縮し、氷上保存した。分離したバンド成分は native PAGE によって純度を確認し、SDS-PAGE によって各ヒストンの組成を確認した。電気泳動後の SDS-PAGE ゲルは CBB 染色し、LAS4000 (FUJI FILM) によって撮影した。

### 2-4-4. 145 塩基対の DNA を用いた H2A.B ヌクレオソームの再構成と精製

145 塩基対の 601 DNA と H2A-H2B 二量体もしくは H2A.B-H2B 二量体および H3.1-H4 四量体を 1:2:2.6 のモル比 (DNA 終濃度 6.8  $\mu$ g/ $\mu$ L) で混合し、塩透析法によって H2A ヌクレオソームおよび H2A.B ヌクレオソームを再構成した。再構成した産物に対して、Prep Cell を用いて native PAGE を行い、ポリアクリルアミドゲルを通過したサンプルをバッファーLに溶出した。精製されたヌクレオソームは限外濾過によって濃縮し、氷上保存した。

## 2-5. 動的光散乱解析

### 2-5-1. 193 塩基対の DNA を含むヘキサソームおよび オクタソームの動的光散乱解析

193 塩基対の 601 DNA を含むヘキサソームおよびオクタソームの 260 nm の吸光値に基づき、ヌクレオソーム中の DNA 濃度が 1.0 mg/mL になるようサンプルを調製した。バッファー L に溶解した上記のサンプルを用いて Zetasizer Nano  $\mu$ V (Malvern) によって 25°C の条件下で動的光散乱解析を行った。

### 2-5-2. H2A オクタソームおよび H2A.B オクタソームの 動的光散乱解析

145 塩基対の DNA を含む H2A オクタソームおよび H2A.B オクタソームの DNA 濃度が 1.0 mg/mL になるようサンプルを調製した。バッファー L に溶解した上記のサンプルを Zetasizer Nano  $\mu$ V (Malvern) によって 20°C の条件下で測定した。

## 2-6. MNase を用いた試験

193 塩基対の 601 DNA を含むヘキサソームおよびオクタソーム (DNA 濃度が 10  $\mu$ g/mL) を、20  $\mu$ L の反応液 (57.5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 12.5 mM NaCl, 12.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.75 mM dithiothreitol (DTT), 0.75 mM EDTA) 中で 0、0.5、1.0 および 2.0 U の MNase (Takara) を加え、23 °C で 5 分反応させた。反応を終了させるために、proteinase K 溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、80 mM

EDTA、0.25% SDS、0.5 mg/mL proteinase K (Roche)) を 15  $\mu$ L 添加し、23  $^{\circ}$ C で 30 分反応させてヒストンおよび MNase を消化した。proteinase K 処理後、エタノール沈殿法により DNA を精製し、native PAGE を行い EtBr によって DNA を染色し、撮影した。

## 2-7. X 線小角散乱解析

### 2-7-1. ヘキサソームの X 線小角散乱解析

バッファー L に溶解した精製後の 112 塩基対の DNA を含むヘキサソームの濃度が 0.7、1.0 および 1.3 mg/mL となるようサンプルを調製した。データ収集は大型放射光施設 SPring-8 (兵庫県) の理化学研究所構造生物学ビームライン I (BL45XU) にて行った。SAXS 強度は PILATUS300 K-W 検出器を用いて、サンプル-検出器間の距離が 3509 mm、X 線の波長が 1.0  $\text{\AA}$ 、室温が 20 $^{\circ}$ C の条件下、各サンプルについて 20 秒間測定を 9 回ずつ行った。SAXS 強度を円環平均処理によって算出し、 $q$  による 1 次式  $I(q)$  (ただし  $q=4\pi \sin \theta / \lambda$ ) として記述した。粒子間相互作用の効果を補正するために、0.7、1.0、および 1.3 mg/mL の 3 点で測定したデータを測定し、濃度 0 外挿処理を行った。バッファー L を用いてバックグラウンドの SAXS 強度の測定を行い、データから差し引いた。小角領域に対して

Guinier approximation  $I(q) = I(0) \exp(-q^2 R_g^2 / 3)$

( $I(0)$  は原点散乱強度)

を適用し、慣性半径  $R_g$  (radius of gyration) を算出した。GNOM ソフトウェアを用いて距離分布関数  $P(r)$  を算出し、 $P(r) = 0$  となる  $r$  の値を最大原子間距離

$D_{\max}$  (Maximum inter-atomic distance) とした (Svergun, 1992)。全てのデータ処理は ATLAS package に含まれるソフトウェアを用いて行った (Konarev, 2006)。112 塩基対の DNA を含むモデル構造はヒトの主要型のヌクレオソームの結晶構造 (PDB ID: 3AFA) を用いて作製した。モデル構造の理論的な散乱曲線は CRYSOLOG ソフトウェアによって算出した (Svergun et al., 1995)。

## 2-7-2. H2A.B ヌクレオソームの X 線小角散乱解析

バッファーLに溶解した精製後の 145 塩基対の DNA を含む H2A オクタソームおよび H2A.B オクタソームの濃度が 0.5、1.0、および 3.0 mg/mL となるようサンプルを調製した。データ収集には高エネルギー加速器研究機構のフォトンファクトリー (茨城県)、BL10C の SAXS camera (SAXES) を用いた。SAXS 強度はイメージングプレート検出器 R-Axis IV++を用いて、サンプル検出器間の距離が 2040.060 mm、X 線の波長が 1.488 Å、室温が 20°C の条件下、各サンプル 600 秒間測定を行った。以降の解析は 2-7-1 のヘキサソームの X 線小角散乱解析と同様に行った。ダミーアトムモデルは DAMMIN ソフトウェアを用いて構築した (Svergun, 1999)。10 回の独立した計算により得られたダミーアトムモデルを、平均化し、最終的なモデル構造とした (Volkov and Svergun, 2003)。

## 2-8. DNA 損傷導入時の H2A.B の細胞内局在解析

解析に用いた HeLa 細胞はダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM; Nacalai Tesque) において、抗生物質 (10 U/mL penicillin、50 µg/mL streptomycin;

Sigma-Aldrich) および 10%のウシ胎児血清の存在下で培養した。pEGFP ベクター (Clontech) にヒトの H2B および H2A.B をコードする配列を挿入して作製した GFP-H2A および GFP-H2A.B 発現用ベクターを HeLa 細胞に導入し、抗生物質 (1 mg/mL G418) 存在下で培養し、GFP-H2A および GFP-H2A.B を発現する細胞を選択した (Kimura et al., 2006)。PCNA-mCherry と GFP-H2A.B もしくは GFP-H2A の両方を発現する細胞は、G418 耐性を有する GFP-H2A.B もしくは GFP-H2A 発現 HeLa 細胞と puromycin 耐性を有する PCNA-mCherry 発現 HeLa 細胞を polyethylene glycol (Roche) によって融合させ、2 種の抗生物質 (1 mg/mL G418, 0.5  $\mu$ g/mL puromycin) 存在下で培養後、単一のコロニーを選択し取得した (Leonhardt et al., 2000; Kimura and Cook, 2001)。ライブセルイメージングにあたり、それぞれの細胞はガラスボトムディッシュ (Mat-Tek) 上で細胞周期を同調せずに培養した。細胞の固定を行う場合には、ガラスボトムディッシュ上で 37°C の条件下で 4% paraformaldehyde を含む 250 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) によって 1 時間、細胞を処理した。生細胞を用いた解析は PlanApoN 60x OSC (NA = 1.4) 油浸レンズを装着した共焦点顕微鏡 (FV-1000; Olympus) を用いて行った。HeLa 細胞の核を 1.644 秒ごとに撮影し、5 枚の画像を撮影した後、2  $\mu$ m 幅のレーザー光 (FRAP 試験では 100% 488-nm laser transmission で 4  $\mu$ s/pixel, DNA 損傷導入試験では 100% 405-nm laser transmission で 200  $\mu$ s/pixel) を照射し、その後さらに 95 枚の画像を BA505-525 フィルター (GFP 由来の蛍光観察用) および BA560IF フィルター (mCherry 由来の蛍光観察用) によって撮影した。PCNA-mCherry の局在パターンにより、各細胞の細胞周期を判断した。蛍光強



度計測には Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用い、各画像についてレーザー照射領域および非照射領域の GFP の蛍光強度を、核外の蛍光強度をバックグラウンドとして差し引いて算出した。レーザー照射前の各領域の蛍光強度を 1 として、蛍光強度の相対値を算出した。

## 第3章 ヘキサソームの生化学的解析および構造生物学的解析

### 3-1. 序

これまでの細胞を用いた解析や、ヌクレオソームを形成した DNA を基質とした試験管内転写解析により、転写の過程においてヘキサソームが形成され、転写を促進することが示唆されている (Baer and Rhodes, 1983; Kimura and Cook, 2001; Kireeva et al., 2002; Belotserkovskaya et al., 2003; Kulaeva et al., 2009; Kuryan et al., 2012; Cole et al., 2014; Rhee et al., 2014)。しかし、ヘキサソームの立体構造や物理的な性質は不明なままであり、ヘキサソームによる転写の制御メカニズムの詳細は明らかになっていない。ヘキサソームの立体構造や物理的な性質の解析がなされていない原因として、ヘキサソームの高純度な精製法が確立されていなかったことが挙げられる。そこで本研究においては、試験管内で再構成したヘキサソームを高純度に精製する方法を確立し、構造生物学的および生化学的解析を行った (Arimura et al., 2012)。本章ではこれらの結果を記す。

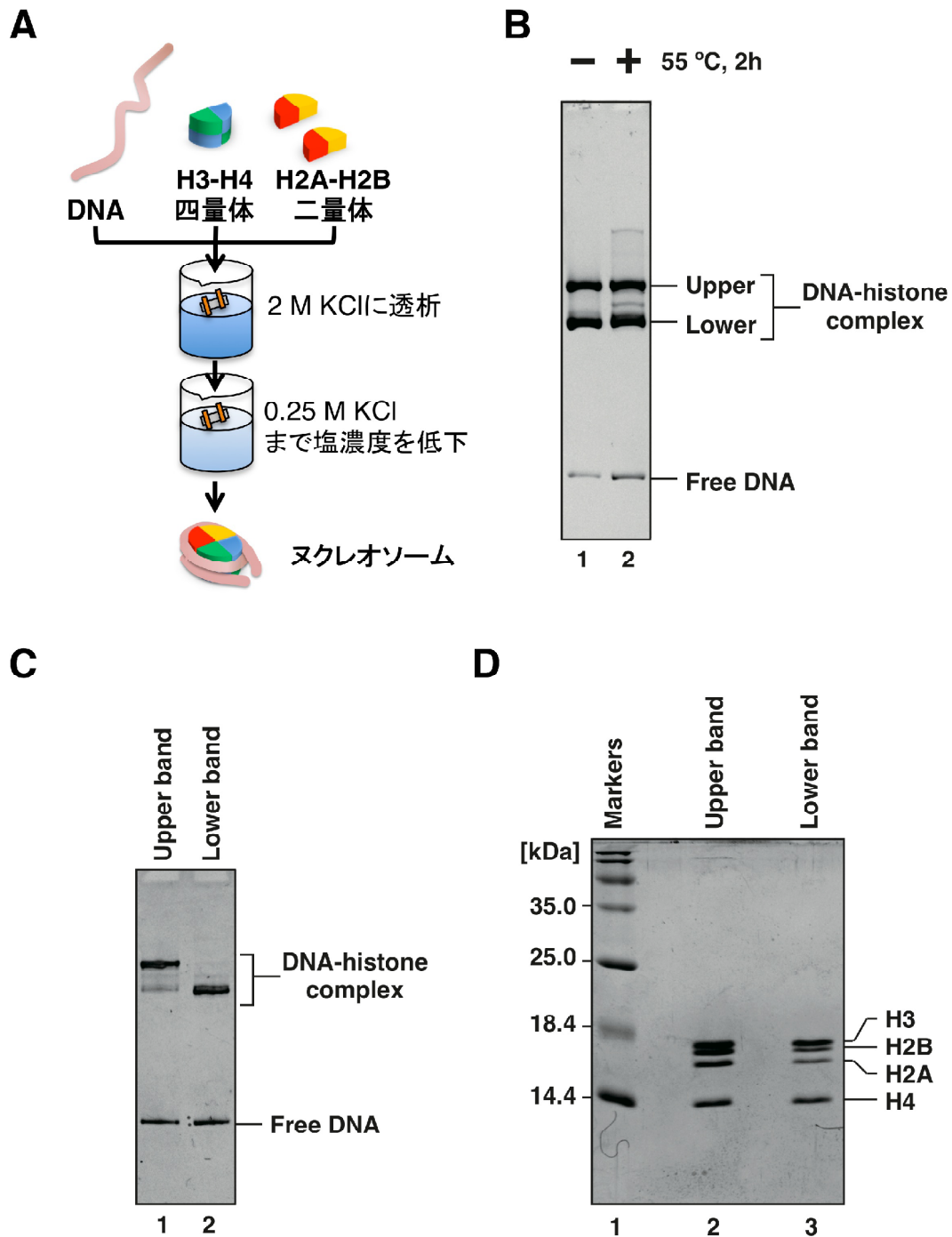
### 3-2. 193 塩基対の DNA を含むヘキサソームの試験管内再構成および精製

既存のヌクレオソームの試験管内再構成法によってヘキサソームの精製を行った場合に生じる問題点として、「①ヒストンを八分子含むヌクレオソーム (オクタソーム) が主に形成され、ヘキサソームの形成効率が悪い」、「②オクタソームとヘキサソームの分離が困難である」、の2点が挙げられる。そこでこれらの問題点を解決する方法を考案した。まず、①の問題点については、ヌクレオソームを再構成する際に、H2A-H2B 複合体の混合比を DNA とヒストン

H3.1-H4 複合体に対して半分にすることで解決できると考え、通常は DNA と H2A-H2B 二量体、H3.1-H4 四量体をモル比 1:2:1 で混合するところを、モル比 1:1:1 で混合することにした。次に、②の問題点を解決するため、native PAGE における泳動度の違いを利用してオクタソームとヘキサソームを分離することを考えた。これまでに、207 塩基対の 5S rDNA を含むオクタソームとヘキサソームは、native PAGE における泳動度が異なるバンドとしてそれぞれ検出されることが示されていた (Mazurkiewicz et al., 2006)。この結果は、単一のヌクレオソームに巻き付く DNA 長に相当する 145 塩基対よりも長い DNA を用いれば、オクタソームとヘキサソームを分離することができる可能性を示唆している。そこで 145 塩基のヌクレオソーム形成配列の両側に 24 塩基対ずつのリンカー DNA を付加した 193 塩基対の 601 DNA を設計し、使用した

(Lowary and Widom, 1998)。ヒトの場合、ゲノム DNA 上に平均 192 塩基対に一つの割合でヌクレオソームが連なって形成されることが報告されていることから (Gaffney, 2012) ヒトのゲノム上におけるオクタソームおよびヘキサソームの構造を考慮する上で、193 塩基対の DNA は適切な長さであると考えられる。また、601 DNA はヌクレオソームが安定に形成される配列であり、601 DNA を用いた場合にはヌクレオソーム形成位置が一箇所限定されるため、均一なオクタソームおよびヘキサソームの調製が可能となる (Lowary and Widom, 1998)。

193 塩基対の 601 DNA と H2A-H2B 二量体、H3.1-H4 四量体を、モル比 1:1:1 で混合し、塩透析法によってヌクレオソームを試験管内で再構成し、native PAGE によって産物を解析した結果、2 種類の DNA-ヒストン複合体のバンドが検出された (図 5A, 図 5B)。再構成した産物を 55°C で 2 時間熱処理してもこ



### 図 5. ヘキサソームの試験管内再構成と精製

(A) 塩透析法のスキーム。DNAとH2A-H2B複合体、H3.1-H4複合体を混合し、2 M KClを含む溶液に対して透析した。透析外液の塩濃度を0.25 M KClまで徐々に低下させ、ヌクレオソームを再構成した。

(B) 193塩基対の601DNAを用いて、再構成したヌクレオソームをnative PAGEによって展開し、EtBrによってDNAを染色して撮影した結果。泳動距離の異なる2種類のDNA-ヒストン複合体が形成されている。再構成産物を55°Cで2時間熱処理してもこれらのバンドは保持されている。((Arimura et al., 2012) Fig. 1Aより引用)

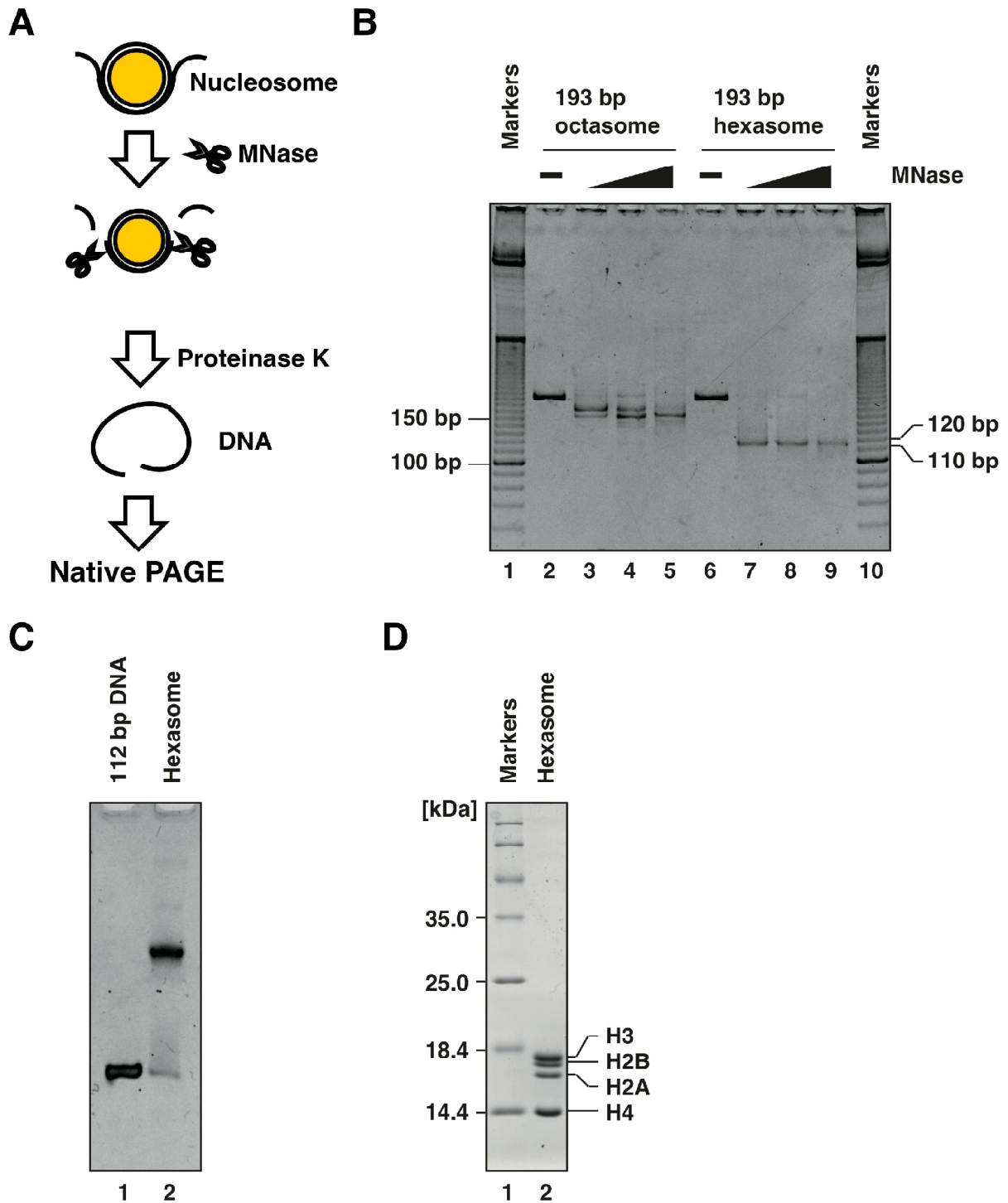
(C) Fig. 5Aに示した再構成ヌクレオソームの2種類のDNA-ヒストン複合体をPrep Cell装置を用いたnative PAGEによって分離した。分離後の2種類のDNA-ヒストン複合体をnative PAGEによって展開し、EtBrによってDNAを染色して撮影した結果を示す。((Arimura et al., 2012) Fig. 1Bより引用)

(D) Fig. 5Bで示した分離後の2種類のDNA-ヒストン複合体をSDS-PAGEによって展開し、CBBでタンパク質を染色して撮影した結果。upperバンドは、4種のヒストン全てを等量ずつ含んでいた(レーン2)。一方、lowerバンドはH2AとH2Bが、H3とH4に対して少ないことが分かった(レーン3)。この結果より、upperバンドは4種のヒストンを各2分子ずつ含むオクタソームであり、lowerバンドはH3とH4を各2分子、H2AとH2Bを各1分子ずつ含むヘキサソームであると結論した。((Arimura et al., 2012) Fig. 1Cより引用)

