

## 多様なヌクレオソームによるクロマチン動態制御機構の生化学的

### および構造生物学的解析

研究代表者 堀越 直樹

(理工学研究所 理工研が募集する次席研究員)

#### 1. 研究課題

真核生物のゲノム DNA はタンパク質と結合し、高度に凝集したクロマチン構造として、細胞核内に収納されている。ゲノム DNA の機能発現は、クロマチンのダイナミックな構造変動によって制御されると考えられているが、クロマチンの構造変動の制御機構は未だ不明な点が多い。クロマチンの基盤構造であるヌクレオソームは、4 種類のヒストンおよび約 150 塩基対の DNA から構成される円盤状の構造体であり、ヒストンや DNA における化学修飾や、ヒストンの亜種であるヒストンバリエントによって多様なヌクレオソームが形成され、これがクロマチン構造変換の原動力になることが考えられる。本研究では、クロマチンの構造変動の要因として考えられているヒストンバリエントやヒストンの化学修飾に着目し、これらのヌクレオソーム構造に及ぼす影響について構造生物学的手法および生化学的手法を用いて解析を行った。

#### 2. 主な研究成果

本研究は、ヒストンバリエント、ヒストンや DNA の化学修飾による多様なヌクレオソームの構造的性質を明らかにし、これらによって構築される高次クロマチン構造による DNA の機能発現制御機構を解明することを目的とした。そこで、転写制御に関与することが報告されているヒストンバリエントである H2A.Z を含むヌクレオソーム、転写活性化に関与することが報告されているヒストン H3 の 122 番目がクロトニル化されたリジンを含むヌクレオソーム、紫外線などによって生じる DNA 損傷であるシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) を含むヌクレオソームの構造生物学的解析および生化学的解析を行った。

先行研究において、研究代表者らはヒストンバリエント H2A.Z を含むヌクレオソームの立体構造を X 線結晶構造解析によって明らかにした (Horikoshi N. et al., *Acta D*, 2013)。H2A.Z あるいは主要型 H2A を含むヌクレオソームの立体構造を比較すると、H2A.Z (H2A) の L1 loop 領域の構造が異なること、さらには H2A.Z を含むヌクレオソームは構造安定性が低下していることが明らかになった。結晶構造解析は原子分解能で立体構造を決定でき、現存する構造解析の手法の中で最も高分解能で構造解析を行うことが可能な手法である一方で、溶液中で取り得る構造のスナップショットにすぎないという負の側面もある。この問題を解決するためには、X 線結晶構造解析に加えて、溶液中での構造を明らかにすることが H2A.Z のクロマチン上での機能解明の上で重要である。そこで本研究では、中性子小角散乱法を用いたコント

ラストバリエーション法によって、H2A.Zを含むヌクレオソームの溶液中での構造解析を行った。その結果、ヒストンに巻きついた DNA の構造には本質的な違いが見られなかったにも関わらず、H2A.Zを含むヒストン複合体は H2A を含むヒストン複合体よりも、ヌクレオソーム中で小さいことが示唆された。このことから、H2A.Z を含むヌクレオソームでは、ヒストンと DNA との相互作用が H2A を含むヌクレオソームの場合と比較して弱まっていることが考えられた。これらの結果から、転写制御における H2A.Z の機能を理解する上で重要な構造的知見が得られた。

次に、転写活性化に寄与することが報告されているヒストン H3 の 122 番目のリジンのクロトニル化(以降、H3K122Cr と記す)に着目した。これまでにヒストンの翻訳後修飾が転写の活性化領域や不活性化領域に局在することが数多く報告されている。しかし、これらの修飾のヌクレオソーム構造に及ぼす影響を明らかにされていなかった。そこで、本研究では、Native chemical ligation 法を用いて、ヒストン H3 の 122 番目のリジンをクロトニル化したヒストン H3K122Cr を調製した。次にこれを含むヒストン複合体を調製し、146 塩基対の DNA と混合してヌクレオソームを再構成した。これを用いて生化学的解析を行った結果、H3K122Cr を含むヌクレオソームは、野生型 H3 を含むヌクレオソームと比較して、熱安定性が低下することが明らかになった。その原因を調べるために X 線結晶構造解析によって原子レベルで立体構造を決定した。野生型 H3 を含むヌクレオソームにおいては、H3 の 122 番目のリジンが水を介して DNA と相互作用しているという報告があるのに対し、H3K122Cr を含むヌクレオソームでは、水を介した DNA と相互作用が消失していた。これによって、DNA とヒストンとの相互作用が減弱し、その結果ヌクレオソームの不安定化が誘起され、転写を活性化するというモデルが提案された。

