

博士論文概要

論文題目

ヒストンバリエント H2A.J および
ALB1 エンハンサーDNA 配列が
ヌクレオソーム構造に及ぼす影響
Effect of histone variant H2A.J and
ALB1 enhancer DNA sequence
on nucleosome structure

申請者

田中	大貴
Hiroki	TANAKA

電気・情報生命専攻 構造生物学研究

2019年11月

地球上のほぼすべての生物において、ゲノム DNA が遺伝情報の担体として機能している。真核生物では、ゲノム DNA は細胞核内に折りたたまれて収納されており、クロマチンと呼ばれる DNA-タンパク質複合体を形成している。そのため、クロマチン上で転写・複製・修復といった反応が行われている。このような反応が適切な時期・場所で起きるためには、クロマチンが適切に折りたたまれている必要がある。多細胞生物では、すべての細胞が同じゲノム DNA を持つにもかかわらず、それぞれが異なる機能を有する細胞へと分化する。このような DNA 配列情報に依存しない表現型の変化は、クロマチン構造の変化による遺伝子発現制御が担っていると考えられている。

クロマチンの基本構造単位はヌクレオソームである。ヌクレオソームは、4種類のヒストンタンパク質（H2A、H2B、H3、H4）二分子ずつからなるヒストン八量体に、約 150 塩基対の DNA が巻きつくことで形成される構造体である。ヌクレオソーム構造に影響を与える因子として、ヒストンタンパク質に導入される翻訳後修飾や、一部のアミノ酸配列が主要型ヒストンと異なるヒストンバリエント、あるいはヌクレオソームを形成する DNA 配列などが挙げられる。これら因子によるヌクレオソーム構造の変化はクロマチンの高次構造の変化へとつながり、遺伝子発現制御に寄与すると考えられている。

本研究では、ヌクレオソーム構造に影響を与える因子としてヒストンバリエントと DNA 配列に着目した。ヒストンバリエントの一つである H2A.J を含んだヌクレオソームと、マウス *ALB1* enhancer DNA 配列を含んだヌクレオソームを試験管内で再構成し、生化学的解析および構造生物学的解析によって、これらのヌクレオソームの物理的な性質について検討した。

H2A.J は、哺乳類特異的なヒストン H2A バリエントである。H2A.J は主要型 H2A と比べて、10 番目のバリンおよび C 末端領域のアミノ酸配列が特異的である。これまで H2A.J の機能については長らく未知であったが、近年、H2A.J が老化細胞に蓄積し、老化細胞で起こる Senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる現象に関わる遺伝子の発現制御に関与することが報告された。しかしながら、H2A.J を含んだヌクレオソームの立体構造や物理的な性質に関する知見がないため、H2A.J による老化細胞での遺伝子発現制御機構の詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、試験管内で再構成した H2A.J ヌクレオソームを用いて、生化学的解析および構造生物学的解析によって H2A.J ヌクレオソームの性質を解析した。

マウス *ALB1* enhancer DNA 配列は、マウスのアルブミン遺伝子 (*ALB1*) の上流 10 キロ塩基対 (kbp) の位置にあるエンハンサー領域の DNA 配列である。肝臓で高発現しているアルブミン遺伝子は、このエンハンサー領域によって発現が制御されている。マウス *ALB1* エンハンサー領域ではヌクレオソームがタンデ

ムに形成されており、それぞれのヌクレオソームには下流から N1、N2、N3 と名前が付けられている。そのうちの N1 領域には、FoxA や GATA4 といった転写因子が結合することが知られている。FoxA や GATA4 はパイオニア転写因子と呼ばれる特殊な転写因子群に属しており、通常の転写因子では結合できないとされるヌクレオソーム構造中に含まれる標的 DNA 配列にも結合することができ、N1 領域の DNA を含むヌクレオソーム (*ALB1* enhancer (N1) ヌクレオソーム) にも安定的に結合する。しかし、これまでに *ALB1* enhancer を含めてエンハンサー領域のヌクレオソームの構造生物学的解析や物理的性質の解析をした例が乏しいため、パイオニア転写因子の結合とヌクレオソームの関係について不明な点が多い。そこで本研究では、試験管内で *ALB1* enhancer (N1) ヌクレオソームを再構成し、その性質について生化学的手法と構造生物学的手法によって解析した。

本論文は、四つの章から構成されている。以下に各章の概略を記す。

第 1 章は序論であり、まず本研究の背景にある、真核生物のゲノム DNA とクロマチン構造、ヌクレオソーム、ヌクレオソームの構造に影響を与える因子について記述した。そして本研究において取り扱う、ヒストンバリエント H2A.J およびマウス *ALB1* enhancer (N1) DNA 配列に関するこれまでの知見を記した。これらの背景を踏まえ、本研究の目的を示した。

