

動的クロマチン構造と機能 (クロマチン動構造)

領域番号:3506

平成 25 年度～平成 29 年度

科学研究費助成事業(科学研究費補助金)

(新学術領域研究 (研究領域提案型))

研究成果報告書

平成 31 年 4月

領域代表者 胡桃坂 仁志

東京大学 定量生命科学研究所教授

はしがき

新学術研究領域「動的クロマチン構造と機能 (略称:クロマチン動構造)」は、2013年に発足し、2018年3月をもって終了となりました。本領域では、生命現象を司るクロマチン構造とその動態を制御する機構の実体を“クロマチン動構造”と定義して、その解明を目指した研究を行ってきました。広範な生命現象と多くの疾病メカニズムの理解を目指すために、分子レベルから個体レベルまでの各階層の研究を推し進めるのみではなく、それらが融合した全体像を俯瞰することで、生命現象の仕組みを理解するよう努めてきました。そのために、構造生物学、生化学、細胞・発生生物学、超解像イメージング、遺伝学、シミュレーションなどの、異なった専門性を有する研究者を集結し、緊密な連携研究を推進するように努めました。その結果、振り返ってみれば約5年間の領域活動を通して、多くの領域内共同研究を推進することができました。そのような連携がさらなる連携を生み出し、我が国でのクロマチン研究を活性化できたのではないかと思います。そして和製クロマチン研究を、国際的な競争力を持つ分野に成長させる一助となったのであれば幸いです。改めて、本領域にご参加いただきました計画・公募の各班の皆様方、およびそれらを支えていただいた領域外の研究者の方々に、心より感謝を申し上げます。

クロマチンの基盤構造ユニットはヌクレオソームです。本領域の研究によって、ヌクレオソームの動的性質や構造多様性、およびそれらとクロマチンの機能発現との相関に関して、重要な情報を得ることができました。クロマチンは我々にすべての秘密を教えてくれたわけではありません。2017年に、ヌクレオソームの高分解能での立体構造解明20周年を記念したEMBO Conference “The Nucleosome: From Atom to Genomes” がハイデルベルグにて行われました。その時に歌った「Nucleosome Song」を最後にお届けいたします (<https://www.youtube.com/watch?v=ZfdVKcjCWNM>)

2019年1月

新学術領域「動的クロマチン構造と機能」 領域代表 胡桃坂 仁志

Nucleosome Song

Music&Words: Hitoshi Kurumizaka

1.
*Long, long time ago.
It came to the world.
Accidentally? inevitably?*

*For long, long time.
It is bound to DNA.
Obstacle? indispensable?*

*Round shape fascinates us.
Existence confuses us.
Yeasts, Archaea, Vertebrates
Please, please tell your secret only to me!*

*We are born to study the nucleosome.
We stay alive to understand the nucleosome.
We are born to fight with the nucleosome.
We still do not understand the nucleosome.*

2.
*Twenty years ago,
we saw your face.
Acidic patches on the face.*

*About a decade ago,
we knew something binds to there
Accidentally? inevitably?*

*Modifications, variants.
But, functions remain mystery.
Epigenetics, reprogramming.
Please, please tell the mechanism only to me!*

*We are born to study the nucleosome.
We stay alive to understand the nucleosome.
We are born to fight with the nucleosome.
We still do not understand the nucleosome.*



2017年 EMBO Conference “The Nucleosome: From Atom to Genomes”にて

目次

はしがき	1
I. 研究領域活動の総括	
1. 領域研究の目的	5
2. 研究組織	6
3. 研究成果の概要	11
4. 領域内連携状況	15
5. 特許	16
6. 受賞	17
7. マスメディア・報道発表等	18
8. 社会貢献・啓蒙活動等	18
II. 各研究課題の成果	
1. 総括班	21
2. 計画研究 (代表、分担)	28
3. 公募研究	95
4. 国際支援班	191
III. 付録	198

I . 研究領域活動の総括

1. 領域研究の目的

真核生物のゲノム DNA は、タンパク質や RNA と結合した“クロマチン”と呼ばれる分子複合体として、細胞核内に存在している。ヒト細胞核はおよそ 10 マイクロメートルの直径の球体であり、この微小空間に、長さ 2 メートルにも及ぶゲノム DNA が収納されている。ヌクレオソームはヒストン 8 量体に 2 重鎖 DNA が巻き付いた構造で、クロマチンの基盤となる繰り返し構造ユニットである。ヌクレオソームの形成はゲノム DNA を 1/5 にまで凝縮させるが、それでもなお 40 センチメートルにも及ぶ。このことは、単にヌクレオソームによる折りたたみだけでは、ゲノム DNA の細胞核への収納を説明することはできないことを示している。

ヌクレオソームは単体でも非常に安定であり、さらに高度に折り畳まれたクロマチンから DNA がほどけるためには、信じられないほどの大きなエネルギーが必要であることが、シミュレーションや 1 分子解析などの研究によって分かってきた。しかし生物はクロマチンにおいて、このような大きなエネルギー障壁が無いかのように、DNA の複製・転写・組換えを行っている。この事実は、クロマチン構造が、低エネルギーで動的に変換しうる性質を持つためと考えられるが、その詳細は全く不明であり、DNA 生物学の最大の謎となっている。

1997 年にアフリカツメガエルのヌクレオソーム構造 (Luger et al, *Nature*, 1997) が、原子分解能で発表された。2005 年には我が国でもヒトのヌクレオソーム構造 (Tsunaka et al, *Nucleic Acids Res*, 2005) が発表され、これらの先駆的研究がクロマチン構造研究の基礎となった。しかし、クロマチンにおける

DNA 機能制御では、単一なヌクレオソーム構造ではなく、多種類のヒストンバリエントや化学修飾によるヌクレオソームの多様性が生み出す“動的クロマチン構造”が中心的な役割を果たすと考えられている (図 1)。これまでのヌクレオソーム構造の解析研究を通して、特異的なヒストンバリエントを含むヌクレオソームは、特徴的な構造と安定性を有することが分かってきた。加えて、ヌクレオソームの不安定性が、特定のヒストン修飾を含むヌクレオソームにおいても観察された。これらの事実から、ヒストンバリエントや修飾を有するヌクレオソームの構造と安定性、そしてそれらの並び順などによって生み出されるクロマチンの多様性こそが、ゲノム DNA の転写・複製・組換えの諸反応を制御する“動的クロマチン構造”の本体であると着想した。

本研究は、ヒストンバリエントと修飾、クロマチン相互作用因子、核内構造体などが織りなす、生命現象を司るクロマチン構造とその動態の実体を明らかにすることを目的とするものである。構造生物学、シミュレーション、生細胞・超解像イメージング、オミクス解析、画像解析、細胞・発生生物学、遺伝学

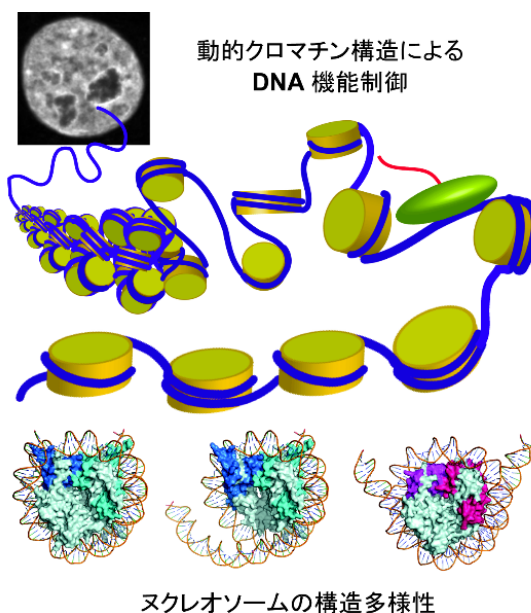


図 1 細胞核における動的クロマチン構造

など多岐に渡る手法を結集して、ブラックボックスとなっているクロマチン構造を解明し、さらに、それを動的に制御する因子や機構を明らかにすることを具体的な目標とする。本領域は、この“動的”クロマチン構造の実体を明らかにすることで、真核生物が DNA を遺伝情報として利用する仕組みについて新しい概念を創出し、広範な生命機能現象と多くの疾病のメカニズムの理解を目指すことを目的とした。

2. 研究組織

<総括班>

研究項目	課題番号/研究課題名	研究期間	代表者氏名 分担者氏名	所属機関/部局/職
X00 総括	25116001 動的クロマチン構造と機能	平成 25 年度 ～ 平成 29 年度	胡桃坂 仁志	早稲田大学・理工学術院・教授

<計画研究>

A01 計画	25116002 再構成ヌクレオソームを用いた動的クロマチン構造の解明	平成 25 年度 ～ 平成 29 年度	胡桃坂 仁志 堀 哲也	早稲田大学・理工学術院・教授 大阪大学大学院・生命機能研究・准教授
A01 計画	25116003 シミュレーション計算による動的クロマチンのダイナミクス解析	平成 25 年度 ～ 平成 29 年度	河野 秀俊	量子科学技術研究開発機構・関西光科学研究所・グループリーダー
A01 計画	25116004 ヘテロクロマチンの構造と機能の理解	平成 25 年度 ～ 平成 29 年度	小布施 力史	大阪大学・理学研究科・教授
A01 計画	25116005 計測と再構築による生細胞内クロマチンダイナミクスの高次元	平成 25 年度 ～ 平成 29 年度	木村 宏 山縣 一夫	東京工業大学・科学技術創成研究院・教授 近畿大学・生物理工学部・准教授
A01 計画	25116006 クロマチン機能を保証する核膜の構造と分子基盤	平成 25 年度 ～ 平成 29 年度	原口 徳子 浅川 東彦	国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所・主任研究員 大阪大学大学院・生命機能研究科・准教授
A01 計画	25116007 1分子in vivoイメージング超解像ナノ解析によるクロマチン動作原理解明	平成 25 年度 ～ 平成 29 年度	徳永 万喜洋	東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

A01 計画	25116008 核膜孔複合体構成因子・ 核輸送因子によるクロマチ ン動態制御の解明	平成 25 年度 ～ 平成 29 年度	米田 悦啓 岡 正啓 安原 徳子	国立研究開発法人医薬基盤・ 健康・栄養研究所・研究所長 国立研究開発法人医薬基盤・ 健康・栄養研究所・プロジェクト リーダー 日本大学文理学部生命科学 科・准教授
A01 計画	25116009 核内構造体とのインタープ レイによるクロマチン動構造 の制御	平成 25 年度 ～ 平成 29 年度	斉藤 典子 原田 昌彦	公益財団法人がん研究会・がん 研究所・部長 東北大学大学院・農学研究科・ 准教授
A01 計画	25116010 細胞分化にともなうクロマチ ン変動メカニズムの解明	平成 25 年度 ～ 平成 29 年度	大川 恭行	九州大学・生体防御医学研究 所・教授

〈公募研究 第 1 期〉

A01 公募	26116501 ヘテロクロマチン結合複合 体によるゲノム安定性の動的 制御	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	田中 耕三	東北大学・加齢医学研究所・教 授
A01 公募	26116502 ニューロンにおける細胞核 構造と遺伝子発現における 核ラミナの意義	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	滝沢 琢己	群馬大学・大学院医学系研究 科・准教授
A01 公募	26116504 マイクロ流体デバイスを用 いたゲノムサイズクロマチ ンの高次構造変化実時間観 察	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	小穴 英廣	東京大学・大学院工学系研究 科・准教授
A01 公募	26116505 マウス卵割期胚におけるN C比制御と核形態・クロマチ ン状態変化の解析	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	大杉 美穂	東京大学・総合文化研究科・准 教授
A01 公募	26116508 核膜アンカーに依存したセ ントロメアクロマチン制御機 構の解析	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	松本 智裕	京都大学・放射線生物研究セン ター・教授
A01 公募	26116509 CV-SANS法による変異 型ヌクレオソームの詳細構 造解析	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	杉山 正明	京都大学・原子炉実験所・教授
A01 公募	26116511 相同染色体対合に必要な 非コードRNAが動的クロマ チン構造と相互作用する仕 組み	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	平岡 泰	大阪大学・生命機能研究科・教 授

A01 公募	26116513 転写と共役したクロマチン 初期化制御の解析	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	加藤 太陽	島根大学・医学部・助教
A01 公募	26116514 ゲノム修復における動的ク ロマチン構造変換	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	田代 聡	広島大学・原爆放射線医科学 研究所・教授
A01 公募	26116515 長鎖ノンコーディングRNA のクロマチンターゲティング	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	佐渡 敬	近畿大学・農学部・教授
A01 公募	26116516 新規エピゲノム分析による クロマチン変異の解析	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	甲斐 雅亮	長崎大学・医歯薬学総合研究 科(薬学系)・教授
A01 公募	26116517 血液細胞分化におけるクロ マチン動構造の研究	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	斉藤 寿仁	熊本大学・自然科学研究科・教 授
A01 公募	26116518 ノンコーディングRNA転写 と共役したクロマチン構造 変化の制御機構の解明	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	廣田 耕志	首都大学東京・理工学研究科・ 教授
A01 公募	26116519 X線小角散乱を用いた再構 成クロマチンの動的構造解 析	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	小田 隆	横浜市立大学・大学院生命医 科学研究科・特任助教
A01 公募	26116521 ヌクレオソームの多様な構 造を解析する技術の開発	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	香川 亘	明星大学・理工学部・准教授
A01 公募	26116522 DNA複製フォークでのクロ マチン構造維持機構	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	荒木 弘之	国立遺伝学研究所・細胞遺伝 研究系・教授
A01 公募	26116523 セントロメア・クロマチンの動 構造の分子基盤と意義	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	広田 亨	公益財団法人がん研究会・がん 研究所・部長
A01 公募	26116525 分裂期染色体凝縮におけ るコアヒストン・ヌクレオソ ームの役割	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	新富 圭史	国立研究開発法人理化学研究 所・平野染色体ダイナミクス研 究室・研究員
A01 公募	26116526 核膜孔複合体と輸送運搬 体によるimportin輸送制 御:細胞核機能から高次生 命へ	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	今本 尚子	国立研究開発法人理化学研究 所・今本細胞核機能研究室・主 任研究員

<公募研究 第2期>

A01 公募	16H01323 ヒストンを基盤とした染色体 構築メカニズムの解明	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	新富 圭史	国立研究開発法人理化学研究 所・平野染色体ダイナミクス研 究室・研究員
-----------	---	---------------------------	-------	---

A01 公募	16H01321 時空間的核アクチン重合化 制御によるクロマチン構造 と転写状態の変動	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	宮本 圭	近畿大学・生物理工学部・講師
A01 公募	16H01320 ヘテロクロマチン形成とクロ マチン環境	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	佐渡 敬	近畿大学・農学部・教授
A01 公募	16H01319 雄性不妊及びび発がん過程 のクロマチン動態解析	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	上田 潤	旭川医科大学・医学部・准教授
A01 公募	16H01318 ヒストンバリエーションに基づくク ロマチンの機能の推定	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	浜田 道昭	早稲田大学・理工学術院・准教授
A01 公募	16H01317 分裂酵母 CENP-A ヌクレオ ソームと動原体の再構築	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	佐藤 政充	早稲田大学・理工学術院・准教授
A01 公募	16H01316 ヌクレオソームの多様な構 造を解析する技術の開発	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	香川 亘	明星大学・理工学部・准教授
A01 公募	16H01315 HP1 による動的クロマチン 構造変換の制御	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	中山 潤一	基礎生物学研究所・クロマチン 制御研究部門・教授
A01 公募	16H01314 非コード RNA によるクロマ チン・高次ゲノム構造制御 機構の解明	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	廣田 耕志	首都大学東京・理工学研究科・ 教授
A01 公募	16H01312 ゲノム修復における動的ク ロマチン構造変換	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	田代 聡	広島大学・原爆放射線医科学 研究所・教授
A01 公募	16H01311 クロマチン動構造を介した DNA 損傷修復制御の分子 基盤	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	菅澤 薫	神戸大学・バイオングナル総合 研究センター・教授
A01 公募	16H01310 サブテロメアクロマチン構造 の動的制御メカニズム	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	加納 純子	大阪大学・蛋白質研究所・准教授
A01 公募	16H01309 染色体上の非コード RNA が動的クロマチン構造を制 御する仕組み	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	平岡 泰	大阪大学・生命機能研究科・教授
A01 公募	16H01307 ヒストン H2AX の交換反応 を介した損傷クロマチンダイ ナミクス	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	井倉 毅	京都大学・放射線生物研究セン ター・准教授
A01 公募	16H01306 量子ビーム散乱法の協奏 的利用による機能性ヌクレ オソームの溶液構造解析	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	杉山 正明	京都大学・原子炉実験所・教授

A01 公募	16H01304 セントロメアにおけるクロマチン構造制御の分子基盤	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	有吉 眞理子	大阪大学・生命機能研究科・特任助教
A01 公募	16H01303 ヌクレオソーム動構造とそのエピジェネティック制御の分子シミュレーション研究	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	高田 彰二	京都大学・理学研究科・教授
A01 公募	16H01300 人工触媒システムを用いたヒストンアシル化の機能解析	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	川島 茂裕	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任講師
A01 公募	16H01298 DNA 修復とクロマチン制御の統合的理解によるがん治療への応用	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	細谷 紀子	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師
A01 公募	16H01297 クロマチン構造変化の可視化によるニューロン分化遺伝子群制御機構の解明	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	岸 雄介	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教
A01 公募	16H01296 新規分子 CAMP を含むヘテロクロマチン結合複合体によるゲノム安定性維持機構	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	田中 耕三	東北大学・加齢医学研究所・教授
A01 公募	16H01295 選択的遺伝子領域の動的ヘテロクロマチン化誘導機構	平成 28 年度 ～ 平成 29 年度	落合 恭子	東北大学・医学系研究科・助教

<国際活動支援班>

Y00 支	15K21730 クロマチン動構造の国際共同研究ネットワーク形成	平成 27 年度 ～ 平成 29 年度	胡桃坂 仁志 木村 宏	早稲田大学・理工学術院・教授 東京工業大学・科学技術創成研究院・教授
----------	-------------------------------------	---------------------------	----------------	---------------------------------------

<交付決定額(配分額)>

	合計	直接経費	間接経費
平成 25 年度	329,420,000 円	253,400,000 円	76,020,000 円
平成 26 年度	292,170,000 円	224,400,000 円	67,770,000 円
平成 27 年度	299,720,000 円	230,900,000 円	68,820,000 円
平成 28 年度	307,320,000 円	236,400,000 円	70,920,000 円
平成 29 年度	306,930,000 円	236,100,000 円	70,830,000 円
総計	1,535,560,000 円	1,181,200,000 円	354,360,000 円

3. 研究成果の概要

本研究は、ヒストンバリエーションと修飾、クロマチン相互作用因子、核内構造体などが織りなす、生命現象を司るクロマチン構造とその動態の実体を明らかにすることを目的とするものである。構造生物学、シミュレーション、生細胞・超解像イメージング、オミクス解析、画像解析、細胞・発生生物学、遺伝学など多岐に渡る手法を結集して、ブラックボックスとなっているクロマチン構造を解明し、さらに、それを動的に制御する因子や機構の解明に取り組んできた。

(1) 多様なヌクレオソームの構造と動態の解明

胡桃坂は、様々な翻訳後修飾を含むヒストンを高純度で作製する方法を確立し、多様なヒストン修飾や DNA 損傷、DNA メチル化をもったヌクレオソームを高効率に作製する方法を構築した。またポリヌクレオソーム(ヌクレオソームが2つあるいは3つ連なったもの)を作製する方法を確立した。これらの方法を駆使して作製した多様な(様々なヒストンバリエーション、ヒストン修飾、DNA 損傷、DNA メチル化などを含む)ヌクレオソーム構造を、X 線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析によって、新たに28種類決定した(菅澤、大川、木村、香川、上田、山縣、川島らとの共同研究、論文25報)。これまでに決定したヌクレオソーム構造は98種類に達し、まさに当該分野では世界のトップリーダーとなった。特に、セントロメア構造と機能との関係を解析した。セントロメアの重要な基盤構造である、セントロメア特異的ヒストン H3 である CENP-A を2分子含んだ CENP-A/CENP-A ヌクレオソームに関して、その特徴的な立体構造と構造的性質を、X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡解析によって世界に先駆けて明らかにした。一方、CENP-A/H3.3 ハイブリッドヌクレオソームが、悪性度の高いがん細胞の染色体腕部に存在することを見出し(Lacoste et al, *Mol Cell*, 2014)、その構造解析にも成功した(Arimura et al, *Sci Rep*, 2014)(堀、香川との共同研究)。さらに、CENP-B と CENP-A ヌクレオソームの結合を明らかにした(Fujita et al, *Nucleic Acids Res*, 2015)。堀は胡桃坂と共同で、ヒストン様構造を形成する CENP-T-W-S-X ヘテロ4量体が正のスーパーコイル活性をもつことを発見した(Takeuchi et al, *Nucleic Acids Res*, 2014)。また、堀は木村と共同し、セントロメア特異的にヒストン H4K20-モノメチル化修飾が集積し、このメチル化が機能的セントロメア形成の分子スイッチとして機能することを提唱した(Hori et al, *Dev Cell*, 2014, 掲載誌表紙を飾る成果)。加えて堀は CENP-A の取り込みに関与するライセンス因子 KNL2 の機能ドメインを明らかにし(Hori et al, *Dev Cell*, 2017)、正常な動原体構築がセントロメアの位置・大きさの安定維持に重要であることを示した(Hori et al, *J Cell Biol*, 2017, 掲載誌 "special collection" に選定)。さらに胡桃坂は、CENP-A ヌクレオソームを含んだポリヌクレオソーム構造をクライオ電子顕微鏡を用いて明らかにし、堀と共同で、セントロメアのゆるんだ構造と可塑性こそがセントロメア機能に重要であることを解き明かしつつある。これらのセントロメアを対象とした解析に加え、胡桃坂は、大川、河野、杉山と共同で、その存在が謎とされていたオーバーラッピングジヌクレオソームの構造を決定し、転写開始点近傍に形成されていることを明らかにした(Kato et al, *Science*, 2017, 報道発表)。また、クライオ電子顕微鏡を用い、エンハンサー領域の DNA 配列を含むヌクレオソームの構造を 4.0 Å の分解能で明らかにした(Takizawa et al, *Open Biol*, 2018)。また、中山と共同し、

ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 が結合した、H3K9-トリメチル化を含むジヌクレオソームの構造を明らかにした (Machida et al, *Mol Cell*, 2018, 報道発表)。さらに、小田や杉山と共同で、結晶化が困難なヌクレオソームやポリヌクレオソームの構造を X 線小角散乱法や中性子散乱法を用いて明らかにした (Arimura et al, *Sci Rep*, 2013; Sugiyama et al, *Biophys J*, 2014)。

(2) シミュレーションによるクロマチン構造ダイナミクスの可視化

河野は、独自に開発した計算科学的なアプローチにより (Ikebe et al, *J Comput Chem*, 2014)、種々のヒストンバリエントや化学修飾をもったヌクレオソームやポリヌクレオソームについて、実験的には捉えることが困難な、ナノ秒からミリ秒の原子・分子のダイナミクス解析を行った。胡桃坂と共同し、セントロメア CENP-A ヌクレオソームでの DNA 不安定性が、2つのアミノ酸残基の違いで生じることを明らかにした (Kono et al, *PLoS One*, 2015)。また、基準振動解析計算を使って、クライオ電子顕微鏡で得られたトリヌクレオソーム画像を再現する原子モデルを構築した結果、CENP-A ヌクレオソームが入ることによって、両端が開いたセントロメア特有のヌクレオソーム構造を作ることが明らかになった (論文準備中)。ヒストン H3 の N 末端領域のアセチル化とメチル化の影響を、スーパーコンピュータを用いて解析し、アセチル化はコンパクトな構造形成に寄与すること、メチル化はアセチル化ほどの寄与がないことを明らかにした (Ikebe et al, *PLoS Comput Biol*, 2016; Kono et al, *PLoS Comput Biol*, 2018)。また、アセチル化とメチル化はともに、ヌクレオソームに巻き付いた DNA をヒストンコアから少し解離させる効果を持つことを発見した (Li and Kono, *Sci Rep*, 2016)。

(3) ヒストンバリエント・修飾の高次生命機能における役割の解析

木村は、徳永、大川と共同し、独自開発した FabLEM 法を用いた翻訳後修飾の生細胞動態解析、1 分子イメージング、ChIP-seq 解析などを組み合わせて、転写活性化におけるヒストン H3K27 アセチル化の役割を明らかにした (Stasevich et al, *Nature*, 2014, 報道発表)。また、山縣、胡桃坂、小布施と共同して、生細胞・胚・個体においてヒストン修飾の動態を解析できるプローブ Mintbody を開発した (Sato et al, *Sci Rep*, 2013; Kimura et al, *Histochem Cell Biol*, 2015, 報道発表)。さらに、山縣、上田、浅川、原口、平岡、胡桃坂と共同し、マウスやゼブラフィッシュの発生過程や減数分裂過程などの高次生命現象を生きたまま可視化することに成功した (Sato et al, *J Mol Biol*, 2016, 掲載誌の表紙を飾る成果; Sato et al, *BioProtoc*, 2017)。この手法は、遺伝子導入が可能なすべてのモデル生物に応用することができるため、今後、発生・分化に伴うヒストン修飾動態の解明やエピゲノムを標的とした創薬開発等への幅広い貢献が期待できる。さらに、山縣は、木村と共同して、メチル化 DNA を認識する蛍光タンパク質を発現するノックインマウス (MethylRO) を作製し、発生過程でのメチル化 DNA を全身にわたり長時間イメージングすることに成功した (Ueda et al, *Stem Cell Rep*, 2014)。それを用いて、マウスの着床前初期胚発生過程及び ES 細胞の樹立過程におけるメチル化 DNA の長期ライブセルイメージングを行い、クロマチン構造そのものが細胞分化の指標になり得ることを明らかにした。山縣は、独自の長時間イメージング技術を用いて、不活性 X 染色体の再活性化過程を明らかにした (Kobayashi et al, *Development*, 2016)。さらに、ゲノム編集技術を使って、マウス胚のセントロメア周辺の DNA メチル化

レベルを改変できる方法を開発した (Yamazaki et al, *PLoS One*, 2017)。大川は、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析法(ゲノミクス)を駆使し、木村と共同で、ヒストン H3 のバリエーションを、2015 年にマウスで 14 種、ヒトで 3 種新たに発見した (Maehara et al, *Epigen Chrom*, 2015; Taguchi et al, *Biochemistry*, 2017)。さらに、山縣、上田、木村、胡桃坂と共同で、これら新規ヒストンバリエーションの骨格筋分化・再生、精子形成における役割を明らかにした (Ueda et al, *Cell Rep*, 2017, 報道発表; Harada et al, *Nat Commun*, 2018, 報道発表)。また、分化に必要な遺伝子発現制御に重要であることを明らかにした (Harada et al, *Nucleic Acids Res*, 2015a, 2015b)。徳永は、新しい 1 分子構造解析イメージング法として、移動部分軌跡解析法 (moving subtrajectory analysis) を開発した (Ito et al, *Sci Rep*, 2017)。これは、従来法では求めることができなかった反応速度定数の定量を実現し、単色の 1 分子イメージング画像からでも可能にする技術である。さらに、多色位置ずれ補正の高精度化や多色超解像ナノ解析方法の高速化を行い、4 色対応 2 色同時観察可能な 1 分子イメージングシステムを構築した。

(4) 核内構造体によるクロマチン機能制御機構の解明

原口と浅川は、徳永、平岡と共同し、分裂酵母の核膜孔複合体を構成する全タンパク質を解明した (Asakawa et al, *Nucleus*, 2014, 掲載誌の表紙を飾る成果)。さらに、平岡と共同し、Nup132 が減数分裂期セントロメア機能に重要な役割があることを明らかにした (Yang et al, *J Cell Biol*, 2015; Yang et al, *Cell Cycle*, 2015; Asakawa et al, *Front Cell Dev Biol*, 2016)。また、平岡、小布施と共同し、核膜タンパク質 LEM2 がセントロメアのヘテロクロマチン形成を増強することも明らかにした (Tange et al, *Genes Cells*, 2016; Hirano et al, *Genes Cells*, 2017)。原口は、平岡と共同し、DNA を結合したビーズ (DNA ビーズ) を生きた細胞に導入するという新規の方法と独自のライブセルイメージング (LiveCLEM 法) を使って、DNA が細胞内に入った直後の細胞応答を可視化することに成功、DNA ビーズ周辺に“核膜様の膜構造”が形成されることを明らかにした (Kobayashi et al, *PNAS*, 2015, 報道発表) (将来の「人工核」作製に道を拓く成果)。さらに、転写因子 p62 タンパク質を除去することで核膜形成を増進させると、DNA トランスフェクション効率が向上することを発見した (Tsuchiya et al, *FEBS Lett*, 2017, 報道発表; Tsuchiya et al, *FEBS Open Bio*, 2018)。米田と岡は、小布施と共同して、核移行因子 importin- α が、サイレンシング因子 TRIM28 への結合を介してクロマチン制御因子として機能すること (Moriyama et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2015)、細胞老化に関わるコアヒストン結合因子 RBBP4 と結合することで、細胞老化を調節することを明らかにした (Tsujii et al, *J Biol Chem*, 2015)。米田と安原は、大川、胡桃坂、木村、斉藤と共同し、細胞分化やがん形成に関わる核輸送因子 importin- α 1 が特定のクロマチン領域に結合して遺伝子発現に働くことを明らかにした (Yamada et al, *Sci Rep*, 2016; Yasuhara & Yoneda, *Neurochem Int*, 2017)。斉藤は、機械学習を用いた独自の画像解析技術を確立し応用した (Tokunaga et al, *Sci Rep*, 2014; Ono et al, *Mol Biol Cell*, 2017; Takagi et al, *J Cell Sci*, 2018)。また、原田と共同し、核内アクチンファミリータンパク質による核小体の形成機構を発見した (Kitamura et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2015)。原田は、徳永、胡桃坂、木村、田代と共同し、核内アクチン関連タンパク質ファミリーの機能解析を行い、DNA 転写や修復の制御、遺伝子初期化に関わることを明らかにし

た (Osakabe et al, *PLoS One*, 2014; Nishibuchi et al, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014; Yamazaki et al, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015)。

(5) ヘテロクロマチンなどのクロマチンドメイン形成機構の解析

小布施は、ヘテロクロマチンの構造と機能を理解するために、H3K27あるいはH3K9のメチル化酵素であるPRC2、G9aについて新規相互作用因子の解析を行い、PRC2は少なくとも7種類、G9a複合体は少なくとも3種類の複合体として存在することを明らかにした(論文準備中)。また、木村と共同し、新規HP1結合タンパク質SCAIの解析をとおしてDNA二重鎖切断時の損傷応答における修復経路選択のメカニズムを明らかにした(Isobe et al, *Cell Rep*, 2017)。また、佐渡と共同し、遺伝子量補償(dosage compensation)と発現量調節との関係を明らかにした(Sakata et al, *Development*, 2017)。佐渡は、条件的ヘテロクロマチンの構築に必要なSmcHD1の機能を検討し、従来考えられてきた不活性X染色体の維持ではなく、クロマチン環境保持に重要であることを提唱した(論文投稿中)。中山は、胡桃坂と共同し、ポリコム抑制複合体の因子であるCBX2のリン酸化は、ヌクレオソームとの結合に重要であることを発見した(Kawaguchi et al, *J Biochem*, 2017)。田中は、HP1結合タンパク質CAMPとRev7の複合体構造を明らかにした(Hara et al, *J Biol Chem*, 2017)。また、原口と共同で、分裂期の動原体の側面に微小管が結合することが、その後の正常の分離に必要であることを発見した(Itoh et al, *Sci Rep*, 2018)。

(6) クロマチンの動構造と疾病との関係を明らかにする

斉藤は、大川と共同し、乳がんの再発過程で、核内RNAクラウドと呼ばれる構造体を形成する非コードRNA(エレノアと命名)を同定し、エレノア構造が、乳がん再発と密接に関連することを明らかにした(Tomita et al, *Nat Commun*, 2015, 報道発表; Tomita et al, *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017)。この発見は、今後、再発乳がんの治療に役立つものと期待されている。米田と岡は、大川、木村と共同し、白血病因因子Nup98-HoxA9が特定のクロマチン領域に結合し、核外輸送因子Crm1と協調的に局所的な遺伝子発現を活性化することを明らかにした(Oka et al, *eLife*, 2016, 報道発表)。今後、白血病の診断や創薬にもつながると考えられる。山縣と上田は、大川が発見したH3mmTバリエントのノックアウトマウスを作製し、胡桃坂と共同で、H3mmTが精子形成に必須な役割を果たすことを明らかにした(Ueda et al, *Cell Rep*, 2017, 報道発表)。このバリエントは精巣に高発現しており、その変異は、無精子症の原因となるものと注目されている。

異分野融合によって得られた階層を越えるクロマチン動構造の新概念

領域代表の胡桃坂は、領域開始前に、セントロメア特異的CENP-Aヌクレオソームの構造を解析し、ヒストンに巻きついたDNAの両端が通常のヌクレオソームより開いた形をしていることを突き止めた(Tachiwana et al, *Nature*, 2011)。この発見は、従来のセントロメア凝縮説とは相反するものであり、その構造の意義の解明が待たれていた。本領域では、X線結晶解析や中性子線散乱解析によるセントロメアヌクレオソームの原子・分子レベルでの構造解析を中心に、シミュレーションによる解析、クライオ

電子顕微鏡による構造解析、生細胞蛍光イメージング法を使った動態解析、遺伝子変異・破壊による機能解析など、異分野の先端的分析技術を駆使して検討を行った。その結果、代表的なヘテロクロマチンとして知られているセントロメアは従来考えられていたほど凝縮していないこと、セントロメアヌクレオソームの“開いた”動的構造こそがセントロメア機能に必須であるという結果を得た。これは、クロマチン構造に新概念をもたらす成果である。

4. 領域内連携状況

「クロマチン動構造と機能」を理解するために、異なる手法(結晶構造解析、イメージング、プロテオミクス解析、ゲノム解析、シミュレーションなど)、研究対象(タンパク質、細胞、組織、個体など)、専門性(生化学、細胞生物学、構造学、物理学、情報科学など)をもつ研究者から成る、9つの計画研究課題を組織した(図2)。これらの計画研究課題は、それぞれ独立性を保ちつつも、「クロマチン動構造と機能の解明」というひとつの目標に向かって、ひとつのバーチャルラボラトリーのような形で研究活動を行っている。そのため、本領域では、項目分けをせず、全計画研究を、項目 A01 として組織した。平成 26 年度には、19 件の公募研究が項目 A01 に加わり、計画研究では不足していた手法(溶液での X 線・中性子散乱による構造解析など)や研究材料(RNA など)、専門性(遺伝学、医学など)を補填し、さらに充実した組織とした。平成 28 年には、22 件の公募研究を採択することで、中間評価で指摘を受けた「シミュレーションや理論科学の強化」を図った。

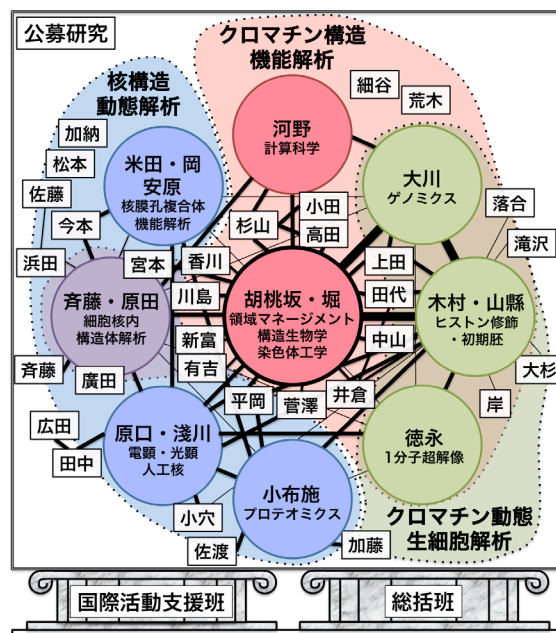


図2 領域内連携状況

共同研究の推進

本研究領域では、目標達成のため、共同研究を円滑に進めることを特に重視している。そのために、各専門分野の研究者を計画研究課題に配置し、アイデアさえあれば、ただちに専門性の高い(時には高価で)特殊な装置(例えば、ライブセルイメージング装置、超分解を実現できる1分子イメージング装置、プロテオミクスに用いる質量分析装置、高速演算処理能力をもつコンピュータなど)や、専門性の高い手法(再構成ヌクレオソーム、結晶構造解析、FRAP、分子・細胞イメージング、プロテオミクス、ゲノミクス、ノックアウトマウス作製、ハイコンテンツ画像解析、シミュレーションなど)を使えるように、研究体制を整えた。総括班の支援及び助言により、計画研究者らは、そのような有機的な連携を積極的に行った。その結果、領域内共同研究の成果として114報の論文が出された。

5. 特許

- ・ 胡桃坂仁志
 1. 2016-167967, 大川恭行、原田哲仁、胡桃坂仁志、木村宏、半田哲也、佐藤優子、林陽子, DNA 結合タンパク質の結合領域の近傍に所望の DNA 断片を挿入する方法, 国立大学法人九州大学、国立大学法人東京工業大学、2017 年 5 月 24 日、大川、胡桃坂、木村
 2. 2017-111580, 木村宏、佐藤優子、大井彰人、胡桃坂仁志、鯨井智也、大川恭行, ヒストン H3 トリメチル化リシン特異的モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片, 東京工業大学、2017 年 6 月 6 日、木村、胡桃坂、大川

- ・ 木村宏
 1. 2016-167967, 大川恭行、原田哲仁、胡桃坂仁志、木村宏、半田哲也、佐藤優子、林陽子, DNA 結合タンパク質の結合領域の近傍に所望の DNA 断片を挿入する方法, 国立大学法人九州大学、国立大学法人東京工業大学、2017 年 5 月 24 日、大川、胡桃坂、木村
 2. 2017-111580, 木村宏、佐藤優子、大井彰人、胡桃坂仁志、鯨井智也、大川恭行, ヒストン H3 トリメチル化リシン特異的モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片, 東京工業大学、2017 年 6 月 6 日、木村、胡桃坂、大川

- ・ 原口徳子
 1. 特許第 5397932 号, 原口徳子、平岡泰、他, Nuf2 蛋白質抗体とその製造方法、抗原、検知方法, 独立行政法人情報通信研究機構, 出願 2008 年・公開 2009 年・登録 2013 年, 平岡泰
 2. 特許第 5476582 号, 原口徳子、平岡泰、他, Vrk1 蛋白質抗体とその製造方法、抗原、検知方法, 独立行政法人情報通信研究機構, 出願 2009 年・公開 2011 年・登録 2014 年, 平岡泰
 3. 2013-061612, 岩本政明、原口徳子、他, 核膜孔タンパク質 Nup98 を特異的に認識するモノクローナル抗体, 独立行政法人情報通信研究機構, 出願 2013 年
 4. 2014-097942, 松田厚志、原口徳子, 色収差補正方法, 独立行政法人情報通信研究機構, 出願 2014 年
 5. 2015-024176, 原口徳子、平岡泰、他, 蛍光相関分光装置, 独立行政法人情報通信研究機構, 出願 2015 年, 平岡泰
 6. 2015-126296, 小林昇平、原口徳子, 細胞内膜構造形成方法および細胞内膜構造観察方法, 国立研究開発法人情報通信研究機構, 出願 2015 年
 7. 2016-006937, 原口徳子、平岡泰、他, 核酸導入促進剤, 国立研究開発法人情報通信研究機構, 出願 2016 年, 平岡泰
 8. 海外 2017-073548, 原口徳子、他, 光検出装置およびレーザー顕微鏡システム, 国立研究開発法人情報通信研究機構, 出願 2017 年

- ・ 米田悦啓、岡正啓
- 1. 2017-026027, 岡正啓、森山哲嗣、米田悦啓、宮本洋一、辻井聡、疋田貴俊、森田真規子, 精神疾患モデル動物およびその製造方法, 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所、国立大学法人京都大学、 2017年2月15日

- ・ 大川恭行
- 1. PCT/JP2017/008320, 大川恭行、前原一満、木村宏、佐藤優子, 標的遺伝子の塩基配列を決定する方法, 国立大学法人九州大学, 2017年3月2日、大川・木村
- 2. PCT/JP2017/019309, 大川恭行、原田哲仁、胡桃坂仁志、木村宏、半田哲也、佐藤優子、林陽子, DNA結合タンパク質の結合領域の近傍に所望のDNA断片を挿入する方法, 国立大学法人九州大学、国立大学法人東京工業大学, 2017年5月24日、大川、胡桃坂、木村
- 3. 2017-111580, 木村宏、佐藤優子、大井彰人、胡桃坂仁志、鯨井智也、大川恭行, ヒストンH3トリメチル化リシン特異的モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片, 東京工業大学, 2017年6月6日、木村、胡桃坂、大川

- ・ 平岡泰
- 1. 特許第5397932号, 原口徳子、平岡泰、他, Nuf2蛋白質抗体とその製造方法、抗原、検知方法, 独立行政法人情報通信研究機構, 出願2008年・公開2009年・登録2013年, 平岡泰
- 2. 特許第5476582号, 原口徳子、平岡泰、他, Vrk1蛋白質抗体とその製造方法、抗原、検知方法, 独立行政法人情報通信研究機構, 出願2009年・公開2011年・登録2014年, 平岡泰
- 3. 2015-024176, 原口徳子、平岡泰、他, 蛍光相関分光装置, 独立行政法人情報通信研究機構, 出願2015年, 平岡泰
- 4. 2016-006937, 原口徳子、平岡泰、他, 核酸導入促進剤, 国立研究開発法人情報通信研究機構, 出願2016年, 平岡泰

- ・ 広田 亨
- 1. 2014-010635, 広田 亨、進藤軌久、熊田和貴, 細胞観察用蛍光プローブ、及びこれを使用する方法, 2014年1月26日

- ・ 宮本圭
- 1. 2017-15891, 宮本圭、岩元正樹, 哺乳動物核移植胚の発生率向上法, 近畿大学(宮本圭)、株式会社プライムテック(岩元正樹), 平成29年1月31日

6. 受賞

- ・ 木村 宏(計画研究代表者):平成 27 年、Robert Feulgen Prize 受賞(欧州の The Society of Histochemistry が贈る賞)
- ・ 加納純子(公募研究代表者):平成 28 年度 日本遺伝学会奨励賞受賞
- ・ 浜田道昭(公募研究代表者):平成 29 年度 文部科学大臣表彰若手研究者賞(科学技術分野)受賞
- ・ 宮本 圭(公募研究代表者):平成 30 年度 文部科学大臣表彰若手研究者賞(科学技術分野)受賞

7. マスメディア・報道発表等 (計 189 件)

- ・ 胡桃坂仁志: 朝日新聞;2014 年 1 月 20 日、日経産業新聞;2015 年 11 月 25 日、読売新聞;2017 年 4 月 17 日、朝日新聞;2017 年 5 月 4 日、日本経済新聞;2018 年 1 月 15 日、他 計 12 件
- ・ 河野秀俊:J-PARC センター;2015 年 8 月 29 日 計1件
- ・ 小布施力史:北海道医療新聞;2014 年 8 月 23 日、他 計 6 件
- ・ 木村宏:日経バイオテクオンライン;2014 年 8 月 14 日、化学工業日報;2014 年 12 月 17 日、日経バイオテクオンライン;2015 年 9 月 22 日、日経産業新聞;2015 年 9 月 30 日、他 計 9 件
- ・ 山縣一夫:日経新聞;2015 年 7 月 8 日、朝日新聞;2015 年 6 月 12 日、産経新聞;2018 年 1 月 18 日、日本経済新聞;2018 年 2 月 27 日、NHK;2018 年 3 月 18 日、他 計17件
- ・ 原口徳子:毎日新聞;2015 年 5 月 19 日、朝日新聞;2015 年 5 月 22 日、神戸新聞;2015 年 7 月 10 日、NHK サイエンス ZERO;2015 年 9 月 13 日、日経産業新聞;2015 年 10 月 28 日、化学工業日報;2015 年 11 月 10 日、日刊工業新聞;2015 年 12 月 25 日、日経産業新聞;2016 年 1 月 8 日、毎日新聞;2016 年 7 月 7 日、Google;2016 年 7 月 7 日、他 計 92 件
- ・ 徳永万喜洋:日経産業新聞;2018 年 10 月 8 日、日経バイオテク;2018 年 8 月 9 日、科学新聞;2018 年 8 月 11 日
- ・ 米田悦啓・安原徳子:産経新聞;2018 年 7 月 30 日、他 計 4 件
- ・ 斉藤典子:熊本日日新聞;2014 年 11 月 12 日、NHKニュース;2015 年 4 月 30 日、毎日新聞;2015 年 5 月 1 日、他 13 件
- ・ 加納純子:大阪大学;2018 年 6 月 29 日、文藝春秋;2018 年 2 月 1 日、他 計 3 件
- ・ 中山潤一:日本経済新聞 Web;2018 年 8 月 1 日、科学新聞;2018 年 1 月 19 日、他 計 10 件
- ・ 上田潤: NHK ニュース 東海 NEWS WEB;2018 年 1 月 28 日、朝日新聞;2018 年 1 月 18 日、他 計 9 件、
- ・ 宮本圭:四国新聞;2017 年 4 月 16 日、科学新聞;2017 年 12 月 1 日、週刊東洋経済;2018 年 2 月 3 日、他 計 10 件

8. 社会貢献・啓蒙活動等:

計 154 件（一般向け講演会・セミナー58 件、小・中・高向け授業・実験・実習 64 件、イベント参加・出展 18 件、広報誌・パンフレット 12 件、サイエンスカフェ 2 件）（以下に、一部を記載）

- ・ **胡桃坂仁志**：（講演）東進ハイスクール 大学学部研究会 2013 東京国際フォーラム、東京都立多摩技術高等学校 科学技術アドバイザー特別授業、広島県立呉三津田高等学校、NIH セミナー "Structural basis of the centromeric chromatin formation"、同志社女子高等学校講演「遺伝子を操る染色体のしくみと創薬」、(株)リバネス バイオガレッジセミナー「クロマチン機能制御機構の構造生物学的研究」、広島大クロマチン動態数理研究拠点ミニシンポジウム講演 "Contribution of histone variants in chromatin structure"、早稲田大学本庄高等学院、『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』、第 35 回生命科学 DOKIDOKI 研究室、テルモ科学技術振興財団『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』、NEXT10 月号、サーモフィッシャー『留学記』、『遺伝子のすがたを原子レベルで見る』、早稲田大学商議会議「エピジェネティクス:生命の源である遺伝子の新しい制御メカニズム」、平成 29 年度創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム公開シンポジウム「エピジェネティクス研究と創薬のための再構成クロマチンの産生と性状解析」、量子ビームサイエンスフェスタ「自動化によって得られたものは?」、他 10 件
- ・ **河野秀俊**：（講演）HPCI 戦略プログラム分野 1×分野 2 in 名大シンポジウム「生体分子複合システムを計算する-相互作用は何をもたらすのか-」、分子シミュレーション、構造インフォマティクスから観るタンパク質-核酸認識機構、（講師）同志社大学、2014 第一回遺伝情報学研究室セミナー、実験とバイオインフォマティクスの協奏による構造生命科学、他 4 件
- ・ **木村宏**：（講演）千里ライフサイエンスセミナー「エピジェネティクス制御からの生命活動の理解とその展望」コーディネーター、（講師）国際イメージングワークショップ（産総研）、(株)リバネス バイオガレッジセミナー「クロマチン機能制御機構の構造生物学的研究」、第 2 回国際イメージング WS（産総研）、東京工業大学生命理工学院 高校生のための夏休み特別講習会「生きた細胞のなかの DNA の働き」、（監修）「DNA を調べよう」自由研究おたすけキット（学研）、（協力）DNA を知る:第1回 DNA、遺伝子、ゲノムの違いがわかりますか? milsil（自然と科学の情報誌;国立科学博物館）
- ・ **山縣一夫**：（講演）一般公開シンポジウム「DNA をあやつる生物のしくみ」、「ケンピロー先生がやってくる!」生駒市桜ヶ丘 1 学童保育所、「ケンピロー先生が帰ってきた!」生駒山麓公園 野外活動センター、一般公開シンポジウム「生き物と細胞の設計図～DNA・クロマチン・核～」、（講師）和歌山放送近大ラジオ講座「ボックス!」、2016 年度第 7 回生物理工学部 BOST Science Café 公開講座、2017 年度第 7 回 BOST Science Café 公開講座、2017 年度中央区民カレッジ
- ・ **安原徳子**：（主催）日本大学セミナー、他 3 件
- ・ **原口徳子**：（主催及び講師）第 21 回細胞生物学ワークショップ、第 22 回細胞生物学ワークショップ、第 24 回 電頭サマースクール、第 23 回細胞生物学ワークショップ、第 24 回細胞生物学ワ

ークショップ、第 25 回細胞生物学ワークショップ、第 26 回細胞生物学ワークショップ、第 27 回細胞生物学ワークショップ、第 28 回細胞生物学ワークショップ、他 6 件

- ・ **斉藤典子**: (講演) 第 193 回 日本橋フォーラム「細胞の初期化と細胞核構造」、一般公開シンポジウム第 2 弾「生き物細胞の設計図～DNA・クロマチン・核」、第 3 回女性研究者交流会、クロマチン動構造 第 3 回若手ワークショップ、クロマチン研究最前線 –海外での研究生活で学んだことを活かして–、一般公開シンポジウム 遺伝子研究の最前線 ミクロの世界に秘められた生命に謎にせまる、(講師)名古屋大学 生命理学特別講義
- ・ **原田昌彦**: (講師)長野県立諏訪清陵高校進路講話、東北放射光シンポジウム、みやぎ県民大学、長野県立長野高校出前授業、(主催)酵母遺伝学シンポジウム第 46 回研究報告会、第 4 回ヒストンバリエーション研究会
- ・ **大川恭行**: (講演) Fukuoka International Symposium on Genomics & Epigenomics 2013、システム生命科学夏の学校「生命を形作る未知の暗号を解読する」、(主催) 第 1 回トレーニングワークショップ(ChIP-Seq データ解析)、他 4 件
- ・ **平岡泰**: (主催及び講師) 第 23 回細胞生物学ワークショップ、第 24 回細胞生物学ワークショップ、第 25 回細胞生物学ワークショップ、第 26 回細胞生物学ワークショップ、第 27 回細胞生物学ワークショップ、第 28 回細胞生物学ワークショップ
- ・ **田代聡**: (講演) Strengthening of Biological Dosimetry in IAEA Member States: Improvement of Current Techniques and Intensification of Collaboration and Networking among the Different Institutes, the 2nd Research
- ・ **広田亨**: (講演) 東京都立日比谷高等学校講演「がんと染色体」、第 69 回日本臨床細胞学会細胞検査士教育セミナー「がんと染色体」 他 3 件
- ・ **加納純子**: (主催及び講演) クロマチン動構造テニユアトラックサバイバル物語、一般講演会(早稲田大学)、他 5 件
- ・ **宮本圭**: (講師) 体験実習「モデル動物の卵の観察」近畿大学生物理工学部 (対象=中学生)、体験実習～分子生物学の研究室とは 近畿大学生物理工学部(対象=高校生)、他 14 件

Ⅱ. 各研究課題の成果

総括班



動的クロマチン構造と機能

平成 25 年度～平成 29 年度

胡桃坂 仁志 (早稲田大学・理工学術院・教授)

【研究目的】

ゲノム DNA に塩基配列として記録されている生命の遺伝情報は、クロマチンによって細胞核に収納されている。本研究課題は、遺伝情報の本体であるクロマチンの機能発現機構を、“動的クロマチン構造”の研究を通して細胞及び個体のレベルで包括的に理解するための研究を、総括班として支援することを目的としている。そのため総括班として行う本研究課題は、研究領域全体の円滑な推進を主眼として、領域全体として最大の成果が得られるように、指導および支援活動を行うものである。構造生物学、計算科学、細胞イメージング、1分子イメージング、プロテオミクス、ゲノミクス、生化学、細胞生物学などの多様な専門性をもつ研究領域全体が、総括班での活動によって円滑に推進され、領域全体として最大の成果が得られるように、9 名の連携研究者と研究代表者・胡桃坂が協力して、様々な活動支援を行う。

【研究組織】

(1)研究代表者

胡桃坂 仁志 (KURUMIZAKA Hitoshi)

早稲田大学・理工学術院・教授

(2)連携研究者

・木村 宏 (KIMURA Hiroshi)

東京工業大学・科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター・教授

・小布施 力史 (OBUSE Chikashi)

大阪大学・理学研究科・教授

・原口 徳子 (HARAGUCHI Tokuko)

情報通信研究機構・未来 ICT 研究所・主任研

究員

・米田 悦啓 (YONEDA Yoshihiro)

医薬基盤健康栄養研究所・研究所長

・徳永 万喜洋 (TOKUNAGA Makio)

東京工業大学・生命理工学院・教授

・河野 秀俊 (KONO Hidetoshi)

量子科学技術研究開発機構・グループリーダー

・斉藤典子 (SAITOH Noriko)

がん研究会・がん生物部・部長

・大川 恭行 (OHKAWA Yasuyuki)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

・原田 昌彦 (HARATA Masahiko)

東北大学・農学研究科・教授

【研究成果】

新学術領域総括班の活動として、本領域で活動する多様な専門性を持つ研究者が、各々の専門性を活かしつつ、かつ他の研究者へ知識や技術を伝承できるように指導・支援を行った。それによって、クロマチン動構造研究の推進を促した。クロマチン動構造研究における領域会議、クロマチン国際学会、若手研究者を受講対象としたイメージング技術講習会、多様な研究手法(イメージング、プロテオミクス、ゲノミクス、結晶構造解析、シミュレーション等)を学ぶためのワークショップや講習会などを開催した。これらの活動を通して、クロマチン研究分野において総合的な視野と技術を身につけた研究者の育成を行った。また、クロマチン動構造領域の研究が、全体として円滑に推進できるよう、研究環境やデータベースを整備した。

得られた研究成果は、論文・著書・講演会などを通じて領域内外へ発信した。

(1)クロマチン動構造領域会議の開催

初年度から継続的に、年に1回のペースで領域会議を開催した。本領域会議では、参加する研究者が一堂に会して研究発表を行い、研究成果や進捗状況を共有化して議論を行う機会を設けた。2013年8月1日、大阪大学コンベンションセンターにて、第1回クロマチン動構造領域会議を開催した。2014年7月3日～5日、サホロにて、第2回クロマチン動構造領域会議を開催した。第2回の領域会議では、領域研究者および関連分野の研究者74名が参加して、最新の研究成果について議論した。2015年5月7日～9日、ルスツにて77名が参加して、第3回クロマチン動構造領域会議を開催した。2016年5月7日～9日、ルスツにて84名が参加して、第4回クロマチン動構造領域会議を開催した。2017年7月13日～15日、ルスツにて83名が参加して、第5回クロマチン動構造領域会議を開催した。これらの領域会議によって、多くの共同研究が成し遂げられ、本領域の発展に大きく貢献した。

(2)公開シンポジウムの開催

2013年8月25日、千里ライフサイエンスセンターにて、一般公開シンポジウム「DNAをあやつる生物のしくみ」を開催した。領域内の研究者から9名が研究成果の発表を行い、約120名の一般市民が参加した。2015年1月12日、千里ライフサイエンスセンターにて、第2回の一般公開シンポジウム「生き物と細胞の設計図～DNA・クロマチン・核～」を開催した。領域内の研究者から9名が発表を行い、約80名の一般市民が参加した。2016年8月21日、早稲田大学井深ホールにて、第3回の一般公開シンポジウム「遺伝子のすがた—カラダの中で起こる不思議—」を開催した。本領域に

X00 総括班(代表)

て招聘した講演者が、高校生、大学生、大学院生を中心に、教育関係者や企業関係者などを含む一般参加者約130名に対して、最新のクロマチン動構造関連の研究成果を発表した。そして、領域研究の包括的な研究成果報告のために、最終的な一般公開シンポジウム「遺伝子研究の最前線」を、2018年1月8日、早稲田大学にて開催した。高校生、大学生、大学院生、教育・企業関係者などを含めた102名の一般参加者を集め、最新の研究成果を分かり易く解説した。

(3)国際シンポジウムの開催

2015年8月23日～26日、国際会議「International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function」を、淡路夢舞台国際会議場にて開催した。クロマチン動構造領域によって招聘した海外からの研究者も含めて、国内外から約150名が参加する規模の国際会議となった。本会議にて、国内外の最新のクロマチン研究成果の発表および情報交換が行われた。また、2015年8月29日、早稲田大学にて、国際シンポジウム「Chromatin and Epigenetics -Dr. Robert T. Simpson memorial meeting-」の開催も主催した。

(4)若手研究者の会

早稲田大学先端生命医科学センターにて、第一回若手研究者ワークショップ「海外で活躍する若手研究者が語る最先端クロマチン研究」を、2013年12月7日に開催した。海外にて実際にポスドクとして研究を行なっている6名の若手研究者と、海外で研究グループを率いている日本人PIの1名を迎え、最新の海外クロマチン研究状況の紹介や、最先端のクロマチン研究に関する情報交換と議論を行った。翌年には、早稲田大学にて若手の会シンポジウム「クロマチン研究最前線—海外での研究生活で学んだことを活かして—」の開催を2015年7月29日に行い、実際に海外での研究経験を持つ研究者による講演会を行っ

た。これらの活動を通して若手研究者の育成を推進した。2017年6月7~9日には、「クロマチン動構造」、「生殖エピゲノム」、「幹細胞老化と疾患」の3つの新学術領域研究の若手の会による「3領域合同若手勉強会 2017」を開催した。このような新学術領域横断的な若手の会の開催は、若手研究者間での交流をより広めることに貢献し、多くの共同研究を育成することができた。

(5)ホームページ(HP)の開設、公開

本領域の研究活動やデータ共有化のために、クロマチン動構造領域のホームページを開設した。本ホームページの開設によって、最新のクロマチン動構造領域の研究成果の紹介、講習会や領域関連のミーティング情報の紹介など、本領域の推進に必要な情報の共有化を行なった。また、領域研究によって得られた情報のデータベース化も、本ホームページを介して行なった。

(6)サーキュラーの発行

クロマチン動構造領域での研究成果の共有化や、領域外研究者への発信のために、2013年8月19日(News Letter No.1)から2018年2月9日(News Letter No.20)までの期間に、合計20回のサーキュラーの発行を行った。サーキュラーの発行によって、本研究領域にて行われた最新の研究の紹介、新たな知見や技術の紹介、領域関連イベント情報の紹介などを円滑に行うことができた。

(7)その他の学会、ミーティングの支援

クロマチン動構造領域関連のミーティングや学会でのシンポジウム・ワークショップなどの支援を多数行なった。

〔国際学会主催〕

1. International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics and Function, 淡路島, 2015年8月
2. Chromatin and Epigenetics -Dr. Robert T.

Simpson memorial meeting, 東京, 2015年8月

3. International Symposium on Nuclear Structure and Epigenetics, 熊本, 2015年8月

【本研究課題に関する発表等】

〔学会発表〕

1. 胡桃坂仁志、クロマチンコーディングの構造基盤、染色体研究の最前線 2018、すずかけ台、2018年3月
2. Kurumizaka H., Nucleosome Remodeling and Structure, INDO-JAPAN Conference (2018): Epigenetics, Human Microbiomes and Disease, コルカタ(インド), 2018年2月
3. 堀越保則、第五回ヒストンバリエント研究会、ヒストンバリエントによるゲノム損傷依存的RAD51核内フォーカス形成の制御、東京、2018年2月
4. 原田昌彦、第五回ヒストンバリエント研究会、クロマチン構造形成におけるH2A.Zの機能とその進化的保存性、東京、2018年2月
5. 有村泰宏、第五回ヒストンバリエント研究会、失敗から学ぶヌクレオソーム構造・機能解析、東京、2018年2月
6. 胡桃坂仁志、クロマチンの高次構造とダイナミクスの相関構造解析、第31回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、つくば、2018年1月
7. 胡桃坂仁志、再構成クロマチンによるエピジェネティクス機構の解析、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
8. 有村泰宏、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、転写因子p53のヒストンとの相互作用、愛知、2017年12月
9. 佐藤祥子、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、試験管内再構

X00 総括班(代表)

- 成クロマチンを基質としたトランスポゾン転移酵素 TN5、愛知、2017 年 12 月
10. 鯨井智也、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、クロマチン結合タンパク質 DEK の機能解析、愛知、2017 年 12 月
 11. 藤田理紗、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、非コード RNA はヌクレオソーム中の H2A-H2B の解離を促進する、愛知、2017 年 12 月
 12. 田中大貴、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、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、愛知、2017 年 12 月
 13. Kurumizaka H., Structural Biology of Epigenetic Chromatin Regulation, 15th Chinese Biophysics Congress, 上海(中国), 2017 年 11 月
 14. 胡桃坂仁志、クロマチン構造とゲノム機能制御機構、平成 29 年度遺伝研研究会、三島、2017 年 10 月
 15. Kurumizaka H., Structural studies of reconstituted chromatin units, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 9 月
 16. 胡桃坂仁志、ヌクレオソームのリモデリング機構、第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月
 17. Kurumizaka H., Structural versatility and dynamics of chromatin units, EMBO CONFERENCE “The Nucleosome: From Atoms to Genomes”, ハイデルベルグ(ドイツ), 2017 年 8 月
 18. 胡桃坂仁志、ゲノム DNA 機能制御のクロマチン構造基盤、大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪、2017 年 8 月
 19. 樋口智香、3領域合同若手勉強会、マウス初期胚発生の進行に重要な受精後に分解される母性タンパク質の探索、白浜、2017 年 6 月
 20. 守田昂太郎、3領域合同若手勉強会、マウス初期胚発生における H3R2me2s の役割、白浜、2017 年 6 月
 21. 日下部将之、3領域合同若手勉強会、ヒストンバリエント H2A.Z の分子進化的解析、白浜、2017 年 6 月
 22. 五月女美香、3領域合同若手勉強会、RAD52-ssDNA 複合体の結晶構造から見える相同組換えの分子機構、白浜、2017 年 6 月
 23. 衛藤光、3領域合同若手勉強会、ポリコーム構成因子による神経系前駆細胞の制御、白浜、2017 年 6 月
 24. 中島達郎、3領域合同若手勉強会、部分的機能欠損 Xist による X 染色体不活性化の異常、白浜、2017 年 6 月
 25. 地引和也、3領域合同若手勉強会、がん化に際する核輸送受容体 importin α 2 の役割、白浜、2017 年 6 月
 26. 小田春佳、3領域合同若手勉強会、胞胚における核 F-アクチンの役割、白浜、2017 年 6 月
 27. 鯨井智也、3領域合同若手勉強会、新規ヌクレオソーム結合因子の同定と機能解析、白浜、2017 年 6 月
 28. 藤田理紗、3領域合同若手勉強会、非コード RNA がヌクレオソームの安定性に及ぼす影響の生化学解析、白浜、2017 年 6 月
 29. 土屋恵、3領域合同若手勉強会、細胞への新規遺伝子導入法の確立とその分子機構の解明、白浜、2017 年 6 月
 30. 衣笠泰葉、3領域合同若手勉強会、分裂酵母核膜タンパク質 Lem2 と Bqt4 の協調的機

- 能の解析、白浜、2017年6月
31. 立和名博昭、3領域合同若手勉強会、透過性細胞を用いたヒストン動態の解析、白浜、2017年6月
 32. 穂井田謙介、3領域合同若手勉強会、単一ES細胞の増殖過程におけるメチル化 DNA 動態の定量的観察、白浜、2017年6月
 33. 波多野裕、3領域合同若手勉強会、ペリセントロメアにおける人為的なDNAメチル化導入が発生に与える影響、白浜、2017年6月
 34. 佐藤優子、3領域合同若手勉強会、胚性ゲノム活性化におけるヒストン修飾の意義、白浜、2017年6月
 35. 小山昌子、3領域合同若手勉強会、パイオニア転写因子の結合が標的ヌクレオソームに与える影響の解析、白浜、2017年6月
 36. 有村泰宏、3領域合同若手勉強会、転写因子 p53 のエンハンサーへの結合にヌクレオソームが与える影響の生化学的解析、白浜、2017年6月
 37. 平野泰弘、3領域合同若手勉強会、分裂酵母核膜タンパク質 Lem2 の細胞内局在は Bqt4によって制御される、白浜、2017年6月
 38. 藤村雪乃、3領域合同若手勉強会、マウス卵胞培養過程で生じる細胞死と活性酸素種(ROS)を指標とした評価基準の作成、白浜、2017年6月
 39. 鈴木由華、3領域合同若手勉強会、ライブセルイメージングを用いたマウス着床前初期胚発生における ATP 動態の可視化と定量化、白浜、2017年6月
 40. 胡桃坂仁志、エピジェネティクスの制御基盤としてのクロマチン構造多様性、DSSB シンポジウム、横浜、2017年6月
 41. 胡桃坂仁志、Structural studies for dynamic chromatin architecture、"Dynamic Structural Biology" (DSB) 第一回研究報告会、兵庫、2017年6月
 42. 胡桃坂仁志、ヌクレオソームの構造と動的多様性によるゲノムDNA機構制御、第17回日本蛋白質科学会年会、仙台、2017年6月
 43. 胡桃坂仁志、細胞核でのクロマチン機能制御の構造基盤、日本大学文理学部生命科学科セミナー、東京、2017年6月
 44. Kurumizaka H., Chromatin contribution in DNA repair, The 6th US-Japan DNA Repair Meeting, バークレー(アメリカ), 2017年5月
 45. Kurumizaka H., Structural basis of epigenetic chromatin regulation, The 5th International Symposium of the Mathematics on Chromatin Dynamics, 広島, 2017年3月
 46. Kurumizaka H., Structural studies for functional chromatin, Japan-Swiss Symposium Chromatin Structure and Dynamics, バーゼル(スイス), 2017年1月
 47. 胡桃坂仁志、染色体の構造基盤、染色体研究の最前線、大阪、2017年1月
 48. Kurumizaka H., Structural studies for epigenetic regulation of genomic DNA, 10th International 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, 松江, 2016年11月
 49. Kurumizaka H., Three dimensional structures and dynamics of chromatin, 第54回生物物理学会, つくば, 2016年11月
 50. 胡桃坂仁志、エピジェネティクスのクロマチン構造基盤、第39回日本分子生物学会、横浜、2016年11月
 51. 胡桃坂仁志、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、三島、2016年10月
 52. 胡桃坂仁志、がん細胞で見られるヒストン変

- 異のクロマチン構造・動態変動への影響、第
89 回日本生化学会大会、仙台、2016 年 9
月
53. Kurumizaka H., Structural basis of chromatin
dynamics, Telluride workshop on chromatin
structure and dynamics, テルライド(アメリカ),
2016 年 8 月
54. Kurumizaka H., Structural Versatility of
Nucleosomes and Chromatin Dynamics,
Colorado Chromatin Meeting, コロラド(アメリ
カ), 2016 年 8 月
55. Kurumizaka H., ALTERED STRUCTURES
AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF
NUCLEOSOMES CONTAINING
CANCER-ASSOCIATED HISTONE
MUTATIONS, DNA metabolism, genome
stability and diseases, 上海(中国), 2016 年 6
月
56. Kurumizaka H., HISTONE
CONTRIBUTIONS TO CHROMATIN
DYNAMICS, Chromatin, Epigenetics and
Transcription, 上海(中国), 2016 年 5 月
57. Kurumizaka H., Structural versatility and
dynamics of chromatin, 第 53 回日本生物物
理学会年会, 金沢, 2015 年 9 月
58. Kurumizaka H., Histone Contributions in
Chromatin Dynamics, International
Symposium on Chromatin Structure,
Dynamics and Function, 淡路島, 2015 年 8
月
59. Kurumizaka H., Chromatin structure and
dynamics regulated by histones Chromatin
and Epigenetics, Chromatin and Epigenetics
-Dr. Robert T. Simpson memorial meeting,
東京, 2015 年 8 月

Ⅱ. 各研究課題の成果

計画研究(代表、分担)



再構成ヌクレオソームを用いた動的クロマチン構造の解明

平成 25 年度～平成 29 年度

胡桃坂 仁志 (早稲田大学・理工学術院・教授)

【研究目的】

真核生物のゲノム DNA は、ヌクレオソームを基本単位としたクロマチンとして高密度に折り畳まれ、核内に収容されている。ヌクレオソームを構成するヒストンには、多種類のヒストンバリエントや化学修飾が存在し、これらによって多様なヌクレオソーム構造が形成される。それによって、クロマチンの高次構造とダイナミクスの多様性が生みだされることで、ゲノム DNA の転写・複製・修復・組換えなどの調節が行われていることが明らかになってきた。本研究では、独自のヒストン精製系及びヌクレオソーム再構成系によって、ヒストンバリエントや化学修飾を含むさまざまなヌクレオソームを試験管内で再構成し、それらを用いて生化学的および構造生物学的な解析を行うことで、「動的クロマチン構造」の基盤を明らかにし、クロマチンによる DNA 機能発現制御の分子機構を解明することを目的とした。

【研究成果】

(1) ヒストンバリエント・ヒストン修飾・ヒストン変異を含むヌクレオソームの立体構造

新規ヒストンバリエント、様々な化学修飾を含むヒストン(メチル化、ユビキチン化、アセチル化、クロニル化、リン酸化)を高純度で作製する方法を確立し、DNA 損傷や DNA メチル化を含むヌクレオソームを高効率で作製する方法を構築した。これらの手法を用いて、ヒストンバリエント、ヒストン修飾、がん化の進行に関与するヒストン変異体、DNA 損傷、DNA メチル化などを含むヌクレオソームを作製し、それらの立体構造を、X 線結晶構造

解析およびクライオ電子顕微鏡による単粒子解析によって決定した。そして、多様なヌクレオソームの構造と動態を解明し、動的クロマチン構造の基盤情報を提供した。

(2) 新規クロマチン基盤ユニットの立体構造

遺伝子の転写開始領域近傍では、転写開始のためにヌクレオソームのリモデリングが引き起こされることが知られている。ヌクレオソームリモデリングの結果、「オーバーラッピングジヌクレオソーム」という特殊なクロマチン構造が形成されることが提案されていたが、その立体構造は不明であった。そこで、オーバーラッピングジヌクレオソームを試験管内で再構成し、X 線構造解析を行った結果、3.14 Å の分解能でその立体構造を決定することに成功した。解析の結果、オーバーラッピングジヌクレオソームは、ヒストン 6 量体に DNA が巻き付いたヘキサソームと、ヒストン 8 量体に DNA が巻き付いたオクタソームが連結することで約 250 塩基対の DNA がヒストン 14 量体に連続的に約 3 回転巻き付いた特殊な構造であることがわかった(図 1)。オーバーラッピングジヌクレオソームは通常のヌクレオソームとは異なる、新規のクロマチンユニットであった。さらに、ヒト培養細胞を用いたゲノム解析により、オーバーラッピングジヌクレオソーム

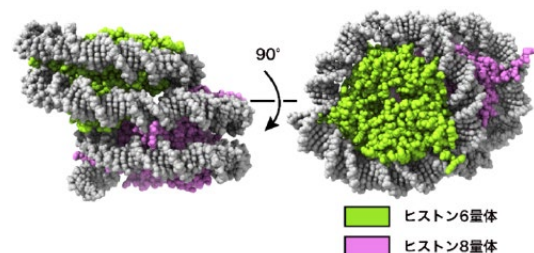


図1. オーバーラッピングジヌクレオソームの立体構造

は、実際に遺伝子の転写開始点付近に形成されることがわかった。本研究成果は、クロマチン構造ユニットの多様性を示した重要な成果となった。

(3) 構成的ヘテロクロマチンの基盤構造

遺伝子発現が不活性化したクロマチン領域であるヘテロクロマチンは、ヒストン H3 の Lys9 がトリメチル化されたクロマチンと構成的ヘテロクロマチンの主要な構成タンパク質である HP1 によって形成されると考えられているが、その構造は明らかではなかった。そこで、構成的ヘテロクロマチンの基盤構造を明らかにするために、ヒストン H3 の Lys9 のトリメチル化を含むジヌクレオソームに HP1 が結合した複合体を試験管内で再構成し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によりその立体構造を決定した。明らかになった立体構造から、HP1 は 2 量体を形成し、ヌクレオソームをブリッジするように結合することがわかった(図2)。

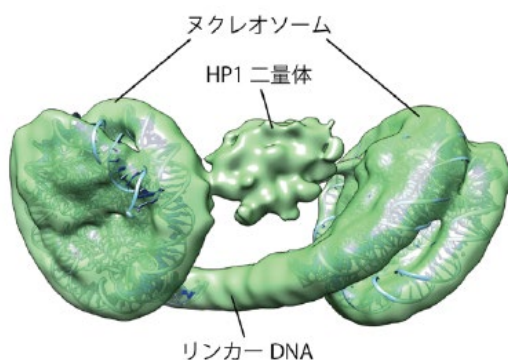


図2. HP1 を含むヘテロクロマチンの基盤構造

【本研究課題に関する主要成果】

〔雑誌論文〕 すべて査読あり

1. Kujirai T, Ehara H, Fujino Y, Shirouzu M, Sekine SI, [Kurumizaka H](#). Structural basis of the nucleosome transition during RNA polymerase II passage. *Science*. 362, 595-598 (2018).
2. Kujirai T, Arimura Y, Fujita R, Horikoshi N, Machida S, [Kurumizaka H](#). Methods for

Preparing Nucleosomes Containing Histone Variants. *Methods Mol Biol*. 1832, 3-20 (2018).

3. 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](#). 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 (2018).
4. Arimura Y, Kono T, Kino K, [Kurumizaka H](#). Structural polymorphism of the *Escherichia coli* poly- α -L-glutamate synthetase RimK. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 74, 385-390 (2018).
5. Osakabe A, Lorkovic ZJ, Kobayashi W, Tachiwana H, Yelagandula R, [Kurumizaka H](#), Berger F. Histone H2A variants confer specific properties to nucleosomes and impact on chromatin accessibility. *Nucleic Acids Res*. 46, 7675-7685 (2018).
6. Higgs MR, Sato K, Reynolds JJ, Begum S, Bayley R, Goula A, Vernet A, Paquin KL, Skalnik DG, Kobayashi W, Takata M, Howlett NG, [Kurumizaka H](#), Kimura H, Stewart GS. Histone Methylation by SETD1A Protects Nascent DNA through the Nucleosome Chaperone Activity of FANCD2. *Mol Cell*. 71, 25-41 (2018).
7. Luo D, Kato D, Nogami J, Ohkawa Y, [Kurumizaka H](#), Kono H. MNase, as a probe to study the sequence-dependent site exposures in the +1 nucleosomes of yeast. *Nucleic Acids Res*. 46, 7124-7137 (2018).
8. Saikusa K, Osakabe A, Kato D, Fuchigami S,

- Nagadoi A, Nishimura Y, Kurumizaka H, Akashi S. Structural Diversity of Nucleosomes Characterized by Native Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 90, 8217-8226 (2018).
9. 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. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. *Nat Commun.* 9, 1400 (2018).
 10. Takizawa Y, Tanaka H, Machida S, Koyama M, Maehara K, Ohkawa Y, Wade PA, Wolf M, Kurumizaka H. Cryo-EM structure of the nucleosome containing the ALB1 enhancer DNA sequence. *Open Biol.* 8, 170255 (2018).
 11. Tanabe K, Liu J, Kato D, Kurumizaka H, Yamatsugu K, Kanai M, Kawashima SA. LC-MS/MS-based quantitative study of the acyl group- and site-selectivity of human sirtuins to acylated nucleosomes. *Sci Rep.* 8, 2656 (2018).
 12. Okamoto Y, Iwasaki WM, Kugou K, Takahashi KK, Oda A, Sato K, Kobayashi W, Kawai H, Sakasai R, Takaori-Kondo A, Yamamoto T, Kanemaki MT, Taoka M, Isobe T, Kurumizaka H, Innan H, Ohta K, Ishiai M, Takata M. Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes. *Nucleic Acids Res.* 46, 2932-2944 (2018).
 13. Machida S, Takizawa Y, Ishimaru M, Sugita Y, Sekine S, Nakayama JI, Wolf M, Kurumizaka H. Structural Basis of Heterochromatin Formation by Human HP1. *Mol Cell.* 69, 385-397 (2018).
 14. Shiraishi K, Shindo A, Harada A, Kurumizaka H, Kimura H, Ohkawa Y, Matsuyama H. Roles of histone H3.5 in human spermatogenesis and spermatogenic disorders. *Andrology.* 6, 58-165 (2018).
 15. Fukuto A, Ikura M, Ikura T, Sun J, Horikoshi Y, Shima H, Igarashi K, Kusakabe M, Harata M, Horikoshi N, Kurumizaka H, Kiuchi Y, Tashiro S. SUMO modification system facilitates the exchange of histone variant H2A.Z-2 at DNA damage sites. *Nucleus.* 9, 87-94 (2018).
 16. Fuse T, Katsumata K, Morohoshi K, Mukai Y, Ichikawa Y, Kurumizaka H, Yanagida A, Urano T, Kato H, Shimizu M. Parallel mapping with site-directed hydroxyl radicals and micrococcal nuclease reveals structural features of positioned nucleosomes *in vivo*. *PLoS One.* 12, e0186974 (2017).
 17. Kawaguchi T, Machida S, Kurumizaka H, Tagami H, Nakayama JI. Phosphorylation of CBX2 controls its nucleosome-binding specificity. *J Biochem.* 162, 343-355 (2017).
 18. Hatanaka Y, Tsusaka T, Shimizu N, Morita K, Suzuki T, Machida S, Satoh M, Honda A, Hirose M, Kamimura S, Ogonuki N, Nakamura T, Inoue K, Hosoi Y, Dohmae N, Nakano T, Kurumizaka H, Matsumoto K, Shinkai Y, Ogura A. Histone H3 Methylated at Arginine 17 Is Essential for Reprogramming the Paternal Genome in Zygotes. *Cell Rep.* 20, 2756-2765 (2017).
 19. Kobayashi W, Hosoya N, Machida S,

- Miyagawa K, Kurumizaka H. SYCP3 regulates strand invasion activities of RAD51 and DMC1. *Genes Cells*. 22, 799-809 (2017).
20. Hori T, Shang WH, Hara M, Ariyoshi M, Arimura Y, Fujita R, Kurumizaka H, Fukagawa T. Association of M18BP1/KNL2 with CENP-A Nucleosome Is Essential for Centromere Formation in Non-mammalian Vertebrates. *Dev Cell*. 42, 181-189 (2017).
21. Bednar J, Garcia-Saez I, Boopathi R, Cutter AR, Papai G, Reymer A, Syed SH, Lone IN, Tonchev O, Crucifix C, Menoni H, Papin C, Skoufias DA, Kurumizaka H, Lavery R, Hamiche A, Hayes JJ, Schultz P, Angelov D, Petosa C, Dimitrov S. Structure and Dynamics of a 197-bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. *Mol Cell*. 66, 384-397 (2017).
22. Ishiguro T, Amamoto Y, Tanabe K, Liu J, Kajino H, Fujimura A, Aoi Y, Osakabe A, Horikoshi N, Kurumizaka H, Yamatsugu K, Kawashima S, Kanai M. Synthetic Chromatin Acylation by an Artificial Catalyst System. *Chem*. 2, 840-859 (2017).
23. Inano S, Sato K, Katsuki Y, Kobayashi W, Tanaka H, Nakajima K, Nakada S, Miyoshi H, Knies K, Takaori-Kondo A, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. RFW3-Mediated Ubiquitination Promotes Timely Removal of Both RPA and RAD51 from DNA Damage Sites to Facilitate Homologous Recombination. *Mol Cell*. 66, 622-634 (2017).
24. Amamoto Y, Aoi Y, Nagashima N, Suto H, Yoshidome D, Arimura Y, Osakabe A, Kato D, Kurumizaka H, Kawashima SA, Yamatsugu K, Kanai M. Synthetic Posttranslational Modifications: Chemical Catalyst-Driven Regioselective Histone Acylation of Native Chromatin. *J Am Chem Soc*. 139, 7568-7576 (2017).
25. Kato D, Osakabe A, Arimura Y, Mizukami Y, Horikoshi N, Saikusa K, Akashi S, Nishimura Y, Park SY, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Matsumoto A, Kono H, Inoue R, Sugiyama M, Kurumizaka H. Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. *Science*. 356, 205-208 (2017).
26. Taguchi H, Xie Y, Horikoshi N, Maehara K, Harada A, Nogami J, Sato K, Arimura Y, Osakabe A, Kujirai T, Iwasaki T, Semba Y, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Crystal Structure and Characterization of Novel Human Histone H3 Variants, H3.6, H3.7, and H3.8. *Biochemistry*. 56, 2184-2196 (2017).
27. Barral S, Morozumi Y, Tanaka H, Montellier E, Govin J, de Dieuleveult M, Charbonnier G, Couté Y, Puthier D, Buchou T, Boussouar F, Urahama T, Fenaille F, Curtet S, Héry P, Fernandez-Nunez N, Shiota H, Gérard M, Rousseaux S, Kurumizaka H, Khochbin S. Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells. *Mol Cell*. 66, 89-101 (2017).
28. Kakumu E, Nakanishi S, Shiratori HM, Kato A, Kobayashi W, Machida S, Yasuda T, Adachi N, Saito N, Ikura T, Kurumizaka H, Kimura H, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Xeroderma pigmentosum group C protein

- interacts with histones: regulation by acetylated states of histone H3. *Genes Cells*. 22, 310-327 (2017).
29. Osakabe A, Arimura Y, Matsumoto S, Horikoshi N, Sugasawa K, Kurumizaka H. Polymorphism of apyrimidinic DNA structures in the nucleosome. *Sci Rep*. 7, 41783 (2017).
 30. Kujirai T, Horikoshi N, Xie Y, Taguchi H, Kurumizaka H. Identification of the amino acid residues responsible for stable nucleosome formation by histone H3.Y. *Nucleus*. 8, 239-248 (2017).
 31. 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. Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep*. 18, 593-600 (2017).
 32. Kujirai T, Machida S, Osakabe A, Kurumizaka H. Influence of polynucleosome preparation methods on sedimentation velocity analysis of chromatin. *J Biochem*. 161, 381-388 (2017).
 33. Koyama M, Nagakura W, Tanaka H, Kujirai T, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kurumizaka H. *In vitro* reconstitution and biochemical analyses of the *Schizosaccharomyces pombe* nucleosome. *Biochem Biophys Res Commun*. 482, 896-901 (2016).
 34. Sato K, Shimomuki M, Katsuki Y, Takahashi D, Kobayashi W, Ishiai M, Miyoshi H, Takata M, Kurumizaka H. FANCI-FANCD2 stabilizes the RAD51-DNA complex by binding RAD51 and protects the 5'-DNA end. *Nucleic Acids Res*. 44, 10758-10771 (2016).
 35. Sato Y, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Ohtsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura A, Kurumizaka H, Kimura H. A Genetically Encoded Probe for Live-Cell Imaging of H4K20 Monomethylation. *J Mol Biol*. 428, 3885-3902 (2016).
 36. Roulland Y, Ouararhni K, Naidenov M, Ramos L, Shuaib M, Syed SH, Lone IN, 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. The Flexible Ends of CENP-A Nucleosome Are Required for Mitotic Fidelity. *Mol Cell*. 63, 674-685 (2016).
 37. Saotome M, Saito K, Onodera K, Kurumizaka H, Kagawa W. Structure of the human DNA-repair protein RAD52 containing surface mutations. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 72, 598-603 (2016).
 38. Horikoshi N, Arimura Y, Taguchi H, Kurumizaka H. Crystal structures of heterotypic nucleosomes containing histones H2A.Z and H2A. *Open Biol*. 6, 160127, (2016).
 39. Machida S, Sekine S, Nishiyama Y, Horikoshi N, Kurumizaka H. Structural and biochemical analyses of monoubiquitinated human histones H2B and H4. *Open Biol*. 6, 160090

- (2016).
40. Ichikawa Y, Morohashi N, Tomita N, Mitchell AP, Kurumizaka H, Shimizu M. Sequence-directed nucleosome-depletion is sufficient to activate transcription from a yeast core promoter *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun.* 476, 57-62 (2016).
 41. Kobayashi W, Takaku M, Machida S, Tachiwana H, Maehara K, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Chromatin architecture may dictate the target site for DMC1, but not for RAD51, during homologous pairing. *Sci Rep.* 6, 24228 (2016).
 42. Kujirai T, Horikoshi N, Sato K, Maehara K, Machida S, Osakabe A, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. *Nucleic Acids Res.* 44, 6127-6141 (2016).
 43. Takaku M, Grimm SA, Shimbo T, Perera L, Menafra R, Stunnenberg HG, Archer TK, Machida S, Kurumizaka H, Wade PA. GATA3-dependent cellular reprogramming requires activation-domain dependent recruitment of a chromatin remodeler. *Genome Biol.* 17, 36 (2016).
 44. Ohtomo H, Akashi S, Moriwaki Y, Okuwaki M, Osakabe A, Nagata K, Kurumizaka H, Nishimura Y. C-terminal acidic domain of histone chaperone human NAP1 is an efficient binding assistant for histone H2A-H2B, but not H3-H4. *Genes Cells.* 21, 252-263 (2016).
 45. 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).
 46. 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).
 47. 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).
 48. 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).
 49. Klein BJ, Muthurajan UM, Lalonde ME, Gibson MD, Andrews FH, Hepler M, Machida S, Yan K, Kurumizaka H, Poirier MG, Côté J, Luger K, Kutateladze TG. Bivalent interaction of the PZP domain of BRPF1 with the nucleosome impacts chromatin dynamics and acetylation. *Nucleic Acids Res.* 44, 472-484 (2016).
 50. 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).
51. 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).
 52. Nagpal H, Hori T, Furukawa A, Sugase K, Osakabe A, Kurumizaka H, Fukagawa T. Dynamic changes in CCAN organization through CENP-C during cell-cycle progression. *Mol Biol Cell.* 26, 3768-3776 (2015).
 53. 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).
 54. 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).
 55. Oroguchi T, Sekiguchi Y, Kobayashi A, Masaki Y, Fukuda A, Hashimoto S, Nakasako M, Ichikawa Y, Kurumizaka H, Shimizu M, Inui Y, Matsunaga S, Kato T, Namba K, Yamaguchi K, Kuwata K, Kameda H, Fukui N, Kawata Y, Kameshima T, Takayama Y, Yonekura K, Yamamoto M. Cryogenic coherent x-ray diffraction imaging for biological non-crystalline particles using the KOTOBUKI-1 diffraction apparatus at SACLA. *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* 48, 184003 (2015).
 56. Okimoto S, Sun J, Fukuto A, Horikoshi Y, Matsuda S, Matsuda T, Ikura M, Ikura T, Machida S, Kurumizaka H, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y, Kiuchi Y, Tashiro S. hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair. *Genes Cells.* 20, 681-694 (2015).
 57. Hira A, Yoshida K, Sato K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Shimamoto A, Tahara H, Ito E, Kojima S, Kurumizaka H, Ogawa S, Takata M, Yabe H, Yabe M. Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet.* 96, 1001-1007 (2015).
 58. Sugimoto N, Maehara K, Yoshida K, Yasukouchi S, Osano S, Watanabe S, Aizawa M, Yugawa T, Kiyono T, Kurumizaka H, Ohkawa Y, Fujita M. Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone-binding protein that facilitates MCM loading through its influence on chromatin architecture. *Nucleic Acids Res.* 43, 5898-5911 (2015).
 59. 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).
 60. 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).

61. Kono H, Shirayama K, Arimura Y, Tachiwana H, Kurumizaka H. Two arginine residues suppress the flexibility of nucleosomal DNA in the canonical nucleosome core. *PLoS One*.10, e0120635 (2015).
62. Saikusa K, Shimoyama S, Asano Y, Nagadoi A, Sato M, Kurumizaka H, Nishimura Y, Akashi S. Charge-neutralization effect of the tail regions on the histone H2A/H2B dimer structure. *Protein Sci*. 24, 1224-31 (2015).
63. Ichikawa Y, Nishimura Y, Kurumizaka H, Shimizu M. Nucleosome organization and chromatin dynamics in telomeres. *Biomol Concepts*. 6, 67-75 (2015).
64. Kato D, Osakabe A, Tachiwana H, Tanaka H, Kurumizaka H. Human tNASP promotes in vitro nucleosome assembly with histone H3.3. *Biochemistry*. 54, 1171-1179 (2015).
65. Saikusa K, Nagadoi A, Hara K, Fuchigami S, Kurumizaka H, Nishimura Y, Akashi S. Mass spectrometric approach for characterizing the disordered tail regions of the histone H2A/H2B dimer. *Anal Chem*. 87, 2220-2227 (2015).
66. Sato K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. Defective FANCI binding by a fanconi anemia-related FANCD2 mutant. *PLoS One*. 9, e114752 (2014).
67. Arimura Y, Shirayama K, Horikoshi N, Fujita R, Taguchi H, Kagawa W, Fukagawa T, Almouzni G, Kurumizaka H. Crystal structure and stable property of the cancer-associated heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3. *Sci Rep*. 4, 7115 (2014).
68. Al Abo M, Dejsuphong D, Hirota K, Yonetani Y, Yamazoe M, Kurumizaka H, Takeda S. Compensatory functions and interdependency of the DNA-binding domain of BRCA2 with the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex. *Cancer Res*. 74, 797-807 (2014).
69. Nishibuchi G, Machida S, Osakabe A, Murakoshi H, Hiragami-Hamada K, Nakagawa R, Fischle W, Nishimura Y, Kurumizaka H, Tagami H, Nakayama J. N-terminal phosphorylation of HP1 α increases its nucleosome-binding specificity. *Nucleic Acids Res*. 42, 12498-12511 (2014).
70. Osakabe A, Takahashi Y, Murakami H, Otawa K, Tachiwana H, Oma Y, Nishijima H, Shibahara KI, Kurumizaka H, Harata M. DNA binding properties of the actin-related protein Arp8 and its role in DNA repair. *PLoS One*. 9, e108354 (2014).
71. Taguchi H, Horikoshi N, Arimura Y, Kurumizaka H. A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye. *Methods*. 70, 119-126 (2014).
72. Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Kurumizaka H, Nozaki N, Kimura H. Evaluation of chemical fluorescent dyes as a protein conjugation partner for live cell imaging. *PLoS One*. 9, e106271 (2014).
73. Takahashi D, Sato K, Shimomuki M, Takata M, Kurumizaka H. Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using *Escherichia coli* cells. *Protein Expr Purif*. 103, 8-15 (2014).
74. Sugiyama M, Arimura Y, Shirayama K, Fujita R, Oba Y, Sato N, Inoue R, Oda T, Sato M, Heenan RK, Kurumizaka H. Distinct features of the histone core structure in nucleosomes

- containing the histone H2A.B variant. *Biophys J.* 106, 2206-2213 (2014).
75. Machida S, Takaku M, Ikura M, Sun J, Suzuki H, Kobayashi W, Kinomura A, Osakabe A, Tachiwana H, Horikoshi Y, Fukuto A, Matsuda R, Ura K, Tashiro S, Ikura T, Kurumizaka H. Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. *Sci Rep.* 4, 4863 (2014).
76. Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugawara K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M. FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. *Cell Rep.* 7, 1039-1047 (2014).
77. Takeuchi K, Nishino T, Mayanagi K, Horikoshi N, Osakabe A, Tachiwana H, Hori T, Kurumizaka H, Fukagawa T. The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA. *Nucleic Acids Res.* 42, 1644-1655 (2014).
78. Urahama T, Horikoshi N, Osakabe A, Tachiwana H, Kurumizaka H. Structure of human nucleosome containing the testis-specific histone variant TSH2B. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 70, 444-449 (2014).
79. Lacoste N, Woolfe A, Tachiwana H, Gareau AV, Barth T, Cantaloube S, Kurumizaka H, Imhof A, Almouzni G. Mislocalization of the centromeric histone variant CenH3/CENP-A in human cells depends on the chaperone DAXX. *Mol Cell.* 53, 631-644 (2014).
80. Kobayashi W, Sekine S, Machida S, Kurumizaka H. Green fluorescent protein fused to the C terminus of RAD51 specifically interferes with secondary DNA binding by the RAD51-ssDNA complex. *Genes Genet Syst.* 89,169-179 (2014).
81. Ichikawa Y, Morohashi N, Nishimura Y, Kurumizaka H, Shimizu M. Telomeric repeats act as nucleosome-disfavouring sequences *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 42, 1541-1552 (2014).
82. Kagawa W, Arai N, Ichikawa Y, Saito K, Sugiyama S, Saotome M, Shibata T, Kurumizaka H. Functional analyses of the C-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad52 protein. *Nucleic Acids Res.* 42, 941-951 (2014).
83. Uanschou C, Ronceret A, Von Harder M, De Muyt A, Vezon D, Pereira L, Chelysheva L, Kobayashi W, Kurumizaka H, Schlögelhofer P, Grelon M. Sufficient amounts of functional HOP2/MND1 complex promote interhomolog DNA repair but are dispensable for intersister DNA repair during meiosis in Arabidopsis. *Plant Cell.* 25, 4924-4940 (2013).
84. Shima H, Suzuki H, Sun J, Kono K, Shi L, Kinomura A, Horikoshi Y, Ikura T, Ikura M, Kanaar R, Igarashi K, Saitoh H, Kurumizaka H, Tashiro S. Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites of DNA damage. *J Cell Sci.* 126, 5284-5292 (2013).
85. Sato Y, Mukai M, Ueda J, Muraki M, Stasevich TJ, Horikoshi N, Kujirai T, Kita H, Kimura T, Hira S, Okada Y, Hayashi-Takanaka Y, Obuse C, Kurumizaka

- H, Kawahara A, Yamagata K, Nozaki N, Kimura H. Genetically encoded system to track histone modification *in vivo*. *Sci Rep.* 3, 2436 (2013).
86. Arimura Y, Kimura H, Oda T, Sato K, Osakabe A, Tachiwana H, Sato Y, Kinugasa Y, Ikura T, Sugiyama M, Sato M, Kurumizaka H. Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. *Sci Rep.* 3, 3510 (2013).
87. Morozumi Y, Ino R, Ikawa S, Mimida N, Shimizu T, Toki S, Ichikawa H, Shibata T, Kurumizaka H. Homologous pairing activities of two rice RAD51 proteins, RAD51A1 and RAD51A2. *PLoS One.* 8, e75451 (2013).
88. 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. Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 69, 2431-2439 (2013).
89. Iwasaki W, Miya Y, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tachiwana H, Shibata T, Kagawa W, Kurumizaka H. Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio.* 3, 363-369 (2013).
90. Azegami N, Saikusa K, Todokoro Y, Nagadoi A, Kurumizaka H, Nishimura Y, Akashi S. Conclusive evidence of the reconstituted hexasome proven by native mass spectrometry. *Biochemistry.* 52, 5155-5157 (2013).
91. Kanda T, Horikoshi N, Murata T, Kawashima D, Sugimoto A, Narita Y, Kurumizaka H, Tsurumi T. Interaction between basic residues of Epstein-Barr virus EBNA1 protein and cellular chromatin mediates viral plasmid maintenance. *J Biol Chem.* 288, 24189-24199 (2013).
- 他、計 97 件
- [学会発表]
1. 胡桃坂仁志、クロマチンによる遺伝子発現制御の構造基盤、第 91 回日本生化学会大会、京都、2018 年 9 月
 2. Kurumizaka H., Structural insights into the chromatin dynamics that underlie genome, FASEB Machines on Genes, コロラド(アメリカ), 2018 年 6 月
 3. Kurumizaka H., Nucleosome Remodeling and Structure, INDO-JAPAN Conference (2018): Epigenetics, Human Microbiomes and Disease, コルカタ(インド), 2018 年 2 月
 4. Kurumizaka H., Structural Biology of Epigenetic Chromatin Regulation, 15th Chinese Biophysics Congress, 上海(中国), 2017 年 11 月
 5. Kurumizaka H., Chromatin contribution in DNA repair, The 6th US-Japan DNA Repair Meeting, バークレー(アメリカ), 2017 年 5 月
 6. Kurumizaka H., Structural basis of chromatin dynamics, Telluride workshop on chromatin structure and dynamics, テルライド(アメリカ), 2016 年 8 月
 7. Kurumizaka H., Structural basis and biological significance of nucleosomes containing human H2A.Z, EMBO meeting on Histone Variants, パリ(フランス), 2014 年 6 月
- 他、計 119 件



再構成ヌクレオソームを用いた動的クロマチン構造の解明

平成 25 年度～平成 29 年度

堀 哲也 (大阪大学大学院・生命機能研究科・准教授)

[計画研究代表:胡桃坂 仁志 (早稲田大学・理工学術院・教授)]

【研究目的】

真核生物のゲノム DNA は、ヌクレオソームを基本単位としたクロマチンとして高密度に折り畳まれ、核内に収容されている。ヌクレオソームを構成するヒストンには、多種類のヒストンバリエーションや化学修飾が存在し、これらによって多様なヌクレオソーム構造が形成される。それによって、クロマチンの高次構造とダイナミクスの多様性が生みだされることで、ゲノム DNA の転写・複製・修復・組換えなどの調節が行われていることが明らかになってきた。本研究では、独自のヒストン精製系及びヌクレオソーム再構成系によって、ヒストンバリエーションや化学修飾を含むさまざまなヌクレオソームを試験管内で再構成し、それらを用いて生化学的および構造生物学的な解析を行うことで、「動的クロマチン構造」の基盤を明らかにし、クロマチンによる DNA 機能発現制御の分子機構を解明することを目的とした。

【研究成果】

(1) セントロメア形成の分子スイッチとして機能するヒストン修飾

ニワトリ DT40 細胞を使用し、反復配列の無いセントロメアや実験的に誘導したネオセントロメアを対象とした網羅的な ChIP-seq 解析(クロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーによる解析)を行い、セントロメア領域の詳細なヒストン修飾プロファイルを明らかにした。その結果、セントロメアに集積するヒストン修飾 H4K20me1 を発見し、セントロメア機能における重要性を明らかにした(*Dev. Cell*, 2014)(図 1)。本成果は、掲載誌の表紙に採用さ

れたほか、*Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 誌でも紹介されるなど、国際的に高く評価された。さらに、この網羅的な ChIP-seq 解析の結果から、セントロメアに取り込まれる前の CENP-A 複合体中のヒストン H4 が、特異的なアセチル化修飾(H4K5ac、H4K12ac)を受けることも発見し、この修飾が CENP-A のセントロメアへの正確な取り込みに必須であることを示した(*Nature Commun.*, 2016)。

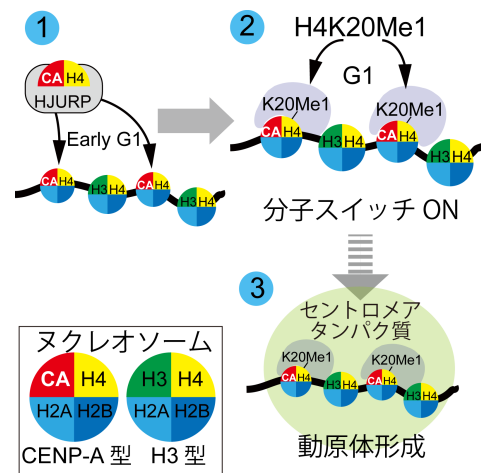


図 1. H4K20me1 修飾による機能的な動原体形成のモデル

(2) セントロメアクロマチンを維持・継承する分子メカニズム

ニワトリ細胞において、CENP-A のセントロメアクロマチンへの取り込みに関与する KNL2 の機能ドメインを明らかにし、「新規の CENP-A を、既にクロマチンに存在する CENP-A の近傍に供給することでセントロメアの位置が安定に継承される」とするモデルを提出した(*Dev. Cell*, 2017)。さらに、複数種のニワトリ DT40 細胞株を対象とした大規模な ChIP-seq 解析を行い、正常な動原体構造がセントロメアの位置および大きさの安定維持に重要であ

ることを示した(*J. Cell Biol.*, 2017)(図 2)。本成果は、セントロメアが 1 細胞レベルで変動していることを示す重要な知見である。

(3) 細胞系列および分化段階で必須性が異なる動原体

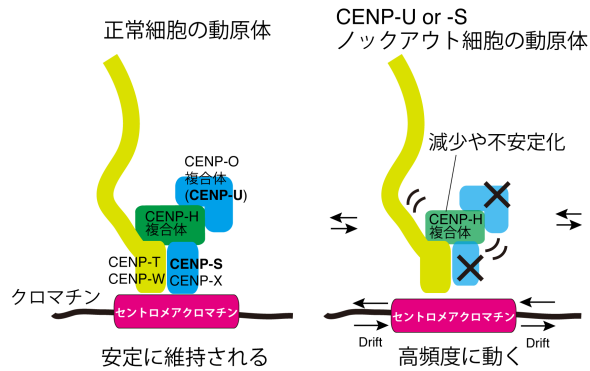


図 2. 動原体構造はセントロメアクロマチンの安定維持に必須

動原体タンパク質

動原体タンパク質複合体のサブグループの一つである CENP-O クラス複合体 (CENP-O, -P, -Q, -R, -U) の遺伝子欠損マウスを作製し、CENP-U 遺伝子が、マウスの初期発生に必須であることを明らかにした(図 3)。さらに、マウス胚性幹細胞 (mES 細胞) およびマウス繊維芽細胞 (MEF 細胞) で同様に CENP-U 遺伝子欠損の影響を解析した結果、mES 細胞では染色体分配の異常により死滅するが、MEF 細胞では生存可能であることが分かった。これら細胞を用いた細胞生物学的解析から、細胞種による M 期チェックポイント活性の違いが細

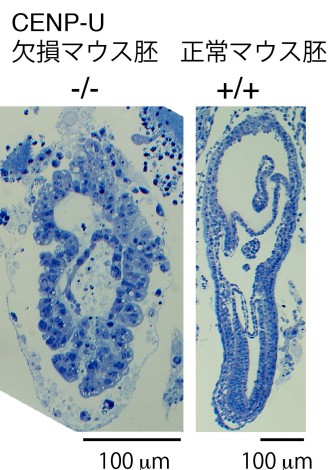


図 3. CENP-U 遺伝子欠損 (-/-) により初期発生に異常を生じたマウス胚

胞種による表現型の違いを引き起こすことを明らかにした(*Chromosome Res.*, 2014)。

【本研究課題に関する主要成果】

【雑誌論文】すべて査読あり

- Hara M, Ariyoshi M, Okumura E, Hori T, Fukagawa T. Multiple phosphorylations control recruitment of the KMN network onto kinetochores. *Nature Cell Biol.* 20, 1378-1388 (2018).
- Nishimura K, Komiya M, Hori T, Itoh T, Fukagawa T. 3D genomic architecture reveals that neocentromeres associate with heterochromatin regions. *J Cell Biol.* in press (2018).
- Hori T, Shang WH, Hara M, Ariyoshi M, Arimura Y, Fujita R, Kurumizaka H, Fukagawa T. Association of M18BP1/KNL2 with CENP-A Nucleosome Is Essential for Centromere Formation in Non-mammalian Vertebrates. *Dev Cell.* 42, 181-189 (2017).
- Hori T, Kagawa N, Toyoda A, Fujiyama A, Misu S, Monma N, Makino F, Ikeo K, Fukagawa T. Constitutive centromere-associated network (CCAN) controls centromere drift in vertebrate cells. *J Cell Biol.* 216, 101-113 (2017).
- Shang WH, Hori T, Westhorpe F, Godek K, Toyoda A, Misu S, Monma N, Ikeo K, Carroll C, Takami Y, Fujiyama A, Kimura H, Straight A, Fukagawa T. Acetylation of histone H4 Lysine 5 and 12 is required for CENP-A deposition into centromeres. *Nature Commun.* 7, 13465 (2016).
- Abe T, Kawasumi R, Arakawa H, Hori T, Shirahige K, Losada A, Fukagawa T, Branzei D. Chromatin determinants of the

- inner-centromere rely on replication factors with functions that impart cohesion. *Oncotarget*. 7, 67934-67947 (2016).
7. Kusakabe M, Oku H, Matsuda R, Hori T, Muto A, Igarashi K, Fukagawa T, Harata M. Genetic complementation analysis showed distinct contributions of the N-terminal tail of H2A.Z to epigenetic regulations. *Genes Cells*. 21, 122-35 (2016).
 8. Furuta M, Hori T, Fukagawa T. Chromatin binding of RCC1 during mitosis is important for its nuclear localization in interphase. *Mol Biol Cell*. 27, 371-381 (2016).
 9. Samejima I, Spanos C, Alves Fde L, Hori T, Perpelescu M, Zou J, Rappsilber J, Fukagawa T, Earnshaw WC. Whole-proteome genetic analysis of dependencies in assembly of a vertebrate kinetochore. *J Cell Biol*. 211, 1141-1156 (2015).
 10. Nagpal H, Hori T, Furukawa A, Sugase K, Osakabe A, Kurumizaka H, Fukagawa T. Dynamic changes in CCAN organization through CENP-C during cell-cycle progression. *Mol Biol Cell*. 26, 3768-3776 (2015).
 11. Perpelescu M, Hori T, Toyoda A, Misu S, Monma N, Ikeo K, Obuse C, Fujiyama A, Fukagawa T. HJURP is involved in the expansion of centromeric chromatin. *Mol Biol Cell*. 26, 2742-2754 (2015).
 12. Kagawa N, Hori T(同等筆頭著者), Hoki Y, Hosoya O, Tsutsui K, Saga Y, Sado T, Fukagawa T. The CENP-O complex requirement varies among different cell types. *Chromosome Res*. 22, 293-303 (2014).
 13. Hori T, Shang W-H, Toyoda A, Misu S, Monma N, Ikeo K, Molina O, Vargiu G, Fujiyama A, Kimura H, Earnshaw William C, Fukagawa T. Histone H4 Lys 20 Monomethylation of the CENP-A Nucleosome Is Essential for Kinetochore Assembly. *Dev Cell*. 29, 740-749 (2014).
 14. Takeuchi K, Nishino T, Mayanagi K, Horikoshi N, Osakabe A, Tachiwana H, Hori T, Kurumizaka H, Fukagawa T. The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA. *Nucleic Acids Res*. 42, 1644-1655 (2014).
- [学会発表]
1. Hori T., Epigenetics and Kinetochore assembly in Vertebrate Cells, EMBO Workshop "Dynamic kinetochore", エディンバラ(イギリス), 2017年6月
 2. 堀哲也、セントロメア機能に必須なエピジェネティック機構、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
 3. Hori T., The size of centromere is controlled by coordination of centromere proteins, ASCB Annual Meeting, ニューオーリンズ(アメリカ), 2013年12月

シミュレーション計算による動的クロマチンのダイナミクス解析



平成 25 年度～平成 29 年度

河野 秀俊 (量子科学技術研究開発機構・量子ビーム科学研究部門・グループリーダー)

【研究目的】

真核生物のゲノム DNA は核内にクロマチン構造としてコンパクトに収納されている。しかし、転写、複製、組換えでは、基本構造であるヌクレオソームから DNA が解けたり、ヌクレオソーム自体が一旦破壊され再構築されたりとその構造をダイナミックに変える。生物は、この過程を通して、制御因子などの DNA 結合タンパク質のアクセスを制御し、DNA の持つ情報を発現している。本研究では、分子動力学シミュレーションを用い、ヌクレオソームやポリヌクレオソームの構造安定性や構造揺らぎなどがクロマチンに及ぼす影響を調べる。これにより、動的なクロマチンと機能発現メカニズムの関係を明らかにする。さらに、他の計画研究の実験研究者と共同し、核内でのクロマチン動態とヒストンバリエーションや化学修飾の関係を調べた。

【研究成果】

(1) モノヌクレオソームのダイナミクス解析

種々のヒストンバリエーション間の構造揺らぎや構造変化の差異を調べるために、カノニカルヌクレオソームに加えて、領域代表者の胡桃坂らによって決定された組成の異なるヌクレオソーム(内在性のヒストンバリエーション、ヒストン H3.3, H2AZ を含む)構造を用いて、100 ナノ秒から 300 ナノ秒の分子動力学計算をおこなった。計算は、本予算で導入した PC クラスタ及び京コンピュータを使って実行した。

バリエーションの性質を調べるため、まず、カノニカルヌクレオソームについて解析を行った。カノニカル

ルヌクレオソームは、4 種類のヒストン H3, H4, H2A, H2B がそれぞれ 2 つずつ入った 8 量体に約 150 塩基対の DNA が巻き付いた構造体である。結晶構造で構造が決定できるのは、コア領域のみで、ヒストンの N 末端及び C 末端領域(テールと呼ばれる)は特定の安定な構造をとらない天然変性領域であるため、結晶構造解析では構造決定ができない。しかし、その領域は多くの翻訳後修飾を受けることから、テールの振る舞いが重要視されている。我々はシミュレーション計算により、H2A テールがヌクレオソームのリンカー DNA の開閉に重要な役割を果たしていることを見出した。テールを切断してシミュレーションでは、リンカー DNA が開くことが観察された。これらの結果から、H2A の C 末テールがリンカー DNA の閉じた状態を安定化していることが示唆された(図1)。

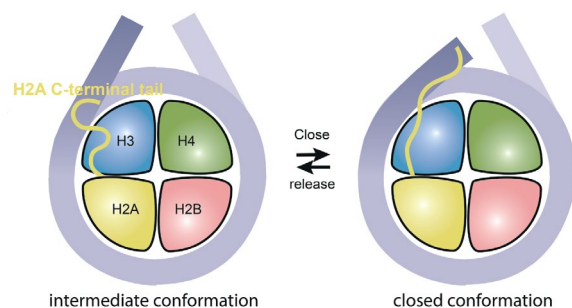


図1. H2A C 末テールが DNA を閉じた状態に安定化

新学術領域内の他の計画研究で見つかったアミノ酸変異を持つヌクレオソームやヒストンバリエーションを持つヌクレオソームの全原子分子動力学シミュレーションを行った。そのなかで、ヒストンバリエーション(H2A.Z)を持つヌクレオソームでは、ひとつ

A01 計画研究(代表)

のアミノ酸変異によってヌクレオソームに巻き付いた DNA が解離しやすくなることを見出した。

H3 テールは、翻訳後修飾を受ける部位を複数持っており、分子生物学的に翻訳後修飾の影響が最もよく調べられている。しかし、その構造が翻訳後修飾によってどのように変わるのかはほとんど分かっていなかった。そこで、独自に開発した拡張アンサンブル法を取り込んだ全原子分子動力学計算を行い、H3 テールの構造アンサンブルの解析を行った。修飾なしと比べて、アセチル化は場所に関わらずヘリックス形成を誘導したが、メチル化ではそのような誘導は見られなかった。また、アセチル化、メチル化ともにテールの空間存在領域を小さくすることが分かった(図 2)。つまり、

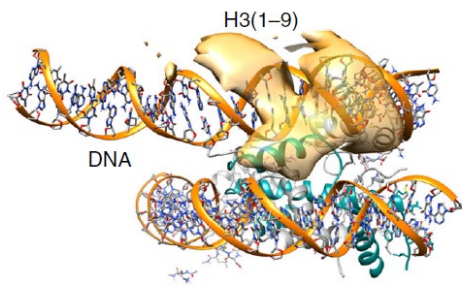


図2. 修飾なしの H3 テール(N 末端の1から9番目までの空間分布(solid 表示)。この領域が、アセチル化やメチル化で小さくなる。

テールはコンパクトな構造を持ち、ある領域に留まることが多くなる傾向が見られた。さらに、メチル化では、テール全体の溶媒露出面積が大きくなることが分かった。このことは、メチル化をターゲットにして結合するタンパク質との結合を促進する効果があると考えられる。また、H3 テールのアセチル化及びメチル化は、リンカーDNA を開く傾向にあること、複数のアセチル化はその傾向をより強めることが分かった。但し、例外的にそのような効果が全く見られないアセチル化部位もあることが分かった。

(2) 高次クロマチンダイナミクスシミュレーションに向けた原子構造モデルの構築

真核生物のゲノムは、ヌクレオソームが連結したク

ロマチン構造をもつ。ヌクレオソーム同士のパッキングや連結したポリヌクレオソームの構造を理解することは、クロマチンの構造やダイナミクスを理解する上で不可欠である。

そこで、分子動力学計算により、2つのヌクレオソームのパッキング状態での構造と解離エネルギーを明らかにした。シミュレーション計算の結果、パッキング状態は、片方のヌクレオソームの H4 テールのもう片方のヌクレオソームとの相互作用の仕方に依存していること、また異なるパッキング状態間のエネルギーはほぼ等しいことなどがわかった。つまり、H4 テールの相互作用の仕方によって多様なパッキング状態が存在しうることが示された。また、H4 テールを切除すると、ヌクレオソーム同士が自発的に解離する現象が見られた。このことは、H4 テールがパッキング状態を安定化するために不可欠であることを示す。

次に、ヌクレオソーム3量体(トリヌクレオソーム)の構造解析を行った。電子顕微鏡解析とコンピュータによる分子モデリングにより、トリヌクレオソームがどのような構造を取り得るのか、また、ヒストンバリエントを含むトリヌクレオソームは構造が変わるのかを調べた。分子モデリングでは、結晶構造解析によって決定された高分解能モノヌクレオソーム構造にリンカーDNA をつなぎ、3 量体のオリゴヌクレオソームの原子モデルを構築した。モノヌクレオソームの分子動力学計算結果と弾性ネットワークモデル解析結果にもとづき、合理的に、つまり、構造エネルギー的な観点からみて無理のない方向に DNA を変形させた。このようにして、取りうる多数の構造をあらかじめ用意し、この中から領域代表者らが取得した 3 量体の電子顕微鏡像データに最もよく適合する構造を探し出すという手法で、トリヌクレオソームの原子モデルを構築した。カノニカルヌクレオソームのみで構成されるトリヌクレオソームと、CENPA(H3 ヒストンのバリエント)を

真ん中に配置したものの2種類に対して解析を行った。CENPAを真ん中にもつtrisヌクレオソームでは、ヌクレオソームに巻き付いたDNAの両端がカノニカルに比べてより開いた構造が多いのに対し、カノニカルでは互いによく似た構造を持ち、構造の多様性が小さかった。これらの結果は、高次クロマチンの構造がモノヌクレオソームの性質の違いを反映させたものになっているということを示唆している。

また、他の計画研究者らとともに新規ヌクレオソーム、オーバーラッピングジヌクレオソーム(OLDN)の構造決定に成功した。ヌクレオソームはカノニカルヒストン8量体と約150bpのDNAから形成されるが、OLDNではヌクレオソーム同士の会合面からH2A-H2Bが欠落し、約250塩基対のDNAが巻き付いていた。この構造体は、レモデラーやRNAポリメラーゼによってヌクレオソームの破壊ないし位置の変化時に形成される中間体だと推定される。さらに、ヒト培養細胞を用いたゲノム解析により、オーバーラッピングジヌクレオソームは、実際に遺伝子の転写開始点付近に形成されることがわかった。本研究成果は、クロマチン構造ユニットの多様性を示した重要な成果となった。

(3) シミュレーション計算で特徴的な物性を示すヌクレオソームのダイナミクス解析

出芽酵母ゲノムの転写開始直後に存在するヌクレオソームのDNA配列には、AA/TT配列が片側(先に転写される側)に多く存在する。我々は、シミュレーション計算により、DNA配列がAA/TTの場合、その領域は硬いということを見出した。これらを合わせて考えると、AA/TTを多く含むDNA配列はヌクレオソームを形成しにくい、つまり、AA/TTの偏りによって転写を一方向に進めるように遺伝子がコードされている、という仮説を立てるに至った。そこで、他の計画研究者らと検証実験を行った。検証実験では、ヌクレオソームを形成

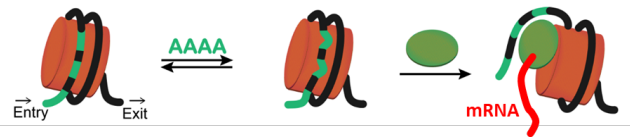


図3. AAが多い側のDNAがヒストンから剥がれやすい。+1ヌクレオソーム中のAAの分布の偏りと遺伝子の発現方向に強い正の相関がある。

するDNAの片側にAA/TTを多く含むヌクレオソームと均等に含むヌクレオソームを再構成し、DNA分解酵素への感受性を調べた。結果、仮説通り、AA/TTを多く含む側の方が優位に高い感受性を示すことが分かった。さらに、そのようなヌクレオソームを持つ傾向は、発現が活発な遺伝子ほど強いことが分かった。以上から、出芽酵母の場合、遺伝子の発現の方向が、DNAのヌクレオソームからの解離しやすさとしてコードされていることが示唆された(図3)。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文] 査読あり16件、査読なし1件

- 1 Li Z, Kono H. Investigating the Influence of Arginine Dimethylation on Nucleosome Dynamics Using All-Atom Simulations and Kinetic Analysis. *J Phys Chem B*. 9625-9634 (2018).
- 2 Luo D, Kato D, Nogami J, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Kono H. MNase, as a probe to study the sequence-dependent site exposures in the +1 nucleosomes of yeast. *Nucleic Acids Res*. 46, 7124-7137 (2018).
- 3 Kono H, Sakuraba S, Ishida H. Free Energy Profiles for Unwrapping the Outer Superhelical Turn of Nucleosomal DNA. *PLoS Comp Biol*. 14, e1006024 (2018).
- 4 池部仁善, 櫻庭俊, 河野秀俊. ヌクレオソーム中におけるヒストンテールの特性とアセチル化の影響 (H3 Histone Tail Structure within the Nucleosome and the Impact of the Acetylation). *日本生物物理学会誌* 57,

- 095-097 (2017).
- 5 Tencer AH, Cox KL, Di L, Bridgers JB, Lyu J, Wang X, Sims JK, Tyler Allen HF, Zhang Y, Gatchalian J, Li W, Ikebe J, Wade PA, Hayes JJ, Strahl BD, Kono H, Poirier MG, Musselman CA, Kutateladze TG. Covalent modifications of histone H3K9 promote binding of CHD3. *Cell Reports* 21, 455-466 (2017).
 - 6 Sunami, T., Chatake, T., Kono, H. DNA conformational transitions inferred from reevaluation of $m|F_o|-D|F_c|$ electron density maps. *Acta Crystal. D*. D73, 600-608 (2017).
 - 7 Kato D, Osakabe A, Mizukami Y, Adachi F, Arimura Y, Saikusa K, Akashi S, Nishimura Y, Park S-Y, Matsumoto A, Kono H, Inoue R, Sugiyama M, Kurumizaka H. Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. *Science* 356, 205-208 (2017).
 - 8 Ishida H, Kono H. H4 tails potentially produce the diversity in the orientation of two nucleosomes. *Biophysical J*. 113, 978-990 (2017).
 - 9 Gatchalian J, Wang X, Ikebe J, Luo D, Gibsono M, Zhang Y, Cox K, Musselman CA, Poirier MG, Kono H, Haynes JJ, Kutateladze TG. Accessibility of the histone H3 tail in the nucleosome for binding of paired readers. *Nat Commun*. 8, 1489 (2017).
 - 10 Andrabi M, Hutchins AP, Miranda-Saavedra D, Kono H, Nussinov R, Mizuguchi K, Ahmad S. Predicting conformational ensembles and genome-wide transcription factor binding sites from DNA sequences. *Sci Rep*. 7, 4071 (2017).
 - 11 Sakuraba S, Kono H. Spotting the difference in molecular dynamics simulations of biomolecules. *J Chem Phys*. 145, 074116 (2016).
 - 12 Li Z, Kono H. Distinct Roles of Histone H3 and H2A Tails in Nucleosome Stability. *Sci Rep*. 6, 31437 (2016).
 - 13 Ikebe J, Sakuraba S, Kono H. H3 Histone Tail Conformation within the Nucleosome and the Impact of K14 Acetylation Studied Using Enhanced Sampling Simulation. *PLoS Comput Biol*. 12, e1004788 (2016).
 - 14 Kono H, Shirayama K, Arimura Y, Tachiwana H, Kurumizaka H. Two Arginine Residues Suppress the Flexibility of Nucleosomal DNA in the Canonical Nucleosome Core. *PLoS ONE* 10, e0120635 (2015).
 - 15 Nakagawa H, Yonetani Y, Nakajima K, Ohira-kawamura S, Kikuchi T, Inamura Y, Kataoka M, Kono H. Local Dynamics Coupled to Hydration Water Determines DNA-sequence Dependent Deformability. *Physical Reviews E*. 90, 022723-022711 (2014).
 - 16 Kai T, Tokuhisa A, Moribayashi K, Fukuda Y, Kono H, Go N. Intensity of diffracted X-rays from biomolecules with radiation damage caused by strong X-ray pulses. *J Phys Soc Jpn*. 83, 094301 (2014).
 - 17 Ikebe J, Sakuraba S, Kono H. Adaptive lambda square dynamics simulation: an efficient conformational sampling method for biomolecules. *J Comp Chem*. 35, 39-50 (2014).

