

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

2018年2月

加藤 大貴

Daiki KATO

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

2018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

加藤 大貴

Daiki KATO

# 目次

## 1 章 序論

- 1.1 真核生物のクロマチン
- 1.2 コアヒストン・ヌクレオソーム
- 1.3 リンカーヒストン
- 1.4 サブヌクレオソーム
- 1.5 オーバーラッピングダイヌクレオソーム
- 1.6 本研究について

## 2 章 実験材料・方法

- 2.1 コアヒストンの精製
- 2.2 リンカーヒストン H1 の精製
- 2.3 ヒストンシャペロン Nap1 の精製
- 2.4 RCC1 の精製
- 2.5 ヒストン複合体の精製
- 2.6 DNA の精製
- 2.7 ヌクレオソーム、オーバーラッピングダイヌクレオソームの精製
- 2.8 オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶構造解析
  - 2.8.1 試料の調製
  - 2.8.2 結晶化
  - 2.8.3 X 線回折実験
  - 2.8.4 構造解析
- 2.9 RCC1 の結合解析

2.10 ヒストン H1 の結合解析

2.10.1 ゲルシフト解析

2.10.2 スクロース密度勾配を用いた超遠心解析

2.11 footprinting 解析

### 3 章 結果

3.1 オーバーラッピングダイヌクレオソームの精製

3.2 オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶化

3.3 オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造決定

3.4 オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造解析

3.5 オーバーラッピングダイヌクレオソームの変異体解析

3.6 オーバーラッピングダイヌクレオソームに対する RCC1 の結合解析

3.7 オーバーラッピングダイヌクレオソームに対する H1 の結合解析

3.8 研究結果のまとめ

### 4 章 総合討論

4.1 オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成機構

4.2 オーバーラッピングダイヌクレオソームの機能

4.3 今後の展望

### 5 章 引用文献

謝辞

研究業績

## 略語一覽

AFM	atomic force microscope
ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
NMR	nuclear magnetic resonance
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PDB	protein data bank
PEG	polyethylene glycol
PGA	polyglutamic acid
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBE	tris-borate-EDTA
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

# 1 章 序論

## 1.1 真核生物のクロマチン

真核生物の遺伝情報は、ゲノム DNA 上に刻まれている。ゲノム DNA は、細胞核内において、ヌクレオソームを基盤構造としたクロマチンを形成することで、コンパクトに収納されている。ヌクレオソームは、ヒストンと呼ばれる塩基性のタンパク質と DNA の複合体であり、直径約 10 nm の円盤状の構造を形成している (Figure 1A)。

クロマチンは、ゲノム DNA を細胞核内に収納するためだけの構造体ではなく、その構造を動的に変換させることで、複製、転写、組換え、修復などの生体内機能を制御している (Luger *et al.*, 2012)。例えば、密に凝集されたクロマチン領域であるヘテロクロマチンでは、一般的に転写が抑制され、疎なクロマチン領域であるユークロマチンでは、転写が活性化されていることが考えられている (Grewal *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2007; Beisel *et al.*, 2011)。また、近年では、空間的に近接したクロマチン領域同士で、多様なドメイン構造を形成し、DNA 上で生じる生体内機能を制御していることなども知られている (Nora *et al.*, 2012; Tanay *et al.*, 2013; Dixon *et al.*, 2016)。さらに、RNA ポリメラーゼや転写因子などが集積した transcription factory と呼ばれる領域で、協調的に DNA の転写制御が行われているモデルなども提唱されている (Iborra *et al.*, 1996; Sutherland *et al.*, 2009)。これらのクロマチンの構造変換は、ヒストンの組成の違いやヒストンの翻訳後修飾の有無などによって制御されることが考えられている (Venkatesh *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2017)。

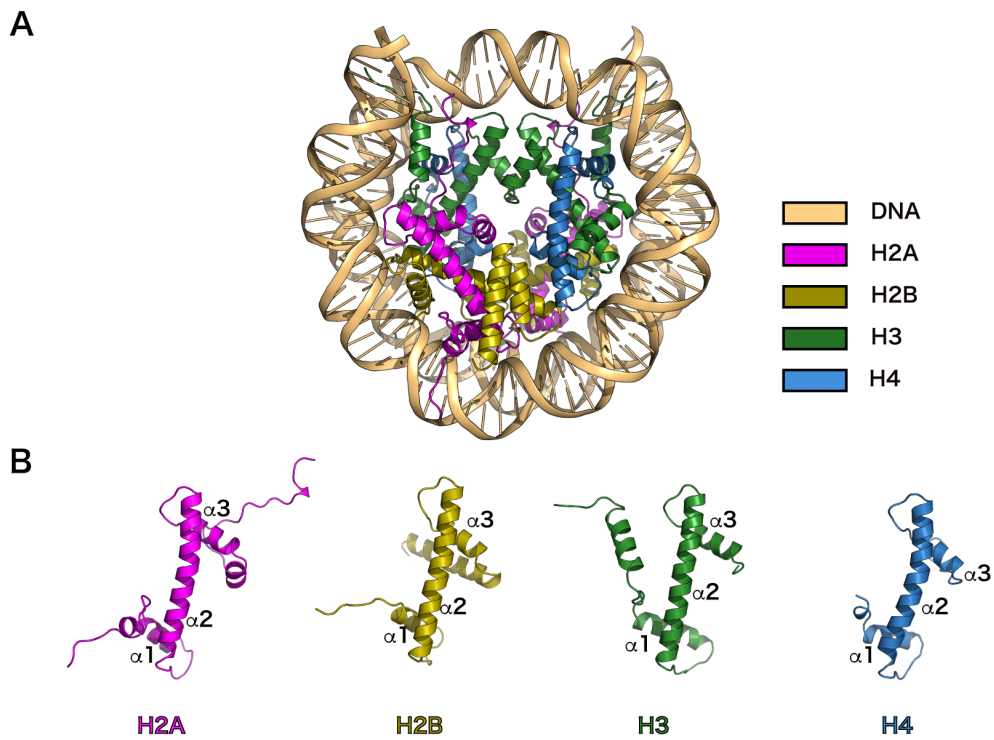
## 1.2 コアヒストン・ヌクレオソーム

ヒストンは、塩基性のアミノ酸に富んだタンパク質であり、コアヒストンとリ

ンカーヒストンの2種に大別される。コアヒストンは、ヌクレオソームを構成するタンパク質群であり、H2A、H2B、H3、H4の4種が存在する。H4を除く各ヒストンには、生体内に広く存在する通常型のヒストンと比較して数アミノ酸の違いを有するヒストンの亜種、ヒストンバリエントが存在する (Talbert *et al.*, 2012; Kurumizaka *et al.*, 2013)。また、各ヒストンは、メチル化やアセチル化などの翻訳後修飾を受けることが知られている (Tessarz *et al.*, 2014)。それぞれのコアヒストンは、3つの $\alpha$ ヘリックスからなるヒストンフォールドドメインを有している (Luger *et al.*, 1997) (Figure 1B)。このヒストンフォールドドメイン間の相互作用によって、H2AはH2Bと、H3はH4と、それぞれヘテロ2量体を形成する。ヌクレオソームの形成の際は、1) DNAと各2分子ずつのH3、H4からなるテトラソームの形成、2) テトラソームへの2組のH2A-H2Bヘテロ2量体の取り込み、の計2ステップによって形成されることが考えられている (Luger *et al.*, 2012)。これにより、ヒストン8量体に約150塩基対のDNAが1.65回転巻きついたヌクレオソーム構造が形成される (Figure 1A)。また、これらのプロセスは、生体内において、ヒストンシャペロンが担っていると考えられている。ヒストンシャペロンは、ヌクレオソームの形成を触媒するタンパク質群であり、これまでに多種のヒストンシャペロンが報告されている。ヒストンシャペロンによるヒストンの使い分けが、クロマチン上におけるヒストンの取り込み部位を規定する一因となることが知られている (Burgess *et al.*, 2013; Hammond *et al.*, 2017)。例えば、ヒストンシャペロンであるHIRAやDAXXは、H3.3という転写の際やテロメアなどに取り込まれることが知られるヒストンバリエントのヒストンシャペロンであることが知られる (Burgess *et al.*, 2013; Hammond *et al.*, 2017)。このようにして形成されたヌクレオソームは、ヒストンバリエントの取り込みや、ヒストンの翻訳後修飾の有無、サブヌクレオソーム

(通常のヌクレオソームとヒストン含量などの異なるヌクレオソーム)の形成や、核内タンパク質のヌクレオソームへの結合などの要因によって、その構造や安定性などを変化させ、DNAの機能発現を制御することが知られる (Taguchi *et al.*, 2014; Venkatesh *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2017)。また、ヌクレオソームは、様々な核内タンパク質の足場として機能することが知られている。特に、ヌクレオソーム中の H2A、H2B から構成される acidic patch と呼ばれる領域は、多種の核内タンパク質の足場として機能することが知られている (Kalashnikova *et al.*, 2013)。これまで、7種のタンパク質やペプチドが acidic patch に結合した複合体の立体構造解析がなされてきた。これらの構造から、アルギニン残基を介して acidic patch と結合する共通の機構を有していることがわかってきた (McGinty *et al.*, 2016; Lesbats *et al.*, 2017) (Figure 2)。また、acidic patch には、近接するヌクレオソームの H4 の N 末端テール領域が結合することも知られており、高次のクロマチンの折りたたみ構造の形成にも寄与していると考えられている (Luger *et al.*, 1997; Kalashnikova *et al.*, 2013)。

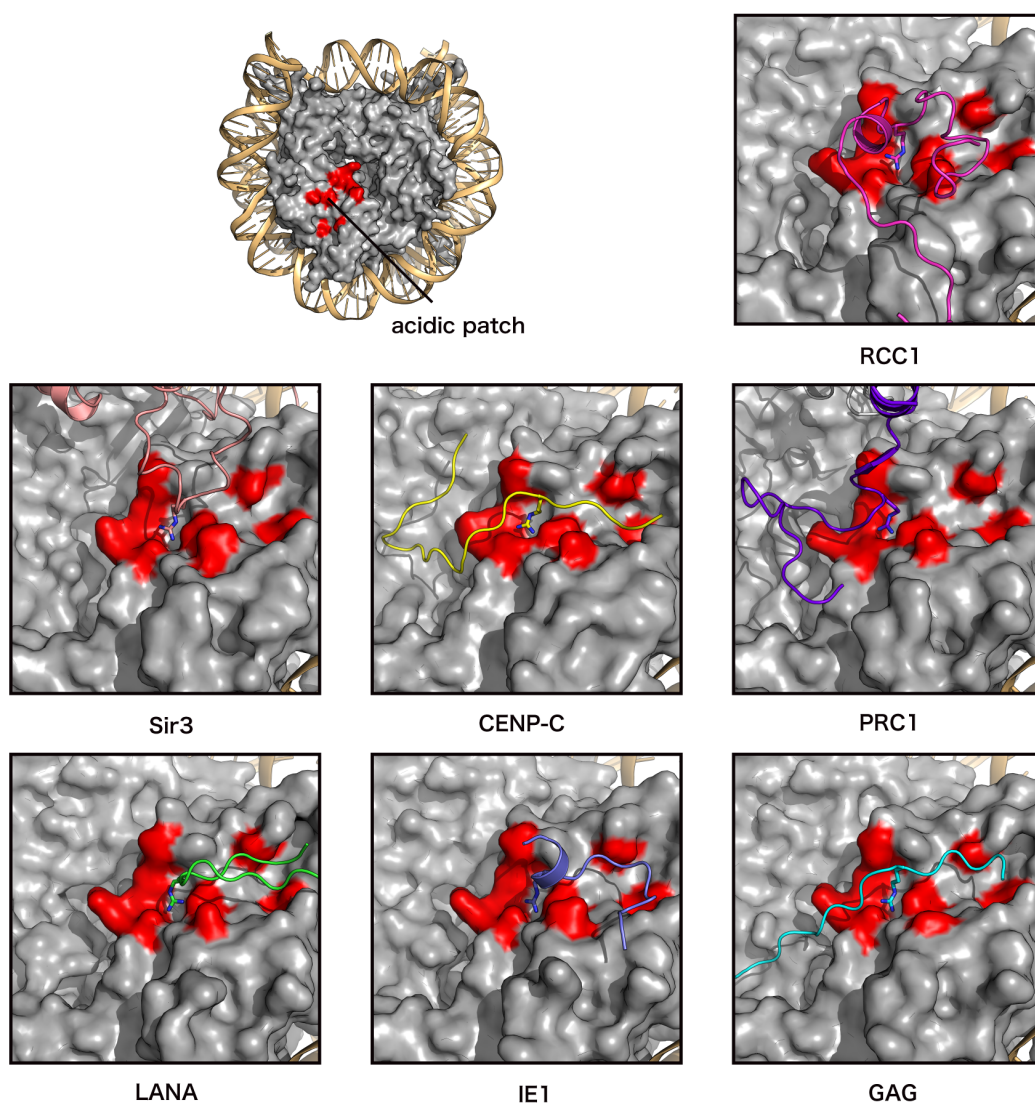




**Figure 1** ヌクレオソームの立体構造

**A.** ヌクレオソーム (PDB ID: 3AFA) の立体構造。肌色は DNA を示している。ピンク、黄色、緑、青はそれぞれ H2A、H2B、H3、H4 を示している (Tachiwana *et al.*, 2010)。

**B.** ヌクレオソーム中のヒストンの立体構造。4 種のヒストンは、それぞれ 3 つの  $\alpha$ ヘリックス ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ) からなるヒストンフォールドドメインを有する。図は、ヌクレオソームの構造情報 (PDB ID: 3AFA) から、ヒストンの情報を抽出して作製した。



**Figure 2** ヌクレオソームの acidic patch

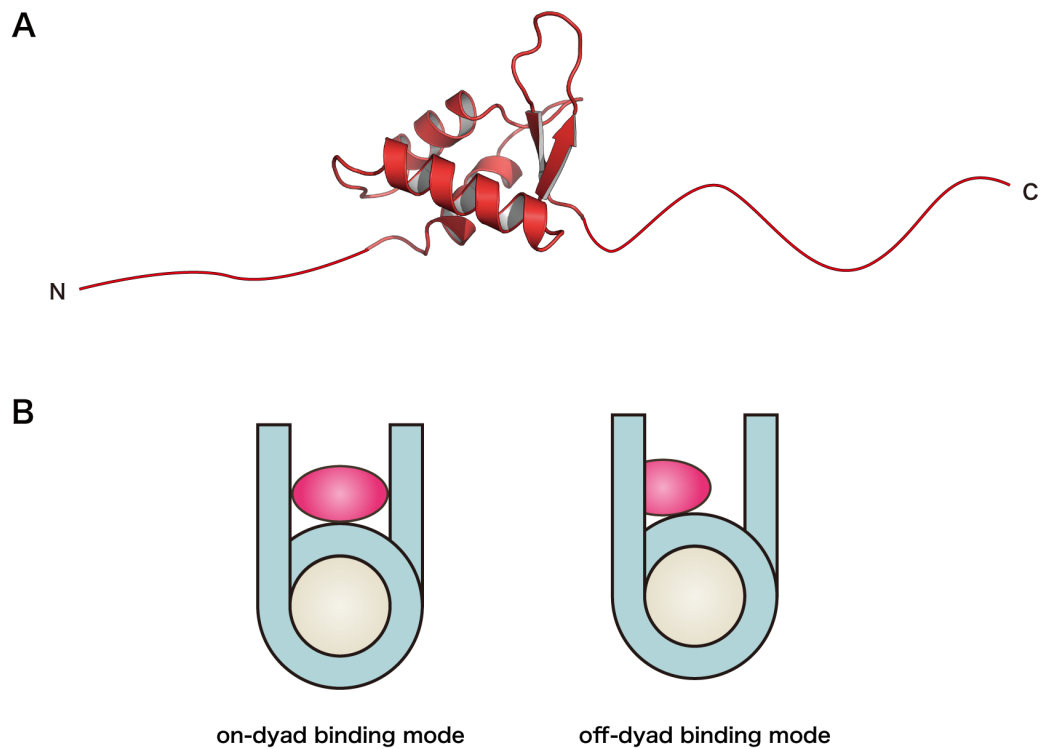
ヌクレオソームと acidic patch 結合タンパク質との立体構造。左上のパネルは、acidic patch の部位をヌクレオソームの立体構造上に示した図 (PDB ID: 3AFA)。赤は、acidic patch を形成するアミノ酸を示している (McGinty *et al.*, 2016)。マゼンタは RCC1 (PDB ID: 3MVD)、薄いピンクは Sir3 (PDB ID: 3TU4)、黄色は CENP-C (PDB ID: 4X23)、紫は PRC1 (PDB ID: 4R8P)、緑は LANA (PDB ID: 1ZLA)、青は IE1 (PDB

ID: 5E5A)、水色は GAG (PDB ID: 5MLU) を示している (Makde *et al.*, 2010; Armache *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2013; McGinty *et al.*, 2014; Barbera *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2016; Lesbats *et al.*, 2017)。RCC1 と PRC1 は acidic patch との結合に重要なループ領域近傍のみを表示した。また、acidic patch との結合に重要なアルギニン側鎖を stick 表示で示した。