これらのバンドは保持されていたことから、安定な DNA-ヒストン複合体が形成されていることがわかる (図 5B)。再構成した産物に対して、Prep Cell を用いて native PAGE による精製を行い、これらの 2 種類のバンド成分を分離することに成功した (図 5C)。SDS-PAGE によって各バンド成分のヒストン組成を解析したところ、upper バンドは、4 種のヒストン全てを等量ずつ含んでいた (図 5D レーン 2)。一方、lower バンドは H2A と H2B が、H3.1 と H4 に対して少ないことが分かった (図 5D レーン 3)。SDS-PAGE のバンド強度を計測したところ、upper バンドの H4 に対する H2A のバンド強度を 1 とすると lower バンドの H4 に対する H2A のバンド強度は 0.52 であった。SDS-PAGE の結果から、upper バンドは 4 種のヒストンを各 2 分子ずつ含むオクタソームであり、lower バンドは H3.1 と H4 を各 2 分子、H2A と H2B を各 1 分子ずつ含むヘキサソームであると結論した。

### 3-3. ヘキサソームを構成する DNA の塩基長の解析

ヘキサソーム構造中においてヒストン複合体に強固に結合する DNA の長さを明らかにするため、MNase (*Micrococcus nucleasase*) を用いた試験を行った。MNase は *Micrococcus* 属の *Staphylococcus aureus* 由来のエンドヌクレアーゼであり、タンパク質などと結合していない DNA のみを消化する特徴がある。この特徴を利用して、MNase に消化されずに残った DNA 断片の長さを解析することで、ヘキサソーム構造中においてヒストンと直接相互作用する DNA の長さを明らかにすることができる (図 6A)。193 塩基対の DNA を含むヘキサソームおよびオクタソームを MNase 処理し、DNA を精製後、native PAGE によ



### 図 6. ヘキサソームを構成するDNAの塩基長の解析

(A) MNase試験のスキーム。MNaseは*Micrococcus*属の*Staphylococcus aureus*由来のエンドヌクレアーゼであり、タンパク質などと結合していないDNAのみを消化する特徴がある。この特徴を利用して、MNaseに消化されずに残ったDNA断片の長さを解析することで、タンパク質と直接相互作用するDNAの長さを明らかにすることができる。193塩基対のDNAを含むヘキサソームおよびオクタソームをMNase処理し、DNAを精製後、native PAGEによって解析した。

(B) 193塩基対の601DNAを用いて、作製したオクタソームおよびヘキサソームをMNaseによって処理し、処理後反応液中のDNAをnative PAGEによって展開し、EtBrによってDNAを染色して撮影した結果。オクタソームの場合は150塩基対程度のDNAがMNaseから保護され、一方、ヘキサソームの場合には、110-120塩基対のDNAがMNaseから保護された。(Arimura et al., 2012) Fig. 2Aより引用)

**(C)** 112 塩基対 $\alpha$ -sat DNAを用いてヘキサソームの試験管内再構成を行い、Prep Cell装置を用いたnative PAGEによってDNA-ヒストン複合体を精製した。精製後のDNA-ヒストン複合体をnative PAGEによって展開し、EtBrによってDNAを染色して撮影した結果を示す。((Arimura et al., 2012) Fig. 2Bより引用)

**(D)** 図 6Cで示したDNA-ヒストン複合体をSDS-PAGEによって展開し、CBBでタンパク質を染色して撮影した結果を示す。H2AとH2Bのバンド強度が弱くなっていることから、ヘキサソームであることを確認した。  
((Arimura et al., 2012) Fig. 2Cより引用)

って解析した結果、オクタソームの場合は 150 塩基対程度の DNA が MNase から保護されていた (図 6B レーン 3-5)。一方、ヘキサソームの場合には、110-120 塩基対の DNA が MNase から保護された (図 6B レーン 7-9)。MNase 試験の結果は、ヘキサソームの構造中でヒストンと安定に結合している DNA が 110-120 塩基対であることを示している。このことを確認するために、112 塩基対  $\alpha$ -sat DNA を用いてヘキサソームの試験管内再構成を試みたところ、1 種類の DNA-ヒストン複合体が再構成された。この複合体を Prep Cell 装置を用いた native PAGE によって精製することで、ヌクレオソームを形成しなかったヒストンを取り除いた (図 6C)。SDS-PAGE によって DNA-ヒストン複合体のヒストン組成を解析した結果、H2A および H2B のバンド強度が、H3.1 および H4 のバンド強度の半分程度であることが明らかになった。このことから、112 塩基対の DNA を用いて再構成された DNA-ヒストン複合体はヘキサソームと考えられた (図 6D)。したがって、少なくとも 112 塩基対の DNA はヘキサソームを形成するために十分であることが考えられた。

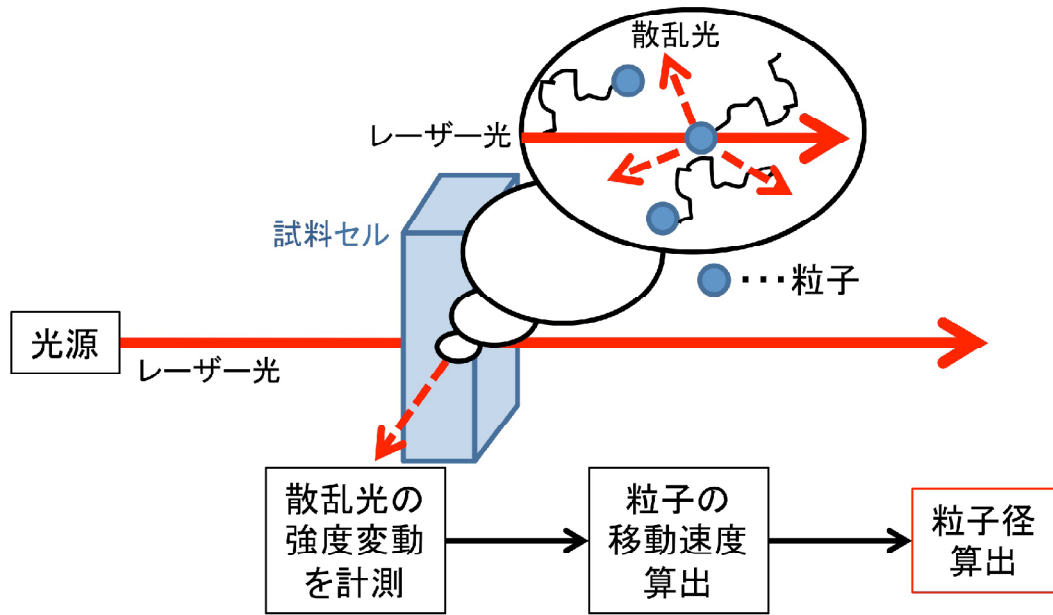
### 3-4. 動的光散乱法によるヘキサソームの粒子径測定

動的光散乱法によって、精製した 193 塩基対の DNA を含むヘキサソームおよびオクタソームの流体力学的粒子径を計測した。動的光散乱法においては、溶液状態のタンパク質に対してレーザー光を照射し、ブラウン運動するタンパク質分子によって散乱した光を計測し、散乱光強度の揺らぎから粒子の移動速度を算出する。水溶液中では大きい粒子ほど移動速度が遅く、小さい粒子ほど移動速度が早いため、粒子の移動速度から流体力学的粒子径を算出することが

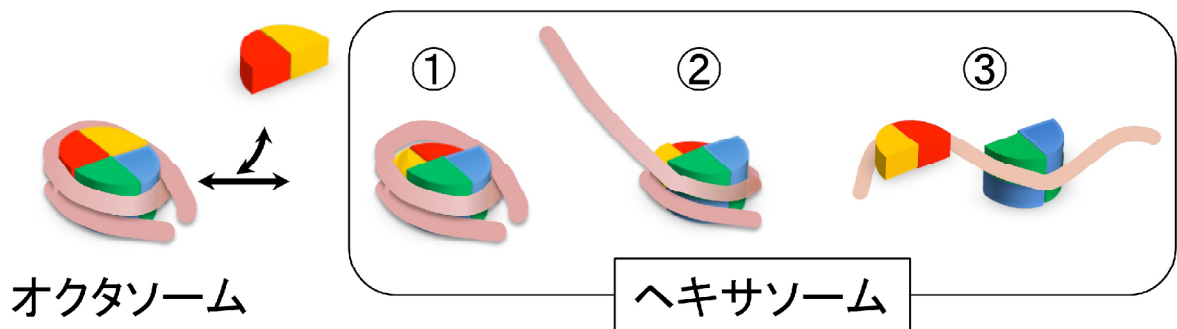


できる (図 7A)。193 塩基対の DNA を含むヘキサソームの構造として考えられるモデル構造を図 7B に示す。ヌクレオソームの構造中で、DNA 出入り口付近に位置する DNA は H3-H4 複合体と結合しているため、図 7B①のようにオクタソームから H2A-H2B が失われたヘキサソームにおいても大きな構造変化が生じない可能性が考えられる。さらに図 7B②のようにヒストン複合体には大きな構造変化は起こらないが、H2A-H2B が失われた側に位置する DNA がヒストン複合体から解離して大きく広がる可能性が考えられる。また図 7B③のようにオクタソームから H2A-H2B が失われることにより、ヒストン複合体の構造が大きく変化する可能性もある。ヘキサソームが図 7B①のような構造であった場合には、動的散乱解析による 193 塩基対の DNA を含むヘキサソームの粒子径は H2A-H2B が失われたために、オクタソームより小さくなると考えられる。一方、ヘキサソームが図 7B②のような構造であった場合には、動的散乱解析による 193 塩基対の DNA を含むヘキサソームの粒子径は DNA が広がるために、オクタソームより大きくなると考えられる。動的散乱解析の結果、ヘキサソームの流体力学的直径は  $16.24 \pm 2.98$  nm、オクタソームの流体力学的直径は  $13.50 \pm 1.84$  nm と算出された (図 7C)。MNase 試験の結果と併せて考えると、ヘキサソームの構造中では 110-120 塩基対の DNA のみがヒストン複合体と直接結合しており、この領域以外の DNA はヒストン複合体から解離し広がったために、オクタソームよりも粒子径の大きな構造になったと考えられ、図 7B②のようにヒストン複合体と DNA の結合様式がオクタソームを類似している場合と、図 7B③のようにオクタソームとヒストン複合体と DNA の結合様式が異なる場合が考えられる。

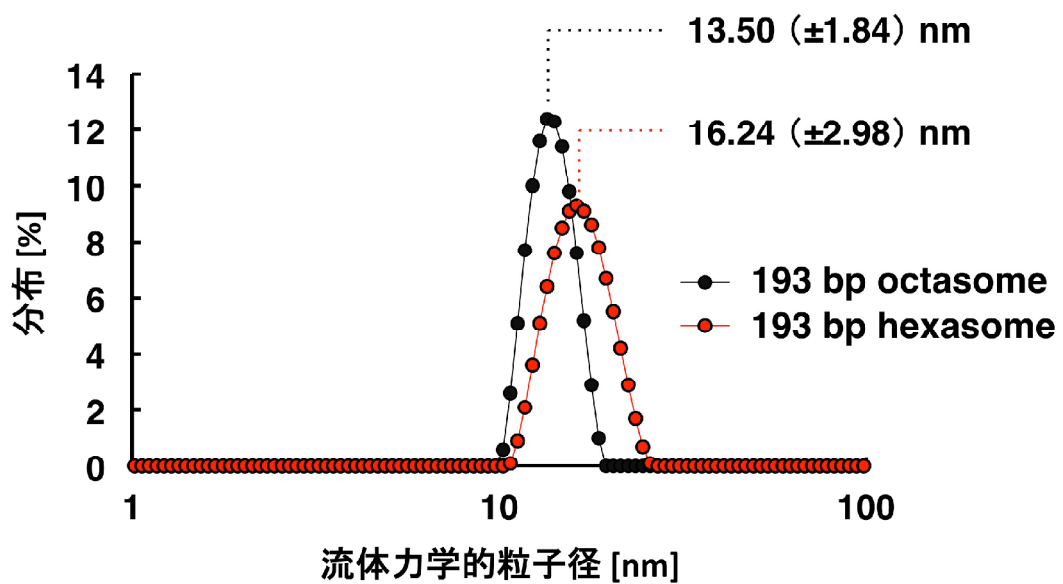
A



B



C



## 図 7. 動的散乱法によるヘキサソームの粒子径測定

(A) 動的散乱解析の原理を図示する。動的散乱法においては、溶液状態のタンパク質に対してレーザー光を照射し、ブラウン運動するタンパク質分子によって散乱した光を計測し、散乱光強度の揺らぎから粒子の移動速度を算出する。水溶液中では大きい粒子ほど移動速度が遅く、小さい粒子ほど移動速度が早いため、粒子の移動速度から流体力学的粒子径を算出することができる。

(B) ヘキサソームの構造モデル。ヌクレオソームの構造中で、DNA出入り口付近に位置するDNAはH3-H4複合体と結合しているため、図 7B①のようにオクタソームからH2A-H2Bが失われたヘキサソームにおいても大きな構造変化が生じない可能性が考えられる。さらに図 7B②のようにヒストン複合体には大きな構造変化は起こらないが、H2A-H2Bが失われた側に位置するDNAがヒストン複合体から解離して大きく広がる可能性が考えられる。また図 7B③のようにオクタソームからH2A-H2Bが失われることにより、ヒストン複合体の構造が大きく変化する可能性もある。

(C) ヘキサソームの流体力学的直径は $16.24 \pm 2.98$  nm、オクタソームの流体力学的直径は $13.50 \pm 1.84$  nmと算出された。ヘキサソームはオクタソームよりも構成因子が少なくなっているにもかかわらず、粒子径は大きくなっていることを示しており、ヘキサソームの構造中では110-120塩基対のDNAのみがヒストン複合体と直接結合しており、この領域以外のDNAはヒストン複合体から解離し広がっているために、145-147塩基対のDNAを結合するオクタソームよりも粒子径の大きな構造になったと考えられる。((Arimura et al., 2012) Fig. 5Bより引用)

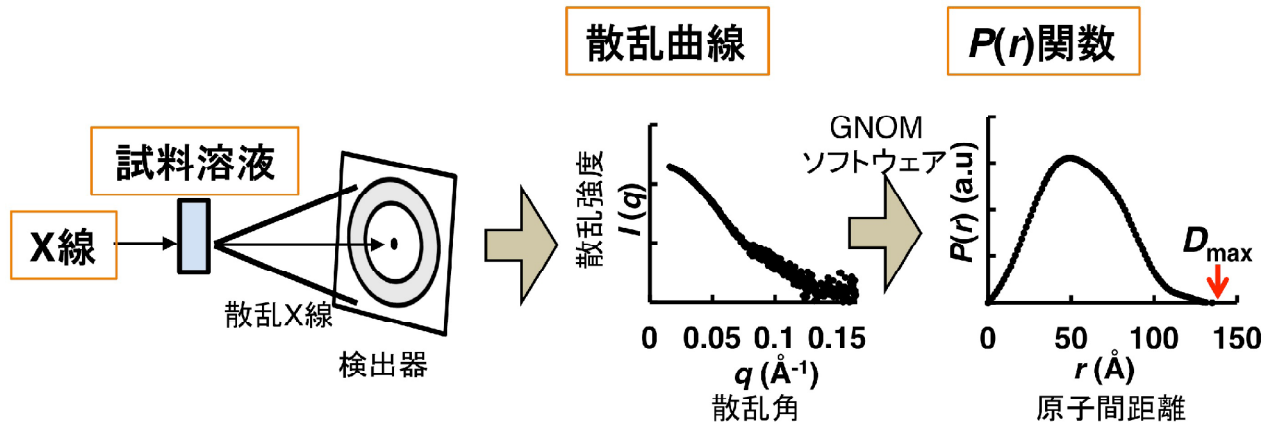
### 3-5. X線小角散乱法によるヘキサソームの構造解析

次に、ヘキサソームの構造をX線小角散乱によって解析した。X線小角散乱は溶液状態のタンパク質のX線散乱データから構造情報を得ることが可能な手法であり、既知の結晶構造などを元に作製したモデル構造の理論的なSAXS曲線を算出し、実測のSAXS曲線と比較することで得られた構造の妥当性を評価することや、溶液サンプルの大まかな立体構造（ダミーアトムモデル）を構築することが可能である（Svergun et al., 1995; Svergun, 1999）（図 8A, 図 9A, 図 18A）。タンパク質の立体構造解析の手法にはSAXS解析以外にもX線結晶構造解析やNMR解析などの方法が存在する。しかし、X線結晶構造解析においてはタンパク質結晶を得る必要がある上、結晶中に高密度に充填されて固定された分子の構造を解析するため、構造の揺らぎが大きい分子解析には不向きである。ヘキサソームはオクタソームからH2A-H2Bが欠落することで、揺らぎの大きな構造となっている可能性があり、SAXS解析に適している。さらにオクタソームの構造は既にX線結晶構造解析によって明らかになっているため、ヘキサソームがオクタソームからH2A-H2Bが欠落しても大きな構造変化を起こさない場合には、オクタソームの結晶構造を元にヘキサソームのモデル構造を構築し、モデル構造の理論的な散乱曲線と実測のSAXS曲線を比較して解析することが可能である。また、NMR解析も溶液状態のタンパク質の立体構造解析が可能な手法であるが、ヘキサソームのような高分子量の分子の構造解析には適していない。

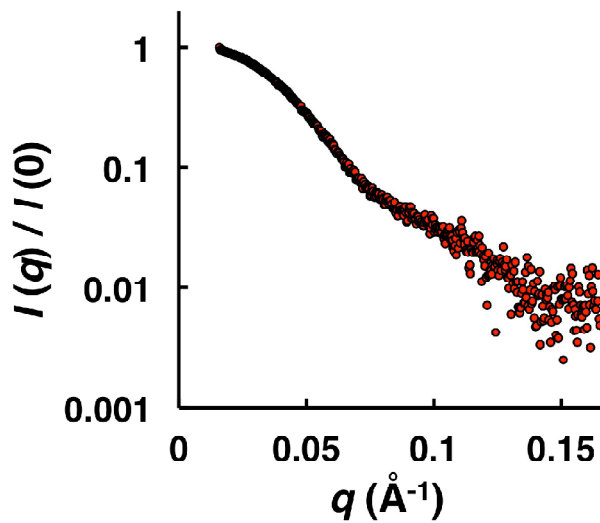
そこで、本研究においてはSAXS解析を用いてヘキサソームの立体構造解析を行った。MNase試験と動的光散乱解析から、ヘキサソームの構造中では

110-120 塩基対の DNA がヒストンと結合し、この領域以外の DNA はヒストンから解離していることが示唆されていたため、3-3において調製した 112 塩基対の DNA を含むヘキサソームを用いて SAXS 解析を行った。SAXS 解析の結果、図 8B に示すような X 線散乱曲線を得た。X 線散乱曲線から算出したヘキサソームの距離分布関数 ( $P(r)$ 関数) を図 8C に、慣性半径 ( $R_g$ : radius of gyration) と最大原子間距離 ( $D_{max}$ : maximum diameter) を図 8D に示す。 $P(r)$ 関数は溶液中のサンプルの単一粒子内に存在する電子間の距離の総和を示しており、 $P(r)$ 関数の形状からサンプル粒子の溶液構造情報を得ることができる。 $D_{max}$ は単一粒子内での最大の距離を示し、 $R_g$ は粒子の重心からの広がりを表す。ヘキサソームの  $D_{max}$  は  $115 \text{ \AA}$  であり、オクタソームの X 線結晶構造においてヌクレオソーム粒子内の最大距離は約  $110 \text{ \AA}$  であることから、ヘキサソームはオクタソームとほぼ同様の粒子径の構造体を形成していることが明らかになった (図 8D)。この結果から、図 7B②のモデルのように、ヘキサソームがオクタソームと同様にヒストンおよび DNA が配置した構造を形成している可能性が考えられた。ヘキサソームが実際にこのような構造を形成するのであれば、オクタソームの立体構造からヘキサソームのモデル構造を作製して理論的な散乱曲線を算出した場合には、実測の散乱曲線とよく一致する結果が得られると考えられる。このために、オクタソームの立体構造 (PDB ID: 3AFA) から 1 組の H2A と H2B および DNA の一部分を削除し、112 塩基対の DNA を結合したヘキサソームのモデル構造を構築した (図 9A)。構築したモデル構造の理論的な散乱曲線を CRY SOL ソフトウェアによって算出した (図 9B)。この理論的な散乱曲線から導出される  $P(r)$ 関数を図 9C に、 $R_g$  および  $D_{max}$  を図 9D に示す。

