

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

2020 年 2 月

田中 大貴

Hiroki TANAKA

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

2020 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

田中 大貴

Hiroki TANAKA

## 目次

### 略語一覧

### 第1章 序論

- 1-1. 真核生物のゲノム DNA とクロマチン構造
- 1-2. クロマチンの基盤構造であるヌクレオソーム
- 1-3. ヒストン翻訳後修飾
- 1-4. ヒストンバリエント
- 1-5. ヒストン H2A バリエント H2A.J
- 1-6. DNA 配列とヌクレオソーム
- 1-7. マウス *ALB1* enhancer
- 1-8. 本研究について

### 第2章 H2A.J を含むヌクレオソームの生化学的解析および構造生物学的解析

- 2-1. 序
- 2-2. 実験方法
  - 2-2-1. リコンビナントヒストンタンパク質の精製および発現
  - 2-2-2. ヒストン複合体の再構成および精製
  - 2-2-3. ヌクレオソーム再構成用の DNA の精製
  - 2-2-4. ヌクレオソームの試験管内再構成および精製
  - 2-2-5. ヌクレオソームの MNase 感受性試験
  - 2-2-6. ヌクレオソームの熱安定性試験

2-2-7. ヌクレオソームの結晶化および構造決定

2-3. 実験結果

2-3-1. ヒストンバリエント H2A.J および主要型ヒストンの精製

2-3-2. H2A.J を含むヌクレオソームの再構成および精製

2-3-3. H2A.J を含むヌクレオソームの MNase 感受性解析

2-3-4. H2A.J を含むヌクレオソームの安定性解析

2-3-5. H2A.J を含むヌクレオソームの構造解析

2-4. 考察

2-4-1. H2A.J ヌクレオソームの老化細胞での役割

2-4-2. H2A の L1 ループの多様性

第3章 *ALB1* enhancer 配列を含むヌクレオソームの生化学的解析および構造生物学的解析

3-1. 序

3-2. 実験方法

3-2-1. ヒストンタンパク質の精製およびヒストン複合体の調製

3-2-2. ヌクレオソーム再構成用の DNA の精製

3-2-3. ヌクレオソームの試験管内再構成および精製

3-2-4. MNase を用いたヌクレオソームポジショニングの解析

3-2-5. 次世代シーケンサーを用いたヌクレオソームポジショニング解析

3-2-6. FoxA1 (170-472)の精製

3-2-7. FoxA1 結合試験

3-2-8. クライオ電子顕微鏡測定用サンプルの調製

3-2-9. クライオ電子顕微鏡によるヌクレオソームの測定および構造決定

3-2-10. ヌクレオソームの DNaseI 感受性試験

3-2-11. DNaseI フットプリント試験

3-2-12. ヌクレオソームの熱安定性試験

3-3. 実験結果

3-3-1. *ALBI* enhancer (N1) 配列を含むヌクレオソームの再構成・精製

3-3-2. *ALBI* ヌクレオソームのヌクレオソーム形成位置の解析

3-3-3. *ALBI* ヌクレオソームへの FoxA1 結合解析

3-3-4. クライオ電子顕微鏡を用いた *ALBI* ヌクレオソームの構造解析

3-3-5. *ALBI* ヌクレオソームの DNaseI 感受性解析

3-3-6. *ALBI* ヌクレオソームの熱安定性解析

3-4. 考察

3-4-1. *ALBI* ヌクレオソームの性質と機能の考察

第 4 章 総合討論

4-1. 構造安定なヌクレオソームを形成するヒストンバリエントの役割

4-2. ヒストンバリエントと遺伝子制御領域の DNA 配列

4-3. 今後の展望

引用文献

謝辞

## 略語一覽

bp	base pair
CBB	coomassie brilliant blue
DAPI	4',6-diamidine-2-phenylindole
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
MNase	micrococcal nuclease
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PDB	protein data bank
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
R.M.S.D.	root mean square deviation
RNA	ribonucleic acid
SASP	Senescence-associated secretory phenotype
SDS	sodium dodecyl sulfate
SHL	Superherical location
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

## 第1章 序論

### 1-1. 真核生物のゲノム DNA とクロマチン構造

地球上のほぼすべての生物において、ゲノム DNA が遺伝情報の担い手である。真核生物では、ゲノム DNA はクロマチンと呼ばれる DNA-タンパク質複合体として折りたたまれて細胞核内に収納されている。この仕組みにより、ヒトの場合約 2 m に相当するゲノム DNA を直径わずか 10  $\mu\text{m}$  程度の細胞核の中に収納することを可能にしている。このような狭い細胞核内において、クロマチン上では転写、複製、修復といった反応が行われている。こういった反応が適切な時期・場所で起こるためには、クロマチンが適切に折り畳まれている必要があると考えられる。とくに多細胞生物では、すべての細胞が同じゲノム DNA を持つにもかかわらず、それぞれ異なる機能を持つ細胞へと分化する。これは、何かしらの遺伝子発現の制御を受けることで、個々の細胞で発現する遺伝子が異なることを意味する。このような DNA の配列情報に依存しない表現型の変化をエピジェネティクスと呼ぶ (Waddington, 1942)。近年、エピジェネティクスの本体はクロマチン構造の変化による遺伝子発現制御であると言われている (Allis and Jenuwein, 2016)。

細胞生物学的解析から、クロマチンは大きく 2 つの領域に分類される。DAPI によって DNA を染色した際に比較的濃く染色される領域をヘテロクロマチン、一方で比較的薄く染色される領域をユークロマチンと呼ぶ (Heitz, 1928)。ヘテロクロマチンはクロマチンが密に凝集した状態であり、ユークロマチンはクロマチンの凝集度が低い状態であると考えられている。これまでの先行研究から、

ヘテロクロマチン領域には遺伝子発現が抑制された遺伝子が含まれており、ユークロマチン領域は遺伝子発現が活性化されている遺伝子が含まれることが知られている。このようにクロマチンの状態と DNA の機能発現制御との間には密接な関わりがある。

## 1-2. クロマチンの基盤構造であるヌクレオソーム

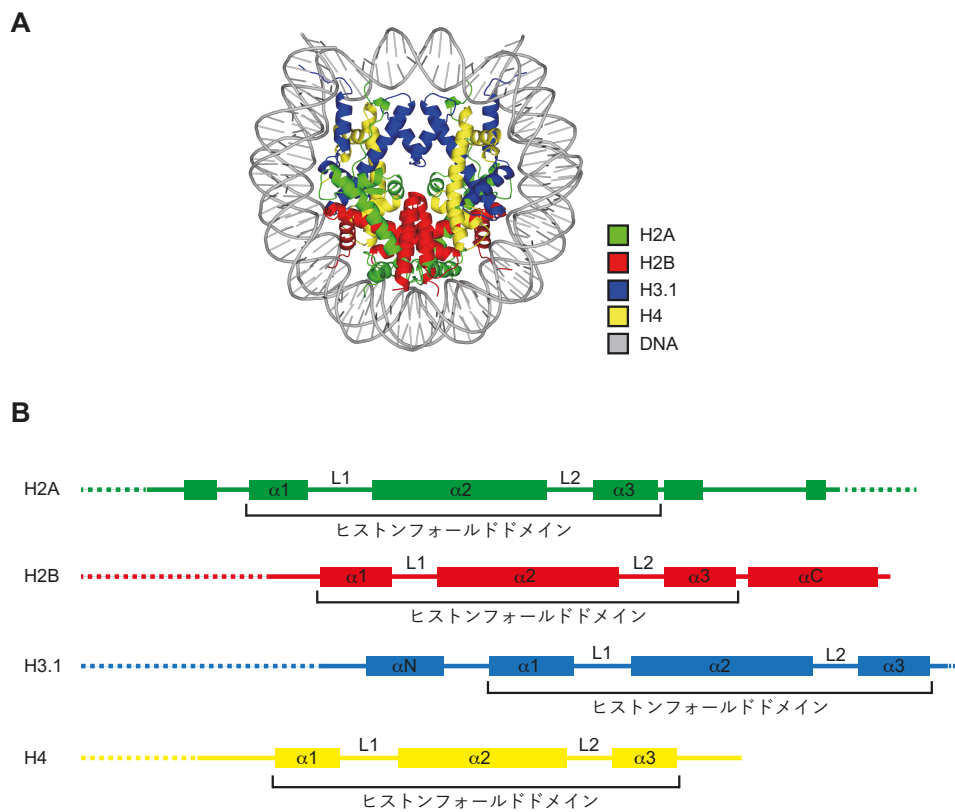
1974 年に電子顕微鏡を用いた解析から、クロマチンは球状構造体がリンカー DNA を介して数珠状に連なった構造であることが明らかになり、球状構造体は“v bodies”と名付けられた (Olins and Olins, 1974)。その後“v bodies”は“ヌクレオソーム”と名前を変え、ヌクレオソームがクロマチンの基盤構造であることが認知された (Oudet *et al.*, 1975)。1997 年には X 線結晶構造解析によって高分解能でヌクレオソームの立体構造が決定された (Luger *et al.*, 1997)。

ヌクレオソームは、4 種類のコアヒストン H2A、H2B、H3、H4 二分子ずつからなるヒストン八量体に 145-147 塩基対の DNA が左巻きに 1.65 回巻き付いた構造体である (図 1A)。ヒストンタンパク質にはリジンやアルギニンといった塩基性アミノ酸が多く含まれており、これらのアミノ酸が DNA のリン酸骨格と相互作用している。4 種類のコアヒストンはいずれも、構造を持つコア領域と構造を持たないヒストンテール領域から構成される (図 1B)。コア領域には 3 つの  $\alpha$  ヘリックスからなるヒストンフォールドドメインと呼ばれる領域が存在し、この領域を介して H2A と H2B および H3 と H4 がヘテロ二量体を形成する。また、H3-H4 ヘテロ二量体は H3 の C 末端領域を介してヘテロ四量体を形成する。生



体内では、H3-H4 ヘテロ四量体が DNA に結合して DNA-ヒストン複合体を形成し、そこに段階的に H2A-H2B ヘテロ二量体が 2 つ結合することでヌクレオソームが形成されると考えられている (Das *et al.*, 2010)。このようなヌクレオソームの形成プロセスはヒストンと結合しヌクレオソームの形成を触媒するタンパク質群であるヒストンシャペロンが担っていると考えられている (Das *et al.*, 2010; Hammond *et al.*, 2017)。

ヌクレオソーム構造に影響を与える因子として、ヒストン翻訳後修飾やヒストンバリエーション、ヌクレオソームを形成している DNA 配列などが挙げられる。ヌクレオソーム構造の変化はクロマチンの高次構造へつながり、遺伝子発現制御に寄与すると考えられている。



**図 1** ヌクレオソームの構造

A. ヌクレオソームの全体構造 (PDB ID:3AFA、Tachiwana *et al.*, 2010)。

B. 各ヒストンの二次構造。運動性が高いために、X線結晶構造解析では構造が決定できない領域は破線で示した。

### 1-3. ヒストン翻訳後修飾

ヒストンタンパク質はメチル化、アセチル化、リン酸化といったさまざまな化学修飾を受けることが知られており、これをヒストン翻訳後修飾と呼ぶ (Bannister and Kouzarides, 2011; Lawrence *et al.*, 2016)。ヒストン翻訳後修飾は、ヒストンのテール領域およびコア領域のどちらにも導入されることが知られている。ヒストンのテール領域への翻訳後修飾は、様々なクロマチン結合因子の結合や、クロマチン中でのヌクレオソーム-ヌクレオソーム間の相互作用に関わる。一方でヒストンのコア領域に導入される翻訳後修飾は、DNA-ヒストン間あるいはヒストン-ヒストン間の相互作用を変化させることでヌクレオソーム構造に影響を与える (Tessarz and Kouzarides, 2014)。例えば、H3 の 56 番目のリジンのアセチル化は DNA-ヒストン間の相互作用を弱め、ヌクレオソーム中の末端 DNA の一過的な解離 (nucleosome breathing) を促進することが報告されている (Neumann *et al.*, 2009)。また、H3 の 122 番目のリジンのアセチル化およびクロトニル化により DNA-ヒストン間の相互作用を変化し、ヌクレオソーム構造が不安定になることが報告されている (Suzuki *et al.*, 2016)。H4 の 91 番目のリジンのアセチル化およびグルタル化によりヒストン-ヒストン間の相互作用を変化し、ヌクレオソーム構造が不安定になることが示唆されている (Ye *et al.*, 2005; Bao *et al.*, 2019)。

#### 1-4. ヒストンバリエント

ヌクレオソームを構成する4種類のヒストンタンパク質のうちH4以外のH2A、H2B、H3には、主要型ヒストンとはアミノ酸配列が異なるが、主要型ヒストンと置き換わることでヌクレオソームに取り込まれるヒストンが存在し、そのようなヒストンをヒストンバリエントと呼ぶ。代表的なヒストンバリエントに関して表1にまとめた。主要型ヒストンとヒストンバリエントの間には、遺伝子のコピー数や発現時期、mRNAの構造に明確な違いが存在し、これらの違いによって区別されている。まず主要型ヒストンは遺伝子が多コピー存在し、これらの遺伝子はゲノム上で集まってクラスターを形成している。そして細胞周期のS期に最も発現し、DNAの複製に依存してクロマチンに取り込まれる(Wu and Bonner, 1981; Heintz *et al.*, 1983)。また、主要型ヒストンにはイントロンがなく、mRNAの3'末端がpoly A テールに代わってステムループ構造を形成していることが特色である(Marzluff *et al.*, 2008)。これらの特徴をもつヒストンが主要型ヒストンとして定義されている。一方でヒストンバリエントは、コードする遺伝子が1コピーあるいは2コピーであり、主要型ヒストンの遺伝子とは異なる領域に存在する。そして細胞周期非依存的に発現し、クロマチンに取り込まれる。また、ヒストンバリエントの多くは、通常タンパク質と同様にイントロンがあり、mRNAの3'末端がpoly A テールになっている。これらの特徴をもつヒストンがヒストンバリエントである。

ヒストンバリエントは特定のクロマチン領域に取り込まれ、ヌクレオソームの構造を変化させる、あるいはヒストンバリエントを認識するタンパク質群を

呼び込むことで特異的な機能を果たすと考えられている (Buschbeck and Hake, 2017; Talbert and Henikoff, 2017)。例えば、精巣特異的なヒストンバリエントである H3T および H3.5 は構造不安定なヌクレオソームを形成する (Tachiwana *et al.*, 2010; Urahama *et al.*, 2016)。セントロメア領域に局在するヒストンバリエント CENP-A は DNA 末端の運動性が高く、この DNA 末端の運動性が正常な染色体分配に重要である (Conde *et al.*, 2007; Dechassa *et al.*, 2011; Tachiwana *et al.*, 2011; Panchenko *et al.*, 2011; Roulland *et al.*, 2016)。ヒトの H3.Y およびマウス H3t についても同様に DNA 末端の運動性が高い (Kujirai *et al.*, 2016; Ueda *et al.*, 2017)。転写活性化された遺伝子上に局在する H2A.B はヌクレオソーム構造中で巻き付いている DNA の長さが主要型ヌクレオソームよりも短いことが報告されている (Bao *et al.*, 2004; Doyen *et al.*, 2006; Tolstorukov *et al.*, 2012; Arimura *et al.*, 2013)。また、ヒストンバリエントによるタンパク質群の呼び込みについては、例えば、CENP-A を含んだヌクレオソームは様々なセントロメアタンパク質が集積するための足場となる (Stellfox *et al.*, 2013; McKinley and Cheeseman, 2016)。DNA 損傷依存的にリン酸化修飾を受ける H2A.X は、リン酸化された C 末端領域を介して DNA 損傷応答タンパク質が結合する (Kinner *et al.*, 2008)。

以上のように、ヒストンバリエントはクロマチンに取り込まれ、ヌクレオソームの構造や物理的性質を変化させる、あるいはヒストンバリエントを認識する因子を呼び込むことで特徴的な機能を果たし、遺伝子発現の制御を行っている。しかしながら、そのメカニズムや機能については依然として不明な点も多い。

表1 代表的なヒストンバリエーションの種類と特徴

名称	特徴
H2A (主要型)	・複製時にクロマチンに取り込まれる
H2A.Z	・プロモーターやエンハンサー、転写活性化領域等に局在
H2A.X	・DNA 損傷部位にてリン酸化修飾を受ける
H2A.B	・転写活性化領域、DNA 損傷部位に局在
macroH2A	・不活化 X 染色体、ヘテロクロマチンに局在
H2A.J	・老化細胞で集積している
H3.1 (主要型)	・複製時にクロマチンに取り込まれる
H3.2 (主要型)	・複製時にクロマチンに取り込まれる
H3.3	・転写活性化領域に取り込まれる ・テロメア、ヘテロクロマチンにも取り込まれる
H3T	・精巣特異的に発現
H3.5	・精巣特異的に発現
H3.X	・精巣や脳、がん細胞で発現
H3.Y	・精巣や脳、がん細胞で発現 ・転写活性化領域に局在
CENP-A	・セントロメア領域に局在

## 1-5. ヒストン H2A バリエント H2A.J

H2A.J は、哺乳類特異的なヒストンバリエントである。H2A.J は主要型の 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 (図 2)。主要型の H2A と相同性が高いが、遺伝子がヒストンクラスターに含まれていない、細胞周期に依存せずに発現する、イントロンが存在するといったヒストンバリエントの特徴を有することから、ヒストンバリエントに分類される (Nishida *et al.*, 2005)。これまで H2A.J に関する研究報告は乏しく、その機能や存在意義は長らく不明であった。しかし 2017 年に、質量分析法によるタンパク質レベルの解析および RT-qPCR による RNA レベルの解析により H2A.J が細胞老化を起こした細胞 (以下、老化細胞と表記) において蓄積していることが報告された (Contrepois *et al.*, 2017)。老化細胞では Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) と呼ばれる、炎症性サイトカインや増殖因子といった分泌因子が高発現する現象が生じていることが知られている (Young and Narita, 2009; Campisi, 2013)。H2A.J を shRNA を用いてノックダウンすると SASP に関わる炎症関連の遺伝子の発現が抑制されること、逆に H2A.J を過剰発現させることによって炎症関連の遺伝子の発現が亢進することから、H2A.J は SASP の制御に関与することが示唆された (Contrepois *et al.*, 2017)。さらに SASP の制御において、H2A.J 特異的な C 末端領域が機能的に重要であることが明らかになっている。ただし、ChIP-qPCR による解析から H2A.J は老化細胞において、H2A.J 依存的な発現上昇を示す遺伝子と H2A.J 非依存的な遺伝子の、両方のプロモーター領域およびエキソン領域に集積が見られることから、単純に H2A.J がクロマチン

に局在することが遺伝子発現を調節しているわけではないことが示唆されている。また、マウスの組織およびヒトの皮膚の細胞の解析から、個体老化にも応じて H2A.J の蓄積が起こることが報告されている (Contrepolis *et al.*, 2017)。以上のことから H2A.J は炎症関連の遺伝子の発現を制御することで SASP に関与し、細胞老化だけでなく個体の老化とも関連があることが考えられているが、どのように H2A.J が SASP に関連する遺伝子の遺伝子発現を制御しているのか、そのメカニズムは不明である。

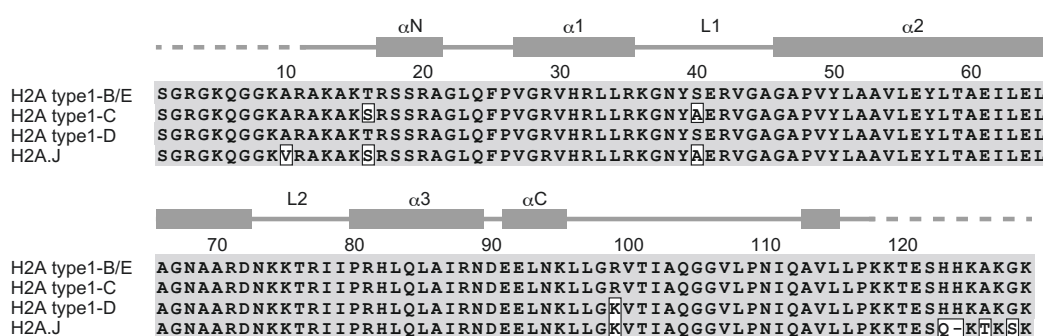


図2 主要型 H2A と H2A.J のアミノ酸配列アライメント

ヒトの主要型 H2A である H2A type1-B/E、H2A type1-C、H2A type1-D と H2A.J のアミノ酸配列のアライメント。H2A type1-B/E と比較して保存されているアミノ酸の背景を灰色で示した。ヌクレオソーム構造中における H2A の二次構造をパネルの上に示した。X 線結晶構造解析では構造を決定できない領域は破線で表示した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用)