### 1.3 リンカーヒストン

ヌクレオソーム間をつなぐリンカーDNAの領域と、ヌクレオソームDNAの中心領域近辺の *dyad axis* と呼ばれる領域には、リンカーヒストンが結合する。リンカーヒストン H1 は、N 末テール領域、球状ドメイン、C 末テール領域の 3 つの領域からなる塩基性のタンパク質である (Lyubitelev *et al.*, 2016) (Figure 3A)。ヌクレオソームに H1 が結合することによって、クロマチンが凝縮し、転写や組換えなどが抑制されることが考えられている (Flanagan *et al.*, 2016)。1993 年にリンカーヒストンの結晶構造解析がなされていたが、リンカーヒストン-ヌクレオソーム複合体の立体構造は、その後約 20 年間明らかにならなかった (Ramakrishnan *et al.*, 1993)。しかし、2013 年に、NMR を用いたリンカーヒストンとヌクレオソームの詳細な結合解析がなされて以降 (Zhou *et al.*, 2013)、ここ数年で、3 報、リンカーヒストン-ヌクレオソーム複合体の立体構造が報告された (Song *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015; Bednar *et al.*, 2017)。これらの構造から、球状ドメインがヌクレオソーム DNA の *dyad axis* の中心部に結合する *on-dyad binding mode* と中心から少し離れた位置に結合する *off-dyad binding mode* の 2 つの結合パターンが存在することが明らかになっている (Figure 3B)。これらの結合モードの違いは、リンカーヒストンのサブタイプや生物種の違いに由来するアミノ酸配列の違いに起因することが明らかになりつつある (Zhou *et al.*, 2016; Bednar *et al.*, 2017)。さらに、H1 の C 末端がリンカーDNA との結合に重要であるとの報告もある (Caterino *et al.*, 2011)。また、生体内におけるヌクレオソーム上へのリンカーヒストンの結合は、ヒストンシャペロンによって触媒されると考えられている。これまでに、リンカーヒストンのヒストンシャペロンとして、Nap1、NASP、TAF-1 が知られている (Richardson *et al.*, 2000; Shintomi *et al.*, 2005; Kepert *et al.*, 2005;

Richardson *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2011)。これらのヒストンシャペロンは、H1 と直接結合し、ヌクレオソームに対する H1 の特異的な結合を補助していることが考えられている。



**Figure 3** リンカーヒストンの構造とヌクレオソーム結合

**A.** リンカーヒストンのモデル。リンカーヒストンは、球状ドメインと N 末と C 末にテール領域を有する。球状ドメインは、既知のリンカーヒストンの結晶構造 (PDB ID: 1HST) を用いて作図した (Ramakrishnan *et al.*, 1993)。

**B.** ヌクレオソームに対する H1 の球状ドメインの結合の様子。on-dyad binding mode と off-dyad binding mode の 2 種の結合様式が知られる。赤は、H1 を示している。

## 1.4 サブヌクレオソーム

生体内に広く存在するヌクレオソームは、ヒストン 8 量体に DNA が左巻きに 1.65 回転巻きついたオクタソーム構造である。一方、生体内には、サブヌクレオソームと呼ばれる通常のヌクレオソームと比較してヒストンの含量や、DNA の巻きつき方の異なるヌクレオソーム構造が形成されることが示唆されていた (Zlatanova *et al.*, 2009; Luger *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2017)。特に、ヒストン含量が通常のヌクレオソーム (オクタソーム) と異なるヌクレオソームについて、ヘキサソーム、テトラソーム、ヘミソームなどが知られている。ヘキサソームは各 2 分子ずつの H3 と H4、各 1 分子ずつの H2A と H2B を含む複合体、テトラソームは H3 と H4 のみを 2 分子ずつ含む複合体、ヘミソームは各 1 分子ずつの H2A、H2B、H3、H4 からなる複合体である (Figure 4)。特に、テトラソームやヘキサソームは、ヌクレオソーム形成の際の中間体として、形成されていることが考えられている (Luger *et al.*, 2012)。さらに、ヘキサソームは、RNA ポリメラーゼによる転写の際に H2A、H2B が解離することで形成される可能性や、ヒストンシャペロン、クロマチンリモデリング因子に依存した H2A、H2B の除去によって、形成される可能性が示唆されている (Kireeva *et al.*, 2002; Zlatanova *et al.*, 2009; Clapier *et al.*, 2017; Lai *et al.*, 2017)。また、ヘミソームは、染色体の狭窄部位であるセントロメアで、形成されることが考えられている (Lavelle *et al.*, 2007; Zlatanova *et al.*, 2009)。さらに、各 4 分子の H3 と H4、各 3 分子の H2A と H2B に DNA が巻きついた複合体についてもその存在が示唆されている (Engelholm *et al.*, 2009)。本研究では、この複合体をオーバーラッピングダイヌクレオソームと呼んでいる。さらに、通常のヌクレオソームは、DNA が左巻きに巻きついているのに対し、DNA が右巻きに巻きついたリバーソームなども報告されている (Zlatanova *et al.*, 2009)。

しかし、これらサブヌクレオソーム構造は、通常のおクタソームを形成するヒストンと、そのアミノ酸配列が同一であるため、その細胞内での解析が困難であった。故に、ヒストンの翻訳後修飾や、ヒストンバリエーションなどの機能解析と比較して、その知見があまり蓄積されていない。近年の次世代シーケンサーの技術進歩により、生体内におけるサブヌクレオソームの解析が可能になりつつあり、転写開始点直下の+1ヌクレオソームと呼ばれるヌクレオソームがサブヌクレオソームを形成している可能性などが示唆されている (Rhee *et al.*, 2014)。



	H2A	H2B	H3	H4
ヘキサソーム	1分子	1分子	2分子	2分子
テトラソーム	0分子	0分子	2分子	2分子
ヘミソーム	1分子	1分子	1分子	1分子
オーバーラッピング ダイヌクレオソーム	3分子	3分子	4分子	4分子

**Figure 4** オクタソームとヒストン含量の異なるサブヌクレオソームのヒストン含量

通常のヌクレオソーム（オクタソーム）とヒストン含量の異なる各種サブヌクレオソームに含まれるヒストン量を表した。

## 1.5 オーバーラッピングダイヌクレオソーム

ゲノム DNA 上では、クロマチンリモデリング因子と呼ばれるタンパク質群によって、ヌクレオソームの再配置が起こることが知られる。クロマチンリモデリング因子は、ATP 依存的にゲノム上でのヌクレオソームの再配置を起こすタンパク質群であり、SWI/SNF、ISWI、CHD、INO80 という 4 つのファミリーに分類される (Tyagi *et al.*, 2016; Clapier *et al.*, 2017)。各ファミリーは、それぞれに特有のドメインを介してヒストンの翻訳後修飾などを認識することで、特定のクロマチン領域におけるヌクレオソームの形成部位を調節している。例えば、SWI/SNF は、N 末に DNA 結合ドメインである HSA ドメイン、C 末にアセチル化されたヒストンテール領域を認識できるプロモドメインを有しているクロマチンリモデリング因子であり、ヌクレオソームの DNA 上での形成位置を移動させたり、ヒストンの除去を行ったりすることで、転写の促進、抑制に関与する。また、ISWI は、C 末領域に HAND、SANT、SLIDE の 3 つのドメインを有しており、未修飾のヒストンのテール領域や、リンカー DNA などと結合し、ヌクレオソーム間の間隔の調整などに寄与している (Volkh *et al.*, 2016; Tyagi *et al.*, 2016)。これらクロマチンリモデリング因子の使い分けなどによって、生体内でのヌクレオソームの形成部位が制御され、転写の制御や、DNA の修復などが行なわれている。

クロマチンリモデリングの過程において、ヌクレオソームの再配置が生じる際、再配置されたヌクレオソームが隣のヌクレオソームと衝突し、各 4 分子の H3 と H4、各 2 分子の H2A と H2B に DNA が巻きついたオーバーラッピングダイヌクレオソームが形成されることが示唆されていた (Ulyanova *et al.*, 2005; Engeholm *et al.*, 2009)。また、先行研究において、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されることが示されていた (Engeholm *et al.*, 2009)。この系では、「601 配列」と呼ば

れる強固にヒストンと結合することが可能な 147 塩基対の DNA 配列を短くした 125 塩基対の DNA 配列を組み合わせることによって、250 塩基対の DNA を設計し、オーバーラッピングダイヌクレオソームを再構成していた。また、SWI/SNF サブ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試験管内で再構成される可能性についても示唆されていた。さらに、この複合体には、各 4 分子の H3 と H4、各 3 分子の H2A、H2B が含まれることが示されていた。また、AFM を用いた解析からその概形が観察されていたものの、立体構造についての詳細は不明なままであった (Engeholm *et al.*, 2009)。

## 1.6 本研究について

クロマチンリモデリングの過程で、再配置されたヌクレオソームが隣のヌクレオソームと衝突し、オーバーラッピングダイヌクレオソームが形成されることが示唆されていた (Ulyanova *et al.*, 2005; Engeholm *et al.*, 2009)。また、この複合体が試験管内において、再構成可能であることが示されていた。一方、その構造や、機能などについては、未だに明らかになっていなかった。

本研究においては、クロマチンの構造に依存した DNA の機能発現機構を明らかにするため、クロマチンリモデリングの過程で形成されると考えられる特殊な染色体構造に着目し、その構造生物学的、生化学的な解析を行った。まず、リコンビナントタンパク質として、ヒトヒストンタンパク質 (H2A、H2B、H3、H4) を発現、精製した。また、オーバーラッピングダイヌクレオソームの再構成に用いる DNA を精製した。さらに、これらの試料を用いて、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、精製した。精製した試料を用いて、オーバーラッピングダイヌクレオソームの結

晶化を行った。得られた結晶について、SPRING-8 を用いた X 線回折実験を行い、3.14 Å の分解能でオーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造を決定した。決定し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、ヒストン 6 量体に DNA が巻きついたヘキサソーム構造とヒストン 8 量体の DNA が巻きついたオクタソーム構造が重なり合い、ヒストン 14 量体に対して DNA が左巻きに 3 回転巻きついた特殊な構造体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に対するリンカーヒストン H1 の結合解析を行った。その結果、オーバーラッピングダイヌクレオソームには、1 つの H1 が結合可能であることが明らかとなった。これらの結果をもとに、オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造と機能について考察した。

## 2 章 実験材料・方法

### 2.1 コアヒストンの精製

ヒトのコアヒストンは、引用文献(Tanaka *et al.*, 2004; Tachiwana *et al.*, 2010)の方法をもとに発現、精製を行った。タンパク質の発現用プラスミドは、ヒトの H2A、H2B、H3.1、H4 をコードする DNA 配列を含む pH2A、pH2B、pH3.1、および pH4 を用いた。このプラスミドを用いて発現されたヒストンタンパク質は、その N 末端に His<sub>6</sub>-tag と thrombin protease の認識配列を有しており、タグの切断が可能となっている。thrombin protease によるタグの切断後は、ヒストンの N 末端に GSHM の 4 アミノ酸が付加される。pH2A、pH2B、pH3.1 は大腸菌 BL21 (DE3) 株、pH4 は大腸菌 JM109 (DE3) 株にそれぞれ導入し、形質転換した。100 µg/ml のアンピシリンを含むプレート上にて、コロニーを形成させた後、回収した菌体を 50 µg/ml のアンピシリンを含む LB 培地に植菌し、37°C で一晚培養した。集菌した菌体をバッファー1 (50 mM Tris-HCl (pH8.0) , 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5% glycerol) で懸濁した後、超音波破碎した。不溶性画分をバッファー2 (50 mM Tris-HCl (pH8.0) , 500 mM NaCl, 7 M guanidine hydrochloride, 5% glycerol) によって変性させた。変性させた試料を 39,191xg で 20 分間遠心分離し、上清を回収した。回収した上清を Ni-NTA アガロースビーズ (QIAGEN) と 4°C で 1 時間混合し、ヒストンタンパク質を吸着させ、バッファー3 (50 mM Tris-HCl (pH8.0) , 500 mM NaCl, 6 M urea, 5% glycerol, 5 mM imidazole) を用いて洗浄することで、大腸菌由来の夾雑物を取り除いた。その後、5-500 mM imidazole の直線濃度勾配によってヒストンを溶出した。得られたヒストンタンパク質をバッファー4 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 2 mM 2-mercaptoethanol) に透析した後、ヒストン 1mg あたり 0.1-1 U の thrombin protease を加え、室温で 3 時間転

倒混和し、タグを切断した。SDS-PAGEによって、タグの切断を確認した後、バッファ5 (20 mM sodium acetate (pH 5.2) , 200 mM NaCl, 6 M urea, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA) とバッファ6 (20 mM sodium acetate (pH 5.2) , 900 mM NaCl, 6 M urea, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA) を用いた MonoS (GE Healthcare) イオンカラムクロマトグラフィーによって、精製を行った。得られた試料は、2 mM 2-mercaptoethanol 溶液に透析した後、凍結乾燥し、パウダーとして回収した。

## 2.2 リンカーヒストン H1 の精製

ヒトのリンカーヒストン H1 を先行研究 (Machida *et al.*, 2014) の方法を用いて精製した。ヒトのリンカーヒストン H1.1 をコードする DNA 配列を pET21a vector (Novagen) に組み込んだプラスミドを発現系に用いた。コードされた H1 の C 末には PreScission protease の認識配列、SUMO-tag および His<sub>6</sub>-tag が付加される。発現用プラスミドを BL21-CodonPlus (DE3) -RIL 株 (Stratagene) に導入し、形質転換を行った。形質転換した大腸菌を 100 µg/ml のアンピシリン、および 35 µg/ml のクロラムフェニコールを含む LB 培地で 30°C にて培養した。OD<sub>600</sub> 値が 0.4 を超えた後、0.5 mM の IPTG を加え、18°C で一晩培養した。集菌した菌体をバッファ1 (50 mM Tris-HCl (pH8.0) , 500 mM NaCl, 10 % glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol) を加えて懸濁し、超音波破碎した。39,191xg にて 20 分間遠心分離を行った後、上清を Ni-NTA アガロースビーズ (QIAGEN) と混合し、4°C で 1 時間吸着させた。バッファ2 (50 mM Tris-HCl (pH8.0) , 500 mM NaCl, 10 % glycerol, 5 mM imidazole, 2 mM 2-mercaptoethanol) でレジンを洗浄後、5-500 mM imidazole の直線濃度勾配によっ

て、H1 を溶出した。回収した試料 1 mg に対し、7 U の PreScission protease を加え、バッファー3 (20 mM Tris-HCl (pH8.0) , 100 mM NaCl, 10 % glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol) に 4°C で一晩透析した。SDS-PAGE によってタグの切断を確認した後、バッファー4 (20 mM Tris-HCl (pH8.0) , 350 mM NaCl, 10 % glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol)、バッファー5 (20 mM Tris-HCl (pH8.0) , 2 M NaCl, 10 % glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol) を用いた MonoS (GE Healthcare) イオン交換カラムクロマトグラフィーによって、H1 を精製し、バッファー3 に透析した後、-80°C にて凍結保存した。

### 2.3 ヒストンシャペロン Nap1 の精製

ヒトの Nap1 について先行研究 (Tachiwana *et al.*, 2008) の方法を参考に精製した。プラスミドは、pET15b vector (Novagen) の thrombin protease 認識配列をコードする DNA 配列を PreScission protease のものに置換したベクターにヒトの Nap1 をコードする DNA 配列を導入したプラスミドを用いた。形質転換した Rosetta-gami B (DE3) 株 (Novagen) を、100 µg/ml のアンピシリンを含む LB 培地にて 37°C で培養した。OD<sub>600</sub> 値が 0.4 を超えたところで 0.5 mM IPTG を加え、Nap1 の発現誘導を行った。18°C で一晩培養し、集菌した菌体をバッファー1 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1mM PMSF) で溶解し、超音波破碎した。可溶性画分を Ni-NTA アガロースビーズ (QIAGEN) に吸着させ、バッファー2 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1mM PMSF) で洗浄した。20-300 mM imidazole の直線濃度勾配によって Nap1 を溶出し、回収した試料 1 mg に 3 U の PreScission protease を加え、バッファー3 (50 mM Tris-HCl (pH

7.5) , 1mM PMSF, 2 mM 2-mercaptoethanol) に 4°Cで一晩透析した。SDS-PAGE に よってタグの切断を確認した後、バッファー4 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 1 mM PMSF, 2 mM 2-mercaptoethanol, 150 mM KCl)、バッファー5 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 1 mM PMSF, 2 mM 2-mercaptoethanol, 600 mM KCl) を用いた MonoQ (GE Healthcare) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって精製した。溶出された試料について、バッファー4 を用いた Superdex200 (GE Healthcare) ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行い、再度 MonoQ イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。最後に、Nap1 をバッファー6 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 0.5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol) に透析し、-80°Cにて凍結保存した。

## 2.4 RCC1 の精製

ヒトの RCC1 (22-421) をコードする DNA 配列を pGEX-6P-1vector (GE Healthcare) に挿入したプラスミドを用いて、RCC1 の発現、精製を行った。このプラスミドを用いて発現させたタンパク質は、その N 末端に glutathione S-transferase (GST) と PreScission protease の認識配列が付加される。プラスミドを導入した BL21 (DE3) 株を 100 µg/ml のアンピシリンを含む LB 培地で培養し、0.5 mM IPTG を加えることによって、発現誘導をした。回収した菌体をバッファー1 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol) で溶かし、超音波破碎した。39,191xg で 20 分間遠心分離を行った後の上清を Glutathione Sepharose 4B ビーズ (GE Healthcare) と 4°C で 1 時間混和した。ビーズをエコノカラム (Bio-Rad) に詰め、バッファー2 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 150 mM NaCl,



