

ヒト精巣において高発現する
ヒストン H3.5 および TSH2B を含む
ヌクレオソームの X 線結晶構造解析

**X-ray crystallographic studies of
the human nucleosomes containing
testis-enriched histones
H3.5 and TSH2B**

2017 年 2 月

浦浜 嵩

Takashi URAHAMA

ヒト精巣において高発現する
ヒストン H3.5 および TSH2B を含む
ヌクレオソームの X 線結晶構造解析

**X-ray crystallographic studies of
the human nucleosomes containing
testis-enriched histones
H3.5 and TSH2B**

2017 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

浦浜 嵩

Takashi URAHAMA

目次

略語一覧

第 1 章 序論

- 1-1 クロマチン構造
- 1-2 精子形成とクロマチン再編成
- 1-3 精巣に高発現するヒストンバリエント
- 1-4 本研究について

第 2 章 材料と方法

- 2-1 リコンビナントヒストンタンパク質の精製
 - 2-1-1 ヒストン H2A、H2B、H3.1、H3.3、H3T、H4 の精製
 - 2-1-2 ヒストン H3.5、H3.5 変異体、H3.3 変異体の精製
 - 2-1-3 ヒストン TSH2B の精製
- 2-2 ヒストン複合体の再構成および精製
 - 2-2-1 ヒストン八量体の再構成と精製
 - 2-2-2 ヒストン四量体および二量体の再構成と精製
- 2-3 146 塩基対の DNA の調製
- 2-4 ヌクレオソームおよびテトラソームの再構成と精製
- 2-5 ヌクレオソームの結晶化
- 2-6 X 線回折データ収集と構造決定
- 2-7 ヌクレオソームの耐塩性試験
- 2-8 テトラソームの耐熱性試験

第 3 章 H3.5 を含むヌクレオソームの構造解析

- 3-1 序
- 3-2 ヒストン H3.5 の精製
- 3-3 H3.5 を含むヌクレオソームの再構成と精製
- 3-4 H3.5 を含むヌクレオソームの耐塩性試験
- 3-5 H3.5 ヌクレオソームの結晶化
- 3-6 H3.5 ヌクレオソームの構造決定
- 3-7 H3.5 ヌクレオソームの構造解析

- 3-8 H3.3 と H3.5 の変異体解析
- 3-9 テトラソームの耐熱性試験

第 4 章 TSH2B を含むヌクレオソームの構造解析

- 4-1 序
- 4-2 ヒストン TSH2B の精製
- 4-3 TSH2B ヌクレオソームの再構成および精製
- 4-4 TSH2B ヌクレオソームの結晶化
- 4-5 TSH2B ヌクレオソームの構造決定
- 4-6 TSH2B ヌクレオソームの構造解析

第 5 章 総合討論

- 5-1 精子形成時における H3.5 の機能
- 5-2 TSH2B ヌクレオソームの構造
- 5-3 H3.5 と TSH2B の関係
- 5-4 今後の展望

引用文献

謝辞

研究業績

略語一覽

bp	: base pair
CBB	: coomassie brilliant blue
ChIP-seq	: chromatin immunoprecipitation followed by sequencing
CIAP	: calf intestinal alkaline phosphatase
DNA	: deoxyribonucleic acid
DTT	: dithiothreitol
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	: ethidium bromide
FRAP	: fluorescence recovery after photobleaching
His ₆	: hexahistidine
Ni-NTA	: nickel-nitrilotriacetic acid
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PEG	: polyethylene glycol
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
r.m.s.d.	: root mean square deviation
SDS	: sodium dodecyl sulfate
TBE	: Tris-borate-EDTA
Tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane

第 1 章 序論

1-1 クロマチン構造

動物は、精子と卵子を受精させることにより生物の遺伝情報である DNA を次世代に継承する。受精卵は細胞分裂を繰り返し、体細胞と生殖細胞に分化する。動物をはじめとする真核生物のゲノム DNA は、細胞核内でヒストン等のタンパク質群と結合し、クロマチンと呼ばれる複合体を形成する。

体細胞のクロマチンは、ヌクレオソームを基本単位とした高次構造を形成している (Kornberg, 1977)。ヌクレオソームは、およそ 150 塩基対の DNA にヒストン H2A、H2B、H3、および H4 がそれぞれ二分子ずつ結合した円盤状の構造体である (Figure 1) (Luger *et al.*, 1997)。H2A、H2B、H3、および H4 はコアヒストンと呼ばれ、これらは共通してヒストンフォールドドメインを持つ (Arents & Moudrianakis, 1995)。H2A は H2B と、そして H3 は H4 との組み合わせで、ヒストンフォールドドメインを介してヘテロ二量体を形成する (Arents *et al.*, 1991; Arents & Moudrianakis, 1995; Luger *et al.*, 1997)。2 つの H3-H4 二量体が DNA と結合することにより、テトラソームと呼ばれる構造体が形成され、テトラソームに 2 つの H2A-H2B 二量体を取り込まれることによりヌクレオソームが形成される (Figure 1) (Luger *et al.*, 2012)。ヌクレオソームから 1 つの H2A-H2B が解離する半減期は 12 ± 6 時間、テトラソームから 1 つの H3-H4 が解離する半減期は 0.7 ± 0.5 時間であると推定されている (Rippe *et al.*, 2008)。数珠状に連なったヌクレオソームは細胞核内でさらに高度に折り畳まれ、凝縮度の低いユークロマチンや凝縮度の高いヘテロクロマチンなどの特徴的なクロマチン構造が形成される。ヌクレオソームの存在は、RNA ポリメラーゼをはじめとした転写装置による遺伝情報の読み取りを阻害する。それゆえに、凝集度の高いヘテロクロマチン領域では遺伝子発現が抑制され、凝集度の低いユークロマチン領域では遺伝子発現が促進されるこ

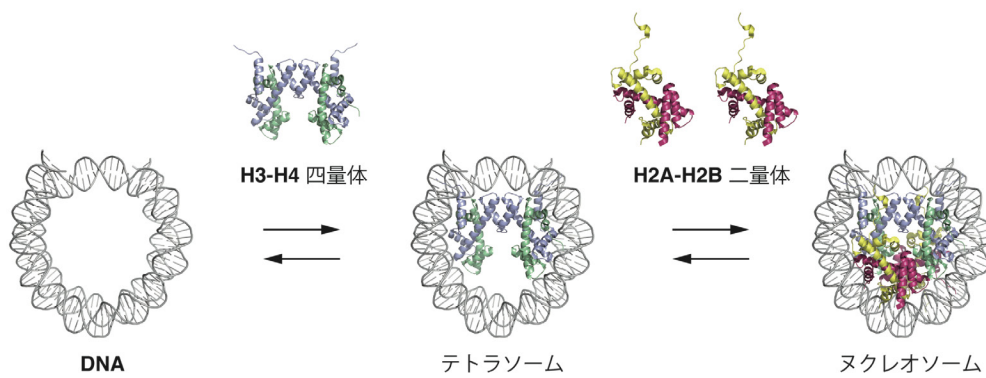


Figure 1. ヌクレオソームの形成機構

DNA に H3-H4 四量体が結合することによりテトラソームが形成され、テトラソームに 2 つの H2A-H2B 二量体が結合することによりヌクレオソームが形成される。ヒトのヌクレオソームの結晶構造 (PDB : 3AFA)を用いて作図した。

とが知られている。近年、ユークロマチンとヘテロクロマチンというクロマチンの状態は可逆的であり、ダイナミックに変動すると考えられている。さらに、クロマチンのダイナミクスは DNA のメチル化、ヒストンの翻訳後修飾、ヒストンの非対立遺伝子的なバリエーション (ヒストンバリエーション) 等のエピジェネティックな要因によって制御されることがわかってきている。すなわち、各種細胞の遺伝子発現はエピジェネティックな要因によって制御されている。ヒストンバリエーションは、主要型のヒストンとはアミノ酸配列がわずかに異なり、それぞれのヒストンバリエーションは別の遺伝子によってコードされている。H2A、H2B、H3 にはヒストンバリエーションが存在し、多くのヒストンバリエーションが発生過程において重要な役割を果たすことが明らかにされてきている (Maze *et al.*, 2014)。主要型ヒストンは真核生物に高度に保存されたタンパク質であり、それぞれのアミノ酸残基が重要な役割を持つ。それゆえ、ヒストンバリエーションにおけるアミノ酸置換は、わずか 1 カ所であっても主要型ヒストンと決定的な機能の違いを生み出す場合がある (Soshnev *et al.*, 2016)。

体細胞のクロマチンの主要構成因子がヒストンであるのに対し、精子に含まれる一倍体のゲノム DNA は、主にプロタミンと呼ばれる塩基性タンパク質と結合している。精子と卵子の受精後、受精卵の DNA 複製が始まる前に父由来のゲノム DNA からプロタミンが解離してヒストンが結合することにより、新規にヌクレオソームが形成される (Nonchev & Tsanev, 1990)。このようにして、受精後に新規のクロマチンが形成され、エピジェネティックな制御によりクロマチン構造が変化することによって細胞の分化が進行する。

1-2 精子形成とクロマチン再編成

クロマチン構造が大きく変化する発生過程の一つが、精子形成である (Figure 2)。精子形成は精原細胞の分化により最終的に精子が形成される過程であり、精巣の精細管内で進行

する。精原細胞は精細管の基底膜側に存在するが、精子への分化に伴い内腔側へと移動していく。精原細胞が精母細胞に分化した後に減数分裂が始まり、減数分裂期には相同染色体間で組換えが起きる。減数分裂後に生じる円形精子細胞は一倍体のゲノム DNA を持つ。円形精子細胞が伸長し、精子の形態が形成される。精原細胞から円形精子細胞に分化する過程ではクロマチンの基本単位はヌクレオソームである。精原細胞のクロマチンは H2B を含むヌクレオソームで構成されているが、精母細胞と精細胞のクロマチンの主要構成因子はヒストン H2B バリエントである TH2B を含むヌクレオソームである (Montellier *et al.*, 2013)。減数分裂後に生じる円形精子細胞が伸長して精子に成熟する過程でヒストン-プロタミン交換が起こる。ヒストン-プロタミン交換では、ゲノム全体にわたりヒストンとトランシジヨンプロテインの交換が起こり、次いでトランシジヨンプロテインがプロタミンに交換される (Figure 2)。ヒストン-プロタミン交換の過程では、ヒストンのアセチル化と TH2B 等のヒストンバリエントが重要な役割を果たすことがわかってきている (Goudarzi *et al.*, 2014)。また、精巣特異的なプロテアソームが、アセチル化したヒストンを分解することが示されている (Qian *et al.*, 2013)。精子のクロマチンにはわずかにヒストンが残っているが、そのゲノム上での局在位置とその役割についてはいまだに議論に決着がついていない (Hammoud *et al.*, 2009; Brykczynska *et al.*, 2010; Erkek *et al.*, 2013; Carone *et al.*, 2014; Saitou & Kurimoto, 2014)。

1-3 精巣に高発現するヒストンバリエント

精子形成は、クロマチン構造が大きく変化する発生過程である。精巣には、他の組織と比べ多くの種類のヒストンバリエントが発現する。既にいくつかのヒストンバリエントについては、精子形成の正常な進行に重要な役割を果たすことがマウスでの解析により示さ

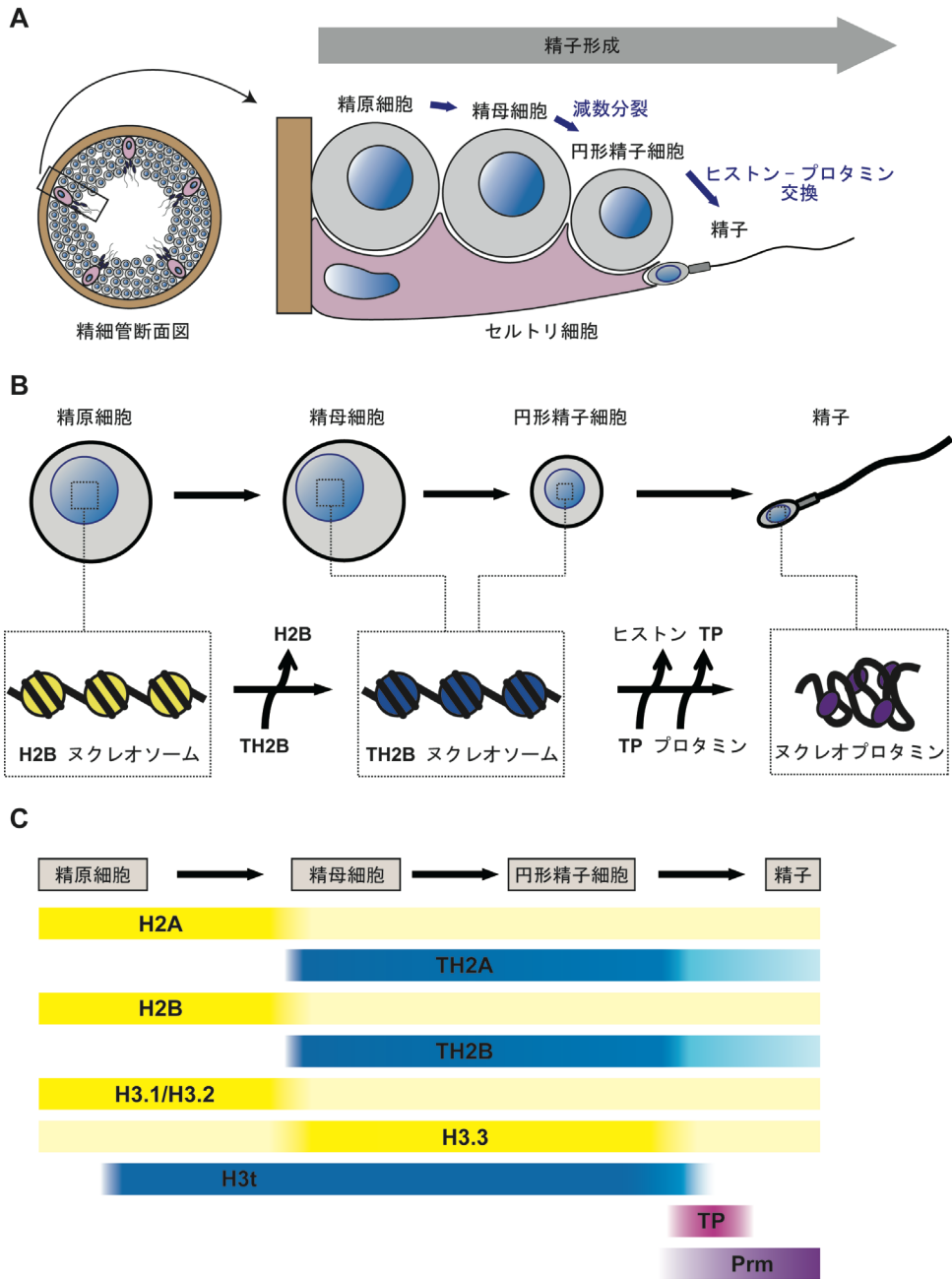


Figure 2. 精子形成におけるクロマチン再編成

(A) 精細管の模式図。精子形成は精巣の精細管内で進行し、精子に分化する細胞は精子への分化過程で基底膜 (橙色)側から内腔側へと移動する。精細管の基底膜付近にある精原細胞が体細胞分裂し、精母細胞が生じる。精母細胞は精細管の内腔へ移動し、減数分裂を開始する。減数分裂により一倍体の円形精子細胞が生じ、円形精子細胞の伸長を経て成熟精子が生じる。円形精子細胞の伸長過程ではクロマチンを構成するヒストンがプロタミンに交換される (ヒストン-プロタミン交換)。セルトリ細胞は、精子形成過程にある各細胞を支持する役割を果たす。((Allais-Bonnet & Pailhoux, 2014)を参考に作図した。)

(B) 精原細胞から精子に分化する過程で起こるクロマチン再編成。マウスでは精原細胞のクロマチンは H2B を多く含むが、精母細胞と円形精子細胞のクロマチンは TH2B を多く含むことが報告されている (Montellier *et al.*, 2013)。円形精子細胞が伸長して精子に成熟する過程で、ヒストンはトランシジョンプロテイン (TP)に交換され、次いで TP はプロタミンに交換される。プロタミンはゲノム DNA を高度に凝縮し、精子頭部に収める役割を果たす。DNA とプロタミンの複合体はヌクレオプロタミンと呼ばれている。

(C) 精子形成過程におけるマウス H2A、TH2A、H2B、TH2B、H3.1/H3.2、H3.3、H3t、トランシジョンプロテイン (TP)、およびプロタミン (Prm)の発現時期の模式図を示す (Montellier *et al.*, 2013; Yuen *et al.*, 2014; Shinagawa *et al.*, 2015; Ueda *et al.*, 2017)。ユビキタスに発現するヒストンを黄色、精巣特異的に高発現するヒストンを青色、トランシジョンプロテインを桃色、プロタミンを紫色で示す。

Table 1. ヒトの精巣特異的に高発現するヒストンバリエントとマウスオルソログ

Human	Mouse
TH2A	TH2A
H2A.B	H2A.B
TSH2B	TH2B
H2BFWT	N.D.
H3T	H3t
H3.5	N.D.

ヒトで同定されている精巣特異的ヒストンバリエントと、それぞれのマウスのオルソログを示した (N.D.は not determined の略)。

れている (Maze *et al.*, 2014)。ヒトの精巣特異的に高発現するヒストンバリエントと、対応するマウスのヒストンバリエントを Table 1 に示した。

本研究で解析するヒトの TSH2B は、マウスの精巣特異的 H2B バリエントである TH2B のオルソログとして同定された (Zalensky *et al.*, 2002)。マウスの TH2B は、不安定なヌクレオソームを形成することにより、精子形成時のヒストン-プロタミン交換を促進する機能を持つことが示唆されている (Montellier *et al.*, 2013)。H2B は精原細胞から検出され、精母細胞と精細胞からはほとんど検出されないのに対し、TH2B は精母細胞と精細胞から検出されている (Montellier *et al.*, 2013)。TH2B はプレレプトテン期/レプトテン期の精母細胞に複製非依存的に発現し始める (Montellier *et al.*, 2013)。しかし、H2B と TH2B がどのようにして交換されるのかは未だに明らかではない。ヒトの TSH2B と主要型の H2B の相同性は 85%、ヒト TSH2B とマウス TH2B の相同性は 95%であり、TSH2B は TH2B と同様に精巣特異的に高発現することが報告されている (Zalensky *et al.*, 2002)。ヒトの精子形成時に、TSH2B がマウスの TH2B と同様の役割を果たすのかについてはいまだに不明である。

マウスの精巣特異的 H2A バリエントである TH2A の発現時期は、TH2B の発現時期と同じであり、TH2A も複製非依存的にクロマチンに取り込まれることが示唆されている (Shinagawa *et al.*, 2015)。H2A は精原細胞において発現しているが、TH2A の発現とともに H2A の存在量は減少することが示されている (Shinagawa *et al.*, 2015)。

ヒトの H3T は、精巣に特異的に高発現する H3 バリエントであることが示されており、(Witt *et al.*, 1996)、不安定なヌクレオソームを形成することが報告されている (Tachiwana *et al.*, 2010)。ヒト H3T のオルソログであるマウスの H3t も精巣特異的な発現を示す (Maehara *et al.*, 2015)。H3t は複製依存的にクロマチンに取り込まれることが示されており (Maehara *et al.*, 2015)、*H3t* 遺伝子をノックアウトしたマウスは精子形成不全による雄性不妊となること

が報告された (Ueda *et al.*, 2017)。H3t は未分化型精原細胞には発現していないが、分化型精原細胞、精母細胞、精細胞には存在し、精子には存在しなかった (Ueda *et al.*, 2017)。一方で、複製依存的にクロマチンに取り込まれる H3.1/H3.2 は、未分化型精原細胞と分化型精原細胞に発現していたが、精母細胞以降の段階では存在量が著しく低下していた (Ueda *et al.*, 2017)。複製非依存的にクロマチンに取り込まれる H3.3 は、精原細胞から精子にまで存在し、パキテン期の精母細胞以降発現量が増加する (Yuen *et al.*, 2014; Ueda *et al.*, 2017)。H3t が複製依存的にクロマチンに取り込まれることにより、ヒストン交換が起こり易い、リラックスしたクロマチン構造が形成され、ヒストンバリエントのクロマチンへの取り込みが促進されるのかもしれない (Ueda *et al.*, 2017)。

本研究で解析するヒトの精巣に特異的に高発現する H3 バリエントである H3.5 は、ヒト科の動物に特異的に保存されている (Schenk *et al.*, 2011)。H3.5 と他の H3 バリエントのアミノ酸配列を比較すると、H3.5 は H3.3 との相同性が最も高い。H3.5 の遺伝子である *H3F3C* は、ヒト科の動物の共通祖先において、H3.3 の遺伝子 (*H3F3A* および *H3F3B*) のうち *H3F3B* がレトロトランスポゾンにより遺伝子重複し、進化したことによって生じたと示唆されている (Schenk *et al.*, 2011)。*H3F3C* は現代人、ネアンデルタール人、ボノボ、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン等のヒト科の動物に特異的に保存されているが、アカゲザル等のヒト科以外の霊長類には保存されていない (Schenk *et al.*, 2011)。なお、ボノボとチンパンジーでは *H3F3C* は偽遺伝子である (Schenk *et al.*, 2011)。H3.5 の mRNA はヒトの精巣の精細管において特異的に高発現することが報告されている (Schenk *et al.*, 2011)。しかし、H3.5 のタンパク質がどの時期に発現しているのかは未解明である。培養細胞で H3.3 をノックダウンすると同時に H3.5 を異所的に発現させると、H3.3 のノックダウンによる細胞増殖異常が補完されることから、細胞増殖において H3.5 と H3.3 は重複した機能を持つことが示唆さ