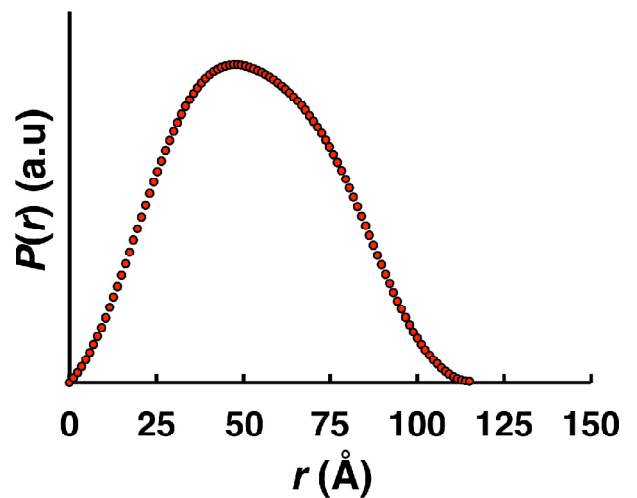
A



B



C



D

慣性半径 $R_g$ [ $\text{\AA}$ ]	最大原子間距離 $D_{\max}$ [ $\text{\AA}$ ]
38.5	115

### 図 8. X線小角散乱法によるヘキサソームの構造解析

(A) X線小角散乱の原理を図示する。X線小角散乱は溶液状態のタンパク質試料にX線を照射し、X線散乱を検出する。散乱データの円環平均である“散乱曲線”と、単一粒子内に存在する電子間の距離の総和を示す“ $P(r)$ 関数”を用いて構造について議論することが可能である。最大原子間距離 ( $D_{\max}$ ) は単一粒子内での最大の距離を示す。

(B) 112塩基対のDNAを含むヘキサソームの散乱曲線。(Arimura et al., 2012) Fig. 6Aより引用)

(C) 112塩基対のDNAを含むヘキサソームの $P(r)$ 関数。(Arimura et al., 2012) Fig. 6Bより引用)

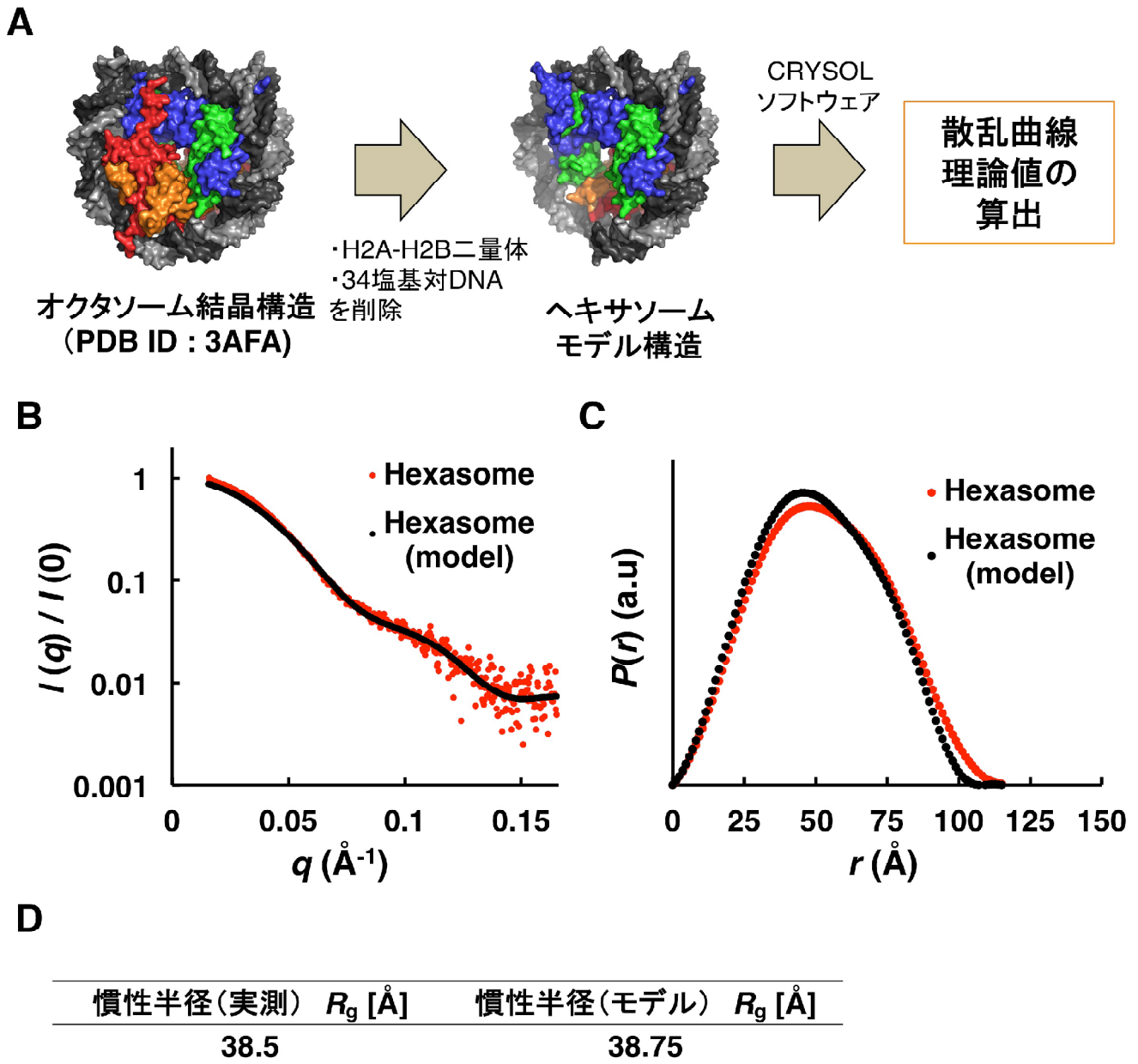
(D) 112塩基対のDNAを含むヘキサソームの慣性半径  $R_g$  および最大原子間距離  $D_{\max}$ 。オクタソームのX線結晶構造においてヌクレオソーム粒子内の最大距離は約110  $\text{\AA}$  であることから、ヘキサソームはオクタソームとほぼ同様の粒子径の構造体を形成していると考えられる。

実測値と比較すると、これらのデータは概ね一致していた。このことから、溶液中でのヘキサソームの構造は作成したモデル構造に近く、ヘキサソームはオクタソームから H2A-H2B が欠失しているにもかかわらず、その他のコアヒストン複合体の配置は大きく変化せずに、円盤状の構造体を形成していることが明らかになった。

### 3-6. 第3章まとめ

本研究ではヘキサソームを試験管内で再構成し、高純度に精製する方法を確立した (図 5)。193 塩基対の DNA を含むヘキサソームを精製し、MNase を用いた試験によって、ヘキサソームの構造中において MNase から保護される DNA は 110~120 塩基対程度であることを明らかにした (図 6)。この値はオクタソームにおいて MNase から保護される DNA よりも 30-40 塩基対程度短かった。112 塩基対の DNA を用いてもヘキサソームが形成可能であったことと、MNase 試験の結果を合わせ、ヘキサソームの構造中においてヒストン複合体に結合する DNA は 110-120 塩基対程度であると考えられる (図 6)。さらに 193 塩基対の DNA を含むヘキサソームとオクタソームの動的散乱解析により、ヘキサソームは同じ塩基長の DNA を含むオクタソームよりも大きく広がった構造を有することを明らかにした (図 7)。112 塩基対の DNA を含むヘキサソームの X 線小角散乱解析の結果、ヘキサソームの構造は、オクタソームの結晶構造を元に作製したモデル構造と良く一致することが分かった (図 8, 図 9)。

これらの結果を統合して考えると、ヘキサソームはオクタソームと類似した円盤状の構造体を形成しているが、H2A-H2B 二量体を欠いているためにヒス



**図 9. モデル構造から算出される理論的X線散乱と実測値の比較解析**

(A) ヘキサソームのモデル構造の作製と理論的散乱曲線の算出のスキーム。オクタソームの立体構造から1分子のH2AとH2B、34塩基対のDNAを削除し、112塩基対のDNAを結合したヘキサソームのモデル構造を作製した。構築したモデル構造の理論的な散乱曲線および理論的な $P(r)$ 関数を、CRY SOLソフトウェアを用いて算出した。

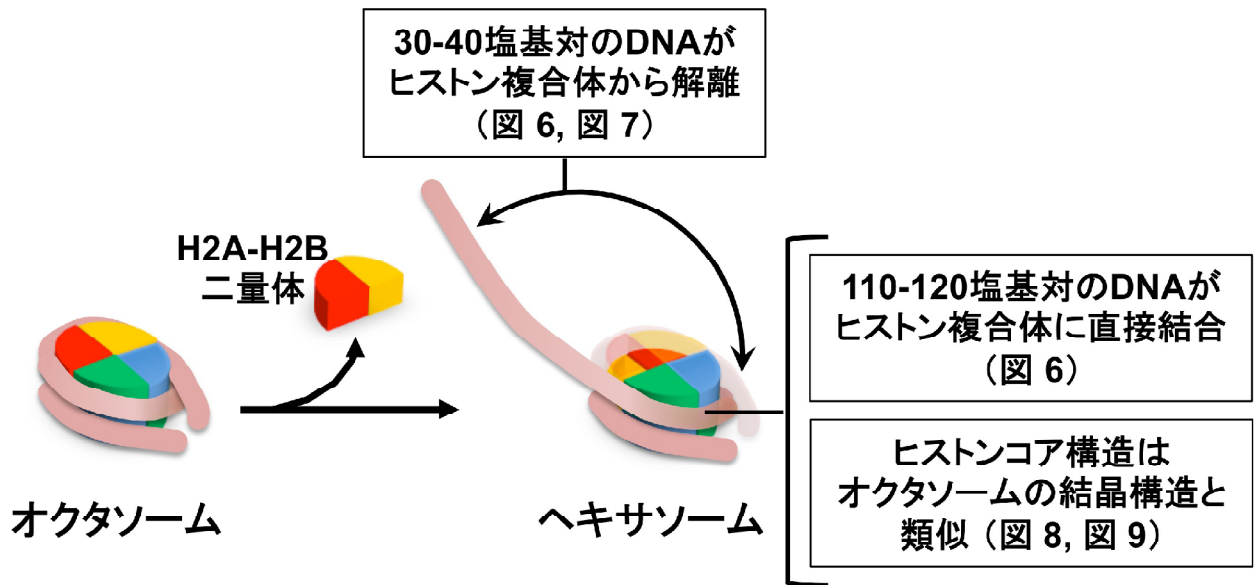
(B) 112塩基対のDNAを含むヘキサソームの散乱曲線の実測値とモデル構造より算出した理論値。実測値は理論値と概ね重なっており、溶液中でのヘキサソームの構造は作成したモデル構造に近い構造であると考えられる。((Arimura et al., 2012) Fig. 7Bより引用)

(C) 112塩基対のDNAを含むヘキサソームの $P(r)$ 関数の実測値とモデル構造より算出した理論値。実測値は理論値と概ね重なっている。((Arimura et al., 2012) Fig. 7Cより引用)

(D) 112塩基対のDNAを含むヘキサソームの慣性半径の実測値とモデル構造より算出した理論値。実測値は理論値と概ね一致している。



トン複合体と強固に結合する DNA がオクタソームよりも 30-40 塩基対程度短く、110-120 塩基対の DNA を結合している。また、ヒストン複合体と結合する DNA がオクタソームよりも短いために、この部分の DNA が大きく開いた構造を形成していると考えられる (図 10)。本研究で得られたヘキサソームに関する知見の、本研究分野における位置づけや、生物学的意義については第 5 章で詳細に述べる。



### 図10. ヘキサソームに関して本論文で得られた知見

ヘキサソームはオクタソームと類似した円盤状の構造体を形成しているが、H2A-H2B 2量体を欠いているためにヒストン複合体と強固に結合するDNAがオクタソームよりも30-40塩基対程度短く、110-120塩基対のDNAを結合している。また、ヒストン複合体と結合するDNAがオクタソームよりも短いために、この部分のDNAが大きく開いた構造を形成していると考えられる。

## 第4章 H2A.Bを含むヌクレオソームの生化学的解析および構造生物学的解析

### 4-1. 序

ヒストン H2A.B は哺乳類に特異的なヒストン H2A のバリエーションであり、精巣や非ホジキンリンパ腫において高発現していることが報告されている

(Ishibashi et al., 2010; Winkler et al., 2012)。これまでに、H2A.B は転写が活性化した遺伝子上にヌクレオソームを形成していることが報告されていた

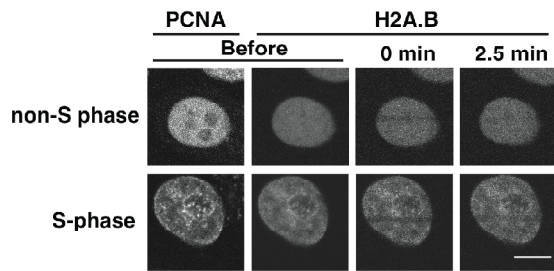
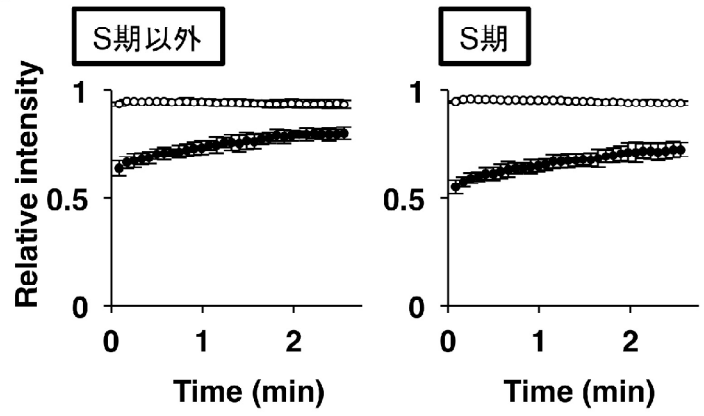
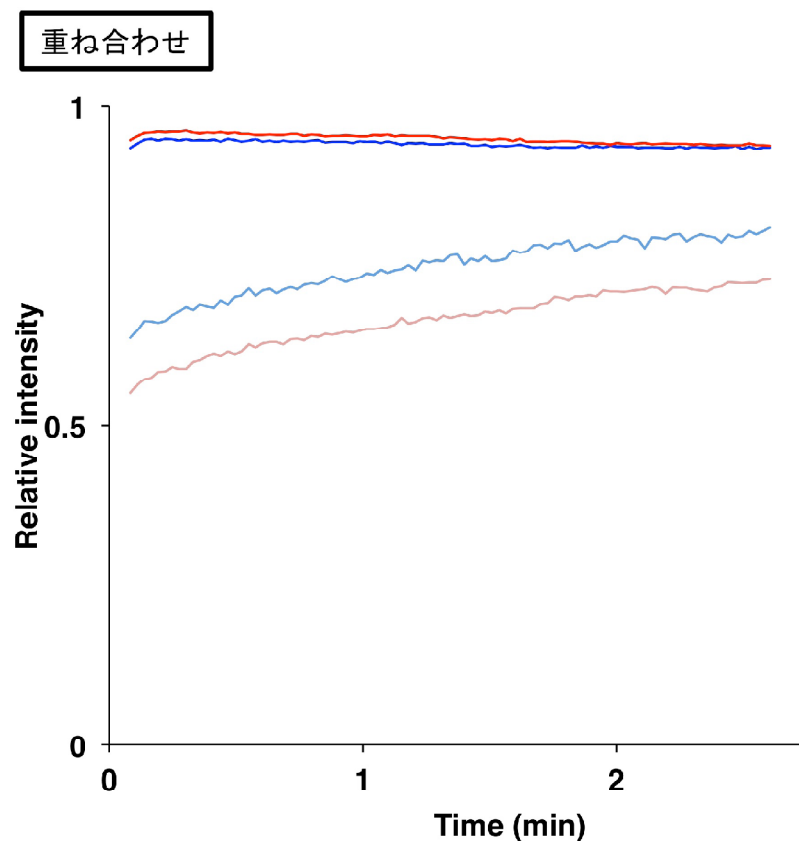
(Tolstorukov et al., 2012; Ioudinkova et al., 2012)。本研究の共同研究者である木村宏教授(現・東京工業大学)によって、GFP-H2A.B と mCherry-PCNA (DNA複製装置の構成因子) を共発現させた HeLa 細胞において、DNA複製期であるS期特異的に GFP-H2A.B と mCherry-PCNA が共局在することが発見された

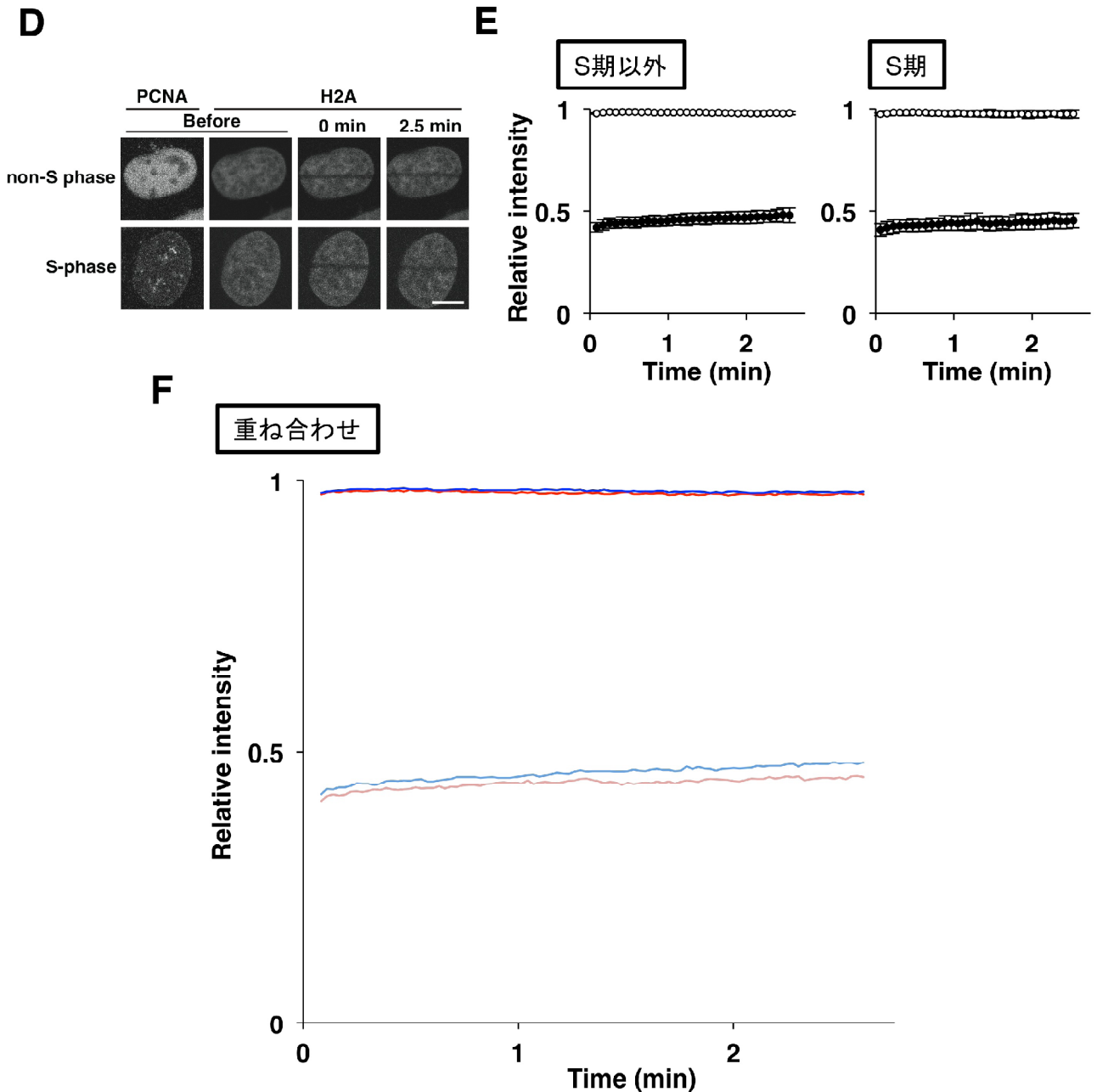
(Arimura et al., 2013)。第1章で紹介したように、転写活性化領域やDNA複製領域では、DNA上でクロマチンの再編成が盛んに起こっている。そこで、同様にクロマチンの再編成が盛んなDNA損傷修復領域へのH2A.Bの集積についても検討した(Arimura et al., 2013)。さらに、精製H2A.Bヌクレオソームを用いた解析によって、H2A.Bは通常のヌクレオソームよりも短いDNAと結合したヌクレオソーム構造を形成することが報告されていたが、H2A.Bを含むヌクレオソームの詳細な分子構造については明らかになっていなかった(Bao et al., 2004; Doyen et al., 2006)。そこで、試験管内でのヌクレオソーム再構成法を用いてH2A.Bヌクレオソームを再構成し、生化学的および構造生物学的解析を行った(Arimura et al., 2013)。本章ではこれらの結果について述べる。