第 2 章では、ヒストンバリエント H2A.J がヌクレオソームに取り込まれた際に、ヌクレオソームの性質にどのような影響を与えるかについて、生化学的解析と構造生物学的解析の結果を記した。まずヒストンバリエント H2A.J をリコンビナントタンパク質として精製した。精製した H2A.J を用いて、H2A.J を含むヌクレオソームを試験管内で再構成した。その結果、H2A.J は主要型 H2A と同様にヌクレオソーム構造を形成することが明らかになった。続いて、再構成した H2A.J ヌクレオソームが通常のヌクレオソームと同様に約 146 塩基対の DNA が巻き付いた構造であるかを調べるために、マイクロコッカルヌクレアーゼに対する感受性試験を行った。その結果、H2A.J ヌクレオソームは通常のヌクレオソームと同様に約 146 塩基対の DNA がヒストン複合体に巻き付いた構造をしており、かつ DNA 末端の運動性についても同程度であることが明らかになった。一般的に、ヒストンバリエントはヌクレオソームの構造安定性に影響を与え、機能的に重要である。そこで次に H2A.J ヌクレオソームの構造安定性を、熱安定性試験によって解析した。その結果、H2A.J ヌクレオソームは主要型 H2A type1-B/E ヌクレオソームと比べて、H2A-H2B 二量体がヌクレオソーム構造中に安定的に保持されていることが明らかになった。更に変異体解析の結果、H2A.J の 40 番目のアラニンが、H2A.J ヌクレオソームの構造安定性に重要であることを明らかにした。これらの結果を踏まえて、H2A.J ヌクレオソームの老化細胞での役割と、H2A の 40 番目のアミノ酸を含む領域の多様性について議論した。

第 3 章では、マウス *ALB1* enhancer (N1) DNA 配列上に形成されるヌクレオソーム (*ALB1* ヌクレオソーム) の性質を明らかにするための生化学的解析と構造生物学的解析の結果について記した。まず *ALB1* enhancer (N1) DNA 断片を用いて、*ALB1* ヌクレオソームを試験管内で再構成した。ヌクレオソームを形成するために必要な DNA の長さは約 146 塩基対であるが、どの位置にヌクレオソームが形成されているのかが不明であるため、再構成には 180 塩基対の DNA 断片を用いた。次に、ヌクレオソームの形成位置を決定するために、マイクロコックルヌクレアーゼを用いて、ヌクレオソームの形成位置を解析した。その結果、*ALB1* enhancer (N1) DNA 断片上では、ヌクレオソームの形成位置が 2ヶ所あることを一塩基分解能で明らかにした。次にクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって、*ALB1* ヌクレオソームの立体構造を決定した。その結果、全体構造は既知の Widom 601 配列を含むヌクレオソーム (601 ヌクレオソーム) の構造と極めて類似していた一方で、601 ヌクレオソームでは見られない局所的にヌクレオソーム中の DNA の運動性が高い領域があることが示唆された。そこでヌクレオソーム中の DNA の運動性を検証するために、DNaseI ヌクレアーゼに対する感受性試験およびフットプリント解析を行ったところ、確かに *ALB1* ヌクレオソーム特異的に DNaseI に対して感受性の高い領域が存在することが明らかになった。*ALB1* ヌクレオソーム中での局所的な DNA の運動性の高さを踏まえて、*ALB1* ヌクレオソームの構造安定性が低いことを予想した。そこで熱安定性試験によって *ALB1* ヌクレオソームの構造安定性を評価したところ、601 ヌクレオソームと比べて不安定であることが明らかになった。これらの結果から、*ALB1* ヌクレオソームの性質と機能について、パイオニア転写因子の結合機構も踏まえて考察した。

第 4 章では、本研究で得られた知見を総括した上で、適切な DNA の機能発現のためのヒストンバリエーションと遺伝子制御領域の DNA 配列の役割について考察した。さらに H2A.J ヌクレオソームによる老化細胞でのクロマチン構造制御や、*ALB1* ヌクレオソームを基盤としたパイオニア転写因子によるクロマチン構造制御に関して、本研究によって得られた知見を踏まえて今後の研究の展望について記した。