10% glycerol, 1 mM EDTA, and 2 mM 2-mercaptoethanol) で洗浄した。洗浄後、ビーズを回収し、373 U の PreScission protease を加え、4°C で一晩転倒混和し、タグを切断した。その後、ビーズを再びエコノカラム (Bio-Rad) に詰め、バッファー3 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol) で溶出した。溶出された RCC1 について、バッファー4 (30 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 500 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol) を用いた Superdex200 (GE Healthcare) カラムクロマトグラフィーを行った。精製された RCC1 は、限外濾過によって濃縮し、-80°C で凍結保存した。

## 2.5 ヒストン複合体の精製

ヒストン 8 量体の再構成と精製は、先行研究 (Tachiwana *et al.*, 2010) を参考にした。H2A、H2B、H3.1、H4 のパウダーを等モル比になるように混合し、総ヒストン濃度が 1.5 mg/ml になるようにバッファー1 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 7 M guanidine hydrochloride, 20 mM 2-mercaptoethanol) で溶解した。4°C で 2 時間混和した後、バッファー2 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol) に透析した。その後、Superdex200 (GE Healthcare) ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって、精製した。8 量体の画分を回収し、-80°C にて凍結保存した。

## 2.6 DNA の精製

ヌクレオソーム、オーバーラッピングダイヌクレオソームの再構成に用いる DNA、および 2.11 の footprinting 解析に用いた DNA は先行研究 (Dyer *et al.*, 2004;

Osakabe *et al.*, 2015) の方法をもとに精製した。目的の DNA 配列をタンデムに並べた DNA 配列を pGEM-T Easy vector (Promega) に挿入したプラスミドを調製した。調製したプラスミドを導入した DH5 $\alpha$ 株 (TOYOBO) を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンを含むプレート上で一晩培養し、得られたコロニーを 5 mL の 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む TB 培地で 37 $^{\circ}\text{C}$ にて 4 時間培養した。その後、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む 2 x TY 培地に移し、4 時間培養した。さらに、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む TB 培地にて一晩培養した。集菌した菌体を 90 ml のバッファー1 (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH8.0) , 10 mM EDTA) を用いて懸濁し、180 ml のバッファー2 (0.2 N NaOH, 1% SDS) を加えて、氷上で 30 分間静置した。次に、315 ml のバッファー3 (4 M potassium acetate, 2 N acetic acid) を加え、20 分間氷上で静置した。その後、10,000xg で 30 分間遠心分離を行い、上清をミラクロス (Merck Millipore) で濾過した。得られた溶液に 300 ml の 2-propanol を加え、1 時間室温で静置した。10,000xg で 30 分間遠心分離を行った後、沈殿を TE 10/50 (10 mM Tris-HCl (pH7.5) , 50 mM EDTA) に溶かし、RNase を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。その後、フェノール・クロロホルム抽出を行い、溶液中のタンパク質を除去した 20 ml の試料に対して、3.1 ml の 5 M NaCl および 7.7 ml の 40 % PEG-6,000 を加え、氷上で 30 分間静置した。39,191xg で 30 分間遠心分離を行った後の沈殿を 20 ml の TE 10/0.1 (10 mM Tris-HCl (pH7.5) , 0.1 mM EDTA) で溶かした。目的の DNA 配列の両端は *EcoRV* の認識配列になっているため、*EcoRV* で切断することによって、目的の DNA 断片を得ることができる。そこで、*EcoRV* を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩静置することで、プラスミドから目的の DNA 断片を切り出した。その後、25 ml になるように TE 10/0.1 を加えた溶液に対して、3.85 ml の 5 M NaCl を加え、白濁するまで PEG-6,000 を加えた。2,300xg で

10 分間の遠心分離によって、ベクター由来の DNA 断片を沈殿させた後、上清を回収し、エタノール沈殿法によって、DNA を沈殿させ、TE 10/0.1 で溶解した。溶かした DNA を TSKgel DEAE-5PM (TOSOH) カラムに吸着させ、TE 10/0.1 で平衡化した。0-0.6 M NaCl の直線濃度勾配によって DNA を溶出し、得られた画分をエタノール沈殿法によって沈殿させた。得られた沈殿を TE 10/0.1 で溶かし、最終精製物とした。本研究では、ダイヌクレオソーム、オーバーラッピングダイヌクレオソームの再構成に用いる DNA として 4 種の DNA を (Figure 5)、footprinting 解析用のマーカー DNA として 1 種の DNA を精製した。配列は、先行研究をもとに設計した (Lowary *et al.*, 1998; Engholm *et al.*, 2009; Kujirai *et al.*, 2016)。精製した DNA の配列を以下に示す。

オーバーラッピングダイヌクレオソーム用 DNA (250 塩基対) : 5'-ATCGA GAATC  
CCGGT GCCGA GGCCG CTCAA TTGGT CGTAG ACAGC TCTAG CACCG CTTAA  
ACGCA CGTAC GCGCT GTCCC CCGCG TTTTA ACCGC CAAGG GGATT ACTCC  
CTAGT CTCCA GGCTC GAGCT CAATT GGTCG TAGAC AGCTC TAGCA CCGCT  
TAAAC GCACG TACGC GCTGT CCCCC GCGTT TTAAC CGCCA AGGGG ATTAC  
TCCCT AGTCT CCAGG CACGT GTCAG ATATA TACAT CCGAT-3'

オーバーラッピングダイヌクレオソーム用 DNA (+ リンカー DNA) (296 塩基対) :  
5'-ATCGG ACCCT ATCGC GAGCC AGGCC TGAGA ATCCC GGTGC CGAGG  
CCGCT CAATT GGTCG TAGAC AGCTC TAGCA CCGCT TAAAC GCACG  
TACGC GCTGT CCCCC GCGTT TTAAC CGCCA AGGGG ATTAC TCCCT AGTCT  
CCAGG CTCGA GCTCA ATTGG TCGTA GACAG CTCTA GCACC GCTTA AACGC

ACGTA CGCGC TGTCC CCCGC GTTTT AACCG CCAAG GGGAT TACTC CCTAG  
TCTCC AGGCA CGTGT CAGAT ATATA CATCC AGGCC TTGTG TCGCG  
AAATT CATGA T-3'

アンダーラインは、*HinfI* の切断サイトを示している。

ダイヌクレオソーム用 DNA (342 塩基対) : 5'-ATCGA GAATC CCGGT GCCGA  
GGCCG CTCAA TTGGT CGTAG ACAGC TCTAG CACCG CTAA ACGCA CGTAC  
GCGCT GTCCC CCGCG TTTTA ACCGC CAAGG GGATT ACTCC CTAGT CTCCA  
GGCAC GTGTC AGATA TATAC ATCCA GGCCT TGTGT CGCGA AATTC ATACT  
CGAGC GGACC CTATC GCGAG CCAGG CCTGA GAATC CCGGT GCCGA  
GGCCG CTCAA TTGGT CGTAG ACAGC TCTAG CACCG CTAA ACGCA CGTAC  
GCGCT GTCCC CCGCG TTTTA ACCGC CAAGG GGATT ACTCC CTAGT CTCCA  
GGCAC GTGTC AGATA TATAC ATCCG AT-3'

ダイヌクレオソーム用 DNA (+ リンカーDNA) (388 塩基対) : 5'-ATCGG ACCCT  
ATCGC GAGCC AGGCC TGAGA ATCCC GGTGC CGAGG CCGCT CAATT  
GGTCG TAGAC AGCTC TAGCA CCGCT TAAAC GCACG TACGC GCTGT CCCCC  
GCGTT TTAAC CGCCA AGGGG ATTAC TCCCT AGTCT CCAGG CACGT GTCAG  
ATATA TACAT CCAGG CCTTG TGTCG CGAAA TTCAT ACTCG AGCGG ACCCT  
ATCGC GAGCC AGGCC TGAGA ATCCC GGTGC CGAGG CCGCT CAATT  
GGTCG TAGAC AGCTC TAGCA CCGCT TAAAC GCACG TACGC GCTGT CCCCC  
GCGTT TTAAC CGCCA AGGGG ATTAC TCCCT AGTCT CCAGG CACGT GTCAG

ATATA TACAT CCAGG CCTTG TGTCG CGAAA TTCAT GAT-3'

footprinting 解析用マーカーDNA (193 塩基対): 5'-ATCGG ACCCT ATCGC GAGCC

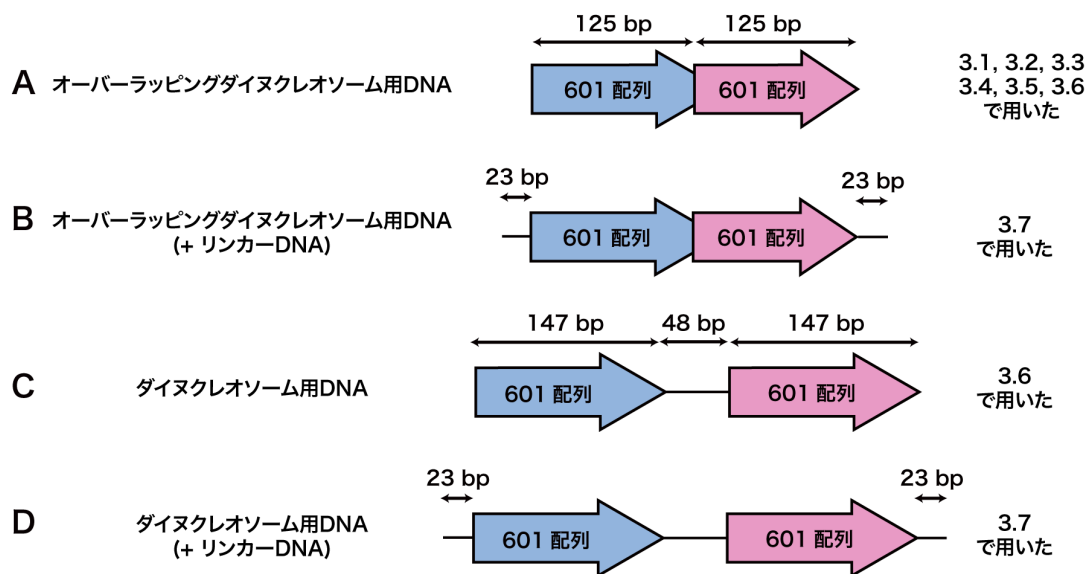
AGGCC TGAGA ATCCG GTGCC GAGGC CGCTC AATTG GTCGT AGACA

GCTCT AGCAC CGCTT AAACG CACGT ACGCG CTGTC CCCCCG CGTTT TAACC

GCCAA GGGGA TTA CT CCCTA GTCTC CAGGC ACGTG TCAGA TATAT ACATC

CAGGC CTTGT GTCGC GAAAT TCATA GAT-3'

アンダーラインは、*Hinf*I の切断サイトを示している。



**Figure 5** 設計した DNA

**A.** オーバーラッピングダイヌクレオソームの再構成に用いた DNA の模式図。右に用いた解析を示した。

**B.** 両端にリンカーDNA を含むオーバーラッピングダイヌクレオソームの再構成に用いた DNA の模式図。右に用いた解析を示した。

**C.** ダイヌクレオソームの再構成に用いた DNA の模式図。右に用いた解析を示した。

**D.** 各ヌクレオソームの両端にリンカーDNA を含むダイヌクレオソームの再構成に用いた DNA の模式図。右に用いた解析を示した。

## 2.7 ヌクレオソーム、オーバーラッピングダイヌクレオソームの精製

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は、先行研究の方法を参考に再構成、精製した (Tachiwana *et al.*, 2010)。精製した DNA 断片とヒストン 8 量体を混合し、2 M の KCl を含む 400 ml のバッファー 1 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 2 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol) に透析した。1600 ml のバッファー 2 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 250 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol) を 0.8 ml/min の流速でペリスタポンプを用いて徐々に加え、KCl 濃度を減少させた。その後、400 ml のバッファー 2 に透析した。また、ヒストンと DNA の非特異的な結合を解消させるため、55°C で 2 時間熱処理した。この試料について、分取用電気泳動装置 Prep Cell (Bio-Rad) を用いて精製した。精製後の試料は、氷上で保存した。

## 2.8 オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶構造解析

### 2.8.1 試料の調製

2.7 の方法を用いて精製したオーバーラッピングダイヌクレオソームを、結晶化用バッファー (20 mM potassium cacodylate (pH 6.0) , 1 mM EDTA) に透析した。透析後、試料を 13.6 mg/ml になるように希釈した。

### 2.8.2 結晶化

結晶化は、結晶化ロボット NT8 (FORMULATRIX) を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法によって行った。まず、70  $\mu$ l のレザーバー溶液 (100 mM potassium bromide, 100 mM potassium thiocyanate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) , 1.5% PGA-LM

(Molecular Dimensions) , 12% PEG 400) を分注した。次に、100 nl のオーバーラッピングダイヌクレオソーム溶液を 100 nl のレザーバー溶液と混合し、フィルムによって密封した。20°Cで静置し、数日から数週間後に結晶を得た。結晶が得られた条件について、カッターを用いてフィルムを破り、ループを用いて結晶を掬った。掬った結晶を不凍液 (100 mM potassium bromide, 100 mM potassium thiocyanate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) , 1.5% PGA-LM, 35% PEG 400) に浸した後、すぐに液体窒素に移し、液体窒素中で保存した。

### 2.8.3 X線回折実験

X線回折実験は、大型放射光施設 SPring-8 の BL41XU で行った。ゴニオメーター上にオーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶をマウントし、1.000 Åの波長の X線を照射した。露光時間 0.2 秒、振り角 0.5° で 1440 枚のデータを収集した。

### 2.8.4 構造解析

得られたデータについて、HKL2000 を用いて指数付け、積分、スケーリングを行った (Otwinowski *et al.*, 1997)。その後、既知のヌクレオソーム構造 (PDB ID: 3AFA)、および既知のヌクレオソーム構造をもとに作成したヘキサソームのモデル構造を用いて、Molrep による分子置換法で位相決定を行った (Vagin *et al.*, 1997)。その後、PHENIX を用いた構造の精密化と、COOT を用いた手動でのモデル構造の構築を繰り返し、構造決定を行った (Emsley *et al.*, 2004; Adams *et al.*, 2010)。得られた構造が正しいことを、MolProbity を用いて確認し (Chen *et al.*, 2010)、最終構造を Protein Data Bank (PDB) に登録した (PDB ID: 5GSE)。X線回折データと得られた構造の



統計値は、Table1 に示した。

## 2.9 RCC1 の結合解析

精製した 342 塩基対の DNA (Figure 5C) を含むダイヌクレオソーム (終濃度 0.1  $\mu\text{M}$ )、および 250 塩基対の DNA (Figure 5A) を含むオーバーラッピングダイヌクレオソーム (終濃度 0.1  $\mu\text{M}$ ) に対して、RCC1 (終濃度 0, 0.5, 1, 3, 5  $\mu\text{M}$ ) を加え、反応溶液 (40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.1 mM dithiothreitol, 300 mM NaCl, 0.2 mM 2-mercaptoethanol) 中で、37°C で 30 分間反応させた。反応後、4% アクリルアミド、ビスアクリルアミド混合液 (29:1)、2 x TBE を含む非変性ゲルを用いて、電気泳動を行った。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドによって染色し、LAS-4000 (GE Healthcare) で撮影した。

## 2.10 ヒストン H1 の結合解析

### 2.10.1 ゲルシフト解析

388 塩基対の DNA (Figure 5D) を用いて再構成したダイヌクレオソーム (終濃度 0.1  $\mu\text{M}$ )、および 296 塩基対の DNA (Figure 5B) を用いて再構成したオーバーラッピングダイヌクレオソーム (終濃度 0.1  $\mu\text{M}$ ) を 2.7 の方法によって精製した。これらのダイヌクレオソーム、オーバーラッピングダイヌクレオソームは、ともに両端に 23 塩基対のリンカー DNA を含んでいる。精製したダイヌクレオソーム (終濃度 0.1  $\mu\text{M}$ )、オーバーラッピングダイヌクレオソーム (終濃度 0.1  $\mu\text{M}$ ) に対し、H1 (終濃度 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4  $\mu\text{M}$ ) を加え、終濃度 0.3  $\mu\text{M}$  の Nap1 を含む 10  $\mu\text{l}$  の反応溶液 (35 mM Tris-HCl (pH 8.0), 70 mM NaCl, 0.01 mM PMSF, 0.05 mM EDTA, 6.5% glycerol,

100 µg/ml BSA, 1.2 mM dithiothreitol, 1.1 mM 2- mercaptoethanol, Nap1 (0.3 µM)) 中で、25°Cで 30 分間反応させた。反応後、4%アクリルアミド、ビスアクリルアミド混合液 (29:1) と 2 x TBE を含む非変性ゲルを用いた電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイドによって染色したゲルを LAS-4000 (GE Healthcare) を用いて撮影した。

## 2.10.2 スクロース密度勾配を用いた超遠心解析

2.10.1 と同様に再構成、精製したダイヌクレオソーム、オーバーラッピングダイヌクレオソームを、バッファー1 (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5) , 1 mM dithiothreitol) に透析した。また、H1 をバッファー2 (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol)、Nap1 をバッファー3 (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5) , 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol) に透析した。透析後、ダイヌクレオソーム (終濃度 0.1 µM)、オーバーラッピングダイヌクレオソーム (終濃度 0.1 µM) をそれぞれ H1 (ダイヌクレオソーム: 終濃度 1.1 µM、オーバーラッピングダイヌクレオソーム: 終濃度 0.8 µM) と混合し、終濃度 0.3 µM の Nap1 を含む反応溶液 (35 mM HEPES-KOH (pH 7.5) , 70 mM NaCl 1.75 mM dithiothreitol, 0.3 µM Nap1) で、37°Cで 30 分間反応させた。反応後、0.05%のホルムアルデヒドを加え、室温で 30 秒間架橋した後、400 mM glycine を加えて反応を停止した。その後、5-25%のスクロース密度勾配溶液に積層し、SW41 ローター (Beckman) を用いた 27,000rpm (チューブの中央で 89,815xg)、16 時間の遠心分離を行った。その後、H1-ダイヌクレオソーム複合体、H1-オーバーラッピングダイヌクレオソームを含む画分を回収し、18%アクリルアミド、ビスアクリルアミド混合液 (29:1) を含む SDS-PAGE で展開した。CBB を用い

