

遺伝情報の維持と継承の分子機構：

染色体基本構造と DNA 組換え機構の解明を目指して

研究代表者 胡桃坂 仁志
(先進理工学部 電気・情報生命工学科 教授)

1. 研究課題

真核生物において、遺伝情報を担う DNA は、さまざまなタンパク質と結合したクロマチンと呼ばれる構造体として細胞核内に収納されている。近年、クロマチン構造は遺伝情報を核内に収納するための役割のみならず、ダイナミックな構造変化を伴った、遺伝情報の発現調節、維持、継承のための役割が明らかになってきた。クロマチンの最小機能単位は、4種類のヒストン H2A、H2B、H3、H4 を2分子ずつ含むヒストン8量体におよそ150塩基対のDNAが巻き付いたヌクレオソームと呼ばれる円盤状の構造体である。染色体上のセントロメアやテロメア、あるいは遺伝子の転写開始点などの特徴的なゲノム領域において、特異的なヒストンの亜種（ヒストンバリエント）、ヒストンの翻訳後修飾、DNAの化学修飾などが局在していることが明らかになっている。それらのことから、DNA配列に依らないエピジェネティックな要因によってクロマチンの構造変動が引き起こされることが示唆されるが、そのメカニズムは未だ明らかになっていない。エピジェネティックなDNA機能制御機構を明らかにするためには、ヒストンバリエントやヒストン修飾などによる多様なクロマチンの構造基盤と、クロマチン上で起こるDNA機能制御の理解が必須である。そこで本研究では、ヒストンバリエントやヒストン修飾、DNAの化学修飾などによる多様なクロマチンの基盤構造と、クロマチン上で起こるDNA機能発現機構を解明するために、構造生物学的解析、生化学的解析、細胞生物学的解析を行った。

2. 主な研究成果

2-1. AP site を含むヌクレオソームの X 線結晶構造解析および生化学的解析

生体内において、脱プリン反応や塩基除去修復などの過程で、AP-site と呼ばれる DNA 損傷が1日に10,000箇所以上生じることが明らかになっている。真核生物において、ゲノムDNAはヌクレオソームが連なったクロマチン構造として細胞核に収納されている。しかし、クロマチン中においてAP-siteがどのように収納されているのか、これまで明らかになっていなかった。そこで本研究では、AP-siteを含む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。X線結晶構造解析の結果、2箇所を導入したAP-siteのうち、一方はB-form DNAの構造を維持したまま塩基が脱落している状態であったのに対し、もう一方はAP-siteがヌクレオソームから飛び出した“inchworm”構造になっていることを

発見した。さらに、本研究で明らかになった inchworm 構造は、特定の塩基配列の中に AP-site が生じる際に形成されることが示唆された。塩基除去修復の過程において、APE1 タンパク質が AP-site を認識することが知られているが、inchworm 構造を形成した AP-site は APE1 によって認識できないことが示唆された。そのため、inchworm 構造の形成はゲノムの不安定化を引き起こす可能性が考えられた。本研究の成果は、Scientific Reports 誌に掲載された (Osakabe A., Arimura Y., et al., *Sci. Rep.*, 2016)。

2-2. クロマチンにおける相同組換えタンパク質 RAD51 および DMC1 の機能解析

精子や卵などの生殖細胞は遺伝情報を次世代に継承するために必須であり、減数分裂を経て成熟する。減数分裂期においては、相同染色体間で相同組換えが起こることでキアズマが形成され、遺伝的な多様性が付与される。相同組換えの中心的な酵素として RAD51 と DMC1 が存在し、どちらも相同な塩基配列を検索し対合させる、相同的対合反応を触媒する。しかし、これまで減数分裂期における RAD51 と DMC1 との機能分担はよく分かっていなかった。また、これまでの減数分裂期組換えの解析において、クロマチン上での解析は技術的な困難さのためにほとんどなされてこなかった。したがって、クロマチン上での RAD51、DMC1 の機能差異を明らかにすることは、真核生物における減数分裂期組換えのメカニズム解明に必須である。そこで本研究では、クロマチンにおける RAD51 と DMC1 との機能差異を明らかにするために、試験管内で再構成したクロマチンを用いて、さまざまな生化学的解析を行った。その結果、興味深いことに、RAD51 と DMC1 のクロマチン上での相同的対合活性は著しく異なることが明らかになった。そこで、RAD51 と DMC1 のヌクレオソームへの結合を解析したところ、RAD51 と比較して DMC1 のヌクレオソームへの結合効率率は著しく低いことが分かった。さらに、ヌクレオソームとリンカーDNA から構成されるオリゴヌクレオソームを基質として、RAD51 と DMC1 の相同的対合活性を調べた結果、RAD51 とは異なり、DMC1 はヌクレオソームが形成されていないリンカーDNA 領域において優先的に相同的対合反応を触媒することが初めて明らかになった。染色体上においては、減数分裂期組換えの頻度が高いホットスポットが存在し、その領域はヌクレオソームが形成されていないことがゲノム解析によって明らかになっている。本研究によって、DMC1 は組換えホットスポットでの相同的対合反応を触媒することが示唆され、RAD51 と DMC1 の機能差異および減数分裂期組換えのメカニズムの解明に向けた重要な知見が得られた。本研究の成果は、Scientific Reports 誌に掲載された (Kobayashi W., et al., *Sci. Rep.*, 2016)。

