

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

2018年2月

田口 裕之  
Hiroyuki TAGUCHI

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

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 構造生物学研究室

田口 裕之  
Hiroyuki TAGUCHI

## 目次

### 略語一覧

## 第1章 序論

- 1-1 ゲノム生物学からエピジェネティクス
- 1-2 クロマチン構造変換
- 1-3 ヌクレオソーム構造
- 1-4 エピジェネティックマークによる多様なヌクレオソーム構造
  - 1-4-1 DNA メチル化
  - 1-4-2 ヒストンの翻訳後修飾
  - 1-4-3 サブヌクレオソーム
  - 1-4-4 ヒストンバリエント
- 1-5 新規ヒストンバリエントの発見
- 1-6 ヌクレオソームの構造安定性
- 1-7 本研究について

## 第2章 材料・実験方法

- 2-1 新規ヒストンバリエント及び点変異体の発現系構築
- 2-2 ヒストン精製
- 2-3 ヒストン H2A. B 精製
- 2-4 ヒストン複合体の再構成
- 2-5 プラスミド DNA 精製
- 2-6 146 bp DNA 精製

- 2-7      ヌクレオソームの再構成
- 2-8      ヌクレオソームの熱安定性試験
- 2-9      ヒストンの熱安定性試験
- 2-10     非変性 PAGE によるヌクレオソームの生化学的解析
- 2-11     ヌクレオソームの結晶化
- 2-12     ヌクレオソームの構造解析
- 2-13     ヒストンのウェスタンブロットィング解析

### 第3章 熱安定性試験の確立

- 3-1      序
- 3-2      ヌクレオソームの再構成と精製
- 3-3      熱安定性試験におけるヌクレオソーム由来の蛍光ピークの同定
- 3-4      熱安定性試験におけるヌクレオソームの崩壊機構
- 3-5      塩濃度の違いによるヌクレオソームの熱安定性解析
- 3-6      ヒストンバリエントを含むヌクレオソームの熱安定性解析

### 第4章 新規ヒト H3 ヒストンバリエントの機能解析

- 4-1      序
- 4-2      ヒストンバリエント精製
- 4-2      ヒストン複合体の検討
- 4-3      ヌクレオソーム再構成の検討
- 4-4      新規ヒストンバリエントを含むヌクレオソームの熱安定性解析

4-5 H3.6 ヌクレオソームの構造解析

4-6 変異体解析

## 第5章 総合討論

5-1 熱安定性試験法の確立

5-2 熱安定性試験によるヌクレオソーム構造安定性の評価

5-3 新規ヒトヒストンバリエントの試験管内再構成解析

5-4 H3.6を含むヌクレオソームの生化学的、構造生物学的解析

5-5 今後の展望

謝辞

研究業績

## 略語一覽

a. u.	: arbitrary unit
bp	: base pair
CBB	: Coomassie Brilliant Blue
CD	: circular dichroism
CIP	: Calf-intestinal alkaline phosphatase
CTCF	: CCCTC-binding factor
C. V.	: Column Volume
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	: Deoxyribonucleic acid
DTT	: Dithiothreitol
ECL	: enhanced chemiluminescence
EDTA	: Etylenediaminetetraacetic acid
EtBr	: Ethidium bromide
FRAP	: Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	: Fluorescence resonance energy transfer
Gdn-HCl	: Guanidine Hydrochloride
HRP	: Horseradish peroxidase
IgG	: Immunoglobulin G
kbp	: kilobase pair
LB	: Luria-Bertani broth
Mbp	: Megabase pair
MNase	: Micrococcal Nuclease
MPD	: 2-methyl-2, 4-pentanediol
Ni-NTA	: Nickel-nitrilotriacetic acid
PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Primer Chain Reaction

PDB : Protein Data Bank  
PEG : Polyethylene glycol  
PMSF : Phenylmethanesulfonyl fluoride  
RMSD : Root Mean Square Deviation  
RNA : Ribonucleic acid  
RNase A : Ribonuclease A  
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
TAE : Tris-Acetate-EDTA  
TBE : Tris-borate-EDTA  
TBS : Tris Buffered Saline  
TE : Tris/EDTA  
Tris : Tris(hydroxymethyl)aminomethane  
UV : Ultraviolet

## 第1章 序論

### 1-1 ゲノム生物学からエピジェネティクス

1953年、J. ワトソン、F. クリックがDNAの二重らせんモデルを提唱した。DNAは、生物の遺伝情報を担う担体であり、あらゆる生命活動の基盤である。DNA配列は遺伝情報として機能しており、そのゲノム配列を全て解読することで、生命現象を理解できると考えられた。1991年にヒトゲノムプロジェクトが始動し、2000年にはヒトゲノム配列が全て解読された。しかし、ヒトゲノムプロジェクトが完了し、ゲノム情報が公開されて15年以上経ったにも関わらず、未だに生命現象の全てを理解するには至っていない。例えば神経細胞、筋細胞、精細胞など、様々な種類の細胞によってヒトは構成されている。これらの細胞は同じゲノムDNAを有するが、遺伝子の発現パターン、細胞の形状・性質が全く異なる。この事実はDNA配列によらない遺伝情報の制御機構の存在を意味する。DNA配列によらない遺伝情報の制御機構を研究することをエピジェネティクス (epigenetics) と呼ぶ (Allis *et al.*, 2007)。エピジェネティック (epigenetic) な制御機構によって同じゲノムDNAから様々な遺伝子発現パターンが形成され、多様な細胞へ分化することができる (図1)。遺伝子の発現機構、細胞分化をはじめとした生命現象を理解するためにはエピジェネティックな制御機構を解明する必要がある。

### 1-2 クロマチン構造変換

真核生物のゲノムDNAは核内タンパク質と結合し、クロマチンと呼ばれる構造体が形成されている。真核生物において転写、修復、複製、組換えなど、DNA



代謝がクロマチン上で行われる (Allis *et al.*, 2007)。DNA 代謝がクロマチン上で行われるためには、特定のクロマチン領域が DNA 代謝に適した構造へ変換されなくてはならない。DNA 代謝が抑制された領域は DNA が凝縮した closed chromatin (閉じたクロマチン)になると考えられている (Allis *et al.*, 2007)。一方、複製、転写、修復など DNA 代謝が促進される領域は DNA が脱凝縮した open chromatin (開いたクロマチン)となると考えられている (Allis *et al.*, 2007)。クロマチンは全領域が一様に凝縮または脱凝縮するわけではない。図 1 のように同一染色体上でも凝縮状態の異なる領域が存在する (図 1)。個々のクロマチンドメインはそれぞれ構造変換され、DNA 代謝制御に適した構造体となっている。凝縮状態の異なるクロマチンが形成されると、同一染色体上でも様々な遺伝子発現パターンが形成される (図 1)。さらに同じクロマチン上でも凝縮パターンが異なる。細胞によって遺伝子発現パターンが異なり、多様な細胞へ分化する (図 1)。

特徴的なクロマチンとしてユークロマチンとヘテロクロマチンが提唱されている。DAPI によって濃く染まる領域がヘテロクロマチン、DAPI によって薄く染まる領域がユークロマチンと呼ばれている (図 2B) (Henikoff, 1990)。ヘテロクロマチンは他のクロマチン領域に比べ、凝縮したクロマチンである。ヘテロクロマチンは転写など DNA 上でのイベントに抑制的であると考えられている (Henikoff, 1990)。ユークロマチンは他のクロマチン領域に比べ、脱凝縮したクロマチンである。ユークロマチンは転写が活発な領域である (Henikoff, 1990)。ヘテロクロマチンとユークロマチンは異なる構造的特徴を有するため、DNA 代謝に違いが生じる。例えばショウジョウバエにおいて、遺伝子がユークロ

マチン上に位置するか、ヘテロクロマチン上に位置するかによって発現が異なり、表現型が変化することが報告されている (Schotta *et al.*, 2003)。このように異なる構造的特徴を有するヘテロクロマチンとユークロマチンは DNA 代謝に違いがある。ヘテロクロマチンやユークロマチンはヌクレオソームと呼ばれる構造体を基本構成単位としている。クロマチン中に含まれるヌクレオソームの種類によってヘテロクロマチンやユークロマチンへ分かれる。例えば macroH2A と呼ばれるタンパク質を含むヌクレオソームは X 染色体に集積し、ヘテロクロマチンを形成することが知られている (Costanzi *et al.*, 1998, Costanzi *et al.*, 2001)。このようにヌクレオソームの種類によってヘテロクロマチンやユークロマチンなど多様なクロマチンが形成される。

### 1-3 ヌクレオソーム

クロマチンは、ヌクレオソームが連なった基本骨格に様々な核内タンパク質が結合した巨大複合体である。それゆえにヌクレオソームはクロマチンの最小機能単位であると言える。ヌクレオソームは、H3、H4、H2A、H2B の 4 種類のヒストンタンパク質 2 分子ずつから構成されるヒストン八量体に DNA が巻きついた、直径 100 Å、厚さ 50 Å 程度の円板状の構造体である (図 3) (Luger *et al.*, 1997)。

真核生物の DNA 代謝はヌクレオソーム上で行われている。DNA 代謝が行われるためには、修復因子やクロマチンリモデリング因子がヌクレオソームに呼び込まれる必要がある。これらのタンパク質をクロマチン領域に呼び込みやすくするため、化学修飾や特殊なヒストンを取り込んだヌクレオソームが形成される。

例えば $\gamma$ H2A.X と呼ばれる化学修飾を受けたヒストンタンパク質を含むヌクレオソームは DNA 損傷修復因子集積の起点となる (Rogakou *et al.*, 1998)。このように化学修飾や特殊なヒストンを取り込んだヌクレオソームがクロマチンを形成し、DNA 代謝を制御する (Allis *et al.*, 2007)。ヌクレオソーム中に付加された化学修飾や特殊なヒストンタンパク質などのエピジェネティック情報の担い手となる因子をエピジェネティックマークと呼ぶ。エピジェネティックマークはヌクレオソーム中に付加された因子だけでなく、コヒーシンや CTCF タンパク質をはじめとしたクロマチンに直接結合し、エピジェネティックに機能する因子も含める (Ohlsson *et al.*, 2001, Parelho *et al.*, 2008)。

#### 1-4 エピジェネティックマークによる多様なヌクレオソーム構造

エピジェネティックマークとして機能するものの一例として、以下に示すように DNA のメチル化、ヒストンの翻訳後修飾、サブヌクレオソームの形成、ヒストンバリエーションの導入などが挙げられる (Allis *et al.*, 2007, Rhee *et al.*, 2014)。これらによってヌクレオソームの性質は多様化しており、こうした様々な性質のヌクレオソームを使い分けることによって、ヘテロクロマチンやユークロマチンの形成、セントロメアの規定などが可能になる (図 2)。エピジェネティックな制御機構を明らかにするためには、クロマチンの基本単位である多種多様なヌクレオソームの性質をそれぞれ明らかにしていく必要がある。

##### 1-4-1 DNA メチル化

DNA メチル化はシトシンのピリミジン環、アデニンのプリン環に付加される化

学修飾である。特にメチル化シトシンは DNA の発現を抑制する (Bird *et al.*, 1985)。DNA メチル化は複製された娘細胞のゲノム DNA に保存される。DNA メチル化によって免疫応答関連の遺伝子や分化関連の遺伝子など、多くの遺伝子が制御を受ける。DNA メチル化が正しく制御されないとこれらの遺伝子の発現パターンは変化する。例えば外来生物 (結核菌) の DNA メチル化酵素が宿主細胞に取り込まれると、宿主細胞の DNA 発現が無秩序に抑制され、免疫応答関連の遺伝子発現が抑制されると報告されている (Sharma *et al.*, 2015)。このように DNA メチル化の有無によって、遺伝子発現が制御される。

#### 1-4-2 ヒストンの翻訳後修飾

ヌクレオソーム中のヒストンはメチル化、リン酸化、アシル化、ユビキチン化などヒストン翻訳後修飾を受けることが知られている。ヒストン翻訳後修飾はその種類と修飾される位置によって DNA 代謝へ与える機能が全く異なる (図2)。例えば、H3 の 64 番目リジンがトリメチル化されたクロマチン領域は転写抑制されるが、H3 の 64 番目リジンがアセチル化されたクロマチン領域は転写促進される (Daujat *et al.*, 2009, Di Cerbo *et al.*, 2014)。また、H3 の 4 番目リジンがトリメチル化された場合、転写を促進するが、H3 の 27 番目リジンがトリメチル化された場合は転写を抑制する (Bernstein *et al.*, 2006, Shi *et al.*, 2006)。このようにヒストンの翻訳後修飾は修飾の種類や修飾される位置を使い分け、DNA 代謝制御に影響を与える。

#### 1-4-3 サブヌクレオソーム

サブヌクレオソームは近年エピジェネティックマークとして注目されている (Lavelle *et al.*, 2007)。ヌクレオソームはヒストン八量体に DNA が巻きついた構造である。それだけでなく、生体内にはヒストン六量体に DNA が巻きついたヘキサソーム、ヒストン四量体に DNA が巻きついたテトラソーム、ヒストン十四量体に 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など、ヒストン八量体と異なるヒストン複合体に DNA が巻きついたサブヌクレオソームが存在する (Lavelle *et al.*, 2007, Kato *et al.*, 2017)。サブヌクレオソームは特殊なヒストン複合体に DNA が巻きついた構造体だけではない。クロマチンリモデリング中間体、リモソームもサブヌクレオソームとして報告されている (Shukla *et al.*, 2010)。ヌクレオソームは 150 bp 程度の DNA にヒストンが巻きついているが、リモソームは 180 bp 程度の DNA にヒストン八量体が巻きついた構造を形成している。さらに MNase によって DNA が分解されやすい、極端に不安定な構造体であるフラジャイルヌクレオソームもサブヌクレオソームとして報告されている (Voong *et al.*, 2016)。サブヌクレオソームは転写伸長反応や、ヌクレオソームリモデリング反応中に形成され、これらの反応を促進していると考えられる (Rhee *et al.*, 2014)。

#### 1-4-4 ヒストンバリエント

エピジェネティックマークの一つにヒストンバリエントが挙げられる。ヒストンタンパク質は細胞内で豊富に存在する主要型ヒストンとヒストンバリエントに分類することができる。ヒストンバリエントとは、主要型ヒストン H3、H4、H2A、H2B の 4 種のヒストンタンパク質に置き換わることのできる亜種である。

ヒストンバリエントは主要型ヒストンとアミノ酸相同性が高い（ヒトの場合44%-99%）。しかし、主要型ヒストンは複製依存的にクロマチンに導入されるが、ヒストンバリエントは複製非依存的にクロマチンに導入される（Ahmad *et al.*, 2002, Tagami *et al.*, 2004）。このことから、ヒストンバリエントは主要型ヒストンとアミノ酸相同性は高いが、異なる機能を有すると考えられる。実際、特定の生物種のみ発現するヒストンバリエント（図 2A）、特定のクロマチン領域に集積されるヒストンバリエント（図 2B、C）、そして DNA 代謝に応じて集積されるヒストンバリエント（図 2D）が存在し、ヒストンバリエントは独自の機能を有する（Talbert *et al.*, 2017）。正常なヒストンバリエントの機能発現は生命活動の維持に欠かせない。実際にヒストンバリエントの欠失や変異、過剰発現によって癌化、胎生致死などを引き起こすことが報告されている（Howman *et al.*, 2000, Tomonaga *et al.*, 2003, Régnier *et al.*, 2007）。

ヒストンバリエント独自の機能の例として H3 のヒストンバリエントである H3.3、CENP-A、H3T を挙げる。H3.3 は転写活性化領域に存在するヒストンバリエントである。H3.3 は転写開始点だけでなく、転写領域に集積し、転写伸長反応に寄与する（Chow *et al.*, 2005）。また、H3.3 の発現量を低下させると、精細胞形成不全が起きる（Inoue *et al.*, 2014）。このことから H3.3 は細胞分化に伴い構造変換されるクロマチンに影響を及ぼし、遺伝子発現の制御を行うと考えられる。

CENP-A は動原体形成において足場となる染色体の一次狭窄部位セントロメアに集積する。CENP-A 遺伝子を欠失したマウスは胎生致死を示す（Howman *et al.*, 2000）。また、CENP-A の過剰発現は染色体分裂異常を引き起こす（Tomonaga *et al.*,

2003)。このことから CENP-A は染色体分配におけるセントロメア領域の形成に寄与していることが考えられている。CENP-A を含むクロマチンでは特殊な構造が形成され、染色体分配に寄与する (Fang *et al.*, 2015)。CENP-A を含むクロマチンだけではなく、CENP-A を含むヌクレオソームも特徴的な構造を形成する (Tachiwana *et al.*, 2011)。このことから CENP-A ヌクレオソームの特徴的な性質によって形成されたクロマチンは、動原体形成に関わる因子の集積を促すことが考えられる。

H3T は精巣特異的に発現量の高いヒストンタンパク質である。マウスの H3T を欠失させると雄性不妊になることから、H3T は精子形成において重要な役割を担っていることが考えられる (Ueda *et al.*, 2017)。H3T ヌクレオソームは主要型ヌクレオソームに比べ、不安定な構造体である (Tachiwana *et al.*, 2010)。この性質は精子形成におけるクロマチンに影響を及ぼすと考えられている。

このように H3 だけでも様々な機能を有するヒストンバリエントが存在する。H3 以外に H2A、H2B にもヒストンバリエントが存在する。例えば DNA 損傷領域に局在する H2A. X や転写開始点・ペリセントロメア領域に集積する H2A. Z が報告されている (Rogakou *et al.*, 1998, Bönisch *et al.*, 2012)。このようなヒストンバリエントを含むヌクレオソームは特徴的なクロマチンを形成し、DNA 代謝に寄与すると考えられている (Talbert *et al.*, 2017)。

## 1-5 新規ヒストンバリエントの発見

近年、新しいヒストンバリエントが発見された。2010 年にヒト、2015 年にマウス、ラット、ヒト特異的に遺伝子がコードされているヒストンバリエントが

報告された (Wiedemann *et al.*, 2010, Maehara *et al.*, 2015)。新規ヒストンバリエーションの機能解析はほとんど行われていない。その理由は新規ヒストンバリエーションの発現量の低さが挙げられる。新規ヒストンバリエーションのアミノ酸配列は既知のヒストンバリエーションとアミノ酸相同性が高い(ヒトの場合 87%-98%)。そのため、既知のヒストンバリエーションとの区別が困難である。さらに mRNA の発現量が著しく低い (Taguchi *et al.*, 2017)。そのためこれらのヒストンバリエーションは今まで偽遺伝子と分類されていた (Ederveen *et al.*, 2011)。

これらのヒストンバリエーションの発現量は少量であるが、細胞内で機能を有していると考えられる (Maehara *et al.*, 2015, Taguchi *et al.*, 2017)。細胞内で発現量の少ないヒストンバリエーションとして、セントロメアに集積する CENP-A 及び転写、複製、修復が起こる DNA 領域に集積する H2A.B が知られている。これらのヒストンバリエーションは特定の領域に集積し、染色体分配や DNA 代謝に寄与する (Henikoff *et al.*, 2000, Arimura *et al.*, 2013)。このことから本博士論文で着目した新規ヒストンバリエーションも細胞内で少量の発現ではあるが、何らかの形で正常な生命活動に貢献している可能性がある。

## 1-6 ヌクレオソームの構造安定性

エピジェネティックマークの機能の一つにヌクレオソームの構造安定性の変化が挙げられる。生体内のヌクレオソームはクロマチン結合因子がリクルートされると、一過的にヌクレオソームが解離・再構成される。例えば転写伸長反応直後のクロマチンからヒストンが脱落すると考えられている (Cole *et al.*, 2014, Venkatesh *et al.*, 2015)。他にもヌクレオソームの構造安定性に重要な



アミノ酸が置換された変異ヒストンによって転写パターンが変化すると報告されている (Kurumizaka *et al.*, 1997)。これらの報告から、構造が不安定なヌクレオソームは転写伸長反応の促進に寄与していることが示唆される。エピジェネティックマークが付加されたヌクレオソームの中でも不安定な構造体は存在する。例えばヒストンバリエント H3T を含むヌクレオソームは細胞内で豊富に存在する主要型ヒストン H3.1 を含むヌクレオソームに比べ、不安定な構造体であることが報告されている (Tachiwana *et al.*, 2010)。このようにエピジェネティックマークが付加されたヌクレオソームの中にも不安定な構造体が報告されており、この性質が転写伸長反応など DNA 代謝に影響を与えていると考えられている。

### 1-7 本研究について

ヌクレオソームの構造安定性の測定は UV 検出法や CD、FRET を用いた解析法など先行研究が数多く報告されている (Fulmer *et al.*, 1979, Bina *et al.*, 1980, Siino *et al.*, 2003, Choy *et al.*, 2010, Ong *et al.*, 2010, Tachiwana *et al.*, 2010, Jimenez-Useche *et al.*, 2012)。先行研究で報告されている安定性試験はヌクレオソーム全体の崩壊を測定している。しかし転写伸長反応において、ヌクレオソーム中のヒストンは DNA からすべて脱落せず、一部のヒストン (H2A と H2B) のみ脱落することが報告されている (Venkatesh *et al.*, 2015)。つまり多量体構造であるヌクレオソームは生体内において段階的に崩壊すると予想される (図 3)。そのため、ヌクレオソームがどのように崩壊していくのか、崩壊モデルをたてられるような解析手法が求められる。

加えて構造安定性の測定試験は簡便であることが求められる。例えば FRET を用いたヌクレオソームの構造安定性の解析は微小な構造の変化を測定できる (Jimenez-Useche *et al.*, 2012)。しかし、FRET を用いるためにはヌクレオソーム中に蛍光ラベルをあらかじめ付加する必要があり、サンプルの準備が煩雑となる。多様なヌクレオソームを比較するためには、できるだけ簡便な手段で測定できることが望ましい。

一方、ヌクレオソームは安定的な構造体であるため、常温の試験系でヌクレオソームの崩壊が起きにくいと考えられる。例えば高塩濃度下 (400-800 mM 塩化ナトリウム) でも安定的にヌクレオソームが維持される (Tachiwana *et al.*, 2010)。つまりヌクレオソームの性状解析を行うためには、なんらかの外的要因でヌクレオソーム中のヒストンを脱落させる必要がある。

そこで本博士論文は熱を用いて蛍光色素で検出する熱安定性試験法に着目した。本手法は評価したいタンパク質複合体と蛍光色素を混ぜ、熱を加えて測定する (Lo *et al.*, 2004)。本手法では精製の段階でヌクレオソームに蛍光ラベルなどをあらかじめ付加する必要がない。加えて測定するヌクレオソームの DNA 配列、ヒストンに制限がない。つまり、多様なヌクレオソームを測定することに熱安定性試験は適している。さらに蛍光色素で測定を行うため、再現性が高く、微細な崩壊パターンの検出が期待される。

タンパク質の熱試験法では数多くの知見が存在する (Subirana *et al.*, 1973, Lo *et al.*, 2004)。温度上昇に伴うタンパク質の崩壊の再現性は高く、性状解析に適している。さらに温度上昇によって構造変化したヌクレオソームはクロマチンリモデリング因子によって構造変換されたヌクレオソームと同じ挙動を

示すことが報告されている (Falus *et al.*, 2003)。つまり、温度上昇によって構造変化や崩壊したヌクレオソームは、DNA 代謝に伴い構造変換されたヌクレオソームと相関しうる。

本博士論文では熱安定性試験を確立し、さらに 2015 年に同定された新規ヒトヒストンバリエント H3.6、H3.7、H3.8 の機能解明に取り組んだ。まず試験管内でのヒストン精製、ヒストン複合体再構成、ヌクレオソーム再構成を検討した。さらに第 3 章で確立した熱安定性試験を行い、H3.6 ヌクレオソームが通常のヌクレオソームと異なる崩壊パターンを示すことを発見した。さらに X 線結晶構造解析及び変異体解析から H3.6 の構造安定性に起因する責任残基を同定した。