## 4-2. DNA 損傷領域における H2A.B の細胞内動態解析

DNA 損傷領域における H2A.B の集積の有無を解析するため、EGFP を付加した H2A.B (GFP-H2A.B) もしくは EGFP を付加した H2A (GFP-H2A) を発現する HeLa 細胞の核にレーザー照射によって DNA 損傷を導入し、その後の GFP-H2A.B および GFP-H2A の局在を解析した。レーザー光が照射された領域では、GFP の蛍光退色が起こる。時間経過に伴って細胞内のタンパク質が移動し、蛍光退色した GFP と未退色の GFP が置き換わることにより、レーザー照射領域の蛍光が回復する現象 (FRAP : Fluorescence Recovery after Photobleaching) が観察される。この現象を利用し、GFP 融合ヒストンのクロマチンへの取り込みと解離の動態を観察することが可能である (Kimura and Cook, 2001)。H2A.B の FRAP 解析については既に報告があり、H2A.B は H2A と比較して、クロマチンへの取り込みと解離の交換速度が早いことがわかっている (Gautier et al., 2004)。

まず、DNA に損傷が導入されない 488 nm の波長のレーザーを用いて図 11A, 図 11D のように GFP-H2A もしくは GFP-H2A.B を発現する HeLa 細胞の細胞核の中央にレーザーを 2  $\mu\text{m}$  幅で照射して GFP を退色させた後、レーザー照射領域およびレーザー非照射領域の GFP の蛍光強度の経時的な変化を定量し、レーザー照射領域の蛍光回復を計測した (図 11B, 図 11E)。その結果、Gautier 博士らの報告通り GFP-H2A.B 発現細胞の方が GFP-H2A 発現細胞よりも蛍光回復が早かった (Gautier et al., 2004)。同様の解析を DNA に損傷が導入される 405 nm の波長のレーザーを用いて行い、レーザー照射領域およびレーザー非照射領域の GFP の蛍光強度の経時的な変化を定量し、DNA 損傷導入領域へ

**A****B****C**



**図 11. 波長488 nmのレーザー照射による生細胞内でのGFP-H2A.Bの動態解析**

(A)(D) GFP-H2A.BもしくはGFP-H2Aを発現するHeLa細胞の細胞核の中央に2  $\mu\text{m}$ 幅のレーザーを照射してGFPを退色させた。時間経過に伴って細胞内のタンパク質が移動し、蛍光退色したGFPと未退色のGFPが置き換わることにより、レーザー光照射領域の蛍光が回復する。PCNA-mCherryの局在パターンにより、各細胞の細胞周期を判断した。S期にはH2A.Bがfociを形成するが、foci形成に関わらず、H2A.BはH2Aと比較して、クロマチンへの取り込みと解離の交換速度が早い。白い棒は10  $\mu\text{m}$ を示す。(Arimura et al., 2013) Fig. S2a, Fig. S2bより引用)

(B)(E) それぞれ(A) (S期以外:  $n = 10$ , S期:  $n = 11$ )と(C) (S期以外:  $n = 11$ , S期:  $n = 13$ )の結果を定量した結果。1.644秒ごとに撮影し、5枚の画像を撮影した後、レーザーを照射した。レーザー照射時を0秒として、Image Jを用い、各画像についてレーザー照射領域および非照射領域のGFPの蛍光強度を、核外の蛍光強度をバックグラウンドとして差し引いて算出した。レーザー照射前の各領域の蛍光強度を1として、蛍光強度の相対値を算出した。白丸がレーザー光非照射領域の蛍光強度を、黒丸がレーザー照射領域の蛍光強度をそれぞれ示す。

(C)(F) (C)は(B)のグラフを、(F)は(E)のグラフをそれぞれ重ね合わせたグラフ。淡い青線がS期以外の細胞周期の細胞におけるレーザー照射領域の蛍光強度を、濃い青線がS期以外の細胞周期の細胞におけるレーザー非照射領域の蛍光強度を、淡い赤線がS期の細胞周期の細胞におけるレーザー照射領域の蛍光強度を、濃い赤線がS期の細胞周期の細胞におけるレーザー非照射領域の蛍光強度をそれぞれ示している。

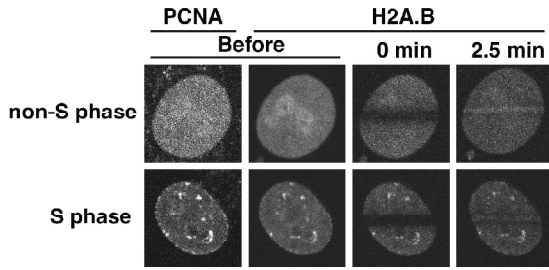
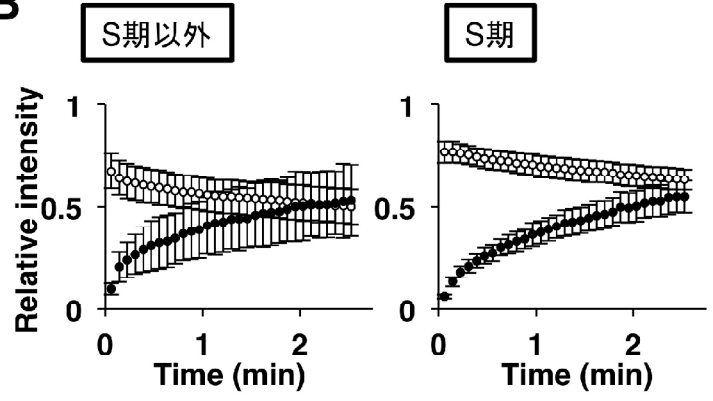
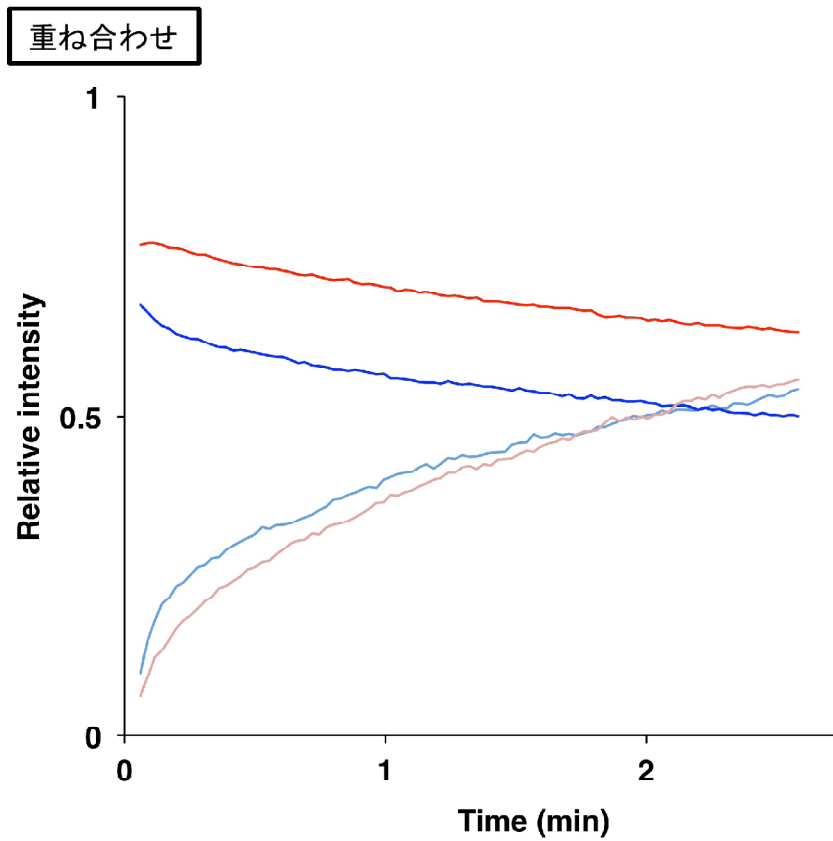
((Arimura et al., 2013) Fig. S2c, Fig. S2dより引用)

の GFP 融合タンパク質の集積を評価した (図 12 A-F)。この結果、GFP-H2A.B 発現細胞の方が GFP-H2A 発現細胞よりも蛍光回復が明らかに早く、さらに、GFP-H2A.B 発現細胞においてのみ、レーザー光照射から 2 分以内に DNA 損傷導入領域の蛍光強度がレーザー光非照射領域の蛍光強度を上回る細胞も見られた (図 12 A, D)。このことから、H2A.B は DNA 損傷導入後、直ちに DNA 損傷領域に集積する性質を有すると考えられた。

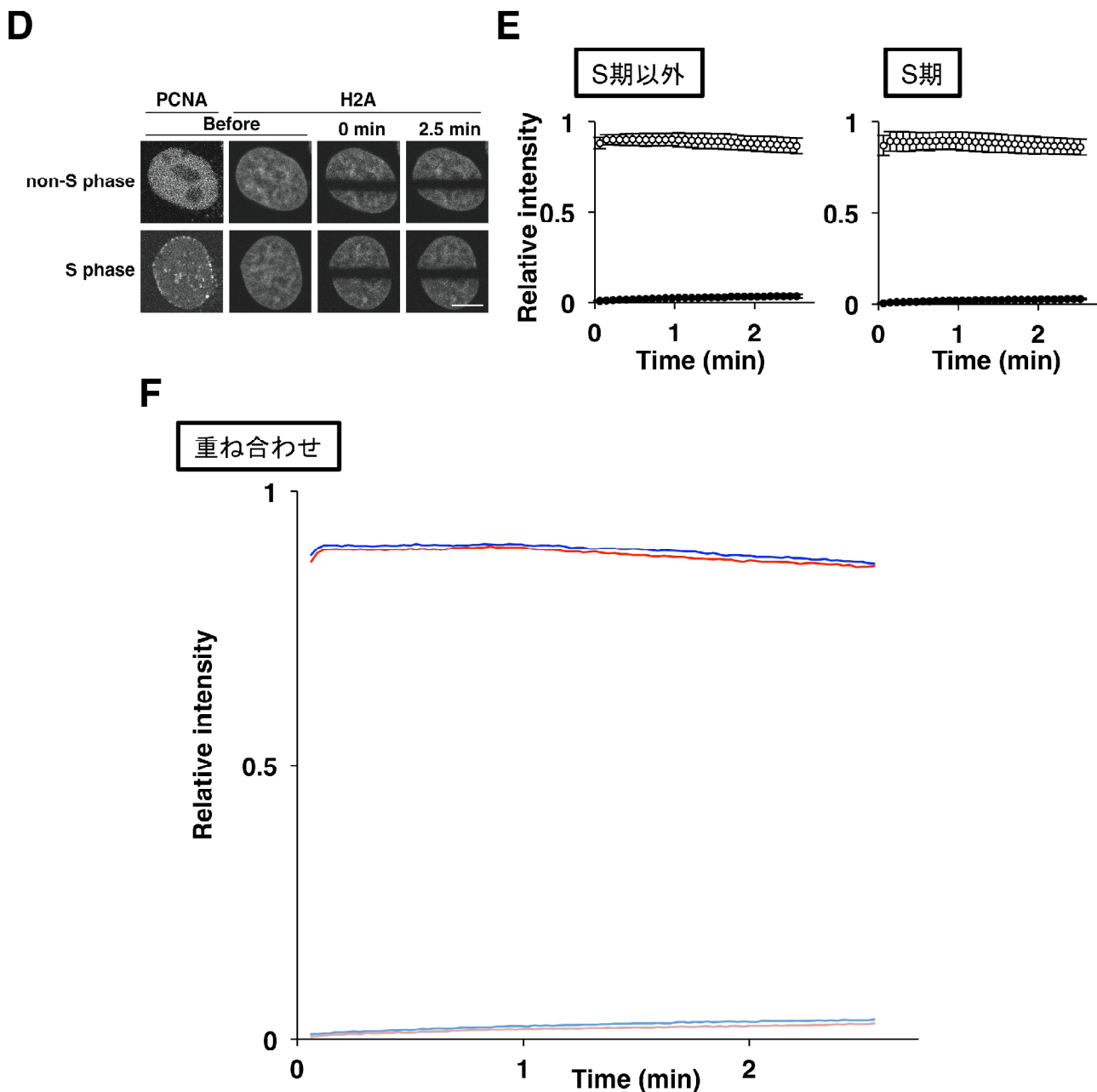
また、本研究の共同研究者である木村宏教授により、DNA 損傷領域と同様に、H2A.B が DNA 複製領域にも集積することが明らかになっていたために、本解析に用いた細胞は PCNA-mCherry を発現したものを使用しており、DNA 複製複合体の構成因子である PCNA の局在パターンによって細胞周期を判別し、S 期および S 期以外の細胞を区別して解析している (図 11、図 12)。この結果、DNA 損傷領域への H2A.B の集積は、S 期および S 期以外のどちらの場合においても共通して観察されることが明らかになった (図 12 A-C)。

### 4-3. 146 塩基対以下の短い DNA を用いたヌクレオソーム形成効率試験

通常型の H2A ヌクレオソームは 146 塩基対の DNA がヒストン複合体の周りに巻き付いてヌクレオソームを形成している。一方、H2A.B ヌクレオソームは、ヌクレオソーム構造中に含まれる DNA が H2A の場合より短いことが、生化学的な試験や、原子間力顕微鏡を用いた観察から示されていた (Bao et al., 2004; Doyen et al., 2006; Tolstorukov et al., 2012)。これらの報告から、H2A.B は短い DNA 領域にもヌクレオソームを新規形成することができのではないかと考

**A****B****C**





**図 12. 波長405 nmのレーザー照射による、DNA損傷領域へのGFP-H2A.Bの集積解析**

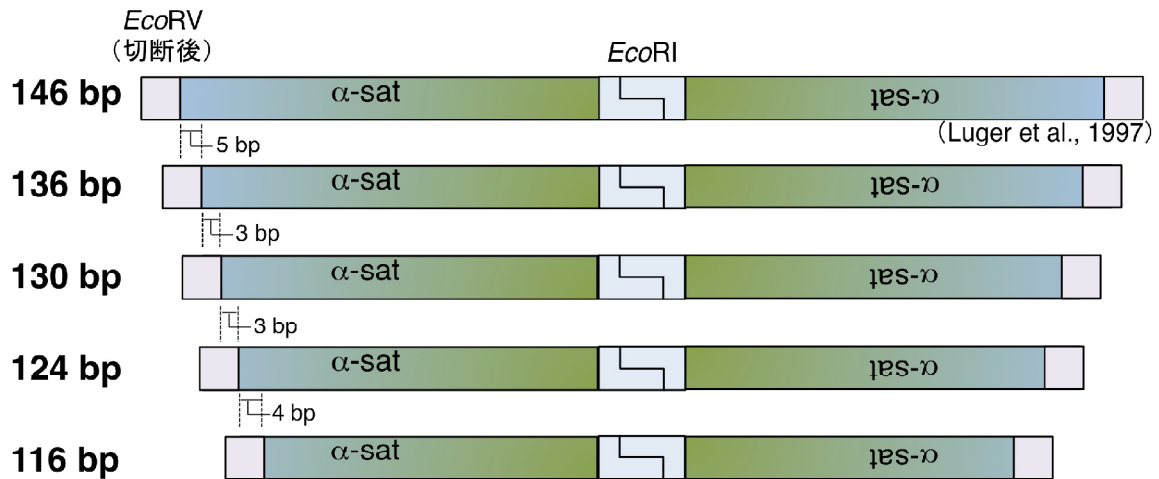
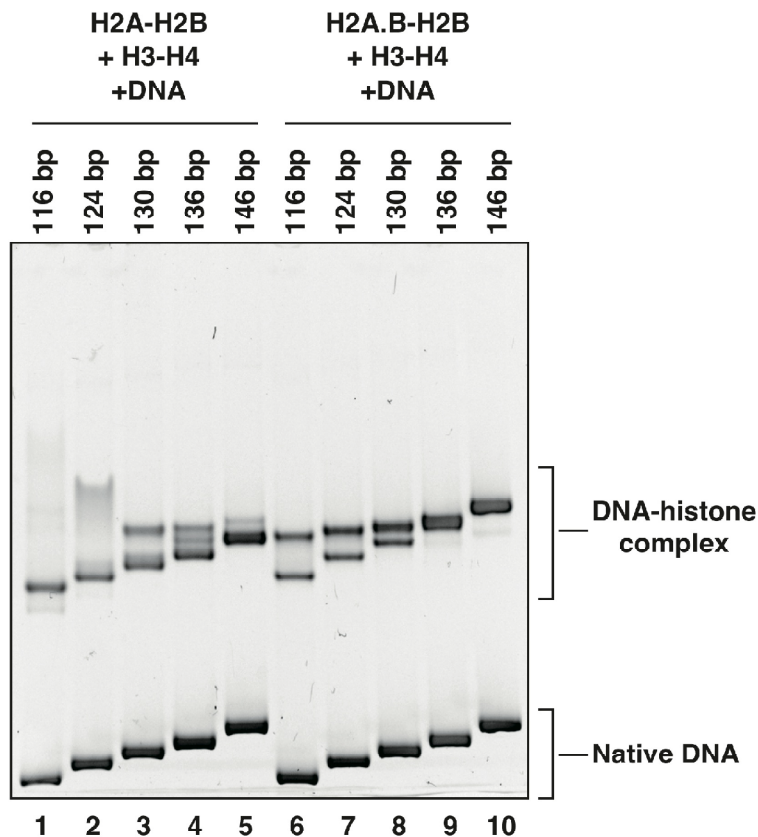
**(A)(D)** GFP-H2AもしくはGFP-H2A.Bを発現するHeLa細胞の細胞核の中央に2  $\mu\text{m}$ 幅の405 nmレーザーを照射してDNA損傷を導入するとともにGFPを退色させた。時間経過に伴って細胞内のタンパク質が移動し、蛍光退色した領域の蛍光が回復する。PCNA-mCherryの局在パターンにより、各細胞の細胞周期を判断した。GFP-H2A.BはGFP-H2Aよりも回復が早いばかりか、この領域に集積する現象がみられた。白い棒は10  $\mu\text{m}$ を示す。(Arimura et al., 2013) Fig. S3a, Fig. S3bより引用

**(B)(E)** それぞれ(A) (S期以外:  $n = 12$ , S期:  $n = 12$ )と(C) (S期以外:  $n = 10$ , S期:  $n = 11$ )の結果を定量した結果。1.644秒ごとに撮影し、5枚の画像を撮影した後、レーザーを照射した。レーザー照射時を0秒として、Image Jを用い、各画像についてレーザー照射領域および非照射領域のGFPの蛍光強度を、核外の蛍光強度をバックグラウンドとして差し引いて算出した。レーザー照射前の各領域の蛍光強度を1として、蛍光強度の相対値を算出した。白丸がレーザー光非照射領域の蛍光強度を、黒丸がレーザー照射領域の蛍光強度をそれぞれ示す。

**(C)(F)** (C)は(B)のグラフを、(F)は(E)のグラフをそれぞれ重ね合わせたグラフ。淡い青線がS期以外の細胞周期の細胞におけるレーザー照射領域の蛍光強度を、濃い青線がS期以外の細胞周期の細胞におけるレーザー非照射領域の蛍光強度を、淡い赤線がS期の細胞周期の細胞におけるレーザー照射領域の蛍光強度を、濃い赤線がS期の細胞周期の細胞におけるレーザー非照射領域の蛍光強度をそれぞれ示している。(Arimura et al., 2013) Fig. S3c, Fig. S3dより引用

えた。そこで、4種類の長さのDNA（116塩基対、124塩基対、130塩基対および136塩基対）を用意し、ヌクレオソームの形成効率を試験した（図13A）。116塩基対、124塩基対、130塩基対、136塩基対および146塩基対のそれぞれのDNAに、H3.1-H4複合体とH2A-H2B複合体もしくはH2A.B-H2B複合体を混合し、塩透析法によってヌクレオソームを再構成した後に、native PAGEによって、それぞれのDNA長におけるヌクレオソームの形成を解析した。

