

博士論文概要

論文題目

新規クロマチン基盤ユニットの
立体構造に関する研究

Structural study on
a novel basic unit of chromatin

申請者

加藤	大貴
Daiki	KATO

電気・情報生命専攻 構造生物学研究

2017年11月

真核生物の遺伝情報の担体はゲノム DNA である。ゲノム DNA は、ヌクレオソームを基盤構造としたクロマチンを形成し、細胞核内に収納される。ヌクレオソームは、塩基性タンパク質である 4 種のヒストン (H2A、H2B、H3、H4) 各 2 分子ずつによって形成されたヒストン 8 量体に、約 150 塩基対の DNA が巻きついた構造体である。また、各ヌクレオソームには、リンカーヒストン H1 が結合し、さらに高次に折りたたまれた構造を形成している。クロマチンは、単に DNA を収納する機能だけでなく、転写、組換え、修復、複製などを制御する機能も有している。例えば、ヒストンバリエーションの取り込み、ヒストンの翻訳後修飾の有無、ヌクレオソームを構成するヒストンの含量の違い、クロマチンリモデリング因子によるヌクレオソームの形成位置の移動などを介して、その性質を変化させ、これらの機能制御を行っている。本論文では、特に「ヒストン含量の異なるヌクレオソーム」と「クロマチンリモデリングによるヌクレオソームの再配置」に着目している。

ヒストン含量の異なるヌクレオソームとしては、各 2 分子の H3 と H4 からなるテトラソーム、各 1 分子の H2A、H2B と各 2 分子の H3、H4 からなるヘキサソーム、各 1 分子の H2A、H2B、H3、H4 からなるヘミソームなどが報告されていた。例えば、テトラソームやヘキサソームはヌクレオソーム形成の中間体として形成されることが考えられている複合体である。また、ヘキサソームについては、RNA ポリメラーゼによる DNA の読み取りの際などにも形成されることが示唆されていた。また、クロマチンリモデリングは、SWI/SNF や ISWI などをはじめとしたクロマチンリモデリング因子と呼ばれるタンパク質複合体によって、ヌクレオソームの再配置が生じる現象である。生体内では、ヌクレオソームの再配置によって遺伝子の発現など、DNA 上で生じる生体内の現象を制御していることが知られている。

クロマチンリモデリング因子によってヌクレオソームの再配置が生じる際には、ヌクレオソームが隣のヌクレオソームと衝突し、特殊な構造体が形成されることが先行研究から示唆されていた。この複合体は、各 3 分子の H2A、H2B と各 4 分子の H3、H4 からなるヒストン 14 量体に約 250 塩基対の DNA が巻きついた特殊な構造体であることが考えられていた。この複合体を、本研究ではオーバーラッピングダイヌクレオソームと呼んでいる。先行研究から、ヒストンと強固に結合する DNA 配列を 2 つ組み合わせた 250 塩基対の DNA 配列を用いることで、試験管内でオーバーラッピングダイヌクレオソームが再構成可能であること、SWI/SNF ファミリーのクロマチンリモデリング因子の 1 つである RSC を用いた際にオーバーラッピングダイヌクレオソームが形成される可能性などが示唆されていた。一方で、この構造の詳細や機能などについては、不明な点が多かった。

本研究では、クロマチンの構造に依存した機能発現機構を明らかにするため、オーバーラッピングダイヌクレオソームに着目し、その構造生物学的、生化

学的解析を行った。具体的には、オーバーラッピングダイヌクレオソームを試験管内で再構成し、X線結晶構造解析の手法を用いてその立体構造を明らかにした。オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造情報をもとに、オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造的および物理化学的性質について解析した。

本論文は、4つの章で構成されている。「1章 序論」では、クロマチンの基盤構造であるヌクレオソームの構造や機能について先行研究に基づいた知見を記載するとともに、リンカーヒストンなどを始めとした核内タンパク質のヌクレオソームに対する結合様式や結合意義などについて記載した。また、通常のヌクレオソームとヒストン含量の異なるヌクレオソームの例について紹介した。さらに、オーバーラッピングダイヌクレオソームに関する先行研究について述べ、本研究の意義を記載した。

「2章 実験材料・方法」では、本研究で用いたタンパク質やDNAの精製方法について述べた後、ヌクレオソームおよびオーバーラッピングダイヌクレオソームの調製法について記載した。また、オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶化の方法やX線回折データの取得法を述べた後、オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造の決定法について記載した。次に、本研究で行った生化学的解析である、ゲルシフト解析、スクロース密度勾配を用いた超遠心解析、およびfootprinting解析の方法について記載した。

「3章 結果」では、本研究によって得られた実験結果について記載した。本研究では、試験管内でオーバーラッピングダイヌクレオソームを再構成し、精製した。精製したオーバーラッピングダイヌクレオソームを用いて、その結晶化を行い、良質の結晶を得ることに成功した。その後、得られた結晶を用いて大型放射光施設であるSPring-8を用いたX線回折実験を行い、オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造を3.14 Åの分解能で決定した。本研究によって明らかにしたオーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造から、オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造中では、ヒストン6量体にDNAが巻きついた立体構造であるヘキサソームとヒストン8量体にDNAが巻きついた構造体であるオクタソームの2つの構造が重なりあうことで、ヒストン14量体の周りに250塩基対のDNAが左巻きに約3回転巻きついた特殊な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。また、オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造中では、ヘキサソームユニットを構成するH3のNヘリックス領域が他のH3と比較して、顕著に短くなった構造を形成していることがわかった。さらに、重なりあった2つのユニット間で、新たなヌクレオソーム-ヌクレオソーム相互作用を生じていることが示唆された。この相互作用に関与すると考えられるアミノ酸を、アラニンや酸性アミノ酸に置換した変異体を用いた解析をおこなった。非変性ゲルを用いた電気泳動による泳動度の差を解析したところ、変異体ヒストンを含むオーバーラッピングダイヌクレオソームは、野生型と比較して、泳動度が小さいことがわかった。このことは、変異体を含むオーバーラッピング