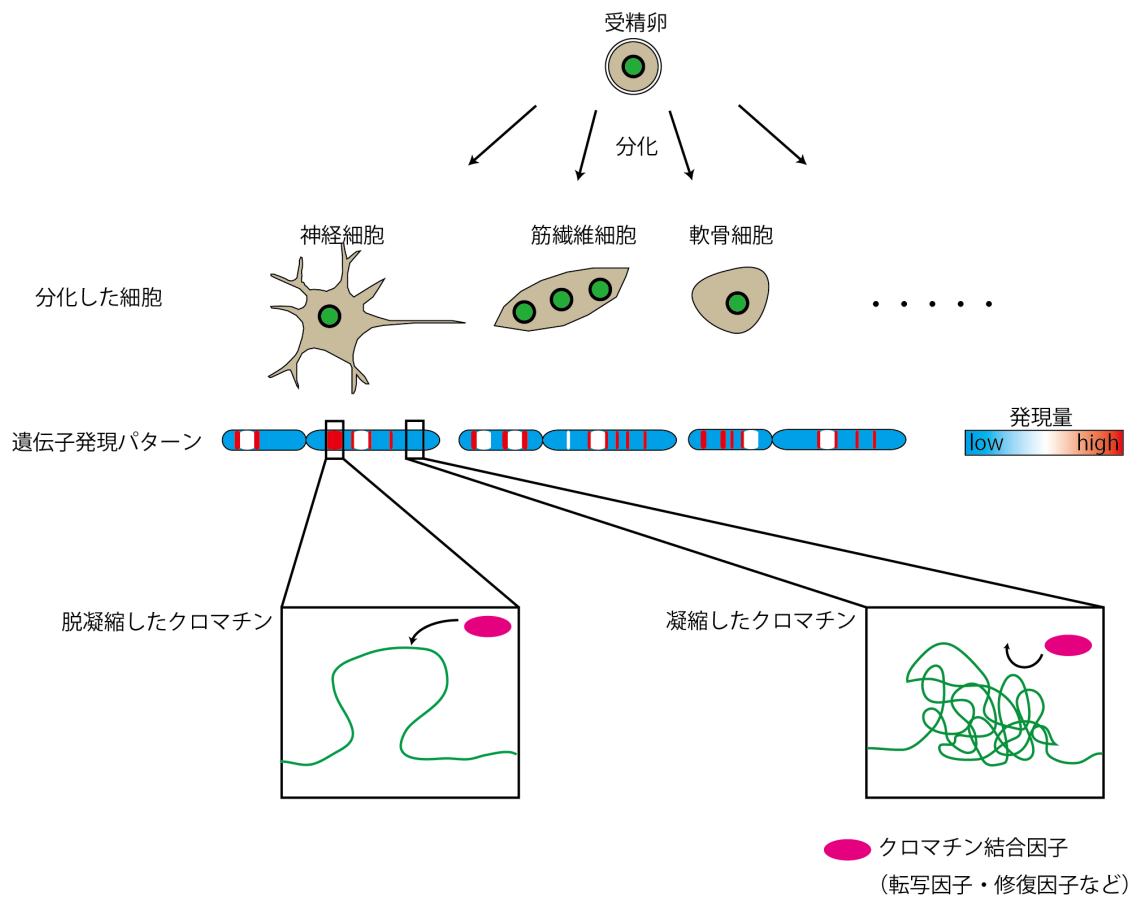


図1 細胞分化に伴う独自の遺伝子発現パターンの形成

(上段) 受精卵から様々な細胞（神経細胞、筋繊維細胞、軟骨細胞など）へ分化する。分化した細胞ごとに染色体の遺伝子発現パターンは異なる。同一染色体上でも遺伝子の発現量が高い領域と低い領域が存在する。(下段) 脱凝縮したクロマチンは転写因子や修復因子などクロマチン結合因子を呼び込みやすい open chromatin（開いた構造）を形成している。凝縮したクロマチンは転写因子や修復因子を呼び込みにくい closed chromatin（閉じた構造）を形成している。



## 図2 主なエピジェネティックマーク

(A) 生物種・組織特異的に発現する主なエピジェネティックマークの一覧。植物、霊長類、マウス、ショウジョウバエ特異的に発現するヒストンバリエントを示した。(B) 特徴的なクロマチン構造体を形成するエピジェネティックマーク一覧。DNA 染色の蛍光色素 DAPI によって濃く染まる領域（ヘテロクロマチン）と薄く染まる領域（ユークロマチン）が存在する。(C) 染色体上の領域を決定する主なエピジェネティックマークの一覧。染色体は両端のテロメア領域、中央の括れた一次狭窄部位がセントロメア領域、セントロメア周辺のペリセントロメア領域が存在し、それぞれに局在するエピジェネティックマークが存在する。(D) DNA 代謝を制御する主なエピジェネティックマークの一覧。転写の ON/OFF、DNA 損傷修復・組換え、DNA 複製、クロマチンリモデリング（変換）領域など様々なクロマチン領域が存在する。クロマチン領域ごとに様々なエピジェネティックマークが集積する。(Allis *et al.*, 2007, Lavelle *et al.*, 2007, Shukla *et al.*, 2010, Wiedemann *et al.*, 2010, Costas *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2011, Bönisch *et al.*, 2012, Ulyanova *et al.*, 2012, Arimura *et al.*, 2013, Di Cerbo *et al.*, 2014, Rhee *et al.*, 2014, Yelagandula *et al.*, 2014, Meahara *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2016, Taguchi *et al.*, 2017)

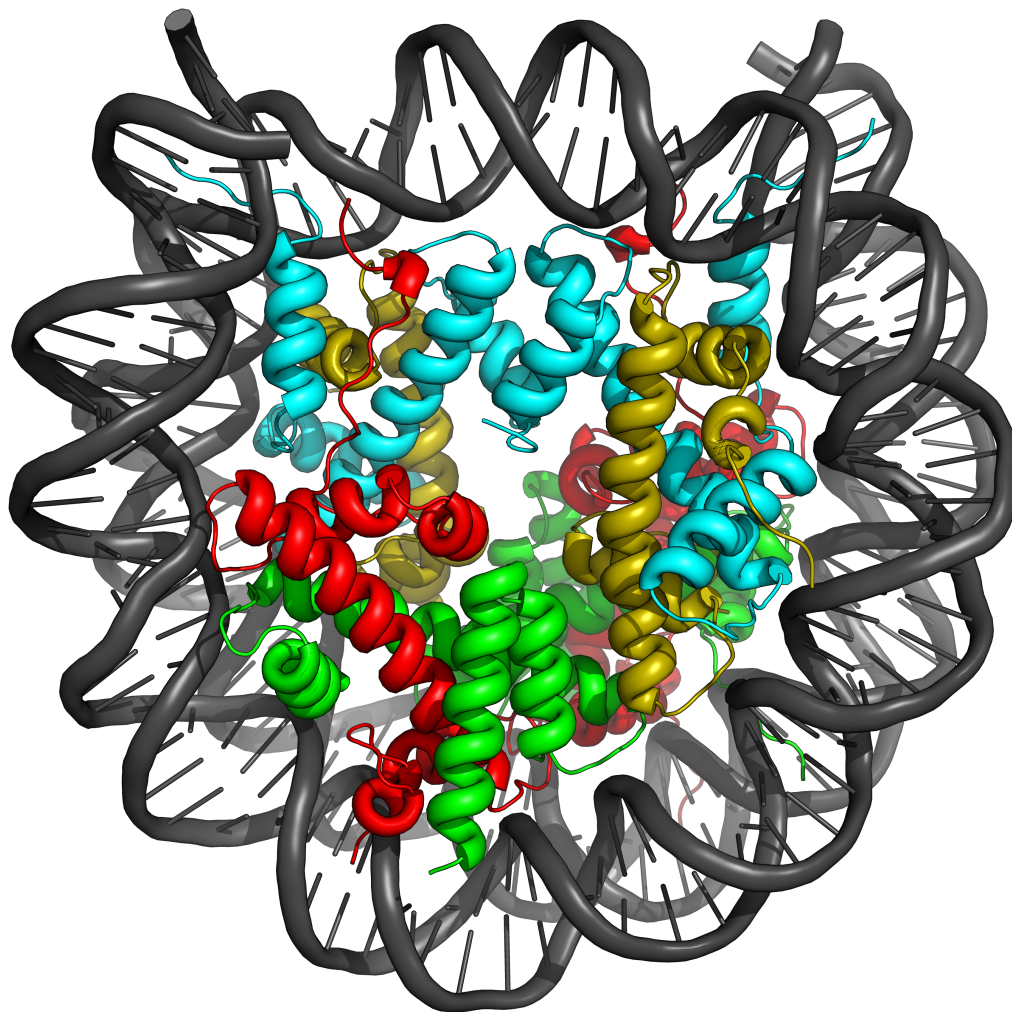


図3 ヌクレオソームの立体構造 (PDB : 3AFA)

X線結晶構造解析により決定したヌクレオソームの全体構造。ヌクレオソームはH3、H4、H2A、H2Bをそれぞれシアン、オリーブ、赤、緑で表示した。ヒストンに巻きついているグレイの二重螺旋構造がDNAである。PyMOLで作図、出力した。

## 第2章 材料・実験方法

### 2-1 新規ヒストンバリエーション及び点変異体の発現系構築

新規ヒストンバリエーション H3.6、H3.7、H3.8 をコードしている遺伝子配列は九州大学大川恭行先生からご提供いただいた。この配列を大腸菌発現ベクター (pHCE ベクター) に挿入した (Poo *et al.*, 2002, Tanaka *et al.*, 2004)。ヒストン遺伝子配列、大腸菌発現ベクターの両末端に切断酵素認識配列を導入し、制限酵素と DNA ligase で挿入した。大腸菌発現ベクターはアンピシリン耐性遺伝子、ヒストン配列の前にヒスチジンタグとスロンビン切断サイトを有する (図 4)。

### 2-2 ヒストン精製

本実験で用いたプラスミドは先行研究と同様のコンストラクトを用いた (Tanaka *et al.*, 2004)。アンピシリン耐性を有した大腸菌発現ベクター (H3: pHCE ベクター、H2A、H2B、H4: pET-15b ベクター (Novagen)) にヒトのコアヒストン H3.1、H3.3、H3T、H4、H2A、H2B をコードしている遺伝子配列が挿入されている (Poo *et al.*, 2002, Tanaka *et al.*, 2004)。すべてのヒストンをコードしている遺伝子配列は大腸菌の発現に適したコドンに置き換えられている。すべてのヒストンコード領域の N 末端にはヒスチジンタグとスロンビンサイトが挿入されている (図 4)。

ヒストン精製は先行研究のプロトコールと表のバッファ組成に沿って行った (Tanaka *et al.*, 2004) (表 1)。まず H2A、H2B、H3 のプラスミドは BL21 (DE3)、H4 のプラスミドは JM109 (DE3) にそれぞれ導入した。導入した各種大腸菌をアン



ピシリン存在下の LB プレート上に撒いた。その後、大腸菌のコロニーを回収し、LB 培地 (5-20 L) に植菌、培養を行った (37°C、24 時間)。菌体は遠心分離機で回収し、懸濁バッファを加え、超音波破碎した。ヒストンタンパク質は不溶性画分に存在する。遠心分離機で沈殿物を回収し、変性バッファを加えて可溶化させた。次に可溶化したサンプル溶液と Ni-NTA agarose (QIAGEN) を混合し、緩やかに攪拌させた。その後、Ni-NTA agarose (QIAGEN) を回収し、エコノカラムに充填した。エコノカラムに充填された Ni-NTA agarose (QIAGEN) は洗浄バッファ 1 で 50 C.V. 洗浄した。次に洗浄バッファ 1 と溶出バッファ 1 を用いたイミダゾールの直線濃度勾配によって、ビーズに結合したヒスチジンタグ付きヒストンを溶出した。溶出されたヒストンを回収し、透析バッファに透析し変性剤を除いた。次にヒストン 1 mg に対し Thrombin protease (GE Healthcare) 1 unit を加え、常温で 2.5 時間攪拌することでヒスチジンタグを切除した。次に陽イオン交換カラムクロマトグラフィ MonoS 10/100GL (GE Healthcare) を用いて、洗浄バッファ 2、溶出バッファ 2 による塩化ナトリウムの直線的な濃度勾配でヒストンを溶出した。精製したヒストンは 2 mM 2-mercaptoethanol 溶液に透析し、Tris と変性剤、塩化ナトリウムを除いた。透析後、凍結乾燥し、ヒストンパウダーにして最終精製物とした。

表1 ヒストン精製に用いたバッファ組成	
懸濁バッファ	50 mM Tris-HCl (pH8.0)、500 mM 塩化ナトリウム、5% glycerol、 1 mM PMSF
変性バッファ	50 mM Tris-HCl (pH8.0)、500 mM 塩化ナトリウム、5% glycerol、 7 M Gdn-HCl
洗浄バッファ1	50 mM Tris-HCl (pH8.0)、500 mM 塩化ナトリウム、5% glycerol、 5 mM imidazole、6 M Urea
溶出バッファ1	50 mM Tris-HCl (pH8.0)、500 mM 塩化ナトリウム、5% glycerol、 500 mM imidazole、6 M Urea
透析バッファ	20 mM Tris-HCl (pH7.5)、2 mM 2-mercaptoethanol
洗浄バッファ2	20 mM 酢酸ナトリウム (pH5.2)、200 mM 塩化ナトリウム、 6 M urea、5 mM 2-mercaptoethanol、1 mM EDTA
溶出バッファ2	20 mM 酢酸ナトリウム (pH5.2)、800 mM 塩化ナトリウム、 6 M urea、5 mM 2-mercaptoethanol、1 mM EDTA

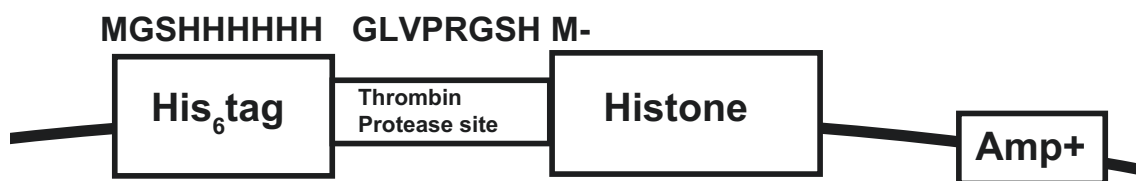


図4 ヒストン遺伝子が挿入されたプラスミドのベクターマップ

アンピシリン耐性遺伝子 (Amp<sup>+</sup>) を有する大腸菌発現ベクターにヒスチジンタグ (His<sub>6</sub>tag)、スロンビンプロテアーゼ切断配列 (Thrombin protease site)、ヒストン (Histone) がそれぞれコードされた遺伝子配列を挿入した。このプラスミドが導入された大腸菌で発現したヒストンタンパク質は N 末端に Met-Gly-Ser-Ser-His-His-His-His-His-His-Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His-Met-[histone] が付加されている。スロンビンプロテアーゼ切断領域は Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser である。スロンビンプロテアーゼによって切断された後、ヒストンタンパク質の N 末端には Gly-Ser-His-Met が付加されている。

### 2-3 ヒストン H2A. B 精製

H2A. B の精製は先行研究に沿って行った (Arimura *et al.*, 2013)。H2A. B は 2-2 の Ni-NTA agarose による精製プロトコールまでは同一である (Tanaka *et al.*, 2004)。Ni-NTA agarose で溶出した His<sub>6</sub>-H2A. B と H2B を混合し、H2A. B-H2B 複合体を形成させた。2-2 に沿って Ni-NTA 精製を行い、溶出したヒストンタンパク質 His<sub>6</sub>-H2A. B に H2B を等モル比加え、変性バッファを用いて透析した (表 2)。変性させたサンプルを再構成バッファ 1-4 に順次透析した (表 2)。その後、Thrombin protease (GE Healthcare) を加え、ヒスチジンタグを切除した。切除後、再構成バッファ 1 でゲル濾過カラムクロマトグラフィ HiLoad16/60 Superdex200 (GE Healthcare) を用いて精製した。溶出サンプルは濃縮管 Amicon Ultra-4 30,000 MWCO を用いて濃縮し、最終精製物とした。

表2 ヒストン複合体再構成に用いたバッファ組成	
変性バッファ	10 mM Tris-HCl (pH7.5)、2 M 塩化ナトリウム、 1 mM EDTA、20 mM 2-mercaptoethanol
再構成バッファ 1	10 mM Tris-HCl (pH7.5)、2 M 塩化ナトリウム、 2 mM 2-mercaptoethanol
再構成バッファ 2	10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 M 塩化ナトリウム、 2 mM 2-mercaptoethanol
再構成バッファ 3	10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5 M 塩化ナトリウム、 2 mM 2-mercaptoethanol
再構成バッファ 4	10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1 M 塩化ナトリウム、 2 mM 2-mercaptoethanol

## 2-4 ヒストン複合体の再構成

本実験では H3. 1、H3. 3、H3. 6、H3. 7、H3. 8 をそれぞれ含むヒストン八量体 (H3-H4-H2A-H2B 八量体)、H3. 1、H3T をそれぞれ含むヒストン四量体 (H3-H4 四量体)、H2A、H2B を含むヒストン二量体 (H2A-H2B 二量体) をそれぞれ再構成した。再構成の方法は先行研究に沿って行った (Tachiwana *et al.*, 2008, Tachiwana *et al.*, 2010)。バッファは表に基づいて作製した (表 2)。

まず 2-2 で精製したヒストンパウダーを等モル比で混合した。ヒストン八量体は H3 (1.4 mg)、H4 (1.0 mg)、H2A (1.2 mg)、H2B (1.2 mg) を混合した。ヒストン四量体は H3 (1.4 mg)、H4 (1.0 mg) で混合した。ヒストン二量体は H2A (1.2 mg)、H2B (1.2 mg) のみ混合した。混合したヒストンパウダー濃度が 1.5 mg/ml となるように変性バッファを加え溶解させた。その後、再構成バッファ 1 に 4 回透析し、変性剤を除いた。透析後のサンプルはゲル濾過カラムクロマトグラフィ HiLoad 16/60 (GE Healthcare) で精製した。溶出サンプルは濃縮管 Amicon Ultra-4 30,000 MWCO を用いて濃縮し、最終精製物とした。

## 2-5 プラスミド DNA 精製

ヌクレオソーム中の DNA は先行研究で用いられている配列にした (Luger *et al.*, 1997)。ヌクレオソーム再構成に用いた DNA はヒト  $\alpha$ -satellite 配列由来の 73 bp が回文配列となった 146 bp DNA である。この DNA 精製に使用したプラスミドには 146 bp DNA の半分にあたる 73 bp の配列がタンデムに 24 リピート挿入されている (図 5)。146 bp DNA プラスミドが挿入されているベクターはアンピシリン耐性遺伝子を有している。精製法は先行研究に基づいて行った (Dyer *et al.*,

2004)。

大腸菌に 146 bp DNA プラスミドを導入し、アンピシリン存在下の LB プレート上に撒いた。大腸菌コロニーを 1 つ回収し、アンピシリン存在下の TB 培地 (5 ml) で 3 時間、2xYT 培地 (100 ml) で 4.5 時間、TB 培地 (8 L) で 17 時間、37°C で培養した。菌体は遠心分離によって回収した。菌体からプラスミド DNA を回収するため、アルカリ-SDS 法を行った (表 3)。菌体にアルカリ I 溶液 90 ml を加え、懸濁した。次にアルカリ II 溶液 180 ml を加え、氷上で 5 分間静置した。最後にアルカリ III 溶液 315 ml を加え、よく混合させた後、沈殿物を除いた。プラスミドを回収するため、イソプロパノールによるアルコール沈殿法を行った。イソプロパノール 0.52 倍量加え、常温で 1 時間静置した。その後、遠心分離によって沈殿物を回収した。沈殿物は TE10/50 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH7.5)、50 mM EDTA (pH8.0)) で懸濁した。最後に RNA 分解酵素である RNaseA (Roche) を加え、37°C で一晩静置した。次に溶液中のタンパク質を除去するため、フェノールクロロホルム抽出を 3 回行った。その後、分解された RNA を除去するため、PEG 沈殿を行った。DNA 溶液に対し、40% PEG-6000 を 0.340 倍量、5 M 塩化ナトリウムを 0.153 倍量加え、激しく浸透した。その後遠心分離によって沈殿物を回収した。回収した沈殿物を TE10/0.1 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1 mM EDTA (pH8.0)) に懸濁し、プラスミド DNA 精製を完了した。

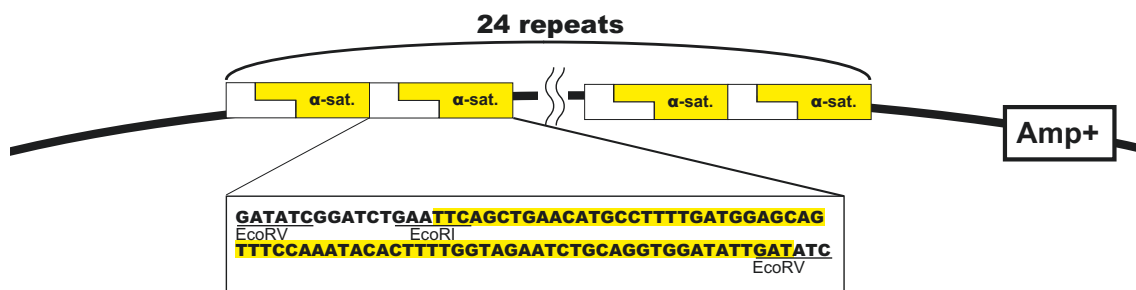


図5 146 bp DNA のプラスミドのベクターマップ

アンピシリン耐性遺伝子を有する大腸菌発現ベクターに 73 bp のヒト  $\alpha$ -satellite DNA 配列が 24 リピート並んでいる。抽出したプラスミドは EcoRV 処理した後、CIP 処理し、EcoRI 処理した。黄色領域の EcoRI 切断領域をライゲーションすることで、146 bp DNA を作製した。



## 2-6 146 bp DNA 精製

2-5 で精製した 146 bp DNA プラスミドから目的 DNA 配列を制限酵素で切り出し、146 bp DNA を精製する (Dyer *et al.*, 2004)。プラスミドは 73 bp リピート両端に EcoRV 切断サイトを有する。EcoRV 切断サイト間に 1 箇所 EcoRI 切断サイトを有する (図 5)。EcoRV、EcoRI 切断することで、片側突出末端の DNA 断片ができる。突出末端同士を T4 DNA ligase でホスホジエステル結合させることで、146 bp DNA を精製する。EcoRV 切断面による平滑末端ライゲーションを防ぐため、EcoRV 切断後、CIP による DNA 末端の脱リン酸化を行う。

プラスミド 1 nmol に対し制限酵素 EcoRV (TAKARA) を 500 unit 加え、プラスミドベクターとリピート配列を切り離した。その後、プラスミドベクターを除去するため、PEG 沈殿を行った。DNA 溶液に対し、40% PEG-6000 を 0.223 倍量、5 M 塩化ナトリウムを 0.153 倍量加え、激しく浸透した。その後遠心分離によって沈殿物を回収した。次に DNA 断片 1 nmol に対し CIP (NIPPON GENE) を 2 unit 加えて DNA 両末端を脱リン酸化した。その後 CIP を除去するため、サンプル溶液に EDTA (pH8.0) 溶液を最終濃度 125 mM になるまで加え、65°C で 30 分間静置した。さらにフェノールクロロホルム抽出を 2 回行った。次に DNA 断片 1 nmol に対し EcoRI (TAKARA) を 25 unit 加え、スペーサー配列を切り離した。次に目的断片から EcoRI 切断されたスペーサー配列を除くため、陰イオン交換カラムクロマトグラフィ TSK-DEAE (Tosoh) を行った。洗浄バッファと溶出バッファを用いて塩化ナトリウムによる濃度勾配で DNA を溶出した (表 3)。回収した目的断片 20 pmol に対し T4 DNA ligase (NIPPON GENE) を 1 unit 加え、16°C で一晩静置した。最後に TSK-DEAE (Tosoh) を用いて 146 bp DNA を精製した。

溶出したサンプルは回収し、エタノール沈殿を行った。沈殿させた目的 DNA を TE10/0.1 溶液に溶解し、最終精製物とした。

表 3 DNA 精製で用いたバッファの組成	
アルカリ I 溶液	50 mM glucose、25 mM Tris-HCl (pH8.0)、10 mM EDTA (pH8.0)
アルカリ II 溶液	0.2 N 水酸化ナトリウム、1% (w/v) SDS
アルカリ III 溶液	4 M 酢酸ナトリウム、2 N 酢酸
TE10/50	10 mM Tris-HCl (pH7.5)、50 mM EDTA
TE10/0.1	10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1mM EDTA
洗浄バッファ	10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1 mM EDTA (pH8.0)
溶出バッファ	10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1 mM EDTA (pH8.0)、 600 mM 塩化ナトリウム

## 2-7 ヌクレオソームの再構成

2-6 で精製した 146 bp DNA 及び 2-4 で精製したヒストン複合体を用いてヌクレオソームを再構成した。ヌクレオソームの再構成法は先行研究に倣って塩透析法で行った (Tanaka *et al.*, 2004.)。

