

博士論文概要

論文題目

ヌクレオソームの構造安定性に関する研究
Study on structural stability of
nucleosomes

申請者

田口	裕之
Hiroyuki	TAGUCHI

電気・情報生命専攻 構造生物学研究

2017年11月

ゲノム DNA は生物の遺伝情報を担う担体である。真核生物の細胞内では、転写、複製、修復など DNA 代謝がゲノム DNA 上で行われている。ゲノム DNA 上には DNA 代謝の活発な領域や活発でない領域が存在する。このようなゲノム DNA 上の各領域における DNA 代謝活性の差異は、ゲノム DNA とタンパク質が結合したクロマチンの性質が、各領域によって異なることで生み出される。クロマチンの性質には、DNA に結合したタンパク質、特にクロマチンの主要構成因子であるヒストンタンパク質の性質が大きく影響する。ヒストンタンパク質には H3、H4、H2A、H2B の 4 種類のヒストンタンパク質が存在する。これらヒストンタンパク質がそれぞれ 2 分子ずつで構成されるヒストン八量体に DNA が巻きつき、ヌクレオソームと呼ばれる構造体が形成される。クロマチンにおいてヌクレオソームは最小機能単位であり、ヌクレオソームが連なることでクロマチンが形成される。ヒストンタンパク質や DNA の化学修飾、ヒストンバリエントなどの様々なエピジェネティックマークによって多様な性質のヌクレオソームが生体内に形成される。本研究では、試験内でさまざまな種類のヌクレオソームを再構成し、これらの“ヌクレオソームの構造安定性を簡便かつ高精度に評価する手法の開発”、及び“新規ヒストンバリエント H3.6、H3.7、H3.8 の機能解析”を行った。

DNA 代謝において、一過的にヌクレオソームの再構成、崩壊が起こる。ヌクレオソームの安定性を低下させるヒストン変異が細胞内での転写パターンを変化させることから、ヌクレオソームの安定性は DNA 代謝に影響を与えると考えられる。エピジェネティックマークを含むヌクレオソームはそれぞれ独自の安定性を持つことが知られており、これらの安定性の差異が、各ゲノム領域特異的な DNA 代謝制御に関与すると考えられる。そこでエピジェネティックマークを含むヌクレオソームの安定性を測定する必要がある。

近年、細胞内で発現している新しいヒストンバリエントが次々と報告されている。ヒストンバリエントとは、細胞内に豊富に存在する主要型ヒストンと置きかわりが可能な亜種である。ヒストンバリエントは転写や修復など DNA 代謝に対し、独自の機能を有することが知られている。2015 年に報告された H3 ヒストンバリエント H3.6、H3.7、H3.8 は霊長類に保存されたヒストンバリエントである。しかし、これらがクロマチンに与える影響は未知である。

これらの背景に基づき、本研究ではエピジェネティックマークを含むヌクレオソームの構造安定性を評価する手法の開発及びそれを用いた新規ヒストンバリエントの機能解析に着手した。まず、各種ヒストンをリコンビナントタンパク質として精製し、これらのタンパク質及び DNA を用いて試験管内でヌクレオソームを再構成した。再構成したヌクレオソームの安定性を測定するため、蛍光色素 SYPRO Orange と RT-PCR 装置を用いた熱安定性試験を開発した。さらに新規ヒストンバリエント H3.6、H3.7、H3.8 のヌクレオソーム形成能を評価した。その結果、H3.6 は効率よくヌクレオソームを形成することが明らかになった。そこで、

H3.6 を含むヌクレオソームについて、熱安定性試験及び X 線結晶構造解析を行い、ヌクレオソームの安定性及びその分子メカニズムを明らかにした。

本論文は全 5 章で構成されており、各章の要約は以下の通りである。

第 1 章は序論である。当該分野における研究の背景と本研究の目的を示した。まず、クロマチンによる遺伝子発現制御機構と、その基盤となるエピジェネティックマークについて概説した。さらに、ヌクレオソームの安定性がクロマチンに与える影響について先行研究を交えて記述した。次に、ヌクレオソームの安定性を測定する意義、及び新規ヒストンバリエントの機能解析、立体構造解析の必要性に焦点をあて、詳述した。

第 2 章は材料・実験方法である。本研究で行われた実験方法を詳述した。各種ヒストンの精製手法、ヒストン複合体の精製手法、ヌクレオソームの精製手法を記述した。さらに熱安定性試験、X 線結晶構造解析及び変異体解析など、生化学的、構造生物学的解析手法について記述した。