〔学会発表〕

1. Kono H., Mono- and Di- nucleosome Dynamics Studied by Molecular Modeling and Simulation, The 8th Taiwan-Japan Joint Meeting on Neutron and X-ray Scattering, 台湾, 2018年3月
 2. Kono H, Luo D., Impact of post-translational modifications on the structure and dynamics of nucleosome, 1st QST International Symposium "Quantum Life Science", 幕張, 2017年7月
 3. Kono H., Role of tails in intra-nucleosome and inter-nucleosomes, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017年7月
 4. Ishida H, Kono H., THE FREE-ENERGY LANDSCAPE OF THE DI-NUCLEOSOME: A CRITICAL ROLE OF THE H4 TAILS FOR THE NUCLEOSOME-NUCLEOSOME CONFORMATION, Biophysical Society 61th Annual Meeting, ニューオーリンズ(アメリカ), 2017年2月
 5. Li Z, Kono H., Distinct Roles of Histone H3 and H2A Tails in Nucleosome Stability, Chromatin Structure & Function, Gordon Conference, レ・ディアブルレ(スイス), 2016年5月
 6. Kono H, Ikebe J, Sakuraba S, Ishida H., Impact of Histone Variant and Post-translational Modification on Nucleosome, Biophysical Society 60th Annual Meeting, ロサンゼルス(アメリカ), 2016年2月
 7. Kono H., Impact on nucleosome dynamics via histone variants and post-translational modifications, スパコン「京」がひらく科学と社会; Supercomputational Life Science 2015, 東京, 2015年10月
 8. Kono H, Ikebe J, Sakuraba S, Ishida H., Dynamics of nucleosomes and impact of acetylation, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015年8月
 9. Kono H, Sakuraba S, Ishida H, Free Energy Profile for Nucleosomal DNA Unwrapping, Biophysical Society 59th Annual Meeting, ボルチモア(アメリカ), 2015年2月
 10. Kono H, Yonetani Y., DISSOCIATION FREE-ENERGY PROFILES OF SPECIFIC AND NON-SPECIFIC DNA-LACREPRESSOR COMPLEXES: ADAPTIVE BIASING FORCE MOLECULAR DYNAMICS STUDY, Biophysical Society 58th Annual Meeting, サンフランシスコ(アメリカ), 2014年2月
 11. Kono H., Understanding Protein-DNA Recognition by Structural Bioinformatics and Molecular Dynamics Simulation, Second BMIRC International Symposium on Advances in Bioinformatics and Medical Engineering, 福岡, 2014年1月
- 他、計35件



ヘテロクロマチンの構造と機能の理解

平成 25 年度～平成 29 年度

小布施 力史 (大阪大学・理学研究科・教授)

【研究目的】

クロマチンの階層の一つの要としてヘテロクロマチンが挙げられる。ヘテロクロマチンは細胞周期を通して凝縮したクロマチン構造であり、遺伝子発現制御機構に必須な役割を果たしている。ヘテロクロマチンの構成因子として、ヌクレオソーム中の9番目のリジンがトリメチル化されたヒストン H3 (H3K9me3)と、それを認識して結合する HP1 (heterochromatin protein 1)が知られている。しかしながら、この H3K9me3 と HP1 を基盤としてどのように凝縮したヘテロクロマチン構造が形成され、どのように様々なクロマチンイベントに働きかけているかは不明である。本課題では、わたしたちが見いだした、ヘテロクロマチンの主要な構成要素である HP1 に結合するヒストン修飾酵素複合体やヘテロクロマチンタンパク質と、それらの相互作用の意義を明らかとし、ヘテロクロマチン構造構築の原理と機能を明らかにすることを目的とした。

【研究成果】

(1) G9a 複合体のバリエーションとその機能

HP1 結合因子として H3K9(ヒストン H3 の9番目のリジン)のメチル化酵素である G9a 複合体を同定した。プロテオミクス解析を行ったところ、G9a 複合体は酵素活性を持つコアコンプレックスの構成因子に加えて、共通のジンクフィンガー様配列を持つ4種類のアクセサリタンパク質(GAZ: G9a associated zinc-finger proteins)が相互作用していることを見出した。ヒストン修飾の定量解析の結果、G9a を細胞から除去すると、H3K9me2 のレベルが低下した。アクセサリタンパク質の一つであ

る GAZ1 は、複製開始複合体(ORC)と相互作用する G9a に含まれ、除去すると H3K9me2 の低下が見られた。また、G9a と相互作用する ORC のサブユニットを細胞から除去すると S 期への進行が遅延した。これらのことは、ヒストン修飾の維持と複製開始制御を同じ G9a-ORC 複合体が担っていることを示しており、細胞世代を超えたエピゲノム情報の継承を保障するメカニズムが示唆された。

(2) PRC2 複合体のバリエーションとその機能

HP1 結合タンパク質として H3K27 のメチルトランスフェラーゼである PRC2 複合体のいくつかのサブユニットを同定した。相互作用解析から、酵素活性を持つコア複合体に加えて、3種類のアクセサリタンパク質(SUZBP: SUZ12 binding protein)が、排他的に結合し PRC2 複合体にバリエーションをもたせていた。3種類の SUZBP とも PRC2 複合体のサブユニットである SUZ12 を介して PRC2 複合体に含まれた。また、相互作用には SUZ12 上の同じ領域を必要することから、排他的に結合し、PRC2 複合体のバリエーションを生み出す分子基盤が明らかになった。

(3) SMCHD1-HBiX1 の不活性 X 染色体、常染色体での機能

公募班の佐渡敬教授との共同で、HBiX1 あるいは SMCHD1 のノックアウトマウスから E13.5 の MEF 採取し解析したところ、不活性 X 染色体上の約半数の遺伝子の発現が上昇したが、その程度はまちまちであった。興味深いことに、HBiX1 あるいは SMCHD1 のノックアウトマウスから得た初期胚由来の MEF では、H3K9me3 や H3K27me3 の分布

に変化があった。また、常染色体の一部の領域において遺伝子発現の脱抑制とヒストン修飾の変化が起きた。SMCHD1-HBiX1 は常染色体においても、ヒストン修飾と共役した高次構造形成を介して遺伝子発現の制御に寄与することが示唆された。

(4) HP1 結合タンパク質の新たな機能の探索

機能が明らかとなっていない HP1 結合タンパク質 SCAI について解析を進めたところ、意外なこと DNA2本鎖切断 (DSB) 時の損傷応答に関わる 53BP1 が結合することが明らかとなった。BRCA1 は、相同組換え修復のような一本鎖 DNA の削り込みを介した修復機構で修復を促進する。一方、53BP1 には RIF1 が結合して BRCA1 を阻害することにより、非相同末端修復 (NHEJ) を促進することが知られている。私たちは、SCAI が RIF1 と拮抗して 53BP1 に結合し、BRCA1 を損傷部位に集積させ、BRCA1 依存的な修復機構を促進する、という一連のプロセスを明らかにした (図1)。このことは、NHEJ モードと BRCA1 依存モードが継時的に順次起こるといった概念を提示するものである。最近、SCAI はヘテロクロマチン領域の DSB 修復を促進することが報告された。このように、HP1 とその結合タンパク質は、クロマチン構造や転写の抑制のみならず、DNA 修復をはじめクロマチン上の幅広い重要なイベントに関与している。

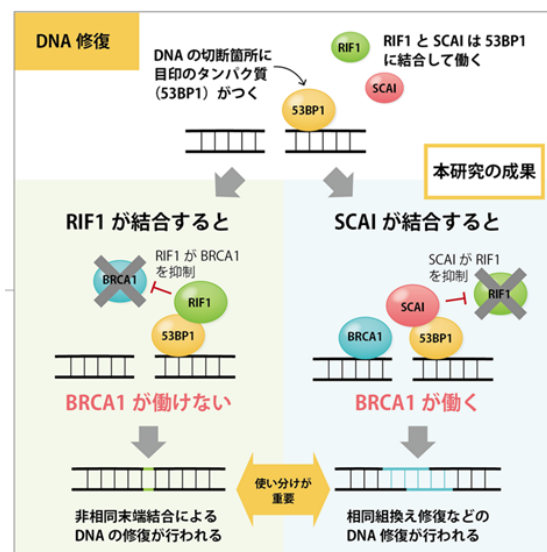


図1 新規HP1結合タンパク質SCAIの損傷修復機能

【本研究課題に関する主要成果】

〔雑誌論文〕すべて査読あり

1. Sakakibara Y, Nagao K, Blewitt M, Sasaki H, Obuse C, Sado T. Role of SmcHD1 in establishment of epigenetic states required for the maintenance of the X-inactivated state in mice. *Development*. 145, dev166462 (2018).
2. Terui R, Nagao K, Kawasoe Y, Taki K, Higashi TL, Tanaka S, Nakagawa T, Obuse C, Masukata H, Takahashi TS. Nucleosomes around a mismatched base pair are excluded via an Msh2-dependent reaction with the aid of SNF2 family ATPase Smarcd1. *Genes Dev*. 32, 806-821 (2018).
3. Hirano Y, Kinugasa Y, Asakawa H, Chikashige Y, Obuse C, Haraguchi T, Hiraoka Y. Lem2 is retained at the nuclear envelope through its interaction with Bqt4 in fission yeast. *Genes Cells*. 23, 122-135. (2018).
4. Kajitani T, Kato H, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y, Kimura H, Ohkawa Y, Obuse C, Hermand D, Murakami Y. Ser7 of RNAPII-CTD facilitates heterochromatin formation by linking ncRNA to RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114, E11208-E11217 (2018).
5. Sakata Y, Nagao K, Hoki Y, Sasaki H, Obuse C, Sado T. Defects in dosage compensation impact global gene regulation in the mouse trophoblast. *Development*. 144, 2784-2797 (2017).
6. Ogushi S, Yamagata K, Obuse C, Furuta K, Wakayama T, Matzuk MM, Saitou M. Reconstitution of the oocyte nucleolus in mice through a single nucleolar protein, NPM2. *J Cell Sci*. 15, 2416-2429 (2017).

7. Isobe SY, Nagao K, Nozaki N, Kimura H, Obuse C. Inhibition of RIF1 by SCAI Allows BRCA1-Mediated Repair. *Cell Rep.* 20, 297-307 (2017).
8. Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, Takasugi M, Watanabe S, Kanemaki MT, Obuse C, Hara E. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun.* 8, 15287 (2017).
9. Iwamoto M, Osakada H, Mori C, Fukuda Y, Nagao K, Obuse C, Hiraoka Y, Haraguchi T. Compositionally distinct nuclear pore complexes of functionally distinct dimorphic nuclei in the ciliate Tetrahymena. *J Cell Sci.* 130, 1822-1834 (2017).
10. Yamaguchi L, Nishiyama A, Misaki T, Johmura Y, Ueda J, Arita K, Nagao K, Obuse C, Nakanishi M. Usp7-dependent histone H3 deubiquitylation regulates maintenance of DNA methylation. *Sci Rep.* 7, 55 (2017).
11. Hiraga SI, Ly T, Garzón J, Hořejší Z, Ohkubo YN, Endo A, Obuse C, Boulton SJ, Lamond AI, Donaldson AD. Human RIF1 and protein phosphatase 1 stimulate DNA replication origin licensing but suppress origin activation. *EMBO Rep.* 18, 403-419 (2017).
12. Isono M, Niimi A, Oike T, Hagiwara Y, Sato H, Sekine R, Yoshida Y, Isobe SY, Obuse C, Nishi R, Petricci E, Nakada S, Nakano T, Shibata A. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Rep.* 18, 520-532 (2017).
13. Suzuki S, Kato H, Suzuki Y, Chikashige Y, Hiraoka Y, Kimura H, Nagao K, Obuse C, Takahata S, Murakami Y. Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 44, 4147-62 (2016).
14. Funami K, Matsumoto M, Obuse C, Seya T. 14-3-3-zeta participates in TLR3-mediated TICAM-1 signal-platform formation. *Mol Immunol.* 73, 60-68 (2016).
15. Kaimori JY, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep.* 6, 24318 (2016).
16. Hamanaka K, Goto K, Arai M, Nagao K, Obuse C, Noguchi S, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Nishino I. Clinical, muscle pathological, and genetic features of Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy 2 (FSHD2) patients with SMCHD1 mutations. *Neuromuscul Disord.* 26, 300-308 (2016).
17. Tsujii A, Miyamoto Y, Moriyama T, Tsuchiya Y, Obuse C, Mizuguchi K, Oka M, Yoneda Y. Retinoblastoma-binding Protein 4-regulated Classical Nuclear Transport Is Involved in Cellular Senescence. *J Biol Chem.* 290, 29375-29388 (2015).
18. Hayashi-Takanaka Y, Maehara K, Harada A, Umehara T, Yokoyama S, Obuse C, Ohkawa Y, Nozaki N, Kimura H. Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Chromosome Res.* 23, 753-766 (2015).
19. Tatematsu M, Funami K, Ishii N, Seya T,

- Obuse C, Matsumoto M. LRRC59Regulates Trafficking of Nucleic Acid-Sensing TLRs from the Endoplasmic Reticulum via Association with UNC93B1. *J Immunol.* 195, 4933-42 (2015).
20. Kimoto C, Moriyama T, Tsujii A, Igarashi Y, Obuse C, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y. Functional characterization of importin $\alpha 8$ as a classical nuclear localization signal receptor. *Biochim Biophys Acta.* 1853, 2676-2683 (2015).
21. Perpelescu M, Hori T, Toyoda A, Misu S, Monma N, Ikeo K, Obuse C, Fujiyama A, Fukagawa T. HJURP is involved in the expansion of centromeric chromatin. *Mol Biol Cell.* 26, 2742-54 (2015).
22. Moriyama T, Sangel P, Yamaguchi H, Obuse C, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y. Identification and characterization of a nuclear localization signal of TRIM28 that overlaps with the HP1 box. *Biochem Biophys Res Commun.* 462, 201-207 (2015).
23. Saito N, Qiao H, Yanagi T, Shinkuma S, Nishimura K, Suto A, Fujita Y, Suzuki S, Nomura T, Nakamura H, Nagao K, Obuse C, Shimizu H, Abe R. An annexin A1-FPR1 interaction contributes to necroptosis of keratinocytes in severe cutaneous adverse drug reactions. *Sci Transl Med.* 6, 245 (2014).
24. Suzuki S, Nagao K, Obuse C, Murakami Y, Takahata S. A novel method for purification of the endogenously expressed fission yeast Set2 complex. *Protein Expr Purif.* 97, 44-49 (2014).
25. Tanaka Y, Umata T, Okamoto K, Obuse C, Tsuneoka M. CxxC-ZF domain is needed for KDM2A to demethylate histone in rDNA promoter in response to starvation. *Cell Struct Funct.* 39, 79-92 (2014).
26. Hoshina S, Yura K, Teranishi H, Kiyasu N, Tominaga A, Kadoma H, Nakatsuka A, Kunichika T, Obuse C, Waga S. Human origin recognition complex binds preferentially to G-quadruplex-preferable RNA and single-stranded DNA. *J Biol Chem.* 288, 30161-30171. (2013).
- [学会発表]
1. Obuse C., Conserved repressive chromatin properties on inactive X chromosome in human and mouse, SMC proteins; Chromosomal organizers from bacteria to human, 山形, 2017年6月
 2. Obuse C., Conserved repressive chromatin properties on inactive X chromosome between human and mouse, X-chromosome inactivation: a tribute to Mary Lyon, ロンドン (イギリス), 2016年10月
 3. Obuse C., DNA Double Strand Breaks Repair Pathway is Controlled by Differentia, 12th International Congress of Cell Biology (ICCB), プラハ(チェコ), 2016年6月
 4. Obuse C., Human inactive X chromosome is compacted through a Polycomb-independent MACHD1-HBIX1 pathway governed by XIST RNA, 23rd Wilhelm Bernhard Workshop on the cell nucleus, デブレツェン (ハンガリー), 2013年8月
- 他、計 53 件



計測と再構築による生細胞内クロマチンダイナミクスの高次元的理解

平成 25 年度～平成 29 年度

木村 宏 (東京工業大学・科学技術創成研究院・教授)

【研究目的】

クロマチンは細胞核内で動的な構造であり、ミリ秒単位の局所的ゆらぎから、遺伝子の転写に応じた秒・分単位の構造変化、さらに細胞の分化や老化に伴う時間・日、あるいは年単位でのマイクロメートルに及ぶ核内配置の変化まで、様々な時空間スケールで変化する。これまでに研究代表者や分担者は、FabLEM (Fab-based Live Endogenous Modification Labeling) や細胞内修飾特異的一本鎖可変領域抗体 mintbody (modification-specific intracellular antibody) などを開発し、培養細胞や初期胚レベルで、ヒストンの分子動態やヒストン修飾と DNA メチル化の動態を生きのまま可視化してきた。これらの独自の技術を用いて、新しい視点からクロマチン構造が理解できると考えた。本研究は、クロマチン動態の正確な「計測」と「再構築」を行い、生細胞や生物個体におけるクロマチンの動的変化とその機能発現における意義を明らかにすることを目的として行った。

【研究成果】

(1) FabLEM 法の確立

FabLEM により生細胞内のヒストン修飾動態の計測が可能であるが、同一の Fab でも結合させる蛍光色素によってバックグラウンドや細胞質の凝集したシグナルの現れ方に差が生じる。そこで、生細胞観察に適した蛍光色素の探索を行い、Alexa488 (緑)、Cy3 (赤)、Cy5 または CF640 (近赤外) が細胞内のイメージングに適していることを

見出した (Hayashi-Takanaka et al, PLoS One, (2014).; 木村、胡桃坂の共同研究)。また、細胞周期を通じたヒストン H3 のアセチル化と RNA ポリメラーゼ II のリン酸化動態についても明らかにした (Stasevich et al, Methods, (2014).)。

(2) ステロイドホルモン(グルココルチコイド)による転写活性化のキネティクス

FabLEM 法により、グルココルチコイドで誘導される遺伝子アレイの転写活性化のキネティクスを計測し、数理モデルへのフィッティングを行うことで、転写開始や伸長の時間や効率を明らかにした。また、ホルモン刺激前に H3K27ac レベルが高い細胞では転写因子(グルココルチコイド受容体)の遺伝子アレイへの集積と RNA ポリメラーゼ II の転写開始から伸長への移行が促進されることが分かった。これらの結果などから、H3K27ac の転写活性化における意義と分子機構を明らかにした (図 1; Stasevich et al, Nature, (2014).; 木村、大川、徳永の共同研究)。

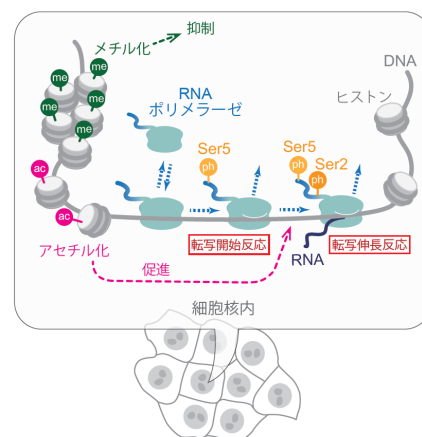


図 1. 転写制御におけるヒストンアセチル化の役割

(3)ゼブラフィッシュ発生過程におけるヒストン修飾動態

胚性ゲノム活性化 (ZGA; zygotic genome activation) や分化の過程でのヒストン修飾動態を明らかにするため、ゼブラフィッシュ受精卵を用いて FabLEM 計測を行った。ゼブラフィッシュの胚発生過程では、初期には転写がおこらず DNA 複製と細胞分裂を素早く繰り返すが、9~10 回分裂すると転写が誘導され ZGA が起こることが知られている。実際に、転写伸長反応の際に起こる RNA ポリメラーゼ II のリン酸化特異的 Fab は、発生初期には細胞核に局在化しないが、ZGA の時期に細胞核の一部に濃縮しはじめることがわかった。現在、様々なヒストン修飾抗体特異的 Fab を用いて FabLEM 計測を行っており、ヒストン H3 アセチル化レベルが ZGA の際に上昇すると結果が得られている。今後、クロマチン制御を介した ZGA のメカニズムの解明が期待できる。

(4)マウス生体内のヒストン修飾動態

H4K20me1 に特異的な mintbody プローブを開発した(図2)。

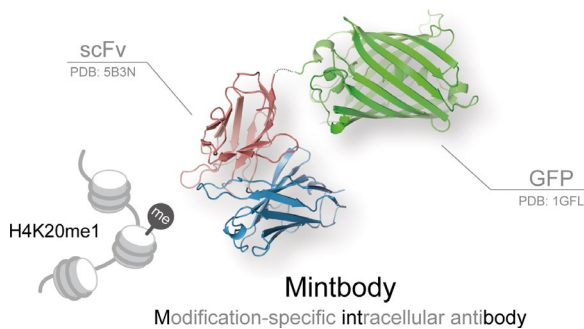


図2. H4K20me1-mintbody

H4K20me1 は、雌由来の培養細胞では不活性 X 染色体に濃縮されることが報告されており、実際にマウス雌培養細胞の生細胞観察により H4K20me1-mintbody が不活性 X 染色体に濃縮

されることが確認された (Sato et al, J Mol Biol, (2016).; 木村、山縣、胡桃坂、原口、平岡の共同研究)。H4K20me1-mintbody 発現細胞を用いた解析から、興味深いことに H4K20me1 は発生の比較的初期では不活性 X 染色体に濃縮するが、細胞分化に伴いその濃縮が見られなくなることが見出された。H4K20me1 は、これまでに細胞周期の制御、DNA 損傷修復制御、転写制御など様々なクロマチン機能制御に関わることが示されており、mintbody 発現マウスやそれ由来の細胞を用いることで、その制御機構の解明に貢献できると考えられた。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文] 査読あり 97 件、査読なし 2 件

1. Harada A, Maehara K, Handa T, Arimura Y, Nogami J, Hayashi-Takanaka Y, Shirahige K, Kurumizaka H, Kimura H, Ohkawa Y. Chromatin integration labeling technology enables low-input epigenomic profiling. *Nat Cell Biol.* in press
2. Sato Y, Stasevich TJ, Kimura H. Visualizing the Dynamics of Inactive X Chromosomes in Living Cells Using Antibody-Based Fluorescent Probes. *Methods Mol Biol.* 1861, 91-102, (2018).
3. 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. 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 (2018).
4. Higgs MR, Sato K, Reynolds JJ, Begum S, Bayley R, Goula A, Vernet A, Paquin KL,

- Skalnik DG, Kobayashi W, Takata M, Howlett NG, Kurumizaka H, Kimura H, Stewart GS. Histone Methylation by SETD1A Protects Nascent DNA through the Nucleosome Chaperone Activity of FANCD2. *Mol Cell*. 71, 25-41, (2018).
5. Parry AJ, Hoare M, Bihary D, Hänsel-Hertsch R, Smith S, Tomimatsu K, Mannion E, Smith A, D'Santos P, Russell IA, Balasubramanian S, Kimura H, Samarajiwa SA, Narita M. NOTCH-mediated non-cell autonomous regulation of chromatin structure during senescence. *Nat Commun*. 9, 1840 (2018).
 6. 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. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. *Nat Commun*. 9, 1400 (2018).
 7. Ruppert JG, Samejima K, Platani M, Molina O, Kimura H, Jeyaprakash AA, Ohta S, Earnshaw WC. HP1 α targets the chromosomal passenger complex for activation at heterochromatin before mitotic entry. *EMBO J*. 37, pii: e97677 (2018).
 8. Shiraishi K, Shindo A, Harada A, Kurumizaka H, Kimura H, Ohkawa Y, Matsuyama H. Roles of histone H3.5 in human spermatogenesis and spermatogenic disorders. *Andrology*. 6, 158-165 (2018).
 9. Chen CCL, Goyal P, Karimi MM, Abildgaard MH, Kimura H, Lorincz MC. H3S10ph broadly marks early-replicating domains in interphase ESCs and shows reciprocal antagonism with H3K9me2. *Genome Res*. 28, 37-51, (2018).
 10. Jenness C, Giunta S, Muller MM, Kimura H, Muir TW, Funabiki H. HELLS and CDCA7 comprise a bipartite nucleosome remodeling complex defective in ICF syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 115, E876-E885 (2018).
 11. Yamazaki T, Hatano Y, Handa T, Kato S, Hoida K, Yamamura R, Fukuyama T, Uematsu T, Kobayashi N, Kimura H, Yamagata K. Targeted DNA methylation in pericentromeres with genome editing-based artificial DNA methyltransferase. *PLoS One*. 12, e0177764 (2017).
 12. 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. Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep*. 18, 593-600 (2017).
 13. Taguchi H, Xie Y, Horikoshi N, Maehara K, Harada A, Nogami J, Sato K, Arimura Y, Osakabe A, Kujirai T, Iwasaki T, Semba Y, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Crystal Structure and Characterization of Novel Human Histone H3 Variants, H3.6, H3.7, and H3.8. *Biochemistry*. 56, 2184-2196 (2017).
 14. Arai R, Sugawara T, Sato Y, Minakuchi Y, Toyoda A, Nabeshima K, Kimura H, Kimura A. Reduction in chromosome mobility accompanies nuclear organization during

- early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep.* 7, 3631 (2017).
15. Imre L, Simandi Z, Horvath A, Fenyofalvi G, Nanasi P, Niaki EF, Hegedus E, Bacso Z, Weyemi U, Mauser R, Ausio J, Jeltsch A, Bonner W, Nagy L, Kimura H, Szabó G. Nucleosome stability measured in situ by automated quantitative imaging. *Sci Rep.* 7, 12734 (2017).
 16. Isobe SY, Nagao K, Nozaki N, Kimura H, Obuse C. Inhibition of RIF1 by SCAI Allows BRCA1-Mediated Repair. *Cell Rep.* 20, 297-307 (2017).
 17. Shirai A, Kawaguchi T, Shimojo H, Muramatsu D, Ishida-Yonetani M, Nishimura Y, Kimura H, Nakayama JI, Shinkai Y. Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 on its heterochromatin assembly. *eLife.* 6, pii: e25317 (2017).
 18. Sato Y, Kimura H. Semi-quantitative Analysis of H4K20me1 Levels in Living Cells Using Mintbody. *Bio-protocol.* 7, e2276 (2017).
 19. Ohzeki J, Shono N, Otake K, Martins NM, Kugou K, Kimura H, Nagase T, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H. KAT7/HBO1/MYST2 Regulates CENP-A Chromatin Assembly by Antagonizing Suv39h1-Mediated Centromere Inactivation. *Dev Cell.* 37, 413-427 (2016).
 20. Oka M, Mura S, Yamada K, Sangel P, Hirata S, Maehara K, Kawakami K, Tachibana T, Ohkawa Y, Kimura H, Yoneda Y. Chromatin-prebound Crml recruits Nup98-HoxA9 fusion to induce aberrant expression of Hox cluster genes. *eLife.* 5, e09540 (2016).
 21. Sato Y, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Ohtsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura A, Kurumizaka H, Kimura H. A Genetically Encoded Probe for Live-Cell Imaging of H4K20 Monomethylation. *J Mol Biol.* 428, 3885-3902 (2016).
 22. Shang WH, Hori T, Westhorpe FG, Godek KM, Toyoda A, Misu S, Monma N, Ikeo K, Carroll CW, Takami Y, Fujiyama A, Kimura H, Straight AF and Fukagawa T. Acetylation of histone H4 lysine 5 and 12 is required for CENP-A deposition into centromeres. *Nat Commun.* 7, 13465 (2016).
 23. Kakumu E, Nakanishi S, Shiratori HM, Kato A, Kobayashi W, Machida S, Yasuda T, Adachi N, Saito N, Ikura T, Kurumizaka H, Kimura H, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: regulation by acetylated states of histone H3. *Genes Cells.* 22, 310-327 (2017).
 24. Kaimori JY, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep.* 6, 24318 (2016).
 25. Kujirai T, Horikoshi N, Sato K, Maehara K, Machida S, Osakabe A, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. *Nucleic*

- Acids Res.* 44, 6127-6141 (2016).
26. Martins NM, Bergmann JH, Shono N, Kimura H, Larionov V, Masumoto H, Earnshaw WC. Epigenetic engineering shows that a human centromere resists silencing mediated by H3K27me3/K9me3. *Mol Biol Cell.* 27, 177-196 (2016).
 27. 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).
 28. Nojima T, Gomes T, Grosso AR, Kimura H, Dye MJ, Dhir S, Carmo-Fonseca M, Proudfoot NJ. Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. *Cell.* 161, 526-540 (2015).
 29. Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Sato Y. Visualizing posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. *Histochem Cell Biol.* 144, 101-109 (2015).
 30. Iwamoto D, Yamagata K, Kishi M, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Wakayama T, Saeki K. Early development of cloned bovine embryos produced from oocytes enucleated by fluorescence metaphase II imaging using a conventional halogen-lamp microscope. *Cell Reprogram.* 17, 106-114 (2015).
 31. Kimura H, Yamagata K. Visualization of epigenetic modifications in preimplantation embryos. *Methods Mol Biol.* 1222, 127-147 (2015).
 32. Harada A, Maehara K, Sato Y, Konno D, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y. Incorporation of histone H3.1 suppresses the lineage potential of skeletal muscle. *Nucleic Acids Res.* 43, 775-786 (2015).
 33. Dias JD, Rito T, Torlai Triglia E, Kukalev A, Ferrai C, Chotalia M, Brookes E, Kimura H, Pombo A: Methylation of RNA polymerase II non-cosensus Lysine residues marks early mammalian cells. *eLife.* 4, e11215 (2015).
 34. Hayashi-Takanaka Y, Maehara K, Harada A, Umehara T, Yokoyama S, Obuse C, Ohkawa Y, Nozaki N, Kimura H: Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Chromosome Res.* 2, 753-766 (2015).
 35. Song C, Feodorova Y, Guy J, Peichl L, Jost KL, Kimura H, Cardoso MC, Bird A, Leonhardt H, Joffe B, Solovei I. DNA methylation reader MECP2: cell type- and differentiation stage-specific protein distribution. *Epigenetics Chromatin.* 7, 17 (2014).
 36. Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H. Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Nature.* 516, 272-275 (2014).
 37. Stasevich TJ, Sato Y, Nozaki N, Kimura H. Quantifying histone and RNA polymerase II post-translational modification dynamics in mother and daughter cells. *Methods.* 70,

- 77-78 (2014).
38. Nakayama T, Mihara K, Kawata J, Kimura H, Saitoh H. Adhesion of suspension cells on a coverslip in serum-free conditions. *Anal Biochem.* 466C, 1-3 (2014).
39. Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Kurumizaka H, Nozaki N, Kimura H. Evaluation of chemical fluorescent dyes as a protein conjugation partner for live cell imaging. *PLoS One.* 9, e106271 (2014).
40. Jullien J, Miyamoto K, Pasque V, Allen GE, Bradshaw CR, Garrett NJ, Halley-Stott RP, Kimura H, Ohsumi K, Gurdon JB. Hierarchical molecular events driven by oocyte-specific factors lead to rapid and extensive reprogramming. *Mol Cell.* 55, 524-536 (2014).
41. Zierhut C, Jenness C, Kimura H, Funabiki H. Nucleosomal regulation of chromatin composition and nuclear assembly revealed by histone depletion. *Nature Struct Mol Biol.* 21, 617-625 (2014).
42. Hori T, Shang WH, Toyoda A, Misu S, Monma N, Ieko K, Molina O, Vargiu G, Fujiyama A, Kimura H, Earnshaw WC, Fukagawa T. Histone H4 Lys 20 mono-methylation of the CENP-A nucleosome is essential for kinetochore assembly. *Dev Cell.* 29, 740-749 (2014).
43. Ueda J, Maehara K, Mashiko D, Ichinose T, Yao T, Hori M, Sato Y, Kimura H, Ohkawa Y, Yamagata K. Heterochromatin Dynamics during the Differentiation Process Revealed by the DNA Methylation Reporter Mouse, MethylRO. *Stem Cell Reports.* 2, 910-924 (2014).
44. Baba T, Otake H, Sato T, Miyabayashi K, Shishido Y, Wang CY, Shima Y, Kimura H, Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, Ohkawa Y, Suyama M, Chung BC, Morohashi K. Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Nat Commun.* 5, 3634 (2014).
45. Arimura Y, Kimura H, Oda T, Sato K, Osakabe A, Tachiwana H, Sato Y, Kinugasa Y, Ikura T, Sugiyama M, Sato M, Kurumizaka H. Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. *Sci Rep.* 3, 3510 (2013).
46. 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. Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* D69, 2431-2439 (2013).
47. Sato Y, Mukai M, Ueda J, Muraki M, Stasevich TJ, Horikoshi N, Kujirai T, Kita H, Kimura T, Hira S, Okada Y, Hayashi-Takanaka Y, Obuse C, Kurumizaka H, Kawahara A, Yamagata K, Nozaki N, Kimura H. Genetically encoded system to track histone modification in vivo. *Sci Rep.* 3, 2436 (2013).

他、計 99 件

[学会発表]

1. Kimura H., Chromatin modification dynamics during cell differentiation, Gordon Research Conference, 香港, 2017 年 6 月
他、計 30 件



計測と再構築による生細胞内クロマチンダイナミクスの高次元的理解

平成 25 年度～平成 29 年度

山縣 一夫 (近畿大学・生物理工学部・准教授)

【研究目的】

クロマチンは細胞核内で動的な構造であり、ミリ秒単位の局所的ゆらぎから、遺伝子の転写に応じた秒・分単位の構造変化、さらに細胞の分化や老化に伴う時間・日、あるいは年単位でのマイクロメートルに及ぶ核内配置の変化まで、様々な時空間スケールで変化する。特に、哺乳動物の生殖系列では、高度に分化した配偶子が受精とともに急激に分化全能性を獲得し、その後、着床前初期胚発生の間に細胞系譜ごとに分化してゆく。このような大規模な細胞の分化状態の変換を保障するため、核内においてはグローバルに DNA メチル化やヒストン修飾が大きく変動することが以前より知られてきた。それに加え近年では、クロマチンレベルで大きな構造変化が起こることが明らかとなりつつある。そこで本研究では、独自の技術を用いて、クロマチン動態の正確な「計測」とエピゲノム編集によりクロマチンを人為的に「再構築」を行い、生殖系列におけるクロマチンの動的変化とその機能発現における意義を明らかにすることを目的とした。

【研究成果】

(1) マウス個体での DNA メチル化動態の可視化
発生や生殖系列における DNA メチル化の変動を生きたまま観察することを目的に、メチル化 DNA を認識する MBD1 (Methyl-CpG Binding Domain protein 1) 蛋白質の MBD ドメインに mCherry を融合したプローブを全身で発現するマウス(メチローと命名)を作製した。このマウスの着

床前初期胚発生過程及び ES 細胞の樹立過程の長期間にわたって生細胞イメージングを行った結果、細胞分化が進行するに伴って特にセントロメア領域の DNA メチル化が上昇し、かつヘテロクロマチン構造の流動性が下がることを見出した。また、イメージングのみならず mCherry 抗体を用いた ChIP-seq によりマウス個体での任意の組織における DNA メチル化領域も明らかにできることを示した (Ueda et al, *Stem Cell Reports*, 2014; 山縣、木村、大川の共同研究)。

(2) マウス精巣特異的ヒストン H3 バリエント(H3T)の機能解析

大川計画研究により精巣特異的ヒストン H3 バリエント、H3T 遺伝子が見出された。精巣において、

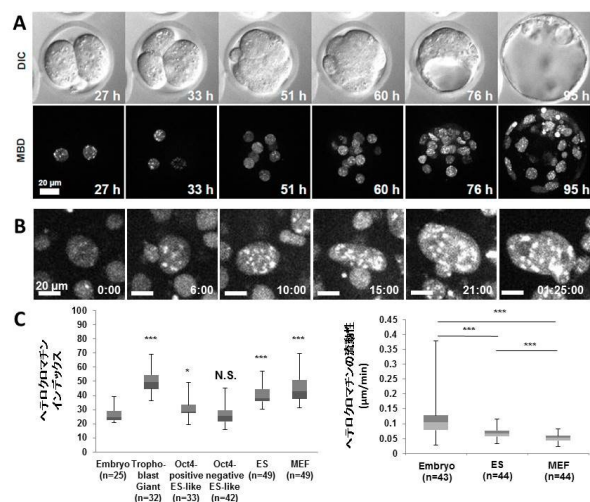


図1 メチロー由来の初期胚のイメージング
(A) 受精卵から胚盤胞期までの約4日間の連続観察。(B) 胚盤胞期胚から栄養膜細胞(将来胎盤になる)が分化誘導される過程の核内構造の変化。細胞核内でメチル化強度が上昇し、顕著にヘテロクロマチン構造が構築されてくる。(C) 初期胚から分化した各種細胞のヘテロクロマチンの大きさ(左)と流動性(右)。

カノニカルなヒストン H3.1 が精原細胞に発現しているのに対して、H3T は精原細胞以降から強く発現していた。H3T-KO マウスの雄は完全に不妊であり、精巣では精原細胞からの精子細胞の分化に異常があり、精子がまったく形成されないことが明らかとなった。また、タンパク質構造解析の結果、42 番目のアミノ酸が H3.1 と異なることによる構造の不安定性が認められた。この成果は、組織特異的なヒストン H3 バリエントが個体レベルで重要な機能を担っていることを示した最初の例であるとともに、1 本の論文の中で原子レベルから個体レベルまで融合させることに成功させた例となった (Ueda et al, *Cell Rep*, 2017; 山縣、木村、大川、胡桃坂の共同研究)。

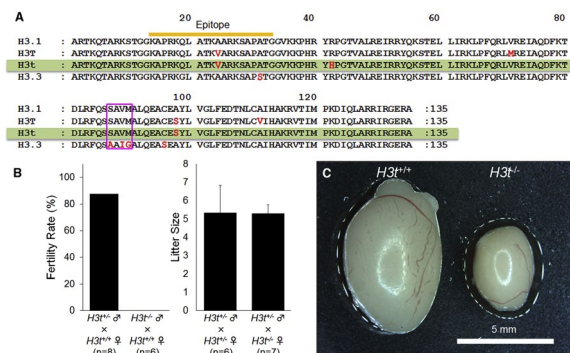


図2, H3T の機能解析 (A) H3T は H3.1 タイプであり、わずかなアミノ酸が異なる。(B) H3T-KO マウスは不妊である。(C) KO の精巣は極端に小さい(右)。

(3) エピゲノム編集によるペリセントロメア領域への人為的 DNA メチル化導入

我々は以前にマウス生殖系列の細胞において特異的にはセントロメア・ペリセントロメア領域が DNA 低メチル化状態であることを見出した (Yamagata, *Dev Biol*, 2007)。そこで、その生物学的な意義を明らかにすることを目的に、細胞内で生きたままこの領域に人為的にメチル化を導入する技術を開発することに着手した。TALE または CRISPR/dCas9 の DNA 結合モジュールとバクテリア由来 CpG メチル基転移酵素

(SssI) との融合タンパク質をコードする RNA をマウス受精卵に導入することで、2 細胞期に染色体セントロメア領域に存在するリピート配列 Major satellite 特異的に DNA メチル化を誘導することに成功した (Yamazaki et al, *PLoS One*, 2017; 山縣、木村の共同研究)。

【本研究課題に関する主要成果】

【雑誌論文】査読あり 24 件、査読なし 1 件

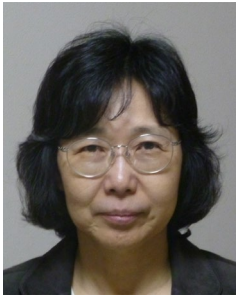
1. Takahashi T, Okeyo KO, Ueda J, Yamagata K, Washizu M, Oana H. A microfluidic device for isolating intact chromosomes from single mammalian cells and probing their folding stability by controlling solution conditions. *Sci Rep.* 8, 13684 (2018).
2. Yao T, Suzuki R, Furuta N, Suzuki Y, Kabe K, Tokoro M, Sugawara A, Yajima A, Nagasawa T, Matoba S, Yamagata K, Sugimura S. Live-cell imaging of nuclear-chromosomal dynamics in bovine in vitro fertilised embryos. *Sci Rep.* 8, 7460 (2018).
3. Morita K, Tokoro M, Hatanaka Y, Higuchi C, Ikegami H, Nagai K, Anzai M, Kato H, Mitani T, Taguchi Y, Yamagata K, Hosoi Y, Miyamoto K, Matsumoto K. Peroxiredoxin as a functional endogenous antioxidant enzyme in pronuclei of mouse zygotes. *J Reprod Dev.* 64, 161-171 (2018).
4. Higuchi C, Shimizu N, Shin SW, Morita K, Nagai K, Anzai M, Kato H, Mitani T, Yamagata K, Hosoi Y, Miyamoto K, Matsumoto K. Ubiquitin-proteasome system modulates zygotic genome activation in early mouse embryos and influences full-term development. *J Reprod Dev.* 64, 65-74

- (2018).
5. Semba Y, Harada A, Maehara K, Oki S, Meno C, Ueda J, Yamagata K, Suzuki A, Onimaru M, Nogami J, Okada S, Akashi K, Ohkawa Y. Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 45, 8758-8772 (2017).
 6. Isotani A, Matsumura T, Ogawa M, Tanaka T, Yamagata K, Ikawa M, Okabe M. A delayed sperm penetration of cumulus layers by disruption of acrosin gene in rats. *Biol Reprod.* 97, 61-68 (2017).
 7. Ogushi S, Yamagata K, Obuse C, Furuta K, Wakayama T, Matzuk MM, Saitou M. Reconstitution of the oocyte nucleolus in mice through a single nucleolar protein, NPM2. *J Cell Sci.* 130, 2416-2429 (2017).
 8. Yamazaki T, Hatano Y, Handa T, Kato S, Hoida K, Yamamura R, Fukuyama T, Uematsu T, Kobayashi N, Kimura H, Yamagata K. Targeted DNA methylation in pericentromeres with genome editing-based artificial DNA methyltransferase. *PLoS One.* 12, e0177764 (2017).
 9. Miyamoto K, Tajima Y, Yoshida K, Oikawa M, Azuma R, Allen GE, Tsujikawa T, Tsukaguchi T, Bradshaw CR, Jullien J, Yamagata K, Matsumoto K, Anzai M, Imai H, Gurdon JB, Yamada M. Reprogramming towards totipotency is greatly facilitated by synergistic effects of small molecules. *Biol Open.* 6, 415-424 (2017).
 10. Satouh Y, Nozawa K, Yamagata K, Fujimoto T, Ikawa M. Viable offspring after imaging of Ca²⁺ oscillations and visualization of the cortical reaction in mouse eggs. *Biol Reprod.* 96, 563-575 (2017).
 11. 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. Testis-Specific histone variant H3t gene is essential for entry into spermatogenesis. *Cell Rep.* 18, 593-600 (2017).
 12. Sato Y, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Ohtsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T. A genetically encoded probe for live-cell imaging of H4K20 monomethylation. *J Mol Biol.* 428, 3885-3902 (2016).
 13. Hara Y, Adachi K, Kagohashi S, Yamagata K, Tanabe H, Kikuchi S, Okumura S and Kimura A. Scaling relationship between intra-nuclear DNA density and chromosomal condensation in metazoan and plant. *Chromosome Science.* 19, 43-49 (2016).
 14. Kobayashi S, Hosoi Y, Shiura H, Yamagata K, Takahashi S, Fujihara Y, Kohda T, Okabe M, Ishino F. Live imaging of X chromosome reactivation dynamics in early mouse development can discriminate naive from primed pluripotent stem cells. *Development.* 143, 2958-2964 (2016).
 15. Yao T, Ueda J, Kobayashi T, Hori M, Yamagata K. Quantitative assessment of embryo quality based on a live-cell imaging technique. *J Mamm Ove Res.* 32, 149-157 (2016).

16. Isotani A, Yamagata K, Okabe M, Ikawa M. Generation of Hprt-disrupted rat through mouse <- rat ES chimeras. *Sci Rep*. 6, 24215 (2016).
17. Muro Y, Hasuwa H, Isotani A, Miyata H, Yamagata K, Ikawa M, Yanagimachi R, Okabe M. Behavior of mouse spermatozoa in the female reproductive tract from soon after mating to the beginning of fertilization. *Biol Reprod*. 94, 1-7 (2016).
18. Vazquez-Diez C, Yamagata K, Trivedi S, Haverfield J, FitzHarris G. Micronucleus formation causes perpetual unilateral chromosome inheritance in mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113, 626-631 (2016).
19. Nakatani T, Yamagata K, Kimura T, Oda M, Nakashima H, Hori M, Sekita Y, Arakawa T, Nakamura T, Nakano T. Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced γ H2AX accumulation. *EMBO Rep*. 16, 582-589 (2015).
20. Iwamoto D, Yamagata K, Kishi M, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Wakayama T, Saeki K. Early development of cloned bovine embryos produced from oocytes enucleated by fluorescence metaphase II imaging using a conventional halogen-lamp microscope. *Cell Rerogram*. 17, 106-114 (2015).
21. Kimura H, Yamagata K. Visualization of epigenetic modifications in preimplantation embryos. *Methods Mol Biol*. 1222, 127-147 (2014).
22. Bashar K, Yamagata K, Kobayashi TJ. Improved and robust detection of cell nuclei form four dimensional fluorescence images. *PLoS One*. 9, e101891 (2014).
23. Ueda J, Maehara K, Mashiko D, Ichinose T, Yao T, Hori M, Sato Y, Kimura H, Ohkawa Y, Yamagata K. Heterochromatin dynamics during the differentiation process revealed by the DNA methylation reporter mouse, MethylRO. *Stem Cell Reports*. 2, 910-924 (2014).
24. Terashita Y, Yamagata K, Tokoro M, Itoi F, Wakayama S, Li C, Sato E, Tanemura K, Wakayama T. Latrunculin A treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful development of cloned embryos. *PLoS One*. 8, e78380 (2013).
25. Sato Y, Mukai M, Ueda J, Muraki M, Stasevich TJ, Horikoshi N, Kujirai T, Kita H, Kimura T, Hira S, Okada Y, Hayashi-Takanaka Y, Obuse C, Kurumizaka H, Kawahara A, Yamagata K, Nozaki N, Kimura H. Genetically encoded system to track histone modification in vivo. *Sci Rep*. 3, 2436 (2013).

〔学会発表〕

1. 山縣一夫、初期胚ライブセルイメージングを始めるには～タイムラプスを用いた知見を含めて～、第11回日本生殖再生医学会学術集会、東京、2016年3月
2. Yamagata K., Live-cell imaging of chromatin and DNA-methylation dynamics using MethylRO mouse, 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 広島, 2015年10月
他、計17件



クロマチン機能を保証する核膜の構造と分子基盤

平成 25 年度～平成 29 年度

原口 徳子 (国立研究開発法人 情報通信研究機構・主任研究員)

【研究目的】

核膜は、遺伝情報であるクロマチン DNA を細胞質から構造的に仕切るだけでなく、転写や複製などのクロマチン機能を制御する足場としての役割がある。クロマチンが正常に機能するためには、核膜タンパク質とクロマチンの相互作用が重要である。本研究は、細胞増殖や発生過程におけるクロマチン機能を保証する核膜の構造を、独自に開発した人工誘導微小核実験系や、生細胞蛍光ナノイメージング法、分子遺伝学などの手法を用いて分子レベルで解明するのを目的とした。

【研究成果】

(1) 人工ビーズを用いたクロマチン機能に必要な核膜因子の同定

DNA を結合したビーズ (DNA ビーズ) を生きた細胞に導入するという新規の方法と独自のライブセルイメージング法を用いて、ビーズ周辺で誘導される核膜構造を解析し、DNA ビーズがエンドソーム膜を破って、細胞質に入った瞬間を捉えることに成功した。DNA ビーズは、細胞質に入った直後 (秒のオーダーで) クロマチンタンパク質 BAF と結合し、BAF の働きにより、ビーズ周辺に“核膜様の膜構造”が形成され、その核膜形成によってオ

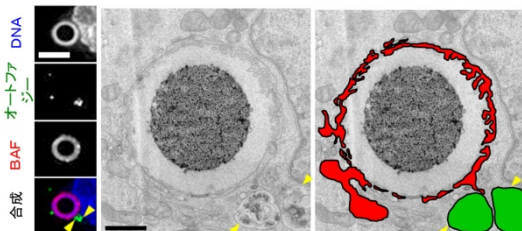


図1. DNAビーズ周辺に形成された核膜(赤) オートファジー膜(緑)は抑制されている。

ートファジーが抑制されることが分かった(図1) (Kobayashi et al, *PNAS*, 2015; 報道発表)。

オートファジーに必要なタンパク質として、オートファジーレセプター p62 タンパク質を細胞から除去すると、外来 DNA のトランスフェクション効率が有意に上昇することを発見した (Tsuchiya et al, *FEBS Lett*, 2016; 報道発表)。さらに、マウス p62 タンパク質の 405 番目 (ヒトでは 403 番目) のセリンのリン酸化型が、外来 DNA の細胞内侵入を阻害する働きをすることを発見した (Tsuchiya et al, *FEBS Open Bio*, 2018)。DNA ビーズ周辺での核膜形成のメカニズムとして、細胞内に導入したタンパク質結合ビーズを用いて、BAF や Ran、RCC1 などのクロマチンタンパク質の核膜形成能を調べ、BAF は LEM ドメインタンパク質の集合に、Ran や RCC1 は核膜孔複合体の集合に役割があることを明らかにした。

(2) 天然微小核を用いたクロマチン機能を保証する核膜因子の解明

蛍光イメージング法を用いて、微小核が形成される過程を観察し、細胞分裂期の染色体分配の異常で形成されることが分かった。その時の核膜は不完全で、特に核膜孔複合体やラミナが正常に形成されていないことが分かった。そのため、微小核では正常な DNA 複製が起こらず、時には、分解系に捨てられてしまうことが明らかになった。

(3) 進化的に保存された核膜タンパク質のクロマチン機能に果たす役割の解明

分裂酵母の核膜孔複合体を構築する全タンパク質を解明した (Asakawa et al, *Nucleus*, 2014; 表紙

に採択)。核膜孔複合体を構成するタンパク質(ヌクレオポリン)のひとつである Nup132 が減数分裂期セントロメア機能に重要な役割があることを明らかにした(Yang et al, *J Cell Biol*, 2015; Yang et al, *Cell Cycle*, 2016; Asakawa et al, *Front Cell Dev Biol*, 2016)。テトラヒメナの核膜孔複合体を構築するタンパク質(約30種類)の局在と相互作用を解析し、大小核での違いを発見した(Iwamoto et al, *J Cell Sci*, 2017; Iwamoto et al, *Commun Integrat Biol*, 2017)。また、分裂酵母の核膜孔複合体構造を解析し、他のモデル生物とは異なる構造をとることを発見した。核膜タンパク質 Lem2 がセントロメアのヘテロクロマチン化を増強する働きをすることを明らかにした(Tange et al, *Genes Cells*, 2016; Hirano et al, *Genes Cells*, 2018)。核膜構造維持に対する核膜タンパク質の役割を提唱した(Iwamoto et al, *Curr Opin Cell Biol*, 2016; Yang et al, *J Biochem*, 2017)。

国際活動支援班活動に協力し、光顕電顕相関顕微鏡法である Live CLEM イメージング法を国内外の研究者に講習し、その成果として、共同研究成果を国際誌に発表した(Kaur et al, *Mol Biol Cell*, 2017; Sparvoli et al, *Curr Biol*, 2018; Ito et al, *Sci Rep*, 2018)。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文] 査読あり 55 件、査読なし 1 件

1. Iwamoto M, Mori C, Osakada H, Koujin T, Hiraoka Y, Haraguchi T. Nuclear localization signal targeting to macronucleus and micronucleus in binucleated ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Genes Cells*. 23, 568-579 (2018).
2. Bao XX, Spanos C, Kojidani T, Lynch EM, Rappsilber J, Hiraoka Y, Haraguchi T, Sawin KE. Exportin Crm1 is repurposed as a docking protein to generate microtubule

organizing centers at the nuclear pore. *eLife*. 7, e33465 (2018).

3. Matsuda A, Schermelleh L, Hirano Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Accurate and fiducial-marker-free correction for three-dimensional chromatic shift in biological fluorescence microscopy. *Sci Rep*. 8, 7583 (2018).
4. Itoh G, Ikeda M, Iemura K, Amin MA, Kuriyama S, Tanaka M, Mizuno N, Osakada H, Haraguchi T, Tanaka K. Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment. *Sci Rep*. 8, 3888 (2018).
5. Sparvoli D, Richardson E, Osakada H, Lan X, Iwamoto M, Bowman GR, Kontur C, Bourland WA, Lynn DH, Pritchard JK, Haraguchi T, Dacks JB, Turkewitz AP: Remodeling the specificity of an endosomal CORVET tether underlies formation of regulated secretory vesicles in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Curr Biol*. 28, 697-710 (2018).
6. Tsuchiya M, Ogawa H, Koujin T, Mori C, Osakada H, Kobayashi S, Hiraoka Y, Haraguchi T. p62/SQSTM1 promotes rapid ubiquitin conjugation to target proteins after endosome rupture during xenophagy, *FEBS Open Bio*. 8, 470-480 (2018).
7. Hirano Y, Kinugasa Y, Asakawa H, Chikashige Y, Obuse C, Haraguchi T, Hiraoka Y. Lem2 is retained at the nuclear envelope through its interaction with Bqt4 in

- fission yeast. *Genes Cells*. 23, 122-135 (2018).
8. Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. Estimation of GFP-nucleoporin amount based on fluorescence Microscopy. *Methods Mol Biol*. 1721, 105-115 (2018).
 9. Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Newly found Tetrahymena nucleoporins, Nup214, Nup153 and Pom121/Pom82, differentiate nuclear pore complexes of functionally distinct nuclei. *Commun Integr Biol*. <http://dx.doi.org/10.1080/19420889.2017.1384890> (2017).
 10. Yang H-J, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Function of nuclear membrane proteins in shaping the nuclear envelope integrity during closed mitosis. *J Biochem*. 161, 471-477 (2017).
 11. Iwamoto M, Osakada H, Mori C, Fukuda Y, Nagao K, Obuse C, Hiraoka Y, Haraguchi T. Compositionally distinct nuclear pore complexes of functionally distinct dimorphic nuclei in ciliate *Tetrahymena*, *J Cell Sci*. 130, 1822-1834, (2017).
 12. Kaur H, Sparvoli D, Osakada H, Iwamoto M, Haraguchi T, Turkewitz A.P. A late endosomal syntaxin and the AP-3 complex are required for formation and maturation of lysosome-related secretory organelles (mucocysts) in *Tetrahymena thermophile*, *Mol Biol Cell*. 28, 1551-1564 (2017).
 13. Chikashige Y, Yamane M, Okamasa K, Osakada H, Tsutsumi C, Nagahama Y, Fukuta N, Haraguchi T, Hiraoka Y. Fission yeast APC/C activators Slp1 and Fzr1 sequentially trigger two consecutive nuclear divisions during meiosis. *FEBS Lett*. 591, 1029-1040 (2017).
 14. Koyama M, Nagakura W, Tanaka H, Kujirai T, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kurumizaka H. In vitro reconstitution and biochemical analyses of the *Schizosaccharomyces pombe* nucleosome. *Biochem Biophys Res Commun*. 482, 896-901 (2017).
 15. Yang H-J, Osakada H, Kojidani T, Haraguchi T, Hiraoka Y. Lipid droplet dynamics during *Schizosaccharomyces pombe* sporulation and their role in spore survival. *Biol Open*, 6, 217-222 (2017).
 16. Nakano T, Okaie Y, Kobayashi S, Koujin T, Chan C-H, Hsu Y-H, Okaie Y, Obuchi T, Hara T, Hiraoka Y, Haraguchi T. Performance Evaluation of Leader-follower-based Mobile Molecular Communication Networks for Target Detection Applications. *IEEE Transactions on Communications*, Nov.11 (2016).
 17. Matsuda A, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Spatial organization of the *Schizosaccharo-myces pombe* genome within the nucleus. *Yeast*. 34(2):55-66 (2016).
 18. Asakawa H, Ding DQ, Haraguchi T, Hiraoka Y. Microscopic observation of living cells stained with fluorescent probes. In *Fission Yeast: A Laboratory Manual*, 230-235 (Cold Spring Harbor Lab Press), (2016)
 19. Sato Y, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Ohtsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura A, Kurumizaka H, Kimura H. A genetically encoded probe for live-cell imaging of

- H4K20 monomethylation. *J Mol Biol.* 428(20), 3885-3902 (2016).
20. Kobayashi S, Iwamoto M, Haraguchi T. Live correlative light-electron microscopy to observe molecular dynamics in high resolution. *Microscopy (Oxf)*. 65, 296- 308 (2016).
 21. Gómez-Saldivar G, Fernandez A, Hirano Y, Mauro M, Lai A, Ayuso C, Haraguchi T, Hiraoka Y, Piano F, Askjaer P. Identification of conserved MEL-28/ELYS domains with essential roles in nuclear assembly and chromosome segregation. *PLoS Genet.* 12, e1006131 (2016).
 22. Tange Y, Chikashige Y, Takahara S, Kawakami K, Higashi M, Mori C, Kojidani T, Hirano Y, Asakawa H, Murakami Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions. *Genes Cells.* 21, 812-832 (2016).
 23. Tsuchiya M, Ogawa H, Koujin T, Kobayashi S, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T. Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells. *FEBS Lett.* 590, 2671-80 (2016).
 24. Matsumura S, Kojidani T, Kamioka Y, Uchida S, Haraguchi T, Kimura A, Toyoshima F. Interphase adhesion geometry is transmitted to an internal regulator for spindle orientation via caveolin-1. *Nat Commun.* 7, 11858 (2016).
 25. Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Uniquely designed nuclear structures of lower eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol.* 40, 66-73 (2016).
 26. Ding D-Q, Haraguchi T, Hiraoka Y. A cohesion-based platform for homologous chromosome pairing in meiosis. *Curr Genet.* 62, 499-502 (2016).
 27. Asakawa H, Yang H-J, Hiraoka Y, Haraguchi T. Virtual nuclear envelope breakdown and its regulators in fission yeast meiosis. *Front Cell Dev Biol.* 4, 5 (2016).
 28. Yang H-J, Haraguchi T, Hiraoka Y. A nucleoporin that facilitates meiotic kinetochore reorganization. *Cell Cycle.* 15, 307-308 (2016).
 29. Ding D-Q, Matsuda A, Okamasa K, Nagahama Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Meiotic cohesin-based chromosome structure is essential for homologous chromosome pairing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma.* 125, 205-214 (2016).
 30. Ohtsuki T, Miki S, Kobayashi S, Haraguchi T, Nakata E, Hirakawa K, Sumita K, Watanabe K, Okazaki S. The molecular mechanism of photochemical internalization of cell penetrating peptide-cargo-photosensitizer conjugates. *Sci Rep.* 5, 18577 (2015).
 31. Yamamoto J, Oura M, Yamashita T, Miki S, Jin T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Terai H, Masataka K: Rotational diffusion measurements using polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy based on superconducting nanowire single-photon detector. *Opt Express.* 23 (25), 32633-32642 (2015).
 32. Chikashige Y, Arakawa S, Leibnitz K, Tsutsumi C, Mori C, Osakada H, Murata M,

- Haraguchi T, Hiraoka Y. Cellular economy in fission yeast cells continuously cultured with limited nitrogen resources. *Sci Rep.* 5, 15617 (2015)
33. Yang H-J, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Nup132 modulates meiotic spindle attachment in fission yeast by regulating kinetochore assembly. *J Cell Biol.* 211, 295-308 (2015).
34. Tsuchiya M, Isogai S, Taniguchi H, Tochio H, Shirakawa M, Morohashi K, Hiraoka Y, Haraguchi T, Ogawa H. Selective autophagic receptor p62 regulates the abundance of transcriptional coregulator ARIP4 during nutrient starvation. *Sci Rep.* 5, 14498 (2015).
35. Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. The nuclear pore complex acts as a master switch for nuclear differentiation. *Commun Integr Biol.* 8, e1056950 (2015)
36. Kobayashi S, Haraguchi T. A novel pathway to detect and cope with exogenous dsDNA. *Commun Integr Biol.* 8(5), e1065361, (2015).
37. Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H, Chikashige Y, Kimura H, Masukata H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Histone H4 acetylation required for chromatin decompaction during DNA replication. *Sci Rep.* 5, 12720 (2015).
38. Matsuda A, Chikashige Y, Ding DQ, Ohtsuki C, Mori C, Asakawa H, Kimura H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Highly condensed chromatins are formed adjacent to sub-telomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast. *Nat Commun.* 6, 7753(2015)
39. Asakawa H, Mori C, Ohtsuki C, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Uncleavable Nup98-Nup96 is functional in fission yeast. *FEBS Open Bio.* 5, 508–514 (2015).
40. Kobayashi S, Koujin T, Kojidani T, Osakada H, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T. BAF is a cytosolic DNA sensor that leads to exogenous DNA avoiding autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112, 7027-7032 (2015)
41. Iwamoto M, Koujin T, Osakada H, Mori C, Kojidani T, Matsuda A, Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. Biased assembly of the nuclear pore complex is required for somatic and germline nuclear differentiation in *Tetrahymena*. *J Cell Sci.* 128, 1812-1823 (2015).
42. Liu N-A, Sun J, Kono K, Horikoshi Y, Ikura T, Tong X, Haraguchi T, Tashiro S. Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage. *FASEB J.* 29, 2514-2525 (2015).
43. Haraguchi T, Osakada H, Koujin T. Live CLEM Imaging to Analyze Nuclear Structures at High Resolution. *Methods Mol Biol.* 1262, 89-103 (2015).
44. Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H, Chikashige Y, Masukata H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Meiotic nuclear movements in fission yeast are regulated by the transcription factor Mei4 downstream of a Cds1-dependent replication checkpoint pathway. *Genes Cells.* 20, 160-172 (2015).
45. Yamashita T, Liu D, Miki S, Yamamoto J, Haraguchi T, Kinjo M, Hiraoka Y, Wang Z, Terai H. Fluorescence correlation spectroscopy with visible-wavelength

- superconducting nanowire single-photon detector. *Opt Express*. 22, 28783–28789 (2014).
46. Chikashige Y, Yamane M, Okamasa K, Mori C, Fukuta N, Matsuda A, Haraguchi T, Hiraoka Y. Chromosomes rein back the spindle pole body during horsetail movement in fission yeast meiosis. *Cell Struct Funct*. 39, 93–100 (2014).
47. Kuramoto K, Sakai F, Yoshinori N, Nakamura TY, Wakabayashi S, Kojidani T, Haraguchi T, Hirose F, Osumi T. Deficiency of a lipid droplet protein, Perilipin 5, suppresses myocardial lipid accumulation, thereby preventing diabetes-induced heart malfunction. *Mol Cell Biol*. 34, 2721-2731 doi (2014).
48. Asakawa H, Yang H-J, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *S. pombe*. *Nucleus*. 5, 149-162 (2014).
49. Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. A method of correlative light and electron microscopy for yeast cells. *Micron*. 61, 53-61 (2014).
50. Oana H, Nishikawa K, Matsuhara H, Yamamoto A, Yamamoto TG, Haraguchi T, Hiraoka Y, Washizu M: Non-destructive handling of individual chromatin fibers isolated from single cells in a microfluidic device utilizing an optically driven microtool. *Lab Chip*. 14, 696-704 (2014).
51. Iwamoto M, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T. Puromycin resistance gene as an effective selection marker for ciliate Tetrahymena. *Gene*. 534, 249-255 (2014).
52. Ding DQ, Haraguchi T, Hiraoka Y. The role of chromosomal retention of noncoding RNA in meiosis. *Chromosome Res*. 21, 665-672 (2013).
53. Fujita N, Morita E, Itoh T, Tanaka A, Nakaoka M, Osada Y, Umemoto T, Saitoh T, Nakatogawa H, Kobayashi S, Haraguchi T, Guan J-L, Iwai K, Tokunaga F, Saito K, Ishibashi K, Akira S, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J Cell Biol*. 203, 115–128 (2013).
54. Iwamoto M, Asakawa H, Ohtsuki C, Osakada H, Koujin T, Hiraoka Y, Haraguchi T. Monoclonal Antibodies Recognize Gly-Leu-Phe-Gly Repeat of Nucleoporin Nup98 of *Tetrahymena*, Yeasts and Humans. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 32, 81-90 (2013).
55. Haraguchi T. Monoclonal antibody 13C2 against Nup98. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 32, 141 (2013).
56. Haraguchi T. Monoclonal antibody 21A10 against Nup98. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 32, 142 (2013).
- [学会発表]
1. Haraguchi T., For Successful Fluorescence Live Cell Imaging., The Cell Biological Science Workshop, 札幌, 2017年7月
 2. 原口徳子、人工ビーズを使ったヒト細胞内での人工核の構築、2017年度 生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
他、計149件



クロマチン機能を保証する核膜の構造と分子基盤

平成 25 年度～平成 29 年度

浅川 東彦 (大阪大学大学院生命機能研究科・准教授)

【研究目的】

核膜は、遺伝情報であるクロマチン DNA を細胞質から構造的に仕切るだけでなく、転写や複製などのクロマチン機能を制御する足場としての役割がある。クロマチンが正常に機能するためには、核膜タンパク質とクロマチンの相互作用が重要である。本研究は、細胞増殖や発生過程におけるクロマチン機能を保証する核膜の構造を、独自に開発した人工誘導微小核実験系や、生細胞蛍光ナノイメージング法、分子遺伝学などの手法を用いて分子レベルで解明するのを目的とした。3項目のうち、特に、項目(3)「進化的に保存された核膜タンパク質のクロマチン機能に果たす役割の解明」を担当した。

【研究成果】

(3) 進化的に保存された核膜タンパク質のクロマチン機能に果たす役割の解明

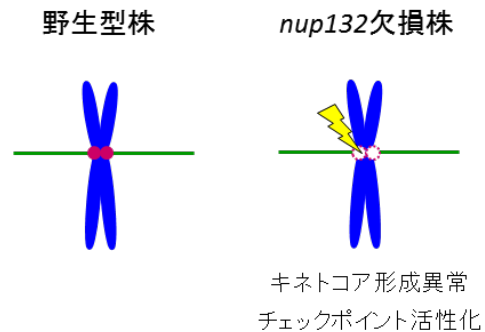
分裂酵母の核膜孔複合体を構築する全タンパク質(ヌクレオポリン、33種類)を解明した

(Asakawa et al, *Nucleus*, 2014; 表紙に採択、右図)。そのうち



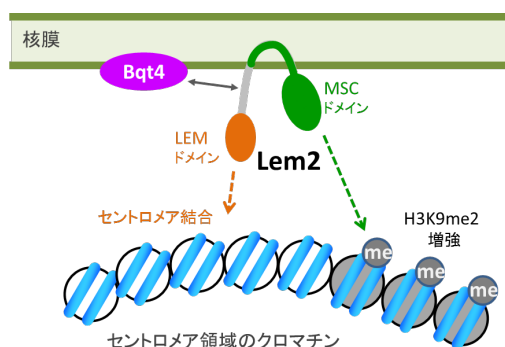
のひとつである Nup132 については、減数分裂期セントロメアの構造の形成と減数第一分裂期でのセントロメア機能維持に重要な役割を果たすことを明らかにした (Yang et al, *J Cell Biol*, 2015;

Yang et al, *Cell Cycle*, 2016; Asakawa et al, *Front Cell Dev Biol*, 2016) (下図)。



また、Nup98 と Nup96 は、ひとつのタンパク質として発現させても細胞の生育に問題がないことを明らかにした (Asakawa et al, *FEBS Open Bio*, 2015)。さらに、蛍光顕微鏡や免疫電子顕微鏡法などを用いて核膜孔複合体の構造を解析したところ、分裂酵母の核膜孔は、これまでに知られている構造とは、大きく異なる構造をしていることを発見した (Asakawa et al, 投稿中)。

核膜タンパク質のクロマチン機能に果たす役割を検討し、高度に保存された核膜タンパク質 Lem2 は、セントロメアのヘテロクロマチン化を増強する働きをすることを明らかにした (Tange et al, *Genes Cells*, 2016) (下図)。また、その核膜局在には、Bqt4 との相互作用が必要であることを明らかにした (Hirano et al, *Genes to Cells*, 2018)。



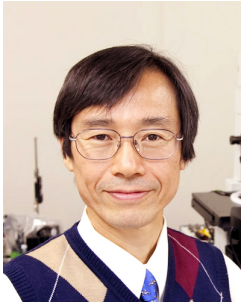
その他、領域内共同研究の成果として、ヒストン H4 のアセチル化が DNA 複製でのクロマチン脱凝縮 (decompaction) に必要であることを発見した (Ruan et al, *Sci Rep*, 2015)。高度に凝縮したクロマチンが、サブテロメア領域のゆるんだ転写不活性なクロマチンの近傍に形成されることを発見した (Matsuda et al, *Nat Commun*, 2015)。木村計画研究で開発された Mintbody を応用し、ヒストン H4K20 のモノメチル化を生きた分裂酵母細胞で可視化することに成功した (Sato et al, *J Mol Biol*, 2016)。さらに、分裂酵母の目的分子の細胞内局在を解析するためのイメージング法 (Live CLEM 法や蛍光イメージングによる定量解析法など) を開発した (Asakawa et al, *Micron*, 2014; Asakawa et al, *Fission Yeast: A Laboratory Manual*; Asakawa et al, *Methods Mol Biol*, 2018)。

【本研究課題に関する主要成果】

【雑誌論文】査読あり 17 件、査読なし 1 件

1. Ogawa S, Kido S, Handa T, Ogawa H, Asakawa H, Takahashi TS, Nakagawa T, Hiraoka Y, Masukata H. Shelterin promotes tethering of late replication origins to telomeres for replication timing control. *EMBO J*. 37, Pii: e98997 (2018).
2. Hirano Y, Kinugasa Y, Asakawa H, Chikashige Y, Obuse C, Haraguchi T, Hiraoka Y. Lem2 is retained at the nuclear envelope through its interaction with Bqt4 in fission yeast. *Genes Cells*. 23, 122-135 (2018).
3. Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. Estimation of GFP-nucleoporin amount based on fluorescence Microscopy. *Methods Mol Biol*. 1721, 105-115 (2018).
4. Matsuda A, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Spatial organization of the *Schizosaccharomyces pombe* genome within the nucleus. *Yeast*. 34, 55-66 (2016).
5. Asakawa H, Ding DQ, Haraguchi T, Hiraoka Y. Microscopic observation of living cells stained with fluorescent probes. In *Fission Yeast: A Laboratory Manual*. 230-235 (Cold Spring Harbor Lab Press) (2016).
6. Sato Y, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Ohtsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura A, Kurumizaka H, Kimura H. A genetically encoded probe for live-cell imaging of H4K20 monomethylation. *J. Mol Biol*. 428, 3885-3902 (2016).
7. Tange Y, Chikashige Y, Takahara S, Kawakami K, Higashi M, Mori C, Kojidani T, Hirano Y, Asakawa H, Murakami Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions. *Genes Cells*. 21, 812-832 (2016).
8. Asakawa H, Yang H-J, Hiraoka Y, Haraguchi T. Virtual nuclear envelope breakdown and its regulators in fission yeast meiosis. *Front Cell Dev Biol*. 4, 5 (2016).
9. Yang H-J, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Nup132 modulates meiotic spindle attachment in fission yeast by regulating kinetochore assembly. *J Cell Biol*. 211, 295-308 (2015).
10. Asakawa H, Yamamoto T. G, Hiraoka Y. Fission yeast meets a legend in Kobe: report

- of the Eighth International Fission Yeast Meeting. *Gene Cells*. 20, 967-971 (2015).
11. Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H, Chikashige Y, Kimura H, Masukata H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Histone H4 acetylation required for chromatin decompaction during DNA replication. *Sci Rep*. 5, 12720 (2015).
 12. Matsuda A, Chikashige Y, Ding DQ, Ohtsuki C, Mori C, Asakawa H, Kimura H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Highly condensed chromatins are formed adjacent to sub-telomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast. *Nat Commun*. 6, 7753 (2015).
 13. Asakawa H, Mori C, Ohtsuki C, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Uncleavable Nup98-Nup96 is functional in fission yeast. *FEBS Open Bio*. 5, 508-514 (2015).
 14. Iwamoto M, Koujin T, Osakada H, Mori C, Kojidani T, Matsuda A, Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. Biased assembly of the nuclear pore complex is required for somatic and germline nuclear differentiation in *Tetrahymena*. *J Cell Sci*. 128, 1812-1823 (2015).
 15. Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H, Chikashige Y, Masukata H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Meiotic nuclear movements in fission yeast are regulated by the transcription factor Mei4 downstream of a Cds1-dependent replication checkpoint pathway. *Genes Cells*. 20, 160-172 (2015).
 16. Asakawa H, Yang H-J, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *S. pombe*. *Nucleus*. 5, 149-162 (2014).
 17. Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. A method of correlative light and electron microscopy for yeast cells. *Micron*. 61, 53-61 (2014).
 18. Iwamoto M, Asakawa H, Ohtsuki C, Osakada H, Koujin T, Hiraoka Y, Haraguchi T. Monoclonal Antibodies Recognize Gly-Leu-Phe-Gly Repeat of Nucleoporin Nup98 of *Tetrahymena*, Yeasts and Humans. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 32, 81-90 (2013).
- [学会発表]
1. 浅川東彦、糀谷知子、Hui-Ju Yang、小坂田裕子、大槻千鶴、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子、分裂酵母に特異的な核膜孔複合体の構造、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
 2. Asakawa H, Kojidani T, Yang H-J, Osakada H, Nagao K, Obuse C, Hiraoka Y, Haraguchi T., Organization of The Nuclear Pore Core Complex Revealed by Immunoelectron Microscopy in The Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*, 9th International Fission Yeast Meeting, アルバート(カナダ), 2017年5月
 3. 原口徳子、浅川東彦、免疫電顕法による分裂酵母核膜孔複合体構造の解析、第7回光塾、広島、2015年9月
- 他、計 27 件



1分子 *in vivo* イメージング超解像ナノ解析によるクロマチン動作原理解明

平成 25 年度～平成 29 年度

徳永 万喜洋 (東京工業大学・生命理工学術院・教授)

【研究目的】

広範な生命機能の基盤として、DNA 生物学の大きな命題となっている、動的クロマチン構造の実体を解くことを目的とする。そのために、クロマチンの構造変化と分子間相互作用を、直接可視化し計測する。1分子超解像解析法の開拓を行い、新学術研究領域内における共同研究を展開して「動的クロマチン構造と機能」の解明を計る。

そのために、超解像法と生細胞イメージングの両方の利点を生かした、動的クロマチン構造の研究に適した新しい技術を開発する。高解像度と多色同時観察とを実現する生細胞多色蛍光1分子イメージング超解像顕微鏡を構築する。また、超解像ナノ解析法、分子動態と相互作用の定量化法を開拓する。これにより、クロマチン構造の細胞レベル *in vivo* 分子動態・要素間相互作用・核内配置のダイナミズムを解明することを目的とした。

【研究成果】

(1) 生細胞多色1分子イメージング超解像顕微鏡の構築

多色同時観察・高解像度高画質・10 ミリ秒以上の時間分解能を有する仕様として、1分子イメージング顕微鏡を構築した。細胞核内でも細胞表面と同等の高画質性能を有している。10 nm オーダー高精度の PALM/STORM 超解像観察と、動的特性を追える 1 分子イメージングとの同時観察、4 色までの多色対応が、大きな特長である。

(2) 多色超解像ナノ解析法の開発と定量化法の開発

新しい定量解析方法として、1分子軌跡追跡を用いた移動部分軌跡解析 (moving subtrajectory analysis) 法を開発した。1分子イメージング動画中の分子1個1個の位置を正確に求め、時間と

もに動く様子を、軌跡として追跡する(図1)。

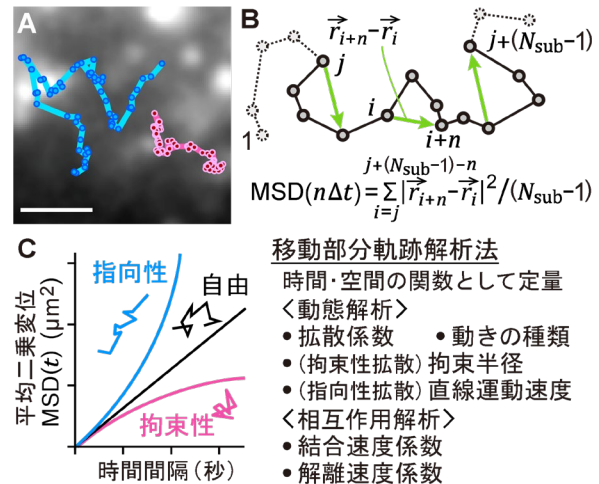


図1. 移動部分軌跡解析 (moving subtrajectory analysis) 法では、動態に加え結合解離速度定数も時間・場所の関数として定量計測できる。(A) 1分子イメージング画像から、個々の分子の軌跡追跡を行う。(B) 1分子軌跡中の一定長さの部分軌跡(subtrajectory)に関し動態解析を行う。部分軌跡を全軌跡中で移動させて解析することにより、経時変化を追う。(C) 2値化した領域マーカー画像を用いて部分軌跡を領域の内・境界・外に分類する。各領域に移動する時間的な頻度、即ち状態間の遷移速度から結合解離速度定数を求めることができる。

さらに、1分子画像と異なる蛍光色の画像から領域マーカー画像を得て、領域内・境界・外に分類して解析する。これにより、移動部分軌跡解析法では、拡散係数、動きの種類(単純拡散・閉じ込められた拡散・方向性ある拡散の3種類)と、そのパラメーター(閉じ込めの大きさ・方向性運動の速度)を、時間・場所(空間)の関数として求められる。また、拡散係数の大小から相互作用 ON/OFF 状態を識別し、両状態間の遷移速度から結合解離速度係数を求めることができる。

この新しい解析方法により、分子の動きが、時間や場所によりどのように変化するかを、数値情報として追うことが始めて可能となった。そればかりで

なく、分子が他の分子と結合する速さと解離する速さ、即ち分子間相互作用の速度定数を1分子の動きのみから求めることを初めて実現した。

(3) スクレオソームと RNA ポリメラーゼの生細胞動態と相互作用

ヒストン H2, H3 の PALM 法によるスクレオソームの超解像顕微鏡法と、1分子イメージングの同時観察を行った(図2)。超解像画像からは、クラスター状の分布が見られ、そのクラスターの粗密も場所により異なっていることが明らかとなった。同時観察した1分子画像を、1分子軌跡追跡解析し分子動態と相互作用を解析した。1箇所近傍でゆらぐ動きと、拡散的な動きの2種類がみられ、その間を1分子内で速く遷移しているとの、生細胞内スクレオソームの新たな動的描像を得た。この情報と超解像解析との相関解析は、従来には無い解析法として新たな情報をもたらすことを可能にするものである。

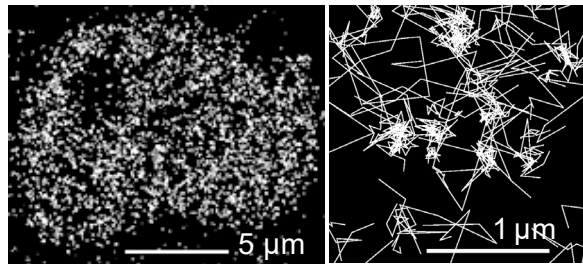


図2. 生細胞における超解像顕微鏡法と1分子イメージングとの同時観察。(左) ヒストンH3.1の超解像画像。(右) RNAポリメラーゼIIの1分子イメージング軌跡追跡。

(4) ヒストンバリエントの生細胞動態における違いと機能の関係

ヒストン H2 と H3 のバリエントを蛍光標識し、同時に RNA polymerase II を他の色で蛍光標識し、生細胞で2色同時超解像1分子イメージングを行った。1分子軌跡追跡解析から、多くのバリエントで上記の2状態が見られた。超解像局在は、それぞれに分布の違いが見られた。核内における超解像局在と1分子動態の、バリエントによる違いは、機能との関係を示している。

(5) 核小体の多層構造における液相特性

多層の液相からなる核小体内各相における1

分子動態の違いを定量解析した。中間層と最外層に局在するタンパク質分子を蛍光標識し、FRAP 法で秒以上の時間オーダーにおける動態を解析し、1分子軌跡追跡解析から拡散係数を求め数十ミリ秒～数秒以下の時間オーダーの動態定量情報を得た。FRAP 法、1分子イメージング法ともに、1分子動態が明確に異なっていた。中間層では、動きが遅く、動く範囲も狭かった。一方、最外層では、動きがより速く、動く範囲も広がった。さらに、リボソームを構成するサブユニットの一つを shRNA ノックダウンさせた細胞で同様のことを行ったところ、最外層での動きが変化した。

液相状態により明確に分子動態が異なること、リボソーム間の分子相互作用が動態を規定していることを意味している。

(6) 転写制御タンパク質の生細胞動態

転写制御および伸長制御に関し、1分子イメージング超解像解析と FRAP 法により、分子動態・局在と転写制御機能の関係を明らかにした。転写開始複合体の構成因子メディエーター複合体のサブユニット MED26 の C 末側領域、中央領域、N 末端ドメインと、RNA Polymerase II、基本転写因子 TFIID、転写伸長因子複合体 SEC・LEC との相互作用が、pausing 解除と転写伸長の機能とよく一致しており、機能と動態の関係を定量的に示すことができた。転写伸長制御因子に関し、NELF と DSIF の結合・解離速度が、転写伸長活性と相関していることが明かとなった。

(7) クロマチンリモデリング複合体サブユニットの生細胞動態

INO80 複合体構成分子である、アクチン関連タンパク質 Arp4・Arp5・Arp8、アクチン、Ino80 タンパク質に関し、数十ミリ秒～数秒以下の時間オーダーの動態定量情報を与える1分子軌跡追跡定量解析と、数秒以上の時間オーダーの動態定量情報を与える FRAP 解析と合わせることで、生細胞内のクロマチンリモデリング INO80 複合体の動態を定量化した。構成分子による違い、ATP 作用機序と構成分子の役割に関し INO80 複合体の新しい描像を得た。

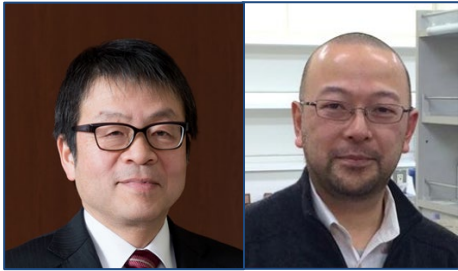
【本研究課題に関する主要成果】

〔雑誌論文〕すべて査読あり

1. Lim WM, Ito Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M. CLIP-170 is essential for MTOC repositioning during T cell activation by regulating dynein localisation on the cell surface. *Sci Rep.* 8, 17447 (2018).
2. Ito Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M. Multi-color single-molecule tracking and subtrajectory analysis for quantification of spatiotemporal dynamics and kinetics upon T cell activation. *Sci Rep.* 7, 6994 (2017).
3. Shin C, Ito Y, Ichikawa S, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Tanaka T. MKRN2 is a novel ubiquitin E3 ligase for the p65 subunit of NF- κ B and negatively regulates inflammatory responses. *Sci Rep.* 7, 46097 (2017).
4. Kasai S, Kajimoto S, Ito Y, Saito T, Yasumoto K, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Fukumura H, Sogawa K. Conformational changes in inhibitory PAS domain protein associated with binding of HIF-1 α and Bcl-xL in living cells. *J Biochem.* 161, 291-296 (2017).
5. Yamazaki S, Yamamoto K, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Harata M. Nuclear actin activates human transcription factor genes including the OCT4 gene. *Biosci Biotechnol Biochem.* 79, 242-246 (2015).
6. Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H. Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Nature.* 516, 272-275 (2014).
7. Ito Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M. A Facile Preparation of Glass-supported Lipid Bilayers for Analyzing Molecular Dynamics. *Anal Sci.* 30, 1103-1106 (2014).
8. Asakawa H, Yang HJ, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleus.* 5, 149-162 (2014).
9. Hotta K, Nashimoto A, Yasumura E, Suzuki M, Azuma M, Iizumi Y, Shima D, Nabeshima R, Hiramoto M, Okada A, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Ito T, Ando H, Sakamoto S, Kabe Y, Aizawa S, Imai T, Yamaguchi Y, Watanabe H, Handa H. Vesnarinone suppresses TNF α mRNA expression by inhibiting valosin-containing protein. *Mol Pharmacol.* 83, 930-938 (2013).

〔学会発表〕

1. Ito Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M., An analysis method for quantification of spatiotemporal dynamics and kinetics using single molecule tracking, The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 熊本, 2017年9月
2. Ito Y, Harata M, Kimura K, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M., Integrated Imaging Approach to the Study of Chromatin Dynamics, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015年8月
他、計55件



核膜孔複合体構成因子・核輸送因子によるクロマチン動態制御の解明

平成 25 年度～平成 29 年度

米田悦啓 (医薬基盤・健康・栄養研究所、研究所長)

岡正啓 (医薬基盤・健康・栄養研究所、プロジェクトリーダー)

【研究目的】

真核生物の核一細胞質間の分子輸送は核膜孔を介して行われる。近年、核膜孔の構成因子(ヌクレオポリン)や核輸送因子が、核輸送以外にも様々な細胞内イベントに関わっていることがわかってきた。また、核内ではクロマチンと物理的・機能的に相互作用し遺伝子発現の調節に働くことが示唆されている。そこで本研究では(1)核膜孔構成因子とクロマチンの相互作用メカニズム、ならびに(2)クロマチン制御因子と核輸送因子の相互作用という2つの視点から、動的クロマチン構造を理解する。特に白血病の発症に深く関わる Nup98 融合タンパク質のクロマチン動構造制御における役割を明らかにする。

【研究成果】

(1) Nup98 融合タンパク質の機能解析

ある種の白血病の原因と考えられるヌクレオポリンとホメオボックス転写因子の融合タンパク質 Nup98-HoxA9 がどのような機能を持っているかはこれまでほぼ不明のままであった。本研究によって Nup98-HoxA9 が Hox クラスター領域 (*HoxA*, *HoxB*, *HoxC*, *HoxD*) に局所的に集積して *Hox* 遺伝子群の発現を亢進する活性を持つ事が明らかになった。また、Nup98 と結合することが知られている核外輸送因子 Crm1 が、あらかじめ Hox クラスター領域に

結合しており、Nup98-HoxA9 をリクルートして遺伝子発現を活性化させている事が分かった(図1)。以上から、Nup98-HoxA9 と Crm1 の相互作用によって起きる遺伝子発現制御の異常が病態に寄与している可能性が示唆された(大川班、木村班との共同研究)。

(2) ヒストン結合因子 RBBP4 と核輸送因子 importin α 相互作用の生理的意義

Retinoblastoma binding protein 4 (RBBP4) は Importin α の結合因子として同定されたが、核輸送の基質ではないことから、両者の相互作用の生理的意義は不明のままであった。本研究によって RBBP4 は通常の輸送基質とは異なり、importin β 結合部位(IBMドメイン)を介して importin α に結合していることがわかった。さらに、RBBP4 は核内で importin β と競合的に IBMドメインに結合することで、importin α - importin β 間相互作用の解離を促進し、核輸送の効率を上げていることが分かった。さらに RBBP4 のノックダウンが核輸送効率の低下と細胞老化を引き起こす事を明らかにした。以上の事から、細胞老化と核輸送の密接な関係が示唆された(小布施班との共同研究)。

(3) クロマチン制御因子 TRIM28 と核輸送因子 importin α 相互作用

新たに同定した TRIM28 (Tripartite motif protein 28) の核局在化シグナル(NLS)がヘテロクロマチンタンパク質(HP1)結合部位とオーバーラップしていることがわかった。さらに、*in vitro* でリコンビナント HP1 が競合的に importin α - TRIM28 間の結合を阻害することが分かった。以上から、核内では importin α が HP1-TRIM28 間の結合を制御することで、新

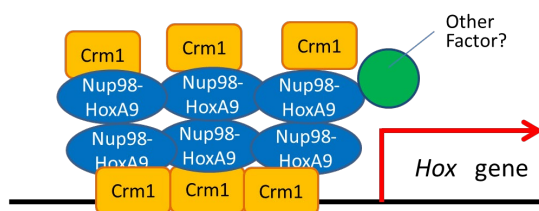


図1. Nup98HoxA9によるHox遺伝子活性化のモデル

たなクロマチン制御因子として機能している可能性が示唆された(小布施班との共同研究)。

(4) 核輸送因子 KPNA2 の新機能

核輸送因子 KPNA2 (importin- α 1)が、がん細胞株では細胞表面に局在していることがわかった。さらに、細胞表面の KPNA2 は細胞増殖因子と相互作用し、下流のシグナル経路を活性化してがん細胞の増殖を促進していることが分かった(図2)。以上から、KPNA2 が新たな機能によって、がんの病態に寄与している可能性が示唆された。

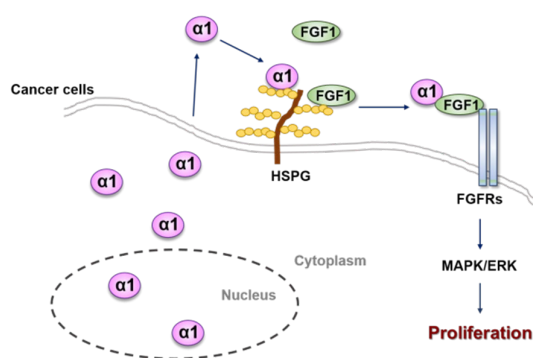


図2. 核輸送因子KPNA2の新たな機能

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Oka M, and Yoneda Y. Importin α : functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proceedings of the Japan Academy, Series B. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*, 94, 259-274 (2018).
2. Higa M., Oka M., Fujihara Y., Masuda K., Yoneda Y., and Kishimoto T. Regulation of inflammatory responses by dynamic subcellular localization of RNA-binding protein Arid5a. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 115, E1214-E1220 (2018).
3. Miyamoto Y., Yoneda Y., Oka M. Protein Transport Between the Nucleus and Cytoplasm, *Nuclear Architecture and Dynamics*, 387-403 (Elsevier) (2018).
4. Fujiwara K, Hasegawa K, Oka M., Yoneda Y., Yoshikawa K. Terminal differentiation of cortical neurons rapidly remodels RanGAP-mediated nuclear transport system. *Genes to Cells*, 21, 1176-1194 (2016).
5. Moriyama T., Tanaka S., Nakayama Y., Fukumoto M., Tsujimura K., Yamada K., Bamba T., Yoneda Y., Fukusaki E., Oka M. Two isoforms of TALDO1 generated by alternative translational initiation show differential nucleocytoplasmic distribution to regulate the global metabolic network. *Sci. Rep.*, 6, 34648 (2016).
6. Miyamoto Y., Oka M. Data on dimer formation between importin α subtypes. *Data Brief*, 7, 1248-1253 (2016).
7. Yamada K., Miyamoto Y., Tsujii A., Moriyama T., Ikuno Y., Shiromizu T., Serada S., Fujimoto M., Tomonaga T., Naka T., Yoneda Y., Oka M. Cell surface localization of importin α 1/KPNA2 affects cancer cell proliferation by regulating FGF1 signalling. *Sci. Rep.*, 6, 21410 (2016).
8. Oka M., Mura S, Yamada K, Sangel P, Hirata S, Maehara K, Kawakami K, Tachibana T, Ohkawa Y, Kimura H, Yoneda Y. Chromatin-prebound Crm1 recruits Nup98-HoxA9 fusion to induce aberrant expression of *Hox* cluster genes. *eLife*, 5, e09540 (2016).
9. Oka M and Yoneda Y. Nuclear Pores. *Encyclopedia of Cell Biology*. 2, 319-323 (2015).
10. Tsujii A, Miyamoto Y, Moriyama T, Tsuchiya Y, Obuse C, Mizuguchi K, Oka M., Yoneda Y. Retinoblastoma Binding Protein 4-Regulated Classical Nuclear Transport Is Involved in

- Cellular Senescence. *J Biol Chem.*, 290, 29375-29388 (2015).
11. Kimoto C, Moriyama T, Tsujii A, Igarashi Y, Obuse C, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y. Functional characterization of importin $\alpha 8$ as a classical nuclear localization signal receptor. *Biochim Biophys Acta.*, 1853, 2676-2683 (2015).
 12. Okimoto S, Sun J, Fukuto A, Horikoshi Y, Matsuda S, Matsuda T, Ikura M, Ikura T, Machida S, Kurumizaka H, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y, Kiuchi Y, Tashiro S. hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair. *Genes to Cells*, 20, 681-694 (2015).
 13. Moriyama T, Sangel P, Yamaguchi H, Obuse C, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y. Identification and characterization of a nuclear localization signal of TRIM28 that overlaps with the HP1 box. *Biochem Biophys Res Commun.*, 462, 201-207 (2015).