早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 田中 大貴 印

(2020年1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>Hiroki Tanaka</u>, Shoko Sato, Masako Koyama, Tomoya Kujirai, Hitoshi Kurumizaka. Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A.J. <i>J. Biochemistry</i>, 2019 (online published. doi: 10.1093/jb/mvz109)</p> <p>Yoshimasa Takizawa*, ○<u>Hiroki Tanaka</u>*, Shinichi Machida, Masako Koyama, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Paul A. Wade, Matthias Wolf, Hitoshi Kurumizaka. Cryo-EM structure of the nucleosome containing the <i>ALB1</i> enhancer DNA sequence. <i>Open Biology</i>, 8, pp170255, 2018. *These authors contributed equally to this work</p>
講演	<p>国内学会 (口頭発表およびポスター発表) ○田中大貴、滝沢由政、町田晋一、小山昌子、前原一満、大川恭行、Paul A. Wade、Matthias Wolf、胡桃坂仁志 パイオニア転写因子の標的となる <i>ALB1</i> スクレオソームの解析 第91回日本生化学会大会、2018年9月</p>
その他	<p>(論文) Shojiro Inano, Koichi Sato, Yoko Katsuki, Wataru Kobayashi, <u>Hiroki Tanaka</u>, Kazuhiro Nakajima, Shinichiro Nakada, Hiroyuki Miyoshi, Kerstin Knies, Akifumi Takaori-Kondo, Detlev Schindler, Masamichi Ishiai, Hitoshi Kurumizaka, Minori Takaka. RFWD3-mediated ubiquitination promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination. <i>Molecular Cell</i>, 66, pp622-634.e8, 2017.</p> <p>Sophie Barral, Yuichi Morozumi, <u>Hiroki Tanaka</u>, Emilie Montellier, Jérôme Govin, Maud de Dieuleveult, Guillaume Charbonnier, Yhann Couté, Denis Puthier, Thierry Buchou, Fayçal Boussouar, Takashi Urahama, François Fenaille, Patrick Héry, Nicolas Fernandez-Nunez, Hitoshi Shiota, Matthieu Gérard, Sophie Rousseaux, Hitoshi Kurumizaka, Saadi Khochbin. Histone variant H2A.L.2 guides transition protein-dependent protamin assembly in male germ cells. <i>Molecular Cell</i>, 66, pp89-101.e8, 2017.</p> <p>Jun Ueda, Akihito Harada, Takashi Urahama, Shinichi Machida, Kazumitsu Maehara, Masashi Hada, Yoshinori Makino, Jumpei Nogami Naoki Horikoshi Akihisa Osakabe, Hiroyuki Taguchi, <u>Hiroki Tanaka</u>, 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 <i>H3t</i> gene is essential for entry into Spermatogenesis. <i>Cell Reports</i>, 18, pp593-600, 2017</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>Masako Koyama, Wataru Nagakura, <u>Hiroki Tanaka</u>, Tomoya Kujirai, Yuji Chikashige, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Hitoshi Kurumizaka. <i>In vitro</i> reconstitution and biochemical analyses of the <i>Schizosaccharomyces pombe</i> nucleosome. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>, 482, pp896-901, 2017</p> <p>Daiki Kato, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, <u>Hiroki Tanaka</u>, Hitoshi Kurumizaka. Human tNASP promotes <i>in vitro</i> nucleosome assembly with histone H3.3. <i>Biochemistry</i>, 54, pp1171-1179, 2015</p> <p>国際学会（ポスター発表） <u>Hiroki Tanaka</u>, Yusuke Kumagawa, Masako Koyama, Motoki Takaku, Paul A. Wade, Hitoshi Kurumizaka. The binding of GATA3 to the target nucleosome and its effects on the nucleosome stability. The 11th 3R+3C Symposium, 2018 November</p> <p>国内学会（ショートトーク） <u>田中大貴</u>、熊川雄祐、滝沢由政、小山昌子、高久誉大、Paul A. Wade、胡桃坂仁志 パイオニア転写因子 GATA3 によるヌクレオソーム中の標的塩基配列認識機構の解析 第 36 回染色体ワークショップ・第 17 回核ダイナミクス研究会、2019 年 1 月</p> <p>国内学会（ポスター発表） <u>田中大貴</u>、熊川雄祐、小山昌子、高久誉大、Paul A. Wade、胡桃坂仁志 パイオニア転写因子 GATA3 の結合がヌクレオソームへ与える影響 第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 12 月</p> <p><u>田中大貴</u>、滝沢由政、町田晋一、小山昌子、前原一満、大川恭行、Matthias Wolf、胡桃坂仁志 パイオニア転写因子 FoxA1 によるヌクレオソーム認識機構の解析 第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会、2017 年 12 月</p> <p><u>田中大貴</u>、小山昌子、Paul A. Wade、胡桃坂仁志 パイオニア転写因子 FoxA1 によるヌクレオソーム認識機構の生化学的解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月</p>