## 1-6. DNA 配列とヌクレオソーム

ヌクレオソームの形成には DNA 配列が大きく関わっている。近年のゲノムワイドなヌクレオソームの形成位置の解析などから、DNA の AA/AT/TA/TT 部位はヌクレオソームの内側を向いてヒストンと相互作用し、CC/CG/GC/GG の部分はヌクレオソームの外側を向く傾向が示され、DNA 配列がヌクレオソーム形成に寄与することが示唆されている (Wang *et al.*, 2005; Segal *et al.*, 2006)。また DNA 配列によってヒストン八量体との相互作用の強さが異なることで構造安定性に影響が生じる (Chua *et al.*, 2012)。

これまでのヌクレオソームの構造解析に使われてきた DNA 配列は主に 2 種類存在する。1 つ目は、 $\alpha$ -サテライト DNA と呼ばれる配列である。この DNA 配列は、ヒトのセントロメア  $\alpha$ -サテライト DNA を元にして、パリンδροミックになるように設計された 146 塩基対の人工的な DNA 配列であり、1997 年に Luger 博士らがヌクレオソームの立体構造を初めて近原子分解能で決めることに成功した際に使用した DNA 配列である (Luger *et al.*, 1997)。2 つ目は、Widom 博士らによって報告された Widom 601 DNA 配列 (以下、601 DNA と表記) である。601 DNA は Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) 法によってヌクレオソームを安定的に形成する配列として報告された配列であり、この配列を用いるとヌクレオソームの形成位置が一つに定まるため、ヌクレオソームの試験管内再構成の際に広く使われている。

先行研究から、プロモーター領域やエンハンサー領域といった遺伝子の制御領域において、ヌクレオソームが形成されている頻度が高いことが報告されて

いる (Tillo *et al.*, 2010)。しかしながら、実際の生体内の遺伝子制御領域の配列を用いたヌクレオソームの構造解析の例としては、マウスの乳がんウイルス (Mouse Mammary Tumor Virus, MMTV) の 3'-LTR (Long Terminal Repeat) にあるプロモーター領域の配列である MMTV-A の 1 例 (Frouws *et al.*, 2016) のみである。プロモーターやエンハンサーといった遺伝子制御領域に存在するヌクレオソームは遺伝子発現制御に重要であることが考えられるが、その構造生物学的知見は乏しい。

#### 1-7. マウス *ALB1* enhancer

マウス *ALB1* enhancer 配列は、マウスのアルブミン遺伝子 (*ALB1*) の上流 10 kbp の位置にあるエンハンサー領域の配列である (図 3)。アルブミン遺伝子は肝臓で高発現しており、このエンハンサー領域によって発現が制御されている (Pinkert *et al.*, 1987)。このエンハンサー領域にはヌクレオソームが規則正しく形成されていることが知られており、またいくつかの転写因子が結合することも知られていることから、組織特異的なクロマチンを調べるモデルの一つとして利用されている (McPherson *et al.*, 1993; McPherson *et al.*, 1996; Cirillo and Zaret, 1999; Cirillo *et al.*, 2002; Iwafuchi-doi *et al.*, 2016; Fernandez *et al.*, 2019)。

マウス *ALB1* enhancer 領域には、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 (図 3、McPherson *et al.*, 1993)。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 (Cirillo and Zaret, 1999; Cirillo *et al.*,

2002; Fernandez *et al.*, 2019)。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であり、通常の転写因子では結合できない、ヌクレオソーム構造に含まれる結合配列にも結合できることが知られている (Cirillo *et al.*, 2002; Iwafuchi-Doi and Zaret, 2014)。FoxA や GATA4 は *ALB1* enhancer (N1) ヌクレオソームに安定的に結合することが知られているが、その結合メカニズム等は明らかになっていない。

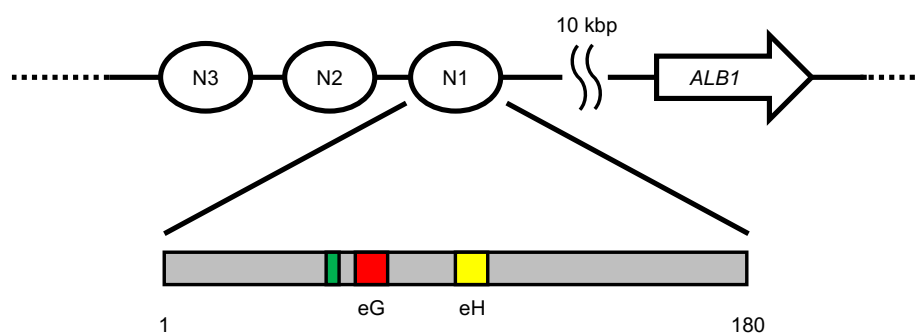


図3 マウス *ALB1* エンハンサー領域の模式図

N1、N2、N3 はエンハンサー領域に形成されるヌクレオソームを表す。また、N1 領域に関して拡大図を表示した。GATA4 結合配列の位置を緑色で、FoxA 結合配列である eG サイトと eH サイト領域をそれぞれ赤色、黄色で示した。

## 1-8. 本研究について

真核生物の DNA の機能発現制御には、クロマチン構造が大きく関わっている。クロマチン構造の基盤構造はヌクレオソームであることから、ヌクレオソームの構造および性質が DNA の機能発現に大きな影響を与えることは容易に想像できる。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ーションと DNA 配列に着目した。

第 2 章ではヒストンバリエーションによるヌクレオソーム構造への影響を解析するために、ヒストン H2A のバリエーションである H2A.J に着目した。H2A.J は老化細胞に集積し、SASP 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ているが、その機構は不明であった。本研究では生化学的解析および構造生物学解析を行うことで H2A.J ヌクレオソームと主要型 H2A ヌクレオソームとを比較した結果、H2A.J ヌクレオソームは主要型 H2A ヌクレオソームよりも構造安定性が高いことを明らかにした。また、この構造安定性に寄与するアミノ酸残基を特定した。

第 3 章ではエンハンサー領域に形成されるヌクレオソームの構造的性質を明らかにするために、マウスの *ALB1* enhancer (N1) 配列に着目した。マウスの *ALB1* enhancer (N1) 配列は安定的にヌクレオソームを形成し、さらにこの領域には複数の転写因子が結合することが知られている。しかしながら、この領域に形成されるヌクレオソームの構造的知見はまったくない。そこでマウス *ALB1* enhancer (N1) 配列を用いてヌクレオソームを試験管内再構成し、生化学的解析および構造生物学的解析を行った。その結果、*ALB1* ヌクレオソームは、局所的に DNA-

ヒストン間の相互作用が弱いことが示唆された。

最後に第 4 章では、H2A.J を含んだヌクレオソームの機能や構造安定性および *ALB1* ヌクレオソームの性質についてそれぞれ考察した上で、今後の展望について議論した。

## 第2章 H2A.Jを含むヌクレオソームの生化学的解析および構造生物学的解析

### 2-1. 序

ヒストン H2A バリエントの一つである H2A.J は、主要型 H2A type1-B/E と比較して、欠失も含めて 8 アミノ酸異なる。そのため、H2A.J は主要型 H2A とは異なる性質・機能を持つ可能性が考えられる。実際、H2A.J は老化細胞で集積が見られ、ロックダウンすることによって老化細胞で起こる SASP 現象に関与する遺伝子の発現が抑制されることが報告されている (Contrepolis *et al.*, 2017)。このことから H2A.J は遺伝子の転写制御に関与することが示唆されるが、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 による転写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 H2A.J ヌクレオソームの立体構造や物理的な性質について明らかにするために、ヌクレオソームの試験管内再構成系を用いて H2A.J ヌクレオソームを再構成し、主要型 H2A type1-B/E ヌクレオソームと比較した生化学的解析および構造生物学的解析を行った。本章ではこれらの結果について述べる。

### 2-1. 実験方法

#### 2-2-1. リコンビナントヒストンタンパク質の精製および発現

本研究で使用したヒトの各種ヒストンタンパク質 (H2A、H2A.J、H2B、H3.1、H4) はすべて先行研究 (Kujirai *et al.*, 2018) を参考に、大腸菌内でリコンビナントタンパク質として発現させた後、精製した。以下に詳細を示す。

まず、ヒトの各種ヒストンタンパク質をコードする DNA 断片を、大腸菌用の

タンパク質発現ベクターである pET15b (Novagen) の *NdeI* サイトと *BamHI* サイトの間に挿入した (以下、作成したプラスミド DNA を pH2A、pH2A.J、pH2B、pH3.1、pH4 と表記)。これらのプラスミド DNA をもちいることで、ヒストンタンパク質を N 末端に His<sub>6</sub> タグとスロンビン認識配列が付加されたタンパク質として大腸菌内で発現させることが可能である。これにより、His<sub>6</sub> タグを利用したアフィニティー精製および、スロンビンを利用した His<sub>6</sub> タグ配列の切除が可能である。スロンビンを利用して His<sub>6</sub> タグ配列を切除したリコンビナントヒストンタンパク質には、最終的に GSHM の 4 アミノ酸が N 末端に付加されている。

各種ヒストンタンパク質の発現・精製のために、まずプラスミド DNA を大腸菌に導入し、形質転換を行った。H2A、H2A.J、H2B、H3.1 の発現のために pH2A、pH2A.J、pH2B、pH3.1 を大腸菌 BL21(DE3)株に、H4 の発現のために pH4 を大腸菌 JM109(DE3)株にそれぞれ導入した。形質転換した大腸菌を、100 µg/ml のアンピシリンを含む LB プレート上で 37°C で一晩培養した。培養後、50 µg/ml のアンピシリンを含む LB 培地に植菌し、37°C で 27 時間培養した。その後、遠心分離により菌体を回収し、ヒストン精製バッファー A (50 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl、1 mM PMSF、5%グリセロール) に懸濁した。その後、超音波処理によって菌体を破碎した。大腸菌内で発現した各 His<sub>6</sub> タグ融合ヒストンタンパク質は不溶性画分に存在するため、超音波処理後の不溶性画分を遠心分離によって分離し、ヒストン精製バッファー B (50 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl、5%グリセロール、7 M グアニジン塩酸塩) を加えて超音波処理した後、4°C で一晩転倒混和し、His<sub>6</sub> タグ融合ヒストンタンパク質を可溶化した。その後、遠心

分離を行い、可溶化した His<sub>6</sub> タグ融合ヒストンタンパク質を含む上清画分を回収した。回収した上清画分を Ni-NTA agarose beads (Qiagen) と混合し、4°C で 1 時間転倒混和し、各 His<sub>6</sub> タグ融合ヒストンタンパク質をビーズに吸着させた。その後、ビーズをエコノカラムに充填し、ヒストン精製バッファーC (50 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl、6 M 尿素、5% グリセロール、5 mM イミダゾール) で洗浄した。そして 5-500 mM イミダゾールの直線濃度勾配で His<sub>6</sub> タグ融合ヒストンタンパク質を溶出した。His<sub>6</sub> タグ融合ヒストンタンパク質を含む画分を回収し、ヒストン精製バッファーD (10 mM Tris-HCl pH 8.0、2 mM 2-メルカプトエタノール) に対して透析した。透析後の His<sub>6</sub> タグ融合ヒストンタンパク質を回収し、スロンビン (Wako) を加えて His<sub>6</sub> タグを切除した。His<sub>6</sub> タグの切除後、ヒストンタンパク質を MonoS 16/100 (GE Healthcare) カラムに吸着させ、ヒストン精製バッファーE (20 mM CH<sub>3</sub>COONa pH 5.2、200 mM NaCl、6 M 尿素、1 mM EDTA、5 mM 2-メルカプトエタノール) でカラムを洗浄した。そして、200 mM-800 mM NaCl の直線濃度勾配でヒストンタンパク質を溶出した。ヒストンタンパク質を含む画分を回収し、2 mM 2-メルカプトエタノールを含む水に対して 4 回透析し、溶液の脱塩を行った。透析終了後、ヒストンタンパク質を含む溶液を凍結乾燥し、ヒストンタンパク質をパウダー状にした。精製したヒストンタンパク質は 4°C で保存した。

H2A.J の各種変異体も、上述の H2A.J の精製と同様の手法で精製した。



### 2-2-2. ヒストン複合体の再構成および精製

ヒストン複合体の再構成および精製は先行研究 (Dyer *et al.*, 2004; Tachiwana *et al.*, 2010; Kujirai *et al.*, 2018) に従って行った。精製した H2A、H2B、H3.1、H4 のヒストンパウダーを等モル比で混合し、合計のヒストンタンパク質の終濃度が 1.5 mg/ml になるように変性バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、7 M グアニジン塩酸塩、20 mM 2-メルカプトエタノール) を加えて、4°C で 1 時間半転倒混和して変性させた。その後、ヒストン複合体バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5、2 M NaCl、1 mM EDTA、5 mM 2-メルカプトエタノール) に透析し、ヒストン八量体を再構成した。再構成したヒストン八量体は、ヒストン複合体バッファーで平衡化した Superdex 200 (GE Healthcare) ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって分離・溶出し精製した。精製したヒストン八量体は限外濾過によって濃縮した後、-80°C で保存した。

H2A.J および H2A.J の各種変異体を含むヒストン複合体についてもすべて同様の操作を行った。

### 2-2-3. ヌクレオソーム再構成用の DNA の精製

第 2 章の研究では、1997 年に Luger 博士らが報告した、ヌクレオソームの X 線結晶構造解析で使用された  $\alpha$ -サテライト由来の 146 塩基対 DNA 断片を用いた (Luger *et al.*, 1997)。DNA 断片の精製は、先行研究に倣って行った (Dyer *et al.*, 2004)。目的の 146 塩基対の  $\alpha$ -サテライト由来 DNA 断片はパリンδροミックであるため、プラスミド DNA には目的配列の半分に相当する 73 塩基対の

DNA 配列がタンデムに挿入されている。まず、このプラスミド DNA を大腸菌内で増幅させ、プラスミド DNA を大量調製した。大量調製したプラスミド DNA を *EcoRV* で処理して DNA 断片をプラスミドから切り出した後、得られた DNA 断片の両末端のリン酸基の脱リン酸化処理および *EcoRI* 処理して目的の DNA 断片の半分に相当する 73 塩基対の DNA 断片を調製した。この 73 塩基対の DNA 断片から、*EcoRI* 処理によって生じた突出末端同士をライゲーションさせて、目的の 146 塩基対の DNA 断片を得た。最終的な DNA 断片の両末端は平滑末端となっている。精製した 146 塩基対の  $\alpha$ -サテライト由来の二本鎖 DNA 断片の片方の鎖の配列を以下に示す。

146 bp  $\alpha$ -サテライト由来 DNA

(5'-)ATCAATATCCACCTGCAGATTCTACCAAAAAGTGTATTTGGAAACTGCTCC  
ATCAAAAAGGCATGTTTCAGCTGAATTCAGCTGAACATGCCTTTTGATGGAGCA  
GTTTCCAAATACACTTTTGGTAGAATCTGCAGGTGGATATTGAT(-3')

#### 2-2-4. ヌクレオソームの試験管内再構成および精製

精製したヒストン複合体と二本鎖 DNA を用いて、先行研究 (Tachiwana *et al.*, 2010; Kujirai *et al.*, 2018) を参考に、塩透析法と呼ばれる手法によりヌクレオソームを試験管内で再構成をした。まず DNA とヒストン複合体を、DNA が終濃度 0.8 mg/ml、ヒストン複合体が DNA に対してモル比で 1.8~2 倍になるように 2 M KCl 条件下で混合し、400 ml の RB-high バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5、2 M KCl、1 mM EDTA、1 mM DTT) に透析した。透析外液に RB-low バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5、250 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM DTT) を 0.8 ml/min

で加えながら、攪拌された透析外液を 0.8 ml/min で排出し、透析外液の塩濃度を徐々に下げてヌクレオソームを再構成した。1600 ml の RB-low バッファーを用いて透析外液を交換した後、再度 400 ml の RB-low バッファーに対して透析した。ヒストンと DNA の非特異的な結合を解消するために 55°C で 2 時間熱処理した後、分取用電気泳動装置 Model 491 Prep Cell (Bio-Rad) を用いて、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、TCS バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM DTT) によってサンプルを溶出した。精製したヌクレオソームは限外濾過によって濃縮した後、氷上保存した。

#### 2-2-5. ヌクレオソームの MNase 感受性試験

ヌクレオソーム (1.2 µg) と MNase (0.72 ユニット) を、50 mM Tris-HCl pH 8.0、25 mM NaCl、2.5 mM CaCl<sub>2</sub>、1.9 mM DTT となるように 60 µl の反応溶液を調製し、37°C で反応させた。その後、0 分から 15 分の間に、それぞれの時間で 10 µl ずつ回収し、5 µl のタンパク質分解溶液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM EDTA、0.1% SDS、0.5 mg/ml proteinase K) を加えて反応を停止させた。そして、反応産物を非変性 PAGE にて展開し、EtBr によって染色した。

#### 2-2-6. ヌクレオソームの熱安定性試験

ヌクレオソームの熱安定性試験は、先行研究 (Taguchi *et al.*, 2014; Arimura *et al.*, 2014) を参考に行った。22.5 pmol のヌクレオソームが、20 mM Tris-HCl pH 7.5、100 mM NaCl、1 mM DTT、5×SYPRO Orange (Sigma-Aldrich) となるように 20 µl

の反応溶液を調製した。調製した反応溶液のうち 19  $\mu$ l を 96 ウェル PCR プレートに入れ、StepOnePlus リアルタイム PCR (Applied Biosystems) を用いて、25°C から 95°C まで 1 分間で 1°C ずつ温度を上昇させ、その際の SYPRO Orange の蛍光シグナルを検出した。得られたシグナルの強度は以下の式に基づいて正規化した。ここで F(T) は T°C における蛍光強度を示す。

$$F(T)_{\text{normalized}} = [F(T) - F(26)] / [F(95) - F(26)]$$

### 2-2-7. ヌクレオソームの結晶化および構造決定

H2A.J を含むヌクレオソームの立体構造を決定するために、X 線結晶構造解析を行った。結晶化のために、精製した H2A.J ヌクレオソームを CCS バッファー (20 mM カコジル酸カリウム pH 6.0、1 mM EDTA) に透析し、3.0 mg/ml となるように限外濾過により濃縮した。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。1  $\mu$ l の H2A.J ヌクレオソームと、1  $\mu$ l のドロップ溶液 (20 mM カコジル酸カリウム pH 6.0、50 mM KCl、110 mM MnCl<sub>2</sub>) をカバーガラス上で混合した。その後、ただちにカバーガラスを 500  $\mu$ l のリザーバー溶液 (20 mM カコジル酸カリウム pH 6.0、40 mM KCl、70 mM MnCl<sub>2</sub>) が入った容器に被せて密封し、20°C で静置した。得られた結晶を 4°C にて、クライオプロテクト液に浸した後、液体窒素で瞬間凍結した。