て染色し、LAS-4000 (GE Healthcare) を用いて、ゲルを撮影した。

## 2.11 footprinting 解析

footprinting 解析は、先行研究 (Kujirai *et al.*, 2016) の方法にならって行った。最初に、footprinting 解析に用いた Cy5 標識した DNA の調製法を記す。まず、脱リン酸化処理した 296 塩基対の DNA (Figure 5B)、および 193 塩基対のマーカ用 DNA を *HinfI* (Takara) で処理した。*HinfI* による切断部位は、2.6 の DNA 配列中にアンダーラインで示した。これにより、5'末端に 3 塩基の突出を持つ、264 塩基対の DNA および、161 塩基対の DNA を調製した。TSKgel DEAE-5PM (TOSOH) カラムクロマトグラフィーによって、DNA 断片を精製し、5'末端に Cy5 ラベルした合成 DNA (FASMAC) とライゲーションした。合成 DNA の配列は本項の最後に示した。得られた DNA 断片は、分取用電気泳動装置 Prep Cell を用いて精製した。精製された DNA 断片は、2.6 に示した 296 塩基対、193 塩基対の DNA と同様の塩基配列であり、その 5'末端が Cy5 ラベルされている。精製した 296 塩基対の DNA を用いて、2.7 の方法によってヌクレオソームとオーバーラッピングダイヌクレオソームを再構成、精製した。精製したヌクレオソーム (終濃度 0.1  $\mu\text{M}$ )、オーバーラッピングダイヌクレオソーム (終濃度 0.1  $\mu\text{M}$ ) を Nap1 (終濃度 0.3  $\mu\text{M}$ ) 存在下で H1 (終濃度 0.4  $\mu\text{M}$ ) と反応させた。反応後の試料は、限外濾過によって濃縮し、反应用溶液 (5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM NaCl, 0.25 mM EDTA) に置換した。DNA 濃度で 30 ng/ $\mu\text{l}$  の試料 50  $\mu\text{l}$  に対し、それぞれ 2.5  $\mu\text{l}$  の溶液 1 (4 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ , 8 mM EDTA (pH 8.0))、溶液 2 (0.1 M sodium ascorbate)、溶液 3 (0.6% hydrogen peroxide) を同時に加えた。2 分間の反応後、反応停止溶液 (100 mM thiourea) を加えて、反応を停止させた。フェノール・

クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った DNA について、8%アクリルアミド、ビスアクリルアミド混合液(19:1)を含む変性ゲルを用いて、電気泳動を行った。Typhoon 9410 imager (GE Healthcare) を用いて、Cy5 のシグナルを検出し、撮影した。

ラベル DNA 作製用オリゴ DNA (top strand)

5'-ATCGG ACCCT ATCGC GAGCC AGGCC TGAG-3'

5'末端が Cy5 でラベルされている

ラベル DNA 作製用オリゴ DNA (bottom strand)

5'-ATTCT CAGGC CTGGC TCGCG ATAGG GTCCG AT -3'

5'末端がリン酸化されている

## 3 章 結果

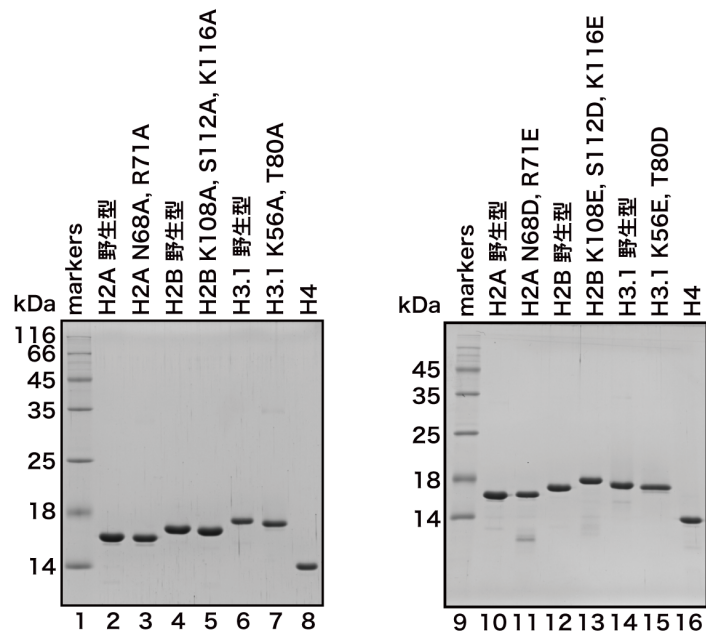
### 3.1 オーバーラッピングダイヌクレオソームの精製

オーバーラッピングダイヌクレオソームの精製にあたり、まずヒトのヒストンをリコンビナントタンパク質として精製した (Figure 6)。その後、精製したヒストンを用いて、ヒストン 8 量体を再構成した。先行研究によって、250 塩基対の DNA を用いた際に、オーバーラッピングダイヌクレオソームを再構成可能であることが示されていた (Engelholm *et al.*, 2009)。この研究では、147 塩基対の「601 配列」を 22 塩基対ずつ短くした DNA を 2 つ組み合わせることで 250 塩基対の DNA を設計していた

(Figure 7A)。「601 配列」は、Widom 博士らのグループによって提唱された、ヌクレオソームが強固に形成される非天然の DNA 配列である (Lowary *et al.*, 1998)。そこで、先行研究に倣って「601 配列」を使用した 250 塩基対の DNA を調製し、オーバーラッピングダイヌクレオソームの再構成を試みた。オーバーラッピングダイヌクレオソームの再構成には塩透析法を用いた。これは、2 M KCl を含む高塩濃度条件下で、DNA とヒストン 8 量体を混合した後、徐々に塩濃度を低下させることで、ヌクレオソームを再構成する手法である (Luger *et al.*, 1997)。再構成された試料について native-PAGE を行い、エチジウムブロマイドによって DNA を染色したところ、DNA に相当するバンドに加えて、さらに 2 つのバンドが観察された (Figure 7B lane 1)。そこで、それぞれの画分を分取用電気泳動装置 Prep Cell を用いて精製し、精製した試料を

SDS-PAGE によって展開した (Figure 7C)。その結果、上のバンドに相当する画分は H2A、H2B の含量が H3、H4 と比較して、わずかに少ないことがわかった (Figure 7C, D)。このことから、精製した試料は先行研究にて報告されていた H2A、H2B が欠落した特殊な複合体に相当する可能性があると考えられた。加えて、明石知子博士 (横浜市

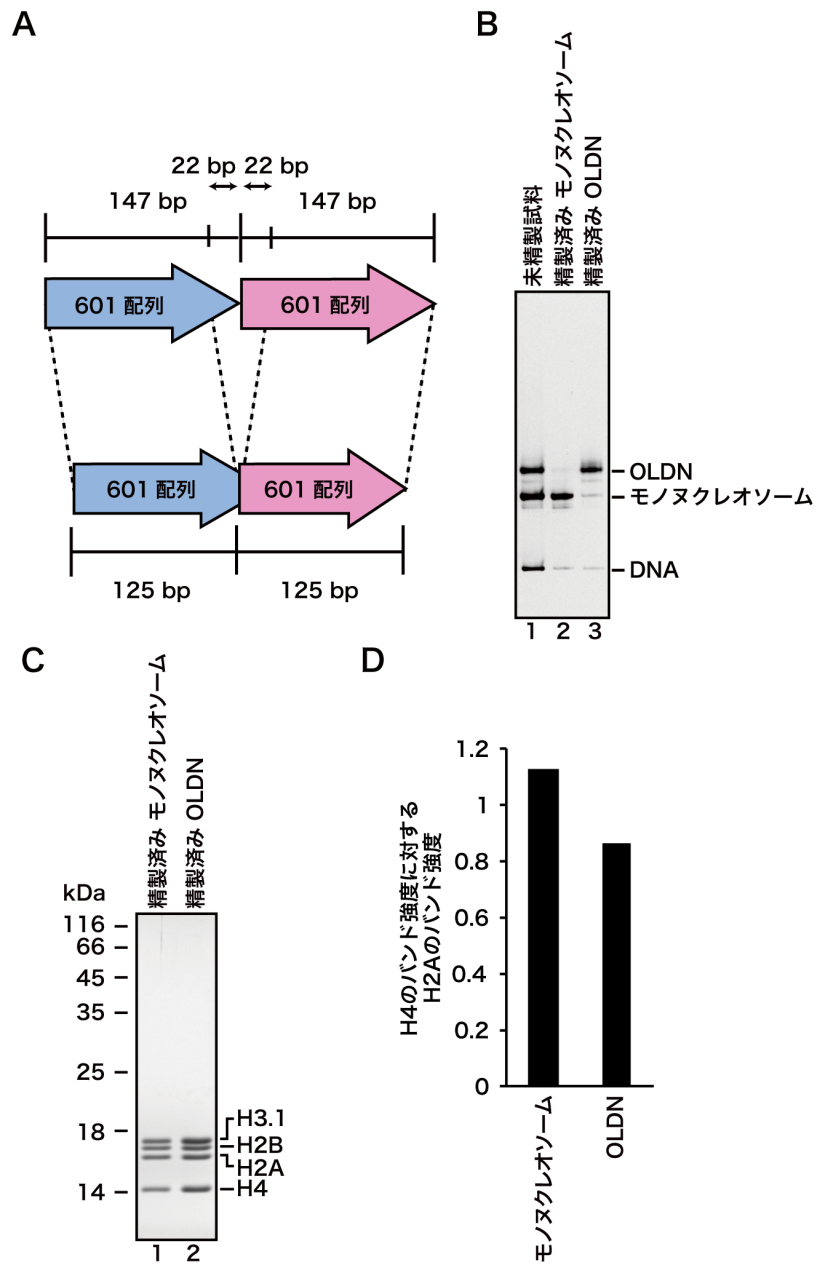
立大学)、七種和美博士 (広島大学、横浜市立大学) との共同研究による **native electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS)** 解析によって、精製した試料の分子量が、オーバーラッピングダイヌクレオソームの分子量の理論値とほぼ一致することがわかった (Kato *et al.*, 2017)。このことから、精製した試料が、ヒストン 14 量体に DNA が巻きついたオーバーラッピングダイヌクレオソームであると判断した。



**Figure 6** ヒストンタンパク質の精製

精製したヒストンを SDS-PAGE によって解析した。ゲルは、CBB を用いて染色した。

((Kato *et al.*, 2017) Fig. S5A, C より引用)



**Figure 7** オーバーラッピングダイヌクレオソームの精製

**A.** オーバーラッピングダイヌクレオソーム (OLDN: overlapping dinucleosome) の再構成のために設計した DNA の模式図。147 塩基対の 601 配列を 22 塩基対ずつ短くし、125 塩基対としたものを組み合わせ、250 塩基対とした。

**B.** 再構成した未精製の試料、および精製したモノヌクレオソーム、オーバーラッピン



グダイヌクレオソームを **native-PAGE** によって解析した。ゲルは、エチジウムブロマイドによって染色した。((Kato *et al.*, 2017) Fig. S1B より引用)

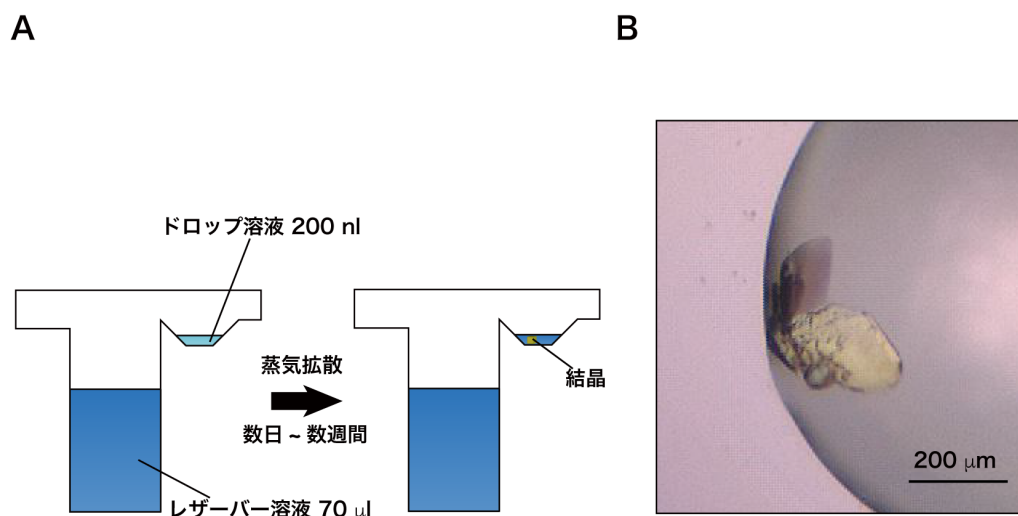
**C.** 精製したモノヌクレオソーム、オーバーラッピングダイヌクレオソームを **SDS-PAGE** によって展開した。ゲルは、**CBB** によって染色した。((Kato *et al.*, 2017) Fig. S1C より引用)

**D.** 精製した試料に含まれるヒストン量を定量した結果のグラフ。C のゲルのうち、**H2A**、**H4** のバンド強度を定量し、**H4** のバンドに対する **H2A** のバンド強度比を縦軸に示した。

### 3.2 オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶化

オーバーラッピングダイヌクレオソームの X 線結晶構造解析を行うにあたり、オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶化を行った。精製したオーバーラッピングダイヌクレオソームを含む溶液 100 nl を 100 nl のレザーバー溶液（100 mM potassium bromide, 100 mM potassium thiocyanate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1.5% PGA-LM, 12% PEG 400）と混合したドロップ溶液を調製し、70  $\mu$ l のレザーバー溶液を含むプレート上で、シッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行った

（Figure 8A）。シッティングドロップ蒸気拡散法は、精製タンパク質と低濃度の沈殿剤を含むドロップ溶液と、高濃度の沈殿剤を含むレザーバー溶液の間で生じた蒸気拡散によって、ドロップ溶液中の沈殿剤濃度が上昇し、目的のタンパク質が結晶化する手法である。その結果、200  $\mu$ m 程度の大きさの結晶を得た（Figure 8B）。得られた結晶をクライオプロテクタント溶液（100 mM potassium bromide, 100 mM potassium thiocyanate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1.5% PGA-LM, 35% PEG 400）に浸した後、液体窒素中で保存した。クライオプロテクタント溶液は、溶液中の水分子をアモルファス状態で凍結させるために使用する溶液である。クライオプロテクタント溶液を用いることで、水分子由来の回折を減少させ、データの精度を向上させることができる。



**Figure 8** オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶化

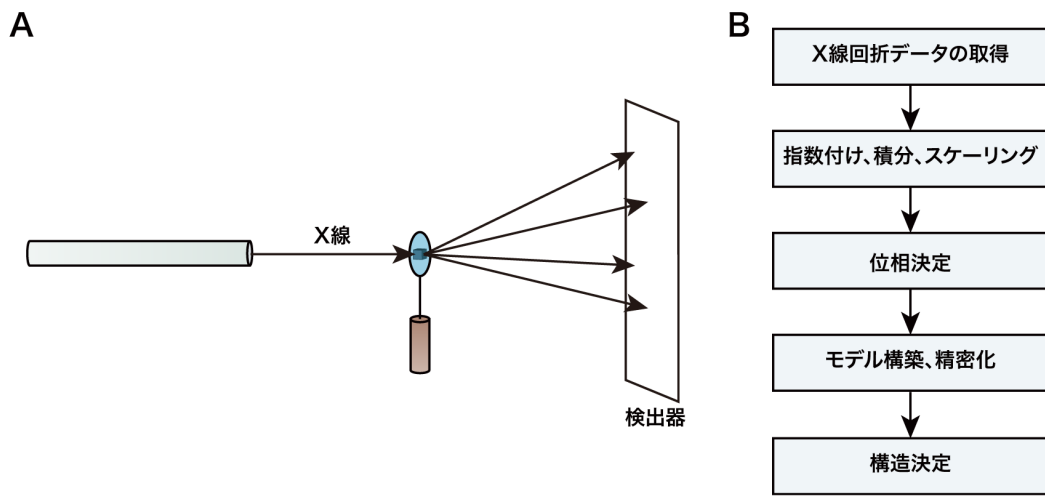
**A.** シッティングドロップ蒸気拡散法の模式図。蒸気拡散によって、ドロップ溶液中の沈殿剤濃度が徐々に上昇し、結晶が得られる。