他、計 20 件

〔学会発表〕

1. 岡正啓、村苑子、野上順平、前原一満、大川泰行、木村宏、米田悦啓、Nup98 融合遺伝子産物による Hox 遺伝子活性化のメカニズム、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017 年 12 月
2. 盛山哲嗣、田中秀、福本昌宏、辻村賢二、山田幸司、中山泰宗、馬場健史、福崎英一郎、米田悦啓、岡正啓、翻訳開始点の異なる 2 つのトランスアルドラーゼが糖代謝全体に影響を及ぼす、第 69 回日本細胞生物学大会、仙台、2017 年 6 月
3. 岡正啓、村苑子、山田幸司、Percival Sangel、

A01 計画研究(代表、分担)

- 大川恭行、木村宏、米田悦啓、ヌクレオポリン融合タンパク質 Nup98-HoxA9 の機能解析、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月
4. 山田幸司、米田悦啓、岡正啓、Extracellular released importin $\alpha 1$ stimulates proliferation of cancer cells、第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月
 5. Oka M., Functional analysis of leukemogenic Nup98-Hox fusion protein, Nuclear Transport Meeting, サン・フェリウ・デ・ギホルス(スペイン)、2015 年 9 月
 6. Oka M, Mura S, Yamada K, Sangel P, Ohkawa Y, Kimura H, Yoneda Y., Functional analysis of leukemogenic Nup98-Hox fusion protein, The International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015 年 8 月
 7. 岡正啓、Sangel Percival、村苑子、山田幸司、木村宏、米田悦啓、Nup98-Hox 融合タンパク質による細胞がん化メカニズム、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月
 8. 岡正啓、米田悦啓、Nup98 融合遺伝子による細胞がん化のメカニズム、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月
- 他、計 32 件



核膜孔複合体構成因子・核輸送因子による クロマチン動態制御の解明

平成 25 年度～平成 29 年度

米田 悦啓 (医薬基盤・健康・栄養研究所、研究所長)

安原 徳子 (日本大学文理学部生命科学科・准教授)

【研究目的】

真核生物の核は核膜により隔てられ、分子の出入りは核膜上の核膜孔を介して起こる。分子サイズの小さなイオンなどは拡散により核膜孔を通過するが、大きなサイズの分子は輸送因子を介した選択的輸送により核内外を行き来する。細胞核への適切なタイミングでの分子輸送は、様々な細胞活動に必要である。我々は Importin α の1つのサブタイプが胚性幹細胞において主要な転写因子を輸送し、未分化維持に働くことを報告している。胚性幹細胞の分化に伴い、哺乳類で数種類のサブタイプが存在している Importin α ファミリーの発現パターンが変化する。この発現変化に伴い、転写因子の輸送効率が影響を受け、細胞分化を抑制、または促進することを明らかにしてきた。さらに、胚性幹細胞への遺伝子導入により Importin α ファミリーの発現を人為的に変えると、多数の遺伝子の発現が変化することから、Importin α ファミリーがクロマチンの機能に何らかの作用を持つことが考えられた。一方、近年、このような核一細胞質間の分子輸送を担う核膜孔構成因子(ヌクレオポリン)や輸送因子(Importin)が、核内でクロマチンと機能的に相互作用することが明らかになってきた。また、細胞分化においては大掛かりなクロマチンリモデリングが起こり、クロマチンの動態が変化する。

そこで、本研究では、核輸送因子とクロマチンの物理的・機能的な相互作用の解析を行い、その実体を明らかにするとともに、細胞分化やがん化、細胞増殖などの高次生命現象での核輸送因

子による動的クロマチン構造制御の重要性を明らかにすることを目指した。

【研究成果】

(1) Importin α —クロマチン相互作用の機能的相互作用と分子メカニズム

核輸送因子 Importin α が細胞のどのようなゲノム領域と相互作用を示すのか、次世代シーケンスを用いた網羅的解析方法によって解析を進めた。その結果、マウス細胞において Importin α が広いゲノム領域と相互作用することが分かった。さらに、*in vitro* 結合実験系を用いた Importin α とクロマチンの相互作用メカニズムの解析、結合ゲノム領域の遺伝子発現解析も行った。その結果、Importin α は、クロマチン修飾を介して細胞の活動に必須な遺伝子に広く作用する、重要なクロマチン制御因子であることが示唆された。さらに、Importin α がファミリー分子の種類依存的に、および細胞の状態の変化に応じてクロマチン制御に関わることを見出した。また、Importin α とクロマチン相互作用の分子メカニズムを明らかにすべく、各種 Importin α 変異体を用い、Importin α のクロマチン結合部位を明らかにしている。

(2) Importin α —クロマチン相互作用の生理的意義

動物培養細胞において、Importin α のノックダウンおよび強制発現を行うと、多数の遺伝子の発現変化が誘導されることを掴んだ。この時、細胞の活動状況がこれら遺伝子発現変化に応じて変化する。これらの結果より、Importin α のクロマチン結合が細胞分化やがん化、細胞増殖などの細

胞活動に果たす役割を明らかにしつつある。

また、Importin α 特異的 RNA アプタマーの作成に成功した。このアプタマーは Importin α ファミリーのうち1種類の分子にのみ作用し、in vitro 輸送アッセイ系において基質である核移行たんぱく質の輸送機能を阻害する。今後、特定の核輸送経路のみを抑制する阻害剤として活用でき、Importin α とクロマチンの相互作用の生理的意義の解明に役立つと期待される。

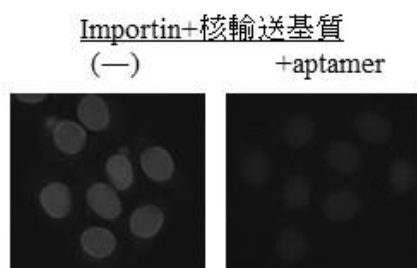


図: in vitro 輸送アッセイにおける Importin 特異的アプタマーの阻害効果

Importin による核移行基質の輸送が、アプタマーの添加により阻害される。

【本研究課題に関する主要成果】

【雑誌論文】すべて査読あり

1. Yasuhara N, Yoneda Y. Importins in the maintenance and lineage commitment of ES cells. *Neurochem Int.* 106, 14-23 (2017).
2. Yasuhara N, Kumar P. Aptamers that bind specifically to human KPNA2 (importin- α 1) and efficiently interfere with nuclear transport. *J Biochem.* 160, 259-268 (2016).
3. Umemura Y, Koike N, Matsumoto T, Yoo SH, Chen Z, Yasuhara N, Takahashi JS, Yagita K. Transcriptional program of Kpna2/Importin- α 2 regulates cellular differentiation-coupled circadian clock development in mammalian cells. *PNAS.* 111,

A01 計画研究(代表、分担)

5039-48 (2014).

4. Choi S, Yamashita E, Yasuhara N, Song J, Song SY, Won YH, Hong HR, Shin YS, Sekimoto T, Park IY, Yoneda Y, Lee SJ. Structural basis for the selective nuclear import of the C2H2 zinc-finger protein Snail by importin β . *Acta Crystallographica Section D.* 70, 1050-60 (2014).

他、計 7 件

【学会発表】

1. 地引和也、山本達郎、中尾光善、斉藤典子、安原徳子細胞増殖における核輸送因子の働き、2017 年度生命科学系学会合同年次大会
 2. Yasuhara N., Nucleocytoplasmic transport and gene regulation, 2nd Swiss-Japan Symposium, Chromatin Structure and Dynamics, 東京, 2017 年 8 月
 3. Yasuhara N., Yoneda Y., The nucleocytoplasmic transport system regulates cell differentiation, RMSC-Korea-2015, 釜山 (韓国), 2015 年 3 月
 4. 安原徳子、米田悦啓、核輸送による遺伝子発現制御と細胞運命決定のメカニズム、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月
 5. 安原徳子、米田悦啓、核輸送による遺伝子発現制御と細胞運命決定のメカニズム、第 66 回日本細胞生物学会、奈良、2014 年 6 月
- 他、計 10 件



核内構造体とのインタープレイによるクロマチン動構造の制御

平成 25 年度～平成 29 年度

斉藤 典子 (がん研究会がん研究所・がん生物部・部長)

【研究目的】

細胞核内でクロマチンは、種々の核内構造体に囲まれ、これらとの相互作用により機能や動態が制御されている。核内構造体は、遺伝子の転写、複製、損傷修復などの核内事象に関わる因子を豊富に含み、それらを周囲に供給する。複数の RNA とタンパク質から成る巨大複合体である。核内構造は、疾患や発生分化の段階で特徴的に変化するがその仕組みは明らかでない。本研究では、核内構造体とクロマチンの相互作用(インタープレイ)の分子メカニズムや、クロマチン制御の機構を明らかにすること、また、疾患への関わりを明らかにすることを目的のひとつとした。並行して、機械学習を用いたイメージング解析をクロマチン・細胞核形態の定量化に適用して、その手法を確立することを目的とした。これらにより、核内の 3 次元構造が「動的クロマチン構造」に果たす役割を明らかにすることを目指した。

【研究成果】

(1) 再発乳がんに関わる非コード RNA と細胞核内 RNA クラウド構造

乳がんの約 60～70%はエストロゲン受容体(ER)を発現する ER 陽性型で、この種類の乳がん細胞はエストロゲンの存在下で増殖するので、エストロゲンを抑制するホルモン治療が有効である。しかし治療が長期にわたると、細胞はエストロゲンがない状態でも増殖できる能力を獲得して、がんが再発することが頻繁にあり、問題である。

本研究では、ER 陽性乳がんのモデル細胞 MCF7 と、再発モデル細胞 LTED (Long Term

Estrogen Deprivation)を用いて、RNA-Seq を行った。その結果 LTED 細胞では、ER をコードしている *ESR1* 遺伝子座から mRNA の転写が高度に活性化されるとともに、非コードゲノム領域から一群の非コード RNA が過剰に転写されていることを見出し、これらの RNA 群を *Eleanors* と命名した。*Eleanors* は、LTED 細胞でクロマチン上の *ESR1* 遺伝子の転写の場に蓄積し、新規の核内構造体である RNA クラウドを形成する(図 1)。*Eleanor* RNA クラウドは、ER 陽性の乳がん患者由来標本でも顕著に観察された。*Eleanor* を阻害すると、*ESR1* 遺伝子の転写が低下し、乳がん細胞の増殖が阻害された。また、ポリフェノールの一種であるレスベラトロールを細胞に投与すると、*Eleanor* が消失し、それにより ER の産生が低下し、同様に、乳がん細胞の増殖が抑制された。

本研究では、非コード RNA を介した新たなクロマチン制御のメカニズムを明らかにした。この成果は、再発性乳がんの新たな診断および治療法の確立につながると期待される。

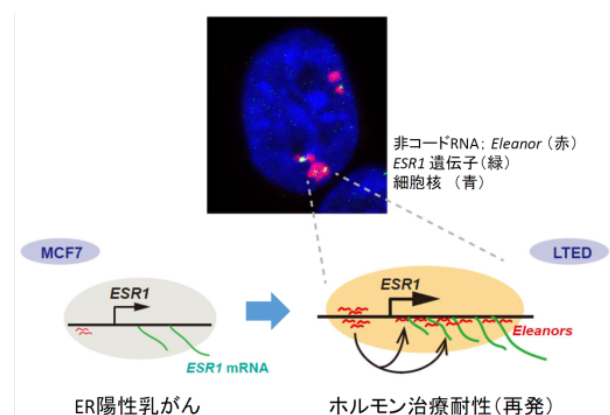


図1. 乳がんの再発における *Eleanor* RNA クラウドの形成と *ESR1* 遺伝子の活性化機構

(2) 機械学習を用いた画像解析によるクロマチン・細胞核形態の定量化

核内構造は、発生分化や疾患で特徴的に変化するため、細胞状態を評価する優れた指標となりうる。しかしクロマチンや核内構造は不定形かつ不均一で、通常の画像解析では変化の度合いを客観的に定量することが極めて困難であった。本研究では、クロマチン・細胞核構造に関わる因子をノックダウンした細胞の画像データセットを構築し、教師付き機械学習アルゴリズムウインチャーム(wndchrm)を用いて、形態変化の量と方向性を定量化する技術を確立した。

(3) 核小体の構造と機能の解析

核小体は、核内最大の構造体で、リボソームのアセンブリーや細胞増殖、恒常性の維持に関わる。核小体の形成には、その構成因子が液相分離を起こしやすい物理的性質をもつことなどが関わると指摘されはじめているが、詳細は不明である。本研究では、核小体の形成に関わる因子を同定するために、siRNA ライブラリーを用いてハイコンテンツスクリーニングを行った。その結果、特定のリボソームタンパク質の減弱が特徴的な形態変化をひき起こすことを見出した。また、核膜タンパク質やクロマチン因子が、液相分離を介した核小体の形成に関わることを見出した(図2)。

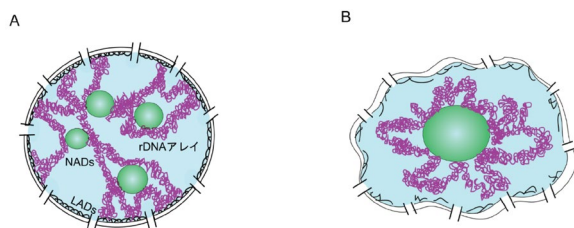


図2. 核膜複合体とクロマチンのインタープレイによる核小体の正常形成

(A)正常細胞 (B)核膜タンパク質 SUN1 のノックダウン細胞. クロマチンの核膜への繫留が失われ、それを介して核小体が自由に融合し、数が少なく肥大した核小体となる

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Yamamoto T, Sakamoto C, Tachiwana H, Kumabe M, Matsui T, Yamashita T, Shinagawa M, Ochiai K, Saitoh N, Nakao M. Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through Eleanor non-coding RNA. *Sci. Rep.* 8, 15202 (2018).
2. Ichikawa Y, Saitoh N, Kaufman PD. An asymmetric centromeric nucleosome. *eLife.* 7 (2018).
3. Takagi M, Ono Y, Natsume T, Sakamoto C, Nakao M, Saitoh N, Kanemaki MT, Hirano T, Imamoto N. Ki-67 and condensins support the integrity of mitotic chromosomes through distinct mechanisms. *J Cell Sci.* 131 (2018).
4. Dobrucki J, Saitoh N. The 4D Nucleome in Kraków-prospects for an emerging field. *Nucleus.* 8, 447-448 (2017).
5. Ono T, Sakamoto C, Nakao N, Saitoh N, Hirano T. Condensin II plays an essential role in reversible assembly of mitotic chromosomes in situ. *Mol Biol Cell.* 28, 2875-2886 (2017).
6. Wang X, Liang S, Sun Y, Li H, Endo F, Nakao M, Saitoh N, Wu L. Analysis of estrogen receptor beta gene methylation in autistic males in a Chinese Han population. *Metab Brain Dis.* 32, 1033-1042 (2017).
7. Tanaka H, Takebayashi SI, Sakamoto A, Igata T, Nakatsu Y, Saitoh N, Hino S, Nakao M. The SETD8/PR-Set7 Methyltransferase Functions as a Barrier to Prevent Senescence-Associated Metabolic Remodeling. *Cell Rep.* 18, 2148-2161 (2017).

8. Tomita S, Abdalla MOA, Fujiwara S, Yamamoto T, Iwase H, Nakao M, Saitoh N. Roles of long non-coding RNAs in chromosome domains. *Wiley Interdisciplinary Review RNA*. (2016).
9. Nakayama T, Saitoh N, Morotomi-Yano K, Yano KI, Nakao M, Saitoh H. Nuclear extrusion precedes discharge of genomic DNA fibers during tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap-osis (NETosis)-like cell death in cultured human leukemia cells. *Cell Biol Int*. 40, 597-602 (2016).
10. Matsumoto A, Sakamoto C, Matsumori H, Katahira J, Yasuda Y, Yoshidome K, Tsujimoto M, Goldberg IG, Matsuura N, Nakao M, Saitoh N, Hieda M. Loss of the integral nuclear envelope protein SUN1 induces alteration of nucleoli, *Nucleus*. 7, 68-83 (2016).
11. Kitamura H, Matsumori H, Kalendova A, Hozak P, Goldberg IG, Nakao M, Saitoh N, Harata M. The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus. *Biochem Biophys Res Commun*. 464, 554-560 (2015).
12. Tomita S, Abdalla MOA, Fujiwara S, Matsumori H, Maehara K, Ohkawa Y, Iwase H, Saitoh N, Nakao M. A cluster of noncoding RNAs activates the ESR1 locus during breast cancer adaptation. *Nat Commun*. 6, Article No. 6966 (2015).
13. Tokunaga K, Saitoh N, Goldberg IG, Sakamoto C, Yasuda Y, Yoshida Y, Yamanaka S, Nakao, M. Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 4, 6996 (2014).
14. Sasai N, Saitoh N, Saitoh H, Nakao M. The transcriptional cofactor MCAF1/ATF7IP is involved in histone gene expression and cellular senescence. *PLoS ONE*. 8, e68478 (2013).
- [学会発表]
1. Saitoh N., Eleanor non-coding RNA defines the active ESR1 chromatin domain in breast cancer recurrence, Wellcome Trust Centre for Cell Biology, Institute of Cell Biology Seminar, 43rd Naito Conference on “Noncoding RNA: Biology, Disease, & Chemistry, 札幌, 2017年6月
 2. Saitoh N., Nuclear structures for gene regulation: the nucleolus and RNA clouds, NIA/NIH seminar, メリーランド(アメリカ), 2016年5月
 3. Saitoh N., Tomita S., Abdalla M.O., Fujiwara S., Nakao M., Novel non-coding RNAs Eleanors, define the activate ESR1 chromatin domain during breast cancer cell adaptation, EMBO Conference Series Nuclear Structure and Dynamics, リル=シュル=ラ=ソルギユ(フランス), 2015年10月
 4. Saitoh N., Nuclear ncRNA-mediated chromatin domain regulation in breast cancer, Institute for Protein Research (IRP) Seminar “Nuclear organization and actin-dependent mechanisms in genome stability, 大阪, 2015年5月
- 他、計 79 件

核内構造体とのインタープレイによるクロマチン動構造の制御



平成 25 年度～平成 29 年度

原田 昌彦 (東北大学 大学院農学研究科・准教授)

【研究目的】

クロマチンは細胞核内で様々な核内構造体と相互作用して空間的に配置され、さらに核内構造体との機能的相互作用（インタープレイ）によってクロマチン機能や動態が制御されている。核内構造体はクロマチンの空間配置を決定するだけでなく、遺伝子の転写、複製、損傷修復などに関わる様々な核内因子を集積される場としても機能する。核内構造は、疾患や発生分化の段階で特徴的に変化するがその仕組みは明らかでない。本研究では、核内構造体とクロマチンの相互作用（インタープレイ）の分子メカニズムや、クロマチン制御の機構を明らかにすること、また、疾患への関わりを明らかにすることを目的のひとつとした。また、細胞核内のインタープレイに重要な役割を果たす因子として、核内アクチンとヒストンバリエント H2A.Z に注目して、これらのクロマチン動構造や細胞核機能構造形成への寄与の解析を行った。これらにより、核内の 3 次元構造が「動的クロマチン構造」に果たす役割を明らかにすることを目指した。

【研究成果】

- (1) 細胞核内アクチンファミリーの、細胞核機能構造およびクロマチン動構造への寄与の解析

アクチンファミリーは、アクチン、およびアクチンに進化的・構造的に関連した一群のアクチン関連タンパク質(actin-related protein; Arp)によって構成されている。このうち、アクチン

の一部が細胞核で機能すること、また 10 種の Arp のうち、Arp4 から Arp9 が細胞核に局在することが知られている。我々は、細胞核のアクチンの機能として、核内で形成された F-actin に Wnt シグナルに関わる転写因子 β -catenin が結合することを示した。また、この結合によってクロマチン/ β -catenin/核内 F-actin のインタープレイが誘導され、これが Wnt シグナルターゲット遺伝子の転写制御に関与することを示

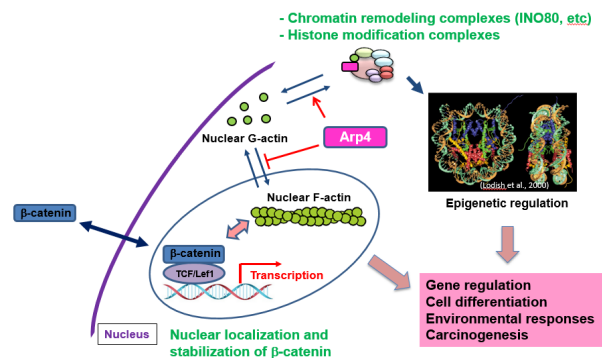


図1. 細胞核内に形成されたアクチン繊維(F-actin)と β -catenin/クロマチンとのインタープレイによる転写制御のモデル図。

した。この結果は、核構造と転写因子・クロマチンのインタープレイがクロマチン動構造を制御する新規な例を示している（図1）。

さらに、INO80 クロマチンリモデリング複合体に含まれるアクチンファミリーである Arp5, Arp8 の機能について、これらの遺伝子ノックアウト細胞などを用いて解析した。その結果、Arp8 はヒストンや DNA に直接結合することにより、INO80 複合体のクロマチンへのリクルートに寄与することが明らかになった。また、Arp5 はヒストンや DNA に直接結合すること

A01 計画研究(分担)

はできないが、INO80 複合体が外部シグナルの下流で活性化する際に必要であることが示された。また INO80 複合体は転写以外にも DNA 損傷修復にも関与しており、Arp5, Arp8 が DNA 損傷修復への寄与を通じて、ゲノム安定性維持に重要な役割を果たしていることも示された。

(2) ヒストンバリエント H2A.Z が形成するクロマチンと核構造とのインタープレイの解析

ヒストンバリエント H2A.Z は、酵母からヒトまで保存されたヒストンバリエントであり、転写・修復・染色体分配などに重要な役割を果たすとされている。脊椎動物においては、H2A.Z には 2 つのアイソフォーム(H2A.Z-1 および H2A.Z-2) が存在する。我々は、H2A.Z-1, H2A.Z-2 のそれぞれをノックアウト(KO)した DT40 細胞、およびテトラサイクリン誘導的に両アイソフォームをノックアウトした DT40 細胞 (H2A.Z-DKO 細胞)を用いて、H2A.Z の機能解析を行った。H2A.Z-1 KO および H2A.Z-2 KO 細胞は生存に問題はないものの、H2A.Z-DKO 細胞は生存できないことから、H2A.Z アイソフォーム間には重複した機能が存在することが示された。また、H2A.Z-DKO 誘導により細胞分裂期の細胞が増加し、染色体分配の異常が観察されることから、H2A.Z が染色体分配に重要な役割を有することが示された(図 2)。

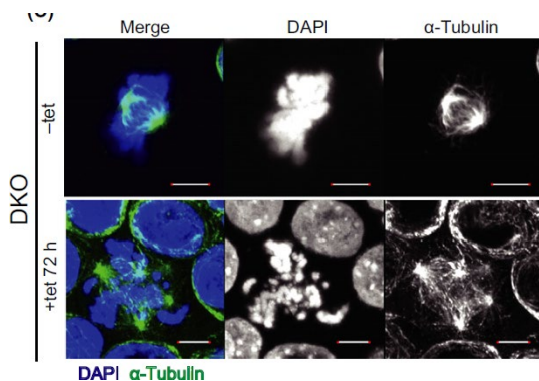


図2. ヒストンバリエント H2A.Z のふたつのアイソフォーム(H2A.Z-1, H2A.Z-2)のダブルノックアウト(DKO)細胞における、分裂期進行の異常。 Kusakabe et al, Genes Cells (2016)より。

常が観察されることから、H2A.Z が染色体分配に重要な役割を有することが示された(図 2)。さらに、H2A.Z-DKO 細胞において、外来性の H2A.Z あるいは変異 H2A.Z を発現することで機能相補を観察する実験系を確立し(genetic complementation system)、H2A.Z の N 末端テールの特徴や翻訳後修飾が、転写制御において重要な役割を果たすことを示した。

以前の我々の報告から、H2A.Z は細胞周期間期核内の染色体テリトリーの放射状配置にも関与することが示されている。そこで、H2A.Z とインタープレイする核内因子を国際共同研究として検索し、核内タンパク質 PWWP2A をその候補として同定した。PWWP2A ノックダウン細胞では染色体分配の異常が観察されることなどから、PWWP2A を介した H2A.Z クロマチンのインタープレイによって、染色体分配や染色体テリトリーの形成における H2A.Z 機能が発現している可能性があり、さらに研究を進めている。

【本研究課題に関する主要成果】

【雑誌論文】査読あり 18 件、査読なし 2 件

1. 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. 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 (2018).
2. Yamazaki S,* Harata M,* Idehara T, Konagaya K, Yokoyama G, Hoshina H, Ogawa Y.* (*corresponding authors) Actin polymerization is activated by terahertz irradiation. *Sci Rep.* 8, 9990 (2018).

3. Sun J, Shi L, Kinomura A, Fukuto A, Horikoshi Y, Oma Y, Harata M, Ikura M, Ikura T, Kanaar R, Tashiro S. Distinct roles of ATM and ATR in the regulation of ARP8 phosphorylation to prevent chromosome translocations. *Elife* 7, e32222 (2018).
4. Fukuto A, Ikura M, Ikura T, Sun J, Horikoshi Y, Shima H, Igarashi K, Kusakabe M, Harata M, Horikoshi N, Kurumizaka H, Kiuchi Y, Tashiro S. SUMO modification system facilitates the exchange of histone variant H2A.Z-2 at DNA damage sites. *Nucleus*. 9, 87-94 (2018).
5. Pünzeler S, Link S, Wagner G, Keilhauer EC, Kronbeck N, Spitzer RM, Leidescher S, Markaki Y, Mentele E, Regnard C, Schneider K, Takahashi D, Kusakabe M, Vardabasso C, Zink LM, Straub T, Bernstein E, Harata M, Leonhardt H, Mann M, Rupp RA, Hake SB. Multivalent binding of PWWP2A to H2A.Z regulates mitosis and neural crest differentiation. *EMBO J*. 36, 2263-2279 (2017).
6. Takahashi D, Orihara Y, Kitagawa S, Kusakabe M, Shintani T, Oma Y, Harata M. Quantitative regulation of histone variant H2A.Z during cell cycle by ubiquitin proteasome system and SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biosci Biotechnol Biochem*. 81, 1557-1560 (2017).
7. Takahashi Y, Murakami H, Akiyama Y, Katoh Y, Oma Y, Nishijima H, Shibahara KI, Igarashi K, Harata M. Actin Family Proteins in the Human INO80 Chromatin Remodeling Complex Exhibit Functional Roles in the Induction of Heme Oxygenase-1 with Hemin. *Front Genet*. 8, 17 (2017).
8. Yamazaki S, Yamamoto K, de Lanerolle P, Harata M. Nuclear F-actin enhances the transcriptional activity of β -catenin by increasing its nuclear localization and binding to chromatin. *Histochem Cell Biol*. 145, 389-399 (2016).
9. Kusakabe M, Oku H, Matsuda R, Hori T, Muto A, Igarashi K, Fukagawa T, Harata M. Genetic complementation analysis showed distinct contributions of the N-terminal tail of H2A.Z to epigenetic regulations. *Genes Cells*. 21, 122-135 (2016).
10. Yamazaki S, Yamamoto K, Harata M. Contribution of nuclear actin to transcription regulation. *Genom Data*. 4, 127-129 (2015).
11. Kitamura H, Matsumori H, Kalendova A, Hozak P, Goldberg IG, Nakao M, Saitoh N, Harata M. The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus. *Biochem Biophys Res Commun*. 464, 554-560 (2015).
12. Georgieva M, Staneva D, Uzunova K, Efremov T, Balashev K, Harata M, Miloshev G. The linker histone in *Saccharomyces cerevisiae* interacts with actin-related protein 4 and both regulate chromatin structure and cellular morphology. *Int J Biochem Cell Biol*. 59, 182-192 (2015).
13. Yamazaki S, Yamamoto K, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Harata M. Nuclear actin activates human transcription factor genes including the OCT4 gene. *Biosci Biotechnol Biochem*. 79, 242-246 (2015).
14. Osakabe A, Takahashi Y, Murakami H, Otawa K, Tachiwana H, Oma Y, Nishijima H,

- Shibahara KI, Kurumizaka H, Harata M. DNA binding properties of the actin-related protein Arp8 and its role in DNA repair. *PLoS One*. 9, e108354 (2014).
15. Horigome C, Oma Y, Konishi T, Schmid R, Marcomini I, Hauer MH, Dion V, Harata M, Gasser SM. SWR1 and INO80 chromatin remodelers contribute to DNA double-strand break perinuclear anchorage site choice. *Mol Cell*. 55, 626-639 (2014).
 16. Konishi T, Harata M. Improvement of the transformation efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* by altering carbon sources in pre-culture. *Biosci Biotechnol Biochem*. 78, 1090-1093 (2014).
 17. Kalendová A, Kalasová I, Yamazaki S, Uličná L, Harata M, Hozák P. Nuclear actin filaments recruit cofilin and actin-related protein 3, and their formation is connected with a mitotic block. *Histochem Cell Biol*. 142, 139-152 (2014).
 18. Nishibuchi I, Suzuki H, Kinomura A, Sun J, Liu NA, Horikoshi Y, Shima H, Kusakabe M, Harata M, Fukagawa T, Ikura T, Ishida T, Nagata Y, Tashiro S. Reorganization of damaged chromatin by the exchange of histone variant H2A.Z-2. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 89, 736-744 (2014).
 19. Ui A, Ogiwara H, Nakajima S, Kanno S, Watanabe R, Harata M, Okayama H, Harris CC, Yokota J, Yasui A, Kohno T. Possible involvement of LKB1-AMPK signaling in non-homologous end joining. *Oncogene*. 33, 1640-1648 (2014).
 20. 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. Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 69, 2431-2439 (2013).
- [学会発表]
1. Harata M., Nuclear actin family proteins: their contribution to functional organization in the nucleus, 4D Nucleome: The Cell Nucleus in Space and Time, クラクフ(ポーランド)2017年5月
 2. Harata M., Modulating gene functions for immunity and susceptibility to diseases: Towards epigenetic control of innate immunity., Lorentz Center Workshop - Innate Immunity of Crops, Livestock and Fish: The Dawn of Agricultural Immunology, ライデン(オランダ), 2016年9月
 3. Harata M., Roles of actin family proteins in chromatin and nuclear organization, 24th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus + 57th Symposium of the Society for Histochemistry, ウィーン(オーストリア), 2015年8月
 4. Harata M., Nuclear actin and ARPs involved in the functional organization of chromatin, The 2014 ASCB/IFCB Meeting, フィラデルフィア(アメリカ), 2014年12月
- 他、計 124 件



細胞分化にともなうクロマチン変動メカニズムの解明

平成 25 年度～平成 29 年度

大川 恭行 (九州大学・生体防御医学研究所・教授)

【研究目的】

本研究のきっかけとなったのはヒストン H3 のバリエーションはヒト及びマウスにおいてこれまで 5、6 種類存在することが確認されていたが、我々の先行解析の結果により、さらに多数存在することが明らかにしていたことであった。*in silico* でゲノムにコードされるヒストン様配列を検索した結果、マウスで新たに 14 種類、ヒトで少なくとも 3 種類の H3 バリエーションの存在が示唆された。マウスの 13 種類の H3 バリエーションは mRNA-seq により発現が確認されたのに加え、そのうちのいくつかについては質量分析によりタンパク質レベルでも検出された。そこで、新たに見つかったマウスヒストンバリエーション 13 種を H3mm6 から H3mm18 と命名した。本研究では、これら未発表の新規バリエーション解析を中心に、細胞分化制御におけるクロマチン変動メカニズムの解明を展開した。

【研究成果】

(1) 新規ヒストン H3 バリエーションによる細胞分化制御機構の解明

網羅的に同定した未知ヒストン遺伝子 2015 年に論文発表を行い、国際データベースに新規遺伝子として登録した。引き続き機能解析を進めた。骨格筋特異的な発現を示すヒストン H3mm7 については、徳島大学竹本龍也教授、長崎大学小野悠介准教授のグループとの共同研究によりノックアウトマウスを樹立し、骨格筋再生が著しく遅延することを明らかにした(図 1)。更に、骨格筋芽細胞 C2C12 をモデルとして H3mm7 の取り込みによるクロマチン弛緩作用を ATACseq により評価した結

果、H3mm7 は取り込み領域において弛緩したクロマチン構造を形成することを明らかにした。また、mRNAseq により得られたトランスクリプトームデータと比較の結果 H3mm7 により誘導されたクロマチン弛緩によって、ゲノムワイドに転写が亢進することを明らかにした(Hypertranscription)。

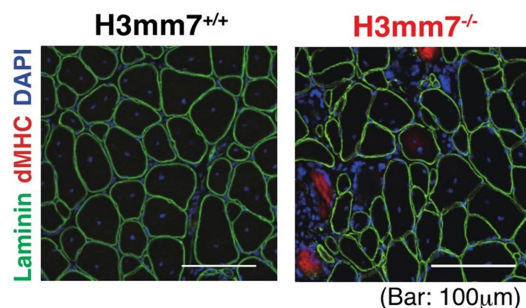


図 1. 筋損傷後2週間後の筋肉の免疫組織染色像

更に、ヌクレオソームレベルでの構造解析を胡桃坂グループと行い、H3mm7 が不安定なヌクレオソーム構造を形成することを明らかにし S57A のアミノ酸置換が特徴的な構造形成に必須であることを明らかにした。残り全ての未知ヒストンバリエーションについてノックアウトマウスの樹立を行い、現在も引き続き解析を行っている。尚、精巣特異的な H3t については近畿大学山縣一夫博士と共同で解析し、ノックアウトマウスは不妊の表現型を示すこと、精子形成過程に特徴的に形成されるクロマチン構造に必要であることを明らかにした。以上から、同定された未知ヒストン H3 バリエーションが生体内で重要な機能を担うことを明らかにした。

(2) トランスクリプトミクスによるクロマチン研究の確立

本研究において、次世代シーケンサー(NGS)

を用いたエピゲノム、トランスクリプトーム解析を領域内共同研究として、ゲノムワイドなクロマチン構造解析を大規模に推進し、トランスクリプトミクスとして体系化した。胡桃坂グループとの連携ではオーバーラッピングヌクレオソーム(OLDN)のゲノム上に存在する位置を NGS 解析により抽出を行い、転写活性化と相関していることを明らかにした。また、木村グループとの連携では、H3K27ac のゲノム上の分布をChIPseq 法により解析し、転写活性化との相関を明らかにした。斎藤グループとの連携では、total RNAseq を行い、新規 non-coding RNA 同定の基となった。米田グループとの連携では核膜輸送タンパク質 Crm1、核膜孔を形成する Nup98 と Hox 遺伝子の融合タンパク質のゲノム上局在を同定し融合タンパク質による発がん機序の解明に繋がった。河野グループとは、弛緩しやすいヌクレオソームに特徴的な核酸配列の抽出を行った。これら解析に加えて公募班とも多くの共同研究を行い、分子から個体レベルで、発生、分化、そしてその破綻である疾病にわたる様々な局面においてゲノムワイドなクロマチン解析を多角的に行い計 71 報の論文発表をおこなった。また、これら大規模解析は九州大学情報基盤センターのスーパーコンピューターを活用し行われ、NGS データ解析の迅速化による機動的な研究活動に貢献した。

【本研究課題に関する主要成果】

〔雑誌論文〕査読あり 84 件、査読なし 1 件

1. Harada A, Maehara K, Handa T, Arimura Y, Nogami J, Hayashi-Takanaka Y, Shirahige K, Kurumizaka H, *Kimura H, *Ohkawa Y. A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling with lower input. *Nat Cell Biol.* in press.
2. 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. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. *Nat Commun.* 9, 1400 (2018).

3. 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. 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 (2018).
4. Takashima Y, Horisawa K, Udono M, Ohkawa Y, Suzuki A. Prolonged inhibition of hepatocellular carcinoma cell proliferation by combinatorial expression of defined transcription factors. *Cancer Sci.* 109, 3543-3553 (2018).
5. Katoh-Fukui Y, Baba T, Sato T, Otake H, Nagakui-Noguchi Y, Shindo M, Suyama M, Ohkawa Y, Tsumura H, Morohashi KI, Fukami M. Mouse polycomb group gene Cbx2 promotes osteoblastic but suppresses adipogenic differentiation in postnatal long bones. *Bone.* 120, 219-231 (2018).
6. Luo D, Kato D, Nogami J, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Kono H. MNase, as a probe to study the sequence-dependent site exposures in the +1 nucleosomes of yeast. *Nucleic Acids Res.* 46, 7124-7137 (2018).
7. Sugimoto N, Maehara K, Yoshida K, Ohkawa Y, Fujita M. Genome-wide analysis of the spatiotemporal regulation of firing and

- dormant replication origins in human cells. *Nucleic Acids Res.* 46, 6683-6696 (2018).
8. Kita Y, Katayama Y, Shiraiishi T, Oka T, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Miyata K, Oike Y, Shirane M, Nishiyama M, Nakayama KI. The Autism-Related Protein CHD8 Cooperates with C/EBPbeta to Regulate Adipogenesis. *Cell Rep.* 23, 1988-2000 (2018).
 9. Matsuda A, Asada Y, Suita N, Iwamoto S, Hirakata T, Yokoi N, Ohkawa Y, Okada Y, Yokomizo T, Ebihara N. Transcriptome profiling of refractory atopic keratoconjunctivitis by RNA sequencing. *J Allergy Clin Immunol.* 21, piiS0091-6749 31639-31647 (2018).
 10. Baba T, Otake H, Inoue M, Sato T, Ishihara Y, Moon JY, Tsuchiya M, Miyabayashi K, Ogawa H, Shima Y, Wang L, Sato R, Yamazaki T, Suyama M, Nomura M, Choi MH, Ohkawa Y, Morohashi KI. Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids. *Commun Biol.* 1, 18 (2018).
 11. Takizawa Y, Tanaka H, Machida S, Koyama M, Maehara K, Ohkawa Y, Wade PA, Wolf M, Kurumizaka H. Cryo-EM structure of the nucleosome containing the ALB1 enhancer DNA sequence. *Open Biol.* 8, pii170255 (2018).
 12. Noda T, Meas SJ, Nogami J, Amemiya Y, Uchi R, Ohkawa Y, Nishimura K, Dabdoub A. Direct Reprogramming of Spiral Ganglion Non-neuronal Cells into Neurons: Toward Ameliorating Sensorineural Hearing Loss by Gene Therapy. *Front Cell Dev Biol.* 6, 16 (2018).
 13. Ueda M, Sato T, Ohkawa Y, Inoue YH. Identification of miR-305, a microRNA that promotes aging, and its target mRNAs in Drosophila. *Genes Cells.* 23, 80-93 (2018).
 14. Kondo Y, Higa S, Iwasaki T, Matsumoto T, Maehara K, Harada A, Baba Y, Fujita M, Ohkawa Y. Sensitive detection of fluorescence in western blotting by merging images. *PLoS One.* 13, e0191532 (2018).
 15. Kajitani T, Kato H, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y, Kimura H, Ohkawa Y, Obuse C, Hermand D, Murakami Y. Ser7 of RNAPII-CTD facilitates heterochromatin formation by linking ncRNA to RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114, E11208-E11217 (2017).
 16. Harada A, *Ohkawa Y, *Imbalzano AN. Temporal regulation of chromatin during myoblast differentiation. *Semin Cell Dev Biol.* 72, 77-86 (2017).
 17. Shimaji K, Tanaka R, Maeda T, Ozaki M, Yoshida H, Ohkawa Y, Sato T, Suyama M, Yamaguchi M. Histone methyltransferase G9a is a key regulator of the starvation-induced behaviors in Drosophila melanogaster. *Sci Rep.* 7, 14763 (2017).
 18. Yuda J, Miyamoto T, Odawara J, Ohkawa Y, Semba Y, Hayashi M, Miyamura K, Tanimoto M, Yamamoto K, Taniwaki M, Akashi K. Persistent detection of alternatively spliced BCR-ABL variant results in a failure to achieve deep molecular response. *Cancer Sci.* 108, 2204-2212 (2017).
 19. Adachi Y, Umeda M, Kawazoe A, Sato T, Ohkawa Y, Kitajima S, Izawa S, Sagami I, Taketani S. The novel heme-dependent

- inducible protein, SRRD regulates heme biosynthesis and circadian rhythms. *Arch Biochem Biophys.* 631, 19-29 (2017).
20. Sasaki F, Koga T, Saeki K, Okuno T, Kazuno S, Fujimura T, Ohkawa Y, Yokomizo T. Biochemical and immunological characterization of a novel monoclonal antibody against mouse leukotriene B4 receptor 1. *PLoS One.* 12, e0185133 (2017).
 21. Fukuda K, Inoguchi Y, Ichiyanagi K, Ichiyanagi T, Go Y, Nagano M, Yanagawa Y, Takaesu N, Ohkawa Y, Imai H, Sasaki H. Evolution of the sperm methylome of primates is associated with retrotransposon insertions and genome instability. *Hum Mol Genet.* 26, 3508-3519 (2017).
 22. Semba Y, Harada A, Maehara K, Oki S, Meno C, Ueda J, Yamagata K, Suzuki A, Onimaru M, Nogami J, Okada S, Akashi K, *Ohkawa Y. Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 45, 8758-8772 (2017).
 23. Kudou K, Komatsu T, Nogami J, Maehara K, Harada A, Saeki H, Oki E, Maehara Y, *Ohkawa Y. The requirement of Mettl3-promoted MyoD mRNA maintenance in proliferative myoblasts for skeletal muscle differentiation. *Open Biol.* 7, pii170119 (2017).
 24. Hara M, Kobayakawa K, Ohkawa Y, Kumamaru H, Yokota K, Saito T, Kijima K, Yoshizaki S, Harimaya K, Nakashima Y, Okada S. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nat Med.* 23, 818-828 (2017).
 25. Nakayama A, Nakaoka H, Yamamoto K, Sakiyama M, Shaikat A, Toyoda Y, Okada Y, Kamatani Y, Nakamura T, Takada T, Inoue K, Yasujima T, Yuasa H, Shirahama Y, Nakashima H, Shimizu S, Higashino T, Kawamura Y, Ogata H, Kawaguchi M, Ohkawa Y, Danjoh I, et al. GWAS of clinically defined gout and subtypes identifies multiple susceptibility loci that include urate transporter genes. *Ann Rheum Dis.* 76, 869-877 (2017).
 26. Taguchi H, Xie Y, Horikoshi N, Maehara K, Harada A, Nogami J, Sato K, Arimura Y, Osakabe A, Kujirai T, Iwasaki T, Semba Y, Tachibana T, Kimura H, *Ohkawa Y, *Kurumizaka H. Crystal Structure and Characterization of Novel Human Histone H3 Variants, H3.6, H3.7, and H3.8. *Biochemistry.* 56, 2184-2196 (2017).
 27. Kato D, Osakabe A, Arimura Y, Mizukami Y, Horikoshi N, Saikusa K, Akashi S, Nishimura Y, Park SY, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Matsumoto A, Kono H, Inoue R, Sugiyama M, Kurumizaka H. Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. *Science.* 356, 205-208 (2017).
 28. Kujirai T, Horikoshi N, Sato K, Maehara K, Machida S, Osakabe A, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. *Nucleic Acids Res.* 45, 3612 (2017).
 29. Nakamura T, Murakami K, Tada H, Uehara Y, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Saitoh H,

- Nishitani H, Ono T, Nishi R, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Thymine DNA glycosylase modulates DNA damage response and gene expression by base excision repair-dependent and independent mechanisms. *Genes Cells*. 22, 392-405 (2017).
30. Li B, Baba T, Miyabayashi K, Sato T, Shima Y, Ichinose T, Miura D, Ohkawa Y, Suyama M, Morohashi KI. Role of Ad4-binding protein/steroidogenic factor 1 in regulating NADPH production in adrenocortical Y-1 cells. *Endocr J*. 64, 315-324 (2017).
31. Umegawachi T, Yoshida H, Koshida H, Yamada M, Ohkawa Y, Sato T, Suyama M, Krause HM, Yamaguchi M. Control of tissue size and development by a regulatory element in the yorkie 3'UTR. *Am J Cancer Res*. 7, 673-687 eCollection 2017. (2017).
32. Yokota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Ohkawa Y, Harada A, Okazaki K, Ishihara K, Yoshida S, Kudo A, Iwamoto Y, Okada S. Periostin Promotes Scar Formation through the Interaction between Pericytes and Infiltrating Monocytes/Macrophages after Spinal Cord Injury. *Am J Pathol*. 187, 639-653 (2017).
33. Shishido Y, Baba T, Sato T, Shima Y, Miyabayashi K, Inoue M, Akiyama H, Kimura H, Kanai Y, Ishihara Y, Haraguchi S, Miyazaki A, Rozman D, Yamazaki T, Choi MH, Ohkawa Y, Suyama M, Morohashi KI. Differential lactate and cholesterol synthetic activities in XY and XX Sertoli cells. *Sci Rep*. 7, 41912 (2017).
34. 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, et al. Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep*. 18, 593-600 (2017).
35. Miyabayashi K, Shima Y, Inoue M, Sato T, Baba T, Ohkawa Y, Suyama M, Morohashi KI. Alterations in Fetal Leydig Cell Gene Expression during Fetal and Adult Development. *Sex Dev*. 11, 53-63 (2017).
36. Sawano S, Komiya Y, Ichitsubo R, Ohkawa Y, Nakamura M, Tatsumi R, Ikeuchi Y, Mizunoya W. A One-Step Immunostaining Method to Visualize Rodent Muscle Fiber Type within a Single Specimen. *PLoS One*. 11, e0166080 (2016).
37. Kuniyoshi Y, Maehara K, Iwasaki T, Hayashi M, Semba Y, Fujita M, Sato Y, Kimura H, Harada A, Ohkawa Y. Identification of Immunoglobulin Gene Sequences from a Small Read Number of mRNA-Seq Using Hybridomas. *PLoS One*. 11, e0165473 (2016).
38. Terada M, Horisawa K, Miura S, Takashima Y, Ohkawa Y, Sekiya S, Matsuda-Ito K, Suzuki A. Kupffer cells induce Notch-mediated hepatocyte conversion in a common mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Sci Rep*. 6, 34691 (2016).
39. Katayama Y, Nishiyama M, Shoji H, Ohkawa Y, Kawamura A, Sato T, Suyama M, Takumi T, Miyakawa T, Nakayama KI. CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature*. 537, 675-679

- (2016).
40. Iwamori N, Tominaga K, Sato T, Riehle K, Iwamori T, Ohkawa Y, Coarfa C, Ono E, Matzuk MM. MRG15 is required for pre-mRNA splicing and spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113, E5408-E5415 (2016).
 41. Kujirai T, Horikoshi N, Sato K, Maehara K, Machida S, Osakabe A, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. *Nucleic Acids Res*. 44, 6127-6141 (2016).
 42. Torigata K, Daisuke O, Mukai S, Hatanaka A, Ohka F, Motooka D, Nakamura S, Ohkawa Y, Yabuta N, Kondo Y, Nojima H. LATS2 Positively Regulates Polycomb Repressive Complex 2. *PLoS One*. 11, e0158562 (2016).
 43. Yabe-Wada T, Matsuba S, Takeda K, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Takai T, Shi H, Philpott CC, Nakamura A. TLR signals posttranscriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin. *Sci Rep*. 6, 26566 (2016).
 44. Yokota K, Saito T, Kobayakawa K, Kubota K, Hara M, Murata M, Ohkawa Y, Iwamoto Y, Okada S. The feasibility of in vivo imaging of infiltrating blood cells for predicting the functional prognosis after spinal cord injury. *Sci Rep*. 6, 25673 (2016).
 45. Kaimori JY, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep*. 6, 24318 (2016).
 46. Kobayashi W, Takaku M, Machida S, Tachiwana H, Maehara K, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Chromatin architecture may dictate the target site for DMC1, but not for RAD51, during homologous pairing. *Sci Rep*. 6, 24228 (2016).
 47. Tanaka M, Shiota M, Nakao T, Uemura R, Nishi S, Ohkawa Y, Matsumoto M, Yamaguchi M, Osada-Oka M, Inagaki A, Takahashi K, Nakayama KI, Gi M, Izumi Y, Miura K, Iwao H. Identification of low-abundance proteins in serum via the isolation of HSP72 complexes. *J Proteomics*. 136, 214-221 (2016).
 48. Inoue M, Shima Y, Miyabayashi K, Tokunaga K, Sato T, Baba T, Ohkawa Y, Akiyama H, Suyama M, Morohashi K. Isolation and Characterization of Fetal Leydig Progenitor Cells of Male Mice. *Endocrinology*. 157, 1222-1233 (2016).
 49. Hayashi M, Maehara K, Harada A, Semba Y, Kudo K, Takahashi H, Oki S, Meno C, Ichiyangi K, Akashi K, *Ohkawa Y. Chd5 Regulates MuERV-L/MERVL Expression in Mouse Embryonic Stem Cells Via H3K27me3 Modification and Histone H3.1/H3.2. *J Cell Biochem*. 117, 780-792 (2016).
 50. Maehara K, *Ohkawa Y. Exploration of nucleosome positioning patterns in transcription factor function. *Sci Rep*. 6, 19620 (2016).
 51. Urahama T, Harada A, Maehara K, Horikoshi N, Sato K, Sato Y, Shiraiishi 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).
52. Oka M, Mura S, Yamada K, Sangel P, Hirata S, Maehara K, Kawakami K, Tachibana T, Ohkawa Y, Kimura H, Yoneda Y. Chromatin-prebound Crml recruits Nup98-HoxA9 fusion to induce aberrant expression of Hox cluster genes. *Elife*. 5, e09540 (2016).
53. Hayashi-Takanaka Y, Maehara K, Harada A, Umehara T, Yokoyama S, Obuse C, Ohkawa Y, Nozaki N, Kimura H. Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Chromosome Res*. 23, 753-766 (2015).
54. Hatanaka Y, Inoue K, Oikawa M, Kamimura S, Ogonuki N, Kodama EN, Ohkawa Y, Tsukada Y, Ogura A. Histone chaperone CAF-1 mediates repressive histone modifications to protect preimplantation mouse embryos from endogenous retrotransposons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112, 14641-14646 (2015).
55. Shimaji K, Konishi T, Tanaka S, Yoshida H, Kato Y, Ohkawa Y, Sato T, Suyama M, Kimura H, Yamaguchi M. Genomewide identification of target genes of histone methyltransferase dG9a during Drosophila embryogenesis. *Genes Cells*. 20, 902-914 (2015).
56. 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, pii150128 (2015).
57. Maehara K, Harada A, Sato Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kimura H, *Ohkawa Y. Tissue-specific expression of histone H3 variants diversified after species separation. *Epigenetics Chromatin*. 8, 35 (2015).
58. Maehara K, *Ohkawa Y. agplus: a rapid and flexible tool for aggregation plots. *Bioinformatics*. 31, 3046-3047 (2015).
59. Yokota K, Kobayakawa K, Kubota K, Miyawaki A, Okano H, Ohkawa Y, Iwamoto Y, Okada S. Engrafted Neural Stem/Progenitor Cells Promote Functional Recovery through Synapse Reorganization with Spared Host Neurons after Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports*. 5, 264-277 (2015).
60. Nishimura T, Sato T, Yamamoto Y, Watakabe I, Ohkawa Y, Suyama M, Kobayashi S, Tanaka M. Sex determination. foxl3 is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka. *Science*. 349, 328-331 (2015).
61. Sugimoto N, Maehara K, Yoshida K, Yasukouchi S, Osano S, Watanabe S, Aizawa M, Yugawa T, Kiyono T, Kurumizaka H, Ohkawa Y, Fujita M. Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone-binding protein that facilitates MCM loading through its influence on chromatin architecture. *Nucleic Acids Res*. 43, 5898-5911 (2015).
62. Ohnishi YH, Ohnishi YN, Nakamura T, Ohno M, Kennedy PJ, Ohkawa Y, Nishi A, Neve R, Tsuzuki T, Nestler EJ. Correction: PSMC5, a 19S proteasomal ATPase, regulates cocaine

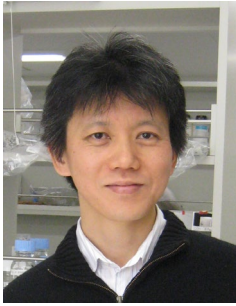
- action in the nucleus accumbens. *PLoS One*. 10, e0131263 (2015).
63. Nasipak BT, Padilla-Benavides T, Green KM, Leszyk JD, Mao W, Konda S, Sif S, Shaffer SA, Ohkawa Y, Imbalzano AN. Opposing calcium-dependent signalling pathways control skeletal muscle differentiation by regulating a chromatin remodelling enzyme. *Nat Commun*. 6, 7441 (2015).
 64. Ohnishi YH, Ohnishi YN, Nakamura T, Ohno M, Kennedy PJ, Ohkawa Y, Nishi A, Neve R, Tsuzuki T, Nestler EJ. PSMC5, a 19S Proteasomal ATPase, Regulates Cocaine Action in the Nucleus Accumbens. *PLoS One*. 10, e0126710 (2015).
 65. Tomita S, Abdalla MO, Fujiwara S, Matsumori H, Maehara K, Ohkawa Y, Iwase H, Saitoh N, Nakao M. A cluster of noncoding RNAs activates the ESR1 locus during breast cancer adaptation. *Nat Commun*. 6, 6966 (2015).
 66. Kawaguchi T, Tanigawa A, Naganuma T, Ohkawa Y, Souquere S, Pierron G, Hirose T. SWI/SNF chromatin-remodeling complexes function in noncoding RNA-dependent assembly of nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112, 4304-4309 (2015).
 67. Harada A, Mallappa C, Okada S, Butler JT, Baker SP, Lawrence JB, *Ohkawa Y, *Imbalzano AN. Spatial re-organization of myogenic regulatory sequences temporally controls gene expression. *Nucleic Acids Res*. 43, 2008-2021 (2015).
 68. Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, Hatakeyama S. MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. *Nat Commun*. 6, 5941 (2015).
 69. Nakamura M, Shibata K, Hatano S, Sato T, Ohkawa Y, Yamada H, Ikuta K, Yoshikai Y. A genome-wide analysis identifies a notch-RBP-J alpha-IL-7R gamma axis that controls IL-17-producing gamma-delta T cell homeostasis in mice. *J Immunol*. 194, 243-251 (2015).
 70. Harada A, Maehara K, Sato Y, Konno D, Tachibana T, Kimura H, *Ohkawa Y. Incorporation of histone H3.1 suppresses the lineage potential of skeletal muscle. *Nucleic Acids Res*. 43, 775-786 (2015).
 71. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, Kallies A, Nutt SL, Sakaguchi S, Takeda K, Kurosaki T, Baba Y. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*. 41, 1040-1051 (2014).
 72. Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H. Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Nature*. 516, 272-275 (2014).
 73. Oki S, Maehara K, Ohkawa Y, Meno C. SraTailor: graphical user interface software for processing and visualizing ChIP-seq data. *Genes Cells*. 19, 919-926 (2014).

74. Tamura I, Ohkawa Y, Sato T, Suyama M, Jozaki K, Okada M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Sato S, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol*. 28, 1656-1669 (2014).
75. Kobayakawa K, Kumamaru H, Saiwai H, Kubota K, Ohkawa Y, Kishimoto J, Yokota K, Ideta R, Shiba K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Iwamoto Y, Okada S. Acute hyperglycemia impairs functional improvement after spinal cord injury in mice and humans. *Sci Transl Med*. 6, 256ra137 (2014).
76. Tanaka M, Yamaguchi M, Shiota M, Kawamoto Y, Takahashi K, Inagaki A, Osada-Oka M, Harada A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Iwao H, Ohkawa Y. Establishment of neutralizing rat monoclonal antibodies for fibroblast growth factor-2. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 33, 261-269 (2014).
77. Yokoyama A, Igarashi K, Sato T, Takagi K, Otsuka I M, Shishido Y, Baba T, Ito R, Kanno J, Ohkawa Y, Morohashi K, Sugawara A. Identification of myelin transcription factor 1 (MyT1) as a subunit of the neural cell type-specific lysine-specific demethylase 1 (LSD1) complex. *J Biol Chem*. 289, 18152-18162 (2014).
78. Ueda J, Maehara K, Mashiko D, Ichinose T, Yao T, Hori M, Sato Y, Kimura H, Ohkawa Y, Yamagata K. Heterochromatin dynamics during the differentiation process revealed by the DNA methylation reporter mouse, MethylRO. *Stem Cell Reports*. 2, 910-924 (2014).
79. Tanaka M, Mun S, Harada A, Ohkawa Y, Inagaki A, Sano S, Takahashi K, Izumi Y, Osada-Oka M, Wanibuchi H, Yamagata M, Yukimura T, Miura K, Shiota M, Iwao H. Hsc70 contributes to cancer cell survival by preventing Rab1A degradation under stress conditions. *PLoS One*. 9, e96785 (2014).
80. Baba T, Otake H, Sato T, Miyabayashi K, Shishido Y, Wang CY, Shima Y, Kimura H, Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, Ohkawa Y, Suyama M, Chung BC, Morohashi K. Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Nat Commun*. 5, 3634 (2014).
81. Harada A, Hayashi M, Kuniyoshi Y, Semba Y, Sugahara S, Tachibana T, Ohkawa Y, Fujita M. Generation of a monoclonal antibody for INI1/hSNF5/BAF47. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 33, 49-51 (2014).
82. Harada A, Okazaki E, Okada S, Tachibana T, Ohkawa Y. Production of a monoclonal antibody for C/EBP beta: the subnuclear localization of C/EBP beta in mouse L929 cells. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 33, 34-37 (2014).
83. LeBlanc SE, Wu Q, Barutcu AR, Xiao H, Ohkawa Y, Imbalzano AN. The PPAR gamma locus makes long-range chromatin interactions with selected tissue-specific gene loci during adipocyte differentiation in a protein kinase A dependent manner. *PLoS One*. 9, e86140 (2014).
84. Kitajima K, Oki S, Ohkawa Y, Sumi T, Meno C. Wnt signaling regulates left-right axis formation in the node of mouse embryos. *Dev*

- Biol.* 380, 222-232 (2013).
85. Katahira J, Okuzaki D, Inoue H, Yoneda Y, Maehara K, Ohkawa Y. Human TREX component Thoc5 affects alternative polyadenylation site choice by recruiting mammalian cleavage factor I. *Nucleic Acids Res.* 41, 7060-7072 (2013).
- [学会発表]
1. Ohkawa Y., Myogenic chromatin structure is formed with the novel histone H3 variant., EMBO Workshop Histone Variants, ミュンヘン (ドイツ), 2017年9月
 2. Ohkawa Y., Tissue - specific Chromatin Structures According Histone H3 Variants, 第12回国際ゲノム会議, 東京, 2017年6月
 3. Ohkawa Y., The baselines of transcription levels are determined by selective incorporation of histone H3 variants, Transcriptional and Epigenetic Control in Stem Cells (J1), カリフォルニア(アメリカ), 2017年1月
 4. Ohkawa Y., Histone variants and cell differentiation, Colorado Chromatin Meeting 2016, コロラド(アメリカ), 2016年8月
 5. Ohkawa Y., N6-methyladenosine is required for the processing of MyoD pre-mRNA for maintaining skeletal muscle differentiation potential., Keystone Symposia, バンクーバー(カナダ), 2016年3月
 6. Ohkawa Y., The Diversity of Mouse Histone H3 Variants, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015年8月
 7. Ohkawa Y., The diversity of mouse histone H3 variants., Epigenomics (Z2), キーストン(アメリカ), 2015年3月
 8. Ohkawa Y., Incorporation of Histone H3 Variants Dictates the Lineage Potential of Skeletal Muscle., Transcriptional and Epigenetic Influences on Stem Cell States (C9), コロラド(アメリカ), 2015年3月
 9. Harada A., Maehara K., Sato Y., Kimura H., Ohkawa Y., Incorporation of Histone H3 Variants Dictates the Lineage Potential of Skeletal Muscle., FASEB; Science Research Conferences, コロラド(アメリカ), 2014年7月
 10. Ohkawa Y., Diversity of histone H3 variants on mouse genome, EMBO Workshop Histone variants, ストラスブール(フランス), 2014年6月
 11. Ohkawa Y., Kurumizaka H., Kimura H., High order chromatin regulation in skeletal muscle differentiation, 第86回日本生化学会大会, 横浜, 9月
 12. 大川恭行, Epigenomic approach unveils cell fate decision, 日本遺伝学会第85回大会, 横浜, 2013年9月
- 他、計63件

Ⅱ. 各研究課題の成果

公募研究



ヘテロクロマチン結合複合体によるゲノム安定性の動的制御
 平成 26 年度～平成 27 年度
 新規分子 CAMP を含むヘテロクロマチン結合複合体によるゲ
 ノム安定性維持機構
 平成 28 年度～平成 29 年度
 田中 耕三 (東北大学・加齢医学研究所・教授)

【研究目的】

クロマチンの動的な構造制御にはヘテロクロマチン形成が重要な役割を果たしており、これには HP1(heterochromatin protein 1)を含むヘテロクロマチン結合複合体が関与している。HP1 は、遺伝子発現制御だけでなく DNA 損傷応答や染色体分配にも関与しており、ゲノムの安定性全般を制御していると考えられる。我々は HP1 と複合体を形成する新規分子 CAMP (chromosome alignment-maintaining phosphoprotein) が、染色体分配に必須であることを明らかにした(*EMBO J* 2011)。CAMP は HP1 の他に DNA 損傷応答に関与する Rev7, 染色体分配に関与する POGZ と複合体を形成している。そこで我々は本領域において、CAMP を含むヘテロクロマチン結合複合体が、DNA 損傷応答や染色体分配を通じてゲノム安定性に果たす役割を、分子・細胞および個体レベルで明らかにすることを目的とした。

【研究成果】

(1) CAMP と Rev7, HP, POGZ との複合体の構造解析

CAMP, Rev7, HP1, POGZ を昆虫細胞で発現させて精製し、これらが複合体を形成することを確認した。このうち CAMP と Rev7 の結合に関しては、CAMP の中央部分の WK 領域と名付けた部分が Rev7 と結合することが判明し、静岡県立大学橋本博教授との共同研究により、CAMP と Rev7 の複合体の立体構造を明らかにした(*J Biol Chem* 2017; 図 1)。

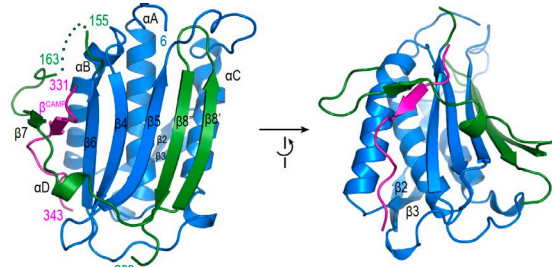


図1. CAMP と Rev7 の複合体の立体構造

興味深いことに、Rev7 における CAMP との結合部位は、すでに損傷乗り越え修復に関与する Rev3 との結合部位であることが知られている seat belt と呼ばれる領域であり、この領域は最近 DNA2 本鎖切断末端を保護する Shieldin 複合体との結合部位でもあることが報告された。このことは、Rev7 が異なる複合体の構成因子として、ゲノム安定性を司る様々な機能に関与していることを示唆している。一方 CAMP と HP1, POGZ との結合には、共に CAMP の C 端側の領域が関与することが明らかになった。また金沢大学古寺哲幸教授との共同研究による高速 AFM での解析により、CAMP が両端の Zn フィンガー領域に相当する球状部位と、それらに挟まれた天然変性領域より成ることが明らかになった。Rev7 あるいは POGZ の C 端側が共存する状況では、高速 AFM での観察で CAMP の天然変性領域が見えなくなることから、これらのタンパク質との会合により、CAMP の天然変性領域の構造変化が起こっていることが示唆された。

(2) CAMP を含む複合体の機能の細胞レベルで

の解析

Rev7, POGZ が DNA2 本鎖切断の修復に関与するという報告があることから、CAMP が DNA2 本鎖切断の修復に関与する可能性について解析を行った。その結果、CAMP の発現抑制細胞は camptothecin や X 線に対して高感受性を示し、1 本鎖 DNA のマーカーであるリン酸化 RPA の減少などを認めたことから、2 本鎖 DNA 切断部位の end resection が抑制される結果、相同組換えによる修復の障害が起こることが明らかになった。このことは、CAMP が POGZ 同様相同組換え修復に関与することを示唆している。一方 Rev7 は前述の Shieldin 複合体の構成因子として非相同末端結合を促進することから、CAMP とその結合分子は、DNA2 本鎖切断の修復の制御に重要な役割を果たしているものと考えられる。

(3) CAMP を含む複合体の個体レベルでの解析
国際共同研究により、小児の発達障害で CAMP 遺伝子(CHAMPI)の変異が見られることを報告した(*Hum Mutat* 2016; 図 2)。

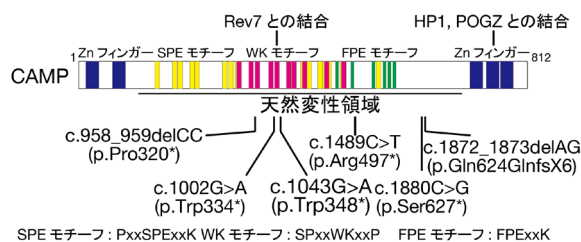


図2. CAMP の構造と発達障害で認められる変異

CAMP の変異は C 末端領域の欠失を生じることから、POGZ との複合体形成が損なわれている可能性が示唆された。興味深いことに POGZ についても発達障害で変異が認められ、CAMP と同様に C 末端領域の欠失を生じると予想されることから、CAMP と POGZ の複合体形成が神経系の発達に重要である

可能性が示唆された。CAMP の個体レベルでの機能を解析するために、CAMP ノックアウトマウスを作成したところ、ホモノックアウトマウスは出生後数日で死亡することが明らかになった。発達障害との関連を探るために、現在 CAMP ノックアウトマウスの脳切片や単離した神経細胞の解析、および CAMP ヘテロノックアウトマウスの行動解析などを行なっている。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Tanaka K, Goto H, Nishimura Y, Kasahara K, Mizoguchi A, Inagaki M. Tetraploidy in cancer and its possible link to aging, *Cancer Sci.* 109, 2632-2640 (2018).
2. Itoh G, Ikeda M, Iemura K, Amin MA, Kurimiya S, Tanaka M, Mizuno N, Osakada H, Haraguchi T, Tanaka K. Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment. *Sci Rep.* 8, 3888 (2018).
3. Konishi M, Shindo N, Komiya M, Tanaka K, Itoh T, Hirota T. Quantitative analyses of the metaphase-to-anaphase transition reveal differential kinetic regulation for securin and cyclin B1. *Biomed Res.* 39, 75-85 (2018).
4. Li J, Shima H, Nishizawa H, Ikeda M, Brydun A, Matsumoto M, Kato H, Saiki Y, Liu L, Watanabe-Matsui M, Iemura K, Tanaka K, Shiraki T, Igarashi K. Phosphorylation of BACH1 switches its function from transcription factor to mitotic chromosome regulator and promotes its

- interaction with HMMR. *Biochem J.* 475, 981 (2018).
5. Hara K, Taharazako S, Ikeda M, Fujita H, Mikami Y, Kikuchi S, Hishiki A, Yokoyama H, Ishikawa Y, Kanno SI, Tanaka K, Hashimoto H. Dynamic feature of mitotic arrest deficient 2-like protein 2 (MAD2L2) and structural basis for its interaction with chromosome alignment maintaining phosphoprotein (CAMP). *J Biol Chem.* 292, 17658-17667 (2017).
 6. Ikeda M, Tanaka K. Plk1 bound to Bub1 contributes to spindle assembly checkpoint activity during mitosis. *Sci Rep.* 7, 8794 (2017).
 7. Asai Y, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Maekawa M, Honma M, Ikeda M, Murakami K, Munakata Y, Shirai Y, Kodama S, Sugisawa T, Chiba Y, Kondo Y, Kaneko K, Uno K, Sawada S, Imai J, Nakamura Y, Yamaguchi H, Tanaka K, Sasano H, Mano N, Ueno Y, Shimosegawa T, Katagiri H. Activation of the Hypoxia Inducible Factor 1 alpha subunit pathway in steatotic liver contributes to formation of cholesterol gallstones. *Gastroenterology.* 152, 1521-1535.e8 (2017).
 8. Tanaka K, Hirota T. Chromosomal instability: A common feature and a therapeutic target of cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1866, 64-75 (2016).
 9. Takahashi M, Tanaka K, Wakai T, and Hirota T. Phosphoproteomic analysis of human mitotic chromosomes identified a chromokinesin KIF4A. *Biomed Res.* 37, 161-165 (2016).
 10. Hasanpourghadi M, Karthikeyan C, Pandurangan AK, Looi CY, Trivedi P, Kobayashi K, Tanaka K, Wong WF, Mustafa MR. Targeting of tubulin polymerization and induction of mitotic blockage by Methyl 2-(5-fluoro-2-hydroxyphenyl)-1H-benzo[d]imidazole-5-carboxylate (MBIC) in human cervical cancer HeLa cell. *J Exp Clin Cancer Res.* 35, 58 (2016).
 11. Isidor B, Küry S, Rosenfeld JA, Besnard T, Schmitt S, Joss S, Davies SJ, Lebel RR, Henderson A, Schaaf CP, Streff HE, Yang Y, Jain V, Chida N, Latypova X, Caignec CL, Cogné B, Mercier S, Vincent M, Colin E, Bonneau D, Denommé AS, Parent P, Gilbert-Dussardier B, Odent S, Toutain A, Piton A, Dina C, Donnart A, Lindenbaum P, Charpentier E, Redon R, Iemura K, Ikeda M, Tanaka K, Bézieau S. De Novo Truncating Mutations in the kinetochore-microtubules attachment gene *CHAMPI* Cause Syndromic Intellectual Disability. *Hum Mutat.* 37, 354-358 (2016).
 12. Iemura K, Tanaka K. Chromokinesin Kid and kinetochore kinesin CENP-E differentially support chromosome congression without end-on attachment to microtubules. *Nat Commun.* 6, 6447 (2015).
 13. Amin MA, Kobayashi K, Tanaka K. CLIP-170 tethers kinetochores to microtubule plus ends against poleward force by dynein for stable kinetochore-microtubule attachment. *FEBS Lett.* 589, 2739-2746 (2015).
 14. Ohira M, Iwasaki Y, Tanaka C, Kuroki M, Matsuo N, Kitamura T, Yukuhiro M, Morimoto H, Pang N, Liu B, Kiyono T,

A01 公募研究(代表)

- Amemiya M, Tanaka K, Yoshida K, Sugimoto N, Ohshima T, Fujita M. A novel anti-microtubule agent with carbazole and benzohydrazide structures suppresses tumor cell growth in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 1850, 1676-1684 (2015).
15. Amin MA, Itoh G, Iemura K, Ikeda M, Tanaka K. CLIP-170 recruits PLK1 to kinetochores during early mitosis for chromosome alignment. *J Cell Sci*. 127, 2818-2824 (2014).
- [学会発表]
1. 田中耕三、新規分子 CAMP による分裂期細胞死制御機構、第26回日本 Cell Death 学会 学術集、東京、2017年7月
 2. 田中耕三、池田真教、藤田拓樹、古寺哲幸、安藤敏夫、家村顕自、永井正義、天然変性タンパク質 CAMP を含む複合体の機能解析、第17回日本蛋白質科学会年会、仙台、2017年6月
 3. Kozo Tanaka, Alterations in chromosome dynamics impair the fidelity of chromosome transmission, International Workshop on Quantitative Biology 2017, 横浜, 2017年4月
 4. 田中耕三、新規分子 CAMP による分裂期細胞死制御機構、第26回日本 Cell Death 学会 学術集、東京、2017年7月
 5. 田中耕三、染色体不安定性とがん、第75回日本癌学会学術総会、横浜、2016年10月
 6. Kozo Tanaka, Defective chromosome dynamics as a cause of chromosomal instability in cancer, International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (KSMCB) 2016, ソウル(韓国), 2016年10月
 7. 田中耕三、効率的な染色体整列の異常による染色体不安定性の出現、第75回日本癌学会学術総会、名古屋、2016年10月
 8. 田中耕三、天然変性ハブ CAMP の機能と疾患・創薬との関連、よこはま NMR 研究会第54回ワークショップ、横浜、2016年1月
 9. 田中耕三、効率的な染色体整列の異常による染色体不安定性の出現、第74回日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月
 10. 田中耕三、染色体不安定性と発がん、第9回日本エピジェネティクス研究会、東京、2015年5月
 11. Kozo Tanaka, Chromosomal instability: a road to cancer and aging, Alfred Benzon Workshop, コペンハーゲン(デンマーク), 2015年5月
 12. 田中耕三、動原体キネシン CENP-E とクロモキネシン Kid による染色体運動の制御 理 研 シンポジウム、第4回分子モーター討論会、大阪、2014年6月
- 他、計48件



ニューロンの核ラミナ発現制御とクロマチン構造解析

平成 26 年度～平成 27 年度

滝沢 琢己 (群馬大学・大学院医学系研究科・准教授)

【研究目的】

細胞核内のゲノムトポロジーすなわち、遺伝子座の空間配置は転写、ひいては細胞の機能に重要である。申請者はこれまで、クロマチン制御や遺伝子座の空間配置という観点から神経幹細胞からのアストロサイト分化の機構を検討してきた。また、細胞分裂を経ずに劇的に形態や機能を変化させるニューロンの成熟過程に着目し、マウス染色体 14 番の Egr3 遺伝子を中心とした領域に成熟依存的に発現が増加する遺伝子が集簇していること、およびその領域が成熟に伴い核膜周辺から内側へと位置を変えることを明らかにしてきた。一方、ニューロン成熟過程で、核膜直下の構造物である核ラミナの構成成分が変化することも発見した。近年、各ラミナが遺伝子座配置に重要であることが相次いで報告されている。そこで、ニューロン成熟過程における核ラミナの分子構成の変化とそれに伴う機能変化が、遺伝子座の核内配置や、核膜周辺に配置する遺伝子の発現制御に重要な役割を有しているのではないかを明らかにする目的で、本研究計画を立案した。

【研究成果】

①方法:胎生 17.5 日目のマウス海馬由来のニューロンを用いて、1 日、4 日、10 日、21 日と異なる日数培養し、遺伝子発現、遺伝子座の核内配置などを検討した。この培養においては、日数に応じて形態学的、機能的な成熟が認められることが報告されている。

②結果

1) 遺伝子発現解析:マイクロアレイによる遺伝子

発現解析を行い、培養日数に応じて発現が増加する遺伝子を同定した。これらの遺伝子の染色体上の分布を調べると、14 番染色体の 14qD2 内の領域(以下 14qD2L)に、最も高い割合で集簇していることが分かった。同領域は、統合失調症などの多くの難治性中枢神経疾患との関与が指摘されている遺伝子が集簇しているヒト 8p21.3 に相同であった。

2) 遺伝子座の核内配置解析:この 14qD2L の遺伝子座の核内配置と同領域の遺伝子発現増加との関連を検討するため、同領域に対してプローブを作製し、DNA FISH 法にて細胞核内における位置を検討した。未成熟なニューロンでは約 43%のアリルが細胞核の辺縁近傍に位置するのに対して、成熟ニューロンでは辺縁に位置する数が約 23%へと減少していることがわかった(図 1A, B)。

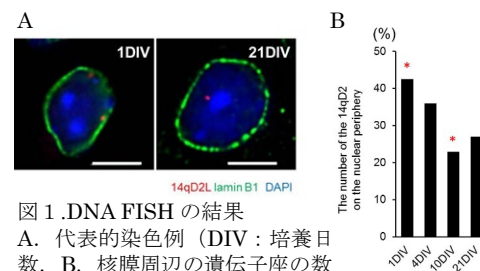


図 1. DNA FISH の結果

A. 代表的染色体例 (DIV: 培養日数). B. 核膜周辺の遺伝子座の数

すなわち、同領域は成熟に伴い核膜周辺部から離れ、中心へと移動していると考えられた。また、マウス新生仔海馬では約 50%の 14qD2L のアリルが核膜周辺に認められたのに対し、成獣の海馬では約 20%と減少しており、脳内でも成熟に伴う移動を認めた。

3) 核ラミナ構成分子の解析:核ラミナを構成する分子の mRNA 発現を検討したところ、成熟に伴い lamin B1 の顕著な減少を認めた。蛋白質レベル

でも減少も確認されたが、さらに興味深いことに成熟ニューロンでは切断された lamin B1 分子の出現を認めた(図2)。同様の結果は、脳サンプルでも認められた。

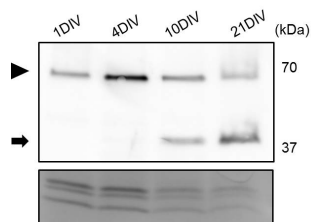


図2. lamin B1 が成熟と共に減少し(矢頭)、それに伴い約 37kDa の短い断片が出現した(矢)。

4) lamin B1 の強制発現: 14qD2L の移動に lamin B1 蛋白質の減少が関与すると想定し、レンチウイルスベクターにより lamin B1 の発現レベルを増加させると、14qD2L は成熟ニューロンでも未成熟ニューロンと同様に核膜周辺に留まるようになることを見出した。この時、同領域内の Egr3 遺伝子の発現も抑制されていた。このことから、ニューロンの成熟過程において lamin B1 の発現減少が、遺伝子座の核内配置変換と転写に影響しており、ニューロン成熟に重要な機構であることが示唆された。

【本研究課題に関する主要成果】

【雑誌論文】すべて査読あり

1. Ito K, Takizawa T. Nuclear Architecture in the Nervous System: Development, Function, and Neurodevelopmental Diseases. hexasome and octasome. *Front Genet.* 9, 308 (2018).
2. Azad GK, Ito K, Sailaja BS, Biran A, Nissim-Rafinia M, Yamada Y, Brown DT, Takizawa T, Meshorer E. PARP1-dependent eviction of the linker histone H1 mediates immediate early gene expression during neuronal activation. *J Cell Biol.* 217, 473-481 (2018).
3. Ito K, Noguchi A, Uosaki Y, Taga T, Arakawa H, Takizawa T. Gfap and Osmr regulation by BRG1 and STAT3 via interchromosomal gene

clustering in astrocytes. *Mol Biol Cell.* 29, 209-219, (2018).

4. Ito K, Sanosaka, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aizawa A, Uosaki Y, Noguchi A, Arakawa H, Nakashima K, Takizawa T. Identification of genes associated with the astrocyte-specific gene Gfap during astrocyte differentiation. *Sci Rep.* 6, 23903 (2017).
 5. Yi SH, He XB, Rhee YH, Park CH, Takizawa T, Nakashima K, Lee SH. Foxa2 acts as a co-activator potentiating expression of the Nurr1-induced DA phenotype via epigenetic regulation. *Development.* 141, 761-772 (2014).
- 他、計 6 件

【学会発表】

1. 野口東美、五十嵐勝秀、伊藤謙治、魚崎祐一、荒川浩一、滝沢琢己、ニューロンにおける遺伝子座の核内配置と転写活性制御の関連、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、神戸、2015 年 12 月
 2. 野口東美、五十嵐勝秀、伊藤謙治、魚崎祐一、荒川浩一、滝沢琢己、海馬ニューロンにおける LaminB1 による遺伝子座の核内配置と転写活性制御について、第 62 回北関東医学会総会、2015 年 10 月
 3. Noguchi T, Igarashi K, Ito K, Uosaki Y, Arakawa H, Takizawa T., Relevant roles of nuclear lamina in chromatin regulation in post-mitotic neurons., 淡路島, 2015 年 8 月
- 他、計 5 件



マイクロ流体デバイスを用いたゲノムサイズクロマチンの高次構造変化実時間観察

平成 26 年度～平成 27 年度

小穴 英廣 (東京大学・工学系研究科・准教授)

【研究目的】

「顕微鏡下で、狙った 1 個の細胞からクロマチンファイバーを断片化させずに取り出し、その場でクロマチンファイバー高次構造変化やクロマチンファイバーとタンパク質との相互作用の様子を直接観察する」という単分子レベル生化学実験は、ライフサイエンス研究分野において、非常に有用な研究手段のひとつとなることが期待される。本研究課題においては、上記実験操作を可能とするマイクロ流体デバイスを開発し、個々の細胞から取り出したクロマチンファイバーを、微細操作によって伸展させた形態且つ基板から浮かせた状態で配置・固定する技術を確認する。次いで、このクロマチンファイバー周囲の溶液組成を変化させることで、クロマチンファイバーに高次構造変化をおこし、その様子を実時間観察することにより、クロマチンファイバー高次構造の階層性とその動態を明らかにすることを目指す。本研究課題遂行を通して顕微鏡下におけるシングルセル・単分子レベル生化学実験手法を確認し、動的クロマチン構造と機能の解明に貢献することを目的とした。

【研究成果】

(1) クロマチン折り畳みの安定性のファイバーに沿った分布の可視化

クロマチン折り畳みの安定性がファイバーに沿って分布していることを、1 分子レベル・直接観察によって明らかにすることを目指した。分裂酵母細胞スフェロプラストを試料として用い、マイクロ流体デバイス中で、個々のスフェロプラストからクロマチンを断片化させずに取り出し、マイクロ流体

デバイス内の微細構造へ係留し、周囲の溶液の塩濃度を段階的に上昇させた際のクロマチンファイバーの応答を蛍光顕微鏡法により観察した。

(1-1) クロマチンファイバーの係留法の改良

単離したクロマチンファイバーをマイクロ流体デバイス中の微細構造に係留する際、片端固定にすると、係留したクロマチンファイバーの伸びの不均一が大きくなってしまふ。また、伸張されたクロマチンファイバーは、観察画面の何画面分にも及ぶので、画像取得・計測作業が煩雑となる。そこで、クロマチンファイバーに係留する微細構造の配置を変更し、クロマチンファイバーの両端を保持することでクロマチンファイバーの伸びの不均一性を抑え、クロマチンファイバーが 1~2 画面中に収まるようにした(図 1)。ここでは、係留したクロマチンファイバーに対し、抗体修飾マイクロビーズをランダムに結合させ、各マイクロビーズ間の距離の変化を計測する事によって、ファイバー折り畳みの解きほぐしが局所的に起きているかどうかを確かめた。

(1-2) クロマチン折り畳みの安定性のファイバーに沿った分布

マイクロ流体デバイス内の微細構造に係留した

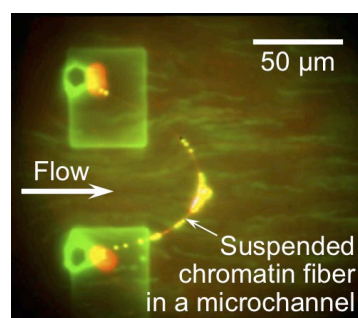


図1. 流れ場中、2本の微細構造(マイクロピラー)に両端を巻き付け係留されたクロマチンファイバー

A01 公募研究(代表)

クロマチンファイバーに対し、周囲の塩濃度を段階的に上昇させていったところ、クロマチンファイバーが徐々に解きほぐされ、見かけの全長が増大していく様子が観察された。ここで、クロマチンファイバーに結合させた抗体修飾マイクロビーズの間隔を計測したところ、クロマチンファイバーの解きほぐしはファイバー全体に渡って一様に起こるのではなく、一本のクロマチンファイバー上であっても、塩濃度上昇に応答して解れる区間/解れない区間が存在し、何 M の塩溶液に曝した際に顕著な高次構造変化をするかは、各区間によってバラツキがある事を確かめた。以上の研究成果は、国内外の学会で発表すると共に論文に纏め、*Biotechnology Journal* 誌に投稿、掲載された。

(2) 細胞の分化度合いと染色体折り畳みの安定性との相関

分裂酵母スフェロプラスト由来のクロマチンを対象とした実験技術を更に発展させ、狙った 1 個の動物細胞から染色体を単離し、1 染色体レベル生化学実験を行うことが可能なマイクロ流体デバイスを開発した。このデバイスをマウス ES 細胞およびマウス胎児線維芽細胞(MEF)に適用し、それぞれの細胞由来の染色体の高次構造安定性について比較・評価を行った。尚、本実験は計画班班員の山縣一夫博士、公募班班員の上田潤博士との共同で行い、メチローマウス由来細胞を動物細胞として用いた。

(2-1) ES 細胞由来染色体の形態不安定性

ES 細胞から取得した染色体は、低塩濃度中では次第に膨潤して解き解れが起こるため、光ピンセット操作で個別に微細操作することは困難であった。そこでこの溶液に 100 mM KCl を添加すると膨潤が抑制されて染色体の形態が安定化し、個別操作が可能である事を確かめた。

(2-2) 細胞の分化度合いと染色体折り畳みの安定性との相関

ES 細胞由来の染色体は、塩濃度 0.5 M の溶液に曝すと速やかに解き解れはじめ、0.75 M の塩濃度中では、更に解きほぐされたクロマチンファイバーとなった。一方、MEF 由来の染色体は、塩濃度 0.5 M の溶液に曝しても形態の変化が殆ど見られず、0.75 M の塩濃度溶液に曝すと徐々に解れはじめて展開し、部分的に凝縮したクロマチンファイバーが得られた(図 2)。本実験により、分化度の異なる細胞間におけるクロマチン凝縮構造安定性の違いが、分裂期の染色体においても保存されている事が明らかとなった。以上の研究成果は、国内外の学会で発表すると共に論文に纏め、*Scientific Reports* 誌に投稿、掲載された。

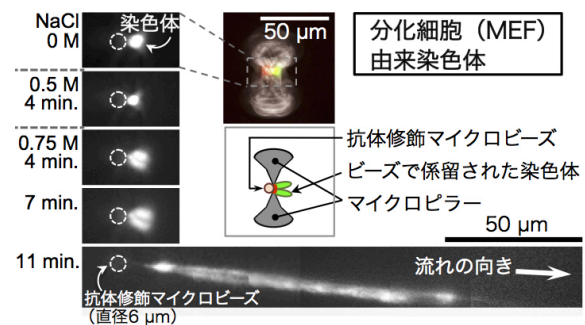


図2. MEF 由来染色体の周囲の塩濃度を段階的に上昇させた際の解きほぐし

【本研究課題に関する成果】

[雑誌論文] すべて査読あり

1. Mori H, Okeyo KO, Washizu M, Oana H. Nucleosomes Exhibit Non-uniform Unwrapping Along Native Chromatin Fibers with Increasing Salt Concentration as Revealed by Direct Imaging in a Microfluidic Channel. *Biotech J.* 13, 1700245 (2018).
2. Takahashi T, Okeyo KO, Ueda J, Yamagata K, Washizu M, Oana H. A microfluidic device for isolating intact chromosomes from single mammalian cells and probing their folding stability by controlling solution conditions. *Sci Rep.* 8, 13684 (2018).

A01 公募研究(代表)

[学会発表]

1. Hiroki Mori, Kennedy Omondi Okeyo, Masao Washizu, Hidehiro Oana, MAPPING POSITIONAL DISTRIBUTION OF HIGHER-ORDER STRUCTURES ALONG UNFRAGMENTED NATIVE CHROMATIN FIBERS ISOLATED FROM SINGLE CELLS IN A MICROCHANNEL, 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2015), 慶州(韓国), 2015年10月
2. Hidehiro Oana, Hiroki Mori, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu, Direct Observation of Distribution and Stability of Higher-order Structure along Tethered Chromatin Fibers in a Micro-flow Channel, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015年8月
3. Hiroki Mori, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu, Hidehiro Oana, Measurement of Higher-order Structural Changes of Tethered Chromatin Fibers in a Micro-flow Channel, 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems, 京都, 2015年6月
4. 小穴英廣、塩濃度変化に対する天然クロマチンファイバーの高次構造変化の直接観察、第52回日本生物物理学会年会、札幌、2014年9月
5. 小穴英廣、蛍光顕微鏡下におけるクロマチンファイバーの単離および高次構造制御、第66回日本細胞生物学会大会、奈良、2014年6月
6. 小穴英廣、蛍光顕微鏡下・マイクロチャンバー内におけるシングルセルからのクロマチンファイバー単離と解きほぐし、第8回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、2014年5月
7. 東郷智之、ケネディ オケヨ、小穴英廣、鷺津正夫、相同組換えタンパクをプローブに用いた標的塩基配列の顕微鏡下リアルタイム探索、第29回化学とマイクロ・ナノシステム学会、東京、2014年5月



マウス卵割期胚における NC 比制御と核形態・クロマチン状態変化の解析

平成 26 年度～平成 27 年度

大杉 美穂 (東京大学・総合文化研究科・教授)

【研究目的】

動物細胞における核と細胞質のサイズ比(N/C比)は、細胞の分化度や腫瘍の悪性度など、細胞の状態を反映する指標の1つとして古くから用いられている。様々なモデル生物を用いた研究から、核の大きさに影響を与え得る要因として、内包する DNA 量、核輸送の効率、細胞質の量などが報告されているが、核の大きさや形態の制御機構についての知見はまだ限られたものしかない。一方、例えばカエルや魚類などの卵割期には、染色体の分配後速やかに染色体を核膜で包み脱凝縮、複製反応を開始させるために karyomere とよばれる多核が形成されるなど、分裂終期における核形成も細胞の性質や環境により多様性がある。本研究ではマウス卵や卵割胚を材料に、細胞の大きさ、核の形態および内包される染色体量に着目し、発生工学、細胞生物学的手法を用いて、核形成のタイミング制御、大きさ形状制御の分子メカニズムを明らかにすることを目指す。

【研究成果】

(1) マウス 1 細胞期胚における核の大きさ制御

マウス前核期胚は①細胞はほぼ球形であり、細胞周期を通して大きさが変化しない、②前核もほぼ球形である、③胚ごとの細胞、核の大きさのばらつきが少ない、④細胞質の吸引除去や 2 つの卵を電気刺激により融合することによる細胞サイズの改変が可能である、⑤単為発生、極体放出抑制、2 つ以上の精子核の注入等により、細胞または核あたりの倍数性の改変が可能である、とい

う特性をもつ。これを利用し、細胞の大きさや細胞または核の倍数性と核の大きさとの相関の有無を検討した。その結果、前核の大きさは、内包する DNA 量にはほとんど影響を受けないが、卵の大きさ(細胞質量)と高い相関を示した。更に、2 つ以上の前核が存在する場合、細胞の大きさに対し、すべての前核の総体積が一定となることが示唆された。

(2) 雌雄前核の大きさ制御

マウス受精卵中の雌雄前核の大きさには差があり、雄性前核の方が大きい。この差がどのように生じるかについて、受精卵および雌雄の単為発生胚における前核の拡大過程についての詳細なライブイメージング解析を行った。その結果、雌雄の前核は拡大速度が異なり、そのことが最終的な大きさの違いに結びつくことが示された。

(3) マウス前核形成タイミング制御

精子と卵との融合により、卵は減数第二分裂を再開し、後期での染色体分配を経て第二極体と雌性前核を形成する。一方、精子核内のクロマチンはヒストンの多くを失いプロタミンにより高度に凝縮されているが、卵細胞質に入るとプロタミン放出、ヒストン取り込み(de novo のヌクレオソーム形成)を経て雄性前核となる。前核形成までの時間は多くの動物では 30 分程度であるが、哺乳類のみ 3 時間ほどかかるという特性がある。この遅い前核形成タイミングは、受精開始後も数時間活性が保たれる MOS-MEK-ERK 経路が関与することが知られていたが、本研究ではその下流分子として

p90 Ribosomal S6 kinase (RSK)を見出した。多くの動物ではRSKは卵減数第二分裂を中期で停止させる活性を担うが、哺乳類ではその役割を担っておらず、卵における役割はこれまで不明であった。領域参画終了後にも研究を継続し、以下の研究成果を得た。前核形成タイミング制御は、体細胞分裂期での核形成と同様にCdk1により活性化されたMASTLまたはGreatwall(Gwl)と呼ばれるキナーゼの下流で、核形成に必要な脱リン酸化酵素PP2A-B55が抑制される、というシグナル伝達経路が関わることを示した。体細胞やカエル卵では後期開始時のCdk1不活性化に伴い速やかにPP2A-B55の活性化と核形成が起こるが、マウス卵ではRSKがMASTLをリン酸化することにより、Cdk1不活性化後も数時間MASTLの活性が維持され、前核形成タイミングも数時間後まで引き延ばされることが示された。さらに、人為的に前核形成タイミングを早期化したところ、雄性前核特異的に小型化、H3.3量の減少、DNA損傷の増加が見られ、第一卵割時の染色体分配不全が引き起こされた。一連の実験結果から、マウス受精卵内での精子クロマチンの再構築には80分程度の時間が必要であり、哺乳類卵特有のRSK-MASTL経路によりその時間が保証されていることが示された。

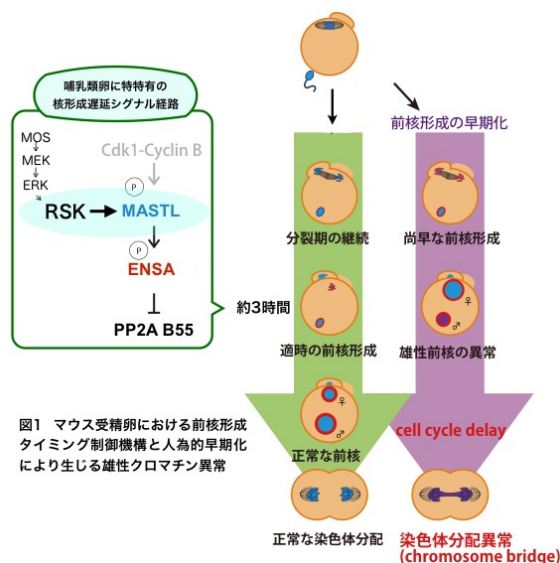


図1 マウス受精卵における前核形成タイミング制御機構と人為的早期化により生じる雄性クロマチン異常

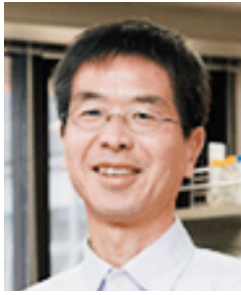
【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Soeda S, Yamada-Nomoto K, Michiue T, and Ohsugi M. RSK-MASTL pathway delays meiotic exit in mouse zygotes to ensure paternal chromosome stability. *Dev Cell*. 47, 363-376 (2018).
2. Soeda S, Yamada-Nomoto K, Ohsugi M. The microtubule-binding and coiled-coil domains of Kid are required for turning off the polar ejection force at anaphase. *J Cell Sci*. 129, 3609-3619 (2016)
3. Park SJ, Shirahige K, Ohsugi M, Nakai K. DBTMEE: a database of transcriptome in mouse early embryos. *Nucleic Acids Res*. 43, D771-776. (2014)

[学会発表]

1. Watanabe H, Ohsugi M., Regulation of pronuclear size in mouse zygotes, Cell biology 2016 ASCB annual meeting, サンフランシスコ(アメリカ), 2016年12月
2. Inoue F, Ohsugi M., Formation of male pronuclei in mouse egg extract., 9th 3R Symposium, 御殿場, 2014年11月
3. 井上玄志, 朴聖俊, 古俣麻希子, 山田かおり, 岸本健雄, 中井謙太, 白髭克彦, 大杉美穂, マウス初期胚を用いた大規模トランスクリプトーム解析, 第55回 日本卵子学会, 2014年5月
4. 渡邊大士, 大杉美穂, マウス初期胚におけるクロモキネシン Kid の局在特性の解明, 第55回 日本卵子学会, 神戸, 2014年5月
他



核膜アンカーに依存したセントロメアクロマチンの制御機構

平成 26 年度～平成 27 年度

松本 智裕 (京都大学・生命科学研究科・教授)

【研究目的】

セントロメアクロマチンの際立った特徴は、ヒストン H3 のバリエーションである Cnp-A を含むことである。Cnp-A ヌクレオソームの存在領域の大きさ、その領域におけるヌクレオソームの密度、Cnp-A ヌクレオソームと H3 ヌクレオソームとの比率は、厳密な制御を受ける。この制御の破綻は、動原体機能、ヘテロクロマチン形成、転写活性等に異常を来す。セントロメアにおいて Cnp-A ヌクレオソームが適切に分布するためには、Cnp-A ヌクレオソームの取込み機構のみではなく、過剰な Cnp-A ヌクレオソームの排出機構も必要であると推測できる。本研究では、セントロメアクロマチンにおける Cnp-A ヌクレオソームの正常な分布を維持する分子メカニズムを解明することを目的とした。

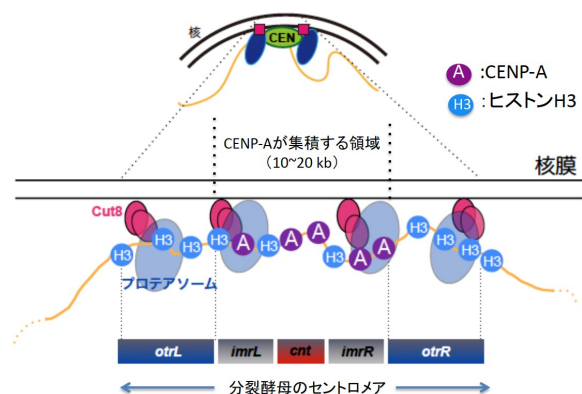
【研究成果】

セントロメアクロマチンにおける Cnp-A ヌクレオソームの正常分布を維持するメカニズムに欠損をもつ変異体は、以下の2つの表現型を示すものと想定した；① Cnp-A の高発現に依存的に高温感受性を示し、なおかつ、② Cnp-A の細胞内局在に異常を示す。

変異源処理を施した分裂酵母から、①、②の表現型を示す変異体を単離し、本研究では2つの変異体 *rpt3-1* と *cnp3-1* について詳細な解析を行なった。

(1) 核膜近傍における Cnp-A ヌクレオソームの排出機構

rpt3-1 変異体1の原因遺伝子は、26 S プロテアソームの 19 S Regulatory Cap のサブユニットの1つ (Rpt3) である AAA 型 ATPase をコードする。*rpt3-1* 変異体では Cnp-A の細胞内レベルは正常でありながら、Cnp-A がより広範に、かつ高密度にセントロメア領域に取り込まれる。また、セントロメア領域のサイレンシング (転写抑制) が亢進し、染色体が不安定化した。先行研究により 19 S Regulatory Cap は、タンパク質分解活性に非依存的にクロマチンリモデリング因子として機能することが示されているので、類似の活性が過剰な Cnp-A を除去すると推察できる。分裂酵母のセントロメアは核膜近傍に、また 19 S Regulatory Cap の一部もアンカーである Cut8 タンパク質に依存的に核膜に局在する。19 S Regulatory Cap を核膜から遊離すると、その Cnp-A 除去活性は著しく低下した。これらの結果より、Rpt3 を含む 19 S Regulatory Cap は、核膜において過剰な Cnp-A ヌクレオソームの排出機構



として機能することが推察できる。

(2) 動原体特異的タンパク質 CENP-C による
Cenp-A ヌクレオソームの集積部位の限定

cnp3-1 変異体の原因遺伝子は、動原体特異的タンパク質 Cnp3 (ヒト CENP-C の相同体) をコードする。野生型 Cnp3 タンパク質は、たとえ細胞内の Cenp-A レベルが上昇しても、セントロメアに特異的に局在する。これに対して、変異型 Cnp3-1 タンパク質は、本来のセントロメアへの結合能が低下する一方、異所集積した Cenp-A と共局在する。これらの結果より、変異型 Cnp3-1 タンパク質は、非セントロメア領域に取り込まれた Cenp-A ヌクレオソームを認識し、その領域において、Cenp-A ヌクレオソームのさらなる集積を助長するものと考えられる。よって、Cenp-A ヌクレオソームの集積を本来のセントロメア領域に限定することが、野生型 Cnp3 タンパク質の機能であると推察する。

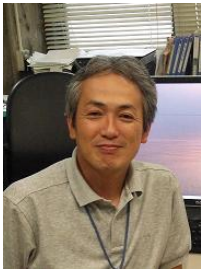
【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文] すべて査読あり

1. Suma M, Kitagawa T, Nakase Y, Nakazawa N, Yanagida, Matsumoto T. Fission Yeast CENP-C (Cnp3) Plays a Role in Restricting the Site of CENP-A Accumulation. *G3 (Bethesda)*. 8, 2723 (2018).
2. Kitagawa T, Ishii K, Takeda K, Matsumoto T. The 19S proteasome subunit Rpt3 regulates distribution of CENP-A by associating with centromeric chromatin. *Nat Commun*. 5, 3597 (2014).