2 M 塩化カリウム溶液下でヒストン複合体と DNA を以下の混合比で混ぜた。ヒストン八量体は 146 bp DNA に対し、1.4 倍量 (モル比) で混合した。H3T-H4 四量体と H2A-H2B 二量体は DNA に対し、それぞれ 1.4 倍量、2.8 倍量 (モル比) で混合した。さらにテトラソームを再構成するため、H3.1-H4 四量体を DNA に対し 1.4 倍量 (モル比) で混合した。DNA とヒストン複合体の混合サンプル溶液は DNA の最終濃度が 800 ng/ml となるように調製した。一度のヌクレオソーム、テトラソームの再構成に用いた 146 bp DNA は 100 µg から 1 mg である。調製した DNA とヒストン複合体混合サンプル溶液は RB-high バッファ 400 ml に透析した (表 4)。透析外液に RB-low バッファ 1.6 L を Perista pump (ATTO) で流速 0.8 ml/min で流入させ、増加した分の溶液を Perista pump (ATTO) を用いて連続的に排出させることで、透析バッファの塩化カリウム濃度を緩やかに下げた (表 4)。1.6 L 分の RB-low を流入後、RB-low バッファ 400 ml に DNA とヒストン複合体の混合サンプル溶液を移した。

透析したサンプルは 55°C で 2 時間静置し、非特異的なヒストン-DNA 複合体を解離させた。ヌクレオソームの精製には連続溶出ゲル電気泳動装置 Prep Cell apparatus (Bio Lad) を用いた。ゲルの組成は 0.2×TBE 6%ポリアクリルアミドである。高さ 6.5 cm のゲルに対し 10 W で電気泳動した (500V 定電圧)。ランニング溶液は 0.2xTBE、溶出溶液は TCS 溶液を用いた (表 4)。溶出したサン

ルは濃縮管 Amicon Ultra-4 30,000 MWCO を用いて濃縮し、最終精製物とした。  
ヌクレオソーム、テトラソームの濃度は吸光光度計で 254 nm の値を測定し、DNA  
換算で濃度を決定した。

表5 ヌクレオソームの再構成で用いたバッファ組成	
RB-high バッファ	10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA、 2 M 塩化カリウム、1 mM DTT
RB-low バッファ	10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA、 0.25 M 塩化カリウム、1 mM DTT
TCS	20 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM DTT

## 2-8 ヌクレオソームの熱安定性試験

2-7 より精製したヌクレオソームを用いて、熱安定性試験を行った。熱安定性  
試験は先行研究を参照し、実験した (Iwasaki *et al.*, 2013, Lo *et al.*, 2004)。  
まず精製したヌクレオソーム (5  $\mu$ M) を 9  $\mu$ l、SYPRO Orange (Sigma) (50x)  
を 2  $\mu$ l、TCS 溶液 9  $\mu$ l を混合した。混合したサンプルは MicroAmp<sup>®</sup> Fast 96-well  
Reaction Plate (0.1 mL) (Applied Biosystems) の 1 ウェルに 19  $\mu$ l 加え  
た。

測定データのバックグラウンドを除くため、ヌクレオソームを加えていない  
サンプルを調製し、同時に測定した。次に MicroAmp<sup>®</sup> Fast 96-well Reaction  
Plate (0.1 mL) (Applied Biosystems) を RT-PCR (Step One Plus) machine

(Applied Biosystems) に設置した。RT-PCR 装置は USB ケーブルで PC に接続させた。以降の操作は全て専用ソフトウェア RT-PCR Software v2.0 (Applied Biosystems) 上で行った。Advanced setup を用いた。Advanced setup で設定する項目は Experiment Properties、Plate setup、Run Method である。Experiment Properties は表の通りの設定とした (表 5)。次に Plate setup で測定波長の決定と測定するウェルの選択を行った。SYPRO Orange の吸収波長は 550 nm のため、それを検出できる TAMRA を reporter dye に設定する (quencher dye は None にする)。次に Assign Targets and Samples タブで測定するウェルを選択した。Passive Reference の設定は None にする。最後に Run method で測定時間、温度の設定を行った。本試験法では、25°C から 95°C までを 1°C ずつ温度を上昇させ、各温度で 1 分間静置してからその時の蛍光強度をウェル毎に測定する設定とした。reaction volume per well の値を 19  $\mu$ l に設定し、測定した。

測定したデータは Amplification data に記載されている。そこで該当箇所をエクセル形式で出力した。以降の操作は Excel 2015、または Office 365 (Microsoft Office) を用いて行った。先行研究に基づき、各ウェルの蛍光強度からバックグラウンドの蛍光強度を減算した値を用いて作図している (Menzen *et al.*, 2014)。また、ヌクレオソーム間の熱安定性試験を比較するにあたり、正規化された数値を用いて一部作図している。正規化する計算式は先行研究に基づき、以下の式で算出した (Arimura *et al.*, 2014)。

$$N(t) = 100 \times \frac{I(t) - I(26)}{I(95) - I(26)}$$

I (t) : 温度 t°C における蛍光強度[a. u.]

N (t) : 温度 t°C における正規化された蛍光強度[%]

表5 RT-PCR 装置の設定	
設定項目	選択するもの
Which instrument are you using to run the experiment?	StepOnePlus™ Instrument (96 Wells)
What type of experiment do you want to set up?	Quantitation- Comparative C <sub>T</sub> (Δ ΔC <sub>T</sub> )
Which reagents do you want to use to detect the target sequence?	SYBR® Green Reagents
Which ramp speed do you want to use in the instrument run?	Fast (~40 minutes to complete a run)

## 2-9 ヒストンの熱安定性試験

2-4、2-5 でそれぞれ精製したヒストンタンパク質を用いて熱安定性試験を行った。

まず、2-4 で精製した各種ヒストンタンパク質は TCS 溶液に溶かした。次にヒストンタンパク質 (5 μM) を 9 μl、SYPRO Orange (Sigma) (50x) を 2 μl、TCS 溶液 9 μl を混合した。混合したサンプルは MicroAmp® Fast 96-well Reaction Plate (0.1 mL) (Applied Biosystems) の 1 ウェルに 19 μl 加えた。測定データのバックグラウンドを除くため、ヒストンタンパク質を加えていないサンプルを調製し、同時に測定した。以降の操作は 2-8 と同様である。

ヒストン八量体は再構成バッファ 1 を用いて希釈した。ヒストン八量体 (5  $\mu$ M) を 9  $\mu$ l、SYPRO Orange (Sigma) (50x) を 2  $\mu$ l、再構成バッファ 1 を 9  $\mu$ l 混合した。混合したサンプルは MicroAmp<sup>®</sup> Fast 96-well Reaction Plate (0.1 mL) (Applied Biosystems) の 1 ウェルに 19  $\mu$ l 加えた。測定データのバックグラウンドを除くため、ヒストン八量体を加えていないサンプルを調製し、同時に測定した。以降の操作は 2-8 と同様である。

## 2-10 非変性 PAGE によるヌクレオソームの生化学的解析

温度によるヌクレオソームの性状を解析するため、RT-PCR 装置を用いて熱を加えたヌクレオソームを非変性 PAGE によって解析した。用いたヌクレオソームは 2-7 で精製したものである。19  $\mu$ l のヌクレオソーム (2.25  $\mu$ M) を、RT-PCR plate のウェルに入れた。RT-PCR 装置のセットアップは 2-8 と同様である。Run method は解析したい温度でそれぞれ終了する設定とした。各温度まで上昇させたサンプルは 6% 非変性 PAGE で解析した。

## 2-11 ヌクレオソームの結晶化

H3.6 ヌクレオソームの立体構造を決定するため、X 線結晶構造解析を行った。2-7 より再構成した H3.6 ヌクレオソームを先行研究に沿って結晶化を行った (Luger *et al.*, 1997, Tachiwana *et al.*, 2010)。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。リザーバー溶液の組成は 20 mM カコジル酸ナトリウム (pH 6.0)、35-45 mM 塩化カリウム、45-60 mM 塩化マンガンとした。ヌクレオソームと等量混合するドロップ溶液の組成は 20 mM カコジル酸ナトリウム

(pH 6.0)、50–70 mM 塩化カリウム、 50–85 mM 塩化マンガンとした。ヌクレオソームとドロップ溶液を 1  $\mu$ l ずつで混合した後、500  $\mu$ l のリザーバー溶液と密閉し、20°C で 2–3 週間程度静置した。得られた結晶は抗凍結剤に浸潤させ、液体窒素で瞬間凍結した。抗凍結剤の組成は 20 mM カコジル酸ナトリウム (pH 6.0)、40 mM 塩化カリウム、 45 mM 塩化マンガン、28% MPD、2%トレハロースを用いた。

## 2-12 ヌクレオソームの構造解析

2-11 で凍結した結晶を用いて大型放射光施設 SPring-8、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory にて X 線回折実験を行った。回折実験を行ったビームステーションは BL-5A、BL-17A、BL41XU である。収集した回折データの指数付け、積分、スケーリングはソフトウェア HKL2000 で行った (Otwinowski *et al.*, 1997)。その後 CCP4 でデータ処理を行った (Winn *et al.*, 2011)。分子置換法で位相を決定した。H3.6 ヌクレオソームの分子置換モデルは主要型ヌクレオソーム (PDB: 3AFA) を用いた (Tachiwana *et al.*, 2011)。分子置換はソフトウェア Phaser を使用した (McCoy *et al.*, 2007)。分子置換後は PHENIX ソフトウェアと COOT を用いて精密化を行い、立体構造を決定した (Emsley *et al.*, 2004, Adams, *et al.*, 2010)。作図には PyMOL (<http://www.PyMOL.org>) を用いた。

## 2-13 ヒストンのウェスタンブロット解析

九州大学の 大川恭行 先生らのグループが作製した新規ヒストンバリエント特異的に認識する抗体をウェスタンブロットで評価した (Urahama *et al.*, 2016)。



2-2 で精製したヒストンパウダー (H3.1、H3.2、H3.3、H3T、H3.5、H3Y、H3.6、H3.7、H3.8) を超純水に溶かしたヒストン溶液を用いた。ヒストン溶液を 16% SDS-PAGE で解析した。その後、ゲルから Hybond-P PVDF メンブレン (GE Healthcare) にタンパク質を転写した。TSB-T (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、137 mM 塩化ナトリウム、0.1% Tween 20) でメンブレンを洗浄後、blocking OneP 溶液を加え、ブロッキングした。次にメンブレンに 1 次抗体 (1 ng/ $\mu$ l となるように希釈) を加え、反応させた。使用した 1 次抗体は九州大学の 大川恭行先生らのグループが作製した新規ヒストンバリエーション H3.6、H3.7、H3.8 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 (7C4、8E9、1A6) である (Taguchi *et al.*, 2017)。TSB-T で洗浄したメンブレンに 1 次抗体を添加後、一晩 4°C で振盪した。そして 2 次抗体 anti-mouse IgG HRP (1000 倍に希釈) を加え、常温で 1 時間静置し、抗体を反応させた。最後に ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を添加し LAD-4000 を用いてメンブレンを撮影した。

### 第3章 熱安定性試験の確立

#### 3-1 序

ヌクレオソームの構造安定性は転写制御に関わっており、例えば、酵母の転写パターンを変化させる変異がヌクレオソームの安定性を低下させるヒストンの変異であることが報告されている (Kurumizaka *et al.*, 1997)。

本博士論文では、ヌクレオソームの構造安定性を測定するため、熱安定性試験を開発した。具体的には再構成したヌクレオソームと SYPRO Orange を混合し、温度を上昇させながら SYPRO Orange 由来の蛍光を検出した。SYPRO Orange は DNA に結合せず、タンパク質の変性によって溶媒に露出する疎水性アミノ酸に結合し、蛍光を発する色素である (Steinberg *et al.*, 1996)。本試験は、蛍光によって、熱によるヌクレオソームの崩壊を検出することができる。

ヌクレオソームを用いて熱安定性試験を行ったところ、温度変化に対する蛍光ピークが検出された。次に得られた蛍光ピークがヌクレオソーム DNA からヒストンが解離した際に生じる蛍光ピークであることを明らかにした。さらに、様々な塩濃度条件下において、本試験が測定可能であることを検証した。加えて、様々なエピジェネティックマークを有するヌクレオソームの安定性の違いを検出可能であることを明らかにした。本章では再構成ヌクレオソームを用いた熱安定性試験の結果を詳述する。

#### 3-2 ヌクレオソームの再構成と精製

2-2 の方法によって H3.1、H4、H2A、H2B はそれぞれ大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質として精製した。精製した各種ヒストンを 16% SDS-PAGE で解

析した (図 6)。CBB によってタンパク質を染色した結果、それぞれ単一のバンドで検出された。ゆえに高純度に精製することができたと考えられる。

次に精製した 4 種のヒストンタンパク質を用いてヒストン八量体、H3-H4 四量体、H2A-H2B 二量体を 2-4 の方法で再構成し、精製した。精製した各種ヒストン複合体を 18% SDS-PAGE で解析した (図 7)。CBB によってタンパク質を染色した結果、各レーンにおいて、複合体を構成するヒストンのバンド強度は同程度であった。つまり、ヒストン複合体中に各種ヒストンが等モル比、含まれると考えられる。

さらに、2-7 の方法に従ってヒストン八量体またはヒストン四量体と 146 bp DNA を混合し、塩透析法により DNA-ヒストン複合体を再構成し、精製した。精製した DNA-ヒストン複合体を 6% 非変性 PAGE で解析し、EtBr で DNA を染色した (図 8 左)。非変性 PAGE の結果、146 bp DNA のバンドがシフトアップし、ヌクレオソーム、テトラソームはそれぞれ単一のバンドとして検出された。そのためシフトアップしたバンドは DNA-ヒストン複合体であると考えられる。次に 18% SDS-PAGE を用いて DNA-ヒストン複合体のヒストン組成を解析した (図 8 右)。ヌクレオソームを SDS-PAGE で解析した結果、H3、H4、H2A、H2B それぞれのバンド強度が同程度である (図 8 右レーン 1)。このことはヌクレオソーム中に各ヒストンが等モル比、含まれることを示唆している。一方、テトラソームの SDS-PAGE 解析の結果、H3、H4 のバンドのみ検出された (図 8 右レーン 2)。このことからテトラソーム中に H3、H4 が等モル比、含まれることを示唆された。非変性 PAGE、SDS-PAGE の結果から、高純度なヌクレオソーム及びテトラソームがそれぞれ得られたと考えられる。

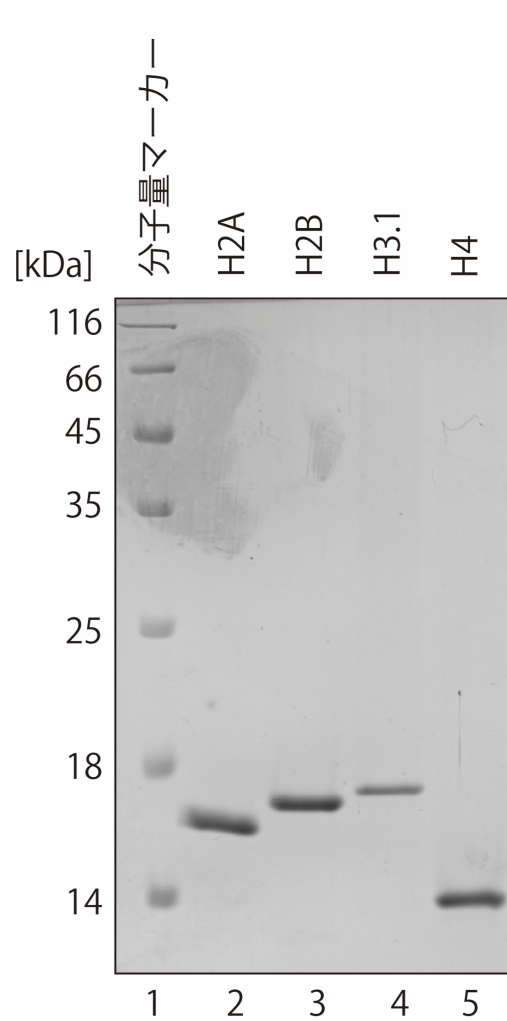


図6 ヒストンタンパク質の精製結果

ヒトの主要型ヒストン H3.1、H4 H2A、H2B の最終精製物を 16% SDS-PAGE で解析した結果。1 レーン目は分子量マーカー、2 レーン目は H2A、3 レーン目は H2B、4 レーン目は H3.1、5 レーン目は H4 を示す。CBB でタンパク質を染色した。

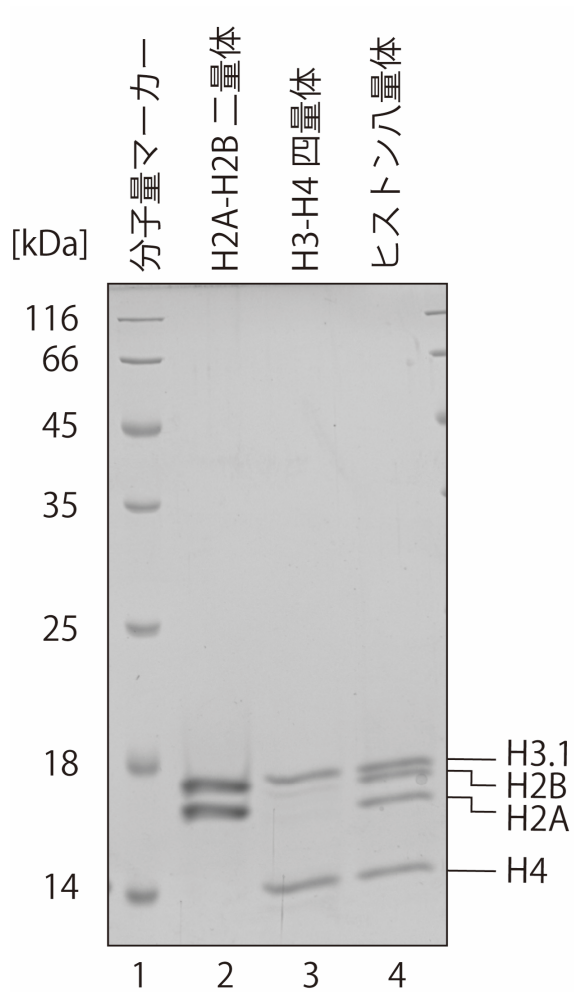


図7 ヒストン複合体の再構成結果

ヒストン複合体 H2A-H2B 二量体 (2 レーン目)、H3.1-H4 四量体 (3 レーン目)、ヒストン八量体 (4 レーン目) の最終精製物を 18% SDS-PAGE によって解析した結果。CBB を用いてタンパク質を染色した。

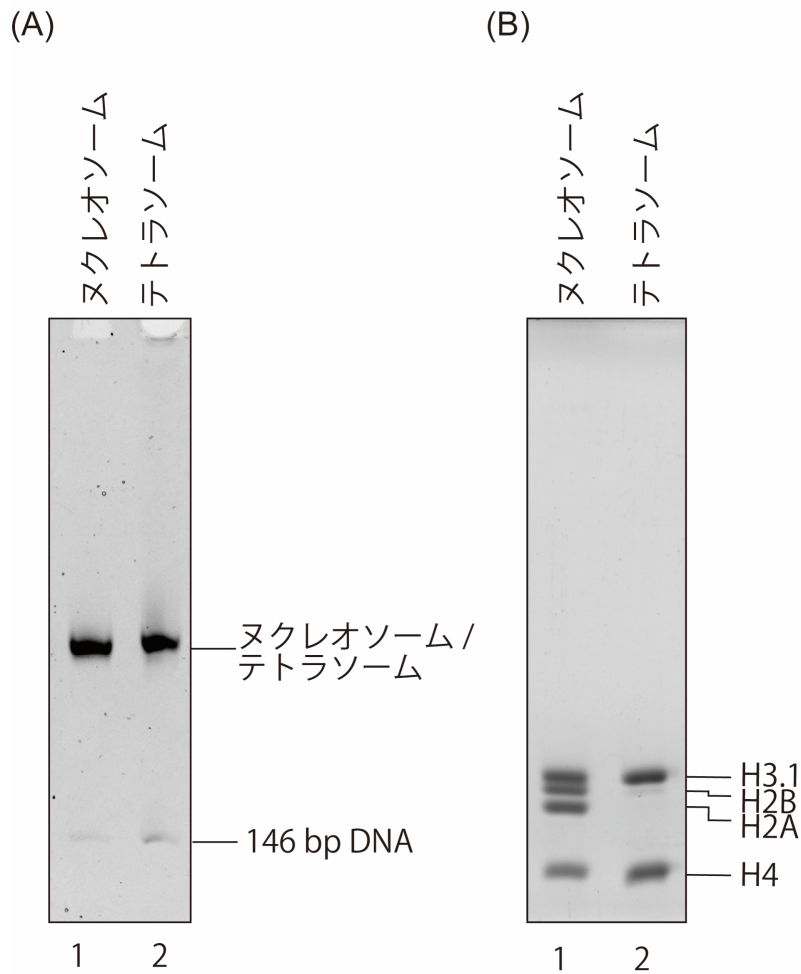


図8 ヌクレオソーム、テトラソームの非変性PAGE及びSDS-PAGE

(A) 再構成したヌクレオソーム、テトラソームを 0.2xTBE 溶液中で 6%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、解析した（以下 6% 非変性 PAGE と記述する）。泳動したゲルは EtBr で染色した。1 レーン目はヌクレオソーム、2 レーン目はテトラソームを示す。(B) 再構成したヌクレオソーム、テトラソームを 18% SDS-PAGE で解析し、CBB で染色した。1 レーン目はヌクレオソーム、2 レーン目はテトラソームを示す。((Taguchi *et al.*, 2014) の Fig.1 より引用、改変した)

### 3-3 熱安定性試験におけるヌクレオソーム由来の蛍光ピークの同定

2-8の方法でヌクレオソームを用いた熱安定性試験を行った。その結果、26°Cから64°Cまで蛍光ピークが検出されなかった。さらに75°C、85°C周辺に二相性を持つ曲線として蛍光ピークが検出された(図9A黒丸)。熱によるヌクレオソームの崩壊には様々な機序が考えられる。この試験においては生体内で起こるようなDNAからヒストンが解離する現象を検出したいと考えていた。そこで得られた蛍光ピークが真にヌクレオソーム中のDNAからヒストンが解離することによって生じたものであるか検証した。

まず、熱安定性試験で得られた蛍光ピークはヒストン八量体単独でも同様に生じる蛍光ピークなのか調べた。ヒストン八量体の熱安定性試験を行った。ヌクレオソームの熱安定性試験結果と比べ、蛍光ピークの温度が大きく低下しているとわかった(図9A赤丸)。ヒストン八量体の蛍光ピークはヒストン同士の解離によるものであると考えられる。ヌクレオソームの熱安定性試験で生じる蛍光ピークは、ヒストン八量体の蛍光ピークとは異なる。つまりヌクレオソームの蛍光ピークはヒストン同士の解離によるものではなく、DNAからヒストンが解離することによって生じた蛍光ピークであることが示唆された。

次に熱安定性試験における蛍光ピークがヒストンの二次構造の崩壊によって生じたものか、調べた。ヒストンタンパク質は複合体形成時に比べ、単独ではほとんど二次構造を形成しない(Stump *et al.*, 2008)。そこでヒストンタンパク質を単独で用いて熱安定性試験を行った。その結果、どのヒストンタンパク質を用いた場合でも蛍光ピークは検出されない一方で、シグナル自体は55°Cから64°Cまで、ヌクレオソームの蛍光シグナルより高いことがわかった(図9B)。

そのためヒストンと SYPRO Orange を混合した時点で疎水表面に SYPRO Orange が結合し、蛍光を発していると考えられる。このことからヌクレオソームの蛍光ピークはヒストンの二次構造の崩壊によるものであると示唆される。