**B.** オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶の図。

### 3.3 オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造決定

大型放射光施設 SPring-8 のビームラインである BL41XU を用いてオーバーラッピングダイヌクレオソームの X 線回折実験を行った (Figure 9A)。高エネルギーの X 線による結晶へのダメージを低減するため、ゴニオメーター上にマウントした結晶に対して約 $-180^{\circ}\text{C}$ の窒素気流を吹き付けながらデータ収集を行った。検出器は PILATUS 3 6M を用いた。この検出器はノイズの少ない高速検出が特徴であり、少ない露光時間でも、解析可能なデータの取得が可能である。各フレームあたり、露光時間 0.2 秒、振り角  $0.5^{\circ}$  でデータを収集し、1440 枚のデータを回収した。収集したデータについて、HKL2000 を用いて指数付け、積分、スケーリングを行った (Figure 9B)。その結果、このデータが  $3.14 \text{ \AA}$  の分解能で解析可能であることがわかった。次に、このデータを用いて位相決定を行った。X 線回折データには、位相の情報が欠失しているため、構造解析を行うために、正しい位相情報を与える必要がある (Taylor *et al.*, 2003)。位相決定のための手法として、分子置換法、単波長異常分散法、重原子同型置換法など、様々な手法が提唱されている (Taylor *et al.*, 2003)。オーバーラッピングダイヌクレオソームの位相決定には、分子置換法を用いた。分子置換法は、目的の試料と類似した構造体の構造情報をもとに、位相を決定する手法である。既知のヒトのオクタソーム構造 (PDB ID: 3AFA) と、ヒトのオクタソーム構造から各 1 分子の H2A、H2B を欠失させたヘキサソームのモデル構造を用意し、これらの構造情報を用いることで位相を決定した。位相決定には、分子置換のソフトウェアである Molrep を用いた (Vagin *et al.*, 1997)。その後、PHENIX を用いたモデルの精密化と COOT を用いた手動のモデリングを繰り返し (Emsley *et al.*, 2004; Adams *et al.*, 2010)、オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造を決定した (Figure 10A, Table 1)。なお、ヒストンの N 末端

およびC末端に存在するテール領域とDNAの一部については電子密度が不明瞭であったため、モデル構築を行わなかった。MolProbityを用いて、構築したモデルの妥当性を確認し、最終構造とした (Chen *et al.*, 2010) (Table1)。



**Figure 9 X 線回折実験の流れ**

- A. X 線回折実験の模式図。X 線を結晶に対して照射し、検出器を用いて X 線の回折像を取得する。
- B. 結晶構造解析のスキーム。

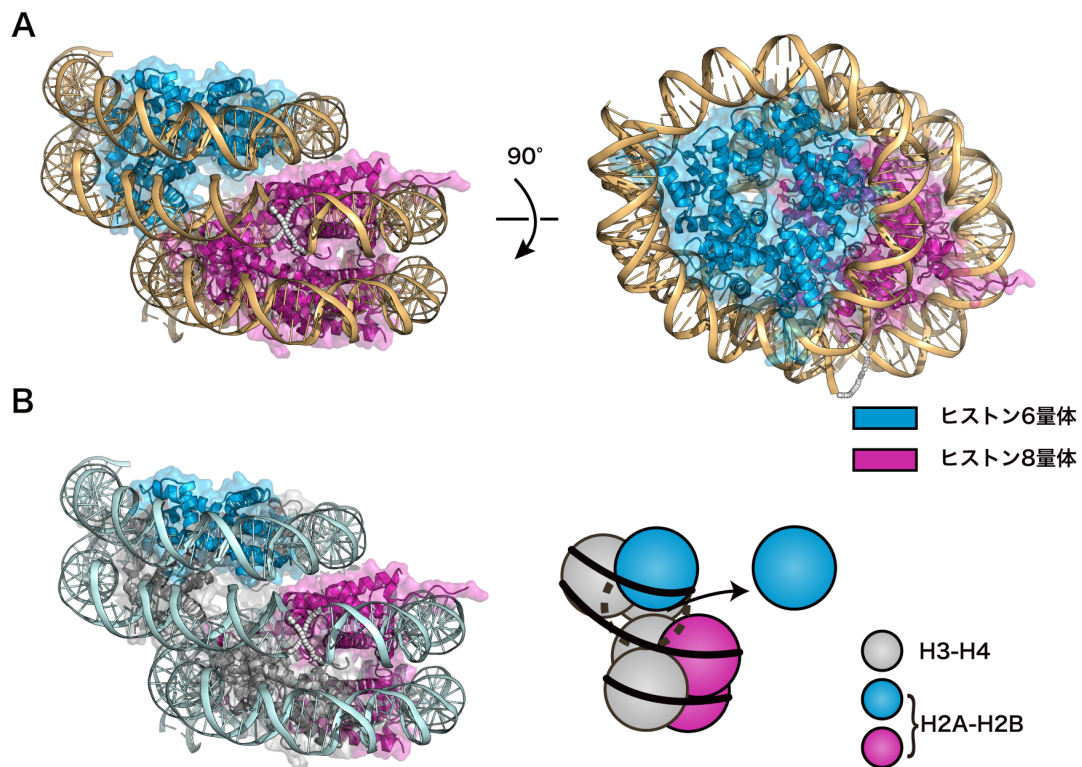
<b>Overlapping dinucleosome</b>	
<b>Data collection</b>	
Space group	<i>P1</i>
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	90.58, 101.80, 102.43
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	119.30, 106.51, 91.36
Resolution (Å)	50.00 - 3.14 (3.25 - 3.14)
$R_{\text{merge}}$ (%)	10.4 (57.3)
Mean $\langle I / \sigma(I) \rangle$	6.4 (1.6)
Completeness (%)	91.0 (90.0)
Redundancy	4.8 (4.0)
No. of unique reflections	47,834
Highest-resolution shell $CC_{1/2}$ (%)	76.8
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	49.66-3.14
No. of reflections	47,636
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.005
Bond angles (°)	0.91
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	19.7 / 25.5
No. of atoms	
Protein	10,196
DNA	10,048
<i>B</i> -factors (Å <sup>2</sup> )	
Protein	76
DNA	117
Ramachandran favoured (%)	96.8
Ramachandran outliers (%)	0.0

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i | I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle |}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}.$$

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

$R_{\text{free}}$  は、精密化に用いなかった5%のデータによって算出した。  
括弧内の値は、最外殻の値を示した。

**Table 1** 結晶構造解析の統計値



**Figure 10** オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造

**A.** オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造 (PDB ID: 5GSE)。青はヘキサソームユニット中のヒストン、赤はオクタソームユニット中のヒストンを示した。また、DNA は茶色で示した。原子座標モデルの構築を行っていない DNA 領域については、二重螺旋が繋がっていると仮定した位置に灰色のドットを示した。((Kato *et al.*, 2017)

Fig. 1B より引用)

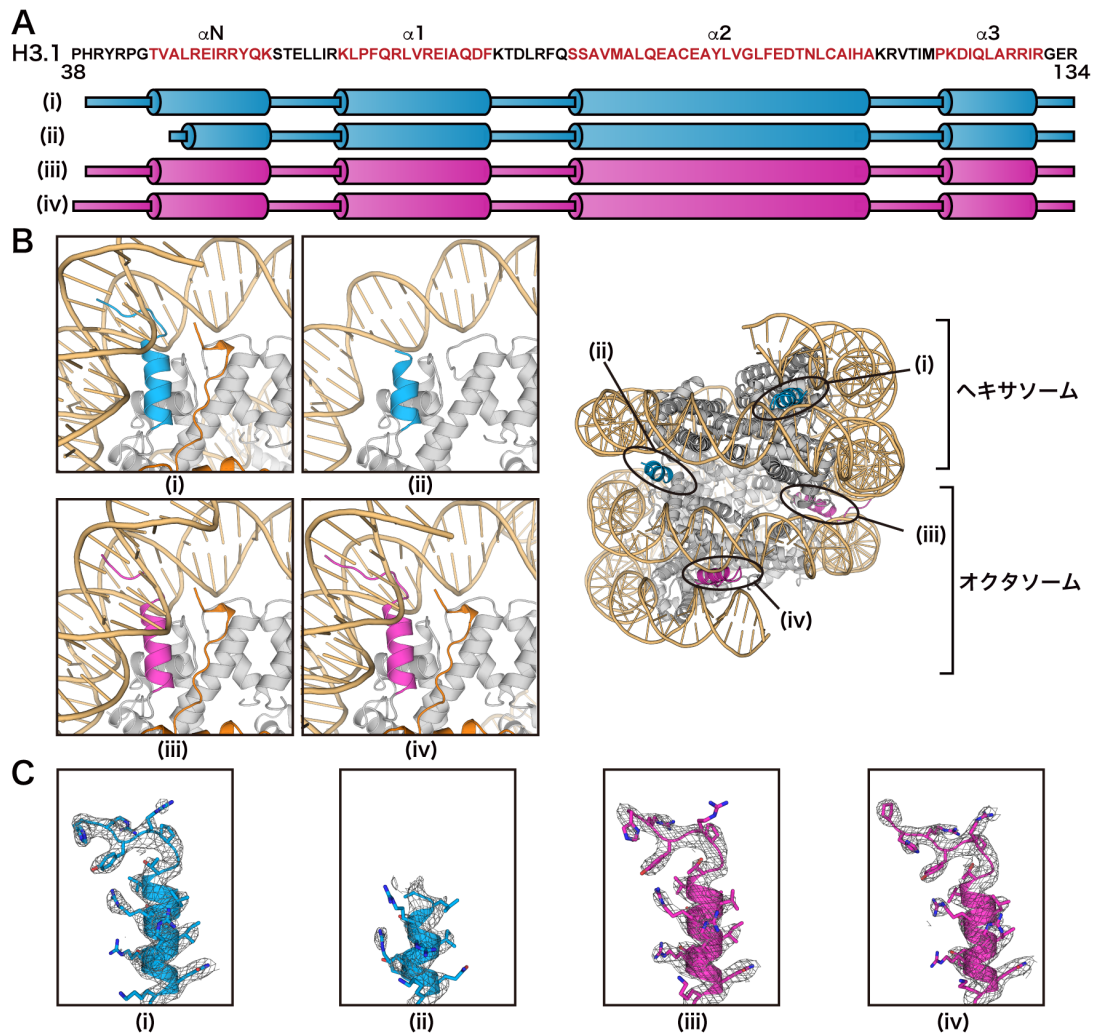
**B.** (左) オーバーラッピングダイヌクレオソーム構造中の H2A、H2B を示した図。青でヘキサソームユニット中の H2A、H2B を、赤でオクタソームユニット中の H2A、H2B を示した。H3、H4、DNA については、灰色で示した。(右) オーバーラッピングダイヌクレオソーム中のヒストンのモデル図。2つのヌクレオソームユニットが向かい合う面から、1組の H2A、H2B が欠落し、オーバーラッピングダイヌクレオソーム



が形成される。(Kato *et al.*, 2017) Fig. 1C より引用)

### 3.4 オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造解析

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 が巻きついたヘキサソーム構造とヒストン 8 量体に DNA が巻きついたオクタソーム構造の 2 つの構造ユニットが重なり合い、ヒストン 14 量体に DNA が約 3 回転巻きついた特殊な構造体を形成していることがわかった (Figure 10A)。ヘキサソーム構造中では、オクタソームと比較して、H2A、H2B が 1 分子ずつ欠落している。今回明らかにした立体構造から、2 つのヌクレオソームユニットが接する面から H2A、H2B の欠落が生じることが示された (Figure 10B)。また、通常のオクタソーム構造中において、H2A の C 末端領域が H3 の  $\alpha$ N ヘリックス (45-56) の近傍に沿うようにして存在していることが知られる。そこで、オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造を観察すると、ヘキサソームユニットのうち、H2A が欠落した箇所の H3 の  $\alpha$ N ヘリックスが他の 3 分子の H3 と比較し、顕著に短くなっていることがわかった (Figure 11)。また、H2A、H2B の欠落は、2 つのヌクレオソームユニットが緊密に重なり合うことを可能にしている。今回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構造中では、ヘキサソームユニット中の H3 の 56 番目のリジンと 80 番目のスレオニンがオクタソームユニット中の DNA と隣接していた。また、オクタソームユニット中の H2A の 68 番目のアスパラギンと 71 番目のアルギニン、H2B の 108 番目のリジンと 112 番目のセリンと 116 番目のリジンがヘキサソームユニット中の DNA と、隣接していた (Figure 12)。このことは、ヘキサソームとオクタソームという 2 つの構造ユニットが相互作用し得ることを示唆している。

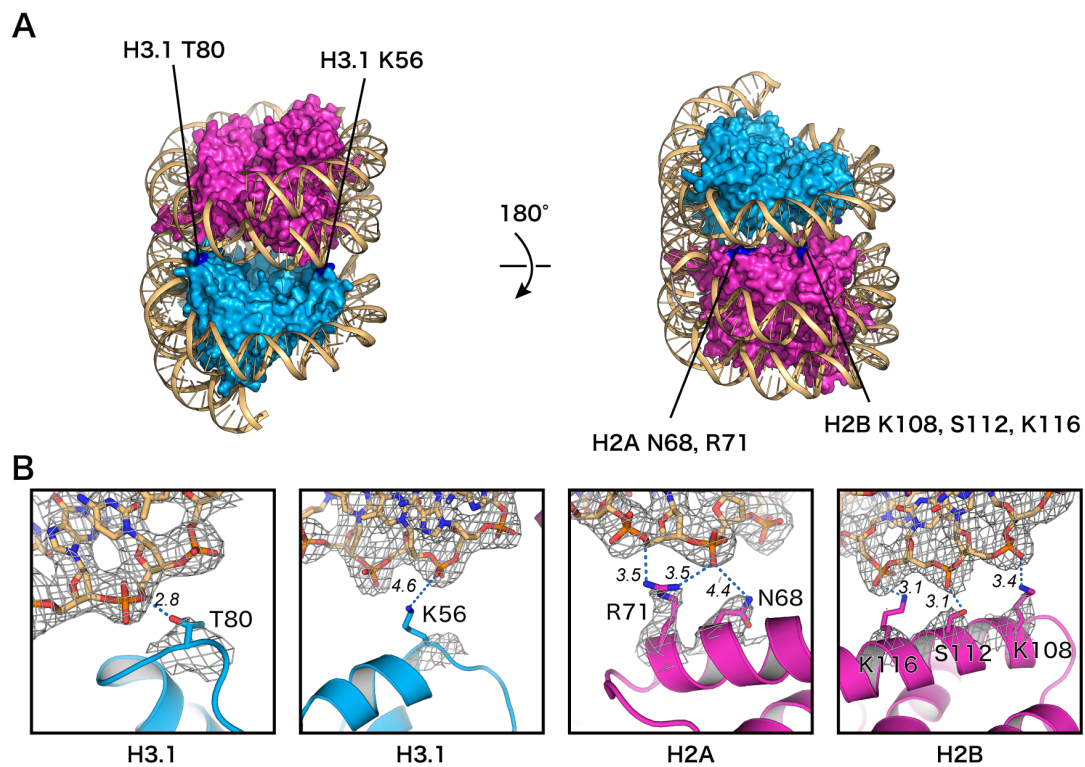


**Figure 11** ヘキサソームユニット中の H3  $\alpha$ N ヘリックス

**A.** H3 の二次構造の模式図。円柱は $\alpha$ ヘリックスを示している。青はヘキサソーム、赤はオクタソームユニット中の $\alpha$ 3を示した。((Kato *et al.*, 2017) Fig. 2A より引用)

**B.** (左) H3  $\alpha$ N ヘリックスの立体構造。青はヘキサソーム、赤はオクタソームユニットの H3  $\alpha$ N ヘリックスを示した。また、オレンジは H2A を示している。(右) 全体構造中の H3  $\alpha$ N ヘリックスの部位を示した。((Kato *et al.*, 2017) Fig. 2B, C より引用)

**C.** H3  $\alpha$ N ヘリックスの電子密度マップ。電子密度は  $1\sigma$  で表示した。((Kato *et al.*, 2017) Fig. 2D より引用)



**Figure 12** ヘキサソームユニットとオクタソームユニットの相互作用

**A.** ヘキサソームユニットとオクタソームユニットの間で相互作用していると考えられる領域を青で示した。((Kato *et al.*, 2017) Fig. 3A より引用)

**B.** 相互作用に関与していると考えられるアミノ酸、および DNA の電子密度を表示した。電子密度は  $1\sigma$  で表示している。斜体は、原子間の距離 (Å) を示した。((Kato *et al.*, 2017) Fig. S4A より引用)