[学会発表]

1. 須摩美智子、松本智裕、Cnp1 の局在制御に関与する Cnp3 の機能解析、酵母遺伝学フォーラム、広島、2015 年 8 月



CV-SANS法による変異型ヌクレオソームの詳細構造解析

平成 26年度～平成 27 年度

量子ビーム散乱法の協奏的利用による機能性ヌクレオソームの溶液構造解析

平成 28 年度～平成 29 年度

杉山 正明 (京都大学・原子炉実験所・教授)

【研究目的】

通常の結晶回折法とは異なり、透過ビーム近傍に現れる散乱を精度良く測定する小角散乱法は、溶液中の試料の構造解析を可能とする手法である。そのため、小角散乱法を用いて生体高分子の溶液中での構造研究が盛んに行われている。ヌクレオソームの溶液構造もこれまで小角散乱法を用いた研究の対象であったが、多様な翻訳後修飾や変異体が混在した試料が用いられていた。本研究では、近年胡桃坂グループにより確立された手法により調製されたこれまでにない純度の単一成分のヌクレオソームを用いて、その溶液中での構造解析を行う事を目的とする。

また、本研究では2つの小角散乱法、X線小角散乱(Small-Angle X-ray Scattering: SAXS)法と中性子小角散乱(Small-Angle Neutron Scattering: SANS)法を協奏的に用いて詳細に構造解析を行う事も目的とした。SAXS法の特長は、ビーム強度が強く少量の試料で測定が可能な事である。加えて、ヌクレオソームの外周に存在するDNAの散乱能がヒストンタンパク質より高い事から、ヌクレオソームの全体構造を測定することに優れている。一方、SANS法は一般的にはビーム強度はSAXS法より低いが、溶媒の軽水と重水の比率を調整することで、ヌクレオソームの構成要素(DNAまたはヒストンタンパク質)を選択的に測定することが可能な点である(コントラスト変調SANS法: CV-SANS法)。

本研究では主として上述の2つの散乱手法を

協奏的に用いて試験管内で再構成されたヒストンバリエーションを含むさまざまなヌクレオソームの溶液構造の解析を行うことで、「溶液中でのヌクレオソームの動的な構造」の解析を目指すことも目的とした。

【研究成果】

(1) 変異体ヒストンを含むヌクレオソームの溶液構造 I

H2A.B ヒストンを含むヌクレオソーム(H2A.Bヌクレオソーム)の溶液構造をSAXS法とCV-SANS法を協奏的に用いることで解析を行った。SAXS法ではH2A.Bヌクレオソームは慣性半径・分子最大長とも通常のヌクレオソーム(以降、H2Aヌクレオソーム)に比べ、大きくなっている。更にab initio立体構造モデリングによるとDNAの両端が強く乖離していることが示唆された。次にCV-SANS法を用いてより詳細にH2A.Bヌクレオソーム構造解析を

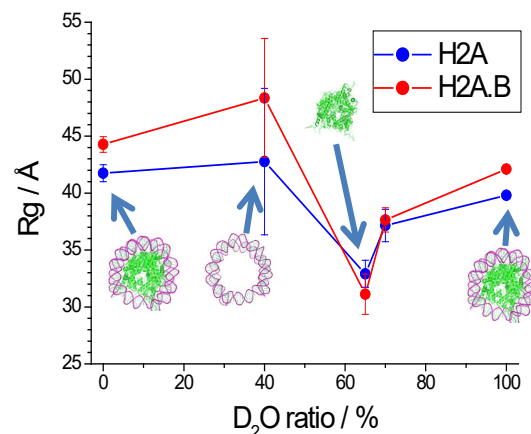


図1. H2A および H2A.Bヌクレオソームの CV-SANS より求められ慣性半径。

行った。CV-SANS 法では 65% D_2O 溶媒中ではヒストンタンパク質、40% D_2O 溶媒中では DNA の構造が選択的に観測できる。図1に示すように DNA を観測している 40% D_2O 溶媒中では、H2A.B ナクレオソームの慣性半径は H2A.B ナクレオソームに比べ大きくなっており、DNA が広がっている=乖離していることが示された。一方、興味深いことにヒストンタンパク質を観測している 65% D_2O 溶媒中では、H2A.B ナクレオソームの慣性半径は、H2A.B ナクレオソームに比べ小さくなっている。これは、距離分布関数の解析より H2A.B ナクレオソームのヒストンテールがヒストンコア近くに存在している可能性が高いことを示され、ヒストンテールの運動性の違いを観測できた。

(2) 変異体ヒストンを含むナクレオソームの溶液構造 II

H2A.Z1 ヒストンを含むナクレオソーム(H2A.Z1 ナクレオソーム)の溶液構造を SAXS 法と CV-SANS 法を用いて解析を行った。SAXS 法では H2A.Z1 ナクレオソームは H2A.B ナクレオソームのような大きな R_g の変化を示さなかったが、CV-SANS 法ではヒストンコアのサイズが小さいことが示され、DNA との結合がわずかながら緩んでいる可能性を示した。これはこの H2A.Z1 ナクレオソームの動的な揺らぎによるものと考えられる。

(3) オーバーラッピングジナクレオソームの溶液構造解析

ナクレオソームのリモデリングの際に形成されることが考えられている「オーバーラッピングジナクレオソーム」という特殊なクロマチン構造の溶液構造解析にも挑戦した。その結果、これまでに提唱されていたヒストン 6 量体の上にヒストン 8 量体が積載されそこに DNA が巻き付いた円筒形状ではないことが判明した。ab initio 立体構造モデリングによるとヒストン 6 量体とヒストン 8 量体はずれた配置を取っていることを構造であることが示唆された。溶

液中でこのような構造をとることは、後に胡桃坂らの詳細な結晶構造解析の結果と矛盾していなかった。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Bernadó P, Shimizu N, Zaccari G, Kamikubo H, Sugiyama M. Solution scattering approaches to dynamical ordering in biomolecular systems. *BBA - Gen Subj.* 1862, 253-274 (2018).
2. Kato D, Osakabe A, Arimura Y, Mizukami Y, Horikoshi N, Saikusa K, Akashi S, Nishimura Y, Park SY, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Matsumoto A, Kono H, Inoue R, Sugiyama M, Kurumizaka H. Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. *Science.* 356, 205-208 (2017).
3. 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).
4. Sugiyama M, Arimura Y, Shirayama K, Fujita R, Oba Y, Sato N, Inoue R, Oda T, Sato M, Heenan RK, Kurumizaka H. Distinct features of the histone core structure in nucleosomes containing the histone H2A.B variant. *Biophys J.* 106, 2206-2213 (2014).

[学会発表]

1. Sugiyama M., Neutron Scattering for Biomolecular Systems, Grand Challenges in Small-angle Scattering, 岡崎, 2017 年 3 月 他、計 11 件



染色体上の非コード RNA が動的クロマチン構造を
制御する仕組み

平成 28 年度～平成 29 年度

相同染色体対合に必要な非コード RNA が動的クロマチン
構造と相互作用する仕組み

平成 26 年度～平成 27 年度

平岡 泰 (大阪大学・大学院生命機能研究科・教授)

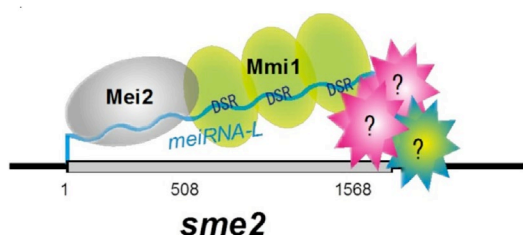
【研究目的】

非コード RNA はヒトゲノムの 4 割を占める広汎な領域から転写されていることが分かっている。ほ乳類 X 染色体の不活性化や分裂酵母の相同染色体の対合では、非コード RNA が染色体上に蓄積することが知られているが、その分子基盤や役割はほとんど解析されていない。本研究は、分裂酵母において、染色体上に蓄積する RNA 分子がクロマチン動構造を制御する仕組みを分子遺伝的手法により解析し、その生物学的意義を明らかにする。

【研究成果】

(1) 非コード RNA が動的クロマチンを制御する仕組み

分裂酵母の減数分裂において相同染色体が対合する仕組みの研究を行い、非コード RNA が相同染色体を認識し対合を促進する仕組みの一端を明らかにした。非コード RNA として *sme2* 遺伝子座から転写される *sme2* RNA に着目し、*sme2* RNA と相互作用するタンパク質を同定した(下図)。その中には、RNA のポリ A 付加に関与する因子群が含ま



れ、非コード RNA のポリ A 付加配列を欠失させると染色体に蓄積しなくなり、対合頻度が低下した。これらのことから、転写された RNA がポリ A 付加と連動して染色体に蓄積することが相同染色体対合に必要であることが示された。

(2) 相同染色体の対合を制御する動的クロマチン構造

クロマチンタンパク質であるコヒーシンについて、クロマチン構造と相同染色体対合に対する役割を検討した。そのために、超解像顕微鏡法として 3D-SIM (Structured Illumination Microscope) を用い、分裂酵母クロマチン構造の解析を可能にした(Matsuda et al, *Yeast* 2016)。3D-SIM により減数分裂コヒーシン Rec8 の欠失変異体のクロマチン構造を解析すると、減数分裂クロマチンのループと軸の構造に変化が見られた。また、相同染色体対合頻度を計測したところ、対合頻度の低下が見られた。Rec8 欠失変異体では、高頻度対合部位である *sme2* 遺伝子座でさえも対合頻度が低下したことから、Rec8 によって形成されるクロマチン構造が相同染色体対合に必須であると結論した(Ding et al, *Chromosoma* 2015, *Curr Genet* 2016)。

(3) ヒストン修飾および核膜タンパク質が動的クロマチン構造を制御する仕組み

動的クロマチン構造を制御する要因として、ヌク

レオソームタンパク質であるヒストンに注目し、その働きを解析した。分裂酵母のヒストンを用いたヌクレオソーム再構成を実現し、その生化学的特性を解析した (Koyama et al., BBRC 2017)。クロマチン構造形成と機能におけるヒストン修飾の働きを明らかにした (Ruan et al, *Sci Rep* 2015; Sato et al, *J Mol Biol* 2016)。また、核内膜タンパク質について、クロマチンとの相互作用における働きを明らかにした (Tange et al, *Genes Cells* 2016; Yang et al, *J Cell Biol* 2015, *Biol Open* 2017, *J Biochem* 2017; Hirano et al, *Genes Cells* 2018)。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文] 査読あり 50 件、査読なし 1 件

- Ogawa S, Kido S, Handa T, Ogawa H, Asakawa H, Takahashi TS, Nakagawa T, Hiraoka Y, Masukata H. Shelterin promotes tethering of late replication origins to telomeres for replication timing control. *EMBO J*. 37, Pii: e98997 (2018).
- Iwamoto M, Mori C, Osakada H, Koujin T, Hiraoka Y, Haraguchi T. Nuclear localization signal targeting to macronucleus and micronucleus in binucleated ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Genes Cells*. 23, 568-579 (2018).
- Bao XX, Spanos C, Kojidani T, Lynch EM, Rappsilber J, Hiraoka Y, Haraguchi T, Sawin KE. Exportin Crml is repurposed as a docking protein to generate microtubule organizing centers at the nuclear pore. *eLife*. 7, e33465 (2018).
- Matsuda A, Schermelleh L, Hirano Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Accurate and fiducial-marker-free correction for three-dimensional chromatic shift in biological fluorescence microscopy. *Sci Rep*. 8, 7583 (2018).
- Yamada S, Kugou K, Ding DQ, Fujita Y, Hiraoka Y, Murakami H, Ohta K, Yamada T. The conserved histone variant H2A.Z illuminates meiotic recombination initiation. *Curr Genet*. doi:10.1007/s00294-018-0825-9 (2018).
- Tsuchiya M, Ogawa H, Koujin T, Mori C, Osakada H, Kobayashi S, Hiraoka Y, Haraguchi T. p62/SQSTM1 promotes rapid ubiquitin conjugation to target proteins after endosome rupture during xenophagy, *FEBS Open Bio*. 8, 470-480 (2018).
- Hirano Y, Kinugasa Y, Asakawa H, Chikashige Y, Obuse C, Haraguchi T, Hiraoka Y. Lem2 is retained at the nuclear envelope through its interaction with Bqt4 in fission yeast. *Genes Cells*. 23, 122-135 (2018).
- Kajitani T, Kato H, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y, Kimura H, Ohkawa Y, Obuse C, Hermand D, Murakami Y. Ser7 of RNAPII-CTD facilitates heterochromatin formation by linking ncRNA to RNAi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 114, E11208-E11217 (2018).
- Yamada S, Kugou K, Ding DQ, Fujita Y, Hiraoka Y, Murakami H, Ohta K, Yamada T. The histone variant H2A.Z promotes initiation of meiotic recombination in fission yeast. *Nucleic Acids Res*. 46, 609-620 (2017).
- Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. Estimation of GFP-nucleoporin amount based on fluorescence Microscopy. *Methods Mol Biol*. 1721, 105-115 (2018).

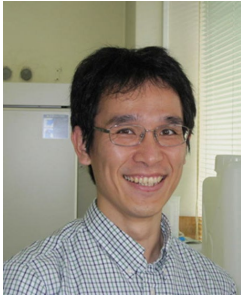
11. Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Newly found Tetrahymena nucleoporins, Nup214, Nup153 and Pom121/Pom82, differentiate nuclear pore complexes of functionally distinct nuclei. *Commun Integr Biol*. <http://dx.doi.org/10.1080/19420889.2017.1384890> (2017).
12. Yang H-J, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Function of nuclear membrane proteins in shaping the nuclear envelope integrity during closed mitosis. *J Biochem*. 161, 471-477 (2017).
13. Iwamoto M, Osakada H, Mori C, Fukuda Y, Nagao K, Obuse C. Hiraoka Y, Haraguchi T. Compositionally distinct nuclear pore complexes of functionally distinct dimorphic nuclei in ciliate *Tetrahymena*, *J Cell Sci*. 130, 1822-1834 (2017).
14. Chikashige Y, Yamane M, Okamasa K, Osakada H, Tsutsumi C, Nagahama Y, Fukuta N, Haraguchi T, Hiraoka Y. Fission yeast APC/C activators Slp1 and Fzr1 sequentially trigger two consecutive nuclear divisions during meiosis. *FEBS Lett*. 591, 1029-1040 (2017).
15. Koyama M, Nagakura W, Tanaka H, Kujirai T, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kurumizaka H. In vitro reconstitution and biochemical analyses of the *Schizosaccharomyces pombe* nucleosome. *Biochem Biophys Res Commun*. 482, 896-901 (2017).
16. Yang H-J, Osakada H, Kojidani T, Haraguchi T, Hiraoka Y. Lipid droplet dynamics during *Schizosaccharomyces pombe* sporulation and their role in spore survival. *Biol Open*. 6, 217-222 doi:10.1242/bio.022384 (2017).
17. Hirai Y, Hirano Y, Matsuda A, Hiraoka Y, Honda T, Tomonaga K. Borna Disease Virus Assembles Porous Cage-like Viral Factories in the Nucleus. *J Biol Chem*. 291, 25789-25798 (2016).
18. Matsuda A, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Spatial organization of the *Schizosaccharo-mycetes pombe* genome within the nucleus. *Yeast*. 34, 55-66 (2016).
19. Rong M, Matsuda A, Hiraoka Y, Lee J. Meiotic cohesin subunits RAD21L and REC8 are positioned at distinct regions between lateral elements and transverse filaments in the synaptonemal complex of mouse spermatocytes. *J Reprod Dev*. 62, 623-630 (2016).
20. Asakawa H, Ding DQ, Haraguchi T, Hiraoka Y. Microscopic observation of living cells stained with fluorescent probes. In *Fission Yeast: A Laboratory Manual*. 230-235 (Cold Spring Harbor Lab Press), (2016).
21. Ding DQ, Hiraoka Y. Visualization of a Specific Genome Locus by the lacO/LacI-GFP System. In *Fission Yeast: A Laboratory Manual*. 236-241(Cold Spring Harbor Lab Press), (2016).
22. Sato Y, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Ohtsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura A, Kurumizaka H, Kimura H. A genetically encoded probe for live-cell imaging of H4K20 monomethylation. *J Mol Biol*. 428, 3885-3902 (2016).

23. Gómez-Saldivar G, Fernandez A, Hirano Y, Mauro M, Lai A, Ayuso C, Haraguchi T, Hiraoka Y, Piano F, Askjaer P. Identification of conserved MEL-28/ELYS domains with essential roles in nuclear assembly and chromosome segregation. *PLoS Genet.* 12, e1006131 (2016).
24. Tange Y, Chikashige Y, Takahara S, Kawakami K, Higashi M, Mori C, Kojidani T, Hirano Y, Asakawa H, Murakami Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions. *Genes Cells.* 21, 812-832 (2016).
25. Tsuchiya M, Ogawa H, Koujin T, Kobayashi S, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T. Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells. *FEBS Lett.* 590, 2671-80 (2016).
26. Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Uniquely designed nuclear structures of lower eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol.* 40, 66-73 (2016).
27. Ding D-Q, Haraguchi T, Hiraoka Y. A cohesion-based platform for homologous chromosome pairing in meiosis. *Curr Genet.* 62, 499-502 (2016).
28. Tashiro S, Handa T, Matsuda A, Ban T, Takigawa T, Miyasato K, Ishii K, Kugou K, Ohta K, Hiraoka Y, Masukata M, Kanoh J. Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. *Nat Commun.* 7, 10393 (2016).
29. Suzuki S, Kato H, Suzuki Y, Chikashige Y, Hiraoka Y, Kimura H, Nagao K, Obuse C, Takahata S, Murakami Y. Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 40, 4147-4162 (2016).
30. Asakawa H, Yang H-J, Hiraoka Y, Haraguchi T. Virtual nuclear envelope breakdown and its regulators in fission yeast meiosis. *Front Cell Dev Biol.* 4, 5, doi:10.3389/fcell.2016.00005 (2016).
31. Yang H-J, Haraguchi T, Hiraoka Y. A nucleoporin that facilitates meiotic kinetochore reorganization. *Cell Cycle.* 15, 307-308 (2016).
32. Ding D-Q, Matsuda A, Okamasa K, Nagahama Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Meiotic cohesin-based chromosome structure is essential for homologous chromosome pairing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma.* 125, 205-214, doi: 10.1007/s00412-015-0551-8 (2016).
33. Yamamoto J, Oura M, Yamashita T, Miki S, Jin T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Terai H, Masataka K: Rotational diffusion measurements using polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy based on superconducting nanowire single-photon detector. *Opt Express.* 23, 32633-32642, doi: 10.1364/OE.23.032633 (2015).
34. Chikashige Y, Arakawa S, Leibnitz K, Tsutsumi C, Mori C, Osakada H, Murata M, Haraguchi T, Hiraoka Y. Cellular economy in fission yeast cells continuously cultured with limited nitrogen resources. *Sci Rep.* 5, 15617, doi: 10.1038/srep15617 (2015).

35. Yang H-J, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Nup132 modulates meiotic spindle attachment in fission yeast by regulating kinetochore assembly. *J Cell Biol.* 211, 295-308 (2015).
36. Asakawa H, Yamamoto T. G, Hiraoka Y. Fission yeast meets a legend in Kobe: report of the Eighth International Fission Yeast Meeting. *Gene Cells.* 20, 967-971 (2015).
37. Tsuchiya M, Isogai S, Taniguchi H, Tochio H, Shirakawa M, Morohashi K, Hiraoka Y, Haraguchi T, Ogawa H. Selective autophagic receptor p62 regulates the abundance of transcriptional coregulator ARIP4 during nutrient starvation. *Sci Rep.* 5, 14498 (2015).
38. Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. The nuclear pore complex acts as a master switch for nuclear differentiation. *Commun Integr Biol.* 8, 4, e1056950 (2015).
39. Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H, Chikashige Y, Kimura H, Masukata H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Histone H4 acetylation required for chromatin decompaction during DNA replication. *Sci Rep.* 5, 12720 (2015).
40. Matsuda A, Chikashige Y, Ding DQ, Ohtsuki C, Mori C, Asakawa H, Kimura H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Highly condensed chromatins are formed adjacent to sub-telomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast. *Nat Commun.* 6, 7753 (2015).
41. Poonperm R, Takata H, Hamano T, Matsuda A, Uchiyama S, Hiraoka Y, Fukui K. Chromosome Scaffold is a Double-Stranded Assembly of Scaffold Proteins. *Sci Rep.* 5, 11916 (2015).
42. Hirano Y, Matsuda A, Hiraoka Y. Recent advancements in structured-illumination microscopy toward live-cell imaging. *Microscopy (Oxf).* 64(4), 237-49 (2015).
43. Asakawa H, Mori C, Ohtsuki C, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Uncleavable Nup98-Nup96 is functional in fission yeast. *FEBS Open Bio.* 5, 508-514 (2015).
44. Kobayashi S, Koujin T, Kojidani T, Osakada H, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T. BAF is a cytosolic DNA sensor that leads to exogenous DNA avoiding autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112, 7027-7032 (2015).
45. Iwamoto M, Koujin T, Osakada H, Mori C, Kojidani T, Matsuda A, Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. Biased assembly of the nuclear pore complex is required for somatic and germline nuclear differentiation in *Tetrahymena*. *J Cell Sci.* 128, 1812-1823 (2015).
46. Ozaki K, Chikashige Y, Hiraoka Y, Matsumoto T. Fission Yeast Scp3 Potentially Maintains Microtubule Orientation through Bundling. *PLoS One.* 10, e0120109 (2015).
47. Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H, Chikashige Y, Masukata H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Meiotic nuclear movements in fission yeast are regulated by the transcription factor Mei4 downstream of a Cds1-dependent replication checkpoint pathway. *Genes Cells.* 20, 160-172 (2015).
48. Yamashita T, Liu D, Miki S, Yamamoto J, Haraguchi T, Kinjo M, Hiraoka Y, Wang Z, Terai H. Fluorescence correlation spectroscopy with visible-wavelength superconducting nanowire single-photon

A01 公募研究(代表)

- detector. *Opt Express*. 22, 28783-28789 (2014).
49. Chikashige Y, Yamane M, Okamasa K, Mori C, Fukuta N, Matsuda A, Haraguchi T, Hiraoka Y. Chromosomes rein back the spindle pole body during horsetail movement in fission yeast meiosis. *Cell Struct Funct*. 39, 93-100 (2014).
 50. Asakawa H, Yang H-J, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *S. pombe*. *Nucleus*. 5, 149-162 (2014).
 51. Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. A method of correlative light and electron microscopy for yeast cells. *Micron*. 61, 53-61 (2014).
- [学会発表]
1. Hiraoka Y., A framework of meiotic chromosomes for homologous pairing., 広島大学クロマチン動態数理研究拠点"5th International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics", 広島, 2017年3月
 2. 平岡泰、ヒストン不足が引き起こす染色体の不分離、よこはまNMR研究会 第56回ワークショップ「ヌクレオームとビッグデータ」、横浜、2017年3月
 3. Hiraoka Y., Chromatin-anchoring nuclear membrane proteins in fission yeast, FMI シンポジウム, バーゼル(スイス), 2017年1月
 4. Hiraoka Y., A framework of meiotic chromosomes for homologous pairing., Workshop on the Molecular and Physical Biology of Chromosomes, マサチューセッツ(アメリカ), 2016年9月
 5. 平岡泰、遺伝子のすがたをきたまま見る、一般公開シンポジウム「遺伝子のすがた -カラダの中でおこる不思議-」、東京、2016年8月
 6. Hiraoka Y., Roles for inner nuclear membrane proteins Lem2 and Bqt4 in chromosome organization, 4th International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics, 広島, 2015年12月
 7. Hiraoka Y., Chromosomes and nuclear structures in fission yeast, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Cell Biology of Yeasts", ニューヨーク(アメリカ), 2015年11月
 8. Hiraoka Y., Role for the fission yeast Lem2 protein in chromosome segregation and genome stability, Nuclear Transport Meeting, サン・フェリウ・デ・ギホルス(スペイン), 2015年9月
 9. Hiraoka Y., Chromosome segregation is impaired by loss of LEM-domain nuclear membrane protein Lem2, 8th International Fission Yeast Meeting, 神戸, 2015年6月
他、計51件



転写と共役したクロマチン初期化制御の解析

平成 26 年度～平成 27 年度

加藤 太陽 (島根大学・医学部・助教)

【研究目的】

真核生物のゲノムは、ヒストン8量体に DNA が巻き付いたヌクレオソームを基本単位とするクロマチンとして核内に収納されている。抑制状態にある遺伝子やエンハンサーを活性化するためには、その遺伝子の上流領域やエンハンサー自体のクロマチンをオープンにする必要がある。このクロマチンの初期化はしばしば転写と共役するが、その詳細な仕組みは明らかになっていない。とくに、ヌクレオソーム構造の解消に転写な場合、転写がヌクレオソーム構造にどういったインパクトをもつかが不明である。本研究は、我々のそれまでの知見をもとに、転写装置である RNA ポリメラーゼ II と直接相互作用するヒストンシャペロン Spt6 が初期化制御に関わるという仮説の検証、および、転写と共役したクロマチン制御の機構を解明することを目的とした。

【研究成果】

(1) 塩基構成バイアスの発見

マイクロコッカルヌクレアーゼによるクロマチン消化後の高速シーケンシング (MNase-seq) で分裂酵母のヌクレオソーム配置をゲノムワイドに検討した結果、非翻訳領域 (UTR) とイントロンに該当するゲノム領域は極端にヌクレオソームに乏しいことが判明した。Moyle-Heyrman らのケミカルマップを調査したところ、同様の傾向が認められた。なお、Spt6 の変異株においても同様にヌクレオソームのシグナルが弱かったことから、UTR におけるヌクレオソーム配置の制御に Spt6 は主な貢献を為さないと考えられる。UTR やイントロンでは特殊

な事情によりヌクレオソームが不安定になっていると予想されたが、当初、その理由が判らなかつた。

詳細に UTR の塩基構成を調べたところ、転写の際に非鋳型鎖となる鎖 (センス鎖) はチミン (T) を豊富に含んでいることが明らかになった。塩基構成が転写方向と明らかに関連していることから、UTR では、転写に対するヌクレオソームの脆弱性にセンス鎖の T が寄与することが疑われた。また、UTR における塩基構成のバイアスは分裂酵母、植物、昆虫、脊椎動物で普遍的に見られることが判明した。ただし、植物では T だけでなく C もセンス鎖に多く、昆虫では A がセンス鎖に多く、脊椎動物では遺伝子毎に多様であった。分裂酵母はもっとも単純であり、塩基構成バイアスの意義を理解するには最適なモデル生物だと考えられる。

(2) ヌクレオソーム配置予測ソフトウェアの開発

UTR がヌクレオソームに乏しいという(1)の結果は、UTR がヌクレオソーム形成に適さないのではないかという疑念を生んだ。一方で、MNase-seq の結果は、UTR の下流にあるタンパク質コード領域 (CDS) のヌクレオソームの配置が転写開始点 (TSS) からの距離で決まっていることを如実に物語っており、少なくとも一端は UTR にヌクレオソームが形成されて定規の役割を果たさなければ、そのような距離的な秩序は生まれまいだろうと思われた。

DNA 配列そのものがヌクレオソーム形成に適するかどうかを調べるため、既存のソフトウェアによるヌクレオソーム配置予測を試したが、満足のいく精度でヌクレオソーム配置を予測できるソフト

ウェアが見つからなかった。そこで我々は、ケミカルマップでトレーニングした隠れマルコフモデルによってヌクレオソーム配置を予測するソフトウェア nuCpos を開発した。これによって我々は、出芽酵母と分裂酵母の細胞内のヌクレオソーム配置を高い精度で予測することができた。とくに出芽酵母を対象とする場合、変異がヌクレオソーム配置に与える影響を予測することにさえ成功した。

高い精度をもつ nuCpos で分裂酵母の UTR を調査したところ、UTR はヌクレオソーム形成に適していると評価された。計画班の胡桃坂グループに UTR のヌクレオソーム形成能の調査を依頼したところ、UTR の配列でも試験管内でのヌクレオソーム再構成が可能であることが明らかになった。これらの結果は、UTR はヌクレオソーム形成に適するが、細胞内の何らかの要因によってヌクレオソームが不安定化することを示唆している。

(3) ヘテロクロマチン構築における熱ショックシャペロンの関与について

分裂酵母の RNAi 依存的ヘテロクロマチンは、転写と共役した RNAi 経路によって構築される。我々は、遺伝学および生化学的スクリーニングによって同定した熱ショックシャペロン、Hsp90 と Mas5 が RNAi 依存的ヘテロクロマチンの構築に必要とされることを明らかにした。Hsp90 と Mas5 の変異株では RNAi 経路で働く低分子 RNA (siRNA) が検出されず、ヒストン H3 の Lys9 のメチル化レベルが減少し、ヘテロクロマチンのサイレンシングが脱抑制されていた。更に、Mas5 の変異によって、RNAi 経路で必須の役割を果たす RITS 複合体のサブユニットである Tas3 が不安定化し、極端に少なくなることが判明した。熱ショックシャペロンの RNAi 経路での役割については、試験管内の生化学的研究で指摘されていたが、実際に細胞内で転写と共役したクロマチン制御に関与することが判明したのは初めてである。

【本研究課題に関する主要発表】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Okazaki K, Kato H, Iida T, Shinmyozu K, Nakayama JI, Murakami Y, Urano T. RNAi-dependent heterochromatin assembly in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* requires heat-shock molecular chaperones Hsp90 and Mas5. *Epigenet Chromatin*. 11, 26 (2018).
2. Kato H, Okazaki K, Urano T. How does Hsp90 function in RNAi-dependent heterochromatin assembly? *Curr Genet*. [Epub ahead of print] (2018).
3. Nakayama N, Sakashita G, Nariai Y, Kato H, Sinmyozu K, Nakayama JI, Kyo S, Urano T, Nakayama K. Cancer-related transcription regulator protein NAC1 forms a protein complex with CARM1 for ovarian cancer progression. *Oncotarget*. 9, 28408-28420 (2018).
4. Kajitani K, Kato H, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y, Kimura H, Ohkawa Y, Obuse C, Hermand D, Murakami Y. Ser7 of RNAPII-CTD facilitates heterochromatin formation by linking ncRNA to RNAi. *PNAS*. 114, E11208-E11217 (2017).
5. Tatsumi K, Sakashita G, Nariai Y, Okazaki K, Kato H, Obayashi E, Yoshida H, Sugiyama K, Park SY, Sekine J, Urano T. G196 epitope tag system: A novel monoclonal antibody, G196, recognizes the small, soluble peptide DLVPR with high affinity. *Sci Rep*. 7, 43480 (2017)
6. Fuse T, Katsumata K, Morohoshi K, Mukai Y, Ichikawa Y, Kurumizaka H, Yanagida A, Urano T, Kato H, Shimizu M. Parallel mapping with site-directed hydroxyl radicals

- and micrococcal nuclease reveals structural features of positioned nucleosomes in vivo. *PLoS ONE*. 12, e0186974 (2017).
7. Suzuki S, Kato H, Suzuki Y, Chikashige Y, Hiraoka Y, Kimura H, Nagao K, Obuse C, Takahata S, Murakami Y. Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 44, 4147-4162 (2016).
 8. Nakayama N, Kato H, Sakashita G, Nariai Y, Nakayama K, Kyo S, Urano T. Protein complex formation and intranuclear dynamics of NAC1 in cancer cells. *Arch Biochem Biophys.* 606, 10-15 (2016).

〔学会発表〕

1. 加藤太陽、分裂酵母の 5'-UTR の特殊な塩基構成とクロマチンの関係、高次クロマチン研究会(BCC6)、東京、2015年9月
2. Kato H, Takahata S, Murakami Y, Urano T., Coupling of Transcription and Nucleosome Destabilization in Fission Yeast, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015年8月
3. 加藤太陽、高畑信也、村上洋太、浦野健、遺伝子の5'非翻訳領域で観察される未知の mRNA プロセッシング、生化学会 中国・四国支部例会、松江、2015年5月
4. 加藤太陽、高畑信也、村上洋太、浦野健、分裂酵母の転写開始点のマッピング、第9回エピジェネティクス研究会年会、東京、2015年5月



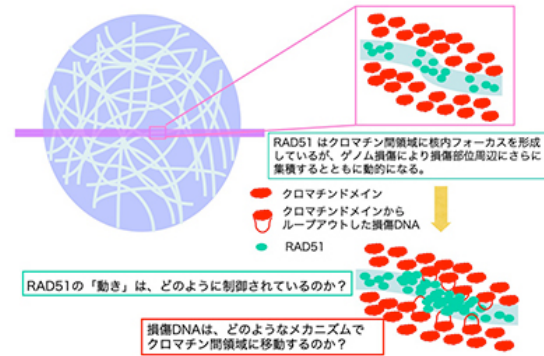
ゲノム修復における動的クロマチン構造変換

平成 26 年度～平成 29 年度

田代 聡 (広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授)

【研究目的】

染色体や核内蛋白質が構築する細胞核高次構造はクロマチン構造を反映し、DNA 代謝の制御に重要な役割を果たしていると考えられている。代表的な細胞核構造のモデルである染色体領域-クロマチン間領域モデルによれば、染色体領域は数 Mb の染色体 DNA を含むクロマチドメインと、クロマチドメインの間隙で様々な機能的蛋白質が存在するクロマチン間領域から構築され、転写やスプライシングは、クロマチドメインの表面で行われる可能性が示されている。しかし、ゲノム修復と細胞核高次構造の関連については未だ不明である。我々は、最も重篤なゲノム損傷である DNA 二本鎖切断の主な修復機構のひとつである相同組換え修復(HR)で重要な役割を果たす蛋白質 RAD51 が、過剰発現によりクロマチン間領域内の束状の領域に集積されること、この領域内に損傷 DNA が存在することを見だし、この領域は HR が行われる場所である可能性が示唆されました。そこで本研究では、この領域での RAD51 動態の制御機構と、損傷 DNA のこの領域への移動の制御機構について検討することで、ゲノム修復における動的クロマチン構造変換の役割の解明に取り組む。



【研究成果】

染色体や核内蛋白質が構築する細胞核高次構造はクロマチン構造を反映し、DNA 代謝の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。我々は、最も重篤なゲノム損傷である DNA 二本鎖切断の主な修復機構のひとつである相同組換え修復(HR)で重要な役割を果たす蛋白質 RAD51 が、損傷部位に集積して RAD51 フォーカスと呼ばれる核内高次構造体を構築することを見出していた。本研究では、ゲノム修復における RAD51 の局在・動態制御機構の解明に取り組んだ。その結果、RAD51 の損傷部位への集積は、SUMO 化修飾機構によるヒストンバリエント H2A.Z-2 の損傷部位での交換反応、核膜関連タンパク質ラミン B1 による RAD51 の分解制御、細胞質-核輸送機構に参与する hCAS/CSE1L による細胞核外への輸送など、様々なレベルで制御されていることが明らかになり、これらを論文発表した。さらに、超解像顕微鏡を用いた RAD51 フォーカスの解析から、RAD51 フォーカスは、損傷依存的に形態が変わること、損傷部位と損傷部位と相同な姉妹染色分体の間に形成されていること、相同組換え修復の

ために形成された ssDNA との局在関係が時間経過とともに密になることなどが明らかになり、現在論文投稿準備中である。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文] 査読あり 21 件、査読なし 1 件

1. Ariyandy A, Sakai C, Ishida M, Mizuta R, Miyagawa K, Tashiro S, Kinomura A, Hiraaki K, Ueda K, Yoshizumi M, Ishida T. XRCC3 polymorphism is associated with hypertension-induced left ventricular hypertrophy. *Hypertens Res.* 41, 426-434 (2018).
2. Miyamoto T, Akutsu SN, Tauchi H, Kudo Y, Tashiro S, Yamamoto T, Matsuura S. Exploration of genetic basis underlying individual differences in radiosensitivity within human populations using genome editing technology. *J Radiat Res.* 59 (suppl_2), ii75-ii82 (2018).
3. Shi L, Tashiro S. Estimation of the effects of medical diagnostic radiation exposure based on DNA damage. *J Radiat Res.* 59 (suppl_2), ii121-ii129 (2018).
4. Fukuto A, Ikura M, Ikura T, Sun J, Horikoshi Y, Shima H, Igarashi K, Kusakabe M, Harata M, Horikoshi N, Kurumizaka H, Kiuchi Y, Tashiro S. SUMO modification system facilitates the exchange of histone variant H2A.Z-2 at DNA damage sites. *Nucleus.* 9, 87-94 (2018).
5. Satoh K, Yasuda H, Kawakami H, Tashiro S. Relative Biological Effectiveness of Neutrons Derived from the Excess Relative Risk Model with the Atomic Bomb Survivors data Managed by Hiroshima University. *Radiat Prot Dosimetry.* 180, 346-350 (2018).
6. Royba E, Miyamoto T, Natsuko Akutsu S, Hosoba K, Tauchi H, Kudo Y, Tashiro S, Yamamoto T, Matsuura S. Evaluation of ATM heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity using genome editing in human cultured cells. *Sci Rep.* 7, 5996 (2017).
7. Fukumoto W, Ishida M, Sakai C, Tashiro S, Ishida T, Nakano Y, Tatsugami F, Awai K. DNA damage in lymphocytes induced by cardiac CT and comparison with physical exposure parameters. *Eur Radiol.* 27, 1660-1666 (2017).
8. Seirin Lee A, Tashiro S, Awazu A, Kobayashi R. A New Application of the Phase-field Method for Understanding the Reorganization Mechanisms of Nuclear Architecture. *Journal of Mathematical Biology.* 74, 333-354 (2017).
9. Nishino T, Matsunaga R, Jikihara H, Uchida M, Maeda A, Qi G, Abe T, Kiyonari H, Tashiro S, Inagaki-Ohara K, Shimamoto F, Konishi H. Antagonizing effect of CLPABP on the function of HuR as a regulator of ARE-containing leptin mRNA stability and the effect of its depletion on obesity in old male mouse. *Biochim Biophys Acta.* 1861, 1816-1827 (2016).
10. Livingston GK, Khvostunov IK, Gregoire E, Barquinero JF, Shi L, Tashiro S. Cytogenetic effects of radioiodine therapy: a 20-year follow-up study. *Radiat Environ Biophys.* 55, 203-13 (2016).
11. Misumi K, Sun J, Kinomura A, Miyata Y, Okada M, Tashiro S. Enhanced gefitinib-induced repression of the epidermal growth

- factor receptor pathway by ataxia telangiectasia-mutated kinase inhibition in non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* 107, 444-51 (2016).
12. 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, 637-46 (2016).
 13. Nakano Y, Ochi H, Onohara Y, Toshishige M, Tokuyama T, Matsumura H, Kawazoe H, Tomomori S, Sairaku A, Watanabe Y, Ikenaga H, Motoda C, Suenari K, Hayashida Y, Miki D, Oda N, Kishimoto S, Oda N, Yoshida Y, Tashiro S, Chayama K, Kihara Y. Common Variant Near HEY2 Has a Protective Effect on Ventricular Fibrillation Occurrence in Brugada Syndrome by Regulating the Repolarization Current. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 9, e003436 (2016).
 14. Okimoto S, Sun J, Fukuto A, Horikoshi Y, Matsuda S, Matsuda T, Ikura M, Ikura T, Machida S, Kurumizaka H, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y, Kiuchi Y, Tashiro S. hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair. *Genes Cells.* 20, 681-94 (2015).
 15. Toma A, Takahashi TS, Sato Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Nakada S, Fukuto A, Horikoshi Y, Tashiro S, Fukai S. Structural basis for ubiquitin recognition by ubiquitin-binding zinc finger of FAAP20. *PLoS One.* 10, e0120887 (2015).
 16. Tashiro S, Lanctôt C. The International Nucleome Consortium. *Nucleus.* 6, 89-92 (2015).
 17. Liu NA, Sun J, Kono K, Horikoshi Y, Ikura T, Tong X, Haraguchi T, Tashiro S. Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage. *FASEB J.* 29, 2514-25 (2015).
 18. Itoh-Nakadai A, Hikota R, Muto A, Kometani K, Watanabe-Matsui M, Sato Y, Kobayashi M, Nakamura A, Miura Y, Yano Y, Tashiro S, Sun J, Ikawa T, Ochiai K, Kurosaki T, Igarashi K. The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing the myeloid program. *Nat Immunol.* 15, 1171-80 (2014).
 19. Ishida M, Ishida T, Tashiro S, Uchida H, Sakai C, Hironobe N, Miura K, Hashimoto Y, Arihiro K, Chayama K, Kihara Y, Yoshizumi M. Smoking cessation reverses DNA double-strand breaks in human mononuclear cells. *PLoS One.* 9, e103993 (2014).
 20. Nishibuchi I, Suzuki H, Kinomura A, Sun J, Liu NA, Horikoshi Y, Shima H, Kusakabe M, Harata M, Fukagawa T, Ikura T, Ishida T, Nagata Y, Tashiro S. Reorganization of damaged chromatin by the exchange of histone variant H2A.Z-2. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 89, 736-44 (2014).
 21. Machida S, Takaku M, Ikura M, Sun J, Suzuki H, Kobayashi W, Kinomura A, Osakabe A, Tachiwana H, Horikoshi Y, Fukuto A, Matsuda R, Ura K, Tashiro S, Ikura T, Kurumizaka H. Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. *Sci Rep.* 4, 4863 (2014).

A01 公募研究(代表)

22. Ishida T, Ishida M, Tashiro S, Yoshizumi M, Kihara Y. Role of DNA damage in cardiovascular disease. *Circ J.* 78, 42-50 (2014).

[学会発表]

1. Tashiro S., Nuclear topography of homologous recombinational repair, The 3rd Hiroshima International Symposium on Future Science "Frontiers in Bioimaging Based Life Science", 広島, 2018年3月
2. Tashiro S., Nuclear topography of DNA repair, 4D Nuclome The Cell Nucleus in Space and Time, クラクフ(ポーランド), 2017年5月
3. Tashiro S., Nuclear Topography of homologous recombinational repair, Friedrich Miescher Institute Seminar, バーゼル(スイス), 2017年11月
4. Tashiro S., ATM regulates phosphorylation of ARP8 to repress the loading of INO80 and RAD51 to chromosome translocation breakpoint hotspots, 第33回京都大学放射線生物研究センター国際シンポジウム「放射線腫瘍生物学の最前線」, 京都, 2017年9月
5. Tashiro S., Cytogenetic effects of radioiodine therapy and CT scan -Application of biodosimetry to medicine, IAEA-Consultants Meeting on Clinical applications of biodosimetry and BIODOSE/RADBIO lab concept, ウィーン(オーストリア), 2016年7月
6. Tashiro S., Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage, Nuclear Organization & Function New York 2016年5月
7. Tashiro S., CT scan-induced DNA damage in

children measured using molecular markers and nanoscope technology, 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA,メルボルン(オーストラリア), 2016年3月

8. Tashiro S., Biological Estimation of the DNA Damage Induced by CT Scan., 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015), 京都, 2015年5月
 9. 田代聡, "相同組換え修復における損傷クロマチン動態", 第52回日本生物物理学会年会、札幌、2014年9月
 10. Tashiro S., Nuclear topography of homologous recombinational repair, Cold Spring Harbor meeting, ニューヨーク(アメリカ), 2014年8月
- 他、計19件



長鎖ノンコーディング RNA のクロマチンターゲティング

平成 26 年度～平成 27 年度

ヘテロクロマチン形成とクロマチン環境

平成 28 年度～平成 29 年度

佐渡 敬 (近畿大学・農学部・教授)

【研究目的】

多段階のプロセスからなるほ乳類のメスに特有な X 染色体不活性化は、胚発生初期に一方の X 染色体から発現する非コード *Xist* RNA がその X 染色体全体を覆うことで開始される。その後、この *Xist* RNA を足場として様々なエピジェネティック制御因子が X 染色体へリクルートされる。胎生期の不活性 X 染色体はそれらの作用によって段階的にエピジェネティック修飾を獲得し、不活性状態を確立・維持すると考えられる。その分子基盤の理解は、ヘテロクロマチン形成機構の解明に寄与すると期待される。本研究では、(1) ノンコーディング RNA である *Xist* が、どのような仕組みで X 染色体のクロマチンを標的として結合するのか、(2) 不活性 X 染色体に局在するクロマチン制御因子のひとつである *SmcHD1* が X 染色体の不活性状態の確立にどのように寄与するのか、について解析し、ヘテロクロマチン形成機構の一端を明らかにすることを目指した。

【研究成果】

(1) *hnRNP U* のノックアウトマウスを製作し、タモキシフェン (OHT) 投与により条件的に *hnRNP U* の機能を阻害できるコンディショナルアレルを持つメスの胚線維芽細胞 (MEF) を用いて解析を行った。その結果、OHT の投与により *hnRNP U* の機能を損なうと DAPI で濃染される構成的ヘテロクロマチンから H3K9me3 の局在が失われ

ることが新たに見出された。*hnRNP U* が RNA 結合タンパク質であることを考えると、この結果は H3K9me3 を触媒するヒストンメチル化酵素を構成的ヘテロクロマチン領域にリクルートするのに何らかの RNA 分子が関わる可能性を示唆するものかもしれない。この時 DAPI の染色パターンに大きな変化はないことから、ヘテロクロマチンの状態は維持されていると考えられるが、構成的ヘテロクロマチンに局在する他の因子への影響についても解析を行っている。また、構成的にヘテロクロマチンへの H3K9me3 の局在に *lncRNA* が関与するかについても解析を進めている。

(2) SMC ファミリーに属し、クロマチン制御因子をコードする *SMCHD1* はヒトの 2 型顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD2) の原因遺伝子である。*SMCHD1* の変異は、4 番染色体長腕末端の D4Z4 リピートのクロマチン構造の異常を招き、その領域に存在する *DUX4* 遺伝子の異所的な発現を引き起こす。これが FSHD の発症に深く関係していると考えられるが、その詳細は不明である。興味深いことに、マウスオソログである *Smchd1* の機能欠損胚の解析から、*SmcHD1* が不活性 X 染色体の転写抑制状態の維持にも重要な役割を果たしていることが示されている。したがって、不活性 X 染色体のクロマチン制御機構における *SmcHD1* の役割を明らかにすることは、FSHD の病態解明に欠かせない *SMCHD1* の作用機序の理解にも寄与すると期待される。

我々はX染色体不活性化の確立と維持における SmcHD1 の役割を明らかにするため、SmcHD1 欠損胚の解析を行ってきた。SmcHD1 欠損胚および胎仔より調製した胚線維芽細胞 (MEF) では、発生の進行に伴い、いったんは不活性化された X 連鎖遺伝子が脱抑制される。脱抑制されるこれらの遺伝子座においては、しばしば H3K27me3 の局在が減少していた。さらに、これらの遺伝子の多くは野生型の胚盤胞において H3K27me3 の局在が低い遺伝子群に含まれていた。興味深いことに、X 染色体不活性化が確立したあとの野生型のメスの MEF で SmcHD1 の機能を阻害しても、不活性 X 染色体に大きな影響は観察されなかった。これらの結果より、SmcHD1 は H3K27me3 などのエピジェネティック修飾の局在が低いながらも発生初期に発現が抑制される X 連鎖遺伝子座に、その後エピジェネティック修飾の導入を促し、安定な不活性状態を構築することに寄与していると推察される。

【本研究課題に関する主要成果】

〔雑誌論文〕すべて査読あり

1. Amakawa Y, Sakata Y, Hoki Y, Arata S, Shioda S, Fukagawa T, Sasaki H, Sado T. A new Xist allele driven by a constitutively active promoter is dominated by Xist locus environment and exhibits the parent-of-origin effects. *Development*. 142, 4299-4308 (2015).
2. Sakaguchi T, Hasegawa Y, Brockdorff N, Tsutsui K, Tsutsui KM, Sado T, Nakagawa S. Control of Chromosomal Localization of Xist by hnRNP U Family Molecules. *Dev Cell*. 39, 11-12 (2016).
3. Sakata Y, Nagao K, Hoki Y, Sasaki H, Obuse C, Sado T. Defects in dosage compensation impact global gene regulation in the mouse

trophoblast. *Development*. 144, 2784-2797 (2017).

4. Chigi Y, Sasaki H, Sado T. The 5' region of Xist RNA has the potential to associate with chromatin through the A-repeat. *RNA* 23, 1894-1901 (2017).
5. Sakakibara Y, Nagao K, Blewitt M, Sasaki H, Obuse C, and Sado T. Role of SmcHD1 in establishment of epigenetic states required for the maintenance of the X-inactivated state in mice. *Development* 145, pii: dev166462 (2018).
6. Sado T. What makes the maternal X chromosome resistant to undergoing imprinted X inactivation? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 372, pii: 20160365 (2017).
7. Shiura H, Sakata Y, Abe K and Sado T. RNA-FISH and Immunofluorescence of Mouse Pre- and Post-implantation Embryos. In "X chromosome inactivation" *Methods in Molecular Biology series* 1861, 161-176, Springer Nature (2018).

他、計 11 件

〔学会発表〕

1. Sado T., Defects in dosage compensation impact global gene regulation in the mouse trophoblast, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017年9月
 2. Sado T., X chromosome inactivation initiated by dysfunctional Xist RNA, The Royal Society Conference, X chromosome inactivation: a tribute to Mary Lyon, ロンドン(イギリス), 2016年10月
- 他、計 38 件

新規エピゲノム分析によるクロマチン変異の解析

平成26年度～平成27年度

甲斐 雅亮（長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授）

【研究目的】

細胞のがん化には DNA の変異・欠損だけでなく、DNA の暗号情報の変化を伴わないクロマチン変異が深く関与している。クロマチン変異は、DNA メチル化と、ヒストンのメチル化・アセチル化・リン酸化を含むヒストン修飾の 2 種に大別される。DNA メチル化とヒストン修飾のパターンは各生体組織によって異なる一方、がん化した細胞での特定遺伝子領域において、高頻度なメチル化など、がん特異的なクロマチン変異が報告されている。

本研究では、研究代表者らがこれまで研究してきた、修飾核酸塩基を導入した人工 siRNA 創製技術、シトシンに特異的な蛍光検出反応、修飾アミノ酸ペプチドを蛍光検出できるタンパク質配列決定法等の新しい分析技術を応用し、シトシンのメチル化位置を定量評価するメチローム解析、及びヒストン修飾の種類と部位を定量的に解析できるタンパク質配列決定の新技法を開発して、新たながん標的遺伝子の発現を抑制する人工 siRNA を創出することを目的としている。

【研究成果】

まず、メチル化シトシンを含む配列既知の 39 bp からなる合成 2 本鎖 DNA を用いて、加水分解したのち、DNA 中のシトシンを蛍光反応によって定量できるか調べた。その結果、加水分解反応や蛍光反応の条件を検討したところ、本測定法によって、メチル化シトシンを定量することができた。

次に、正常細胞由来として繊維芽細胞、がん細胞由来として HeLa 細胞からヒストンを抽出し、3 種類の酵素（トリプシン、キモトリプシン、プロテイナーゼ K）によって分解した。分解ペプチドを新規の

蛍光誘導体化反応によって特異的に蛍光体にしたのち、HPLC による蛍光検出および分離プロファイルと比較したところ、両細胞由来のヒストン間で、高さや位置の異なる複数の蛍光ピークが観察された。この結果は、本測定法によって、アセチル化などのヒストン修飾部位を検出できることを示している（図1）。今後、がん組織およびその周辺の正常組織からのヒストンや DNA を抽出する方法を検討し、今回開発した検出法を用いて、がんおよび正常組織由来のクロマチン変異を簡便に同定解析できる手法を開発する予定である。

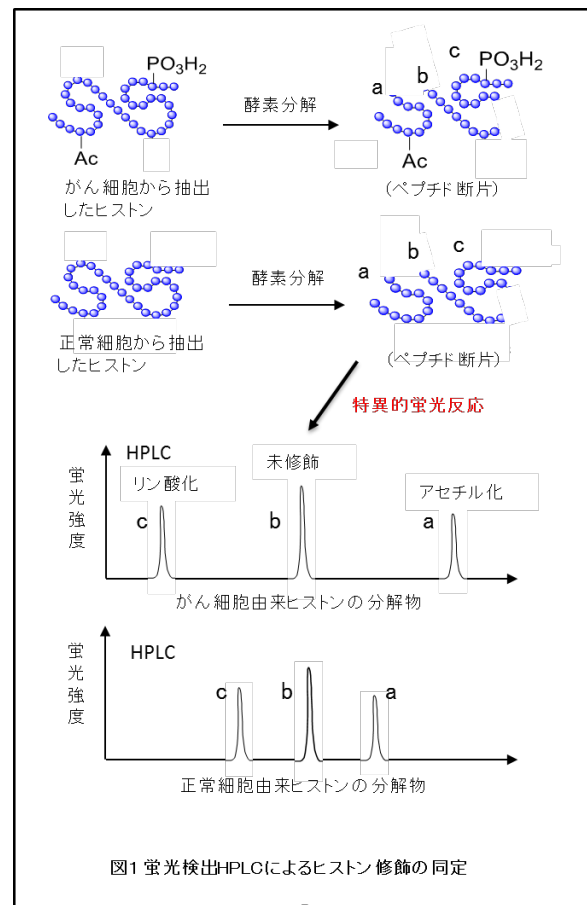


図1 蛍光検出HPLCによるヒストン修飾の同定

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. El-Mahdy AF, Shibata T, Kabashima T, Kai M. Dendrimer-like polymeric DNAs as chemiluminescence probes for amplified detection of telomere DNA on a solid-phase membrane. *Chem Commun.* 50, 859-861 (2014).
2. Dragusha S, Shibata T, Yin S, Fujita JY, Kabashima T, Kai M. Selective, sensitive and fluorometric determination of urinary cytosine with 4-trifluoromethylbenzamid oxime and N,N-dimethylformamide. *Clin Chim Acta.* 429, 123-128 (2014).
3. Yasmin H, Kabashima T, Rahman MS, Shibata T, Kai M. Amplified and selective assay of collagens by enzymatic and fluorescent reactions. *Sci Rep.* 4, 4950. doi: 10.1038/srep04950 (2014).
4. Yasmin H, Rahman MS, Shibata T, Kabashima T, Kai M. A novel fluorometric method for the selective determination of Pro-Gly and Pro-Gly-Pro. *Int J Pept Res Ther.* 20, 441-446 (2014).
5. Baj S, Krawczyk T, Pradel N, Azam MG, Shibata T, Dragusha S, Skutil K, Pawlyta M, Kai M. Carbon Nanofiber-based Luminol-biotin probe for sensitive chemiluminescence detection of protein. *Anal Sci.* 30, 1051-1056 (2014).
6. El-Mahdy AF, Ejupi V, Shibata T, Kabashima T, Lu J, Kai M. Facile preparation of streptavidin-coated sephadex beads and their application to chemiluminescence detection of a target DNA. *Microchim Acta.* 182, 495-503 (2015).
7. Yasmin H, Rahman MS, Shibata T, Kabashima T, Kai M. Sensitive and selective determination of peptides, PG and PGP, using a novel fluorogenic reagent 4-chlorobenzene-1,2-diol. *Chem Pap.* 69, 504-509 (2015).
8. Azam MG, Yamasuji M, Krawczyk T, Shibata T, Kabashima T, Kai M. Chemiluminescence-imaging detection of DNA on a solid-phase membrane by using a peroxidase-labeled macromolecular probe. *Talanta.* 139, 138-142 (2015).
9. Zhu Q, Yu Z, Kabashima T, Yin S, Dragusha S, El-Mahdy AF, Ejupi V, Shibata T, Kai M. Fluorometric assay for phenotypic differentiation of drug-resistant HIV mutants. *Sci Rep.* 5, 10323. doi: 10.1038/srep10323 (2015).
10. Yin S, Dragusha S, Ejupi V, Shibata T, Kabashima T, Kai M. Sensitive and selective determination of orotic acid in biological specimens using a novel fluorogenic reaction. *J Fluoresc.* 25, 1005-1011 (2015).
11. El-Mahdy AF, Shibata T, Kabashima T, Zhu Q, Kai M. Delivery of siRNA using siRNA/cationic vector complexes encapsulated in dendrimer-like polymeric DNAs. *RSC Adv.* 5, 32775-32785 (2015).
12. Ejupi V, Dragusha S, Kabashima T, Zhu Q, El-Mahdy AF, Yin S, Shibata T, Kai M. Spectrofluorometric assays of human collagenase activity using native collagen and acetyl-peptide substrates. *Adv Enzy Res.* 3, 19-29 (2015).
13. Zhu Q, Liu G, Kai M. DNA aptamers in the diagnosis and treatment of human diseases.

A01 公募研究 (代表)

- Molecules*. 20, 20979-20997 (2015).
14. Yin S, Kabashima T, Zhu Q, Shibata T, Kai M. Fluorescence assay of dihydroorotate dehydrogenase that may become a cancer biomarker. *Sci Rep*. 7, 40670. doi: 10.1038/srep40670 (2017).
- [学会発表]
1. 大島澄佳、柴田孝之、椛島力、甲斐雅亮、新規蛍光反応による DNA 中のメチル化シトシン定量法の開発、日本薬学会第 136 年会、横浜、2016 年 3 月
 2. 柴田孝之、田上奈緒美、椛島力、甲斐雅亮、ペプチドの新規蛍光検出反応および HPLC によるヒストン修飾部位の解析、新アミノ酸分析研究会第 5 回学術講演会、東京、2015 年 12 月
 3. 安達杏奈、椛島力、柴田孝之、甲斐雅亮、DNA アプタマーの HER2 発現細胞への導入、第 32 回日本薬学会九州支部大会、宮崎、2015 年 11 月
 4. 陣内伸俊、椛島力、柴田孝之、甲斐雅亮、プリオンタンパク質の加熱処理によるプロテアーゼ抵抗性への影響、第 32 回日本薬学会九州支部大会、宮崎、2015 年 11 月
 5. 田上奈緒美、椛島力、柴田孝之、甲斐雅亮、新規蛍光反応によるヒストン修飾解析法の開発、第 32 回日本薬学会九州支部大会、宮崎、2015 年 11 月
 6. Jianzhong Lu, Masaaki Kai, Platforms of luminescence in analytical chemistry for nucleic acids, 日本分析化学会第 64 年会、福岡、2015 年 9 月
 7. Sheng Yin, Tsutomu Kabashima, Takayuki Shibata, Masaaki Kai, Fluorometric assay of dihydroorotate dehydrogenase activity and orotic acid concentration in a cell lysate, 日本分析化学会第 64 年会、福岡、2015 年 9 月
 8. Valon Ejupi, Tsutomu Kabashima, Takayuki Shibata, Masaaki Kai, Collagenase activity and its stimulation in cultured cells by spectrofluorometric evaluation, 日本分析化学会第 64 年会、福岡、2015 年 9 月
 9. 安達杏奈、朱欽昌、椛島力、柴田孝之、甲斐雅亮、DNA アプタマー-siRNA による HIV プロテアーゼの発現抑制効果、第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、長崎、2015 年 8 月
 10. 椛島力、曾宮実和子、柴田孝之、甲斐雅亮、3,4-DHPAA 蛍光反応の新規プロリダーゼ活性測定法への応用、日本薬学会第 135 年会、神戸、2015 年 3 月
 11. 川島歌織、椛島力、柴田孝之、甲斐雅亮、ペプチドに特異的な蛍光反応を用いた HIV/HCV 識別法の開発、第 31 回日本薬学会九州支部大会、福岡、2014 年 12 月
 12. 曾宮実和子、椛島力、柴田孝之、甲斐雅亮、3,4-DHPAA を用いた新規プロリダーゼ活性測定法の開発、第 31 回日本薬学会九州支部大会、福岡、2014 年 12 月
 13. 尹晟、椛島力、柴田孝之、甲斐雅亮、Dihydroorotate dehydrogenase assay using a specific fluorescence reaction、日本分析化学会第 63 年会、広島、2014 年 9 月
 14. Valon Ejupi, 椛島力、柴田孝之、甲斐雅亮、Assay of collagenase activity in human cells using a novel fluorescence reaction、日本分析化学会第 63 年会、広島、2014 年 9 月



血液細胞分化におけるクロマチン動構造の研究

平成 26年度～平成 27年度

斉藤 寿仁 (熊本大学・大学院・先端科学・教授)

【研究目的】

好中球は骨髄の血液幹細胞から分化・成熟する白血球の一種で、分化・成熟の過程で核が3～4 つに区画化され、「分葉核」と呼ばれる構造になる。成熟した好中球は体内で細菌などの病原菌と遭遇すると、それらを捕獲・貪食し、貪食後には分葉核内のクロマチンを一斉に伸長させて、細胞外に放出する。この現象は、「Neutrophil Extracellular Traps (NETs)」と呼ばれている。NETs が形成する特殊な細胞外クロマチン構造は、抗菌作用を呈するが、その生理的な意義や構造的な基盤は十分明らかではない。

好中球の分化と成熟に伴う核構造の変化、すなわち球状核→分葉化→NETs 構造に至る大規模な核膜とクロマチンのリモデリング制御の解明は、新たな核の高次構造の構築原理を明らかにすることにつながると考えられた。本研究では、低分子化合物による細胞核とクロマチンの大規模リモデリングを誘導する「ケミカルリモデリング」実験系を確立し、今まで知られていない核とクロマチン動構造の制御基盤の一端をイメージングと生化学分析によって明らかにすることを目的とした。

現在、クロマチンと核の研究としては、エピジェネティックな解析が盛んであるが、近い将来は、より高次の階層におけるクロマチンと核の構造研究が主流になると推測される。本研究で確立されたケミカルリモデリング実験系は、今

後のクロマチン動構造研究の指針になる新たな原理の発見や技術の開発に貢献すると考えられる。

【研究成果】

(1) HL-60 細胞を用いた分葉核へのケミカルリモデリング誘導条件の確立と分葉核の形成・維持の分子制御の解析

血液細胞の分化の研究に用いられている白血病細胞株 HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) をレチノイン酸や dimethyl sulfoxide (DMSO) によって処理することで、未分化な球状核から好中球様の分葉核に誘導する実験条件を確立して、核膜、核内構造体や核輸送因子、微小管、アクチンなどの局在を観察を免疫染色法によって観察した。アクチンの量的な増加および局在の変動、ラミン A/B/C の減少、RanGTPase 制御因子の減少を観察したことから、Rho/Rac と Ran の 2 つの GTPase のバランス制御が分葉核の形成に関与する可能性を示唆した(図 1)。

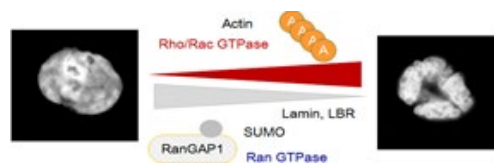


図1. 分葉核のケミカルリモデリング誘導系の確立と分子制御の解析。

(2) HL-60 細胞を用いた細胞外クロマチンのケミカルリモデリング誘導系の確立とその分子基盤の解析

HL-60 細胞を小胞体 ER ストレス誘導剤および

糖鎖修飾阻害剤として知られるツニカマイシン tunicamycin (TN) で処理することで、効率よく核内 DNA を細胞外に放出させる条件を見出した。好中球でも同様の誘導が観察できた。細胞外 DNA の放出過程をライブ観察した結果、形態的に識別できる 2 つのステップ(核放出とクロマチン放出)が存在することを明らかにした。また、TN 処理細胞では活性酸素種 ROS の生産が活発になることも明らかにして、好中球の NET 形成と類似の分子経路が活性化されていることを示唆した(図2)。

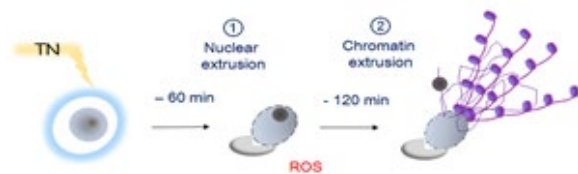


図2. 細胞外 DNA のケミカルリモデリング誘導系の確立と分子制御の解析.

(3) ケミカルリモデリングによる微小核の形成と微小核内部におけるクロマチン構造の分子制御の解析

微小核の形成は核とクロマチンの大規模な構造変換を伴う過程であり、クロモソプシス chromothripsis や細胞老化 senescence などの細胞のがん化に関わる現象と深く関わる。このことから、微小核の形成とその内部でのクロマチン動構造の制御解析は重要と考えて、本研究を開始した。微小管阻害剤と分裂期キナーゼ阻害剤を用いた2つの異なる条件下で、微小核を誘導する培養細胞系を確立し(図3)、核膜構造の分断化やヒストン修飾の変化についての解析を開始して、新

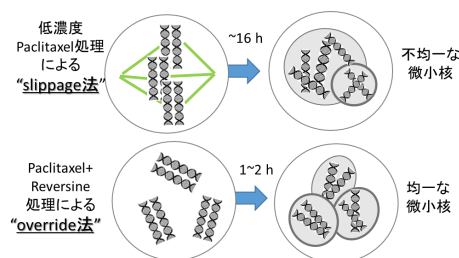


図3. 微小核のケミカルリモデリング誘導条件の確立と分子制御の解析.

たな知見を得つつある。後継の領域研究につなげていければと考えている。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文] 査読あり 22 件、査読なし 2 件

1. Takir GG, Ohsaki Y, Morotomi K, Yano K, Saitoh H. Linkage between lipid droplet formation and nuclear deformation in HeLa human cervical cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 504, 485-490 (2018).
2. Okada S, Yankawa S, Saitoh H. Wash-free instant detection of giant plasma membrane vesicles. *Anal. Biochem.* 557, 59-61 (2018).
3. Komiya M, Ito A, Endo M, Hiruma D, Hattori M, Saitoh H, Yoshida M, Ozawa A. genetic screen to discover SUMOylated proteins in living mammalian cells. *Sci. Rep.* 7, 17443 (2017).
4. Nakamura T, Murakami K, Tada H, Uehara Y, Nagami J, Maehara K, Okawa Y, Saitoh H, Nishitani H, Ono T, Nishi R, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Thymine DNA glycosylase modulates the DNA damage response and gene expression by base excision repair-dependent and -independent mechanisms. *Genes to Cells* 22, 392-405 (2017).
5. Iihoshi H, Ishihara T, Kuroda S, Ishihara N, Saitoh H. Aclarubicin, an anthracycline anti-cancer drug, fluorescently contrasts mitochondria and reduces the oxygen consumption rate in living human cells. *Toxicol. Lett.* 277, 109-114 (2017).

6. Matsumoto H, [Saitoh H](#). Puromycin induces SUMO and ubiquitin redistribution upon proteasome inhibition. Puromycin induces SUMO and ubiquitin redistribution upon proteasome inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 476, 153-158 (2016).
7. Uozumi N, Matsumoto H, [Saitoh H](#). Detection of O-propargyl-puromycin with SUMO and ubiquitin by click chemistry at PML-nuclear bodies during abortive proteasome activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 474, 247-251 (2016).
8. Higashi H, Wang D, Matsuoka T, Namihira T, Akiyama H, [Saitoh H](#). GFP Transduction into HeLa Cells Using Atmospheric-Pressure Helium Plasma Jet. *IEEE Transactions on Plasma Sci.* 44, 1-7 (2016).
9. Nakayama T, Saitoh N, Morotomi-Yano K, Yano K, Nakao M, [Saitoh H](#). Nuclear extrusion precedes discharge of genomic DNA fibers during tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap-osis (NETosis)-like cell death in cultured human leukemia cells. *Cell Biol. Int.* 40, 597-602 (2016).
10. Yuasa E, [Saitoh H](#). *In Situ* SUMOylation and DeSUMOylation Assays: Fluorescent Methods to Visualize SUMOylation and DeSUMOylation in Permeabilized Cells. *Methods Mol. Biol.* 1475, 151-159 (2016).
11. Jamiruddin MR, Kaitsuka T, Hakim F, Fujimura A, Wei FY, [Saitoh H](#), Tomizawa K. HDAC9 regulates the alternative lengthening of telomere (ALT) pathway via the formation of ALT-associated PML bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 481, 25-30 (2016).
12. Mihara K, Nakayama T, [Saitoh H](#). A Convenient Technique to Fix Suspension Cells on a Coverslip for Microscopy. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 68, 4.30.1-10 (2015).
13. Akita M, Tak Y-S, Shimura T, Matsumoto S, Okuda-Shimizu Y, Shimizu Y, Nishi R, [Saitoh H](#), Iwai S, Mori T, Ikura T, Sakai W, Hanaoka F, Sugasawa K. SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C protein regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *Sci. Rep.* 5, 10984 (2015).
14. Nakayama T, Mihara K, Kawata J, Kimura H, [Saitoh H](#). Adhesion of suspension cells on a coverslip in serum-free conditions. *Anal. Biochem.* 466, 1-3 (2014).
15. Nakayama T, [Saitoh H](#). Tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap (NET)-like structures in cultured human myeloid cell lines. *Cell Boil. Int.* 39, 355-359 (2014).
16. Saito M, Fujimitsu Y, Sasano T, Yoshikai Y, Ban-Ishihara R, Nariai Y, Urano T, [Saitoh H](#). The SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 localizes to etoposide-exposed mitotic chromosomes: implication for a novel DNA damage response during mitosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447, 83-88 (2014).
17. Moriyama T, Fujimitsu Y, Yoshikai Y, Sasano T, Yamada K, Murakami M, Urano T, Sugasawa K, [Saitoh H](#). SUMO-modification and elimination of the active DNA demethylation enzyme TDG in cultured

- human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447, 419-424 (2014).
18. Nakayama T, Yuasa E, Kanemaru A, Saito M, Saitoh H. Construction of a mouse Aosl-Uba2 chimeric SUMO-E1 enzyme, mAU, and its expression in baculovirus-insect cells. *Bioengineered* 5, 133-137 (2014).
 19. Hirohama M, Voet AR, Ozawa T, Saitoh H., Nakao Y, Zhang KY, Ito A, Yoshida M. Assay methods for small ubiquitin-like modifier (SUMO)-SUMO-interacting motif (SIM) interactions in vivo and in vitro using a split-luciferase complementation system. *Anal. Biochem.* 448, 92-94 (2014).
 20. Takamura T, Wang D, Satoh T, Namihira T, Saitoh H., Akiyama H. Effect of Atmospheric-Pressure Helium Plasma Jet on Cell Culture Medium. *Electronics and Communications in Japan* 97, 65-73 (2014).
 21. Kawata J, Kikuchi M, Saitoh H. Genomic DNAs in a human leukemia cell line unfold after cold shock, with formation of neutrophil extracellular trap-like structures. *Biotechnol. Lett.* 36, 241-250 (2014).
- 他、計 23 件
- [学会発表]
1. 魚住直毅、斉藤寿仁、SUMO とユビキチンによる新生ポリペプチド鎖の核内における品質管理の制御、第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会、神戸、2015 年 12 月
 2. 湯浅映里・斉藤寿仁、トポイソメラーゼ反応阻害剤による M 期染色体の損傷と SUMO-RNF4-ユビキチン経路の活性化、第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会、神戸、2015 年 12 月
 3. 榊田実紗妃、斉藤寿仁、SUMO とユビキチン修飾による塩基除去修復因子 TDG の細胞内局在と安定性の制御、第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会、神戸、2015 年 12 月
 4. 中山智文、三原佳子、斉藤寿仁、血液細胞分化における核の分葉化と細胞死における細胞外クロマチンの形成、第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会、神戸、2015 年 12 月
 5. Yuasa E, Masuda M, Saitoh H., Characterization of Chromatin Regulators that Interact with SUMO-2/3: Toward Elucidating Roles of the SUMO Modification Pathway in Epigenetic, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015 年 8 月
 6. Nakayama T, Mori K, Saitoh H., Tunicamycin Induces Extracellular Chromatin in Cultured Human Myeloid Cell Lines., International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015 年 8 月
 7. 三原佳子、中山智文、斉藤寿仁、新しい浮遊細胞の固定法を用いたヒト白血病細胞株 HL-60 の核の分葉化の制御に関する研究、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月
他、計 9 件



ノンコーディング RNA 転写と共役したクロマチン構造変化の
制御機構の解明 平成 26 年度～平成 27 年度

非コード RNA によるクロマチン・高次ゲノム構造制御機構の
解明 平成 28 年度～平成 29 年度

廣田 耕志 (首都大学東京・理学研究科・教授)

【研究目的】

タンパク質をコードしない転写物(非コード RNA)は、ヒトゲノムの広範な領域において転写されている。非コード RNA の中で遺伝子プロモーター領域において発現する転写物は、プロモーター非コード RNA と呼ばれており、遺伝子制御において機能することが知られている。このような RNA 転写は酵母からヒトにいたる広範な真核細胞に見られ、その重要性が注目されているが、その制御機構には多くの不明な点が残っている。本研究では、独自に同定している分裂酵母 *fbp1* 遺伝子プロモーター領域に発現している「mlonRNA」と名付けた非コード RNA の、クロマチン構造・高次ゲノム構造の制御を介した遺伝子調節機構における働きについて解明することを目的とした。

【研究成果】

(1) mlonRNA の転写領域のヒストンアセチル化とクロマチンリモデラー因子による制御機構
mlonRNA の転写される領域において、転写活性化段階において RNAP-II の結合分布はプロモーター上流から下流領域に順次変化する。この変化とともに、ヒストンアセチル化が引き起こされることから、プロモーター領域での RNAP-II 通過が、その領域のアセチル化に関わることが示唆された。この仮説の証明のため、RNAP-II 通過領域に転写終結配列を挿入した細胞を作製した。この細胞では、mlonRNA 転写終結より上流にはアセチル

化がみられ、終結配列挿入部位下流のアセチル化のみが阻害されていることが判明し、mlonRNA を転写する転写ポリメラーゼが通過領域のヒストンをアセチル化することが示唆された。また、遺伝学的解析から、このアセチル化が Gcn5 アセチルトランスフェラーゼに依存することや、その後のリモデリングには Snf22 および Hrp3 リモデリング因子が相補的に寄与することが判明した。さらに、これらリモデリング因子は、アセチル化にも必要であることから、アセチル化とリモデリングが相互に依存しながら進められるという、これまでには考えられてこなかった機構を同定した(業績 6)。

(2) 転写活性化因子 Atf1, Rst2, Php2-5 と転写抑制補因子 Tup11/12 による転写制御機構

転写抑制補因子 Tup11/12 の3段階の転写抑制機構を同定した。(1) Tup11/12 が転写因子結合部位のクロマチン状態を、接近できない状態に維持している。パイオニア転写因子の Atf1 は転写誘導シグナルに応答し、最初に DNA に結合し Tup11/12 による転写因子結合領域のクロマチン抑制を解除し、開いたクロマチン構造に変化させる。(2) Tup11/12 による TATA ボックスのクロマチン抑制を Php2-5 転写活性化因子が転写因子結合領域に結合して解除する。(3) TATA ボックスへの安定な RNAP-II 複合体の結合を Tup11/12 は阻害している。この阻害を Rst2 が転写因子結合部位に結合することで解消し、大規模な転写につな

げる。(1)-(3)の3段階のクロマチン-転写制御機構を解明した(業績 20)。

(3) 高次ゲノム構造形成を介した転写制御機構
mlonRNA 転写領域のクロマチン構造が開いた構造に変化した後、この領域に存在する2箇所の転写因子結合部位が接近したループ構造を形成することを見出した。この構造を通じて Rst2 転写因子が上流結合領域から下流結合領域に結合分布を変化させることで、特異的な転写誘導に必須の働きを持つことを見出した。この発見で、高次ゲノム構造を通じた転写因子のテンポラルな結合制御機構を初めて提唱できた(業績 13)。

(4) mlonBox の発見、普遍的 mlonRNA 転写のクロマチン構造制御機構の発見

分裂酵母の *fbp1* 遺伝子プロモーター領域に発現する mlonRNA の転写開始に必要な配列を同定し、発現領域の 290bp 以内のヌクレオソームが効果的に開いた構造に変化することを見出した(業績 1)。さらに、mlonRNA 転写に必要なコンセンサス配列を同定し、「mlonBox」と名付けた。この配列を減数分裂期相同組換え部位 *ade6-M26* に移植する実験で、*fbp1* 以外の領域でも機能し、転写のみならず組換え活性化に寄与することを示した。また、分裂酵母ゲノムの mlonBox の分布の情報学的解析から、天然の減数分裂機相同組換え部位や転写開始部位と有意なオーバーラップを認めることができ、分裂酵母ゲノムの普遍的な制御に mlonRNA による機構が関わることを示唆できた(未発表)。

(5) mlonRNA 分子の機能の発見

転写された mlonRNA 分子自体が Tup11/12 転写抑制因子に結合し、Tup11/12 による Atf1 の DNA 結合を抑制する機能を解除することを見出した。この研究で、mlonRNA 転写には、転写装置の通過によるクロマチン制御と転写された RNA 分子自身による制御があることが示された(業績 18)。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Senmatsu S, Asada R, Abe T, Ohta K, Hoffman CS and Hirota K. lncRNA transcriptional initiation induces chromatin remodeling within a limited range in the fission yeast *fbp1* promoter. *Scientific Rep.* (in press).
2. Umeda M, Tsunekawa C, Senmatsu S, Asada R, Abe T, Ohta K, Hoffman CS, Hirota K. Histone-chaperone Asf1 is required for the establishment of repressive chromatin in *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* gene repression. *Mol. Cell Biol.* 38, 18 (2018).
3. Saha LK, Kim S, Kang H, Akter S, Choi K, Sakuma T, Yamamoto T, Sasanuma H, Hirota K, Nakamura J, Honma M, Takeda S, Dertinger S. Differential micronucleus frequency in isogenic human cells deficient in DNA repair pathways is a valuable indicator for evaluating genotoxic agents and their genotoxic mechanisms. *Environ. Mol. Mutagen.* 59, 529-538 (2018).
4. Ooka M, Abe T, Cho K, Koike K, Takeda S, Hirota K. Chromatin remodeler ALC1 prevents replication-fork collapse by slowing fork progression. *PLoS One* 13, e0192421 (2018).
5. Nakazato A, Kajita K, Ooka M, Akagawa R, Abe T, Takeda S, Branzei D, Hirota K. SPARTAN promotes genetic diversification of the immunoglobulin-variable gene locus in avian DT40 cells. *DNA Repair (Amst)* 68, 50-57 (2018).
6. Adachi A, Senmatsu S, Asada R, Abe T, Hoffman CS, Ohta K, Hirota K. Interplay

- between chromatin modulators and histone acetylation regulates the formation of accessible chromatin in the upstream regulatory region of fission yeast *fbp1*. *Genes Genet. Syst.* 92, 267-276 (2018).
7. Abe T, Ooka M, Kawasumi R, Miyata K, Takata M, Hirota K, Branzei D. Warsaw breakage syndrome DDX11 helicase acts jointly with RAD17 in the repair of bulky lesions and replication through abasic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 8412-8417 (2018).
 8. Abe T, Kawasumi R, Giannattasio M, Dusi S, Yoshimoto Y, Miyata K, Umemura K, Hirota K, Branzei D. AND-1 fork protection function prevents fork resection and is essential for proliferation. *Nat. Commun.* 9, 3091 (2018).
 9. Tsuda M, Terada K, Ooka M, Kobayashi K, Sasanuma H, Fujisawa R, Tsurimoto T, Yamamoto J, Iwai S, Kadoda K, Akagawa R, Huang SN, Pommier Y, Sale JE, Takeda S, Hirota K. The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase epsilon in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C). *Oncotarget* 8, 33457-33474 (2017).
 10. Tsuda M, Cho K, Ooka M, Shimizu N, Watanabe R, Yasui A, Nakazawa Y, Ogi T, Harada H, Agama K, Nakamura J, Asada R, Fujiike H, Sakuma T, Yamamoto T, Murai J, Hiraoka M, Koike K, Pommier Y, Takeda S, Hirota K. ALC1/CHD1L, a chromatin-remodeling enzyme, is required for efficient base excision repair. *PLoS One* 12, e0188320 (2017)
 11. Kawasumi R, Abe T, Arakawa H, Garre M, Hirota K, Branzei D. ESCO1/2's roles in chromosome structure and interphase chromatin organization. *Genes Dev.* 31, 2136-2150 (2017).
 12. Fujisawa R, Ohashi E, Hirota K, Tsurimoto T. Human CTF18-RFC clamp-loader complexed with non-synthesising DNA polymerase epsilon efficiently loads the PCNA sliding clamp. *Nucleic Acids Res.* 45, 4550-4563 (2017).
 13. Asada R, Umeda M, Adachi A, Senmatsu S, Abe T, Iwasaki H, Ohta K, Hoffman CS, Hirota K. Recruitment and delivery of the fission yeast Rst2 transcription factor via a local genome structure counteracts repression by Tup1-family corepressors. *Nucleic Acids Res.* 45, 9361-9371 (2017).
 14. Hirota K, Tsuda M, Mohiuddin, Tsurimoto T, Cohen IS, Livneh Z, Kobayashi K, Narita T, Nishihara K, Murai J, Iwai S, Guilbaud G, Sale JE, Takeda S. In vivo evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Res.* 44, 7242-7250 (2016).
 15. Kobayashi K, Guillian TA, Tsuda M, Yamamoto J, Bailey LJ, Iwai S, Takeda S, Doherty AJ, Hirota K. Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleosides. *Cell Cycle* 15, 1997-2008 (2016).
 16. Ooka M, Kobayashi K, Abe T, Akiyama K, Hada M, Takeda S, Hirota K. Determination of genotoxic potential by comparison of structurally related azo dyes using DNA

- repair-deficient DT40 mutant panels. *Chemosphere* 164, 106-112 (2016).
17. Ooka M, Takazawa H, Takeda S, Hirota K. Cytotoxic and genotoxic profiles of benzo[a]pyrene and N-nitrosodimethylamine demonstrated using DNA repair deficient DT40 cells with metabolic activation. *Chemosphere* 144, 1901-1907 (2016).
 18. Takemata N, Oda A, Yamada T, Galipon J, Miyoshi T, Suzuki Y, Sugano S, Hoffman CS, Hirota K, Ohta K. Local potentiation of stress-responsive genes by upstream noncoding transcription. *Nucleic Acids Res.* 44, 5174-5189 (2016).
 19. Yamamoto J, Takahata C, Kuraoka I, Hirota K, Iwai S. Chemical Incorporation of Chain-Terminating Nucleoside Analogs as 3'-Blocking DNA Damage and Their Removal by Human ERCC1-XPF Endonuclease. *Molecules* 21, pii E766 (2016).
 20. Asada R, Takemata N, Hoffman CS, Ohta K, Hirota K. Antagonistic controls of chromatin and mRNA start site selection by Tup family corepressors and the CCAAT-binding factor. *Mol. Cell Biol.* 35, 847-855 (2015).
 21. Hirota K, Yoshikiyo K, Guilbaud G, Tsurimoto T, Murai J, Tsuda M, Phillips LG, Narita T, Nishihara K, Kobayashi K, Yamada K, Nakamura J, Pommier Y, Lehmann A, Sale JE, Takeda S. The POLD3 subunit of DNA polymerase delta can promote translesion synthesis independently of DNA polymerase zeta. *Nucleic Acids Res.* 43, 1671-1683 (2015).
 22. Hoa NN, Akagawa R, Yamasaki T, Hirota K, Sasa K, Natsume T, Kobayashi J, Sakuma T, Yamamoto T, Komatsu K, Kanemaki MT, Pommier Y, Takeda S, Sasanuma H. Relative contribution of four nucleases, CtIP, Dna2, Exo1 and Mre11, to the initial step of DNA double-strand break repair by homologous recombination in both the chicken DT40 and human TK6 cell lines. *Genes Cells* 20, 1059-1076 (2015).
 23. Kobayashi K, Fujii T, Asada R, Ooka M, Hirota K. Development of a targeted flip-in system in avian DT40 cells. *PLoS One* 10, e0122006 (2015).
 24. Kobayashi S, Kasaishi Y, Nakada S, Takagi T, Era S, Motegi A, Chiu RK, Takeda S, Hirota K. Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end joining. *Oncogene* 34, 4403-4411 (2015).
 25. Shimizu N, Ooka M, Takagi T, Takeda S, Hirota K. Distinct DNA Damage Spectra Induced by Ionizing Radiation in Normoxic and Hypoxic Cells. *Radiat. Res.* 184, 442-448 (2015).
 26. Tada K, Kobayashi M, Takiuchi Y, Iwai F, Sakamoto T, Nagata K, Shinohara M, Io K, Shirakawa K, Hishizawa M, Shindo K, Kadowaki N, Hirota K, Yamamoto J, Iwai S, Sasanuma H, Takeda S, Takaori-Kondo. A Abacavir, an anti-HIV-1 drug, targets TDPI-deficient adult T cell leukemia. *Sci. Adv.* 1, e1400203 (2015).
 27. Yamamoto KN, Hirota K, Takeda S, Haeno H. Evolution of pre-existing versus acquired

- resistance to platinum drugs and PARP inhibitors in BRCA-associated cancers. *PLoS One* 9, e105724 (2014).
28. Taoka M, Ishikawa D, Nobe Y, Ishikawa H, Yamauchi Y, Terukina G, Nakayama H, Hirota K, Takahashi N, Isobe T. RNA cytidine acetyltransferase of small-subunit ribosomal RNA: identification of acetylation sites and the responsible acetyltransferase in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 9, e112156 (2014).
29. Saito Y, Takeda J, Adachi K, Nobe Y, Kobayashi J, Hirota K, Oliveira DV, Taoka M, Isobe T. RNase MRP cleaves pre-tRNASer-Met in the tRNA maturation pathway. *PLoS One* 9, e112488 (2014).
30. Mohiuddin, Keka IS, Evans TJ, Hirota K, Shimizu H, Kono K, Takeda S, Hirano S. A novel genotoxicity assay of carbon nanotubes using functional macrophage receptor with collagenous structure (MARCO)-expressing chicken B lymphocytes. *Arch Toxicol* 88, 145-160 (2014).
31. Hirota K, Tsuda M, Murai J, Takagi T, Keka IS, Narita T, Fujita M, Sasanuma H, Kobayashi J, Takeda S. SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 plays a critical role in preventing chromosome loss. *Genes Cells* 19, 743-754 (2014).
32. Al Abo M, Dejsuphong D, Hirota K, Yonetani Y, Yamazoe M, Kurumizaka H, Takeda S. Compensatory functions and interdependency of the DNA-binding domain of BRCA2 with the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex. *Cancer Res* 74, 797-807 (2014).
- [学会発表]
- Hirota K., In vivo evidence for translesion DNA synthesis by replicative DNA polymerase δ , US-JP DNA repair work meeting, バークレー(アメリカ), 2017年5月
 - 廣田耕志、SUMO 化蛋白質を認識する RING 型ユビキチンリガーゼ RNF4 による染色体恒常性維持機構の解明、ヒストンバリエーション研究会、仙台、2017年2月
 - 廣田耕志、安井明、荻朋男、原田浩、中村純、Yves Pommier、武田俊一、PAR 結合蛋白質 ALC1/CHDL1 と XRCC1 による単鎖切断修復、第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回 核ダイナミクス研究会、松島、2016年1月
 - Hirota K., SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase RNF4 required for genome maintenance regulates stability of the histone variant H2A.Z., International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics and Function, 淡路島, 2015年8月
 - 廣田耕志、村井純子、Guillaume Guilbaud、津田雅貴、成田岳雄、西原佳那、笹沼博之、釣本俊樹、Julian Sale、武田俊一、複製ポリメラーゼ δ POLD3/p66 サブユニットはポリメラーゼ ϵ 経路と独立に損傷乗り越えに寄与する、第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会、広島、2014年12月
- 他、計 63 件

X線小角散乱を用いた再構成クロマチンの動的構造解析



平成 26 年度～平成 27 年度

小田 隆 (横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・特任助教)

【研究目的】

真核生物のゲノム DNA はヒストンに巻きつきヌクレオソーム構造を形成し、それが高度に折りたたまれてクロマチンを形成し核に収納されている。転写、複製、修復はクロマチンのダイナミックな構造変化をとおして行われ、ヒストンバリエントの使い分けやヒストン修飾、その他様々なクロマチン結合タンパク質等によって制御されると考えられている。クロマチンの構造研究はモノヌクレオソームの結晶構造解析とともに発展してきたが、クロマチンの構造から機能発現機構を明らかにするためには、大きな構造揺らぎのために結晶化が困難なヒストンバリエントヌクレオソームや、さらにはモノヌクレオソームよりも高次のクロマチンの動的構造を解析する必要がある。本研究では低分解能ではあるが動的構造を解析できる X 線小角散乱法を用いて、これまでに明らかにされたモノヌクレオソームの原子分解能の構造と合わせることで、高次クロマチンの動的構造と機能の解明を試みた。

【研究成果】

(1) ヒストンバリエント(H2A.B)を含むモノヌクレオソームの動的構造

H2A のヒストンバリエントである H2A.B を含むモノヌクレオソームの構造を X 線及び中性子小角散乱法により解析した。H2A.B は転写や DNA 複製・修復が行われているクロマチン領域に一時的にヌクレオソームを形成し、その役割を果たしていると考えられている。H2A.B モノヌクレオソームはおそらくは大きな構造揺らぎのため、結晶構造は明らかにされていなかった。我々は X 線小角散乱

実験と生化学的解析から、通常の H2A モノヌクレオソームでは DNA がヒストン 8 量体に強く巻きついているのに対し、H2A.B モノヌクレオソームでは DNA の両端がヒストン 8 量体からはがれて大きく揺らいだ構造であることを示していた (図 1)。京都大学 杉山、早稲田大学 (現・東大) 胡桃坂らと行った中性子小角散乱実験では溶媒の重水と軽水の比を変え、溶媒とヒストンおよび DNA の散乱のコントラストを変化させることにより、ヒストンと DNA の散乱を別々に観測し、X 線小角散乱実験では得られない個々の成分の構造情報を解析した。その結果、H2A.B ではヒストン 8 量体に構造変化が見られこれが H2A.B の大きな構造変化につながっていることが示された。ヒストン 8 量体の構造変化は特にヒストンテールの構造状態の違いによるものと推測された。このようにして H2A.B は緩んだ状態のクロマチンを形成できることが示された。

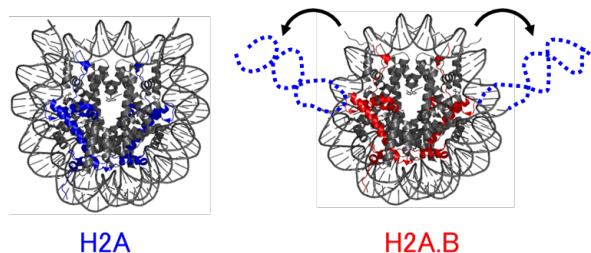


図 1. H2A.B モノヌクレオソームの構造モデル

(2) ヒストンバリエント(CENP-A)を含むトリヌクレオソームの動的構造

我々はこれまでにヒストン H3 のセントロメア特異的なバリエントである CENP-A (CA) を含むモノヌクレオソームについて、結晶構造解析と X 線小角散乱解析から、通常の H3 モノヌクレオソームでは

ヒストン8量体に固く巻き付いているDNAの両端がCENP-Aモノヌクレオソームでは大きくはがれて揺らいでいることを示していた。そこで本研究ではこのようなCENP-Aモノヌクレオソームの性質がより高次のクロマチン構造に与える影響を調べるために3つのモノヌクレオソームを連結したトリヌクレオソームを調製しX線小角散乱解析を行った。その結果、中央にCENP-Aモノヌクレオソームを含むH3-CA-H3トリヌクレオソーム(セントロメア領域のモデル)ではH3-H3-H3トリヌクレオソームとX線小角散乱パターンに有意な差が見られ、H3-CA-H3トリヌクレオソームはH3-H3-H3トリヌクレオソームと比べて個々のヌクレオソーム間の距離がより開いた状態であることが予想された(図2)。そこでより詳細に解析するために京都大学高田らと粗視化分子動力学計算を行いトリヌクレオソームの動的構造をシミュレーションした(図3)。計算の妥当性を確認するためにシミュレーションの動的構造から予測されるX線小角散乱パターンと実測のパターンを比較したところよく一致し、この解析の有効性を示すことができた。得られたH3-CA-H3トリヌクレオソームの動的構造の特徴から、CENP-Aヌクレオソームはクロマチン繊維から突出するという特異な構造を取ることがわかり、これがセントロメア領域の目印としてCENP-Aが機能する構造基盤であるというモデルを提唱した。

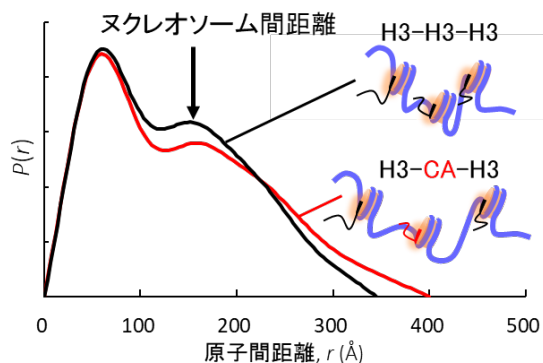


図2. 小角散乱パターンのフーリエ変換により得られたトリヌクレオソームの原子間距離分布関数

A01 公募研究(代表)

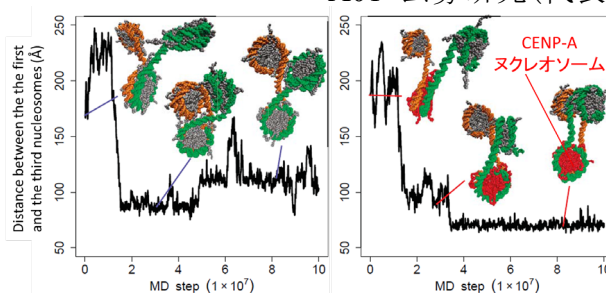


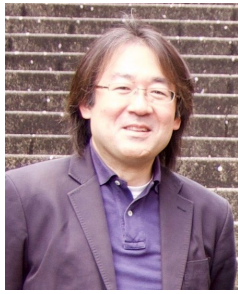
図3. 粗視化分子動力学計算により得られたトリヌクレオソームの動的構造. 左: H3-H3-H3, 右: H3-CA-H3

【本研究課題に関する主要成果】

【雑誌論文】すべて査読あり

1. Kori S, Ferry L, Matano S, Jimenji T, Kodera N, Tsusaka T, Matsumura R, Oda T, Sato M, Dohmae N, Ando T, Shinkai Y, Defossez PA, and Arita K. Structure of the UHRF1 tandem tudor domain bound to a methylated non-histone protein, LIG1, reveals rules for binding and regulation. *Structure* (in press).
2. Oda T, Hirabayashi H, Shikauchi G, Takamura R, Hiraga K, Minami H, Hashimoto H, Yamamoto M, Wakabayashi K, Shimizu T, and Sato M. Structural basis of autoinhibition and activation of the DNA-targeting ADP-ribosyltransferase pierisin-1. *J. Biol. Chem.* 292, 15445-15455 (2017).
3. Oda K, Oda T, Matoba Y, Sato M, Irie T, and Sakaguchi T. Structural analysis of the STAT1:STAT2 heterodimer revealed the mechanism of Sendai virus C protein-mediated blockade of type 1 interferon signaling. *J. Biol. Chem.* 292, 19752-19766 (2017).
4. Jo CH, Son J, Kim S, Oda T, Kim J, Lee MR, Sato M, Kim HT, Unzai S, Park SY and Hwang KY. Structural insights into a

- 20.8-kDa tegumental-allergen-like (TAL) protein from *Clonorchis sinensis*. *Sci. Rep.* 7, 1764 (2017).
5. Shimojo H, Kawaguchi A, Oda T, Hashiguchi N, Omori S, Moritsugu K, Kidera A, Hiragami-Hamada K, Nakayama J, Sato M, and Nishimura Y. Extended string-like binding of the phosphorylated HP1 α N-terminal tail to the lysine 9-methylated histone H3 tail. *Sci. Rep.* 6, 22527 (2016).
 6. Soh YM, Burmann F, Shin HC, Oda T, Jin KS, Toseland CP, Kim C, Lee H, Kim SJ, Kong MS, Durand-Diebold ML, Kim YG, Kim HM, Lee NK, Sato M, Oh BH, and Gruber S. Molecular basis for SMC rod formation and its dissolution upon DNA binding. *Mol. Cell* 57, 290-303 (2015).
 7. Yoshida H, Park SY, Oda T, Akiyoshi T, Sato M, Shirouzu M, Tsuda K, Kuwasako K, Unzai S, Muto Y, Urano T, and Obayashi E. A novel 3' splice site recognition by the two zinc fingers in the U2AF small subunit. *Genes Dev.* 29, 1649-1660 (2015).
 8. Hizukuri Y, Oda T, Tabata S, Tamura-Kawakami, K, Oi R, Sato M, Takagi J, Akiyama Y, and Nogi T. A Structure-Based Model of Substrate Discrimination by a Noncanonical PDZ Tandem in the Intramembrane-Cleaving Protease RseP. *Structure* 22, 326–336 (2014).
 9. Sugiyama M, Arimura Y, Shirayama K, Fujita R, Oba Y, Sato N, Inoue R, Oda T, Sato M, Heenan RK, and Kurumizaka H. Distinct features of the histone core structure in nucleosomes containing the histone H2A.B Variant. *Biophys. J.* 106, 2206-2213 (2014).
- [学会発表]
1. Takashi Oda, Hiroaki Tachiwana, Yusuke Takagi, Yasuhiro Arimura, Shoji Takada, Hitoshi Kurumizaka, and Mamoru Sato, Structural analysis of tri-nucleosome containing centromere specific histone variant, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015年8月
 2. 小田隆、小林裕也、館岡太郎、宮城泰城、石黒あかり、有田恭平、禾晃和、石野良純、杉山正明、佐藤衛、DNA 架橋損傷修復に関わる天然変性タンパク質 Hef の構造研究、第 14 回日本蛋白質科学会年会、横浜、2014年6月
 3. 小田隆、X 線小角散乱によるタンパク質の揺らいだ構造の解析、第 2 回タンパク質 X 線溶液散乱講習会、つくば、2014年6月



ヌクレオソームの多様な構造を解析する技術の開発

平成 26 年度～平成 29 年度

香川 亘 (明星大学・理工学部・准教授)

【研究目的】

真核生物のゲノム DNA は、クロマチンと呼ばれる高度に凝縮した構造体を形成して細胞核の中に収まっている。クロマチンの構造変化は、生命活動の維持に極めて重要であり、DNA 複製、転写、修復、組換えなどの DNA 代謝に応じてクロマチン構造がほどけたり、凝縮したりする。クロマチンの構造変化を理解するためには、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームにおける構造変化の詳細を明らかにすることが重要だが、クロマチンダイナミクスの理解に必要な構造基盤はよく分かっていない。本研究は、多様なヌクレオソーム構造やヌクレオソームとその結合因子との複合体の構造を、X 線結晶構造解析法を用いて明らかにするために必要な技術の開発を目的とした。

【研究成果】

(1) セレン原子を用いたヌクレオソームの X 線結晶構造解析法の確立

多様なヌクレオソーム構造を明らかにするためには、既知のヌクレオソーム構造の情報を用いずに構造解析を行う必要がある。本研究では、ヒストン H3、H2A、及び H2B にセレン原子を導入し、セレン原子から得られる異常分散の情報をもとにカノニカルヌクレオソーム構造を決定した。最終的に、H2A と H2B それぞれに 1 ヶ所ずつ、メチオニン点変異を導入した点変異体 (H2A L65M、H2B L106M) を用い、合計 12 個のセレン原子の異常分散の情報をもとに 3.2 Å 分解能でカノニカルヌクレオソーム構造を決定することに成功した (図 1)。決定した構造を既知のヌクレオソーム構造と比較

したところ、構造が高度に類似していたことから本研究で確立した方法は多様なヌクレオソーム構造の X 線結晶構造解析に有用であることが考えられた。

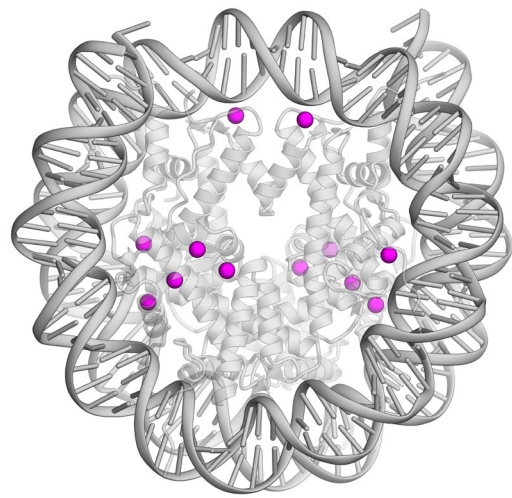


図1. セレン原子を導入したカノニカルヌクレオソームの結晶構造

(2) リピート DNA 配列を含むヌクレオソームの大量調製とその物理化学的解析

既知のヌクレオソームの構造には 2 回転対称性という特徴がある。しかし生体内におけるヌクレオソームは、非対称な構造を有する可能性が考えられる。非対称なヌクレオソーム構造を誘起する要因の一つとして、DNA の塩基配列が挙げられる。これまでの研究から、DNA の塩基配列はヌクレオソームの安定性に影響することがわかっている。そこで非対称なヌクレオソームを大量調製するために、*in vivo* でのヌクレオソーム形成効率が確認されているリピート DNA 配列を含む 147 bp DNA の調製法を確立した。リピート DNA 配列の種類と

しては、酵母細胞内でヌクレオソーム形成効率が
高いものから低いものまでの10種類のトリヌクレオ
チドリピート配列を用いた。調製したDNAと野生
型ヒストンを用い、ヌクレオソームの再構成を行っ
た結果、いずれのリピート配列を含むDNAにつ
いても、構造解析がなされている既知のヌクレオソ
ームと同程度の効率でヌクレオソームを調製でき
ることがわかった。再構成したヌクレオソームの安
定性を塩耐性アッセイと熱耐性アッセイを用いて
解析した結果、リピート配列によって多少の違い
が見られた。本研究で確立した非対称なヌクレオ
ソームを大量調製法は、リピートDNA配列の種類
に関わらず、様々なDNA配列に応用することが
可能である。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Saotome M, Saito K, Yasuda T, Ohtomo H, Sugiyama S, Nishimura Y, Kurumizaka H, Kagawa W. Structural basis of homology-directed DNA repair mediated by RAD52. *iScience* 3, 50-62 (2018).
2. Yasuda T, Kagawa W, Ogi T, Kato TA, Suzuki T, Dohmae N, Takizawa K, Nakazawa Y, Genet MD, Saotome M, Hama M, Konishi T, Nakajima NI, Hazawa M, Tomita M, Koike M, Noshiro K, Tomiyama K, Obara C, Gotoh T, Ui A, Fujimori A, Nakayama F, Hanaoka F, Sugasawa K, Okayasu R, Jeggo PA, Tajima K. Novel function of HATs and HDACs in homologous recombination through acetylation of human RAD52 at double-strand break sites. *PLoS Genet.* 14, e1007277 (2018).
3. Saotome M, Saito K, Onodera K, Kurumizaka H, Kagawa W. Structure of the human DNA-repair protein RAD52 containing surface

4. 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).
5. 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).
6. 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).
7. Kagawa W, Arai T, Ishikura S, Kino K, Kurumizaka H. Structure of RizA, an L-amino-acid ligase from *Bacillus subtilis*. *Acta Cryst. F* 71, 1125-1130 (2015).
8. Arai N, Kagawa W. Molecular mechanisms of homologous recombination promoted by budding yeast Rad52. *Seikagaku* 86, 693-697 (2014).
9. Arimura Y, Shirayama K, Horikoshi N, Fujita R, Taguchi H, Kagawa W, Fukagawa T, Almouzni G, Kurumizaka H. Crystal structure and stable property of the cancer-associated

heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3. *Sci. Rep.* 4, 7115 (2014).

10. Kagawa W, Arai N, Ichikawa Y, Saito K, Sugiyama S, Saotome M, Shibata T, Kurumizaka H. Functional analyses of the C-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad52 protein. *Nucleic Acids Res.* 42, 941-951 (2014).