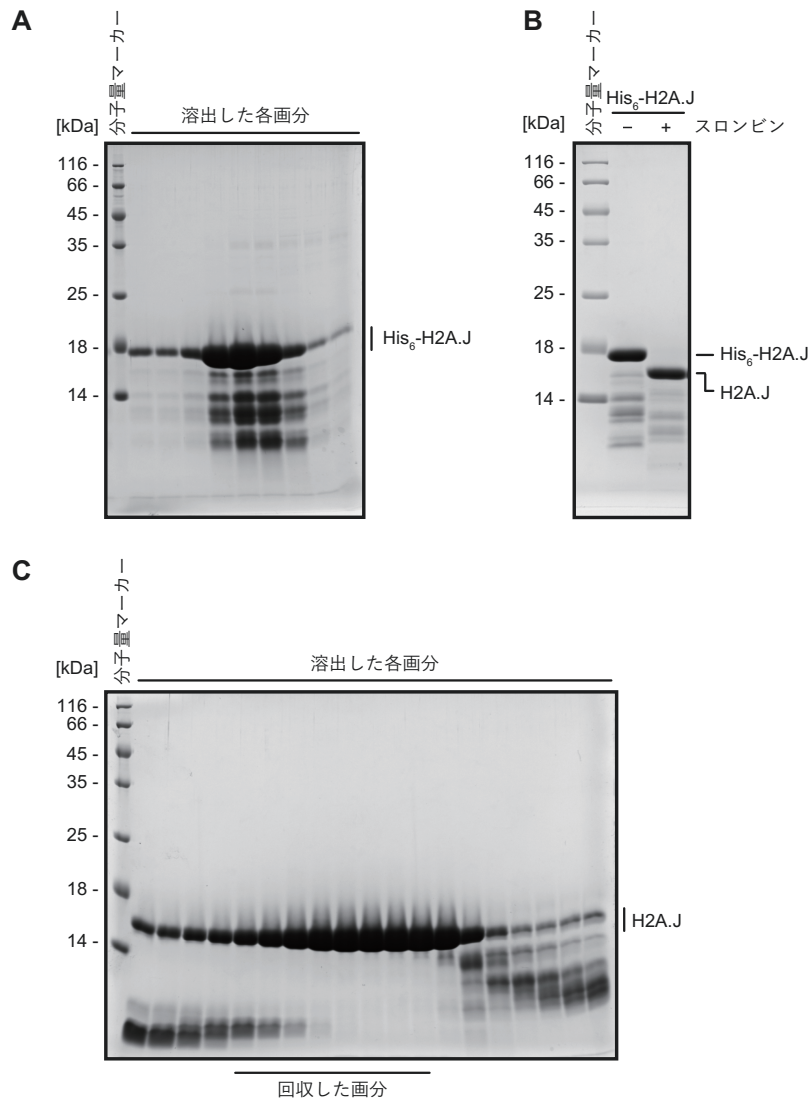
高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の BL-1A ビームラインおよび、大型放射光施設 SPring-8 の BL41XU ビームラインにて、凍結した H2A.J ヌクレオソームの結晶に X 線を照射し回折データを収集した。収集した回折データの

指数付け、積分、スケーリングには XDS ソフトウェア (Kabsch 2010a, b) を用いた。その後、既知のヌクレオソーム構造 (PDB ID: 5Y0C、Arimura *et al.*, 2018) をサーチモデルとして、Phaser プログラム (McCoy *et al.*, 2007) による分子置換法によって位相を決定した。その後、PHENIX ソフトウェア (Adams *et al.*, 2010) を用いた構造の精密化と COOT (Emsley *et al.*, 2004) を用いた手動でのモデル修正を繰り返すことで立体構造を決定した。結晶構造に関わる作図には PyMOL プログラム (<http://pymol.org>) を用いた。

## 2-3. 実験結果

### 2-3-1. ヒストンバリエント H2A.J および主要型ヒストンの精製

ヒストンバリエント H2A.J がヌクレオソームの構造に与える影響を調べるために、ヒストンバリエント H2A.J を含むヌクレオソームを解析した。そのため、ヒトの H2A.J を大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質として発現させ、精製した。精製方法はすべて主要型のヒストンと同じ方法 (Kujirai *et al.*, 2018) を用いた。まず、大腸菌 BL21 (DE3) で発現させた His<sub>6</sub> タグ融合 H2A.J を、変性条件下で Ni-NTA agarose を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって粗精製した (図 4A)。次に His<sub>6</sub>-H2A.J に含まれる His<sub>6</sub> タグをスロンビンによって切除した。His<sub>6</sub> タグが切除されていることを SDS-PAGE によって解析した (図 4B)。その結果、スロンビンを加える前後でバンドシフトが見られることから His<sub>6</sub> タグが切除されていることが考えられる。さらに、H2A.J を精製するために MonoS カラムを用いたカラムクロマトグラフィーを行い、分画したサンプルを SDS-PAGE によって解析した (図 4C)。解析の結果、H2A.J を高純度に精製することに成功し、これを最終精製物とした。



#### 図4 ヒストンタンパク質の精製

A. His<sub>6</sub> タグ融合 H2A.J (His<sub>6</sub>-H2A.J) を Ni-NTA agarose を用いたアフィニティークロマトグラフィーで粗精製した結果。溶出した各画分を SDS-PAGE によって展開した後、CBB によってタンパク質を染色した。

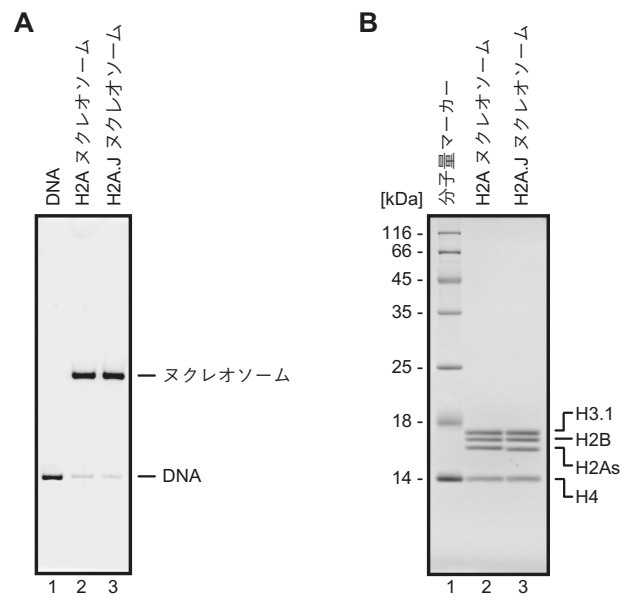
B. His<sub>6</sub>-H2A.J をスロンビンで処理した結果。

C. H2A.J を MonoS カラムクロマトグラフィーによって精製した結果。溶出した各画分を SDS-PAGE によって展開した後、CBB によってタンパク質を染色した。

### 2-3-2. H2A.J を含むヌクレオソームの再構成および精製

精製したヒストンを用いてヒストン八量体を再構成し、さらに 146 塩基対の  $\alpha$ -サテライト由来の二本鎖 DNA と混合し、塩透析法によってヌクレオソームを再構成した。再構成した DNA-ヒストン複合体を Prep Cell を用いた非変性 PAGE によって精製し、濃縮したサンプルを最終精製物とした。精製したヌクレオソームを非変性 PAGE で解析した結果、H2A.J ヌクレオソームは H2A ヌクレオソームと同様の単一バンドとして確認された (図 5A)。更に、精製したヌクレオソームを SDS-PAGE によって展開し、複合体中に含まれるタンパク質を解析した (図 5B)。その結果、H2A.J ヌクレオソームは主要型 H2A ヌクレオソームと同様に各種ヒストンのバンド強度が同程度であることが確認された。このことから、H2A.J は主要型 H2A と同様にヒストン八量体に DNA が巻き付いたヌクレオソーム構造を形成していることが示唆された。





### 図 5 ヌクレオソームの精製

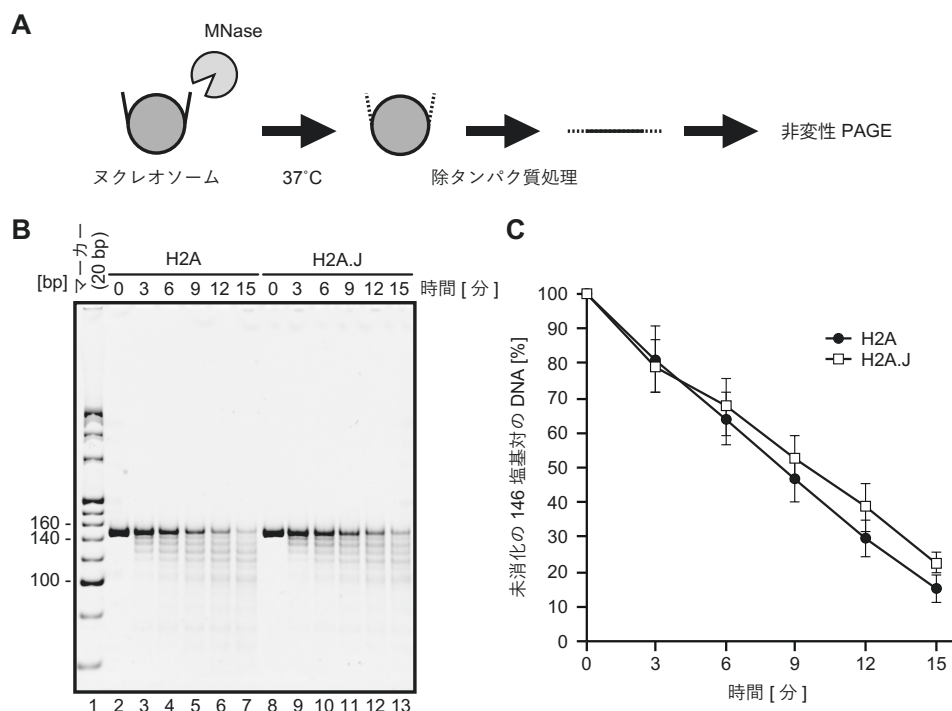
A. 再構成に用いた DNA、および精製した H2A あるいは H2A.J を含んだヌクレオソームを非変性 PAGE により展開し、EtBr によって DNA を染色した。  
(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)

B. 精製した H2A あるいは H2A.J を含んだヌクレオソームを SDS-PAGE によって展開し、CBB によってタンパク質を染色した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)

### 2-3-3. H2A.J を含むヌクレオソームの MNase 感受性解析

次に、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 146 塩基対の DNA がヒストン複合体に巻き付いた構造であるかを確認するために、MNase に対する感受性を解析した (図 6A)。MNase はヌクレアーゼの一種であり、タンパク質と結合していない DNA 領域を優先的に切断する性質を持つ。そのため、ヌクレオソームに対して MNase を反応させた場合には、ヒストン複合体から解離している DNA を優先して切断するため、ヌクレオソーム中でのヒストン複合体に巻き付いている DNA の長さを推定することができる。また、MNase 感受性が低い場合には DNA がヒストン複合体から解離する頻度が低いことを意味し、DNA 末端が安定的にヒストンに結合していることが示唆される。

再構成・精製した H2A ヌクレオソームおよび H2A.J ヌクレオソームについて MNase に対する感受性を解析した結果、MNase によって消化される DNA のバンドパターンを H2A と H2A.J とで比較すると、ともに 146 塩基対のバンド強度が徐々に減弱し、より短いさまざまな長さの DNA 断片が生じることが確認された (図 6B)。このことから、H2A.J ヌクレオソームは、主要型の H2A ヌクレオソームと同様に 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いることがわかった。またこの実験を 3 回行い、未消化の 146 塩基対の DNA 断片を定量し DNA の消化効率を見積もった (図 6C)。その結果、H2A.J ヌクレオソームは H2A ヌクレオソームと比べて、MNase 感受性が僅かであるが低かった。そのため、H2A.J ヌクレオソームは DNA 末端が安定的にヒストンと結合していることが示唆された。



## 図 6 MNase 感受性解析

A. MNase 感受性解析の模式図

B. 146 塩基対の  $\alpha$ -サテライト DNA を含む H2A ヌクレオソーム (レーン 2-7) あるいは H2A.J ヌクレオソーム (レーン 8-13) を MNase によって 0-15 分間反応させた。タンパク質分解処理後のサンプルを非変性 PAGE により展開し、EtBr によって DNA を染色した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)

C. H2A ヌクレオソームと H2A.J ヌクレオソームの MNase 感受性解析を 3 回行い、消化されなかった DNA 断片を定量した。3 回行った際の平均値をプロットし、標準偏差をエラーバーとして示した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)

#### 2-3-4. H2A.J を含むヌクレオソームの安定性解析

次に、H2A.J ヌクレオソームの安定性を熱安定性試験によって解析した。熱安定性試験は、目的タンパク質などを蛍光物質である SYPRO Orange と混合し、温度を上昇させた際のタンパク質の熱変性を蛍光シグナルとして検出することで目的タンパク質などの熱安定性を測定する試験である。SYPRO Orange は、タンパク質の疎水性表面に結合すると蛍光を発する性質を持つため、ヌクレオソームの場合では、温度上昇によってヌクレオソームが崩壊した際に、ヒストンタンパク質の疎水性表面が露出し、そこに SYPRO Orange が結合して蛍光を発する (Taguchi *et al.*, 2014)。

先行研究から、熱安定性試験において、ヌクレオソームの崩壊は 2 段階の反応で起こることが知られている (図 7A)。まず 1 段階目の反応として、ヌクレオソームから H2A-H2B 二量体が解離し、H3-H4 と DNA からなる複合体が保持される。2 段階目の反応として、H3-H4 が DNA から解離することでヌクレオソームは完全に崩壊する。先行研究 (Taguchi *et al.*, 2014) で報告されているように、主要型 H2A ヌクレオソームでは H2A-H2B が解離する 1 段階目のピークと、H3-H4 が解離する 2 段階目のピークが確認された (図 7B、C)。そこで H2A.J ヌクレオソームについて熱安定性試験を行ったところ、H2A ヌクレオソームと比較して、1 段階目のピークが高温側へシフトした。一方で 2 段階目のピークについては H2A ヌクレオソームと H2A.J ヌクレオソームとでは同じ位置にピークが見られた。この結果から、H2A.J が主要型の H2A type1-B/E と比べて、H2A-H2B 二量体がヌクレオソーム中に安定的に保持されるような、安定なヌクレオソーム

構造を形成していることが示唆された。H2A.Jヌクレオソームの構造安定性が高いという性質は、H2A.Jがクロマチンに安定的に保持されるために重要な性質であると考えられる。

次に、H2A.Jヌクレオソームの構造安定性を担うアミノ酸を同定するために、変異体解析を行った。先行研究 (Contrepois *et al.*, 2017) において、H2A.Jの細胞内での機能にはC末端領域が重要であることが示されている。そこでH2A.J特異的なC末端領域のアミノ酸配列に着目し、変異体を設計した。具体的にはH2A.J特異的なC末端領域のアミノ酸配列 QKTKSK を主要型 H2A type1-B/E のC末端領域のアミノ酸配列 HHKAKGK に置換した H2A.J<sub>csw</sub> を作製した。精製した H2A.J<sub>csw</sub> を用いて、ヌクレオソームの再構成および精製を行った。その結果、H2A.J<sub>csw</sub> は野生型の H2A.J と同様の効率でヌクレオソームを形成することが明らかになった (図 8A、B)。精製した H2A.J<sub>csw</sub> ヌクレオソームを用いて熱安定性試験を行った結果、H2A.J<sub>csw</sub> ヌクレオソームは野生型の H2A.J ヌクレオソームと類似した熱変性のプロファイルが得られた (図 8C、D)。このことから、H2A.Jの特異的なC末端領域は、H2A.Jヌクレオソームに見られる構造安定性に寄与しないことが明らかになった。

次に、H2A.Jの16番目のセリン、40番目のアラニン、99番目のリジンを、それぞれ対応する H2A type1-B/E のスレオニン、セリン、アルギニンに置換した、H2A.J (S16T)、H2A.J (A40S)、H2A.J (K99R) を作製した。精製した点変異体 H2A.J を含むヌクレオソームの再構成および精製を行った。その結果、各点変異体 H2A.J は野生型の H2A.J と同様の効率でヌクレオソームを形成することが明

らかになった (図 9A、B)。精製した各点変異体 H2A.Jヌクレオソームを用いて熱安定性試験を行った結果、H2A.J (S16T)、H2A.J (K99R)ヌクレオソームは、野生型の H2A.Jヌクレオソームとほぼ同じ熱変性のプロファイルが得られた (図 9C、D 左および右のパネル)。一方で、H2A.J (A40S)ヌクレオソームは、野生型の H2A.Jヌクレオソームと比べて 1 段階目のピークが低温側へシフトする、つまり H2A.J (A40S)ヌクレオソームは野生型の H2A.Jヌクレオソームと比べて熱安定性が低いことが確認された (図 9C、D 中央のパネル)。このことから、40 番目のアラニンが H2A.J の構造安定性に重要であることが明らかになった。

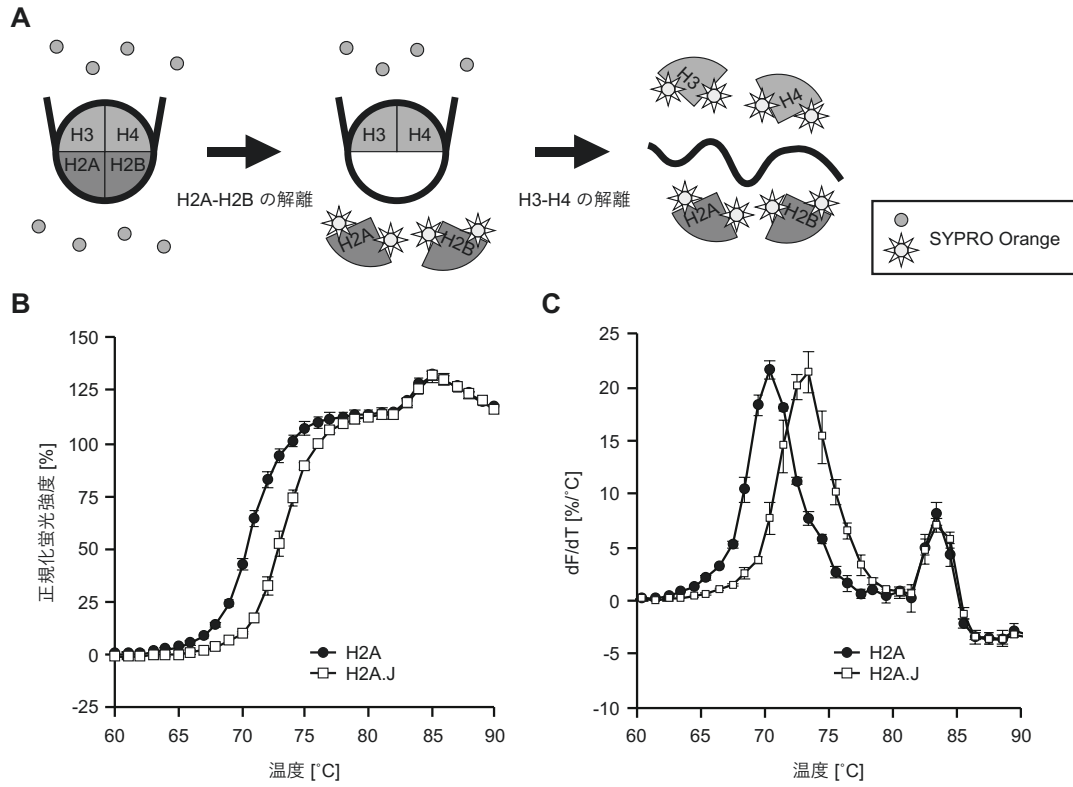
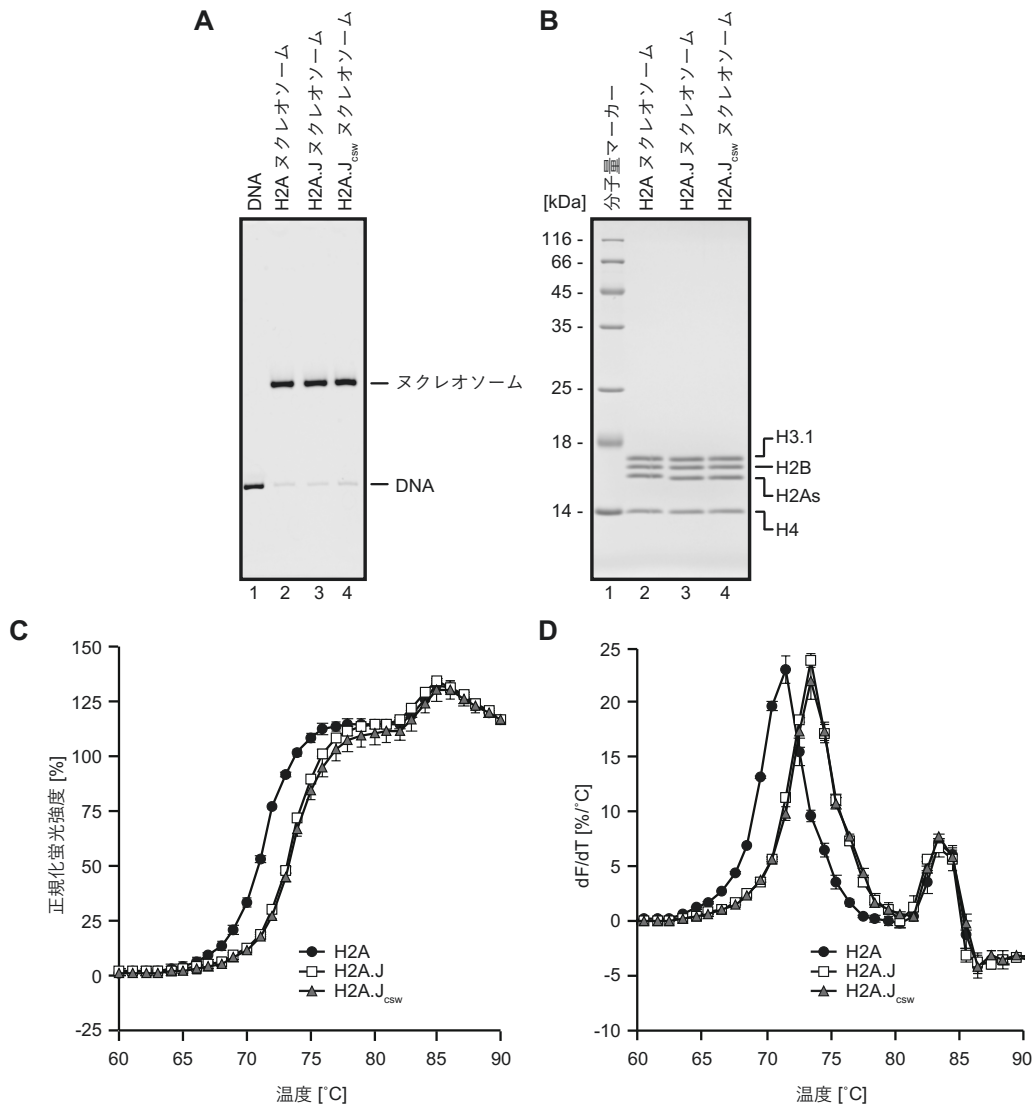