れる (Schenk *et al.*, 2011)。しかし、H3.5 を含むクロマチン構造、およびヒトの精子形成時のクロマチン再編成における H3.5 の役割はいまだによくわかっていない。

ヒトの精子には、体細胞と比べるとおよそ 10%のヒストンが残っており、マウスの精子ではおよそ 1%のヒストンが残っている (Brykczynska *et al.*, 2010)。したがって、生物種によって精子形成時のクロマチン再編成のメカニズムが異なる可能性が考えられる。H3.5 のような生物種特異的なヒストンバリエントによって、種特異的なクロマチン構造の形成が促進されるのかもしれない。

1-4 本研究について

近年、ヒトの不妊の原因の半分は男性側にあるといわれている。従って、新たな不妊治療技術の創出のために、精子形成のメカニズムを理解することは重要であると考えられる。精子形成時のクロマチン再編成の制御には、ヒストンバリエントが重要な役割を果たすことがわかってきている (Maze *et al.*, 2014)。精巣には多様なヒストンバリエントが発現しており、これらはアミノ酸配列が類似していても、僅かなアミノ酸置換によりそれぞれが異なる機能を有すると考えられる。このため、精巣に高発現するヒストンバリエントの機能や構造を一つ一つ明らかにしていくことは、精子形成の制御機構を正確に把握するのに必須であると考えられる。

精子形成時のクロマチン再編成のメカニズムは、ヒトとマウスでは異なる可能性が考えられる。ヒトの不妊治療への応用の可能性を考え、本研究ではヒトの精子形成の制御機構の理解を深めることを目指して、ヒトの精巣に高発現するヒストンバリエントの解析を行うことにした。

まず、ヒト TSH2B に着目した。ヒト TSH2B は、精子形成時のヒストン-プロタミン交換

を促進する機能を持つと考えられているマウス TH2B のオルソログである。ヒト TSH2B がマウス TH2B と完全に同じ機能を持つのかについては未だに不明であるが、TSH2B は H2B より TH2B との相同性が高いことから、TSH2B は TH2B に近い機能を持つことが考えられる。ヒト TSH2B がマウス TH2B と同様に精子形成時のヒストン-プロタミン交換において重要な役割を果たしているのであれば、TSH2B の機能・構造解析はヒトの精子形成メカニズムの理解に繋がることが期待される。そこで本研究では、ヒトの TSH2B を含むヌクレオソーム (TSH2B ヌクレオソーム)の構造解析を行うことにした。

次に、ヒト科の動物に特異的に保存されており、ヒトの精巣に特異的に高発現することが確認されている H3.5 に着目した。H3.5 はヒト科の動物に特異的であるため、H3.5 によってヒトとマウスの精子形成時クロマチン構造に違いが生じるのかもしれない。H3.5 を含むヌクレオソームの機能・構造は未解明であり、これらの解析は、他の生物種と比べてヒトの精子形成時のクロマチンダイナミクスがどのように制御されているのかを明らかにしていく上で重要であると考えられる。このため、本研究ではヒトの H3.5 を含むヌクレオソーム (H3.5 ヌクレオソーム)の機能・構造解析を行うことにした。

本論文の構成を以下に示す。第 2 章では実験の材料と方法について詳述した。第 3 章では H3.5 ヌクレオソームの機能・構造解析の結果を示した。この解析では、まず試験管内で再構成した H3.5 ヌクレオソームの立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにした。その結果、H3.5 特異的な 103 番目のロイシンへの置換により、H3.5 は H3.3 と比較して H3 と H4 の間の疎水性相互作用が低下していることが示唆された。さらに、H3.5 ヌクレオソームの塩耐性を解析した結果、H3.5 ヌクレオソームは H3.3 ヌクレオソームと比較して NaCl に対する耐性が低いことがわかった。また、H3.5 を含むテトラソーム (H3.5 テトラソーム)を再構成して熱安定性を解析した結果、H3.5 テトラソームは H3.3 テトラソームより熱に対す

る安定性が低いことがわかった。H3.5 の変異体を用いた生化学的解析によって、H3.5 ヌクレオソームが H3.3 ヌクレオソームより NaCl に対する安定性が低く、H3.5 テトラソームが H3.3 テトラソームより熱に対する安定性が低い主要な原因は、H3.5 の 103 番目のロイシンであることが明らかになった。第 4 章では TSH2B ヌクレオソームの構造解析の結果を示した。この解析では、まず TSH2B ヌクレオソームを再構成し、X 線結晶構造解析により TSH2B ヌクレオソームの立体構造を明らかにした。TSH2B ヌクレオソームと H2B ヌクレオソームの構造を比較した結果、TSH2B 特異的な 61 番目のセリンや 85 番目のセリン周辺で TSH2B と H2B の構造が局所的に異なることがわかった。第 5 章では本研究の結果を総括し、精子形成時のクロマチン再編成における H3.5 と TSH2B の機能を考察した。

第2章 材料と方法

2-1 リコンビナントヒストンタンパク質の精製

ヒストンの精製は引用文献 (Tanaka *et al.*, 2004; Tachiwana *et al.*, 2010; Tachiwana *et al.*, 2011)を参考にした。ヒストンの発現には、アンピシリン耐性遺伝子を含み、His₆ タグと thrombin protease 認識配列とヒストンをこの順番でコードする DNA を含むプラスミドを使用した。

2-1-1 ヒストン H2A、H2B、H3.1、H3.3、H3T、H4 の精製

以下、ヒトのヒストン H2A、H2B、H3.1、H3.3、H3T、H4 をコードする DNA を含むプラスミドをそれぞれ pH2A、pH2B、pH3.1、pH3.3、pH3T、pH4 と記す。pH2A、pH2B、pH3.1、pH3.3、pH3T をそれぞれ大腸菌株 BL21(DE3)に導入し、pH4 を大腸菌株 JM109(DE3)に導入した。形質転換した大腸菌を 100 µg/ml ampicillin を含む LB 寒天培地において 37°C で培養した。大腸菌のコロニーを 50 µg/ml ampicillin を含む LB 培地に移して 37°C で培養し、His₆ タグ融合ヒストンを発現させた。大腸菌を遠心回収し、buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5% glycerol, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF)で懸濁した後、粘性が低くなるまで氷上で超音波破碎を行った。細胞破碎液を遠心し、可溶性画分と不溶性画分を分離した。His₆ タグ融合ヒストンは不溶性画分に含まれるため、不溶性画分を回収して buffer A で懸濁した。懸濁液を再び氷上で超音波破碎してから遠心分離し、His₆ タグ融合ヒストンを含む不溶性画分を回収した。不溶性画分を buffer B (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5% glycerol, 500 mM NaCl, 7 M guanidine hydrochloride)で懸濁した後、氷上で超音波破碎した。その後、ローテーターを用いて 4°C で一晩緩やかに転倒混和させて His₆ タグ融合ヒストンを可溶化させた。遠心分離により可溶性画分を回収し、Ni-NTA agarose (Qiagen)と 4°C で 1 時間、ローテーターを用いて緩やかに

転倒混和した。His₆ タグ融合ヒストンを吸着したビーズをエコノカラム (Bio-Rad)に充填し、buffer C (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5% glycerol, 500 mM NaCl, 6 M urea, 5 mM imidazole)で洗浄した。さらに、5–500 mM imidazole の直線勾配により His₆ タグ融合ヒストンを溶出し、His₆ タグ融合ヒストンを含む画分を buffer D (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM 2-mercaptoethanol)に透析した。次に、Thrombin protease (GE Healthcare)を加え、室温で3時間混合させて His₆ タグを切断した。このタンパク質溶液を Mono S カラム (GE Healthcare) に添加してヒストンを吸着させ、buffer E (20 mM sodium acetate (pH 5.2), 1 mM Na-EDTA, 200 mM NaCl, 6 M urea, 2 mM 2-mercaptoethanol)で洗浄した。さらに、200–800 mM NaCl の直線勾配によりヒストンを溶出し、ヒストンを含む画分を 2 mM 2-mercaptoethanol に透析した。その後、ヒストンを凍結乾燥し、粉末化したヒストンを 4°C で保存した。精製したヒストンを SDS-PAGE により解析し、分解していないことを確認した。

ヒストンを 2 mM 2-mercaptoethanol に透析した後に凍結乾燥するという実験操作は、他のグループでも行われている (Luger *et al.*, 1999)。各種ヒストンを変性状態で混合した後、高塩濃度下で変性剤を除くことにより、ヒストン複合体をリフォールディングすることができる。この方法によって、これまで多くのヌクレオソーム再構成実験が行われてきたが、凍結乾燥を行わない方法にて調製したヌクレオソームと、生化学的な性質は同様であることが確認されている (Tachiwana *et al.*, 2008; 2010)。ヒストンを凍結乾燥せずに保存することもできるが、凍結乾燥して粉末化した方がヒストンの長期保存が可能であり、ヒストン複合体を再構成する時にも異なった組み合わせのヒストンを利用することができる。これらの理由により、本研究では凍結乾燥法を用いたヒストン調製を採用した。

2-1-2 ヒストン H3.5、H3.5 変異体、H3.3 変異体の精製

ヒトのヒストン H3.3 をコードする DNA を *NdeI-BamHI* 部位に挿入した pET-15b ベクター (Novagen)を用いて、部位特異的変異導入法によりヒトの H3.5、H3.5 変異体 (H3.5 N78K および H3.5 L103F)、H3.3 変異体 (H3.3 K79N および H3.3 F104L)の発現プラスミドを作製した。H3.5、H3.5 変異体、H3.3 変異体の発現と精製は、H3.1、H3.3、H3T と同様の方法で行った。

2-1-3 ヒストン TSH2B の精製

ヒトのヒストン TSH2B をコードする DNA を、pUC19 から派生したベクターの *NdeI-BamHI* 部位に挿入した。この pUC19 から派生したベクターは、H2B の発現に使用したものと同じである (Tanaka *et al.*, 2004)。TSH2B の発現と精製は、H2B と同様の方法で行った。

2-2 ヒストン複合体の再構成および精製

ヒストン複合体の再構成および精製は、引用文献 (Tachiwana *et al.*, 2008; Tachiwana *et al.*, 2010)を参考にした。

2-2-1 ヒストン八量体の再構成と精製

精製したヒストン H2A、H2B、H3.1、H4 を等モルずつ混合し、buffer F (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM 2-mercaptoethanol, 7 M guanidine hydrochloride)を加えて、ローテーターを用いて 4°Cで 2 時間緩やかに転倒混和させた。その後、buffer G (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 M NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM Na-EDTA)に透析し、H2A、H2B、H3.1、H4 を含むヒストン八量体を再構成した。このタンパク質溶液を、buffer G で平衡化した Superdex 200 カラム (GE Healthcare)に添加し、buffer G でタンパク質を溶出した。ヒストン八量体を含む画分を

回収して濃縮し、氷上または-80°Cで保存した。

また、同様の方法で TSH2B、H3.3、または H3.5 を含むヒストン八量体をそれぞれ再構成して精製した。

2-2-2 ヒストン四量体および二量体の再構成と精製

精製したヒストン H4 を H3.3、H3T、または H3.5 と等モル混合し、buffer F を加えた後にローテーターを用いて 4°C で 2 時間緩やかに転倒混和させた。その後、buffer G に透析し、NaCl 濃度を 1 M、0.5 M、0.1 M に段階的に下げ、H3.3-H4 複合体、H3T-H4 複合体、H3.5-H4 複合体を再構成した。また、精製したヒストン H2A と H2B を等モル混合し、buffer F を加えた後にローテーターを用いて 4°C で 2 時間緩やかに転倒混和させた後、buffer G に透析して H2A-H2B 複合体を再構成した。再構成したヒストン複合体を、buffer G で平衡化した Superdex 200 カラムに添加し、buffer G でタンパク質を溶出した。ヒストン複合体を含む画分を回収して濃縮し、氷上または-80°Cで保存した。

また、H3.3-H4 複合体、H3.5-H4 複合体と同様に H3.3 変異体-H4 複合体、H3.5 変異体-H4 複合体をそれぞれ再構成して精製した。

2-3 146 塩基対の DNA の調製

ヌクレオソームの再構成に用いた 146 塩基対の DNA の調製は、引用文献 (Dyer *et al.*, 2004)を参考に行った。この DNA はヒトの α -サテライト DNA に由来し、回文構造を持つように設計されており、1997 年に Luger 博士らが報告したアフリカツメガエルのヌクレオソームの 2.8 Å 分解能での結晶構造の決定において使用された (Luger *et al.*, 1997)。

Luger 博士より供与された、ヒトの α -サテライト DNA 由来の DNA 断片が 24 個直列に挿

入されたプラスミドを、大腸菌株 DH5 α に導入した。形質転換した大腸菌を大量培養し、プラスミドを増幅させた。大腸菌を遠心回収し、アルカリ SDS 法によりプラスミドを抽出した。*EcoRV* により、 α -サテライト DNA 由来の DNA 断片を切り出した後、PEG 沈殿により DNA 断片とベクターを分離した。DNA 断片を回収して CIAP で処理した後、CIAP を加熱処理によって失活させて DNA 断片を抽出した。この DNA 断片に *EcoRI* を添加し、セルフライゲーションに用いる付着末端を生じさせた。その後、付着末端を持つ α -サテライト由来の DNA 断片を DEAE カラム (TOSOH) によって精製した。精製した DNA 断片に T4 DNA ligase を加えてライゲーション反応を行い、回文構造を持つ 146 塩基対の DNA を作製した。この 146 塩基対の DNA を DEAE カラムで精製し、-30°C で保存した。

2-4 ヌクレオソームおよびテトラソームの再構成と精製

ヌクレオソームの再構成および精製は、引用文献 (Dyer *et al.*, 2004; Tachiwana *et al.*, 2010; Tachiwana *et al.*, 2011) を参考にした。精製した 146 塩基対の DNA とヒストン八量体を 2 M KCl を含む溶液中で混合した。また、精製した 146 塩基対の DNA と H3T-H4 複合体と H2A-H2B 複合体を 2 M KCl を含む溶液中で混合した。その後、これらの溶液を buffer H (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 M KCl, 1 mM Na-EDTA, 1 mM DTT) に透析した。透析外液の KCl 濃度を徐々に下げてヌクレオソームを再構成し、最終的に 0.25 M KCl を含む buffer H に透析した。その後、ヌクレオソーム溶液を 55°C で 2 時間静置することにより、非特異的なヒストンと DNA の結合を解消した。次に、Prep Cell (Bio-Rad) を用いて、非変性 PAGE によってヌクレオソームを精製した。ヌクレオソームの溶出には、buffer I (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM Na-EDTA, 1 mM DTT) を用いた。精製したヌクレオソームは氷上で保存した。

また、テトラソームの再構成および精製は、引用文献 (Taguchi *et al.*, 2014) を参考にした。

精製した H4 と H3.3、H3.5、H3.3 変異体、または H3.5 変異体の複合体と、146 塩基対の DNA を 2 M KCl を含む溶液中で混合した。その後、ヌクレオソームと同様にテトラソームの再構成と精製を行った。

2-5 ヌクレオソームの結晶化

ヌクレオソームの結晶化は、引用文献 (Tachiwana *et al.*, 2010)を参考にした。精製した H3.5 ヌクレオソームおよび TSH2B ヌクレオソームを buffer J (20 mM potassium cacodylate (pH 6.0), 1 mM Na-EDTA)に透析した。その後、それぞれのヌクレオソームを 2.5 mg/ml 以上の濃度に調製し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。1 μ l の H3.5 ヌクレオソームまたは TSH2B ヌクレオソームを、1 μ l の buffer K (20 mM potassium cacodylate (pH 6.0), 75-155 mM MnCl₂, 50 mM KCl)と混合した後、500 μ l の buffer L (20 mM potassium cacodylate (pH 6.0), 50-80 mM MnCl₂, 35-40 mM KCl)に対して 20°Cで平衡化させることにより、それぞれのヌクレオソームの結晶を得た。

2-6 X 線回折データ収集と構造決定

X 線回折データ収集と構造決定は、引用文献 (Tachiwana *et al.*, 2010; Horikoshi *et al.*, 2013)を参考に行った。H3.5 ヌクレオソームと TSH2B ヌクレオソームの結晶を、それぞれ buffer M (20 mM potassium cacodylate (pH 6.0), 50-80 mM MnCl₂, 35-40 mM KCl, 29% 2-methyl-2,4-pentane-diol, 2% trehalose)に室温で浸した後、100 K の窒素ガス中で急速に凍結させた。大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL41XU において、それぞれのヌクレオソームの結晶に 1.000 Å の波長の X 線を照射し、X 線回折データを取得した。

X 線回折データは、HKL2000 プログラムを用いて処理した (Otwinowski & Minor, 1997)。

HKL2000 プログラムに含まれる Scalepack プログラムからの出力ファイルを、CCP4 プログラムを用いて MTZ 形式に変換した (Winn *et al.*, 2011)。次に、PHASER プログラムを用いて分子置換法により位相決定を行った (McCoy *et al.*, 2007)。分子置換では、H3.5ヌクレオソームのモデルをヒトの H3.3ヌクレオソームの結晶構造 (PDB : 3AV2)とし、TSH2Bヌクレオソームのモデルをヒトの主要型のヌクレオソームの結晶構造 (PDB : 3AFA)とした (Tachiwana *et al.*, 2010; Tachiwana *et al.*, 2011)。H3.5ヌクレオソームの構造を、PHENIX プログラムを用いて精密化した (Adams *et al.*, 2010)。また、TSH2Bヌクレオソームの構造を、CNS プログラムを用いて精密化した (Brünger *et al.*, 1998)。それぞれのヌクレオソームのモデル構築には、COOT プログラムを用いた (Emsley & Cowtan, 2004)。H3.5ヌクレオソームの最終構造を MolProbity プログラムにより検証し、ラマチャンドラプロットにおいて、すべてのアミノ酸の主鎖の二面角が正常値であることを確認した (Chen *et al.*, 2010)。また、TSH2Bヌクレオソームの最終構造を RAMPAGE プログラムにより検証し、ラマチャンドラプロットにおいて、すべてのアミノ酸の主鎖の二面角が正常値であることを確認した (Lovell *et al.*, 2003)。X線回折データと構造精密化における統計値を Table 2 および Table 3 に示した。結晶構造の図を、PyMOL プログラムを用いて作成した (Schrödinger, LLC)。H3.5ヌクレオソームと TSH2Bヌクレオソームの結晶構造データを、それぞれの PDB ID を 4Z5T、3WKJ として Protein Data Bank に登録した。

2-7 ヌクレオソームの耐塩性試験

ヌクレオソームの耐塩性試験は、引用文献 (Tachiwana *et al.*, 2010)を参考に行った。精製したヌクレオソーム (240 ng/μl)を、0.4、0.6、0.7、または 0.8 M NaCl を含む buffer N (36 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.8 mM Na-EDTA, 1.8 mM DTT)中で、50°Cで 1 時間静置した。その後、各

試料の NaCl 濃度を 0.4 M に調製し、6% native-PAGE によって解析した。電気泳動後、ゲルを EtBr で染色した。

2-8 テトラソームの耐熱性試験

テトラソームの耐熱性試験は、引用文献 (Taguchi *et al.*, 2014) を参考に行った。精製したテトラソーム (225 ng/μl) と SYPRO Orange (5×) を buffer I 中で混合し、室温で静置した。その後、StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems) を用いて 1 分間に 1°C 上昇させることにより、26°C から 95°C へ段階的に温度を上昇させた。各温度で、1 分間静置した後に蛍光信号を検出した。温度 T°C (T = 26 ~ 95) における蛍光強度を F(T) とし、蛍光強度を計算式 $[F(T) - F(26)]/[F(95) - F(26)]$ により正規化した。

第3章 H3.5を含むヌクレオソームの構造解析

3-1 序

ヒト科に特異的に保存されているヒストンH3バリエントであるH3.5の遺伝子*H3F3C*は、ヒト科の動物の共通祖先においてH3.3の遺伝子*H3F3B*が遺伝子重複して進化したことにより生じたと考えられている (Schenk *et al.*, 2011)。ヒトのH3.5とH3.3は、アミノ酸配列が6カ所異なる (Figure 3)。H3.5はH3.3の36番目のリジンまたは37番目のリジンを欠失している (Figure 3)。また、H3.5ではH3.3の29番目のアラニンはスレオニン、33番目のグリシンはシステイン、79番目のリジンはアスパラギン、89番目のイソロイシンはバリン、104番目のフェニルアラニンはロイシンに置換されている (Figure 3)。主要型ヒストンのアミノ酸配列は、生物種間でほとんど変わらないことが知られている。従って、H3.3とH3.5の間の6カ所のアミノ酸置換は、それぞれがヒストンの機能変化に重要な役割を果たすかもしれない。中立な変異も残っている可能性があり、H3.5の機能を理解するには各アミノ酸置換について解析することが重要である。

ヒトのH3.5は精巣の精細管に特異的に高発現することがわかっている (Schenk *et al.*, 2011)。ヒト科の動物の共通祖先において、H3.5が生じたことにより精子形成の効率が上がり、子孫を残しやすくなったのかもしれない。

H3.3はユビキタスに発現しており、複製非依存的にクロマチンに取り込まれ、多様な役割を担う。マウスの解析で、H3.3をノックアウトすると胚発生に異常が生じることが示されている (Jang *et al.*, 2015)。H3.3は動物の発生に必須であるため、H3.3のアミノ酸変異は動物の発生に異常をもたらすのかもしれない。一方、H3.5は精巣特異的な発現を示すことから、精子形成時のクロマチンに取り込まれると考えられる。精子形成時はヒストンのアセチル化により、ヒストンの交換が盛んに起きることが知られている (Goudarzi *et al.*, 2014)。