ヌクレオソームを用いた熱安定性試験から、ヌクレオソームは 26-64°C で安定的な構造体であることがわかった。この温度は先行研究で CD 解析及び UV 検出法によってヌクレオソーム安定的な構造体を形成する温度と一致する (Subirana, 1973, Jackson *et al.*, 1981)。従って SYPRO Orange によってヌクレオソームの安定性は影響しないと推察される。そこで、SYPRO Orange の量を変化させることで、ヌクレオソームの安定性が変化するか、検証した。SYPRO Orange の量を 2-8 に示した通常プロトコールに比べ 2 倍量、0.5 倍量とし、熱安定性試験を行った。この実験によって SYPRO Orange の量が十分であるか、SYPRO Orange 自体がヌクレオソームの安定性を変化させていないか、の二点について調べることが可能である。まず、0.5 倍量の熱安定性試験では通常量 (1 倍量) の蛍光ピークに比べ、半分程度となっていることがわかった (図 9C)。このことから 0.5 倍量の SYPRO Orange では、ヒストンの疎水表面に十分結合し切れていないと考えられる。2 倍量の SYPRO Orange を用いた熱安定性試験は通常量の蛍光ピークとほとんど変わらない挙動を示す (図 9C)。このことから通常量の SYPRO Orange で十分ヌクレオソームに結合できる量を満たしていることが示唆された。また、SYPRO Orange の量の変化による蛍光ピークのズレは検出されなかった。



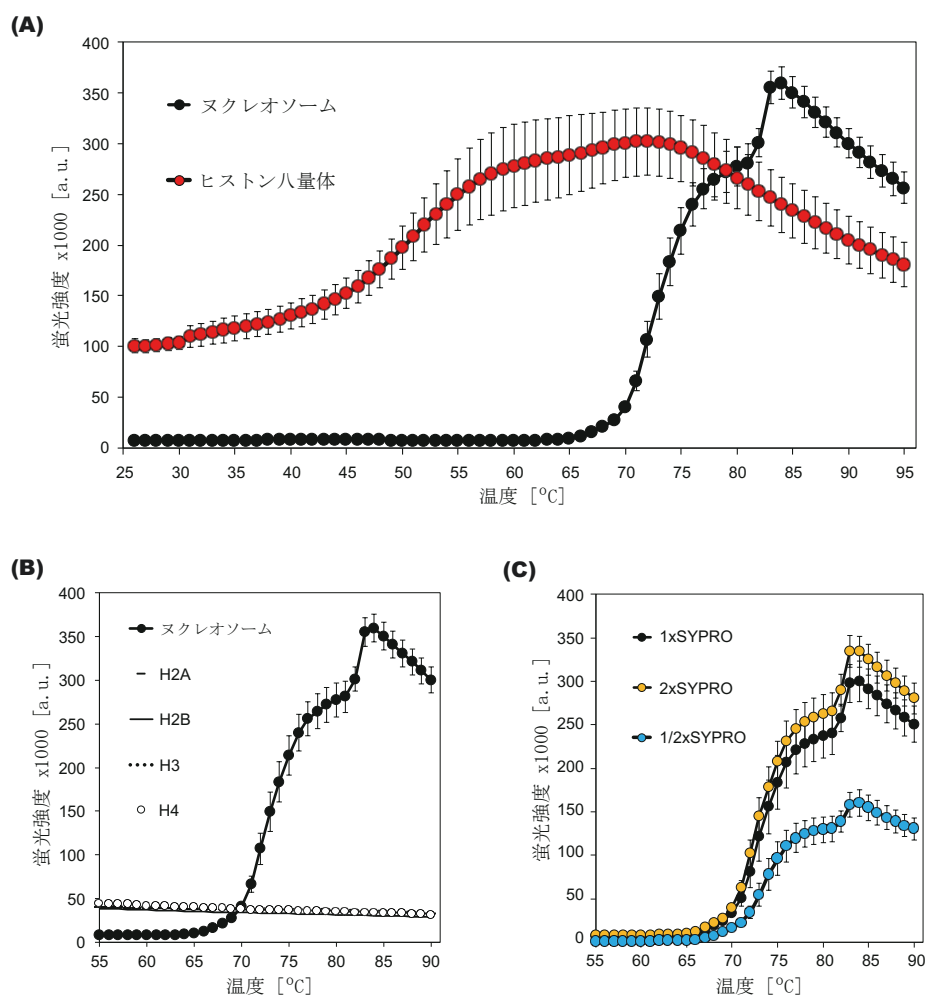


図9 ヌクレオソームの熱安定性試験の結果

(A) ヒストン八量体とヌクレオソームをそれぞれ精製し、熱安定性試験を行った。ヌクレオソームは黒丸、ヒストン八量体は赤丸で示した。それぞれ3回ずつ試験を行い、その平均と標準偏差を作図した。(B) 各種ヒストンタンパク質 H3、H4、H2A、H2B 及びヌクレオソームを用いて熱安定性試験を行った結果。ヌクレオソームのデータは図9Aと同一である。(C) SYPRO Orange を2倍量(黄丸)、0.5倍量(青丸)加え、熱安定性試験を行った結果。それぞれ3回ずつ試験を行い、その平均と標準偏差を作図した。((Taguchi *et al.*, 2014) の Fig. 2, Fig. 5 より引用、改変した)

### 3-4 熱安定性試験におけるヌクレオソームの崩壊機構

ヌクレオソームの熱安定性試験で得られた2つの蛍光ピークがそれぞれのヒストンのDNAからの解離に由来するか検証した。そこでH3-H4とDNAの複合体であるテトラソームの熱安定性試験を行った。テトラソームを用いた際の蛍光ピークはH3-H4とDNAの解離を示すと考えられる。テトラソームの熱安定試験の結果、85°C周辺に単一の蛍光ピークが生じた(図10 青丸)。この蛍光ピークはヌクレオソームの2番目の蛍光ピーク(2ndピーク)と一致した。つまり、熱安定性試験におけるヌクレオソームの2nd蛍光ピークはH3-H4とDNAの解離に由来すると考えられる。ヌクレオソームはH3、H4、H2A、H2BとDNAの複合体である(図3)。以上から、熱安定性試験で得られたヌクレオソームの1st蛍光ピークはH2A-H2BがDNAから解離するときに生じた蛍光ピークであると示唆された。

85°Cから90°Cにおいて、ヌクレオソーム、テトラソームともに蛍光強度が低下している(図10)。温度上昇に伴うSYPRO Orangeの消光原因として、温度上昇に伴う発色団の機能低下及び、疎水性アミノ酸に結合したSYPRO Orangeの解離が考えられる。SYPRO Orangeのみで測定した結果を測定データから減算しているため、温度上昇に伴う発色団の機能低下は解析データから検出されないと考えられる。よって蛍光強度が低下した原因は疎水性アミノ酸に結合したSYPRO Orangeの解離と示唆される。

さらにRT-PCRで各温度(55、65、75、85、95°C)まで上昇させたヌクレオソームを6%非変性PAGEで展開し、それぞれの温度においてヌクレオソームがどのような状態にあるか解析した。温度上昇させたヌクレオソームを再度低温条

件にしても、崩壊した構造は元に戻らないことが先行研究でわかっている (Flaus A, *et al.*, 2003)。温度上昇に伴い、ヌクレオソームのバンドはシフトアップし、その後消失することがわかった (図 11 レーン 6, 7)。まず、85°C、95°C における結果に着目すると、85°C、95°C に温度上昇するとヌクレオソームのバンドが消失している。85 °C、95°C は 2nd 蛍光ピーク後の温度に該当する。このことから、2nd 蛍光ピークにおいてヌクレオソーム中のヒストンは DNA と完全に解離すると考えられる。

1st 蛍光ピークの温度にあたる 75°C でヌクレオソームのバンドがシフトアップしている (図 11 レーン 5)。75°C においてヌクレオソームがどのような状態であるか調べるため、75°C まで温度上昇させたヌクレオソームを、Prep Cell を用いて精製した。精製したサンプルを 6% 非変性 PAGE によって解析した。その結果、熱処理前のヌクレオソームのバンドよりもシフトアップした DNA-ヒストン複合体を精製することができたことが確認できた (図 12)。Prep Cell を用いて精製を行った際の温度は 4°C である。つまり温度上昇させたヌクレオソームは低温条件に戻し、その構造体を精製できることがわかった。さらに精製した DNA-ヒストン複合体を SDS-PAGE で解析した。SDS-PAGE の結果、各種ヒストンのバンド強度が異なっていた (図 13A 左)。そこでバンド強度を定量した結果、ヒストン H3、H4 に比べ、H2A、H2B のバンド強度が低いことがわかった (図 13A 右、図 13B)。このヒストン-DNA 複合体はヒストン六量体に DNA が巻きついた、ヘキサソームであると考えられる。つまりヌクレオソームを 75°C まで温度上昇させると H2A-H2B が DNA から解離し、ヘキサソームを形成することが明らかとなった。

テトラソームの熱安定性試験で得られた結果と非変性 PAGE による熱安定性試験の解析結果より、ヌクレオソームは 1st 蛍光ピークで H2A-H2B が、2nd 蛍光ピークで H3-H4 が DNA から解離するモデルをたてられる (図 14)。さらにテトラソームの熱安定性試験結果はヌクレオソームから H2A-H2B に該当する 1st 蛍光ピークを差し引いた結果と一致する。テトラソームの立体構造は未だ不明であるが、熱安定性試験の結果から H3-H4 四量体と DNA で再構成したテトラソームとヌクレオソームから H2A-H2B が抜けたテトラソームが同じ性質を持つ構造体であることが示唆された。

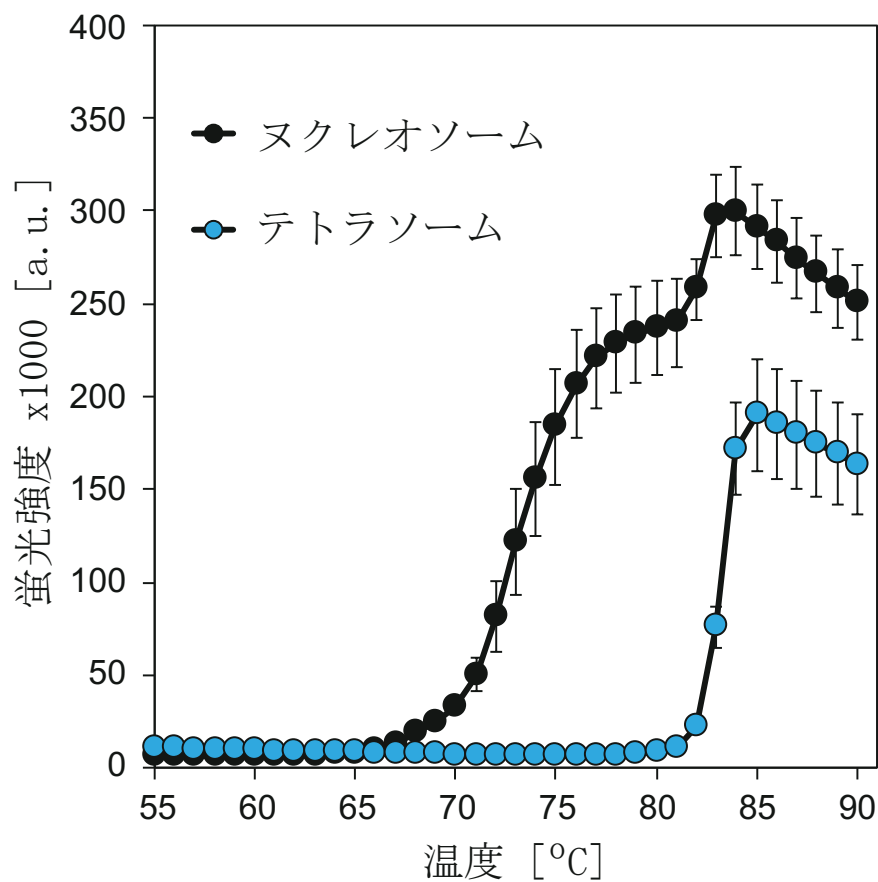


図10 テトラソームの熱安定性試験の結果

再構成したテトラソームを用いて熱安定性試験を行った。黒丸がヌクレオソーム、青丸がテトラソームを示す。ヌクレオソームのデータは図9Cと同一である。

各種3回ずつ測定し、その平均と標準偏差を作図した。(Taguchi *et al.*, 2014)

の Fig. 2, Fig. 5 より引用、改変した)

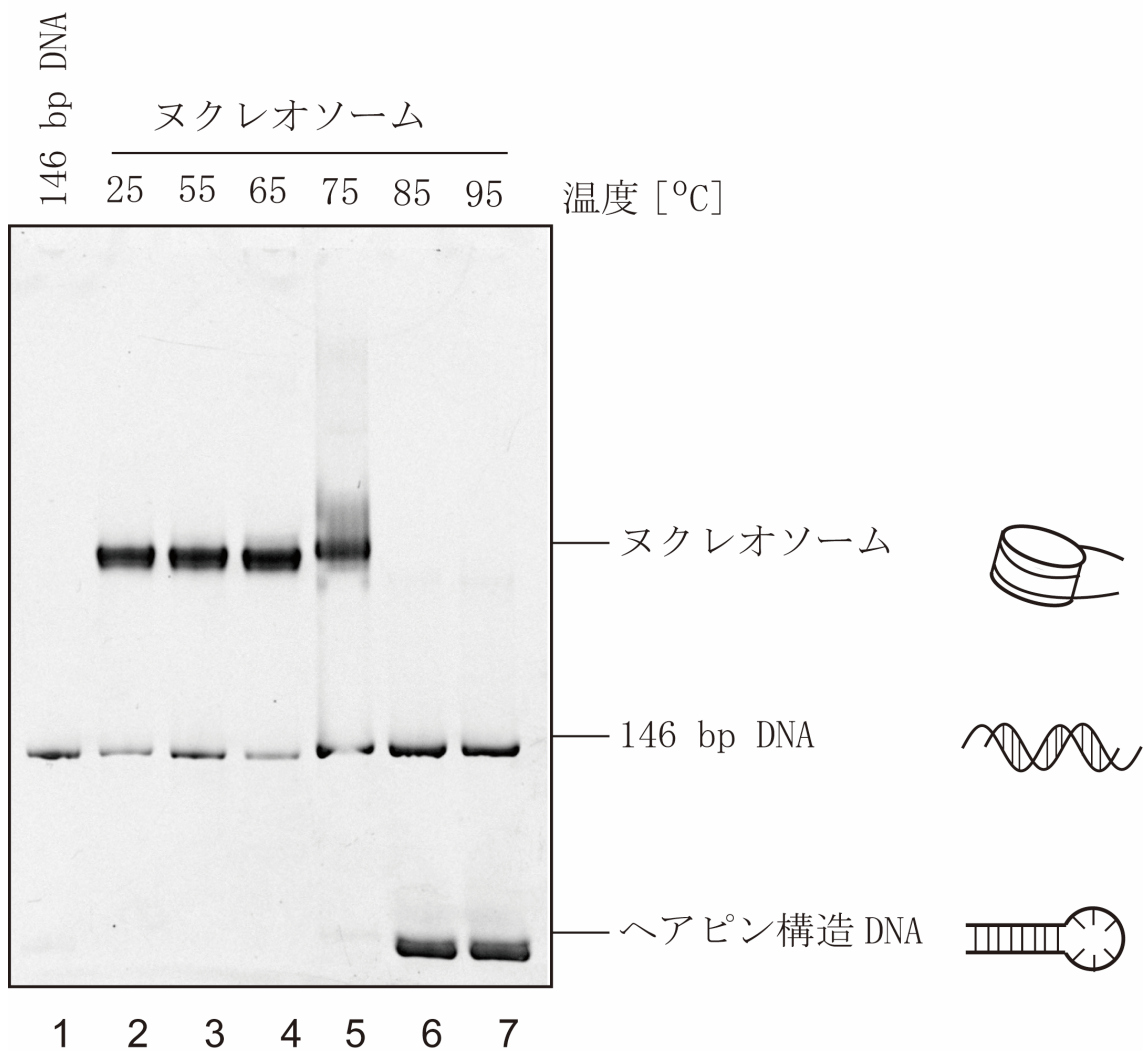


図 11 各温度まで上昇させたヌクレオソームの非変性 PAGE

RT-PCR 装置で 25、55、65、75、85、95°C まで温度上昇させたヌクレオソームを 6% 非変性 PAGE で解析した結果。EtBr で DNA を染色した。1 レーン目に 146 bp DNA を泳動し、2-7 レーン目にはそれぞれ 25、55、65、75、85、95°C まで温度上昇させたヌクレオソームを泳動した。模式図は上から順に、ヌクレオソーム、146 bp DNA、ヘアピン構造 DNA を示した。((Taguchi *et al.*, 2014) の Fig. 3 より引用、改変した)

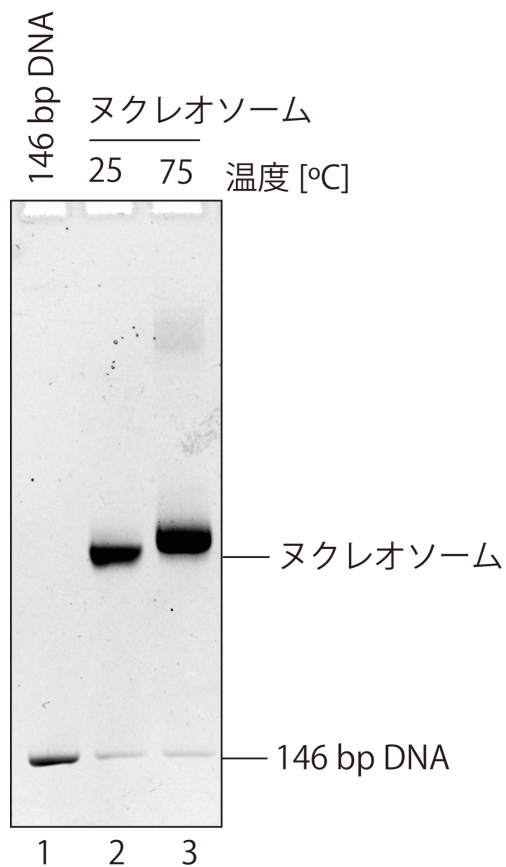


図 12 75°C まで温度上昇させたヌクレオソームの精製結果

RT-PCR 装置で 75°C まで温度上昇させたヌクレオソームを Prep Cell によって精製した。精製後、6% 非変性 PAGE で解析した。各レーンは 146 bp DNA (1 レーン目)、温度上昇前のヌクレオソーム (2 レーン目)、温度上昇後のヌクレオソーム (3 レーン目) を示す。EtBr で DNA を染色した。((Taguchi *et al.*, 2014) の Fig. 3 より引用、改変した)

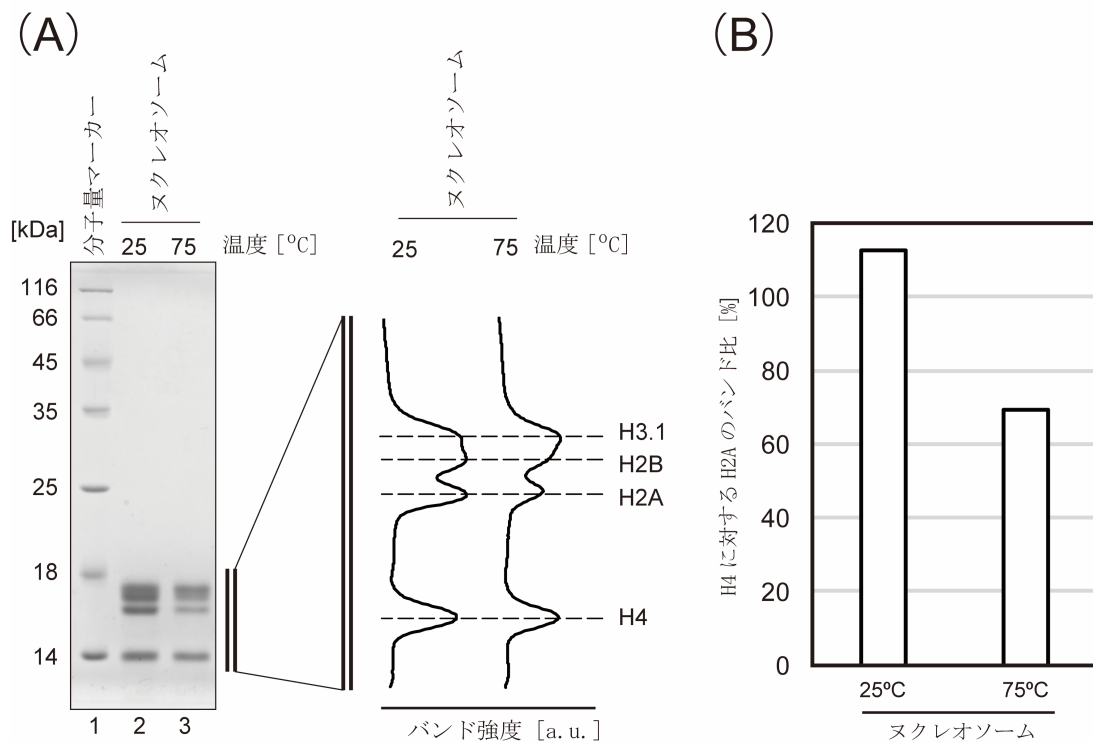


図 13 75°C まで温度上昇させたヌクレオソーム中のヒストン解析

(A) 図 12 で精製したサンプルに含まれる各種ヒストンを 18% SDS-PAGE で解析した(左図)。CBB でタンパク質を染色した。各レーンは分子量マーカー (1 レーン目)、温度上昇前のヌクレオソーム (2 レーン目)、温度上昇後のヌクレオソーム (3 レーン目) を示す。(右図) 左図の泳動結果をソフトウェア MultiGauge (FUJI FILM) で定量した。ヒストンのバンド強度を定量し、作図した。作図は Excel で行った。縦軸が電気泳動距離、横軸がバンド強度である。左の曲線が温度上昇前のヌクレオソーム、右の曲線が温度上昇後のヌクレオソームである。各種ヒストンのバンド頂点は点線で示した。((Taguchi *et al.*, 2014) の Fig.3 より引用、改変した) (B) 図 13A で算出したバンド強度から H4 に対する H2A のバンド比を定量し、作図した。



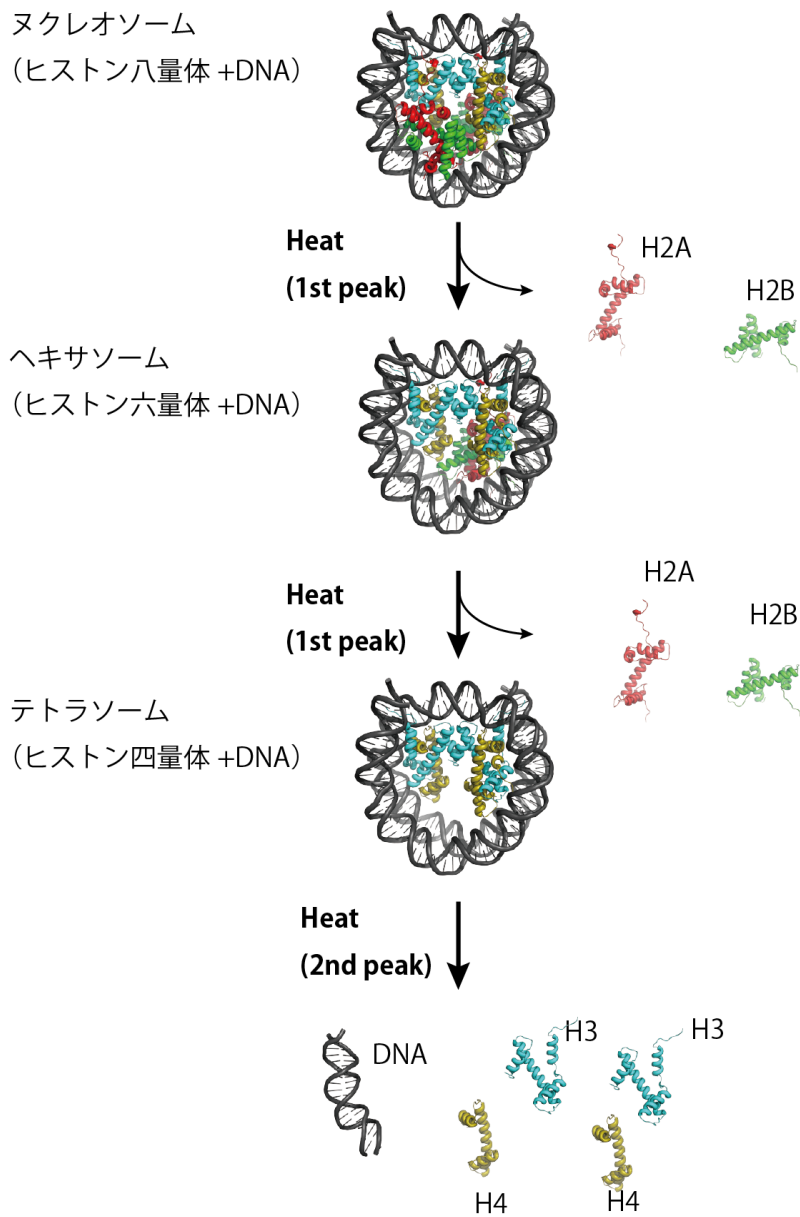


図 14 ヌクレオソームの熱による崩壊モデル

本実験で示唆された熱安定性試験によるヌクレオソーム (PDB:3AFA) の崩壊機序。PyMOL で分子構造の画像を出力し、Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems) で作図した。