図7 H2A.Jを含むヌクレオソームの安定性解析

A. ヌクレオソームの熱安定性試験の模式図

B. H2AあるいはH2A.Jヌクレオソームの、各温度における蛍光シグナルの強度を正規化し、プロットした。試験は3回行い、平均値と標準偏差を図に示した。(Tanaka *et al.*, 2019より引用、改変)

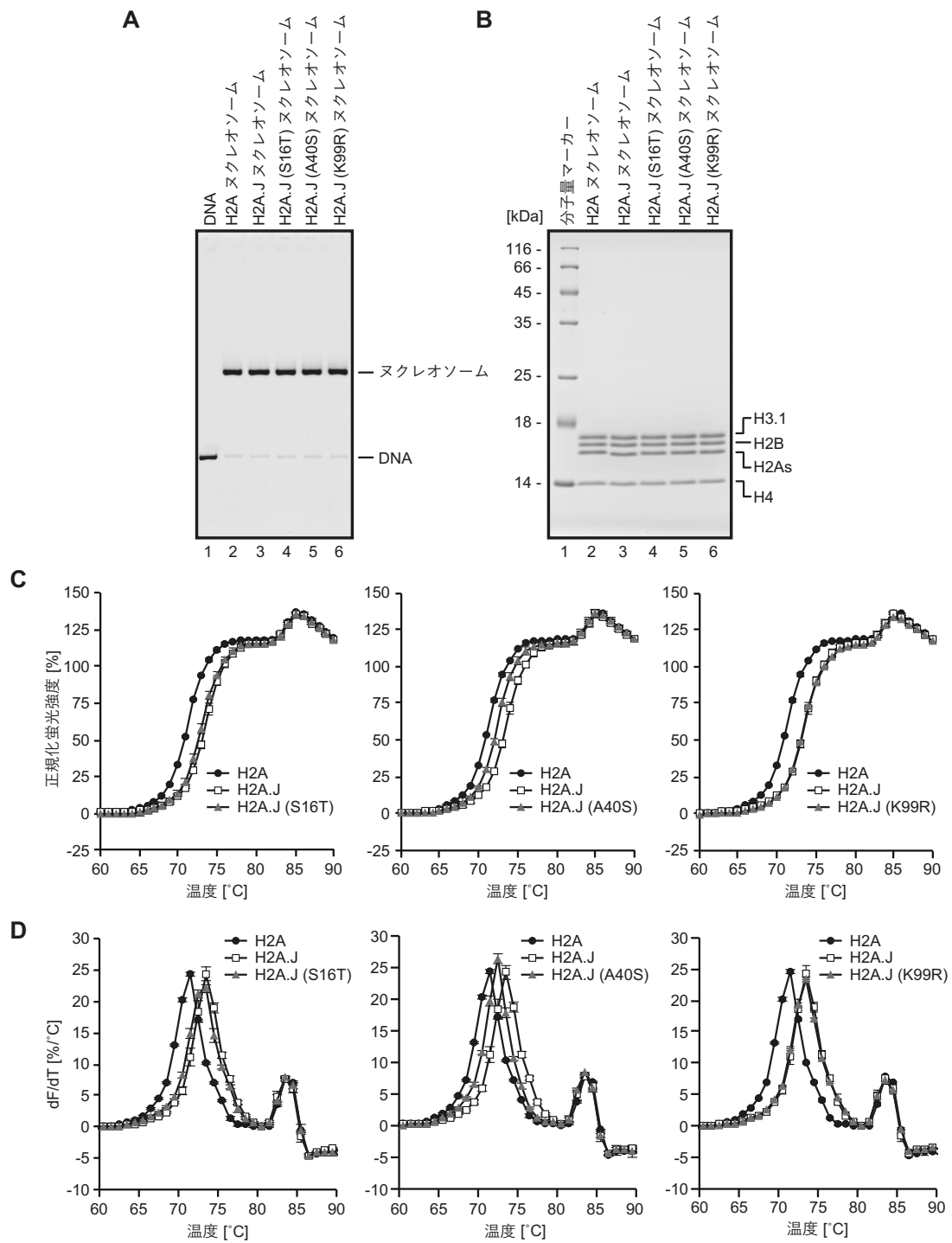
C. パネルBの蛍光シグナル強度の微分プロット。試験は3回行い、平均値と標準偏差を図に示した。(Tanaka *et al.*, 2019より引用、改変)



**図 8 H2A.J<sub>csw</sub> を含むヌクレオソームの安定性解析**

- A. 再構成に用いた DNA、および精製した H2A、H2A.J あるいは H2A.J<sub>csw</sub> ヌクレオソームを非変性 PAGE により展開し、EtBr によって DNA を染色した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)
- B. 精製した H2A、H2A.J あるいは H2A.J<sub>csw</sub> ヌクレオソームを SDS-PAGE によって展開し、CBB によってタンパク質を染色した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)
- C. H2A、H2A.J および H2A.J<sub>csw</sub> ヌクレオソームの各温度における蛍光シグナルの強度を正規化し、プロットした。試験は 3 回行い、平均値と標準偏差を図に示した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)
- D. パネル C の蛍光シグナル強度の微分プロット。試験は 3 回行い、平均値と標準偏差を図に示した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)





## 図 9 H2A.J 変異体を含むヌクレオソームの安定性解析

A. 再構成に用いた DNA、および精製した H2A、H2A.J あるいは H2A.J 変異体ヌクレオソームを非変性 PAGE により展開し、EtBr によって DNA を染色した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)

B. 精製した H2A、H2A.J あるいは H2A.J 変異体ヌクレオソームを SDS-PAGE によって展開し、CBB によってタンパク質を染色した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)

C. H2A、H2A.J および H2A.J 変異体ヌクレオソームの各温度における蛍光シグナルの強度を正規化し、プロットした。試験は 3 回行い、平均値と標準偏差を図に示した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)

D. パネル C の蛍光シグナル強度の微分プロット。試験は 3 回行い、平均値と標準偏差を図に示した。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)

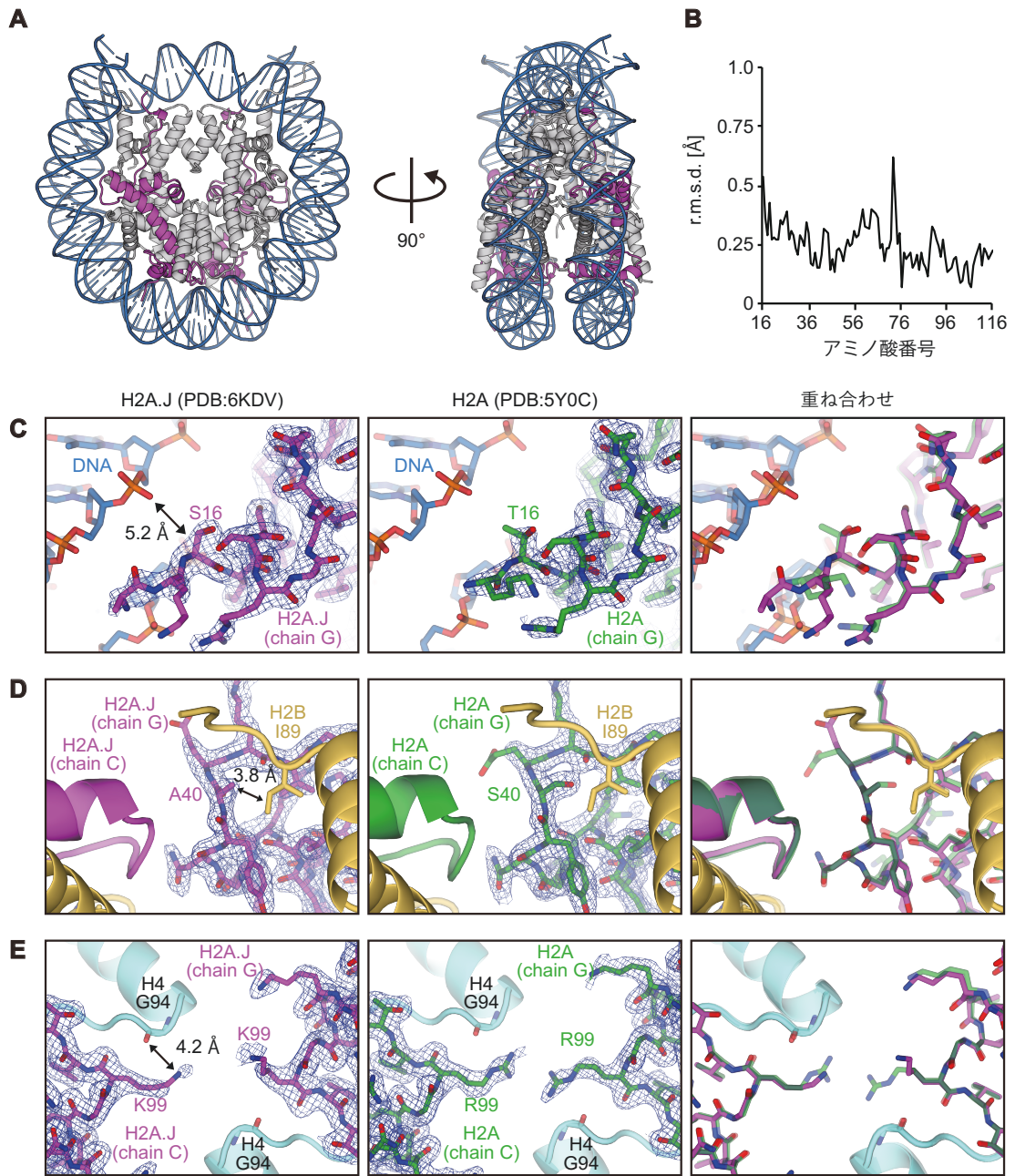
パネル C と D において、左、中央、右の 3 つのパネルで H2A ヌクレオソームと H2A.J ヌクレオソームはそれぞれ同じ蛍光シグナルデータである。

### 2-3-5. H2A.J を含むヌクレオソームの構造解析

H2A.J ヌクレオソームの構造安定性解析の結果、H2A ヌクレオソームと比べて、H2A.J ヌクレオソームは安定な構造体であることがわかった。そこでその詳細な分子機構を明らかにするために、H2A.J ヌクレオソームの X 線結晶構造解析を行い、H2A.J ヌクレオソームの立体構造を決定することとした。精製した H2A.J ヌクレオソームを用いてハンギングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行った。得られた結晶を用いて X 線回折実験を行い、回折データを収集し、解析することで H2A.J ヌクレオソームの立体構造を 2.21 Å 分解能で決定した (図 10A)。構造解析における統計値を表 2 に示す。結晶構造から、H2A.J ヌクレオソームの全体構造は、主要型の H2A type1-B/E を含むヌクレオソームと非常に類似していることが明らかになった。

構造決定した H2A.J ヌクレオソーム (PDB ID: 6KVD) と、既知の H2A ヌクレオソームの立体構造 (PDB ID: 5Y0C) とを構造比較した (図 10B-E)。H2A.J ヌクレオソームと H2A ヌクレオソームを重ね合わせた際の、H2A.J 分子と H2A 分子の主鎖の C $\alpha$  の距離を計算した結果、主鎖に関して大きく構造が異なる領域はなかった (図 10B)。図 10B において、73 番目のアミノ酸付近で r.m.s.d. が高い値となっているが、これはもともと 73 番目のアミノ酸付近は結晶構造中において原子の揺らぎが大きい領域であり、揺らぎが大きい領域同士で主鎖の C $\alpha$  の距離を比較したためであり、アミノ酸の違いによる構造変化ではないと考えられる。構造決定した H2A.J ヌクレオソームにおいて、H2A.J 特異的な 10 番目のバリンを含む N 末端のテール領域および C 末端のテール領域は結晶中で運動性が

高いため、構造が見えなかった。そこで、その他の H2A.J で特徴的な 16 番目のセリン、40 番目のアラニン、99 番目のリジン周辺の構造について、主要型 H2A type1-B/E の対応するアミノ酸の周辺の構造とより詳細に比較した。3-5 の熱安定性解析の結果から H2A.J の構造安定性に関わらないことが明らかになった 16 番目のセリンおよび 99 番目のリジンと、対応する H2A ヌクレオソームの 16 番目のスレオニンおよび 99 番目のアルギニンとの間の r.m.s.d. はそれぞれ 0.5 Å と 0.2 Å であり、主鎖の構造に大きな違いがないことが分かった (図 10B)。また、H2A.J の 16 番目のセリンは DNA のリン酸骨格と、H2A.J の 99 番目のリジンは H4 の 94 番目のグリシンに近い位置にあるが、距離を測るとそれぞれ 5.2 Å と 4.2 Å であったことから、これらは相互作用していないと考えられる (図 10C、E)。そして、興味深いことに、変異体解析の結果 H2A.J の構造安定性に関わることが明らかになった、L1 ループ領域内にある H2A.J の 40 番目のアラニンについても、対応する H2A の 40 番目のセリンの主鎖との間の r.m.s.d. は 0.2 Å であったことから、主鎖の構造に関して大きな違いがないことが明らかになった。一方で、H2A.J の 40 番目のアラニンの疎水性の側鎖が、H2B の 89 番目のイソロイシンの疎水性の側鎖と 3.8 Å の距離にあることがわかった。一般的に、疎水性の側鎖が集まることで疎水性のコアを形成し、安定な構造を形成する。このことから、H2A.J の 40 番目のアラニンによる H2A.J ヌクレオソームの安定化は、40 番目のアミノ酸が親水性のセリン残基から疎水性のアラニン残基に変化したことによる、側鎖のわずかな疎水性の変化によるものであると推測される。



### 図 10 H2A.Jヌクレオソームの立体構造

A. H2A.Jヌクレオソームの全体構造 (PDB ID: 6KVD)。構造中において H2A.J の分子をマゼンタで示した。

B. H2A.Jヌクレオソームと H2Aヌクレオソームを重ね合わせた後、H2A.J分子と H2A分子の各アミノ酸の C $\alpha$ 原子の r.m.s.d.を計算した。2分子の H2A分子 (chain C と chain G) の r.m.s.d.の平均値を縦軸、アミノ酸番号を横軸としてプロットした。(Tanaka *et al.*, 2019 より引用、改変)

C、D、E. H2A.Jに特徴的な S16、A40、K99の周辺構造 (左のパネル)、それに対応する H2Aヌクレオソーム (PDB ID: 5Y0C) の T16、S40、R99の周辺構造 (中央のパネル)。Contour level  $1.2\sigma$  (CおよびD) あるいは  $0.7\sigma$  (E) を閾値として、電子密度マップを表示した。右のパネルには H2A.Jと H2Aの 16番目、40番目、99番目のアミノ酸の周辺構造を重ね合わせたものを表示した。

表 2 結晶構造解析の統計値

	H2A.J nucleosome
<b>Data collection</b>	
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	99.64, 108.79, 171.18
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90.000, 90.000, 90.000
Resolution (Å)*	50.0-2.21 (2.34-2.21)
No. of unique reflections*	93881 (14912)
Completeness (%)*	99.9 (99.4)
R <sub>merge</sub> (%)*	17.6 (200.4)
Mean I/ $\sigma$ (I)*	13.05 (1.25)
CC <sub>1/2</sub> (%)*	99.8 (52.0)
Redundancy*	14.0 (14.4)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)*	47.84-2.21 (2.24-2.21)
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> (%)	21.27 / 25.74
No. atoms	
Protein	5979
DNA	5983
Water	292
Ion	17
B factors (Å <sup>2</sup> )	
Protein	38.71
DNA	63.77
Water	40.16
Ion	62.62
r.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.010
Bond angles (°)	1.11
Ramachandran favored (%)	98.64
Ramachandran outliers (%)	0.00
PDB ID	6KVD

\* 括弧内の値は、最外殻分解能における情報を示す。

## 2-4. 考察

### 2-4-1. H2A.Jヌクレオソームの老化細胞での役割

ヒストン H2A バリエントの一つである H2A.J は、最近の研究により、老化細胞に集積しており、老化細胞で見られる SASP 現象に関与する遺伝子の発現制御に寄与することが示唆されている (Contrepolis *et al.*, 2017)。そのため、H2A.J は主要型 H2A とは異なる性質・機能を持つ可能性が考えられる。そこで本研究では H2A.J ヌクレオソームの物理的性質および立体構造に焦点を当てて解析した。その結果、*in vitro* において 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、H2A-H2B 二量体がヌクレオソーム中に保持されやすいことが明らかになった。これまでに *in vitro* において安定性の低いヌクレオソームは *in vivo* においても不安定であり、*in vitro* において安定性の高いヌクレオソームは *in vivo* でも安定である、といった一定の相関関係がある (Horikoshi *et al.*, 2013; Kujirai *et al.*, 2016; Urahama *et al.*, 2016; Harada *et al.*, 2018; Horikoshi *et al.*, 2019)。そのため H2A.J も生体内において、主要型 H2A type1-B/E よりも安定的にクロマチンに取り込まれてヌクレオソームを形成していることが期待される。老化細胞における SASP 現象に関与する遺伝子発現制御においては、H2A.J 特異的な C 末端領域が機能的に重要であることが知られているが (Contrepolis *et al.*, 2017)、本研究の解析からはこの C 末端領域はヌクレオソームの物理的性質および立体構造には影響を与えないことが確認された。このことから H2A.J 特異的な C 末端領域は、先行研究 (Contrepolis *et al.*, 2017) で提唱されているように、H2A.J の C 末端領域を特異的に認識するようなタンパク質が存在し、そのタン



パク質が結合することで SASP 関連遺伝子の発現が調節されているのかもしれない。つまり H2A.J が特定の DNA 領域に取り込まれた際に、安定なヌクレオソーム構造を維持しており、その H2A.J ヌクレオソームをターゲットとする何かしらの因子をリクルートし、その因子を安定的にその領域にとどめることが老化細胞における H2A.J の機能として重要なのではないかと考えている。H2A.J の C 末端領域には、ヒストンバリエント H2A.X の C 末端領域の SQ モチーフ配列に似た配列が存在する。H2A.X の場合はこの SQ モチーフ中のセリン残基がリン酸化を受け、このモチーフを認識するタンパク質が集積する (Kinner *et al.*, 2008)。H2A.J の SQ モチーフがリン酸化を受けるかは現時点では不明であるが、今後の解析が期待される。