従って、精巣特異的ヒストンバリエントに変異が入っても、精子形成に重大な異常を生じさせる変異でない限り、ヒストン交換が盛んに起きることにより他の必須なヒストンバリエントに交換されるため問題が生じず、変異が次世代に引き継がれるのかもしれない。このため、H3.5の変異はH3.3の変異より次世代に継承されやすくなっている可能性が考えられる。また、精巣特異的に高発現するヒストンバリエントであるH2A.B、TH2B、H2BFWTも主要型のH2AやH2Bより進化速度が速いことがわかっている (González-Romero *et al.*, 2010)。

精子形成時においてH3.5がどのように働くのかは興味深い問題だが、ほとんど未解明である。そこで、ヒトのH3.5の機能を明らかにするため、H3.5をリコンビナントタンパク質として精製し、H3.5を含むヌクレオソームを再構成して構造解析を行った。さらに、再構成したヌクレオソームの安定性を生化学的に解析した。本章では、その結果を詳述する。

3-2 ヒストン H3.5 の精製

リコンビナントタンパク質として大腸菌に発現させて精製したヒトのH3.1、H3.3、H3T、H3.5をSDS-PAGEで解析した結果、H3.1、H3.3、H3Tは移動度が同程度であるのに対し、H3.5は他のH3バリエントより移動度が大きいことが示された (Figure 4)。

3-3 H3.5 を含むヌクレオソームの再構成と精製

H3.5を含むヒストン八量体と146塩基対のDNAを用いて、塩透析法によりH3.5ヌクレオソームを再構成して精製した。比較のために、H3.5の代わりにH3.1、H3.3、またはH3Tを含むヌクレオソーム (H3.1ヌクレオソーム、H3.3ヌクレオソーム、およびH3Tヌクレオソーム)も再構成して精製した。精製したヌクレオソームを非変性PAGEで解析した結果、

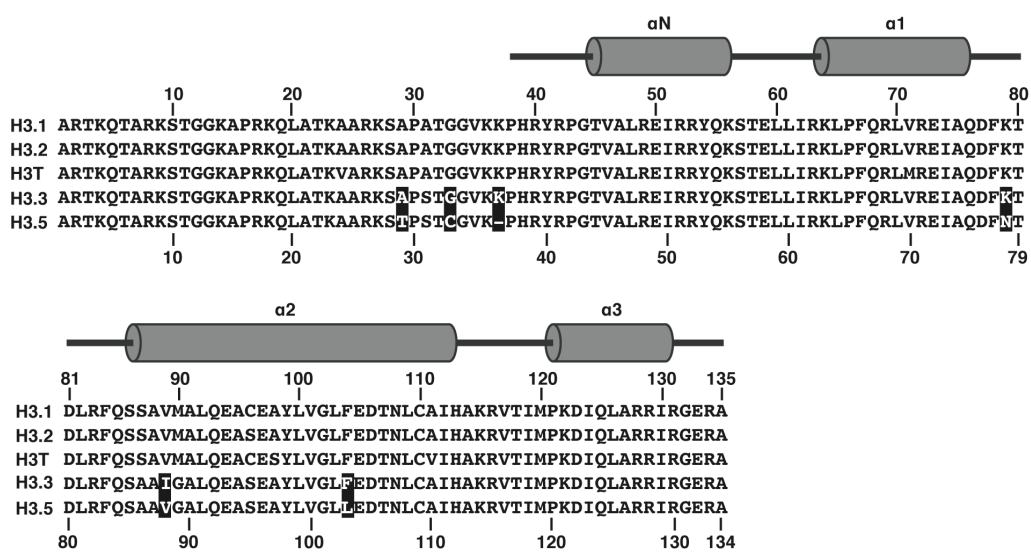


Figure 3. ヒトのヒストン H3.1、H3.2、H3.3、H3T、H3.5 のアミノ酸配列

H3.1、H3.2、H3.3、H3T、H3.5 のアミノ酸配列とともにヌクレオソーム中の H3 の二次構造を示す。H3.5 と H3.3 の間で保存されていないアミノ酸を黒色の四角で囲み、白色の文字で示す。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 1a より引用)

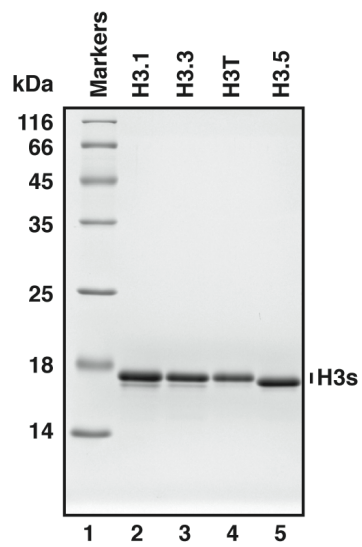


Figure 4. ヒトのヒストン H3.1、H3.3、H3T、H3.5 の精製

精製した H3.1、H3.3、H3T、H3.5 を 18% SDS-PAGE により解析した。ゲルは CBB で染色した。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 1b より引用)

H3.5 ヌクレオソームは他の H3 バリエントを含むヌクレオソームと同程度の移動度を示した (Figure 5A)。また、精製したヌクレオソームを SDS-PAGE によって解析した結果、H3.5 ヌクレオソームは他の H3 バリエントを含むヌクレオソームと同様に、H2A、H2B、H3、H4 のシグナル強度が同程度だった (Figure 5B)。これまでに、H3.1 ヌクレオソーム、H3.3 ヌクレオソーム、および H3T ヌクレオソームは、いずれも H2A、H2B、H3、H4 をそれぞれ 2 分子ずつ含むことが報告されている (Tachiwana *et al.*, 2010; Tachiwana *et al.*, 2011)。これらのことから、H3.5 ヌクレオソームも同様に H2A、H2B、H3.5、H4 をそれぞれ 2 分子ずつ含むことが示唆された。

3-4 H3.5 を含むヌクレオソームの耐塩性試験

H3.5 ヌクレオソームの構造の安定性を調べるため、耐塩性試験を行った。ヌクレオソームは、正の電荷を持つヒストンが負の電荷を持つ DNA に結合してできているので、ヌクレオソームを高塩濃度で処理すると DNA とヒストンは解離する (Figures 6A)。耐塩性試験では、精製したヌクレオソームを 0.4、0.6、0.7、または 0.8 M NaCl 存在下で、50°C で 1 時間静置した後、NaCl 濃度を 0.4 M に揃えて native-PAGE によって解析することにより、高塩濃度下でヌクレオソーム構造が保たれているかを調べた。塩と熱により DNA とヒストンが解離した場合、0.4 – 0.8 M NaCl 存在下では、ヒストン八量体は崩壊して H3-H4 複合体と H2A-H2B 複合体に分かれると考えられる。さらに、ヌクレオソームを適切に形成させるには、DNA に H3-H4 が結合した後、H2A-H2B が結合するという段階的な反応を起こす必要があることから、耐塩性試験でヌクレオソームが崩壊した後に新たにヌクレオソームが適切に形成されることは無いと考えられる。

ヌクレオソームの耐塩性試験の結果、精製後のヌクレオソーム溶液と比較し、0.4 M NaCl

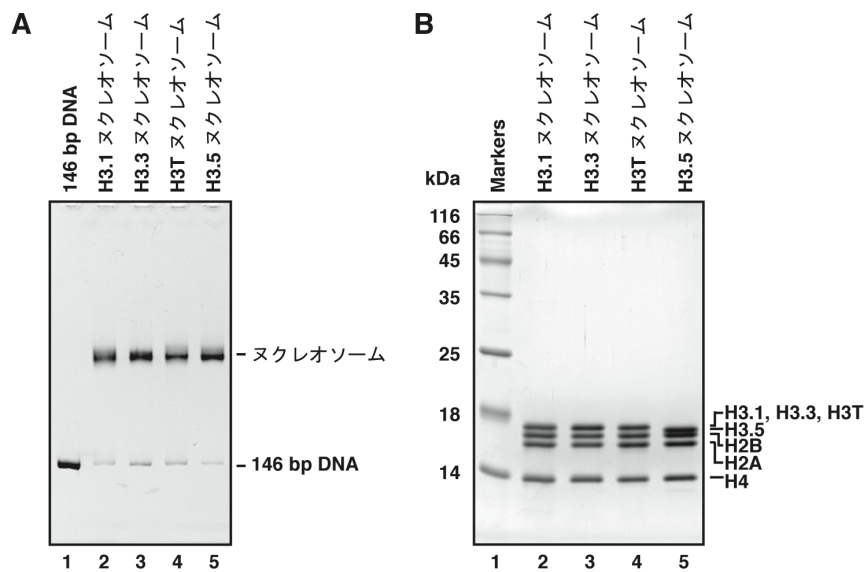


Figure 5. H3.1、H3.3、H3T、または H3.5 を含むヌクレオソームの精製

(A) H3.1、H3.3、H3T、または H3.5 を含むヌクレオソームを再構成して精製した後、6% native-PAGE により解析した。ゲルは EtBr で染色した。レーン 1 ではヌクレオソームの再構成に用いた 146 塩基対の DNA を泳動した。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 1c より引用)

(B) H3.1、H3.3、H3T、または H3.5 を含むヌクレオソームを再構成して精製した後、18% SDS-PAGE により解析した。ゲルは CBB で染色した。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 1d より引用)

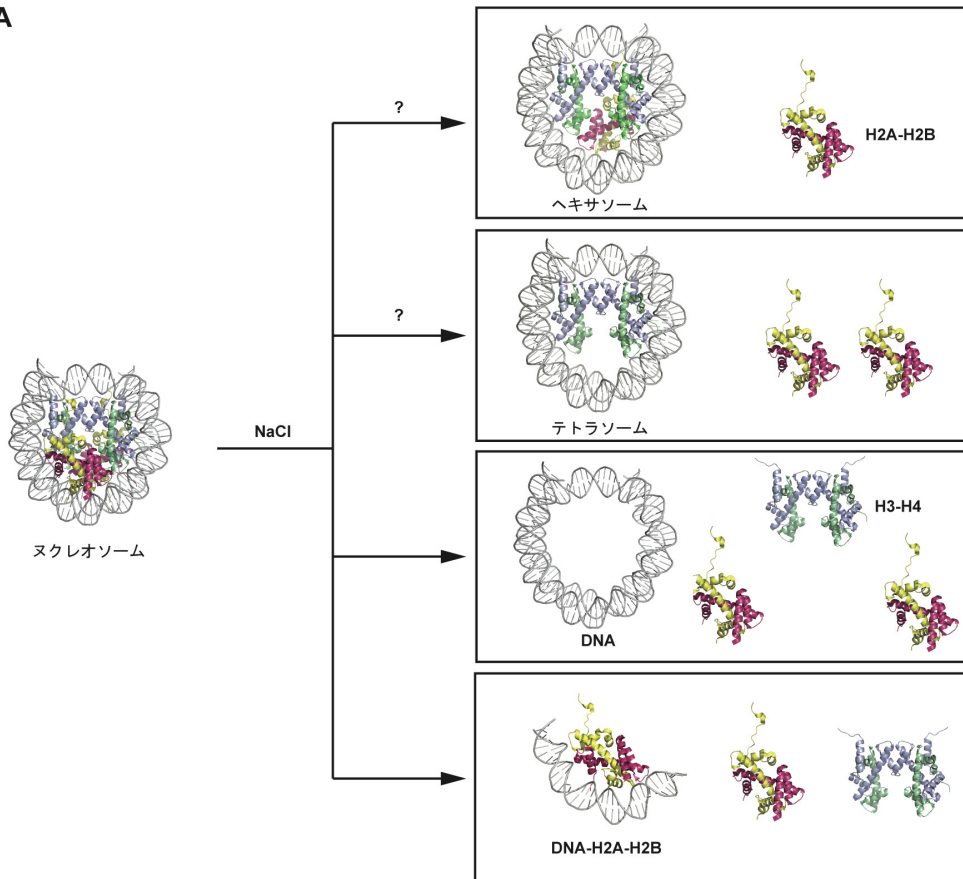
存在下で耐塩性試験を行った後のヌクレオソーム溶液では、ヌクレオソームに対する遊離 DNA の量が増加していた (Figures 5A, 6)。この原因は、0.4 M NaCl 存在下でヌクレオソームを 50°C で 1 時間静置したことによる一部のヌクレオソームの構造の崩壊であると考えられる。H3.1 ヌクレオソームと H3.3 ヌクレオソームはともに、0.4 M NaCl 存在下で一部のヌクレオソームの構造が崩壊したものの、0.6 – 0.8 M NaCl 存在下においても構造を保つヌクレオソームが存在した (Figure 6B)。これに対し、H3.5 ヌクレオソームは 0.7 – 0.8 M NaCl 存在下で大部分のヌクレオソームの構造が崩壊していた (Figure 6C)。先行研究と同様に、H3T ヌクレオソームは 0.6 M 以上の濃度の NaCl 存在下において、ほぼ全てのヌクレオソームの構造が崩壊していた (Figure 6C) (Tachiwana *et al.*, 2010)。H3T ヌクレオソームと H3.5 ヌクレオソームでは、ヌクレオソームに対応するバンドの消失に伴い、新たなバンドが観察された (Figure 6C)。H3T ヌクレオソームの先行研究で、このバンドは DNA および H2A-H2B を含む複合体に対応することが報告されているが、この複体内で H2A-H2B と DNA がどのような状態で結合しているのかは未だに不明である (Tachiwana *et al.*, 2010)。

以上の結果から、H3.5 ヌクレオソームは、H3T ヌクレオソームと比較すると塩に対する安定性が高いが、H3.1 ヌクレオソームおよび H3.3 ヌクレオソームと比較すると塩に対する安定性が低いことが示された。

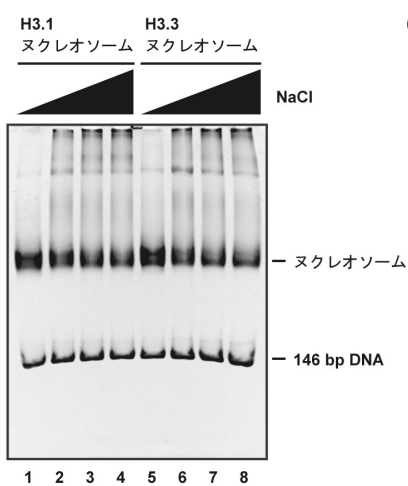
3-5 H3.5 ヌクレオソームの結晶化

H3.5 ヌクレオソームの構造が塩に対して不安定である原因を明らかにするため、X 線結晶構造解析によって H3.5 ヌクレオソームの立体構造を原子分解能で明らかにすることにした。そのため、精製した H3.5 ヌクレオソームをハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化させた。その結果、長径がおよそ 400 μm の柱状結晶を得ることに成功した (Figure 7)。

A



B



C

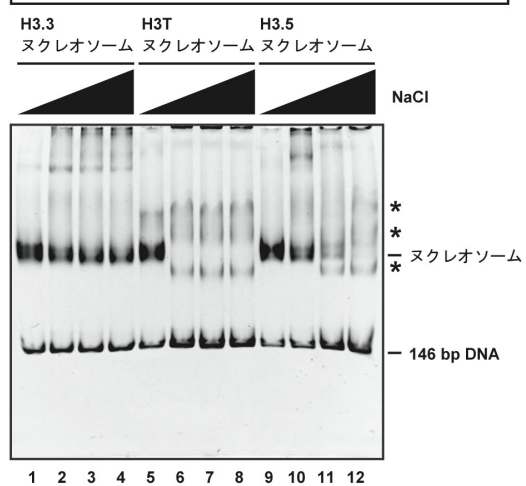


Figure 6. H3.1、H3.3、H3T、または H3.5 を含むヌクレオソームの耐塩性試験

(A) ヌクレオソームの耐塩性試験の模式図。ヌクレオソームの耐塩性試験では、ヌクレオソーム構造の崩壊により遊離の DNA が生じることや、DNA と H2A-H2B の複合体が生じることが示されている (Tachiwana *et al.*, 2010)。先行研究では示されていないが、ヌクレオソームから H2A-H2B 二量体が一つ外れたヘキサソーム構造や、ヌクレオソームから H2A-H2B 二量体が二つ外れたテトラソーム構造が生じる可能性も考えられる。

(B) H3.1 ヌクレオソームおよび H3.3 ヌクレオソームを、0.4、0.6、0.7、または 0.8 M NaCl 存在下で、50°C で 1 時間静置した後、NaCl 濃度を 0.4 M に調製して 6% native-PAGE により解析した。ゲルは EtBr で染色した。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 1e より引用)

(C) H3.3 ヌクレオソーム、H3T ヌクレオソーム、および H3.5 ヌクレオソームを用いて、パネル B と同様に実験を行った。ヌクレオソームの崩壊により生じたヒストンと DNA の複合体をアスタリスクで示す (Tachiwana *et al.*, 2010)。先行研究から、アスタリスクで示したヒストンと DNA の複合体は、パネル A で示した DNA と H2A-H2B の複合体であることが推定される (Tachiwana *et al.*, 2010)。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 1f より引用)

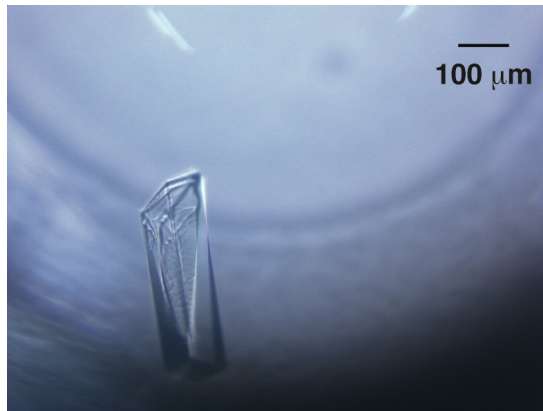


Figure 7. H3.5ヌクレオソームの柱状結晶

結晶化プレート内の H3.5ヌクレオソームの柱状結晶の写真を、明視野顕微鏡を用いて撮影した。

3-6 H3.5ヌクレオソームの構造決定

大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL41XU において、H3.5ヌクレオソームの柱状結晶に X 線を照射し、X 線回折データを取得した。X 線回折データを、分解能 2.8 Å までの反射を用いて処理し、分子置換法により位相決定を行った。その後、H3.5ヌクレオソームの構造のモデル構築と精密化を繰り返した。最終的に、H3.5ヌクレオソームの構造を分解能 2.8 Å で決定することができた (Figure 8B, Table 2)。

3-7 H3.5ヌクレオソームの構造解析

H3.5ヌクレオソームの構造と、先行研究で決定された H3.3ヌクレオソームの構造 (PDB : 3AV2)を比較した (Tachiwana *et al.*, 2011)。H3.5ヌクレオソームの構造は、H3.3ヌクレオソームの構造と全体的に類似していた (Figure 8)。

H3.5の N 末端テールは、H3.3の N 末端テールと同様に天然変性領域であることから、N 末端テールの構造は比較できなかった。H3.5と H3.3は N 末端テールにおいてアミノ酸配列が 3ヶ所異なり、これらの部位も含め、N 末端テールの電子密度は見えなかった。

次に、H3.5と H3.3のヒストンフォールドドメインにおける構造の違いを調べた。ヒストンフォールドドメインでは、H3.5と H3.3は 3カ所でアミノ酸が異なっており、H3.5の 78番目のアスパラギン、88番目のバリン、103番目のロイシンは H3.3に保存されていない (Figure 3)。H3.5と H3.3の構造の主鎖を、全体の r.m.s.d. (root mean square deviation)が最小になるよう重ね合わせ、対応するアミノ酸残基の C α の座標を用いて r.m.s.d.を計算した (Figure 9A)。r.m.s.d.の値から、2つの構造の C α の座標のずれが定量的にわかる。

r.m.s.d.の計算結果から、H3.5の 78番目のアスパラギン周辺の構造が H3.3と大きく異なっていることがわかった (Figure 9A)。H3.5の 78番目のアスパラギンは H3.3の 79番目のリ

Table 2. H3.5ヌクレオソームのX線回折データ収集および構造精密化における統計値

	H3.5 nucleosome
Data collection	
Space group	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å)	a = 104.89, b = 109.13, c = 174.49
Resolution (Å)	50.0–2.80 (2.90–2.80)
No. of reflections	447587
No. of unique reflections	50581
Completeness (%)	99.5 (96.5)
R _{sym} (%)	9.4 (50.0)
I/σ(I)	10.2 (2.7)
Multiplicity	8.8 (6.4)
Refinement	
Resolution (Å)	37.81–2.80
R _{work} /R _{free} (%)	22.8/26.9
B factors (Å ²)	
Protein	66.4
DNA	132.5
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.005
Bond angles (°)	0.815
PDB code	4Z5T

最外殻の分解能における値を括弧内に示した。

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

$$R_{\text{work}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} |F_o| - |F_c|}{\sum_{\text{hkl}} |F_o|}$$