### 3-5 塩濃度の違いによるヌクレオソームの熱安定性解析

熱安定性試験によってヌクレオソームの崩壊を検出できることがわかった。次に様々な塩濃度条件下でヌクレオソームの熱安定性試験を行うことが可能か検証した。最終塩濃度を 50、100、200 mM 塩化ナトリウム条件下として、熱安定性試験を行った。その結果、塩濃度の上昇に伴い、ヌクレオソームの安定性は変化するが、特徴的な二相性を持つ蛍光シグナルは保存された (図 15)。特に 100-200 mM 塩化ナトリウムは 0 mM 塩化ナトリウム条件に比べ、より生理条件に近い (Warley A *et al.*, 1985)。つまり、熱安定性試験で見られる段階的な崩壊機序は生理条件でも起こり得る。加えて本試験が生理条件下を始め、異なる塩化ナトリウム濃度を変化させても高い再現性で本試験を行うことができることがわかった。今後、様々な溶媒条件下で構造安定性を評価できることが期待される。

塩化ナトリウム濃度の上昇に伴い、1st 蛍光ピークの温度が低下し、2nd 蛍光ピークの温度が上昇した (図 15)。それぞれの蛍光カーブで蛍光強度が最も大きく変化した際の温度を  $T_m$  値とし、その温度を比較した (表 6)。塩濃度の上昇に伴い、1st 蛍光カーブの  $T_m$  値は最大 5°C 程度低下し、2nd 蛍光カーブの  $T_m$  値は最大 2°C 程度上昇することがわかった。塩化ナトリウム濃度の上昇によって、疎水性相互作用は上昇し、イオン相互作用は低下する。これらのことから、H2A-H2B と H3-H4 はそれぞれ DNA との結合様式が異なると示唆される。具体的には H2A-H2B と DNA の結合はイオン相互作用が中心的役割を担っており、H3-H4 と DNA の結合は疎水性相互作用によって成り立っていると考えられる。

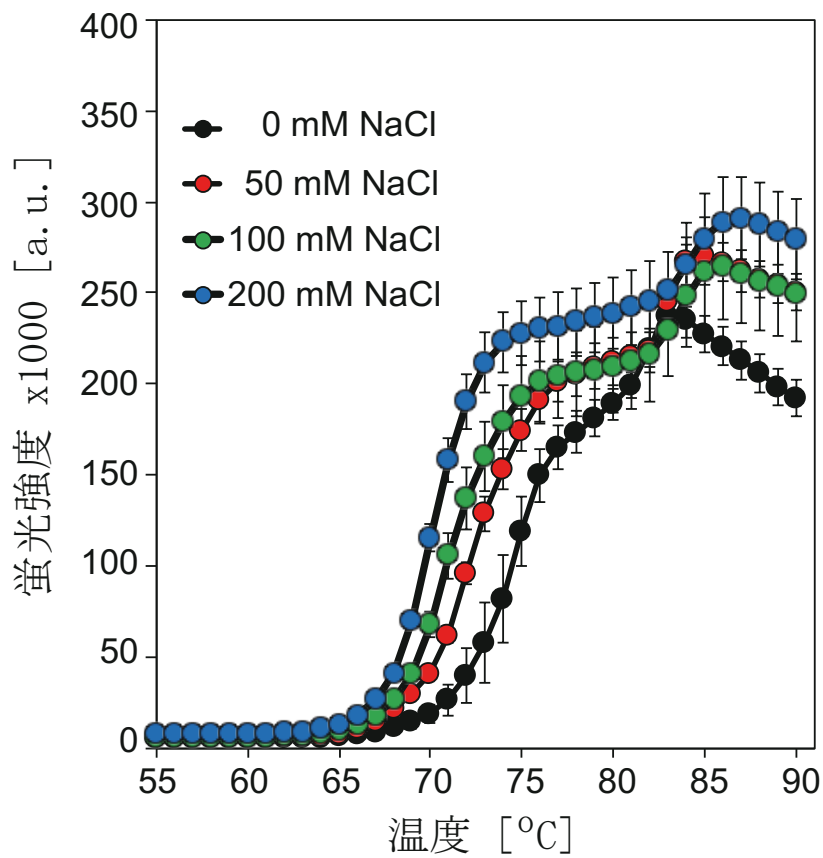


図 15 塩濃度の違いによるのヌクレオソームの熱安定性解析

異なる塩濃度でヌクレオソームの熱安定性試験を行った。黒丸、赤丸、緑丸、青丸はそれぞれ最終塩濃度 0、50、100、200 mM 塩化ナトリウムのヌクレオソームを示す。それぞれ 3 回ずつ試験し、その平均と標準偏差を作図した。((Taguchi *et al.*, 2014) の Fig. 4 より引用、改変した)

表 6 塩化ナトリウム濃度による T <sub>m</sub> 値の変化		
塩化ナトリウム 最終濃度 [mM]	T <sub>m</sub> 値 [°C]	
	1st 蛍光カーブ	2nd 蛍光カーブ
0	74-75	81-82
50	71-72	82-83
100	70-71	83-84
200	69-70	83-84

### 3-6 ヒストンバリエントを含むヌクレオソームの熱安定性解析

次にヒストンバリエントを含むヌクレオソームを用いてヒストンバリエントによるヌクレオソームの構造安定性の違いを測定できるか検証した。精巣特異的に発現する H3 のヒストンバリエント H3T と複製・転写・修復など DNA 代謝イベントに一過的に発現することが報告されている H2A のヒストンバリエント H2A.B をそれぞれ含むヌクレオソームの構造安定性を測定した (Tachiwana *et al.*, 2010, Arimura *et al.*, 2013.)。

主要型ヌクレオソームと H3T ヌクレオソームの熱安定性解析の結果、主要型ヌクレオソームに比べ、蛍光カーブの温度が低い (図 16A)。つまり熱安定性試験によって H3T ヌクレオソームは構造不安定であると示された。この結果は先行研究と一致している (Tachiwana *et al.*, 2010)。

次に H2A.B ヌクレオソームの熱安定性試験を行った。主要型ヌクレオソームと異なり、H2A.B ヌクレオソームの熱安定性試験では蛍光ピークが 1 つしか検出

されなかった (図 16B)。そこで、塩濃度を 200 mM 塩化ナトリウム条件下とし、再度熱安定性試験を行った。その結果、主要型ヌクレオソームの 1st 蛍光ピークの温度に比べ、H2A. B ヌクレオソームの 1st 蛍光ピークの温度が高く検出された。一方 H2A. B ヌクレオソームの 2nd 蛍光ピークは主要型ヌクレオソームと同じ温度で検出された (図 16C)。つまり、H2A. B ヌクレオソームは主要型ヌクレオソームに比べ、H2A. B-H2B が DNA から解離しにくい非常に安定的な構造体であることがわかった。以上の解析からヒストンバリエーションによるヌクレオソームの熱安定性の変化を測定できることが明らかとなった。

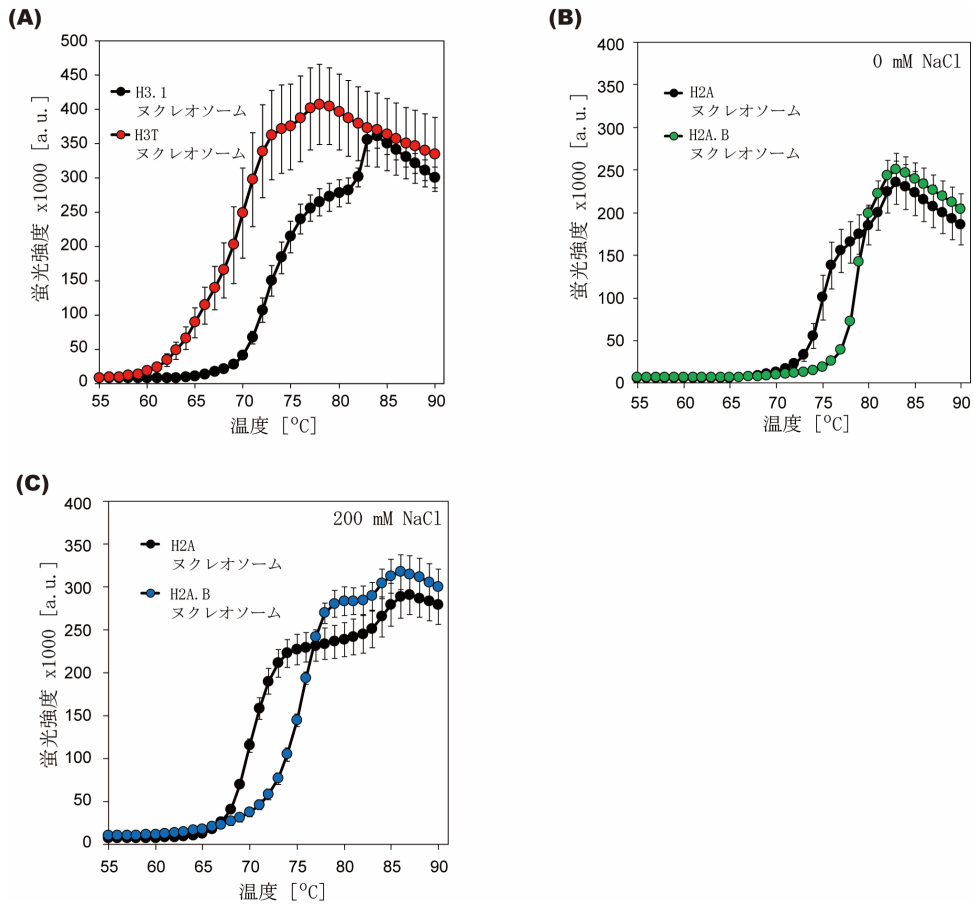


図 16 ヒストンバリエントを含むヌクレオソームの熱安定性解析

(A) H3T ヌクレオソームの熱安定性解析の結果。赤丸は H3T ヌクレオソーム、黒丸は主要型ヌクレオソームを示す。主要型ヌクレオソームのデータは図 9A と同一である。(B) H2A.B ヌクレオソームの熱安定性解析の結果。緑丸は H2A.B ヌクレオソーム、黒丸は主要型ヌクレオソームを示す。主要型ヌクレオソームのデータは図 15 と同一である。(C) 200 mM 塩化ナトリウム存在下の H2A.B ヌクレオソームの熱安定性解析の結果。青丸は H2A.B ヌクレオソーム、黒丸は主要型ヌクレオソームを示す。主要型ヌクレオソームのデータは図 15 と同一である。すべてのグラフは各種 3 回ずつ測定し、その平均と標準偏差を作図している。

((Taguchi *et al.*, 2014) の Fig.6 より引用、改変した)

## 第4章 新規ヒト H3 ヒストンバリエントの機能解析

### 4-1 序

2015年に初めて報告された3種類の新規ヒト H3 ヒストンバリエント H3.6、H3.7、H3.8に着目し、機能解析を試みた (Maehara *et al.*, 2015) (図 17)。これらのヒストンタンパク質は生体内で発現しているのか、ヌクレオソームに取り込まれるのか、どのような機能を有しているのか、全く不明である。ヒストンバリエントは、ヌクレオソーム中に取り込まれることで特徴的なクロマチンを形成する。例えば CENP-A はヘテロクロマチンの中でもセントロメア領域に集積し、特殊なクロマチン構造を形成していることが知られている (Henikoff *et al.*, 2000)。CENP-A を含むヌクレオソームは DNA のフレキシビリティの異なる特殊な構造体を形成しており、この性質がセントロメア領域の特殊なクロマチンを規定しているのではないかと考えられる (Tachiwana *et al.*, 2011)。そこで新規ヒトヒストンバリエントを含むヌクレオソームの形成能と構造的・生化学的機能を明らかにするため、構造生物学的解析及び、第3章で確立した熱安定性試験を用いて実験を行った。

まず、試験管内再構成系で新規ヒストンバリエント H3.6、H3.7、H3.8 がヒストン複合体を形成可能か調べた。ヒストン複合体再構成解析から H3.6、H3.8 を含むヒストン複合体が形成されることを明らかにした。次にこれらのヒストン複合体はヌクレオソーム形成が可能か調べた。その結果、H3.6 ヌクレオソームは高純度に再構成が可能で、構造生物学的・生化学的解析可能であることがわかった。熱安定性試験の結果、H3.6 ヌクレオソームは H3.3 ヌクレオソームに比べ、ヒストンが DNA から解離しやすい不安定な構造であることが明らかとなっ

た。H3.6ヌクレオソームの構造不安定性の原因を調べるため、H3.6ヌクレオソームの結晶化を行い、立体構造を決定した。立体構造に基づいた構造解析及び変異体解析から、H3.6ヌクレオソームの構造安定性を特徴づける責任残基を特定した。本章では新規ヒストンバリエーションの精製系、ヌクレオソーム再構成系の確立及び生化学的・構造生物学的解析を詳述する。

#### 4-2 ヒストンバリエーション精製

新規ヒストンバリエーションはH3.3とアミノ酸相同性が高い(図17)。そこで新規ヒストンバリエーションとの比較対象はH3.3とした。本実験で用いたヒストンタンパク質H3.3、H3.6、H3.7、H3.8は先行研究と同じ方法(2-2)で精製した(Tanaka *et al.*, 2004)。全てのヒストンは凍結乾燥でパウダー状にしたものを最終精製物とした。精製したヒストンを16% SDS-PAGEで解析し、CBBでタンパク質を染色した。新規ヒストンバリエーションはそれぞれ単一バンドで高純度に精製できた(図18)。また、H3.6、H3.8は主要型ヒストンH3.1やH3.3に比べ、異なる泳動距離を示すことがわかった。



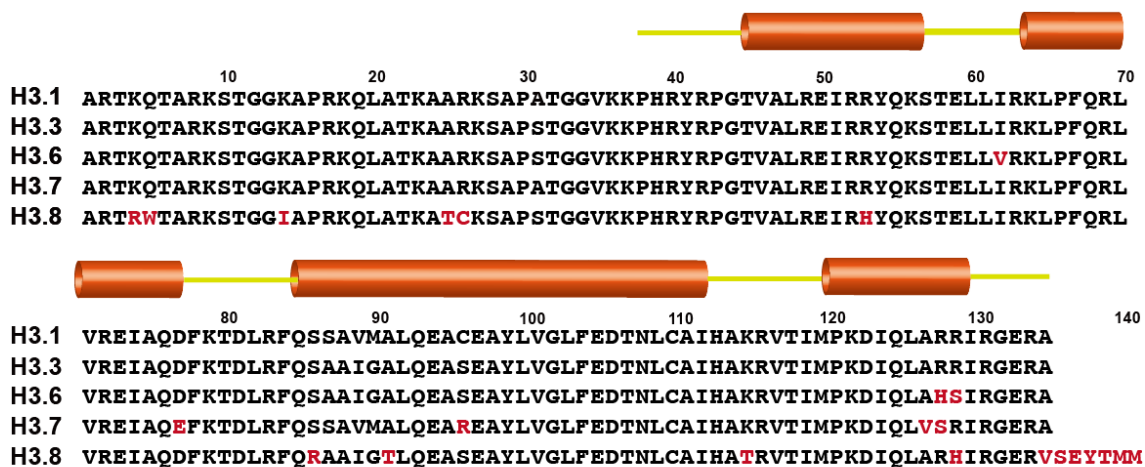


図 17 各種ヒトヒストンバリエーションのアミノ酸配列

主要型ヒストン H3.1 及びヒストンバリエーション H3.3、H3.6、H3.7、H3.8 のアミノ酸配列を比較した。赤文字は H3.1、H3.3 と異なるアミノ酸置換部位を示している。アミノ酸配列の上にはヒト主要型ヌクレオソーム (PDB: 3AFA) 中の H3.1 の二次構造を示した。橙シリンダーは  $\alpha$ -helix を示す。((Taguchi *et al.*, 2017) の Fig. 1 より引用、改変した)

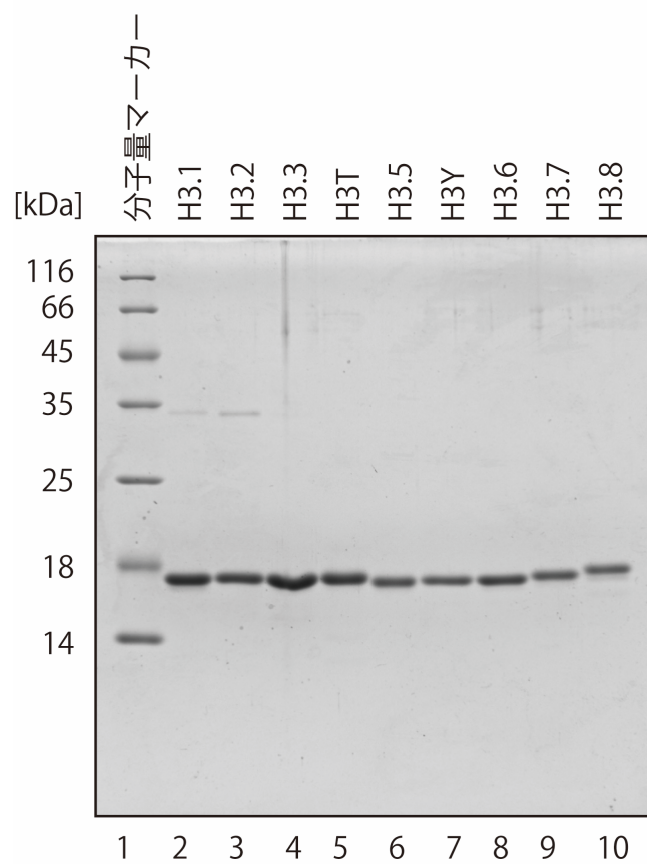


図 18 精製したヒトヒストンの SDS-PAGE

ヒトヒストンタンパク質を精製し、16% SDS-PAGE で解析した結果。CBB でタンパク質を染色した。1 レーン目は分子量マーカーを泳動した。2-10 レーン目はそれぞれ H3.1、H3.2、H3.3、H3T、H3.5、H3Y、H3.6、H3.7、H3.8 を泳動した。

((Taguchi *et al.*, 2017) の Fig.2 より引用、改変した)

#### 4-2 ヒストン複合体の検討

H3.6、H3.7、H3.8 がヒストン複合体を形成できるか検討した。ヒストン複合体の再構成法は先行研究で確立されている 2-4 の方法を用いた (Tachiwana *et al.*, 2010)。H4、H2A、H2B にそれぞれのヒストンバリエント H3.3、H3.6、H3.7、H3.8 を加え、変性させた。その後、透析によって変性剤を除いた。透析後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィにより溶出した。溶出サンプルは 280 nm の吸光をモニタリングしている。モニタリングの結果を作図し、ピークが検出された領域を 16% SDS-PAGE で解析した (図 19)。

H3.3、H3.6 のヒストン複合体再構成解析の結果、H3、H4、H2A、H2B がそれぞれ同程度のバンド強度で検出された (図 19A、B)。加えて H3.6 複合体のゲル濾過カラムクロマトグラフィのピークプロファイルで H3.3 と同様に 65-70 ml 程度にピークが生じている (図 19A、B)。これらのことから、H3.6 は H3.3 と同様にヒストン八量体を形成可能であることが明らかとなった。さらにゲルろ過カラムクロマトグラフィで得られたピーク周辺 (図 19 (i)、(ii)) を 16% SDS-PAGE で解析した。結果、H3.3 のレーンにおいて H3.3、H4、H2A、H2B の 4 本のバンドがはっきりと区別できるが、H3.6 のレーンにおいて H3.6 と H2B のバンドが重なり、はっきりと区別できないことがわかった (図 19A、B)。H3.6 は H3.3 とアミノ酸相同性が 98% と高いが、ヒストンの電気泳動距離が僅かに異なる (図 18)。この性質によって H3.6 は H2B とバンドが重なったと考えられる。

H3.7 のヒストン複合体再構成解析の結果、H2A、H2B のバンドのみ検出された (図 19C)。このことから、従来のヒストン複合体再構成法によって H3.7 はヒストン複合体を形成できないと考えられる。

H3.8 のヒストン複合体再構成解析の結果、H3.8 と H4 のバンドを同時に溶出している領域を確認した (図 19D)。このことから、H3.8 と H4 は複合体が形成可能であることがわかった。一方、H3.8-H4 のバンドに比べて H2A-H2B のバンドは薄い (図 19D)。このことは H3.8、H4、H2A、H2B が等モル比含まれるヒストン八量体が形成できていないと示唆される。H3.8 八量体は形成されないにもかかわらず、H2A、H2B が H3.8 と同じ領域にバンドが検出されている。このことから H3.8-H4 が 2 分子ずつ、H2A-H2B が 1 分子で構成される H3.8 六量体が形成されているのではないかと考えられる。そこで、H3.8、H4、H2A、H2B の溶出領域を全て回収し、次のヌクレオソーム再構成解析を行うことにした。本実験から、H3.6、H3.8 はヒストン複合体を形成可能であることが示された。

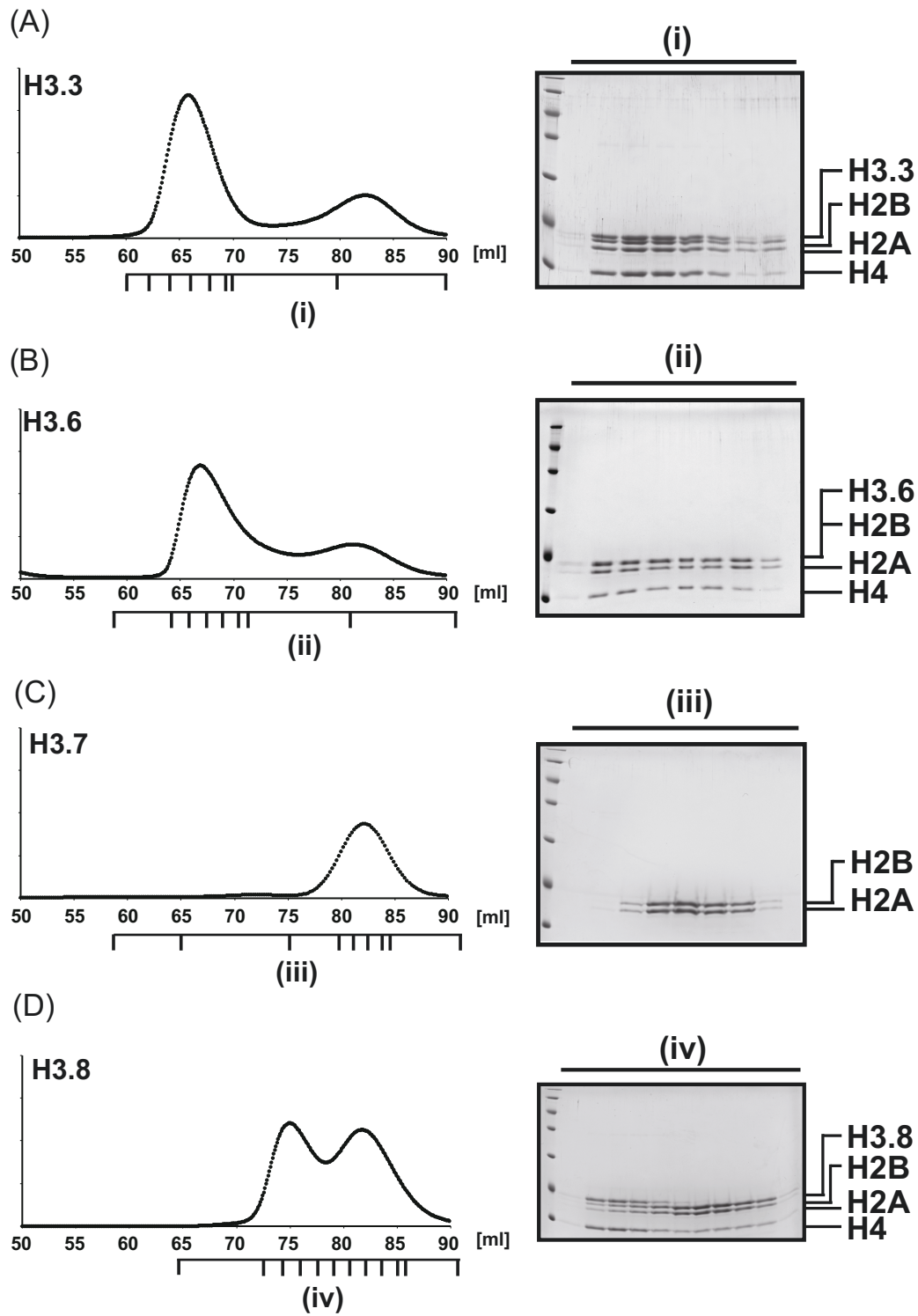


図 19 ヒストンバリエントを含むヒストン複合体の再構成

H2A、H2B、H4 に H3.3 (A)、H3.6 (B)、H3.7 (C)、H3.8 (D) をそれぞれ加え、ゲル濾過カラムクロマトグラフィ HiLoad 16/60 Superdex200 (GE Healthcare) で溶出した。溶出されたサンプルは 280 nm の吸光をモニタリングしている。モニタリング結果は Excel 形式で出力し、作図した。縦軸は吸光度、横軸は溶出位置を示す。それぞれのグラフの下線部 (i-iv) の領域を 16% SDS-PAGE で解析した。CBB でタンパク質を染色した。((Taguchi *et al.*, 2017) の Fig. 3 より引用、改変した)