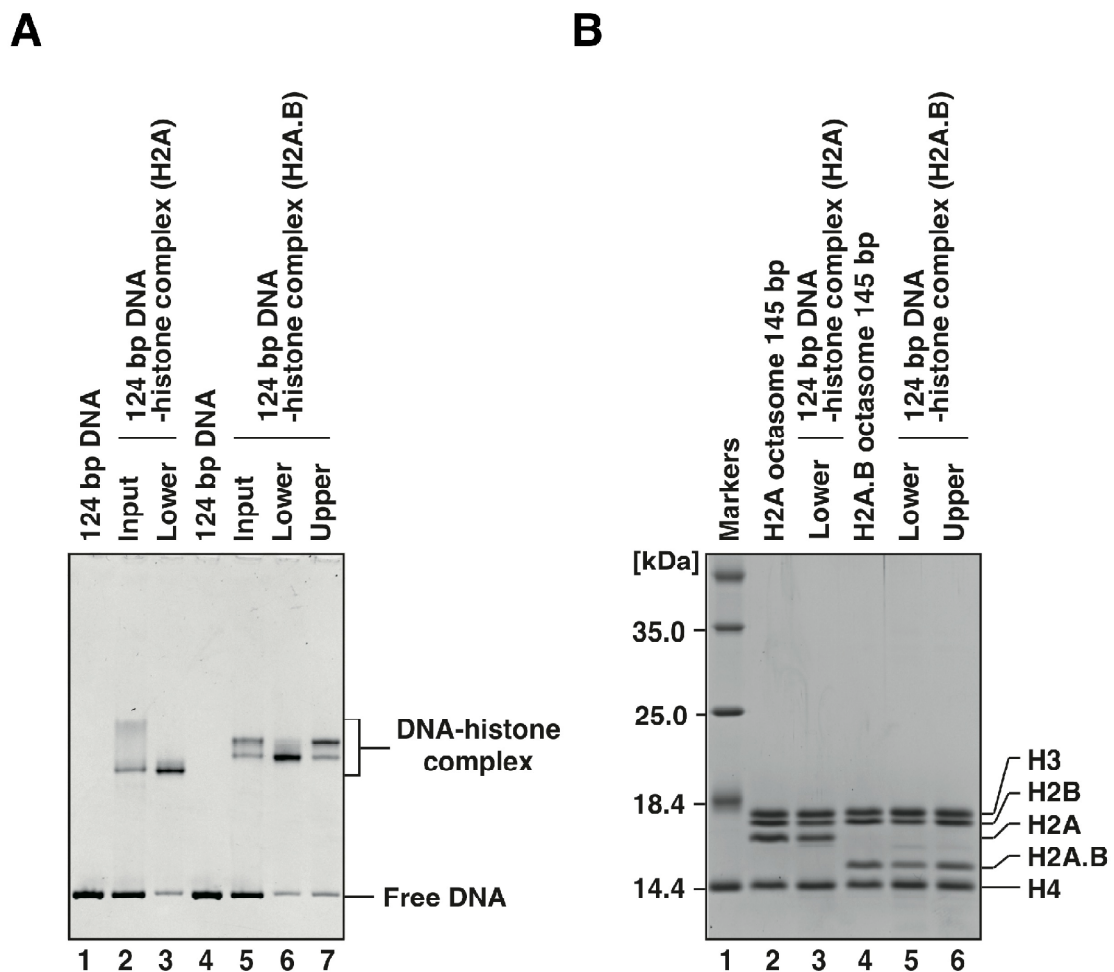
（図13A, 図13B）。この結果、H2Aを含む場合（図13B レーン1-5）と、H2A.Bを含む場合（図13B レーン6-10）ではヌクレオソームの形成パターンが明らかに異なっていた。特に124塩基対以下のDNAを用いた場合には顕著な差異が認められた。116塩基対および124塩基対のDNAを用いてH2Aヌクレオソームを再構成した場合（図13B レーン1, レーン2）ではDNA-ヒストン複合体のバンドが1本のみ観察されるのに対し、H2A.Bの場合（図13B レーン6, レーン7）ではDNA-ヒストン複合体のバンドが2本観察された。これらのバンドがどのようなDNA-ヒストン複合体に由来するのかを明らかにするため、124塩基対のDNAから形成されたDNA-ヒストン複合体のバンド成分をPrep Cell装置を用いてnative PAGEによって図14Aに示すように分画し、さらに図14Bに示すようにSDS-PAGEによってヒストン組成を解析した。その結果、H2Aを含む124 bp DNA-ヒストン複合体はH2AオクタソームよりもH2AおよびH2Bの含有量が少なく、ヘキサソームであると考えられた（図14B レーン3）。H2A.Bを含む124 bp DNA-ヒストン複合体のうちLowerバンドとして検出されるものについても、H2A.BオクタソームよりもH2A.BおよびH2Bの含有量が少なく、ヘキサソームであると考えられた（図14B レーン5）。

**A****B**

### 図 13. 146塩基対以下の短いDNAを用いた、H2A.B を含むヌクレオソームの形成効率試験

(A) 146塩基対以下のDNAの設計図。146塩基対のDNAはLuger博士らが結晶構造解析にもちいたヒト $\alpha$ -サテライト領域由来のDNA配列を回文配列にしたものを使用した(Luger et al., 1997)。136塩基対、130塩基対、124塩基対および116塩基対のDNAは、図のように146塩基対のDNAに基づき、回文性を保ちつつ $\alpha$ -サテライト部分をDNA末端側から短くすることで、設計した。

(B) 116塩基対、124塩基対、130塩基対、136塩基対および146塩基対のそれぞれのDNAに、H3-H4複合体とH2A-H2B複合体もしくはH2A.B-H2B複合体を混合し、塩透析法によってヌクレオソームを再構成した産物をNative PAGEによって展開し、EtBrでDNAを染色して撮影することで、DNA-ヒストン複合体の形成を解析した結果を示す。116塩基対および124塩基対のDNAを用いてH2Aヌクレオソームを再構成した場合(レーン1, 2)ではDNA-ヒストン複合体のバンドが1本のみ観察されるのに対し、H2A.Bの場合(レーン6, 7)ではDNA-ヒストン複合体のバンドが2本観察された。(Arimura et al., 2013) Fig. 3cより引用)



### 図 14. 124塩基対 DNA-ヒストン複合体の組成解析

Fig. 13 B, レーン2, 7のバンドがどのようなDNA-ヒストン複合体に由来するのかを明らかにするため、124塩基対のDNAから形成されたDNA-ヒストン複合体のバンド成分をPrep Cell装置を用いてnative PAGEによって分離、精製した。

**(A)** 単離精製したDNA-ヒストン複合体をnative PAGEによって展開し、EtBrでDNAを染色して撮影することで、精製純度を確認した結果を示す。((Arimura et al., 2013) Fig. 4aより引用)

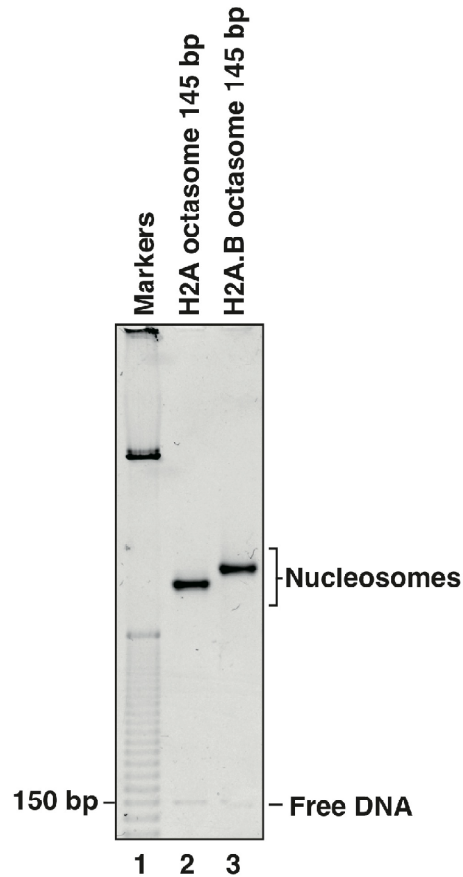
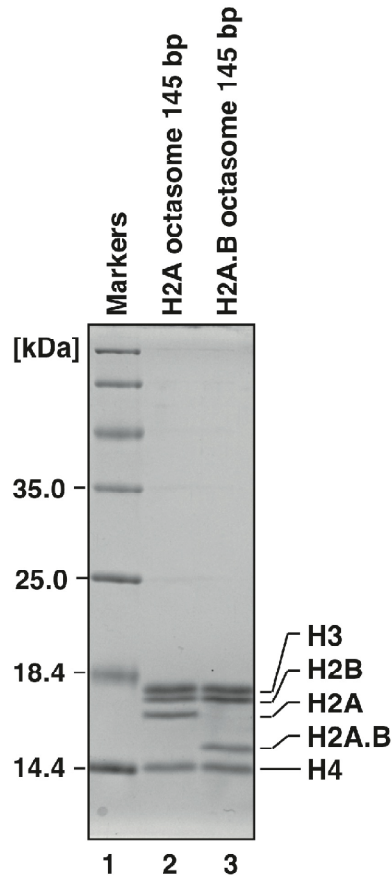
**(B)** 単離精製したDNA-ヒストン複合体をSDS-PAGEによって展開し、EtBrでDNAを染色して撮影することで、各バンドを構成するDNA-ヒストン複合体のヒストン組成を確認した結果を示す。レーン3に示すH2Aを含む124 bp DNA-ヒストン複合体はヘキサソームと考えられた。一方、H2A.Bを含む124 bp DNA-ヒストン複合体はLowerバンド(レーン5)がヘキサソーム、upperバンド(レーン6)がオクタソームと考えられた。((Arimura et al., 2013) Fig. 4bより引用)

一方、H2A.B を含む 124 bp DNA-ヒストン複合体のうち upper バンドとして検出されるものにおいては、H2A.B オクタソームと同等の H2A および H2B を含んでおりオクタソームであると考えられた (図 14B レーン 6)。この結果は H2A.B はヌクレオソームを新規形成するために必要な DNA が、通常型の H2A よりも短く、H2A.B は H2A ヌクレオソームが形成できないような短い DNA 領域にもヌクレオソームを形成することが可能であることを示している。

図 13B レーン 3 にみられるように、130 塩基対の DNA を用いた場合、2 種類の H2A を含む DNA-ヒストン複合体が形成された。124 塩基対の DNA を用いた場合結果から、lower バンドはヘキサソームであると考えられる。Upper バンドは、146 塩基対の DNA を含むオクタソームよりも泳動度が小さいため、ヘキサソームに非特異的にヒストンが結合した DNA-ヒストン複合体かもしれない。

#### 4-4. 145 塩基対の DNA および H2A.B を含むヌクレオソームの試験管内再構成

動的光散乱および X 線小角散乱に用いるため、145 塩基対の 601 配列を含む DNA を用いて H2A ヌクレオソームおよび H2A.B ヌクレオソームを試験管内で再構成し、Prep Cell を用いて native PAGE による精製を行った。601 DNA は非常に安定で均一なヌクレオソーム構造を形成する DNA 配列であり、SAXS 解析によるヌクレオソームのビーズモデル構築に有効であることが示されている (Yang, C. et al., 2011)。精製後の H2A ヌクレオソームおよび H2A.B ヌクレオソームを native PAGE および SDS-PAGE によって解析した (図 15A, 図 15B)。

**A****B**

### 図 15. 145塩基対のDNAを含むH2A.Bヌクレオソームの試験管内再構成

動的光散乱およびX線小角散乱に用いるため、145塩基対のwidom 601配列を含むDNAを用いてH2AヌクレオソームおよびH2A.Bヌクレオソームを試験管内で再構成し、Prep Cellを用いてnative-PAGEによる精製をおこなった。

(A) 精製後のH2AヌクレオソームおよびH2A.Bヌクレオソームをnative PAGEによって展開し、EtBrによってDNAを染色して撮影した結果を示す。それぞれのヌクレオソームが高純度に精製できていることが分かる。

(B) 精製後のH2AヌクレオソームおよびH2A.BヌクレオソームをSDS-PAGEによって展開し、CBBIによってタンパク質を染色して撮影した結果を示す。全てのヒストンが等量ずつ含まれたオクタソームが精製されたことが分かる。

以下の解析はこれらの純度のヌクレオソームを用いて行った。

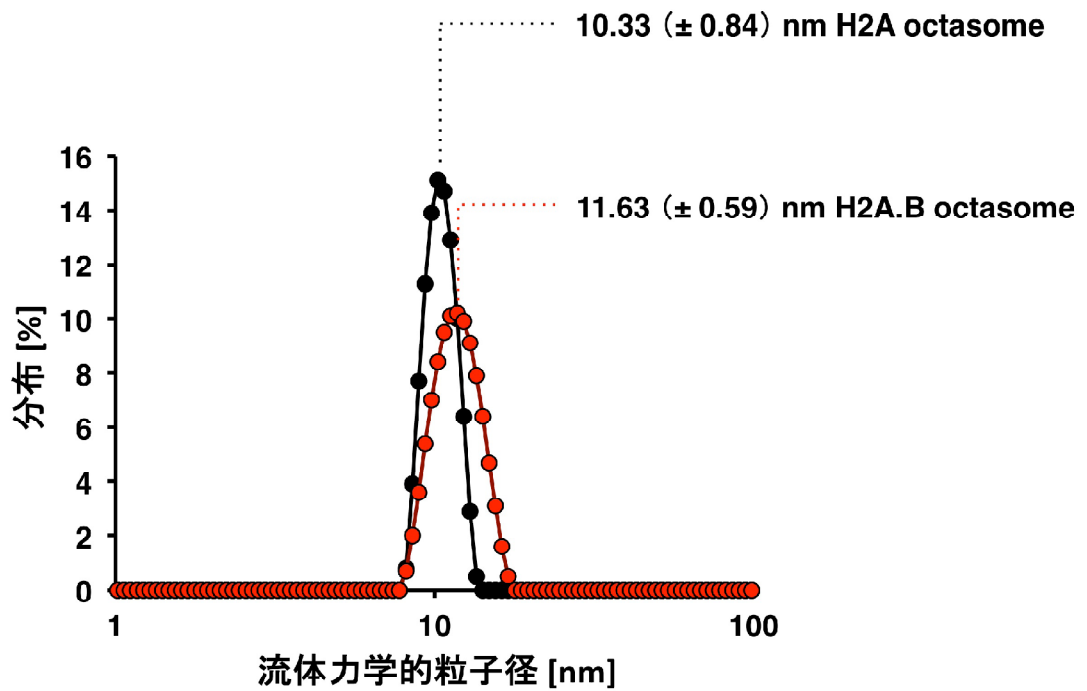
#### 4-5. H2A.B を含むヌクレオソームの動的光散乱解析

H2A.Bヌクレオソームの流体力学的粒子径を測定するため、4-4に記した方法で精製した145塩基対のDNAを含むヌクレオソームを用いて動的光散乱解析を行った(図16)。先行研究から想定されたように、H2A.BオクタソームにおいてDNAがヒストン複合体から解離した構造を形成するのであれば、流体力学的粒子径はH2Aオクタソームよりも大きく算出されると考えられる(Bao et al., 2004; Doyen et al., 2006; Tolstorukov et al., 2012)。実際にはH2Aオクタソームの流体力学的粒子径は $10.33 \pm 0.84$  nmであり、H2A.Bオクタソームの流体力学的粒子径は $11.63 \pm 0.59$  nmであった(図16)。この結果から、H2A.Bヌクレオソームは、先行研究から想定されていたようにヒストン複合体からDNAが解離した構造を形成していると考えられた。

#### 4-6. X線小角散乱によるH2A.Bを含むヌクレオソームの構造解析

SAXS法によって水溶液中のH2A.Bヌクレオソームの構造を解析するため、4-4に記した方法で精製した145塩基対のDNAを含むオクタソームを用いて実験を行った。図16AにH2A.BオクタソームおよびH2AオクタソームのX線散乱曲線を示す。X線散乱曲線から算出したH2A.BオクタソームおよびH2Aオクタソーム粒子内の距離分布( $P(r)$ 関数)を図17Bに示す。さらにH2AオクタソームおよびH2A.Bオクタソームの慣性半径 $R_g$ と最大原子間距離 $D_{max}$ を

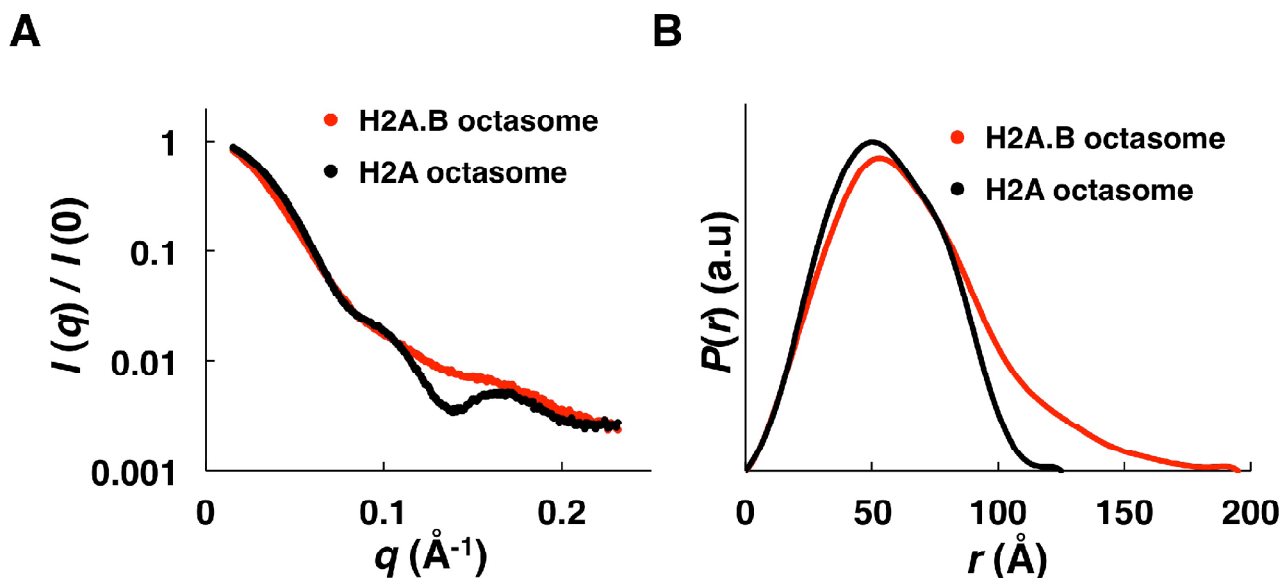




### 図 16. H2A.B を含むヌクレオソームの動的光散乱解析

精製した145塩基対のDNAを含むヌクレオソームを用いた動的光散乱解析。先行研究から想定されたように、H2A.BヌクレオソームにおいてDNAがヒストン複合体から解離した構造を形成するのであれば、流体力学的粒子径はH2Aヌクレオソームよりも大きく算出されると考えられる。実際にはH2Aヌクレオソームの流体力学的粒子径は $10.33 \pm 0.84$  nmであり、H2A.Bヌクレオソームの流体力学的粒子径は $11.63 \pm 0.59$  nmであった。この結果から、H2A.Bヌクレオソームは、ヒストン複合体からDNAが解離した構造を形成していると考えられた。





C

	慣性半径 $R_g$ [ $\text{\AA}$ ]	最大原子間距離 $D_{\max}$ [ $\text{\AA}$ ]
H2A オクタソーム	43.4	125
H2A.B オクタソーム	49.4	195