構造精密化に用いなかった 5%のデータを用いて R_{free} を計算した。

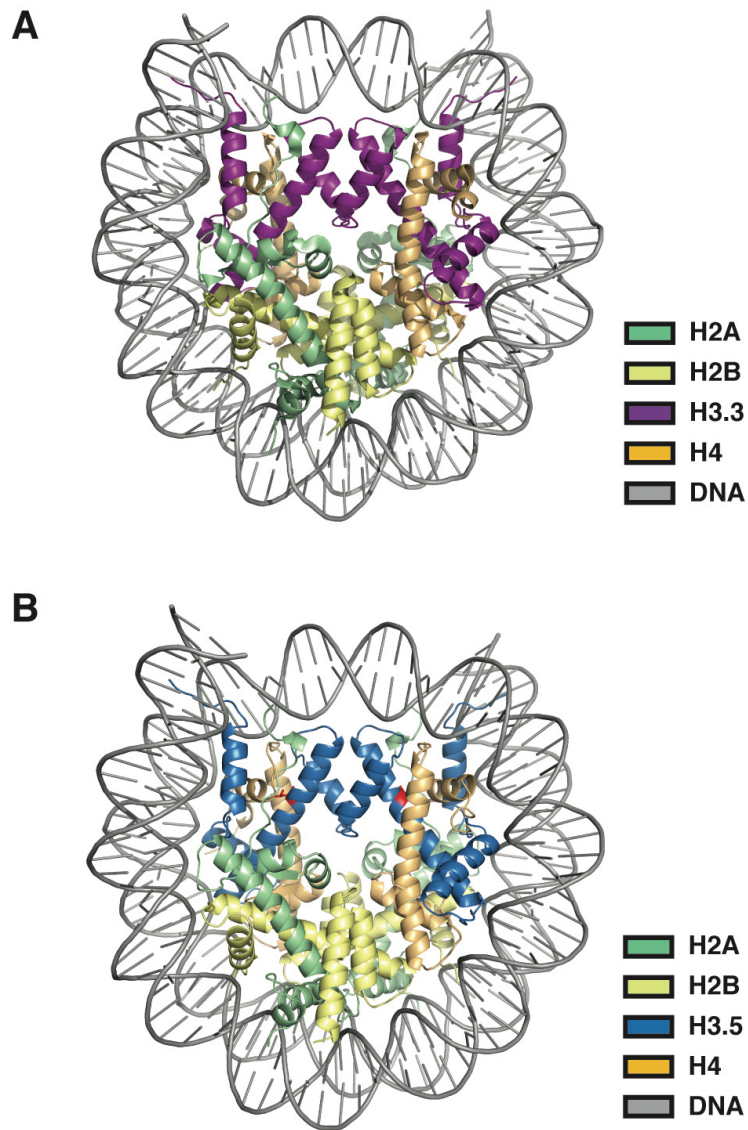


Figure 8. H3.3ヌクレオソームおよびH3.5ヌクレオソームの全体構造

(A) H3.3ヌクレオソーム (PDB : 3AV2)の全体構造 (Tachiwana *et al.*, 2011)。H2A、H2B、H3.3、H4、DNA をそれぞれ緑色、黄色、紫色、橙色、灰色で示した。

(B) H3.5ヌクレオソームの全体構造。H2A、H2B、H3.5、H4、DNA をそれぞれ緑色、黄色、青色、橙色、灰色で示した。H3.5の103番目のロイシンを赤色で示し、側鎖を表示した。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 2a より引用)

ジンに対応し、この部位は L1 ループ上にある。H3.5 の 78 番目のアスパラギン周辺の構造はループであることから、構造が変化しやすいと考えられる。L1 ループ内では、H3.5 の 78 番目のアスパラギンの側鎖は 80 番目のアスパラギン酸の主鎖と水素結合を形成しているのに対し、H3.3 の 79 番目のリジンの側鎖は H3.3 の分子内と水素結合を形成していなかった (Figure 10A)。このような L1 ループ内の相互作用の違いにより、L1 ループの構造が変化しただと考えられる。H3 の L1 ループは、Sir3 等のクロマチン結合因子が認識する部位であることが報告されている (Armache *et al.*, 2011)。H3.5 は L1 ループによって、クロマチン結合因子との結合を制御するのかもしれない。なお、H3.5 の 78 番目のアスパラギンと、対応する H3.3 の 79 番目のリジンは、いずれも H2A-H2B 二量体や DNA と相互作用していなかったため、このアミノ酸置換がヌクレオソームの塩耐性の違いの原因であるとは考えにくい。

また、H3.5 の 88 番目のバリンは H3.3 の 89 番目のイソロイシンや H3.1 の 89 番目のバリンに対応するが、この部位近辺の構造はほとんど変わらなかった (Figures 9A, 10B) (Tachiwana *et al.*, 2011)。

一方、H3.5 の 103 番目のロイシン周辺は α ヘリックス上にあり、主鎖の構造が H3.3 とわずかに異なっていた (Figure 9A)。H3.5 の 103 番目のロイシンは H3.3 の 104 番目のフェニルアラニンに対応し、これらは H3 と H4 の相互作用面に位置しており、この部位のアミノ酸置換によって H3.5 は H3.3 と比較して H4 との疎水性相互作用が弱くなっていることが考えられた (Figures 10C, 10D)。H3.3 の 104 番目のフェニルアラニンは、H4 の $\alpha 1$ ヘリックスと $\alpha 2$ ヘリックスにより形成される疎水性ポケットに収まっており、H4 の 34 番目のイソロイシン、50 番目のイソロイシン、54 番目のスレオニンの側鎖と疎水性相互作用していた (Figure 10C)。これに対し、H3.5 の 103 番目のロイシンは、H3.3 の 104 番目のフェニルアラニンより側鎖が小さいため、H4 の 34 番目のイソロイシン、50 番目のイソロイシン、54 番

目のスレオニンの側鎖との距離が長くなっており、疎水性相互作用が弱くなっていると考えられた (Figure 10D)。これらのことから、H3.5 の 103 番目のロイシンによるヌクレオソーム内部の疎水性相互作用の強さの低下により、ヌクレオソームが不安定になる可能性が示唆された。

次に、H3.5 ヌクレオソームと H3.3 ヌクレオソームの H2A、H2B、H4 の構造を比較した。その結果、H2A、H2B、H4 の構造は、H3.5 ヌクレオソームと H3.3 ヌクレオソームの間でほとんど同じであった。従って、H3.5 と H3.3 の構造の違いは、H2A、H2B、H4 の主鎖の構造にほとんど影響しないことが示唆された。しかし、H2B の L1 ループや、 $\alpha 3$ ヘリックスと αC ヘリックスの間のループ周辺では、他の領域と比べると構造の違いが見られた (Figures 9B, 9C, 9D)。H2B で構造の違いが見いだされた領域はヌクレオソームの表面に位置しており、運動性が高いため構造の違いが生じやすいのではないかと考えられた。

以上の結果から、H3.5 ヌクレオソームが H3.3 ヌクレオソームより塩耐性が低い原因は、H3.5 の 103 番目のロイシンによる H3 と H4 の間の疎水性相互作用の低下である可能性が示唆された。

3-8 H3.3 と H3.5 の変異体解析

H3.5 ヌクレオソームの構造解析の結果から、H3.5 ヌクレオソームが H3.3 ヌクレオソームと比較して塩耐性が低い原因は、H3.5 の 103 番目のロイシンである可能性が示唆された。そこで、H3.3 と H3.5 の変異体解析により、H3.5 ヌクレオソームの塩耐性に寄与するアミノ酸残基を調べた。H3.5 は、H3.3 の 36 番目のリジンまたは 37 番目のリジンを欠失しており、さらに 5 カ所のアミノ酸が異なる (Figure 3)。ヌクレオソーム構造の構築に重要なヒストンフォールドドメインにおいて H3.5 と H3.3 の配列を比較すると、3 カ所でアミノ酸が異なっ

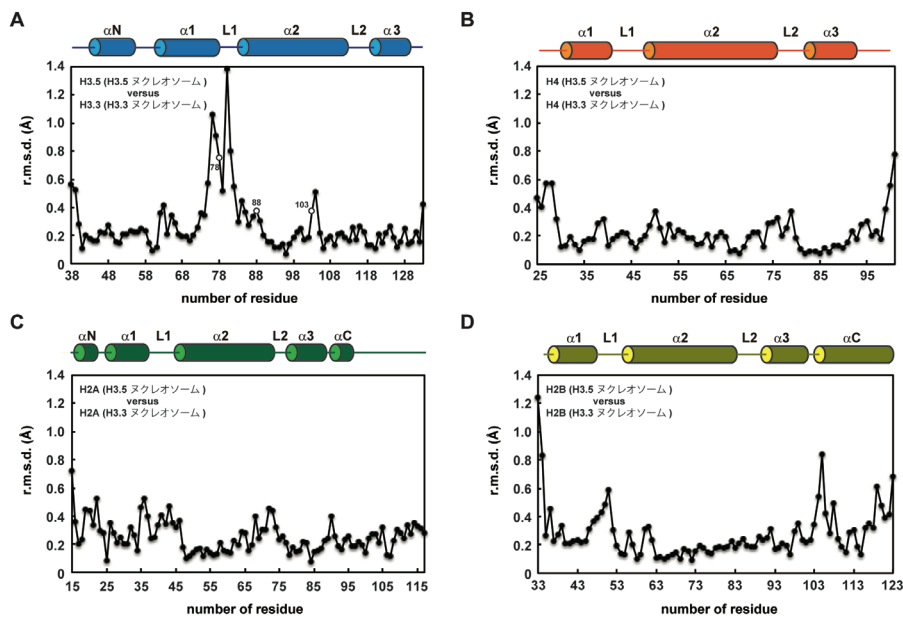


Figure 9. H3.5 ナクレオソームと H3.3 ナクレオソームの構造比較

(A) H3.5 と H3.3 の構造を重ね合わせ、対応するアミノ酸残基について r.m.s.d. を計算してプロットした。アミノ酸置換部位の r.m.s.d. を白丸で示し、H3.5 における残基番号を示した。ナクレオソーム内の H3.5 の二次構造をグラフの上に示す。

(B) H3.5 ナクレオソームと H3.3 ナクレオソームの H4 の構造を重ね合わせ、対応するアミノ酸残基について r.m.s.d. を計算してプロットした。ナクレオソーム内の H4 の二次構造をグラフの上に示す。

(C) H3.5 ナクレオソームと H3.3 ナクレオソームの H2A の構造を重ね合わせ、対応するアミノ酸残基について r.m.s.d. を計算してプロットした。ナクレオソーム内の H2A の二次構造をグラフの上に示す。

(D) H3.5 ナクレオソームと H3.3 ナクレオソームの H2B の構造を重ね合わせ、対応するアミノ酸残基について r.m.s.d. を計算してプロットした。ナクレオソーム内の H2B の二次構造をグラフの上に示す。

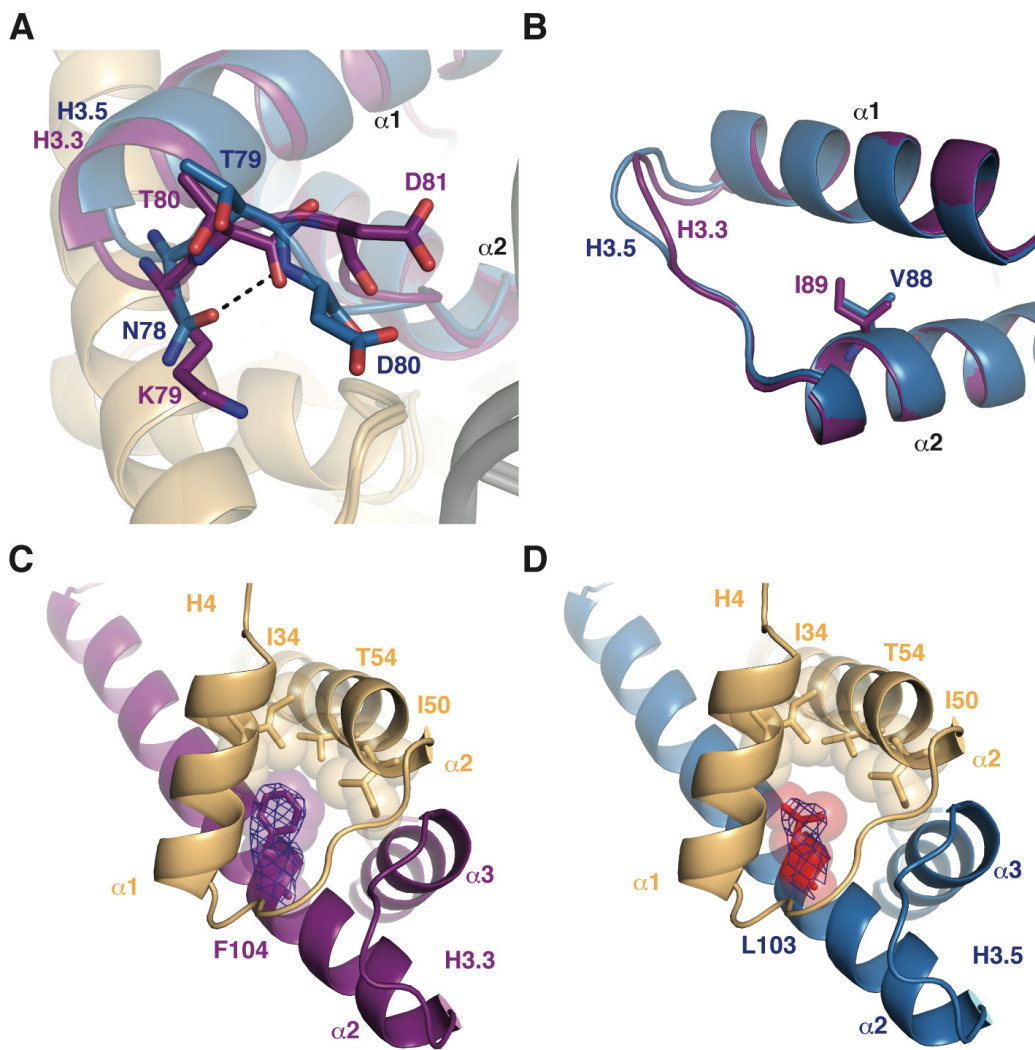


Figure 10. H3.5 特異的なアミノ酸残基周辺の構造の拡大図

(A) H3.5ヌクレオソーム内のH3.5の78番目のアスパラギン周囲の構造の拡大図。H3.3ヌクレオソーム(PDB:3AV2)の構造を重ね合わせて表示した(Tachiwana *et al.*, 2011)。H3.5は青色で示し、H3.3は紫色で示した。水素結合を黒色の点線で表示した。

(B) H3.5ヌクレオソーム内のH3.5の88番目のバリン周囲の構造の拡大図。H3.3ヌクレオソーム(PDB:3AV2)の構造を重ね合わせて表示した(Tachiwana *et al.*, 2011)。H3.5は青色で示し、H3.3は紫色で示した。

(C) H3.3ヌクレオソーム(PDB:3AV2)内のH3.3の104番目のフェニルアラニン周囲の構造の拡大図(Tachiwana *et al.*, 2011)。H3.3は紫色で示し、H4は橙色で示した。H3.3の104番目のフェニルアラニン周辺の $2mF_o-DFc$ 電子密度マップ(1.5σ)を青色のメッシュで示した。H4の34番目のイソロイシン、50番目のイソロイシン、および54番目のスレオニンと、H3.3の104番目のフェニルアラニンの側鎖のファンデルワールス表面を示した。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 2c より引用)

(D) H3.5ヌクレオソーム内のH3.5の103番目のロイシン(赤色)周囲の構造の拡大図。H3.5は青色で示し、H4は橙色で示した。H3.5の103番目のロイシン周辺の $2mF_o-DFc$ 電子密度マップ(1.5σ)を青色のメッシュで示した。H4の34番目のイソロイシン、50番目のイソロイシン、および54番目のスレオニンと、H3.5の103番目のロイシンの側鎖のファンデルワールス表面を示した。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 2b より引用)

ており、H3.5 の 78 番目のアスパラギン、88 番目のバリン、103 番目のロイシンは、それぞれ H3.3 では 79 番目のリジン、89 番目のイソロイシン、104 番目のフェニルアラニンとなっている (Figure 3)。H3 は N 末端テールとヒストンフォールドドメインで構成されており、N 末端テールはフレキシブルな領域であることからヌクレオソーム構造の安定性への寄与は少ないと考えられる。これらのことから、H3.5 のヒストンフォールドドメインに存在する 78 番目のアスパラギン、88 番目のバリン、103 番目のロイシンによって、H3.5 ヌクレオソームの塩耐性が低下していると考えた。H3.5 の 88 番目のバリンは、H3.3 ではイソロイシンに置換されているが、H3.1、H3.2、および H3T では H3.5 と同様にバリンである (Figure 3)。この部位において H3.1 と H3.3 ではアミノ酸が異なるが、H3.1 ヌクレオソームと H3.3 ヌクレオソームはともに 0.8 M NaCl 存在下で安定に保たれていた (Figure 6B)。従って、H3.5 の 88 番目のアミノ酸残基におけるバリンとイソロイシンの違いは、ヌクレオソームの塩耐性の違いを引き起こす要因ではないと考えられる。

そこで、H3.5 の 78 番目のアスパラギン、103 番目のロイシンによってヌクレオソームの塩耐性が低下するのかを、これらのアミノ酸の変異体を用いて解析した。H3.5 の 78 番目のアスパラギンは H3.3 の 79 番目のリジンに対応し、H3.5 の 103 番目のロイシンは H3.3 の 104 番目のフェニルアラニンに対応することから、H3.5 N78K、H3.5 L103F、H3.3 K79N、および H3.3 F104L 変異体を調製した。H3.3 ヌクレオソームおよび H3.5 ヌクレオソームと同様に、塩透析法により H3.3 K79N ヌクレオソーム、H3.3 F104L ヌクレオソーム、H3.5 N78K ヌクレオソーム、および H3.5 L103F ヌクレオソームをそれぞれ再構成して精製した。精製したヌクレオソームを native-PAGE で解析した結果、それぞれのヌクレオソームは同程度の移動度を示した (Figure 11A)。また、精製したヌクレオソームを SDS-PAGE で解析し、それぞれのヌクレオソームについて H2A、H2B、H3、H4 のシグナル強度が同程度であること

を確認した (Figure 11B)。

精製したヌクレオソームを用いて、Figure 6 と同じ条件でヌクレオソームの耐塩性試験を行った (Figures 11C, 11D)。H3.5 ヌクレオソームと H3.5 N78K ヌクレオソームは塩に対する不安定性を同様に示したが、これらと比較して H3.5 L103F ヌクレオソームはより高塩濃度でも安定に保たれた (Figure 11C)。また、H3.3 ヌクレオソームと H3.3 K79N ヌクレオソームは同様に高塩濃度で安定に保たれたが、これらと比較して H3.3 F104L ヌクレオソームは不安定だった (Figure 11D)。しかし、H3.3 F104L ヌクレオソームは H3.5 ヌクレオソームと比較すると塩に対して安定だった (Figures 11C, 11D)。これらの結果から、H3.5 ヌクレオソームが H3.3 ヌクレオソームより塩耐性が低い原因の一つは H3.5 の 103 番目のロイシンであり、さらに他のアミノ酸置換も安定性の違いに寄与することが明らかになった。

H3.5 と H3.3 は N 末端テールのアミノ酸配列が 3 カ所異なる。これらのうち、H3.3 の 36 番目または 37 番目のリジンが H3.5 では欠失しているという点が興味深い。H3.3 の 36 番目および 37 番目のリジンは運動性の高い N 末端テールの中にあり結晶構造中では見えないが、隣の 38 番目のプロリンはヌクレオソームの DNA に近接しているため、36 番目のリジンや 37 番目のリジンはヌクレオソームの DNA と結合する可能性が考えられる。H3.3 の 36 番目または 37 番目のリジンを H3.5 は欠失していることから、H3.5 は DNA との結合が弱くなっているのかもしれない。このような N 末端テールの配列の違いによって H3.5 ヌクレオソームが塩耐性の低下になっているのかについては、今後の解析が待たれる。

3-9 テトラソームの耐熱性試験

H3.5 ヌクレオソームが塩に対して不安定である原因の一つは H3.5 の 103 番目のロイシンであることがわかったため、H2A-H2B 非存在下で H3.5-H4 複合体の DNA との結合につい

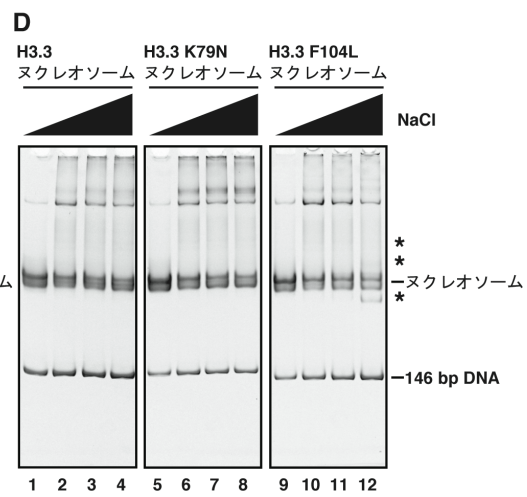
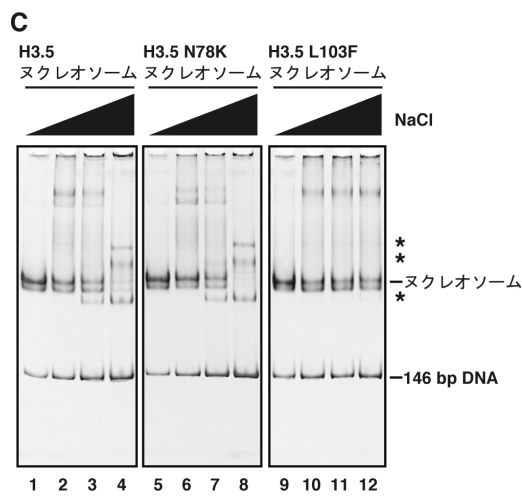
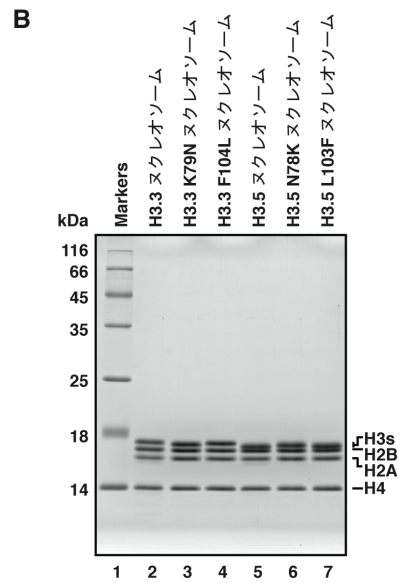
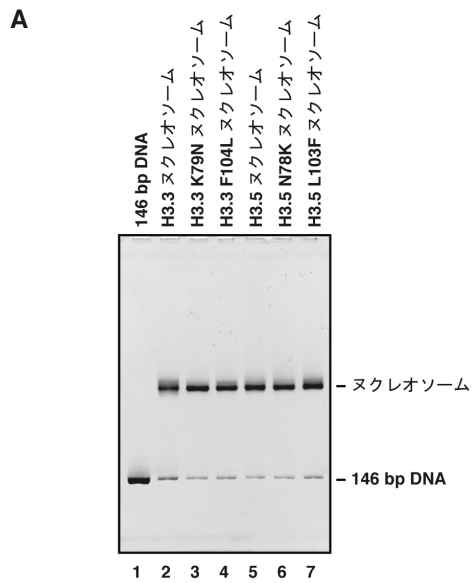