#### 2-4-2. H2A の L1 ループの多様性

変異体解析の結果、H2A.J の構造安定性に寄与するアミノ酸は 40 番目のアラニンであることが明らかになった。この 40 番目のアラニンは H2A の中でも L1 ループと呼ばれる領域に存在する (図 10D)。H2A の L1 ループ領域はヌクレオソーム分子の中で、2 分子の H2A が近接する領域であり、H2B や DNA とも近い距離にある。これまでの先行研究から、H2A のヒストンバリエントである H2A.Z および macroH2A は主要型 H2A と L1 ループ領域に構造差異があること、L1 ループが構造安定性および細胞内動態に寄与することが知られている (Chakravarthy *et al.*, 2005; Chakravarthy and Luger, 2006 ; Horikoshi *et al.*, 2013; Horikoshi *et al.*, 2019)。本研究結果から、H2A.J の場合、L1 ループ領域のアミノ

酸の主鎖の構造変化を起こすことなく構造安定性を変化させていることが明らかになった。このことから、L1 ループのアミノ酸置換は構造変化に伴わずとも構造安定性に寄与するという新たな知見を得た。

ヒトの場合、主要型 H2A は 11 種類存在し、その中には今回の研究で構造安定性に寄与することが明らかになった 40 番目のアミノ酸について、セリンである主要型 H2A と、H2A.J と同じくアラニンである主要型 H2A の 2 タイプがある (図 2)。そのため、主要型 H2A もセリン型とアラニン型とで構造安定性が異なることが想定される。近年、主要型 H2A アイソフォームのひとつである H2A type1-C はエストロゲン受容体標的遺伝子の制御に関わること、テロメアの反復配列上に局在してゲノム安定性に寄与することが報告がされている (Su *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2016)。このように特定の主要型 H2A アイソフォームの特徴的な機能に、主要型 H2A に複数存在するアミノ酸多型による構造安定性の違いが寄与している可能性が考えられる。

## 第3章 *ALB1* enhancer 配列を含むヌクレオソームの生化学的解析および構造生物学的解析

### 3-1. 序

DNA 配列はヌクレオソーム構造を規定する上で重要な因子の一つである。しかしながら、これまでにヌクレオソームの構造解析に主に用いられてきた DNA 配列は  $\alpha$ -サテライト由来 DNA と Widom 601 DNA の 2 種類の人工的な DNA 配列である。クロマチンにおけるゲノム DNA の機能発現制御を理解する上では、生体内の天然の DNA 配列を含んだヌクレオソームの構造および性質を知る必要がある。

そこでマウス *ALB1* enhancer (N1) 配列に注目した。マウス *ALB1* enhancer (N1) 配列は、生体内でヌクレオソームを形成しており、さらに複数の転写因子も結合することが知られている (Cirillo and Zaret, 1999; Cirillo *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2019)。しかしながら、*ALB1* enhancer (N1) 配列を含んだヌクレオソーム自体の構造や性質は不明である。そこで *ALB1* enhancer (N1) 配列を含むヌクレオソームを再構成・精製し、生化学的解析および構造生物学的解析を行った。本章ではこれらの結果について述べる。

## 3-2. 実験方法

### 3-2-1. ヒストンタンパク質の精製およびヒストン複合体の調製

ヒストンタンパク質は、2-2-1 と同様の方法で大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質として精製した。精製したヒストンタンパク質を用いて、2-2-2 と同様の方法でヒストン複合体を調製した。

### 3-2-2. スクレオソーム再構成用の DNA の精製

第3章の研究では、Widom 601 DNA（以下、601 DNA と表記）とマウス *ALB1* enhancer (N1) DNA の2種類の DNA 配列を用いた。

これらの二本鎖 DNA 断片を二通りの方法で精製した。1つ目の方法は、先行研究 (Dyer *et al.*, 2004) を参考にした、大腸菌内で増幅させたプラスミド DNA から精製する方法である。まず、目的の DNA が *EcoRV* 認識配列を介してタンデムに並んだ配列を挿入したプラスミド DNA を大腸菌内で増幅させた。その後大腸菌からプラスミド DNA を精製し、*EcoRV* で処理することで目的の DNA 断片を切り出した。その後、PEG 沈殿法によりベクター DNA と目的 DNA 断片とを分画し、最後に TSK gel DEAE-5PW カラム (TOSOH) を用いて精製した。2つ目は目的 DNA 断片を PCR により増幅し、精製する方法である。この方法ではまずプラスミド DNA をテンプレートに PCR 法により目的の DNA 断片を増幅させる。その後、フェノール・クロロホルム抽出により酵素等を除去し、最後に分取用電気泳動装置 Model 491 Prep Cell (Bio-Rad) を用いた非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製した。大腸菌を用いた精製方法では、601

DNA 配列を含んだ 147 塩基対の 601 配列（以下、147 bp 601 DNA と表記）、193 塩基対の 601 配列（以下、193 bp 601 DNA と表記；Arimura *et al.*, 2012）および *ALBI* enhancer DNA に *EcoRV* 認識配列を加えた 186 塩基対の *ALBI* enhancer DNA 配列（以下、186 bp *ALBI* DNA と表記）、147 塩基対の *ALBI* right position DNA（以下、147 bp *ALBI* right DNA）を精製した。また PCR を用いた精製方法では、DNA の片側の 5'末端が Cy5 でラベルされた 147 塩基対の 601 配列（以下、Cy5-147 bp 601 DNA と表記）と 147 塩基対の *ALBI* enhancer right DNA（以下、Cy5-147 bp *ALBI* right DNA と表記）および 180 塩基対の *ALBI* enhancer DNA（以下、180 bp *ALBI* DNA と表記）を精製した。精製した二本鎖 DNA 断片の片方の鎖の配列を以下に示す。

#### 147 bp 601 DNA

(5'-)ATCGAGAATCCCGGTGCCGAGGCCGCTCAATTGGTCGTAGACAGCTCTA  
GCACCGCTTAAACGCACGTACGCGCTGTCCCCCGCGTTTTTAACCGCCAAGGG  
GATTACTCCCTAGTCTCCAGGCACGTGTCAGATATATACATCCGAT(-3')

#### 193 bp 601 DNA

(5'-)ATCGGACCCTATCGCGAGCCAGGCCTGAGAATCCGGTGCCGAGGCCGCT  
CAATTGGTCGTAGACAGCTCTAGCACCGCTTAAACGCACGTACGCGCTGTCC  
CCCGCGTTTTTAACCGCCAAGGGGATTACTCCCTAGTCTCCAGGCACGTGTCA  
GATATATACATCCAGGCCTTGTGTCGCGAAATTCATAGAT(-3')

186 bp *ALBI* DNA

(5'-)ATCCGAGATGGTACTTTGTGTCTCCTGCTCTGTCAGCAGGGCACTGTACT  
TGCTGATACCAGGGAATGTTTGTCTTAAATACCATCATTCCGGACGTGTTTG  
CCTTGGCCAGTTTTCCATGTACATGCAGAAAGAAGTTTGGACTGATCAATAC  
AGTCCTCTGCCTTTAAAGCAATAGGAAAGAT(-3')

147 bp *ALBI* right DNA

(5'-)ATCAGGGCACTGTACTTGCTGATACCAGGGAATGTTTGTCTTAAATACC  
ATCATTCCGGACGTGTTTGCCTTGGCCAGTTTTCCATGTACATGCAGAAAGAA  
GTTTGGACTGATCAATACAGTCCTCTGCCTTTAAAGCAATAGAT(-3')

Cy5-147 bp 601 DNA

(5'-(Cy5-)ATCGAGAATCCCGGTGCCGAGGCCGCTCAATTGGTCGTAGACAGC  
TCTAGCACCGCTTAAACGCACGTACGCGCTGTCCCCGCGTTTTAACCGCCA  
AGGGGATTACTCCCTAGTCTCCAGGCACGTGTCAGATATATACATCCGAT(-3')

Cy5-147 bp *ALBI* right DNA

(5'-(Cy5-)AGCAGGGCACTGTACTTGCTGATACCAGGGAATGTTTGTCTTAAA  
TACCATCATTCCGGACGTGTTTGCCTTGGCCAGTTTTCCATGTACATGCAGAA  
AGAAGTTTGGACTGATCAATACAGTCCTCTGCCTTTAAAGCAATAGGA(-3')

180 bp *ALBI* DNA

(5'-)CGAGATGGTACTTTGTGTCTCCTGCTCTGTCAGCAGGGCACTGTACTTGC  
TGATACCAGGGAATGTTTGTCTTAAATACCATCATTCCGGACGTGTTTGCCTT  
GGCCAGTTTTCCATGTACATGCAGAAAGAAGTTTGGACTGATCAATACAGTC  
CTCTGCCTTTAAAGCAATAGGAAA(-3')

### 3-2-3. ヌクレオソームの試験管内再構成および精製

精製したヒストン複合体と *ALBI* DNA あるいは 601 DNA を用いて、2-2-3 と同様の方法でヌクレオソームを再構成・精製した。

### 3-2-4. MNase を用いたヌクレオソームポジショニングの解析

ヌクレオソームの形成位置を解析するために、MNase を用いてヌクレオソームのポジショニングを解析した。まずヌクレオソームを 20 mM HEPES-NaOH pH 7.5、1 mM DTT のバッファーに透析しバッファーを交換した。このヌクレオソームに対して、最終濃度が 0.5% になるようにホルムアルデヒドを加え、25°C で 30 秒間静置して DNA とヒストンタンパク質を架橋し、次に最終濃度が 200 mM になるようにグリシンを加えて架橋反応を停止させた。その後、再度 TCS バッファーに透析しバッファーを交換した。架橋したヌクレオソーム (0.6 µg) と MNase (0.24 ユニット) を 50 mM Tris-HCl pH 8.0、25 mM NaCl、2.5 mM CaCl<sub>2</sub>、1.9 mM DTT となるように 60 µl の反応溶液を調製し、37°C で反応させた。その後、各時間で 10 µl ずつ回収し、5 µl のタンパク質分解溶液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM EDTA、0.1% SDS、0.5 mg/ml proteinase K) を加えて反応を停止させた。その後 DNA とヒストン間の架橋を外すために、最終濃度が 420 mM になるように NaCl を加えて 65°C で一晩静置した。その後、反応産物の一部を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により展開し、EtBr で染色した。およそ 145 塩基対まで DNA が消化されたことを確認した反応産物について、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて DNA 断片を精製し、Klenow fragment

および T4 polynucleotide kinase で処理した。その後、*EcoRV* を用いて直鎖化し、CIAP を用いて脱リン酸化処理した pGEM-T-easy ベクターにライゲーションし挿入した。挿入した DNA 配列について、DNA シーケンスを解析した。シーケンス解析は FASMAC に外注した。

### 3-2-5. 次世代シーケンサーを用いたヌクレオソームポジショニング解析

ヌクレオソーム (0.6  $\mu\text{g}$ ) と MNase (0.24 ユニット) を 50 mM Tris-HCl pH 8.0、25 mM NaCl、2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、1.9 mM DTT となるように 60  $\mu\text{l}$  の反応溶液を調製し、37°C で反応させた。その後、各時間で 10  $\mu\text{l}$  ずつ回収し、5  $\mu\text{l}$  のタンパク質分解溶液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM EDTA、0.1% SDS、0.5 mg/ml proteinase K) を加えて反応を停止させた。その後、反応産物の一部を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により展開し、EtBr で染色した。およそ 145 塩基対まで DNA が消化されたことを確認した反応産物について、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて DNA 断片を精製し、Illumina MiSeq (Illumina K.K.; USA) を用いて DNA シーケンス解析を行った。その後のデータ処理には、FLASH (Magoc *et al.*, 2011; version 1.2.11, option: -m 10 -M 200)、および BOWTIE (Langmead *et al.*, 2009; version 1.2, options: -v3 -m1) を用いた。



### 3-2-6. FoxA1 (170-472)の精製

まずヒト FoxA1 (170-472)をコードする DNA 断片を、大腸菌用のタンパク質発現ベクターである pET21a (Novagen) を改変したベクターの *NdeI* サイトと *XhoI* サイトの間に挿入した。このプラスミド DNA を用いることで、ヒト FoxA1 (170-472)の C 末端に PreScission 認識配列と SUMO-His<sub>6</sub> タグが付加されたタンパク質として大腸菌内で発現させることが可能である。このプラスミド DNA で大腸菌 BL21 (DE3) CodonPlus RIL 株(Stratagene)を形質転換した。形質転換した大腸菌を、100 µg/ml のアンピシリンを含む LB プレート上で、37°C で一晚培養した。プレート上のコロニーを、50 µg/ml のアンピシリン、17.5 µg/ml のクロラムフェニコールを含む LB 培地に植菌し、30°C で培養した。OD<sub>600</sub> 値が 0.8 になった時点で、終濃度 0.5 mM になるように IPTG を加え、18°C で一晚培養した。その後、遠心分離により菌体を回収し、バッファー1 (50 mM Tris-HCl pH 7.5、500 mM NaCl、5%グリセロール、1 mM PMSF) に懸濁し、超音波処理した。FoxA1(170-472)-SUMO-His<sub>6</sub> は不溶性画分に存在するため、超音波破碎後の不溶性画分を遠心分離によって分離し、バッファー2 (50 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl、7 M グアニジン塩酸塩、5% グリセロール) を加えて超音波処理した後、4°C で一晚転倒混和し、目的タンパク質を可溶化した。その後、遠心分離を行い、可溶化した目的タンパク質を含む上清を回収した。回収した上清画分を Ni-NTA agarose beads (Qiagen) と混合し、4°C で1時間転倒混和し、目的タンパク質をビーズに吸着させた。その後、ビーズをエコノカラムに充填し、バッファー3 (50 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl、6 M 尿素、5% グリセロール、5 mM イミダゾール)

で洗浄した。そして 5-500 mM イミダゾールの直線濃度勾配で溶出した。FoxA1 (170-472)-SUMO-His<sub>6</sub> を含む画分を回収し、透析バッファー1 (50 mM Tris-HCl pH 7.5、500 mM NaCl、10 % グリセロール、2 mM 2-メルカプトエタノール) に透析した。その後、PreScission protease を加えて、透析バッファー2 (20 mM Tris-HCl pH 7.5、200 mM NaCl、10% グリセロール、2 mM 2-メルカプトエタノール) に透析した。SUMO-His<sub>6</sub> タグを切除した FoxA1 (170-472) を MonoS 5/50 (GE Healthcare) カラムを用いて精製し、透析バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、100 mM NaCl、10% グリセロール、2 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM MgCl<sub>2</sub>) に透析した。透析後、液体窒素で急速凍結して -80°C で保存した。

### 3-2-7. FoxA1 結合試験

186 bp *ALB1* nucleosome (終濃度 0.2 μM) と FoxA1 (170-472) の終濃度が 0, 0.4, 0.8 μM になるように混合し、10 μl の反応液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5、100 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT) 中で、室温で 30 分間静置した。反応液を非変性 PAGE により展開し、EtBr によって染色した。

### 3-2-8. クライオ電子顕微鏡測定用サンプルの調製

*ALB1* ヌクレオソームをクライオ電子顕微鏡で観察するために、GraFix 法 (Kastner *et al.*, 2008) によりサンプルを調製した。186 塩基対の *ALB1* enhancer 配列を用いて再構成したヌクレオソーム (最終濃度 4 μM) と FoxA1 (170-472) (最終濃度 12.2 μM) を、20 mM Tris-HCl pH 7.5、50 mM NaCl、0.25 mM MgCl<sub>2</sub>、

0.25 mM 2-メルカプトエタノール、0.25 mM DTT となるように調製し、室温で 30 分間静置した。静置した反応溶液を、GraFix バッファーA (10 mM HEPES-NaOH pH 7.5、20 mM NaCl、1 mM DTT、5%スクロース) および GraFix バッファーB (10 mM HEPES-NaOH pH 7.5、20 mM NaCl、1 mM DTT、25%スクロース、4%パラホルムアルデヒド) を使って作成した濃度勾配溶液の上に積層した。濃度勾配の作製には Gradient Master (BIOCOMP) を用いた。その後、密度勾配溶液を、SW28 ローター (Beckman Coulter) を用い 4°C、27,000 rpm の条件で、16 時間遠心分離した。遠心後の密度勾配の上層から 1.3 ml ずつ回収し、ヌクレオソームが含まれる画分を、電顕バッファー (10 mM HEPES-NaOH pH 7.5、1 mM DTT) に透析した。透析後のサンプルは限外濾過により濃縮した。

### 3-2-9. クライオ電子顕微鏡によるヌクレオソームの測定および構造決定

GraFix 法で精製したサンプルを用いて、クライオ電子顕微鏡による観察を行った。精製したサンプル 2.5  $\mu$ l を Quantifoil (R1.2/1.3 200-mesh Cu) グリッドにのせ、Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher, Hillsboro, USA) を用いて、液化エタンで瞬間凍結した。作製したグリッドはクライオ電子顕微鏡 Talos Arctica (Thermo Fisher, Hillsboro, USA) および Falcon 3 検出器 (Thermo Fisher, Hillsboro, USA) を用いて観察し、データを取得した。

撮影したデータは MOTIONCOR2 (Zheng *et al.*, 2017) を用いてフレームをアライメントした。その後の画像処理は RELION 2.1 ソフトウェア (Scheres, 2012; Scheres, 2016) を用いて行った。60 Å の low pass filter をかけた既知のヌクレオ

ソーム構造 (PDB ID:3LZ0、Vasudevan *et al.*, 2012) を初期構造とし、三次元構造を再構成した。最終の三次元構造の分解能は、Fourier Shell Correlation (FSC) の値が 0.143 となる値とした (Scheres, 2016)。密度マップは MAPMAN (Kleywegt *et al.*, 2004) を用いて正規化した。Local resolution map は RESMAP (Kucukelbir *et al.*, 2014) を用いて作製した。得られた密度マップへの構造の当てはめには UCSF Chimera を使い、構造の作図には UCSF Chimera および UCSF ChimeraX を用いた (Pettersen *et al.*, 2004; Goddard *et al.*, 2017)。

### 3-2-10. ヌクレオソームの DNaseI 感受性試験

200 ng のヌクレオソームと DNaseI を、35 mM Tris-HCl pH 7.5、10 mM NaCl、1.5 mM MnCl<sub>2</sub>、1.6 mM DTT となるように 10  $\mu$ l の反応溶液を調製し、26°C で 15 分間反応させた。その後、5  $\mu$ l のタンパク質分解溶液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5、20 mM EDTA、0.1% SDS、0.5 mg/ml proteinase K) を加えて反応を停止させた。そして、反応産物を非変性 PAGE にて展開し、EtBr によって染色した。

### 3-2-11. DNaseI フットプリント試験

DNA の片側の 5'末端が Cy5 でラベルされたヌクレオソーム (3  $\mu$ g) と DNaseI (1 あるいは 4 ユニット) を、15 mM Tris-HCl pH 7.5、1.5 mM MgCl<sub>2</sub> となるように 22  $\mu$ l の反応溶液を調製し、25°C で 5 分間反応させた。その後、6  $\mu$ l のタンパク質分解溶液 (33 mM EDTA、12.4 mg/ml proteinase K) を加えて反応を停止させた。その後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、反応後の

DNA 断片を精製した。精製した DNA 断片は、尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により展開した。泳動後、Cy5 のシグナルを Amersham Typhoon scanner (GE Healthcare) を用いて検出した。

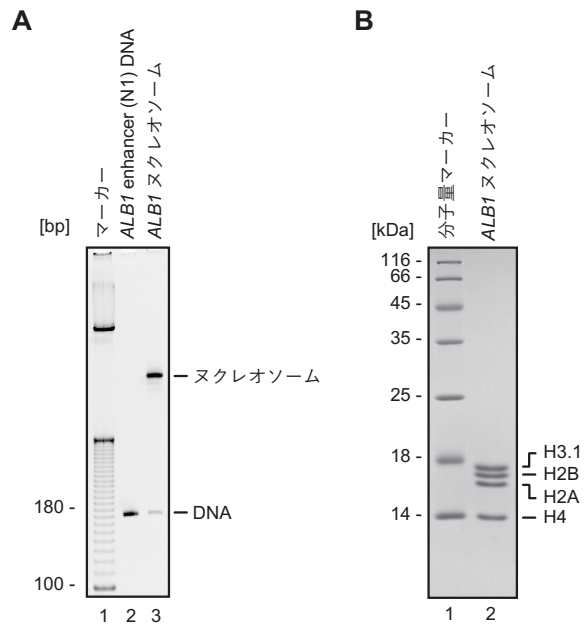
### 3-2-12. ヌクレオソームの熱安定性試験

精製した 147 bp *ALB1* right ヌクレオソームと 147 bp 601 ヌクレオソームを用いて、2-2-6 と同様の手法で熱安定性試験を行った。