第 3 章はヌクレオソームの熱安定性試験の開発について詳述した。まず熱安定性試験を用いて、熱によってヌクレオソームが崩壊する過程を検出した。その結果、ヌクレオソームからヒストンが解離する過程を、蛍光色素が解離したヒストンに結合した際の蛍光シグナルの変化として検出できることがわかった。各種ヒストンタンパク質がどの順にヌクレオソームから解離しているのか特定するため、**H3**、**H4** からなるヘテロ四量体に DNA が巻きついたテトラソームの熱安定性試験を行い、ヌクレオソームの熱安定性試験結果と比較した。その結果、熱によって、**H2A**、**H2B** が低い温度でヌクレオソームから解離し、その次に **H3**、**H4** が DNA から解離することが明らかとなった。さらに、複数の濃度での塩化ナトリウム条件下で、ヌクレオソームの安定性を熱安定性試験を用いて調べた。その結果、塩化ナトリウムの濃度上昇に伴い、**H2A**、**H2B** はヌクレオソームから解離しやすくなり、**H3**、**H4** は DNA から解離しにくくなる現象が検出された。続いて、エピジェネティックマークの代表例であるヒストンバリエントを含むヌクレオソームの安定性の差異を、熱安定性試験を用いて検証した。その結果、ヒストン **H3** バリエント **H3T** を含むヌクレオソームは通常型のヌクレオソームと異なり、著しく不安定な構造を形成することが明らかとなった。以上の結果から、熱安定性試験を用いてヌクレオソームの安定性の変化を検出することが可能であることが示された。

第 4 章は新規ヒストンバリエントの機能解析における実験結果を詳述した。最初に大腸菌を利用してヒストンバリエント **H3.6**、**H3.7**、**H3.8** をリコンビナントタンパク質として精製することを試みた。その結果、全てのヒストンタンパク質が高純度に精製可能であることがわかった。次にヒストンバリエント **H3.6**、**H3.7**、**H3.8** をそれぞれ含むヒストン複合体の再構成を試みた。その結果、**H3.6** は、**H4**、**H2A**、**H2B** とともにヒストン複合体を形成した。**H3.8** は **H4** と複合体を形成できることがわかった。ところが、**H3.7** は、**H4**、**H2A**、**H2B** とともにヒ

ストン複合体を形成することができないことが明らかになった。そこで、H3.6複合体および H3.8 複合体を用いて、ヌクレオソームの再構成を試みた。その結果、H3.6 および H3.8 は、それぞれヌクレオソームを形成することができた。しかし、H3.8 については精製過程において、ヒストン含有量がヒストン八量体とは異なるサブヌクレオソームが優先的に形成され、ヒストン八量体を含む通常型のヌクレオソームを高純度に精製することはできなかった。再構成された H3.6 を含むヌクレオソームを用いて熱安定性試験を行った結果、既知のヒストンバリエーション H3.3 を含むヌクレオソームと比べて、H3.6 ヌクレオソームは不安定であることが明らかになった。そこで H3.6 を含むヌクレオソームが不安定な構造的な原因を解明するために、X 線結晶構造解析によって H3.6 を含むヌクレオソームの立体構造を決定した。H3.3 ヌクレオソームと H3.6 ヌクレオソームの立体構造の比較ならびに周辺領域の表面面積の比較の結果、H3.6 の 62 番目の Val がヌクレオソームの安定性を低下させる原因であることが示唆された。そこで 62 番目のアミノ酸に変異をもつヒストンを含むヌクレオソームを調製し、熱安定性試験を行った。その結果、H3.6 の 62 番目の Val がヌクレオソームの安定性を低下する原因アミノ酸であることを示した。

