

## 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

遺伝情報の維持・継承は、あらゆる生物が生存するために必須である。真核生物において、遺伝情報の担い手であるゲノム DNA はさまざまな細胞核内タンパク質と結合し、高次に折りたたまれたクロマチン構造として細胞核内に収納されている。クロマチンの基盤構造は 4 種類のコアヒストンタンパク質(H2A、H2B、H3、H4)複合体に 145~148 塩基対の DNA が巻きついたヌクレオソームであり、さらにリンカーヒストンと呼ばれるタンパク質が結合することで、高次のクロマチン構造が形成されている。遺伝情報の維持・継承は、高次クロマチン構造およびその構造変動によって制御されていると考えられているが、その制御機構は未だほとんど分かっていない。クロマチン構造変動を介した遺伝情報の維持・継承の分子機構を解明することは、生命現象の基本原理を理解することのみならず、さまざまな遺伝子疾患に対する創薬研究にも大いに貢献できると考えられる。本研究では、精巣で高発現しているヒストンバリエント H3.5 による遺伝子発現制御や、生殖細胞特異的なリンカーヒストン H1T の相同組換えにおける機能について、構造生物学的手法、生化学的手法、細胞生物学的手法を組み合わせた多面的なアプローチによって解析を行った。

#### 2. 主な研究成果

##### 2.1 精巣で高発現するヒストンバリエント H3.5 の構造および機能解析

H3.5 は、霊長類特異的なヒストンバリエントとして発見された。また、H3.5 は H3.3 から派生したヒストンバリエントであり、精巣において mRNA レベルで高発現していることがわかっている。しかし、H3.5 がクロマチン構造に及ぼす影響や H3.3 との違いについてはほとんど解析されていない。そこで本研究では、H3.5 を含むヌクレオソームを試験管内で再構成し、構造生物学解析および生化学的解析を行った。生化学的解析を行った結果、H3.5 を含むヌクレオソームは H3.3 を含むヌクレオソームよりも構造安定性が低いことが明らかになった。X線結晶構造解析によって、H3.5 を含むヌクレオソームの立体構造を原子レベルで決定し、H3.3 を含むヌクレオソームとの構造比較を行った結果、H3.5 の 103 番目のロイシンが H3.5 を含むヌクレオソームの構造不安定性を誘起していることが明らかになった。さらに、細胞内での H3.5 の動態を Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法を用いて解析した結果、H3.3 と比較して、H3.5 は細胞核内での動態が早いことが明らかになった。この結果は、試験管内での H3.5 を含むヌクレオソームの構造不安定性と一致している。さら

に、免疫組織化学法を用いてヒト精細管における H3.5 の局在を解析した結果、H3.5 は精原細胞および一次精母細胞に局在していることが明らかとなり、また成熟した精子においては検出されなかった。さらに、ヒト精巣細胞を用いてクロマチン免疫沈降法および次世代シーケンス解析によって、H3.5 のゲノム上での局在を調べた。その結果、H3.5 は、遺伝子の転写量には依存せずに、遺伝子の転写開始点周辺に多く局在することが明らかになった。これらの結果から、H3.5 はヌクレオソームに不安定な性質を付与することによって、精子形成時におけるダイナミックなクロマチン再編成において重要な役割を果たすことが考えられた。

## 2.2 相同組換えにおける生殖細胞特異的リンカーヒストン H1T の機能解析

リンカーヒストンはヌクレオソームに結合して、クロマチンを高次に折りたたむ機能を持っている。リンカーヒストン H1 には多くのサブタイプが存在し、体細胞において発現する H1.0、H1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5、H1.x と、生殖細胞において発現する H1T、H1T2、H1LS1、H1foo に分類される。ラットの一次精母細胞においては、リンカーヒストンの 60% が H1T に交換されることが報告されていることから、H1T は生殖細胞において特徴的なクロマチン構造を形成して、正常な減数分裂を促すことが考えられる。そこで本研究では、ヌクレオソームが連なったポリヌクレオソームに H1T を結合させたクロマチンを再構成し、構造および機能解析を行った。さらに、細胞内での相同組換えへの影響について解析を行った。生化学的解析の結果、体細胞におけるリンカーヒストン H1.2 と比較して、H1T が結合したクロマチンでは凝集度が低いことが明らかになった。さらに、H1.2 と比較して、H1T は相同組換えにおいて中心的な役割を果たす RAD51 による相同対合反応を阻害する効果が低いことも明らかになった。また、H1T あるいは H1.2 を過剰発現させた細胞における相同組換え効率を解析した結果、H1.2 と比較して、H1T 過剰発現細胞では相同組換えの阻害効果が低いことが明らかになった。これらの結果から、H1T は緩んだクロマチンを形成することで、減数分裂期の相同組換えを促進させることが示唆された。

## 3. 共同研究者

木野 邦器 (先進理工学部・応用化学科)	香川 亘 (明星大学)
杉山 正明 (京都大学)	菅澤 薫 (神戸大学)
岩井 成憲 (大阪大学)	白石 晃司 (山口大学)
木村 宏 (東京工業大学)	大川 恭行 (九州大学)
田代 聡 (広島大学)	花岡 文雄 (学習院大学)
Nicolas Thomä (Friedrich Miescher Institute)	舛本 寛 (かずさ DNA 研究所)
高田 稔 (京都大学)	

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

Machida S, Hayashida R, Takaku M, Fukuto A, Sun J, Kinomura A, Tashiro S, Kurumizaka H., Relaxed Chromatin Formation and Weak Suppression of Homologous Pairing by the Testis-Specific Linker Histone H1T, *Biochemistry*, **55**, 637-646 (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 (2016).