Figure 11. H3.3 と H3.5 の変異体解析

(A) H3.3、H3.3 K79N、H3.3 F104L、H3.5、H3.5 N78K、または H3.5 L103F を含むヌクレオソームを再構成して精製した後、6% native-PAGE により解析した。ゲルは EtBr で染色した。レーン 1 ではヌクレオソームの再構成に用いた 146 塩基対の DNA を泳動した。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 3a より引用)

(B) H3.3、H3.3 K79N、H3.3 F104L、H3.5、H3.5 N78K、または H3.5 L103F を含むヌクレオソームを再構成して精製した後、18% SDS-PAGE により解析した。ゲルは CBB で染色した。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 3b より引用)

(C) H3.5 ヌクレオソーム、H3.5 N78K ヌクレオソーム、および H3.5 L103F ヌクレオソームを、0.4、0.6、0.7、または 0.8 M NaCl 存在下で、50°C で 1 時間静置した後、NaCl 濃度を 0.4 M に調製して 6% native-PAGE により解析した。ゲルは EtBr で染色した。ヌクレオソームの崩壊により生じたヒストンと DNA の複合体をアスタリスクで示す (Tachiwana *et al.*, 2010)。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 3c より引用)

(D) H3.3 ヌクレオソーム、H3.3 K79N ヌクレオソーム、および H3.3 F104L ヌクレオソームを用いてパネル C と同様に実験を行った。ヌクレオソームの崩壊により生じたヒストンと DNA の複合体をアスタリスクで示す (Tachiwana *et al.*, 2010)。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 3d より引用)

て解析した。そのために、DNA と H3-H4 四量体の複合体であるテトラソームを再構成し、耐熱性試験を行なった。耐熱性試験では、タンパク質の熱変性により露出される疎水性領域に蛍光色素である SYPRO Orange が結合することによって発せられる蛍光を検出することで、テトラソームの安定性を評価した。SYPRO Orange は核酸の存在下では蛍光を発しないことが示されている (Steinberg *et al.*, 1996)。テトラソームの耐熱性試験では、熱による DNA とヒストンとの解離が蛍光シグナルとして検出されることが示されている (Taguchi *et al.*, 2014)。耐熱性試験は、塩の添加による疎水性相互作用の変動を考慮しないで、DNA とヒストンとの結合強度を評価することができる。

精製した H3.3-H4 複合体、H3.3 F104L-H4 複合体、H3.5-H4 複合体、H3.5 L103F-H4 複合体と 146 塩基対の DNA を用いて、塩透析法により H3.3 テトラソーム、H3.3 F104L テトラソーム、H3.5 テトラソーム、および H3.5 L103F テトラソームをそれぞれ再構成して精製した。精製したテトラソームを native-PAGE で解析した結果、それぞれのテトラソームは同程度の移動度を示した (Figure 12A)。また、精製したテトラソームを SDS-PAGE で解析し、それぞれのテトラソームについて H3 と H4 のシグナル強度が同程度であることを確認した (Figure 12B)。

精製したテトラソームを用いて、テトラソームの耐熱性試験を行った (Taguchi *et al.*, 2014)。テトラソームと SYPRO Orange を混合した後に温度を 1 分間に 1°C ずつ上昇させ、蛍光を検出した (Figure 12C)。その結果、H3.5 テトラソームは H3.3 テトラソームより低い温度で崩壊したことがわかり、H3.5 テトラソームは H3.3 テトラソームより熱に対して不安定であることが示された (Figure 12D)。さらに、H3.5 L103F テトラソームの熱に対する安定性は、H3.5 テトラソームのそれより高いが、H3.3 テトラソームのそれより低いことが示された (Figure 12D)。また、H3.3 F104L テトラソームの熱に対する安定性は、H3.3 テトラソ

ームのそれより低い、H3.5 テトラソームのそれより高いことが示された (Figure 12D)。これらの結果から、H3.5 テトラソームは H3.3 テトラソームより熱に対して不安定であり、その原因の一つは H3.5 の 103 番目のロイシンであり、さらに他のアミノ酸置換も安定性の違いに寄与することが明らかになった。この結論は、ヌクレオソームの耐塩性試験から得られた結論と同様である。従って、H3.5 の 103 番目のロイシンにより、DNA と H3-H4 の間の相互作用が弱くなるのが、H3.5 ヌクレオソームの構造の安定性の低下の原因の一つであると考えられる。

テトラソームの耐熱性試験の結果から、H3.5 の 103 番目のロイシン以外の残基もテトラソームの熱安定性に寄与していることが考えられたが、どの部位のアミノ酸置換が安定性の低下に寄与しているのかは特定できていない。テトラソームの立体構造は未だに解明されていないため H3-H4 複合体と DNA がどのように結合しているのかは不明だが、H3.5 と H3.3 の間のアミノ酸置換で DNA との相互作用が変わり、テトラソームの熱に対する安定性に違いが生じている可能性が考えられる。H3.5 の 103 番目のロイシン以外のどの部位のアミノ酸残基が、どのようにしてテトラソームの熱に対する安定性の低下を引き起こすのかについては今後の解析が待たれる。

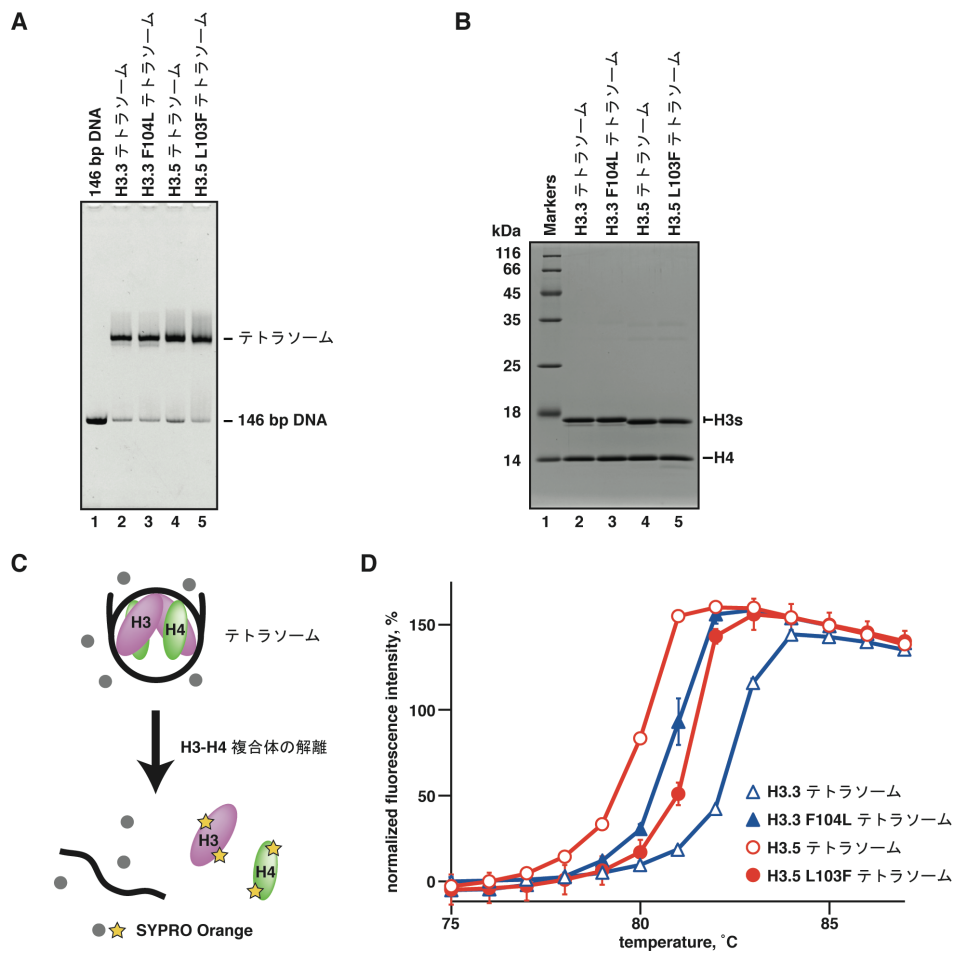


Figure 12. テトラソームの耐熱性試験

(A) H3.3、H3.3 F104L、H3.5、または H3.5 L103F を含むテトラソームを再構成して精製した後、6% native-PAGE により解析した。ゲルは EtBr で染色した。レーン 1 ではテトラソームの再構成に用いた 146 塩基対の DNA を泳動した。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 4a より引用)

(B) H3.3、H3.3 F104L、H3.5、または H3.5 L103F を含むテトラソームを再構成して精製した後、18% SDS-PAGE により解析した。ゲルは CBB で染色した。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 4b より引用)

(C) テトラソームの耐熱性試験の模式図。テトラソームと SYPRO Orange を混合した後、温度を 26°C から 95°C へ 1 分間に 1°C ずつ上昇させ、H3-H4 複合体を解離させる。解離したヒストンの疎水性領域に SYPRO Orange が結合することにより蛍光が発せられる。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 4c より引用)

(D) H3.3、H3.3 F104L、H3.5、または H3.5 L103F を含むテトラソームの耐熱性試験の結果。実験を独立に三回行い、実験結果の平均値を標準偏差とともにプロットした。((Urahama *et al.*, 2016) Fig. 4d より引用)

第4章 TSH2Bを含むヌクレオソームの構造解析

4-1 序

ヒトの TSH2B は H2B と比べると、1 アミノ酸が挿入されており、さらにアミノ酸置換が 18 カ所でみられる (Figure 13)。先行研究で、ヒトの TSH2B を含むヌクレオソームの生化学的解析が行われているが、ヒトの TSH2B を含むヌクレオソームと H2B を含むヌクレオソームの性質の違いは見いだされなかった (Li *et al.*, 2005)。そこで、TSH2B ヌクレオソームの特徴をより詳細に解析するために、ヒトの TSH2B ヌクレオソームを再構成し、その立体構造を X 線結晶構造解析によって高分解能で決定し、H2B ヌクレオソームと構造比較した。本章では、その結果を詳述する。

4-2 ヒストン TSH2B の精製

リコンビナントタンパク質として大腸菌に発現させて精製した H2A、H2B、TSH2B を SDS-PAGE で解析した結果、TSH2B は H2B より移動度が大きく、H2A より移動度が小さいことが示された (Figure 14)。

4-3 TSH2B ヌクレオソームの再構成および精製

TSH2B を含むヒストン八量体と 146 塩基対の DNA を用いて、塩透析法により TSH2B を含むヌクレオソームを再構成して精製した。比較のために、TSH2B の代わりに H2B を含むヌクレオソームも再構成して精製した。精製したヌクレオソームを native-PAGE で解析した結果、TSH2B ヌクレオソームは H2B ヌクレオソームと同程度の移動度を示した (Figure 15A)。また、精製したヌクレオソームを SDS-PAGE で解析した結果、TSH2B ヌクレオソームには微量の分解物が含まれていたが、H2A、TSH2B、H3.1、H4 が含まれていることが確

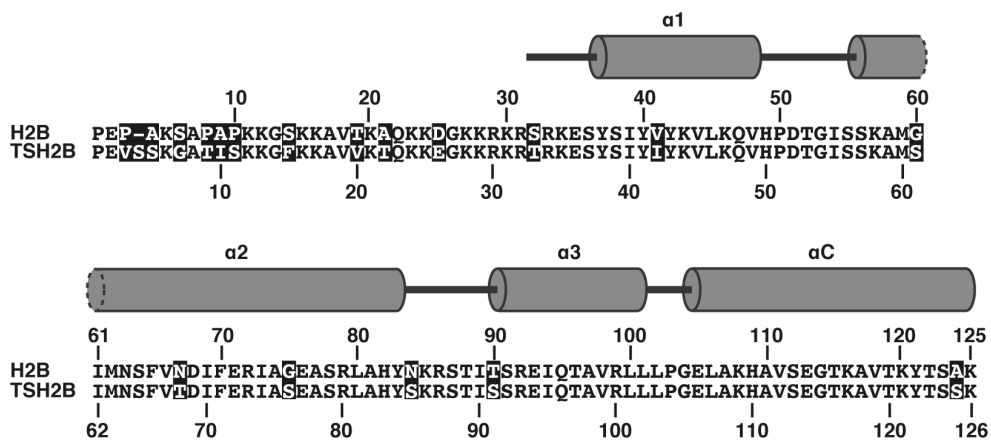


Figure 13. ヒトのヒストン H2B、TSH2B のアミノ酸配列

H2B、TSH2B のアミノ酸配列とともにヌクレオソーム中の H2B の二次構造を示す。TSH2B と H2B の間で保存されていないアミノ酸を黒色の四角で囲み、白色の文字で示す。((Urahama *et al.*, 2014) Fig. 1a より引用)

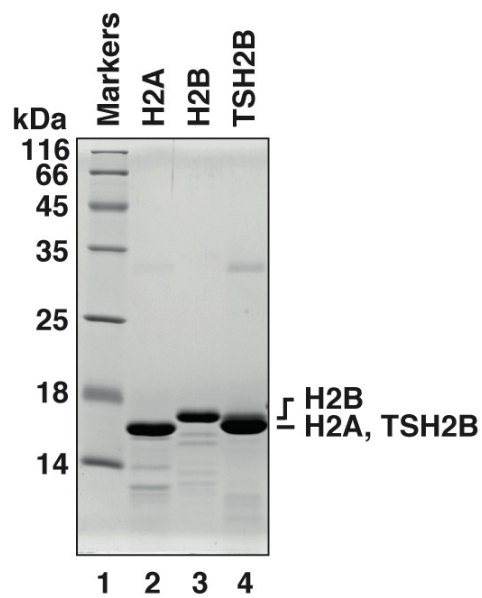


Figure 14. ヒトのヒストン TSH2B の精製

精製したヒトの H2A、H2B、TSH2B を 18% SDS-PAGE により解析した。ゲルは CBB で染色した。

((Urahama *et al.*, 2014) Fig. 1d より引用)

認できた (Figure 15B)。

4-4 TSH2B ヌクレオソームの結晶化

X線結晶構造解析により TSH2B ヌクレオソームの立体構造を原子分解能で明らかにするため、精製した TSH2B ヌクレオソームを用いてハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化した。その結果、長径がおよそ 900 μm の柱状結晶を得ることに成功した (Figure 16)。

4-5 TSH2B ヌクレオソームの構造決定

TSH2B ヌクレオソームの柱状結晶を用いて、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL41XU において X 線回折実験を行った。その結果、分解能 2.8 \AA の X 線回折データを取得した。X 線回折データを処理した後、位相を分子置換法により決定した。その後、モデル構築と精密化を繰り返し、TSH2B ヌクレオソームの構造を分解能 2.8 \AA で決定した (Figure 17B, Table 3)。

4-6 TSH2B ヌクレオソームの構造解析

TSH2B ヌクレオソームの構造と、先行研究で決定された H2B ヌクレオソームの構造 (PDB: 3AFA) を比較した (Tachiwana *et al.*, 2010)。TSH2B ヌクレオソームと H2B ヌクレオソームは、全体的に構造が類似していた (Figure 17)。

H2B の $\alpha 2$ ヘリックス上にある 2 カ所のグリシンが、TSH2B ではセリンに置換されていることから、TSH2B は H2B と比べると $\alpha 2$ ヘリックスの安定性が高くなっているという仮説が考えられた。そこで、TSH2B と H2B の各アミノ酸残基について、構造の揺らぎの大きさを表す温度因子 (B-factor) を調べた (Figure 18)。その結果、全体的に TSH2B は H2B より

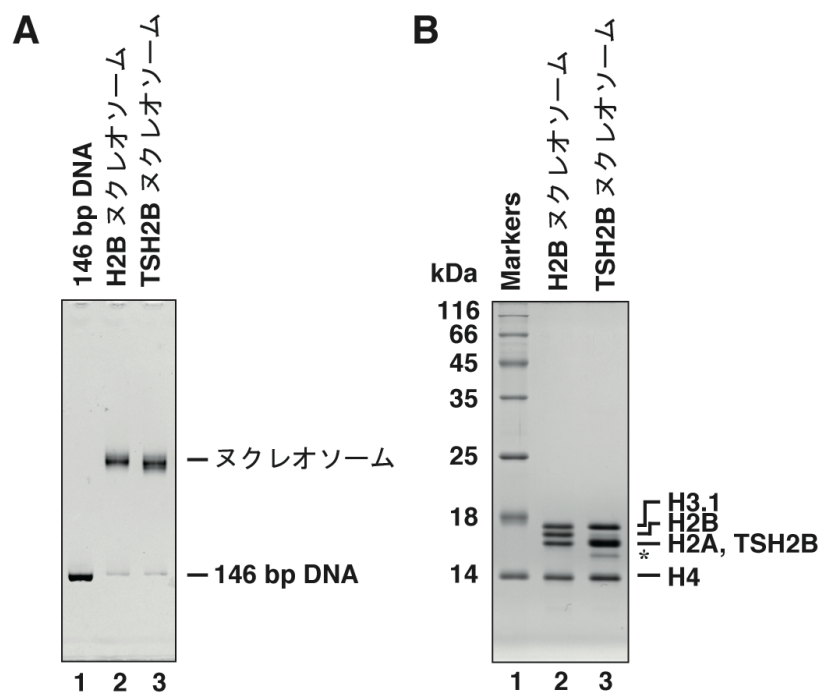


Figure 15. TSH2B ヌクレオソームの精製

(A) H2B または TSH2B を含むヌクレオソームを再構成して精製した後、6% native-PAGE により解析した。ゲルは EtBr で染色した。レーン 1 ではヌクレオソームの再構成に用いた 146 塩基対の DNA を泳動した。((Urahama *et al.*, 2014) Fig. 1f より引用)

(B) H2B または TSH2B を含むヌクレオソームを再構成して精製した後、18% SDS-PAGE により解析した。ゲルは CBB で染色した。分解物をアスタリスクで示す。((Urahama *et al.*, 2014) Fig. 1g より引用)

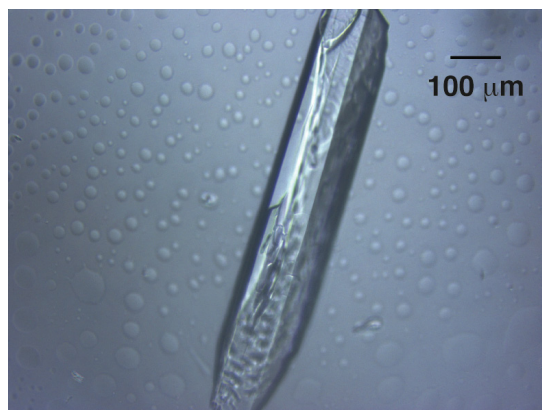


Figure 16. TSH2B ヌクレオソームの柱状結晶

結晶化プレート内の TSH2B ヌクレオソームの柱状結晶の写真を、明視野顕微鏡を用いて撮影した。

Table 3. TSH2BヌクレオソームのX線回折データ収集および構造精密化における統計値

	TSH2B nucleosome
Data collection	
Space group	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å)	a = 107.04, b = 109.93, c = 182.96
Resolution (Å)	50.0–2.80 (2.90–2.80)
No. of reflections	1075793
No. of unique reflections	54290
Completeness (%)	98.9 (90.9)
R_{sym} (%)	7.9 (50.4)
$I/\sigma(I)$	7.0 (4.3)
Multiplicity	7.3 (6.6)
Refinement	
Resolution (Å)	47.24–2.80
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	23.5/28.7
B factors (Å ²)	
Protein	46.9
DNA	111.4
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.007
Bond angles (°)	1.16
PDB code	3WKJ

最外殻の分解能における値を括弧内に示した。

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

$$R_{\text{work}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} ||F_o| - |F_c||}{\sum_{\text{hkl}} |F_o|}$$

