

博士論文審査報告書

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

2020 年 2 月

真核生物の遺伝情報を担うゲノム 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。そのため、ゲノム DNA の転写、複製、修復、組換えといった反応が適切に行なわれるためには、クロマチン構造が適切に折りたたまれている必要がある。加えて、クロマチン構造の多様性とダイナミックな変動による遺伝子発現制御によって、すべての細胞が同じゲノム DNA 配列を持つにも関わらず、異なる機能を持つ細胞集団へと分化することを可能にしていると考えられている。

ヌクレオソームはクロマチン構造の基本構造単位であり、4 種類のヒストン H2A、H2B、H3、および H4 のそれぞれを二分子ずつ含むヒストン複合体（ヒストン 8 量体）に、DNA が左巻きに 1.65 回巻き付いた構造をしている。しかし、ヌクレオソームは均一な構造体ではなく、ヒストンタンパク質に導入される翻訳後修飾や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 配列の違いなどによって、構造的な多様性を有している。これらのヌクレオソームの特徴的な構造や性質が、クロマチン構造を介した遺伝子発現制御において中心的な役割を果たすと考えられている。しかし、ヌクレオソーム構造の多様性とダイナミクスについての知見が不十分であるため、それらによる制御機構については依然として不明な点が多い。

本論文では、ヌクレオソームの性質と構造に影響を与える因子として、主要型ヒストンとアミノ酸配列が異なっているヒストンバリエント H2A.J と、細胞の機能発現に重要な *ALB1* 遺伝子のエンハンサー DNA 配列に着目している。ヒストンバリエントは、染色体において主要型ヒストンと置き換わることでクロマチン構造中のヌクレオソームに取り込まれる。ヒストンバリエントを含むヌクレオソームは、その種類に特化した特徴、構造、ダイナミクスをもつため、染色体の特定の領域に取り込まれることで、ゲノム DNA の機能発現の制御に寄与していると考えられている。ヒストンバリエントの中でも、H2A.J は哺乳類特異的なヒストンバリエントであり、その機能に関しては未知であった。しかし近年、H2A.J が老化細胞に蓄積し、老化細胞に特徴的な Senescence-associated secretory phenotype(SASP)という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、H2A.J を含むヌクレオソームの物理的な性質や立体構造に関する知見が全く得られていないため、老化細胞での SASP に、H2A.J を含むヌクレオソームがどのように寄与しているのかは明らかになっていない。

マウス *ALB1* エンハンサー DNA 配列とは、アルブミン遺伝子 (*ALB1*) のコード領域から上流 10 キロ塩基対付近に位置する、エンハンサー領域の DNA 配列である。このマウス *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、そのうちの N1 領域のヌクレオソーム中には、FoxA や GATA4 といった、転写の活性化を促すパイオニア転写因子が結合することが知られている。ヌクレオソーム構造中に含まれる標的 DNA 配列には、ヒストンと DNA との結合のため、通常の転写因子は結合することができない。しかし、パイオニア転写因子は、ヌクレオソーム中の DNA 配列にも結合し、それによって特定の遺伝子発現を誘導することができる特殊な転写因子として定義されている。しかし、これまでにパイオニア転写因子が結

合する生体内に存在する DNA 配列を含んだヌクレオソームの構造解析がなされた例が著しく乏しいため、ヌクレオソームとパイオニア転写因子の結合の関係についてはその詳細は明らかにされていない。

以上のような背景を踏まえて、本論文では、ヒストンバリエーションとして H2A.J を、生体内に存在する DNA 配列としてマウス *ALB1* エンハンサー DNA 配列を選定し、それらを含んだヌクレオソームの再構成を行っている。そして、H2A.J もしくは *ALB1* エンハンサー DNA 配列を含んだヌクレオソームの性質および構造を明らかにすることを目的として研究を遂行している。本論文は全 4 章から構成されており、以下に各章の概要及び評価を記す。

第 1 章では序論として、本研究に関する背景をこれまでの先行研究に基づいて記述している。まずクロマチン構造の概要からはじまり、ヌクレオソーム構造、ヌクレオソーム構造に影響を与える要素、ヒストンバリエーションの概要について記述されている。そして本研究の対象となるヒストンバリエーション H2A.J とマウス *ALB1* エンハンサー DNA 配列に関するこれまでの知見について詳細に説明されている。本論文の研究内容を理解する上で必要な背景について、明確に記述されており、序論として必要な情報を提供していると評価できる。