#### 4-3 ヌクレオソーム再構成の検討

ヒストン複合体の再構成解析から、H3.6、H3.8を含むヒストン複合体は形成し得ることがわかった。そこで、H3.6、H3.8を含むヌクレオソームが形成可能か検証した。ヌクレオソームの再構成法は先行研究に倣い、塩透析法で行った (Tanaka *et al.*, 2004)。

再構成したヒストン-DNA 複合体は Prep Cell で精製し、濃縮したサンプルを最終精製物とした。6% 非変性 PAGE で解析した結果、H3.6ヌクレオソームは H3.3ヌクレオソームと同程度の位置にバンドが確認された (図 20A)。このことから H3.6 は H3.3 と同様の手法でヌクレオソームが形成可能であるとわかった。

H3.8ヌクレオソームのバンドは H3.3ヌクレオソームに比べ、シフトアップしている (図 20A)。加えて H3.3ヌクレオソームは単一のバンドで検出されているが、H3.8ヌクレオソームは複数のバンドを検出した (図 20A)。複数のバンドはヘキサソームやテトラソームなど、サブヌクレオソームの由来と考えられる。このことから H3.8 は H3.3 に比べ、再構成効率が低い、H3.8 複合体と DNA が結合できることが明らかとなった。

SDS-PAGE の解析結果、H3.3ヌクレオソームのレーン中に含まれる各種ヒストンのバンド強度は同じである (図 20B)。同様に、H3.6ヌクレオソーム及び H3.8ヌクレオソームのレーン中に含まれる各種ヒストンのバンド強度は同じである (図 20B)。つまり、H3.6、H3.8 はヒストン八量体に DNA が巻きついたヌクレオソーム構造を形成しうることを示唆された。

H3.6ヌクレオソームは H3.3ヌクレオソームと同程度の純度で再構成し、精製可能であることがわかった。一方 H3.8ヌクレオソームはサブヌクレオソームを

多く含むため、生化学的解析及び構造生物学的解析に不向きであることがわかった。以降の実験は H3.6 ヌクレオソームで行った。

#### 4-4 新規ヒストンバリエーションを含むヌクレオソームの熱安定性解析

H3.6 ヌクレオソームの構造安定性を解析するため、熱安定性試験を行った。熱安定性試験は 2-8 の方法で行った。その結果、H3.6 ヌクレオソームの 2nd 蛍光ピークに比べ、1st 蛍光ピークが高いことがわかった (図 21A)。このことから 1st 蛍光ピークにおいて H3.6 ヌクレオソームは H3.3 ヌクレオソームと異なる崩壊機序を示すことが考えられる。

そこで 75°C において H3.3 ヌクレオソーム、H3.6 ヌクレオソームは異なる崩壊様式を示すと考え、75°C まで上昇させた H3.3、H3.6 ヌクレオソームを 6% 非変性 PAGE で解析した。その結果、H3.3 ヌクレオソームは 75°C で 146 bp DNA に相当するバンドがほとんど検出されないことがわかった (図 21B レーン 2)。一方、H3.6 ヌクレオソームは 146 bp DNA が検出された (図 21B レーン 4)。つまり、H3.6 ヌクレオソームは H2A-H2B が DNA から解離するとき、同時に H3-H4 が DNA から解離すると示唆された。以上の結果、H3.6 ヌクレオソームは H3.3 ヌクレオソームに比べ、不安定な構造であることが考えられる。



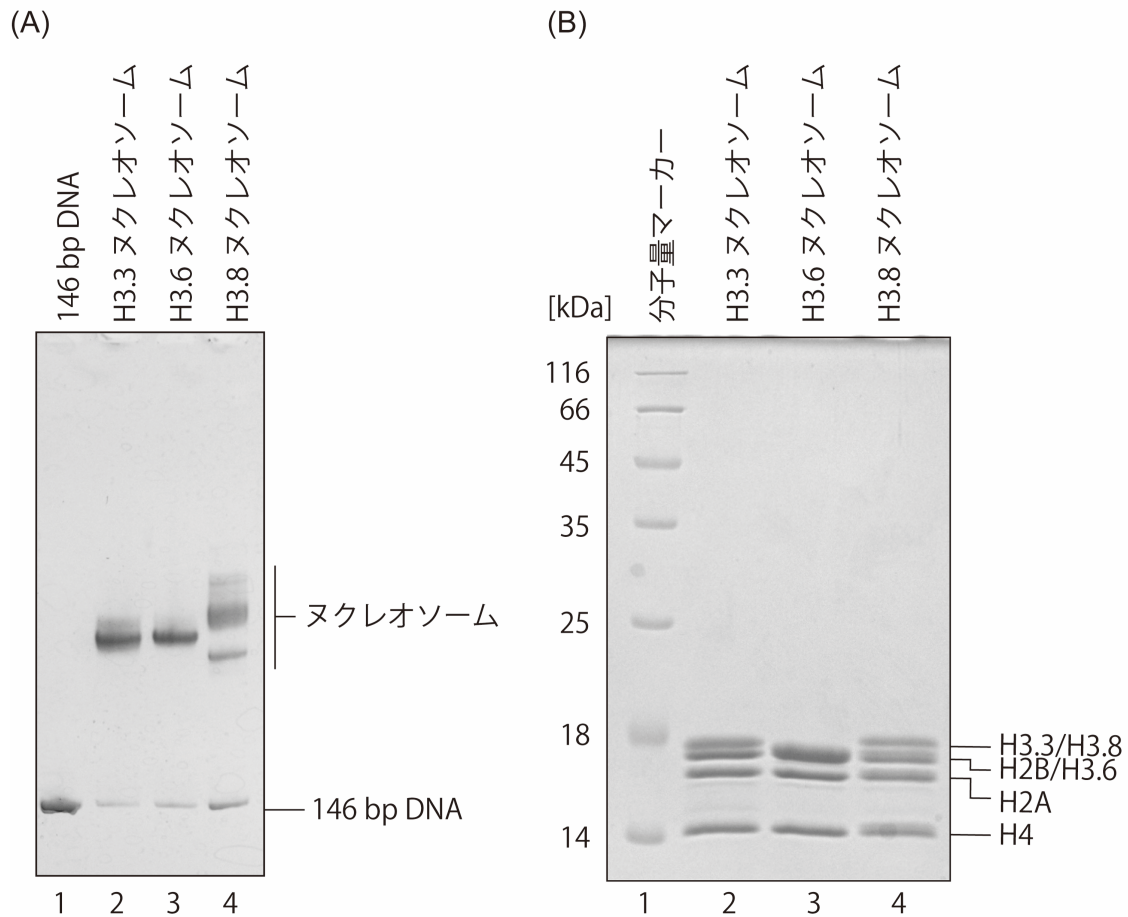
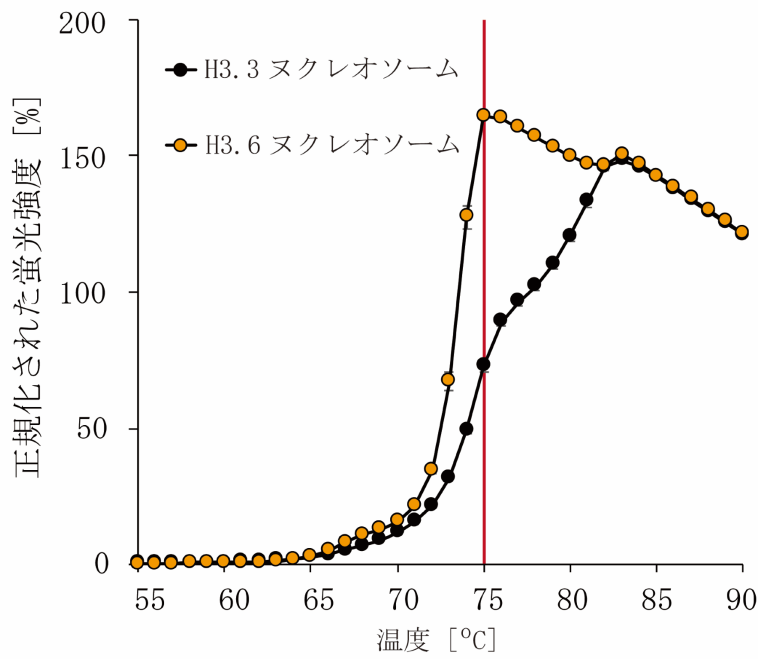


図 20 新規ヒストンバリエントを含むヌクレオソームの再構成

H3.3、H3.6、H3.8ヌクレオソームを再構成し、Prep Cellにより精製した。精製したヌクレオソームを6%非変性PAGE (A)と18%SDS-PAGE (B)で解析した。非変性PAGEはEtBrでDNAを、SDS-PAGEはCBBでタンパク質をそれぞれ染色した。(Taguchi *et al.*, 2017)のFig.4より引用、改変した)

(A)



(B)

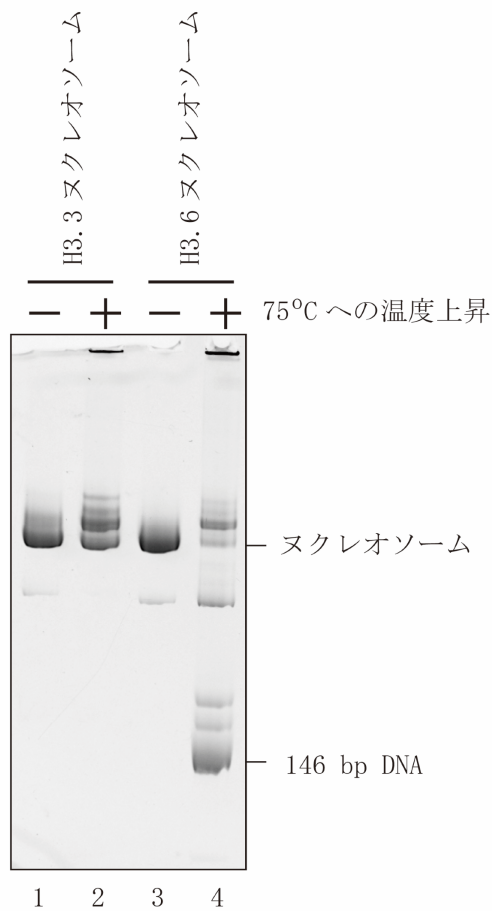


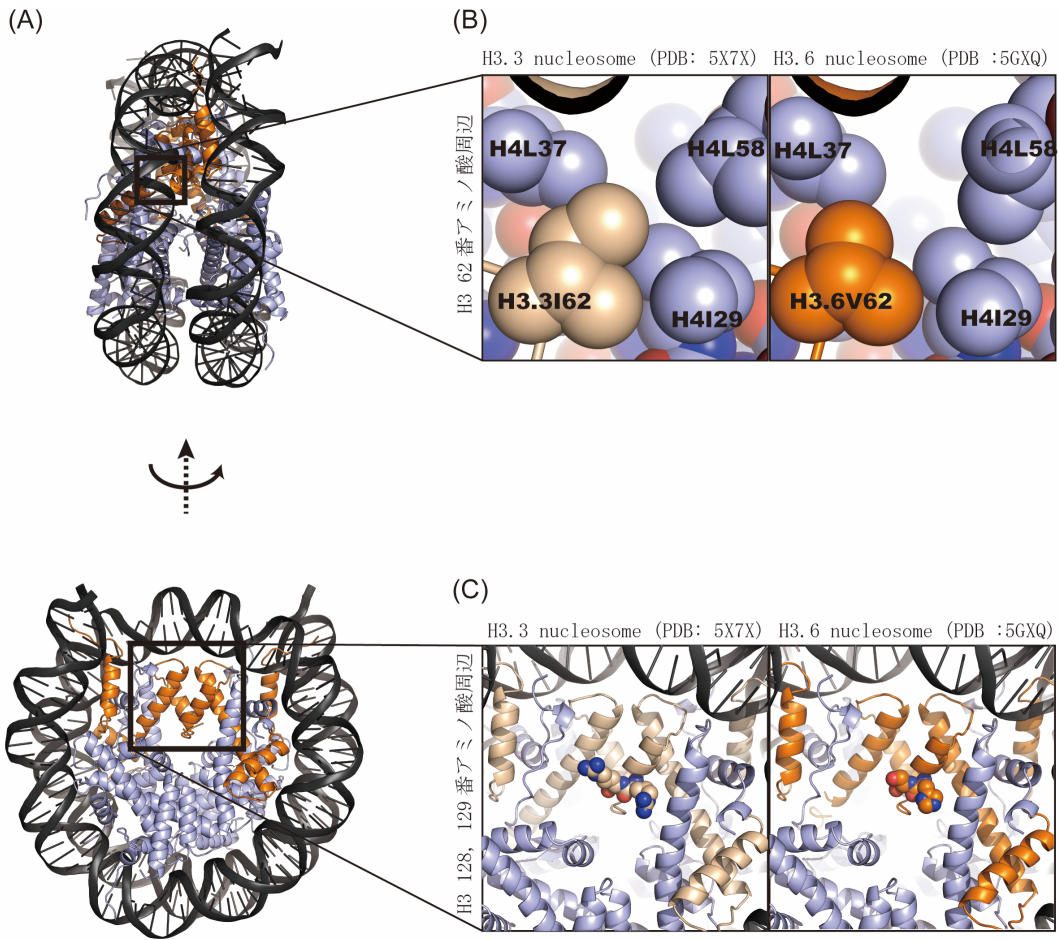
図 21 H3.6 ヌクレオソームの熱安定性試験

(A) H3.6 ヌクレオソームの熱安定性試験の結果。橙丸は H3.6 ヌクレオソーム、黒丸は H3.3 ヌクレオソームを示す。各種ヌクレオソームは 3 回ずつ試験した。出力結果は正規化し、その平均と標準偏差を作図した。赤線は 75°C の目盛を示している。(B) 75°C まで温度を上昇させた H3.3、H3.6 ヌクレオソーム を 6% 非変性 PAGE で解析した結果。EtBr で DNA を染色した。((Taguchi *et al.*, 2017) の Fig. 5 より引用、改変した)

#### 4-5 H3.6ヌクレオソームの構造解析

H3.6ヌクレオソームの熱安定性試験の結果、H3.3ヌクレオソームに比べ、H3.6ヌクレオソームは不安定な構造体であることがわかった。この詳細な分子機構を明らかにするため、X線結晶構造解析を行い、H3.6ヌクレオソームの立体構造の決定を行った。2-10の方法で結晶化を行った。ハンギングドロップ蒸気拡散法でH3.6ヌクレオソームの結晶を得た。得られた結晶を用いてX線回折実験で回折データを収集した。収集したデータは2-11の方法で解析した。収集データからH3.6ヌクレオソームの立体構造を2.85Åの分解能で決定した(PDB: 5GXQ) (図22A、表7)。

H3.6ヌクレオソームはH3.3ヌクレオソーム(PDB: 5X7X)と構造比較した。まず、H3の62番目周辺のアミノ酸を比較した結果、H3の62番目周辺のアミノ酸とH4は疎水性相互作用を生じ得ることが考えられた(図22B)。H3.3ではイソロイシンだが、H3.6はバリンである。H3.3の62番目周辺とH4の接触面積は174.8Å<sup>2</sup>である(図22)。一方H3.6の62番目周辺とH4の接触面積は153.2Å<sup>2</sup>である(図22)。イソロイシンからバリンへのアミノ酸置換が起きると、側鎖が短くなり、H4の疎水性アミノ酸とH3の接触面積が少なくなるため、疎水性相互作用が弱くなると考えられる。その結果H3-H4間が不安定になるため、H2A-H2BのDNA解離とともにH3.6ヌクレオソームはH3-H4もDNAから解離すると想定される。次にH3の128、129番目周辺のアミノ酸を比較した。その結果、他のヒストンタンパク質と相互作用する部位はなく、ヌクレオソームの表面に露出している領域であることがわかった(図22C)。以上の結果から、H3.6ヌクレオソームを不安定な構造にする責任残基はH3.6Val162であることが示唆された。



## 図 22 H3.6 ヌクレオソームの構造解析

(A) H3.6 ヌクレオソームの全体構造 (PDB: 5GXQ)。上図を縦軸に対し  $90^\circ$  回転した構造が下図。上下図の黒枠は H3.6 特異的なアミノ酸周辺位置を示す。ヒストン H3.6 はオレンジ、その他ヒストンは紫、DNA はグレイで示した。アミノ酸、DNA はリボン表示とした。(B) H3 の 62 番目周辺を拡大した結果。H3.3 ヌクレオソーム (PDB: 5X7X) 及び H3.6 ヌクレオソーム (PDB: 5GXQ) をそれぞれ示す。ヒストン H3.3 は薄茶、ヒストン H3.6 はオレンジ、ヒストン H4 は紫で色付けした。アミノ酸は球状表示とした。(C) H3 の 128、129 番目周辺をクローズアップした結果。H3.3 ヌクレオソーム (PDB: 5X7X) 及び H3.6 ヌクレオソーム (PDB: 5GXQ) をそれぞれ示す。ヒストン H3.3 は薄茶、ヒストン H3.6 はオレンジ、ヒストン H4 は紫、DNA をグレイで色付けした。128、129 番目のアミノ酸を球状表示、他のアミノ酸、DNA をリボン表示とした。すべての図は PyMOL で出力し、Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems) で作図した。((Taguchi *et al.*, 2017) の Fig. 7 より引用、改変した)

表7 H3.6ヌクレオソーム構造の統計値

H3.6ヌクレオソーム	
<b>Data Collection</b>	
空間群	$P2_12_12_1$
格子定数	
	a = 106.026
a, b, c (Å)	b = 109.764
	c = 181.400
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90$
分解能 (Å)	50.00 - 2.85 (2.95 - 2.85)
Reflections (Unique)	50454
Rmerge (%)	8.4 (46.4)
シグナル強度比 $I/\sigma I$	13.5 (6.8)
Completeness (%)	99.6 (100)
Redundancy	5.9 (5.9)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	38.13 - 2.85
Rwork/free (%)	21.91 / 26.18
温度因子 B-factors (Å <sup>2</sup> )	
Protein	44.63
DNA	96.37
R. M. S Deviations	
Bond Length (Å)	0.010
Bond Angles (°)	1.147
Ramachandran Plot	
Residues in favorable resions (%)	97.30
Residues in allowed regions (%)	2.70
PDB code	<b>5GXQ</b>

#### 4-6 変異体解析

H3.6ヌクレオソームの構造解析から、62番目のアミノ酸が構造安定性に寄与することが示唆された。この考えを検証するため、変異体ヒストンを精製し、生化学的解析を行った。

H3.3の62、128、129番目はそれぞれイソロイシン、アルギニン、アルギニンである。一方、H3.6はそれぞれバリン、ヒスチジン、セリンに置換されている。そこで、点変異体 H3.3I62V、H3.3 R128H R129S を用いて変異体解析を行った。点変異体ヒストンのプラスミドは site-directed mutagenesis 法で作製した。変異体ヒストンは通常のヒストンと同様の手法で精製し、ヌクレオソームを再構成・精製した (2-2、2-4、2-7)。

再構成・精製した変異体ヌクレオソームを用いて熱安定性試験を行った (2-8)。その結果、H3.3 R128H、R129SヌクレオソームはH3.3ヌクレオソームと、H3.3 I62VヌクレオソームはH3.6ヌクレオソームとそれぞれ熱安定性試験の蛍光プロファイルが一致する (図 23)。つまり 62番目のバリンが H3.6ヌクレオソームの構造安定性に起因する責任残基であることが、変異体解析で明らかとなった。



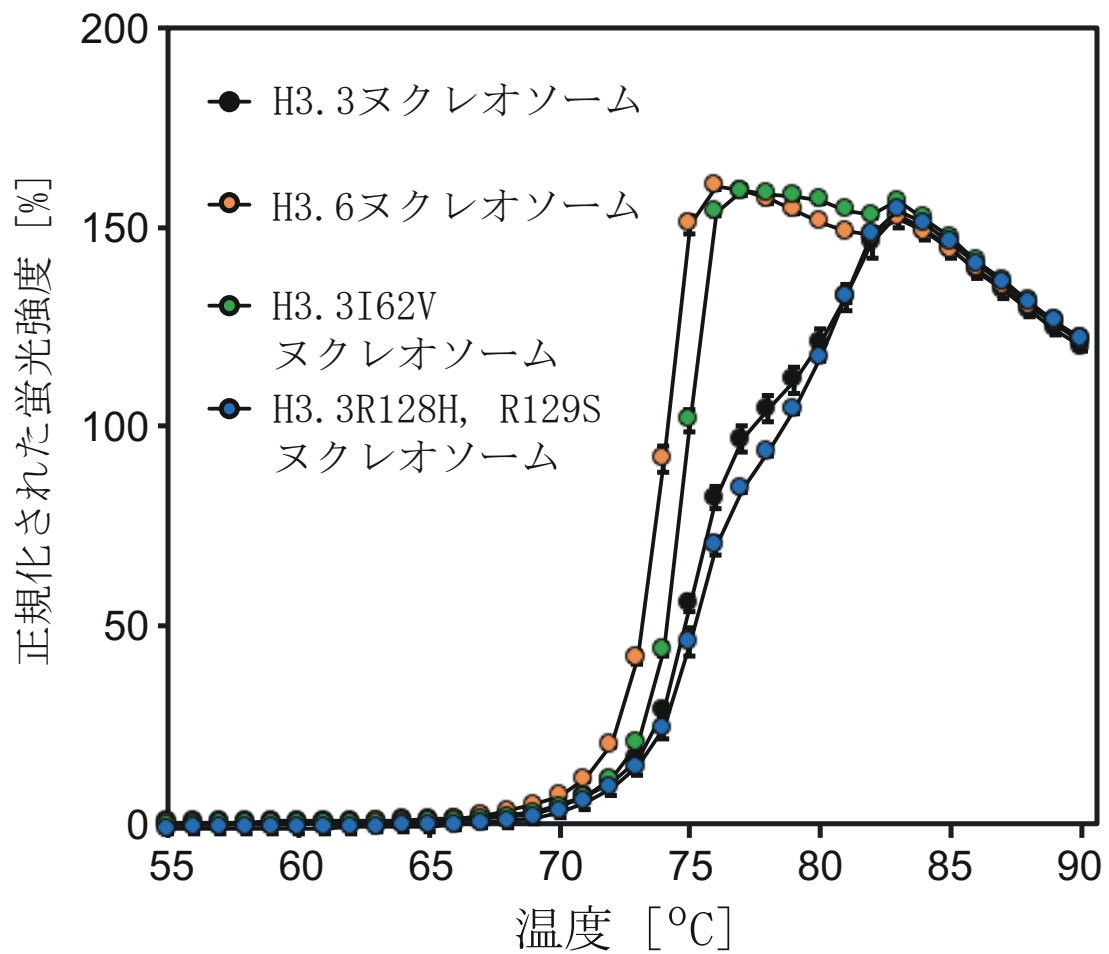


図 23 変異体ヌクレオソームの熱安定性試験

H3.3 I62V ヌクレオソーム、H3.3 R128H R129S ヌクレオソームによる熱安定性試験の結果。黒丸は H3.3 ヌクレオソーム、橙丸は H3.6 ヌクレオソーム、緑丸は H3.3 I62V ヌクレオソーム、青丸は H3.3 R128H R129S ヌクレオソームである。各ヌクレオソームは 3 回ずつ実験した。出力結果を正規化した後、その平均と標準偏差を作図した。((Taguchi *et al.*, 2017) の Fig. 8 より引用、改変した)