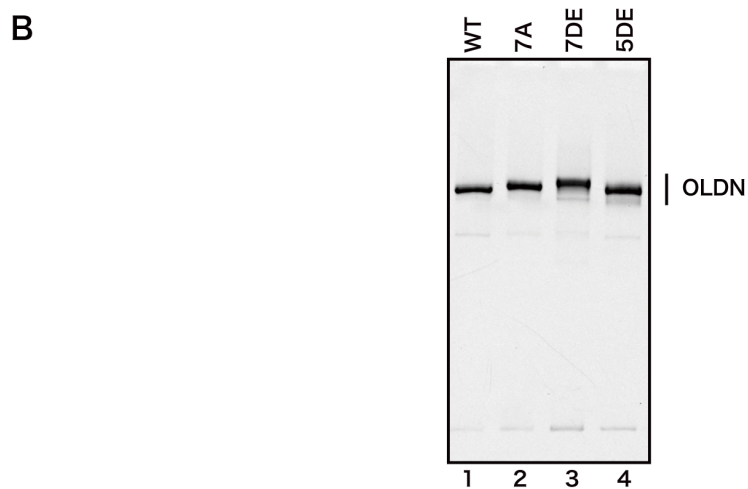
### 3.5 オーバーラッピングダイヌクレオソームの変異体解析

オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造から、ヘキサソームユニットとオクタソームユニットの間で相互作用が生じていることが示唆された。そこで、このことを確かめるために、変異体を用いた解析を行った。まず、相互作用の可能性のあるアミノ酸をアラニンに置換した変異体、もしくは酸性アミノ酸に置換した変異体ヒストンを、それぞれリコンビナントタンパク質として調製した (Figure 6)。精製は野生型と同様の方法を用いた。精製したヒストンを用いて、4種のヒストン8量体を再構成、精製した。今回調製したヒストン8量体の構成は、Figure 13A に示した。これらのヒストン8量体は、1) H2A、H2B、H3 についてアラニン置換変異体を用いたヒストン8量体 (7A)、2) H2A、H2B、H3 について酸性アミノ酸置換変異体を用いた試料 (7DE)、3) H2A、H2B について酸性アミノ酸置換変異体を用いた試料 (5DE)、4) 野生型 (WT) の4種である (Figure 13A)。それぞれのヒストン8量体を用いて、オーバーラッピングダイヌクレオソームの再構成を試みた。再構成、精製された試料を明石知子博士 (横浜市立大学)、七種和美博士 (広島大学、横浜市立大学) との共同研究による native ESI-MS 解析を行ったところ、再構成された複合体の分子量は、オーバーラッピングダイヌクレオソームの理論値とほぼ一致した (Kato *et al.*, 2017)。このことから、変異体を用いた場合においても、野生型と同様にオーバーラッピングダイヌクレオソームを再構成することが可能であることがわかった。また、調製したオーバーラッピングダイヌクレオソームを native-PAGE を用いて解析したところ、H2A、H2B、H3 の3種のヒストンの変異体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 (WT) と比較して、泳動度が小さいことがわかった (Figure 13B lanes 1, 2, 3)。この性質は、アラニン変異体を含むオーバーラッピングダイヌクレオソームよりも、酸性アミノ酸変異

体を含むオーバーラッピングダイヌクレオソームでより顕著であった。native-PAGE 上における泳動度の差異は、試料の大きさや電荷などの影響を受ける。変異体を含むオーバーラッピングダイヌクレオソームでは、野生型と比較して、正電荷を持つアミノ酸が減少していることから、泳動度が大きくなることが予想されたものの、泳動度が小さくなる結果を得た。このことから、これらのアミノ酸の変異体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、やや大きな構造を形成することが考えられた。この現象は、ヘキサソーム-オクタソーム間の相互作用が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、減弱していることに由来すると考えている。さらに、H2A、H2B の変異体のみ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、泳動度の明確な差異は見られなかった (Figure 13B lanes 1, 4)。このことは、ヘキサソームユニットとオクタソームユニットの相互作用には、特に H3 が重要な役割を担っていることを示唆している。

**A**

	H2A	H2B	H3
WT	WT	WT	WT
7A	N68A, R71A	K108A, S112A, K116A	K56A, T80A
7DE	N68D, R71E	K108E, S112D, K116E	K56E, T80D
5DE	N68D, R71E	K108E, S112D, K116E	WT



**Figure 13 変異体解析**

**A.** 調製したオーバーラッピングダイヌクレオソームに含まれるヒストンの種類を示した表。全てのオーバーラッピングダイヌクレオソームにおいて、H4は野生型を用いた。

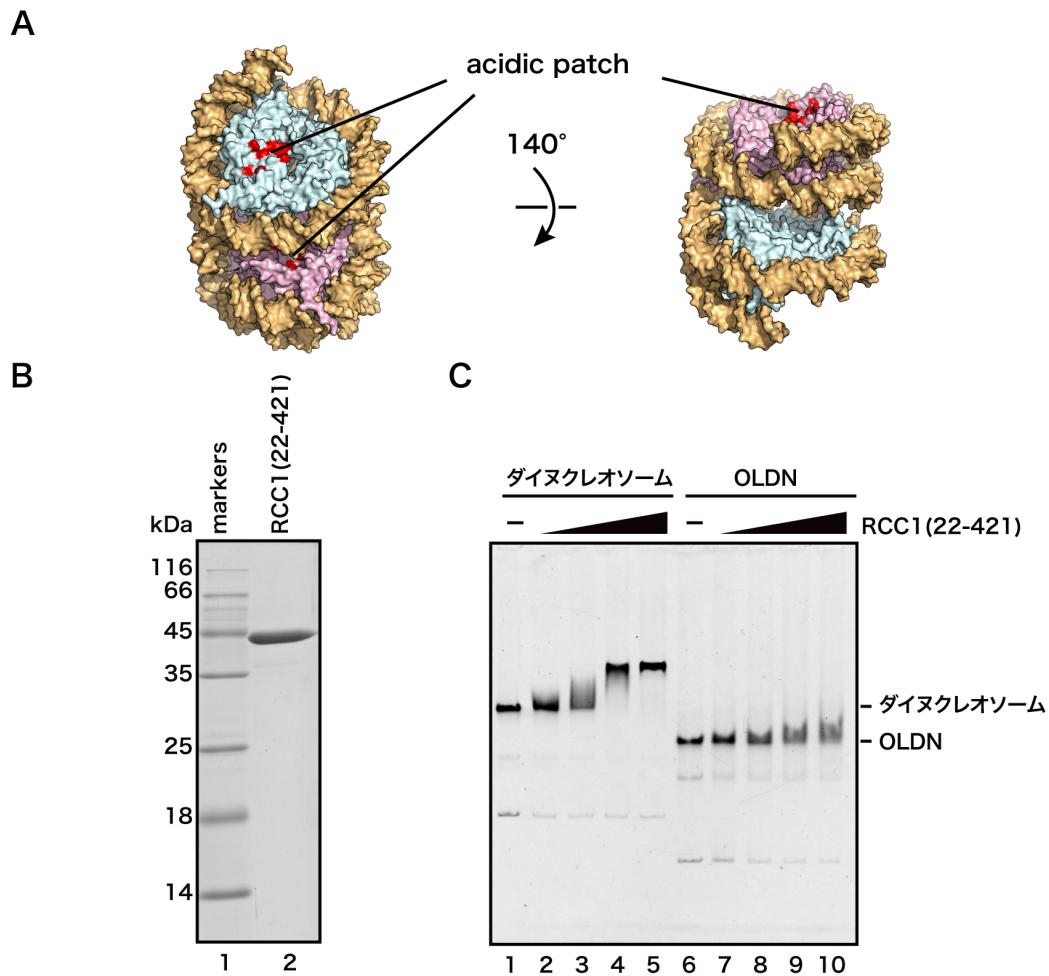
**B.** 精製したオーバーラッピングダイヌクレオソームを native-PAGE を用いて解析した。ゲルは、エチジウムブロマイドで染色した。OLDN はオーバーラッピングダイヌクレオソームを表している。((Kato *et al.*, 2017) Fig. 3B より引用)

### 3.6 オーバーラッピングダイヌクレオソームに対する RCC1 の結合解析

ヌクレオソームの表面には、H2A、H2B によって形成される acidic patch と呼ばれる酸性領域が存在し、様々な核内タンパク質がクロマチン上へ結合する際の足場として機能する (McGinty *et al.*, 2016)。生体内に広く存在するオクタソーム構造中には、2つの acidic patch が存在する。オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造中では、H2A、H2B の欠落によって、ヘキサソームユニットの acidic patch が1か所失われていた。また、オクタソームユニットの acidic patch のうちの1つがヘキサソームユニットによって覆い隠されていた (Figure 14A)。このことから、オーバーラッピングダイヌクレオソーム構造中では、acidic patch に対する核内タンパク質の結合能が低下することが考えられた。そこで、acidic patch に結合することが知られる RCC1 を用いて、オーバーラッピングダイヌクレオソームへの RCC1 の結合解析を行った。Tan 博士らのグループによって明らかにされた RCC1-ヌクレオソーム複合体の結晶構造から、RCC1 の acidic patch への結合には、RCC1 の $\alpha$ プロペラドメインが寄与していることが示された (Makde *et al.*, 2010)。また、RCC1 の N 末テール領域は DNA 結合活性を有することが知られる (Seino *et al.*, 1992)。そこで、RCC1 の acidic patch 結合能を評価するために、本研究では、RCC1 の N 末テールを欠失させた変異体、RCC1 (22-421)を用いた。まず、リコンビナントタンパク質として、RCC1 を精製した (Figure 14B)。次に、精製した RCC1 と通常のダイヌクレオソーム、オーバーラッピングダイヌクレオソームを用いて、ゲルシフトアッセイを行った。RCC1 とダイヌクレオソーム、オーバーラッピングダイヌクレオソームを混合し、native-PAGE を用いた解析をした。その結果、オーバーラッピングダイヌクレオソーム中では、RCC1 の結合が、ダイヌク



レオソームと比較して顕著に低下していることが示された (Figure 14C)。



**Figure 14** 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解析

**A.** オーバーラッピングダイヌクレオソーム中における acidic patch の位置を示した図。

赤は、acidic patch を構成するアミノ酸を示している。水色は、ヘキサソームユニットのヒストンを、ピンクはオクタソームユニットのヒストンをそれぞれ示している。

((Kato *et al.*, 2017) Fig. S3A より引用)

**B.** 精製した RCC1 の SDS-PAGE。ゲルは、CBB を用いて染色した。((Kato *et al.*, 2017)

Fig. S3B より引用)

**C.** ダイヌクレオソームとオーバーラッピングダイヌクレオソームに対する RCC1 の

結合について行ったゲルシフトアッセイの図。ダイヌクレオソーム (0.1  $\mu\text{M}$ )、および

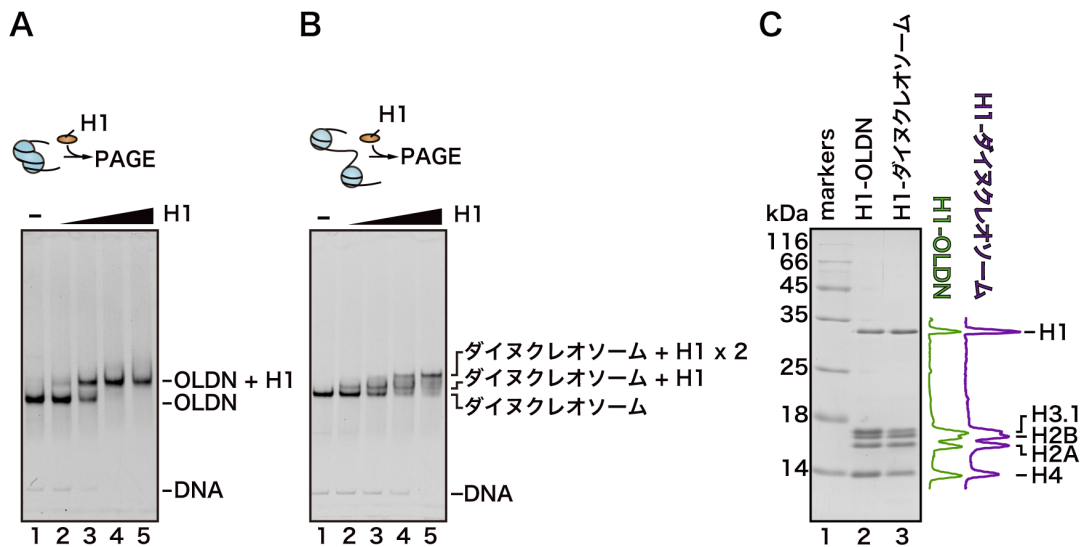
オーバーラッピングダイヌクレオソーム (0.1  $\mu\text{M}$ ) に RCC1 (0, 0.5, 1, 3, 5  $\mu\text{M}$ ) を加え、native-PAGE を用いて解析した。ゲルは、エチジウムブロマイドを用いて染色した。OLDN はオーバーラッピングダイヌクレオソームを表している。((Kato *et al.*, 2017) Fig. S3C より引用)

### 3.7 オーバーラッピングダイヌクレオソームに対する H1 の結合解析

生体内では、リンカーヒストン H1 がヌクレオソーム中の DNA の中心領域である dyad axis の近傍と、2つのヌクレオソーム間をつなぐリンカーDNA の領域に跨がって結合することが知られる (Simpson *et al.*, 1978; Zhou *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015; Bednar *et al.*, 2017) (Figures 3B, 17A)。通常のダイヌクレオソームには、2つの H1 が結合することが考えられたが (Song *et al.*, 2014)、オーバーラッピングダイヌクレオソームには、H1 が結合可能であるか、結合した場合いくつかの H1 が結合するのか、不明であった。そこで、オーバーラッピングダイヌクレオソームにも H1 が結合可能であるか調べた。まず、両端に 23 塩基対ずつのリンカーDNA を含むダイヌクレオソームとオーバーラッピングダイヌクレオソームを再構成するために DNA を調製した (Figure 5B, D)。次に、調製した DNA を用いて、両端にリンカーDNA を含むダイヌクレオソーム、およびオーバーラッピングダイヌクレオソームを調製した (Figures 15A lane 1, 15B lane 1)。また、リコンビナントタンパク質として、リンカーヒストン H1、および H1 のヌクレオソームへの結合を補助する因子であるヒストンシャペロン Nap1 を精製した。Nap1 存在下で、H1 とダイヌクレオソーム、オーバーラッピングダイヌクレオソームを混合し、ゲルシフト解析を行った。その結果、通常のダイヌクレオソームでは、2段階のバンドシフトが観察された。一方で、オーバーラッピングダイヌクレオソームでは、1段階のバンドシフトが観察された (Figures 15A, B)。また、H1-ダイヌクレオソーム複合体、H1-オーバーラッピングダイヌクレオソーム複合体をスクロース密度勾配によって精製し、SDS-PAGE を用いて解析した (Figure 15C)。コアヒストンのバンドに対する H1 のバンド強度を比較すると、H1-

オーバーラッピングダイヌクレオソーム複合体では、H1-ダイヌクレオソーム複合体よりも低かった。これらのことから、オーバーラッピングダイヌクレオソームには、1分子の H1 が結合すると考えた。

さらに、オーバーラッピングダイヌクレオソーム中における H1 の結合部位を明らかにするために、ヒドロキシラジカルを用いた footprinting 解析を行った (Figure 16)。ヒドロキシラジカルは、タンパク質で保護されていない DNA 領域を優先的に切断する。このことから、H1 の結合部位を特定することができる。ヌクレオソームに対して、footprinting 解析を行うと、10 塩基ごとの周期で濃いバンドと薄いバンドが現れることがわかる (Figure 16B lane 2)。濃いバンドが得られた箇所は、ヌクレオソームの外側に DNA 領域が露出していることを、薄いバンドが得られた箇所はヌクレオソームの内側にその DNA 領域が存在していることを示している。H1 非存在下と存在下でオーバーラッピングダイヌクレオソームの footprinting 解析を行ったところ、オクタソーム中の dyad axis と呼ばれる、ヌクレオソーム DNA の中心領域に相当する箇所でバンド強度が低下していた (Figure 16B lanes 3, 5)。このことは、オクタソーム中の dyad axis に H1 が結合していることを示唆している (Figure 16C)。

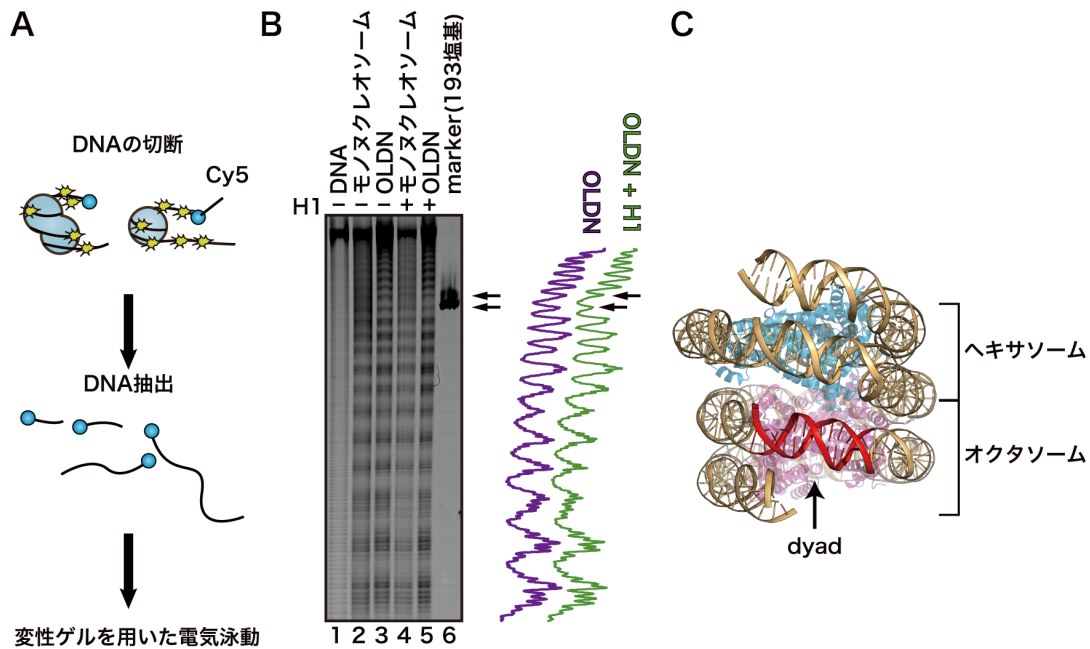


**Figure 15** オーバーラッピングダイヌクレオソームに対する H1 の結合解析

**A.** オーバーラッピングダイヌクレオソームに対する H1 の結合に関するゲルシフト解析。オーバーラッピングダイヌクレオソーム (0.1  $\mu\text{M}$ ) に対して、H1 (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4  $\mu\text{M}$ ) を加え、native-PAGE で解析した。ゲルはエチジウムブロマイドを用いて染色した。また、OLDN はオーバーラッピングダイヌクレオソームを示している。((Kato *et al.*, 2017) Fig. 4A より引用)