### 図 17. X線小角散乱によるH2A.B を含むヌクレオソームの構造解析

145塩基対のDNAを含むヌクレオソームを用いて、SAXS法による水溶液中のH2A.Bオクタソームの構造解析を行った。

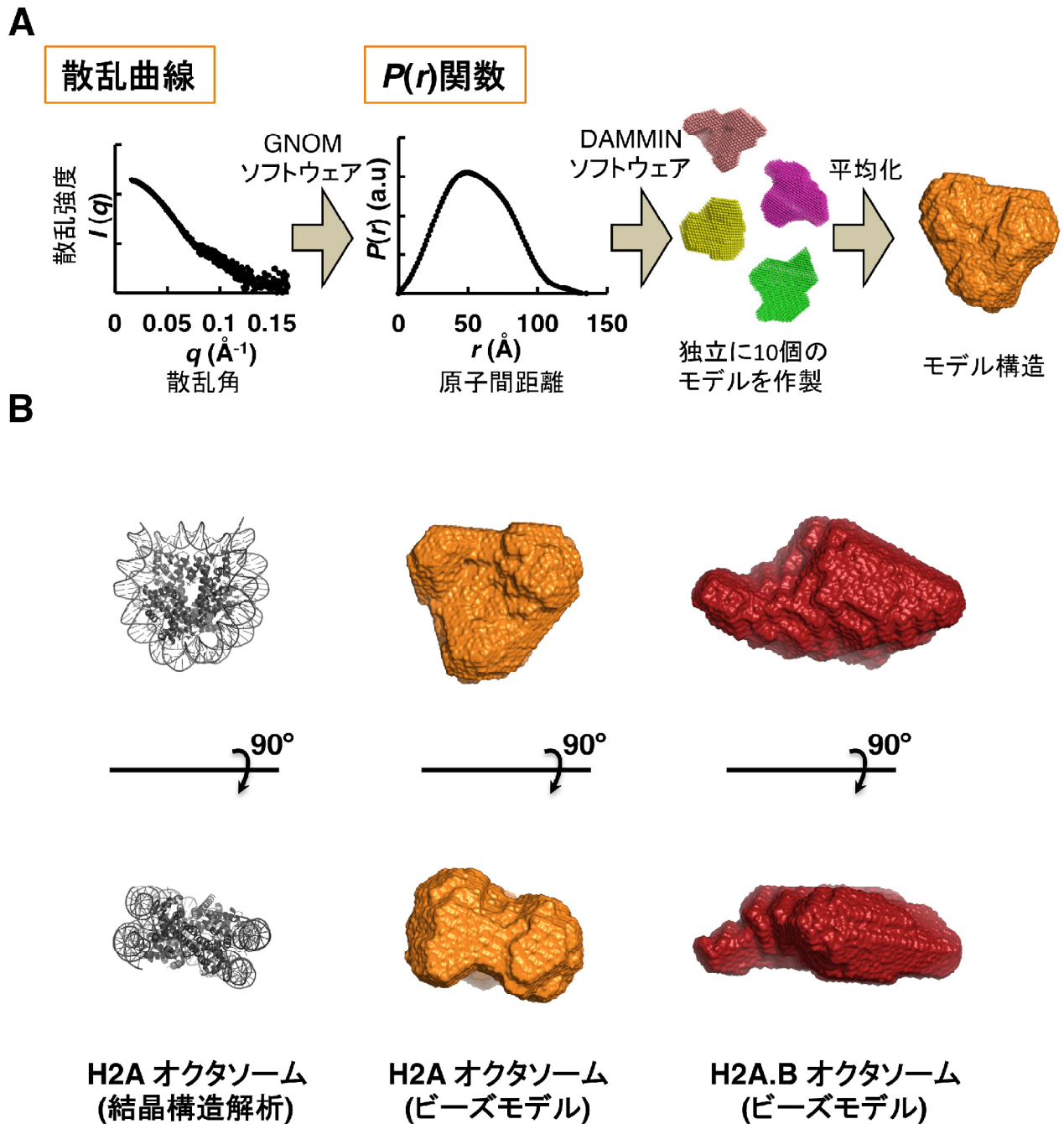
(A) H2AオクタソームおよびH2A.BオクタソームのX線散乱曲線。H2A.Bオクタソーム(赤の点)とH2Aオクタソーム(黒の点)の間で散乱曲線が大きく異なることから、これらのヌクレオソームの構造は大きく異なることが分かる。

(B) X線散乱曲線から算出したH2Aオクタソーム(黒の線)およびH2A.Bオクタソーム(赤の線)の粒子内の距離分布( $P(r)$ 関数)。H2A.BオクタソームとH2Aオクタソームの間で粒子内の距離分布が大きく異なることから、これらのヌクレオソームの構造は大きく異なり、H2A.Bオクタソームは大きく広がった構造を形成していることが分かる。(Arimura et al., 2013) Fig. 5cより引用)

(C) H2AオクタソームおよびH2A.Bオクタソームの慣性半径 $R_g$ と最大原子間距離 $D_{\max}$ 。慣性半径と最大原子間距離もH2A.BオクタソームがH2Aオクタソームと比較して大きく広がった構造を形成していることを示している。(Arimura et al., 2013) Fig. 5dより引用)

図 17C に示す。H2A.B オクタソームと H2A オクタソームの間で散乱曲線と  $P(r)$  関数が大きく異なることから、これらのヌクレオソームの構造は大きく異なることが分かる。さらに  $R_g$ ,  $D_{max}$  および  $P(r)$  関数に比較すると、H2A.B オクタソームが H2A オクタソームと比較して大きく広がった構造を形成していることが分かる。

1999 年に Svergun 博士によって開発された DAMMIN ソフトウェアを用いることで、SAXS によって得られた散乱データと矛盾しないタンパク質分子のモデル構造を構築することができる (Svergun, 1999)。DAMMIN ソフトウェアを用いて独立に 10 回の演算を行って得られた構造を平均化し、最終的なモデル構造を構築した。H2A.B オクタソームおよび H2A オクタソームのモデル構造を図 18B に示す。H2A オクタソームのモデル構造は H2A オクタソームの結晶構造と概ね一致しており、このことから、DAMMIN ソフトウェアを用いることで妥当なモデル構造が構築できていると考えられる。一方、H2A.B ヌクレオソームのモデル構造は、楕円形の円盤となっており、ヌクレオソームの DNA 出入り口付近に付加的な構造領域が存在している。このことから、H2A.B ヌクレオソームは通常のヌクレオソームよりも大きく広がった、特殊なヌクレオソーム構造を形成していることが明らかになった。また、ビーズモデルの形状から、H2A.B ヌクレオソーム上の DNA 出入り口付近において、DNA が広がった構造を形成している可能性が考えられる。筆者らは引き続き行った中性子小角散乱 (SANS) 解析により、DNA 由来の散乱データとヒストン由来の散乱データを別々に解析することで、H2A.B ヌクレオソームにおいて広がった構造を形成しているのは DNA であり、ヒストン複合体はむしろコンパクトな構造を形成して



**図 18. X線小角散乱によるH2A.B を含むヌクレオソームのモデル構造構築**

(A) SAXS解析によるモデル構造構築のスキーム。GNOMソフトウェアによってX線散乱データから粒子内の距離分布( $P(r)$ 関数)を算出することが出来る。DAMMINソフトウェアを用いることで、 $P(r)$ 関数と矛盾しないタンパク質分子の構造(ダミーアトムモデル)をモデリングすることができる。DAMMINソフトウェアを用いて独立に10回の演算をおこなって得られた構造を平均化し、最終的なモデル構造を作成した。

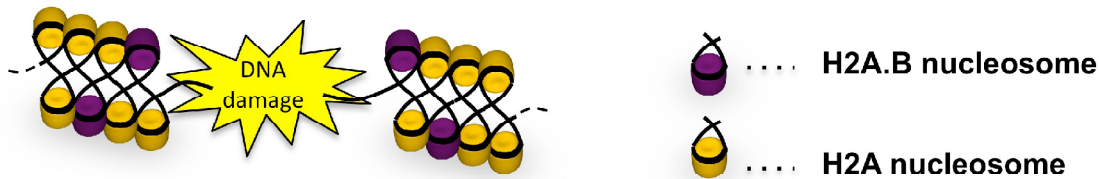
(B) H2Aオクタソームの結晶構造(PDB ID: 3AFA)と、H2AオクタソームとH2A.Bオクタソームのビーズモデル構造。H2Aオクタソームのモデル構造(オレンジ色)はH2Aオクタソームの結晶構造と概ね一致しており、このことから、DAMMINソフトウェアを用いることで妥当なモデル構造が構築できていると考えられる。一方、H2A.Bヌクレオソームのモデル構造(赤色)は、楕円形の円盤となっており、ヌクレオソームのDNA出入り口付近に付加的な構造領域が存在している付加的な構造領域が存在することから、H2A.Bヌクレオソームは通常のヌクレオソームよりも大きく広がった、特殊なヌクレオソーム構造を形成していることが明らかになった。ビーズモデルの形状から、H2A.Bヌクレオソーム上のDNA出入り口付近において、DNAが広がった構造を形成している可能性が考えられた。(Arimura et al., 2013) Fig. 5eより引用)

いることを明らかにしている (Sugiyama et al., 2014)。

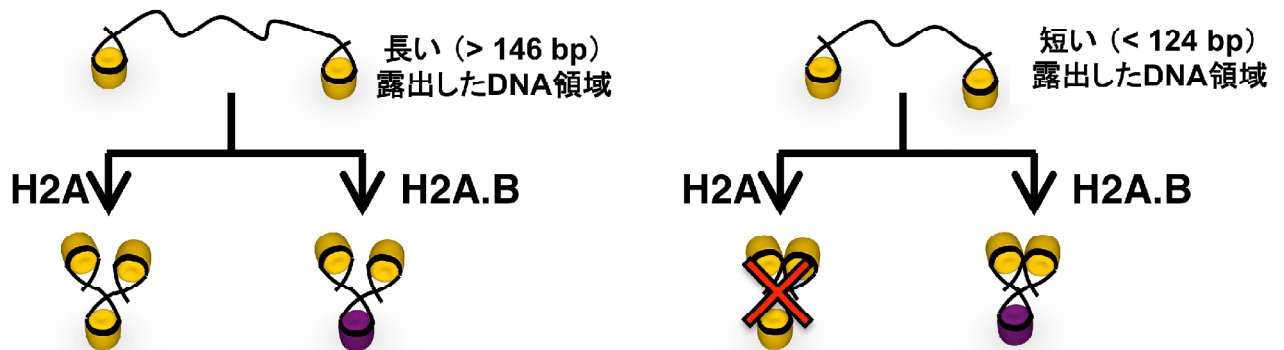
#### 4-7. 第4章まとめ

第4章において報告した知見を図19にまとめた。本研究においては、生細胞を用いたH2A.Bの動態解析によって、H2A.BがDNA損傷領域に集積することを新たに見出した(図11, 12)。さらに、試験管内ヌクレオソーム再構成法を用いて、H2A.BはH2Aオクタソームが形成できないような短いDNA領域にもオクタソームを形成することが可能であることを示した(図13, 14)。加えて、試験管内で再構成したヌクレオソームを用いた動的散乱解析およびX小角散乱解析によって、水溶液中のH2A.Bオクタソームが、通常のオクタソームとは明らかに異なる大きく広がったヌクレオソーム構造を形成していることを明らかにした(図16, 17, 18)。本研究で得られたビーズモデルの形状や先行研究の結果から、H2A.Bヌクレオソーム中ではDNAがヒストン複合体から解離して広がった状態であると推測された。(Bao et al., 2004; Doyen et al., 2006)。本研究で得られたH2A.Bに関する知見の、本研究分野における位置づけや、生物学的意義については第5章で詳細に述べる。

H2A.BはDNA 損傷領域に集積する  
(図 11, 図 12)



H2A.BはH2Aオクタソームが形成できないような短いDNA領域にもオクタソームを形成することが可能である(図 13, 図 14)



水溶液中のH2A.Bオクタソームは通常のオクタソームよりも大きく広がった特殊な構造を形成している(図 16, 図 17, 図 18)



図 19. H2A.B を含むヌクレオソームに関する本論文で得られた知見

本研究においては、生細胞を用いたH2A.Bの動態解析によって、H2A.BがDNA損傷領域に集積することを新たに見出した(図 11, 12)。さらに、試験管内ヌクレオソーム再構成法を用いて、H2A.BはH2Aオクタソームが形成できないような短いDNA領域にもオクタソームを形成することが可能であることを示した(図 13, 14)。加えて、試験管内で再構成したヌクレオソームを用いた動的光散乱解析およびX線小角散乱解析によって、水溶液中のH2A.Bオクタソームが通常のオクタソーム明らかに異なる大きく広がったヌクレオソーム構造を形成していることを明らかにした(図 16, 17, 18)。ビーズモデルの形状や先行研究の結果からH2A.Bヌクレオソーム中ではDNAがヒストン複合体から剥がれて広がっているのではないかと考えられる(Bao et al., 2004; Doyen et al., 2006)。

## 第5章 総合討論

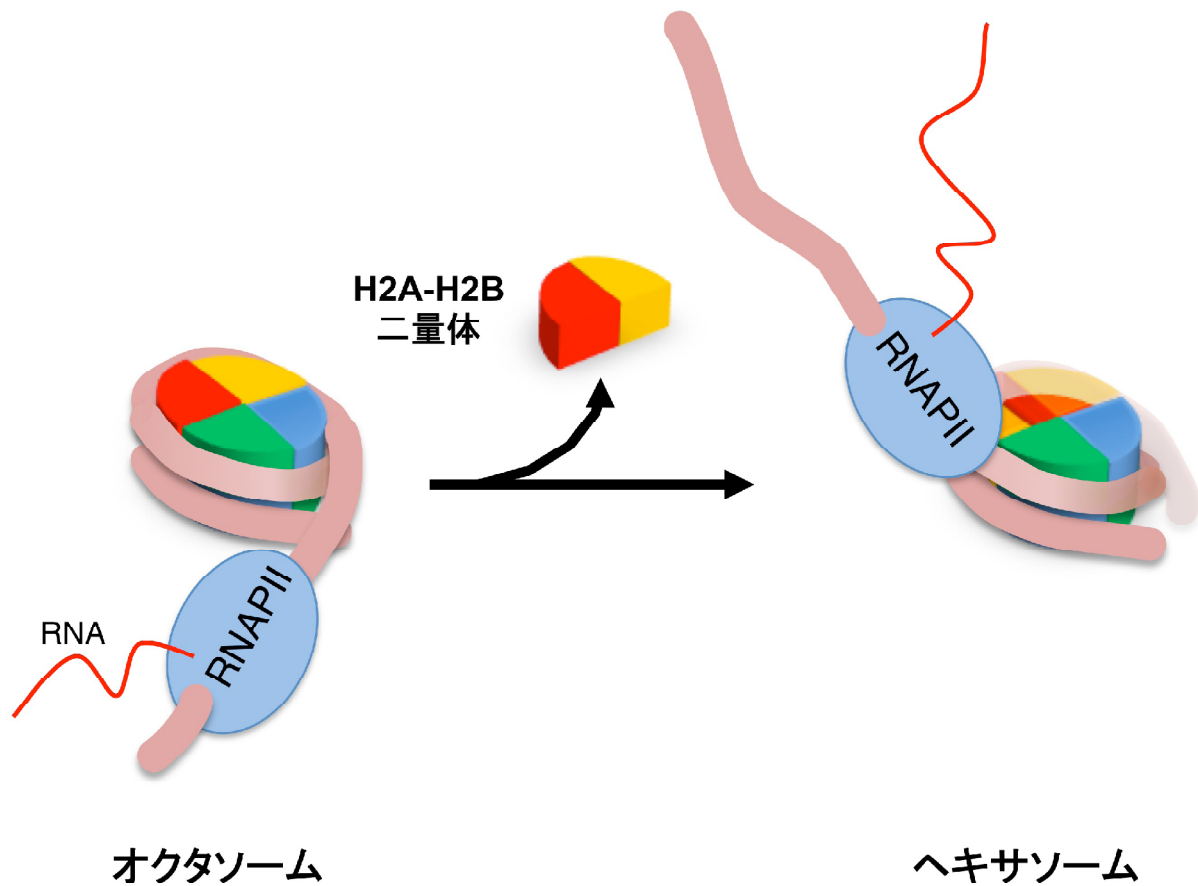
### 5-1. ヘキサソームの構造と生物学的意義

試験管内における、ヌクレオソームを形成した DNA を鋳型とした転写解析において、ヌクレオソームは、その他のタンパク質の DNA 結合を阻害することで転写開始を抑制することや、RNA ポリメラーゼの進行の障壁となることで転写伸長を強く阻害することが報告されてきた (Knezetic and Luse, 1986; Izban and Luse, 1991)。このため、ゲノム DNA 上に形成されたヌクレオソームは転写伸長に抑制的に働き、転写伸長時にはヌクレオソームがゲノム DNA 上から排除されると考えられてきた。しかし、近年の解析によって、実際の細胞内においては転写されている DNA 上からもヌクレオソームは完全には排除されておらず、それにも関わらず細胞内では毎分 1,000-4,000 塩基対の速度で転写伸長されることが報告されている (Weiner et al., 2010; Ardehali and Lis, 2009; Singh and Padgett, 2009)。この転写伸長速度は試験管内でヌクレオソームの形成されていない裸の DNA を鋳型とした転写と大差ない速度であることから、細胞内においては、ヌクレオソームが転写の開始や伸長の障壁とならないような機構が備わっていると考えられている (Kulaeva et al., 2010; Petesch and Lis 2012)。ヘキサソームは転写が活性化された領域に形成されることが示唆されており、試験管内における転写解析においても、オクタソームから H2A-H2B が解離し、ヘキサソームが形成することで転写が促進されることが報告されている (Baer and Rhodes, 1983; Kimura and Cook, 2001; Belotserkovskaya et al., 2003; Kuryan et al., 2012)。このように、ヘキサソームの転写への影響が議論されている中、ヘキサソームの立体構造や物理的な性質は不明なままであり、ヘキサソームによ

る転写の制御メカニズムの詳細は明らかになっていなかった。本研究では、ヘキサソームは、オクタソームと比べて 30-40 塩基対の DNA がヒストン複合体から解離した構造を形成することを明らかにした (図 10)。この特徴によって、RNA ポリメラーゼや転写因子といった転写開始に必要なタンパク質が DNA に結合するための足場を提供することができると考えられる。また、これまでの、ヌクレオソームを形成した DNA を鋳型とした転写解析においては、ヌクレオソーム形成位置から 30-45 塩基対までの領域は比較的容易に転写伸長されることが示されている (Hodges et al., 2009; Kulaeva et al., 2009)。これらの転写過程においては、ヘキサソームが形成されていると考えられ、ヘキサソームはオクタソームに比べ 30-40 塩基対の DNA をヒストン複合体から解離しているために、この領域における転写伸長反応を容易にし、ヌクレオソーム形成領域の内側まで RNA ポリメラーゼを進行させることを可能にしていると考えられる (図 20)。

## 5-2. ヘキサソームの機能の理解に向けた今後の展開

本研究をふまえ、今後ヘキサソームを介した転写制御機構を理解する上では、RNA ポリメラーゼがヌクレオソーム形成位置から 30-45 塩基対まで転写伸長してヘキサソーム上で進行を停止した後に、どのようにして再び進行を再開するのかという点が重要であると考えられる。興味深い知見として、転写が活性化された領域においては、オクタソームやヘキサソームの構造中においてはヌクレオソームの内側に埋もれている H3 の 110 番目のシステインが表面に露出することが示されており、ヌクレオソームを乗り越えて転写が行われる際には、



**図 20. ヘキサソームの機能モデル**

これまでの、ヌクレオソームを形成したDNAを鋳型とした転写解析においては、ヌクレオソーム形成位置から30-45塩基対までの領域は比較的容易に転写伸長されることが示されている(Hodges et al., 2009; Kulaeva et al., 2009)。これらの転写過程においては、ヘキサソームが形成されていると考えられ、ヘキサソームはオクタソームに比べ30-40塩基対のDNAをヒストン複合体から解離しているために、この領域における転写伸長反応を容易にし、ヌクレオソーム形成領域の内側までRNAポリメラーゼを進行させることを可能にしていると考えられる。



ヌクレオソームの構造がダイナミックに変化することが示唆されている (Chen et al., 1991)。ヘキサソーム上で進行を停止した RNA ポリメラーゼが転写を再開するためには、このようなヌクレオソームの大きな構造変化が必要であるのかもしれない。これまでに様々なヒストンコアへの翻訳後修飾が転写を活性化することが報告されており、このような修飾がヘキサソームの構造安定性にどのように寄与するのかという点も興味深い (Tessarz and Kouzarides, 2014)。本研究で確立したヘキサソームの精製法を利用することによって、このような修飾を有するヘキサソームの構造安定性などについても試験することが可能になった。

### 5-3. H2A.B を含むヌクレオソームの生物学的意義

H2A.B は哺乳類特異的なヒストンバリエントであり、精巣で高発現する他、非ホジキン型リンパ腫においても mRNA の高発現が報告されていた (Ishibashi et al., 2010; Winkler et al., 2012)。H2A.B は転写が活性化した遺伝子上にヌクレオソームを形成しており、試験管内におけるヌクレオソームを形成した DNA を鋳型とした転写解析によっても、H2A.B は通常のヌクレオソームよりも転写が起こりやすいことが示されていた (Chadwick and Willard, 2001; Tolstorukov et al., 2012; Ioudinkova et al., 2012; Bao et al., 2004)。このため、H2A.B は主に転写の活性化のために働くヒストンバリエントであると考えられてきた (Bönisch and Hake, 2012)。本研究においては、H2A.B が DNA 損傷領域においても集積することを新たに見出した (図 11, 図 12)。また筆者は、共同研究者である木村宏教授 (東京工業大学) と共に、H2A.B が DNA 複製の行

われているクロマチン領域に集積することを明らかにした (Arimura et al., 2013)。H2A.B の DNA 複製領域および DNA 損傷領域への集積については、最近になって他の研究グループからも報告された (Sansoni et al., 2014)。本研究を含めたこれらの知見によって、H2A.B は転写の活性化だけではなく、DNA 複製や DNA 損傷の制御にも関わっていることが示唆された。このような領域に共通する特徴として、クロマチンからのヒストンの取り外しおよび新規取り込みが頻繁に起こっていることが挙げられる。本研究で明らかになったように、H2A.B は通常型の H2A ではオクタソームを形成できないような短い DNA においてもオクタソームを形成することが可能である (図 13, 図 14)。この性質によって H2A.B はこれらの領域において一過的に形成される短い露出された DNA 領域上に、素早く取り込まれ、この領域を他の DNA 結合タンパク質から保護するのではないかと考えられる。