〔学会発表〕

1. 香川亘、五月女美香、齋藤健吾、安田武嗣、杉山修正、胡桃坂仁志、ヒト RAD52 が促進する DNA アニールリングの分子機構、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、蒲郡、2017 年 12 月
2. Wataru Kagawa, Kazuki Urano, Naoki Horikoshi, Tomoya Kujirai, Hiroyuki Taguchi, Hitoshi Kurumizaka, Developing alternative methods for the structural determination of the nucleosome, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015 年 8 月
3. 香川亘、五月女美香、齋藤健吾、安田武嗣、荻朋男、胡桃坂仁志、ヒト Rad52 タンパク質における二つの DNA 結合部位の役割、第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年 11 月
他、計 20 件



DNA 複製フォークでのクロマチン構造維持機構

平成 26 年度～平成 27 年度

荒木 弘之 (国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授)

【研究目的】

染色体のクロマチン構造は、染色体 DNA が複製される際に忠実に維持される。これは複製因子とクロマチン構造に関わる因子が協調して働き、複製後にも複製前と同様のクロマチン構造を維持しているためだと考えられている。しかし、複製フォークでのクロマチンの挙動は未知の部分が多く、我々はこの問題を明らかにすることを目的とし、*in vitro* の反応系を用いて取り組んだ。

【研究成果】

DNA 複製の際には、2本鎖の DNA を1本鎖にほどく DNA ヘリカーゼが複製フォークの先頭を進む。真核生物では、ヘリカーゼ活性のコアは Mcm2-7 (ヘテロ6量体) であるが、これだけでは活性は示さず、2つの複製因子、GINS (ヘテロ4量体) と Cdc45 が複製開始時に加わった Cdc45-Mcm2-7-GINS (CMG) 複合体が複製フォークで活性型の DNA ヘリカーゼとして働く(図1)。我々は酵母 CMG 複合体の全サブユニット(11 ペプチド)を同一の酵母細胞で発現し、そこから CMG 複合体を精製した。精製した CMG 複合体は裸の DNA を基質にすると、プロセッサなヘリカーゼ活性を示した。また、出芽酵母の精製ヒストンから複製フォーク様 DNA 上にクロマチン構造の

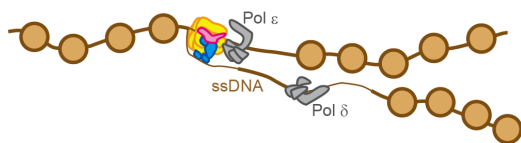


図1. クロマチン構造を持った染色体 DNA の複製。複製フォークの先頭では CMG ヘリカーゼが2本鎖 DNA を1本鎖にほどき、Polεがリーディング鎖、Polδがラギング鎖の合成を行う

根幹であるヌクレオソームを再構成し、シヨ糖密度勾配遠心法によりヌクレオソームを持つ DNA (クロマチン DNA) を調整し、精製した CMG 複合体のヘリカーゼ活性を調べた。驚くことに、ヌクレオソーム構造を持つ DNA でも、裸の DNA 同様に CMG ヘリカーゼによりほどかれることが分かった。詳細な解析からは、ヌクレオソーム構造を持つ DNA の方がわずかにほどかれにくいことは分かったが、数個のヌクレオソームを持つ基質では大きな差はない。従って、CMG ヘリカーゼはヌクレオソーム構造を持つ DNA でもその活性を示すことは明らかである。

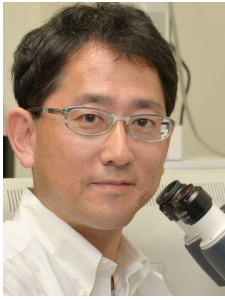
ヌクレオソーム(クロマチン)構造を持つ DNA を用いたヘリカーゼ活性測定系のできたことにより、複製前後でのヌクレオソームの挙動解析が今後は可能となった。また、ヘテロクロマチン構造等による複製フォークの挙動変化が今後の課題となってくる。

【本研究課題に関する成果】

[雑誌論文] すべて査読あり

1. Hizume K, Endo S, Muramatsu S, Kobayashi T, Araki H. DNA polymerase e-dependent modulation of the pausing property of CMG helicase at the barrier. *Genes Dev.* 32, 1315-1320 (2018).
2. Miyazawa-Onami M, Araki H, Tanaka S. Pre-initiation complex assembly functions as a molecular switch that splits the Mcm2-7 double hexamer, *EMBO Rep.* 18, 1752-1761

- (2017).
3. Hizume K, Kominami H, Kobayashi K, Yamada H, Araki H. Flexible DNA path in the MCM double hexamer loaded on DNA. *Biochemistry*, 56, 2435-2445 (2017).
 4. Carroni M, March MD, Medagli B, Krastanova I, Taylor IA, Amenitsch H, Araki H, Pisani FM, Patwardhan A, Onesti S. New insights into the GINS complex explain the controversy between existing structural models. *Sci. Rep.* 7, 40188 (2017).
 5. Okimoto H, Tanaka S, Araki H, Ohashi E, Tsurimoto T. Conserved interaction of Ctf18-RFC with DNA polymerase ϵ is critical for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 21, 482-491 (2016).
 6. Itou H, Shirakihara Y, Araki H. The quaternary structure of the eukaryotic DNA replication proteins Sld7 and Sld3. *Acta Cryst.* D71, 1649-1656 (2015).
 7. Tanaka S, Miyazawa-Onami M, Iida T, Araki H. iAID: an improved auxin-inducible degron system for the construction of a 'tight' conditional mutant in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 32, 567-581 (2015).
 8. Garbacz M, Araki H, Flis K, Bebenek A, Zawada A, Jonczyk P, Makiela-Dzbenska K, Fijakowska IJ. Fidelity consequences of the impaired interaction between DNA polymerase epsilon and the GINS complex. *DNA Repair* 29, 23-35 (2015).
 9. Itou H, Muramatsu S, Shirakihara Y, Araki H. Crystal Structure of the Homology Domain of the Eukaryotic DNA Replication Proteins Sld3/Treslin. *Structure* 22, 1341-1347 (2014).
- [学会発表]
1. Kohji Hizume, Hiroyuki Araki, MCM-DNA 複合体の原子間力顕微鏡による可視化解析, 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014年11月
 2. Kohji Hizume, Masaru Yagura, Shizuko Endo, and Hiroyuki Araki, Nucleosome on helicase activity of CMG complex, The 9th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair), 御殿場, 2014年11月
 3. Hiroyuki Araki, The cell cycle regulated initiation mechanism of chromosomal DNA replication in budding yeast, 国際生化学・分子生物学会, 台湾, 2014年10月



セントロメア・クロマチンの動構造の分子基盤と意義

平成 26 年度～平成 27 年度

広田 亨 (がん研究会がん研究所実験病理部・部長)

【研究目的】

細胞周期を通じたクロマチンの動態制御は、細胞増殖におけるゲノム安定性の鍵であり、個体にとって恒常性維持の生命線である。染色体動態制御の中核であるセントロメアは、ヒストン・バリエント CENP-A を含む特異なクロマチンによって構成され、細胞分裂に際して巨視的な構造変換を遂げることが知られている。セントロメアの外側には動原体「キネトコア」を形成して微小管と結合を促し、その内側には姉妹染色分体の結合因子コヒーシンを濃縮することにより、染色体の中期赤道面への整列から姉妹染色分体の分離に至る一連の過程を時空間的に制御する。つまり、ゲノムを均等に分配するための全機能がセントロメアに集約されていると言っても過言ではない。

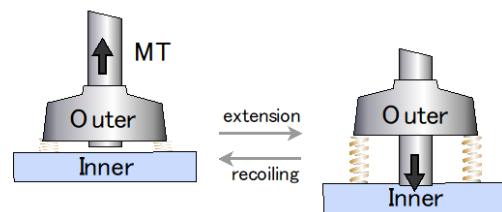
われわれは先行研究で、分子イメージング法を応用して、動原体は伸張と収縮を繰り返すダイナミックな構造体であることを見出しました。続く本研究では、この「動原体ストレッチング」と名付けたこの現象を基軸として、セントロメアの動的な構造変化の分子機構を解明し、その生物学的意義を問うことを目的とした。

【研究成果】

(1) 動原体ストレッチングの発生機構

動原体ストレッチングは、単極性の微小管に結合した動原体にも生じることから必ずしも引く力を反映しているのではなく、むしろ、微小管の重合・脱重合によって生じる現象であることが判った。

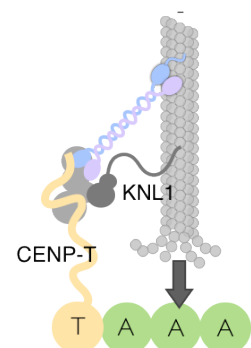
他方で、ストレッチングした動原体の電子顕微鏡により、動原体の外層が微小管端の側面に付着して引っぱられている様子が観察された。これらの観察より、動原体ストレッチングは、微小管端が重合したときに生じる動原体内層を内側に向かって押す力によって、二層間の距離が大きくなること



を反映しているというモデルが導きだされた(図)。

この仮説に基づくと、動原体の内層と外層とは弾性を有したタンパク質によって繋がれていることが予測され、そこに CENP-T の関与が浮上した。即ち、CENP-T の N 末端はヒストン様構造をとり動原体内層で DNA を結合する一方で、C 末端は外層に延びて微小管と結合する Ndc80 複合体をつなぎ止めているが、分子の大部分は長大な天然変性領域(ID 領域)であり、その可変性が内層と外層を繋ぐスプリングの役割をしていると考えられた(右図)。

実際に、ID 領域を欠く変異体を作成したところ、動原体のストレッチングは消失した。こうした実験結果から、CENP-T

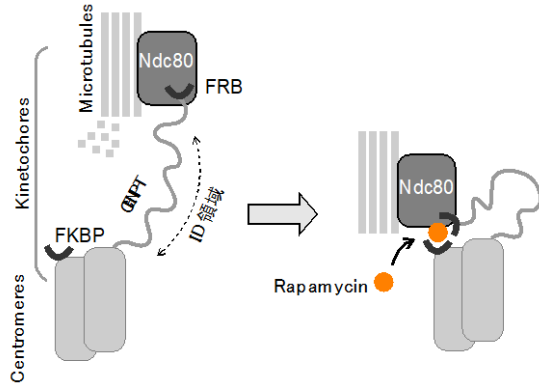


の ID 領域は、そのフレキシビリティによって、セントロメア・クロマチンのダイナミックな構

造を支えているという新たな視点を提供した。

(2) 動原体ストレッチングの生物学的意義

動原体ストレッチングが、CENP-T の ID 領域の関与が示唆されたので、まずはこのドメインを人為的に制御する実験系を構築した(以下の図)。



図にあるように、CENP-T の N 末端と C 末端に、ラパマイシン存在下で結合するようなタンパク質を融合し、それを発現する細胞を作成した。期待どおり、細胞培養液にラパマイシンを添加して30分後には、ストレッチングの抑制が観察された。

これを用いた実験より、動原体ストレッチングは、中期から後期への移行を規定する「M期チェックポイント」の解消を促進するための運動であることが見えてきた。さらに詳細な観察を行うと、この動原体ストレッチングは微小管の側面結合では見られず、末端結合を必要とすることが判明した。つまり、細胞は後期への移行を進めるにあたり、動原体における微小管の結合様式までを監視していると解釈することができ、染色体分配の正確性を高めるために備わっている細胞機能と考えられた(Uchida et al., *in preparation*)。

【本研究課題に関する主要成果】

〔雑誌論文〕すべて査読あり

1. Takahashi M, [Hirota T](#). Dynamics of sister chromatids through the cell cycle: Together and apart. Spotlight. *J Cell Biol.* 217, 1887-1889 (2018).

2. Hayashi Y, Fujimura A, Kato K, Udagawa R, [Hirota T](#), Kimura K. Nucleolar integrity during interphase supports faithful Cdk1 activation and mitotic entry. *Sci Adv.* 4, eaap7777 (2018).
3. Konishi M, Shindo N, Komiya M, Tanaka K, Itoh T, [Hirota T](#). Quantitative analyses of the metaphase-to-anaphase transition reveal differential kinetic regulation for securin and cyclin B1. *Biomed Res.* 39, 75-85 (2018).
4. Takahashi M, Wakai T, [Hirota T](#). Condensin I-mediated mitotic chromosome assembly requires association with chromokinesin KIF4A. *Genes Dev.* 30, 1931-1936 (2016).
5. Tanaka K, [Hirota T](#). Chromosomal instability: a common feature and a therapeutic target of cancer. Review. *Biochim Biophys Acta.* 1866, 64-75 (2016).
6. Abe Y, [Hirota T](#). System-level deficiencies in Aurora B control in cancers. Review. *Cell Cycle.* 10, 1-2 (2016).
7. Nagasaka K, Hossain JM, Roberti JM, Ellenberg J, [Hirota T](#). Sister chromatid resolution is an intrinsic part of chromosome organization in prophase. *Nat Cell Biol.* 18, 692-699 (2016).
8. Abe Y, Sako K, Takagaki K, Hirayama Y, Uchida KSK, Herman J, DeLuca JG, [Hirota T](#). HP1-assisted Aurora B kinase activity prevents chromosome segregation errors. *Dev. Cell.* 36, 487-497 (2016).
9. Takahashi M, Tanaka K, Wakai T, [Hirota T](#). Phosphoproteomic analysis of human mitotic chromosomes identified a chromokinesin KIF4A. *Biomed Res.* 37, 161-165 (2016).
10. Uchida KSK, [Hirota T](#). Spindle assembly checkpoint: its control and aberration. DNA

- Replication, Recombination and Repair. Review. *Molecular Mechanisms and Pathology*. Hanaoka and Sugasawa ed. pp 429-447 (2016).
11. Nagasaka K, Hirota T. Clarifying the role of condensins in shaping chromosomes. *News and Views. Nat Cell Biol.* 17, 711-713 (2015).
 12. Minamino M, Ishibashi M, Nakato R, Akiyama K, Tanaka H, Kato Y, Negishi L, Hirota T, Sutani T, Bando M, Shirahige K. Escol acetylates cohesin via a mechanism different from that of Escoc2. *Curr Biol.* 25, 1694-706 (2015).
 13. Gallego-Paez LM, Tanaka H, Bando M, Takahashi M, Nozaki N, Nakato R, Shirahige K, Hirota T. Smc5/6-mediated replication progression contributes to chromosome assembly in human cells. *Mol Biol Cell.* 25, 302-317 (2014).
 5. 広田 亨、HP1-assisted Aurora B kinase activity prevents chromosome segregation errors、国際高等研究所研究プロジェクト「クロマチンデコーディング」研究会、京阪奈、2015年3月
 6. Hirota T., An origin of chromosome missegregation in mitosis, The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 横浜, 2014年11月
 7. Hirota T., A molecular lesion of chromosome missegregation in mitosis, The 73rd Japanese Cancer Association, Annual Meeting, 横浜, 2014年9月
 8. 広田亨、ライブ・セル・イメージングがもたらすがん研究の新展開、第11回日本病理学会カンファレンス、神戸、2014年8月

他

[学会発表]

1. Hirota T., A system level deficiency of the chromosomal passenger complex in cancer cells, The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 名古屋, 2015年10月
2. Hirota T., An origin of chromosome missegregation in mitosis, The 27th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, ソウル(韓国), 2015年9月
3. 広田亨、がんと染色体、第69回日本臨床細胞学会細胞検査士教育セミナー、東京、2015年8月
4. Hirota T., Dynamic deformation of kinetochores controls mitotic progression, EMBO Workshop Dynamic Kinetochores, コペンハーゲン(デンマーク), 2015年5月



分裂期染色体凝縮におけるコアヒストン・ヌクレオソームの役割

ヒストンを基盤とした染色体構築メカニズムの解明

平成 26 年度～平成 29 年度

新富 圭史 (理化学研究所・研究員)

【研究目的】

真核生物では、細胞分裂に先立つ数十分間にクロマチン構造が大きく変化する。すなわち、分裂前期に急速なクロマチンの組織化が始まると、中期にはロッド状の姉妹染色分体が並んだ構造(染色体)へと変換され、後期の開始に伴って各々の染色分体が娘細胞へと分配される。こうした分裂期染色体の構築過程については、130 年以上も前から光学顕微鏡を用いた観察が行われ、その背後にあるメカニズムについて多様な方法を用いた研究が進められてきた。近年では、染色体構築に不可欠な役割を果たすタンパク質複合体としてコンデンシンが同定されるなどの進展があったが、依然として、長大なゲノム DNA が染色体へと折り畳まれるメカニズムに対する理解は進んでいない。私は、この本質的な問題の解決には、試験管内で分裂期染色体を再構成し、それを精密に操作する方法が有効であると考えた。そこで、本研究では、染色体再構成法の開発と改良を通じて、染色体構築に必要なかつ十分なタンパク質のリストを完成させること、さらに、最も代表的な染色体構成タンパク質であるコアヒストンの役割を理解することを目標として研究を推進した。

【研究成果】

(1) 精製タンパク質を用いた染色体再構成系の確立

カエルの未受精卵抽出液の無細胞系において、カエルの精子核をインキュベートすると、精子由

来の DNA と卵抽出液由来のタンパク質によって染色体(厳密には、単一染色分体)が作られる。そこで、卵抽出液の代わりに精製タンパク質を使って、一連の過程を再現することに挑戦した。まず、クロマトグラフィーで卵抽出液を分画し、逐次、染色体構築を促進する活性を検定することにより、必要なタンパク質を絞り込んだ。その結果、最終的には、精子核とわずか 6 種類の精製タンパク質(コアヒストン、Npm2、Nap1、FACT、トポⅡ、コンデンシンⅠ)を ATP 存在下でインキュベートするだけで、染色体を再構成できることが明らかになった(図 1)。また、この再構成系においては、Cdk1 によるコンデンシンⅠのリン酸化が染色体構築に必要なかつ十分な翻訳後修飾であることも示された。これらの結果から、染色体構築という一見すると複雑な現象がきわめてシンプルなメカニズムによって制御されていると考えられた。今後は、この再構成系をさらに洗練させ、従来の方法では解析が難しかった問題(例えば、イオンや分子混雑度などの染色体周囲の化学的・物理的要素が染色体構造にどのような影響を与えるのか?)を検討する予定である。

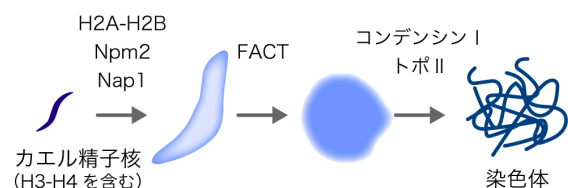


図1. 精製タンパク質を用いた染色体再構成の概略

(2) カエル卵無細胞系を用いたヌクレオソームを含まない染色体の解析

分裂期染色体はヌクレオソームを基本構造単位とするクロマチンが折り畳まれた構造であるが、その構築過程にヌクレオソームが不可欠であるのかは明らかにされていない。この原因のひとつは適切な実験方法がないことであり、たとえ前述の精製タンパク質の再構成系を用いても、もともとヒストン H3-H4 を含むカエルの精子核を用いるため実験的に操作できるのは H2A-H2B に限られていた。そこで、ほとんどヒストンを含まないマウス精子核をカエル卵抽出液の無細胞系に導入し、試験管内で染色体を構築する方法を確立した。また、この方法において、卵抽出液からヒストンシャペロン Asf1 を除去すると、精子核 DNA 上へのヒストンのローディングが完全に阻害された。しかし、驚くべきことに、このヌクレオソームを含まない DNA を起点とした場合でも、凝縮度は低いものの、明瞭な軸構造をもつ染色体が作られた(図 2)。さらに、Asf1 とコンデンシンを単独または同時に除去した時の影響を詳細に比較したところ、染色体軸上に集積するコンデンシンがロッド状の染色体を形作るのに不可欠であったのに対し、染色体全域に存在するヌクレオソームは軸の周囲に広がったクロマチンループをコンパクトにする役割を果たすことが明らかになった。今後は、マウス精子核と精製タンパク質を使って、すべてのコアヒストンに対する実験操作が可能な染色体再構成系を完成させ、

ヌクレオソームとコンデンシンの機能がどのように相互作用しているのかを検討する予定である。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. [Shintomi K](#), Hirano T. Reconstitution of mitotic chromatids in vitro. *Curr Protoc Cell Biol.* 79, e48 (2018).
2. [Shintomi K](#), Hirano T. Mitotic chromosome assembly in vitro: functional cross talk between nucleosomes and condensins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 82, 157-164 (2017).
3. [Shintomi K](#), Inoue F, Watanabe H, Ohsumi K, Ohsugi M, Hirano T. Mitotic chromosome assembly despite nucleosome depletion in *Xenopus* egg extracts. *Science.* 356, 1284-1287 (2017).
4. [Shintomi K](#), Hirano T. A sister chromatid cohesion assay using *Xenopus* egg extracts. *Methods Mol Biol.* 1515, 3-21 (2017).
5. [Shintomi K](#), Takahashi TS, Hirano T. Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors. *Nat Cell Biol.* 17, 1014-1023 (2015).

[学会発表]

1. Shintomi K, Hirano T., Mitotic chromosome assembly in vitro: functional collaboration between condensins and nucleosomes, The 82nd Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, ニューヨーク(アメリカ), 2017年6月
他、計9件

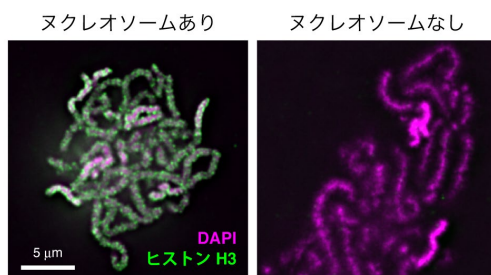


図 2. ヌクレオソームを含む染色体とヌクレオソームを含まない染色体の蛍光顕微鏡像



核膜孔複合体と輸送運搬体による Importin 輸送制御:細胞核機能から高次生命へ

平成 26 年度～平成 27 年度(2014 年 4 月から 2016 年 3 月:2015 年辞退)

今本 尚子 (理化学研究所・今本細胞核機能研究室・主任研究員)

【研究目的】

真核細胞で発現するタンパク質のおよそ 35%にも及ぶ分子種が、細胞周期のどこかの時点で核に移入すると考えられている。この膨大な数のタンパク質の大部分は、ヒト細胞では 23 種類存在する Importin β ファミリー輸送運搬体によって、核膜孔複合体を通して核内外に運ばれている。しかし、それぞれのファミリー分子が、どのタンパク質を運搬するのかといった基質情報が少ないため、それぞれの運搬体が担う細胞機能が未だにわかっていないのが現状である。基質情報が乏しいのは、従来の分子間相互作用解析法だけでは、運搬体・基質の相互作用の同定が困難であるからである。そのため私たちは、新規の大規模輸送基質同定系を考案して、Importin β ファミリー運搬体分子のそれぞれが運ぶ基質タンパク質を包括的に同定することを試みた。輸送基質の機能から輸送経路の働きを考えていくことで、核-細胞質間輸送と高次生命機能の関係を明らかにしていく基盤を作ることを目標とする。

【研究成果】

(1) 大規模輸送基質同定系の構築

私たちは、輸送活性を利用した”functional assay”で輸送基質を同定する新しい方法を考案した(図 1)。具体的には、培養細胞の安定同位体標識(Stable isotopic labeling in cell culture: SILAC)法、試験管内の核-細胞質間輸送再構築、比較定質量分析法の3つの方法を組み合わせることで、輸送基質の大規模決定を行う。1) 軽いアミノ酸をもつ細胞(通常の細胞)から Importin β ファミリー

全てを吸収除去した細胞抽出液(Light アミノ酸をもつ)を調整し、重たいアミノ酸で標識した細胞(安定同位体標識細胞)から細胞膜を透過性にしたセミインタクト細胞(Heavy アミノ酸をもつ)を調整する。2) 細胞抽出液とセミインタクト細胞を混ぜ、そこに任意の精製 Importin β ファミリー分子を加えて輸送反応を試験管内で再構築させる。ここで加えた運搬体に結合する抽出液中のタンパク質(Light アミノ酸をもつ)はセミインタクト細胞(Heavy アミノ酸をもつ)の核に運ばれ、核に集積する。3) 輸送反応後、セミインタクト細胞の核からタンパク質を抽出し、質量分析(LC-MS/MS)でタンパク質を同定すると同時に、個々のタンパク質の Light アミノ酸と Heavy アミノ酸の量比(Light/Heavy = L/H)を定量することで、任意の

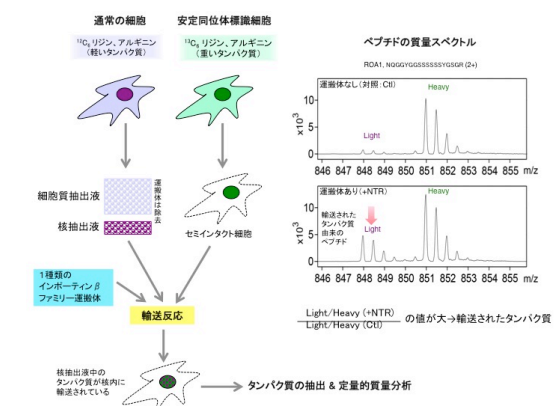


図 1 functional assay による輸送基質同定法

運搬体で運ばれる基質タンパク質を同定する。L/H 比の高い分子が基質になる。

(2) 12 Importin β pathway の大規模基質同定
Importin β ファミリーが構成するヒト細胞の核内輸送経路を網羅することを考えた。具体的には10の核内輸送運搬体(Imp- β 、transportin-1、-2、

-SR(-3)、Imp-4、-5 (RanBP5)、-7、-8、-9、-11) と2つの双方向性輸送運搬体 (Imp-13、Exp-4) の合計12のImportin β ファミリー運搬体の基質候補の大規模決定を行った。

Orbitrap 型質量分析装置の使用により、約2千種類の蛋白質の輸送分子比を決定し、それぞれ運搬体の基質候補を同定した(各運搬体について、300個前後が基質タンパク質であると推定した)。Importin β ファミリー運搬体は輸送基質の選択に関し、重複と一意性を巧みに使い分け、それぞれ特徴のある機能をもつタンパク質グループの輸送を分担していることが確認された。また、ほぼ全ての輸送因子がリボソーム蛋白質、mRNA スプライシング因子の輸送に関与するが、これらのタンパク質グループの輸送にも輸送因子間の分担があることが明らかとなった。この解析で明らかにした、輸送基質の機能による Importin β ファミリー運搬体の役割分担を図2に示す。

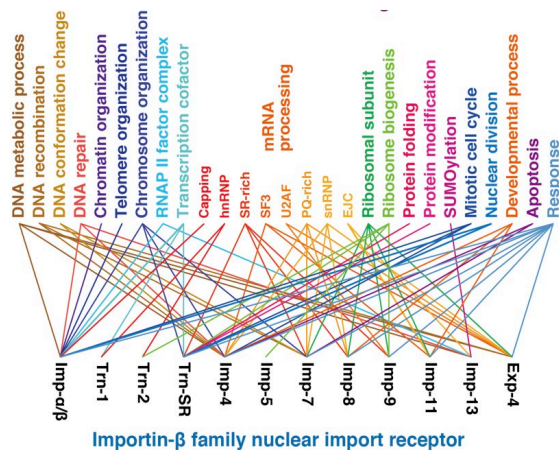


図2 Importin β ファミリー輸送経路の役割分担

【本研究課題に関する主要成果】

〔雑誌論文〕査読あり14件、査読なし2件

1. Kimura M, Morinaka Y, Imai K, Kose S, Horton P, Imamoto N. Extensive cargo identification reveals distinct biological roles of the 12 importin pathways. *eLife*. 6, e21184s (2017).
2. Mimura Y, Takagi M, Clever M, Imamoto N,

ELYS regulates the localization of LBR by modulating its phosphorylation state. *J Cell Sci*. 129, 4200-4212 (2016).

3. Takagi M, Natsume T, Kanemaki MT, Imamoto N. The perichromosomal protein Ki67 supports mitotic chromosome architecture. *Genes Cells*. 21, 1113-1124 (2016).
4. Edvardson S, Kose S, J alas C, Fattal-Valevski A, Watanabe A, Ogawa Y, Mamada H, Fedick AM, Ben-Shachar S, Treff NR, Shaag A, Bale S, Gärtner J, Imamoto N, Elpeleg O. Leukoencephalopathy and early death associated with an Ashkenazi-Jewish founder mutation in the Hikeshe gene. *J. Med. Genet*. 53, 132-137 (2016). *equal correspondence
5. Mimura Y, Imamoto N. Nuclear Organization (Nuclear Structure and Dynamics). *Encyclopaedia of Cell Biology* Vol. 2: Organizational Cell Biology, 311-318 (2015).
6. Miyake N, Tsukaguchi H, Koshimizu E, Shono A, Matsunaga S, Shiina M, Mimura Y, Imamura S, Hirose T, Okudela K, Nozu K, Akioka Y, Hattori M, Yoshikawa N, Kitamura A, Cheong H-I, Kagami S, Yamashita M, Fujita A, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saito H, Ohashi K, Imamoto N, Ryo A, Ogata K, Iijima K, Matsumoto N. Biallelic Mutations in Nuclear Pore Complex Subunit NUP107 Cause Early-Childhood-Onset Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Am J Hum Genet*. 97, 555-566 (2015).
7. Song J, Kose S, Watanabe A, Son SY, Choi S, Hong H, Yamashita E, Park IY, Imamoto N, Lee SJ. Structural and functional analysis

- of Hikeshi, a new nuclear transport receptor of Hsp70s. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 71, 473-483 (2015). * equal correspondence
8. Kose S, Funakoshi T, Imamoto N. Reconstitution of nucleocytoplasmic transport using digitonin-permeabilized cells. *Methods Mol. Biol.* 1262, 291-303 (2015).
 9. Song C, Takagi M, Park J, Xu R, Gallagher-Jones M, Imamoto N., Ishikawa T. Analytic 3D imaging of mammalian nucleus at nanoscale using coherent X-Rays and optical fluorescence microscopy. *Biophysical J.* 107, 1074-1081 (2014).
 10. Takagi M, Nishiyama Y, Taguchi A, Imamoto N. Ki67 antigen contributes to the timely accumulation of protein phosphatase 1 γ on anaphase chromosomes. *J Biol Chem.* 289, 22877-22887 (2014).
 11. Kose S, Imamoto N. Nucleocytoplasmic transport under stress conditions and its role in HSP70 chaperone systems. *BBA-General Subjects* 1840, 2953-2960 (2014).
 12. Oda Y, Kimura M, Kose S, Fasken MB, Corbett AH, Imamoto N. The Schizosaccharomyces pombe Hikeshi/Opi10 protein has similar biochemical functions to its human homolog but acts in different physiological contexts. *FEBS Lett.* 588, 1899-1905 (2014).
 13. Kimura M, Imamoto N. Biological significance of the importin- β family-dependent nucleocytoplasmic transport pathways. *Traffic* 15, 727-748 (2014).
- 他、計 16 件
- [学会発表]
1. Imamoto N., Thermal stress-induced nucleocytoplasmic transport mediated by Hikeshi, Nuclear Transport Meeting, バルセロナ(スペイン), 2015 年 9 月
 2. 今本尚子、Thermal stress-induced nucleocytoplasmic transport mediated by Hikeshi、生物物理学会、金沢、2015 年 9 月
 3. Kimura M, Imamoto N., Large Scale Identification of Nuclear Transport Receptor Substrates using Novel Approach, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015 年 8 月
 4. 今本尚子、核一細胞質間輸送運搬体 Hikeshi の機能、細胞生物学会、東京、2015 年 6 月
 5. 今本尚子、Thermal stress induced nuclear transport mediated by Hikeshi ~ its mechanism and physiological significance ~2, HIHA 4th Workshop, 広島、2015 年 6 月
 6. 今本尚子、核一細胞質間輸送運搬体 Hikeshi 機能の破綻で誘引されるヒト疾患とマウス発生異常、第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会、広島、2014 年 12 月
- 他、計 17 件



時空間的核アクチン重合化制御によるクロマチン構造と転写状態の変動

平成 28 年度～平成 29 年度

宮本 圭 (近畿大学・生物理工学部・講師)

【研究目的】

カエル卵母細胞核中に移植された哺乳類体細胞核は、卵由来のクロマチン結合タンパク質を取り込み、最終的に抑制遺伝子が活性される。この現象を転写リプログラミングと呼び、卵子内での転写リプログラミングは他のリプログラミング系と比較しても効率よく誘導されることが知られている。転写リプログラミングを受ける遺伝子領域のクロマチンは閉じた状態にあり、転写活性化因子が標的 DNA に結合するためには卵由来のクロマチン結合因子の効果による脱凝縮が必要と考えられてきた。宮本らはこれまで、転写リプログラミングに向けた一連のクロマチン構造の変化が階層的に順序だてて誘導されることを示した(図1)。一方で、図1に示したように、RNAポリメラーゼ(Pol II)の体細胞 DNA への結合からリン酸化を受けた活性化状態への移行がリプログラミングの「律速段階」となっていることがわかる。この律速段階解除と時

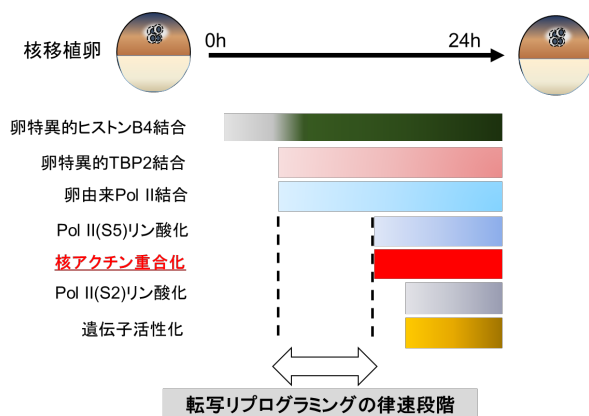


図1. カエル卵母細胞内で、移植された細胞核の転写状態がリプログラムされる過程。0h,24h は核移植後の時間。

期を同じくしてアクチンの重合化が核内で観察される。本研究では、転写リプログラミングに伴うクロマチン構造の変化を明らかにし、リプログラミングの律速段階解除に寄与する因子を探索する。また、律速段階解除に関わる候補因子として核アクチンの機能を調べる。そのため、光遺伝学的手法を用いて核アクチンの重合化を時空間特異的に制御する手法の開発も目指す。

【研究成果】

(1) クロマチンへのアクセシビリティが転写リプログラミングに与える影響

クロマチン構造の形成によって、核内タンパク質の DNA へのアクセスが制限されており、これによって各遺伝子からの転写は大きな影響を受ける。本研究では、転写リプログラミング前後で細胞核内のクロマチン状態を、ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible

Chromatin Sequencing)

を用いて調べ、クロマチン構造を形成せず、容易にアクセス可能な DNA 領域を同定した。遺伝子の転写状態との

関係を調べてみたところ、分化細胞においてアクセス可能な DNA 領域が、核移植後に優先的に転写されることを明

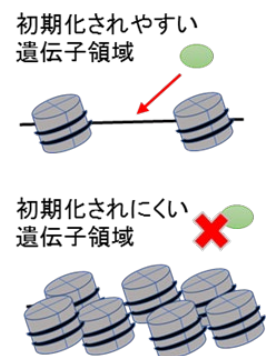


図2. 上図のように開いた状態の遺伝子領域は初期化されやすく、クロマチンが密に重なった下図のような領域は初期化されにくい。

らかにした(図 2)。

逆に、分化細胞においてアクセス不可能となっている領域においても転写リプログラミングは起きるが、その効率は低かった。例えば、卵に細胞核を移植後も継続的にアクセス不可能な状態を維持している遺伝子も多く見られた。転写リプログラミングを成功させるためには、アクセス不可能の状態からアクセス可能へとクロマチン構造を変化させる必要があり、卵内に存在する転写因子がこのクロマチン構造の制御に重要であることも示した。これらの研究により、DNA のアクセスを規定するクロマチン構造自体の重要性が明らかになった。また、核アクチンの重合化促進により、クロマチンのアクセシビリティがゲノムワイドに増加することも示した。

(2) 核アクチン重合化と初期発生

核アクチン重合化の核形成における役割を培養細胞を用いて調べる過程で、重合化核アクチンが初期 G1 期にのみ存在することを、宮本を含む共同研究グループが明らかにした。この一過的に存在する核アクチンの重合化を阻害したところ、核の体積に有意な減少が見られた。核アクチン重合化を阻害した結果、クロマチンの凝縮も観察された。さらに、細胞分裂後の核アクチン重合化をマウスの初期胚で検討したところ、培養細胞と同様に、最初の有糸分裂後の初期 G1 期に重合化核アクチンが観察された。また、初期胚における核アクチン重合化の阻害は、2 細胞期胚の核の体積に有意な減少を導き、胚発生の遅延も引き起こした。本研究により、細胞核が一定の大きさまで膨化し、正常な核内構造を構成するために必要な因子として核アクチンを同定した。

(3) 光遺伝学ツールを用いた核アクチン重合化と転写リプログラミングの制御

上記研究からも、核アクチンの重合化が核内でのクロマチン構造制御に重要な役割を有するこ

A01 公募研究(代表)

とがわかる。核アクチンは、これらのクロマチン構造制御を通じて転写リプログラミングに重要な因子として働いていると考えられる。核アクチンを研究する上で、その重合化を自由に制御する実験手法の開発が望まれる。そこで本研究では、核アクチンの重合化を時空間特異的に制御するために、光遺伝学ツールの一つである「LOV (light, oxygen, voltage)ドメイン」に注目した。LOV ドメインにアクチン重合化促進因子である Rac1 を結合することにより、Rac1 のアクチン重合化活性が阻害される。しかし、LOV ドメインは青色光に反応してその構造が変化することが知られており、光刺激によって Rac1 のアクチン重合化活性が復元する。LOV-Rac1 をカエル核移植卵に過剰発現することによって、リプログラミングを受けている最中の体細胞核に、核アクチン重合化を光刺激に応じて時空間特異的に誘導することに成功した。この実験系を用いて、核アクチン重合化促進に反応してクロマチンへの結合が変化するタンパク質群を同定した。

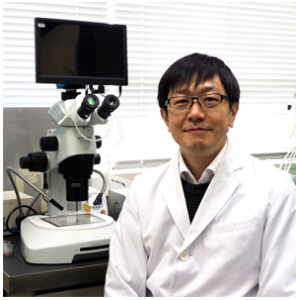
【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Miyamoto K, Nguyen KT, Allen GE, Jullien J, Kumar D, Otani T, Bradshaw CR, Livesey FJ, Kellis M, Gurdon JB. Chromatin accessibility impacts transcriptional reprogramming in oocytes. *Cell Rep.* 24, 304-311 (2018).
2. Ikeda T, Hikichi T, Miura H, Shibata H, Mitsunaga K, Yamada Y, Woltjen K, Miyamoto K, Hiratani I, Yamada Y, Hotta A, Yamamoto T, Okita K, Masui S. Srf destabilizes cellular identity by suppressing cell-type-specific gene expression programs. *Nat Commun.* 9, 1387 (2018).
3. Azuma R, Miyamoto K, Oikawa M, Yamada

- M, Anzai M. Combinational treatment of trichostatin A and vitamin C improves the efficiency of cloning mice by somatic cell nuclear transfer. *J Vis Exp.* 26 (2018).
4. Morita K, Tokoro M, Hatanaka Y, Higuchi C, Ikegami H, Nagai K, Anzai M, Kato H, Mitani T, Taguchi Y, Yamagata K, Hosoi Y, Miyamoto K, Matsumoto K. Peroxiredoxin as a functional endogenous antioxidant enzyme in pronuclei of mouse zygotes. *J Reprod Dev.* 64, 161-171 (2018).
 5. Higuchi C, Shimizu N, Shin SW, Morita K, Nagai K, Anzai M, Kato H, Mitani T, Yamagata K, Hosoi Y, Miyamoto K, Matsumoto K. Ubiquitin-proteasome system modulates zygotic genome activation in early mouse embryos and influences full-term development. *J Reprod Dev.* 64, 65-74 (2018).
 6. Baarlink C, Plessner M, Sherrard A, Morita K, Misu S, Virant D, Kleinschnitz EM, Harniman R, Alibhai D, Baumeister S, Miyamoto K, Endesfelder U, Kaidi A, Grosse R. A transient pool of nuclear F-actin at mitotic exit controls chromatin organization. *Nat Cell Biol.* 19, 1389-1399 (2017).
 7. Miyamoto K, Tajima Y, Yoshida K, Oikawa M, Azuma R, Allen GE, Tsujikawa T, Tsukaguchi T, Bradshaw CR, Jullien J, Yamagata K, Matsumoto K, Anzai M, Imai H, Gurdon JB, Yamada M. Reprogramming towards totipotency is greatly facilitated by synergistic effects of small molecules. *Biol Open.* 6, 415-424 (2017).
 8. Misu S, Takebayashi M, Miyamoto K. Nuclear actin in development and transcriptional reprogramming. *Front Genet.* 8, 27 (2017).
 9. Jullien J, Vodnala M, Pasque V, Oikawa M, Miyamoto K, Allen G, David SA, Brochard V, Wang S, Bradshaw C, Koseki H, Sartorelli V, Beaujean N, Gurdon J. Gene resistance to transcriptional reprogramming following nuclear transfer is directly mediated by multiple chromatin-repressive pathways. *Mol Cell.* 65, 873-884 (2017).
 10. Teperek M, Simeone A, Gaggioli V, Miyamoto K, Allen GE, Erkek S, Kwon T, Marcotte EM, Zegerman P, Bradshaw CR, Peters AH, Gurdon JB, Jullien J. Sperm is epigenetically programmed to regulate gene transcription in embryos. *Genome Res.* 26, 1034-46 (2016).
- 他、計 11 件
- [学会発表]
1. Miyamoto K., Nuclear actin polymerization in mouse embryonic development, ASCB/EMBO 2017 meeting, フィラデルフィア(アメリカ), 2017年12月
 2. Miyamoto K., Open chromatin configuration at primed promoters is formed during embryogenesis and accelerates transcriptional activation during differentiation and nuclear reprogramming, EMBO Conference The Nucleosome: From Atoms to Genomes, ハイデルベルグ(ドイツ), 2017年8月
 3. Miyamoto K., Mechanisms of nuclear reprogramming in eggs and oocytes, King Abdullah University of Science and Technology, サウジアラビア, 2016年11月
- 他、計 11 件

雄性不妊及び発がん過程のクロマチン動態解析



平成 28 年度～平成 29 年度

上田 潤 (旭川医科大学・教育研究推進センター・准教授)

【研究目的】

近年の研究からエピジェネティクス及びクロマチン構造は発生・分化過程のみならず、がん化などの病態進行過程においてもダイナミックに変化することが明らかとなってきた。本研究では「病態進行過程におけるクロマチン構造の動態変化」をキーワードに、二つのテーマを推進した。一つ目のテーマでは、マウスの精巣特異的ヒストン H3 バリエントである H3t に着目し、クロマチン構造が大規模に変動する精子形成過程において H3t がどのような役割を担っているのかを明らかにした。二つ目のテーマでは、メチル化 DNA を可視化したレポーターマウス「メチロー」を用いて、腫瘍形成過程にメチル化 DNA 及びヘテロクロマチン構造がどのように変動するかを解析することを目的として行った。

【研究成果】

(1) H3t の精子形成過程での役割解明

ヒトを含む多くの真核生物は、配偶子を形成する過程で減数分裂を行い、遺伝的多様性を獲得する。我々はマウスの精巣特異的ヒストン H3 バリエントである H3t に着目し、クロマチン構造が大規模に変動する精子形成過程において H3t がどのような役割を担っているのかを明らかにするために、マウスを用いた逆遺伝学的解析を行った。その結果、マウスの精巣に特異的に発現するヒストン H3 バリエントである H3t 遺伝子が精子形成過程に必須であり、精原細胞が分化する過程で canonical な H3 と置き換わっていることを明らかと

した(図 1)。H3t 欠損マウスの雄性不妊の原因を詳しく調べていくと、分化型精原細胞の数が激減し、生殖細胞が減数分裂に入った途端に停止していること、さらに減数分裂の進行に必須の遺伝子の発現が著しく低下していることも明らかとした。そして、H3t タンパク質は未分化型精原細胞の維持には必要なく、精原細胞が分化し、減数分裂に移行するために必要であることを明らかにした。また、本領域代表の胡桃坂仁志博士のグループの解析によって、H3t を組み込んだヌクレオソームは canonical な H3 である H3.1 を組み込んだヌクレオソームに比べて開いた構造を取っていることが結晶構造並びに生化学的解析によって明らかとなり、この構造の違いがヌクレオソームの entry/exit 部位に位置する H3t の 42 番目のヒスチジン残基 (canonical な H3 では 42 番目がアルギニン残基) に由来することも点変異の実験によって突き止めた。

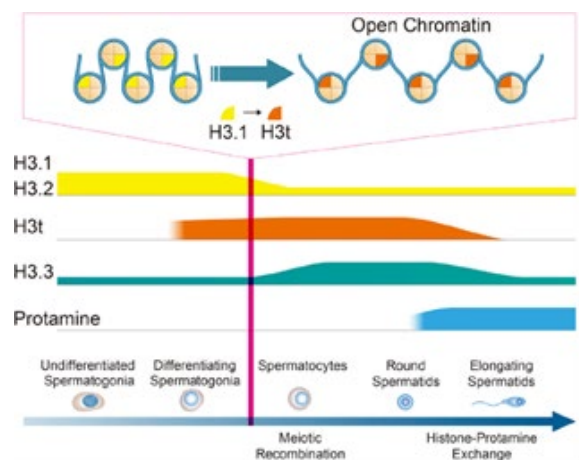


図 1. 精子形成過程でのヒストン H3 バリエントの変遷

(2) 腫瘍形成過程のクロマチン構造解析

腫瘍形成過程にメチル化 DNA 及びヘテロクロマチン構造がどのように変動するかを明らかにするために、メチローマウスと発がんモデルマウスを掛け合わせ、組織切片を用いて画像解析を行った。その結果、前腫瘍と腫瘍を区別する細胞核の特徴量がいくつか存在することが明らかとなった。また、中部大の岩本隆司博士、岩堀祐之博士との共同研究によって、腫瘍切片のヘマトキシリン・エオシン染色(明視野)画像から細胞核を抽出する方法の開発も行った。

(3) 環状染色体に関する臨床研究

民間の ART(生殖補助医療)クリニックとの共同研究によって、環状染色体を保有し、乏精子症と診断された患者の精子中に環状染色体が含まれるか否かを検査する臨床研究を行った。この研究によって、精子中に環状染色体は含まれておらず、アスペクト比の高い精子または精子頭部の短径が短い精子の受精率が高いことを明らかにした。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Omori Y, Ono Y, Tanino M, Karasaki H, Yamaguchi H, Furukawa T, Enomoto K, Ueda J, Sumi A, Katayama J, Muraki M, Taniue K, Takahashi K, Ambo Y, Shinohara T, Nishihara H, Sasajima J, Maguchi H, Mizukami Y, Okumura T, Tanaka S. A revised model of clonal evolution of intraductal papillary mucinous neoplasm-related pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology*, *In Press* (2018).
2. Takahashi T, Okeyo KO, Ueda J, Yamagata K, Washizu M, Oana H. A microfluidic device for isolating intact chromosomes from single mammalian cells and probing their folding stability by controlling solution conditions. *Sci Rep.* 8, 13684 (2018).
3. Nishikawa K[†], Itoi F^{†*}, Nagahara M, Jose M, Matsunaga A, Ueda J^{*}, Iwamoto T. The normality of sperm in an infertile man with ring chromosome 15: A case report. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35, 251-256 (2018). ([†]co-first author, ^{*}co-correspondence)
4. Ho JC^{*}, Pang QY, Toh TB, Abdullah LN, Jha S, Chow EK, Yang H, Kato H, Poellinger L, Ueda J^{*}, Lee KL^{*}. Inhibition of the H3K9 methyltransferase G9A attenuates oncogenicity and activates the hypoxia signaling pathway. *PLOS ONE*, 12, e0188051 (2017). (^{*}co-correspondence)
5. Tsukada Y, Iwahori Y, Funahashi K, Jose M, Ueda J, Iwamoto T. Extraction of Cell Nuclei using CNN Features. *Procedia Computer Science*, 112, 1633-1640 (2017).
6. Semba Y, Harada A, Maehara K, Oki S, Meno C, Ueda J, Yamagata K, Suzuki A, Onimaru M, Nogami J, Akashi K, Ohkawa Y. Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 45, 8758-8772 (2017).
7. Yamaguchi L, Nishiyama A, Misaki T, Johmura Y, Ueda J, Arita K, Nagao K, Obuse C, Nakanishi M. Usp7-dependent histone H3 deubiquitylation regulates maintenance of DNA methylation. *Sci Rep.* 7, 55 (2017).
8. Ueda J^{†*}, Harada A[†], Urahama T[†], Machida S, Maehara K, Nogami J, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tanaka H, Tachiwana H, Yao T, Yamada M, Iwamoto T, Isotani A, Ikawa M, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y,

Kurumizaka H, and Yamagata K*.
Testis-Specific Histone Variant H3t is
Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell
Reports*. 18, 593-600 (2017). (†co-first author,
*co-correspondence)

9. Sato Y, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Otsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura A, Kurumizaka H, Kimura H. A genetically encoded probe for live-cell imaging of H4K20 monomethylation. *Journal of Molecular Biology*. 428, 3885-3902 (2016).

[学会発表]

1. Ueda J, Harada A, Urahama T, Machida S, Maehara K, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tanaka H, Tachiwana H, Yao T, Isotani A, Ikawa M, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Yamagata K., Testis-Specific Histone Variant H3t is Essential for Entry into Spermatogenesis., Cold Spring Harbor Asia ‘Chromatin, Epigenetics and Transcription’, 蘇州(中国), 2016年5月
他、計9件

ヒストンバリエントに基づくクロマチン機能の推定



平成 28 年度～平成 29 年度

浜田 道昭 (早稲田大学・理工学術院・教授)

【研究目的】

ヒストンの修飾およびヒストンバリエントは、遺伝子発現のエピジェネティックな制御等のクロマチンの機能に重要な役割を果たしている。また、クロマチンの機能には、ヒストン修飾のみならずヒストンバリエントが重要であると考えられるが、クロマチン機能の推定にはヒストン修飾データが主に利用され、ヒストンバリエントのデータはそれほど多く用いられていない。このような背景を受け本研究では、ヒストンバリエントがクロマチンの機能にどのような影響を与えるかを明らかにするために、代表者が開発した方法を発展改良させることにより、クロマチン状態の生物学的な意味を自動的に推定し、ヒストンバリエントがクロマチンの機能に与える影響を解析・解明することを目的とする。

【研究成果】

(1) ヒストンバリエントを含むクロマチンマークに対するクロマチン状態の推定

ヒストンバリエントのデータとしては、ヒト:Kujirai+, NAR (2016) 44, 6127-41, マウス:Maehara+, Epigenetics Chromatin (2015) 17;8:35 を用いた。これらのデータを用いて、研究代表者が開発した手法を用いてクロマチン状態の推定を行った。さらに、推定されたクロマチン状態と、様々なゲノムアノテーションとの相関を調査した。

図1が推定されたヒトのクロマチン状態、図2がヒトのクロマチン状態の意味付けを表している。状態1と状態6はオープンクロマチン領域にエンリッチ、また、TSS 付近にエンリッチしていることがわ

かる(図2)。状態1と6は結合する転写因子がコンプリメンタリーな関係にあることがわかった(特にNRSF)。図3, 4はマウスに関するクロマチン状態と意味付けである。

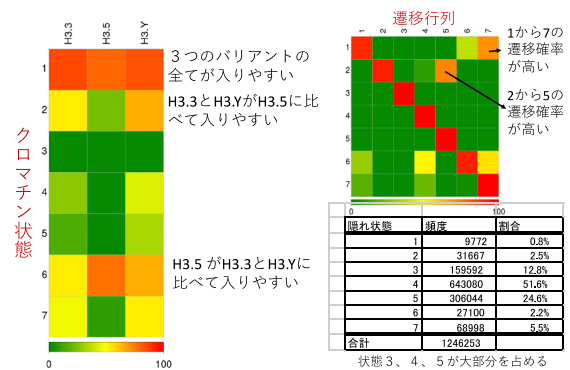


図 1 推定されたヒトのクロマチン状態

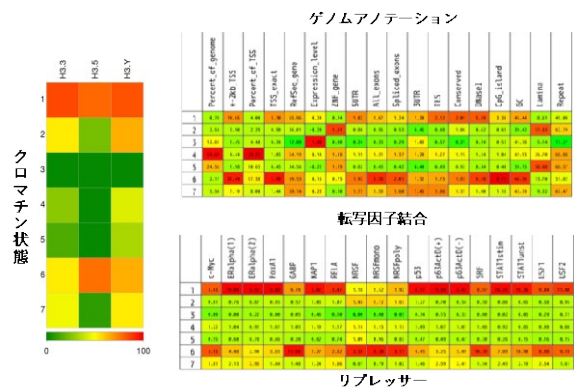


図 2 ヒトのクロマチン状態の意味付け

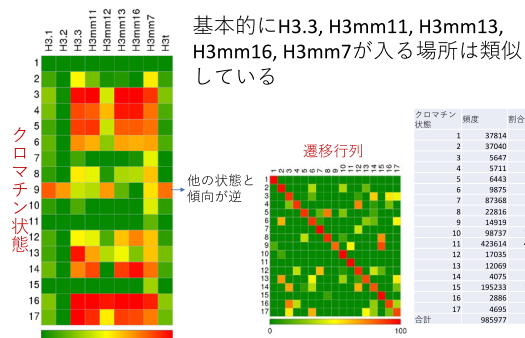


図 3 推定されたマウスのクロマチン状態

(3) 階層的なクロマチン状態を推定するための情報技術の開発。

プロモーターやエンハンサーも、階層的な構造を有していると考えた。例えば, promoter⇒strong promoter, weak promoter, bivalent promoter などである。従来のクロマチン状態の推定手法においては、このような階層性を考えることはできなかったため、我々は独自に手法の開発を行った。そのためのプロトタイプシステムの開発を行い小さなデータを用いてその有効性を検証した(図6)。

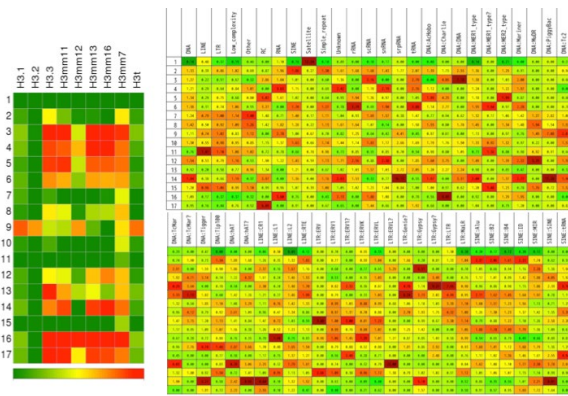


図4 マウスのクロマチン状態の意味付け

(2) データベース lncRRIdb: 発現, 局在情報を統合した lncRNA-RNA 相互作用データベース
本研究では、クロマチン機能を長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) の観点から特徴づけることを試みるために、lncRNA と相互作用を行う RNA の網羅的なデータベースの構築を行った。これは研究代表者らが開発した Rlblast を用いて、計算機による網羅的な相互作用予測を行った結果を、発現および局在の実験情報とともに格納したデータベースである(図5)。



図5 lncRRIdb(<http://rtools.cbrc.jp/lncRRIdb/>) lncRNA-RNA 相互作用の網羅的なデータベース。発現および局在の実験データを用いた絞り込みが可能となる。

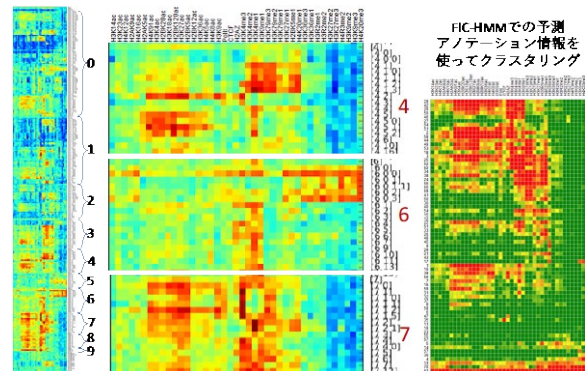


図6 新規開発手法を用いて推定した階層的なクロマチン状態

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Fukunaga T, Hamada M. Rlblast: an ultrafast RNA-RNA interaction prediction system based on a seed-and-extension approach. *Bioinformatics*. 33, 2666-2674 (2017).
2. Chishima T, Iwakiri J, Hamada M*, Identification of transposable elements contributing to tissue-specific expression of long non-coding RNAs. *Genes* 9, 23 (2018).
3. Iwakiri J*, Terai G, Hamada M. Computational prediction of lncRNA-mRNA interactions by integrating tissue specificity in human transcriptome. *Biology Direct* 12, 15 (2017).
4. Fukunaga T*, Hamada M*. A novel method

for assessing the statistical significance of RNA-RNA interactions between two long RNAs. *J Comput Biol.* 25, 976-986 (2018)

他、計 10 件

[学会発表]

1. Yuki Takeda, Michiaki Hamada, Analysis of histone modifications using latent feature models, 第 6 回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP 2017), 札幌, 2017 年 9 月
2. 武田悠希, 浜田道昭、隠れ特徴モデル (LFM)によるヒストン修飾解析、東京バイオインフォマティクスミーティング、東京、2017 年 8 月



分裂酵母 CENP-A ヌクレオソームと動原体の再構築

平成 28 年度～平成 29 年度

佐藤 政充 (早稲田大学・理工学術院・准教授)

【研究目的】

セントロメアにはヒストン H3 バリエントである CENP-A が集積し、それを土台として 100 種類もの動原体因子が順次呼び込まれて動原体を形成するといわれる。これまでの国内外の研究において、CENP-A がセントロメアに呼び込まれて動原体を構成する分子機構の解明が進んできた。しかしながら、CENP-A 自身が動原体の機能にどのように関わるのか、あるいは動原体の多数の因子が単純に構造的土台として存在しているのか、この巨大複合体の形成機構と機能には不明な点も多く残る。

そこで我々は、分裂酵母をモデルとして用いて、CENP-A が動原体の形成において具体的に果たす役割の追究をおこなうとともに、動原体構成因子、その中でも特に Kis1/Mis19/Eic1 および Mis6/CENP-I の具体的な役割について解析をおこない、これらの問いに答えを見いだそうと試みている。

【研究成果】

我々は先行研究において、分裂酵母の紡錘体微小管が極度に不安定化し、かつ動原体との結合に異常を示す変異体として *kis1* 変異体を単離した。その原因遺伝子がコードする Kis1 タンパク質は、当時未知の因子であり、その後我々を含む複数のグループの研究によりセントロメアに CENP-A を呼び込む因子であることが明らかとなった (Hirai et al. 2014; Hayashi et al. 2014; Subramanian et al. 2014)。

この *kis1* 温度感受性変異体を制限温度下におくと、セントロメアにおける CENP-A ヌクレオソームは比較的速やかに局在を消失し、かわりにアセチル化されたヒストン H3 を含むヌクレオソームが入り込む。さらに、動原体構成因子のひとつである Mis6/CENP-I も同様に動原体から局在が失われるが、その他の構成因子、例えば紡錘体微小管との結合に関わるとされる Ndc80 などの外側動原体因子は正常な局在を示した。

それでは、なぜ外側因子が正常でも *kis1* 変異体では動原体と微小管の結合に欠陥を生じたのか。本研究では、GFP/RFP によるセントロメア可視化システムを用いて、その細胞内での空間的な構造を測定したところ、*kis1* 変異体ではセントロメア DNA の立体配置に異常が生じている可能性を見いだした(図)。このことは、CENP-A ヌクレオソームは、動原体構成因子が積み重なるための足場としての機能に加えて、セントロメア DNA を正しく立体的に構成するためにも重要な役割を担うこと

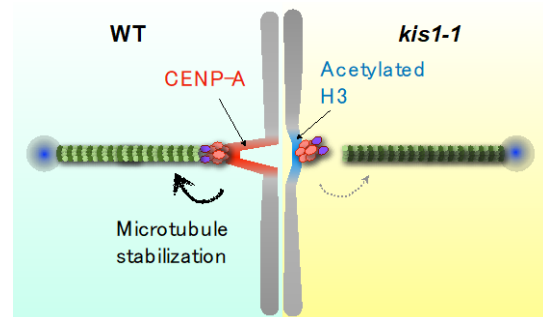


図 CENP-A ヌクレオソームはセントロメアの立体配置を作り上げることで、動原体と微小管と正しい結合を促進する

左は野生型、右は *kis1* 変異体細胞におけるセントロメアの立体配置と、微小管との結合の可否を模式的に示したものである。*kis1* 変異体では結合が正しく起きず、その後、微小管が不安定化される。

を示唆している。

さらに我々は、*kis1* 変異体では CENP-A のみならず、Mis6/CENP-I が消失することにも着目した。*kis1* 変異体および *mis6* 変異体 (Takahashi et al. 2000) ではいずれも CENP-A のセントロメア局在が低下することから、両者は CENP-A をセントロメアに呼び込む機能があると推定されていた。しかしながら、Mis6/CENP-I の局在パターンは、Kis1 や HJURP など一連の CENP-A 呼び込み因子の局在パターンと異なる点があることに注目した。ここから、Mis6/CENP-I が単純に CENP-A の呼び込み因子として機能するだけでなく、何らかの別の役割を担う可能性があるかと推測するに至った。

このような Mis6/CENP-I の未知の機能に迫るために、我々ははじめに FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) などの細胞生物学的手法を用いて、セントロメアにおける CENP-A スクレオソームの経時的な挙動を追跡した。その結果、細胞周期の間期では CENP-A スクレオソームは呼び込みが起きるが同時にセントロメアからの排出(ターンオーバー)が起きること、また、細胞周期の分裂期(M期)にはこの CENP-A ダイナミクスが停止することを確認した。

分裂期には、CENP-A の呼び込み因子である Kis1 や HJURP が動原体から消失するため CENP-A スクレオソームの新規呼び込みが著しく低下するといえるが、排出(ターンオーバー)はどのように停止するのであろうか。

我々は、Mis6/CENP-I は分裂期にも動原体に局在することから、分裂期に CENP-A スクレオソームがセントロメアから排出されないように維持する役割を担うと想定した。そこで、野生型および *mis6* 変異体の分裂期における CENP-A の局在を経時的にモニターしたところ、セントロメアの CENP-A 局在量は、野生型よりも *mis6* 変異体において、時間とともに著しく減少した。このことは、

Mis6/CENP-I が CENP-A スクレオソームの維持に関わる可能性を示すものである。現在はさらに研究を進展させ、Mis6/CENP-I による CENP-A 維持機構とその生物学的な意義について追究を重ねている。

本研究では、分裂酵母を用いたこれらの実験を進めるために効果的な材料の開発・作製にも力を注いでおり、Golden Gate 法を利用したシステムティックなプラスミド作製のためのツールを論文にて公開した(文献 1)。

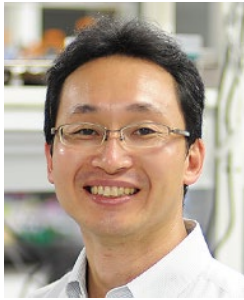
【本研究課題に関する主要成果】

〔雑誌論文〕すべて査読あり

1. Kiriya K, Tsuyuzaki H, Sato M. Module-based systematic construction of plasmids for episomal gene expression in fission yeast *Gene* 637, 14-24 (2017).

〔学会発表〕

1. Masamistu Sato, How microtubule cytoskeleton is reorganized during the cell cycle, 3D Lab Exchange Symposium, ワン・ノース(シンガポール), 2015年9月



HP1 による動的クロマチン構造の制御

平成 28 年度～平成 29 年度

中山 潤一 (基礎生物学研究所・教授)

【研究目的】

真核生物に存在するヘテロクロマチンは、染色体の機能やゲノム恒常性の維持、さらにエピジェネティックな遺伝子発現制御にも重要な役割を果たしている。このヘテロクロマチン構造形成において重要な役割を果たしているのが、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 である。特徴的なヒストンのメチル化修飾を認識してこの HP1 がクロマチンに結合することが明らかにされたが、翻訳後修飾による HP1 の機能制御や、実際のヌクレオソームへの結合様式など、HP1 がクロマチン構造変換を引き起こす分子機構については不明な点が多い。本研究では、生化学的・遺伝学的解析によって、リン酸化がどのように HP1 の機能を制御し、クロマチンの動的構造変換に寄与しているのかについて解明を目指した。

【研究成果】

(1) 哺乳類 HP1 α の M 期特異的なリン酸化の制御とその役割

これまでの研究から、哺乳類の HP1 α は CK2 によって恒常的なリン酸化を受け、このリン酸化が HP1 α の H3K9me3 ヌクレオソームへの結合特異性を向上させることを明らかにした。HP1 α は M 期特異的なリン酸化を受けるが、その制御や役割については明らかにされていない。この M 期特異的なリン酸化の役割を明らかにすることを目指して、まずリン酸化部位の同定を試みた。293T 細胞を用いて、候補となるセリン残基に変異を入れた HP1 α を発現させ、細胞を M 期に同調後にそのリン酸化状態を解析することで、ヒンジ領域の 92 番

目のセリン (S92) が優先的にリン酸化されることを明らかにした。また阻害剤を用いた実験によって、Aurora B キナーゼが主要な S92 のリン酸化酵素であること、また M 期特異的に HP1 α と相互作用する因子の探索から、PP2A と PP2C β が S92 の脱リン酸化を触媒する酵素活性を持つことをそれぞれ明らかにした(図1)。

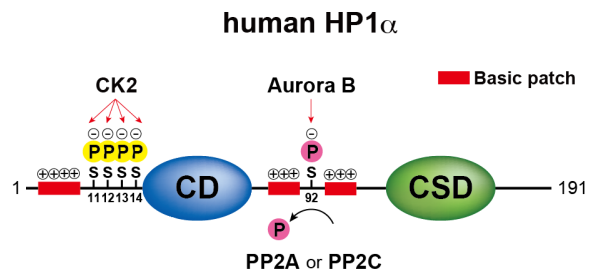


図1. ヒト HP1 α のリン酸化とその制御

次に、細胞周期を同調させたヒト培養細胞を用いて HP1 α の挙動を詳細に解析したところ、M 期特異的なリン酸化を受けた HP1 α がクロマチンから優先的に解離すること、また HP1 α のリン酸化が主要な M 期のマークとして知られる H3S10 のリン酸化に先立って起きることが明らかになった。さらに大腸菌の共発現系を応用して、それぞれのリン酸化を持つ HP1 α を調製し、ヌクレオソーム結合能と DNA 結合能を比較した結果、M 期のリン酸化によって HP1 α のヌクレオソーム結合特異性はほとんど変化しないが、DNA への結合が変化することが明らかになった。以上の結果より、哺乳類 HP1 α の M 期特異的なリン酸化は、ヌクレオソーム DNA との親和性を変化させ、HP1 α のクロマチン結合を制御していることが示唆された。

(2) 分裂酵母 Swi6 の M 期特異的なリン酸化の制御とその役割

HP1 の機能制御するリン酸化の関係を探るため、分裂酵母の HP1 ホモログである Swi6 について解析した。細胞周期を同調させた細胞を用いて Swi6 のリン酸化状態を調べたところ、ヒト HP1 α と同様に Swi6 が M 期特異的なリン酸化を受けることが分かった。M 期特異的なリン酸化酵素として分裂酵母の Aurora キナーゼである Ark1 に着目し、Ark1 が Swi6 をリン酸化するかどうか検討した。Swi6 と Ark1 を大腸菌で共発現させ、Swi6 のリン酸化状態を調べることで、Swi6 の N 末のドメインが Ark1 によってリン酸化されることが明らかになった。実際に候補となるセリン残基をアラニンに置換した変異 Swi6 を分裂酵母で発現させリン酸化状態を調べることで、N 末端領域のセリン残基が細胞内で M 期特異的にリン酸化されることを確認した。興味深いことに、リン酸化を受ける N 末端領域は分裂酵母の近縁種で高度に保存されており、遺伝子サイレンシングにも重要なことから(図2)、N 末端領域のリン酸化が Swi6 の機能を制御する可能性が示唆された。

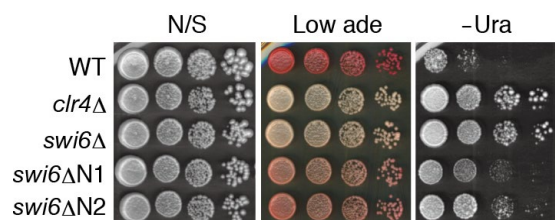


図2. Swi6 の N 末端はサイレンシングに必要である

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Bommi JR, Prasada Rao HD, Challa K, Higashide M, Shinmyozu K, Nakayama J, Shinohara M, Shinohara A. Meiosis-specific cohesin component, Rec8, promotes the localization of Mps3 SUN domain protein on

the nuclear envelope. *Genes Cells*. (2018) in press.

2. Maksimov V, Oya E, Tanaka M, Kawaguchi T, Hachisuka A, Ekwall K, Bjerling P, Nakayama J. The binding of Chp2's chromodomain to methylated H3K9 is essential for Chp2's role in heterochromatin assembly in fission yeast. *PLoS ONE*. 13, e0201101 (2018).
3. Nakayama N, Sakashita G, Nariai Y, Kato H, Shinmyozu K, Nakayama J, Kyo S, Urano T, Nakayama K. Cancer-related transcription regulator protein NAC1 forms a protein complex with CARM1 for ovarian cancer progression. *Oncotarget*. 9, 28408-28420 (2018).
4. Okazaki K, Kato H, Iida T, Shinmyozu K, Nakayama J, Murakami Y, Urano T. RNAi-dependent heterochromatin assembly in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* requires heat-shock molecular chaperones Hsp90 and Mas5. *Epigenetics Chromatin*. 11, 26 (2018).
5. Machida S, Takizawa Y, Ishimaru M, Sugita Y, Sekine S, Nakayama J, Wolf M, Kurumizaka H. Structural basis of heterochromatin formation by human HP1. *Mol Cell*. 69, 385-397 (2018).
6. Zafar F, Okita AK, Onaka AT, Su J, Katahira Y, Nakayama J, Takahashi TS, Nasukata H, Nakagawa T. Regulation of mitotic recombination between DNA repeats in centromeres. *Nucleic Acid Res*. 45, 11222-11235 (2017).
7. Shirai A, Kawaguchi T, Shimojo H, Muramatsu D, Ishida-Yonetani M, Nishimura

A01 公募研究(代表)

- Y, Kimura H, Nakayama J, Shinkai Y. Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 on its heterochromatin assembly. *Elife*. 6, pii: e25317 (2017).
8. Kawaguchi T, Machida S, Kurumizaka H, Tagami H, Nakayama J. Phosphorylation of CBX2 controls its nucleosome-binding specificity. *J Biochem*. 162, 343-355 (2017).
 9. Eustache S, Créchet J-B, Bouceba T, Nakayama J, Tanaka M, Suzuki M, Woisard A, Tuffery P, Baouz S, Hountondji C. A Functional Role for the Monomethylated Gln-51 and Lys-53 Residues of the 49GGQTK53 Motif of eL42 from Human 80S Ribosomes. *Open Biochem J*. 11, 8-26 (2017).
 10. Mutazono M, Morita M, Tsukahara C, Chinen M, Nishioka S, Yumikake T, Dohke K, Sakamoto M, Ideue T, Nakayama J, Ishii K, Tani T. The intron in centromeric noncoding RNA facilitates RNAi-mediated formation of heterochromatin. *PLoS Genet*. 13, e1006606 (2017).
 11. Kamata K, Shinmyozu K, Nakayama J, Hatashita M, Uchida H, Oki M. Four domains of Adal form a heterochromatin boundary through different mechanisms. *Genes Cells* 21, 1125-1136 (2016).
 12. Mitsumori R, Shinmyozu K, Nakayama J, Uchida H, Oki M. Gic1 is a novel heterochromatin boundary protein *in vivo*. *Genes Genet Syst*. 91, 151-159 (2016).
2. 中山潤一、分裂酵母におけるヘテロクロマチン構造形成の分子機構、第 89 回日本生化学会年会、仙台、2016 年 9 月
 3. 中山潤一、分裂酵母におけるヘテロクロマチン構造形成の分子機構、第 7 回高次クロマチン研究会、出雲、2016 年 8 月

[学会発表]

1. 中山潤一、高次クロマチン構造形成の分子機構、第 11 回 日本エピジェネティクス研究会年会、東京、2017 年 5 月



クロマチン動構造を介した DNA 損傷修復制御の分子基盤

平成 28 年度～平成 29 年度

菅澤 薫 (神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授)

【研究目的】

ヌクレオチド除去修復 (NER) は、紫外線や化学変異原によって誘起される様々な DNA 損傷を取り除き、突然変異と発がんの抑制に寄与する重要な DNA 修復機構である。色素性乾皮症 (XP) 関連因子の機能解析を中心として哺乳類細胞における NER の分子機構の理解が進んだ一方、クロマチン構造の関与を含め、その生体内制御については未解明の部分が多く残されている。本研究では、NER において DNA 損傷の認識及び修復反応の開始を担う XPC タンパク質複合体とヘテロクロマチン構造との機能的相互作用を示唆する独自の知見に基づき、この相互作用を制御する分子機構と NER 反応機構における役割を明らかにすることで、クロマチン動構造が持つ新たな機能的側面の理解に貢献することを目的とした。

【研究成果】

(1) DNA 損傷認識因子 XPC のヘテロクロマチン局在機構

マウス細胞において安定発現させた EGFP 融合 XPC タンパク質が、DNA 損傷とは無関係にクロモセーターに局在するメカニズムの解析を行った。まず XP 患者で同定された XPC タンパク質のアミノ酸置換変異体 (W690S) を用い、クロモセーターへの局在が XPC の DNA 結合能に依存しないことを示した。また光褪色後蛍光回復 (FRAP) 法を用いた解析により、XPC のクロモセーターへの局在が極めて動的であることがわかった。次に、ヒストン H3K9me3 修飾を担うメチル化酵素 Suv39h1/2 の発現抑制を行ったところ、H3K9me3 や HP1 α の

クロモセーターへの局在が消失しても XPC の局在は維持されていたことから、両者の局在制御機構が異なることが示された。一方、H3K27ac と XPC は相互排他的な局在を示し、後述するように XPC が非アセチル化ヒストンに富むクロマチン領域に結合しやすいというモデルが支持された。

(2) XPC とヒストンの相互作用解析

XPC を含むタンパク質複合体の単離と質量分析による網羅的な解析から、XPC がヒストンと相互作用することを見出した。ファーウエスタンブロット及びプルダウン実験により、XPC がヒストン H3 及び H1 と直接相互作用することを明らかにした。特にヒストン H3 との相互作用は H3 の N 末端テールに依存しており、またヒストンアセチル化酵素 CBP 処理によりヒストンにアセチル化修飾を導入することで XPC との相互作用が著しく減弱した (図 1)。一方、細胞核の局所に紫外線を照射して DNA 損傷を誘導すると、損傷領域において H3K27ac 等のアセチル化ヒストンのレベルが有意に低下することから、DNA 損傷部位周辺のクロマチン領域でヒストンの脱アセチル化が実際に誘導されていることが強く示唆された。細胞のヒストン脱アセチル

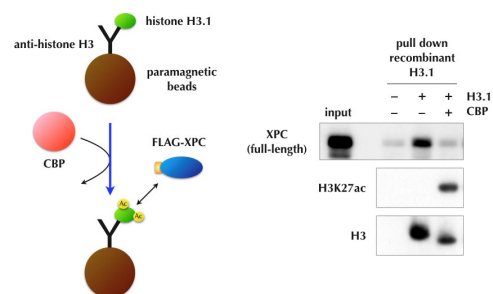


図 1. ヒストン H3 のアセチル化は XPC との相互作用を負に制御する

化酵素阻害剤による処理が XPC の損傷部位へのリクルート及び DNA 損傷除去速度の低下を引き起こすという以前の我々の結果と合わせ、ヒストンの脱アセチル化を含むヘテロクロマチン様構造の形成が XPC による損傷認識を補助するという、遺伝子発現制御とは異なる新たなモデルを提唱した(図2)。クロマチンのグローバルな脱凝縮は DNA 損傷に対するアクセスを容易にする一方、XPC の非特異的な DNA 結合も増強するため、結果として損傷認識の特異性と効率が低下してしまうのではないかと考えている。

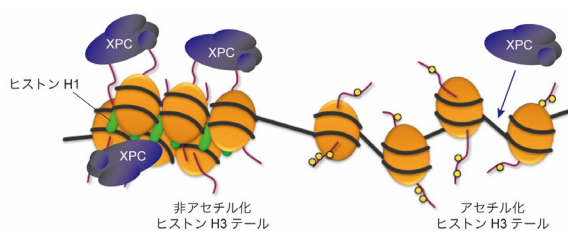


図 2. XPC 複合体のクロマチン局在制御に関するモデル

(3) クロマチン上の DNA 損傷を認識するための構造基盤

DNA 損傷がヌクレオソームコアの内部に生じた場合、XPC との相互作用及びそれに続く修復反応が阻害されることが、無細胞系を使った生化学的解析により示されていた。一方、紫外線誘発 DNA 損傷の認識において XPC を補助する UV-DDB は損傷を含むヌクレオソームにも結合できることを明らかにしており、損傷ヌクレオソームと UV-DDB の複合体の構造解析を共同研究により進めている。また、ヌクレオソームコアの内部に脱塩基部位が生じた場合、周辺の塩基配列によっては通常の塩基除去修復による認識が困難な特殊な構造を取る可能性があることを示した。

【本研究課題に関する主要成果】

〔雑誌論文〕すべて査読あり

1. Nukina K, Hayashi A, Shiomi Y, Sugasawa K, Ohtsubo M, Nishitani H. Mutations at

multiple CDK phosphorylation consensus sites on Cdt2 increase the affinity of CRL4Cdt2 for PCNA and its ubiquitination activity in S phase. *Genes Cells*. 23, 200-213 (2018).

2. Calses PC, Dhillon KK, Tucker N, Chi Y, Huang JW, Kawasumi M, Nghiem P, Wang Y, Clurman BE, Jacquemont C, Gafken PR, Sugasawa K, Saijo M, Taniguchi T. DGCR8 mediates repair of UV-induced DNA damage independently of RNA processing. *Cell Rep*. 19, 162-174 (2017).
3. Nakamura T, Murakami K, Tada H, Uehara Y, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Saitoh H, Nishitani H, Ono T, Nishi R, Yokoi M, Sakai W, Sugasawa K. Thymine DNA glycosylase modulates DNA damage response and gene expression by base excision repair-dependent and independent mechanisms. *Genes Cells*. 22, 392-405 (2017).
4. Kakumu E, Nakanishi S, Shiratori HM, Kato A, Kobayashi W, Machida S, Yasuda T, Adachi N, Saito N, Ikura T, Kurumizaka H, Kimura H, Yokoi M, Sakai W, Sugasawa K. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: regulation by acetylated status of histone H3. *Genes Cells*. 22, 310-327 (2017).
5. Osakabe A, Arimura Y, Matsumoto S, Horikoshi N, Sugasawa K, Kurumizaka H. Polymorphism of apyrimidinic DNA structures in the nucleosome. *Sci Rep*. 7, 41783 (2017).
6. Sugasawa K. Molecular mechanisms of DNA damage recognition for mammalian nucleotide excision repair. *DNA Repair*. 44,

110-117 (2016).

[学会発表]

1. Sugasawa Kaoru, Coordinated DNA damage recognition by xeroderma pigmentosum gene products., International Meeting on RECQ Helicases and Related Diseases, 千葉, 2018年2月
 2. 菅澤薫、ヌクレオチド除去修復におけるDNA損傷認識の高次制御機構、日本薬学会第138年会、金沢、2018年3月
 3. Sugasawa Kaoru, Interaction of DNA damage recognition factors with chromatin., 6th US-Japan DNA Repair Meeting, バークレー(アメリカ), 2017年5月
 4. Sugasawa Kaoru, Chromatin dynamics regulating DNA damage recognition of nucleotide excision repair., 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens, 仁川(中国), 2017年11月
 5. Sugasawa Kaoru, Mechanism and regulation of DNA damage recognition in nucleotide excision repair., 2nd Biosignal Research Center International Symposium, 神戸, 2017年11月
 6. Sugasawa Kaoru, Interaction of DNA damage recognition factors with the chromatin structure., Japan-Swiss Symposium: Chromatin Structure and Dynamics, バーゼル(スイス), 2017年1月
 7. 菅澤薫、多田遥人、大西優貴、岩井成憲、胡桃坂仁志、酒井恒、ヌクレオチド除去修復のDNA損傷認識とその制御の分子基盤2016、第89回日本生化学会大会、仙台、2016年9月
 8. Sugasawa Kaoru, DNA damage recognition mechanism for mammalian nucleotide excision repair., KSBMB International Conference 2016, ソウル(韓国), 2016年5月
 9. Sugasawa Kaoru, Dissection of the DNA damage recognition machinery in mammalian nucleotide excision repair., Conference: Responses to DNA Damage: from Molecule to Disease, エグモント・アーン・ゼー(オランダ), 2016年4月
- 他、計12件



サブテロメアクロマチン構造の動的制御メカニズム

平成 28 年度～平成 29 年度

加納 純子 (大阪大学・蛋白質研究所・准教授)

【研究目的】

線状染色体の末端に存在するドメインであるテロメアに隣接して「サブテロメア」と呼ばれるドメインが存在する。サブテロメアは真核生物で広く保存されている染色体ドメインであるにもかかわらず、DNA 配列が完全に決定されていない、長大な共通配列を含むことにより染色体部位が特定できないなどの実験手法的困難から、その機能がほとんど明らかにされてこなかった染色体の未開の地である。本研究では、実験生物の中でサブテロメアの数が極めて少なく遺伝学的解析が容易な分裂酵母の利点を活かし、“実験生物史上初の”サブテロメア共通配列完全欠失細胞を作製し、世界に先駆けて動的なサブテロメアクロマチン構造の制御や機能を明らかにすることを目的とした。

【研究成果】

(1) サブテロメア共通(SH)配列完全欠失株の作製

サブテロメア DNA には長大な共通配列が存在する。分裂酵母の場合、共通配列の長さは約 50 kb であり、ここを足場としてヒストン H3-K9 メチル化を介したヘテロクロマチンが形成される。複数コピー存在するサブテロメア共通配列が細胞内機能にどのように寄与しているのか、なぜ複数コピー必要なのかを探るためには、すべての共通配列をゲノムから削除し、その影響を探るのが最善の方法である。そこで、サブテロメアの数の少なさと遺伝学的操作が容易であるという圧倒的な有利性を利用して、分裂酵母のすべてのサブテロメア

共通配列(以下、SH 配列とよぶ)をマーカー遺伝子によって置き換えて削除した haploid 株(SD5 株と呼ぶ)の作製を試み、成功した。

(2) SH 配列は生育やテロメア DNA 維持に必須ではない

まず、SH 配列が細胞増殖などに必須かどうか調べた。SD5 株は、栄養豊富な培地において野生株とほぼ同じ速度で増殖し、減数分裂期の進行や孢子形成にも異常が見られなかったことから、SH 配列は細胞増殖に必須ではないことがわかった。また、SH 配列に隣接するテロメア DNA 長にも異常が見られなかったことから、SH 配列はテロメア DNA 長維持にも必須ではないことがわかった。

(3) サブテロメアはテロメア短小化時の染色体維持に重要である

テロメラーゼを欠失させてテロメア DNA を短小化させると、染色体末端が保護されないことにより、多くの細胞は死に至る。しかし、低頻度に生き残る細胞が現れる。分裂酵母の場合、そのメジャーな生存方法は染色体自己環状化である。染色体自己環状化の際、SH 配列に仕込まれている、自己環状化した際に同方向になる相同 DNA 配列において、single-strand annealing 反応が起きる。そこで、SD5 株においてテロメラーゼを欠失させたところ、意外なことにサバイバーが多数取得できた。それらのサバイバーの染色体の形態を調べたところ、30%程度の頻度で(通常見られない)異染色体間末端融合が見られた。このことから、SH 配列は本来、テロメアが短小化した際、染色体分配に支障をきたす、危険な異染色体間末端融合を

起こさないようにする機能があることがわかった。また、SH 配列のない SD5 株では、サブテロメア領域内外の相同配列(レトロトランスポゾンの LTR 配列など)において染色体が融合していた。以上のことから、サブテロメアにはテロメア短小化の危機に対して染色体を守る複合的な防御機構が備わっていることが明らかになった。

(4) 異染色体間末端融合に伴うセントロメアの不活性化現象

SD5 株でテロメアを短小化させると、異染色体間末端融合が見られたが、細胞は致死ではなかった。異染色体間末端融合した染色体はセントロメア領域を二つ持つが、興味深いことに、どちらか片方のセントロメアにおいて CENP-A タンパク質(キネトコア形成の基盤となるヒストン H3 バリエント)が完全に消失していた。さらに、その不活性化されているセントロメアのコア領域には、通常は見られないヘテロクロマチンが侵入しており、CENP-A の再局在を防いでセントロメアの不活性化状態を維持していることが示唆された。

(5) サブテロメアバウンダリー機構の発見

サブテロメアの SH 配列にはヘテロクロマチンが形成される。SD5 株では、ヘテロクロマチンが SH に隣接するサブテロメア領域に局在していた。このことから、SH 領域は普段ヘテロクロマチンを緩衝する役割を果たしていることがわかった。さらに SH 隣接領域を削ったところ、ヘテロクロマチンはサブテロメア末端より外側に局在をシフトすることはなかったことから、サブテロメアの末端にはヘテロクロマチンの局在を制限するバウンダリー機構が備わっていることが示唆された。その境界部位では、ヒストンの局在が欠落していたことから、ヒストン局在のギャップを設けることによってユークロマチン領域へのヘテロクロマチンの浸潤を防いでいる可能性が示唆された。

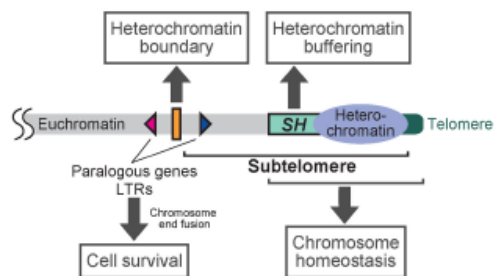
(6) SH 隣接領域へのヘテロクロマチンの侵入に

よるサブテロメア遺伝子群の転写の抑制

SD5 株においてヘテロクロマチンが SH 隣接領域に侵入してきたことにより、その領域全体において遺伝子発現が著しく抑制されていることがマイクロアレイ解析により明らかになった。さらに、そのことにより LiCl や NaCl などに高感受性を示すようになった。

(7) まとめ

以上の結果より、サブテロメアは染色体の恒常性、遺伝子発現、生命を維持するための防御機構を複合的に備えていることがわかった。



【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

1. Hu C, Inoue H, Sun W, Takeshita Y, Huang Y, Xu Y, Kanoh J, Chen Y. Structural insights into chromosome attachment to the nuclear envelope by an inner nuclear membrane protein Bqt4 in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* (in press).
2. Hu C, Inoue H, Sun W, Takeshita Y, Huang Y, Xu Y, Kanoh J, Chen Y. The inner nuclear membrane protein Bqt4 in fission yeast contains a DNA-binding domain essential for telomere association with the nuclear envelope. *Structure* (in press).
3. Xue J, Chen H, Wu J, Takeuchi M, Inoue H, Liu Y, Sun H, Chen Y, Kanoh J, Lei M. Structure of the fission yeast *S. pombe* telomeric Tpz1-Poz1-Rap1 complex. *Cell Res.*

- 27, 1503-1520 (2017).
4. Tashiro S, Nishihara Y, Kugou K, Ohta K, Kanoh J. Subtelomeres constitute a safeguard for gene expression and chromosome homeostasis. *Nucleic Acids Res.* 45, 10333-10349 (2017).
 5. Kanoh J. Telomeres and subtelomeres: new insights into the chromatin structures and functions of chromosome ends. *Genes Genet. Syst.* 92, 105 (2017).
 6. Kanoh J. Unexpected roles of a shugoshin protein at subtelomeres. *Genes Genet. Syst.* 92, 127-133 (2017).
 7. Inoue H, Sugimoto S, Takeshita Y, Takeuchi M, Hatanaka M, Nagao K, Hayashi T, Kokubu A, Yanagida M, Kanoh J. CK2-phospho-independent assembly of the Tel2-associated stress-signaling complex in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells.* 22, 59-70 (2017).
- chromosome homeostasis, Telomeres & Telomerase, ニューヨーク(アメリカ), 2017年5月
5. 加納純子、Tel2はPIKKタンパク質群の発現を維持し正常なストレス応答を保障する、第50回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、東京、2017年9月
 6. 加納純子、テロメア DNA 長は染色体腕部の DNA 複製タイミングの維持に重要である、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、蒲郡、2017年12月

[学会発表]

1. 加納純子、真核生物における染色体の線状形態の意義、染色体研究の最前線 2018、横浜、2018年3月
2. Junko Kanoh, Telomere length-dependent regulation of DNA replication timing at non-telomeric regions, 3rd Trilateral Workshop for Frontier Protein Studies 2017, 上海(中国), 2017年8月
3. Junko Kanoh, Subtelomeres constitute a safeguard for gene expression and chromosome homeostasis2017, 9th International fission yeast meeting, バンフ(カナダ), 2017年5月
4. Junko Kanoh, Subtelomeres constitute a safeguard for gene expression and



ヒストン H2AX の交換反応を介した損傷クロマチンのダイナミクス

平成 28 年度～平成 29 年度

井倉 毅(京都大学大学院生命科学研究附属放射線生物研究センター・准教授)

【研究目的】

ヒストン H2AX は、DNA 損傷に伴いリン酸化され、DNA 損傷応答シグナルの活性化に深く関与していることが知られている。我々は、H2AX が、リン酸化修飾に加え、TIP60 ヒストンアセチル化酵素によってアセチル化することを明らかにし、そのアセチル化が、DNA 損傷領域で、H2AX の交換反応の促進に関与することを見出している。しかしながら、アセチル化を介した H2AX 交換反応の分子メカニズムと DNA 損傷応答シグナル活性化における H2AX の交換反応の役割については、未だ不明な点が多い。我々は、これらの問題を解決するためにクロマチンから放出された H2AX を蛋白質複合体として精製し、マスマスペクトロメリー(MS) 解析により、クロマチンリモデリング因子、ヒストンシャペロンなどのクロマチン構造変換に関連する因子や DNA 損傷応答シグナル関連因子などを同定した。

本課題では、H2AX の交換反応における TIP60 とクロマチンリモデリング因子、ヒストンシャペロンとの関係を明らかにすることにより、H2AX 交換反応が、DNA 損傷部位での高次レベルでのクロマチンの opening に関与するか否かについて検証し、さらに DNA 損傷応答シグナルの活性化における H2AX 交換反応を介したクロマチン構造変換の役割を明らかにすることを目的とした。

【研究成果】

本課題の研究成果として、G1/S 期にのみ GFP-H2AX が、損傷領域に集積することを UV マイクロ照射法 (405nm) で確認し、この集積が、TIP60 による H2AX のアセチル化に依存していることを示した。さらにバイオレイヤー干渉法により TIP60 ヒストンアセチル化酵素による H2AX のアセチル化が、ADP-リボシル化酵素 PARP-1 を活性化させることにより、H2AX の交換反応に関わるクロマチンリモデリング因子とヒストンシャペロンとの連携を制御し、損傷領域のクロマチンを open に維持することを明らかにした。また細胞内で TIP60 による H2AX のアセチル化を阻害すると、S 期において相同組換え因子の DNA 損傷部位への誘導が阻害された。これらの結果から TIP60 による H2AX のアセチル化は、クロマチンリモデリング因子とヒストンシャペロンとの連携を促すことにより H2AX の交換反応を制御し、相同組換え修復を促進することが明らかになった(図 1 参照、投稿準備中)。

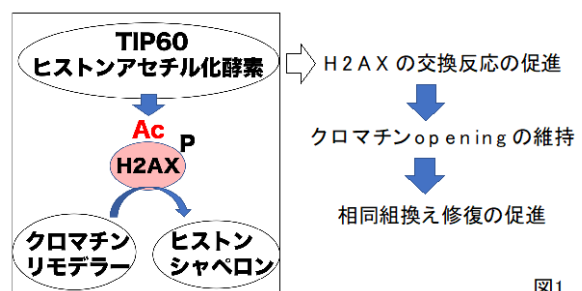


図 1

DNA 損傷後の TIP60 による H2AX のアセチル化は、クロマチンリモデラーからヒストンシャペロンへの H2AX の transfer を制御し、H2AX の交換反応を促す。

【本研究課題に関する主要成果】

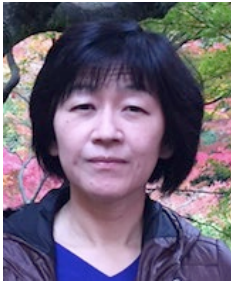
[雑誌論文]すべて査読あり

1. 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. 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 (2018).
2. Sun J, Shi L, Kinomura A, Fukuto A, Horikoshi Y, Oma Y, Harata M, Ikura M, Ikura T, Kanaar R, Tashiro S. Distinct roles of ATM and ATR in the regulation of ARP8 phosphorylation to prevent chromosome translocations. *eLIFE.* 7, e32222 (2018).
3. Fukuto A, Ikura M, Ikura T, Sun J, Horikoshi Y, Shima H, Igarashi K, Kusakabe M, Harata M, Horikoshi N, Kurumizaka H, Kiuchi Y, Tashiro S. SUMO modification system facilitates the exchange of histone variant H2A.Z-2 at DNA damage sites. *Nucleus.* 9, 87-94 (2018).
4. Wakida T, Ikura M, Kuriya K, Ito S, Shiroywa Y, Habu T, Kawamoto T, Okumura T, Ikura T, Furuya K. The CDK-PLK1 axis targets the DNA damage checkpoint sensor protein RAD9 to promote cell proliferation and tolerance to genotoxic stress. *eLIFE.* 6, e29953 (2017).
5. Kakumu E, Nakanishi S, Shiratori HM, Kato A, Kobayashi W, Machida S, Yasuda T, Adachi N, Saito N, Ikura T, Kurumizaka H, Kimura H, Yokoi M, Sakai W, Sugasawa K. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: regulation by acetylated states of histone H3. *Genes Cells.* 3, 310-327 (2017).
6. Aihara H, Nakagawa T, Mizusaki H, Yoneda M, Kato M, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Ikura T, Hayashi T, Kodama Y, Oki M, Nakayama T, Cheung E, Aburatani H, Takayama KI, Koseki H, Inoue S, Takeshima Y, Ito T. Histone H2A T120 Phosphorylation Promotes Oncogenic Transformation via Upregulation of Cyclin D1. *Mol Cell.* 64, 176-188 (2016).
7. Kaimori, J, Maehara, K, Hayashi-Takanaka, Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K., Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep.* 6, 24318 (2016).
8. Ikura, M, Furuya K, Fukuto A, Matsuda R, Adachi J, Matsuda T, Kakizuka A, Ikura T. Coordinated regulation of TIP60 and PARP-1 in damaged chromatin dynamics. *Mol Cell Biol.* 36, 1595-1607 (2016).

[学会発表]

1. 井倉毅、タンパク質複合体解析の現状と今後への挑戦、岡崎フラグメント 50 周年シンポジウム、名古屋、2016 年 12 月
2. 井倉毅、がん研究入門コース 1「がん研究におけるクロマチン生物学」 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月

他、計 23 件



セントロメアにおけるクロマチン構造制御の分子基盤

平成 28年度～平成 29 年度

有吉 眞理子 (大阪大学大学院生命機能研究科・特任助教)

【研究目的】

キネトコア形成領域であるセントロメアは、正常な染色体分配と細胞周期におけるクロマチン動態において極めて重要な役割を担っている。このセントロメア形成の核となるのは、セントロメア特異的なヒストン H3 バリエントである CENP-A である。特徴的な CENP-A ナクレオソーム構造を目印として、キネトコアタンパク質複合体が会合し、機能的なセントロメアが構築される。従って、セントロメアの構造と機能を安定に維持するために、CENP-A のセントロメア領域への取り込みは細胞周期と同調して厳密に制御されている。Mis18 タンパク質複合体は、CENP-A シャペロンである HJURP による CENP-A のセントロメア領域への取り込みを制御するライセンス因子として働く。本研究では、セントロメアにおける CENP-A ナクレオソーム形成・維持およびキネトコアタンパク質による CENP-A ナクレオソーム認識の分子機構を解明することを目的とし、Mis18 複合体およびキネトコアタンパク質の構造機能解析を行なった。

【研究成果】

1) Mis18 複合体の構造機能解析

Mis18 複合体は、Mis18 α 、Mis18 β および M18BP1 (Mis18 binding protein 1/KNL2)の3つのタンパク質から構成される。細胞周期と連動したリン酸化依存的な Mis18 複合体の会合と解離が CENP-A ナクレオソームの形成と維持に重要な役割を果たすことが示されていたが、その分子機構はまだ不明な点が残されていた。本研究では、Mis18 複

体に関して、以下の2つの研究項目を実施した。

1)-1 Mis18 複合体コアの分子会合機構

ヒト由来の Mis18 複合体の会合状態を調べるため、3者複合体の安定なコア領域を同定、大腸菌内共発現系をもちいて複合体として発現・精製した。本研究に先立ち、Mis18 α : Mis18 β 複合体の電子顕微鏡による単粒子解析の結果から、Mis18 α と Mis18 β のみでは、6量体から8量体の高次の会合状態を取ることがわかっていた。今回、分析ゲルろ過や分析超遠心などを用いた生化学的解析の結果から、4分子の Mis18 α と2分子の Mis18 β が安定な複合体を形成することを明らかにした。さらに、M18BP1の60残基からなるN末端領域の結合によって、Mis18 α : Mis18 β 複合体の会合状態が変化するという新規の知見を得た(図1)。これまでに6.5 Å 分解能の Mis18 複合体コアの結晶を得ている。

1)-2 M18BP1 タンパク質のセントロメア局在制御

DNA 複製、染色体分配後のセントロメア領域への CENP-A の取り込みには、Mis18 複合体のセントロメアへの結合が必須である。アミノ酸配列解析から、ヒトを除く脊椎動物では SANTA ドメインの C 末側にキネトコアタンパク質が有する CENP-A 結合モチーフと類似の配列が保存されていることがわかった。このペプチド領域と CENP-A ナクレオソームコアの相互作用解析を行った結果、M18BP1 がこの領域を介して、CENP-A ナクレオソームに特異的に結合することを明らかにした。ニワトリ DT40 細胞を用いた実験からも、M18BP1 の CENP-A 結合モチーフ様の配列が M18 複合体のセントロメア

A01 公募研究 (代表)

への局在、CENP-A の取込みに必要不可欠であることが示されており、M18BP1 の新たな機能(図1) を明らかにするものである。

本研究で得られたこれらの知見は、原子レベルでの Mis18 複合体の構造解析、および CENP-A シャペロン等の他のタンパク質因子との機能相関研究につながり、今後のセントロメアの維持機構の全体像の解明に貢献するものである。

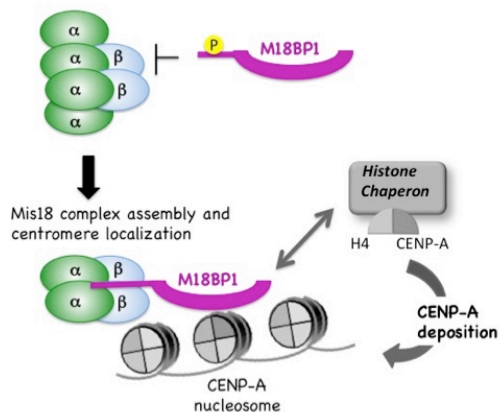


図1 Mis18 複合体の会合とセントロメア局在による CENP-A の取込みの制御モデル

2) キネトコアタンパク質 CENP-C による CENP-A の認識

キネトコアは、クロマチンと染色体分配の駆動力となる動原体微小管を連結するタンパク質複合体である。CENP-C は CENP-A ヌクレオソームを直接認識し、セントロメア上のキネトコア形成の核となるタンパク質である。CENP-C の CENP-A ヌクレオソームとの結合には、CENP-C モチーフと呼ばれる30アミノ酸からなる領域が必要であることが知られている。本研究では、CENP-C モチーフを含むニトリの CENP-C の C 末領域 (264 アミノ酸; 601-864) と CENP-A ヌクレオソームとの相互作用解析を行い、CENP-C モチーフだけでは安定な複合体形成に不十分であるという新規の知見を得た。相互作用解析の結果に基づき、CENP-C: CENP-A ヌクレオソーム複合体を *in vitro* で再構成、精製し、クライオ電顕による単粒子解析を行

った。その結果、CENP-C 中の新たな CENP-A ヌクレオソーム結合部位の存在を明らかにした。この結果は、これまでのキネトコア形成制御モデルの再考の必要性を示しており、キネトコア研究の新しい視点を提供するものである。

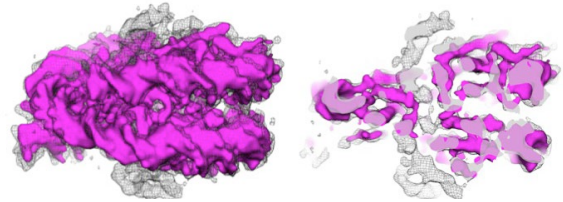


図2 CENP-C:CENP-A ヌクレオソーム複合体 (Gray mesh). CENP-A ヌクレオソーム単独の構造 (Magenta) を重ねて表示している。

【本研究課題に関する主要成果】

【雑誌論文】すべて査読あり

1. Hara M, Ariyoshi M, Okumura EI, Hori T, Fukagawa T. Publisher Correction: Multiple phosphorylations control recruitment of the KMN network onto kinetochores. *Nat Cell Biol.* 20, 1434 (2018).
 2. Hori T, Shang WH, Hara M, Ariyoshi M, Arimura Y, Fujita R, Kurumizaka H, Fukagawa T. Association of M18BP1/KNL2 with CENP-A Nucleosome Is Essential for Centromere Formation in Non-mammalian Vertebrates. *Dev Cell* 42,181-189 (2017).
- 他、計3件

【学会発表】

1. Mariko Ariyoshi, Structural biochemistry of methyl CpG binding domain containing protein, 第55回日本生物物理学会大会, 熊本, 2017年9月



ヌクレオソーム動構造とそのエピジェネティック制御の分子シミュレーション研究

平成 28 年度～平成 29 年度

高田 彰二 (京都大学・大学院理学研究科・教授)

【研究目的】

ヌクレオソームは、クロマチン構造を形作る構造ユニットであり、遺伝子発現制御から、ゲノム複製まであらゆる核内の過程に重要な寄与をしている。ヒストン 8 量体からなるカノニカルヌクレオソームについては、原子レベルの構造情報からその多量体構造まで数多くの構造情報が得られている。しかし、ヌクレオソームは静的な構造物ではなく、細胞状況に応じてその構造状態を変化させる、柔軟かく、多様な動構造を示す分子である。例えば、ヌクレオソームはリモデラー等の作用により スライディング し、ゲノム上で結合位置を変える。その機構は、数個のモデルは提案されているものの、未解明である。転写時には RNA ポリメラーゼの作用により ヒストン放出 してヌクレオソームは分解される。

また、ヌクレオソームがリンカー DNA で連結したポリ・ヌクレオソームは、極めて柔らかな動構造をもち、エピジェネティックな変化等によって、さまざまな高次折れたたみ構造状態を有する。ポリヌクレオソームはクロマチン繊維のモデルとして、生化学的、構造生物学的に盛んに研究されている。例えば、ヒストンアセチル化は、より開いたクロマチン構造を有することによって転写活性を上げると考えられる。ま

た、ヒストン H3 の K9 トリメチル化 H3K9me3 は、ヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) の作用によってよりコンパクトなクロマチン構造を形成しヘテロクロマチン化に導く。H3K27me3 は、ポリコム群により遺伝子サイレンシングに寄与する。これらの構造動態の詳細には未だに不明な点が多い。

【研究成果】

独自の粗視化分子シミュレーション技法によって、次の 4 つの研究課題に取り組み、成果を得た。

- (1) ヘテロクロマチン蛋白質 **HP1** によるメチル化ヒストン認識の動構造解析：**HP1** はヒストン **H3K9me3** を認識しヘテロクロマチン化に寄与する。ヌクレオソーム環境下での **HP1** の動構造は未解明である。本研究では、オープンな高次構造をとるジ・ヌクレオソーム環境下の 2 量体 **HP1 α** 及び γ の結合モードを解析し、**HP1 α** 二量体が、二つのヌクレオソームの H3 テールとそれぞれ結合するモードが支配的であることを見出した。このモードを好む理由は、**HP1 α** が有するリンカー領域の 3 つの塩基モチーフがリンカー DNA と親和性が高い点にあることが分かった。生化学実験 (共同研究) で、そのモチーフを消失されると **HP1 α** のジヌクレオソームへの結合は顕著に弱く

なった(Watanabe et al, *Biophys. J.* 2018)。

- (2) 熱揺らぎによるヌクレオソームスライディングの動的分子機構解析：粗視化分子シミュレーションを用いて、ヌクレオソームスライディング分子機構を調べた。周期2の単純塩基配列をもつ2本鎖DNAについては、2本鎖DNAの長軸周りの回転と共役したスクリュウ型スライディングが起こった。一方、601配列のようにヒストン8量体と親和性の高い塩基配列の場合は、回転共役型のスライディングとともに、回転を伴わない10塩基遷移も見られた(Niina et al *PLoS Comp. Biol.* 2017)。スクリュウ型スライディングは、ヒストン周りのDNA1巻き(約10塩基対)の過渡的な伸長(1巻き9塩基対、under twist defect)あるいは圧縮(1巻き11塩基対、over twist defect)を、間欠的に形成し、それを伝搬させることで実現されている(Brandani et al, *Nucleic. Acids, Res.* 2018)。
- (3) ATP依存リモデラーによるヌクレオソームスライディングの動的分子機構解析：多くのリモデラーは、ヌクレオソームのSHL2領域に結合し、ATP依存的にヌクレオソームをスライドさせている。この過程の分子シミュレーションに成功した。リモデラーは、ATPサイクルを通じたインチウーム運動と共役して、その結合位置回りで1塩基対のヌクレオソームスライドを引き起こす。これは上流(dyad方向)にover twist defect、下流にunder twist defectを生じ、それらが伝搬し、全体のスライディングを完結する。(Brandani & Takada, *PLoS Comp.*

Biol. 2018)。

- (4) パイオニア転写因子のヌクレオソームへの結合の動態解析：パイオニア転写因子Oct4は、ヌクレオソーム上の認識配列に結合する。シミュレーションで得られた結合様式は非常に多様であり、主にはOct4の2つのPOUドメインのどちらか一方でヌクレオソーム外側に向いたDNA配列を認識する。この結合によるヌクレオソームの状態変化は、顕著には起こらなかった。

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文]すべて査読あり

- Brandani G.B, Takada S. Chromatin remodelers couple inchworm motion with twist-defect formation to slide nucleosomal DNA. *PLoS Comp. Biol.* in press, (2018).
- Watanabe S.*, Mishima Y.*, Shimizu M, Suetake I, Takada S. Interactions of HP1 bound to H3K9me3 di-nucleosome by molecular simulations and biochemical assays. *Biophys J.* 114, 2336-2351 (2018). *) These authors contributed equally.
- Shimizu M, Takada S. Reconstruction of atomistic structures from coarse-grained models for protein-DNA complexes. *J. Chem. Theo. Comp.* 14, 1682-1694 (2018).
- Brandani G.B, Niina T, Tan C, Takada S. DNA sliding in nucleosomes via twist defect propagation revealed by molecular simulations. *Nucleic Acids Res.* 46, 2788-2801 (2018).
- Niina T*, Brandani* G.B, Tan C, Takada S. Sequence-dependent nucleosome sliding in rotation-coupled and uncoupled modes

A01 公募研究(代表)

- revealed by molecular simulations. *PLoS Comp Biol.* 13: e1005880 (2017). *) These authors contributed equally.
6. Kubo S, Li W, Takada S. Allosteric conformational change cascade in cytoplasmic dynein revealed by structure-based molecular simulations, *PLoS Comp Biol.* 13: e1005748 (2017).
 7. Saito M, Terakawa T, Takada S. How one-dimensional diffusion of transcription factors are affected by obstacles: coarse-grained molecular dynamics study. *Mol Simulation.* 43, 1315-1321 (2017).
 8. Shimizu M, Noguchi Y, Sakiyama Y, Kawakami H, Katayama T, Takada S. Near-atomic structural model for bacterial DNA replication initiation complex and its functional insights. *Proc Nat Acad Sci USA.* 113, E8021- E8030 (2016).
 9. Chang L, Takada S. Histone acetylation dependent energy landscapes in tri-nucleosome revealed by residue-resolved molecular simulations. *Sci Rep.* 6, 34441 (2016).
 10. Tan C, Terakawa T, Takada S. Dynamic Coupling among Protein Binding, Sliding, and DNA Bending Revealed by Molecular Dynamics. *J Am Chem Soc.* 138, 8512-8522 (2016).
 3. Shoji Takada, Coarse-grained molecular simulations for giant protein-DNA complexes, American Physical Society Meeting, ニューオーリンズ(アメリカ), 2017年1月
 4. Shoji Takada, Protein folding and misfolding studied by molecular simulations, International IPR Seminar “New Frontiers in Protein Misfolding and Aggregation”, 大阪, 2017年1月
 5. 高田彰二、分子シミュレーションによるDNA・クロマチン・ゲノム動構造研究、第7回数理論デザイン道場、東京、2016年12月
 6. Shoji Takada, Multiscale computational modeling for giant biomolecular complexes, 複雑・複合系の理論計算科学に関する日・仏・スペイン合同シンポジウム、京都、2016年10月
 7. Shoji Takada, Multiscale Modeling of Flexible Biomolecular Complex, 4th International Conference on Molecular Simulation (ICMS 2016), 上海(中国), 2016年10月

他、計11件

[学会発表]

1. Shoji Takada, Protein folding and misfolding studied by molecular simulations, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台, 2017年6月
2. 高田彰二、複雑生体分子系のマルチスケー



人工触媒システムを用いたヒストンアシル化の機能解析

平成 28 年度～平成 29 年度

川島 茂裕 (東京大学大学院薬学系研究科・特任講師)

【研究目的】

ヒストンは、クロマチンを構成する主要なタンパク質であり、DNA を折りたたんで核内に収納する役割を持つだけでなく、様々な翻訳後修飾をうけることにより、多様なヌクレオソーム構造とそれに伴う遺伝子転写等の動的制御を可能にしている。ヒストン翻訳後修飾の研究は反応を触媒する酵素の発見・解析とともに精力的に行なわれてきたが、近年の質量分析技術の発展により、ヒストンはこれまで想像していた以上に複雑な翻訳後修飾を受けていることが明らかになってきた。興味深いことに、塩基性タンパク質であるヒストンに数多く含まれるリジン残基には、これまで最も研究されてきたアセチル化だけではなく、ブチリル化やマロニル化等の様々な種類のアシル化修飾が同定され、ヒストンアシル化による精密な動的クロマチン制御が示唆された。しかしながら、これらヒストンアシル化修飾の機能についてはほとんど知見がない。我々はこれまでにヒストンのリジン残基選択的にアシル化修飾を導入する人工触媒システムの開発を行ってきた。本研究では、独自に開発した新規人工触媒システムを用いてヌクレオソームにリジン残基選択的にアシル化を導入することにより、機能未知のヒストンアシル化の動的クロマチン制御における機能を明らかにすることを目的とする。

【研究成果】

(1) ヒストンテールを選択的にアシル化する人工触媒システム SynCAc の開発

ヌクレオソームに巻きついているDNAが負の電荷性を帯びている性質を利用し、DNAに親和性

を持つ分子として正の電荷性を持つ触媒 8DMAP とアセチルドナー 3NMD8R を設計・合成した(図1 A)。これらを同時に用いる触媒システム SynCAc (SynCAc: Synthetic Chromatin Acetylation)は、ヌクレオソームに含まれるヒストンのヒストンテール領域の複数のリジン残基を広範囲にアセチル化した(図1B)。さらに、アセチルドナーを他のアシルドナーへと変えることにより、アセチル化だけではなく他の様々なアシル化をヒストンテールのリジン残基に導入できることを利用し、リジンマロニル化修飾のヌクレオソーム安定性及びヌクレオソーム間相互作用に与える影響を初めて明らかにした。

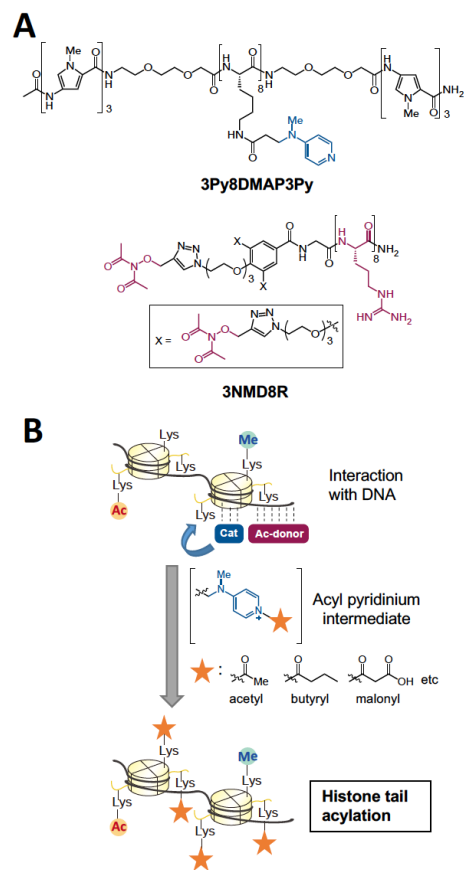


図1: SynCAc システム

(2) アシル CoA を活性化する新規人工触媒 DSH の開発

細胞内に存在するヒストンアセチル化酵素(HAT)はアシルCoAを活性化し、アシル基をヒストンなどの基質へと転移する。しかし、これまでにアシルCoAを活性化できる人工触媒は存在しなかった。そこで、アシルCoAを活性化できる新規触媒DSHを開発した(図2A)。DSHにヌクレオソーム結合リガンドLANAを連結させた人工触媒LANA-DSHは、ヒストンの特定のリジン残基選択的に多様なアシル化を導入できた(図2B)。さらに、この系を用いて、H2BK120のアセチル化及びマロニル化がヌクレオソーム間相互作用に与える影響を初めて明らかにした。

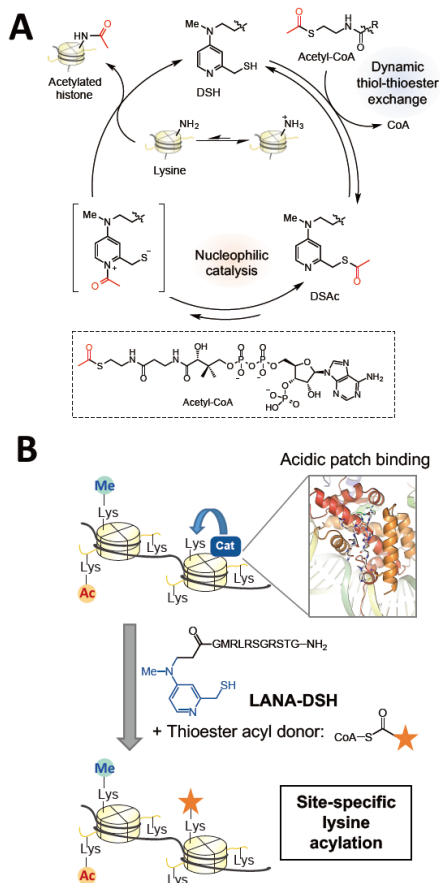


図2: DSH システム

(3) ヒトサーチュインのリジン残基およびアシル基選択性の網羅的解析

SynCAc システムを用いて調製したアシル化再構成ヌクレオソームに対し、ヒトのサーチュインを

作用させた後のヒストン修飾パターンについて、高速液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計を用いた解析により、各残基の脱アシル化率を網羅的に定量化する系を確立した。その結果、ヒト Sirt1-7 のリジン残基およびアシル基選択性についての網羅的知見を得ることに成功した。特にがん化との関連がよく知られている Sirt7 は、自身のカルボキシ末端に存在する塩基性アミノ酸に富んだ領域を介してヌクレオソームに直接結合し、これまで主な標的と考えられていたヒストン H3 の 18 番目のリジン残基よりも、36 番目のリジン残基を効率的に脱アセチル化及び脱ブチリル化することを見出した。

【本研究課題に関する主要成果】

【雑誌論文】すべて査読あり

- Amamoto Y, Aoi Y, Nagashima N, Suto H, Yoshidome D, Arimura Y, Osakabe A, Kato D, Kurumizaka H, Kawashima SA, Yamatsugu K, Kanai M. Synthetic Posttranslational Modifications: Chemical Catalyst-Driven Regioselective Histone Acylation of Native Chromatin. *J Am Chem Soc.* 139, 7568 (2017).
- Ishiguro T, Amamoto Y, Tanabe K, Liu J, Kajino H, Fujimura A, Aoi Y, Osakabe A, Horikoshi N, Kurumizaka H, Yamatsugu K, Kawashima SA, Kanai M. Synthetic chromatin acylation by artificial catalyst system. *Chem*, 2, 840 (2017).
- Tanabe K, Liu J, Kato D, Kurumizaka H, Yamatsugu K, Kanai M, Kawashima SA. LC-MS/MS-based quantitative study of the acyl group- and site-selectivity of human sirtuins to acylated nucleosomes. *Sci Rep.* 8, 2656 (2018).