第 5 章は総合討論である。まず第 3 章の熱安定性試験の知見から得られたヌクレオソームの構造安定性と先行研究の結果を比較し、その妥当性や生体内での機能を考察した。次に第 4 章の新規ヒストンバリエーションを含むヌクレオソーム形成能及び、ヌクレオソームの熱安定性試験、立体構造解析から生体内における新規ヒストンバリエーションの役割について考察した。さらに新規ヒストンバリエーションの機能解明の今後の展望について併せて考察した。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 田口 裕之 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	<p>○<u>Hiroyuki Taguchi</u>, Naoki Horikoshi, Yasuhiro Arimura, Hitoshi Kurumizaka A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye <i>Methods</i>, 70, pp119-126, 2014.</p> <p>○<u>Hiroyuki Taguchi</u>, Yan Xie, Naoki Horikoshi, Kazumitsu Maehara, Akihito Harada, Jumpei Nogami, Koichi Sato, Yasuhiro Arimura, Akihisa Osakabe, Tomoya Kujirai, Takeshi Iwasaki, Yuichiro Semba, Taro Tachibana, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Hitoshi Kurumizaka Crystal Structure and Characterization of Novel Human Histone H3 Variants, H3.6, H3.7, and H3.8 <i>Biochemistry</i>, 56, pp2184-2196, 2017.</p>
講演	<p>学会発表</p> <ul style="list-style-type: none"> ・国内学会（口頭発表及びポスター発表） ○<u>田口裕之</u>、堀越直樹、有村泰宏、越阪部晃永、胡桃坂仁志 ヒストンバリエントを含むヌクレオソームの構造安定性と機能解析 第86回日本生化学会大会、2013年09月 ・国内学会（ポスター発表） ○<u>田口裕之</u>、堀越直樹、佐藤浩一、有村泰宏、越阪部晃永、前原一満、木村宏、大川恭行、胡桃坂仁志 新規ヒトヒストンバリエント H3F3AP6 を含むヌクレオソームの機能解析 第31回染色体ワークショップ、第12回核ダイナミクス研究会、2013年11月 ・国内学会（ポスター発表） ○<u>Hiroyuki Taguchi</u>, Naoki Horikoshi, Yan Xie, Tomoya Kujirai, Yasuhiro Arimura, Akihisa Osakabe, Kazumitsu Maehara, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Hitoshi Kurumizaka Structural and biochemical analyses of a mouse nucleosome containing novel H3 variant 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月 ・国内学会（ポスター発表） ○<u>田口裕之</u>、堀越直樹、謝炎、鯨井智也、有村泰宏、越阪部晃永、前原一満、木村宏、大川恭行、胡桃坂仁志 新規マウスヒストン H3 バリエントを含むヌクレオソームの構造安定性と機能解析 第32回染色体ワークショップ・第13回核ダイナミクス研究会、2014年12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）
講演	<p>・国際学会（ポスター発表） ○ <u>Hiroyuki Taguchi</u>, Naoki Horikoshi, Koichi Sato, Yasuhiro Arimura, Akihisa Osakabe, Kazumitsu Maehara, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Hitoshi Kurumizaka Structural significance of the nucleosome containing a novel H3 variant, H3F3AP6 Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 2015年8月</p> <p>・国内学会（ポスター発表） ○ <u>田口裕之</u>、堀越直樹、佐藤浩一、有村泰宏、前原一満、原田哲仁、木村宏、大川恭行、胡桃坂仁志 ヒストンバリエント H3.6 を含むヌクレオソームは DNA からヒストンが解離しやすい 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> <p>・国内学会（ポスター発表） ○ <u>田口裕之</u>、堀越直樹、佐藤浩一、謝炎、鯨井智也、太田充、前原一満、原田哲仁、木村宏、大川恭行、胡桃坂仁志 ヒトヒストンバリエント H3.6 を含むヌクレオソームは特殊なクロマチン構造を形成する 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月</p>
その他	<p>〈論文〉 Wakana Iwasaki, Yuta Miya, Naoki Horikoshi, Akihisa Osakabe, <u>Hiroyuki Taguchi</u>, Hiroaki Tachiwana, Takehiko Shibata, Wataru Kagawa, Hitoshi Kurumizaka Contribution of N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes <i>FEBS Open Biology</i>, 3, pp363-369, 2013.</p> <p>Yasuhiro Arimura, Kazuyoshi Shirayama, Naoki Horikoshi, Risa Fujita, <u>Hiroyuki Taguchi</u>, Wataru Kagawa, Tatsuo Fukagawa, Genevieve Almouzni, Hitoshi Kurumizaka Crystal structure and stable property of the cancer-associated heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3 <i>Scientific Reports</i>, 4, 7115, 2014.</p> <p>Masaaki Sugiyama, Naoki Horikoshi, Yuya Suzuki, <u>Hiroyuki Taguchi</u>, Tomoya Kujirai, Rintaro Inoue, Yojiro Oba, Nobuhiro Sato, Anne Martel, Lionel Porcar, Hitoshi Kurumizaka Solution structure of variant H2A.Z.1 nucleosome investigated by small-angle X-ray and neutron scatterings <i>Biochemistry and Biophysics Reports</i>, 4, pp28-32, 2015.</p> <p>Naoki Horikoshi, Yasuhiro Arimura, <u>Hiroyuki Taguchi</u>, Hitoshi Kurumizaka Crystal structures of heterotypic nucleosomes containing histones H2A.Z and H2A <i>Open Biology</i>, 6, 160127, 2016.</p>

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）
その他	<p>〈論文〉</p> <p>Jun Ueda, Akihito Harada, Takashi Urahama, Shinichi Machida, Kazumitsu Maehara, Masashi Hada, Yoshinori Makino, Jumpei Nogami, Naoki Horikoshi, Akihisa Osakabe, <u>Hiroyuki Taguchi</u>, 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 <i>Cell Reports</i>, 18, pp593-600, 2017,</p> <p>Tomoya Kujirai, Naoki Horikoshi, Yan Xie, Hiroyuki Taguchi, Hitoshi Kurumizaka Identification of the amino acid residues responsible for stable nucleosome formation by histone H3.Y. <i>Nucleus</i>, 8, pp239-248, 2017.</p>