#### 5-4. H2A.B を含むヌクレオソームの構造

これまでに、H2A.B ヌクレオソームはヒストン複合体と強固に結合する DNA が通常のヌクレオソームよりも短いことが複数の研究グループの報告により示されていた (Bao et al., 2004; Doyen et al., 2006; Tolstorukov et al., 2012)。これらの報告により、H2A.B は DNA が大きく広がった特殊なヌクレオソーム構造を形成すると考えられていた (Bönisch and Hake, 2012)。本研究で行った X 線小角散乱解析によって、H2A.B ヌクレオソームが溶液中で実際にこのような特殊なヌクレオソーム構造を形成していることが初めて明らかになった (図 16, 図 17, 図 18)。本論文で示したデータに加え、これまでに京都大学原子炉研究

所の杉山正明教授との共同研究により、H2A.Bヌクレオソーム中において広がった構造を形成するのはDNAであり、ヒストン複合体のみの構造を比較した場合には、H2AヌクレオソームよりもH2A.Bヌクレオソームの方がコンパクトな構造を有していることを見出している (Sugiyama et al., 2014)。H2A.Bヌクレオソームの特殊な構造が有することの生物学的意義は未だ明らかではないが、このようなヌクレオソームがゲノムDNA上に形成されることで、高次のクロマチン構造が大きく変化し、脱凝縮したクロマチン構造を形成することで、DNAの転写や複製および修復が行われやすいようなクロマチン環境を形成する可能性が考えられる (図 21)。

## 5-5. H2A.Bを含むヌクレオソームの機能の理解に向けた今後の展開

本研究や、これまでに報告されている細胞生物学的解析において、H2A.Bは細胞内においてクロマチンからの取り外しと再取り込みのサイクルが非常に早いことが示されている (図 11) (Gautier et al., 2004)。しかし、試験管内で再構成されたH2A.Bヌクレオソームは、H2Aヌクレオソームよりも高塩濃度下において物理的に安定であることが報告されており、筆者を含むグループもH2A.BヌクレオソームがH2Aヌクレオソームよりも高温度下において物理的に安定であることを報告している (Bao et al., 2004; Taguchi et al., 2014)。また、通常のヌクレオソームはクロマチンリモデリング因子やヒストンシャペロンによって、ゲノムDNA上のヌクレオソーム形成位置が移動させられることによって適切な転写制御を行うが、H2A.Bヌクレオソームはクロマチンリモデリング

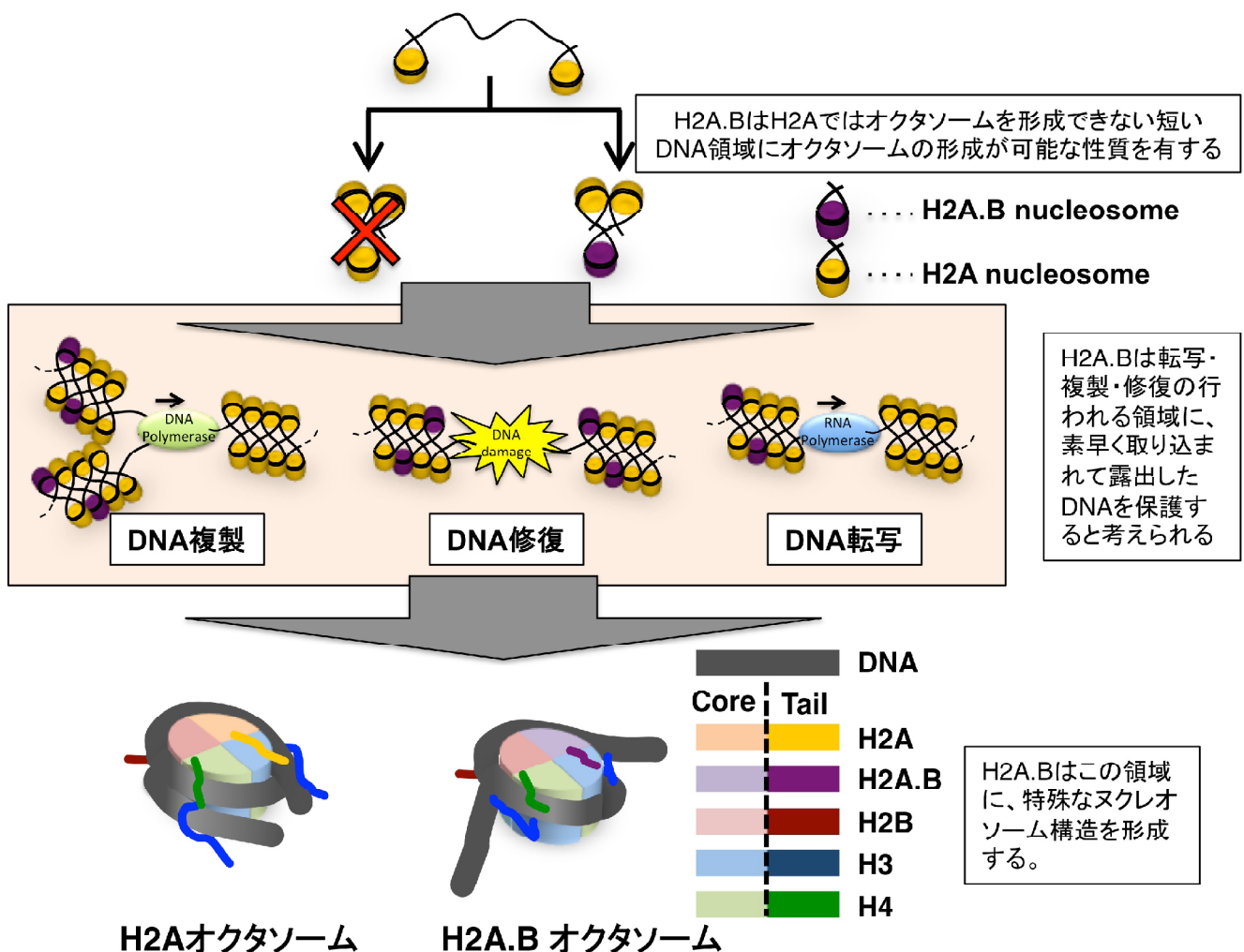


図 21. H2A.B を含むヌクレオソームの機能モデル

H2A.Bは通常型のH2Aではオクタソームを形成できないような短いDNAにおいてもオクタソームを形成することが可能な性質を有することがわかった(図 13, 図 14)。この性質によってH2A.Bは転写・複製・修復の行われる領域において一過的に形成される短い露出されたDNA領域上に、素早く取り込まれて、露出したDNAを保護するのではないかと考えられる(図 11, 図 12) (Chadwick and Willard, 2001; Tolstorukov et al., 2012; loudinkova et al., 2012; Bao et al., 2004; Arimura et al., 2013; Sansoni et al., 2014)。このような領域に、本研究で明らかになったDNAの広がった特殊なヌクレオソームがゲノムDNA上に形成されることで、高次のクロマチン構造が大きく変化し、脱凝縮したクロマチン構造を形成することで、DNAの転写や複製および修復が行われやすいようなクロマチン環境を形成する可能性が考えられる(図 16, 図 17, 図 18) (Sugiyama et al., 2014)。

因子やヒストンシャペロンによってもヌクレオソーム形成位置を変化させることが出来ないことが報告されている (Angelov et al., 2004; Angelov et al., 2006)。このような細胞生物学的解析の結果と再構成ヌクレオソームの生化学的解析の不一致は、これまでに解析された他のヒストンには見られない特徴である。H2A.Bヌクレオソームが物理的に安定であるにも関わらず、細胞内においてクロマチン上でのH2A.Bの交換速度が早いという観察結果からは、未だ明らかにされていないユニークな機能をH2A.Bが有していることを想像させる。本研究において明らかになったH2A.Bヌクレオソームのユニークな構造は、このようなH2A.Bヌクレオソームが特異的な機能を発揮するために働いている可能性がある。

## 5-6. 多種多様なヌクレオソームとその機能

本研究で扱ったヘキサソームやH2A.Bヌクレオソームのように、細胞核内にはヒストンの組成が変化したヌクレオソームやヒストンバリエーションを含むヌクレオソームなど様々なヌクレオソームが、それぞれゲノムDNA上の特定の領域で使い分けられて存在している (Palmer et al., 1987; Barski et al., 2007; Goldberg et al., 2010; Maze et al., 2014)。さらに各ヒストンの特定のアミノ酸残基に翻訳後修飾が導入されることで、ヌクレオソームの多様性はさらに拡大されている (Li et al., 2007; Suganuma and Workman, 2011; Tessarz and Kouzarides, 2014)。このような多様なヌクレオソームがそれぞれ異なる性質を有することで、ゲノムDNA上の各領域における転写・複製・修復といった機能の発現を適切に制御することを可能にしていると考えられている (Luger et al. 2012)。

興味深いことに、種々のがんにおいて、ヒストンやヒストンシャペロン、ヒストン翻訳後修飾関連因子の異常が、近年のゲノム解析やトランスクリプトーム解析の技術発展に伴って明らかになってきた (Vardabasso et al., 2014)。例えばヒストンバリエント CENP-A や H2A.Z は、それぞれ特定の種類のがん細胞において高発現することが報告されている (Tomonaga et al., 2003; Biermann et al., 2007; Dunican et al., 2002; Rhodes et al., 2004; Zucchi et al., 2004)。一方 mH2A (別名 macroH2A) は黒色種などのがんにおいて発現の低下や、スプライシング異常がみられることが報告されている (Kapoor et al., 2010; Novikov et al., 2011)。このような細胞においては通常の細胞には存在しないような組み合わせでヒストンバリエントが含まれた特殊なヌクレオソームが形成されると考えられる。CENP-A が高発現するがん細胞に関しては、このような特殊なヌクレオソームが存在することが示されている (Behjati et al., 2013)。通常細胞において CENP-A はセントロメア領域特異的にヌクレオソーム中に二分子の CENP-A が含まれるヌクレオソームを形成する (Tachiwana et al., 2011)。一方、CENP-A が高発現するがん細胞においてはセントロメア領域以外の領域にも局在し、CENP-A と H3.3 を 1 分子ずつ含むような特殊なヌクレオソームが形成されることが報告されている (Lacoste et al., 2014)。筆者らは CENP-A と H3.3 を一分子ずつ含むヌクレオソームの性質と構造を解析し、CENP-A の特徴であるセントロメアタンパク質集積に関わる機能と H3.3 の特徴であるヌクレオソームが物理的に安定な性質の両方を有することを報告している (Arimura et al., 2014)。また、がん患者由来の体細胞とがん細胞のゲノム DNA 配列の比較解析により、H3.3 の 3 箇所のアミノ酸の点変異 (H3.3 K27M,

G34R/V) がそれぞれ重篤な小児性悪性脳腫瘍である膠芽腫の原因変異であることが報告されている (Schwartzentruber et al., 2012; Wu et al., 2012)。さらには H3.3 の K36M 点変異が軟骨芽細胞腫の患者から、G34W/L 点変異が骨巨細胞腫の患者から見出された (Behjati et al., 2013)。驚くべきことに、この変異は患者の 90%以上から見出され、これらの患者は TP53 などのがん原因遺伝子の変異を含まなかった (Behjati et al., 2013)。このような腫瘍においては、ヌクレオソームの多様性によって担保されるゲノム DNA の機能発現制御機構の破綻が、発がんや、がんの悪性化を引き起こしていると考えられ、ヌクレオソームの多様性のゲノム DNA 機能発現制御における重要性を物語っている。今後、様々なタイプのヌクレオソームの構造的、物理的な性質を明らかにすることで、ゲノム DNA 上の各領域において転写・複製・修復といった機能発現が制御されるメカニズムの詳細が明らかになると期待される。

## 第 6 章 引用文献

Ahmad, K. and Golic, K.G. (1998). The transmission of fragmented chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *148*, 775-792.

Alabert, C. and Groth, A. (2012). Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* *13*, 153-167.

Angelov, D., Verdel, A., An, W., Bondarenko, V., Hans, F., Doyen, C.M., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2004). SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *EMBO J.* *23*, 3815-3824.

Angelov, D., Bondarenko, V.A., Almagro, S., Menoni, H., Mongélard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S. and Bouvet P. (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* *25*, 1669-1679.

Ardehali, M.B. and Lis, J.T. (2009). Tracking rates of transcription and splicing in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1123-1124.

Arimura, Y., Tachiwana, H., Oda, T., Sato, M. and Kurumizaka, H. (2012). Structural analysis of the hexasome, lacking one histone H2A/H2B dimer from the conventional nucleosome. *Biochemistry* *51*, 3302-3309.

Arimura, Y., Kimura, H., Oda, T., Sato, K., Osakabe, A., Tachiwana, H., Sato, Y., Kinugasa, Y., Ikura, T., Sugiyama, M., Sato, M. and Kurumizaka, H. (2013). Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. *Sci. Rep.* *3*, 3510.



Arimura, Y., Shirayama, K., Horikoshi, N., Fujita, R., Taguchi, H., Kagawa, W., Fukagawa, T., Almouzni, G. and Kurumizaka, H. (2014). Crystal structure and stable property of the cancer-associated heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3. *Sci. Rep.* *4*, 7115.

Armache, K.J., Garlick, J.D., Canzio, D., Narlikar, G.J. and Kingston, R.E. (2011). Structural basis of silencing: Sir3 BAH domain in complex with a nucleosome at 3.0 Å resolution. *Science* *334*, 977-982.

Baer, B.W. and Rhodes, D. (1983). Eukaryotic RNA polymerase II binds to nucleosome cores from transcribed genes. *Nature* *301*, 482-488.

Bao, Y., Konesky, K., Park, Y.J., Rosu, S., Dyer, P.N., Rangasamy, D., Tremethick, D.J., Laybourn, P.J. and Luger, K. (2004). Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *EMBO J.* *23*, 3314-3324.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* *129*, 823-837.

Behjati, S., Tarpey, P.S., Presneau, N., Scheipl, S., Pillay, N., Van Loo, P., Wedge, D.C., Cooke, S.L., Gundem, G., Davies, H., Nik-Zainal, S., Martin, S., McLaren, S., Goody, V., Robinson, B., Butler, A., Teague, J.W., Halai, D., Khatri, B., Myklebost, O., Baumhoer, D., Jundt, G., Hamoudi, R., Tirabosco, R., Amary, M.F., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Campbell, P.J. and Flanagan, A.M. (2013). Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define

chondroblastoma and giant cell tumor of bone. *Nat. Genet.* *45*, 1479-1782.

Beisel, C. and Paro, R. (2011). Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 123-135.

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M. and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* *301*, 1090-1093.

Biermann, K., Heukamp, L.C., Steger, K., Zhou, H., Franke, F.E., Guetgemann, I., Sonnack, V., Brehm, R., Berg, J., Bastian, P.J., Müller, S.C., Wang-Eckert, L., Schorle, H. and Büttner, R. (2007). Gene expression profiling identifies new biological markers of neoplastic germ cells. *Anticancer Res.* *27*, 3091-3100.

Bönisch, C. and Hake, S.B. (2012). Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic Acids Res.* *40*, 10719-10741.

Boyarchuk, E., Montes, de Oca R. and Almouzni, G. (2011). Cell cycle dynamics of histone variants at the centromere, a model for chromosomal landmarks. *Curr. Opin. Cell Biol.* *23*, 266-276.

Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A. and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* *276*, 42462-42467.

Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X

chromosome. *J. Cell Biol.* *152*, 375-384.

Chen, T.A., Smith, M.M., Le, S.Y., Sternglanz, R. and Allfrey, V.G. (1991). Nucleosome fractionation by mercury affinity chromatography. Contrasting distribution of transcriptionally active DNA sequences and acetylated histones in nucleosome fractions of wild-type yeast cells and cells expressing a histone H3 gene altered to encode a cysteine 110 residue. *J. Biol. Chem.* *266*, 6489-6498.

Chow, C.M., Georgiou, A., Szutorisz, H., Maia, e Silva, A., Pombo, A., Barahona, I., Dargelos, E., Canzonetta, C. and Dillon N. (2005). Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep.* *6*, 354-360.

Cole, H.A., Ocampo, J., Iben, J.R., Chereji, R.V. and Clark, D.J. (2014). Heavy transcription of yeast genes correlates with differential loss of histone H2B relative to H4 and queued RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* *42*, 12512-12522.

Costanzi, C. and Pehrson, J.R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* *393*, 599-601.

Das, C., Tyler, J.K. and Churchill, M.E. (2010). The histone shuffle: histone chaperones in an energetic dance. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 476-489.

Doyen, C.M., Montel, F., Gautier, T., Menoni, H., Claudet, C., Delacour-Larose, M., Angelov, D., Hamiche, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2006). Dissection of the

unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. *EMBO J.* *25*, 4234-4244.

Dunican, D.S., McWilliam, P., Tighe, O., Parle-McDermott, A. and Croke D.T. (2002) Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene* *21*, 3253-3257.

Dyer, P.N., Edayathumangalam, R.S., White, C.L., Bao, Y., Chakravarthy, S., Muthurajan, U.M. and Luger, K. (2003). Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA. *Methods Enzymol.* *375*, 23-44.

Engelholm, M., de Jager, M., Flaus, A., Brenk, R., van Noort, J. and Owen-Hughes, T. (2009). Nucleosomes can invade DNA territories occupied by their neighbors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 151-158.

Gaffney, D.J., McVicker, G., Pai, A.A., Fondufe-Mittendorf, Y.N., Lewellen, N., Michelini, K., Widom, J., Gilad, Y. and Pritchard, J.K. (2012). Controls of nucleosome positioning in the human genome. *PLoS Genet.* *8*, e1003036.

Gautier, T., Abbott, D.W., Molla, A., Verdell, A., Ausio, J. and Dimitrov, S. (2004). Histone variant H2A.Bbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep.* *5*, 715-720.

Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., Wen, D., Chapgier, A.,

DeKever, R.C., Miller, J.C., Lee, Y.L., Boydston, E.A., Holmes, M.C., Gregory, P.D., Grealley, J.M., Rafii, S., Yang, C., Scambler, P.J., Garrick, D., Gibbons, R.J., Higgs, D.R., Cristea, I.M., Urnov, F.D., Zheng, D. and Allis, C.D. (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* 140, 678-691.

Groth, A., Rocha, W., Verreault, A. and Almouzni, G. (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128, 721-733.

Henikoff, S. (1990). Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet.* 6, 422-426.

Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M. and Bustamante, C. (2009). Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II. *Science* 325, 626-628.

Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., Kimura, H., Ikura, M., Nishikubo, S., Ito, T., Muto, A., Miyagawa, K., Takeda, S., Fishel, R., Igarashi, K. and Kamiya, K. (2007). DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7028-7040.

Ioudinkova, E.S., Barat, A., Pichugin, A., Markova, E., Sklyar, I., Pirozhkova, I., Robin, C., Lipinski, M., Ogryzko, V., Vassetzky, Y.S. and Razin, S.V. (2012). Distinct distribution of ectopically expressed histone variants H2A.Bbd and MacroH2A in open and closed chromatin domains. *PLOS One* 7, e47157.

Ishibashi, T., Li, A., Eirín-López, J.M., Zhao, M., Missiaen, K., Abbott, D.W., Meistrich, M., Hendzel, M.J. and Ausió, J. (2010). H2A.Bbd: an X-chromosome-encoded histone involved in mammalian spermiogenesis. *Nucleic Acids Res.* *38*, 1780-1789.

Izban, M.G. and Luse, D.S. (1991). Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev.* *5*, 683-696.

Kapoor, A., Goldberg, M.S., Cumberland, L.K., Ratnakumar, K., Segura, M.F., Emanuel, P.O., Menendez, S., Vardabasso, C., Leroy, G., Vidal, C.I., Polsky, D., Osman, I., Garcia, B.A., Hernando, E. and Bernstein, E. (2010). The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature* *468*, 1105-1109.

Karpen, G.H. and Spradling, A.C. (1992). Analysis of subtelomeric heterochromatin in the *Drosophila* minichromosome Dp1187 by single P element insertional mutagenesis. *Genetics* *132*, 737-753.

Kimura, H. and Cook, P.R. (2001). Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J. Cell Biol.* *153*, 1341-1353.

Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M. and Studitsky, V.M. (2002). Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol. Cell* *9*, 541-552.

Knezetic, J.A. and Luse, D.S. (1986). The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell* *45*, 95–104.

Konarev, P.V., Petoukhov, M.V., Volkov, V.V. and Svergun, D.I. (2006). ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* *39*, 277-286.

Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* *184*, 868-871.

Kulaeva, O.I., Gaykalova, D.A., Pestov, N.A., Golovastov, V.V., Vassilyev, D.G., Artsimovitch, I. and Studitsky, V.M. (2009). Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1272-1278.