〔学会発表〕

1. 川島茂裕、山次健三、触媒医療の実現に向けて：人工触媒システムによる ヒストンの合成的アシル化(1)、日本薬学会第137年会、仙台、2017年3月
2. Shigehiro Kawashima, Developing artificial catalyst systems for synthetic epigenetics, The 21st iCeMS International Symposium, 京都、2016年6月
3. Shigehiro Kawashima, Yoshifumi Amamoto, Tadashi Ishiguro, Kana Tanabe, Nozomu Nagashima, Yuki Aoi, Jiaan Liu, Hitoshi Kurumizaka, Kenzo Yamatsugu, Motomu Kanai, Developing artificial catalyst systems for synthetic histone acylation, Cold Spring harbor laboratory meeting: EPIGENETICS & CHROMATIN, ニューヨーク(アメリカ), 2018年9月
4. 川島茂裕、Developing fission yeast for chemical biology、2016 酵母ルネッサンス、東京、2016年11月
5. 川島茂裕、人工触媒システムを用いたクロマチン修飾、第16回日本蛋白質科学会、福岡、2016年6月



DNA修復とクロマチン制御の統合的理解によるがん治療への応用

平成 28 年度～平成 29 年度

細谷 紀子 (東京大学・大学院医学系研究科・講師)

【研究目的】

DNA 修復は、遺伝情報を安定に維持するために不可欠なシステムであり、その異常は、がんの発症につながるるとともに、がん治療への反応性にも変化をもたらす。近年、クロマチンの構造変換や細胞核内の微小環境の変化が DNA 損傷に対する生体応答の制御において重要な役割を果たしている可能性が示唆されているが、その分子メカニズムについては不明の点が多い。クロマチン制御と DNA 修復の関係を統合的に理解し、がんにおける DNA 修復の異常が引き起こされるメカニズムを明らかにすることは、細胞核内環境が疾患制御に果たす新たな役割を示すことにつながる事が期待される。

我々は近年、減数分裂期相同組換えに関連する分子群の中に、生殖細胞では高発現し、正常体細胞では極めて低レベルでしか発現しないものの、一部のがんにおいて発現の上昇が見られる分子があることに着目し、そのような分子の発現が体細胞に及ぼす生物学的影響について検討を進めてきた。SYCE2 は、減数分裂期相同組換えにおいて見られるシナプトネマ複合体を形成する分子の 1 つであり、正常体細胞では極めて低いレベルでしか発現しないものの、がん細胞では多様なレベルで発現が上昇している。我々の予備検討により、SYCE2 が体細胞で発現すると、ATM の活性化が亢進し、DNA 二本鎖切断修復が促進されることを見出してきた。

本研究では、SYCE2 発現により体細胞での

DNA 修復が亢進する背景として、SYCE2 分子が細胞核内構造を司る蛋白質との複合体形成を介して、細胞核内環境に何らかの影響を及ぼしている可能性を考え、SYCE2 発現によるクロマチン関連蛋白質の挙動への影響と DNA 修復亢進との関連性について調べることを目的とした。

【研究成果】

(1) SYCE2 は HP1 α をヘテロクロマチンから引き離す

SYCE2 の発現がクロマチン関連蛋白質の挙動に与える影響を調べるために、SYCE2 を発現するがん細胞において SYCE2 の発現を抑制したり、正常網膜上皮細胞 RPE に FLAG-SYCE2 を安定発現させたりして SYCE2 の発現量を変化させることにより、クロマチン関連蛋白質の局在の変化が見られるかどうかを調べてみた。その結果、SYCE2 の発現変化は、ヘテロクロマチンのマーカーである H3K9me3 の局在には影響を与えないものの、H3K9me3 と結合してヘテロクロマチン形成に寄与するとされる HP1 α の局在に対しては影響を与えることが分かった。すなわち、がん細胞で SYCE2 を発現抑制すると、HP1 α の細胞核内でのドメイン形成が増加し、正常細胞で SYCE2 を強制発現させると、HP1 α の細胞核内でのドメイン形成が阻害されることが明らかになった(図 1)。さらに、SYCE2 の発現により、HP1 α と H3K9me3 の結合が阻害されることも分かり、SYCE2 はヘテロクロマチンの局在には影響を与えずに、HP1 α をヘテロクロマチンから引き離すことが明らかとなった。

A01 公募研究(代表)

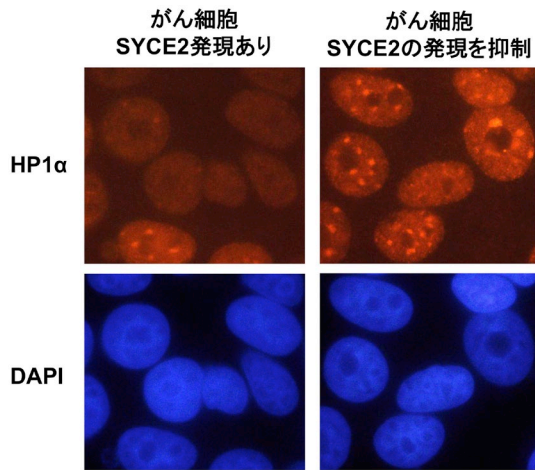


図1. SYCE2 発現による HP1 α ドメイン形成阻害

(2) SYCE2 は HP1 α と直接結合する

以上のことから、SYCE2 が HP1 α を直接の標的としていることが示唆されたために、SYCE2 と HP1 α の相互作用の有無について調べてみたところ、SYCE2 は HP1 α と直接結合することが分かった。その後、種々の SYCE2 と HP1 α の欠失変異体を作成し、結合部位を同定した。SYCE2 は、HP1 α の CSD (Chromo Shadow Domain) と結合することが分かった。既知の多くの HP1 α 結合分子は PxVxL モチーフを介して HP1 α の CSD と結合することが知られる。SYCE2 の N 末領域にも PxVxL 類似モチーフが存在するが、SYCE2 は、PxVxL 類似モチーフではなく、そのモチーフから少し離れた疎水性に富んだ 8 アミノ酸領域を介して HP1 α に結合することが分かった。

(3) SYCE2 が HP1 α と結合して HP1 α の核内局在を変化させることは SYCE2 発現細胞における ATM 依存性 DNA 損傷応答・修復の亢進に必須である

前述の疎水性に富んだ 8 アミノ酸領域を欠失した SYCE2 変異体、あるいは、その領域内の疎水性アミノ酸を疎水性ではない別のアミノ酸に置換した SYCE2 変異体を安定発現させた RPE 細胞を樹立したところ、いずれの細胞においても、SYCE2 全長を安定発現させた RPE 細胞でみられ

る ATM の活性化の亢進の表現型が見られなくなった。以上のことから、SYCE2 が疎水性アミノ酸領域を介して HP1 α と結合し、HP1 α をヘテロクロマチンから引き離すことが、SYCE2 発現がん細胞における ATM 依存性の DNA 損傷応答と修復の亢進に必須であることが示された。

このように、SYCE2 は細胞核内環境の制御を介してがん細胞の DNA 修復能を規定する重要な因子であり、SYCE2 を発現するがんにおける DNA 修復能力の特性に基づいた新しい治療の開発につながることを期待される(図 2)。

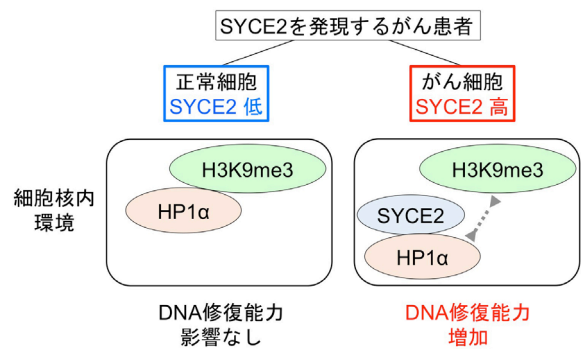


図2. SYCE2 を発現するがん細胞と正常細胞における細胞核内環境と DNA 修復能力の違い

【本研究課題に関する主要成果】

【雑誌論文】すべて査読あり

1. Hosoya N, Ono M, Miyagawa K. Somatic role of SYCE2: an insulator that dissociates HP1 α from H3K9me3 and potentiates DNA repair. *Life Sci Alliance*. 1, e201800021 (2018).
2. Kobayashi W, Hosoya N, Machida S, Miyagawa K, Kurumizaka H. SYCP3 regulates strand invasion activities of RAD51 and DMC1. *Genes Cells*. 22, 799-809 (2017).
3. Hosoya N: Radiation biology as a basis for multidisciplinary cancer therapy. *Ionizing Radiation*. 42, 39-42 (2017).

〔学会発表〕

1. 細谷紀子、宮川清、がん治療の標的となる DNA 修復を制御する核内微小環境～シナプトネマ複合体形成分子 SYCE2 の体細胞での解析から分かること～、第 20 回 菅原・大西記念 癌治療増感シンポジウム in 奈良、奈良、2018 年 2 月
 2. 細谷紀子、宮川清、がん精巣抗原 SYCE2 は DNA 修復能を規定する核内構造を形成する、第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月
 3. Hosoya N, Miyagawa K., The synaptonemal complex protein SYCE2 potentiates ATM-mediated DNA repair activity in cancer., The International Ataxia-Telangiectasia Workshops 2017, ミラノ(イタリア), 2017 年 3 月
 4. 細谷紀子、がんの集学的治療の基盤となる放射線生物学、第 28 回放射線夏の学校、白浜、2016 年 8 月
 5. 細谷紀子、遺伝子を守る仕組みと病気、新学術領域「動的クロマチン構造と機能」一般公開シンポジウム「遺伝子のすがた カラダの中でおこる不思議」、東京、2016 年 8 月
 6. 細谷紀子、放射線研究から医学のパラダイムシフトへ、日本放射線腫瘍学会第 29 回学術大会、京都、2016 年 11 月
 7. 細谷紀子、放射線生物学が拓く新しい健康科学、女性研究者による安全・安心のための放射線情報発信講演会、富山、2016 年 12 月
- 他、計 13 件



クロマチン構造変化の可視化によるニューロン分化遺伝子群制御機構の解明

平成 28 年度～平成 29 年度

岸 雄介 (東京大学大学院・薬学系研究科・講師)

【研究目的】

我々の脳における情報伝達に必須の役割を果たすニューロンの多くは発生期に神経幹細胞から産生されるが、その分化過程では神経突起やシナプスなど機能的な性質を獲得する。これらのニューロンに特徴的な形質を適切に発現するためには、神経幹細胞が分化する過程でニューロンの機能に関わる遺伝子が適切に発現することが重要である。本研究では、独自の視点から神経幹細胞におけるクロマチン構造を調べることで、ニューロン分化におけるニューロン関連遺伝子の発現制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【研究成果】

組織幹細胞の1つであるマウス大脳新皮質神経幹細胞は、出生前にはニューロンを産生することができる、すなわちニューロン分化能を持っているが(ニューロン分化期)、出生後にはニューロン分化能を失い、グリア細胞を産生ようになる(グリア分化期)。この時、ニューロン関連遺伝子は、転写は可能であるが抑制されている「一過的な」抑制状態から「永続的な」抑制状態へと移行します。興味深いことに、我々や他の研究グループのこれまでの研究から、この両方の抑制状態に転写抑制因子である PcG が重要であることがわかっていました。そこで我々は、ニューロン分化期とグリア分化期の神経幹細胞で PcG にどのような変化が起き

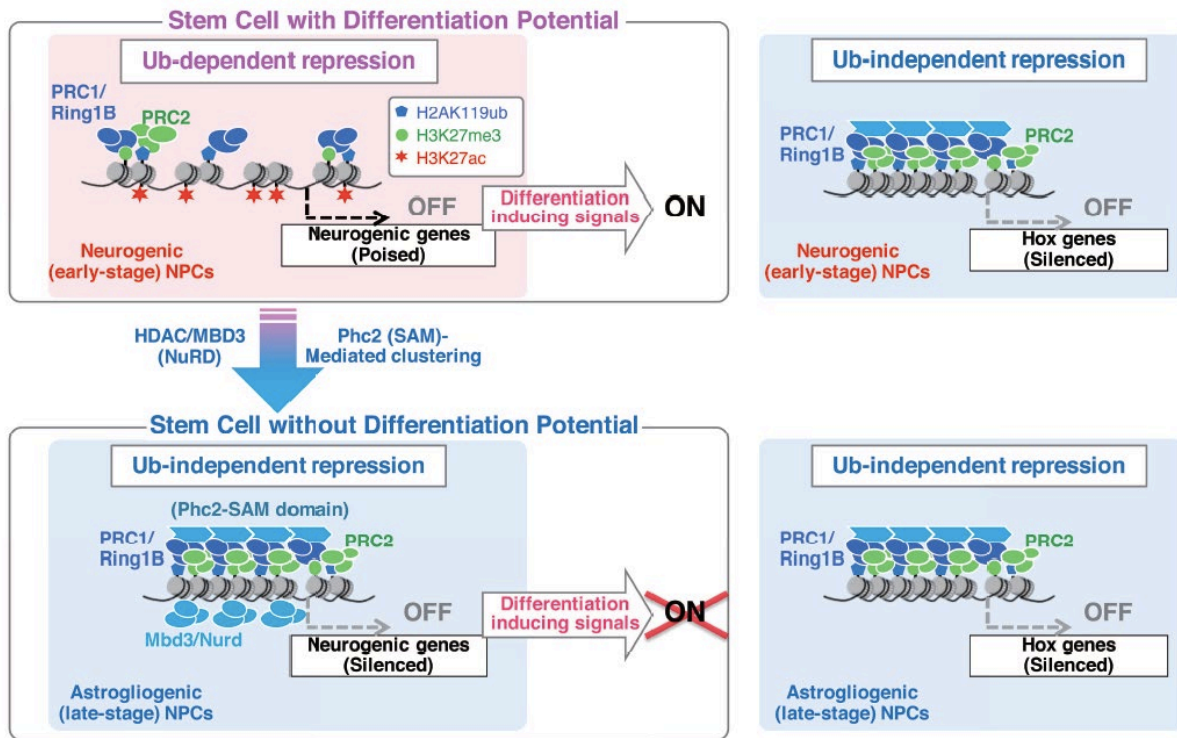
ているかに注目してこの課題に取り組んだ。

PcG の必須構成因子である Ring1 タンパク質は、E3 ユビキチンリガーゼとしてヒストン H2A にユビキチン化を施すことが知られている。我々は、Ring1 タンパク質のユビキチン化活性を完全に消失した Ring1B 変異体

(Ring1B I53A/D56K) を世界で初めて作製し、Ring1A, B を欠損した初代培養神経幹細胞を用いて Ring1 タンパク質のユビキチン化活性の必要性を検討した。

その結果興味深いことに、ニューロン分化期における「一過的な」抑制状態には Ring1 タンパク質のユビキチン化活性が必要であつ他にもかわらず、グリア分化期の「永続的な」抑制状態にはユビキチン化活性は不要であることが明らかとなった。さらに重要なことにこの「永続的な」抑制状態には Ring1 と複合体を作る Phc2 という因子による重合/凝集が必要であることが示唆された。

これらの結果から、神経幹細胞におけるニューロン関連遺伝子の「一過的な」抑制状態は Ring1 タンパク質のユビキチン化活性が必要であるが、「永続的な」抑制状態にはユビキチン化は必要なく染色体の凝集が関与する、ということが示唆された。これは、神経幹細胞における2つの異なる分化遺伝子抑制状態がどのように制御されているかを明らかにした世界で初めての研究である。



ではユビキチン化活性依存的な抑制状態から非依存的な抑制状態へはどのようにして移行するのだろうか？我々はこの点について、Mbd3 タンパク質を含む NuRD 複合体がヒストンの脱アセチル化を行い、ユビキチン化活性の依存性が変化することを示唆する結果を得た。つまりヒストンの脱アセチル化こそが、発生の時間経過とともに神経幹細胞の分化能を喪失させるトリガーであると言える。

上述の通り、神経幹細胞にかかわらず、幹細胞における分化細胞で機能する遺伝子の「一過的な」抑制状態と「永続的な」抑制状態の使い分けは、幹細胞が産生することができる細胞系譜の決定に必須の役割を担う。本研究成果は、幹細胞ではどのようにその特殊な能力が維持されているのか、という幹細胞研究の本質に迫るものであると考えている。PcG はニューロン関連遺伝子だけでなく、ほとんどの分化関連遺伝子を抑制することが知られている。したがって本研究で明らかになった「分化能あり・な

し」の PcG によるスイッチは他の幹細胞にも共通している可能性がある。

【本研究課題に関する主要成果】

〔雑誌論文〕すべて査読あり

1. Tsuboi M, Kishi Y,#* Kyojuka W, Koseki H, Hirabayashi Y, Gotoh Y* (#Co-first author, *Correspondence) Ubiquitination-independent repression of PRC1 targets during neuronal fate restriction in the developing mouse neocortex. *Developmental Cell*, in press (2018)
 2. Kishi Y,* Gotoh Y (*Correspondence) Regulation of chromatin structure during neural development. *Frontiers in Neuroscience*, Review, in press (2018).
- 他、計 3 件

〔学会発表〕

1. 岸雄介、神経発生を in vivo で理解するための技術開発 - 非造血系組織の生体内における発生理解に向けて、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017 年 12 月
- 他、計 5 件



選択的遺伝子領域の動的ヘテロクロマチン化誘導機構

平成 28 年度～平成 29 年度

落合 恭子 (東北大学・医学系研究科・助教)

【研究目的】

遺伝子発現制御には、転写制御複合体に含まれる様々な因子が関与し、なかでも転写因子は特異的な DNA 配列を認識・結合することで、特定の遺伝子領域に転写制御複合体をリクルートする。近年、遺伝子発現とクロマチン構造の関連性が明らかとなり、とりわけヘテロクロマチン構造は遺伝子抑制に関与する。本研究では、転写因子が結合する特異的遺伝子領域がヘテロクロマチン構造に含まれていく動的な制御機構の解明を目的とした。解析には、成熟 B 細胞を *in vitro* で分化誘導する形質細胞分化モデルを用いる。形質細胞は抗体産生に特化した細胞で、核内には車軸状核と呼ばれる特異的なヘテロクロマチン構造を保有する。B 細胞が形質細胞へ分化する過程では、多くの遺伝子発現が劇的に変化して不要遺伝子は抑制されるが、この遺伝子抑制機構にヘテロクロマチン化が関与すると想定した。

【研究成果】

(1) 高頻度な *in vitro* 形質細胞分化誘導系の確立
遺伝子動的変化の追跡には、効率的な細胞分化誘導系が有用である。しかし、脾臓成熟 B 細胞を用いた LPS や IL-4/CD40 リガンドによる従来の *in vitro* 形質細胞分化誘導系では、およそ 15～20% 程度の細胞分化しか誘導できない。この問題を解決するため、B 細胞受容体トランスジェニックマウス(大阪大・黒崎教授および Rockfeller University Prof. Nussenzweig より分与)より分離した脾臓成熟 B 細胞を用い、およそ 40～50% 程度の細胞分化誘導系を確立した。

(2) 転写因子 Ikaros の形質細胞分化制御における機能発見と新規 DNA モチーフの同定

形質細胞分化には転写因子 IRF4 が必須であり、現在までに3種の結合 DNA モチーフとその機能を報告した(Ochiai K. *Immunity* 2013)。これらの転写活性化モチーフに加え、IRF4 による転写抑制機能が示唆されたため、マイクロアレイによる野生型と *Irf4* 欠損 B 細胞での遺伝子発現比較および IRF4 ChIP-seq の統合解析から、遺伝子抑制に関与しうる新たな DNA モチーフを抽出した。同 DNA モチーフは、Zinc-finger 型転写因子と IRF の Composite element で ZICE と名づけた(図1)。そして、IRF4 複合体解析によって ZICE への結合パートナー転写因子 Ikaros を同定した。ZICE の抑制標的遺伝子には B 細胞維持に重要な転写因子 *Ebfl*

などが含まれており、Ikaros-IRF4 による遺伝子抑制が分化促進に重要であることを明らかにした。

(3) 転写因子 Ikaros によるヘテロクロマチン化制御機構の解明

上記 ZICE 機能には Ikaros が必須であるため、Ikaros がヘテロクロマチン化機構に重要だと想定した。IRF4 複合体には Ikaros に加え、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1、リンカーヒストン H1、核膜

ZICE
(Zinc-finger-IRF composite element)



Ikaros-IRF4 ヘテロダイマーが結合して
遺伝子発現を抑制する

(図1)
新規同定 DNA モチーフ ZICE

タンパク質、HP1 およびヒストン H1 と相互作用する HP1 結合因子が含まれていた。この HP1 結合因子の B 細胞での機能詳細は不明だったため、B 細胞特異的遺伝子ノックアウトマウス (cKO) を作成し解析した。

①cKO における B 細胞分化異常

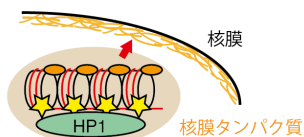
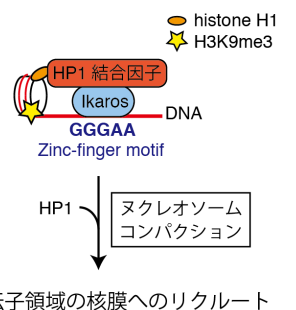
野生型と比較して cKO では成熟 B 細胞数が約 1/4 程度に減少し、形質細胞への分化頻度も顕著に減少していた。

②cKO での Ikaros 抑制標的遺伝子脱制御

cKO 成熟 B 細胞では Ikaros 発現が顕著に減少し、cKO 成熟 B 細胞で発現異常を示す遺伝子の大部分が Ikaros 結合標的遺伝子とその下流で制御される遺伝子であった。このうち Ikaros 抑制標的遺伝子は、cKO 成熟 B 細胞で Ikaros 結合遺伝子領域のヘテロクロマチンマーカー H3K9me3 シグナルの減少、ヒストン H1 結合の減少、核膜タンパク質結合の減少が認められた。

これらの解析から、「Ikaros の遺伝子領域結合」→「HP1 結合因子-ヒストン H1-HP1 によるヌクレオソームコンパクション」→「同遺伝子領域の核膜直下へのリクルート」という、選択的遺伝子領域のヘテロクロマチン化制御機構の存在が示唆された (図 2) (近日投稿予定)。

転写因子 Ikaros による標的遺伝子の選択



(図2)

Ikaros-HP1 結合因子による選択的遺伝子領域のヘテロクロマチン化制御機構

【本研究課題に関する主要成果】

[雑誌論文] すべて査読あり

1. Tamahara T, Ochiai K, Muto A, Kato Y, Sax N, Matsumoto M, Koseki T, Igarashi K. The mTOR-Bach2 Cascade Controls Cell Cycle and Class Switch Recombination during B Cell Differentiation. *Mol Cell Biol.* 37, e00418-17 (2017)
2. Ochiai K, Kondo H, Okamura Y, Shima H, Kurokochi Y, Kimura K, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Yui K, Kinoshita K, Igarashi K. Zinc finger-IRF composite elements bound by Ikaros/IRF4 complexes function as gene repression in plasma cell. *Blood Adv.* 2, 883-894 (2018).

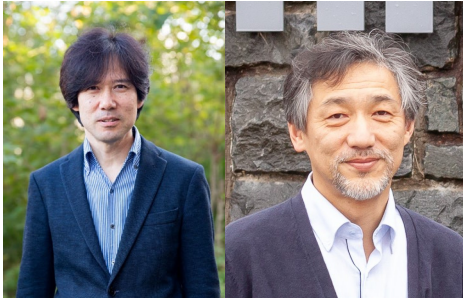
他、計 5 件

[学会発表]

1. Kyoko Ochiai, Gene regulatory networks of B-to-plasma cell differentiation orchestrated by IRF4 and its partner transcription factors, 日本免疫学会, 仙台, 2017 年 12 月
2. Kyoko Ochiai, Gene regulatory networks composed by transcription factors orchestrate plasma cell differentiation, The 2017 Japan-NIH joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease, 仙台, 2017 年 2 月

Ⅱ. 各研究課題の成果

国際支援班



クロマチン動構造の国際共同研究ネットワーク

平成 27 年度～平成 29 年度

胡桃坂 仁志 (早稲田大学・理工学術院・教授)

木村 宏 (東京工業大学・科学技術創成研究院・教授)

【研究目的】

真核生物のゲノム DNA は、クロマチンを形成することで核内に収納されている。それゆえ、細胞核内で転写・複製・修復・組換えなどの、ゲノム DNA の制御が行われるためには、クロマチンの構造がダイナミックに変化することが必須である。本領域のでは、この生命の根幹であるクロマチンの機能発現機構を、構造生物学、シミュレーション、生細胞・超解像イメージング、オミクス解析、細胞・発生生物学、遺伝学など多彩な手法を結集して明らかにすることを目的としている。近年、クロマチンの破綻がさまざまな疾病の原因となることが明らかにされつつあり、それゆえクロマチン研究は世界的にも精力的に進められている。そのような国際的な背景から、本領域に参画する研究者らが国際共同研究を推進し、連携を図ることは我が国における当該分野のさらなる発展に重要である。そこで(1)領域関係者の海外でのセミナーへの派遣、(2)海外若手研究者への技術指導、(3)海外からの研究者の招聘、(4)領域内若手研究者の海外派遣に重点をおき、クロマチン研究を国際的に牽引することを目的として国際活動支援班を運営した。

【研究成果】

(1) 領域関係者の海外派遣と共同研究

以下 3 件の国際学会を海外にて共催、24 名の領域関係者を派遣し、世界的クロマチン研究の動向に関する情報収集と国際連携の強化を図った。

1. “Colorado Chromatin Meeting” (アメリカ、H28)
2. “Swiss-Japan Symposium” Chromatin Structure and Dynamics” (スイス、H28)
3. “HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Meeting” (ドイツ、ミュンヘン、H29)

この他にも、のべ 11 名の領域関係者を海外に派遣した。

(2) 国際的な技術指導

本領域関係者の開発した FabLEM 法、Mintbody 法、LiveCLEM 法などのライブセルイメージング法や 1 分子超解像イメージング法、ヌクレオソーム試験管内再構成法は、海外からも注目されている。これらの技術指導のため、次の通り本領域の研究室にて実技講習会を開催した。

・Turkewitz 教授、Sparvoli 氏:シカゴ大学→原口研究室

・Ruppert 氏:エジンバラ大学→木村研究室

・Shim 氏:シカゴ大学→胡桃坂研究室

これらの共同研究から以下の 4 報の論文を報告した(Kaur et al, Mol Biol Cell, 2017; Sparvoli et al, Curr Biol, 2018; Ruppert et al, EMBO J, 2018; Parry et al, Nat Commun, 2018)。

(3) 領域内の若手研究者の海外派遣

若手研究者への支援として、海外での実験活動 4 件、国際学会、共同研究打ち合わせへの参加、計 24 件を行った。

(4) 海外からの共同研究者の招聘

海外研究者の日本での研究発表の機会を設けるため、2nd Swiss-Japan Symposium “Chromatin

Structure and Dynamics”を開催するなど、のべ 9 名の海外研究者の日本への来訪やセミナー開催を支援した。

以上のように、本研究領域において構築された国際共同研究の多くは現在も継続中であり、今後のさらなる研究成果の創出や、我が国における当該分野の発展が期待できる。

【本研究課題に関する主要成果】

〔雑誌論文〕すべて査読あり

1. Sparvoli D, Richardson E, Osakada H, Lan X, Iwamoto M, Bowman GR, Kontur C, Bourland WA, Lynn DH, Pritchard JK, Haraguchi T, Dacks JB, Turkewitz AP. (2018) Remodeling the Specificity of an Endosomal CORVET Tether Underlies Formation of Regulated Secretory Vesicles in the Ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Curr Biol*. 28, 697-710.
2. Ruppert JG, Samejima K, Platani M, Molina O, Kimura H, Jeyaprakash AA, Ohta S, Earnshaw WC. (2018) HP1 α targets the chromosomal passenger complex for activation at heterochromatin before mitotic entry. *EMBO J*. 37, e97677.
3. Parry AJ, Hoare M, Bihary D, Hänsel-Hertsch R, Smith S, Tomimatsu K, Mannion E, Smith A, D'Santos P, Russell IA, Balasubramanian S, Kimura H, Samarajiwa SA, Narita M. (2018) NOTCH-mediated non-cell autonomous regulation of chromatin structure during senescence. *Nat Commun*. 9, 1840.
4. Kaur H, Sparvoli D, Osakada H, Iwamoto M, Haraguchi T, Turkewitz AP. (2017) An endosomal syntaxin and the AP-3 complex are required for formation and maturation of

Y00 国際活動支援班(代表、分担)
candidate lysosome-related secretory organelles (mucocysts) in *Tetrahymena thermophila*. *Mol Biol Cell*. 28, 1551-1564.

〔学会発表〕

1. Kurumizaka H., Nucleosome Remodeling and Structure, INDO-JAPAN Conference (2018): Epigenetics, Human Microbiomes and Disease, Bose Institute, コルカタ(インド), 2018年2月
2. Kurumizaka H., Structural Biology of Epigenetic Chromatin Regulation, 15th Chinese Biophysics Congress, 上海(中国), 2017年11月
3. Kurumizaka H., Structural biology of chromatin: Towards the understanding of epigenetics, Structural biology of chromatin: Towards the understanding of epigenetics, ベセスダ(アメリカ), 2017年11月
4. Kurumizaka H., Structural studies of reconstituted chromatin units, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017年9月
5. Kimura H., Chromatin modification and transcription dynamics in living cells, Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics Seminar, ドレスデン(ドイツ), 2017年9月
6. Kurumizaka H., Structural studies of the nucleosome-nucleosome interaction, EMBO CONFERENCE: The Nucleosome: From Atoms to Genomes, ハイデルベルグ(ドイツ), 2017年8月
7. Hirano Y, Kinugasa Y, Asakawa H, Chikashige Y, Obuse C, Haraguchi T, Hiraoka Y., Lem2 is implicated in lipid metabolism in

- fisson yeast, The Pleiotropic Nuclear Envelope, エディンバラ(イギリス), 2017 年 8 月
8. Kimura H., Chromatin modification dynamics during cell differentiation, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 9. Kurumizaka H., Structural studies of reconstituted chromatin units, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 10. Ohkawa Y., ChILT - an Immunoprecipitation-free Epigenome Profiling Technology, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 11. Obuse C., Elucidation of heterochromatin function through HP1 binding proteins, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 12. Sado T., Defects in dosage compensation impact global gene regulation in the mouse trophoblast., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 13. Yamagata K., Targeted DNA methylation in pericentromeres with genome editing-based artificial DNA methyltransferase. HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 14. Miyamoto K., Roles of nuclear actin in nuclear reprogramming and mouse embryonic development. HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, , ミュンヘン(ドイツ), Y00 国際活動支援班(代表、分担) 2017 年 7 月
 15. Kono H., Role of tails in intra-nucleosome and inter-nucleosomes, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 16. Harata M., Roles of histone- and actin-families in the organization of chromatin and the cell nucleus., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 17. Saitoh N., Non-coding RNAs involved in active chromatin domain in breast cancer., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 18. Arimura Y., Chromatin remodeler or histone chaperone independent histone exchange activity of histone variant H2A.B., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 19. Chigi Y., The 5' region of Xist RNA has the potential to associate with chromatin through the A-repeat, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 20. Fujita R., Nucleosome destabilization and histone exchange mediated by noncoding RNA. HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
 21. Harada A., Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月

22. Hoida K., Quantification of methylated DNA dynamics during duplication and differentiation in single ES cell., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
23. Kobayashi W., Effect of histone variants and histone modifications on the overlapping dinucleosome., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
24. Koyama M., Biochemical and biophysical analyses of *S. pombe* nucleosome. HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
25. Kujirai T., The nucleosome structures of *Marchantia polymorpha*., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
26. Morita K., Methylation of arginine 2 in histone H3.3 is important for minor zygotic genome activation in mouse pronuclear embryos., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
27. Nakajima T., The defects in X-inactivation caused by partially dysfunctional Xist allele., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
28. Sato Y., Transcription activation is regulated by histone acetylation during maternal-to-zygotic transition in zebrafish., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
29. Suzuki Y., Understanding of nuclear assembly in mouse preimplantation embryo by reconstitution approach., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
30. Tachiwana H., Analysis of histone dynamics using permeabilized cells and in vitro reconstituted histone complexes., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
31. Takahashi D., Histone variant H2A.Z and the cell cycle: its quantitative regulation and roles in chromosome segregation., HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
32. Tokoro M., The possibility of infertility caused by centromere dysfunction in autoimmune disease patients, HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, ミュンヘン(ドイツ), 2017 年 7 月
33. Kurumizaka H., Structural studies for epigenetic regulation of chromatin, Structural studies for epigenetic regulation of chromatin, マサチューセッツ(アメリカ), 2017 年 5 月
34. Kurumizaka H., Chromatin contribution in DNA repair, The 6th US-Japan DNA Repair Meeting, Berkeley, 2017 年 5 月
35. Kimura H., Chromatin modification dynamics during gene activation in living cells, 10th Berlin Summer Meeting, ベルリン(ドイツ), 2017 年 5 月
36. Sato Y., Zygotic genome activation is dynamically mediated by histone acetylation, EMBO workshop "Awakening of the genome: The maternal to zygotic transition", ドレスデン(ドイツ), 2017 年 4 月
37. Kimura H., Chromatin modification dynamics

- during gene activation in living cells, 4D Nucleome: The Cell Nucleus in Space and Time, クラクフ(ポーランド), 2017 年 5 月
38. Hiraoka Y., Chromatin-anchoring nuclear membrane proteins in fission yeast, Chromatin Structure and Dynamics, Japan-Swiss Symposium, バーゼル(スイス), 2017 年 1 月
 39. Sugasawa K., Interaction of DNA damage recognition factors with the chromatin structure, Chromatin Structure and Dynamics, Japan-Swiss Symposium, バーゼル(スイス), 2017 年 1 月
 40. Harata M., Actin-histone cross talk in chromatin and nuclear organization, Chromatin Structure and Dynamics, Japan-Swiss Symposium, バーゼル(スイス), 2017 年 1 月
 41. Yamasaki S., Roles of nuclear actin in transcription and DNA repair, Chromatin Structure and Dynamics, Japan-Swiss Symposium, バーゼル(スイス), 2017 年 1 月
 42. Kurumizaka H., Structural studies for functional chromatin, Chromatin Structure and Dynamics, Japan-Swiss Symposium, バーゼル(スイス), 2017 年 1 月
 43. Arimura Y., A cancer-associated histone H2B mutation, Chromatin Structure and Dynamics, Japan-Swiss Symposium, バーゼル(スイス), 2017 年 1 月
 44. Koyama M., Biochemical and biophysical analyses of the *S. pombe* nucleosome, Chromatin Structure and Dynamics, Japan-Swiss Symposium, バーゼル(スイス), 2017 年 1 月
 45. Hiraoka Y., A framework of meiotic chromosomes for homologous pairing, 2016 Workshop on the Molecular and Physical Biology of Chromosomes, マサチューセッツ(アメリカ), 2016 年 9 月
 46. Ohkawa Y., The selective incorporation of histone H3 variants tunes the basal level of transcription, Colorado Chromatin Meeting, コロラド(アメリカ), 2016 年 8 月
 47. Kono H., Role of histone H3 and H2A tails in nucleosome stability, Colorado Chromatin Meeting, コロラド(アメリカ), 2016 年 8 月
 48. Harata M., H2A.Z and actin family proteins in functional chromatin organization, Colorado Chromatin Meeting, コロラド(アメリカ), 2016 年 8 月
 49. Kimura H., Histone modification Dynamics in living cells, Colorado Chromatin Meeting, コロラド(アメリカ), 2016 年 8 月
 50. Kurumizaka H., Structural versatility of nucleosomes and chromatin dynamics, Colorado Chromatin Meeting, コロラド(アメリカ), 2016 年 8 月
 51. Horikoshi N, Sato K, Arimura Y, Taguchi H, Oku H, Kusakabe M, Harata M, Kimura H, Kurumizaka H., Structure and function of nucleosomes containing H2A.Z, 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference, Chromatin, Epigenetics & Transcription, 蘇州(中国), 2016 年 5 月
 52. Li Zhenhai, Kono H., Distinct roles of histone H3 and H2A tails in nucleosome stability, Gordon Research Conference, Chromatin Structure & Function, レ・ディアブルレ(スイス), 2016 年 5 月
 53. Maehara K, Harada A, Ohkawa Y., Novel Histone H3 Variant, H3mm7, Regulates

Skeletal Muscle Differentiation, Keystone
Symposia, Chromatin and Epigenetics, ブリテ
ィッシュコロンビア(カナダ), 2016 年 3 月

〔国際学会開催〕

1. 2nd, Japan-Swiss Symposium, Chromatin
Structure and Dynamics Switzerland, 東京に
て開催、2017 年 8 月
2. HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin
Symposium, ミュンヘンにて開催、2017 年 7
月
3. Japan-Swiss Symposium, Chromatin
Structure and Dynamics Switzerland, スイス
にて開催、2017 年 1 月
4. Colorado Chromatin Meeting, アメリカにて開
催、2016 年 8 月

III. 付録

クロマチン動構造

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp>

News Letter

No.

1

2013
19th Aug

1. 領域発足にあたって・胡桃坂仁志領域代表
2. 第一回班会議・総括班会議レポート
3. 新学術領域「遺伝情報場」平岡泰領域代表からのエール
4. アウトリーチ活動・講習会・シンポジウム報告
5. 成果紹介
6. 今後の予定
7. 研究組織【計画研究】

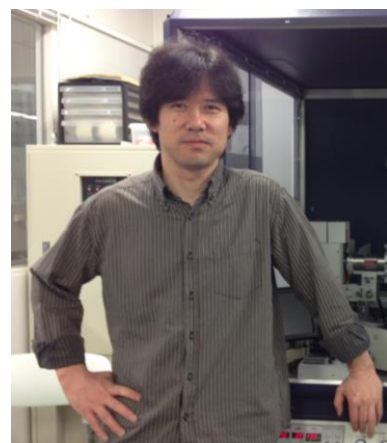
1. 領域発足にあたって・胡桃坂仁志領域代表

新学術領域研究「動的クロマチン構造と機能（2013-2017）」が、「核ダイナミクス（代表：米田悦啓、2004-2008）」「遺伝情報場（代表：平岡泰、2008-2012）」の後継プロジェクトとして発足いたしました。領域略称は「クロマチン動構造」です。

クロマチンは、DNA にとって阻害的であるはずですが、生物はいとも簡単にクロマチンでのDNAの機能発現を成し遂げています。この“不思議”を解明したい！という共通の目的のもと、本領域が立ち上がりました。

かつて（20年くらい前まで）は、クロマチンは、ゲノム DNA を細胞核内に収納するためにのみ働く静的なものという考えが支配的でした。つまり、無いと困るが、無くてもストーリーは変わらない、背景みたいなものでしょうか。しかし1990年代中頃から、クロマチン構造自体が、同一ゲノム配列から多種多様な細胞を生み出すための“遺伝子発現制御マシン”として機能していることが明らかになり、急に主役に抜擢されました。

何十年にもおよぶ永い下積み生活のため、脇役癖が抜けにくいクロマチンは、なかなか自己主張してくれません。とてもシャイで、その姿すらなかなか見せてくれません。クロマチン動構造班では、こんな気難しいクロマチンと付き合い、うちとけて、そしてこっそり秘密を打ち明けてくれるような親密な関係になることを目指します。



2. 第一回班会議・総括班会議レポート

2013年8月1日（木）、大阪大学コンベンションセンターにおいて、本新学術領域の第1回班会議が行われた。木村宏班員と研究室員が開催準備を担当し、班員、若手研究者、学生など、48名の参加があった。

班会議に先立って、総括班会議が行われた。総括班会議では、研究計画や内部評価などを含めて本領域の活



動の全般について話し合いがもたれた。そのなかでも特に、①若手研究者育成、②アウトリーチ活動、に関して、多くの時間が割かれた。①については、クロマチン動構造若手の会の立ち上げを支援すること、若手シンポジウムを12月7日に早稲田大学で開催すること、若手研究者の共同研究推進のために旅費のサポートを行うことなどが決められた。②については、ニュースレターの発行、領域ホームページの作成、研究成果のデータベース化、高校などの教育機関への出張講義の実施、などが決められた。

引き続き、計画班員による研究成果・計画の報告が行われ、また報告に対する活発な討論が会場使用の時間制限間際まで続けられた。各班員のこれまでの研究アクティビティを基に、領域内の共同研究や技術・情報供与などを最大限に活用することによって、動的クロマチン構造解明を目指す意識を強く感じることができた。報告終了後、出席した総括班研究協力者から、研究報告から領域内での意識共有や有機的な共同研究進展が見て取れたとの評価や、研究の方向性に関する提案など、貴重なコメントをいただいた。

全日程の終了後、夕食をかねて懇親会が行われ、若手参加者を交えた歓談・討論が時間いっぱいまで続いた。(領域事務担当・原田昌彦)

◆総括班研究協力者の木村暁先生(遺伝研)、柴田武彦先生(理研)、平岡泰先生(阪大)、森川耿右先生(高等研)からのコメント(抜粋)

“研究を進める上では、先を見る目、時代に安易に流されない目を持つことが大切である。”

“この分野の研究は、いくつかの特定領域・新学術領域として引き継がれてきた伝統があり、今後もこの「継承」を期待している。”

“クロマチンのダイナミクスを核として、クロマチンの高分解能分子構造を基礎に細胞分化まで理解しようという意欲的な領域と理解した。”

“わが国では生物学者に分子構造の意義が十分に理解されているとは言えず、生物学と分子構造との間の距離がまだかなりある。この溝を埋めて、生命現象を原理と法則で理解することが当たり前になる時代をつくることも、本新学術領域の意義と考える。”

“ヒストンバリエーションの構造と機能についての研究の進展が印象的であった。早い時点で研究がまとまるのでは、と期待している。”

“多くの発表者が、自身の研究の新学術領域での位置づけを強く意識していることが感じられた。領域内での実質を伴う共同研究が盛んになり、その相乗効果で結果を出すことを期待する。”

“各研究者が有する研究手法の紹介にも重点がおかれた発表となっており、領域内の活発な共同研究が促されるような工夫が見られた。”

“会議には各研究グループの若手研究者が多く参加していた。若手研究者の参加は本領域が次世代の領域を担う研究者の育成に力をこめていることをうかがわせる。”

3. 新学術領域「遺伝情報場」平岡泰領域代表からのエール

「遺伝情報場」から「クロマチン動構造」へ

遺伝情報の収納・発現・継承は生命活動の根幹であり、染色体はその根幹を担う。あまりに根幹であるがゆえに、空気のような当たり前の重要さを忘れる者も居るほどである。染色体に関わる領域研究は、この国の伝統として連綿と続いてきた。先人が守ってきたこの流れを絶やすことなく、遺伝情報場の「DNA」をクロマチン動構造に継承できたことを、この上なく嬉しく思う。われわれが培った理念が受け継がれ、さらに発展していくことを期待している。



4. アウトリーチ活動・講習会・シンポジウム報告

2013年8月5-10日に、原口徳子班員のオーガナイズによる「第21回 細胞生物学ワークショップ 蛍光顕微鏡トレーニングコース1 -初級から中級-」が開催されました。木村宏班員と徳永万喜洋班員も講師として参加したほか、本領域班員の研究室からも数名の若手研究者が受講生として参加しました。

私は、これまで共焦点レーザー顕微鏡の基礎を学ぶ機会がない一方で、生細胞イメージングなど他の解析を今後取り入れたいと考えておりました。そこで今回、第 21 回細胞生物学ワークショップに参加させていただきました。このワークショップの大きなテーマは、「生きた細胞内の生体分子のダイナミクスを解析するのに必要な、蛍光顕微鏡の基礎と方法論」を正しく理解し実践できるようになることでした。

初日から、顕微鏡の結像特性について学ぶことで、カバーガラスの厚さなど、今まで顕微鏡を使用しているときに気にしていなかったことに自分の無知さを感じ、顕微鏡の原理を正しく理解することの大切さを身に染みて感じました。今後の顕微鏡解析に対する向き合い方が大きく変わり、非常に有意義な 6 日間でした。最後になりましたが、貴重なお時間を割いて講義をしてくださった原口先生、木村先生はじめ、私たちの講義を支えてくださった方々に深くお礼を申し上げます。今後も領域研究において、先生方にご教示賜りたいと存じます。(九州大学・大川研・原田哲仁)

5. 成果紹介

米田悦啓班員・安原徳子班員らの論文が *Developmental Cell* 誌に掲載されました。

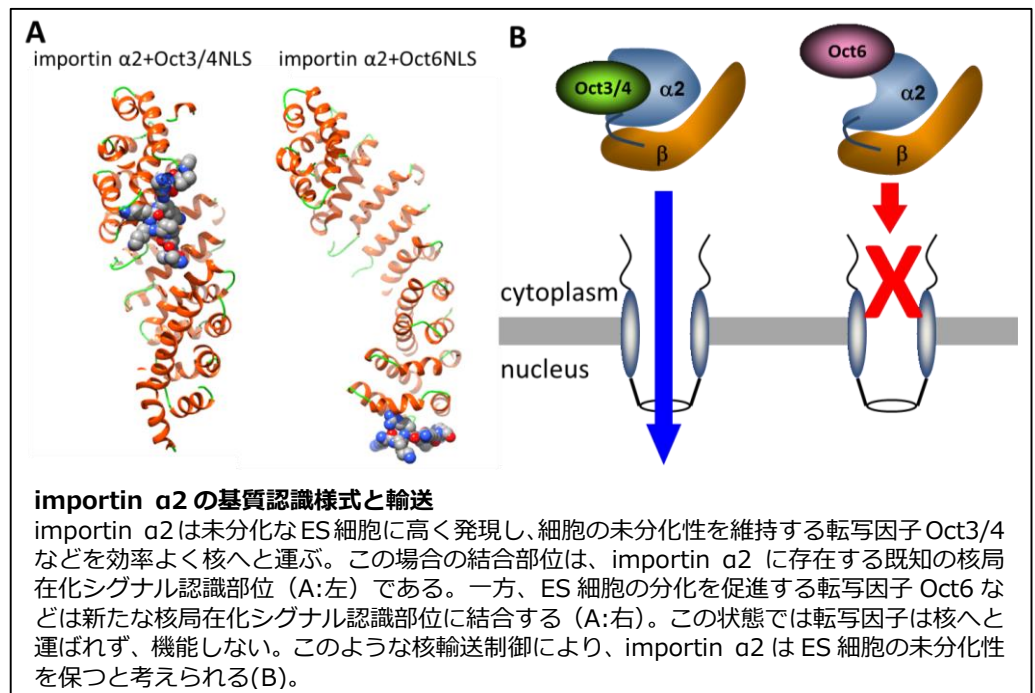
Importin alpha subtypes determine differential transcription factor localization in embryonic stem cells maintenance.

*Yasuhara N, Yamagishi R, Arai Y, Mehmood R, Kimoto C, Fujita T, Touma K, Kaneko A, Kamikawa Y, Moriyama T, Yanagida T, *Kaneko H, Yoneda Y.

Dev Cell, 2013 July 29;26(2):123-135.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580713003857>

真核細胞の核は核膜により覆われ、大きな分子の核内外への移行は自由ではない。機能性分子の多くは、エネルギーと輸送受容体を必要とする選択的な輸送により核内外へ運ばれる。輸送因子 importin α は転写因子をはじめ、核で機能する重要なタンパク質の核輸送に関わる。これまでに、importin $\alpha 2$ が、未分化な ES 細胞で高く発現すること、さらに初期化に必要な Oct3/4 タンパク質などの核局在化シグナル (NLS) に結合し、その



核内への輸送に働くことが知られていた。本研究では、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた解析と計算構造生物学の手法を使い、動物細胞核へのタンパク質輸送を担う輸送受容体 importin $\alpha 2$ が哺乳類の ES 細胞における未分化性を維持する機構の一端を明らかにした。importin $\alpha 2$ には、既知のものとは異なる新たな核局在化シグナル認識部位があり、この部位では分化を促進する Oct6 などの転写因子と結合しその輸送を選択的に阻害する。つまり、importin $\alpha 2$ は複数の基質認識部位を持ち、未分化性を維持する転写因子の輸送を促進するだけでなく、阻害活性により細胞分化を誘導する転写因子の核内輸送を阻害することにより細胞の分化を抑制するという、2つの制御を行うことで未分化性が維持されることを明らかにした。

6. 今後の予定

一般公開シンポジウム「DNAをあやつる生物のしくみ」

日時：2013年8月25日（日）13:00~17:25

会場：千里ライフサイエンスセンター サイエンスホール

主催：新学術領域「遺伝情報場」、新学術領域「クロマチン動構造」

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/outreach.html>

7. 研究組織【計画研究】

「再構成ヌクレオソームを用いた動的クロマチン構造の解明」

研究代表者：胡桃坂 仁志（早稲田大学 理工学術院・教授）

研究分担者：堀 哲也（情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所・助教）

「シミュレーション計算による動的クロマチンのダイナミクス解析」

研究代表者：河野 秀俊（日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門・研究主幹）

「ヘテロクロマチンの構造と機能の理解」

研究代表者：小布施 力史（北海道大学大学院 先端生命科学研究院・教授）

「計測と再構築による生細胞内クロマチンダイナミクスの高次元的理解」

研究代表者：木村 宏（大阪大学大学院 生命機能研究科・准教授）

研究分担者：山縣 一夫（大阪大学 微生物病研究所・特任准教授）

「クロマチン機能を保証する核膜の構造と分子基盤」

研究代表者：原口 徳子（独立行政法人 情報通信研究機構 未来 ICT 研究所・上席研究員）

研究分担者：浅川 東彦（大阪大学大学院 生命機能研究科・助教）

「1分子 *in vivo* イメージング超解像ナノ解析によるクロマチン動作原理解明」

研究代表者：徳永 万喜洋（東京工業大学 生命理工学研究科・教授）

「核膜孔複合体構成因子・核輸送因子によるクロマチン動態制御の解明」

研究代表者：米田 悦啓（独立行政法人 医薬基盤研究所・理事長）

研究分担者：岡 正啓（大阪大学大学院 生命機能研究科・助教）

研究分担者：安原 徳子（大阪大学大学院 生命機能研究科・特任助教）

「核内構造体とのインタープレイによるクロマチン動構造の制御」

研究代表者：斉藤 典子（熊本大学 発生医学研究所・准教授）

研究分担者：原田 昌彦（東北大学大学院 農学研究科・准教授）

「細胞分化にともなうクロマチン変動メカニズムの解明」

研究代表者：大川 恭行（九州大学 医学研究院・准教授）

編集後記：暑い日が続きますが、皆様いかがお過ごしでしょうか。「クロマチン動構造」発足に向けて準備を始めてからほぼ1年が経ちます。申請書の作製、ヒアリングの準備など胡桃坂領域代表を中心に計画班員全員で大変な苦勞をしてきましたが、本当に大変なのは実はこれからです。限られた予算の中で、領域の目標に向けて成果を上げることが求められています。幸いなことに、領域のチームワークは良く、新たな融合研究が生まれる機運は高まっています。領域の進捗をHPと連動したニュースレターを通じて発信していきますので、よろしくお願ひします。 HiKi

※公募要領が公開されました。
http://www.mext.go.jp/component/a_menu/science/detail/_icsFiles/afieldfile/2013/09/02/1339083_05.pdf

1. 研究紹介：【早稲田大・胡桃坂】、【日本原子力研究開発機構・河野】
2. アウトリーチ活動：一般公開シンポジウム「DNA をあやつる生物のしくみ」、顕微鏡講習会「ケンビロー先生がやってくる!!」
3. ミーティング報告：23th Wilhelm Bernhard Workshop on the cell nucleus
4. 成果紹介
5. 今後の予定

1. 研究紹介

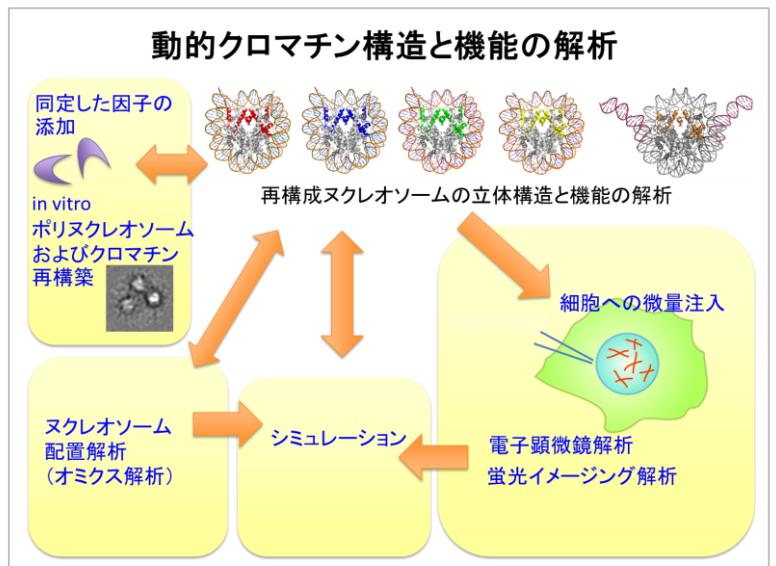
【計画研究ア 再構成ヌクレオソームを用いた動的クロマチン構造の解明】

研究代表者：胡桃坂 仁志（早稲田大学理工学術院・教授・構造生物学）

研究分担者：堀 哲也（国立遺伝学研究所・助教・染色体工学）

ヌクレオソームは、クロマチンの基盤構造である。本研究では、in vitro でのクロマチン再構成系を用いた、生化学的および構造生物学的な解析を通して、クロマチンの高次構造および動的変動メカニズムの解析を行う。並行して、遺伝学的、細胞生物学的、オミクス解析、計算科学的解析などを行い、種々のクロマチンの機能解析を行う。これらの解析を通して、真核生物の動的クロマチン構造と機能の解明に挑む。

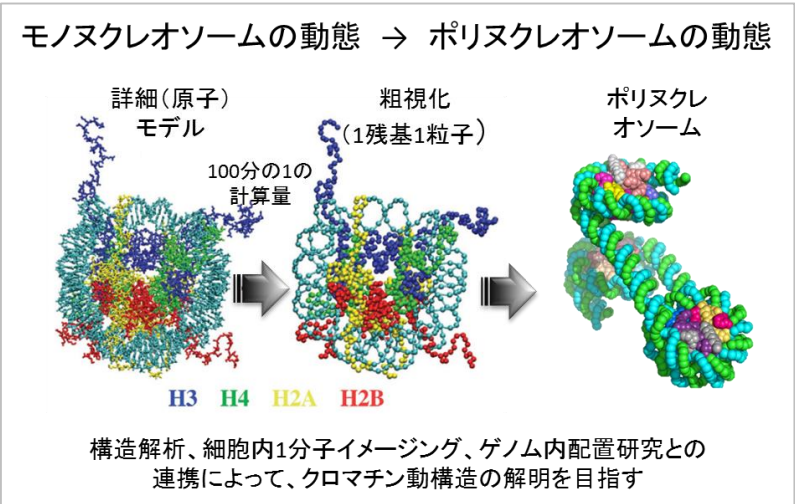
ヒストン H2A、H2B、H3、H4 は、ヌクレオソームのタンパク質成分である。ヌクレオソームでは、それぞれのヒストンが 2 分子ずつ会合して形成されたヒストン 8 量体に、約 150 塩基対の DNA が 1.65 回転巻き付いて円盤状の構造体を形成している。このヌクレオソームの構造とその動的性質が、高次クロマチン構造と機能の基盤となる。ヌクレオソームを構成するヒストンには、種々のバリエーションが存在する。さらにヒストンは、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などの様々な翻訳後修飾を受けている。また、クロマチンは、リンカーヒストンとヌクレオソームが凝集した状態で、動的に構造を変えながら機能発現をしている。このような、ヒストンの違いやヒストン修飾が与えるクロマチン構造と性質への影響を、さまざまなヒストンバリエーションやヒストン修飾を含むヌクレオソームの解析から検討する。また、高次クロマチン形成に重要であるリンカーヒストンを含むヌクレオソーム（クロマトソーム）の構造解析も行う。これらの研究を通して、高次クロマチンの形成とその機能発現機構を原子レベルで理解することを目指す。



【計画研究イ シミュレーション計算による動的クロマチンのダイナミクス解析】

研究代表者：河野 秀俊（日本原子力研究開発機構・研究主幹・生物物理学）

ヌクレオソームを構成するヒストンには、これまでに知られている以上のバリエーションが存在していることがわかってきた。また、ヒストンの化学修飾は、エピジェネティクスのマーカーとして働いていることも明らかにされつつある。ヒストンバリエーションや化学修飾を受けたヒストンで構成されるヌクレオソームの結晶構造は、基本的にはカノニカルヌクレオソームによく似た構造をしている。従って、静的な構造のみからはクロマチンのダイナミックな形態変化の仕組みを理解することは難しい。本研究では、本領域で



決定される構造や既知構造にもとづき、クロマチンダイナミクスの物理的な実体であるヌクレオソームやポリヌクレオソームについて原子レベルや粗視化したシミュレーションを行い、個々のヌクレオソームのダイナミクスやそれがクロマチンの構造多様性に及ぼすインパクトを調べる。このようなシミュレーション計算を通して、ヒストンバリエーションや化学修飾とクロマチンダイナミクスとの関係を詳細に調べる。一方、領域内連携により、細胞内でのヌクレオソーム動態、ゲノム内での配置など個々のヌクレオソームやポリヌクレオソームの特性との関連を明らかにすることによって、クロマチン動構造の解明を目指す。

2. アウトリーチ活動

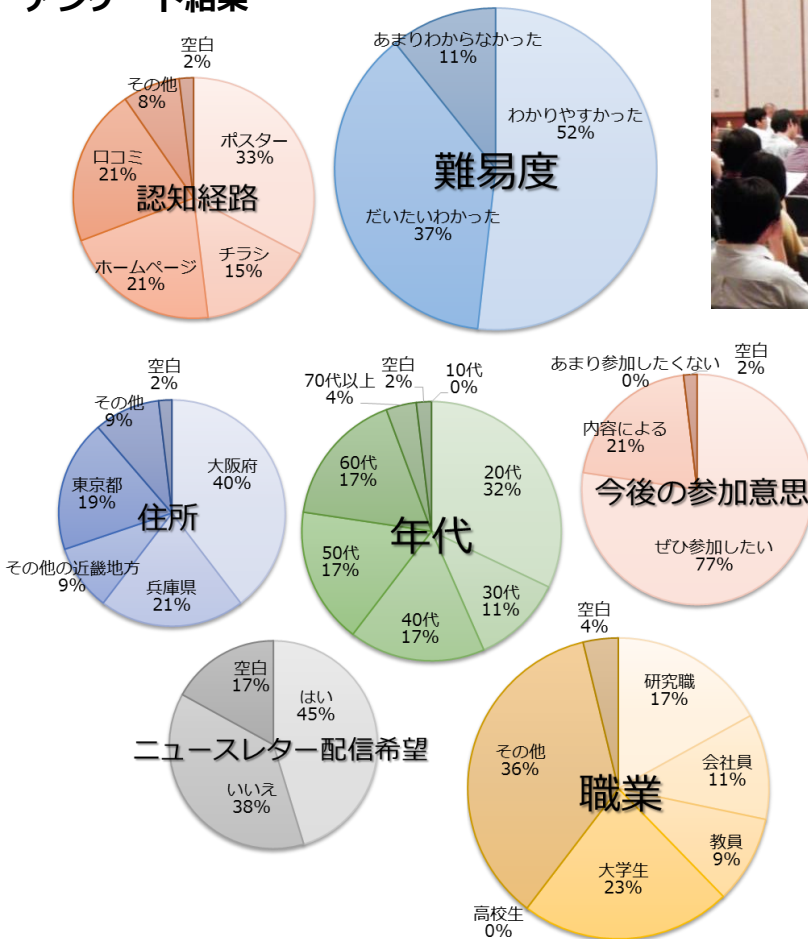
■ 一般公開シンポジウム「DNA をあやつる生物のしくみ」

8月25日、千里ライフサイエンスセンターにおいて、山縣一夫班員、平岡泰「遺伝情報場」領域代表らの企画により開催されました。当日は近畿地方各地で局地的な大雨を記録し、道路の冠水や各路線のダイヤが乱れるなか、およそ120人の市民が参加されました。



“一般公開シンポジウム DNA をあやつる生物のしくみ”では新学術領域「遺伝情報場」、「クロマチン動構造」のメンバー9名が様々な手法・生物を用いたそれぞれの研究テーマについて講演を行いました。第一線の研究者たちによる聴きごたえ充分なものであったのと同時に、公開シンポジウムとして一般の方々にも非常に分かりやすく工夫を凝らし、普段見慣れないスライドや例え話を用いながらの講演が続きました。アンケートの結果からも、その評判の良さが伺えます。通常の学会やミーティングの発表では、ここまで分野外の人々を意識した解説が聞ける機会は滅多にありませんが、私自身にとっても普段見過ごしがちな“分かっているようで、実は理解不十分だったこと”が思いのほか多いということを思い知らされ、大変勉強になりました。また、自分の研究をより広く社会に発信し、そして理解してもらうことがいかに大切かを再認識させられる場でした。講演終了後は別室で懇親会があり、平岡領域代表・胡桃坂領域代表による、まるでネタ合わせしていたかのような挨拶（掛け合い？）で場が大きく盛り上がり、最後は今後の領域のますますの発展を祈って幕を閉じました。（大阪大学・岡正啓）

アンケート結果



▼感想の抜粋：

- ・「場」という考え方は斬新だ（60代医師）
- ・研究をこれだけわかりやすく話すのは素晴らしい（40代）
- ・一般と専門家のつながりを太くすることは国としても有益（20代）
- ・最先端科学に興味があり、勉強できることが嬉しい（60代デザイナー）
- ・最新情報を知ることができ、有意義（40代主婦）
- ・おもしろかった（60代年金受給者）
- ・刺激があって楽しい（60代引退）
- ・もう少しやさしい内容に（20代大学生）

■顕微鏡講習会「ケンピロー先生がやってくる!!」

8月25日、子どもたちに本物の顕微鏡を使って観察することで科学の一端にふれる体験をしてもらうべく、山縣班員が顕微鏡の専門家ケンピロー先生に扮して3台の実体顕微鏡とともに、生駒市桜ヶ丘1学童保育所を訪ねました。まずは顕微鏡でニワトリ、ウズラ、サケ、マウスの卵を見せて、哺乳動物であるわれわれヒトにもタマゴがあることを知ってもらいました。子どもたちはみんな驚いた様子で画面を見つめていました。その後は校庭に出て、各自顕微鏡でみたいものをもって来ました。草花や鉱物、虫など、多彩なサンプルが集まりました。実体顕微鏡で立体的に観察する経験が初めての子どもたちは、夢中でのぞきこんでいました。この中から未来の科学者が誕生するかもしれませんね。（大阪大学・山縣研・堀真由子）



子どもたちは初めて見る本物の実体顕微鏡にくぎ付けでした。（ケンピロー先生）

▼子どもの感想：人間に、自分にも「たまご」があることにビックリした（4年生女子）、だんごむしが大きく見えてすごいと思った（1年男子）、高い顕微鏡に緊張した（複数）、トンボの羽がきれいだった（3年男子）、アップにした虫の顔がこわかった（2年男子）



▼学童指導員の感想：普段の保育ではできない経験を子どもたちにさせてあげることができました。撮りためた写真を見直すと子どもたちの表情はどれもいきいきとしており、子どもたちにとってよい企画であったと感じています。これが契機となり子どもたちの可能性が広がればよいと感じています。小学校の夏休みの作品展を見ましたが、ケンピロー先生でのスケッチを出している子もいたようです。（桜ヶ丘1学童指導員・宮坂裕美、大澤宏志）

3. ミーティング報告



2013年8月19日から23日まで、ハンガリーのデブレツェンで“23th Wilhelm Bernhard Workshop on the cell nucleus”が開催されました。本領域からは木村宏班員、小布施力史班員、原田昌彦班員が口頭発表者として参加し、このうち木村班員はプレナリートークを行いました。また、本領域若手の会からも我々2名が参加し、ヒストンバリエント（口頭発表 日下部）と核内アクチン（ポスター発表 山崎）に関する研究成果を発表しました。

学会のプログラムは基礎研究から応用研究まで設けられており、細胞核に関する最新の知見や、新たなクロマチン構造解析技術、さらに細胞核機能を標的とした創薬に関する研究まで幅広い講演がありました。その中でも印象に残った発表として、骨格タンパクに関する分野で、McNally 博士が変異ラミンへの結合タンパク質をプロテオミクス解析したところ、転写制御タンパク質やヒストンバリエントなどの多くのタンパク質が同定された報告が挙げられます。ラミノパシーの原因であるラミン変異部位の特定は多数報告されており、現在は組織表現型への影響メカニズム解明が課題となっていました。変異ラミンとヒストンバリエントの結合の可能性は、ラミノパシーとクロマチン構造変化との関連の解明に繋がる興味深い報告でした。今回の講演では核内骨格タンパク質に関する発表はあまり多くなかったですが、今後はこのようなエピジェネティクス機構における骨格タンパク質の機能の解明がさらに進展していくことを期待しております。また我々がインスピレーションを受けたのはクロマチン構造の分野で、Groth 博士のグループによるエピゲノム維持機構に関する発表です。その講演では各エピゲノム修飾が DNA 複製後のどの段階で維持されるかを Nascent / Mature Chromatin を単離することで解析していました。クロマチン機能ドメインはそれぞれのエピゲノム修飾がクロストークすることで形成されますが、その形成順序の解明モデルとして経時的アプローチを用いることは非常に斬新でした。我々はヒストンバリエントがクロマチン機能ドメイン形成にどのように関与するかを明らかにしようとしており、今後の分子機能の解明モデルとして彼らの実験方法を応用し、その成果をこの国際学会で再び発表できるよう頑張ろうと考えております。



今回は私たちにとって国際学会への初参加でしたが、口頭発表、ポスター発表ともに、幸いにも多くの研究者の方々に興味を持っていただき、さらに研究に対する貴重なご助言や新しい共同研究の機会を得ることができ、非常に充実した5日間を過ごすことが出来ました。（東北大・原田研・日下部将之、山崎祥他）

4. 成果紹介

① 木村宏班員らの論文が Scientific Reports 誌に掲載されました。本研究は領域内共同研究の成果です。

Genetically encoded system to track histone modification *in vivo*.

Sato Y, Mukai M, Ueda J, Muraki M, Stasevich TJ, Horikoshi N, Kujirai T, Kita H, Kimura T, Hira S, Okada Y, Hayashi-Takanaka Y, Obuse C, Kurumizaka H, Kawahara A, Yamagata K, Nozaki N, *Kimura H.

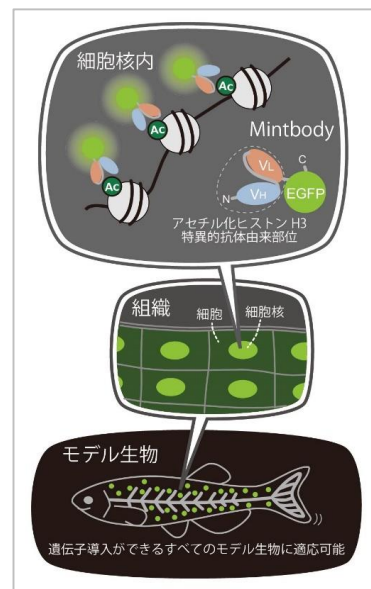
Sci Rep. 2013 Aug 14;3:2436

<http://www.nature.com/srep/2013/130814/srep02436/full/srep02436.html>

ヒストン翻訳後修飾は、細胞世代を通して安定に伝達されると同時に、細胞の分化や刺激により動的に変化する。この性質からヒストン修飾は細胞分化過程の基盤として重要な役割を果たすと考えられている。しか

し生体内で継時的にヒストン修飾を観察する手段がないため、任意の細胞における修飾状態の変化と細胞機能の表現型との関連性は、未だ不明な点が多い。我々は、ヒストン修飾特異的抗体由来の一本鎖可変領域をEGFPと融合させた、'Modification specific intracellular antibody; Mintbody'を細胞内に発現させ、生体内のヒストン H3 Lys9 アセチル化 (H3K9ac) 動態を検出することに成功した。

H3K9ac-mintbody をヒト培養細胞に発現させると、核内でユークロマチン領域に局在し、また、脱アセチル化酵素阻害剤添加後のアセチル化レベルの上昇を FRAP および核/細胞質シグナル比によって観察することができた。さらに H3K9ac-mintbody を発現するゼブラフィッシュとショウジョウバエを作製し、生体内ヒストン修飾動態を観察した。ショウジョウバエ胚発生初期においては、母性/胚性転移 (MZT) に伴う核アセチル化レベルの上昇を観察することができた。Mintbody 発現ショウジョウバエおよびゼブラフィッシュが正常に発生したことから、観察可能なレベルの Mintbody の発現は、少なくとも発生・分化には影響を及ぼさないことがわかった。本研究により開発したヒストン修飾特異的 Mintbody は、遺伝子導入が可能なるすべてのモデル生物に応用することができるため、発生・分化に伴うヒストン修飾動態の解明やエピゲノムを標的とした創薬開発等への幅広い貢献が期待できる。



② 胡桃坂仁志領域代表らの論文が、FEBS Open Bio 誌に掲載されました。

Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes.

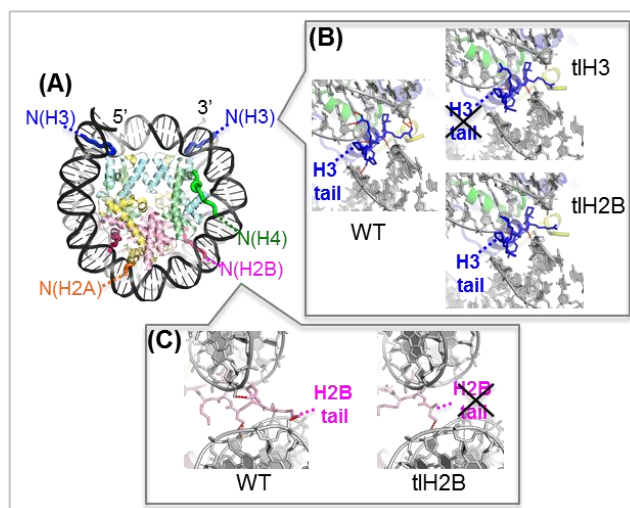
Iwasaki W, Miya Y, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tachiwana H, Shibata T, Kagawa W, *Kurumizaka H.

FEBS Open Bio 2013;3:363-369

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221154631300048X>

クロマチンの基本単位であるヌクレオソームコア粒子は、コアヒストン H2A、H2B、H3、H4 各 2 分子からなるヒストン 8 量体の周囲に DNA が巻き付いた構造体である。4 種のコアヒストンはいずれも、ヒストンフォールドと呼ばれる共通の構造を持つ中央部と、二次構造を持たない N、C 末端のテールからなる。柔軟性に富み、塩基性残基を多く含む N 末端テール領域は、ヌクレオソームコアから突出してヌクレオソーム DNA や隣接したヌクレオソーム上の酸性パッチと相互作用する (図(A))。それにより、テール領域がヌクレオソームの構造の安定化および高次クロマチン構造の形成に寄与していることが以前から知られていた。また、テール領域は、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受けてクロマチンの構造を変換させ、転写・複製・組換え・修復などを制御する重要な役割を担う。本研究は、ヌクレオソームの構造安定性に対する各ヒストンのテール領域の役割を、原子レベルで明らかにすることを目的とした。

4 種のコアヒストンのうち、1 種の N 末端テールを欠失させた tailless ヌクレオソームを各々作製し (tH2A, tH2B, tH3, tH4)、結晶構造解析を行った。tH2A, tH4 ヌクレオソームについては野生型と比べて大きな変化は見られなかった。一方、tH3 ヌクレオソームにおいては、H3 N 末端テール領域の欠失により、残存している H3 N 末端領域の運動性が增大し、DNA の entry/exit 領域との相互作用が不安定化されることが分かった (図(B))。また、tH2B ヌクレオソームにおいては、広範囲に渡ってヒストン-DNA 間の相互作用に変化が見られた。H2B N 末端領域は、野生型ヌクレオソームにおいては、ヒス



トン8量体に巻き付いた1周目と2周目のDNAの間から外へ向かって突出している。H2B N末端テールを欠失させると、残存しているH2B N末端部と1、2周目のDNAの相互作用が共に不安定化されることが明らかになった(図(C))。さらに、立体構造上で遠方に位置するDNAのentry/exit領域-H3 N末端領域の相互作用も、H2Bテール欠失によって不安定化されることが明らかになった(図(B))。以上の結晶構造解析の結果は、熱安定性実験の結果とも一致した。熱安定性は、疎水性部位に特異的に結合する蛍光色素を用いて、温度上昇と共に進行する疎水性部位の露出(すなわち会合体の崩壊、構成成分の変性)を観測することにより測定した。野生型ヌクレオソームでは、温度の上昇に伴う蛍光強度増大曲線に2相の変化が見られ、最初の変化はH2A/H2B 2量体の離脱、2番目の変化はH3/H4 4量体の離脱・全体の崩壊/変性と考えられた。4種のテール欠失ヌクレオソームにおいても同様の2相の変化が見られたが、tH2B, tH3ヌクレオソームにおいては、最初のH2A/H2B 2量体の脱離と目される変化が顕著に低温度で起こることが判明した。以上より、H2B, H3 N末端テールは、ヒストン-DNA相互作用を維持し、ヌクレオソーム構造の安定化に重要であることが明らかになった。

5. 今後の予定

第22回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ

日時：2013年11月20日(水) 13:30 ~ 22日(金) 昼頃(予定)

会場：ホテルニュー水戸屋 宮城県仙台市太白区秋保町湯元薬師 102

主催：第22回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ 運営委員会

岩崎博史(東京工業大)、和賀祥(日本女子大)、菱田卓(学習院大)

共催：文部科学省新学術領域研究「染色体適応」「ゲノム普遍的制御」「非コードDNA」「クロマチン動構造」

<http://www-cc.gakushuin.ac.jp/~20139165>

第31回 染色体ワークショップ・第12回 核ダイナミクス研究会

日時：2013年11月25日(月) 14時頃 ~ 27日(水) 13時頃(予定)

会場：ホテルおかだ 神奈川県足柄下郡箱根町湯本茶屋 191

主催：第31回 染色体ワークショップ・第12回核ダイナミクス研究会

合同開催事務局 今本尚子(理研)、吉村成弘(京大)

後援：文部科学省新学術領域研究「クロマチン動構造」他

申し込み・問い合わせ先：[chromosomenucleus.goudou\[a\]gmail.com](mailto:chromosomenucleus.goudou[a]gmail.com)

([a]を@に変えてください)

新学術領域「クロマチン動構造」若手の会 第1回 シンポジウム

日時：2013年12月7日(土) 13時~ 18時

会場：早稲田大学先端生命科学センター(TWIns)

主催：文部科学省新学術領域研究「クロマチン動構造」若手の会

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/workshop/20131207.html>

新学術領域「クロマチン動構造」若手の会 第1回 シンポジウム

**海外で活躍する若手研究者が語る
最先端クロマチン研究**

2013年12月7日(土) 13:00~18:00 (12:30 open)
早稲田大学先端生命科学センター(TWIns)

Keynote Address:
"Gene regulation in cellular senescence"
成田 匡志
Cancer Research UK

Speakers:
Emory Univ. Xiaodong Cheng lab.
橋本 秀春 "Structural studies of DNA demethylation-related glycosylases, NBD4 glycosylase, and TDG glycosylase"
Northwestern Univ. Robert Goldman lab.
志見 剛 "The nuclear lamin networks: Defining the chromatin landscape"
Stanford Univ. Roger Kornberg lab.
永井 成樹 "Transcribing native chromatin *in vitro*"
Harvard Univ. Yi Zhang lab.
井上 梓 "Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly"
Cambridge Univ. John Gindoff lab.
宮本 圭 "Transcriptional reprogramming of mammalian nuclei by maternal factors"
Princeton Univ. Jason Lieb lab.
池上 浩太 "Unexpected lamin A/C interactions with active genes are altered in cells from progeria patients"
Waseda Univ. Hirotoshi Kuramizaka lab.
佐藤 浩一 "DNA repair factor FANCD2 is a histone chaperone"
Kyushu Univ. Yasuyuki Ohkawa lab.
原田 哲仁 "The lineage potential of skeletal muscle is dictated by histone H3 variants"

Access: 都営地下鉄大江戸線 若松河田駅より徒歩5分
都営地下鉄新宿線 曙橋より徒歩8分

Organizers: 佐藤 浩一(早稲田大学)、須藤 仁志(早稲田大学)、木村 宏(大阪大学)

事前の参加登録は必要ありません。(参加費無料)
お問い合わせ：koichi-sato@aoni.waseda.jp
<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/workshop.html>

編集後記：ようやく暑さからは解放されましたが、季節の変わり目で不安定な天候が続いています。学会や科研費申請のシーズンに突入し、忙しい時期を迎えますので、皆様も体調を崩さないよう気をつけてください。最近、学会やシンポジウムの数が多く、若干食傷気味になってしまっていますが、そのような中で一般向け公開シンポジウムはとても良かったと思います。班員の方々からも継続して行いたいとの声が多く聞こえています。今後もアウトリーチ活動を積極的に行い、研究の成果を国民に還元していくことが大事だと実感しました。HiKi

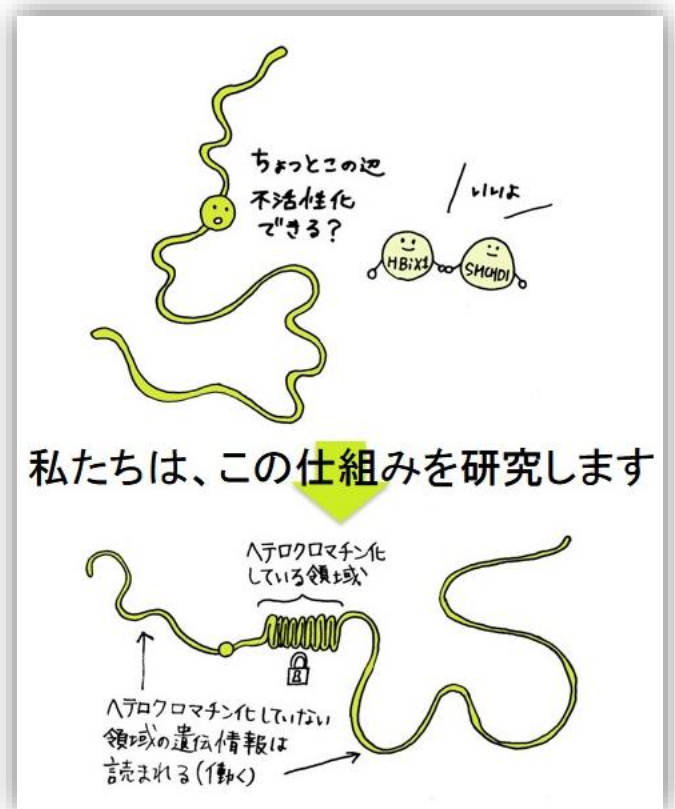
1. 研究紹介：【北海道大・小布施】、【大阪大・木村、山縣】
2. アウトリーチ活動：日本科学未来館ブログ「DNA をあやつるアイツを追い！」
3. ミーティング報告：EMBO Conference Series on Nuclear Structure and Dynamics
4. 成果紹介：胡桃坂グループの研究成果が Nucleic Acids Research 誌に掲載されました。
5. 受賞報告：米田班員が武田医学賞を受賞
6. 今後の予定

1. 研究紹介

【計画研究ウ ヘテロクロマチンの構造と機能の理解】

研究代表者：小布施 カ史（北海道大学 先端生命科学研究院・教授）

クロマチンは、ヌクレオソームを基本単位として、これを構成する DNA やヒストンの化学修飾などを目印として、特異的なタンパク質複合体が結合する巨大な複合体である。その高次構造は、クロマチン間相互作用や核内構造体との相互作用など、様々な階層から成り立っている。これらの階層を構成する因子や相互作用は、必ずしもヌクレオソームを基点として一方向に組み上がっているのではなく、互いに補いあい作用しあいながら、転写の抑制や発現などの状態を定常的に維持する性質（頑強性）を持つと考えられる。クロマチンの階層の一つの要としてヘテロクロマチンが挙げられる。ヘテロクロマチンは細胞周期を通して凝縮したクロマチン構造であり、頑強性と可塑性とを兼ね備えた性質により遺伝子発現制御機構に必須な役割を果たしている。本研究では、ヘテロクロマチンの分子ネットワークを基軸に、ヒストン修飾酵素群の複合体形成と染色体上の分布を、ヒストン修飾の分布と対応づけて明らかにし、ヘテロクロマチンの頑強性と可塑性の分子メカニズムを解明する。また、不活性 X 染色体のヘテロクロマチン化に必須な H3K9me3-SMCHD1 複合体を基軸に、ヘテロクロマチン構造形成への RNA の関与と分子ネットワークを明らかにする。これらの知見により、ヘテロクロマチンの構造と機能を分子レベルで理解する。



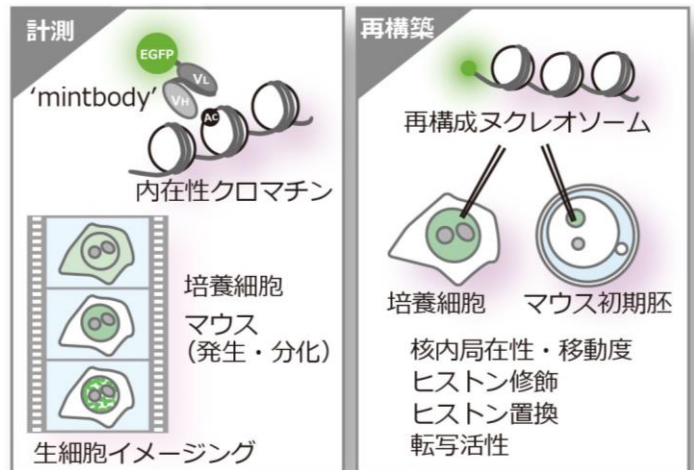
【計画研究工 計測と再構築による生細胞内クロマチンダイナミクスの高次元的理解】

研究代表者：木村 宏（大阪大学大学院 生命機能研究科・准教授）

研究分担者：山縣 一夫（大阪大学 微生物病研究所・特任准教授）

種々の生命現象におけるクロマチン構造の制御と意義を理解するためには、生細胞内のクロマチンダイナミクスをさまざまな時間軸で高次元的に捉える必要がある。本研究では、生細胞・生体内エピゲノム修飾可視化技術の開発を通じて、特定のヒストン修飾を持つクロマチンの動態の「計測」と再構成ポリヌクレオソームを用いた「再構築」を行うことで、生細胞・生体内におけるクロマチンの動的変化とその意義を明らかにすることを旨とする。具体的には、ヒストン修飾可視化プローブである修飾特異的細胞内抗体（mintbody; modification-specific intracellular antibody）や DNA メチル化可視化プローブ（GFP-MBD）を発現させたモデル生物を用いて、それらの時空間動態を明らかにする。

また、蛍光標識した再構成ヌクレオソームを培養細胞や受精卵の核に導入して、その動態や機能発現を計測することで、ヒストンバリエーションやヒストン修飾の意義を明らかにする。本研究による成果は、クロマチン関連基礎研究にとどまらず、再生医療、生殖医療、薬剤開発等にも広く波及効果が期待できる。



2. アウトリーチ活動



■日本科学未来館ブログ「DNAをあやつるアイツを追え！」

8月25日に千里ライフサイエンスセンターにおいて開催された、本領域主催の一般公開シンポジウム「DNAをあやつる生物のしくみ」が、日本科学未来館ブログで紹介されました。記事では、遺伝子配列を「言葉」に例えながら、各種の細胞が遺伝子のレパートリーを選択して多様性を実現する仕組みについて、わかりやすく解説されています。

<http://blog.miraikan.jst.go.jp/topics/2013092932106#more-32106>

3. ミーティング報告

2013年10月2日から5日間、南フランスのアヴィニョンの近く、L'Isle sur la Sorgue (リル・シュル・ラ・ソルグ) という街で“EMBO Conference Series on Nuclear Structure and Dynamics”が開催されました。本学会シリーズは、クロマチン・細胞核を研究するヨーロッパの研究者らで構成されている Epigenesys などの組織に支援され、2005年より一年おきにフランスで行われています。今回で5回目となるそうです。



学会会場 Domaine de Mousquety



街中を流れるソルグ川

本会議では、間期細胞核イメージングを中心とした研究に加え、Hi-C、ChIP、高速シーケンス、人工ヌクレアーゼによるゲノム編集、超解像顕微鏡などの新規技術を用いた研究がさかんに披露され、研究分野に激しい流れがあることを感じました。話題も、間期および分裂期染色体の構造、DNA の転写・複製・修復、核内 RNA や疾患など多岐にわたっていました。その中で印象的なものを、簡単に紹介します。

遺伝子の核内配置は、転写活性に相関があることは以前より示されてきました。例えば、核膜近傍にある遺伝子は転写抑制で、核内部にある遺伝子は転写活性の傾向がある、などです。しかし、遺伝子の配置が転写活性を規定するのか、またはその逆で転写制御の結果、遺伝子の核内配置が規定されるのか、いわゆる“卵が先か、ニワトリが先か (chicken and egg problem)”といった問題は未解決でした。Wendy Bickmore 博士 (エジンバラ大学) は、ES 細胞の分化過程で転写が活性化され、それとともに核内に移動する遺伝子座に着目して、この問題に取り組みました。この遺伝子座に非常に強力な転写因子を人工的に結合させて、転

写を活性化させたところ、それだけで遺伝子座が核内部に移動しました。また、クロマチンの脱凝縮を誘導するペプチドを遺伝子座に結合させるだけでも、核の内部に移動させることもできました。これらのことから、遺伝子の核内配置は、クロマチンリモデリングとそれに続く転写活性化の結果である、と結論づけました。また、Keynote speaker の Susan Gasser 博士 (FMI) は、ヘテロクロマチンの核膜周辺への局在に着目しながら、*C. elegans* における RNAi スクリーニング解析系を用いて、同様の問題に取り組みました。ヘテロクロマチンが核膜周辺に局在できないノックダウン個体でも、ヒストン H3K9 メチル化はそのまま保持されており、遺伝子もサイレンシングされたままであることなどから、ヘテロクロマチンの核膜周辺への局在は、H3K9 のメチル化を介した遺伝子のサイレンシングの結果である、と結論づけました。どちらも、遺伝子の核内局在は遺伝子の活性 (抑制) の結果である、という概念を支持するものでした。

細胞分裂期に、染色体が高度に凝縮して他の染色体から分離することは、娘細胞に適切に染色体を分配するために重要で、その不全は、がんなどの原因となり得ます。分裂期の染色体がどのような分子構造であるかは、長い間研究されていますが、いまだ不明な点が残されています。Leonid Mirny 博士 (MIT) と Job Dekker 博士 (UMass) は、Hi-C 技術を分裂中期染色体に応用しました。既に、同技術を用いた間期染色体の研究では、いわゆる TAD (Topologically associating domains) とよばれる数 Mb におよぶ大きな高次クロマチンドメインが形成されていることが示されています。分裂期染色体では、この構造が消失し、80-120 kb のループが連続的に形成され、それがさらに、高次に凝縮している、と提唱しました。このモデルには確固としたスキャフォールドは存在せず、むしろ、より低次元で連続的にループが構築されることこそが重要である、という主張でした。ディスカッションでは、Laemmli, Paulson, Earnshaw らの 1970 年代の染色体構造研究で得られた、ループ構造を示唆する結果などと照らし合わせており、新しいテクノロジーを導入して異なる局面から、古典的な問題を解く、という内容で、大変興味深かったです。

また、3C, 4C, 5C, Hi-C 技術は、Edith Heard 博士 (CNRS) らの X 染色体の不活化の研究などを筆頭に、会議全体をとおして種々の発表に登場し、圧倒的な威力を感じました。

本会議には、日本からも平野達也さん (理研)、深川竜郎さん (遺伝研) が招待講演者としてそれぞれ、分裂期染色体の凝縮メカニズム、ネオセントロメアの構築などについての研究成果を発表されたほか、増井修さん (理研)、原裕貴さん (現 EMBL、元遺伝研)、松田厚志さん (口頭発表、NICT/大阪大学)、筆者の斉藤典子 (熊本大学) が参加し、発表やディスカッションを行い、国内外のクロマチン・細胞核の研究者との交流を行いました。 (熊本大学・斉藤典子)



日本からの参加者 (一部)。左から、松田厚志さん (NICT/大阪大学)、増井修さん (理研)、深川竜郎さん (遺伝研)、原裕貴さん (現 EMBL、元遺伝研)

4. 成果紹介

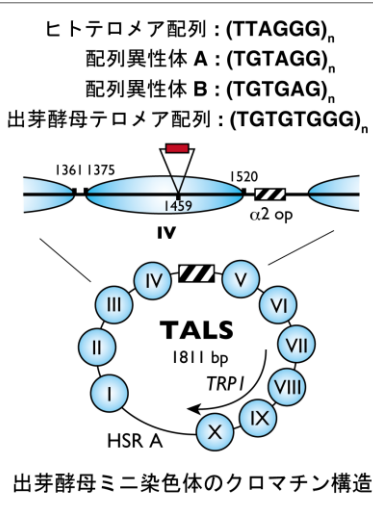
胡桃坂仁志領域代表らの論文が Nucleic Acids Research 誌に掲載されました。

Telomeric repeats act as nucleosome-disfavouring sequences *in vivo*.

Ichikawa Y., Morohashi N., Nishimura Y., *Kurumizaka H., *Shimizu M.