最後に、紫外線による DNA 損傷のひとつであるシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) を含むヌクレオソームの X 線結晶構造解析を行った。先行研究によって、CPD を認識する UV-DDB タンパク質複合体は、DNA を湾曲させることで CPD を認識することが報告されていた。しかし、UV-DDB がヌクレオソームにおける CPD 損傷を認識する機構はもとより、ヌクレオソームにおける CPD 損傷の収納機構については明らかになっていなかった。そこで、CPD を含む DNA を調製し、ヒストン複合体と混合してヌクレオソームを再構成した。その結果、CPD を含むヌクレオソームは通常のヌクレオソームと同様に再構成されることがわかった。さらに、X 線結晶構造解析によって、CPD 損傷が導入されても、相同鎖 DNA との水素結合が部分的に保持されていることが明らかになった。この性質は、研究代表者らが既に構造決定した異なる DNA 損傷である (6-4) 光産物を含むヌクレオソーム構造と比較して、顕著に異なることが明らかになった。異なる DNA 損傷のヌクレオソームにおける収納機構によって、損傷を認識する因子の結合特異性が生み出されることが示唆された。

### 3. 共同研究者

胡桃坂 仁志 (理工学術院 教授)	立和名 博昭 (理工学術院・次席研究員)
越阪部 晃永 (理工学術院・次席研究員)	鈴木 佑弥 (先進理工学研究科・修士2年)
加藤 大貴 (先進理工学研究科・博士1年)	田口 裕之 (先進理工学研究科・博士1年)
鯨井 智也 (先進理工学研究科・博士1年)	杉山 正明 (京都大学)
井上 倫太郎 (京都大学)	大場 洋次郎 (京都大学)
佐藤 信浩 (京都大学)	松本 翔太 (神戸大学)

菅澤 薫 (神戸大学)

岩井 成憲 (大阪大学)

#### 4. 研究業績

##### 4.1 学術論文

Horikoshi, N., Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Matsumoto, S., Iwai, S., Sugasawa, K., and Kurumizaka, H., Crystal structure of the nucleosome containing ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **471**, 117–122 (2016).

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

Suzuki, Y., Horikoshi, N., Kato, D., Kurumizaka, H., Crystal structure of the nucleosome containing histone H3 with crotonylated lysine 122, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **469**, 483–489 (2015).

Osakabe, A., Tachiwana, H., Kagawa, W., Horikoshi, N., Matsumoto, S., Hasegawa, M., Matsumoto, N., Toga, T., Yamamoto, J., Hanaoka, F., Thomä N.H., Sugasawa, K., Iwai, S., Kurumizaka, H., Structural basis of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct recognition by UV-DDB in the nucleosome, *Sci. Rep.*, **5**, 16330 (2015).

Sugiyama, M., Horikoshi, N., Suzuki, Y., Taguchi, H., Kujirai, T., Inoue, R., Oba, Y., Sato, N., Martel, A., Porcar, L., Kurumizaka, H., Solution structure of variant H2A.Z.1 nucleosome investigated by small-angle X-ray and neutron scatterings, *Biochem. Biophys. Rep.*, **4**, 28–32 (2015).

Fujita, R., Otake, K., Arimura, Y., Horikoshi, N., Miya, Y., Shiga, T., Osakabe, A., Tachiwana, H., Ohzeki, J. I., Larionov, V., Masumoto, H., and Kurumizaka, H., Stable complex formation of CENP-B with the CENP-A nucleosome, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 4909-4922 (2015).

##### 4.2 総説・著書

堀越直樹、有村泰宏、胡桃坂仁志、ヒストン H2A バリエントによる細胞機能制御、*Annual Review 呼吸器* 2016、中外医学社、2016年、p20–27

##### 4.3 招待講演

##### 4.4 受賞・表彰

##### 4.5 学会および社会的活動

## 5. 研究活動の課題と展望

ヒストンバリエント H2A.Z は転写開始点周辺に局在し、転写制御に関与することが知られているが、転写が活発な領域にも不活発な領域にも局在することから、転写制御における H2A.Z の機能は未だに未解明なままである。ゲノム上において、H2A.Z と共局在するヒストン翻訳後修飾として、ヒストン H3 の 4 番目のリジンのメチル化、ヒストン H3 の 27 番目のリジンのメチル化、転写が活発な領域においては H2A.Z の N 末端領域のアセチル化などが報告されている。転写をはじめとする DNA の機能発現は、ヒストンバリエントやヒストン翻訳後修飾などによって協調的に制御されていることが考えられるが、このような協調的な制御についての解析はほとんど行われていない。今後は、H2A.Z に加えて H2A.Z と共局在するヒストン翻訳後修飾を含むクロマチンを再構成し、転写制御における H2A.Z の機能を生化学的解析および細胞生物学的解析によって明らかにする。