構造精密化に用いなかった 5%のデータを用いて R_{free} を計算した。

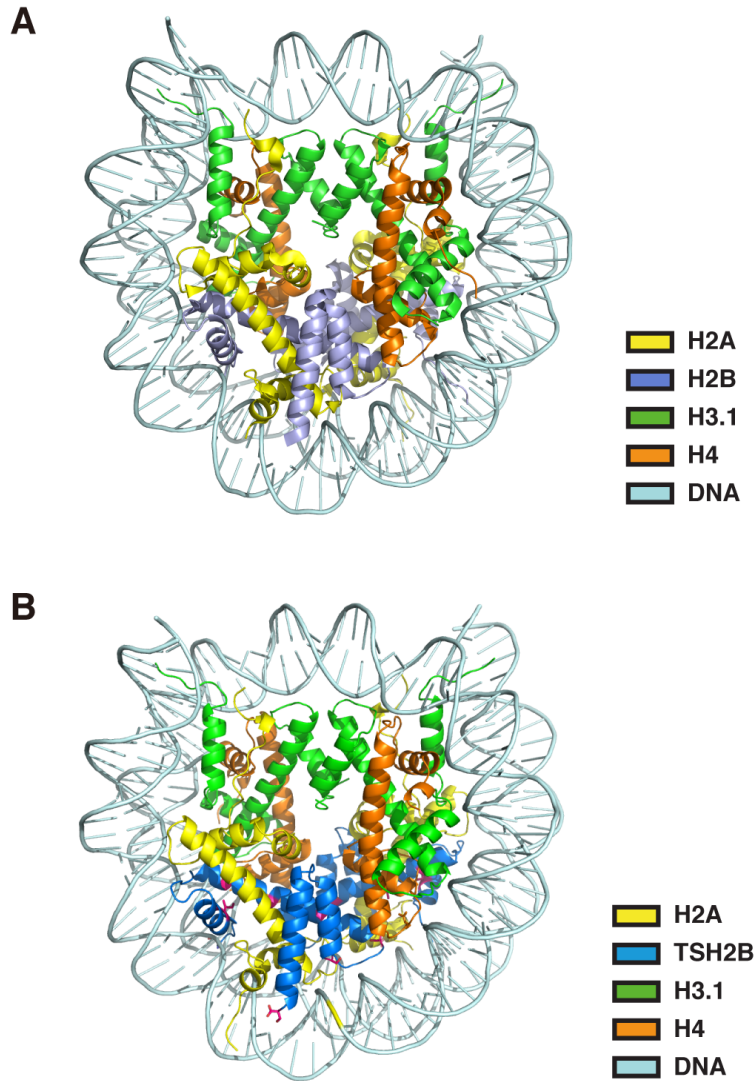


Figure 17. H2B ヌクレオソームおよび TSH2B ヌクレオソームの全体構造

(A) H2B ヌクレオソーム (PDB : 3AFA)の全体構造 (Tachiwana *et al.*, 2010)。H2A、H2B、H3.1、H4、DNA をそれぞれ黄色、薄青色、緑色、橙色、水色で示した。

(B) TSH2B ヌクレオソームの全体構造。H2A、TSH2B、H3.1、H4、DNA をそれぞれ黄色、青色、緑色、橙色、水色で示した。TSH2B 特異的なアミノ酸を紫色で示し、側鎖を表示した。((Urahama *et al.*, 2014) Fig.2 より引用)

も温度因子が高かった。これは、TSH2Bヌクレオソーム(分解能 2.8 Å)の方がH2Bヌクレオソーム(分解能 2.5 Å)より低分解能であることが原因であると考えられる。また、TSH2BとH2Bの温度因子の比を各アミノ酸残基について計算した結果、 $\alpha 2$ ヘリックス上でTSH2BとH2Bの温度因子の比が小さくなる傾向は見られなかった (Figure 18)。したがって、グリシンからセリンへの置換によってTSH2BがH2Bより $\alpha 2$ ヘリックスの安定性が高くなるという仮説は否定された。これまでに、NMRによって溶液中のH2A-H2B二量体の立体構造が決定されている (Moriwaki *et al.*, 2016)。H2A-H2B二量体のコア領域の溶液中構造は、ヌクレオソームの結晶構造中のH2A-H2Bの構造と似ていたが、溶液中構造ではH2Bの αC ヘリックスの運動性が高かったことが報告されている (Moriwaki *et al.*, 2016)。ヌクレオソーム中のH2Bの αC ヘリックスは、H2Aの αN ヘリックスにより安定化されており、溶液中のH2A-H2B二量体ではH2Aの αN ヘリックスが変性していることが原因でH2Bの αC ヘリックスの運動性が高くなっていると考えられている (Moriwaki *et al.*, 2016)。なお、溶液中のH2Bの $\alpha 2$ ヘリックスは、他の領域と比べ最も運動性が低いことが示されている (Moriwaki *et al.*, 2016)。

次に、TSH2BとH2Bの構造を重ね合わせ、対応するアミノ酸残基の $C\alpha$ の座標を用いてr.m.s.d.を計算した結果、TSH2Bの61番目のセリン、85番目のセリン、および105番目のグリシン周辺の主鎖の構造がH2Bと大きく異なっていることがわかった (Figure 19A)。

一方、同様の方法でヌクレオソーム中のH2A、H3.1、H4の構造を比較した結果、そのような大きな構造の違いはなかった (Figures 19B, 19C, 19D)。従って、TSH2BとH2Bの構造の違いは、H2A、H3.1、H4の構造に影響しないことがわかった。

TSH2Bの61番目のセリンは、H2Bの60番目のグリシンに対応し、この部位は α ヘリックス上にあるにも関わらず構造変化している。この構造変化は、グリシンからセリンへの

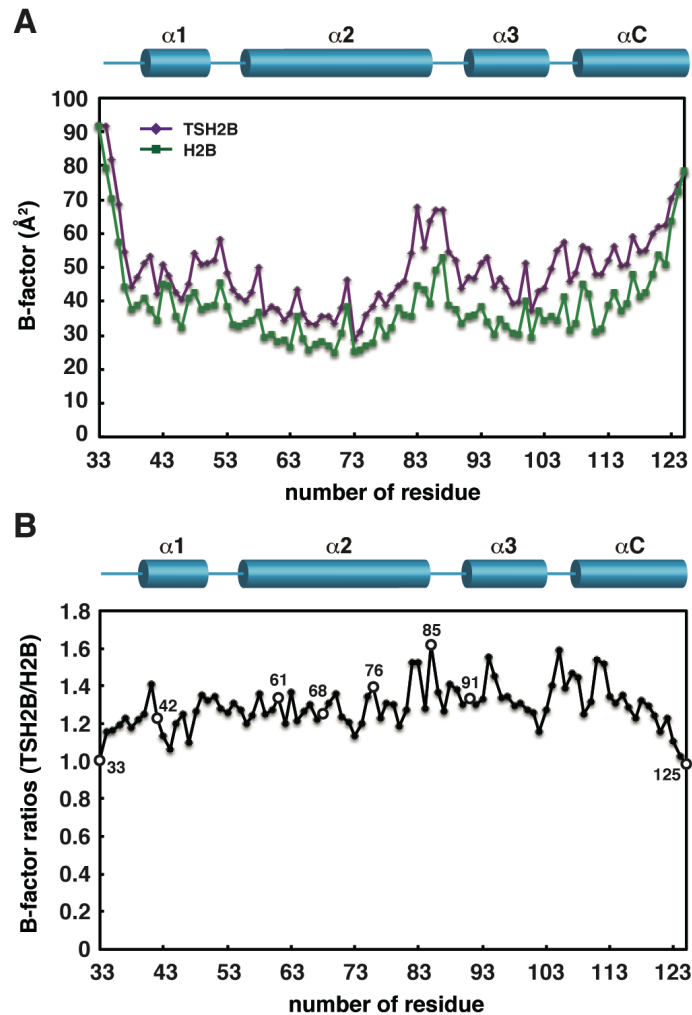


Figure 18. TSH2B と H2B の温度因子

(A) TSH2B と H2B の各アミノ酸残基の温度因子の平均値を計算してプロットした。TSH2B における残基番号を示した。ヌクレオソーム内の TSH2B の二次構造をグラフの上に示す。

(B) TSH2B と H2B の温度因子の比を各アミノ酸残基について計算してプロットした。アミノ酸置換部位の温度因子の比を白丸で示し、TSH2B における残基番号を示した。ヌクレオソーム内の TSH2B の二次構造をグラフの上に示す。

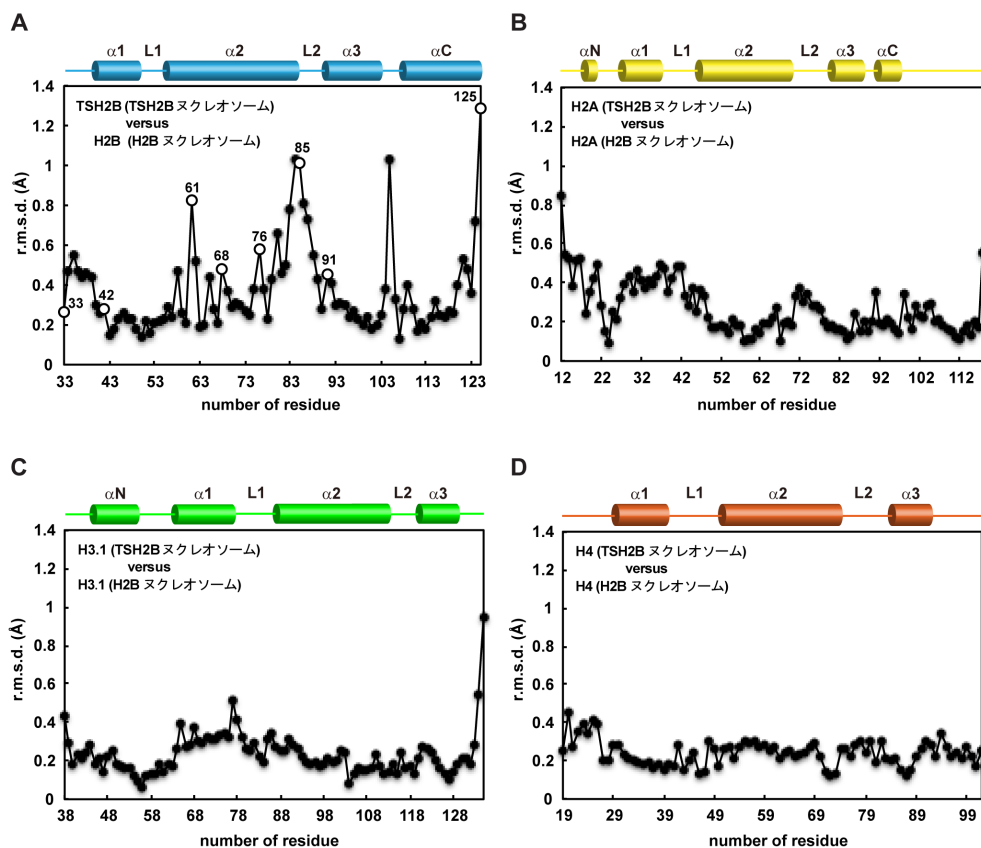


Figure 19. TSH2B ナクレオソームと H2B ナクレオソームの構造比較

(A) TSH2B と H2B の構造を重ね合わせ、対応するアミノ酸残基について r.m.s.d. を計算してプロットした。アミノ酸置換部位の r.m.s.d. を白丸で示し、TSH2B における残基番号を示した。ナクレオソーム内の TSH2B の二次構造をグラフの上に示す。((Urahama *et al.*, 2014) Fig. 3a より引用)

(B) TSH2B ナクレオソームと H2B ナクレオソームの H2A の構造を重ね合わせ、対応するアミノ酸残基について r.m.s.d. を計算してプロットした。ナクレオソーム内の H2A の二次構造をグラフの上に示す。((Urahama *et al.*, 2014) Fig. 3b より引用)

(C) TSH2B ナクレオソームと H2B ナクレオソームの H3.1 の構造を重ね合わせ、対応するアミノ酸残基について r.m.s.d. を計算してプロットした。ナクレオソーム内の H3.1 の二次構造をグラフの上に示す。((Urahama *et al.*, 2014) Fig. 3c より引用)

(D) TSH2B ナクレオソームと H2B ナクレオソームの H4 の構造を重ね合わせ、対応するアミノ酸残基について r.m.s.d. を計算してプロットした。ナクレオソーム内の H4 の二次構造をグラフの上に示す。((Urahama *et al.*, 2014) Fig. 3d より引用)

置換により、セリンの側鎖と周辺のアミノ酸の主鎖が水素結合を形成したことにより引き起こされたと考えられる (Figure 20C)。

TSH2B の 85 番目のセリンは、H2B の 84 番目のアスパラギンに対応し、この部位は L2 ループ上にあるため、構造変化が起きやすい。H2B の 84 番目のアスパラギンの側鎖は、H4 の 78 番目のアルギニンの側鎖と、水分子を介して水素結合していた (Figure 20A)。一方、対応する TSH2B の 85 番目のセリンと H4 の 78 番目のアルギニンの間には、そのような結合はみられなかった (Figure 20B)。このような相互作用の違いや、ループ上にあるという性質により、主鎖の構造変化が引き起こされたと考えられる。

TSH2B の 105 番目のグリシンは、H2B の 104 番目のグリシンに対応し、この部位は $\alpha 3$ ヘリックスと αC ヘリックスの間のループ上に存在する。 $\alpha 3$ ヘリックスと αC ヘリックスでは構造変化が小さい。従って、TSH2B の 105 番目のグリシンにおける構造変化は、ループの運動性の高さによって引き起こされたと考えられる。

次に、各アミノ酸置換部位における構造の違いを調べた結果、TSH2B の 85 番目のセリン以外の場所ではほとんど構造は変わらなかった。TSH2B と H2B の N 末端テールは定まった構造を持たないので、ヒストンフォールドドメインにおけるアミノ酸置換部位について構造比較を行った。TSH2B のヒストンフォールドドメインでは、33 番目のスレオニン、42 番目のイソロイシン、61 番目のセリン、68 番目のスレオニン、76 番目のセリン、85 番目のセリン、91 番目のセリン、125 番目のセリンが H2B に保存されていない。従って、これらの TSH2B のアミノ酸の構造と、H2B の対応するアミノ酸の構造を重ね合わせて比較した。その結果、85 番目のセリンを除き、これらの TSH2B のアミノ酸の周辺では、TSH2B と H2B の間でアミノ酸の主鎖の構造や側鎖の向きに大きな違いはみられなかった (Figures 20D-20K)。

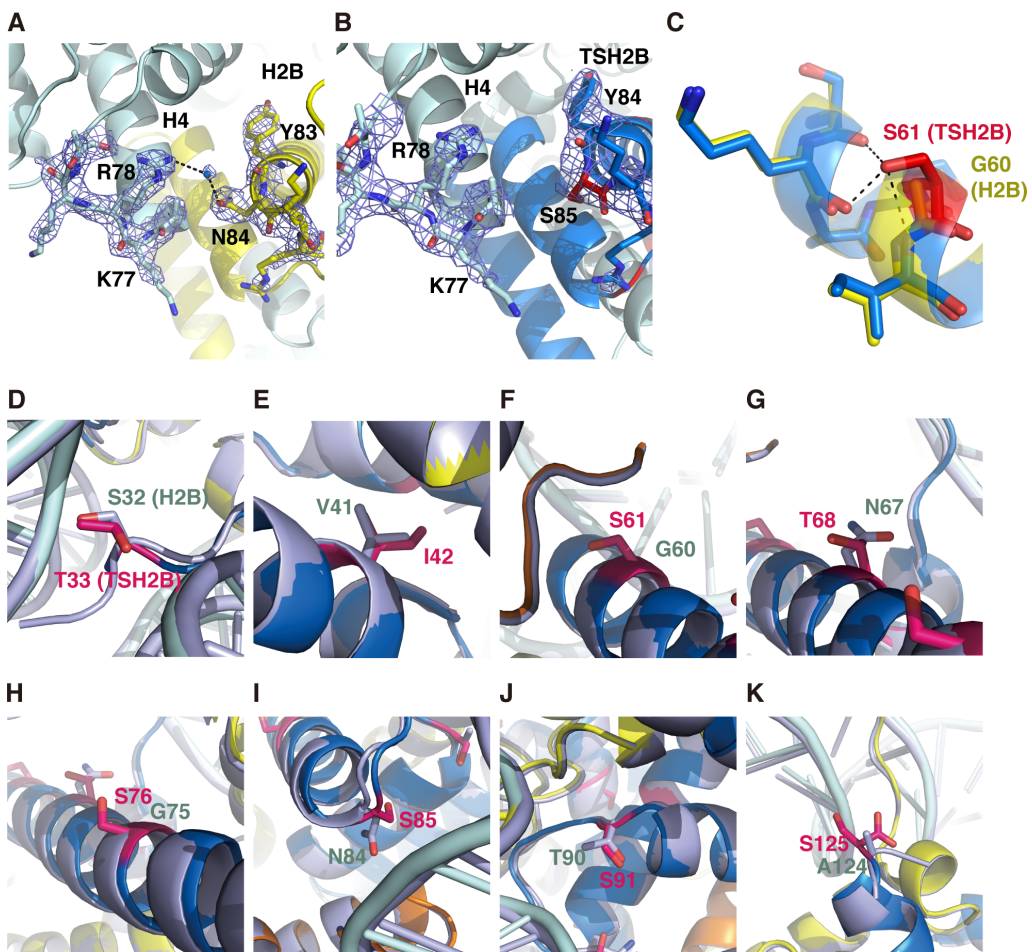


Figure 20. TSH2B 特異的なアミノ酸残基周辺の構造の拡大図

(A) ヌクレオソーム (PDB : 3AFA)内の H2B の 84 番目のアスパラギン周囲の構造の拡大図 (Tachiwana *et al.*, 2010)。H2B と H4 をそれぞれ黄色と水色で示し、H2B の 84 番目のアスパラギンと H4 の 78 番目のアルギニン周囲のアミノ酸の側鎖を示した。H2B の 84 番目のアスパラギンと H4 の 78 番目のアルギニンの間の水分子を介した水素結合を点線で示した。H2B の 84 番目のアスパラギンと H4 の 78 番目のアルギニンの周辺の 2mFo-DFc 電子密度マップ (1.5 σ)を青色のメッシュで示した。((Urahama *et al.*, 2014) Fig. 4a より引用)

(B) TSH2B ヌクレオソーム内の TSH2B の 85 番目のセリン周囲の構造の拡大図。TSH2B と H4 をそれぞれ青色と水色で示し、TSH2B の 85 番目のセリン (赤色)と H4 の 78 番目のアルギニン周囲のアミノ酸の側鎖を示した。TSH2B の 85 番目のセリンと H4 の 78 番目のアルギニンの周辺の 2mFo-DFc 電子密度マップ (1.5 σ)を青色のメッシュで示した。((Urahama *et al.*, 2014) Fig. 4b より引用)

(C) TSH2B ヌクレオソーム内の TSH2B の 61 番目のセリン周囲の構造の拡大図。H2B (黄色)の構造を重ね合わせて表示した。TSH2B は青色で示し、TSH2B の 61 番目のセリンを赤色で示した。水素結合を点線で示した。

(D-K) TSH2B ヌクレオソーム内の TSH2B の 33 番目のスレオニン (D)、42 番目のイソロイシン (E)、61 番目のセリン (F)、68 番目のスレオニン (G)、76 番目のセリン (H)、85 番目のセリン (I)、91 番目のセリン (J)、125 番目のセリン (K)周囲の構造の拡大図。H2B の構造を重ね合わせて表示した。TSH2B は青色で示し、TSH2B の 33 番目のスレオニン、42 番目のイソロイシン、61 番目のセリン、68 番目のスレオニン、76 番目のセリン、85 番目のセリン、91 番目のセリン、125 番目のセリンを紫色で示した。H2B は灰色で示した。((Urahama *et al.*, 2014) Figs. 4c-4j より引用)

第5章 総合討論

5-1 精子形成時における H3.5 の機能

精子形成時において、減数分裂後に生じる一倍体のゲノムは精子頭部の核内に密に収納される。この過程では、クロマチン構造が再編成され、大部分のヒストンがプロタミンに交換される (Govin *et al.*, 2004; Boussouar *et al.*, 2008; Gaucher *et al.*, 2009)。ヒトの精巣では TSH2B や H3T 等のヒストンバリエントが高発現しており、これらのヒストンバリエントは精子形成時におけるクロマチン再編成において重要な役割を果たす可能性が考えられている。H3.5 は近年新しく同定されたヒストンバリエントであり、H3.5 の mRNA はヒトの精巣において高発現することが示されている (Schenk *et al.*, 2011)。しかしながら、H3.5 の機能はほとんど不明であった。

そこで本研究では、精子形成時における H3.5 の機能を明らかにすることを目的として、H3.5 ナクレオソームの構造解析を行い、H3.5 ナクレオソームの構造が不安定であることと、そのメカニズムを明らかにした。まず、H3.5 ナクレオソームの構造安定性を耐塩性試験により解析した結果、H3.5 ナクレオソームは H3.3 ナクレオソームと比較して構造が不安定であることが明らかになった (Figure 6)。次に、H3.5 ナクレオソームが H3.3 ナクレオソームと比べて塩耐性が低い原因を明らかにするため、H3.5 ナクレオソームの構造を X 線結晶構造解析により決定し、H3.3 ナクレオソームの構造と比較した。その結果、H3.3 の 104 番目のフェニルアラニンに対応する H3.5 の 103 番目のアミノ酸がロイシンであることが原因で、H3.5 と H4 の疎水性相互作用が H3.3 と H4 のそれと比べて弱くなっていることが示唆された (Figures 10C, 10D)。そこで、H3.5 ナクレオソームの安定性の低さが H3.5 の 103 番目のロイシンにより引き起こされているのかを検証するため、変異体を用いた生化学的解析を行った。その結果、H3.5 ナクレオソームの塩耐性の低さは、H3.5 の 103 番目のロイシンが

部分的に引き起こしていることがわかった (Figure 11)。また、H3.5 の 103 番目のロイシンによって DNA と H3.5-H4 複合体の相互作用が弱くなっているのかを検証するため、テトラソームを再構成して耐熱性試験を行った。その結果、H3.5 テトラソームは H3.3 テトラソームより熱に対して不安定であることが明らかとなり、さらに H3.5 テトラソームの熱に対する安定性が低い部分的な原因は H3.5 の 103 番目のロイシンであることがわかった (Figure 12)。