第 2 章では、H2A.J を含んだヌクレオソームの性質および構造に関する研究について記述されている。まず、精製タンパク質を用いた試験管内再構成系によって H2A.J を含んだヌクレオソームを再構成し、精製することに成功している。このことは、H2A.J が実際にヌクレオソームを形成することができることを初めて示している。精製した H2A.J ヌクレオソームと、比較のために調製した主要型の H2A ヌクレオソームを用いて、ヌクレオソームの両端 DNA のヒストンとの結合が緩んでいる部分を特異的に切断する、マイクロコッカルヌクレアーゼ感受性試験を行っている。その結果から、H2A.J ヌクレオソームは、主要型の H2A ヌクレオソームとほぼ同様に、146 塩基対の DNA にヒストンが巻き付いた構造を形成していることを明らかにしている。このことは H2A.J ヌクレオソームでは、DNA 末端が安定にヒストンと結合していることを示唆している。次にヌクレオソームの構造安定性を熱安定性試験によって評価した結果、主要型の H2A ヌクレオソームと比較して H2A.J ヌクレオソームは構造安定性が若干高く、H2A-H2B がヌクレオソーム構造中に安定に保持されていることを発見している。H2A.J ヌクレオソームの構造安定性の詳細な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っている。そして、 2.21\AA という高い分解能で H2A.J ヌクレオソームの立体構造を決定することに成功している。今回明らかにした立体構造に基づいた変異体解析を行い、H2A.J の 40 番目のアラニンが構造安定性に寄与していることを明らかにしている。これらの知見は、これまで全く未知であったヒストンバリエーション H2A.J の、ヌクレオソームおよびクロマチンにおける機能の理解を深める上で重要な発見であり、クロマチン構造による転写調節機構の理解や、老化細胞での SASP 現象の理解を深める上で必須の情報を提供していると評価できる。

第 3 章では、*ALB1* エンハンサー DNA 配列を含んだヌクレオソームに関す

る研究について記述されている。*ALB1* エンハンサー DNA 配列を含んだヌクレオソームを調製し、DNA 配列に対するヌクレオソームの形成位置（ポジショニング）を、1 塩基の分解能で決定することに成功している。そして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 4.5Å 分解能で決定している。得られた立体構造から、*ALB1* ヌクレオソーム構造中で DNA とヒストンとの結合が緩い領域が存在することを見出し、その領域を生化学的解析によって確認している。さらに熱安定性試験の結果から、*ALB1* ヌクレオソームが、他の DNA 配列を含むヌクレオソームと比較して不安定な性質であることを明らかにしている。本章で得られた *ALB1* ヌクレオソームの性質および構造に関する知見は、パイオニア転写因子のヌクレオソームへの結合とそれに伴うクロマチン構造変換を理解する上で重要な情報を提供し、ゲノムにおけるクロマチンを介した遺伝子発現制御を理解するために重要な発見であると評価できる。

第 4 章では、H2A.J ヌクレオソームと *ALB1* ヌクレオソームの構造生物学的および生化学的な知見をもとに、ヒストンバリエーションおよび特定のゲノム制御領域の DNA 配列からなるヌクレオソームおよびクロマチンの構造多様性による遺伝子制御機構について考察している。さらに当該分野の今後の展望についても議論している。

以上のように本研究によって得られた知見は、ヒストンバリエーションや DNA 配列によるクロマチン構造制御と遺伝子機能との関連を理解する上で大変価値あるものであり、当該分野の発展に大きく貢献すると考えられる。予備審査において論文の章立てに分かりにくいところがあること、また実験方法の記述に不明瞭な点があるとの指摘がなされた。これに対して申請者は公聴会までに博士論文を修正した。公聴会では指摘された項目に関して適切な修正がなされていることを確認した。また、質疑では的確に応答し、申請者の十分な学識を確認することができた。以上より、本論文は博士（理学）の学位論文に値すると判断する。

2020 年 2 月

審査員

(主査)	早稲田大学教授	薬学博士（九州大学）	柴田 重信
	早稲田大学教授	博士（理学）京都大学	岡野 俊行
	早稲田大学教授	博士（理学）名古屋大学	岩崎 秀雄
	東京大学教授	博士（学術）埼玉大学	胡桃坂 仁志