3. 共同研究者

大川 恭行 (九州大学・教授)	菅澤 薫 (神戸大学・教授)
木村 宏 (東京工業大学・教授)	清水 光弘 (明星大学・教授)
山縣 一夫 (近畿大学・准教授)	平岡 泰 (大阪大学・教授)
原口 徳子 (情報通信研究機構・主任研究員)	香川 亘 (明星大学・准教授)

4. 研究業績

4.1 学術論文

T. Kujirai, S. Machida, A. Osakabe, H. Kurumizaka, Influence of polynucleosome preparation methods on sedimentation velocity analysis of chromatin, *J. Biochem.*, 18,

doi:10.1093/jb/mvw081 (2017)

E. Kakumu, S. Nakanishi, HM. Shiratori, A. Kato, W. Kobayashi, S. Machida, T. Yasuda, n. Adachi, N. Saito, T. Ikura, H. Kurumizaka, H. Kimura, M. Yokoi, W. Sakai, K. Sugasawa, Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: regulation by acetylated states of histone H3, *Genes Cells*, doi: 10.1111/gtc.12479. (2017)

A. Osakabe, Y. Arimura, S. Matsumoto, N. Horikoshi, K. Sugasawa, H. Kurumizaka, Polymorphism of apyrimidinic DNA structures in the nucleosome, *Scientific Reports*, 7, 41783, (2017)

T. Kujirai, N. Horikoshi, N. Xie, H. Taguchi, H. Kurumizaka, Identification of the amino acid residues responsible for stable nucleosome formation by histone H3.Y, *Nucleus*, 1-10, [Epub ahead of print] (2017)

M. Koyama, W. Nagakura, H. Tanaka, T. Kujirai, Y. Chikashige, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, H. Kurumizaka, In vitro reconstitution and biochemical analyses of the *Schizosaccharomyces pombe* nucleosome, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 896-901, (2017)

J. Ueda, A. Harada, T. Urahama, S. Machida, K. Maehara, M. Hada, Y. Makino, J. Nogami, N. Horikoshi, A. Osakabe, H. Taguchi, H. Tanaka, H. Tachiwana, T. Yao, M. Yamada, T. Iwamoto, A. Isotani, M. Ikawa, T. Tachibana, Y. Okada, H. Kimura, Y. Ohkawa, H. Kurumizaka, K. Yamagata, Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis, *Cell Rep.*, 18(3), 593-600, (2017)

Y. Sato, Y. Kujirai, R. Arai, H. Asakawa, C. Ohtsuki, N. Horikoshi, K. Yamagata, J. Ueda, T. Nagase, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, A. Kimura, H. Kurumizaka, H. Kimura, A Genetically Encoded Probe for Live-Cell Imaging of H4K20 Monomethylation, *J Mol Biol.*, 428(20), 3885–3902, (2016)

K. Sato, M. Shimomuki, Y. Katsuki, D. Takahashi, W. Kobayashi, M. Ishiai, H. Miyoshi, M. Takata, H. Kurumizaka, FANCI-FANCD2 stabilizes the RAD51-DNA complex by binding RAD51 and protects the 5'-DNA end, *Nucleic Acids Research*, 44(22), 10758–10771, (2016)

M. Saotome, K. Saito, K. Onodera, H. Kurumizaka, W. Kagawa, Structure of the human DNA-repair protein RAD52 containing surface mutations, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.*, 72(Pt 8), 598-603, (2016)

Y. Roulland, K. Ouararhni, M. Naidenov, L. Ramos, M. Shuaib, SH. Syed, IN. Lone, R. Boopathi, E. Fontaine, G. Papai, H. Tachiwana, T. Gautier, D. Skoufias, K. Padmanabhan, J. Bednar, H. Kurumizaka, P. Schultz, D. Angelov, A. Hamiche, S. Dimitrov, The Flexible Ends of CENP-A Nucleosome Are Required for Mitotic Fidelity, *Mol Cell.*, 63(4), 674-85, (2016)