**B.** ダイヌクレオソームに対する H1 の結合のゲルシフト解析。ダイヌクレオソーム (0.1  $\mu\text{M}$ ) に H1 (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4  $\mu\text{M}$ ) を加えた後、native-PAGE で解析した。ゲルはエチジウムブロマイドにて染色した。((Kato *et al.*, 2017) Fig. 4B より引用)

**C.** 精製した H1-オーバーラッピングダイヌクレオソーム複合体、H1-ダイヌクレオソーム複合体を SDS-PAGE にて展開した。ゲルは、CBB を用いて染色した。OLDN はオーバーラッピングダイヌクレオソームを示している。定量したバンド強度は H1-オーバーラッピングダイヌクレオソーム複合体、H1-ダイヌクレオソーム複合体の間で H4 のバンド強度が同一になるように正規化した。((Kato *et al.*, 2017) Fig. S6 より引用)



**Figure 16 footprinting 解析**

**A.** footprinting 解析の模式図。

**B.** footprinting 解析の結果。ヒドロキシラジカルで処理した試料を変性ゲルで解析した。レーン 1 は DNA を、レーン 2、4 はモノヌクレオソーム由来の DNA を、レーン 3、5 はオーバーラッピングダイヌクレオソーム由来の DNA を、レーン 6 はマーカーとして 193 塩基の DNA を泳動した。また、レーン 1、2、3 は H1 非存在下、レーン 4、5 は H1 存在下で解析した。ゲルは、Cy5 の蛍光を Typhoon 9410 imager を用いて検出した。矢印は、H1 によって、ヒドロキシラジカルによる DNA の切断から保護された箇所を示している。((Kato *et al.*, 2017) Fig. 4C より引用)

**C.** H1 によって、ヒドロキシラジカルによる DNA の切断から保護された箇所を示した図。保護された領域は赤で示している。((Kato *et al.*, 2017) Fig. 4D より引用)

### 3.8 研究結果のまとめ

本研究では、クロマチンリモデリングの過程で形成されることが考えられる特殊なサブヌクレオソーム構造である、オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造解析を行った。試験管内で再構成したオーバーラッピングダイヌクレオソームを結晶化し、大型放射光施設 SPring-8 を用いた X 線回折実験を行うことによって、3.14 Å の分解能でオーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造を明らかにした (Figure 10)。オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造中では、ヒストン 6 量体に DNA が巻きついたヘキサソーム構造とヒストン 8 量体に DNA が巻きついたオクタソーム構造が重なり合い、ヒストン 14 量体に約 3 回転の DNA が巻きついた特殊な立体構造を形成していることが明らかになった。また、オーバーラッピングダイヌクレオソーム構造の形成は、ヌクレオソーム同士が接する面からの H2A、H2B の欠落によって可能となっていた。H2A、H2B の欠落は、2 つのヌクレオソームユニットが重なり合うことを可能にしており、その結果、2 つのヌクレオソームユニットの間で、従来知られていたオクタソーム構造には見られない相互作用が生じていた (Figure 12)。さらに、オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造中では、2 つのヌクレオソームユニットが重なり合う領域において、ヌクレオソームの表面に存在する酸性領域である acidic patch が一方のヌクレオソームユニットに覆われ、塞がれていることがわかった。acidic patch に結合することが知られる 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能を調べたところ、通常のダイヌクレオソームよりも RCC1 の結合能が低いことが明らかになった (Figure 14)。また、オーバーラッピングダイヌクレオソームに対して、リンカーヒストン H1 が結合可能であるかどうか調べたところ、オーバーラッピングダイヌクレオソームには、1 分子の H1 が結合可能であることを示す結果が得られた



(Figure15)。これらの結果が示す意味などについては、4章で考察した。

## 4 章 総合討論

### 4.1 オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成機構

本研究では、オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造を明らかにし、オーバーラッピングダイヌクレオソームがヘキサソームユニットとオクタソームユニットからなる特殊な構造を形成していることを明らかにした (Figure 10A)。また、生化学的な解析によって、オーバーラッピングダイヌクレオソームの性状解析を行った。一方、生体内のどのような領域にオーバーラッピングダイヌクレオソームが形成されているのかは、不明であった。

そこで、生体内においてオーバーラッピングダイヌクレオソームが形成される領域を明らかにするために、大川恭行博士 (九州大学)、野上順平博士 (九州大学)、前原一満博士 (九州大学) との共同研究によって、ゲノム解析 (MNase-seq 解析) を行った。ゲノム解析に先立ち、試験管内において、ヒストンによって保護されていない DNA 領域を優先的に切断する DNA 切断酵素である MNase (Micrococcal nuclease) に対する耐性を試験したところ、オーバーラッピングダイヌクレオソームは通常のヌクレオソームと比較して、MNase に対する耐性が高く、約 250 塩基対の DNA が MNase から保護されることがわかった。そこで、HeLa 細胞から抽出した核を MNase で処理し、250 塩基対程度の DNA 断片を抽出して、次世代シーケンサーを用いて解析することで、オーバーラッピングダイヌクレオソームのゲノム上での形成領域を推察した。その結果、オーバーラッピングダイヌクレオソームが、遺伝子の転写開始点直下の領域に形成されていることが示唆する結果が得られた (Kato *et al.*, 2017)。転写開始点近傍の領域は、クロマチンリモデリングによって、ヌクレオソームの再配置が頻繁に生じる領域であり、様々なクロマチンリモデリング因子が、ヌクレオソームの再配置を行う。ま

た、SWI/SNF ファミリーのクロマチンリモデリング因子も転写開始点近傍において、ヌクレオソームの再配置を行うことが知られている (Krietenstein *et al.*, 2016; Clapier *et al.*, 2017)。このことは、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 によって、オーバーラッピングダイヌクレオソームが形成され得ることを示す先行研究のデータとも一致する (Engelholm *et al.*, 2009)。また、クロマチンリモデリングは、転写だけでなく、DNA の修復の際などにも生じていることが知られる (Hara *et al.*, 2003; Tyagi *et al.*, 2016)。このことは、オーバーラッピングダイヌクレオソームが、転写開始点近傍に限らず、生体内で広く形成され得る可能性も示唆している。

次に、オーバーラッピングダイヌクレオソームがどのように形成されるのか、その機構について考察した。本研究から、オーバーラッピングダイヌクレオソームには、2分子の H1 は結合せず、1分子の H1 のみが結合可能であることが示された (Figure 15)。一方、生体内では、ほぼすべてのヌクレオソームにリンカーヒストンが結合していることが報告されている (Bates *et al.*, 1981; Woodcock *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2016)。このことは、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成の際に 1 分子の H1 が解離することを示唆している。その機構として、「オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造形成によって 1 分子の H1 が解離する可能性」と「オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成前に片方のヌクレオソームから 1 分子の H1 が解離する可能性」の 2 つの可能性が考えられた。リンカーヒストンは、クロマチンを凝縮させることから、クロマチンリモデリングに対して疎外的に働くことが考えられる。また、Nap1 をはじめとしたヒストンシャペロンは、H1 をクロマチン上から取り除くことによって、クロマチンリモデリング因子によるヌクレオソームのポジショニング変化を生じやすくさせる

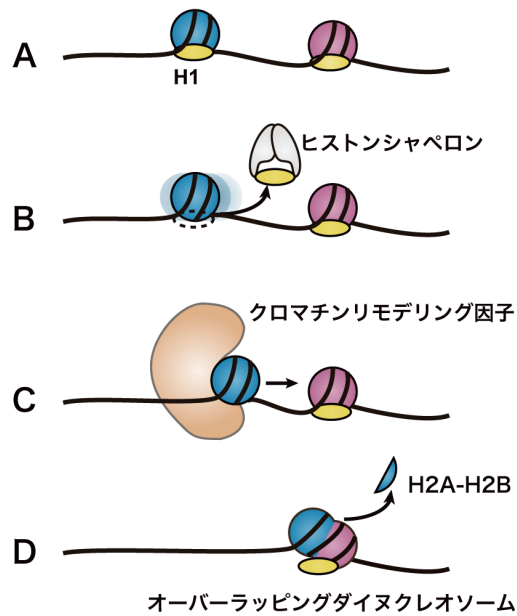
ことが報告されている (Machida *et al.*, 2014; Bednar *et al.*, 2016)。これらのことから、はじめにヒストンシャペロンによって H1 が解離し、自由度の増したヌクレオソームが、クロマチンリモデリング因子によって隣のヌクレオソームと衝突することで、オーバーラッピングダイヌクレオソームが形成されるモデルを考えた (Figure 17)。

また、本研究の結果より、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成の際には、2 つのヌクレオソームが向き合う面から、H2A、H2B が各 1 分子ずつ解離することがわかった (Figure 10B)。SWI/SNF ファミリーのクロマチンリモデリング因子は、ヌクレオソーム中の DNA の構造を変化させることが知られる (Liu *et al.*, 2017; Clapier *et al.*, 2017)。このことにより、ヒストンと DNA の結合力が減少し、ヌクレオソーム同士の衝突に伴った H2A、H2B の解離を容易にしているのかもしれない。

一方、クロマチンリモデリング以外の機構によって、オーバーラッピングダイヌクレオソームが形成されることもあるかもしれない。例えば、転写の際に RNA ポリメラーゼによって、H2A、H2B がヌクレオソームから欠落する現象が知られている (Kireeva *et al.*, 2002)。転写の際、RNA ポリメラーゼによって、H2A、H2B が欠落したヌクレオソームが隣のヌクレオソームに衝突し、オーバーラッピングダイヌクレオソームが形成されることもあるかもしれない。このことは、DNA 上で生じる生体内機能に依存してオーバーラッピングダイヌクレオソームが形成され得ることを示唆しており、オーバーラッピングダイヌクレオソームは DNA 上で生じる生体内機能に何らかの影響を及ぼすと考えられる。オーバーラッピングダイヌクレオソームの機能については、4.2 で考察した。

また、ヌクレオソームの形成部位が、DNA の配列依存的に制御される可能性も示唆されている (Segal *et al.*, 2006; Brogaard *et al.*, 2012; Struhl *et al.*, 2013)。よ

って、オーバーラッピングダイヌクレオソームは、DNA 配列依存的に生体内で幅広く形成されることもあるかもしれない。さらに、特定の DNA 配列依存的に形成されたオーバーラッピングダイヌクレオソームが、生体内の特定の遺伝子の機能発現を制御している可能性も考えられる。また、生体内には、多数のリピート配列が存在していることが知られる (Biscotti *et al.*, 2015)。このようなリピート配列上においては、もしかしたら、3 つ以上のヌクレオソームが衝突した特殊な構造体が形成されることもあるかもしれない。



**Figure 17** オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成のモデル

**A.**ヌクレオソームのリンカーDNA領域には、H1が結合している。**B.**ヒストンシャペロンがH1を剥がす。**C.**クロマチンリモデリング因子がヌクレオソームのポジショニングを変化させる。**D.**ヌクレオソーム同士の衝突によって、オーバーラッピングダイヌクレオソームが形成される。((Kato *et al.*, 2017) Fig. S7 より引用)

## 4.2 オーバーラッピングダイヌクレオソームの機能

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構造中では、ヌクレオソームの表面に存在する酸性領域である **acidic patch** の1つが、H2A、H2B の欠落によって消失していた (Figure 14)。また、オクタソームユニットの **acidic patch** のうちの1つはヘキサソームユニットによって塞がれていた。これらのことによって、オーバーラッピングダイヌクレオソームは、通常のダイヌクレオソームよりも、表面に露出する **acidic patch** の領域が減少していることが考えられた。**acidic patch** は、ヌクレオソーム表面に存在し、様々な核内タンパク質のクロマチン結合の足場として機能する領域である。生体内においては、**acidic patch** と相互作用した核内タンパク質が、DNA の機能発現を制御していることが知られる (McGinty *et al.*, 2016; Lesbats *et al.*, 2017)。例えば、ヌクレオソームの **acidic patch** に結合することで、ヌクレオソーム表面にアクセスすることが知られるタンパク質複合体の1つとして PRC1 が知られる。PRC1 は、クロマチンを凝縮することで遺伝子の発現を抑制すること、H2A の 119 番目のリジン残基をユビキチン化することが知られる複合体である (McGinty *et al.*, 2014; McGinty *et al.*, 2016)。オーバーラッピングダイヌクレオソームは、**acidic patch** の欠落によって、このような核内タンパク質のヌクレオソーム表面への結合を減弱させ、転写をはじめとした DNA の機能発現を制御しているかもしれない。一方、**acidic patch** には、近接したヌクレオソーム中のヒストンのテール領域が相互作用し、クロマチンの高次構造形成に関与することも知られている (Luger *et al.*, 1997; Kalashnikova *et al.*, 2013)。もしかしたら、オーバーラッピングダイヌクレオソームにおける **acidic patch** 領域の減少は、**acidic patch** を介したヌクレオソーム間相互作用、およびそれに伴ったクロマチンの高次構造形成に対して、阻害的に作用している可能性がある。このこと

よって、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成がクロマチンの高次構造を大きく変化させ、RNA ポリメラーゼを始めとした DNA 機能発現に直接関与する因子のクロマチン結合量を変化させる可能性がある。

また、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成の際に H2A、H2B が欠落することによって、重なり合うことが可能になったヘキサソームユニットとオクタソームユニットの間で、相互作用が生じている可能性が示唆された (Figures 12、13)。この新しいヌクレオソーム間の相互作用は、2つのヌクレオソームユニットが重なり合うことではじめて可能となる相互作用であり、今まで報告されていたどのヌクレオソーム間の相互作用とも異なる形式であった (Tan *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2014; Mattioli *et al.*, 2017)。このことは、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成によって、特殊なクロマチンの高次構造を形成し得ることを示唆する。また、2つのヌクレオソームユニット間の相互作用に関与していると考えられるアミノ酸は、酵母、植物、昆虫、両生類、哺乳類など様々な生物種で保存されている (Figure 18)。このことは、オーバーラッピングダイヌクレオソーム依存的なクロマチン構造の形成が、進化の過程で広く保存された重要な機構であることを示唆している。生体内においては、ヌクレオソーム同士の相互作用によって、クロマチンが高度に折りたたまれていることが考えられている (Tan *et al.*, 2011; Peppenella *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014; Mattioli *et al.*, 2017)。また、クロマチンの多様な高次構造形成に伴って、クロマチン内に多数のドメインが形成され、立体的に近接したゲノム領域間で遺伝子発現の調節が行なわれていることが知られる (Dixon *et al.*, 2016)。このようなクロマチンの多様な高次構造形成に、オーバーラッピングダイヌクレオソーム内の新たなヌクレオソーム間相互作用が寄与している可能性がある。



また、幾つかの核内タンパク質は、複数のヌクレオソームの間を跨ぐようにして結合し、クロマチンの構造を制御していることが考えられている (Machida *et al.*, 2018)。本研究によって、明らかになったオーバーラッピングダイヌクレオソーム中では、2つのヌクレオソームユニットが緊密に密接していた。このことから、複数のヌクレオソームの間に跨がって結合する相互作用因子は、オーバーラッピングダイヌクレオソーム内の2つのヌクレオソームユニット間に結合できない可能性がある。もしかしたら、このような相互作用因子の結合の有無が、オーバーラッピングダイヌクレオソームに依存したクロマチンの構造形成や制御機能に何らかの役割を果たしていることもあるかもしれない。

	H2A		H2B			H3	
	68	71	108	112	116	56	80
<i>Homo sapiens</i>	N	R	K	S	K	K	T
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	N	R	K	T	K	K	T
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	N	R	K	S	R	K	T
<i>Arabidopsis thaliana</i>	N	R	K	S	K	K	T
<i>Drosophila melanogaster</i>	N	R	K	S	K	K	T
<i>Xenopus laevis</i>	N	R	K	S	K	K	T
<i>Mus musculus</i>	N	R	K	S	K	K	T

**Figure 18** ヘキサソームユニットとオクタソームユニットの相互作用に寄与するアミノ酸の生物種間での保存性

ヒト、分裂酵母、出芽酵母、シロイヌナズナ、キイロショウジョウバエ、アフリカツメガエル、ハツカネズミにおいて、オーバーラッピングダイヌクレオソームを形成した際にヘキサソームユニットとオクタソームユニット間の相互作用に重要であると考えられるアミノ酸を比較した。

### 4.3 今後の展望

本研究では、クロマチンリモデリングの過程で形成されることが考えられるサブヌクレオソーム構造である、オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造を明らかにし、その性状を明らかにした。また、大川博士らとの共同研究によって、転写開始点直下の領域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ことを示唆するデータが得られている (Kato *et al.*, 2017)。一方、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成意義やその機能などを、直接的に示すデータは少ない。今後、オーバーラッピングダイヌクレオソームのより詳細な機能解析が進展することにより、クロマチンを介した DNA 機能発現制御研究の新展開が期待される。例えば、オーバーラッピングダイヌクレオソームを含む複数のヌクレオソームが連なったヌクレオソームアレイの性状解析を行うことで、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成が高次のクロマチン構造に与える影響が明らかになる。また、オーバーラッピングダイヌクレオソームを含むクロマチン上における転写解析を行うことによって、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成が直接的に転写に与える影響が明らかになる。また、本研究によって、オーバーラッピングダイヌクレオソームと通常のヌクレオソームの間で、核内タンパク質の結合能が異なる可能性が示唆された。今後、オーバーラッピングダイヌクレオソームに対するプロテオミクス解析を行うことなどによって、オーバーラッピングダイヌクレオソームに通常のヌクレオソームと異なる特異的な相互作用因子の存在が明らかになるかもしれない。さらに、オーバーラッピングダイヌクレオソームに特異的な構造を認識することが可能な抗体などの作製によって、生体内におけるオーバーラッピングダイヌクレオソームの検出が可能になれば、*in vivo* におけるオーバーラッピングダイヌクレオソームの機能解析が大きく進展することになる。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は、通常のヌクレオソームには存在しない、ヘキサソームユニットとオクタソームユニット間が相互作用した構造を含んでいる。この知見がオーバーラッピングダイヌクレオソームに特異的な構造を認識する抗体の設計などにも役に立つと考えられる。さらに、これまでに原子分解能で明らかにされたヌクレオソームの立体構造は、すべてヒストン 8 量体に DNA が巻きついた構造体であり、本研究におい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は、サブヌクレオソームの立体構造を明らかにした初めての例であった。今後、さらに多様なサブヌクレオソームの立体構造が明らかになることで、サブヌクレオソームの使い分けに依存した新たな遺伝子発現制御機構などが明らかになることが期待される。

## 5 章 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., Zwart P. H., PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. (2010) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 213-221.