木村宏博士らのグループとの共同研究で、HeLa 細胞に GFP 融合 H3.5 と GFP 融合 H3.3 を過剰発現させて FRAP 解析を行った結果、GFP 融合 H3.5 の方が GFP 融合 H3.3 より核内での動きが速いことが示され、ヌクレオソーム中で H3.5 は H3.3 より速く交換されることが示唆された (Urahama *et al.*, 2016)。さらに、変異体を用いた解析の結果、生細胞内での H3.5 の速い動きに重要なアミノ酸は H3.5 の 103 番目のロイシンであることが示された (Urahama *et al.*, 2016)。生細胞を用いて得られたこれらの結果は、試験管内で再構成したヌクレオソームの耐塩性試験から得られた結果と一致している。

本研究により、H3.5 の 103 番目のロイシンは、ヌクレオソームの安定性の低下を引き起こすことがわかった。H3.5 はヒト科の動物に特異的に保存されている (Schenk *et al.*, 2011)。H3.5 の 103 番目のロイシンは、現代人、ネアンデルタール人、ボノボ、チンパンジー、ゴリラに保存されているが、オランウータンには保存されていない (Schenk *et al.*, 2011)。H3.5 の 103 番目のロイシンへの置換は、ヒト亜科とオランウータン亜科の分岐において重要な役割を果たしたのかもしれない。H3.5 はボノボとチンパンジーでは偽遺伝子となっており、ボノボとチンパンジーは H3.5 がなくても精子を作ることができる。H3.5 は、精子形成に必要ではなく、精子形成過程に起きる現象の効率の調節等に関わっているのかもしれない。

H3.5 の他に、ヒトの精巣に特異的に高発現するヒストン H3 バリエントとして H3T が同

定されている (Witt *et al.*, 1996)。ヒトの H3Tヌクレオソームはヒトの H3.5ヌクレオソームと同様に不安定であることが報告されている (Tachiwana *et al.*, 2010)。つまり、ヒト精巣特異的に高発現するヒストン H3 バリエントである H3T と H3.5 は共通して、不安定なヌクレオソームを形成するという性質を持っている。精子形成時のクロマチン中で不安定なヌクレオソームを形成することは、ヒストンをトランシジョンプロテインおよびプロタミンに交換するのに役立つ可能性が考えられる。

H3T と H3.5 は、どちらも不安定なヌクレオソームを形成するが、全く同じ機能を持つわけではない。H3.5ヌクレオソームの不安定性の主要な原因が H3.5 の 103 番目のロイシンであるのに対し、H3Tヌクレオソームの不安定性の主要な原因は H3T の 111 番目のバリンである (Tachiwana *et al.*, 2010)。H3.5 の 103 番目のロイシンは、H3.3 の 104 番目のフェニルアラニンと比べると H4 との疎水性相互作用が弱い、周辺の主鎖の構造はほとんど同じである (Figure 10C, 10D)。これに対し、H3T の 111 番目のバリンは周辺の主鎖の構造に歪みを生じさせている (Tachiwana *et al.*, 2010)。また、H3Tヌクレオソームは H3.5ヌクレオソームよりも安定性が低い。したがって、H3.5 の 103 番目のロイシンと H3T の 111 番目のバリンは異なるメカニズムによってヌクレオソームの不安定を引き起こすと言える。H3Tヌクレオソームと H3.5ヌクレオソームが異なるメカニズムにより不安定になることは、クロマチンダイナミクスの制御において重要である可能性が考えられる。精子への分化過程で H3T と H3.5 は異なるゲノム領域のヌクレオソームに取り込まれ、それぞれの領域の転写量の調節に関わるのかもしれない。

H3.5 の 103 番目のロイシンと H3T の 111 番目のバリンは、ヌクレオソーム中の DNA の中央付近に存在する。この領域では、H3 の 116 番目のアルギニンのヒスチジンへの変異がヌクレオソームの安定性を低下させることが報告されている (Kruger *et al.*, 1995;

Kurumizaka and Wolffe, 1997)。この変異はクロマチンリモデリング因子 Swi/Snf 複合体の必要性を軽減する Sin 変異として知られている (Kruger *et al.*, 1995; Wechsler *et al.*, 1997)。Sin 変異の表現型は出芽酵母の H3 の 111 番目のアラニンのグリシンへの変異でもみられている (He *et al.*, 2008)。さらに、出芽酵母では H3 の 103 番目または 104 番目のアミノ酸の変異が、クロマチンリモデリングを通じて転写制御に影響を及ぼすことが示唆されている (Sakamoto *et al.*, 2009)。したがって、H3 の C 末端領域は安定なヌクレオソームを形成する上で重要な役割を果たし、この領域におけるアミノ酸変異はヌクレオソームの安定性に影響を及ぼすことが考えられる。

本研究の H3.5 ヌクレオソームの X 線結晶構造解析により、H3 のヒストンフォールドドメインにおけるアミノ酸置換によって H3.5 ヌクレオソームが H3.3 ヌクレオソームより不安定になるメカニズムが明らかになった。H3 の N 末端テールは天然変性領域であり、ヌクレオソームの外側に飛び出しており、電子密度が観察されなかったため構造を解析することはできなかったが、H3 の N 末端テールもヌクレオソームの安定性の制御に関与することが示されている (Ferreira *et al.*, 2007)。本研究においても、H3.5 の N 末端テールがヌクレオソームの安定性の低下の部分的な原因であることが示唆されたが、立体構造が決定できなかったため、そのメカニズムに迫ることはできなかった。しかしながら、本研究ではヒストンフォールドドメインの立体構造解析によって、H3.5 特異的な 103 番目のロイシンにより、ヌクレオソーム構造が不安定になるメカニズムを明らかにすることができた。

H3.5 ヌクレオソームが不安定である原因は、H3.5 の 103 番目のロイシン以外にもあることがテトラソームを用いた変異体解析から示され、H3.5 の N 末端テールもヌクレオソームの安定性の低下に寄与している可能性が考えられた。H3.5 と H3.3 は N 末端テールにおいてアミノ酸配列が 3 カ所異なる。N 末端テールでは、H3.5 の 29 番目のスレオニンと 33 番目

のシステインは H3.3 に保存されておらず、さらに H3.5 は H3.3 の 36 番目または 37 番目のリジンに欠失している。H3.3 の 37 番目のリジンの隣の 38 番目のプロリンから C 末端側の立体構造は決定されており、H3.3 の 38 番目のプロリンはヌクレオソームの DNA に近接している (Tachiwana *et al.*, 2011)。このことから、H3.3 の 36 番目のリジンや 37 番目のリジンはヌクレオソームの DNA と結合する可能性が考えられる。H3 の 36 番目、37 番目のリジンのアラニンへの変異は、熱によるヌクレオソームのスライディングの効率を高めることが報告されている (Ferreira *et al.*, 2007)。H3.5 では H3 の 36 番目または 37 番目のリジンの欠失により、DNA とヒストンの結合が弱くなり、ヌクレオソームが不安定になる可能性が考えられる。また、H3.5 の 29 番目のスレオニンに H3.3 ではアラニン、33 番目のシステインは H3.3 ではグリシンであり、これらのアミノ酸置換もヌクレオソームの安定性の制御に関与する可能性が考えられる。

H3 の N 末端テールは、翻訳後修飾を受けるほか、クロマチン結合因子が結合する部位でもあることが知られている。H3 の 36 番目のリジンおよび 37 番目のリジンは翻訳後修飾を受ける。H3 の 36 番目のリジンは、メチル化やアセチル化を受けることが報告されている (Morris *et al.*, 2007; Wagner & Carpenter, 2012)。H3 の 36 番目のリジンのメチル化は、転写の活性化だけでなく、転写の抑制、選択的スプライシング、遺伝子量補償、DNA 修復・組換え等の様々なプロセスに関係する (Wagner & Carpenter, 2012)。H3 の 36 番目のリジンのアセチル化は、RNA ポリメラーゼ II により転写される遺伝子のプロモーター領域に集積している (Morris *et al.*, 2007)。H3 の 37 番目のリジンはメチル化やアセチル化を受けることが報告されており、アセチル化の機能はよくわかっていないが、メチル化は G1 および G2/M 期に複製開始点周辺に集積することが示唆されている (Szerlong *et al.*, 2010; Unnikrishnan *et al.*, 2010)。H3 の 36 番目のリジンのメチオニンへの変異は、腫瘍を引き起こすことが報告され

ている (Lu *et al.*, 2016)。この変異は、野生型の H3 の 36 番目のリジンのメチル化を阻害する (Lu *et al.*, 2016)。H3.5 における H3 の 36 番目または 37 番目のリジンの欠失は翻訳後修飾のパターンの違いを引き起こして、ヌクレオソームの安定性制御以外の役割を果たすのかもしれない。H3.5 の 29 番目のスレオニン H3.3 ではアラニンであり、H3.5 の 33 番目のシステイン H3.3 ではグリシンである。これらのアミノ酸置換も、翻訳後修飾や結合因子の制御等に関与する可能性が考えられる。

H3.5 のヒストンフォールドドメインでは、103 番目のロイシンの他に、78 番目のアスパラギン、88 番目のバリンが H3.3 に保存されていない。H3.5 の 78 番目のアスパラギン周辺の L1 ループの構造は H3.3 と異なっていた (Figure 10A)。H3 の L1 ループはヌクレオソームの表面にあり、H3 の L1 ループを認識するクロマチン結合因子が存在することが知られている。H3.5 と他の H3 バリエントは、L1 ループの構造が異なることにより、異なるクロマチン結合因子と結合するのかもしれない。H3.5 の 88 番目のバリンは、H3.3 の 89 番目のイソロイシンや H3.1 の 89 番目のバリンに対応するが、この部位周辺の構造は H3.3 とほとんど同じだった (Figure 10B)。この部位では、H3.1 と H3.3 の間でも主鎖の構造変化はほとんどないことが報告されている (Tachiwana *et al.*, 2011)。これらのことから、この部位に関して H3.5 は H3.1 と同様の機能を持つことが考えられる。

H3.5 に結合する因子は、他の H3 バリエントに結合する因子とは異なるのかという問題は未解決である。H3.5 は H3 の 36 番目のリジンまたは 37 番目のリジンを欠失しているため、H3.5 と他の H3 バリエントは 36 番目のリジンの翻訳後修飾に違いが生じている可能性が考えられる。H3 の 36 番目のリジンのメチル化を認識して結合するタンパク質が存在することから、36 番目のリジンの翻訳後修飾の違いによって H3.5 と他の H3 バリエントは結合因子が異なるのかもしれない (Wagner & Carpenter, 2012)。今後、H3.5 が受ける翻訳後修飾を

網羅的に解析するとともに、H3.5 に結合する因子を網羅的に同定し、他の H3 バリエントの結合因子との違いを明らかにすることが求められる。結合因子の違いから、H3.5 の未知の機能が明らかになると期待される。

本研究では、H3.5 ヌクレオソームの安定性が低いことを明らかにした。そこで、H3.5 のタンパク質が精巣内に実際に存在するのかを共同研究で調べた (Urahama *et al.*, 2016)。株式会社モノクローナル抗体研究所に依頼し、H3.5 特異的モノクローナル抗体を作製することに成功した (Urahama *et al.*, 2016)。白石晃司博士と杉野法広博士との共同研究で、H3.5 特異的モノクローナル抗体を用いてヒトの精巣切片の免疫組織化学的解析を行った結果、精細管に含まれる精原細胞や一次精母細胞からは H3.5 が検出されたのに対し、精細胞からは H3.5 はほとんど検出されなかった (Figure 21) (Urahama *et al.*, 2016)。また、大川恭行博士らのグループとの共同研究でヒトの精巣と成熟精子のウェスタンブロット解析を行った結果、精巣からは H3.5 が検出されたのに対し、成熟精子からは H3.5 は検出されなかった (Urahama *et al.*, 2016)。したがって、H3.5 は精原細胞の時期から発現し始め、第一減数分裂までの分化過程に適切なクロマチン構造を形成する役割を持つ可能性が考えられる。ヒト TSH2B のオルソログであるマウス TH2B も、発生時期特異的発現を示すことが報告されている (Zalensky *et al.*, 2002; Montellier *et al.*, 2013)。TH2B は精母細胞で発現し始め、精子のクロマチンにもわずかに存在する (Zalensky *et al.*, 2002; Montellier *et al.*, 2013)。発生時期特異的に、異なるヒストンバリエントをクロマチンに取り込むことは、精子への分化において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

ヒトの精巣に H3.5 がタンパク質として発現していることがわかったので、H3.5 がゲノム上のどの領域に局在するのかを九州大学の大川恭行博士らのグループとの共同研究で調べた (Urahama *et al.*, 2016)。H3.5 特異的モノクローナル抗体を用いて、ヒト精巣内の内在性の

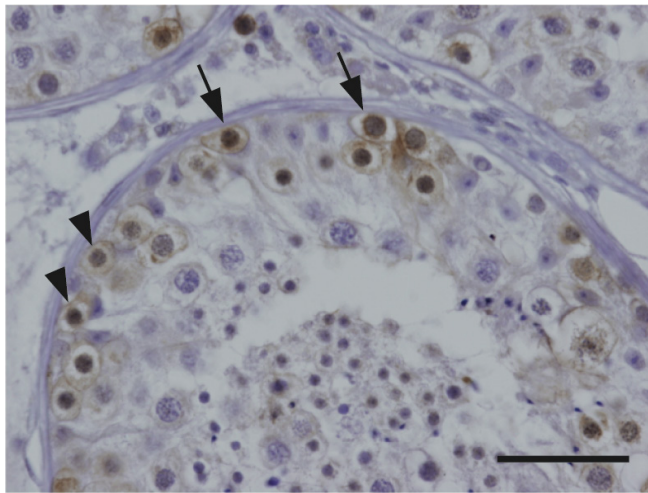


Figure 21. ヒト精巣切片の免疫組織化学的解析

H3.5 特異的モノクローナル抗体を用いて、ヒト精巣切片を免疫組織化学的に染色した。バーは 50 μm を示す。矢印はレプトテン期の一次精母細胞を示し、矢じりはプレレプトテン期の一次精母細胞を示す。(Urahama *et al.*, 2016) Fig. 7a より引用。山口大学医学部附属病院泌尿器科の白石晃司博士よりご提供いただいた。)

H3.5 のゲノム上における局在位置を解析した結果、H3.5 は遺伝子の転写開始点周辺に、遺伝子の転写量に依存せず集積することが明らかになった (Urahama *et al.*, 2016)。したがって、H3.5 は精子形成の初期の段階における遺伝子の転写調節に関わっていることが考えられる。しかし、ヒトの精巣内で H3.3 も転写開始点に集積しており、H3.3 の集積は遺伝子の転写量に依存していたことから、H3.3 も精子形成時の転写制御に深い関係を持つことが考えられる (Urahama *et al.*, 2016)。H3.5 は転写開始点を一過的にマークし、転写量に応じて H3.3 に交換するのを促進する機能を持つのもかもしれない。

5-2 TSH2B ヌクレオソームの構造

ヒト TSH2B のオルソログであるマウスの TH2B は、精子形成時のヒストンとプロタミンの交換において重要な役割を持つことが示唆されている (Montellier *et al.*, 2013)。マウスの精母細胞において、ゲノム全体で H2B は TH2B に交換される (Montellier *et al.*, 2013)。TH2B は不安定なヌクレオソームを形成することによりヒストンとプロタミンの交換を促進することが示唆されている (Montellier *et al.*, 2013)。しかしながら、これまでのヒトの TSH2B を含むヌクレオソームの生化学的解析では、TSH2B を含むヌクレオソームと H2B を含むヌクレオソームの性質の違いは見いだされていなかった (Li *et al.*, 2005)。

そこで、本研究では TSH2B ヌクレオソームの特徴を明らかにすることを目的とし、TSH2B ヌクレオソームの構造解析を行った。まず、ヒトの TSH2B ヌクレオソームを再構成し、X線結晶構造解析により TSH2B ヌクレオソームの構造を決定した (Figure 17B)。次に、TSH2B ヌクレオソームと H2B ヌクレオソームの構造を比較した (Figure 19)。その結果、TSH2B 特異的な 85 番目のセリン周辺で局所的に TSH2B と H2B の構造が異なることがわかった (Figure 19A)。TSH2B の 85 番目のセリンは H4 と相互作用していないのに対し、対応する

H2B の 84 番目のアスパラギンは H4 の 78 番目のアルギニンと水分子を介して水素結合を形成していることが示された (Figures 20A, 20B)。これに対し、他の TSH2B 特異的なアミノ酸は、H2B との大きな構造の違いを引き起こしていなかった (Figures 20D-20K)。これらの知見により、精子形成時に TSH2B が形成するクロマチン構造について理解が深まることが期待される。

本研究により決定したヒトの TSH2Bヌクレオソームの結晶構造を報告した後、マウスの TH2B を含むヌクレオソームの結晶構造が他のグループから報告された (Padavattan *et al.*, 2015)。このマウスの TH2Bヌクレオソームの構造は、ヒトの TSH2Bヌクレオソームの構造と全体的に類似していることが示されている (Padavattan *et al.*, 2015)。

TSH2B 特異的なアミノ酸残基のほとんどは N 末端テール領域に存在することから、TSH2B の N 末端テールは TSH2B 特異的なクロマチンリモデリング因子やヒストンシャペロンをリクルートする機能を持つことが示唆される。精巣に高発現するヒストンシャペロンとして、Nap2 が同定されている (Hu *et al.*, 1996)。通常型のヒストンシャペロンである Nap1 は、Nap2 と比べると H3Tヌクレオソームの形成効率が低いことが報告されている (Tachiwana *et al.*, 2008)。TSH2B 特異的なアミノ酸を認識し、TSH2Bヌクレオソームを優先的に形成するヒストンシャペロンも存在するのかもしれない。

5-3 H3.5 と TSH2B の関係

先行研究で、TH2B は精原細胞からは検出されないが、精母細胞や精細胞からは検出されることが報告されている (Figure 22) (Montellier *et al.*, 2013)。一方、H3.5 は精原細胞や一次精母細胞からは検出されたのに対し、精細胞からはほとんど検出されなかった (Figures 21, 22) (Urahama *et al.*, 2016)。ヒトの TSH2B の発現時期はほとんど未解明だが、マウスの TH2B

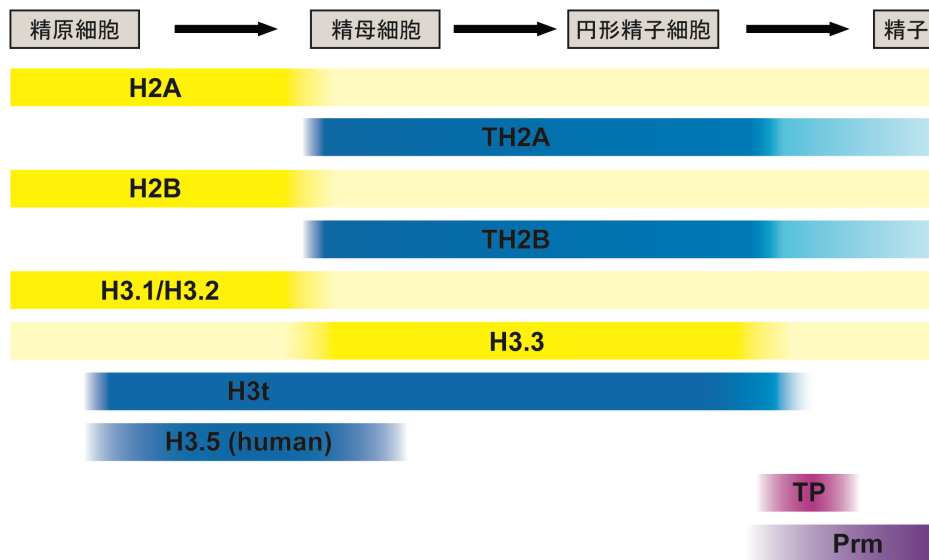


Figure 22. H3.5 の発現時期

精子形成過程におけるヒト H3.5、マウス H2A、TH2A、H2B、TH2B、H3.1/H3.2、H3.3、H3t、トランシジョンプロテイン (TP)、およびプロタミン (Prm) の発現時期の模式図を示す (Montellier *et al.*, 2013; Yuen *et al.*, 2014; Shinagawa *et al.*, 2015; Urahama *et al.*, 2016; Ueda *et al.*, 2017)。ユビキタスに発現するヒストンを黄色、精巣特異的に高発現するヒストンを青色、トランシジョンプロテインを桃色、プロタミンを紫色で示す。

の発現時期と同じであるとすれば、一次精母細胞において TSH2B と H3.5 は共存し、他の細胞では共存しない可能性が考えられる (Figure 22)。H3.5ヌクレオソームの不安定性は、減数分裂期組替えの制御に関与するのかもしれない。また、一次精母細胞への分化において H3.5 は不安定なヌクレオソームを形成することにより、TSH2B のクロマチンへの取り込みを促進するのかもしれない。これにより、精子形成後期のヒストン-プロタミン交換の効率が制御されている可能性が考えられる。

本研究で決定した H3.5ヌクレオソームと TSH2B の構造を重ね合わせた結果、TSH2B は H2B と同様にヌクレオソーム内に収まった (Figure 23)。従って、H3.5 と TSH2B の両方を含むヌクレオソームは形成可能であると考えられる。一次精母細胞において TSH2B と H3.5 が共存する可能性があることから、H3.5 と TSH2B の両方を含むヌクレオソームがクロマチン中に存在する可能性が考えられる。ヌクレオソーム内で H3.5 と H2B は直接的には相互作用していない。さらに、H3.5 と H3.3 のアミノ酸置換部位と、TSH2B と H2B のアミノ酸置換部位は、ヌクレオソーム内で近接していない (Figure 23)。従って、H3.5 と TSH2B の間で特異的な相互作用が形成されることはないと考えられる。H3.5 と TSH2B の両方を含むヌクレオソームは、単純に H3.5ヌクレオソームの性質と TSH2Bヌクレオソームの性質の両方を合わせ持つだけなのかもしれない。H3.5 と TSH2B の両方に結合するクロマチン結合因子があるのかという点や、H3.5 と TSH2B が相乗的に働くのかといった点に関しては、今後の解析が待たれる。