T. Kujirai, N. Horikoshi, K. Sato, K. Maehara, S. Machida, A. Osakabe, H. Kimura, H. Ohkawa, H. Kurumizaka, Structure and function of human histone H3.Y nucleosome, *Nucleic Acids Res.*, 44(13), 6127-41, (2016)

Y. Ichikawa, N. Morohashi, N. Tomita, AP. Mitchell, H. Kurumizaka, M. Shimizu, Sequence-directed nucleosome-depletion is sufficient to activate transcription from a yeast core promoter in vivo, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476, 57-62,

(2016)

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

N. Horikoshi, Y. Arimura, H. Taguchi, H. Kurumizaka, Crystal structures of heterotypic nucleosomes containing histones H2A.Z and H2A, *Open Biol.*, 6, 160127, (2016)

W. Kobayashi, M. Takaku, S. Machida, H. Tachiwana, K. Maehara, Y. Ohkawa, H. Kurumizaka, Chromatin architecture may dictate the target site for DMC1, but not for RAD51, during homologous pairing, *Scientific Reports*, 6, 24228, (2016)

4.2 総説・著書

4.3 招待講演

“HISTONE CONTRIBUTIONS TO CHROMATIN DYNAMICS”, Chromatin, Epigenetics and Transcription, Cold Spring Habor Asia, China, May 2016.

“ALTERED STRUCTURES AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF NUCLEOSOMES CONTAINING CANCER-ASSOCIATED HISTONE MUTATIONS”, DNA metabolism, genome stability and diseases, Cold Spring Habor Asia, China, June 2016.

“Structural basis of chromatin dynamics”, Telluride workshop on chromatin structure and dynamics, Telluride, USA, August 2016.

“Structural Versatility of Nucleosomes and Chromatin Dynamics”, Colorado Chromatin Meeting 2016, Colorado, USA, August 2016.

“Structural studies for epigenetic regulation of genomic DNA”, 10th International 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, Matsue, Japan, November 2016

“Structural studies for functional chromatin”, Japan-Swiss Symposium Chromatin Structure and Dynamics, Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Swiss, January 2017.

“Effect of histone mutations found in cancer cells on chromatin structure and dynamics”第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25-27 日、東北大学

「クロマチン構造によるゲノム DNA 制御」平成 28 年度遺伝研研究会「クロマチン・細胞核の動的構造変換とエピジェネティック制御」、2016 年 10 月 27-28 日、遺伝学研究所

“Three dimensional structures and dynamics of chromatin” 第 54 回生物物理学会、2016 年 11 月 25-27 日、つくば国際会議場

“Structural basis of epigenetic chromatin” 第 39 回日本分子生物学会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜

「染色体の構造基盤」染色体研究の最前線、2017 年 1 月 16-17 日

4.4 受賞・表彰

4.5 学会および社会的活動

オーガナイザー、一般公開シンポジウム「遺伝子のすがたーカラダの中で起こる不思議ー」
2016 年 8 月

オーガナイザー、第 4 回若手の会ワークショップ、2016 年 12 月 17 日、早稲田大学西早稲田
キャンパス

オーガナイザー、第4回ヒストンバリエーション研究会、2017年2月11日、東北大学
キャリアパス委員、分子生物学会
大学・研究所などにおける招待講演

1. 『Studies for chromatin structure and dynamics: Toward understanding epigenetic regulation of genomic DNA』、Shanghai Center for Plant Stress Biology、2016年6月
2. 『Epigenetic regulation of genomic DNA via chromatin structure』、University of Vienna、2016年9月
3. 『エピジェネティクスの構造基盤』、日本女子大学、2016年11月
4. 『エピジェネティクスの基盤としてのクロマチン高次構造解析』、大阪大学、2016年11月
5. 「岡崎フラグメント 50周年シンポジウム」名古屋大学、2016年12月
6. 『エピジェネティクスを担うクロマチンの高次構造』、熊本大学、2017年2月
7. 『真核生物染色体のセントロメア領域のクロマチン構造と機能』、新潟高校、2016年11月

5. 研究活動の課題と展望

近年のゲノム解析技術の発展により、特徴的なゲノム領域にヒストンバリエーション、ヒストン修飾、DNAの化学修飾などが特異的に局在することが塩基対レベルで明らかになってきた。さらに、クロマチンリモデリング因子などによって、クロマチン構造が再編成され、特殊なクロマチン構造が形成されることも分かってきた。このように、多様なヌクレオソームを基盤とした多彩なクロマチン構造によるDNA機能制御機構を解明することが今後も重要な研究課題である。X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析による原子レベルの立体構造解析、細胞や個体を用いた細胞生物学的解析、遺伝学的解析などの多彩なアプローチによって、多様なクロマチン構造によるDNA機能制御機構の解明が期待される。