## 3-3. 実験結果

### 3-3-1. *ALB1* enhancer (N1) 配列を含むヌクレオソームの再構成・精製

精製した 180 塩基対の *ALB1* enhancer (N1) DNA とヒストン八量体を混合し塩透析法によって、*ALB1* enhancer (N1) DNA を含んだヌクレオソーム（以降、*ALB1* ヌクレオソームと表記）を再構成した。再構成した DNA-ヒストン複合体を Prep Cell を用いた非変性 PAGE によって精製し、濃縮したサンプルを最終精製物とした。精製した DNA-ヒストン複合体を非変性 PAGE で解析した結果、DNA とは異なる泳動度の位置に単一のバンドが確認された（図 11A）。更に、精製した DNA-ヒストン複合体を SDS-PAGE によって展開して複合体中に含まれるタンパク質を解析した（図 11B）。その結果、各種ヒストンが均一に含まれていることが確認された。このことから、生体内の *ALB1* enhancer (N1) 領域の DNA 配列を用いてヌクレオソーム構造を試験管内で再構成することができたことが示唆された。



### 図 11 *ALB1*ヌクレオソームの精製

A. 再構成に用いた DNA、および精製した *ALB1* enhancer (N1) 配列を含んだヌクレオソームを非変性 PAGE により展開し、EtBr によって DNA を染色した。

(Takizawa *et al.*, 2018 より引用、改変)

B. 精製した *ALB1*ヌクレオソームを SDS-PAGE によって展開し、CBB によってタンパク質を染色した。(Takizawa *et al.*, 2018 より引用、改変)

### 3-3-2. *ALBI* ヌクレオソームのヌクレオソーム形成位置の解析

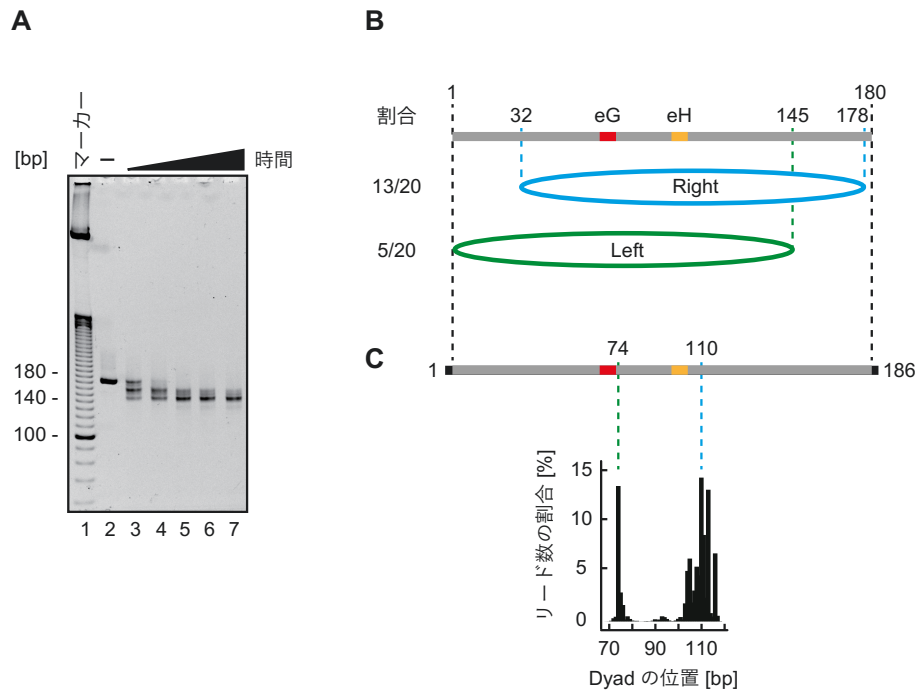
今回の *ALBI* ヌクレオソームの再構成に用いた DNA は、これまで先行研究で広く使われてきた 180 塩基対の 2 本鎖 DNA 断片である。実際にヌクレオソームを形成するために必要な DNA の長さは約 145-147 塩基対であるため、今回のように 180 塩基対の 2 本鎖 DNA 断片を用いると、どの位置にヌクレオソームが形成されているかがわからない。今回の 180 塩基対の *ALBI* enhancer (N1) 配列を用いた再構成の場合、先行研究の MNase と制限酵素を用いたポジショニング解析の結果から、左寄りのポジショニング (Left position) と右寄りのポジショニング (right position) があることが知られている (McPherson *et al.*, 1996)。しかしこのポジショニング解析の結果には 5 塩基程度の振れ幅が存在した。ヌクレオソーム中でポジショニングが 5 塩基ずれた場合、ヌクレオソーム中の DNA が溶媒側に向くかヒストン側に向くかが変わってしまうため、転写因子の結合配列の位置を議論する場合には不便である。そこで *ALBI* ヌクレオソームのヌクレオソーム形成位置を 1 塩基分解能で決定することを目指して、ポジショニングを解析した。

DNA-ヒストン間をホルムアルデヒドで架橋した *ALBI* ヌクレオソームに対してタンパク質と結合していない DNA 領域を優先的に切断する MNase で処理した。MNase で処理したヌクレオソームをタンパク質分解処理した後、残された DNA 断片を非変性 PAGE で展開したところ、約 145 塩基対まで DNA が消化されていることが確認された (図 12A)。この約 145 塩基対の DNA 断片がヌクレオソームを形成している領域であることが考えられるため、この DNA 断片のシ

ーケンスを解析した。その結果、65% (20 個のうち 13 個) の DNA 断片が 180 塩基対の *ALBI* enhancer (N1) 配列のうちの 32 番目から 178 番目までの 147 塩基対の断片であり、25% (20 個のうち 5 個) が 1 番目から 145 番目までの 145 塩基対の断片であることが確認された (図 12B)。このことから 180 塩基対の *ALBI* enhancer (N1) 配列上では、32 番目から 178 番目までの **right position** に優先的にヌクレオソームが形成されることが示唆された。

この実験結果を確認するためさらに、両末端に 3 塩基対ずつ付加された 186 塩基対の *ALBI* enhancer (N1) 配列を用いてヌクレオソームを再構成し、ホルムアルデヒドによる架橋をしていない条件下で MNase によってリンカーDNA を消化し、得られた DNA 断片を次世代シーケンサーによってシーケンスを解析した。得られた DNA 配列の中央に相当する部分をプロットした結果、先程の解析結果と同様に、DNA 配列の右端付近にヌクレオソームが形成された **right position** と左端付近にヌクレオソームが形成された **left position** の 2 種類のヌクレオソーム形成位置があり、**right position** が優先的に形成される傾向にあることが明らかになった (図 12C)。





### 図 12 ALB1 ヌクレオソームのヌクレオソーム形成位置の解析

A. ホルムアルデヒドで架橋した *ALB1* ヌクレオソームを MNase で処理したものをタンパク質分解処理した後、非変性 PAGE で展開した。(Takizawa *et al.*, 2018 より引用、改変)

B. 180 塩基対の *ALB1* ヌクレオソームを MNase で処理して得られた約 145 塩基対の DNA 断片を pGEM-T-easy ベクターに挿入し、挿入した DNA 断片の塩基配列をシーケンスした。得られた 20 個の断片の配列をアライメントし、割合を示した。図中の eG、eH は FoxA1 結合配列の位置を示している。(Takizawa *et al.*, 2018 より引用、改変)

C. 186 塩基対の *ALB1* ヌクレオソームを MNase で処理して得られた約 145 塩基対の DNA 断片を次世代シーケンサーを用いてシーケンス解析した。得られた DNA 断片の 5'末端から 73 塩基対の箇所をヌクレオソーム中の DNA の中央としてプロットした。(Takizawa *et al.*, 2018 より引用、改変)

### 3-3-3. *ALB1* ヌクレオソームへの FoxA1 結合解析

*ALB1* ヌクレオソームには FoxA1 が結合することが報告されている (Cirillo *et al.*, 2002; Cirillo *et al.*, 2002)。今回、FoxA1-*ALB1* ヌクレオソーム複合体の構造解析を目指して、FoxA1 の DNA 結合ドメインおよびヒストン結合ドメインを含む FoxA1 (170-472) を精製した。この FoxA1 (170-472) が *ALB1* ヌクレオソームに結合するかをゲルシフトアッセイによって確認した結果、FoxA1 (170-472) は *ALB1* ヌクレオソームに結合することが確認できた (図 13)。

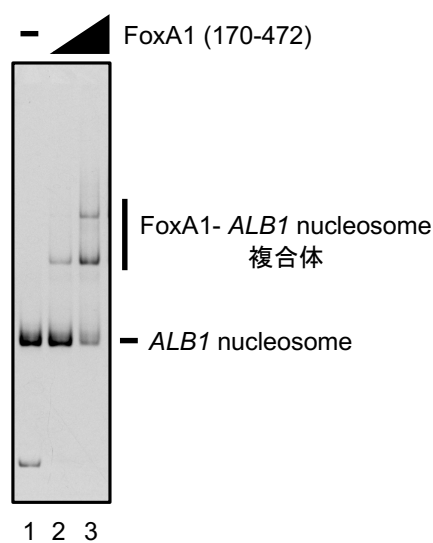


図 13 *ALB1* ヌクレオソームへの FoxA1 結合試験

*ALB1* ヌクレオソームに対する FoxA1 (170-472) の結合活性をゲルシフトアッセイによって解析した。

### 3-3-4. クライオ電子顕微鏡を用いた *ALB1* ヌクレオソームの構造解析

次に、FoxA1 と *ALB1* ヌクレオソーム複合体の立体構造の決定を試みた。これまでに、ヌクレオソームの立体構造は主に X 線結晶構造解析によって決定されてきた (Luger *et al.*, 1997; Davey *et al.*, 2002; Vasudevan *et al.*, 2010; Frouws *et al.*, 2016)。しかしながら X 線結晶構造解析のためには前提条件としてタンパク質結晶を得る必要があり、構造中に運動性が高い領域が含まれている場合や、構造に多様性がある場合には不向きである。今回調製した FoxA1-*ALB1* ヌクレオソーム複合体には、ヌクレオソームのリンカーDNA 領域といった運動性の高い領域や FoxA1 の天然変性領域といった構造を持たない領域が含まれるため、X 線結晶構造解析に不向きであると考えた。そこで、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析に注目した。クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析は、サンプルを溶液中で瞬間凍結し、クライオ電子顕微鏡により多数の画像を取得し、さまざまな向きサンプルの画像を平均化し、最終的には三次元構造を再構成する手法である。この手法の利点の一つとして、事前にタンパク質結晶を得る必要がないことが挙げられる。そのため近年、単粒子解析によるヌクレオソーム単体やヌクレオソームとその結合因子との複合体の新規立体構造が多数報告されている (Chua *et al.*, 2016; Wilson *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Chittori *et al.*, 2018; Kujirai *et al.*, 2018; Matsumoto *et al.*, 2019)。

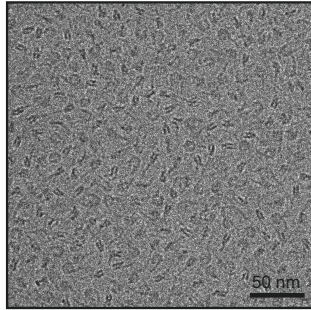
そこで、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって、立体構造解析を行った。186 塩基対の *ALB1* enhancer (N1) DNA 配列を含むヌクレオソームと FoxA1 (170-472)を用いて GraFix 法によりパラホルムアルデヒドで架橋して複合体を精

製し、クライオ電子顕微鏡によって観察した (図 14A)。合計 2313 枚の画像を撮影し、得られた画像から粒子を拾い集め、平均化し、三次元構造を再構成した結果、合計 139343 個の粒子を用いて 4.5 Å 分解能の立体構造を得た (図 14B、C および表 3)。この構造ではリンカー-DNA 領域の一部についても密度マップとして見る事ができた。3-3-2 の結果から今回の構造解析に用いた *ALBI* ヌクレオソームには *right position* と *left position* のものがそれぞれ 65%、25%の割合で含まれており、今回の 4.5 Å 分解能の構造ではそれら 2 つは区別できていない。したがって得られた構造は *right position* と *left position* の混ざったものである。得られた立体構造が *right position* あるいは *left position* であると仮定した際の、2 ヶ所に存在する FoxA 結合配列の位置をマッピングした (図 14D)。今回の解析では、DNA 結合領域とヒストン結合領域を持つ FoxA1 断片 (170-472、Cirillo *et al.*, 2002) を *ALBI* ヌクレオソームに加えてサンプルを調製したのにもかかわらず、得られた構造には FoxA1 由来の密度マップは FoxA 結合配列周辺を含め、どこにも見られなかった (図 14C、D)。これは、クライオ電子顕微鏡で観察するためのグリッド作成の過程で FoxA1 が解離してしまったためであると考えられる。

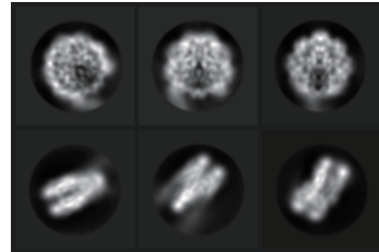
目的の FoxA1-*ALBI* ヌクレオソーム複合体の立体構造は得られなかったが、*ALBI* ヌクレオソーム単体の構造を 4.5 Å 分解能で得ることには成功した。そこで *ALBI* ヌクレオソームの構造的性質について解析することとした。そのためにまず、得られた *ALBI* ヌクレオソームの立体構造を、過去に報告されている Widom 601 配列を含むヌクレオソームの構造と比較した。Widom 601 配列は安定的にヌクレオソームを形成し、ヌクレオソーム形成位置が一つに定まること

が知られている配列である (Lowary and Widom 1998)。先行研究において、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析で得られた 601 配列を含むヌクレオソームの立体構造は、X 線結晶構造解析によって得られた立体構造と大きな違いがないことが報告されている (Vasudevan *et al.*, 2010; Chua *et al.*, 2016)。本解析で得られた *ALB1* ヌクレオソームの密度マップを、X 線結晶構造解析で得られた 601 ヌクレオソームのモデル構造およびクライオ電子顕微鏡による単粒子解析で得られた 601 ヌクレオソームの密度マップと構造比較した。その結果、ヒストンと DNA の結合位置も含めて *ALB1* ヌクレオソームと 601 ヌクレオソームとで構造は極めて似ていることが明らかになった (図 15A、B)。しかし、*ALB1* ヌクレオソームについて、領域ごとの分解能を表す local resolution map を見てみると、*ALB1* ヌクレオソーム中の DNA の分解能が低い領域が存在することが明らかになった (図 15C、左のパネル)。これは *ALB1* ヌクレオソーム中の DNA は運動性が高いことを示唆するものである。一方で、601 配列を含むヌクレオソームのクライオ電子顕微鏡解析による構造ではこのような領域があることは報告されていない (Chua *et al.*, 2016)。特に、*ALB1* ヌクレオソームの構造中で運動性が高い DNA 領域にはヒストンタンパク質と近接するような領域も含まれていた (図 15C、右のパネル)。このことから、*ALB1* enhancer (N1) DNA は、601 DNA と比べてヌクレオソーム中のヒストンと緩く結合していることが示唆された。

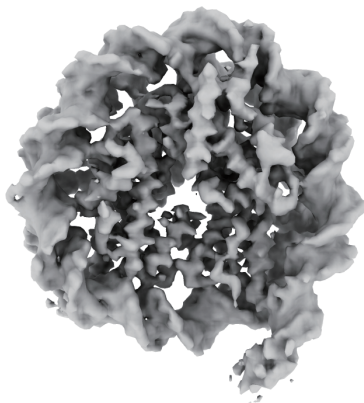
A



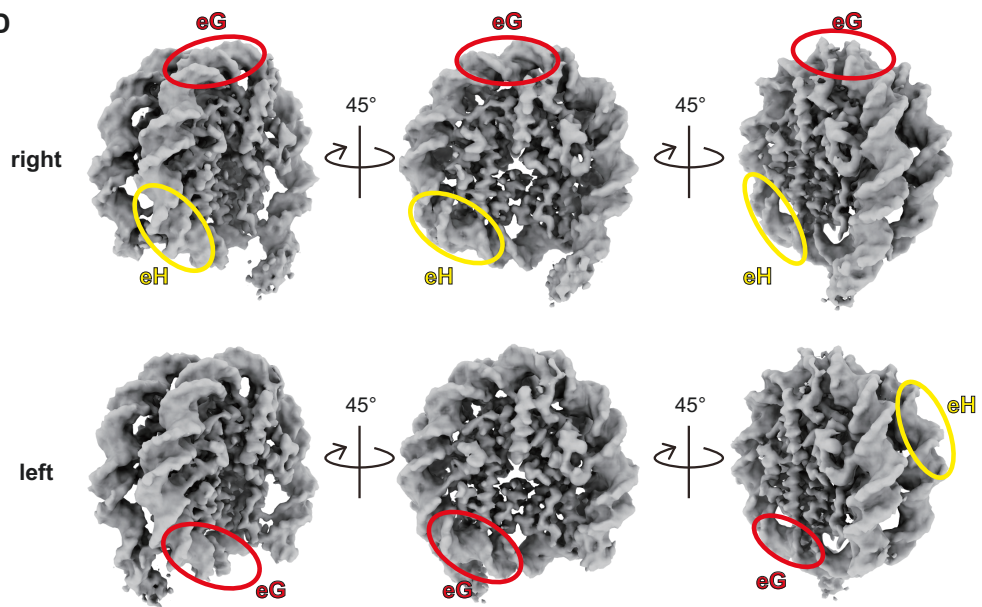
B



C



D



**図 14 ALB1 ヌクレオソームの立体構造**

- A. ALB1 ヌクレオソームのクライオ電子顕微鏡画像。(Takizawa *et al.*, 2018 より引用)
- B. ALB1 ヌクレオソームの単粒子解析によって得られた二次元平均像の一部。Box の一辺の長さは 19.6 nm に相当する。(Takizawa *et al.*, 2018 より引用)
- C. リンカーDNA を含む ALB1 ヌクレオソームの三次元構造(EMDB ID:6898)。Contour level  $5.3\sigma$  を閾値として、密度マップを表示した。
- D. リンカーDNA を含む ALB1 ヌクレオソームの三次元構造に 2 つ存在する FoxA 結合配列の位置 (eG サイトおよび eH サイト) を示した。eG サイトおよび eH サイトをそれぞれ赤色と黄色で示した。上の段が right position の際の eG サイトおよび eH サイトの位置。下の段が left position の際の eG サイトおよび eH サイトの位置。

**表 3 クライオ電子顕微鏡解析の統計値**

	<i>ALB1 nucleosome</i>
<b>Data collection</b>	
Electron microscope	Talos Arctica
Detector	Falcon 3
Voltage (kV)	200
Pixel size (Å)	1.40
Exposure time (s)	2
Movie frames (no.)	79
Electron dose (e <sup>-</sup> / Å <sup>2</sup> )	~80
Defocus range (μm)	-1.5 to -3.0
<b>Processing</b>	
Software	RELION 2.1
Final particles (no.)	139,343
Symmetry	C1
B-factor (Å)	-331
Final resolution (Å)	4.5
FSC criterion	0.143
EMDB ID	EMD-6898