Nucleic Acids Res. First published online: October 29, 2013

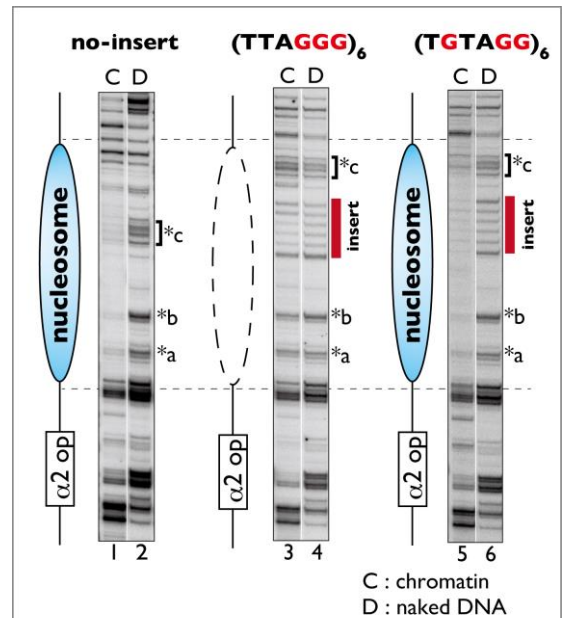
<http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2013/10/29/nar.gkt1006.full>



真核生物ゲノム DNA の末端は、テロメアと呼ばれる特殊な染色体領域を形成している。テロメアはゲノムの安定な維持において非常に重要な領域であり、テロメアの不安定化は細胞の老化やガン化と深く関わっている。我々は、テロメア・クロマチンの形成と機能発現機構を理解するために、テロメア DNA 配列がクロマチンの基本構造であるヌクレオソームの形成に及ぼす影響を解析した。本論文では、出芽酵母ミニ染色体を用いて、テロメア反復配列がヌクレオソーム構造に及ぼす影響を、塩基対レベルの高分解能で *in vivo* にて解析した。

ヒトテロメア反復配列 (TTAGGG)_n、または出芽酵母テロメア反復配列 (TGTGTGGG)_n を出芽酵母ミニ染色体に挿入し、

その領域のクロマチン構造を Micrococcal nuclease の切断によって解析した。Micrococcal nuclease は、ヌクレオソーム中の DNA は切断しないが、リンカー DNA を優先的に切断することが知られている。本解析の結果、ヒトおよび酵母のテロメア反復配列は、ミニ染色体上でのヌクレオソーム形成を阻害することが明らかになった。一方で、ヒトテロメア反復配列の配列異性体である (TGTAGG)_n や (TGTGAG)_n はヌクレオソームを効率良く形成することを見いだした。以上の結果から、テロメア反復配列は、*in vivo* においてヌクレオソーム形成に対して阻害的に働き、その性質には反復配列中に存在する 3 つの連続したグアニン残基が必須であることが明らかになった。テロメア反復配列のこのような特性は、テロメア・クロマチンの高次構造やダイナミクスに影響を与え、テロメア・クロマチンの機能発現を理解するために重要であると考えられる。



ヒトテロメア反復配列の挿入によりヌクレオソーム形成が阻害された(中央)。一方、配列異性体はヌクレオソームに取り込まれた(右)

5. 受賞報告

米田悦啓班員が、「核—細胞質間分子輸送機構解明に基づく高次生命機能の理解に関する研究」で、武田科学振興財団より武田医学賞を受賞しました。贈呈式は、11月12日(火)午後6時よりホテルオークラ(東京)で行われる予定です。

http://www.takeda-sci.or.jp/business/doc/2013_prize.pdf

大阪大学のマスコット・マチカネワニと



6. 今後の予定

第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ

日時：2013 年 11 月 20 日（水）13:30 ～ 22 日（金）昼頃（予定）

会場：ホテルニュー水戸屋 宮城県仙台市太白区秋保町湯元薬師 102

主催：第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 運営委員会

岩崎博史（東京工業大）、和賀祥（日本女子大）、菱田卓（学習院大）

共催：文部科学省新学術領域研究「染色体適応」「ゲノム普遍的制御」「非コード DNA」「クロマチン動構造」

<http://www-cc.gakushuin.ac.jp/~20139165>

第 31 回 染色体ワークショップ・第 12 回 核ダイナミクス研究会

日時：2013 年 11 月 25 日（月）14 時 ～ 27 日（水）13 時

会場：ホテルおかだ 神奈川県足柄下郡箱根町湯本茶屋 191

主催：第 31 回 染色体ワークショップ・第 12 回核ダイナミクス研究会合同開催事務局 今本尚子（理研）、吉村成弘（京大）

後援：文部科学省新学術領域研究「クロマチン動構造」他

申し込み・問い合わせ先：[chromosomenucleus.goudou\[a\]gmail.com](mailto:chromosomenucleus.goudou[a]gmail.com)

（[a]を@に変えてください）

新学術領域「クロマチン動構造」若手の会 第 1 回 シンポジウム

日時：2013 年 12 月 7 日（土）13 時～ 18 時

会場：早稲田大学先端生命科学センター（TWIns）

主催：文部科学省新学術領域研究「クロマチン動構造」若手の会

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/workshop/20131207.html>

新学術領域「クロマチン動構造」若手の会 第 1 回 シンポジウム

海外で活躍する若手研究者が語る 最先端クロマチン研究

2013 年 12 月 7 日（土）13:00～18:00 (12:30 open)
早稲田大学先端生命医学センター (TWIns)

Keynote Address:
‘Gene regulation in cellular senescence’
成田 匡志
Cancer Research UK

Speakers:

- Emory Univ. • Xiaodong Cheng lab.
橋本 秀春 ‘Structural studies of DNA demethylation-related glycosylases; MBD4 glycosylase, and TDG glycosylase’
- Northwestern Univ. • Robert Goldman lab.
志見 剛 ‘The nuclear lamin networks: Defining the chromatin landscape’
- Stanford Univ. • Roger Kornberg lab.
永井 成樹 ‘Transcribing native chromatin *in vitro*’
- Harvard Univ. • Yi Zhang lab.
井上 梓 ‘Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly’
- Cambridge Univ. • John Gurdon lab.
宮本 圭 ‘Transcriptional reprogramming of mammalian nuclei by maternal factors’
- Princeton Univ. • Jason Lieb lab.
池上 浩太 ‘Unexpected lamin A/C interactions with active genes are altered in cells from progeria patients’
- Waseda Univ. • Hiotoshi Kurumizaka lab.
佐藤 浩一 ‘DNA repair factor FANCD2 is a histone chaperone’
- Kyushu Univ. • Yasuyuki Ohkawa lab.
原田 哲仁 ‘The lineage potential of skeletal muscle is dictated by histone H3 variants’

Access: 都営地下鉄大江戸線 若松河田駅より徒歩5分
都営地下鉄新宿線 曙橋より徒歩8分

Organizers: 佐藤 浩一 (早稲田大学)、胡桃坂 仁志 (早稲田大学)、木村 室 (大阪大学)

事前の参加登録は必要ありません (参加費無料)
お問い合わせ: koichi-sato@aoni.waseda.jp
<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/workshop.html>

編集後記：科研費申請も一段落し、少しメ切から解放されたかと思いきや、年末・年度末が近付いており、どことなく焦燥感に駆られる日々を過ごしています。さて、ありがたいことに、このニュースレターを楽しみにしているという声を伺いました。発行間隔は基本的に不定期ですが、今のところ約 6 週間に一度（3 カ月に 2 回程度）を考えています。引き続きよろしく申し上げます。

HiKi

1. 研究紹介：【情報通信研究機構・原口、大阪大学・浅川】、【東工大・徳永】
2. アウトリーチ活動 ① 「染色体と細胞核のダイナミクス」(化学同人) 出版
 ② 日経産業新聞に記事(テクノトレンド) 掲載
3. ミーティング報告 ① 2013 Mechanisms of Nuclear Transport Meeting
 ② クロマチン動構造若手の会 第1回 シンポジウム
4. 成果紹介：胡桃坂と木村の共同研究の成果が Scientific Reports 誌に掲載されました。
5. 今後の予定

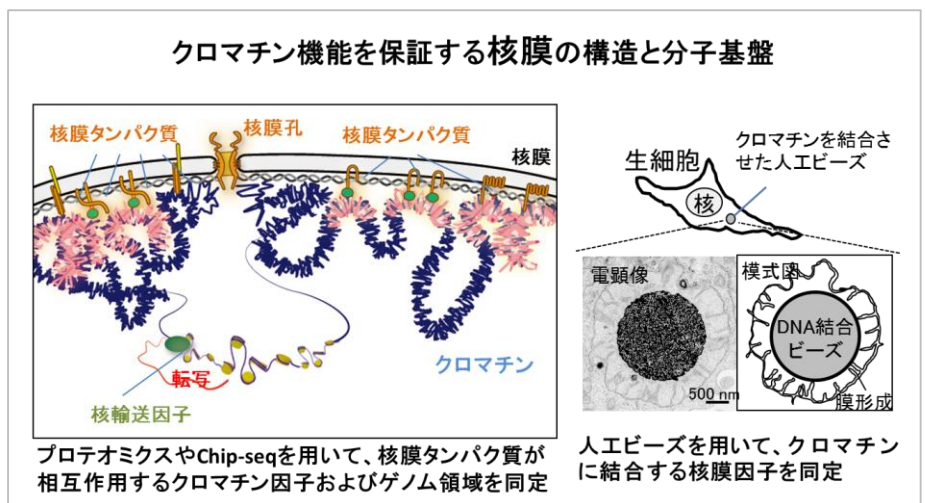
1. 研究紹介

【計画研究オ クロマチン機能を保証する核膜の構造と分子基盤】

研究代表者：原口 徳子 (情報通信研究機構・上席研究員)

研究分担者：浅川 東彦 (大阪大学生命機能研究科・助教)

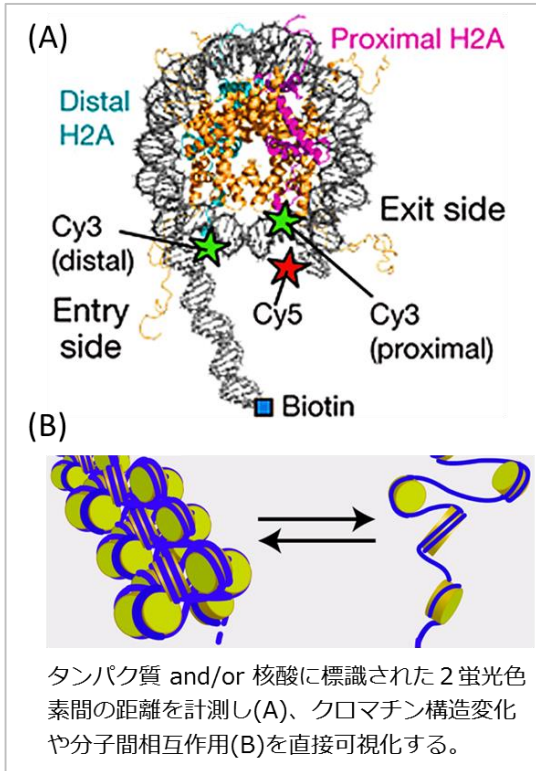
クロマチンが正常に機能するためには、核構造が非常に重要である。その中でも、核膜は、核膜タンパク質の働きによって、特殊なクロマチン構造(ピンク色で示した染色体)を核膜付近にアセンブリーさせ、転写のオンオフを時空間的に制御すると考えられている。その仕組みを明らかにするために、まず、特定の核膜タンパク質が相互作用するゲノム領域を、プロテオミクスやChIP-seq、イメージングなどの方法を駆使して



特定し、その特徴を抽出する。このような従来法に加えて、新しい実験系を用いて解析を行う。すなわち、人工ビーズに DNA や核膜形成に重要と予想されるクロマチン結合因子、あるいは in vitro 再構成させてヌクレオソームを結合させた後、生きた細胞内に導入し、ビーズ周辺で構築される人工的な核構造(右図の電顕像)を調べることにより、核膜タンパク質とクロマチンとの1対1の相互作用を、生きた細胞内で明らかにする。また、胚発生やガン細胞で高頻度に見られる微小核について、核膜の有無や、核膜構成成分、内包するクロマチン構造、DNA複製・修復の有無などを検討し、クロマチン機能を保証する核膜因子を明らかにする。特に、核膜病(筋ジストロフィーや早老症など)の原因として同定されている核膜タンパク質(エメリン、ラミン、BAF、SUN/KASHタンパク質、LEMドメインタンパク質など)が核膜上に正常な構造を構築するのに必要な条件を、クロマチンと核膜の両者から検討する。核膜孔複合体やLEMドメインタンパク質など進化的に保存されている核膜タンパク質に関しては、遺伝学的な手法に優れた分裂酵母を用いて、クロマチン構造と機能への影響を検討する。これらの研究を通して、正常なクロマチン機能を保証する核膜構造とその分子基盤を明らかにすることを旨とする。

【計画研究力 1分子 *in vivo* イメージング超解像ナノ解析によるクロマチン動作原理解明】

研究代表者：徳永 万喜洋（東京工業大学 大学院生命理工学研究科・教授）



DNA 生物学の重要な命題「動的クロマチン構造の実体」解明に新たな展開を計ることを目的として、クロマチンの構造変化と分子間相互作用を、直接可視化・計測する。光学顕微鏡を用いた1分子研究と、新たな世界的潮流である超解像顕微鏡法とを組合せ発展させる。(1) 多色1分子蛍光顕微鏡システムと超解像顕微鏡法を融合した顕微鏡を開発構築する。(2) 多色1分子画像の超解像ナノ解析法と、1分子 FRET 法(蛍光共鳴エネルギー移動, Fluorescence resonance energy transfer) とを用い、相互作用を定量計測する。(3) ヒストンや DNA を蛍光標識し、クロマチン構造変化・相互作用変化を直接可視化する。胡桃坂班、木村班、原口班との共同研究により、*in vitro* および細胞レベル *in vivo* で蛍光標識再構成クロマチンを用いて行う。(4) 以上の成果を、多種分子・時間・三次元空間の関数としての定量化を進める。(5) 領域内外共同研究を通して、ヒストン修飾状態と転写制御、新たな構成要素の動態、核内複合体ダイナミクスへと展開を計る。

2. アウトリーチ活動

■「染色体と細胞核のダイナミクス」(化学同人) 2013年11月30日出版

この本は、「DNAがどのようにして細胞の働きを正しく操るのか?」、あるいは「細胞はどのようにDNAを操り遺伝情報を適切に引き出すのか?」という古くて新しい問題に対して、現在明らかになっている事実を整理し、最新の知見を初学者に伝えることを目指したものです。著者は、その分野の最前線で活躍する先生にお願いしました。本新学術領域「クロマチン動構造」からは、胡桃坂仁志領域代表を始めとして、計画班員の木村宏、原口徳子、斉藤典子、原田昌彦が執筆を行っています。編集は、本領域総括班員の平岡泰と計画班員の原口徳子が行いました。

内容としては、遺伝子やヌクレオソームといった基本的なクロマチン構造から、セントロメアやテロメア、ヘテロクロマチンといったやや複雑な染色体構造や、染色体機能に影響を与える因子・構造として、コンデンシン、染色体空間配置、核膜、核内ボディー、核骨格の問題を取りあげました。また、高次生命現象として減数分裂と発生・分化を取りあげ解説しています。

本書は、大学生や大学院生にも理解できるようにするため、阪大の4回生数名に読んでもらい、彼らが理解できるまで修正を行いました。彼らの協力のおかげで、専門性を維持しながらも初学者に読みやすいものとなっていると思います。染色体や細胞核の教科書として、いつも傍らに置いて読んで貰えることを願っています。

(情報通信研究機構・原口 徳子)



■日経産業新聞に本領域の研究が紹介されました

胡桃坂領域代表と木村班員の研究が、日経産業新聞の記事(テクノトレンド)に紹介されました(11月29日)。

3. ミーティング報告

■2013 Mechanisms of Nuclear Transport Meeting

2013年10月18日から10月23日まで、アメリカ東海岸にある Marine Biological Laboratory (海洋生物学研究所) で“2013 Mechanisms of Nuclear Transport Meeting” (オーガナイザー: Thomas Schwartz and Karsten Weis) が開催されました。本領域からは、原口徳子班員が参加しました。本会議は、細胞核への物質輸送の仕組みを研究する研究者が世界中から集まり、2年に一度開催される国際会議です。1997年に最初に開かれて以来、



各年毎に継続されています。今年は14回目となるはずなのですが、第何回と呼ばれていない「有志の会」的な会議です。今回は、ボストンから車で2時間ほど行った MBL で行われました。MBL は、GFP の発見でノーベル賞を受賞された下村先生がクラゲをたくさん捕まえていたということで“有名な”研究所であり、イメージングの分野ではビデオマイクروسコピーの開発で有名な Shinya Inoue (井上信也) 先生が長年研究されていた研究所でもあります。海洋生物学やイメージングの研究者にとっては、まさに聖地のような研究所です。筆者は、今回、初めてこの「聖地」に足を踏み入れる機会を頂き、ワクワクしました。

参加者は約90名で、そのほとんどが研究室を主宰するPI(主要研究者)です。18日に夜のセッションから始まり、23日の朝まで、16のセッションが開かれ、66演題の口頭発表が行われました。アメリカからはもちろんのこと、カナダ、イギリス、フランス、ドイツ、イタリア、スペイン、スイス、オーストリア、ベルギー、スウェーデン、日本、中国など、世界各国から、この分野の第一線で活躍する研究者が参加しました。日本からは、筆者を含めて4名が参加しました。この会議の特徴は、参加者が未発表データを含めた最新の成果を発表することです。そのためアブストラクトは求められません。ほとんどの発表は未発表の内容であり、「最近出た論文で読んだなあ」というような内容はほとんどありません。だから、個別の発表の内容の詳細に紹介することはしませんが、大まかにいうと、核移行のメカニズムに言及する講演はかなり少数派で、核膜孔の構造や形成メカニズムに関する発表や、ヌクレオポリンの機能に関する発表が大半を占めました。また、核膜タンパク質の機能や染色体との相互作用が果たす役割に関する発表もかなりありました。中でも核ラミナの主要成分であるラミンの機能に関する発表は2つのセッションを構成するほど行われました。核膜は、ラミンの変異や核膜タンパク質の変異によって筋ジストロフィーやプロジェリア早老症、心筋症など、さまざまな遺伝病が起こることが知られています。そのため、欧米では関心が高く、基礎研究から応用研究までさまざまな研究が行われています。

学問的には、面白い発表が次から次へと続く魅力的なミーティングですが、それに加え、会期中の半日を使って行われたレクリエーションも興味深いものでした。参加者は、バードウォッチングとホエールウォッチングのどちらかを選ぶことができます。このような体験を通して、研究者同士が個人レベルで親しくなり、より深くサイエンスの議論をすることができるようになります。日本のミーティングでは、このような機会が与えられることは皆無に近く、ゆったりとした環境でサイエンスの議論を深めることができる環境は、とても素晴らしいものでした。



このミーティングで面白かったもう一つの体験は、次のミーティングの決め方です。この会議は、基本的にはアメリカとヨーロッパで交互に開くというルールのようなのですが、前はイスラエルで開催され、今回はアメリカでした。それで、次は、ヨーロッパ方面で行われるまわりとなるのですが、その選択は候補となる国(都市)が立候補する形で進められました。オリンピック招致のように、プレゼンをやって、みんなで気に入ったところに拳手をして決めるのです。立候補は、イギリス(エジンバラ)、ドイツ(ハイデルベルグ)、

スペイン（指定なし）、イスラエル（指定なし）の4カ国（4都市）でした。最初の“投票”で、イギリスとドイツが落選し、スペインとイスラエルが決戦に進み、次に決戦でスペインが圧倒的多数で選ばれて、次の開催地と決まりました。その様子は、まるで五輪の招致活動のようで、本当にみんなで作る会議なのだと実感しました。実に面白かったです。（情報通信研究機構・原口 徳子）

■新学術領域「クロマチン動構造」若手の会 第1回 シンポジウム

2013年12月7日に早稲田大学先端生命医科学センター(TWIns)にて、本領域の若手の会主催のシンポジウム「海外で活躍する若手研究者が語る最先端クロマチン研究」が開催されました。若手の会の会員は博士研究員や博士課程学生で構成されており、今後海外留学を視野に入れている人が大勢います。若手の会発足後、第1回目となる本シンポジウムでは、海外の若手研究者として、海外の著名な研究室に所属する6名の博士研究員の方々と、Cancer Research UKの成田匡志先生を招いて、世界最先端の知見や、最新の海外ラボ事情を語っていただきました。さらに若手の会から九州大（大川研）の原田哲仁会員、早稲田大（胡桃坂研）の佐藤浩一会員が発表しました。



会場の早稲田大学先端生命医科学センター

発表では各ラボが誇るオリジナルの手法や ChIP-seq、RNA-seq などの最新技術を駆使した、未発表データを含む最新のデータが次々に披露され、聴衆を魅了しました。質疑応答では質問者が後を絶たず、白熱した議論が展開されていました。特に、若手の方が活発に質問をしていた点が若手の会のシンポジウムならではの、演者の皆さんも若手からの質問にも丁寧に答えて下さり、普段の学会にはないフランクな雰囲気がありました。以下では発表内容について簡単に紹介します。

ご承知の通り、真核生物のゲノム DNA はクロマチンを形成し、DNA 上で起こる転写や修復といったイベントはヌクレオソームにコードされたエピジェネティックなマークや、さまざまな因子によって複雑に制御されています。しかし、クロマチン上で起こるイベントの制御機構には未だ未解明な点が多く残されています。スタンフォード大（Roger Kornberg Lab.）の永井成樹博士は、出芽酵母のゲノム DNA から精製したクロマチンと精製タンパク質を用いて、試験管内でクロマチンからの転写を再構成する系を紹介し、ネイティブなクロマチン上で起こる転写制御機構の詳細解析に新たな可能性を示しました。ハーバード大（Yi Zhang Lab.）の井上梓博士は、マウス受精卵の雄性前核においてヌクレオソームを欠損した核を作製する革新的な手法を確立し、ヌクレオソームの欠損した核では核膜孔が形成されないという衝撃的なデータを報告しました。ケンブリッジ大（John Gurdon Lab.）の宮本圭博士は、アフリカツメガエルの卵にマウスの

細胞核を移植して初期化した後に移植核のゲノム解析を ChIP-seq 法により行う技術などを確立し、リンカーヒストン B4 とクロマチンに取り込まれることと、核内でアクチンタンパク質が重合することがリプログラミング過程に必須であること発表しました。早稲田大の佐藤会員は、DNA 損傷修復過程で働く FANCD2 がヒストンシャペロンであることを発見し、FANCD2 依存的なクロマチンリモデリングが DNA クロスリンクの修復に重要であることを報告しました。

細胞の分化や環境応答に伴う転写状態の変化は、ゲノム上の特定の領域における DNA のメチル化やヒストンの翻訳後修飾といったエピジェネティックなコードを可塑的に変化させることで実現されており、エピジェネティックコードの制御機構の解明は細胞における動的な遺伝子発現制御の理解に必須です。エモリー大（Xiaodong Cheng Lab.）の橋本秀春博士は、結晶構造解析によって、DNA の脱メチル化経路で働く MBD4 と TDG という2つのタンパク質による基質 DNA の認識機構を解析し、DNA の脱メチル化の機構を解明しました。さらに、DNA 脱メチル化経路の中間産物に対する結合が増強した変異体タンパクを用い



(上) 宮本さんの発表の様子。(下) 質疑・応答の様子。質問者が行列を作っている。

て、脱メチル化反応中間体のゲノム上の局在解析への応用の可能性をも示しました。九州大の原田会員は、筋分化において筋特異的遺伝子のプロモーター領域にヒストンバリエント H3.3 が取り込まれることで、転写を on にも off にもできるバイバレントなヒストン修飾状態が誘起され、分化が可能な状態になることを報告しました。

DNA の転写制御に重要な、クロマチンの高次構造や、染色体の核内配置は核膜と密接に関係しています。ノースウェスタン大 (Robert Goldman Lab.) の志見剛博士は、核ラミナ構造とクロマチンへの影響および、細胞老化における核ラミンの関与について研究されております。今回は、核ラミナを構成するラミン B1 のロックダウンで細胞核の球状構造が破綻して細胞核の一部が飛び出したように変形する事を見だし、飛び出した領域に存在する染色体はユークロマチン状態にあるにも関わらず、転写が活性化されないという興味深い現象などを報告しました。プリンストン大 (Jason Lieb Lab.) の池上浩太博士は、C. elegans において snoRNA をコードする領域上に核膜孔タンパク質が結合し、snoRNA 転写の大部分は核膜孔の中で行われているという仮説を披露し、聴衆を驚かせました。また、ChIP-seq を用いたゲノム解析から、ゲノム DNA 上のラミンの局在が、早老症の患者では変化するというデータを発表しました。

最後に特別講演の成田匡志先生には、細胞老化やがんなどの様々なストレス応答において中心的な役割をはたす p53 による遺伝子発現の制御についてお話いただき、細胞老化やがん細胞など、表現型の異なる細胞については p53 のゲノム DNA 上の局在も大きく異なり、これまでに報告されていた p53 のターゲット遺伝子は限られた細胞の表現型における p53 の部分的な働きしかみていないという結果を報告していただきました。

発表後には懇親会が催され、発表で聞ききれなかった質問や、海外のラボ事情について先輩研究者とリラックスして懇談する事が出来ました。本ワークショップを通して、海外で成果を挙げている先輩方と交流できた事は、私たち国内の若手研究者にとって非常に刺激的で、自分の研究スタイルや今後の研究者人生を考える上で重要な指針を得る事が出来ました。

(早稲田大学・胡桃坂研・有村 泰宏)



4. 成果紹介

胡桃坂仁志領域代表と木村宏班員らの領域内共同研究による論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。この成果は、12月17日付化学工業日報に紹介されました。

Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin.

Arimura Y., *Kimura H., Oda T., Sato K., Osakabe A., Tachiwana H., Sato Y., Kinugasa Y., Ikura T., Sugiyama M., Sato M., *Kurumizaka H.

Sci Rep. 2013 Dec 16;3:3510.

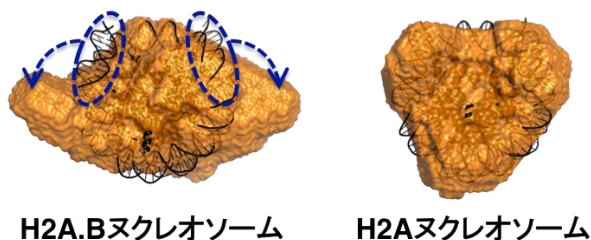
<http://www.nature.com/srep/2013/131216/srep03510/full/srep03510.html>

真核生物のゲノム DNA は、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 各 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体の周りに巻き付いて、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームを形成している。H4 以外のヒストンにはアミノ酸配列の異なる“バリエント”が存在しており、特定のクロマチン領域における主要型ヒストンからのバリエントへの交換は、クロマチンのエピジェネティックな状態の切り替えに寄与することが分かっている。我々は哺乳類特異的に存在し、精巣において高い発現が認められるヒストン H2A.B (別名: H2A.Bbd) バリエントが、DNA 複製領域および DNA 損傷領域に一過的に集積することを細胞生物学的解析から明らかにした (図 A、B)。H2A.B が転写される領域に取り込まれることはすでに分かっていた。これらの知見を合わせて、H2A.B はヌクレオソームの再編成が活発なクロマチン領域に一過性に取り込まれると考えられ

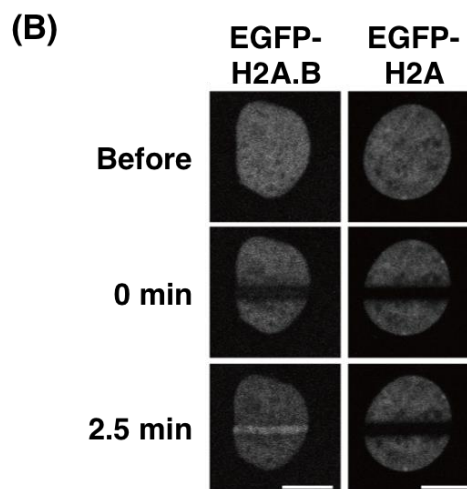
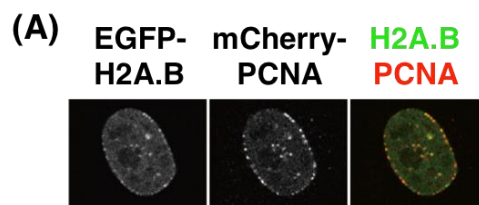
た。これまでに DNA の転写・複製・修復のすべての過程で働くヒストンバリエーションは例がなく、H2A.B がこれらのクロマチン領域に取り込まれる機構と、これらの領域での H2A.B の機能メカニズムが次の疑問となった。

生化学的解析によって、主要型の H2A を含んだ通常のヒストン 8 量体ではヌクレオソームを形成することのできない 124 塩基対以下の短い DNA を用いても、H2A.B を含んだヒストン 8 量体ではヌクレオソームが形成されることを明らかにした。さらに X 線小角散乱解析を用いて溶液中での構造解析を行い、H2A.B ヌクレオソームが、H2A ヌクレオソームよりも DNA が広がった“open”なヌクレオソーム構造を形成することを明らかにした (図 C)。H2A.B の取り込みに特異的なヒストンシャペロンやクロマチンリモデリング因子が関与するのか、さらに H2A.B が作り出す“open”なクロマチン構造が転写・複製・修復にどのように関与するのかといった点を今後明らかにしていく必要がある。

(C)



(C) H2A.BヌクレオソームはDNAがひろがった“open”なヌクレオソーム構造を形成していた。



(A) H2A.BがDNA複製複合体のマーカであるPCNAと共局在している。
(B) レーザーによるDNA損傷導入領域にH2A.Bが集積している。

5. 今後の予定

小布施班員、木村班員が班友として参加する新学術領域「ゲノム普遍的制御」(花岡文雄領域代表)の国際シンポジウム「Replication, repair and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity」(2014年2月4-5日、京都大学百周年時計台記念館1階 百周年記念ホール)が開催されます。

詳しくは、こちらをご覧ください。

<http://www.dnarepair.jp/english/conference2014/>

International Conference, Kyoto, 2014

Replication, repair and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity

F2014 E B 4-5
Clock Tower Centennial Hall, Kyoto University

Confirmed Speakers

Dr. Haico van Attikum (Leiden University, The Netherlands)	Dr. Leon Mullenders (Leiden University, The Netherlands)
Dr. Jean-Marc Egly (IGBMC, France)	Dr. Irina Solovoi (LMU Munich, Germany)
Dr. Thomas Helleday (Karolinska Institutet, Sweden)	Dr. Toshi Tsukiyama (Fred Hutchinson, USA)
Dr. Tom Misteli (NCI, USA)	Dr. Wei Yang (NIDDK, USA)

We cordially announce the international conference entitled “Coupling of replication, repair and transcription, and their common mechanism of chromatin remodeling”. The conference will be held at the Centennial Hall, Kyoto University, in Kyoto, Japan. The 2-day conference will begin in the afternoon on February 4th (Tue.), 2014, and conclude at late afternoon on February 5th (Wed.), 2014.

<http://www.dnarepair.jp/english/conference2014/>

ORGANIZERS:
Fumio Hanaoka
Akira Yasui
Kiyoi Tanaka
Tsuyoshi Ikura
Kanji Furuya

Supported By:
Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas
“Coupling of Repair, Replication and Transcription on Chromatin”

Access: From JR Kyoto Station: Bus no.206 (anti-clockwise)
From Hatakey Kawaramachi St: Bus no.201 (anti-clockwise).
Bus stop at Kyodai Saemon-mae

The official language in this conference is English.
Participants are welcome. For details, please contact:
genome_symposium@house.rbc.kyoto-u.ac.jp

編集後記: 今年の本領域発足にあたり、平年より一層めまぐるしく過ぎて行きました。皆様方には大変お世話になり、領域の研究も成果がではじめています。来年も引き続きご指導・ご鞭撻のほどよろしくお願ひします。良いお年をお迎へください。

HiKi

1. 研究紹介：【医薬基盤研・米田、大阪大学・岡、安原】、【熊本大学・斉藤、東北大学・原田】
2. アウトリーチ活動
3. 成果紹介：胡桃坂領域代表らの成果が Acta Crystallographica 誌に掲載されました。
4. 今後の予定

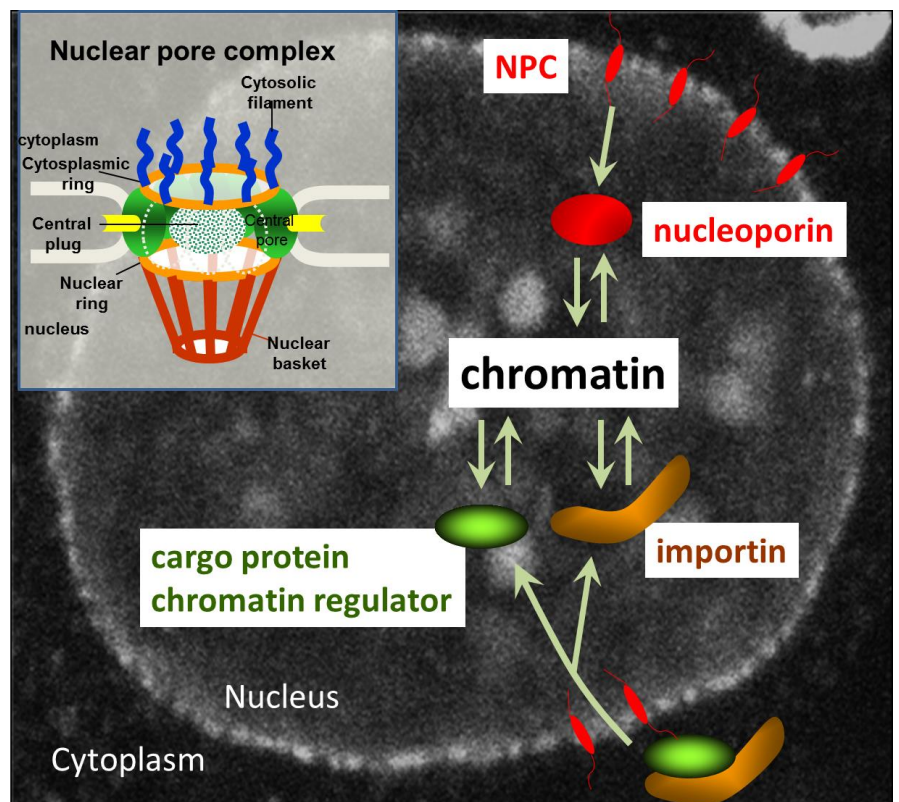
1. 研究紹介

【計画研究力 核膜孔複合体構成因子・核輸送因子によるクロマチン動態制御の解明】

研究代表者：米田 悦啓（医薬基盤研・理事長）
 研究分担者：岡 正啓（大阪大学生命機能研究科・助教）
 研究分担者：安原 徳子（大阪大学生命機能研究科・特任助教）

真核生物の細胞核は核膜により細胞質と隔てられており、核内外への分子の移動は核膜孔を介する核輸送により選択的におこなわれる。このような選択的核輸送は核内の環境をコントロールし、遺伝情報を適切に利用するのに不可欠であり、細胞の様々な活動に重要な役割を果たす。細胞質で翻訳されたクロマチン制御因子を適切なタイミングで核へと輸送することはクロマチン構造の維持に重要であると考えられる。そこでクロマチン制御因子の核—細胞質間輸送のメカニズムを解析し、その制御機構を明らかにする。またこれまでに核—細胞質間の分子輸送を担う輸

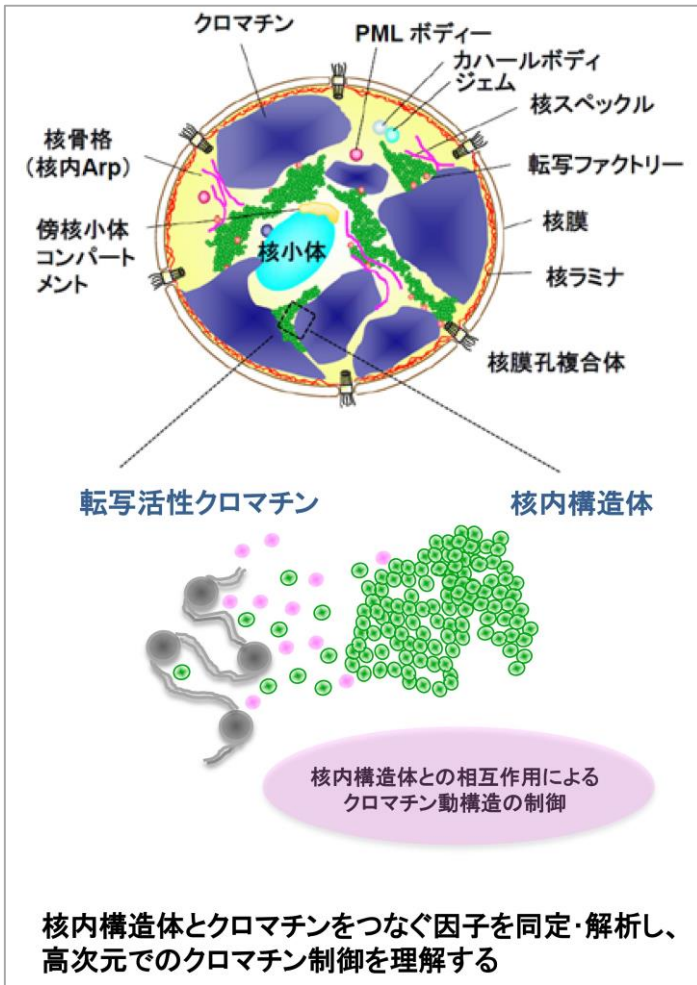
送因子(Importin)や核膜孔構成因子（ヌクレオポリン）などの核輸送制御因子が核内でクロマチンと相互作用を示すこと、さらに、それらの相互作用が細胞分化やストレス応答などの細胞内環境に応じて変化することが報告されている。そこで、本研究では領域内の共同研究を通してヌクレオポリンや Importin とクロマチンの相互作用の物理的・機能的な相互作用の解析を行い、その生理的な意義を明らかにする。さらに、核輸送制御因子の機能破綻とがんや白血病などの病態との関連に着目し、ヌクレオポリン・核輸送因子による動的クロマチン構造制御の視点から病態メカニズムを明らかにすることを旨とする。



【計画研究キ 核内構造体とのインタープレイによるクロマチン動構造の制御】

研究代表者：齊藤 典子（熊本大学 発生医学研究所・准教授）

研究分担者：原田 昌彦（東北大学大学院 農学研究科・准教授）



細胞核内は極めて不均一な環境で、クロマチンは、核小体、核スペックル、核骨格など種々の核内構造体に取り囲まれている。クロマチンの機能や動態は、これらとの相互作用により制御されていると考えられている。核内構造はがんを含む疾患や発生・分化段階で顕著に変化し、その構成因子の変異は、神経変性疾患や早老症などの一連の疾患に関わる。しかしその背景にある分子機序は不明である。本研究では、核内構造体とクロマチンの相互作用に関わるものを I/F (インターフェイス) 因子と位置づけて、それらの同定と機能解析を行う。まず培養細胞株に対して siRNA ライブラリー導入を行い、発現の減弱によって核構造の形態変化を誘導する因子をスクリーニングする。核内構造体の変化の方向性は、ハイコンテンツ画像解析技術や機械学習パターン認識システムによって客観的に評価する。このうち、クロマチン機能に関わる可能性のある因子に関して、その分子メカニズムの解析を行う。さらに、疾患や発生分化における核構造変化の責任因子である可能性を検証する。本研究により、核内構造体とクロマチンをつなぐ因子を軸とする高次元でのク

ロマチン制御が理解されるとともに、がんなどでみられる核の異型や、発生・分化過程におけるダイナミックな核構造の変性の機序が理解されることが期待される。

2. アウトリーチ活動

① 第 22 回細胞生物学ワークショップ 顕微鏡トレーニングコース 2 -中級から上級-

12月16-18日に北海道大学で行われた第22回細胞生物学ワークショップにおいて、木村班員、原口班員が講演などを行いました。

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/infmcd/ws/ws22/schedule.html>

② 1st AIST International Imaging Workshop

1月21日、産総研主催の国際イメージングワークショップにおいて、木村班員が講演を行いました。

<https://unit.aist.go.jp/biomed-ri/ci/event/AIST%20Imaging%20Workshop%202014.pdf>

3. 成果紹介

胡桃坂領域代表らの領域内共同研究による論文が、Acta Crystallographica 誌に掲載されました。

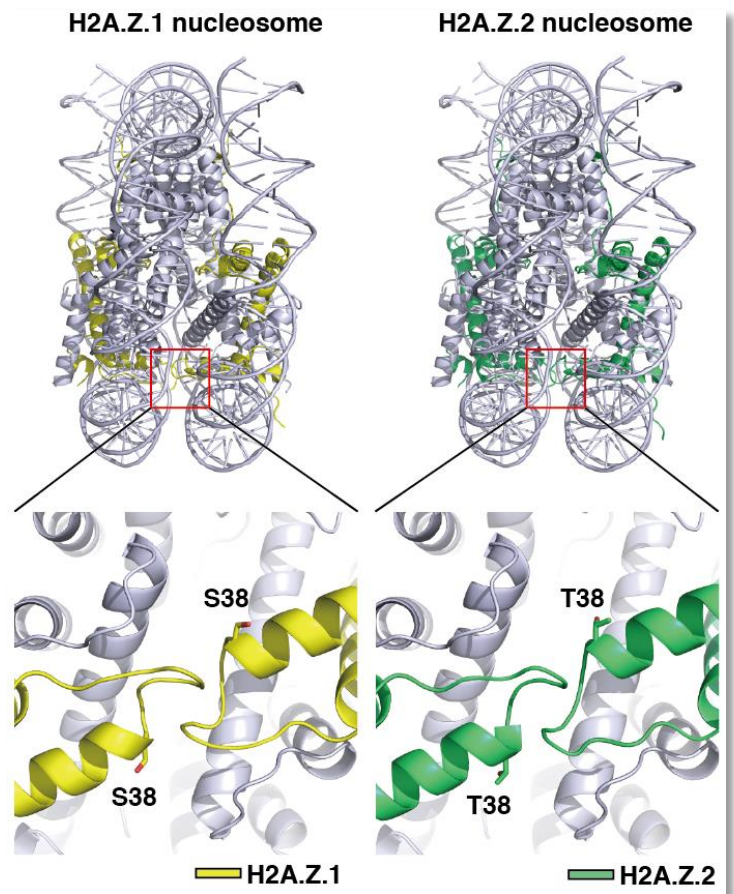
Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2

Horikoshi N, Sato K, Shimada K, Arimura Y, Osakabe A, Tachiwana H, Hayashi-Takanaka Y, Iwasaki W, Kagawa W, Harata M, Kimura H and *Kurumizaka H

Acta Cryst. 2013 D69;2431-2439

<http://journals.iucr.org/d/issues/2013/12/00/mv5091/index.html>

クロマチンの最小単位であるヌクレオソームは、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 を 2 分子ずつ含むヒストン 8 量体に、DNA が 146 塩基巻き付いた円盤状の構造体である。ヒストン H2A、H2B、H3 には、高い相同性を有するヒストンバリエントが多く存在し、ヒストンバリエントがクロマチンに取り込まれることで、特異的な高次クロマチン構造が形成されることが示唆されている。ヒストン H2A のバリエントである H2A.Z には、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の 2 つの isoform が存在し、DNA の転写や修復などのさまざまな DNA 代謝に関与することが報告されている。H2A.Z.1 と H2A.Z.2 は、細胞増殖や遺伝子発現調節において異なる機能を有することが示唆されているが、それぞれの機能についての詳細な違いは明らかになっていない。本論文では、ヒト H2A.Z.1 および H2A.Z.2 を含むヌクレオソームの結晶構造解析、および FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) による H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の細胞内動態を解析した。結晶構造解析から、ヌクレオソーム中で 2 分子の H2A.Z が相互作用する領域である L1 loop に、H2A.Z.1



と H2A.Z.2 との間で構造的な違いがあることが明らかとなった。この領域のアミノ酸配列は、H2A.Z.1 と H2A.Z.2 で同一であり、この構造多形の原因の 1 つとして H2A.Z.1、H2A.Z.2 の L1 loop の運動性が高いことが考えられた。さらに、L1 loop 直前に存在する 38 番目のアミノ酸の違い(H2A.Z.1 ではセリン、H2A.Z.2 ではスレオニン)が、L1 loop における構造多形を誘引する原因と考えられた。

H2A.Z.1 と H2A.Z.2 の細胞内動態について、FRAP 法により解析したところ、通常の H2A と比較して、H2A.Z.1 は細胞核内での運動性が高いが、H2A.Z.2 は H2A とほぼ同程度であることが明らかになった。さらに、H2A.Z.1、H2A.Z.2 の 38 番目のアミノ酸を置換した H2A.Z.1 S38T、H2A.Z.2 T38S を用いた FRAP 解析から、38 番目のアミノ酸が、H2A.Z.1 および H2A.Z.2 の細胞核内での動的性質に部分的に働いていることが判明した。これらの結果から、38 番目のアミノ酸の違い、および L1 loop の柔軟性が H2A.Z.1、H2A.Z.2 の動的性質および機能に重要であることが示唆された。

4. 今後の予定

① “よく分かる次世代シーケンサー解析” ～最先端トランスクリプトーム解析～

開催期間：3月17-19日、13:00～16:30

開催場所：九州大学 馬出キャンパス

主催：九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プロジェクト「ゲノム・エピゲノム解析拠点」

共催：新学術領域研究「動的クロマチン構造と機能」

内容：次世代シーケンサー(NGS)解析は、様々な研究者が取り入れています。NGS解析にはWetと呼ばれる分子生物学的手法と、Dryと呼ばれる計算科学の手法の両方が必要です。この両者の連携が解析の成功のカギを握っています。そこで、WetからDryまでの最先端の研究者を招いて、特にトランスクリプトーム解析手法についてのセミナー（1時間）と人数を限定したトレーニング（1.5-2時間程度）を開催します。

お申込み、お問い合わせ先：seminarseries0317@gmail.com

申込〆切：2月14日

② 高等研カンファレンス 2014「Chromatin Decoding」

開催期間：5月12-15日

開催場所：公益財団法人国際高等研究所

主催：公益財団法人国際高等研究所

後援（予定）：文部科学省、日本学術振興会、京都府、関西経済連合会、関西文化学術研究都市推進機構、日本細胞生物学会、日本生化学学会、日本分子生物学会、日本RNA学会

協力：文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「動的クロマチン構造と機能」「ゲノム複製、修復、転写のカップリングと普遍的なクロマチン構造変換機構」「転写サイクル」「ゲノムを支える非コードDNA領域の機能」

詳しくはこちらをご覧ください。

http://www.ias.or.jp/research/ias_conference/2014/info.html

③ 第14回 日本蛋白質科学会年会

開催期間：6月25-27日

開催場所：ワークピア横浜/横浜ホールマリネリア

本領域協賛のワークショップ「クロマチンの動的構造とDNA機能発現機構」（オーガナイザー：胡桃坂・河野）があります。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.aeplan.co.jp/pssj2014/index.html>

編集後記：2014年が明けて早や1月が過ぎました。遅ればせながら、本年もどうぞよろしく申し上げます。午年ということで、何事も“うま”くいくことを願っております。先日、衝撃的なSTAP (stimulus-triggered acquisition of pluripotency) 細胞の発表がありました。酸性処理でクロマチンがどう変化するのか、興味深いところです。 HiKi

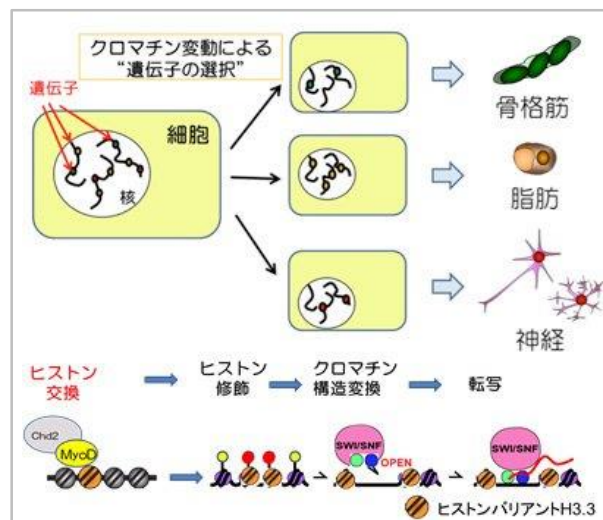
1. 研究紹介：【計画研究】九州大学・大川
【研究分担者の紹介】 遺伝研・堀、阪大・山縣、阪大・浅川、阪大・岡、阪大・安原、東北大・原田
2. 学会報告：アメリカ生物物理学会年会（日本原子力研究開発機構・河野）
Keystone シンポジウム-Transcriptional Regulation（九州大学・前原）
3. 今年度の成果
4. 今後の予定

1. 研究紹介

【計画研究ケ 細胞分化にともなうクロマチン変動メカニズムの解明】

研究代表者：大川 恭行（九州大学 医学研究院・准教授）

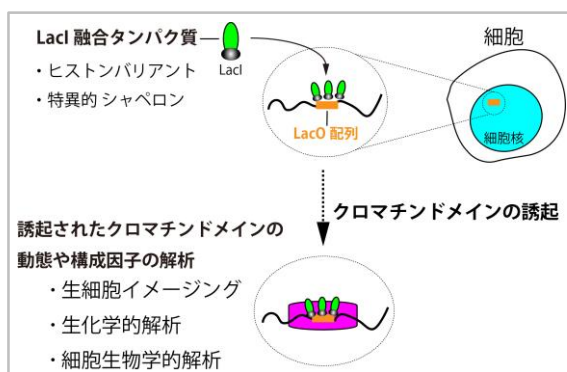
生物個体が形成されるためには、異なる形質を発現する様々な細胞への分化が必須である。この細胞分化の過程で、ゲノム上に存在する 2-3 万もの遺伝子から特定遺伝子の発現が選択される。この選択的な遺伝子発現には、DNA のメチル化やヒストン修飾から、クロマチンの凝集と弛緩に至る幅広いクロマチン構造制御（“動的クロマチン”）が関与することが明らかとなってきた。分化における遺伝子選択の破たんは、がんなど疾病の原因ともなりうるが、近年、ヒストンそのものの変異と小児性脳腫瘍との関係が見出されている。この小児性脳腫瘍の原因と考えられる h3f3a 遺伝子によりコードされるヒストン H3.3 は、全ヒストン H3 のうちの 5% 程度を占めるバリエーションであるが、転写活性化領域に選択的に取り込まれる。この H3.3 バリエーションは、主要な H3.1 ヒストンと比べてわずかに 5 アミノ酸が異なるだけであるが、このわずかな違いこそが機能的に重要であり、遺伝子発現制御の多様性の一翼を担っている。本研究では、これらヒストンバリエーションを軸にしたクロマチン変動機構の解析によって、細胞分化にともなう遺伝子選択機能の解明を目指す。



【研究分担者の紹介】

計画研究ア 再構成ヌクレオソームを用いた動的クロマチン構造の解明（代表者：早稲田大学・胡桃坂）

研究分担者：堀 哲也（国立遺伝学研究所・助教）

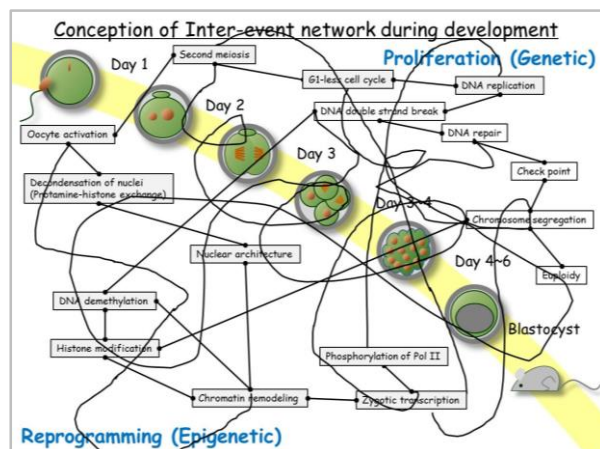


本計画研究では、*in vitro* でのクロマチン再構成系を用いた、生化学的および構造生物学的な解析を通して、クロマチンの高次構造および動的変動メカニズムの解析を行い、高次クロマチンの形成とその機能発現機構を原子レベルで理解することを目指している。本分担研究では、主に染色体工学的手法を利用して、構造生物学的な解析や他計画研究より見いだされた興味深い新規ヒストンバリエーションやヒストンシャペロンなどを、特定の染色体部位へ人為的に局在させ、任意のクロマチンドメインの誘起を行なう。誘起されたクロマチンドメインの動態や構

成因子および形成機構を、細胞生物学的手法や生化学的手法あるいは生細胞イメージング法により明らかにする。これらの研究を通して、高次クロマチン形成に至るメカニズムおよびその意義の解明を目指す。

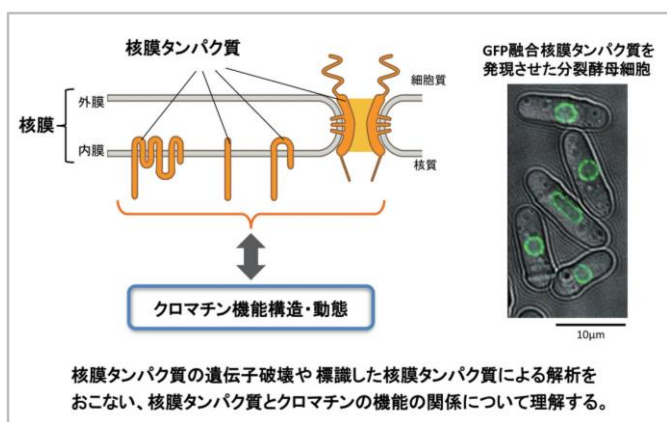
計画研究工 **計測と再構築による生細胞内クロマチンダイナミクスの高次元的理解** (代表者:大阪大・木村)
研究分担者: 山縣 一夫 (大阪大学 微生物病研究所・特任准教授)

受精・着床前初期胚発生は、終末分化した細胞である配偶子とそのエピジェネティックな記憶をいったん消去し、全能性を持つ細胞としての記憶を獲得する過程である。同時に、遺伝情報を短期間に正確に増殖させてゆく(図)。その過程で起きた異常は、発生の破たんを引き起こし、不妊や早期流産の原因となる。一方、これら作用機序についてはその細胞の性質から実験法が限られており、これまで十分に研究がなされているとはいえない。そこで本研究では、研究代表者である木村宏博士と協力しながら、最終的にはこれら作用機序を明らかにすることを目的に、まずは以下に挙げるような新しい方法論の開発に主眼を置いた研究を行っている。



- 1、個体レベルでの動的クロマチン解析のためのツールづくり、および細胞分化過程におけるクロマチン構造変換の定量化に関する研究。
- 2、受精卵、初期胚を用いた再構成ポリヌクレオソームの機能発現に関する研究。
- 3、各種ヒストンバリエント、クロマチン関連タンパク質のノックアウト、ノックインマウスの作製。
- 4、ゲノム編集技術を応用した人為的エピジェネティック操作技術の開発。

計画研究オ **クロマチン機能を保証する核膜の構造と分子基盤** (代表者: 情報通信研究機構・原口)
研究分担者: 浅川 東彦 (大阪大学 生命機能研究科・助教)



核膜は、クロマチンが正常に機能するための重要な足場となる。分裂酵母は核膜タンパク質として核膜孔複合体や LEM ドメインタンパク質を保持する一方、ラミンのホモログを持たないことから、真核生物の中でも限られた核膜タンパク質のセットしか持たない生物と考えられる。そこで分裂酵母で保存されている核膜タンパク質についてクロマチン機能における役割について研究する。分裂酵母は、相同組換えによって、内在性の遺伝子を改変することが可能である。蛍光タンパク質などの標識と融合した核膜タンパク質や遺伝子破壊を使った解析によって、核膜タンパク質と核構造、DNA 複製、染色体分配 (mitosis および meiosis) との関係の詳細に調べる。クロマチン機能との関連を検討することにより、進化的に保存された核膜タンパク質の機能を明らかにし、核膜タンパク質がクロマチン機能を保証する分子メカニズムを明らかにする。

核膜タンパク質の遺伝子破壊や標識した核膜タンパク質による解析をおこない、核膜タンパク質とクロマチンの機能の関係について理解する。

計画研究キ **核膜孔複合体構成因子・核輸送因子によるクロマチン動態制御の解明**
研究分担者: 岡 正啓 (大阪大学 生命機能研究科・助教) (代表者: 医薬基盤研・米田)

核膜孔を形成する核膜孔複合体は、約 30 種類のヌクレオポリンと呼ばれる構成因子から成る巨大な複合体である。それぞれのヌクレオポリンは固有の動態を示し、特に動的ヌクレオポリンは核膜孔と核質、あるいは細胞質の間をシャトリングしながら核-細胞質間輸送制御に関わっている。近年、Nup98 などの動的ヌクレオポリンが核内でクロマチンと物理的・機能的な相互作用を示し、遺伝子発現の調節に関与することが報告されている。また、急性骨髄性白血病(AML)の原因の一つが、Nup98 遺伝子が染色体転座することによって形成される融合遺伝子産物であることが分かってきた。本領域研究では、ヌクレオポリン融合遺伝子産物による遺伝子発現制御メカニズムの解析を中心にヌクレオポリンと動的クロマチン構造との関連を明らかにし、病態メカニズムの解明を目指す。

研究分担者：安原 徳子（大阪大学 生命機能研究科・特任助教）

輸送因子 importin α は ES 細胞の未分化維持と運命決定に不可欠である。また、importin α は酸化や紫外線照射などのストレス条件下で核集積すると共にクロマチンと相互作用を示し、遺伝子発現制御に関わる。さらに importin α をコードする遺伝子のうち KPNA2 は、各種腫瘍組織やがん細胞のマーカー遺伝子であることが知られている。これらから、importin α はクロマチンとの相互作用を通し、ゲノムワイドな遺伝子発現制御に大きなインパクトを持つ可能性が高い。本研究では、核輸送因子とクロマチンの相互作用によるクロマチン変化とがん化メカニズムの解明を目指す。

計画研究ク **核内構造体とのインタープレイによるクロマチン動構造の制御**（代表者：熊本大学・斉藤）

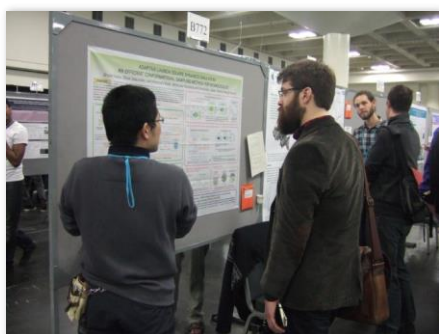
研究分担者：原田 昌彦（東北大学大学院 農学研究科・准教授）

細胞核内には様々なアーキテクチャが存在しており、これらはクロマチンダイナミクスに影響を与え、エピジェネティック制御に重要な役割を有する。本研究では、核内アーキテクチャの構成因子として、アクチンファミリーに注目する。また、核アーキテクチャと相互作用するクロマチン因子の候補として、ヒストンバリエーションの解析を行う。これらの分子機能を解明すると共に、これら分子に結合するペプチドや化合物を利用することによって、核アーキテクチャネットワークの人為的なマニピュレーションを試みる。これらの研究を、研究代表者（斉藤）による組織細胞・疾患細胞のハイコンテンツ画像解析結果と組み合わせることで、発生・分化過程におけるダイナミックな核・クロマチン構造変化の機序を明らかにすると共に、核内構造変化を伴う疾患を標的とした創薬の基盤確立を目指す。

2. 学会報告

📍アメリカ生物物理学会年会 (Biophysical Society 58th Annual meeting)

久々のアメリカ西海岸への出張である。出発当日は、大雪に見舞われて閑空にたどり着けるか心配されたが、無事サンフランシスコにたどり着いた。本年会には約 7,000 名の研究者が集まり、4,500 以上の研究発表がなされた。出張者らは、開発した計算手法及びその応用例について発表すると同時に、新たなシミュレーション手法やクロマチン（ヌクレオソーム）に関する情報収集を行った。クロマチン関係では、H2A.Z がらみの発表が多かったように思う。H2A.Z はヌ



クレオソームを不安定化することが知られているが、その要因は外側の DNA (Outer turn) との相互作用にあると考えられている。しかし、Yale 大学の Regan グループは、光ピンセットを用いた一分子実験から、内側の DNA (Inner turn) との相互作用の違いによるというこれまでとは異なる主張をしており、興味深かった。しかし、具体的にヌクレオソーム分子に何が起きているかは依然として謎のままで、シミュレーション研究の必要性を強く感じた。また、転写因子との絡みでは、p53 が H3 以外のヒストンテールとの結合を好み、裸の DNA よりヌクレオソーム状態の方が強く結合することや ISW1a と SWI/SNF が 転写因子の結合に対して異なるレスポンスを示すことなど多くの興味深い発表があった。年会では、これらの研究発表者やボスと直に議論することができ、寒い日本を忘れて有意義な 1 週間を過ごすことができた。

(日本原子力研究開発機構・河野 秀俊)



📖 Keystone シンポジウム

(Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology “Transcriptional Regulation”)

2014年2月4日から2月9日にかけてニューメキシコ州サンタ・フェにて開催された Keystone シンポジウムの Transcriptional Regulation に参加した (参加者: 大川、原田、前原)。セッション初日では、preinitiation complex (PIC) assembly について、DNA と共に TBP, TFIIA, B, … とこれらが順次組み上がってゆく様子を取得し、それらを連結したムービーによって PIC 形成の連続的・動的な構造モデルを説明する、タンパク質構造の時系列解析とも言える Eva Nogales 博士の衝撃的なプレゼンテーションで幕を開けた。こうした RNA Polymerase II の研究発表を主軸としながらも、幅広い対象・アプローチからの研究発表が行われた。Job Dekker 博士の Hi-C 技術を用いたクロマチンの空間構造の解析は、ゲノム上に多数存在する空間ドメイン (~100kbp) である Topologically associated Domain (TAD) が、細胞周期によりダイナミックに形成・消失する研究結果が紹介された。また近年提唱されたばかりの Super-enhancer に続き、細胞分化に伴って enhancer 領域が拡大する Stretch-enhancer という新しい regulatory elements の概念までも提唱され、近年の大規模配列解析技術の発達により明らかとなってきたクロマチンの動的構造の解明はいよいよ世界的な盛り上がりを見せてきていると感じた。

また今回のシンポジウムは、Cancer Epigenetics とのジョイントセッションとして開催されており、プロモドメイン阻害剤である JQ1 に代表される、エピジェネティック創薬への展開も発表が相次いだ。今後ともクロマチン構造から様々なアウトプットが期待できるエキサイティングな会であった。

(九州大学・大川研 前原 一満)

3. 今年度の成果

原著論文

領域内共同研究による論文が 6 報発表されました。

The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA

Takeuchi K, Nishino T, Mayanagi K, Horikoshi N, Osakabe A, Tachiwana H, [Hori T](#), [Kurumizaka H](#) and Fukagawa T
Nucleic Acids Res, 2014, 42(3): 1644-1655

Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin

Arimura Y, [Kimura H](#), Oda T, Sato K, Osakabe A, Tachiwana H, Sato Y, Kinugasa Y, Ikura T, Sugiyama M, Sato M and [Kurumizaka H](#)
Sci Rep, 2013, 3: 3510

Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2

Horikoshi N, Sato K, Shimada K, Arimura Y, Osakabe A, Tachiwana H, Hayashi-Takanaka Y, Iwasaki W, Kagawa W, [Harata M](#), [Kimura H](#) and [Kurumizaka H](#)

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2013, 69(Pt 12): 2431-2439

Genetically encoded system to track histone modification in vivo

Sato Y, Mukai M, Ueda J, Muraki M, Stasevich TJ, Horikoshi N, Kujirai T, Kita H, Kimura T, Hira S, Okada Y, Hayashi-Takanaka Y, [Obuse C](#), [Kurumizaka H](#), Kawahara A, [Yamagata K](#), Nozaki N and [Kimura H](#)

Sci Rep, 2013, 3: 2436

Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast

[Asakawa H](#), Yang HJ, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, [Tokunaga M](#), Iwamoto M, Hiraoka Y and [Haraguchi T](#)
Nucleus, 2014, 5(2), doi: 10.4161/nucl.28487

Human TREX component Thoc5 affects alternative polyadenylation site choice by recruiting mammalian cleavage factor I

Katahira J, Okuzaki D, Inoue H, [Yoneda Y](#), Maehara K and [Ohkawa Y](#)

Nucleic Acids Res, 2013, 41(14): 7060-7072

その他 35 報の論文が発表されました。

Structure of human nucleosome containing the testis-specific histone variant TSH2B

Urahama T, Horikoshi N, Osakabe A, Tachiwana, and [Kurumizaka H](#)

Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2014, doi:10.1107/S2053230X14004695

Mislocalization of the Centromeric Histone Variant CenH3/CENP-A in Human Cells Depends on the Chaperone DAXX

Lacoste N, Woolfe A, Tachiwana H, Gareau AV, Barth T, Cantaloube S, [Kurumizaka H](#), Imhof A and Almouzni G

Mol Cell, 2014, 53(4): 631-644

Compensatory functions and interdependency of the DNA-binding domain of BRCA2 with the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex

Al Abo M, Dejsuphong D, Hirota K, Yonetani Y, Yamazoe M, [Kurumizaka H](#) and Takeda S

Cancer Res, 2014, 74(3): 797-807

Telomeric repeats act as nucleosome-disfavouring sequences in vivo

Ichikawa Y, Morohashi N, Nishimura Y, [Kurumizaka H](#) and Shimizu M

Nucleic Acids Res, 2014, 42(3): 1541-1552

Functional analyses of the C-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad52 protein

Kagawa W, Arai N, Ichikawa Y, Saito K, Sugiyama S, Saotome M, Shibata T and [Kurumizaka H](#)

Nucleic Acids Res, 2014, 42(2): 941-951

Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes

Iwasaki W, Miya Y, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tachiwana H, Shibata T, Kagawa W and [Kurumizaka H](#)
FEBS Open Bio, 2013, 3: 363-369

Homologous pairing activities of two rice RAD51 proteins, RAD51A1 and RAD51A2

Morozumi Y, Ino R, Ikawa S, Mimida N, Shimizu T, Toki S, Ichikawa H, Shibata T and [Kurumizaka H](#)
PLoS One, 2013, 8(10): e75451

Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites of DNA damage

Shima H, Suzuki H, Sun J, Kono K, Shi L, Kinomura A, Horikoshi Y, Ikura T, Ikura M, Kanaar R, Igarashi K, Saitoh H, [Kurumizaka H](#) and Tashiro S
J Cell Sci, 2013, 126(Pt 22): 5284-5292

Conclusive evidence of the reconstituted hexasome proven by native mass spectrometry

Azegami N, Saikusa K, Todokoro Y, Nagadoi A, [Kurumizaka H](#), Nishimura Y and Akashi S
Biochemistry, 2013, 52(31): 5155-5157

Interaction between basic residues of Epstein-Barr virus EBNA1 protein and cellular chromatin mediates viral plasmid maintenance

Kanda T, Horikoshi N, Murata T, Kawashima D, Sugimoto A, Narita Y, [Kurumizaka H](#) and Tsurumi T
J Biol Chem, 2013, 288(33): 24189-24199

Adaptive lambda square dynamics simulation: an efficient conformational sampling method for biomolecules

Ikebe J, Sakuraba S and [Kono H](#)
J Comput Chem, 2014, 35(1): 39-50

A novel method for purification of the endogenously expressed fission yeast Set2 complex

Suzuki S, Nagao K, [Obuse C](#), Murakami Y and Takahata S
Protein Expr Purif, 2014, 97c: 44-49

CxxC-ZF domain is needed for KDM2A to demethylate histone in rDNA promoter in response to starvation

Tanaka Y, Umata T, Okamoto K, [Obuse C](#) and Tsuneoka M
Cell Struct Funct, 2014, doi.org/10.1247/csf.13022

Human origin recognition complex binds preferentially to G-quadruplex-preferable RNA and single-stranded DNA

Hoshina S, Yura K, Teranishi H, Kiyasu N, Tominaga A, Kadoma H, Nakatsuka A, Kunichika T, [Obuse C](#) and Waga S
J Biol Chem, 2013, 288(42): 30161-30171

NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies

Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, [Kimura H](#), Yokoi T, Nakagawa S, Benard M, Fox AH and Pierron G
Mol Biol Cell, 2014, 25(1): 169-183

Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL1 mutations

Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, Oki T, Maehara A, Isobe M, Tsuchiya A, Harada Y, Harada H, Ochiya T, Aburatani H, [Kimura H](#), Thol F, Heuser M, Levine RL, Abdel-Wahab O and Kitamura T
J Clin Invest, 2013, 123(11): 4627-4640

JMJD1C, a JmjC domain-containing protein, is required for long-term maintenance of male germ cells in mice

Kuroki S, Akiyoshi M, Tokura M, Miyachi H, Nakai Y, [Kimura H](#), Shinkai Y and Tachibana M
Biol Reprod, 2013, 89(4): 93

Epigenetics of eu- and heterochromatin in inverted and conventional nuclei from mouse retina

Eberhart A, Feodorova Y, Song C, Wanner G, Kiseleva E, Furukawa T, [Kimura H](#), Schotta G, Leonhardt H, Joffe B and Solovei I
Chromosome Res, 2013, 21(5): 535-554

Enhanced chromatin dynamics by FACT promotes transcriptional restart after UV-induced DNA damage

Dinant C, Ampatzidis-Michailidis G, Lans H, Tresini M, Lagarou A, Grosbart M, Theil AF, Van Cappellen WA, [Kimura H](#), Bartek J, Fousteri M, Houtsmuller AB, Vermeulen W and Marteiijn JA
Mol Cell, 2013, 51(4): 469-479

Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence

Sadaie M, Salama R, Carroll T, Tomimatsu K, Chandra T, Young AR, Narita M, Perez-Mancera PA, Bennett DC, Chong H, [Kimura H](#) and Narita M
Genes Dev, 2013, 27(16): 1800-1808

In aggressive variants of non-Hodgkin lymphomas, Ezh2 is strongly expressed and polycomb repressive complex PRC1.4 dominates over PRC1.2

Abd Al Kader L, Oka T, Takata K, Sun X, Sato H, Murakami I, Toji T, Manabe A, [Kimura H](#) and Yoshino T
Virchows Arch, 2013, 463(5): 697-711

Pericentric heterochromatin generated by HP1 protein interaction-defective histone methyltransferase Suv39h1

Muramatsu D, Singh PB, [Kimura H](#), Tachibana M and Shinkai Y
J Biol Chem, 2013, 288(35): 25285-25296

Latrunculin A treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful development of cloned embryos

Terashita Y, [Yamagata K](#), Tokoro M, Itoi F, Wakayama S, Li C, Sato E, Tanemura K and Wakayama T
PLoS One, 2013, 8(10): e78380

Non-destructive handling of individual chromatin fibers isolated from single cells in a microfluidic device utilizing an optically driven microtool

Oana H, Nishikawa K, Matsuhara H, Yamamoto A, Yamamoto TG, [Haraguchi T](#), Hiraoka Y and Washizu M
Lab Chip, 2014, 14(4): 696-704

Puromycin resistance gene as an effective selection marker for ciliate Tetrahymena

Iwamoto M, Mori C, Hiraoka Y and [Haraguchi T](#)
Gene, 2014, 534(2): 249-255

The role of chromosomal retention of noncoding RNA in meiosis

Ding DQ, [Haraguchi T](#) and Hiraoka Y
Chromosome Res, 2013, 21(6-7): 665-672

Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin

Fujita N, Morita E, Itoh T, Tanaka A, Nakaoka M, Osada Y, Umemoto T, Saitoh T, Nakatogawa H, Kobayashi S, [Haraguchi T](#), Guan JL, Iwai K, Tokunaga F, Saito K, Ishibashi K, Akira S, Fukuda M, Noda T and Yoshimori T
J Cell Biol, 2013, 203(1): 115-128

The role of Importin-betas in the maintenance and lineage commitment of mouse embryonic stem cells
Sangel P, Oka M and Yoneda Y
FEBS Open Bio, 2014, 4: 112-120

Quantitative regulation of nuclear pore complex proteins by O-GlcNAcylation
Mizuguchi-Hata C, Ogawa Y, Oka M and Yoneda Y
Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(12): 2682-2689

Importin alpha subtypes determine differential transcription factor localization in embryonic stem cells maintenance
Yasuhara N, Yamagishi R, Arai Y, Mehmood R, Kimoto C, Fujita T, Touma K, Kaneko A, Kamikawa Y, Moriyama T, Yanagida T, Kaneko H and Yoneda Y
Dev Cell, 2013, 26(2): 123-135

The transcriptional cofactor MCAF1/ATF7IP is involved in histone gene expression and cellular senescence
Sasai N, Saitoh N, Saitoh H and Nakao M
PLoS One, 2013, 8(7): e68478

Generation of a Monoclonal Antibody for INI1/hSNF5/BAF47
Harada A, Hayashi M, Kuniyoshi Y, Semba Y, Sugahara S, Tachibana T, Ohkawa Y and Fujita M
Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 2014, 33(1): 49-51

Production of a Monoclonal Antibody for C/EBPbeta: The Subnuclear Localization of C/EBPbeta in Mouse L929 Cells
Harada A, Okazaki E, Okada S, Tachibana T and Ohkawa Y
Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 2014, 33(1): 34-37

The PPARgamma locus makes long-range chromatin interactions with selected tissue-specific gene loci during adipocyte differentiation in a protein kinase A dependent manner
Leblanc SE, Wu Q, Barutcu AR, Xiao H, Ohkawa Y and Imbalzano AN
PLoS One, 2014, 9(1): e86140

Wnt signaling regulates left-right axis formation in the node of mouse embryos
Kitajima K, Oki S, Ohkawa Y, Sumi T and Meno C
Dev Biol, 2013, 380(2): 222-232

英文総説

6 報 (印刷中も含む)

英文著書

Molecular Communication.
Nakano T, Eckford AW, and Haraguchi T
Cambridge University Press, 2013

和文総説・著書 (分担執筆)

18 報 (印刷中も含む)

和文著書 (編書)

染色体と細胞核のダイナミクス
平岡 泰・原口 徳子/編
化学同人, 2013 (全 224 ページ)

アウトリーチ活動

34 件

特許

1 件 (出願中)

受賞

河野 秀俊 2013 年 10 月 28 日 第 2 回 BIOPHYSICS 論文賞
米田 悦啓 2013 年 11 月 12 日 2013 年 武田医学賞

どなたでも自由に参加できます!
一般公開シンポジウム

DNAをやつる生物のしくみ
2013年8月25日(日) 13:00~17:25
千里ライフサイエンスセンター 5階 サイエンスホール
予報中央館より徒歩5分
主催: 新学術領域「遺伝情報」新学術領域「クロマチン情報」
連絡先: 山崎一夫 (大阪大学) 06-6879-8372
参加費無料 事前登録不要 入場無料 駐車場有 (有料)

プログラム

12:30 ~開場~
I. 新しい(視点で捉えた)生物学
平岡 泰 (大阪大) あいさつ 「この夏、遺伝情報がおもしろい!」
平岡 泰 (大阪大) 「DNAの情報を子孫に伝える仕組み」
河野 秀俊 (原子力機構) 「スーパーコンピュータで読める分子の動き」
佐々木 万寿洋 (東工大) 「分子1個を光で観る生命のダイナミクス」

II. 遺伝子生物学
田代 忠 (阪大) 「放射線から遺伝情報を守る」
大川 敏行 (九州大) 「生命も動物も未知の層層を解明する」
山崎一夫 (大阪大) 「親子DNAを調べることでよく見てくると知る」

III. 面白い生物学
原口 徳子 (情報通信研究機構) 「ふたつの種を使い分ける動物の生物学的ヒミツ」
木村 直 (大阪大) 「遺伝子にかけた「0」を盗んで」
船橋 仁志 (早稲田大) 「細胞内のDNAの正体を分子のレベルで見ると」
船橋 仁志 おわりに 「クロマチン情報編みだつておもしろい!」
17:25 ~終了~

大阪大学
Osaka University



4. 今後の予定

① 高等研カンファレンス 2014「Chromatin Decoding」

期間：5月12-15日

場所：公益財団法人国際高等研究所

主催：公益財団法人国際高等研究所

後援：文部科学省、日本学術振興会、京都府、関西経済連合会、関西文化学術研究都市推進機構、日本細胞生物学会、日本生化学学会、日本分子生物学会、日本RNA学会

協力：文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「動的クロマチン構造と機能」「ゲノム複製、修復、転写のカップリングと普遍的なクロマチン構造変換機構」「転写サイクル」「ゲノムを支える非コードDNA領域の機能」

詳しくはこちらをご覧ください。

http://www.ias.or.jp/research/ias_conference/2014/info.html

② 高等研レクチャー2014「Chromatin Decoding」

期間：5月16日 13:30-17:00

場所：東京大学伊藤謝恩ホール（東京都文京区本郷7-3-1）

主催：公益財団法人国際高等研究所

詳しくはこちらをご覧ください。

http://www.ias.or.jp/research/ias_lecture/2014/info.html

③ 「クロマチン動構造と創薬」セミナー

期間：5月23日 13:00より

場所：医薬基盤研究所 (<http://www.nibio.go.jp/introduction/access.html>)

主催：文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「動的クロマチン構造と機能」

詳しくはクロマチン動構造HPでお知らせします。

④ 第14回 日本蛋白質科学会年会

期間：6月25-27日

場所：ワークピア横浜/横浜ホールマリネリア

本領域協賛のワークショップ「クロマチンの動的構造とDNA機能発現機構」（オーガナイザー：胡桃坂・河野）があります。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.aeplan.co.jp/pssj2014/index.html>

⑤ 新学術領域「動的クロマチン構造と機能」若手の会、班会議

期間：7月2日 若手の会、7月3-5日 第2回 班会議

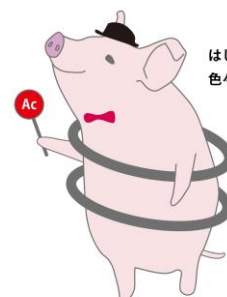
場所：サホロリゾート (<http://www.sahoro.co.jp/>)

編集後記：

STAP細胞の衝撃の発表から、現在に至るまでの展開は驚くばかりです。再発防止のために、関係諸機関には徹底的な調査と厳正なる処置を期待します。現在噴出している様々な問題に対して真摯に対応することができなければ、日本の科学の未来は暗いのではないのでしょうか。もちろん、我々研究者の意識も高めていく必要があることは言うまでもありません。

さて、新学術領域「クロマチン動構造」の初年度が終了しました。領域内共同研究による論文の発表も相次ぎ、好いスタートを切ったと思います。2年目には、融合研究をさらに推進することで、クロマチン研究のブレイクスルーとなるような仕事が発表できることを願っています。また、4月からは公募班が加わりますが、今後どのように領域の研究が発展していくか楽しみです。

HiKi

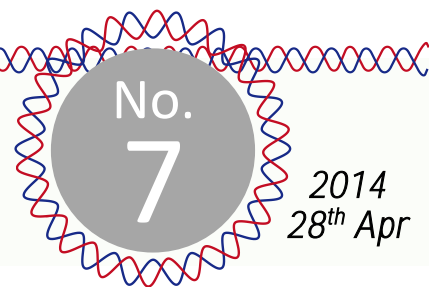


はじめまして。ヒストんです。
色々と、トントン拍子にうまくいくとイイですね。

クロマチン動構造

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp>

News Letter



1. 2014 年度にあたって・胡桃坂仁志領域代表
2. 研究組織（公募班）の紹介
3. 学会報告: Keystone Symposia “Chromatin Mechanisms and Cell Physiology”（大阪大・山縣研 上田 潤）
4. 成果紹介: 原口徳子班員らの領域内共同研究による論文が、Nucleus 誌に掲載されました。
5. 異動のお知らせ
6. 今後の予定

1. 2014 年度にあたって・胡桃坂仁志領域代表

新学術領域研究「動的クロマチン構造と機能」の2014年度が、19名の公募研究班員の皆さんをお迎えしてスタートいたしました。本領域も2年目となり、これから多くの共同研究が企画され、発展して行くことと思います。その支援として、5月には創薬を見据えたミーティングを、7月には領域全体の班会議を計画しております。このような機会を、是非、共同研究や各々の研究の発展にお役立ていただければと思っております。

クロマチン構造の動的変動が“同一ゲノム配列からの細胞分化の原動力である”という考えのもと、「クロマチン動構造」領域は研究を進めております。クロマチン動構造という、一見漠然とした研究に立ち向かうためには、多様なアプローチ、広範な視点、そしてブレークスルーを生み出すような研究対象を共有することが重要です。公募研究班員をお迎えしたことで、計画班に不足していた研究手法や研究対象が加わり、領域全体が格段にパワーアップした状態となりました。皆さんと力を合わせて、“クロマチン動構造”のベールをはがし、遺伝情報の機能制御メカニズムを解明したいと願っております。領域内・外を問わず、本領域がクロマチン研究の新たな展開の礎となれることを期待しています。

2. 研究組織（公募研究）の紹介

所属	役職等	名前	研究課題
東北大学・加齢医学研究所	教授	田中 耕三	ヘテロクロマチン結合複合体によるゲノム安定性の動的制御
群馬大学・医学系研	准教授	滝沢 琢己	ニューロンにおける細胞核構造と遺伝子発現における核ラミナの意義
東京大学・工学系研	准教授	小穴 英廣	マイクロ流体デバイスを用いたゲノムサイズクロマチンの高次構造変化実時間観察
東京大学・総合文化研究科	准教授	大杉 美穂	マウス卵割期胚におけるNC比制御と核形態・クロマチン状態変化の解析
京都大学・放生研	教授	松本 智裕	核膜アンカーに依存したセントロメアクロマチン制御機構の解析
京都大学・原子炉実験所	教授	杉山 正明	C V-S A N S法による変異型ヌクレオソームの詳細構造解析
大阪大学・生命機能研究科	教授	平岡 泰	相同染色体対合に必要な非コードRNAが動的クロマチン構造と相互作用する仕組み
島根大学・医学部	助教	加藤 太陽	転写と共役したクロマチン初期化制御の解析
広島大学・原医研	教授	田代 聡	ゲノム修復における動的クロマチン構造変換
長崎大学・医歯薬学研究科	教授	甲斐 雅亮	新規エピゲノム分析によるクロマチン変異の解析
熊本大学・自然科学研究科	教授	斉藤 寿仁	血液細胞分化におけるクロマチン動構造の研究

首都大学東京・理工学研究科	教授	廣田 耕志	ノンコーディングRNA転写と共役したクロマチン構造変化の制御機構の解明
横浜市立大学・生命医科学	特任助教	小田 隆	X線小角散乱を用いた再構成クロマチンの動的構造解析
明星大学・理工学部	准教授	香川 亘	ヌクレオソームの多様な構造を解析する技術の開発
近畿大学・農学部	教授	佐渡 敬	長鎖ノンコーディングRNAのクロマチンターゲティング
国立遺伝学研究所	教授	荒木 弘之	DNA複製フォークでのクロマチン構造維持機構
公益財団法人がん研究会	部長	広田 亨	セントロメア・クロマチンの動構造の分子基盤と意義
独立行政法人理化学研究所	研究員	新富 圭史	分裂期染色体凝縮におけるコアヒストン・ヌクレオソームの役割
独立行政法人理化学研究所	主任研究員	今本 尚子	核膜孔複合体と輸送運搬体によるimportin輸送制御：細胞核機能から高次生命へ

3. 学会報告

📍Keystone Symposia “Chromatin Mechanisms and Cell Physiology”

2014年3月23～28日までドイツ、オーベルストドルフで開催された Keystone Symposia “Chromatin Mechanisms and Cell Physiology”に参加しました。今回の参加者は合計150名程度（日本からの参加者は筆者を含めて9名）と、Keystoneとしては規模が小さかったものの、この分野の研究者がスキージャンプの開催地として有名なオーベストドルフに集結しました。5日間にわたって、クロマチン、エピジェネティクスに関わる最新の知見が紹介されました（口頭発表47題、ポスター発表91題）。

エピジェネティック因子の生化学、遺伝学で名を馳せた功名家の方々、多少ぎこちないながらもChIP-seq解析のデータの話をする姿を見て、次世代シーケンサーを用いた解析がすっかりエピジェネティクス研究のスタンダードになったことを実感しました。一方、ビッグデータを扱った話題が多い中、大学院生のKathryn Malecekさん（シカゴ大のAlex Ruthenburg研）がTEDばりのトークで、カラムを使った昔ながらの蛋白質精製法で、5-ヒドロキシメチルシトシンと5-ホルミル化シトシンに結合する蛋白質を精製したという話はとても強く印象に残りました（残念ながら蛋白質名は明かされませんでした）。エピジェネティクスに関わる役者はだいたい出揃ったかと思っておりましたが、まだまだ新しい役者が加わりそうな予感がしました。

Keystone と言えばスキーですが、今回スキーは遠慮して、学会主催のハイキングに参加しました。オーベルストドルフの周りの小高い丘を4時間ほど歩いたのですが、その道中に参加者の方々と話す機会がありました。ドイツ開催ということもあって、多くの方はヨーロッパから来られていましたが、大学院生を含む参加者の多くが一人で参加されていることに驚きました。一人で参加すると必然的に周りの人と話をする機会が増え、学会期間中に仲良くなっていく様子でした。国際学会では日本人はとかく集まってしまうがちですが、是非一人で参加して、多くの学会参加者と交流することをお勧めします。



会場での夕食会の様子。会議中に知り合ったシンガポールの南洋理工大学の Eugene さん（左）と筆者（右）。

今回がドイツで最初の Keystone Symposia だったので、オーガナイザーの一人の Jenuwein 博士が、学生の発表に対して積極的に質問したり、参加者の様子を気遣ったりしている姿がとても印象に残りました。終わってみれば、とてもスムーズで魅力的な会議だったように思います。また、トークをした研究者の多くが、ユーモアたっぷりに自身の研究を楽しそうに話をする姿を見て、どんなに技術が進歩して研究が大規模になっても、サイエンスが個々人の研究者の個性によって形作られているものであることを改めて実感しました。個人的には色々な方との出会いがあったり、自分の研究に対してフィードバックがあったりと、とても有意義な会議でした。機会があれば是非参加したいと思います。（大阪大学・山縣研 上田 潤）

※本記事は、日本エピジェネティクス研究会会報にも掲載されています。



シンポジウムが行われた会場（オーベルストドルフ・ハウス）。

4. 成果紹介

原口徳子班員・浅川東彦班員らの論文が、Nucleus 誌に掲載されました。これは、徳永万喜洋班員、平岡泰班員（公募）らとの領域内共同研究による成果です。

Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

Asakawa H, Yang HJ, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, *Hiraoka Y, *Haraguchi T.

Nucleus. 2014, 5(2), [Epub ahead of print]

<https://www.landesbioscience.com/journals/nucleus/article/28487/>

核膜孔複合体は、細胞核—細胞質間の物流の要となっている細胞構造である。核移行に関与するのはもちろんのこと、クロマチン構造や機能にも重要な核構造のひとつと考えられる。これまで、出芽酵母とヒト細胞を中心として、核膜孔複合体の構成因子や構造が明らかにされてきたが、これらの知見が全ての真核生物に共通であるか不明であった。我々は、遺伝子操作がしやすい分裂酵母を用いて、核膜孔複合体を構成するヌクレオポリンのそれぞれに GFP を融合した GFP 融合タンパク質を発現する細胞株を作成した。これらの細胞では内在するそれぞれのヌクレオポリン遺伝子を GFP 融合遺伝子で置換しているため、それぞれのヌクレオポリンは GFP 融合タンパク質としてのみ発現する。GFP を検出することによ

って生細胞蛍光イメージングと生化学によってそれぞれのヌクレオポリンの量を定量したところ、ヒトや出芽酵母で提唱されている発現量とは異なる量比で発現するヌクレオポリンがあることがわかった（図 1）。特に核膜孔複合体の中でも複合体形成の基盤と考えられる Nup107-Nup160 サブコンプレックスの量比は、ヒトや出芽酵母ではすべての構成タンパク質が 1 分子ずつ集まってひとつのユニットを作るといわれているのに対し、Nup107（ヒトでは Nup107）などは極端に少なく、Nup132（ヒトでは Nup133）は極端に多いということが明らかとなった。ヌクレオポリンとして同定した 31 種類のタンパク質のうち、15 種類が生育に必須であった。残り 16 種類の非必須タンパク質のうち、約半数が高温または HU や TBZ 存在下での増殖に必要であること、また 11 種類が減数分裂過程に必要であることが初めて分かった（図 2）。

これらのことはヌクレオポリンがゲノムの安定性にも必須の役割をもつことを示唆する。我々の論文に関連するイラストがジャーナル表紙に選ばれた。

5. 異動のお知らせ

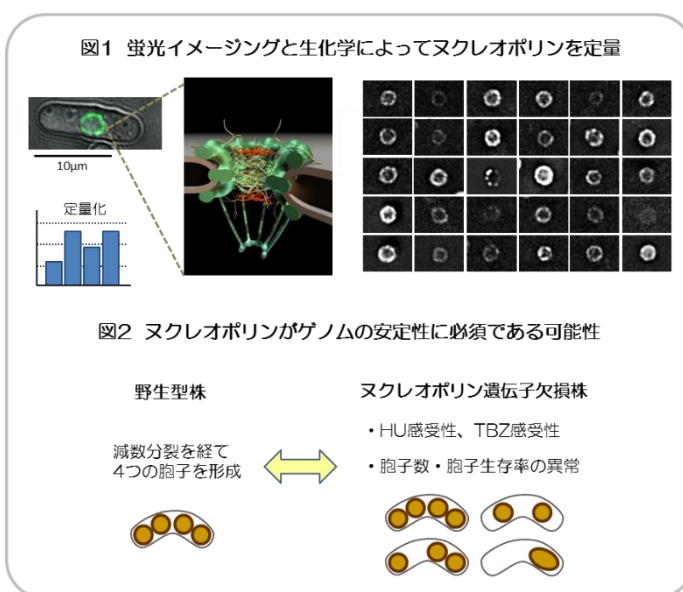
名前：岡 正啓

所属：独立行政法人 医薬基盤研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト

身分：プロジェクトリーダー

E-mail：moka(a)nibio.go.jp 【(a)をアットマークに変換してください】

コメント：大阪大学在籍中は皆様にお世話になり、ありがとうございました。医薬基盤研でも核膜孔構成因子によるクロマチン動態制御の研究を進めてまいります。また今後、皆様の研究と創薬との連携に何かお役にたてるのが出来ればと思います。引き続きよろしくお願いたします。



名前：安原徳子

所属：独立行政法人医薬基盤研究所、細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト

身分：特任研究員

E-mail：nyasuhara(a)nibio.go.jp 【(a)をアットマークに変換してください】

コメント：大阪大学在籍中は大変お世話になりました。今後も、核輸送因子と細胞運命決定機構の研究を進めてまいりますので、引き続きよろしく申し上げます。

6. 今後の予定

①「クロマチン動構造と創薬」セミナー

5月23日（金）に医薬基盤研究所で「クロマチン動構造と創薬」セミナーを開催します。
領域内の研究と創薬との連携を高める目的で、領域内や医薬基盤研の研究者による発表となります。

13：30～13：45 米田 悦啓（計画班員）
13：45～14：15 仲 哲治（医薬基盤研）
14：15～14：40 岡 正啓（計画班員）
14：40～15：05 木村 宏（計画班員）
---休憩（15分）---
15：20～15：45 斉藤 典子（計画班員）
15：45～16：10 山縣 一夫（計画班員）
16：10～16：35 小布施 力史（計画班員）
16：35～17：00 今本 尚子（公募班員）

※場所：医薬基盤研究所 大会議室

こちらのサイトをご参照ください。<http://www.nibio.go.jp/introduction/access.html>

大阪モノレール・彩都西駅から徒歩10分、あるいは、千里中央か北千里からタクシーの利用となります。申し訳ございませんが研究所内は駐車場のスペースが限られておりますので、自家用車をご遠慮願います。

※新学術領域外の方で参加を希望される方は4月30日までに医薬基盤研・岡（moka(a)nibio.go.jp【(a)をアットマークに変換してください】宛に、お名前・ご所属・ご連絡先をメール願います。

※領域内の方には別途、参加申し込み法をご連絡致します。

よろしく願いいたします。

独立行政法人 医薬基盤研究所 岡 正啓、米田 悦啓

お問い合わせ先：

〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8

独立行政法人 医薬基盤研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト
岡 正啓

電話：072-641-9012

E-mail: moka(a)nibio.go.jp 【(a)をアットマークに変換してください】

② 第14回 日本蛋白質科学会年会

期間：6月25-27日

場所：ワークピア横浜/横浜ホールマリネリア

本領域協賛のワークショップ「クロマチンの動的構造とDNA機能発現機構」（オーガナイザー：胡桃坂・河野）があります。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.aeplan.co.jp/pssj2014/index.html>

③ 新学術領域「動的クロマチン構造と機能」若手の会、班会議

期間：7月2日 若手の会、7月3-5日 第2回 班会議

場所：サホロリゾート (<http://www.sahoro.co.jp/>)

編集後記：春になり新年度がスタートしました。最近、自然の風景よりも、研究費の報告書と申請書の時期によって季節の変わり目を感じる事が多くなってきたのが少し悲しいところです。それはともかく、公募班が加わり、今後どのように「クロマチン動構造」領域が発展していくのか楽しみです。次号から、公募班の研究紹介を掲載していく予定ですので、引き続きよろしく申し上げます。HiKi

クロマチン動構造

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp>

News Letter

No.
8

2014
23rd Jun

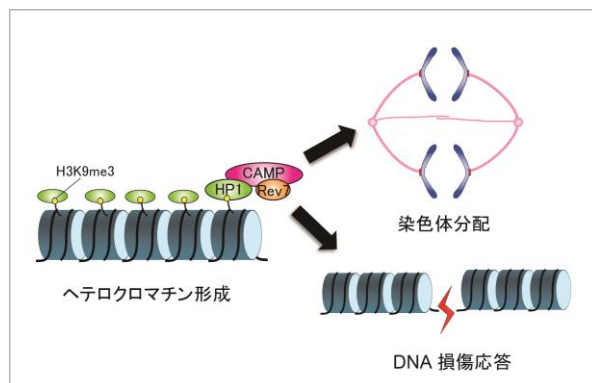
1. 公募班の研究紹介: 東北大学・田中 耕三、群馬大学・滝沢 琢己、東京大学・小穴 英廣
2. アウトリーチ活動: 「クロマチン動構造と創薬」セミナー
3. 学会報告: EMBO Workshop “Histone variants”
4. 成果紹介: ①胡桃坂領域代表らの領域内共同研究による論文が、Biophysical Journal 誌に掲載されました。
②山縣班員らの領域内共同研究による論文が、Stem Cell Reports 誌に掲載されました。
5. 今後の予定

1. 公募班の研究紹介

【ヘテロクロマチン結合複合体によるゲノム安定性の動的制御】

研究代表者：田中 耕三（東北大学 加齢医学研究所）

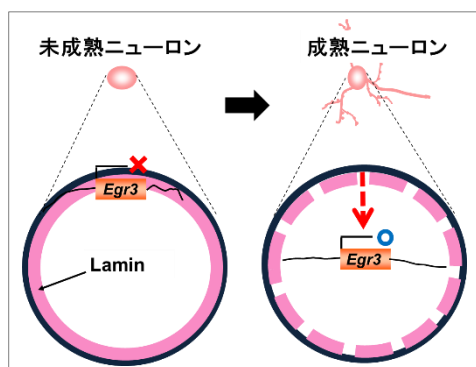
ヘテロクロマチン形成はクロマチン動構造制御の重要な一翼を担っている。これに関与する HP1 (heterochromatin protein 1) は遺伝子発現の制御だけでなく、DNA 損傷応答や染色体分配にも関与することが知られており、ゲノムを足場にした種々の機構を動的に制御していると考えられる。われわれが DNA 損傷応答に関連する Rev7 と結合する分子として同定した CAMP (C13orf8) は、染色体分配に必須の役割を果たしている (EMBO J 2011)。興味深いことに Rev7 と CAMP は、HP1 と共に複合体を形成し、これはヘテロクロマチン領域のマーカであるトリメチル化されたヒストン H3 の 9 番目のリジンに結合する主要な複合体であることが知られている。そこで本研究では、クロマチン構造変化と DNA 損傷応答、染色体分配の関連について解析し、CAMP, REV7, HP1 からなる複合体がこれらの機能を統合している可能性について検討する。



【ニューロンにおける細胞核構造と遺伝子発現における核ラミナの意義】

研究代表者：滝沢琢己（群馬大学 医学系研究科）

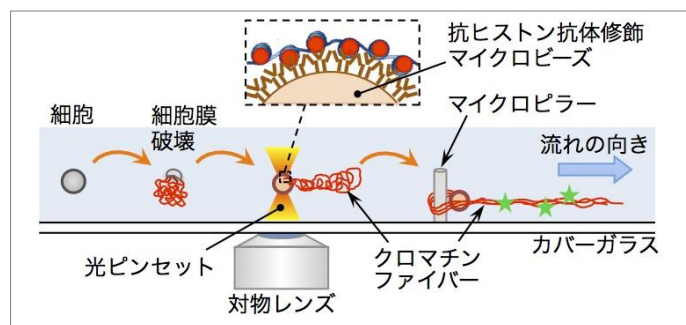
遺伝子の発現制御には、転写因子の活性化に加えて、エピジェネティクスなどのクロマチン修飾が大きな役割を果たしている。近年、これに加えて遺伝子座の空間配置も重要であることがわかってきている。我々はこれまで、クロマチン制御や遺伝子座の空間配置という観点から神経幹細胞からのアストロサイト分化の機構を検討してきた。さらに、当領域の前身である「遺伝情報場」では、細胞分裂を経ずに劇的に形態や機能を変化させるニューロンの成熟過程に着目し、マウス染色体 14 番の Egr3 遺伝子を中心とした領域に成熟依存的に発現が増加する遺伝子が集簇していること、およびその領域が成熟に伴い核膜周辺から内側へと位置を変えることを明らかにしてきた。一方、成熟ニューロンは機能的な LaminB を欠くことを発見した。本研究班では、ニューロン成熟過程における核ラミナの分子構成の変化とそれに伴う機能変化が、遺伝子座の核内配置や、核膜周辺に配置する遺伝子の発現制御に重要な役割を有しているのではないかと仮説を立て、それを検証することで、新規な観点からニューロンの機能を明らかにしたいと考えています。



【マイクロ流体デバイスを用いたゲノムサイズクロマチンの高次構造変化実時間観察】

研究代表者：小穴 英廣（東京大学 工学系研究科）

「顕微鏡下で、狙った1個の細胞からクロマチンファイバーを断片化させずに取り出し、その場でクロマチンファイバー高次構造変化やクロマチンファイバーとタンパク質との相互作用の様子を直接観察する」という単分子レベル生化学実験は、ライフサイエンス研究分野において、非常に有用な研究手段のひとつとなることが期待される。本研究課題においては、上記実験操作を可能とするマイクロ流体デバイスを開発し、個々の細胞から取り出したクロマチンファイバーを、微細操作によって伸展させた形態且つ基板から浮かせた状態で配置・固定する技術を確認する。次いで、このクロマチンファイバー周囲の溶液組成を変化させることで、クロマチンファイバーに高次構造変化をおこし、その様子を実時間観察することにより、クロマチンファイバー高次構造の階層性とその動態を明らかにすることを旨とする。本研究課題遂行を通して顕微鏡下におけるシングルセル・単分子レベル生化学実験手法を確認し、動的クロマチン構造と機能の解明に貢献する。



2. アウトリーチ活動

「クロマチン動構造と創薬」セミナー

2014年5月23日（金）、医薬基盤研究所（大阪府茨木市）にて本新学術領域主催の「クロマチン動構造と創薬」セミナーが開催されました。本領域の計画班、公募班、医薬基盤研、ならびに外部からの参加者があり、会場は多くの聴衆で埋まりました。セミナーは米田悦啓班員によるアカデミア創薬の現状や医薬基盤研の取り組みの話で幕を開けました。医薬基盤研・免疫シグナルプロジェクトリーダー仲哲治先生による自己免疫疾患の発表がそれに続き、さらに本領域からは 木村宏班員、斉藤典子班員、山縣一夫班員、小布施力史班員、今本尚子班員、岡正啓（筆者）がそれぞれ自身の研究と病態や創薬との関連を中心に発表を行いました。多くの基礎研究が病態研究と結びついていることを改めて認識させられた一方で、基礎研究と臨床研究や創薬の間にはまだ隔たりがあると実感しました。また、お互いを知る機会になるこのような発表の場は非常に有意義なものであると感じました。終了後は医薬基盤研のラウンジで懇親会があり、大阪平野を一望しながらリラックスしたムードで会話が弾みました。

（医薬基盤研・岡 正啓）



3. 学会報告

EMBO Workshop “Histone variants”

2014年6月2日から4日まで、フランス東部ストラスブールの Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC) で EMBO Workshop “Histone variants”が開催されました。本領域からは、招待講演として胡桃坂仁志代表が参加し、原田昌彦班員、大川恭行班員と若手の会から越阪部、堀越、有村（以上、胡桃坂班）、日下部、奥（以上、原田班）、前原、原田（以上、大川班）らがポスター発表演者として参加しました。今回が2回目となる会の冒頭で、会場となった IGBMC について、オーガナイザーの Maria-Elena

Torres-Padilla 博士が、年間 200 報以上もの論文報告を行う非常にアクティブな研究所であることを紹介していました。本研究会も、ヒストンバリエントを題材に、この研究所で行われるに相応しい活発な議論が交わされました。

今回のミーティングでは、特に CENP-A (CenH3) の研究をリードする研究者が多く招待されており、濃密な議論がなされました。H3 バリエントの 1 つである CENP-A は、セントロメアに局在し、細胞分裂時の正常な染色体分配に必要とされています。Ben Black 博士は、CENP-C の結合によりヒト CENP-A ヌクレオソーム構造が安定化することを、構造生物学的視点をもとに示しました。さらに、胡桃坂代表は CENP-A ヌクレオソームの末端に位置する DNA のフレキシブルな構造が、セントロメアタンパク質 CENP-B の安定的な結合に寄与するという機能的側面を報告しました。このように、本会において、ヒストンバリエントの“構造”と“機能”が徐々にリンクしてきていると感じ取ることが出来ました。ヒストンバリエントをクロマチンへと取り込むヒストンシャペロンの役割についても新たな知見が報告されました。Geneviève Almouzni 研究室の立和名博士は、CENP-A 特異的ヒストンシャペロン (ヒトでは HJURP) が CENP-A 以外のセントロメアタンパク質の集積にも寄与することを示しました。また Philippe Collas 博士によれば、H3.3-H4 の二量体が核内構造の一つである PML ボディ内にヒストンシャペロン DAXX を介して取り込まれた後に、テロメアへと移行しますが、その補助をするために、DNA 結合因子 DEK が、他のヒストンシャペロンによる H3.3 の無差別的 (promiscuous) なクロマチンへの取り込みを妨害しているという研究報告がありました。これは、取り込みに妨害的な因子の存在が、ヒストンバリエントの局所的なゲノム領域への取り込みを支えるという新しい観点を与えてくれるものでした。Paul Talbert 博士の進化的に CENP-A を介さずに染色体分配を行う生物の報告や大川班員の新規マウスヒストン H3 バリエントの報告は、様々な生物種、組織における細胞機能におけるヒストンバリエントの選択性が重要であることを窺わせるものでした。本会は 2 回目ということでしたが、ヒストンオクタマーを形成する H2A, H2B, H3, H4 とリンカーヒストン H1 に対する各バリエントが多様に存在し異なる機能を持つという事実は、ヒストンバリエントが今後も活発に研究が行われるべきトピックの 1 つであり、今後も会を重ねるごとに会が盛り上がっていくであろうことを感じました。我々、領域若手メンバーも世界をリードする研究を進めていく決意を新たにした有意義な会でした。(早稲田大学・胡桃坂研・有村泰宏、九州大学・大川研・前原一満、原田哲仁)



本会場である IGBMC にて

※本記事は、日本エピジェネティクス研究会会報にも掲載されています。

4. 成果紹介

① 胡桃坂仁志領域代表らの論文が、Biophysical Journal 誌に掲載されました。これは、杉山正明班員、小田隆班員らとの領域内共同研究による成果です。

Distinct Features of the Histone Core Structure in Nucleosomes Containing the Histone H2A.B Variant.

Sugiyama M, Arimura Y, Shirayama K, Fujita R, Oba Y, Sato N, Inoue R, Oda T, Sato M, Heenan RK, Kurumizaka H.

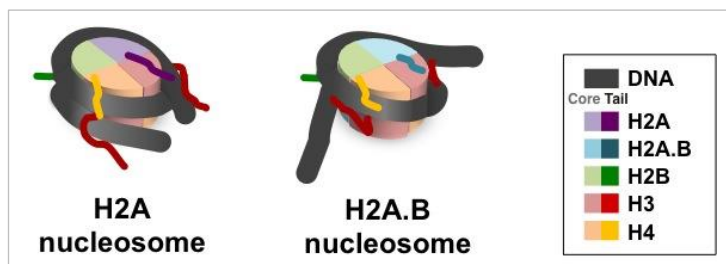
Biophys J. 2014, 106; 2206-2213.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349514003907#>

クロマチンの基本ユニットであるヌクレオソームは、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 各 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体の周りに約 150 塩基対の DNA が 1.7 周かけて巻き付いた構造体である。ヒストンにはバリエントが多数存在し、特定のゲノム領域において主要型のヒストンがヒストンバリエントへ交換されることによって、その領域のクロマチン動態が変化し、転写をはじめとする DNA 機能発現が制御されると考えられている。

本研究において、我々はヒストンバリエントを含むヌクレオソームの構造を、中性子小角散乱(SANS)によって解析した。SANS 解析の長所は、水溶液中の DNA-タンパク質複合体に含まれる“DNA”と“タンパク質”の構造情報を個別に取得可能な点である。今回、ヒストンバリエント H2A.B を含むヌクレオソームと主要型 H2A を含むヌクレオソーム溶液構造解析を行った。その結果、先に報告した X 線小角散乱(SAXS)解析の結果と一致して、H2A.B ヌクレオソームでは、ヌクレオソーム DNA の末端がヒストン 8 量体から剥がれて広がった構造を形成することが分かった。各ヒストンの N 末端側や C 末端側にはヒストンテールとよばれる領域が存在し、ヌクレオソーム DNA の外側に飛び出し、特定の構造を持たないフレキシブルな状態で存在している。今回、H2A.B ヌクレオソームでは、ヒストンのテール領域の構造が変化し、タンパク質部分では全体としてコンパクトになっていることを明らかにした (図)。

H2A.B は哺乳類特異的な H2A バリエントであり、昨年度、本領域の木村、小田、杉山、胡桃坂らによって、DNA 転写活性化領域、DNA 複製領域、DNA 損傷領域といった、ヌクレオソームの再編成が活発なクロマチン領域に取り込まれることを報告したものである。今後は、H2A.B の特殊なヒストンテール構造が、DNA の転写・複製・修復にどのように寄与するのかを明らかにしたい。



② 山縣一夫班員らの論文が、Stem Cell Reports 誌に掲載されました。これは、大川恭行班員、木村宏班員らとの領域内共同研究による成果です。本研究成果は日刊工業新聞、日経バイオテック、産経新聞、サイエンスポータル、朝日新聞、日本経済新聞に取り上げられました。

Heterochromatin Dynamics during the Differentiation Process Revealed by the DNA Methylation Reporter Mouse, MethylRO

Ueda J, Maehara K, Mashiko D, Ichinose T, Yao T, Hori M, Sato Y, Kimura H, Ohkawa Y, *Yamagata K.