## 第5章 総合討論

### 5-1 熱安定性試験法の確立

DNA の遺伝子発現はエピジェネティックに制御される (Allis *et al.*, 2007)。エピジェネティックな制御機構とは、化学修飾や特殊なヒストンタンパク質をはじめとしたエピジェネティックマークが付加された多様なヌクレオソームによって様々な構造的特徴を有するクロマチンが形成され、転写や複製、修復など DNA 代謝が制御されることである (Allis *et al.*, 2007, Rhee *et al.*, 2014)。つまり、エピジェネティックな制御機構の理解には多様なヌクレオソームの性状解析が必要である。

本博士論文では多様なヌクレオソームの性質を知るため、SYPRO Orange を用いた熱安定性試験法を確立した。SYPRO Orange は DNA に結合せず、疎水性アミノ酸に結合し、蛍光を発する性質を持つ (Steinberg *et al.*, 1996)。本試験法はヌクレオソームと SYPRO Orange の混合溶液の温度を RT-PCR 装置で上昇させる。温度上昇に伴い、DNA から解離、変性したヒストンの疎水性アミノ酸に SYPRO Orange が結合し、発する蛍光を RT-PCR 装置で定量する (Lo *et al.*, 2004)。

ヌクレオソームの熱安定性試験から、ヌクレオソーム中の H2A-H2B、H3-H4 がそれぞれ段階的に DNA から解離することがわかった (図 10-13)。先行研究で温度上昇に伴うヌクレオソームの構造変化はクロマチンリモデリング因子によるヌクレオソームの構造変換と一致することが示されている (Flaus *et al.*, 2003)。そこで本博士論文で得られた熱によるヌクレオソームの崩壊機序から、生体内でヌクレオソーム中のヒストンがどのように脱落するのか、考察した (図 14)。熱安定性試験の結果、H2A-H2B は H3-H4 より DNA から解離しやすい (図 9, 14)。

先行研究で複製、転写の前後でヌクレオソームの位置が変わらないことが報告されている (Eaton *et al.*, 2010, Cole *et al.*, 2014)。このことから、複製、転写において、H3-H4 がヌクレオソームの位置を定める中心的役割を担っていると考えられる。ヌクレオソームの位置によって遺伝子の発現量は変化する (Harada *et al.*, 2015)。今後は 1 塩基分解能でのヌクレオソームの正確な位置情報の取得を行い、H3-H4 がヌクレオソームの位置にどのように寄与するか、詳細に解析することが求められる。

さらに、本博士論文はヌクレオソーム単独で熱安定性試験を行ったが、生体内では、ヌクレオソームの形成と解離はヒストンシャペロンやクロマチン結合因子を介して行われる (Venkatesh *et al.*, 2015)。今後、ヒストンシャペロンやクロマチン結合因子を加えたヌクレオソームの安定性を評価していくことが求められる。例えばヒストンシャペロンはヌクレオソーム中のヒストンを交換するだけでなく、H2A-H2B が 1、2 分子抜けたヘキサソームやテトラソーム中にヒストンを導入できる (Venkatesh *et al.*, 2015, Tsunaka *et al.*, 2016)。本博士論文で確立した熱安定性試験は熱によって一部崩壊したヌクレオソームやヘキサソーム、テトラソームを温度毎に精製できる (図 11-13)。これらの知見を踏まえ、今後、温度を上昇させたヌクレオソームを精製し、ヒストンシャペロンを用いることで、どのようにヒストンが導入されるのかそのダイナミクスを明らかにできるかもしれない。

温度上昇に伴うヌクレオソームの構造変化はクロマチンリモデリング因子によるヌクレオソームの構造変換と一致することが示されており、熱試験は有用なヌクレオソーム解析手法である (Flaus *et al.*, 2003)。一方、温度上昇によ

って構造変化したヌクレオソームは、再度、低温条件にしても元の構造に戻らないことがわかった (図 11)。このことから温度上昇させたヌクレオソームの崩壊は不可逆な反応であることが示唆される。クロマチンリモデリング因子によるヌクレオソームの構造変換は可逆的であるため、熱による構造変換機構はクロマチンリモデリング因子による構造変換と厳密には異なることに留意する必要がある (Peterson *et al.*, 2000)。熱による構造変換機構が不可逆な反応の原因として、熱によってヌクレオソームが構造変化するだけでなく、ヒストンタンパク質の一部が変性すると考えられる。今後はタンパク質の変性を抑えるため、低温でもヌクレオソームが構造変化する条件を検討し、よりクロマチンリモデリング反応に近い試験法の確立が期待される。

また、熱安定性試験では DNA からヒストンタンパク質がどの順に解離するかは明らかになったが、どのように解離していくのか、その詳細なダイナミクスは不明である。先述した熱による崩壊途中のヌクレオソームを用いてフットプリント法を行うと DNA とヒストン間の相互作用領域を詳細にマッピングすることができるかと期待される。このような手法よりヌクレオソーム中のヒストンがどのように崩壊するのか、詳細なダイナミクスを知ることができるかもしれない。

## 5-2 熱安定性試験によるヌクレオソーム構造安定性の評価

本項では様々な条件で行った熱安定性試験について考察する。まず、異なる塩化ナトリウム条件下において熱安定性試験を行った結果、塩化ナトリウム濃度の上昇に伴い、H2A-H2B と DNA 間の相互作用が弱まり、H3-H4 と DNA 間の相互

作用は強まることがわかった (図 15、表 6)。このことから、H2A-H2B と DNA の結合はイオン相互作用が中心的役割を担っており、H3-H4 と DNA の結合は疎水性相互作用によって成り立っていると考えられる。中心的な相互作用の種類が異なることは、ヌクレオソームが段階的に崩壊するために必要な性質なのかもしれない。

次にヒストンバリエントを含む H3T ヌクレオソームについて考察した。ヒストンバリエント H3T を含むヌクレオソームの熱安定性試験を行った結果、主要型ヌクレオソームに比べ、著しく不安定な構造であることが明らかとなった (図 16A)。先行研究で H3T ヌクレオソームは主要型ヌクレオソームに比べ、著しく不安定な構造体であると報告されており、熱安定性試験の結果と先行研究は一致している (Tachiwana *et al.*, 2010)。熱安定性試験における H3T ヌクレオソームは主要型ヌクレオソームと比べ、2nd 蛍光ピークが低い温度に位置している。つまり、H3T-H4 と DNA の解離温度が低いため、ヌクレオソーム全体の構造が不安定になったと推察できる。このことは H3-H4 と DNA の結合がヌクレオソーム全体の構造安定性と相関していることを示唆している。実際、H3 と DNA の安定性に重要だと報告されている N 末端にアミノ酸置換を持つ CENP-A を含むヌクレオソームは主要型ヌクレオソームに比べ、不安定な構造体を形成する (Arimura *et al.*, 2015, Kono *et al.*, 2016)。本博士論文で得られた知見から、H3-H4 はヌクレオソーム全体の安定性に影響を及ぼす、土台のような役割を担っていると考えられる。H3-H4 は転写伸長反応前後では脱落しないが、H3 に付加される翻訳後修飾や導入されるヒストン H3 バリエントの一部は転写活性化の役割を持つ。つまり H3-H4 はクロマチン上に存在しながら転写を活性化させる独自の機

能を有していることが示唆される。今後、H3-H4 がどのようにヌクレオソーム全体の安定性に影響を及ぼし、転写伸長反応に寄与するのか詳細に解析する必要がある。

次にヒストンバリエント H2A. B を含むヌクレオソームの熱安定性試験について考察する。H2A. B は転写、修復、複製などが起きる DNA 領域に一過的に集積することが知られている (Arimura *et al.*, 2013)。FRAP 解析によって H2A. B は細胞内で高いモビリティであると知られており、その原因は H2A. B ヌクレオソームの構造不安定性によるものだと考えられていた (Gautier *et al.*, 2004)。しかし、本博士論文で得られた知見で H2A. B ヌクレオソームはむしろ主要型ヌクレオソームに比べ、安定的な構造体を形成することがわかった (図 16B, C)。つまり、H2A. B のモビリティの高さは別のメカニズムによってなされていると考えられる。例えばヒストンのクロマチン導入、除去に関与するヒストンシャペロンの作用機序の違いによってヒストンのモビリティは変化する。これらのことから H2A. B は独自のヒストンシャペロンとの作用機序によるものではないかと推察される。本博士論文で得られた知見を踏まえ、今後、細胞内での H2A. B の詳細な解析が期待される。

### 5-3 新規ヒトヒストンバリエントの試験管内再構成解析

ヒストンバリエントはヌクレオソームに取り込まれることで、特徴的なクロマチンを形成し、DNA 代謝に寄与する。近年、新規ヒトヒストンバリエント H3. 6、H3. 7、H3. 8 が発見された (Maehara *et al.*, 2015)。これらのヒストンバリエントは細胞内に豊富に存在する主要型ヒストン H3. 1 やヒストンバリエント H3. 3

とアミノ酸相同性が高い (87-98%、図 17)。しかしアミノ酸相同性が高くてもヒストンバリエーションの機能は他のヒストンと異なることが想定される。例えば H3.3 は主要型ヒストン H3.1 と比較すると、135 アミノ酸中僅か 5 アミノ酸のみ異なるアミノ酸相同性の高いヒストンバリエーションである。しかし H3.1 は複製依存的にクロマチンに取り込まれるのに対し、H3.3 は複製非依存的にクロマチンに取り込まれ、それぞれ異なるクロマチン導入経路 (複製非依存的) を持つことが知られている (Lewis *et al.*, 2010)。実際 H3.3 は H3.1 より優位にテロメア領域やペリセントロメア領域に局在することが知られている (Lewis *et al.*, 2010, Wong *et al.*, 2010)。加えて H3.3 は転写活性化領域に局在することがわかっており、H3.3 の過剰発現は転写伸長反応に寄与すると報告されている (Chow *et al.*, 2005)。このようにヒストンバリエーションはアミノ酸相同性が高くても、細胞内では全く異なる機能を有する。つまり H3.6、H3.7、H3.8 は H3.3 とアミノ酸相同性は高いが、独自の機能を有することが考えられる。

今まで、九州大学の太田恭行先生らのグループと共に、H3.6、H3.7、H3.8 が生体内で発現しているか調べた。まず、九州大学の太田恭行先生らのグループは mRNA-seq を行った。mRNA-seq の結果、H3.6、H3.7、H3.8 共に転写されていることがわかった (Taguchi *et al.*, 2017)。次に九州大学の太田恭行先生らのグループと共に各ヒストンバリエーション特異的に認識する抗体を作製した (図 24)。この抗体を用いて九州大学の太田恭行先生らのグループはヒト組織を用いた免疫染色を行った。その結果、H3.6、H3.7 はヒト組織上で発現が確認された (Taguchi *et al.*, 2017)。H3.8 ははっきりと検出されなかった。mRNA-seq でも H3.8 は低い転写量であるため、H3.8 ヒストンタンパク質の発現量が著しく低

く、ほとんど検出されていない可能性がある。

これらのヒストンバリエーションの機能解析を行うため、試験管内での再構成を試みた。

H3.7 はヒストンタンパク質とアミノ酸相同性が高い (97%) が、従来法でヒストン複合体及びヌクレオソームが形成されないとわかった (図 19)。H3.7 が複合体を形成できない原因を特定するため、H3.7 ヌクレオソームのモデル構造を COOT、PyMOL で作成し、H3.3 ヌクレオソームと比較した。その結果、H3.7Arg96 の側鎖が H4 に対し物理的に衝突しうることがわかった (図 25)。本モデルから H3.7 は H4 と複合体を形成できない理由の一つであると考えられる。このことから、H3.7 の機能は H4 以外のクロマチン結合因子と複合体を形成し、クロマチンに取り込まれることが考えられる。H3、H4、H2A、H2B はともにヒストンフォールドドメインと呼ばれる、 $\alpha$ -helix によって構成される二次構造を持つ。H3-H4、H2A-H2B 複合体はそれぞれヒストンフォールドドメイン同士が相互作用することで複合体を形成する。しかし 4 種類のヒストンタンパク質以外にも基本転写因子 TFIID のサブユニットである TAF4、TAF6、TAF9、TAF12 やセントロメア領域に集積しているタンパク質、CENP-T、CENP-W、CENP-S、CENP-X など、ヒストンフォールドドメインを持つタンパク質は存在する (Xie *et al.*, 1996, Nishino *et al.*, 2012)。H3.7 はヒストンフォールドドメインを持つタンパク質と複合体を形成し、クロマチンに取り込まれるかもしれない。

H3.8 はヌクレオソーム形成されることがわかったが、ヌクレオソームの他にサブヌクレオソームと考えられる産物が生じている (図 20A レーン 4)。H3.8 ヌクレオソームにサブヌクレオソームが含まれた原因として H3.8 ヌクレオソーム



が著しく不安定な構造体であるため、非変性 PAGE で H3.8 ヌクレオソームが部分的に崩壊し、サブヌクレオソームが形成されたと考えられる。実際に H3.8 ヌクレオソームの熱安定性試験を行った結果、H3.3 ヌクレオソームに比べ、構造安定性が著しく不安定であることがわかった (図 26)。サブヌクレオソームはクロマチンリモデリング領域や転写領域などクロマチン結合因子が集積する領域に局在すると考えられている (Rhee *et al.*, 2014)。また、H3.8 は N 末端テイルに特異的なアミノ酸置換が多い (図 16)。ヒストンタンパク質の N 末端テイル領域は特定の構造を持たず、フレキシブルである。H3 テイルは翻訳後修飾を受け、ヌクレオソームの性質に影響を与える。例えば H3 の 4 番目リジンのトリメチル化はユークロマチンのエピジェネティックマークであり、転写を促進することが知られている (Bernstein *et al.*, 2006, Shi *et al.*, 2006)。さらに H3 の 14 番目リジンのアセチル化は転写活性化に寄与する (Johnsson *et al.*, 2009)。一方、H3.8 の 4 番目、14 番目はアルギニン、イソロイシンに置換されており、化学修飾をほとんど受けない。つまり H3.8 が取り込まれたクロマチンはユークロマチンになりにくく、転写抑制的なクロマチンになると考えられる。以上のように H3.8 はクロマチンリモデリングされやすい領域に集積し、特徴的な翻訳後修飾パターンを持つことが想定される。今後、H3.8 の翻訳後修飾や、クロマチンリモデリング因子との関係を詳細に解析することが期待される。

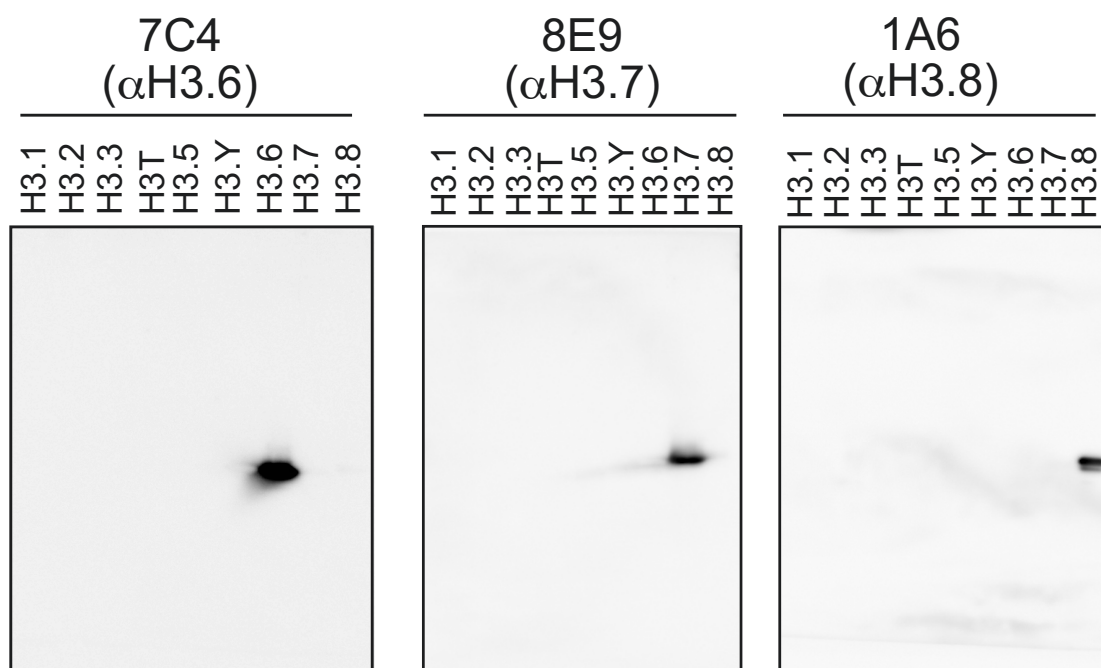


図 24 新規ヒストンバリエーション特異的に認識する抗体の評価

精製した各種 H3 ヒストンタンパク質を 16% SDS-PAGE で解析した。その後 $\alpha$ -H3.6 抗体(左パネル)、 $\alpha$ -H3.7 抗体(中央パネル)、 $\alpha$ -H3.8 抗体(右パネル)それぞれの抗体を用いてウェスタンブロット解析した。((Taguchi *et al.*, 2017) の Figure2A より引用)

(A) H3.3ヌクレオソーム

(B) H3.7ヌクレオソーム

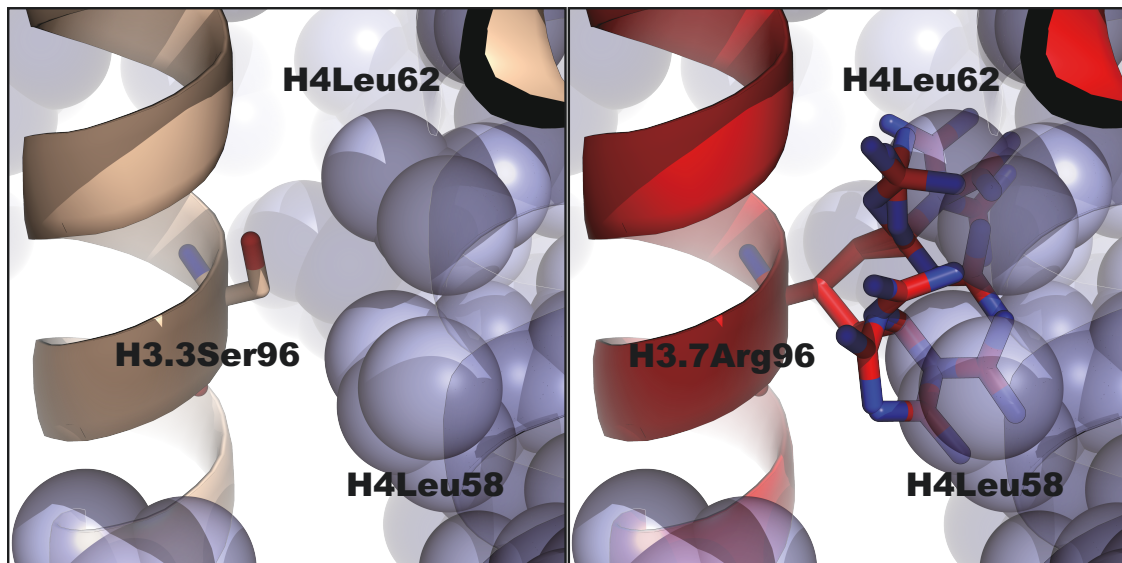


図 25 H3.7ヌクレオソームモデル

(A) H3.3ヌクレオソーム (5X7X) の96番目周辺のアミノ酸を拡大した図。薄茶がH3.3、紫が他のヒストンを示している。(B) H3.7のアミノ酸を置換したH3.7ヌクレオソームのモデル構造 (初期モデル:5X7X) の96番目周辺のアミノ酸を拡大した図。赤がH3.7、紫が他のヒストンを示している。H3.7Arg96はソフトウェアCOOTで側鎖が取り得る全ての構造を示している。全ての図はPyMOLで作成した。((Taguchi *et al.*, 2017)のSupplementary Figureより引用、改変した)

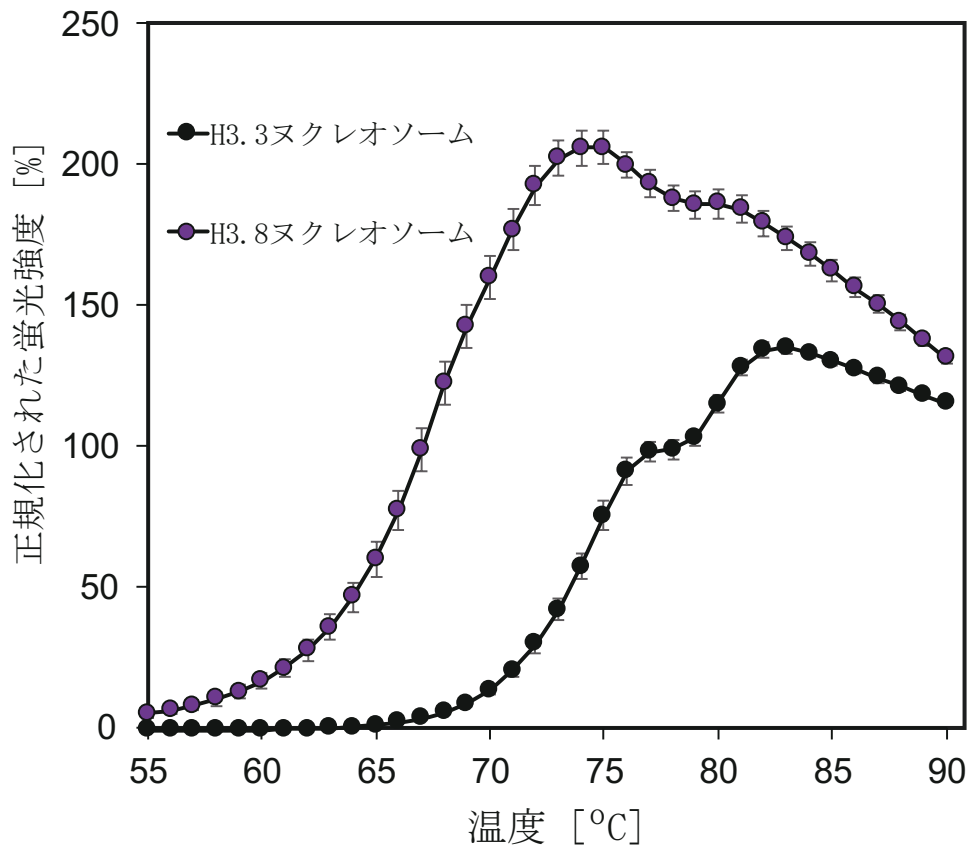


図 26 H3.8ヌクレオソームの熱安定性解析

H3.3ヌクレオソームとH3.8ヌクレオソームの熱安定性解析の結果。紫丸はH3.8ヌクレオソーム、黒丸はH3.3ヌクレオソームである。各種3回実験し、正規化した後、その平均と標準偏差を作図した。(Taguchi *et al.*, 2017) の Fig.5 より引用、改変した)

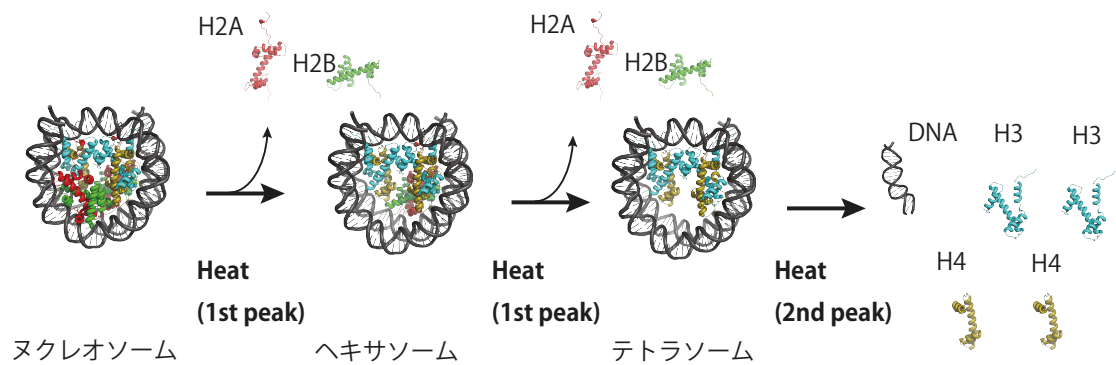
#### 5-4 H3.6 を含むヌクレオソームの生化学的、構造生物学的解析

新規ヒストンバリエント H3.6 を含むヌクレオソームは H3.3 ヌクレオソームと似た構造である。しかし H3.3 ヌクレオソームと全く異なる崩壊機序を有することがわかった (図 27)。H3.6 はヘキサソーム構造をほとんど維持できないことが示唆された (図 26)。近年、転写反応はヌクレオソームの脱落ではなく、ヘキサソームをはじめとしたサブヌクレオソームの形成によってなされることがわかってきた (Cole *et al.*, 2014)。そのため、ヘキサソームを形成できない H3.6 ヌクレオソームは一般的な転写反応ではなく、特殊な状況下の転写反応に寄与すると考えられる。例えばヒートショック応答に関する遺伝子周辺では、一般的なヌクレオソームを維持する転写反応機構ではなく、ヒストンが DNA から全て脱落する特殊な転写反応であることが示唆されている (Tsukiyama *et al.*, 1994)。このような特殊な転写反応が起こる遺伝子上に H3.6 は集積しているのかもしれない。今後、H3.6 がクロマチン中でどのような局在になるか解析し、転写制御機構における H3.6 の役割の解明が期待される。