5-4 今後の展望

本研究では、H3.5ヌクレオソームと TSH2Bヌクレオソームの構造解析を行った。これまでに、ヒト TSH2B のオルソログであるマウス TH2B は他の H2A バリエントと協同的に働

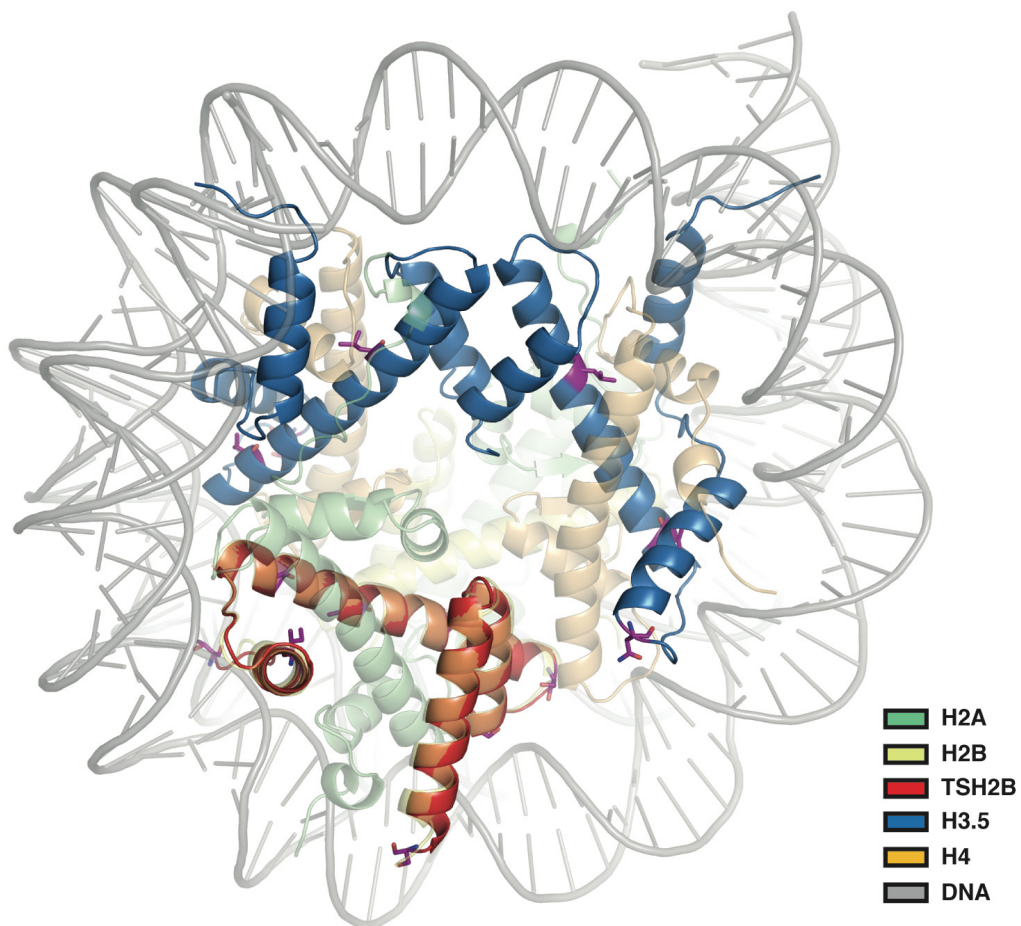


Figure 23. H3.5ヌクレオソームおよびTSH2Bの構造の重ね合わせ

H3.5ヌクレオソームとTSH2Bの構造を重ね合わせ、H3.5とTSH2B以外の分子を半透明で表示した。H2A、H2B、TSH2B、H3.5、H4、DNAをそれぞれ緑色、黄色、赤色、青色、薄橙色、灰色で示した。H3.3とH3.5のアミノ酸置換部位と、H2BとTSH2Bのアミノ酸置換部位の側鎖を表示し、紫色で示した。

くことが報告されている。精巣特異的 H2A バリエントである H2AL2 は、H2B より TH2B と優先的に複合体を形成し、精細胞の凝縮過程において動原体を挟んだヘテロクロマチン領域のクロマチン再編成に関与することが示されている (Govin *et al.*, 2007)。また、精巣特異的ヒストンバリエントとして同定された TH2A と TH2B は、卵子および初期胚にも高発現することが示されており、TH2A と TH2B は開いたクロマチン構造を形成してリプログラミングを促進することが示唆されている (Montellier *et al.*, 2013; Shinagawa *et al.*, 2014)。精子形成時に、TH2B は H3.1 だけでなく H3.3 やヒト H3T のオルソログであるマウス H3t との組み合わせでもヌクレオソームを形成することが報告されている (Montellier *et al.*, 2013)。したがって、精子形成時のクロマチン構造をより深く理解するためには、ヒストンバリエントを組み合わせたヌクレオソームの構造を解析する必要があると考えられる。

ヒストンバリエントは、精子形成の正常な進行に重要な役割を果たすことがわかってきている (Maze *et al.*, 2014)。しかし、H3.5 が精子形成に必要なのかはいまだに不明である。今後、精子形成に異常を持つドナーからの検体を解析することにより、精子形成における H3.5 の機能の理解が深まることが期待される。

H3.5 の mRNA は、精巣以外では精液、白血球、および肝臓で少量発現することが確認されている (Schenk *et al.*, 2011)。精巣に特異的に発現するタンパク質は、がん細胞で不適切に過剰発現するタンパク質であることが多い。近年、ヒトの H3.5 の遺伝子 *H3F3C* のミスセンス変異が腫瘍に存在することが報告された (Kandoth *et al.*, 2013)。がん細胞において、H3.5 の変異体が不適切に発現することにより、適切な染色体の機能が損なわれるのかもしれない。H3.5 の変異が、がんの原因となるのかについては今後の解析が待たれる。

引用文献

Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., and Zwart, P.H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221.

Allais-Bonnet, A., and Pailhoux, E. (2014) Role of the prion protein family in the gonads. *Front. Cell Dev. Biol.* **2**, 56.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **88**, 10148–10152.

Arents, G., and Moudrianakis, E.N. (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **92**, 11170–11174.

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.

Boussouar, F., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2008) A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle.* **7**, 3499–3502.

Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., and Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921.

Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E.J., Roloff, T.C., Beisel, C., Schübeler, D., Stadler, M.B., and Peters, A.H. (2010) Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 679–687.

- Carone, B.R., Hung, J.H., Hainer, S.J., Chou, M.T., Carone, D.M., Weng, Z., Fazio, T.G., and Rando, O.J. (2014) High-resolution mapping of chromatin packaging in mouse embryonic stem cells and sperm. *Dev. Cell.* **30**, 11–22.
- Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21.
- Dyer, P.N., Edayathumangalam, R.S., White, C.L., Bao, Y., Chakravarthy, S., Muthurajan, U.M., and Luger, K. (2004) Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA. *Methods Enzymol.* **375**, 23–44.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132.
- Erkek, S., Hisano, M., Liang, C.Y., Gill, M., Murr, R., Dieker, J., Schübeler, D., van der Vlag, J., Stadler, M.B., and Peters, A.H. (2013) Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 868–875.
- Ferreira, H., Somers, J., Webster, R., Flaus, A., and Owen-Hughes, T. (2007) Histone tails and the H3 alphaN helix regulate nucleosome mobility and stability. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4037–4048.
- Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2009) From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J.* **277**, 599–604.
- González-Romero, R., Rivera-Casas, C., Ausió, J., Méndez, J., and Eirín-López, J.M. (2010) Birth-and-death long-term evolution promotes histone H2B variant diversification in the male germinal cell line. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 1802–1812.
- Goudarzi, A., Shiota, H., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2014) Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis. *J. Mol. Biol.* **426**, 3342–3349.

- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3459–3469.
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thévenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., and Caron, C. (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* **176**, 283–294.
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., and Cairns, B.R. (2009) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature.* **460**, 473–478.
- He, Q., Yu, C., and Morse, R.H. (2008) Dispersed mutations in histone H3 that affect transcriptional repression and chromatin structure of the *CHA1* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* **7**, 1649–1660.
- Horikoshi, N., Sato, K., Shimada, K., Arimura, Y., Osakabe, A., Tachiwana, H., Hayashi-Takanaka, Y., Iwasaki, W., Kagawa, W., Harata, M., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2013) Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 2431–2439.
- Hu, R.J., Lee, M.P., Johnson, L.A., and Feinberg, A.P. (1996) A novel human homologue of yeast nucleosome assembly protein, 65 kb centromeric to the *p57KIP2* gene, is biallelically expressed in fetal and adult tissues. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1743–1748.
- Jang, C.W., Shibata, Y., Starmer, J., Yee, D., and Magnuson, T. (2015) Histone H3.3 maintains genome integrity during mammalian development. *Genes Dev.* **29**, 1377–1392.
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J., and Ding, L. (2013) Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature.* **502**, 333–339.
- Kornberg, R.D. (1977) Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 931–954.

- Kruger, W., Peterson, C.L., Sil, A., Coburn, C., Arents, G., Moudrianakis, E.N., and Herskowitz, I. (1995) Amino acid substitutions in the structured domains of histones H3 and H4 partially relieve the requirement of the yeast SWI/SNF complex for transcription. *Genes Dev.* **9**, 2770–2779.
- Kurumizaka, H., and Wolffe, A.P. (1997) Sin mutations of histone H3: influence on nucleosome core structure and function. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6953–6969.
- Li, A., Maffey, A.H., Abbott, W.D., Conde e Silva, N., Prunell, A., Siino, J., Churikov, D., Zalensky, A.O., and Ausió, J. (2005) Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry.* **44**, 2529–2535.
- Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B., de Bakker, P.I., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2003) Structure validation by C α geometry: phi,psi and C β deviation. *Proteins.* **50**, 437–450.
- Lu, C., Jain, S.U., Hoelper, D., Bechet, D., Molden, R.C., Ran, L., Murphy, D., Venneti, S., Hameed, M., Pawel, B.R., Wunder, J.S., Dickson, B.C., Lundgren, S.M., Jani, K.S., De, Jay, N., Papillon-Cavanagh, S., Andrulis, I.L., Sawyer, S.L., Grynspan, D., Turcotte, R.E., Nadaf, J., Fahiminiyah, S., Muir, T.W., Majewski, J., Thompson, C.B., Chi, P., Garcia, B.A., Allis, C.D., Jabado, N., and Lewis, P.W. (2016) Histone H3K36 mutations promote sarcomagenesis through altered histone methylation landscape. *Science.* **352**, 844–849.
- 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.
- Luger, K., Rechsteiner, T.J., and Richmond, T.J. (1999) Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. *Methods. Mol. Biol.* **119**, 1–16.
- 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.
- Maehara, K., Harada, A., Sato, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kimura, H., and Ohkawa, Y. (2015) Tissue-specific expression of histone H3 variants diversified after species separation.

Epigenetics Chromatin. **8**, 35.

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.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674.

Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., Shiota, H., Debernardi, A., Héry, P., Curtet, S., Jamshidikia, M., Barral, S., Holota, H., Bergon, A., Lopez, F., Guardiola, P., Pernet, K., Imbert, J., Petosa, C., Tan, M., Zhao, Y., Gérard, M., and Khochbin, S. (2013) Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.* **27**, 1680–1692.

Moriwaki, Y., Yamane, T., Ohtomo, H., Ikeguchi, M., Kurita, J., Sato, M., Nagadoi, A., Shimojo, H., and Nishimura, Y. (2016) Solution structure of the isolated histone H2A-H2B heterodimer. *Sci. Rep.* **6**, 24999.

Morris, S.A., Rao, B., Garcia, B.A., Hake, S.B., Diaz, R.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Allis, C.D., Lieb, J.D., and Strahl, B.D. (2007) Identification of histone H3 lysine 36 acetylation as a highly conserved histone modification. *J. Biol. Chem.* **282**, 7632–7640.

Nonchev, S., and Tsanev, R. (1990) Protamine-histone replacement and DNA replication in the male mouse pronucleus. *Mol. Reprod. Dev.* **25**, 72–76.

Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.

Padavattan, S., Shinagawa, T., Hasegawa, K., Kumasaka, T., Ishii, S., and Kumarevel, T. (2015) Structural and functional analyses of nucleosome complexes with mouse histone variants TH2a and TH2b, involved in reprogramming. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**, 929–935.

Qian, M.X., Pang, Y., Liu, C.H., Haratake, K., Du, B.Y., Ji, D.Y., Wang, G.F., Zhu, Q.Q., Song, W., Yu, Y., Zhang, X.X., Huang, H.T., Miao, S., Chen, L.B., Zhang, Z.H., Liang, Y.N., Liu, S., Cha, H., Yang, D., Zhai, Y., Komatsu, T., Tsuruta, F., Li, H., Cao, C., Li, W., Li, G.H., Cheng, Y., Chiba, T., Wang, L., Goldberg, A.L., Shen, Y., and Qiu, X.B. (2013) Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell*. **153**, 1012–1024.

Rippe, K., Mazurkiewicz, J., and Kepper, N. (2008) 6. Interactions of Histones with DNA: Nucleosome Assembly, Stability, Dynamics, and Higher Order Structure. *DNA Interactions with Polymers and Surfactants*. John Wiley & Sons. 135–172.

Saitou, M., and Kurimoto, K. (2014) Paternal nucleosomes: are they retained in developmental promoters or gene deserts? *Dev. Cell*. **30**, 6–8.

Sakamoto, M., Noguchi, S., Kawashima, S., Okada, Y., Enomoto, T., Seki, M., and Horikoshi, M. (2009) Global analysis of mutual interaction surfaces of nucleosomes with comprehensive point mutants. *Genes Cells*. **14**, 1271–1330.

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.

Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4.

Shinagawa, T., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Huynh, L.M., Sivaraman, P., Kumarevel, T., Inoue, K., Nakato, R., Katou, Y., Sado, T., Takahashi, S., Ogura, A., Shirahige, K., and Ishii, S. (2014) Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. **14**, 217–227.

Shinagawa, T., Huynh, L.M., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Kwak, H.G., Dohmae, N., Noguchi, J., and Ishii, S. (2015) Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in spermatogenesis. *Development*. **142**, 1287–1292.

Soshnev, A.A., Josefowicz, S.Z., and Allis, C.D. (2016) Greater Than the Sum of Parts: Complexity

of the Dynamic Epigenome. *Mol. Cell.* **62**, 681–694.

Steinberg, T.H., Haugland, R.P., and Singer, V.L. (1996) Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains. *Anal. Biochem.* **239**, 238–245.

Szerlong, H.J., Prenni, J.E., Nyborg, J.K., and Hansen, J.C. (2010) Activator-dependent p300 acetylation of chromatin in vitro: enhancement of transcription by disruption of repressive nucleosome-nucleosome interactions. *J. Biol. Chem.* **285**, 31954–31964.

Tachiwana, H., Osakabe, A., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2008) Nucleosome formation with the testis-specific histone H3 variant, H3t, by human nucleosome assembly proteins in vitro. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2208–2218.

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., Osakabe, A., Shiga, T., Miya, Y., Kimura, H., Kagawa, W., and Kurumizaka, H. (2011) Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 578–583.

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.

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.

Ueda, J., Harada, A., Urahama, T., Machida, S., Maehara, K., Hada, M., Makino, Y., Nogami, J., Horikoshi, N., Osakabe, A., Taguchi, H., Tanaka, H., Tachiwana, H., Yao, T., Yamada, M., Iwamoto, T., Isotani, A., Ikawa, M., Tachibana, T., Okada, Y., Kimura, H., Ohkawa, Y., Kurumizaka, H., and Yamagata, K. (2017) Testis-specific histone variant H3t gene is essential for entry into spermatogenesis. *Cell Rep.* **18**, 593–600.

Unnikrishnan, A., Gafken, P.R., and Tsukiyama, T. (2010) Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 430–437.

Urahama, T., Horikoshi, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., and Kurumizaka, H. (2014) Structure of human nucleosome containing the testis-specific histone variant TSH2B. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **70**, 444–449.

Urahama, T., Harada, A., Maehara, K., Horikoshi, N., Sato, K., Sato, Y., Shiraishi, K., Sugino, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., Kagawa, W., Kimura, H., Ohkawa, Y., and Kurumizaka, H. (2016) Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics Chromatin.* **9**, 2.

Wagner, E.J., and Carpenter, P.B. (2012) Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 115–126.

Wechsler, M.A., Kladde, M.P., Alfieri, J.A., and Peterson, C.L. (1997) Effects of Sin- versions of histone H4 on yeast chromatin structure and function. *EMBO J.* **16**, 2086–2095.

Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., and Wilson, K.S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242.

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

Yuen, B.T., Bush, K.M., Barrilleaux, B.L., Cotterman, R., and Knoepfler, P.S. (2014) Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. *Development.* **141**, 3483–3494.

Zalensky, A.O., Siino, J.S., Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Tomilin, N.V., Yau, P., and Bradbury, E.M. (2002) Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* **277**, 43474–43480.

謝辞

本研究は、早稲田大学胡桃坂研究室で6年間にわたり行われたものです。研究全般において、早稲田大学理工学術院教授 胡桃坂仁志先生に懇切丁寧なご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。また、本研究を行うにあたり、胡桃坂研究室の皆様に様々なご助言と激励を頂きました。深く感謝申し上げます。

X線回折測定では、SPring-8のビームラインBL41XUのスタッフの皆様にご尽力いただきました。心より御礼申し上げます。

X線結晶構造解析を行うにあたり、丁寧なご指導を頂きました明星大学准教授 香川亘先生、早稲田大学理工学術院助教 堀越直樹博士に深く御礼申し上げます。

実験操作をはじめとして研究についてご指導を賜り、本研究について議論して頂きましたGregor Mendel Institute 研究員 越阪部晃永博士、早稲田大学理工学術院講師 立和名博昭博士に厚く御礼申し上げます。

生体内のH3.5の機能解析において、共同研究をさせていただいた東京工業大学教授 木村宏先生、東京工業大学研究員 佐藤優子博士、Hubrecht Institute 研究員 佐藤浩一博士、山口大学講師 白石晃司先生、山口大学教授 杉野法広先生、九州大学教授 大川恭行先生、九州大学助教 原田哲仁博士、九州大学助教 前原一満博士に心より御礼申し上げます。

最後に、研究生活を支えてくれた家族に感謝いたします。

研究業績

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者
論文	<p>○<u>Takashi Urahama</u>, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Naoki Horikoshi, Koichi Sato, Yuko Sato, Koji Shiraishi, Norihiro Sugino, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Wataru Kagawa, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Hitoshi Kurumizaka Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis Epigenetics & Chromatin, 9, 2, 2016.</p> <p>○<u>Takashi Urahama</u>, Naoki Horikoshi, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Hitoshi Kurumizaka Structure of human nucleosome containing the testis-specific histone variant TSH2B Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications, 70, pp444-449, 2014.</p>
講演	<p>学会発表</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 国際学会 (ポスター発表) <p><u>Takashi Urahama</u>, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Naoki Horikoshi, Koichi Sato, Yuko Sato, Koji Shiraishi, Norihiro Sugino, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Wataru Kagawa, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, and Hitoshi Kurumizaka Structural, Biochemical, and Genome-Wide Analyses of Human Histone Variant H3.5 International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 2015, August, Awaji, Hyogo, Japan.</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 国内学会 (口頭およびポスター発表) <p>浦浜嵩、堀越直樹、田口裕之、鈴木佑弥、越阪部晃永、木村宏、大川恭行、胡桃坂仁志 マウス精巣特異的な発現を示すヒストンバリエントH3mmTを含むヌクレオソームの構造解析および生化学的解析 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月</p> <p>浦浜嵩、越阪部晃永、堀越直樹、佐藤浩一、立和名博昭、香川亘、大川恭行、木村宏、胡桃坂仁志 ヒト精巣特異的に高発現するヒストンバリエントH3.5を含むヌクレオソームの構造解析および機能解析 第86回日本生化学会大会、2013年9月</p>

研究業績

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者
講演	<p>・国内学会 (ポスター発表)</p> <p>浦浜嵩、Zdravko Lorkovic、Ramesh Yelagandula、小林航、劉恩緯、堀越直樹、田口裕之、町田晋一、Frederic Berger、胡桃坂仁志 シロイヌナズナのヘテロクロマチンを構成するヒストンバリエントH2A.Wを含むヌクレオソームの構造解析 第39回日本分子生物学会年会 2016年12月</p> <p>浦浜嵩、Sophie Barral、田中大貴、両角佑一、越阪部晃永、Saadi Khochbin、胡桃坂仁志 精巣特異的ヒストンバリエントH2AL2とTH2Bの機能解析 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会 2015年12月</p> <p>浦浜嵩、越阪部晃永、立和名博昭、堀越直樹、志賀達也、香川亘、胡桃坂仁志 ヒト精巣特異的ヒストンバリエントを含むヌクレオソームの構造解析 第6回日本エピジェネティクス研究会年会、2012年5月</p>
その他	<p>Jun Ueda, Akihito Harada, <u>Takashi Urahama</u>, Shinichi Machida, Kazumitsu Maehara, Masashi Hada, Yoshinori Makino, Jumpei Nogami, Naoki Horikoshi, Akihisa Osakabe, Hiroyuki Taguchi, Hiroki Tanaka, Hiroaki Tachiwana, Tatsuma Yao, Minami Yamada, Takashi Iwamoto, Ayako Isotani, Masahito Ikawa, Taro Tachibana, Yuki Okada, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Hitoshi Kurumizaka, Kazuo Yamagata Testis-specific histone variant H3t gene is essential for entry into spermatogenesis Cell Reports, 18, pp593-600, 2017.</p>