

博士論文審査報告書

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

2018年2月

真核生物のゲノム DNA は、クロマチンを形成し、細胞核内にコンパクトに収納されている。クロマチンは、円盤状の基盤構造であるヌクレオソームが連なることで構成されている。ヌクレオソームは、4 種のヒストンと呼ばれる塩基性のタンパク質（H2A、H2B、H3、H4）が各 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体の周りに、約 150 塩基対の DNA が 1.65 回転巻きついた構造体である。ヌクレオソームを構成するヒストンのわずかなアミノ酸配列の違いや翻訳後修飾の有無などによって、クロマチンの構造変換が誘起され、転写・組換え・修復などの生体内機能を制御していることが知られている。これまでに、生体内に多く存在する、ヒストン 8 量体に DNA が巻きついたヌクレオソーム（オクタソーム）と比較して、ヒストン含量などが異なる特殊なヌクレオソーム（サブヌクレオソーム）が形成されることが示唆されている。例えば、各 2 分子の H3、H4 と各 1 分子の H2A、H2B からなるヘキサソームや、各 2 分子の H3、H4 からなるテトラソーム、各 1 分子の H2A、H2B、H3、H4 からなるヘミソームなどの存在が提案されている。これらの通常のヌクレオソームとは異なる多様なヌクレオソームは、ゲノム DNA の生体内での機能を担うために重要な役割を果たすと考えられている。しかし、これらの複合体を構成するヒストンは、通常のヌクレオソームを構成するヒストンとアミノ酸配列が同一であるため、解析が困難であり、ヒストンの翻訳後修飾などを対象とした解析と比較して、研究が立ち遅れている。

遺伝子発現の際には、クロマチンリモデリング因子と呼ばれるタンパク質群が、ゲノム DNA 上に形成されたヌクレオソームの再配置を行うことで、遺伝子の発現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によって、ヌクレオソームの再配置が行われる際、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することで、特殊なヌクレオソーム構造を形成することが先行研究から考えられていた。この複合体には、各 3 分子の H2A、H2B と各 4 分子の H3、H4 が含まれることが示唆されていた。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名付けている。先行研究において、ヌクレオソームが強固に形成されることが知られる DNA 配列である 601 配列の DNA を 2 つ組み合わせた 250 塩基対の DNA を用いることで、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可能であることが示されていた。また、原子間力顕微鏡を用いた解析から、立体構造の概形が観察されていたものの、立体構造の詳細は不明であった。

本研究では、特殊な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に着目し、その立体構造解析を行うことで、オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造や機能を明らかにすることを目的にしている。そのために、リコンビナントタンパク質として精製したヒトのヒストンを用いてオーバーラッピングダイヌクレオソームを再構成し、X 線結晶構造解析や生化学的解析を行っている。本論文は、5 つの章から構成されている。

第 1 章では、本研究の背景として、クロマチンやヌクレオソーム、ヒスト

ンについて、先行研究によって明らかにされていることを記載している。また、通常のヌクレオソームと比較してヒストン含量などの異なるサブヌクレオソームについて紹介するとともに、オーバーラッピングダイヌクレオソームについて、現在明らかになっていることや不明な点について論じている。これらの内容について、本研究を理解する上で必要となる情報がわかりやすく記載されており、適切な内容であると評価している。

第 2 章では、本研究で用いた試料の調製法や解析法について記載されている。まず、本研究で用いられているヒストンや、ヌクレオソームへのリンカーヒストンの結合を触媒するタンパク質である **Nap1**、ヌクレオソームの **acidic patch** と呼ばれる酸性領域に結合するタンパク質である **RCC1**、ヌクレオソームの再構成に用いる DNA の調製方法が詳細に記載されている。次に、ヒストン複合体や、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方法、精製方法が記載されている。その後、本研究で行われている X 線結晶構造解析の手法について、結晶化からデータ解析まで、詳細な手法が記載されている。最後に、生化学的な解析の手法が記載されている。具体的には、オーバーラッピングダイヌクレオソームに対する **RCC1** の結合や、リンカーヒストン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について行ったゲルシフト解析、スクロース密度勾配を用いた超遠心による解析、ヒドロキシラジカルを用いたフットプリンティング解析について記載されている。いずれも詳細に手法が記載されており、適切な情報を与えていると評価できる。

第 3 章では、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の構造生物学的、生化学的解析の結果が記載されている。まず、リコンビナントタンパク質として精製したヒトのヒストンを用いてヒストン複合体を再構成し、250 塩基対の DNA 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、精製を行っている。次に、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、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ている。その後、大型放射光施設である **SPring-8** を用いた X 線回折実験によって、 3.14 \AA 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することに成功している。得られた立体構造から、オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造は、ヘキサソームユニットとオクタソームユニットの 2 つの構造ユニットが重なり合うようにして形成されていることが示されている。その結果、オーバーラッピングダイヌクレオソームでは、ヒストン 14 量体に DNA が 3 回転巻きついた構造を形成しており、通常のヌクレオソームとは異なる特殊な立体構造であることを明らかにしている。また、立体構造解析の結果から、ヘキサソームユニットの 1 つの H3 の α ヘリックスが、他の H3 の α ヘリックスよりも短くなっていることや、2 つのヌクレオソームユニット間で相互作用が生じている可能性などに言及している。その後、**RCC1** とリンカーヒストン **H1** という 2 つの核内タンパク質の、オ

オーバーラッピングダイヌクレオソームに対する結合の解析を行っている。オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造中では、通常のヌクレオソームに2つ存在している **acidic patch** と呼ばれる酸性領域の数が減少していることなどを示している。このことから、**acidic patch** 結合タンパク質である **RCC1** の結合能が低下することを予測し、ゲルシフト解析によってオーバーラッピングダイヌクレオソームに対する **RCC1** の結合能を検証している。また、リンカーヒストン **H1** の結合についてもゲルシフト解析や、スクロース密度勾配を用いた解析、ヒドロキシラジカルを用いたフットプリンティング解析などを行い、オーバーラッピングダイヌクレオソームに1分子の **H1** が結合することを示している。これらの結果を踏まえ、オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造や機能を論じている。これらの結果は、当該分野において重要な知見を与える研究であると評価する。

第4章では、本研究によって得られたオーバーラッピングダイヌクレオソームの構造生物学的、生化学的解析の知見から、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成機構や機能、関連研究分野の今後の展望について、先行研究を踏まえた上で議論している。

以上のように、本研究は、通常のヌクレオソームとは異なる特殊なクロマチン基盤構造であるオーバーラッピングダイヌクレオソームについて、構造生物学的な解析や生化学的な解析を行い、オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造や機能を明らかにした研究である。クロマチンの構造の多様性に依存した遺伝子の発現制御機構の理解は、当該分野における重要なテーマであり、本研究が与える知見は、当該分野に重要な影響を与えるものであると考えられる。したがって、本論文は博士（理学）に十分に値する内容であると判断した。

2018年2月

審査員

(主査) 早稲田大学教授 博士（学術） 埼玉大学 胡桃坂 仁志

早稲田大学教授 博士（理学） 東京大学 木賀 大介

早稲田大学准教授 博士（理学） 東京大学 佐藤 政充