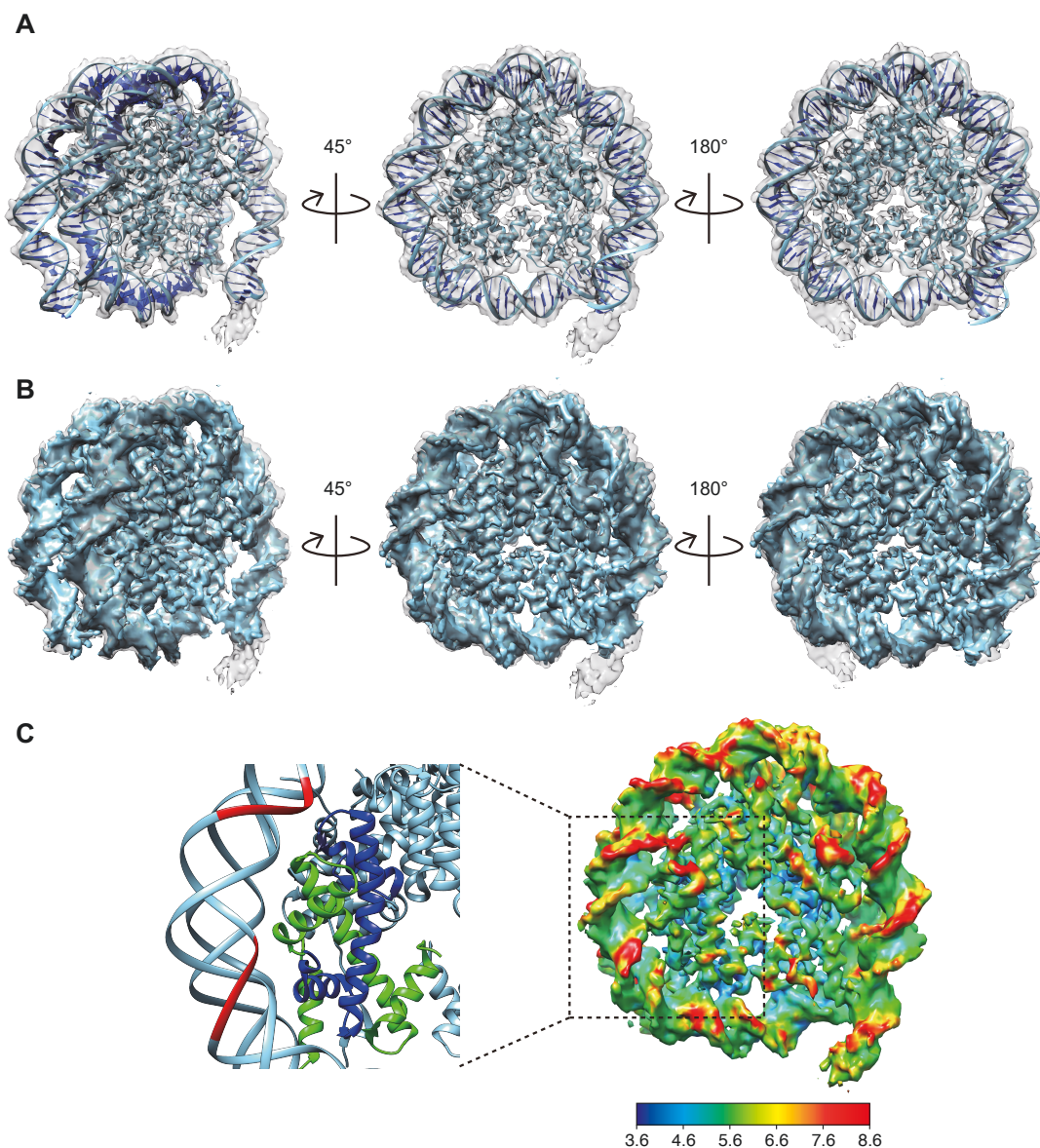


図 15 *ALB1* ヌクレオソームと *601* ヌクレオソームとの構造比較

A. *ALB1* ヌクレオソームの密度マップと *601* ヌクレオソームの結晶構造の比較。*ALB1* ヌクレオソームの密度マップを  $5.3\sigma$  で表示し (灰色、EMDB ID:6898)、*601* ヌクレオソームのモデル構造 (青色、PDB ID: 3LZ0) を当てはめた。

B. *ALB1* ヌクレオソームと *601* ヌクレオソームの密度マップの比較。*ALB1* ヌクレオソームの密度マップを  $5.3\sigma$  で表示し (灰色、EMDB ID:6898)、*601* ヌクレオソームの密度マップ (青色、EMDB ID: 8140) を重ね合わせた。

C. *ALB1* ヌクレオソームの local resolution map。3.6 Å から 8.6 Å の範囲で示した (右のパネル)。破線で示した範囲に対応する *601* ヌクレオソームのモデル構造 (左のパネル)。ヒストン H3 および H4 をそれぞれ緑色と青色で示した。8.6 Å よりも分解能が低い DNA の領域を赤色で示した。(Takizawa *et al.*, 2018 より引用)



### 3-3-5. *ALB1* ヌクレオソームの DNaseI 感受性解析

601 DNA と比べて、*ALB1* enhancer (N1) DNA がヒストンタンパク質と緩く結合しているかを検証するために、*ALB1* ヌクレオソームと 601 ヌクレオソームとを DNaseI 処理を行い、その感受性を比較した。DNaseI は、タンパク質と結合していない DNA を優先して分解するエンドヌクレアーゼであり、DNA-タンパク質相互作用解析でよく使用されている。DNA がヒストンタンパク質と緩く結合しているのであれば、DNaseI に対する感受性が高いことが期待される。

本解析では、186 塩基対の *ALB1* enhancer (N1) 配列を含んだ *ALB1* ヌクレオソームと 193 塩基対の 601 配列を含んだ 601 ヌクレオソームをそれぞれ DNaseI 処理した後に、タンパク質分解処理することで酵素反応を停止した。反応後の DNA 断片を非変性 PAGE によって解析した (図 16A)。その結果、601 ヌクレオソームは DNaseI で処理すると 140-150 塩基対程度の単一のバンドとして現れるのに対して (図 16A、レーン 8-13)、*ALB1* ヌクレオソームについては単一バンドにならず、複数の長さの異なるバンドが現れた (図 16A、レーン 2-7)。これは、DNaseI に感受性が高い箇所が複数あり、そこで切断が起こっているためであると考えた。この結果から、*ALB1* ヌクレオソーム中の DNA は 601 ヌクレオソームと比べて、ヒストンに緩く結合していることが示唆された。

次に、*ALB1* ヌクレオソーム中の *ALB1* enhancer (N1) DNA 配列のどこが DNaseI に感受性が高いのか、つまりヒストンとの相互作用が弱いのかを解析するために、DNaseI を用いたフットプリント解析を行った。本解析では Cy5 ラベルした 147 塩基対の *ALB1* right position DNA を含むヌクレオソームと 147 塩基対の 601

配列を含むヌクレオソームをそれぞれ DNaseI で処理した後、タンパク質分解処理およびフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片を尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した (図 16B)。その結果、right position の *ALB1* ヌクレオソームにおいて、Cy5 でラベルした DNA 末端から約 20 塩基、あるいは約 40 塩基の箇所において 601 ヌクレオソームでは見られないバンドが得られたことから、この領域が DNaseI に対する感受性が高い領域であることが確認された。この領域は *ALB1* ヌクレオソームの立体構造において local resolution が低い領域とも一致した (図 16C)。以上のことから、ヌクレオソーム中において *ALB1* enhancer (N1) DNA は局所的に緩くヒストンタンパク質と結合していることが示唆された。

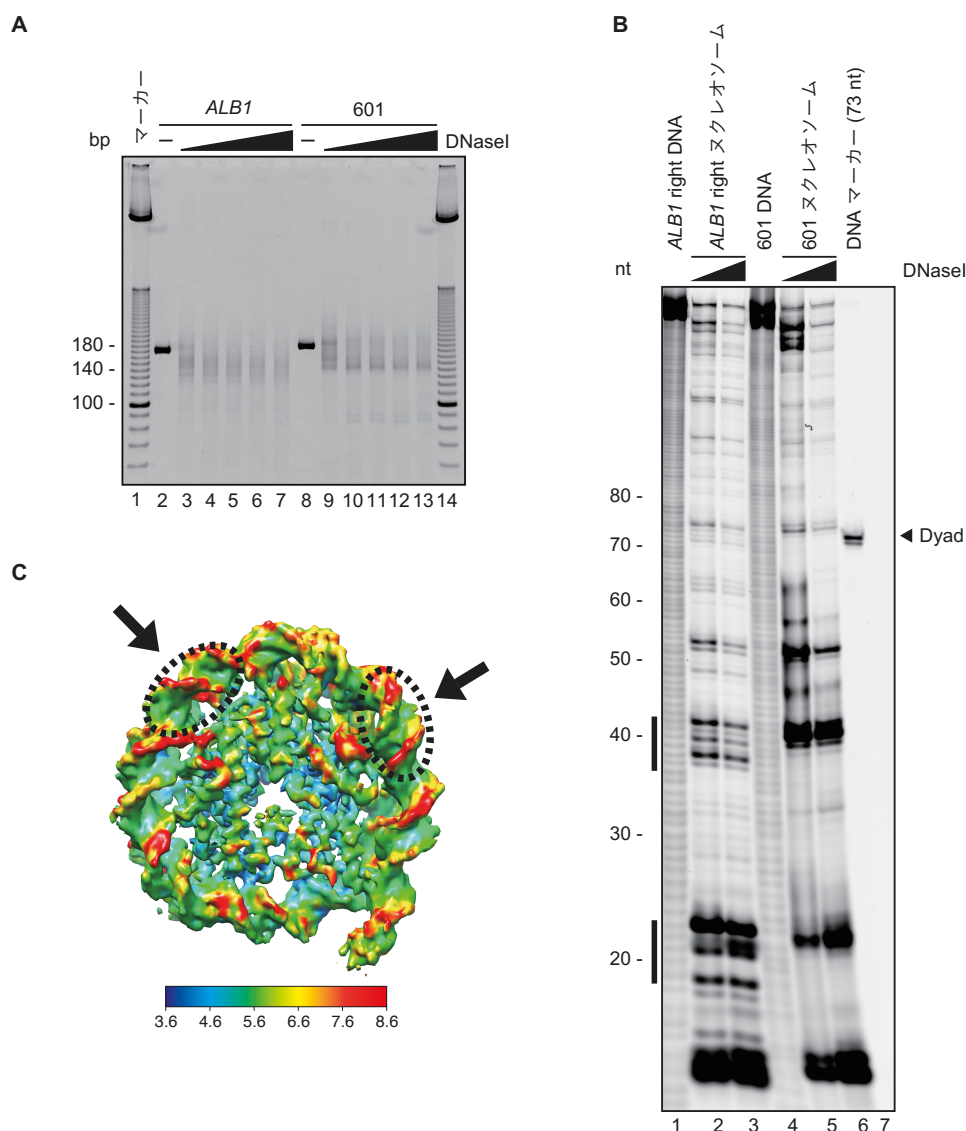


図 16 *ALB1* ヌクレオソームの DNaseI 感受性解析

A. 186 塩基対の *ALB1* ヌクレオソーム (レーン 2-7) と 193 塩基対の 601 ヌクレオソーム (レーン 8-13) を DNaseI (0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 ユニット) によって 15 分間反応させた。タンパク質分解処理後のサンプルを非変性 PAGE により展開し、EtBr によって DNA を染色した。(Takizawa *et al.*, 2018 より引用、改変)

B. 147 塩基対の right position の *ALB1* ヌクレオソーム (レーン 2-3) と 147 塩基対の 601 ヌクレオソーム (レーン 5-6) を DNaseI (1 あるいは 4 ユニット) によって 5 分間反応させた。除タンパク質処理後のサンプルを尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により展開し、Cy5 の蛍光を検出した。ゲル画像の横に示した黒線は DNaseI 感受性の高い領域を示している。(Takizawa *et al.*, 2018 より引用、改変)

C. *ALB1* ヌクレオソームの local resolution map に対して、DNaseI フットプリン ト解析で明らかになった DNaseI 感受性の高い領域を示した。

### 3-3-6. *ALB1* ヌクレオソームの熱安定性解析

これまでの解析から、*ALB1* enhancer (N1) DNA 配列を含むヌクレオソームは、局所的に DNA がヒストンタンパク質と緩く結合していることが示唆された。その場合、ヌクレオソーム中のヒストンが維持されにくく、ヌクレオソームの安定性が低いことが考えられる。そこで熱安定性試験による 147 塩基対の right position の *ALB1* ヌクレオソームと 147 塩基対の 601 ヌクレオソームの構造安定性を比較した。その結果、601 ヌクレオソームと比べて *ALB1* ヌクレオソームでは、H2A-H2B の解離を示す 1 段階目のピークおよび H3-H4 の解離を示す 2 段階目のピークそれぞれの、低温側へのシフトが確認された (図 17A、B)。このことから、*ALB1* ヌクレオソームは 601 ヌクレオソームと比べて熱に対する安定性が低いことが明らかになった。これは、*ALB1* ヌクレオソームは DNA とヒストンとの相互作用が弱く、局所的に緩んだ構造になっていることに起因すると考えられる。

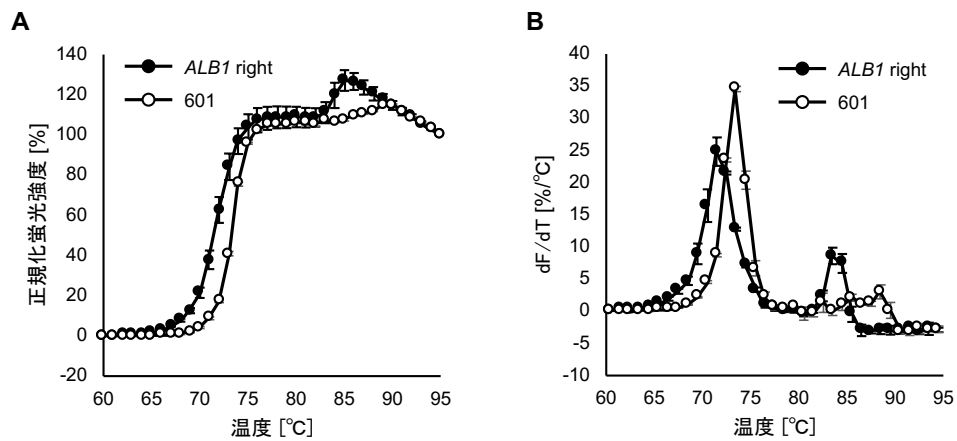


図 17 *ALB1* ヌクレオソームの熱安定性解析

A. *ALB1* ヌクレオソームおよび 601 ヌクレオソームの各温度における蛍光シグナルの強度を正規化し、プロットした。試験は 3 回行い、平均値と標準偏差を図に示した。(Takizawa *et al.*, 2018 より引用、改変)

B. パネル A の蛍光シグナル強度の微分プロット。試験は 3 回行い、平均値と標準偏差を図に示した。

### 3-4. *ALB1* ヌクレオソームの性質と機能の考察

本研究では、マウスの *ALB1* enhancer (N1) DNA 配列を用いたヌクレオソームを試験管内で再構成し構造生物学的解析および生化学的解析を行った。その結果、*ALB1* ヌクレオソーム中の DNA は局所的にヒストンと緩く結合していることが明らかになった。*ALB1* enhancer (N1) DNA には FoxA や GATA4 といったパイオニア転写因子が結合することが知られている (Cirillo and Zaret, 1999; Cirillo *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2019)。*ALB1* ヌクレオソームにおける DNA の局所的な緩みは、FoxA や GATA4 がヌクレオソーム中の標的 DNA 配列に結合するのを助けるのかもしれない。パイオニア転写因子が結合した後、クロマチンリモデリング因子などがリクルートされることによって、ヌクレオソームの位置の移動や解離が起こることが知られている (Takaku *et al.*, 2016)。その際に *ALB1* ヌクレオソームの局所的な DNA の緩みあるいは構造安定性の低さが助けになるのかもしれない。今後の *ALB1* ヌクレオソーム上でのパイオニア転写因子結合の解析が期待される。

*ALB1* ヌクレオソームの局所的な DNA の緩みと熱安定性の低さは DNA-ヒストン間の相互作用が局所的に弱いことに起因すると考えられる。しかしながら、今回の我々が構造決定した *ALB1* ヌクレオソームの分解能では DNA-ヒストン間の相互作用の詳細については議論できない。この点については今後のさらなる高分解能での構造解析が必要である。

## 第4章 総合討論

### 4-1. 構造安定なヌクレオソームを形成するヒストンバリエントの役割

本研究により、ヒストンバリエント H2A.J を含むヌクレオソームは構造安定性が高いことが明らかになった。これまでに H2A.J と同じように熱安定性試験の結果から構造安定性の高いヌクレオソームを形成することが報告されているヒストンバリエントとして H2A.X と H3.Y が存在する (Kujirai *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2019)。H2A.X は DNA 二重鎖切断損傷に応答してリン酸化修飾され、リン酸化修飾された H2A.X を認識する因子が結合する足場となることが知られている (Kinner *et al.*, 2008)。H3.Y は組織特異的に発現するヒストンバリエントであり (Wiedemann *et al.*, 2010)、クロマチンの高次構造を変化させて転写に必要な因子群を呼び込むことで転写を促進することが示唆されている (Kujirai *et al.*, 2016)。構造安定なヌクレオソームを形成するヒストンバリエントの機能についてまとめると、①特定の細胞や特定の刺激に応答して発現あるいはクロマチンに取り込まれ、②クロマチン構造を変化させる、あるいはクロマチン認識因子の結合の足場となる。一部のヒストンバリエントが安定なヌクレオソームを形成するという性質は、②の機能において、長期的に機能するために重要なのではないかと考えている。先行研究 (Kujirai *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2019) と本研究より、構造安定性に寄与する責任残基は同定されていることから、責任残基に変異を入れた際のこれらのヒストンバリエントがクロマチンに取り込まれている時間や、認識因子のクロマチンへの局在の変化が解析可能である。これらの解析から、安定なヌクレオソームを形成する重要性が明らかになることが期待される。

#### 4-2. ヒストンバリエントと遺伝子制御領域の DNA 配列

本博士論文ではヒストンバリエント H2A.J あるいは遺伝子制御領域であるエンハンサー-DNA 配列を含んだヌクレオソームをそれぞれ独立したものとして解析した。しかし実際の生体内では、ヒストンバリエントと遺伝子制御領域とは密接に関わっている。例えば、ヒストン H2A バリエントである H2A.Z および H3 バリエントである H3.3 はそれぞれプロモーターやエンハンサー領域に局在しており、転写の活性化に関与することが知られている (Jin *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013; Brunelle *et al.*, 2015)。これまでは H2A.Z あるいは H3.3 を含んだヌクレオソームの性質をもとに、プロモーターやエンハンサー領域での H2A.Z あるいは H3.3 の機能が議論されてきた。しかしながら、今回の解析からエンハンサー領域のヌクレオソームを形成する DNA 配列がヌクレオソームの性質に影響を与える可能性が示唆された。したがって、今後、ゲノムの特定の領域に取り込まれるヒストンバリエントの性質を解析する際には、取り込まれる先の DNA 配列の性質も考慮すべきなのかもしれない。ヒストンバリエントは特定の領域への局在を見せるものが多数報告されている (Buschbeck and Hake 2017)。もしかすると、ヒストンバリエントそれぞれに好みの配列が存在し、その好みの配列とヒストンバリエントの組み合わせによる相乗的なヌクレオソーム構造の安定性といったものが存在するかもしれない。

現時点では、H2A.J がゲノム上のどの領域に取り込まれるかに関する知見がないため、推測しかできないが、H2A.J は SASP 関連遺伝子の発現制御に関わることから、H2A.J は SASP 関連遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域に取り込



まれている可能性は十分にある。H2A.J を含んだヌクレオソームは主要型 H2A を含んだヌクレオソームよりも構造安定性が高い。これらのプロモーター・エンハンサー領域の DNA 配列が、*ALBI* enhancer 配列と同じように若干不安定なヌクレオソームを形成する傾向にある場合、H2A.J が取り込まれた場合のみが安定なヌクレオソームとなることが想像できる。これにより、H2A.J ヌクレオソームが集積し、H2A.J を認識する因子によって遺伝子発現が制御されるのかもしれない。

#### 4-3. 今後の展望

本博士論文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ーションと DNA 配列に着目し、解析を行った。ヒストンバリエーションの一例として H2A.J を含んだヌクレオソーム、DNA 配列の一例としてエンハンサー領域に着目して *ALBI* enhancer (N1) DNA 配列を含んだヌクレオソームの生化学的解析および構造生物学的解析を行った。その結果、それぞれが特徴的な構造的性質・物理的性質をもつことが明らかになった。

H2A.J に関して、本研究から主要型 H2A ヌクレオソームと比べて構造安定性が高いことが明らかになった。これまでに H2A.J の細胞内動態を解析した例がないため、今後は H2A.J が細胞内においても安定的にヌクレオソーム中に取り込まれているかを解析することが求められる。また、本研究で明らかにした H2A.J ヌクレオソームの構造安定性に寄与する H2A.J の 40 番目のアラニンが、実際に生体内でも重要な役割を果たしているかを明らかにするために、細胞レ

ベルでの変異体解析も必要である。さらに、H2A.Jがゲノムのどの領域に取り込まれているのか、ロックアウトした際の表現型はどうなるのか、H2A.Jの機能的に重要なC末端領域は何をしているのか、相互作用因子は何なのか、などを明らかにするために、遺伝的解析・ゲノム解析・相互作用因子の探索といった包括的な解析が期待される。

*ALBI*ヌクレオソームに関しては、本研究から局所的にDNAがヒストンタンパク質と緩く結合していることが明らかになった。このような領域の周辺にはパイオニア転写因子の標的DNA配列が存在するため、*ALBI*ヌクレオソームの局所的にDNAがヒストンタンパク質と緩く結合しているという性質は、パイオニア転写因子の結合に有利に働くのではないかと予想される。パイオニア転写因子はヌクレオソーム中のDNAの中に含まれる標的DNA配列に結合できるとされているが、実際にパイオニア転写因子がヌクレオソームに結合する機構とヌクレオソーム構造との間にどのような影響があるかに関する構造的知見が乏しい。そこで今回、FoxA1-*ALBI*ヌクレオソーム複合体の構造解析にも挑戦したが、残念ながら今の段階では複合体の構造は得られていない。しかしながら本研究では、パイオニア転写因子の標的となる生体内配列を含んだヌクレオソームの構造を明らかにすることに成功した。この研究の発展として、今後はパイオニア転写因子-ヌクレオソーム複合体の構造が明らかになることが期待される。

## 引用文献

Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. & Zwart, P. H. (2010) PHENIX : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221.