H3.6 は 128、129 番目にも特徴的なアミノ酸置換を有する。H3 の 128、129 番目はヌクレオソームの表面に位置しており、他のヒストンタンパク質と直接相互作用していない (図 22C)。しかし他のクロマチン結合因子との相互作用に関わるのではないかと考えられる。例えば H3Arg129 はヒストンシャペロン Asf1/CIA との相互作用に重要な領域であると報告されている (Natsume *et al.*, 2007)。ヒストンシャペロンはヒストンタンパク質のクロマチンへの導入や脱落を手助けするタンパク質である。H3.6 の 129 番目はセリンであるため、H3.6 は H3.3 と比べ、Asf1/CIA と相互作用しにくいことが示唆される。そのため、H3.6

はH3.3と異なるクロマチン導入経路を持つ可能性がある。今後、H3.6ほどのヒストンシャペロンを介してクロマチンに導入され、機能するのか、明らかにすることが期待される。

主要型ヌクレオソームの崩壊機序



H3.6 ヌクレオソームの崩壊機序

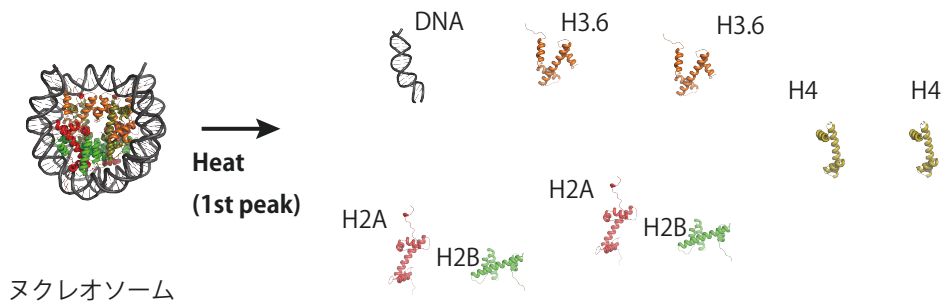


図 27 H3.6 ヌクレオソームの崩壊機序モデル

熱安定性試験から得られた主要型ヌクレオソーム（上段）と H3.6 ヌクレオソーム（下段）の崩壊機序モデル、PyMOL で作成し、Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems) で作図した。

## 5-5 今後の展望

本博士論文ではヌクレオソーム構造安定性を測定する熱安定性試験を確立し、新規ヒストンバリエントを含むヌクレオソームの機能解析を行った。

確立した熱安定性試験は様々な化学修飾や特殊なヒストンバリエントを有する多様なヌクレオソームの熱安定性を測定できる。本博士論文ではヒストンバリエントを含むヌクレオソームのみ実験を行ったが、現在までに翻訳後修飾やDNAメチル化を含むヌクレオソーム、別の生物種のヒストンを含むヌクレオソーム、変異体ヒストンを含むヌクレオソームなど、多様なヌクレオソームが熱安定性試験で評価可能であると報告されている (Iwasaki *et al.*, 2013, Arimura *et al.*, 2014, Osakabe *et al.*, 2015, Wakamori *et al.*, 2015, Horikoshi *et al.*, 2016, Kujirai *et al.*, 2016, Machida *et al.*, 2016, Urahama *et al.*, 2016, Koyama *et al.*, 2017, Kujirai *et al.*, 2017, Sueoka *et al.*, 2017, Ueda *et al.*, 2017)。近年、複数のエピジェネティックマークを有するヌクレオソームが報告されているため、今後はその解析に熱安定性試験が用いられることが期待される。例えばヒストンバリエント H3.3 と H2A.Z を含むヌクレオソームは転写開始点周辺のクロマチンに共局在している (Jin *et al.*, 2009)。このように複数のエピジェネティックマークが付加されたヌクレオソームは蛍光ラベルを付加するヌクレオソームなど、複数種類のヌクレオソームを精製することが困難である。しかし熱安定性試験は蛍光ラベルや特殊なタグなど付加されていない native なサンプルを用いる。このようなサンプルはゲル解析や分光解析など、複数の解析を同じサンプルで行うことができるため、高い汎用性を持つ。これらの事実を踏まえ、熱安定性試験は今後、フットプリント法やゲル解析、一分



子解析などを併用して解析することができると期待される。さらに複数の蛍光色素を用いることで多波長解析を行い、複数のタンパク質や DNA との動態を観察することができるかもしれない。また、SYPRO Orange が結合しない化合物などを用いたヌクレオソームの安定性解析や、ヌクレオソームと相互作用する化合物の探索にも熱安定性試験は応用できると期待される。

さらに熱安定性試験は H2A-H2B と H3-H4 の安定性を独立して観察することができる (図 9)。近年ヌクレオソーム中の H2A-H2B の脱落が転写に重要であるとわかってきた (Venkatesh *et al.*, 2015)。熱安定性試験ではヌクレオソーム中の H2A-H2B の動態の観察に適している可能性がある。

現在報告されている H3 バリエント H3T や CENP-A はコードしている遺伝子の欠失で雄性不妊や胎生致死など重篤な表現系を示す (Howman *et al.*, 2010, Ueda *et al.*, 2017)。つまり、H3 のヒストンバリエントはヌクレオソームに導入され、エピジェネティックにクロマチンを制御することで個体の表現系に影響を与える重要なタンパク質であると考えられる。本博士論文で解析した新規ヒトヒストンバリエント H3.6、H3.7、H3.8 は既知のヒストンバリエント H3.3 と高いアミノ酸相同性を有していたが、その性質は H3.3 と全く異なる独自の役割を持つことが明らかとなった (図 17)。これらの性質について、細胞内で実際にどのように寄与しているのか、解析が期待される。

## 引用文献

Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 213–221.

Ahmad K, Henikoff S. (2002) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell*, **9**, 1191–200.

Allis D, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML. EPIGENETICS, Cold Spring Harbor Laboratory PRESS, 2007.

Arimura Y, Tachiwana H, Oda T, Sato M, Kurumizaka H. (2012) Structural analysis of the hexasome, lacking one histone H2A/H2B dimer from the conventional nucleosome. *Biochemistry*, **51**, 3302–3309.

Arimura Y, Kimura H, Oda T, Sato K, Osakabe A, Tachiwana H, Sato Y, Kinugasa Y, Ikura T, Sugiyama M, Sato M, Kurumizaka H. (2013) Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. *Sci. Rep.*, **3**, 3510.

Arimura Y, Shirayama K, Horikoshi N, Fujita R, Taguchi H, Kagawa W, Fukagawa T, Almouzni G, Kurumizaka H. (2014) Crystal structure and stable property of the cancer-associated heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3. *Sci. Rep.*, **4**, 7115.

Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, **125**, 315–326.

Bina M, Sturtevant JM, Stein A. (1980) Stability of DNA in nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **7**, 4044-4047.

Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D. (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*, **40**, 91-99.

Bönisch C, Hake SB. (2012) Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10719-10741.

Cartwright IL, Elgin SC. (1986) Nucleosomal instability and induction of new upstream protein-DNA associations accompany activation of four small heat shock protein genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 779-791.

Chen H, Li B, Workman JL. (1994) A histone-binding protein, nucleoplasmin, stimulates transcription factor binding to nucleosomes and factor-induced nucleosome disassembly. *EMBO J.*, **13**, 380-390.

Chow CM, Georgiou A, Szutorisz H, Maiae Silva A, Pombo A, Barahona I, Dargelos E, Canzonetta C, Dillon N. (2005) Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep.*, **6**, 354-360.

Choy JS, Wei S, Lee JY, Tan S, Chu S, Lee TH. (2010) DNA methylation increases nucleosome compaction and rigidity. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1782-1783.

Cole HA, Ocampo J, Iben JR, Chereji RV, Clark DJ. (2014) Heavy transcription of yeast genes correlates with differential loss of histone H2B relative to H4 and queued RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12512-12522.

Costanzi C, Pehrson JR. (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, **393**, 599–601.

Costanzi C, Pehrson JR. (2001) MACROH2A2, a new member of the MARCOH2A core histone family. *J. Biol. Chem.*, **276**, 21776–21784.

Costas C, de la Paz Sanchez M, Stroud H, Yu Y, Oliveros JC, Feng S, Benguria A, López-Vidriero I, Zhang X, Solano R, Jacobsen SE, Gutierrez C. (2011) Genome-wide mapping of Arabidopsis thaliana origins of DNA replication and their associated epigenetic marks. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 395–400.

Daujat S, Weiss T, Mohn F, Lange UC, Ziegler-Birling C, Zeissler U, Lappe M, Schübeler D, Torres-Padilla ME, Schneider R. (2009) H3K64 trimethylation marks heterochromatin and is dynamically remodeled during developmental reprogramming. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 777–781.

Di Cerbo V, Mohn F, Ryan DP, Montellier E, Kacem S, Tropberger P, Kallis E, Holzner M, Hoerner L, Feldmann A, Richter FM, Bannister AJ, Mittler G, Michaelis J, Khochbin S, Feil R, Schuebeler D, Owen-Hughes T, Daujat S, Schneider R. (2014) Acetylation of histone H3 at lysine 64 regulates nucleosome dynamics and facilitates transcription. *Elife*, **3**, e01632.

Dyer PN, Edayathumangalam RS, White CL, Bao Y, Chakravarthy S, Muthurajan UM, Luger K. (2004) Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA. *Methods Enzymol.*, **375**, 23–44.

Eaton ML, Galani K, Kang S, Bell SP, MacAlpine DM. (2010) Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes Dev.*, **24**, 748–753.

Ederveen TH, Mandemaker IK, Logie C. (2011) The human histone H3 complement anno 2011. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1809**, 577–586.

- Emsley P, Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2126–2132.
- Fang J, Liu Y, Wei Y, Deng W, Yu Z, Huang L, Teng Y, Yao T, You Q, Ruan H, Chen P, Xu RM, Li G. (2015) Structural transitions of centromeric chromatin regulate the cell cycle-dependent recruitment of CENP-N. *Genes Dev.*, **29**, 1058–1073.
- Flaus A, Owen-Hughes T. (2003) Dynamic properties of nucleosomes during thermal and ATP-driven mobilization. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 7767–7779.
- Fulmer AW, Fasman GD. (1979) Analysis of chromatin reconstitution. *Biochemistry*, **18**, 659–668.
- Gautier T, Abbott DW, Molla A, Verdel A, Ausio J, Dimitrov S. (2004) Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep.*, **5**, 715–720.
- Henikoff S. (1990) Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet.*, **6**, 422–426.
- Henikoff S, Ahmad K, Platero JS, van Steensel B. (2000) Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 716–721.
- Horikoshi N, Arimura Y, Taguchi H, Kurumizaka H. (2016) Crystal structures of heterotypic nucleosomes containing histones H2A.Z and H2A. *Open Biol.*, **6**, pii: 160127.
- Howman EV, Fowler KJ, Newson AJ, Redward S, MacDonald AC, Kalitsis P, Choo KH. (2000) Early disruption of centromeric chromatin organization in

centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 1148–1153.

Hug CB, Grimaldi AG, Kruse K, Vaquerizas JM. (2017) Chromatin Architecture Emerges during Zygotic Genome Activation Independent of Transcription. *Cell*, **169**, 216–228.

Inoue A, Zhang Y. (2014) Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly in mouse zygotes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 609–616.

Iwasaki W, Miya Y, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tachiwana H, Shibata T, Kagawa W, Kurumizaka H. (2013) Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio.*, **3**, 363–369.

Jackson JB, Rill RL. (1981) Circular dichroism, thermal denaturation, and deoxyribonuclease I digestion studies of nucleosomes highly enriched in high mobility group proteins HMG 1 and HMG 2. *Biochemistry*, **20**, 1042–1046.

Jimenez-Useche I, Yuan C. (2012) The effect of DNA CpG methylation on the dynamic conformation of a nucleosome. *Biophys J.*, **103**, 2502–2512.

Jimenez-Useche I, Ke J, Tian Y, Shim D, Howell SC, Qiu X, Yuan C. (2013) DNA methylation regulated nucleosome dynamics. *Sci. Rep.*, **3**, 2121.

Jin C, Zang C, Wei G, Cui K, Peng W, Zhao K, Felsenfeld G. (2009) H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.*, **41**, 941–945.

Johnsson A, Durand-Dubief M, Xue-Franzén Y, Rönnerblad M, Ekwall K, Wright A. (2009) HAT-HDAC interplay modulates global histone H3K14 acetylation in gene-coding regions during stress. *EMBO Rep.*, **10**, 1009–1014.

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

Kono H, Shirayama K, Arimura Y, Tachiwana H, Kurumizaka H. (2015) Two arginine residues suppress the flexibility of nucleosomal DNA in the canonical nucleosome core. *PLoS One.*, **10**, e0120635.

Koyama M, Nagakura W, Tanaka H, Kujirai T, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kurumizaka H. (2017) In vitro reconstitution and biochemical analyses of the *Schizosaccharomyces pombe* nucleosome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **482**, 896–901.

Kujirai T, Horikoshi N, Sato K, Maehara K, Machida S, Osakabe A, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. (2016) Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 3612.

Kujirai T, Horikoshi N, Xie Y, Taguchi H, Kurumizaka H. (2017) Identification of the amino acid residues responsible for stable nucleosome formation by histone H3.Y. *Nucleus*, **8**, 239–248.

Kurumizaka H, Wolffe AP. (1997) Six mutations of histone H3: influence on nucleosome core structure and function. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 6953–6969.

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

Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, Allis CD. (2010) Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc. Natl. Acad.*

*Sci. U S A*, **107**, 14075–14080.

Lo MC, Aulabaugh A, Jin G, Cowling R, Bard J, Malamas M, Ellestad G. (2004) Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Anal. Biochem.*, **332**, 153–159.

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251–260.

Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, Santos-Simarro F, Gilbert-Dussardier B, Wittler L, Borschiwer M, Haas SA, Osterwalder M, Franke M, Timmermann B, Hecht J, Spielmann M, Visel A, Mundlos S. (2015) Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*, **161**, 1012–1025.

Machida S, Sekine S, Nishiyama Y, Horikoshi N, Kurumizaka H. (2016) Structural and biochemical analyses of monoubiquitinated human histones H2B and H4. *Open Biol.*, **6**, pii: 160090.

Maehara K, Harada A, Sato Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kimura H, Ohkawa Y. (2015) Tissue-specific expression of histone H3 variants diversified after species separation. *Epigenetics Chromatin*, **8**, 35.

Menzen TA. (2014) Temperature-induced unfolding, aggregation, and interaction of therapeutic monoclonal antibodies. Dissertation, LMU München, Faculty of Chemistry and Pharmacy.

McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.*, **40**, 658–674.



Nishino T, Takeuchi K, Gascoigne KE, Suzuki A, Hori T, Oyama T, Morikawa K, Cheeseman IM, Fukagawa T. (2012) CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold. *Cell*, **148**, 487-501.

Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V. (2001) CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet.*, **17**, 520-527.

Ong MS, Vasudevan D, Davey CA. (2010) Divalent metal- and high mobility group N protein-dependent nucleosome stability and conformation. *J. Nucleic Acids.*, **143890**.

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

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

Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, Jarmuz A, Canzonetta C, Webster Z, Nesterova T, Cobb BS, Yokomori K, Dillon N, Aragon L, Fisher AG, Merckenschlager M. (2008) Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell*, **132**, 422-433.

Pehrson JR, Fried VA. (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science*, **257**, 1398-400.

Peterson CL, Workman JL. (2000) Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev.*, **10**, 187-192.

Poo H, Song JJ, Hong SP, Choi YH, Yun SW, Kim JH, Lee SC, Lee SG, Sung

MH. (2002) Novel high-level constitutive expression system, pHCE vector, for a convenient and cost-effective soluble production of human tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biotechnology Lett.*, **24**, 1185-1189.

Régnier V, Vagnarelli P, Fukagawa T, Zerjal T, Burns E, Trouche D, Earnshaw W, Brown W. (2005) CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 3967-3981.

Rhee HS, Bataille AR, Zhang L, Pugh BF. (2014) Subnucleosomal structures and nucleosome asymmetry across a genome. *Cell*, **159**, 1377-1388.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5858-5868.

Schotta G, Ebert A, Dorn R, Reuter G. (2003) Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol.*, **14**, 67-75.

Sharma G, Upadhyay S, Srilalitha M, Nandicoori VK, Khosla S. (2015) The interaction of mycobacterial protein Rv2966c with host chromatin is mediated through non-CpG methylation and histone H3/H4 binding. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 3922-3937.

Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Cote J, Chua KF, Gozani O, (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*, **442**, 96-99.

Shukla MS, Syed SH, Montel F, Faivre-Moskalenko C, Bednar J, Travers A,

Angelov D, Dimitrov S. (2010) Remosomes: RSC generated non-mobilized particles with approximately 180 bp DNA loosely associated with the histone octamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **107**, 1936–1941.

Siino JS, Yau PM, Imai BS, Gatewood JM, Bradbury EM. (2003) Effect of DNA length and H4 acetylation on the thermal stability of reconstituted nucleosome particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 885–891.

Steinberg TH, Haugland RP, Singer VL. (1996) Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains. *Anal. Biochem.*, **239**, 238–245.

Stump MR, Gloss LM. (2008) Mutational analysis of the stability of the H2A and H2B histone monomers. *J. Mol. Biol.*, **384**, 1369–1383.

Subirana JA. (1973) Studies on the thermal denaturation of nucleohistones. *J. Mol. Biol.*, **74**, 363–386.

Sueoka T, Hayashi G, Okamoto A. (2017) Regulation of the Stability of the Histone H2A–H2B Dimer by H2A Tyr57 Phosphorylation. *Biochemistry*, **56**, 4767–4772.

Tachiwana H, Osakabe A, Kimura H, Kurumizaka H. (2008) Nucleosome formation with the testis-specific histone H3 variant, H3t, by human nucleosome assembly proteins in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **36**(7):2208–2218.

Tachiwana H, Kagawa W, Osakabe A, Kawaguchi K, Shiga T, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Kurumizaka H. (2010) Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **7**, 10454–10459.

Tachiwana H, Kagawa W, Shiga T, Osakabe A, Miya Y, Saito K, Hayashi-Takanaka Y, Oda T, Sato M, Park SY, Kimura H, Kurumizaka H. (2011) Crystal structure

of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature*, **476**, 232–235.

Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, **116**, 51–61.

Taguchi H, Xie Y, Horikoshi N, Maehara K, Harada A, Nogami J, Sato K, Arimura Y, Osakabe A, Kujirai T, Iwasaki T, Semba Y, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. (2017) Crystal Structure and Characterization of Novel Human Histone H3 Variants, H3.6, H3.7, and H3.8. *Biochemistry*, **56**, 2184–2196.

Taguchi H, Horikoshi N, Arimura Y, Kurumizaka H. (2014) A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye. *Methods*, **70**, 119–126.

Talbert PB, Henikoff S. (2017) Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 115–126.

Tanaka Y, Tawaramoto-Sasanuma M, Kawaguchi S, Ohta T, Yoda K, Kurumizaka H, Yokoyama S. (2004) Expression and purification of recombinant human histones. *Methods*, **33**, 3–11.

Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, Oohashi T, Shimada H, Ochiai T, Yoda K, Nomura F. (2003) Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res.*, **63**, 3511–3516.

Tsukiyama T, Becker PB, Wu C. (1994) ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature*, **367**, 525–532.

Tsunaka Y, Fujiwara Y, Oyama T, Hirose S, Morikawa K. (2016) Integrated molecular mechanism directing nucleosome reorganization by human FACT. *Genes Dev.* **30**, 673–686.

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, Yamagata K. (2017) Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep.*, **18**, 593–600.

Ulyanova NP, Schnitzler GR. (2012) Human SWI/SNF generates abundant, structurally altered dinucleosomes on polynucleosomal templates. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 11156–11170.

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, Kurumizaka H. (2016) Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics Chromatin*, **9**, 2.

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

Voong LN, Xi L, Sebeson AC, Xiong B, Wang JP, Wang X. (2016) Insights into Nucleosome Organization in Mouse Embryonic Stem Cells through Chemical Mapping. *Cell*, **167**, 1555–1570.

Wakamori M, Fujii Y, Suka N, Shirouzu M, Sakamoto K, Umehara T, Yokoyama S. (2015) Intra- and inter-nucleosomal interactions of the histone H4 tail revealed with a human nucleosome core particle with genetically-incorporated H4 tetra-acetylation. *Sci Rep.*, **5**, 17204.

Wang Z, Zhang H, Liu J, Cheruiyot A, Lee JH, Ordog T, Lou Z, You Z, Zhang

Z. (2016) USP51 deubiquitylates H2AK13,15ub and regulates DNA damage response. *Genes Dev.*, **30**, 946–959.

Warley A, Stephen J. (1985) X-ray microanalysis of synchronized HeLa S3 cells infected with Vaccinia virus. *J. Cell Sci.*, **75**, 401–409.

Wiedemann SM, Mildner SN, Bönisch C, Israel L, Maiser A, Matheisl S, Straub T, Merkl R, Leonhardt H, Kremmer E, Schermelleh L, Hake SB. (2010) Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X and H3.Y. *J. Cell Biol.*, **190**, 777–791.

Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan R M, Krissinel EB, Leslie AGW, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **67**, 235–242.

Wong LH, McGhie JD, Sim M, Anderson MA, Ahn S, Hannan RD, George AJ, Morgan KA, Mann JR, Choo KH. (2010) ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res.*, **20**, 351–360.

Xie X, Kokubo T, Cohen SL, Mirza UA, Hoffmann A, Chait BT, Roeder RG, Nakatani Y, Burley SK. (1996) Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer. *Nature*, **380**, 316–322.

Yelagandula R, Stroud H, Holec S, Zhou K, Feng S, Zhong X, Muthurajan UM, Nie X, Kawashima T, Groth M, Luger K, Jacobsen SE, Berger F. (2014) The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in Arabidopsis. *Cell*, **158**, 98–109.

Zhang Z, Pugh BF. (2011) Genomic organization of H2Av containing

nucleosomes in *Drosophila* heterochromatin. *PLoS One*, **6**, e20511.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、貴重なご指導と有益な助言をいただきました、指導教官の早稲田大学理工学術院教授 胡桃坂仁志先生に心から感謝申し上げます。

新規ヒストンバリエントのヒト組織免疫染色解析及びゲノム解析では、九州大学教授 大川恭行先生、九州大学研究員 原田哲仁博士、前原一満博士に大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

新規ヒストンバリエントの細胞生物学的解析では、東京工業大学教授 木村宏先生、Hubrecht Institute 研究員 佐藤浩一博士に大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

Stanford University 研究員 堀越直樹博士、早稲田大学理工学術院助教 有村泰宏博士には、本研究の全般に渡るご指導、ご助言を頂きました。心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力をしていただいた、胡桃坂研究室の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に研究生生活を支えてくれ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>Hiroyuki Taguchi</u>, Naoki Horikoshi, Yasuhiro Arimura, Hitoshi Kurumizaka A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye <i>Methods</i>, <b>70</b>, 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>, <b>56</b>, pp2184-2196, 2017.</p>
講演	<p>学会発表 ・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</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、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</p> <p>・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</p> <p>・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</p>

<p>講演</p>	<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>
<p>その他</p>	<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>, <b>3</b>, 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>, <b>4</b>, 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>, <b>4</b>, pp28-32, 2015.</p>

その他	<p>〈論文〉</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>, <b>6</b>, 160127, 2016.</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>, <b>18</b>, 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>, <b>8</b>, pp239-248, 2017.</p>
-----	---