Kulaeva, O., Hsieh, F.K., Chang, H.W., Luse, D.S. and Studitsky, V.M. (2013). Mechanism of transcription through a nucleosome by RNA polymerase II. *Biochem. Biophys. Acta* *1829*, 76-83.

Kurumizaka, H., Horikoshi, N., Tachiwana, H. and Kagawa, W. (2013). Current progress on structural studies of nucleosomes containing histone H3 variants. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *23*, 109-115.

Kuryan, B.G., Kim, J., Tran, N.N., Lombardo, S.R., Venkatesh, S., Workman, J.L. and Carey, M. (2012). Histone density is maintained during transcription mediated by the chromatin remodeler RSC and histone

chaperone NAP1 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *109*, 1931-1936.

Lacoste, N., Woolfe, A., Tachiwana, H., Garea, A.V., Barth, T., Cantaloube, S., Kurumizaka, H., Imhof, A. and Almouzni G. (2014) Mislocalization of the centromeric histone variant CenH3/CENP-A in human cells depends on the chaperone DAXX. *Mol. Cell.* *53*, 631-644.

Lavelle, C. and Prunell, A. (2007). Chromatin polymorphism and the nucleosome superfamily: a genealogy. *Cell Cycle* *6*, 2113-2119.

Leonhardt, H., Rahn, H.P., Weinzierl, P., Sporbert, A., Cremer, T., Zink, D. and Cardoso M.C. (2000). Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J. Cell. Biol.* *149*, 271-280.

Li, B., Carey, M. and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* *128*, 707-719.

Lo, A.W., Magliano, D.J., Sibson, M.C., Kalitsis, P., Craig, J.M. and Choo, K.H. (2001). A novel chromatin immunoprecipitation and array (CIA) analysis identifies a 460-kb CENP-A-binding neocentromere DNA. *Genome Res.* *11*, 448-457.

Lombraña, R., Almeida, R., Revuelta, I., Madeira, S., Herranz, G., Saiz, N., Bastolla, U., Gómez, M. (2013). High-resolution analysis of DNA synthesis start sites and nucleosome architecture at efficient mammalian replication origins. *EMBO J.* *32*, 2631-2644.

Lowary, P.T. and Widom, J. (1998). New DNA sequence rules for high



affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.* *276*, 19-42.

Luger, K., Dechassa, M.L. and Tremethick, D.J. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* *13*, 436-447.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251-260.

Makde, R.D., England, J.R., Yennawar, H.P. and Tan, S. (2010). Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. *Nature* *467*, 562-566.

Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C. and Lukas, J. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* *131*, 887-900.

Maze, I., Noh, K.M., Soshnev, A.A. and Allis, C.D. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 259-271.

Mazurkiewicz, J., Kepert, J.F. and Rippe, K. (2006). On the mechanism of nucleosome assembly by histone chaperone NAP1. *J. Biol. Chem.* *281*, 16462-16472.

Mejlvang, J., Feng, Y., Alabert, C., Neelsen, K.J., Jasencakova, Z., Zhao, X.,

Lees, M., Sandelin, A., Pasero, P., Lopes, M. and Groth, A. (2014). New histone supply regulates replication fork speed and PCNA unloading. *J. Cell Biol.* *204*, 29-43.

Mito, Y., Henikoff, J.G. and Henikoff, S. (2005). Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat. Genet.* *37*, 1090-1097.

Muller, H.J. (1930). Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.*, *22*, 299-334.

Noll, M. (1974). Subunit structure of chromatin. *Nature* *251*, 249-251.

Novikov, L., Park, J.W., Chen, H., Klerman, H., Jalloh, A.S. and Gamble, M.J. (2011). QKI-mediated alternative splicing of the histone variant MacroH2A1 regulates cancer cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 4244-4255.

Old, R.W. and Woodland, H.R. (1984). Histone genes: not so simple after all. *Cell* *38*, 624-626.

Olins, A.L. and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* *183*, 330-332.

Palmer, D.K., O'Day, K., Wener, M.H., Andrews, B.S. and Margolis, R.L. (1987). A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J. Cell Biol.* *104*, 805-815.

Petes, S.J. and Lis, J.T. (2012). Overcoming the nucleosome barrier during

transcript elongation. *Trends Genet.* *28*, 285-294.

Ransom, M., Dennehey, B.K. and Tyler, J.K. (2010). Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell* *140*, 183-195.

Rhee, H.S., Bataille, A.R., Zhang, L. and Pugh, B.F. (2014). Subnucleosomal Structures and Nucleosome Asymmetry across a Genome. *Cell* *159*, 1377-1388.

Rhodes, D.R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A. and Chinnaiyan, A.M. (2004). Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *101*, 9309-9314.

Sansoni, V., Casas-Delucchi, C.S., Rajan, M., Schmidt, A., Bönisch, C., Thomae, A.W., Staeger, M.S., Hake, S.B., Cardoso, M.C. and Imhof, A. (2014). The histone variant H2A.Bbd is enriched at sites of DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* *42*, 6405-6420.

Schenk, R., Jenke, A., Zilbauer, M., Wirth, S. and Postberg, J. (2011). H3.5 is a novel hominid-specific histone H3 variant that is specifically expressed in the seminiferous tubules of human testes. *Chromosoma* *120*, 275-285.

Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.Y., Jones, D.T., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.A., Tönjes, M., Hovestadt, V., Albrecht, S., Kool, M., Nantel, A., Konermann, C., Lindroth, A., Jäger, N., Rausch, T., Ryzhova, M., Korbel, J.O., Hielscher, T., Hauser, P., Garami, M.,

Klekner, A., Bognar, L., Ebinger, M., Schuhmann, M.U., Scheurlen, W., Pekrun, A., Frühwald, M.C., Roggendorf, W., Kramm, C., Dürken, M., Atkinson, J., Lepage, P., Montpetit, A., Zakrzewska, M., Zakrzewski, K., Liberski, P.P., Dong, Z., Siegel, P., Kulozik, A.E., Zapatka, M., Guha, A., Malkin, D., Felsberg, J., Reifenberger, G., von Deimling, A., Ichimura, K., Collins, V.P., Witt, H., Milde, T., Witt, O., Zhang, C., Castelo-Branco, P., Lichter, P., Faury, D., Tabori, U., Plass, C., Majewski, J., Pfister, S.M. and Jabado, N. (2012) Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* *482*, 226-231.

Singh, J. and Padgett, R.A. (2009). Rates of in situ transcription and splicing in large human genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1128-1133.

Singleton, S., Zalensky, A., Doncel, G.F., Morshedi, M. and Zalenskaya, I.A. (2007). Testis/sperm-specific histone 2B in the sperm of donors and subfertile patients: variability and relation to chromatin packaging. *Hum. Reprod.* *22*, 743-750.

Smith, D.J. and Whitehouse, I. (2012). Intrinsic coupling of lagging-strand synthesis to chromatin assembly. *Nature* *483*, 434-438.

Sogo, J.M., Stahl, H., Koller, T. and Knippers, R. (1986). Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *J. Mol. Biol.* *189*, 189-204.

Suganuma, T. and Workman, J.L. (2011). Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annu. Rev. Biochem.* *80*, 473-499.

Sugiyama, M., Arimura, Y., Shirayama, K., Fujita, R., Oba, Y., Sato, N., Inoue, R., Oda, T., Sato, M., Heenan, R.K. and Kurumizaka, H. (2014). Distinct features of the histone core structure in nucleosomes containing the histone H2A.B variant. *Biophys. J.*, *106*, 2206-2213.

Svergun, D.I. (1992). Determination of the regularization parameter in indirect transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* *25*, 495-503.

Svergun, D.I., Barberato, C. and Koch, M.H.J. (1995). CRY SOL - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *J. Appl. Cryst.* *28*, 768-773.

Svergun, D.I. (1999). Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* *76*, 2879-2886.

Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., Kimura, H. and Kurumizaka, H. (2010). Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 10454-10459.

Tachiwana, H., Kagawa, W., Shiga, T., Osakabe, A., Miya, Y., Saito, K., Hayashi-Takanaka, Y., Oda, T., Sato, M., Park, S.Y. and Kurumizaka, H. (2011). Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature* *476*, 232-235.

Taguchi, H., Horikoshi, N., Arimura, Y. and Kurumizaka, H. (2014). A

method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye. *Methods* *70*, 119-126.

Talbert, P.B., Ahmad, K., Almouzni, G., Ausió, J., Berger, F., Bhalla, P.L., Bonner, W.M., Cande, W.Z., Chadwick, B.P., Chan, S.W., Cross, G.A., Cui, L., Dimitrov, S., Doenecke, D., Eirin-López, J.M., Gorovsky, M.A., Hake, S.B., Hamkalo, B.A., Holec, S., Jacobsen, S.E., Kamieniarz, K., Khochbin, S., Ladurner, A.G., Landsman, D., Latham, J.A., Loppin, B., Malik, H.S., Marzluff, W.F., Pehrson, J.R., Postberg, J., Schneider, R., Singh, M.B., Smith, M.M., Thompson, E., Torres-Padilla, M.E., Tremethick, D.J., Turner, B.M., Waterborg, J.H., Wollmann, H., Yelagandula, R., Zhu, B. and Henikoff, S. (2012). A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics Chromatin* *5*, 7.

Tan, S. and Davey, C.A. (2011). Nucleosome structural studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *21*, 128-136.

Tanaka, Y., Tawaramoto-Sasanuma, M., Kawaguchi, S., Ohta, T., Yoda, K., Kurumizaka, H. and Yokoyama, S. (2004). Expression and purification of recombinant human histones. *Methods*. *33*, 3-11.

Tessarz, P. and Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, *15*, 703-708.

Tolstorukov, M.Y., Goldman, J.A., Gilbert, C., Ogryzko, V., Kingston, R.E. and Park, P.J. (2012). Histone variant H2A.Bbd is associated with active transcription and mRNA processing in human cells. *Mol. Cell* *47*, 596-607.

Tomonaga, T., Matsushita, K., Yamaguchi, S., Oohashi, T., Shimada, H., Ochiai, T., Yoda, K. and Nomura F. (2003). Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res.* *63*, 3511-3516.

Vardabasso, C., Hasson, D., Ratnakumar, K., Chung, C.Y., Duarte, L.F. and Bernstein E. (2014). Histone variants: emerging players in cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 379-404.

Vasudevan, D., Chua, E.Y. and Davey, C.A. (2010). Crystal structures of nucleosome core particles containing the '601' strong positioning sequence. *J. Mol. Biol.* *403*, 1-10.

Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B.J. and Grunstein, M. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol. Cell* *10*, 1223-1233.

Volkov, V.V. and Svergun, D.I. (2003). Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* *36*, 860-864.

Weiner, A., Hughes, A., Yassour, M., Rando, O.J. and Friedman N. (2010). High-resolution nucleosome mapping reveals transcription-dependent promoter packaging. *Genome Res.* *20*, 90-100.

Wiedemann, S.M., Mildner, S.N., Bönisch, C., Israel, L., Maiser, A., Matheisl, S., Straub, T., Merkl, R., Leonhardt, H., Kremmer, E., Schermelleh, L. and Hake, S.B. (2010). Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X and H3.Y. *J. Cell Biol.* *190*,

777-791.

Winkler, C., Steingrube, D.S., Altermann, W., Schlaf, G., Max, D., Kewitz, S., Emmer, A., Kornhuber, M., Banning-Eichenseer, U. and Staeger, M.S. (2012). Hodgkin's lymphoma RNA-transfected dendritic cells induce cancer/testis antigen-specific immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.* *61*, 1769-1779.

Witt, O., Albig, W. and Doenecke, D. (1996). Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp. Cell Res.* *229*, 301-306.

Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Beckfort, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., Zhang, J., Gajjar, A., Dyer, M.A., Mullighan, C.G., Gilbertson, R.J., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., Ellison, D.W., Zhang, J., Baker, S.J. and St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome Project. (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat. Genet.* *44*, 251-253.

Wu, Q., Qian, Y.M., Zhao, X.L., Wang, S.M., Feng, X.J., Chen, X.F. and Zhang, S.H. (2012). Expression and prognostic significance of centromere protein A in human lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* *77*, 407-414.

Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y. and Price, B.D. (2012). Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* *48*, 723-733.

Yang, C., van der Woerd, M.J., Muthurajan, U.M., Hansen, J.C. and Luger,



K. (2011) Biophysical analysis and small-angle X-ray scattering-derived structures of MeCP2-nucleosome complexes. *Nucleic Acids Res.* *39*, 4122-4135.

Zlatanova, J., Bishop, T.C., Victor, J.M., Jackson, V. and van Holde, K. (2009). The nucleosome family: dynamic and growing. *Structure* *17*, 160-171.

Zucchi, I., Mento, E., Kuznetsov, V.A., Scotti, M., Valsecchi, V., Simionati, B., Vicinanza, E., Valle, G., Pilotti, S., Reinbold, R., Vezzoni, P., Albertini, A. and Dulbecco, R. (2004). Gene expression profiles of epithelial cells microscopically isolated from a breast-invasive ductal carcinoma and a nodal metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 18147-18152.

有村泰宏、越阪部晃永、胡桃坂仁志 (2013). ヌクレオソーム. イラストで徹底理解する エピジェネティクスキーワード事典 分子機構から疾患・解析技術まで (羊土社), 81-90.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究活動の全てにおいて丁寧な御指導、御鞭撻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。

X線小角散乱解析における多大なるお力添えを賜りました、横浜市立大学教授 佐藤衛先生、京都大学教授 杉山正明先生、横浜市立大学特任助教 小田隆博博士に厚く御礼申し上げます。

ライブセルイメージング解析における多大なるお力添えおよび、本研究以外の研究内容におきましても丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました東京工業大学教授 木村宏先生、東京工業大学 佐藤優子博士、大阪大学 衣笠泰葉様に厚く御礼申し上げます。

研究の開始より様々な御指導、ご助言をいただきました早稲田大学胡桃坂研究室の立和名博昭博士、越阪部晃永博士に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、様々な面でご支援いただきました胡桃坂研究室の皆様に心より感謝致します。

# 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○<u>Yasuhiro Arimura</u>, Hiroshi Kimura, Takashi Oda, Koichi Sato, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Yuko Sato, Yasuha Kinugasa, Tsuyoshi Ikura, Masaaki Sugiyama, Mamoru Sato and Hitoshi Kurumizaka Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. <i>Scientific Reports</i>, <b>3</b>, 3510, 2013.</p> <p>○<u>Yasuhiro Arimura</u>, Hiroaki Tachiwana, Takashi Oda, Mamoru Sato and Hitoshi Kurumizaka Structural analysis of the hexasome, lacking one histone H2A/H2B dimer from the conventional nucleosome. <i>Biochemistry</i>, <b>51</b>, pp3302-3309, 2012.</p>
講演	<p>学会発表</p> <p>・国内学会（口頭発表およびポスター発表） <u>有村泰宏</u>、白山一義、堀越直樹、藤田理紗、田口裕之、香川亘、胡桃坂仁志 がん化の進行に関わる、ヒストンバリエントCENP-A、H3.3を1分子ずつ含むヌクレオソームの構造生物学解析 第87回日本生化学会大会、2014年10月</p> <p>・国内学会（ポスター発表） <u>有村泰宏</u>、白山一義、野田真美子、藤田理紗、堀越直樹、胡桃坂仁志 がんに関わるヌクレオソームの生化学的・構造生物学的解析 第26回高遠分子細胞生物学シンポジウム、2014年8月</p> <p>・国際学会（ポスター発表） <u>Yasuhiro Arimura</u>, Kazuyoshi Shirayama, Naoki Horikoshi, Risa Fujita, Hiroyuki Taguchi, Wataru Kagawa and Hitoshi Kurumizaka Preparation and analysis of the heterotypic nucleosome with CENP-A and H3.3 EMBO Workshop on Histone Variants, 2014, June</p> <p>・国際学会（ポスター発表） <u>Yasuhiro Arimura</u>, Kazuyoshi Shirayama, Naoki Horikoshi, Risa Fujita, Hiroyuki Taguchi, Wataru Kagawa and Hitoshi Kurumizaka Structural and biochemical analyses of the heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3 IIAF Reserch Conference 2014“Chromatin Decoding”, 2014, May</p> <p>・国内学会（ポスター発表） <u>有村泰宏</u>、越阪部晃永、白山一義、竹田瑤弥、宮優太、立和名博昭、河野秀俊、胡桃坂仁志 CENP-Aヌクレオソームにおける動的なDNA構造とその制御機構 第36回分子生物学会大会、2013年12月</p>

# 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>・国内学会（口頭発表）  <u>有村泰宏</u>、木村宏、小田隆、佐藤浩一、佐藤優子、衣笠泰葉、藤田理紗、白山一義、堀越直樹、越阪部晃永、立和名博昭、杉山正明、佐藤衛、胡桃坂仁志            ヒトヒストンバリエントH2A.B 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、2013年11月</p> <p>・国内学会（口頭発表およびポスター発表）  <u>有村泰宏</u>、小田隆、佐藤浩一、藤田理紗、松本亮平、田口裕之、堀越直樹、越阪部晃永、立和名博昭、杉山正明、佐藤衛、木村宏、胡桃坂仁志            ヒトヒストンバリエントH2A.Bの機能解析            第86回日本生化学会大会、2013年9月</p> <p>・国内学会（ポスター発表）  <u>有村泰宏</u>、小田隆、佐藤浩一、松本亮平、田口裕之、堀越直樹、越阪部晃永、立和名博昭、杉山正明、佐藤衛、木村宏、胡桃坂仁志            ヒストンバリエントH2A.Bによるヌクレオソーム形成とその構造・機能解析            第7回エピジェネティクス研究会、2013年5月</p> <p>・国内学会（口頭発表およびポスター発表）  <u>有村泰宏</u>、立和名博昭、小田隆、佐藤衛、胡桃坂仁志            ヘキサソームの構造生物学的・生化学的解析            第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月</p> <p>・国内学会（ポスター発表）  <u>有村泰宏</u>、松本亮平、立和名博昭、胡桃坂仁志            Biochemical and structural analyses of the CENP-A nucleosome recognition by CENP-C            第 35 回分子生物学会大会、2012 年 12 月</p>
著書	<p>実験医学  <u>有村泰宏</u>、越阪部晃永            担当：ヒストンバリエントと発がん(p2097-2104)            羊土社、2014年8月</p> <p>イラストで徹底理解する エピジェネティクスキーワード事典 分子機構から疾患・解析技術まで  <u>有村泰宏</u>、越阪部晃永、胡桃坂仁志            担当：ヌクレオソーム(p81-90)            羊土社、2013年1月</p>

# 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
その他	<p>(論文)</p> <p>Hiroyuki Taguchi, Naoki Horikoshi, <u>Yasuhiro Arimura</u> and Hitoshi Kurumizaka. A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye. <i>Methods</i>, <b>70</b>, 119-26, 2014.</p> <p><u>Yasuhiro Arimura</u>, Kazuyoshi Shirayama, Naoki Horikoshi, Risa Fujita, Hiroyuki Taguchi, Wataru Kagawa, Tatsuo Fukagawa, Geneviève Almouzni and Hitoshi Kurumizaka. Crystal structure and stable property of the cancer-associated heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3. <i>Scientific reports</i>, <b>4</b>, 7115, 2014.</p> <p>Masaaki Sugiyama, <u>Yasuhiro Arimura</u>, Kazuyoshi Shirayama, Risa Fujita, Yojiro Oba, Nobuhiro Sato, Rintaro Inoue, Takashi Oda, Mamoru Sato, Richard K. Heenan and Hitoshi Kurumizaka Distinct features of the histone core structure in nucleosomes containing the histone H2A.B variant. <i>Biophysical Journal</i>, <b>106</b>, pp2206-2213, 2014.</p> <p>Naoki Horikoshi, Koichi Sato, Keisuke Shimada, <u>Yasuhiro Arimura</u>, 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. <i>Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography</i>, <b>69</b>, pp2431-2439, 2013.</p> <p>Toshinobu Arai, <u>Yasuhiro Arimura</u>, Shun Ishikura and Kuniki Kino L-amino acid ligase from <i>Pseudomonas syringae</i> producing tabtoxin can be used for enzymatic synthesis of various functional peptides. <i>Applied and Environmental Microbiology</i>, <b>79</b>, pp5023-5029, 2013.</p> <p>Kuniki Kino, Toshinobu Arai and <u>Yasuhiro Arimura</u> Poly-alpha-glutamic acid synthesis using a novel catalytic activity of RimK from <i>Escherichia coli</i> K-12. <i>Applied and Environmental Microbiology</i>, <b>77</b>, pp2019-2025, 2011.</p> <p>(受賞)</p> <p>第 87 回日本生化学会大会、若手優秀発表賞、2014 年 10 月 第 86 回日本生化学会大会、鈴木紘一メモリアル賞、2013 年 9 月 第 85 回日本生化学会大会、鈴木紘一メモリアル賞、2012 年 12 月</p>