ダイヌクレオソームにおいて、ヌクレオソーム間の相互作用が減弱していることに起因すると考えられ、これらのアミノ酸がオーバーラッピングダイヌクレオソームの構造形成に重要であることが示唆された。ヌクレオソームの表面には **acidic patch** と呼ばれる領域が存在するが、オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造中では、4つ存在する **acidic patch** の1つが消失し、もう1つが表面に露出していないことが示された。**acidic patch** は、核内タンパク質のヌクレオソームに対する結合に重要な役割を果たすことが知られる領域である。そこで、**acidic patch** に結合する核内タンパク質の1つである **RCC1** を用いて、**RCC1** のオーバーラッピングダイヌクレオソームに対する結合をゲルシフト解析によって試験した。その結果、オーバーラッピングダイヌクレオソームでは、通常のダイヌクレオソームと比較して **RCC1** の結合が著しく低下していた。この結果から、**acidic patch** に結合するタンパク質のオーバーラッピングダイヌクレオソームに対する結合能は、通常のダイヌクレオソームと異なることが示された。最後に、ヌクレオソームに対するリンカーヒストン **H1** の結合を解析したところ、通常のダイヌクレオソームには2分子の **H1** が結合するのに対し、オーバーラッピングダイヌクレオソームでは、1分子の **H1** が結合することを示した。また、**footprinting** 解析によって、**H1** がオクタソームユニットの二回対象軸付近の DNA 領域の近傍に結合していることを示唆する結果を得た。

「4章 総合討論」では、本研究によって行われた構造生物学的および生化学的解析から、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成機構や、その機能について考察した。

早稲田大学 博士（理学）

学位申請 研究業績書

氏名 加藤 大貴 印

(2017年10月 現在)

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	○ <u>Daiki Kato</u> , Akihisa Osakabe, Yasuhiro Arimura, Yuka Mizukami, Naoki Horikoshi, Kazumi Saikusa, Satoko Akashi, Yoshifumi Nishimura, Sam-Yong Park, Jumpei Nogami, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Atsushi Matsumoto, Hidetoshi Kono, Rintaro Inoue, Masaaki Sugiyama, Hitoshi Kurumizaka Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. <i>Science</i> , 356 , pp205-208, 2017.
講演	<学会発表> 国際学会（ポスター発表） ○ <u>Daiki Kato</u> , Akihisa Osakabe, Fumiya Adachi, Yuka Mizukami, Yasuhiro Arimura, Kazumi Saikusa, Satoko Akashi, Yoshifumi Nishimura, Sam-Yong Park, Atsushi Matsumoto, Hidetoshi Kono, Rintaro Inoue, Masaaki Sugiyama, Hitoshi Kurumizaka Structural analysis of unusual form of nucleosome. Colorado Chromatin Meeting, 2016, August. 国際学会（ポスター発表） <u>Daiki Kato</u> , Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Hiroki Tanaka, Hitoshi Kurumizaka Histone chaperone tNASP promotes nucleosome assembly with H3.3. International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 2015, August. 国内発表（ポスター発表） ○加藤大貴、越阪部晃永、足立風水也、水上優夏、有村泰宏、七種和美、明石知子、西村善文、朴三用、松本淳、河野秀俊、井上倫太郎、杉山正明、胡桃坂仁志 特殊なヌクレオソームの立体構造解析 第39回日本分子生物学会年会、2016年12月 国内発表（ポスター発表） 加藤大貴、越阪部晃永、明石知子、胡桃坂仁志 新生ヒストンの貯蔵に関わるヒストンシャペロン-ヒストン複合体（NASP-Asf1-H3-H4複合体）の機能解析 第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016年5月 国内発表（ポスター発表） 加藤大貴、越阪部晃永、明石知子、胡桃坂仁志 新生ヒストンの貯蔵に関与するヒストンシャペロン-ヒストン複合体の機能解析 第33回染色体ワークショップ・第14回核ダイナミクス研究会、2016年1月

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 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）
日本語 総説	<p><著書> 胡桃坂仁志、○加藤大貴、越阪部晃永 実験医学 担当：オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造と形成機構（pp2381-2384） 羊土社、2017年8月</p> <p><ウェブサイト> ○加藤大貴、越阪部晃永、胡桃坂仁志 オーバーラッピングジヌクレオソームのX線結晶構造解析 ライフサイエンス 新着論文レビュー、2017年5月 http://first.lifesciencedb.jp/archives/16431</p>
その他	<p><論文> Yoshifumi Amamoto, Yuki Aoi, Nozomu Nagashima, Hiroki Suto, Daisuke Yoshidome, Yasuhiro Arimura, Akihisa Osakabe, <u>Daiki Kato</u>, Hitoshi Kurumizaka, Shigehiro A. Kawashima, Kenzo Yamatsugu, Motomu Kanai Synthetic Posttranslational Modifications: Chemical Catalyst-Driven Regioselective Histone Acylation of Native Chromatin. <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, 139, pp7568-7576, 2017.</p> <p>Yuya Suzuki, Naoki Horikoshi, <u>Daiki Kato</u>, Hitoshi Kurumizaka Crystal structure of the nucleosome containing histone H3 with crotonylated lysine 122. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>, 469, pp483-489, 2016.</p> <p><u>Daiki Kato</u>, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Hiroki Tanaka, Hitoshi Kurumizaka Human tNASP promotes in vitro nucleosome assembly with histone H3.3. <i>Biochemistry</i>, 54, pp1171-1179, 2015.</p>