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

Barbera A. J., Chodaparambil J. V., Kelley-Clarke B., Joukov V., Walter J. C., Luger K., Kaye K. M., The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. (2006) *Science*, **311**, 856-861.

Bates D. L., Thomas J. O., Histones H1 and H5: one or two molecules per nucleosome? (1981) *Nucleic Acids Res.*, **9**, 5883-5894.

Bednar J., Hamiche A., Dimitrov S., H1-nucleosome interactions and their functional implications. (2016) *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 436-443.

Bednar J., Garcia-Saez I., Boopathi R., Cutter A. R., Papai G., Reymer A., Syed S. H., Lone I. N., Tonchev O., Crucifix C., Menoni H., Papin C., Skoufias D. A., Kurumizaka H., Lavery R., Hamiche A., Hayes J. J., Schultz P., Angelov D., Petosa C., Dimitrov S., Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. (2017) *Mol. Cell*, **66**, 384-397.

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

Biscotti M. A., Olmo E., Heslop-Harrison J. S., Repetitive DNA in eukaryotic genomes. (2015) *Chromosome Res.*, **23**, 415-420.

Brogaard K., Xi L., Wang J. P., Widom J., A map of nucleosome positions in yeast at base-pair resolution. (2012) *Nature*, **486**, 496-501.

Burgess R. J., Zhang Z., Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. (2013) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 14-22.

Caterino T.L., Fang H., Hayes J. J., Nucleosome linker DNA contacts and induces specific folding of the intrinsically disordered H1 carboxyl-terminal domain. (2011) *Mol. Cell Biol.*, **31**, 2341-2348.

Chen V. B., Arendall W. B. 3rd, Headd J. J., Keedy D. A., Immormino R. M., Kapral G. J., Murray L. W., Richardson J. S., Richardson D. C., MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. (2010) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 12-21.

Clapier C. R., Iwasa J., Cairns B. R., Peterson C. L., Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. (2017) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 407-422.

Dixon J. R., Gorkin D. U., Ren B., Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization. (2016) *Mol. Cell.*, **62**, 668-680.

Dyer P. N., Edayathumangalam R. S., White C. L., Bao Y., Chakravarthy S., Muthurajan U. M., Luger K., Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA. (2004) *Methods Enzymol.*, **375**, 23-44.

Emsley P., Cowtan K., Coot: model-building tools for molecular graphics. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2126-2132.

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

Fang Q., Chen P., Wang M., Fang J., Yang N., Li G., Xu R. M., Human cytomegalovirus IE1 protein alters the higher-order chromatin structure by targeting the acidic patch of the nucleosome. (2016) *Elife*, **5**, e11911.

Flanagan T. W., Brown D. T., Molecular dynamics of histone H1. (2016) *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 468-475.

Grewal S. I., Moazed D., Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. (2003) *Science*, **301**, 798-802.

Hammond C. M., Strømme C. B., Huang H., Patel D. J., Groth A., Histone chaperone networks shaping chromatin function. (2017) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 141-158.

Hara R., Sancar A., Effect of damage type on stimulation of human excision nuclease by SWI/SNF chromatin remodeling factor. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 4121-4125.

Iborra F. J., Pombo A., Jackson D. A., Cook P. R., Active RNA polymerases are localized within discrete transcription 'factories' in human nuclei. (1996) *J. Cell Sci.*, **109**, 1427-1436.



Kalashnikova A. A., Porter-Goff M. E., Muthurajan U. M., Luger K., Hansen J. C.,  
The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin  
structure. (2013) *J. R. Soc. Interface*, **10**, 20121022.

Kato D., Osakabe A., Arimura Y., Mizukami Y., Horikoshi N., Saikusa K., Akashi S.,  
Nishimura Y., Park S. Y., Nogami J., Maehara K., Ohkawa Y., Matsumoto A., Kono  
H., Inoue R., Sugiyama M., Kurumizaka H., Crystal structure of the overlapping  
dinucleosome composed of hexasome and octasome. (2017) *Science*, **356**, 205-208.

Kato H., Jiang J., Zhou B. R., Rozendaal M., Feng H., Ghirlando R., Xiao T. S.,  
Straight A. F., Bai Y., A conserved mechanism for centromeric nucleosome  
recognition by centromere protein CENP-C. (2013) *Science*, **340**, 1110-1113.

Kato K., Okuwaki M., Nagata K., Role of Template Activating Factor-I as a  
chaperone in linker histone dynamics. (2011) *J. Cell Sci.*, **124**, 3254-3265.

Kepert J. F., Mazurkiewicz J., Heuvelman G. L., Tóth K. F., Rippe K., NAP1  
modulates binding of linker histone H1 to chromatin and induces an extended  
chromatin fiber conformation. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 34063-34072.

Kireeva M. L., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V., Kashlev M., Studitsky

V. M., Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 541-552.

Krietenstein N., Wal M., Watanabe S., Park B., Peterson C. L., Pugh B. F., Korber P., Genomic Nucleosome Organization Reconstituted with Pure Proteins. (2016) *Cell*, **167**, 709-721.

Kujirai T., Horikoshi N., Sato K., Maehara K., Machida S., Osakabe A., Kimura H., Ohkawa Y., Kurumizaka H., Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. (2016) *Nucleic Acids Res.*, **44**, 6127-6141.

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

Lai W. K. M., Pugh B. F., Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. (2017) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 548-562.

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

Lesbats P., Serrao E., Maskell D. P., Pye V. E., O'Reilly N., Lindemann D.,

Engelman A. N., Cherepanov P., Structural basis for spumavirus GAG tethering to chromatin. (2017) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**, 5509–5514.

Liu X., Li M., Xia X., Li X., Chen Z., Mechanism of chromatin remodelling revealed by the Snf2-nucleosome structure. (2017) *Nature*, **544**, 440-445.

Lowary P. T., Widom J., New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. (1998) *J. Mol. Biol.*, **276**, 19-42.

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

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

Lyubitelev A. V., Nikitin D. V., Shaytan A. K., Studitsky V. M., Kirpichnikov M. P., Structure and Functions of Linker Histones. (2016) *Biochemistry (Mosc.)*, **81**, 213-223.

Machida S., Takaku M., Ikura M., Sun J., Suzuki H., Kobayashi W., Kinomura A., Osakabe A., Tachiwana H., Horikoshi Y., Fukuto A., Matsuda R., Ura K., Tashiro S., Ikura T., Kurumizaka H., Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. (2014) *Sci. Rep.*, **4**, 4863.

Machida S., Takizawa Y., Ishimaru M., Sugita Y., Sekine S., Nakayama J., Wolf M., Kurumizaka H., Structural Basis of Heterochromatin Formation by Human HP1. (2018) *Mol. Cell*, **69**, 1–13.

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

Mattiroli F., Bhattacharyya S., Dyer P. N., White A. E., Sandman K., Burkhart B. W., Byrne K. R., Lee T., Ahn N. G., Santangelo T. J., Reeve J. N., Luger K., Structure of histone-based chromatin in Archaea. (2017) *Science*, **357**, 609-612.

McGinty R. K., Henrici R. C., Tan S., Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. (2014) *Nature*, **514**, 591-596.

McGinty R. K., Tan S., Recognition of the nucleosome by chromatin factors and enzymes. (2016) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **37**, 54-61.

Nora E. P., Lajoie B. R., Schulz E. G., Giorgetti L., Okamoto I., Servant N., Piolot T., van Berkum N. L., Meisig J., Sedat J., Gribnau J., Barillot E., Blüthgen N., Dekker J., Heard E., Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. (2012) *Nature*, **485**, 381-385.

Osakabe A., Adachi F., Arimura Y., Maehara K., Ohkawa Y., Kurumizaka H., Influence of DNA methylation on positioning and DNA flexibility of nucleosomes with pericentric satellite DNA. (2015) *Open Biol.*, **5**, 150128.

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

Pan C., Fan Y., Role of H1 linker histones in mammalian development and stem cell differentiation. (2016) *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 496-509.

Pepenella S., Murphy K. J., Hayes J. J., Intra- and inter-nucleosome interactions of the core histone tail domains in higher-order chromatin structure. (2014) *Chromosoma*, **123**, 3-13.

Ramakrishnan V., Finch J. T., Graziano V., Lee P. L., Sweet R. M., Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome

binding. (1993) *Nature*, **362**, 219-223.

Rhee H. S., Bataille A. R., Zhang L., Pugh B. F., Subnucleosomal structures and nucleosome asymmetry across a genome. (2014) *Cell*, **159**, 1377-1388.

Richardson R. T., Batova I. N., Widgren E. E., Zheng L. X., Whitfield M., Marzluff W. F., O'Rand M. G., Characterization of the histone H1-binding protein, NASP, as a cell cycle-regulated somatic protein. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 30378-30386.

Richardson R. T., Alekseev O. M., Grossman G., Widgren E. E., Thresher R., Wagner E. J., Sullivan K. D., Marzluff W. F., O'Rand M. G., Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP), a linker histone chaperone that is required for cell proliferation. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 21526-21534.

Segal E., Fondufe-Mittendorf Y., Chen L., Thåström A., Field Y., Moore I. K., Wang J. P., Widom J., A genomic code for nucleosome positioning., (2006) *Nature*, **442**, 772-778.

Seino H., Hisamoto N., Uzawa S., Sekiguchi T., Nishimoto T., DNA-binding domain of RCC1 protein is not essential for coupling mitosis with DNA replication. (1992) *J. Cell Sci.*, **102**, 393-400.

Shintomi K., Iwabuchi M., Saeki H., Ura K., Kishimoto T., Ohsumi K., Nucleosome assembly protein-1 is a linker histone chaperone in *Xenopus* eggs. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 8210-8215.

Simpson R. T., Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. (1978) *Biochemistry*, **17**, 5524-5531.

Song F., Chen P., Sun D., Wang M., Dong L., Liang D., Xu R. M., Zhu P., Li G., Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. (2014) *Science*, **344**, 376-380.

Struhl K., Segal E., Determinants of nucleosome positioning. (2013) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 267-273.

Sutherland H., Bickmore W. A., Transcription factories: gene expression in unions? (2009) *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 457-466.

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

Tachiwana H., Kagawa W., Osakabe A., Kawaguchi K., Shiga T.,

Hayashi-Takanaka Y., Kimura H., Kurumizaka H., Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 10454-10459.

Taguchi H., Horikoshi N., Arimura Y., Kurumizaka H., A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye. (2014) *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. I., 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., Henikoff S., A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. (2012) *Epigenetics Chromatin.*, **5**, 7.

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

Tanaka Y., Tawaramoto-Sasanuma M., Kawaguchi S., Ohta T., Yoda K.,



Kurumizaka H., Yokoyama S., Expression and purification of recombinant human histones. (2004) *Methods*, **33**, 3-11.

Tanay A., Cavalli G., Chromosomal domains: epigenetic contexts and functional implications of genomic compartmentalization. (2013) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **23**, 197-203.

Taylor G., The phase problem. (2003) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **59**, 1881-1890.

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

Tyagi M., Imam N., Verma K., Patel A. K., Chromatin remodelers: We are the drivers!! (2016) *Nucleus*, **7**, 388-404.

Ulyanova N. P., Schnitzler G. R., Human SWI/SNF generates abundant, structurally altered dinucleosomes on polynucleosomal templates. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 11156-11170.

Vagin A., Teplyakov A., MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. (1997) *J. Appl. Cryst.*, **30**, 1022-1025.

Venkatesh S., Workman J. L., Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. (2015) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 178-189.

Volokh O. I., Derkacheva N. I., Studitsky V. M., Sokolova O. S., Structural studies of chromatin remodeling factors. (2016) *Mol. Biol. (Mosk)*, **50**, 922-934.

Woodcock C. L., Skoultchi A. I., Fan Y., Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. (2006) *Chromosome Res.*, **14**, 17-25.

Zhou B. R., Feng H., Kato H., Dai L., Yang Y., Zhou Y., Bai Y., Structural insights into the histone H1-nucleosome complex. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 19390-19395.

Zhou B. R., Jiang J., Feng H., Ghirlando R., Xiao T. S., Bai Y., Structural Mechanisms of Nucleosome Recognition by Linker Histones. (2015) *Mol. Cell*, **59**, 628-638.

Zhou B. R., Feng H., Ghirlando R., Li S., Schwieters C. D., Bai Y., A Small Number of Residues Can Determine if Linker Histones Are Bound On or Off Dyad in the Chromatosome. (2016) *J. Mol. Biol.*, **428**, 3948-3959.

Zhou J., Fan J. Y., Rangasamy D., Tremethick D. J., The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 1070-1076.

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

## 謝辞

早稲田大学理工学術院教授 胡桃坂仁志先生には、本研究を遂行するにあたり、多数の貴重なご助言をいただくとともに、研究生活全般において、懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました。心より感謝申し上げます。

グレゴールメンデル研究所 越阪部晃永博士、早稲田大学 有村泰宏博士には、本研究を遂行する上で必要となる技術のご指導をいただくとともに、本研究全般にわたる多数のご指導をいただきました。厚く御礼申し上げます。

横浜市立大学准教授 明石知子先生、広島大学 七種和美博士には、**native ESI-MS** 解析にて、多大なお力添えをいただきました。深く感謝申し上げます。

九州大学教授 大川恭行先生、九州大学 野上順平博士、九州大学 前原一満博士には、ゲノム解析を行っていただきました。深く御礼申し上げます。

京都大学教授 杉山正明先生、京都大学准教授 井上倫太郎先生には、X線小角散乱解析において、多大なお力添えをいただきました。深く感謝申し上げます。

横浜市立大学教授 朴三用先生には、X線結晶構造解析を行うにあたり、貴重なアドバイスをいただきました。厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、多数の支援をいただきました早稲田大学胡桃坂研究室の皆様には深く感謝申し上げます。

最後に、研究生活をサポートして下さった家族に感謝致します。

## 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（申請者含む）
論文	<p>○<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>, <b>356</b>, pp205-208, 2017.</p>
講演	<p>&lt;学会発表&gt; 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.</p> <p>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.</p> <p>国内発表（ポスター発表） ○<u>加藤大貴</u>、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</p> <p>国内発表（ポスター発表） <u>加藤大貴</u>、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</p>

講演	<p>国内発表（ポスター発表）  <u>加藤大貴</u>、<u>越阪部晃永</u>、<u>明石知子</u>、<u>胡桃坂仁志</u>          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</p>
日本語 総説	<p>&lt; 著書 &gt;  <u>胡桃坂仁志</u>、<u>○加藤大貴</u>、<u>越阪部晃永</u>          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>&lt; ウェブサイト &gt;  <u>○加藤大貴</u>、<u>越阪部晃永</u>、<u>胡桃坂仁志</u>          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  <a href="http://first.lifesciencedb.jp/archives/16431">http://first.lifesciencedb.jp/archives/16431</a></p>
その他	<p>&lt; 論文 &gt;  <u>Yoshifumi Amamoto</u>, <u>Yuki Aoi</u>, <u>Nozomu Nagashima</u>, <u>Hiroki Suto</u>,  <u>Daisuke Yoshidome</u>, <u>Yasuhiro Arimura</u>, <u>Akihisa Osakabe</u>, <u>Daiki Kato</u>,  <u>Hitoshi Kurumizaka</u>, <u>Shigehiro A. Kawashima</u>, <u>Kenzo Yamatsugu</u>,  <u>Motomu Kanai</u>          Synthetic Posttranslational Modifications: Chemical Catalyst-Driven          Regioselective Histone Acylation of Native Chromatin.  <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, <b>139</b>, pp7568-7576, 2017.</p> <p><u>Yuya Suzuki</u>, <u>Naoki Horikoshi</u>, <u>Daiki Kato</u>, <u>Hitoshi Kurumizaka</u>          Crystal structure of the nucleosome containing histone H3 with          crotonylated lysine 122.  <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>, <b>469</b>, pp483-489, 2016.</p> <p><u>Daiki Kato</u>, <u>Akihisa Osakabe</u>, <u>Hiroaki Tachiwana</u>, <u>Hiroki Tanaka</u>,  <u>Hitoshi Kurumizaka</u>          Human tNASP promotes in vitro nucleosome assembly with histone          H3.3.  <i>Biochemistry</i>, <b>54</b>, pp1171-1179, 2015.</p>