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.

Arimura, Y., Ikura, M., Fujita, R., Noda, M., Kobayashi, W., Horikoshi, N., Sun, J., Shi, L., Kusakabe, M., Harata, M., Ohkawa, Y., Tashiro, S., Kimura, H., Ikura, T. & Kurumizaka, H. (2018) Cancer-associated mutations of histones H2B, H3.1 and H2A.Z.1 affect the structure and stability of the nucleosome. *Nucleic Acids Res.* **46**, 10007–10018.

Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381–395.

Bao, X., Liu, Z., Zhang, W., Gladysz, K., Fung, Y. M. E., Tian, G., Xiong, Y., Wong, J. W. H., Yuen, K. W. Y. & Li, X. D. (2019) Glutarylation of histone H4 lysine 91 regulates chromatin dynamics. *Mol. Cell* **76**, 1–16.

Bao, Y., Konesky, K., Park, Y. J., Rosu, S., Dyer, P. N., Rangasamy, D., Tremethick, D. J., Laybourn, P. J. & Luger, K. (2004) Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *EMBO J.* **23**, 3314–3324.

Brunelle, M., Nordell Markovits, A., Rodrigue, S., Lupien, M., Jacques, P.-É. & Gévry, N. (2015) The histone variant H2A.Z is an important regulator of enhancer activity. *Nucleic Acids Res.* **43**, 9742–9756.

Buschbeck, M. & Hake, S. B. (2017) Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 299–314.

Campisi, J. (2013) Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 685–705.

Chakravarthy, S., Gundimella, S. K. Y., Caron, C., Perche, P.-Y., Pehrson, J. R., Khochbin, S. & Luger, K. (2005) Structural Characterization of the Histone Variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7616–7624.

Chakravarthy, S. & Luger, K. (2006) The Histone variant macro-H2A preferentially forms “Hybrid Nucleosomes”. *J. Biol. Chem.* **281**, 25522–25531.

Chen, P., Zhao, J., Wang, Y., Wang, M., Long, H., Liang, D., Huang, L., Wen, Z., Li, W., Li, X., Feng, H., Zhao, H., Zhu, P., Li, M., Wang, Q. -f. & Li, G. (2013) H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin. *Genes Dev.* **27**, 2109–2124.

Chittori, S., Hong, J., Saunders, H., Feng, H., Ghirlando, R., Kelly, A. E., Bai, Y. & Subramaniam, S. (2018) Structural mechanisms of centromeric nucleosome recognition by the kinetochore protein CENP-N. *Science* **359**, 339–343.

Chua, E. Y. D., Vasudevan, D., Davey, G. E., Wu, B. & Davey, C. A. (2012) The mechanics behind DNA sequence-dependent properties of the nucleosome. *Nucleic Acids Res.* **40**, 6338–6352.

Chua, E. Y. D., Vogirala, V. K., Inian, O., Wong, A. S. W., Nordenskiöld, L., Plitzko, J. M., Danev, R. & Sandin, S. (2016) 3.9 Å structure of the nucleosome core particle determined by phase-plate cryo-EM. *Nucleic Acids Res.* **44**, 8013–8019.

Cirillo, L. A., McPherson, C. E., Bossard, P., Stevens, K., Cherian, S., Shim, E. Y., Clark, K. L., Burley, S. K. & Zaret, K. S. (1998) Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *EMBO J.* **17**, 244–254.

Cirillo, L. A. & Zaret, K. S. (1999) An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA. *Mol. Cell* **4**, 961–969.

Cirillo, L. A., Lin, F. R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M. & Zaret, K. S. (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell* **9**, 279–289.

Conde e Silva, N., Black, B. E., Sivolob, A., Filipski, J., Cleveland, D. W. & Prunell, A. (2007) CENP-A-containing nucleosomes: easier disassembly versus exclusive centromeric localization. *J. Mol. Biol.* **370**, 555–573.

Contrepois, K., Coudereau, C., Benayoun, B. A., Schuler, N., Roux, P.-F., Bischof, O., Courbeyrette, R., Carvalho, C., Thuret, J.-Y., Ma, Z., Derbois, C., Nevers, M.-C., Volland, H., Redon, C. E., Bonner, W. M., Deleuze, J.-F., Wiel, C., Bernard, D., Snyder, M. P., Rube, C. E., Olaso, R., Fenaille, F. & Mann, C. (2017) Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nat. Commun.* **8**, 14995.

Das, C., Tyler, J. K. & Churchill, M. E. A. (2010) The histone shuffle: Histone chaperones in an energetic dance. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 476–489.

Davey, C. A., Sargent, D. F., Luger, K., Maeder, A. W. & Richmond, T. J. (2002) Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **319**, 1097–1113.

Dechassa, M. L., Wyns, K., Li, M., Hall, M. A., Wang, M. D. & Luger, K. (2011) Structure and Scm3-mediated assembly of budding yeast centromeric nucleosomes. *Nat. Commun.* **2**, 313.

Doyen, C. M., Montel, F., Gautier, T., Menoni, H., Claudet, C., Delacour-Larose, M., Angelov, D., Hamiche, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., Bouvet, P. & Dimitrov, S. (2006) Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. *EMBO J.* **25**, 4234–4244.

Dyer, P. N., Edayathumangalam, R. S., White, C. L., Bao, Y., Chakravarthy, S., Muthurajan, U. M. & Luger, K. (2003) Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA. *Methods Enzymol.* **375**, 23–44.

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

Fernandez Garcia, M., Moore, C. D., Schulz, K. N., Alberto, O., Donague, G., Harrison, M. M., Zhu, H. & Zaret, K. S. (2019) Structural features of transcription factors associating with nucleosome binding. *Mol. Cell* **75**, 921–932.e6.

Frouws, T. D., Duda, S. C. & Richmond, T. J. (2016) X-ray structure of the MMTV-A nucleosome core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 1214–1219.

Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Morris, J. H. & Ferrin, T. E. (2018) UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* **27**, 14–25.

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

Harada, A., Maehara, K., Ono, Y., Taguchi, H., Yoshioka, K., Kitajima, Y., Xie, Y., Sato, Y., Iwasaki, T., Nogami, J., Okada, S., Komatsu, T., Semba, Y., Takemoto, T., Kimura, H., Kurumizaka, H. & Ohkawa, Y. (2018) Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. *Nat. Commun.* **9**, 1400.

Heitz, E. (1928) Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss. Bot.*, **69**, 762-818.

Heintz, N., Sive, H. L. & Roeder, R. G. (1983) Regulation of human histone gene expression: kinetics of accumulation and changes in the rate of synthesis and in the half-lives of individual histone mRNAs during the HeLa cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 539–550.



Horikoshi, N., Sato, K., Shimada, K., Arimura, Y., Osakabe, A., Tachiwana, H., Hayashi-Takanaka, Y., Iwasaki, W., Kagawa, W., Harata, M., Kimura, H. & Kurumizaka, H. (2013) Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 2431–2439.

Horikoshi, N., Kujirai, T., Sato, K., Kimura, H. & Kurumizaka, H. (2019) Structure-based design of an H2A.Z.1 mutant stabilizing a nucleosome in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **515**, 719–724.

Iwafuchi-Doi, M. & Zaret, K. S. (2014) Pioneer transcription factors in cell reprogramming. *Genes Dev.* **28**, 2679–2692.

Iwafuchi-Doi, M., Donahue, G., Kakumanu, A., Watts, J. A., Mahony, S., Pugh, B. F., Lee, D., Kaestner, K. H. & Zaret, K. S. (2016) The pioneer transcription factor FoxA maintains an accessible nucleosome configuration at enhancers for tissue-specific gene activation. *Mol. Cell* **62**, 79–91.

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.

Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132.

Kabsch, W. (2010) Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 133–144.

Kastner, B., Fischer, N., Golas, M. M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., Uchtenhagen, H., Urlaub, H., Herzog, F., Peters, J. M., Poerschke, D., Lührmann, R. & Stark, H. (2008) GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nat. Methods* **5**, 53–55.

Kinner, A., Wu, W., Staudt, C. & Iliakis, G. (2008)  $\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5678–5694.

Kleywegt, G. J., Harris, M. R., Zou, J. Y., Taylor, T. C., Wählby, A. & Jones, T. A. (2004) The Uppsala Electron-Density Server. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2240–2249.

Kucukelbir, A., Sigworth, F. J. & Tagare, H. D. (2014) Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps. *Nat. Methods* **11**, 63–65.

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.* **44**, 6127–6141.

- Kujirai, T., Arimura, Y., Fujita, R., Horikoshi, N., Machida, S. & Kurumizaka, H. (2018) Methods for preparing nucleosomes containing histone variants. *Methods Mol. Biol.* **1832**, 3–20.
- Kujirai, T., Ehara, H., Fujino, Y., Shirouzu, M., Sekine, S., & Kurumizaka, H. (2018) Structural basis of the nucleosome transition during RNA polymerase II passage. *Science* **362**, 595–598.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**, R25.
- Lawrence, M., Daujat, S. & Schneider, R. (2016) Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet.* **32**, 42–56.
- Liu, X., Li, M., Xia, X., Li, X. & Chen, Z. (2017) Mechanism of chromatin remodelling revealed by the Snf2-nucleosome structure. *Nature* **544**, 440–445.
- Lowary, P. T. & Widom, J. (1998) New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.* **276**, 19–42.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260.

Magoc, T. & Salzberg, S. L. (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**, 2957–2963.

Matsumoto, S., Cavadini, S., Bunker, R. D., Grand, R. S., Potenza, A., Rabl, J., Yamamoto, J., Schenk, A. D., Schübeler, D., Iwai, S., Sugasawa, K., Kurumizaka, H. & Thomä, N. H. (2019) DNA damage detection in nucleosomes involves DNA register shifting. *Nature* **571**, 79–84.

Marzluff, W. F., Wagner, E. J. & Duronio, R. J. (2008) Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: Life without a poly(A) tail. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 843–854.

McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674.

McKinley, K. L. & Cheeseman, I. M. (2016) The molecular basis for centromere identity and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 16–29.

McPherson, C. E., Shim, E.-Y., Friedman, D. S. & Zaret, K. S. (1993) An active tissue-specific enhancer and bound transcription factors existing in a precisely positioned nucleosomal array. *Cell* **75**, 387–398.

McPherson, C. E., Horowitz, R., Woodcock, C. L., Jiang, C. & Zaret, K. S. (1996) Nucleosome positioning properties of the albumin transcriptional enhancer. *Nucleic Acids Res.* **24**, 397–404.

Neumann, H., Hancock, S. M., Buning, R., Routh, A., Chapman, L., Somers, J., Owen-Hughes, T., van Noort, J., Rhodes, D. & Chin, J. W. (2009) A method for genetically installing site-specific acetylation in recombinant histones defines the effects of H3 K56 acetylation. *Mol. Cell* **36**, 153–163.

Nishida, H., Suzuki, T., Tomaru, Y. & Hayashizaki, Y. (2005) A novel replication-independent histone H2a gene in mouse. *BMC Genet.* **6**, 10.

Olins, A. L. & Olins, D. E. (1974) Spheroid Chromatin Units (v Bodies). *Science* **183**, 330–332.

Oudet, P., Gross-Bellard, M. & Chambon, P. (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**, 281–300.

Panchenko, T., Sorensen, T. C., Woodcock, C. L., Kan, Z. -y., Wood, S., Resch, M. G., Luger, K., Englander, S. W., Hansen, J. C. & Black, B. E. (2011) Replacement of histone H3 with CENP-A directs global nucleosome array condensation and loosening of nucleosome superhelical termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 16588–16593.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612.

Pinkert, C. A., Ornitz, D. M., Brinster, R. L. & Palmiter, R. D. (1987) An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Genes Dev.* **1**, 268–276.

Roulland, Y., Ouararhni, K., Naidenov, M., Ramos, L., Shuaib, M., Syed, S. H., Lone, I. N., Boopathi, R., Fontaine, E., Papai, G., Tachiwana, H., Gautier, T., Skoufias, D., Padmanabhan, K., Bednar, J., Kurumizaka, H., Schultz, P., Angelov, D., Hamiche, A. & Dimitrov, S. (2016) The flexible ends of CENP-A nucleosome are required for mitotic fidelity. *Mol. Cell* **63**, 674–685.

Scheres, S. H. W. (2012) RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* **180**, 519–530.

Scheres, S. H. W. (2016) Processing of structurally heterogeneous cryo-EM data in RELION. *Methods Enzymol.* **579**, 125–157.

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

Sharma, D., De Falco, L., Padavattan, S., Rao, C., Geifman-Shochat, S., Liu, C.-F. & Davey, C. A. (2019) PARP1 exhibits enhanced association and catalytic efficiency with  $\gamma$ H2A.X-nucleosome. *Nat. Commun.* **10**, 5751.

Stellfox, M. E., Bailey, A. O. & Foltz, D. R. (2013) Putting CENP-A in its place. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 387–406.

Su, C. H., Tzeng, T. Y., Cheng, C. & Hsu, M. T. An (2014) H2A histone isotype regulates estrogen receptor target genes by mediating enhancer-promoter-3'-UTR interactions in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **42**, 3073–3088.

Su, C. H., Cheng, C., Tzeng, T. Y., Lin, I. H. & Hsu, M. T. (2016) An H2A histone isotype, H2ac, associates with telomere and maintains telomere integrity. *PLoS One* **11**, 1–27.

Suzuki, Y., Horikoshi, N., Kato, D. & Kurumizaka, H. (2016) Crystal structure of the nucleosome containing histone H3 with crotonylated lysine 122. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **469**, 483–489.

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.* **107**, 10454–10459.

Tachiwana, H., Kagawa, W., Shiga, T., Osakabe, A., Miya, Y., Saito, K., Hayashi-Takanaka, Y., Oda, T., Sato, M., Park, S. Y., Kimura, H. & Kurumizaka, H. (2011) Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature* **476**, 232–235.

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.

Takaku, M., Grimm, S. A., Shimbo, T., Perera, L., Menafrá, R., Stunnenberg, H. G., Archer, T. K., Machida, S., Kurumizaka, H. & Wade, P. A. (2016) GATA3-dependent cellular reprogramming requires activation-domain dependent recruitment of a chromatin remodeler. *Genome Biol.* **17**, 36.

Takizawa, Y., Tanaka, H., Machida, S., Koyama, M., Maehara, K., Ohkawa, Y., Wade, P. A., Wolf, M. & Kurumizaka, H. (2018) Cryo-EM structure of the nucleosome containing the *ALB1* enhancer DNA sequence. *Open Biol.* **8**, 170255.

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

Tanaka, H., Sato, S., Koyama, M., Kujirai, T. & Kurumizaka, H. (2019) Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A.J. *J. Biochem.* online published, doi: 10.1093/jb/mvz109

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



Tillo, D., Kaplan, N., Moore, I. K., Fondufe-Mittendorf, Y., Gossett, A. J., Field, Y., Lieb, J. D., Widom, J., Segal, E. & Hughes, T. R. (2010) High nucleosome occupancy is encoded at human regulatory sequences. *PLoS One* **5**, e9129.

Tolstorukov, M. Y., Goldman, J. A., Gilbert, C., Ogryzko, V., Kingston, R. E. & Park, P. J. (2012) Histone variant H2A.Bbd is associated with active transcription and mRNA processing in human cells. *Mol. Cell* **47**, 596–607.

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.

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**, 1–16.

Vasudevan, D., Chua, E. Y. D. & Davey, C. A. (2010) Crystal structures of nucleosome core particles containing the ‘601’ strong positioning sequence. *J. Mol. Biol.* **403**, 1–10.

Waddington, C. H. (1942) The epigenotype. *Endeavour*, **1**, 18–20.

Waddington, C. H. (1942) Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, **150**, 563–565.

Wang, J. P. Z. & Widom, J. (2005) Improved alignment of nucleosome DNA sequences using a mixture model. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6743–6755.

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

Wilson, M. D., Benlekbir, S., Fradet-Turcotte, A., Sherker, A., Julien, J.-P., McEwan, A., Noordermeer, S. M., Sicheri, F., Rubinstein, J. L. & Durocher, D. (2016) The structural basis of modified nucleosome recognition by 53BP1. *Nature* **536**, 100–103.

Wu, R. S. & Bonner, W. M. (1981) Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* **27**, 321–330.

Ye, J., Ai, X., Eugeni, E. E., Zhang, L., Carpenter, L. R., Jelinek, M. A., Freitas, M. A. & Parthun, M. R. (2005) Histone H4 lysine 91 acetylation. *Mol. Cell* **18**, 123–130.

Young, A. R. J. & Narita, M. (2009) SASP reflects senescence. *EMBO Rep.* **10**, 228–230.

Zheng, S. Q., Palovcak, E., Armache, J.-P., Verba, K. A., Cheng, Y. & Agard, D. A. (2017) MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* **14**, 331–332.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究活動の全般において丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学定量生命科学研究so教授および早稲田大学名誉教授 胡桃坂仁志先生に心より御礼申し上げます。

研究開始当初より実験操作を御指導いただき、また研究全般にわたって大変お世話になりました、オーストリア Gregor Mendel Institute 越阪部晃永博士、東京大学定量生命科学研究so 小山昌子博士、滝沢由政博士、鯨井智也博士、佐藤祥子博士、フランス Institute of Human Genetics 町田晋一博士に厚く御礼申し上げます。

クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析における多大なるお力添えを賜りました、沖縄科学技術大学院大学准教授 Matthias Wolf 博士に厚く御礼申し上げます。

次世代シーケンサーを用いたヌクレオソームポジショニング解析における多大なるお力添えを賜りました、九州大学教授 大川恭行博士、ならびに九州大学前原一満博士に厚く御礼申し上げます。

論文を作成するにあたり貴重なご助言を賜りました、アメリカ National Institute of Environmental Health Sciences Paul A. Wade 博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、様々な御協力をいただきました胡桃坂研究室の皆様をはじめ多くの方々に深く感謝申し上げます。

## 研究業績書

(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>, <b>8</b>, 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>, <b>66</b>, 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>, <b>66</b>, 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>, <b>18</b>, pp593-600, 2017</p>

## 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>, <b>482</b>, 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>, <b>54</b>, 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>