Osakabe A, Tachiwana H, Kagawa W, Horikoshi N, Matsumoto S, Hasegawa M, Matsumoto N, Toga T, Yamamoto J, Hanaoka F, Thomä NH, 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).

Osakabe A, Adachi F, Arimura Y, Maehara K, Ohkawa Y, Kurumizaka H., Influence of DNA methylation on positioning and DNA flexibility of nucleosomes with pericentric satellite DNA, *Open Biol.*, **5**, 150128 (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. Res. Commun.*, **4**, 28–32 (2015).

Kagawa W, Arai T, Ishikura S, Kino K, Kurumizaka H., Structure of RizA, an L-amino-acid ligase from *Bacillus subtilis*, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, **71**, 1125-1130 (2015).

Takahashi D, Sato K, Hirayama E, Takata M, Kurumizaka H., Human FAN1 promotes strand incision in 5'-flapped DNA complexed with RPA. *J. Biochem.*, **158**, 263-270 (2015).

Fujita R, Otake K, Arimura Y, Horikoshi N, Miya Y, Shiga T, Osakabe A, Tachiwana H, Ohzeki J, Larionov V, Masumoto H, 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

Ichikawa Y, Nishimura Y, Kurumizaka H., Shimizu M., Nucleosome organization and chromatin dynamics in telomeres, *Biomol. Concepts*, **6**, 67-75 (2015).

有村泰宏、胡桃坂仁志、『ヒストンバリエントとは』

Surgery frontier、メディカルレビュー社、2015年、22巻(2)、p51-55

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

『Structural properties of the nucleosomes containing cancer-associated mutations』、大阪大学蛋白質研セミナー Nuclear organization and actin-dependent mechanisms in genome stability、大阪大学蛋白質研究所、吹田、2015年5月18-19日

『モノクローナル抗体が切り開いたヒストンバリエント研究の新展開』、第9回エピジェネティクス研究会年会、学術総合センター、東京、2015年5月25日

『ヒストン変異による発がん機構』、京都大学、2015年7月

『クロマチン構造と生命機能』、九州大学、2015年7月

『クロマチン脆弱性の構造基盤』、名古屋大学、2015年9月

『ヒストン変異によるエピジェネティック発がんの分子機構』、東京大学、2015年9月

『Structural versatility and dynamics of chromatin』、第53回日本生物物理学会年会、2015年9月13-15日、金沢大学 角間キャンパス、金沢

『Structural basis of epigenetic regulation of chromatin』、Gregor Mendel Institute (オーストリア)、2015年10月

『ヒストンバリエントによるクロマチン動構造制御』、遺伝研研究会 クロマチン・細胞核構造の形成とダイナミクスによるゲノム機能制御 2015年10月29-30日、国立遺伝学研究所、三島

『Structural studies of histone variants in chromatin』、沖縄科学技術大学院大学、2015年11月

『クロマチン構造とダイナミクスの分子機構』、国際高等研究所 クロマチン・デューディング、2015年12月19-20日、国際高等研究所、京都

『天然変性ハブとしてのクロマチン構造』、横浜 NMR 研究会、2016年1月8日、理化学研究所、横浜

『Structural basis of chromatin dynamics regulated by histone variants』、National University of Ireland, Galway (アイルランド)、2016年3月

#### 4.4 受賞・表彰

#### 4.5 学会および社会的活動

『クロマチン構造による DNA 機能のエピジェネティック制御』、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1-4日、神戸ポートアイランド、神戸、オーガナイザー

第3回ヒストンバリエント研究会、2016年2月28日、早稲田大学先端生命医科学センター、東京、オーガナイザー

『ミュージシャンを夢見たが、生命科学の面白さに目覚め研究者に』、第35回生命科学 DOKIDOKI 研究室、テルモ科学技術振興財団

『生命現象を支配する遺伝子 DNA の発見から現在の生命科学へ』、早稲田大学本庄高等学院、

2015年7月

『留学記』、NEXT10月号、サーモフィッシャー

## 5. 研究活動の課題と展望

遺伝情報の維持・継承の分子機構を解明するためには、生殖細胞におけるクロマチンの動態制御機構を明らかにすることが非常に重要である。精子形成過程においては、ダイナミックなクロマチンの再編成が行われ、成熟した精子においては大部分のヒストンがクロマチンから放出され、代わりにプロタミンがクロマチンに取り込まれることで非常に凝集したクロマチン構造が形成されることが分かっている。これらのことから、クロマチン再編成における精巣特異的なヒストンバリエントやリンカーヒストンの機能解明こそが、遺伝情報の維持・継承の分子機構を明らかにする上で重要な課題のひとつである。今後は、プロタミンへの置き換えりにおける精巣特異的なヒストンバリエントやリンカーヒストンの機能について解析を行うことで、精子形成過程におけるクロマチン再編成の分子機構の解明のみならず、不妊症などの疾患に対する新たな知見が得られることが期待される。