Stem Cell Rep., 2, 910-924.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213671114001490>

DNA のメチル化は、遺伝子刷り込み (ゲノミックインプリンティング) や X 染色体の不活性化、トランスポゾン転移の抑制など正常な発生過程に重要な役割を果たしているほか、その制御異常が発がんなどの様々な疾患と関連しており、DNA メチル化を指標とした抗がん剤の開発も進められている。また、妊婦の生活習慣が胎児の DNA のメチル化状態に影響を及ぼし、ひいては生まれてくる子どもの疾病罹患率に影響を及ぼすとの研究報



図 1. DNA のメチル化を可視化したメチローマウスの新生児 (黄矢印)。励起光を照射してフィルターを介して見ると全身が赤く光る (右図)。

告もあり、ストレス応答や環境の変化によっても DNA のメチル化がダイナミックに変化するものとして認識されるようになってきている。しかし、これまでの DNA メチル化解析法では、細胞を変性処理してしまうことから、ある瞬間の DNA のメチル化状態しか解析できず、単一の細胞や個体レベルでの動態変化を追跡する手法の開発が求められていた。

本研究では、メチル化 DNA を認識する MBD1 (Methyl-CpG Binding Domain protein 1) たんぱく質の MBD ドメインに赤色蛍光たんぱく質を融合したプローブを全身で発現するマウスを作成し、「メチロー (MethylRO : methylation probe in ROSA26 locus)」と命名した (図 1)。このメチローマウスより得られた細胞を、低侵襲性ライブセルイメージング技術と組み合わせることによって、マウスの着床前初期胚発生過程及び ES 細胞の樹立過程の長期間ライブセルイメージングを行ったところ、細胞分化が進行するに伴って特にセントロメア近傍の DNA メチル化が上昇し、かつヘテロクロマチン構造が形成されていく様子 (図

2) を捉えることができた。これらの結果から、核内の DNA のメチル化レベルの増減だけでなくクロマチン構造そのものが細胞分化の指標になり得ることが明らかとなった。このメチローマウスは、今後のエピジェネティクス研究に有用になるものと考えられる。

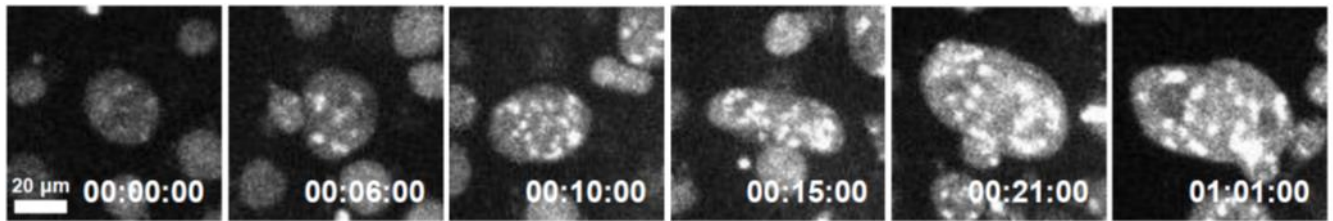


図 2. 細胞分化過程におけるメチル化 DNA の変化。受精卵から胎盤の細胞ができていく過程で、核内において DNA メチル化が上昇し、ヘテロクロマチンが形成されてゆく様子がわかる。

5. 今後の予定

① 第 14 回 日本蛋白質科学会年会

期間：6 月 25-27 日

場所：ワークピア横浜/横浜ホールマリネリア

本領域協賛のワークショップ「クロマチンの動的構造と DNA 機能発現機構」（オーガナイザー：胡桃坂・河野）があります。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.aeplan.co.jp/pssj2014/index.html>

② 新学術領域「動的クロマチン構造と機能」若手の会、班会議

期間：7 月 2 日 若手の会、7 月 3-5 日 第 2 回 班会議

場所：サホロリゾート (<http://www.sahoro.co.jp/>)

③ 第 23 回 細胞生物学ワークショップ 顕微鏡トレーニング 1-基礎から中級-

期間：8 月 4-9 日

場所：情報通信研究機構 未来 ICT 研究所（神戸）

詳しくはこちらをご覧ください。

http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131103/CellMagic/workshop/23workshop.pdf

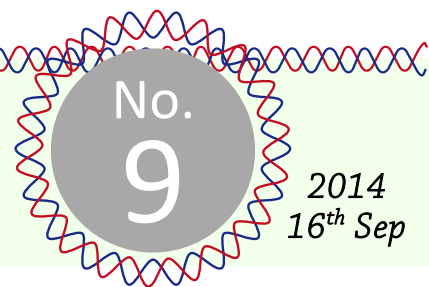
編集後記：湿りがちな季節になりましたが、研究の方は湿らずに行きたいところです。個人的には、何気なく眺めてきた太陽の塔も、もうすぐ見納めかと思うと若干いとおしく感じる今日この頃です。来月は、北海道で班会議があります。爽やかな環境で心身ともにリフレッシュできればと思います。ニュースレターでは、本号から公募研究を紹介して行きます。成果紹介や学会報告は随時受け付けておりますので、どしどしお寄せ下さい。

HiKi

クロマチン動構造

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp>

News Letter

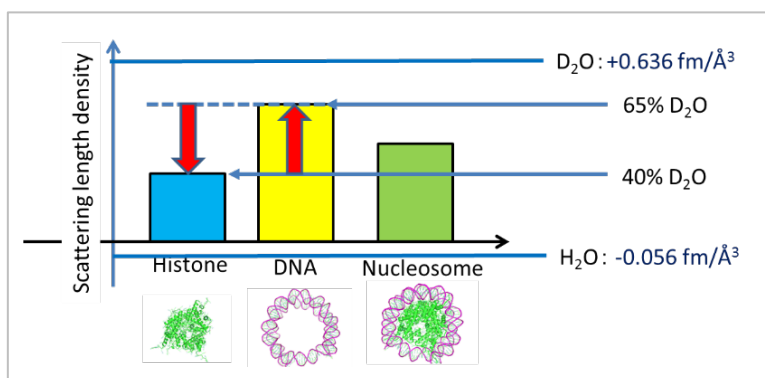


1. 公募班の研究紹介: 京都大学・松本 智裕、京都大学・杉山 正明
2. クロマチン動構造班会議・若手の会ワークショップの報告
3. 学会報告: ①Plant Genome Stability and Change、②CSHL Meeting: Nuclear Organization & Function
4. 成果紹介: 堀班員らの領域内共同研究による論文が、Developmental cell 誌に掲載されました。
5. 寄稿: ロックフェラー大学・船引 宏則
6. 異動のお知らせ
7. 今後の予定

1. 公募班の研究紹介

【CV-SANS 法による変異型ヌクレオソームの詳細構造解析】

研究代表者: 杉山 正明 (京都大学 原子炉実験所)



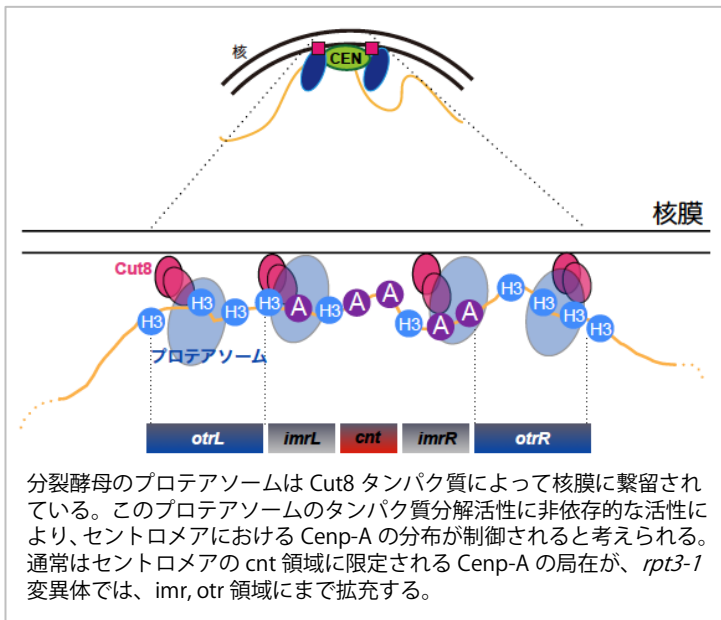
小角散乱法は低分解能ではあるが溶液中での生体分子構造を直接観測することが可能な手法である。プローブとして中性子線を用いる場合、中性子散乱における軽水素と重水素の散乱能違いを利用することができる。例えば軽水の散乱能(負)と重水の散乱能(正)は大きく異なり、両者を適当に混合することで溶媒に任意の散乱能を与えることができる。一方、生体高分子もその構成原子の違いにより散乱能が異なり、DNA とタンパク質の散乱能はそれぞれ 65%と

40%の重水の散乱能と一致する。したがって、両者の複合体であるヌクレオソームを 65%(または 40%)重水溶液中で観測すれば、複合体中のヒストン(または DNA) のみの構造を測定することができる(コントラスト変調中性子小角散乱法: CV-SANS)。筆者と胡桃坂研の共同研究チームはこの手法により H2A.B を含む変異型ヌクレオソームにおいて、ヒストンテールの配置が通常型のヌクレオソームと異なっている事を見出した。今後は他の変異型ヌクレオソームの動的構造変異の観測に適用したい。さらに、この「特定の生体分子を浮き上がらせる手法」は多くのクロマチン繊維中の単一のクロマチンの構造観測も原理的には可能である。この手法の実現の可能性も検討していきたい。

【核膜アンカーに依存したセントロメアクロマチン制御機構の解析】

研究代表者: 松本 智裕 (京都大学 放射線生物研究センター)

ほとんどの真核生物で、セントロメアは染色体あたり 1 箇所存在し、その大きさも厳密に制限されている。ヒストン H3 バリエーションである CENP-A は、セントロメアの一領域に局在し動原体形成の根幹をなす。CENP-A の局在をセントロメアの一領域に制限する機構が存在すると予測されるがその実体は不明であった。この機構の解明を目的として、分裂酵母を用いて Cnp1/CENP-A を過剰発現時に高温感受性を示す変異体のスクリーニングを行った。変異体の一つの原因遺伝子が 19S プロテアソーム調節サブユニット(19S RP)の構成因子、Rpt3 であることを明らかになった。分裂酵母 Cnp1 の局在領域はセントロメアの中央コア領域 10-20



kbに制限されているが、*rpt3-1* 変異体セントロメアにおいては40-70 kbに広がっていた。分裂酵母Rpt3は主に核膜に局在するが、変異Rpt3-1は核膜局在が低下し、さらにセントロメアに対する結合も同様に低下した。Rpt3がセントロメアに結合することによってCnp1の取り込みの制御がなされ、結果として適切なCnp1の局在領域が制限されると考えられる。Rpt3を含むプロテアソームは、タンパク質分解活性に非依存的なクロマチンリモデリング活性により、転写制御やDNA損傷修復に機能することが種々の生物で示されている。おそらく、本研究で示したプロテアソームによるCnp-Aヌクレオソームの分布制御も、類似の作用機序によるものであると考えられる。

2. クロマチン動構造班会議・若手のワークショップの報告

新学術領域研究「クロマチン動構造」第2回班会議・総括班会議報告

「クロマチン動構造」第2回班会議が、7月3日から5日の日程で、北海道サホロリゾートホテルで開催されました。今年度から公募班の研究もスタートし、計画班代表、計画班分担の報告も合わせて、32題の研究報告がありました。参加者も58名と、第1回班会議と比べて大幅に増えたと同時に、今回は若手シンポジウムから引き続いての開催となったこともあり、学生や若手研究者の参加者数と存在感が増していました。公募研究の開始によって、クロマチン動構造をさらに多様な手法と対象から解明する研究が報告されました。すべての報告について、活発な質疑応答が行われ、その中には新たな共同研究の可能性も多く指摘されました。また、「アウトリーチを考える」と題した特別講演を、高崎健康福祉大学・片山豪博士が行いました。講演では、高校生のセントラルドグマの理解を深めるための転写・翻訳を可視化する教材を例に意義や問題点、さらに本領域における先端研究を教材化する意義についても紹介がありました。今後、本領域でもこのようなアウトリーチ活動を活発に展開していく必要性を感じました。これらの講演の合間に設けられたコーヒブレーク、意見交換会、フリーディスカッションでは、じっくりと腰を据えた班員間の意見交換が頻繁に行われ、今後の活発な共同研究によりクロマチン動構造の理解がさらに深まることへの期待が感じられました。班会議の期間中、2回の総括班会議が開かれ、第2回一般公開シンポジウム(2015年1月12日、千里ライフサイエンスセンター)、第3回班会議(2015年5月14日~16日、北海道)、クロマチン動構造国際会議(2015年8月23日-26日、淡路夢舞台国際会議場)について、日程と開催地を決定し、その概要についても意見交換がされました。

また、参加した評価委員からは、本領域の活動と今回の班会議について、以下のコメントがありました。「班員の研究分野のバランスが良い。質疑応答も活発で、厳しい意見が出ることもあったが、全体的な雰囲気は良かった。」「グループ間の緊密な共同研究・ネットワークをもとに成果が着実につつある。」「本領域外への情報発信の積極的な姿勢がうかがえた。」「情報公開や公開シンポジウムを積極的に進めている。」「班会議の場で若手研究者に研究室マネジメントのノウハウを伝えていくことも必要ではないか。」

班会議期間中には北海道の大自然に触れる企画も用意されており、参加者はそれぞれに北の大地に癒され、また新たな研究活力をインスパイアされて、それぞれの研究室に戻っていききました。最後に、今回の班会議をオーガナイズした小布施班員と研究室メンバーの皆様、お疲れ様でした。

(東北大学・原田昌彦)



第2回 若手の会「クロマチン動構造 若手交流ワークショップ」



班会議に先立ち、同じサホロリゾートにて若手の会主催の「クロマチン動構造 若手交流ワークショップ」が開催されました。今回が実質的には初めての交流会となりましたが、自己紹介を兼ねた研究紹介、研究不正をテーマにした座談会、英語論文作成講座、エクスカッション、と充実した内容でおこなわれました。開催後のアンケートでは87%が「とても良かった/良かった」という感想でした。

2014年7月2・3日の2日間に渡り、北海道の十勝サホロリゾートにて、本領域の第2回若手の会「若手交流ワークショップ」が開催されました。第1日目には本ワークショップに参加した27名の若手会のメンバーが口頭発表をしました。今年度から、若手の会に多くの新メンバーが加わったこともあり、冒頭に自己紹介を含めた形式で発表が進められました。今回は27名もの大勢の若手研究者が発表するだけあって、研究手法も様々でした。超解像顕微鏡を用いたイメージング技術、質量分析を用いたプロテオミクス解析、試験管内でのヌクレオソーム再構成系、ChIP-seqなど各ラボ独自の手法を駆使して研究が進められており、聴衆は発表に終始惹き付けられていました。どの発表においても研究の導入部分から現状までが丁寧に説明されていたため、質疑応答も活発に交わされ、今後の研究の発展が大きく期待されました。以下に発表のいくつかを紹介します。

真核生物のゲノムDNAは、ヒストン8量体の周囲にDNAが巻き付いたヌクレオソームを構造基盤とし、それらが更に高度に折り畳まれたクロマチンとして核内に収納されています。発生・分化が進み、個体が形成されていく過程では、ヒストン修飾の変動に伴ってクロマチン構造も動的に変化し、遺伝子発現が調節されています。佐藤優子会員は、ヒストン修飾の生体イメージングを可能にすることで、個体発生に伴うヒストン修飾のダイナミクスについて報告し、それらヒストン修飾の変動のタイミングと転写との関連性について議論が展開されました。また、ヒストンバリエーションの組み合わせによっても、クロマチンの構造や機能が制御されており、ヒストンバリエーションの過剰発現や変異は発がん等の原因となることも明らかになりつつあります。有村泰宏会員はヒストンバリエーションおよび変異型ヒストンを含むヌクレオソームを試験管内で再構成し、生化学的・構造学的解析から、ヌクレオソームレベルでのクロマチン構造について報告しました。

ヒストン修飾やバリエーションのほかに、DNAのメチル化状態によってもクロマチン構造や転写調節は制御されています。上田潤会員はメチル化されたDNAを認識するMBD1タンパク質にレポーターを融合した遺伝子を全身性発現するマウス個体とライブイメージングを組み合わせることにより、発生過程を通してDNAのメチル化状態を視覚的に示しました。今後は、細胞分化時においてDNAのメチル化状態により構成されるヘテロクロマチンの動態を解析することなどが期待されています。

細胞がストレスにさらされDNA損傷が生じた場合においても、クロマチン構造は動的に制御されることが注目されています。真核生物には二重鎖DNA切断損傷の修復機構として、相同組換え修復や非相同末端結合修復が備わっており、特に相同組換え修復はDNA損傷を正確に修復するために必須な機構です。しかし、修復時のクロマチンの高次構造の変化や修復が行われる場所については未解明な点が多く残されています。堀越保則会員、福戸敦彦会員は超解像顕微鏡を用いて従来の光学顕微鏡の10倍もの分解能を実現させ、核内ドメインの詳細な構造解析を可能にしました。これにより、損傷クロマチン動態を詳細に解析し、DNA損傷の修復機構の解明に取り組んでいることを報告しました。発表後の懇親会では発表時間内だけでは終えることのできなかったディスカッションや普段の研究生活などについても話が及び、和やかな雰囲気ですることができました。懇親会後半になると、山縣一夫先生（大阪大学）を囲んでの座談会が行われ、研究の取り組み方について深く議論しました。

2日目には木村宏先生（東京工業大学）による「英語で正確に表現するために」と題した英語論文作成講座が開催されました。ここでは、英語論文作成時において、主張の表現の仕方や誤りがちな微妙なニュアンスの違い、更にはパラグラフを意識することの大切さを



教わりました。講座を終えたあとには、サホロの美しい自然を散策し、若手研究者間の交流を深めました。本ワークショップでは若手研究者による活発な発表や質疑応答のみならず、英語論文の作成講座、研究の取り組み方についての議論なども行われ、我々参加者にとって、今後の研究生活において大変有意義な会となりました。(東京大学・大杉研 渡邊大士)

3. 学会報告

Plant Genome Stability conference 2014



2014年7月17-21日まで、“Plant Genome Stability and Change 2014”が開催されました。本領域からは、招待講演者として胡桃坂仁志領域代表が参加し、小林(胡桃坂班)がポスター発表者として参加しました。本会議は、アメリカ西海岸、アシロマの“Asilomer conference center”で行われました。アシロマと言えば、1975年にポール・バークらによって行われた、アシロマ会議を思い浮かべる方が多いかと思います。その科学史で有名な場所での、ミーティングに参加できたことは非常に感慨深く、過去を想像せずにはいられませんでした。

ミーティングは約100人程度の小規模で行われ、日本からの参加者も数多く見られました。また、国内企業の方が最新の技術や知識の吸収のために、訪れている様子が伺えました。本会議では、題名どおり、植物におけるゲノムの安定的維持及び、次世代への遺伝的継承について活発に議論がなされました。セッションは主に、「クロマチン構造」、「減数分裂」、「DNA 損傷応答及び修復」の三項目にわかれ、議論が交わされました。まず、ミーティングはPlenary speakerとしてHenikoff博士を迎え、始まりました。Henikoff博士は酵母や線虫をはじめとした、CenH3 特異的なクロマチン構造に関する報告をしました。減数分裂のセッションでは、ChIP-seq法を用いたゲノムワイドな解析が目立ち、組換えホットスポットやキアズマの形成部位に関する報告がなされていました。Pawlowski博士は、トウモロコシの組換えホットスポットにおいては、既に動物細胞で組換えホットスポットのマーカーと知られている、H3K4me3のヒストン翻訳後修飾が見られることを報告しました。また、Chales博士は、シロイヌナズナにおけるRAD51及びDMC1の機能的差異を遺伝学的解析及び細胞学的解析から示しました。さらに、胡桃坂代表は、イネにおけるRAD51及びDMC1両者の機能的差異を生化学的解析より示しました。DNA損傷応答のセッションでは、転写因子であるSOG1の報告が興味深いものでした。SOG1は動物細胞におけるp53と類似した機能を有しているのですが、そのアミノ酸の保存性は低く、植物独自の進化的変遷を辿っていることが示されました。会議の後半では、植物におけるゲノム編集技術に関する報告がなされました。特に、近年急速に発達しているCRISPER/Cas9を用いたゲノム編集技術の改良や応用例について議論が交わされ、ポスターセッションでも特にこのゲノム編集技術に関する報告が多い印象でした。植物は、酵母と比較してノックアウト株を作製するのに時間を要することから、効率的なゲノム編集技術の重要だと言えます。

今回は植物の学会への初参加でしたが、ポスター発表では海外の研究者の方々に興味を持って頂き、助言を頂くなど大変貴重な体験を経ることができました。また、会議を通して、植物は動物とは異なる独自の進化を遂げていることから、動物からは知り得ない生命現象を発見しうる宝庫であるように感じました。今回のミーティングは、自分の中の視野が大きく開けた有意義なものとなりました。また機会があれば是非参加してみたいと思います。(早稲田大学・胡桃坂研 小林航)

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Nuclear Organization & Function

2014年8月19日から23日まで、アメリカニューヨーク州ロングアイランドにあるCold Spring Harbor研究所で開催された“2014 meeting on Nuclear organizations & Function”に参加致しました。研究所は、多くの緑と海に囲まれた非常に自然豊かな場所にあり、建築物にはDNAのらせん構造やリボソームのタンパク合成を模した工夫などがあり、研究の歴史と創造性を感じました。休憩時間に散歩するにもとても気持ちがよく、この様な環境であれば研究にも集中でき、アイデアもたくさん浮かぶのではないかと思います。



ミーティング会場からワイン&チーズへの散策道。
キャンパスは緑にあふれていました。

ミーティングの内容は、細胞周期と DNA 修復、核膜や核膜孔複合体、核内 RNA、エピジェネティクス、発生と疾患など多岐に渡り、動物に限らず、植物を対象にした研究もありました。私は細胞核内構造体の形成と機能に関心があり、特に核小体に関する発表が興味深かったです。核小体の形成にはポリメラーゼ I による rRNA の転写が必要ですが、Maiwen Caudron-Herger 博士らは、アクチノマイシン D によるポリメラーゼの阻害によっても核小体構造が変化することから、単離した核小体の RNAseq を行い、核小体形成に関わる因子として Alu 配列をもつ RNA (AluRNAs) を同定しました。AluRNAs は、核小体タンパクである B23/NPM や C23/NCL と結合し、rRNA の転写活性にも関与していました。これまでに、rDNA から転写されるノンコーディング RNA が、

rDNA のヘテロクロマチン構造の維持や核小体ストレス応答に関わるということが報告されています。今回、rDNA 以外の領域からも核小体の形成や機能に関わる RNA が転写されることが明らかになり、核小体とその外部とのインタープレイによって機能することが示されました。これ以外にも、Hi-C や ChIA-PET による解析データや、ゲノム編集を応用し CRISPR labeling によってクロマチン動態を可視化するなど、新規技術を用いた研究も印象的でした。Lamina Associated chromatin Domains (LADs) を同定した Bas van Steensel 博士は、一細胞レベル行った DamID の結果を報告されました。近年、一細胞や一分子レベルでの遺伝子発現や核内局在の追跡が可能になったことに驚くと同時に、膨大に得られるデータの統計処理など、今後はドライな解析技術の理解と習得が必要であることを、改めて実感しました。

ポスター発表も、とても活発に行われていました。私にとっては海外で初めての発表でしたが、拙い英語ながら、夢中で説明しディスカッションができたこと、異なる国や分野であってもサイエンスを共有できたことは、とても貴重な経験になりました。今回は日本人の参加も多く、アメリカやヨーロッパでの研究や生活の違いについて、話を聞くことができたのも大変貴重でした。またミーティング全体を通して、女性研究者の発表がとても多かったことも印象的でした。どの方も意欲的に研究され、そしてエレガントで、とても励みになりました。

(熊本大学・齊藤(典)研 松森はるか)



蛋白質 3次元モデル像の前にて

4. 成果紹介

① 堀班員らの論文が、Developmental cell 誌に掲載されました。これは、木村班員との領域内共同研究による成果です。

Histone H4 Lys 20 mono-methylation of the CENP-A nucleosome is essential for kinetochore assembly

Hori T, Shang W H, Toyoda A, Misu S, Monma N, Ikeo K, Molina O, Vargiu G, Fujiyama A, Kimura H, Earnshaw W C and Fukagawa T.

Developmental Cell, 2014, 29; 740–749.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580714002810>

動原体は、遺伝情報を安定に次世代細胞へ維持・継承する過程で重要な役割を担う。動原体が形成されるセントロメアのゲノム領域には、ヒストン H3 のバリエーションである CENP-A が存在し、セントロメア形成において重要な働きをしていることがすでに指摘されている。しかし、CENP-A が取り込まれるだけでは、機能的なセントロメアの形成には十分ではない。これまで我々の研究グループは、ニワトリ DT40 細胞を用いた染色体工学技術を活用して実験的にネオセントロメアを誘導すること、およびセントロメアタンパク質の異所局在化による人工セントロメアを作成することに成功し、セントロメア構築メカニズムの一端を明らか

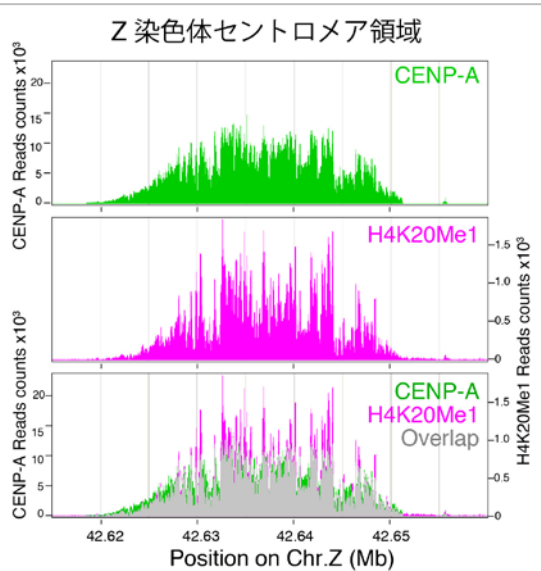


図 1. CENP-A と良く似たピークパターンを示す H4K20me1 修飾

ニワトリ Z 染色体のセントロメア領域の ChIP-seq マッピング。ヒストン修飾 H4K20me1 は、セントロメア特異的ヒストンバリエント CENP-A と極めて良く似たピークパターンを示す。

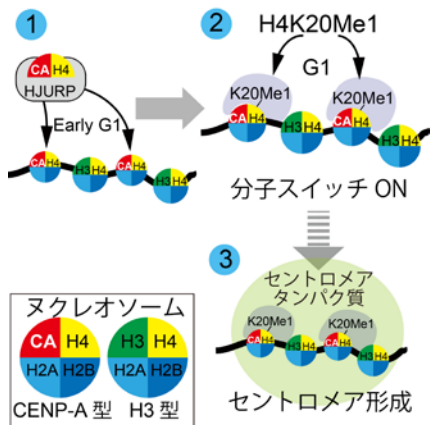


図 2. セントロメア形成のモデル

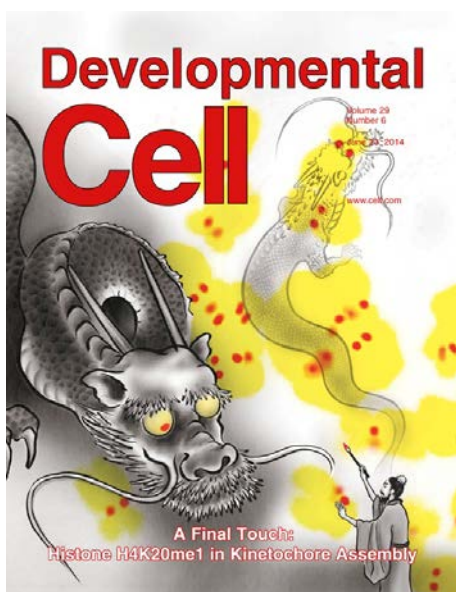
1) CENP-A が HJURP の介在でセントロメア領域へ取り込まれる。2) CENP-A ヌクレオソーム内の H4 の 20 番目のリシン残基がモノメチル化される (分子スイッチ ON)。3) 分子スイッチを引き金にセントロメア形成がおこる。

にしてきた。今回、これら実験系をさらに活用し、セントロメア構築の分子スイッチとして機能するヒストン修飾を見いだした。

はじめに、各種ヒストン修飾抗体を利用した網羅的 ChIP-seq 解析を行ない、CENP-A と極めて良く似たピークパターンを示すヒストン修飾「ヒストン H4 の 20 番目の Lys 残基のモノメチル化 (H4K20me1)」を見いだした (図 1)。詳細な生化学的解析を行なった結果、細胞周期の G1 期初期に CENP-A がクロマチンに取り込まれた後、CENP-A ヌクレオソーム内の H4K20 が速やかにモノメチル化されることが明らかになった (図 2)。この H4K20me1 修飾がセントロメア形成にどのように関わるかをさらに解析した。これを調べるため、セントロメア領域の H4K20me1 修飾を特異的に除去できる実験法を開発した。まず、H4K20me1 修飾の脱メチル化酵素 (PHF8) とセントロメアタンパク質 CENP-U との融合タンパク質を発現させ、セントロメア領域へ特異的に局在させた。その結果、セントロメア領域の H4K20me1 修飾を特異的になくすことに成功した。セントロメア領域で H4K20me1 修飾が起きない細胞では、セントロメア形成の目印となる CENP-A は存在した。しかし、セントロメア上に構築される構造体 (キネトコア) タンパク質である CENP-H や CENP-T が局在しなくなっていることがわかった。CENP-H や CENP-T が存在しないことでセントロメアの機能は失われ、染色体分配の異常が多数観察された。この実験から H4K20me1 修飾は、機能的なセントロメア形成に必須であると結論できた。

これらの実験結果から考察し、「セントロメア領域に CENP-A が取り込まれた後、すぐに CENP-A ヌクレオソームの H4K20 がモノメチル化される。そして、このメチル化が分子スイッチとして働き、CENP-H や CENP-T の集合を促して機能的なセントロメアが形成される」というモデルを提出した (図 2)。また、これら研究成果が評価され、掲載誌の表紙に選ばれた。

この分子スイッチを操作することによって、将来的にはがんをはじめとする染色体分配不全が原因でおこる各種遺伝性疾患の解明・治療も可能になることが期待できる。



本研究成果の掲載誌の表紙

画家がキャンバスにむけて竜の絵を書いている。目に最後の筆をいれると竜がキャンバスからとびだす「画竜点睛」のイメージ。このコンセプトは、H4K20me1 による分子スイッチを引き金にセントロメア形成がおこる、というコンセプトと類似している。

5. 寄稿

無茶すぎて誰もやらなかったヒストン H3/H4 を *Xenopus* 卵抽出液から除去するプロジェクトの顛末記 — 木村宏班員との共同研究の成果報告 —

船引 宏則 (ロックフェラー大学)

Nucleosomal regulation of chromatin composition and nuclear assembly revealed by histone depletion.

Zierhut C., Jenness C., Kimura, H., and Funabiki, H.
Nat. Struct. Mol. Biol. 2014, 21; 617-625.

光陰矢のごとし。染色体の研究を京都大学の柳田充弘教授の下で始めて 24 年。大学院時代は、染色体分離異常をおこす分裂酵母温度感受性変異株の解析が主な研究テーマの一つであった。不思議なことであるが、ヒストンは染色体構成タンパク質の主成分であるものの、当時、ヒストンの事は研究室でほとんど話題にならなかった。例外的に、セントロメアのヌクレオソーム構造をマイクロコッカルヌクレアーゼ処理法で解析されている大学院生がおられたり、短期間 FISH 法を学ぶために訪問されていた Robin Allshire さんが、セントロメアのヘテロクロマチン構造におけるヒストンアセチル化などの研究について話されたぐらいだ。

2002 年にロックフェラー大学で研究室を立ち上げ、たまたま翌 2003 年に染色体パッセンジャー複合体 (Chromosomal Passenger Complex; CPC) の新規サブユニット Dasra (Borealin) を発見したのが (Samapth et al., 2004, Cell)、私がヒストンを研究するきっかけになったことは間違いない。しかし、CPC のキナーゼサブユニットである Aurora B が M 期にヒストン H3 の 10 番目のセリン残基 (H3S10) をリン酸化することを David Allis さんが 1999 年に発表されていたということは、発表当時は大して気にとめていなかった。ところが、偶然は重なるもので、その Allis さんが 2003 年の春からロックフェラー大の教授として赴任されてこられ、早速お話させていただく機会に恵まれた。Allis さんのヒストン修飾への情熱に、私もすっかり感化されてしまい、さっそく秘蔵の抗メチル化ヒストン H3 抗体を使ったトライアル実験を試してみたことが、Aurora B の H3S10 のリン酸化が、H3 の 9 番目のメチル化を認識する HP1 を乖離する、という発見につながった (Fischle et al, 2005, Nature)。

ここにたって、漸くヒストンの M 期染色体構造や機能における役割がほとんど分かっていないことに気付いたのだが、我が研究室で使っている *Xenopus* 卵抽出液系でヒストンを操作するのはあまりにも難しいと思われた。何しろ、卵抽出液にヒストンは高濃度で含まれているし、免疫除去法を使うにしても大量の質の良い抗ヒストン抗体が必要だろう。しかし、もっと低濃度で存在していて、しかもタンパク質配列の進化的保存度が比較的ゆるいターゲットへの抗体ですら、天に祈る気持ちで作成しているのに、極めて高度に配列が保存されているヒストンに強いアフィニティをもつ抗体が簡単にできるとも思えなかった。さらに、例えヒストンを除去したとしても、もし一緒にヒストン結合タンパク質と一緒に除かれてしまえば、ヒストン除去による特異的な効果を検証するには極めて難しいと考えられた。一方で、もしこの技術的なハードルを乗り越えれば、*Xenopus* 卵抽出液の系でしか検証できないヒストンの機能にアプローチできるのではないかとも思った。*Xenopus* 卵抽出液では、様々なクロマチン機能を、転写非依存的に再構成できるからである。生きた細胞のシステムでは、ヒストン操作は転写に対する影響は免れないので、例え M 期染色体機能に影響が出たとしても、転写異常による二次的な効果を否定することは難しい。

そんなことを考えていた 2007 年、ポスドクとして研究室に参入した Christian Zierhut に、ぼそっと「ヒストン H3 を卵抽出液から除去できて、さらに組み換えタンパク質で再構成できれいんだけどねえ」とつぶやいたら、Christian が真に受けてしまった。色々調べてみて、histone H3/H4 とシャペロン ASF1 の X 線結晶解析構造が決定されているのなら、ASF1 をアフィニティベイトとすれば H3/H4 を除去できるのではないかと主張した。様々な試行錯誤の末に、ヒト IgG の Fc 断片と ASF1 の融合タンパク質を卵抽出液に加えれば、protein A-beads によって極めて効果的に H3/H4 を除去することが分かった。そして、この方法によって H3/H4 を除去した卵抽出液では、スピンドルが形成されないことも分かった。ところが、この喜びは一瞬で砕け散ることになる。なんと、H3/H4 とともに CPC も除去されてしまっていたのだ。我々は CPC はスピンドル形成に必須であることを既に示していたので (Samapth et al., 2004, Cell)、CPC が除去されてしまったらスピンドルが形成されなくとも不思議ではない。何よりも、H3/H4 除去とともに他のヒストン結合タンパク質も除去されるのではないのかという当初の不安が的中してしまったことになった。しかし、捨てる神あれば拾う神あり。この CPC と H3/H4 の強い結合という知見が、CPC の Survivin サブユニットと、H3 の 3 番目のスレオニン残基(H3T3)のリン酸化との結合を発見する契機となった (Kelly et al., 2010, Science)。

さて、話は再び2007年に戻る。渡邊嘉典さん（東大）と深川竜郎さん（国立遺伝研）が、横浜で開かれた分子生物学学会年会のワークショップに招待して下さいました。その学会会場でたまたまお会いしたのが木村宏さん（阪大）である。木村さんとは、私が大学院生時代に染色体ワークショップを通して仲良くさせてもらっていたのが、以降あまり研究がクロスロードすることは無かった。その時、学会会場で木村さんに見せて頂いたのが、野崎直仁さん（現、モノクローナル抗体研究所）と作成されておられた数々のヒストン修飾に対するモノクローナル抗体のリストである。しかも、「どれでも、使ってくれていいよ」とおっしゃるではないか。早速、いくつかの抗体を頂き、間接蛍光などに使わせていただいた。ただ、この時は、これを利用してヒストンの免疫除去をするという発想はでなかった。

ASF1によるH3/H4除去法の問題点はCPCの共除去という点だけにとどまらなかった。ほぼ、1ヶ月に1度程度の割合で、ASF1を精製する必要があったのだ。そろそろ、潮時かなとも思ったときに、ふと木村さんのモノクローナル抗体のことが頭によぎり、2011年の3月、木村さんにコンタクトをとってみることにした。「木村さんのモノクローナル抗体の中に、H3/H4をXenopus卵抽出液から除去できるものがないか試させていただくことはできないでしょうか？」なんと、木村さん2つ返事で快諾していただき、早速いくつかの抗体を見繕って送って下さった。そのうち、H4の12番目のリジン残基のアセチル化（H4K12ac）抗体が、見事にH3/H4を除去することができた。以降、木村さんには何十ミリグラムという単位のアフィニティ精製された抗体を供給していただくことになる。

2011年にH3/H4を除去するプロトコルを確立したものの、組み換えH3/H4を加え直して表現型を相補しなくては使い物にならない。ところが、これが全くうまくいかなかった。まず、H3/H4のヘテロ4量体を卵抽出液に加えると、ドミナントネガティブ的に精子核の核形成を阻害してしまった。既知のH3/H4シャペロンは、H3/H4とともに一部しか除去されなかったため、残存シャペロンで何とかなるだろうという考えが甘かったようである。シャペロンの一つ、N1とあらかじめ結合させた状態でH3/H4を加えると、ドミナントネガティブ的效果は中和されたものの、組み換えヒストンをヌクレオソームに取り込ませることはできなかった。

さて、どうしたものか。この2011年、私がUCSFのAndrew Murrayラボでポストドクをしていたときからの友人であるAaron Straight (Stanford)が、セントロメア特異的なH3類似タンパク質CENP-Aと、H4、H2A、H2Bを用いてin vitroでヌクレオソームを作らせたものをビーズに結合させ、それをXenopus卵抽出液に加えるとキネトコアをビーズ上に形成することができるという画期的な論文を発表していた（Guse et al., 2011, Nature）。Aurora Bによるスピンドルチェックポイント制御に興味をもっていたので、ポストドクのDavid WynneをStraightラボに派遣し、その方法をマスターさせていた。「これが使えるのではないか？」つまり、ヌクレオソームをあらかじめin vitroで作らせたものを Δ H3/H4エキストラクトに加えれば、ヌクレオソーム形成のステップで起こっていた問題を回避できるはずである。

このやり方で、組み換えH3、H4、H2A、H2Bを用いたヌクレオソームをビーズに結合させ（ヌクレオソームビーズ）、M期の Δ H3/H4エキストラクトに加えると、ビーズからスピンドルが形成された（図）。一方、単なるDNAビーズを加えても、何も起こらない。スピンドル形成という複雑なプロセスを、組み換えヒストンを使って再構成できたということは、このH3/H4除去法によってはCPCを初めとする多くのヒストンタンパク質に影響がなかったということだ！間期ではヌクレオソームビーズ上に核膜形成が観察された。おもしろいことに、核膜の結合自体には、ヌクレオソームは必要でなく、DNAだけで充分であるが、核膜孔の形成にはヌクレオソームが必要であった。さらにChristianは、ヌクレオソームが核膜孔形成に必要なのはRCC1とELYSという二つのタンパク質がヌクレオソームに直接結合する必要があることを示した。

足かけ7年かけて作り上げたシステムであるが、これによって、ヌクレオソームがクロマチン構成タンパク質に直接及ぼす影響を生理的条件下で検証することが可能になった。質量分析法を組み合わせることにより、タンパク質のクロマチン結合に際して、ヌクレオソームの正負両方の効果をシステムティックに解析でき、そのパイロット的な解析結果を報告することができた。今後は、ヒストンの配列や修飾を直接操作するなどして、ヒストンおよびヒストン修飾の細胞周期における様々な役割を様々な角度から検証していきたいと思っている。これからさらにクリアすべき技術的問題もあるが、クロマチン構造のヒストン修飾の役割を生物物理学的手法を用いて解析することも検討している。もしこのシステムに興味をもち、共同研究やポ

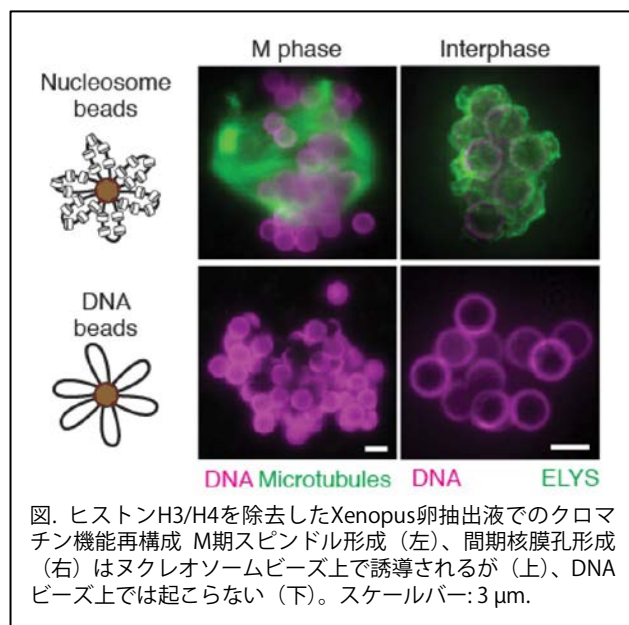


図. ヒストンH3/H4を除去したXenopus卵抽出液でのクロマチン機能再構成 M期スピンドル形成（左）、間期核膜孔形成（右）はヌクレオソームビーズ上で誘導されるが（上）、DNAビーズ上では起こらない（下）。スケールバー: 3 μ m.

スドクとしての研究参加に興味がある方がおられれば、是非、ご一報いただきたい。

最後になりましたが、このプロジェクトのキーとなる抗体を快く提供して下さいました木村宏さん、また抗体の作成、精製に携わった野崎直仁さん、木村研の佐藤優子さん、林陽子さんに、感謝いたします。

6. 異動のお知らせ

名前：木村 宏

所属：東京工業大学 生命理工学研究科 生体システム専攻

身分：教授

E-mail：hkimura(a)bio.titech.ac.jp 【(a)をアットマークに変換して下さい】

コメント：大阪大学在籍中は、大変お世話になりました。7月1日から東工大に着任しました。RNA ポリメラーゼやヒストン修飾の生細胞動態を中心に、クロマチン動構造の研究を引き続き進めていく予定です。今後ご指導の程よろしくお願ひ致します。

7. 今後の予定

①第 52 回 日本生物物理学学会年会

期間：9月 25-27 日

場所：札幌コンベンションセンター

本領域協賛のシンポジウム「生命現象の基本に迫る動的クロマチン構造・機能研究の最前線 (Studies of dynamic chromatin structure and function to understand fundamentals of life)」(オーガナイザー：徳永・原口)があります。詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.aeplan.co.jp/bsj2014/index.html>

②第 87 回 日本生化学会大会

期間：10月 15-18 日

場所：京都国際会館・グランドプリンスホテル京都

米田班員(計画班)が大会会頭を務めます。また、本領域共催のシンポジウム「動くクロマチン構造」を追う(オーガナイザー：胡桃坂・大川)があります。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.aeplan.co.jp/jbs2014/j/index.html>

③The 9th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair)

期間：11月 17-21 日

場所：御殿場高原ホテル(静岡)

胡桃坂領域代表が組織委員会に参加している他、複数の班員の講演が予定されています。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://3r2014.com/index.html>

④ 第 32 回 染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会(合同開催)

期間：12月 15-17 日

場所：安芸グランドホテル(広島)

田代班員(公募班)と斉藤班員(計画班)がオーガナイザーを務めます。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/chrom/chrnc/>

⑤ The 4D Nucleome 2014

期間：12月 17-20 日

場所：安芸グランドホテル(広島)

田代班員(公募班)がオーガナイザー代表を務めるほか、木村班員(計画班)も組織委員会に参画しています。

詳しくはこちらをご覧ください。

http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/chrom/en/4d_nucleome_2014.html

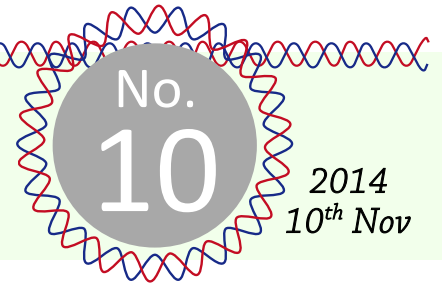
編集後記：7月発行の前号から少し間が空き、すっかり夏も過ぎ去ってしまいましたが、皆様お変わりなくお過ごしでしょうか。このところ(20年近く?)ほとんど運動していなかったのですが、最近、坂道を歩く時間が長くなったおかげで、若干体が締まってきたような気がしています。研究にも体力が必要なので、これを機に少しは体力維持のことも考えていきたいと思っておりますが、どうなることか。

HiKi

クロマチン動構造

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp>

News Letter



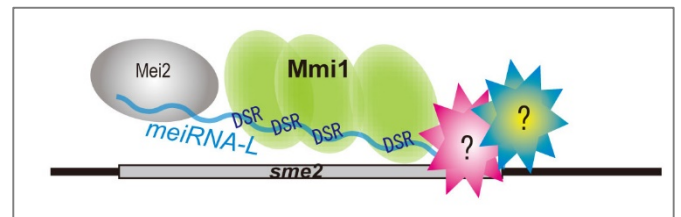
1. 公募班の研究紹介: 大阪大学・平岡 泰、広島大学・田代 聡、島根大学・加藤 太陽
2. アウトリーチ: 「ケンピロー先生がかえってきた！」
3. 成果紹介: ①堀班員らの領域内共同研究による論文が、Chromosome Res 誌に掲載されました。
②木村班員らの領域内共同研究による論文が、PLoS One 誌に掲載されました。
4. 寄稿: ケンブリッジ大学・宮本 圭
5. 今後の予定

1. 公募班の研究紹介

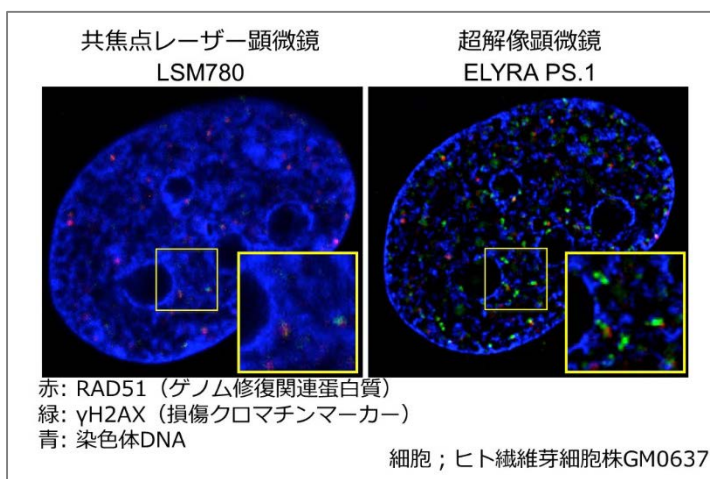
【相同染色体対合に必要な非コード RNA が動的クロマチン構造と相互作用する仕組み】

研究代表者：平岡 泰（大阪大学 生命機能研究科）

相同染色体の対合・組換えは、正常な減数分裂に必須であり、その理解は生殖を行うすべての真核生物に共通に重要である。分裂酵母では、減数分裂期になると、染色体末端テロメアが細胞核の1箇所にクラスターを形成し、テロメアを先頭に核が往復運動を繰り返す。分裂酵母では、このテロメアクラスターと往復運動が相同染色体の対合を促進する。高等動植物では、核全体の往復運動は見られないが、テロメアクラスターとテロメアの核内運動が相同染色体の対合に関わることが確認されている。相同染色体対合過程において、相同染色体と非同源染色体を識別する仕組みがあると予想されるが、その仕組みはわかっていない。分裂酵母において、第2染色体上の特定の遺伝子座（*sme2* 遺伝子座）から減数分裂特異的に長鎖（1500塩基）の非コードRNAが転写され、相同染色体の対合を強く促進することがわかった。この非コードRNAが相同染色体の対合を促進する仕組みを研究し、クロマチン動構造とRNAの相互作用を理解することを目指して研究を進めている。これまでの研究から、この非コードRNA（*meiRNA*）は、polyA付加反応とリンクして *sme2* 遺伝子座に蓄積することがわかってきた（右図）。現在、生化学的・分子生物学的な手法に加え、蛍光顕微鏡による検索を併用して、クロマチンへの蓄積に関わるタンパク質の同定を進めている。



【ゲノム修復における動的クロマチン構造変換】 研究代表者：田代 聡（広島大学 原爆放射医科学研究所）



染色体DNAは、自然放射線や化学物質、あるいはCT検査の医療放射線など様々なストレスを受けている。DNA二本鎖切断(DNA Double strand breaks, DSBs)は、ゲノム情報の改変や細胞死誘導に繋がる最も重篤な染色体DNAの損傷である。DSBsの修復システムの一つである相同組換え修復は、損傷DNAと相同なDNAを鋳型に用いて正確にDNA修復を行うシステムである。このため、損傷DNAは損傷を受けた場所にとどまるのではなく、相同DNAとの組換え反応のために「移動」し、さらに修復のために損傷部位周辺のクロマチン構造が変換される可能性がある。

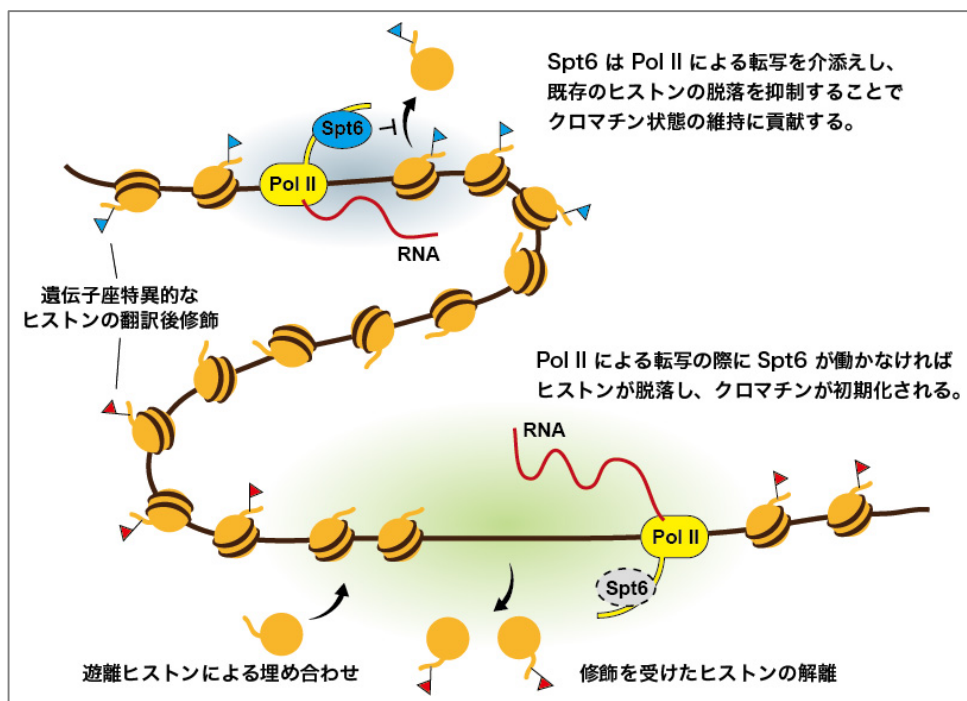
る。私たちは、相同組換え修復で中心的役割を果たす修復タンパク質 RAD51 が、ゲノム損傷部位に集積し核内高次構造体 RAD51 フォーカスを形成することを見いだしている（前頁図）。本研究では、超解像顕微鏡などを用いて、従来の光学顕微鏡では解析不可能であった RAD51 フォーカスや損傷クロマチンの微細構造の解析を行うことにより、相同組換え修復におけるクロマチン構造の動的変化を検討する。

【転写と共役したクロマチン初期化制御の解析】

研究代表者：加藤 太陽（島根大学 医学部）

真核生物は、ヒストンを基盤としたエピジェネティック制御機構を採用している。ヌクレオソームの配置やヒストンの翻訳後修飾によって遺伝子座の性質を長期に特徴づけるためには、DNA とヒストンの物理的接触を維持する必要がある。しかしながら、RNA ポリメラーゼ II（PolII）が転写を実行するためには DNA とヒストンを解離させる必要があるため、それによって長期記憶が失われかねないというジレンマがあった。

我々はこれまでに、PolII による転写を介添えするヒストンシャペロンタンパク質である Spt6 が、転写領域におけるヒストンの解離と交換を抑制することでヘテロクロマチンやユークロマチンにおける遺伝子座特異的なヒストン翻訳後修飾の維持に貢献することを見いだした（右図）。本研究では、エピジェネティック制御機構がヒトに類似しておりゲノムワイドな解析に有利な分裂酵母をモデル生物として、Spt6 の不活性化によって起こる「転写と共役したクロマチンの初期化」の制御機構の解明に取り組んでいる。



2. アウトリーチ

「ケンビロー先生がかえってきた！」

日時：2014年8月23日（土）19：15～21：00 ごろ
場所：生駒山麓公園 野外活動センター



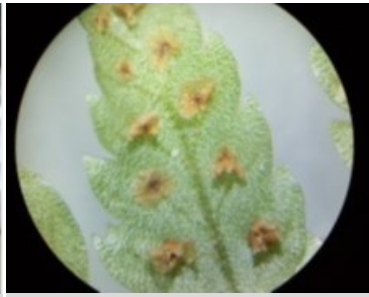
顕微鏡の説明をするケンビロー先生

昨年夏に行った「ケンビロー先生がやってくる！」の活動を今年もやらせていただけることになり、山縣班員扮するケンビロー先生とその研究室メンバーが実体顕微鏡をかついで小学校の学童保育を訪問しました。今年は生駒山でのキャンプイベント中に行ったということもあり、サンプルを集める環境は抜群だったのではないのでしょうか。子どもたちは、配られたディッシュに多種多様なサンプルを集めてきてくれました。花や木の実、石、木片、蟻やゲジゲジなどの虫、なかにはディッシュからはみ出しそうなヒキガエルまで！観察会場に集合し、まずはケンビロー先生から顕微鏡についての説明がありました。いろんな顕微鏡があっいろんな使い方が

あるという話を聞いた後、実際に観察をしました。初めて実体顕微鏡に触れる子どもたちもたくさんいて、拡大されて立体に見えるサンプルに大興奮。自分で集めたサンプルを観察し、写真に撮ってもらったものをスケッチして、とても満足げでした。高学年の子どもたちは顕微鏡の構造に興味津々で、様々な使い方を楽しんでいました。今年は、保護者の方も大勢参加してくださり、わが子と一緒に楽しそうに観察されていてよかったと思います。子どもたちの生き生きした眼差しに、私たちも心洗われる体験ができました。



いろいろなサンプルを集めています



シダの葉の裏側

キャンプの反省会報告書より、子どもたちと保護者の感想：普段できない経験なので、子どももとても喜んでいました。興味深く参加していました。／大人もワクワクする企画でした。貴重な体験をさせて頂いたとケンビロー先生に感謝しています。／子どもたちに一生のうちでも経験できないものだったと思います。

(大阪大学・山縣研 森光子)

3. 成果紹介

① 堀班員らの論文が、Chromosome Research 誌に掲載されました。これは、公募班の佐渡班員との領域内共同研究による成果です。

The CENP-O complex requirement varies among different cell types.

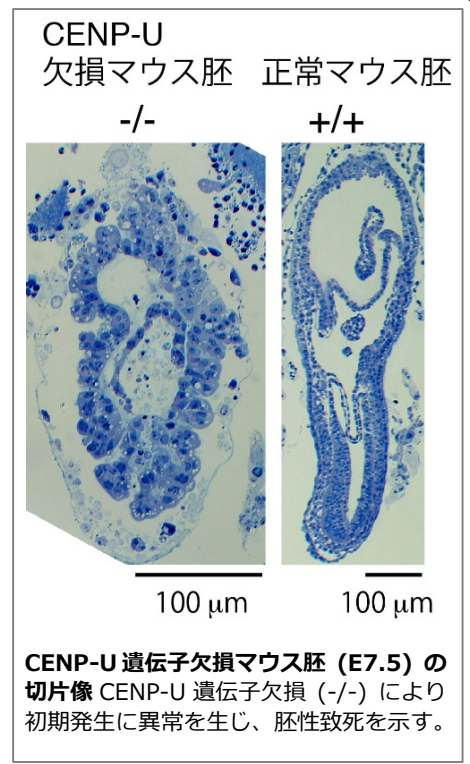
Kagawa N, Hori T, Hoki Y, Hosoya O, Tsutsui K, Saga Y, Sado T, Fukagawa T.

Chromosome Res. 2014 Sep;22(3):293-303.

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10577-014-9404-1>

動原体は、遺伝情報を安定に次世代細胞へ維持・継承する過程で重要な役割を担う。この動原体は複数のタンパク質で構成された巨大な構造体であり、17種類のCENPと呼ばれるタンパク質群 (CCAN) が中心的な役割をすることが分かっている。これまでの研究から、CCANタンパク質群は機能的に異なるサブグループに分類され、大部分は染色体分配に重要な機能を持ち、細胞の生存にも必須であることが分かっている。ところが、サブグループの一つであるCENP-Oクラス複合体 (CENP-O, -P, -Q, -R, -U)は、ニワトリのBリンパ球由来のDT40細胞の生存には必須ではなく、染色体分配における機能には未だ不明な点が多く残されている。今回、マウスを用いた遺伝学的解析によりCENP-Oクラス複合体欠損時に現れる表現型が細胞種によって違うこと、およびその原因を明らかにした。

はじめに、CENP-Oクラス複合体の個体での役割を解析することを目指して、CENP-U遺伝子欠損マウスを作製した。その結果、CENP-U遺伝子欠損により初期発生に障害がおり、マウスでは胚性致死(～E7.5)を示すことが明らかとなった(右図)。さらに、作製したCENP-U遺伝子欠損マウスを利用して、薬剤添加(OHT)により条件的に遺伝子欠損できるマウス胚性幹細胞(mES細胞)およびマウス繊維芽細胞(MEF細胞)を取得した。これら細胞株を利用してOHT添加により遺伝子欠損を引き起こしたところ、mES細胞においては、多数の細胞で染色体分配に異常が観察され、最終的に死滅することが分かった。一方、MEF細胞においては、CENP-U遺伝子欠損を引き起こしても生存可能であることが分かった。細胞分裂時の状態を生細胞観察法等で詳細に解析したところ、致死性を示すmES細胞は、染色体分配に異常を生じて死滅するが、生存可能なDT40細胞やMEF細胞は、mESと同様に分裂期に異常は観察されるが最終的には修正され、正常に染色体分配が進行することが観察された。さらに幾つかの細胞生物学的解析を行なった結果、CENP-Oクラス複合体の染色体分配における機能は細胞種によらず同じであるが、M期チェックポイント活性が細胞種によって異なるため、CENP-U遺伝子欠損に伴う染色体分配異常の修正の精度が異なることが示唆された。そのため、CENP-U遺伝子欠損に伴う表現型が細胞種の違いで一見異なった形で現れると考えられた。



CENP-U 遺伝子欠損マウス胚 (E7.5) の切片像 CENP-U 遺伝子欠損 (-/-) により初期発生に異常を生じ、胚性致死を示す。

② 木村班員らの論文が、PLoS One 誌に掲載されました。これは、胡桃坂領域代表との共同研究による成果です。

Evaluation of chemical fluorescent dyes as a protein conjugation partner for live cell imaging.

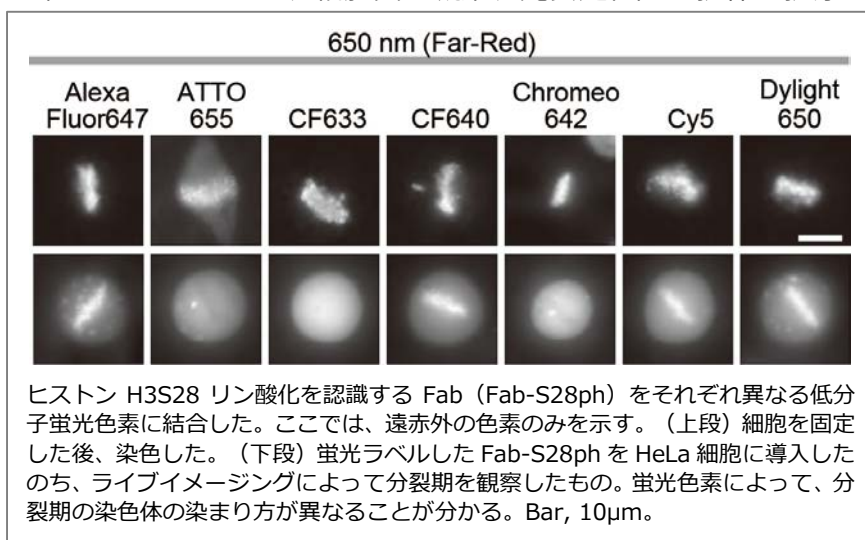
Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Kurumizaka H, Nozaki N, and Kimura H.

PLoS One. 2014 Sep 3;9(9):e106271. doi: 10.1371/journal.pone.0106271.

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0106271>

生細胞内の蛋白質蛍光イメージングは、現在の細胞生物学に重要な技術となっている。近年、様々な波長特性を持つ蛍光蛋白質が開発され、任意の蛋白質と融合させたものを細胞に発現させることで、蛋白質の局在変化を追跡できるようになった。しかしながら、蛍光蛋白質は必ずしも万能ではなく、その大きさや光安定性などが問題となる場合もある。一方、低分子蛍光色素を蛋白質に直接結合させて蛍光イメージングを行うことも可能である。低分子蛍光色素は、多様な蛍光特性を持つものが開発されており、蛍光蛋白質以上に選択の幅が広い。

我々は、蛍光色素で標識したヒストン修飾特異的抗原結合断片 (Fab) を細胞に導入することで、内在性ヒストン修飾の動態を生細胞で追跡することを可能にした。しかし、同一の Fab でも色素によってバックグラウンドや細胞質の凝集したシグナルの現れ方に差が生じることが分かり、生細胞観察に適した蛍光色素を選択する必要あると考えられた。そこで、緑、赤、近赤外に蛍光波長を持つ様々な色素をヒストン修飾特異的 Fab と結合させ、その細胞内での特性 (シグナルノイズ比、細胞質の凝集、光安定性) と抗体の抗原結合の親和性に与える影響を系統的に解析した (右図)。その結果、緑色の蛍光波長を持つ色素は概ね抗体の結合能に影響を与えず、細胞内でも非特異的吸着が少ないため、細胞内解析に適していることが明らかになった。しかし、安定性に関しては、赤色の蛍光色素が優れていた。総合的には、それぞれの蛍光波長域の色素の中で、Alexa488 (緑)、Cy3 (赤)、Cy5 または CF640 (近赤外) が、細胞内のイメージングに最も適していると考えられた。



4. 寄稿

Hierarchical molecular events driven by oocyte-specific factors lead to rapid and extensive reprogramming

Jerome Jullien[†], Kei Miyamoto[†], Vincent Pasque[†], George E Allen, Charles R Bradshaw, Nigel J. Garrett, Richard P Halley-Stott, Hiroshi Kimura, Keita Ohsumi and J.B. Gurdon.

[†] These authors contributed equally to this work.

Mol Cell. 2014 Aug 21;55(4):524-36

分化した体細胞を未受精卵子内に核移植することによって、初期化 (リプログラミング) が誘導され、体細胞を未分化な状態へと戻すことが出来ます。卵子によるリプログラミングは、他のリプログラミングの系と比較しても、効率よく、また質の高い未分化細胞の作製につながる事が示されてきました。また、卵子内因子が人工多能性細胞 (iPS 細胞) の作製効率を上昇させることもわかっています。すなわち、卵子が持つ「自然の」リプログラミング誘導機構を理解することは、未分化細胞の効率的な作製のために重要な意味を持てきます。

私達は以前、カエルの卵殻胞期の卵子 (卵母細胞) にマウス体細胞を移植することによって、体細胞に転写のリプログラミングを誘導できることを示しました。この実験系は、細胞分裂なしに転写リプログラミングを誘導できるため、解析を単純化し、リプログラミング機構を探るのに適したシステムです。本研究では、この核移植系を用い、卵母細胞

胞内での転写リプログラミングを詳細に、ゲノムワイドレベルで追いました。まず、新規転写物を RNA シークエンシング法によって調べ、約 2000 もの遺伝子が 2 日以内に活性化されることがわかりました。驚くべきことに、翻訳阻害剤の存在下でもほぼ同数の遺伝子の活性化が起きたことから、卵子内に元々存在する因子だけで 300 個もの移植された体細胞核をリプログラムすることになります。そこで、卵内に大量に存在する因子に注目して転写活性化までの 2 日間における体細胞核への卵内因子の取り込みを調べました。その結果、卵特異的なリンカーヒストンに続き、卵内の RNA ポリメラーゼ II、卵特異的な基本転写因子 TBP2 が比較的早くに体細胞核内に取り込まれることがわかりました。従って、卵特異的な転写機構が体細胞の転写機構に取って代わることがわかります。さらに、後に起こる RNA ポリメラーゼ II の活性化(リン酸化)のレベルは体細胞の 8 倍にもものぼり、卵内の効率的な転写リプログラミングが体細胞では起こりえないほどの量の活性化 RNA ポリメラーゼ II によって支持されていることがわかります。さらに、リプログラミングのごく初期の段階で起こるヒストン B4 の取り込みは、ゲノム全体を弛緩させ、他のクロマチン因子による結合を促すための現象と考えられ、最終的には転写機構の会合による、転写開始点から取り除かれることが示唆されました。以上のように、卵母細胞によるリプログラミングは、卵内に大量に存在する因子によって誘導され、体細胞の転写機構が卵内転写機構に取って代わることを明らかにしました。この卵内因子が特異的な機構によって体細胞クロマチンに作用するのか、非特異的に体細胞核内のアクセラ可能な領域に「侵入」していくのかは今後明らかにされるべき興味深い点だと思います。

本研究はケンブリッジ大学ガードン研究室メンバー3人とボスのジョン・ガードンが牽引して行われました。事の発端は、博士課程の学生が核移植した際にほぼ全ての体細胞がリン酸化 RNA ポリメラーゼ II によって染色されたことに刺激を受けて、私を含めたもう一人のポスドクとボスに呼びかけることによって始まりました。一見当たり前のようですが、300 個の体細胞を 1 つの卵母細胞が転写誘導しているので、興味深い現象です。そこから、チームアップしたメンバーが、そこに至る前での過程を明らかにしようと目標をたて、各々の得意分野を集結させました。途中でメンバーが他の研究室に移ることもあり、一時はプロジェクトを終えることは無理かと思いましたが、数年かけて何とか論文にまでたどり着きました。刺激的な共著者に囲まれて、First co-author がうまく機能した例だと考えています。また、本研究のために作製した核移植卵は合計で 5000 個を超えていますが、全ての核移植をボスのジョン・ガードンが行いました。ジョンの研究に取り組む姿勢には、敬服するばかりです。

(ケンブリッジ大学・宮本圭)

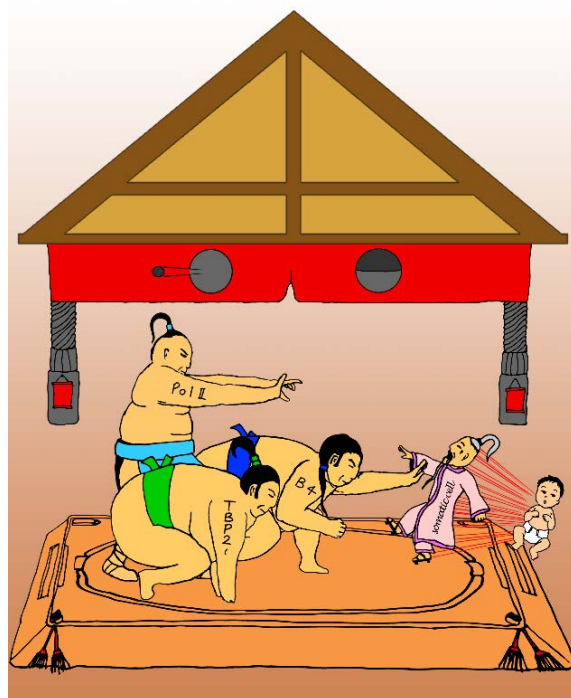


図 1. 卵母細胞に大量に存在する 3 つの因子が体細胞を強制的に「若返らせる」卵内の因子 (B4, TBP2, Pol II) は豊富に存在することからも相撲取りになぞらえている。体細胞 (老人) にとっては非常に過酷な戦いとなり、ほとんどの取り組みに敗北し、強制的に押し戻される。

5. 今後の予定

① The 9th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair)

期間：11 月 17-21 日

場所：御殿場高原ホテル (静岡)

胡桃坂領域代表が組織委員会に参加している他、複数の班員の講演が予定されています。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://3r2014.com/index.html>

② 第 32 回 染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会 (合同開催)

期間：12 月 15-17 日

場所：安芸グランドホテル (広島)

田代班員 (公募班) と齊藤班員 (計画班) がオーガナイザーを務めます。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/chrom/chrnc/>

③ The 4D Nucleome 2014

期間：12月17-20日

場所：安芸グランドホテル（広島）

田代班員（公募班）がオーガナイザー代表を務めるほか、木村班員（計画班）も組織委員会に参画しています。詳しくはこちらをご覧ください。

http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/chrom/en/4d_nucleome_2014.html

④ 本領域の一般公開シンポジウムが開催されます。

「生き物と細胞の設計図 ～DNA・クロマチン・核～」

日時：2015年1月12日（祝）

会場：千里ライフサイエンスセンター（大阪）

セッション1 DNA・クロマチン・核を「見る」方法

- 原子レベルで見る生命の設計図（早稲田大学・胡桃坂仁志）
- ライブセルイメージングでヒト受精卵のDNAを見て不妊を知る（大阪大学・山縣一夫）
- DNA配列解読技術の飛躍的進歩による生命科学の発展（島根大学・加藤太陽）

セッション2 DNA・クロマチン・核のなりたちとはたらき

- 細胞核；ゲノムの環境問題を考えよう（熊本大学・齊藤典子）
- 核に分子を運んで遺伝子を操る（医薬基盤研・安原徳子）
- 小児科医が覗く細胞核構造（群馬大学・滝沢琢己）

セッション3 DNA・クロマチン・核研究の新展開

- DNAでできた糸球を解いてみよう！（東京大学・小穴英廣）
- 試験管の中で染色体を作る～130年来の謎を解くために～（理研・新富圭史）
- 細胞核の中にも男女の違いが！～不活性化X染色体の秘密～（北海道大学・小布施力史）

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/activities/20141104.html>

一般公開シンポジウム第2弾
生き物と細胞の設計図
～DNA・クロマチン・核～
新学術領域「動的クロマチン構造と機能」

セッション1 「DNA・クロマチン・核を「見る」方法」
■ 原子レベルで見る生命の設計図
胡桃坂仁志（早稲田大学・理工学研究所）
■ ライブセルイメージングでヒト受精卵のDNAを見て不妊を知る
山縣一夫（大阪大学・理化学研究所）
■ DNA配列解読技術の飛躍的進歩による生命科学の発展
加藤太陽（島根大学・理学部）

セッション2 「DNA・クロマチン・核のなりたちとはたらき」
■ 細胞核；ゲノムの環境問題を考えよう
齊藤典子（熊本大学・理化学研究所）
■ 核に分子を運んで遺伝子を操る
安原徳子（医薬基盤研究所）
■ 小児科医が覗く細胞核構造 一遺伝子はどこに配っている？
滝沢琢己（群馬大学・理学部研究科）

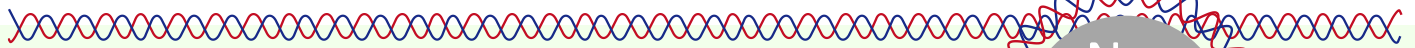
セッション3 「DNA・クロマチン・核研究の新展開」
■ DNAでできた糸球を解いてみよう！
小穴英廣（東京大学・工学部研究科）
■ 試験管の中で染色体を作る～130年来の謎を解くために～
新富圭史（理化学研究所）
■ 細胞核の中にも男女の違いが！～不活性化X染色体の秘密～
小布施力史（北海道大学・先端生命科学研究科）

日時：2015年1月12日（祝）
開場 12:30 / 開演 13:00～17:30
会場：千里ライフサイエンスセンター
（大阪府：大阪府立大学千里中央キャンパス）
サイエンスホール（有料駐車場有り）
主催：新学術領域「動的クロマチン構造と機能」
連絡先：山縣一夫（大阪大学）06-6879-8372

参加費無料・事前登録不要・入場随時

編集後記：秋も深まってきましたが、皆様お元気でお過ごしでしょうか？今号では、先号に引き続き海外で活躍する日本人研究者からの寄稿を掲載しています。今後も、機会があれば「クロマチン動構造」に関係する海外日本人研究者の仕事を紹介していきたいと思っています。それから、昨年好評だった一般公開シンポジウムを今年度もやることになりました（成人の日、場所は前回と同じ千里中央です）。普段の研究の発表とは一味違った話が聞けるので、今から楽しみです。皆様是非ご参加ください。

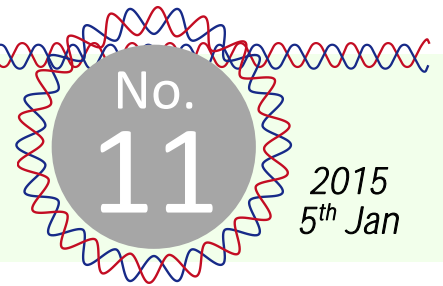
HiKi



クロマチン動構造

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp>

News Letter

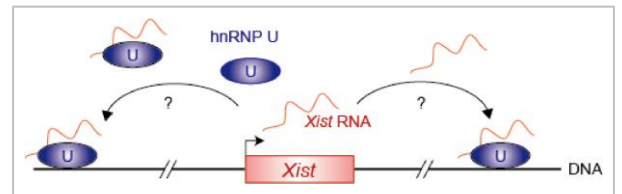


1. 公募班の研究紹介: 近畿大学・佐渡 敬、熊本大学・斉藤 寿仁、長崎大学・甲斐 雅亮
2. 成果紹介: ①胡桃坂領域代表と原田班員らの領域内共同研究による論文が、PLOS One 誌に掲載されました。
②木村班員らの領域内共同研究による論文が、Nature 誌に掲載されました。
3. 寄稿: フリードリッヒ・ミーシャー生物医学研究所 (スイス)・堀籠 智洋
4. 今後の予定

1. 公募班の研究紹介

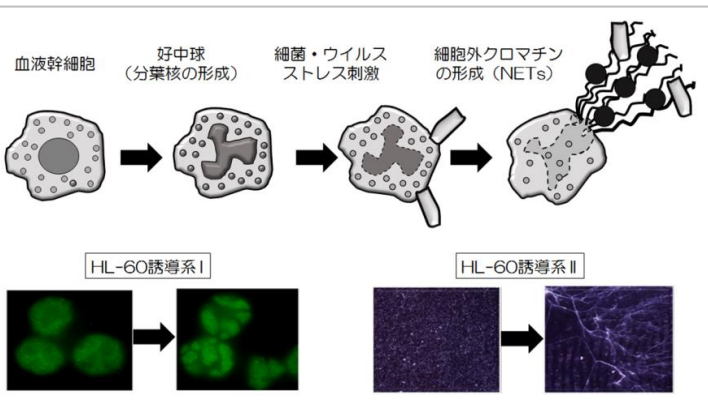
【長鎖ノンコーディングRNAのクロマチンターゲティング】 研究代表者：佐渡 敬 (近畿大学 農学部)

エピジェネティック制御因子と相互作用する一部の長鎖ノンコーディング (lncRNA) は、特定のゲノム領域を標的とし、その領域のクロマチン修飾の確立に重要な役割を果たす。したがって、lncRNA のクロマチンターゲティング機構は、エピジェネティクス制御の分子基盤を理解するために必要な課題の一つといえる。本研究では、哺乳類のメスの細胞で X 染色体を覆い、そのヘテロクロマチン化を引き起こす Xist RNA とその局在制御に関与すると考えられる hnRNP U をモデルとして、lncRNA のクロマチンターゲティングについてマウス胚を用いた解析を行う。hnRNP U の条件的機能欠損マウスを作製し、適当な cre 発現マウスと交配して得られる胚で hnRNP U が Xist RNA とクロマチンの相互作用に果たす役割と効果を明らかにする。まずは、完全機能欠損アレルのホモ接合体の胚において、hnRNP U の欠損が Xist RNA の局在制御と X 染色体のクロマチン制御に及ぼす影響について調べる。また、初期発生を経て確立された X 染色体の不活性状態の維持に hnRNP U が関わるかについても調べる。さらに、他の lncRNA によるクロマチン制御にも hnRNP U が関与しているか検討し、hnRNP U を介した lncRNA のクロマチンターゲティングの普遍性、あるいは特異性について考察する。



【血液細胞分化におけるクロマチン動構造の研究】 研究代表者：斉藤 寿仁 (熊本大学 自然科学研究科)

ヒト末梢血中の白血球の約 50% を占める好中球は、分化の過程で核が 3~4 つに分葉化する。核の分葉化は好中球の分化・成熟度合いを表すと考えられている。2004 年に Brinkmann と Zychlinsky らは好中球が細胞外クロマチン Neutrophil Extracellular Traps (NETs) を形成し細菌を捕獲することを報告し、好中球が外部から侵入してきた細菌を貪食し死滅させる免疫応答の他に、細胞外クロマチンを介して免疫に関与する可能性を指摘した。しかしながら、分葉核から NETs に至るクロマチン動構造や細胞外クロマチンによる免疫

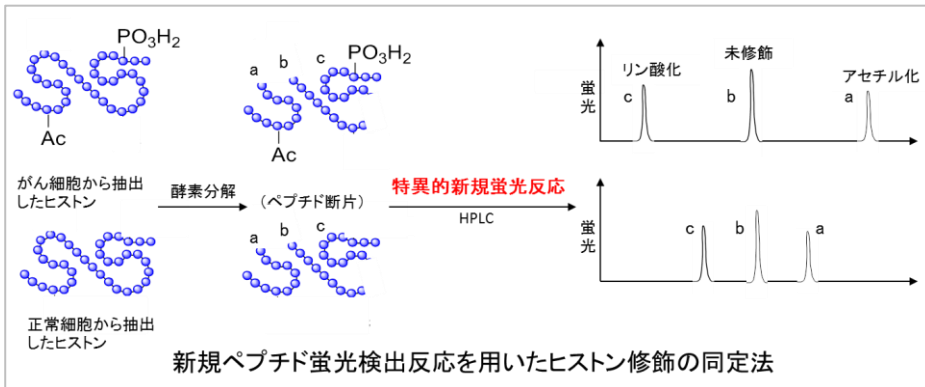


応答の制御については不明な点が多い。研究代表者らは、白血球由来の細胞株 HL-60 を用い、分葉核と NETs 類似の構造体を誘導することに成功している (下図)。現在、この独自の実験系を用いて核とクロマチン動構造制御に関わる因子群を解析している。本研究を通じて、好中球の分化と NETs 形成の分子制御に迫ることで、自己免疫疾患や敗血症、血栓形成の予防、診断そして治療などの保健医療分野の発展に貢献できれば幸いである。

【新規エピゲノム分析によるクロマチン変異の解析】

研究代表者：甲斐 雅亮（長崎大学 医歯薬学総合研究科）

DNA 配列の変化を伴わないクロマチン変異は、細胞のがん化に深く関与している。クロマチン変異は、メチル化、アセチル化、リン酸化などのヒストン修飾とメチル化 DNA 修飾に大別され、これらの修飾パターンは、正常細胞とがん細胞では異なることが報告されている。修飾変異の違いを分析する装置として HPLC が汎用されているが、検出には UV が使用されている。一方、蛍光検出は、UV 検出と比較して、検出感度や特異性が優れており、これまでに我々は、ペプチドに特異的な蛍光検出反応(Sci.Rep.,4:4950|2014 等)、修飾アミノ酸残基を蛍光検出できるアミノ酸配列決定法、各種核酸塩基の特異的な蛍光検出反応などを開発してきた。現在、これらの手法を応用し、がん細胞及び正常細胞由来のヒストンを酵素分解後、各ペプチド断片の HPLC による蛍光分離パターンの相違を解析している。これにより、修飾アミノ酸配列の同定を容易にできるヒストン修飾解析技術を開発する。さらに、染色体を各核酸塩基に分解後、それらに特異的な蛍光検出反応を行うことによって、がん細胞内遺伝子のメチル化シトシンを定量評価する解析技術の開発も行っている。



片の HPLC による蛍光分離パターンの相違を解析している。これにより、修飾アミノ酸配列の同定を容易にできるヒストン修飾解析技術を開発する。さらに、染色体を各核酸塩基に分解後、それらに特異的な蛍光検出反応を行うことによって、がん細胞内遺伝子のメチル化シトシンを定量評価する解析技術の開発も行っている。

2. 成果紹介

①胡桃坂領域代表と原田班員らの領域内共同研究による論文が、PLOS One 誌に掲載されました。

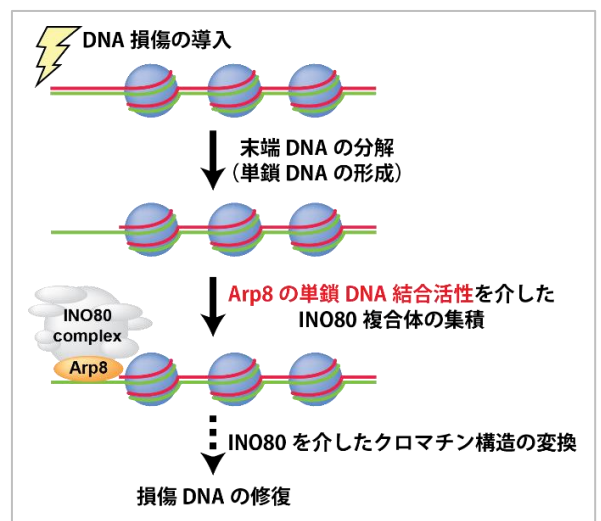
DNA binding properties of the actin-related protein Arp8 and its role in DNA repair.

Osakabe A, Takahashi Y, Murakami H, Otawa K, Tachiwana H, Oma Y, Nishijima H, Shibahara KI, Kurumizaka H, Harata M.

Published: October 09, 2014

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0108354>

遺伝情報を担うゲノム DNA は、DNA 複製時のエラーや放射線や紫外線等の様々な内外的要因によって損傷を受ける。このようなゲノム DNA の損傷が蓄積すると細胞死や細胞のがん化などに繋がるため、生物にはこれらの損傷を修復する機構を獲得している。一方、真核生物におけるゲノム DNA は核内タンパク質群とクロマチンを形成し、細胞核内に収納される。そのため、損傷を受けたクロマチン中のゲノム DNA を修復するために、クロマチンの構造がダイナミックに変化することが必要とされる。クロマチンリモデリング因子は、ATP 加水分解活性を利用してクロマチンの構造を変化させ、DNA 修復、転写、複製などの核内における DNA 機能発現を制御する。特に、酵母からヒトまで広く保存されているクロマチンリモデリング因子である INO80 複合体は、アクチンやアクチン関連因子群 (Actin-related-protein: Arp) などの 15 種類以上のサブユニットによって構成され、遺伝子発現の制御や DNA 修復に関与することが示されている。先行研究により、INO80 複合体は構成因子のひとつである Arp8 を介して DNA 二重鎖切断部位に集積することが報告された。しかし、Arp8 の DNA 切断部位への集積機構がこれまで不明であった。そこで本論文では、DNA 損傷修復における Arp8 の機能を明らかにする



ために、リコンビナントタンパク質として精製した Arp8 を用いて生化学的解析を行った。その結果、Arp8 は DNA 結合活性を有し、特に DNA 二重鎖切断損傷修復の過程で形成される単鎖 DNA に優先的に結合することを見出した。次に、先行研究により Arp8 が ATP と結合することが示されていることから、ATP が Arp8 の DNA 結合活性に与える影響を解析した。その結果、ATP の添加によって Arp8 の二重鎖 DNA への結合活性が顕著に低下した。一方、興味深いことに Arp8 の単鎖 DNA への結合活性については ATP を添加しても大きな影響を受けなかった。さらに、Arp8 をテトラサイクリン添加によってノックアウトできるヒト Nalm-6 B 細胞株を樹立し、細胞生物学的解析を行った。その結果、Arp8 を欠損した細胞は DNA 二重鎖損傷を導入するアフィディコリンおよびカンプトテシンに対して感受性を示し、DNA 損傷修復に異常が生じていることが明らかになった。以上より、DNA 二重鎖切断損傷修復において、Arp8 は DNA 修復時の過程で生じる単鎖 DNA に対する結合活性を通して INO80 複合体を損傷部位ヘリクルートし、INO80 複合体によるクロマチン構造変換を介した損傷修復機構に関与することが示唆された (図)。今後の研究により、DNA 損傷修復時における他の INO80 構成因子や修復関連因子群と Arp8 の DNA 結合活性との関連性が解明されれば、INO80 関連遺伝子の変異が原因となる慢性腎臓病などの疾病のメカニズムの理解に繋がることが期待される。

②木村班員らの論文が、Nature 誌に掲載されました。これは、徳永班員、大川班員との領域内共同研究による成果です。日経産業新聞、科学新聞、日経バイオテク ONLINE、Nature Reviews Molecular Cell Biology などに取り上げられました。

Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells

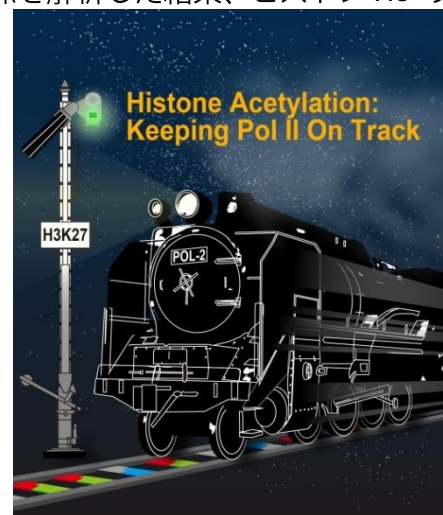
Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H.

Nature. 2014 Dec 11;516(7530):272-275

<http://www.nature.com/nature/journal/v516/n7530/full/nature13714.html>

真核細胞では、ヒストンの翻訳後修飾が遺伝子発現制御に重要な役割を果たすことがわかってきた。しかし、ヒストン修飾が、個々の細胞でどのように転写制御に働くのかは、ほとんど分かっていない。特に、特定の修飾が転写の能動的な調節因子であるのか、あるいは単に受動的な副産物であるのかを区別するのは、非常に困難である。それは、ほとんどの解析が、固定された細胞集団を用いていることや時間分解能が限られているからである。従って、単一生細胞において、より高い時間分解能で、ヒストン修飾と RNA ポリメラーゼ II (RNAP2) の動態を追跡する方法が必要となる。

我々は、蛍光標識した修飾特異的抗原結合断片を用いた生細胞解析法 (Fab-based live endogenous modification labeling; FabLEM) を開発し、ヒストン修飾の生細胞動態を解析してきた。今回、この系を活性化型 RNAP2 の指標となるリン酸化修飾に適用し、ステロイドホルモンで誘導される遺伝子の転写活性化の速度を計測した。また、ヒストン修飾レベルの変動と転写活性化の関係を解析した結果、ヒストン H3 の 27 番目のリジンのアセチル化 (H3K27ac) のレベルが高い細胞では、転写因子のクロマチンへの結合が促進されることに加え、RNAP2 の転写開始から伸長への移行が促進されることが明らかになった。さらに、人工的に H3K27ac レベルを低下させた場合、転写の開始よりも伸長の反応に大きな影響が見られた。また、これらの生細胞解析の結果は、クロマチン免疫沈降と塩基配列解析 (ChIP-seq) によっても支持された。従って、H3K27ac は、おそらくクロマチンの脱凝縮を介して転写因子の結合を促進させる役割と RNAP2 の転写開始から伸長への移行を促進する役割を持つと考えられた。このように、単一の生細胞を用いた転写とヒストン修飾動態の解析により、今後の個々の細胞レベルでの遺伝子発現制御機構の解明が進むと期待できる。



3. 寄稿

接眼レンズ越しに見る細胞生物学 フリードリッヒ・ミーシャー 生物医学研究所 堀籠 智洋

SWR1 and INO80 Chromatin Remodelers Contribute to DNA Double-Strand Break Perinuclear Anchorage Site Choice.

Chihiro Horigome, Yukako Oma, Tatsunori Konishi, Roger Schmid, Isabella Marcomini, Michael Hauer, Vincent Dion, Masahiko Harata and Susan M. Gasser

Mol Cell. 2014 Aug 21;55(4):626-39

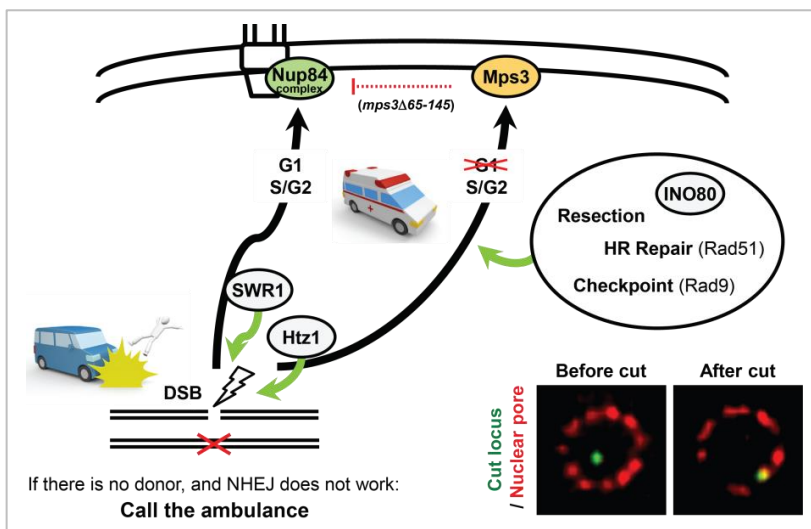
生きた細胞の顕微鏡観察は、場所、動き、量、形、色など実に多くの情報を与えてくれる。もちろん論文として共有可能なデータに仕上げるためには、これらの情報から必要な要素を抽出して、定量的に扱う必要がある。筆者はポスドクとしてスイスに移って以来、二本鎖切断を受けた DNA の場所と動きを制御する機構について注目した解析を進めている。

DNA 二本鎖切断 (DNA double strand break: 以下 DSB と表記する) は、核内において動的空間的に制御されている。出芽酵母において、DSB が引き起こされるとクロマチンの移動性がローカル (切断部位)、グローバル (非切断部位) に増大する (Dion et al. 2012, Nat Cell Biol; Mine-Hattab and Rothstein 2012, Nat Cell Biol; Seeber et al. 2013, Genes Dev)。また、持続的に引き起こされる DSB や崩壊した複製フォークが、核膜に移動して核膜孔 Nup84 複合体および核内膜 SUN ドメインタンパク質 Mps3 と結合することが示されている (Nagai et al. 2008, Science; Oza et al. 2009, Genes Dev; Kalocsay et al. 2009 Mol Cell; Oza et al. 2010, Cell Cycle)。興味深いことに、全ての DSB が核膜に移動するのではないことも分かっている。核膜移動には一定の条件がある。例えば、同一染色体上に相同組み換えに利用可能な配列がある場合は核膜への移動は起こらない。一方、相同配列が他の染色体上にある場合は移動が起こる。つまり、持続的に引き起こされ、修復が困難な DSB のみが核膜へ移動するようなのである。

この度発表した論文で我々は、SWR1 および INO80 クロマチンリモデリング複合体が核膜における DSB 結合部位の決定に影響を及ぼすことを明らかにした。定量的顕微鏡解析およびクロマチン免疫沈降法を組み合わせることにより、核膜孔への DSB の移動は細胞周期を通して観察されること、一方、Mps3 との結合は G1 期を除く細胞周期に特異的な現象であることを示した。Mps3 との結合は INO80 複合体および Rad51 に依存したが、SWR1 複合体によるヒストンバリエント Htz1 の DSB 部位への組み込みは、核膜孔および Mps3、両方の経路に必須であった (図参照)。核膜を構成する核膜孔と Mps3 は、DSB 修復において異なった経路で役割を果たしており、非正統的な組み換えである uSCR を協調的に抑制した。Mps3 との結合は DSB を他のクロマチン領域から隔離し、組み換えを抑制する。一方、核膜孔は SUMO 依存的ユビキチンリガーゼ Six5/Six8 と結合し、核膜縁のプロテアソームと共にエピスタティックな相互作用を示すことから、SUMO 化とその代謝を介して修復に機能している可能性がある。本研究は FMI、スーザン・ガッサー研究室そして東北大学、原田研究室の共同研究として行われた。共同研究では、HO エンドヌクレアーゼによる切断を誘導するための条件設定の段階から、綿密に情報をすり合わせて進めさせていただいた。本論文を日本・スイス国交樹立 150 周年にあたる 2014 年、両国の共同研究の成果として発表できたことは望外の喜びだ。

最近、自戒も含めて気になっていることがある。CCD カメラの普及により、我々細胞生物学者の接眼レンズを覗く機会が減ってはいないだろうか。顕微鏡の接眼レンズの代わりにディスプレイを凝視する研究者が増えたように思う。デジタルイメージを用いることによりデータの取得、保存、解析が容易になったが、カメラ越しの“観察”への移行によ

って失われたものも大きい。定量的解析手法が飛躍的に進んだ一方、豊穡な情報と示唆に富んだ「観察」がおろそかになっているのではないか。顕微鏡観察を基礎として、核小体形成領域 (nucleolus organizer region: NOR) の存在を提唱したバーバラ・マクリントックの言葉が思い出される。『私が細胞を見る時は、細胞のなかへ降りていき、そして周りを見回すのです』(エブリン・フォックス・ケラー『動く遺伝子』)。接眼レンズを覗いて、細胞のなかへ降りて行きたい。DNA 二本鎖切断が核内を動き回る様が見え、損傷修復の音まで聞こえてくるのだろうか。



4. 今後の予定

① 本領域の一般公開シンポジウムが開催されます。

「生き物と細胞の設計図 ～DNA・クロマチン・核～」
<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/outreach/20150112.html>

日時：2015年1月12日(祝) 13:00～17:30(開場 12:30)
会場：千里ライフサイエンスセンター(大阪)
※参加申し込み・事前登録不要

セッション1 DNA・クロマチン・核を「見る」方法

- 原子レベルで見る生命の設計図(早稲田大学・胡桃坂仁志)
- ライブセルイメージングでヒト受精卵のDNAを見て不妊を知る(大阪大学・山縣一夫)
- DNA配列解読技術の飛躍的進歩による生命科学の発展(島根大学・加藤太陽)

セッション2 DNA・クロマチン・核のなりたちとはたらき

- 細胞核;ゲノムの環境問題を考えよう(熊本大学・斉藤典子)
- 核に分子を運んで遺伝子を操る(医薬基盤研・安原徳子)
- 小児科医が覗く細胞核構造(群馬大学・滝沢琢己)

セッション3 DNA・クロマチン・核研究の新展開

- DNAでできた糸絨を解いてみよう!(東京大学・小穴英廣)
- 試験管の中で染色体を作る～130年来の謎を解くために～(理研・新富圭史)
- 細胞核の中にも男女の違いが!～不活性化X染色体の秘密～(北海道大学・小布施力史)

② 本領域の国際シンポジウムが開催されます。

“Chromatin Structure, Dynamics, and Function”
<http://www.knt-ec.net/2015/iscsdf/>
<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/activities/20150823.html>

日時：2015年8月23-26日
会場：淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)
※参加申し込み・演題登録などの詳細についてはウェブサイトでお知らせします。

Invited speakers:

Frederic Berger (GMI, Austria)
Kerstin Bystricky (Univ. Toulouse, France)
Philippe Collas (Univ. Oslo, Norway)
Roland Foisner (MFPL, Austria)
Peter Fraser (Babraham Inst., UK)
Martin W. Hetzer (Salk Inst., USA)
Anthony Imbalzano (Univ. Mass, USA)
Joachim Lingner (EPFL, Switzerland)
Michael Guy Poirier (Ohio State Univ., USA)
Kannanganattu V. Prasanth (Univ. Illinois, USA)
Maria-Elena Torres-Padilla (IGBMC, France)
Paul A. Wade (NIEHS, NIH, USA)

International Symposium on
Chromatin Structure, Dynamics, and Function
August 23-26, 2015

Registration and abstract deadline: Jun 30, 2015
<http://www.knt-ec.net/2015/iscsdf/>
Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan
<http://www.yumebutai.org/english/index.html>

Organizers
Hitoshi Kurumizaka (Waseda Univ.)
Hiroshi Kimura (Tokyo Tech.)
Tokuko Haraguchi (NICT)

Overseas Invited Speakers
Frederic Berger (GMI, Austria)
Philippe Collas (Univ. Oslo, Norway)
Roland Foisner (MFPL, Austria)
Peter Fraser (Babraham Inst., UK)
Martin W. Hetzer (Salk Inst., USA)
Anthony Imbalzano (Univ. Massachusetts, USA)
Joachim Lingner (EPFL, Switzerland)
Michael Guy Poirier (Ohio State Univ., USA)
Kannanganattu V. Prasanth (Univ. Illinois, USA)
Maria-Elena Torres-Padilla (IGBMC, France)
Paul A. Wade (NIEHS, NIH, USA)

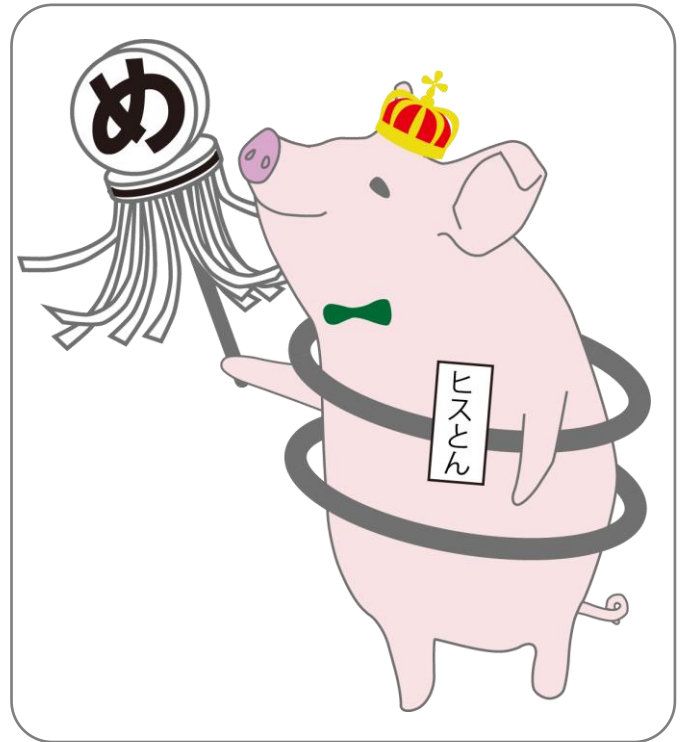
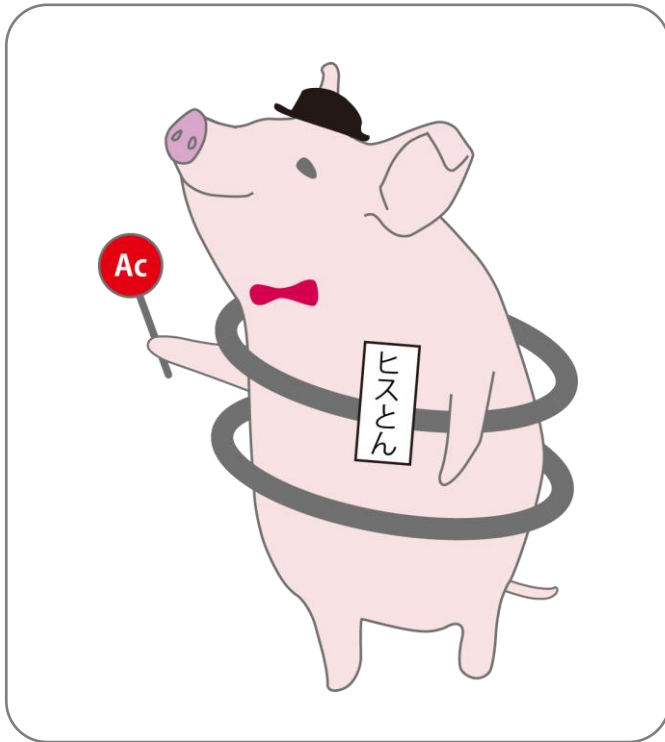
Supported by
Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas "Chromatin Structure, Dynamics, and Function" from the MEXT of Japan
National Institute of Information and Communications Technology (NICT), Japan

編集後記：寒さが身に沁みる今日この頃ですが、いかがお過ごしでしょうか。私は年末年始も容赦なく宿題がてんこ盛りの中、いつの間にか年が明けていて焦りました。みなさま風邪などひかれないう、ご自愛ください。今年もどうぞよろしくお祈りします。

HIKI

間違い探し

左右の絵で違うところはどこでしょう？



答えは本研究領域のホームページで！

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/index.html>

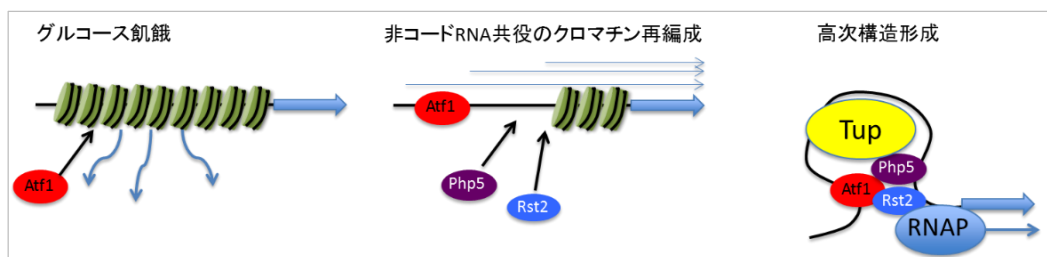
1. 公募班の研究紹介：首都大学東京・廣田 耕志、横浜市立大学・小田 隆
2. アウトリーチ活動：一般公開シンポジウム「生き物と細胞の設計図 ～DNA・クロマチン・核～」
3. 成果紹介：①胡桃坂領域代表らの領域内共同研究による論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。
②齊藤(典)らの論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。
③大川班員らの領域内共同研究による論文が、Nucleic Acids Research 誌に掲載されました。
4. 平成 26 年度の成果
5. 今後の予定

1. 公募班の研究紹介

【ノンコーディング RNA 転写と共役したクロマチン構造変化の制御機構の解明】

研究代表者：廣田 耕志（首都大学東京 理工学研究科）

近年、長鎖非コード RNA の核スペックルやカハル体の形成への関与や、がん転移と相関した長鎖非コード RNA 転写誘導などが報告されており、長鎖非コード RNA に関する多くの発見が出始めている。これまで研究代表者らは、分裂酵母のクロマチン動構造の制御機構の研究を行い、非コード RNA 転写に沿った転写領域でのクロマチン再編成現象を見いだしている。しかし、その分子機構は未知の部分が多く残っている。本研究では、非コード RNA 転写と共役するクロマチン再編成や、その制御における転写抑制・活性化因子のクロストークおよび、クロマチン再編成後に見られる遺伝子座内部での高次構造形成メカニズムについて研究を行う。現在、転写抑制因子 Tup11-12 の複合体が遺伝子プロモータ領域に集積していることや、この領域内で非コード RNA に依存した高次構造を形成（下図）していることを見いだしている。さらに、Tup11-12 複合体が転写のストレス応答特異性や転写開始点選択などの精密制御に必須の役割を果たすことを見だしている。本研究を通じて、非コード RNA によるクロマチン動構造の新機構解明に繋げることが出来れば幸いである。



【X線小角散乱を用いた再構成クロマチンの動的構造解析】

研究代表者：小田 隆（横浜市立大学 生命医科学）

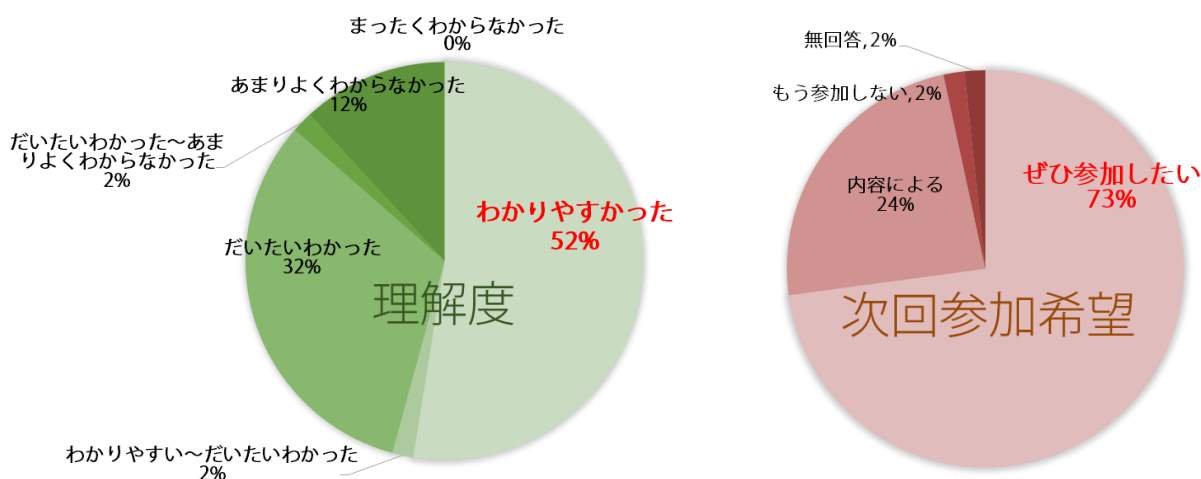
小角散乱法は結晶構造解析のような原子レベルの分解能はないものの、溶液中での動的な構造情報を得ることができる手法である。クロマチンの構成単位であるモノヌクレオソームはこれまでも多くの結晶構造が解かれているが、クロマチンの動構造と機能発現を理解するためにはモノヌクレオソームの構造をより高次のクロマチン構造へとつなげてゆく必要がある。モノヌクレオソームを複数つないだポリヌクレオソームは結晶化が難しく、仮に結晶が得られた場合でも結晶化パッキングなどの影響を多分に受けていると推測され

る。従って、本領域内で行われる結晶構造解析による原子分解能での構造決定と合わせて、動的な構造解析も必要と考えられる。本研究では X 線小角散乱法により、結晶化パッキングの影響のない溶液中での動的な構造情報を観測し、ヒストンバリエントを含むヌクレオソームが高次のクロマチン構造へどのような影響を与えるかを明らかにする。さらに、得られた小角散乱データは分子動力学シミュレーションの検証にも利用できるため、これら領域内研究との連携によりクロマチンの動構造の解明を目指す。

2. アウトリーチ活動

■ 一般公開シンポジウム第 2 弾「生き物と細胞の設計図～DNA・クロマチン・核～」

1月12日(月)、千里ライフサイエンスセンターにおいて、山縣一夫班員を中心に企画された一般公開シンポジウムが開催されました。これは、2014年8月に行われたシンポジウムに続く二回目のものです。当日は、成人の日、かつ、入試シーズンであったにも関わらず、10代から70代以上の幅広い年齢層の約80名の参加者がありました。そのうち、59名の方がアンケートに回答してくださいました。多くの方々に発表内容を理解していただけたようで、意義のあるものとなりました。



3. 成果紹介

①胡桃坂領域代表と香川班員らによる領域内共同研究の論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。

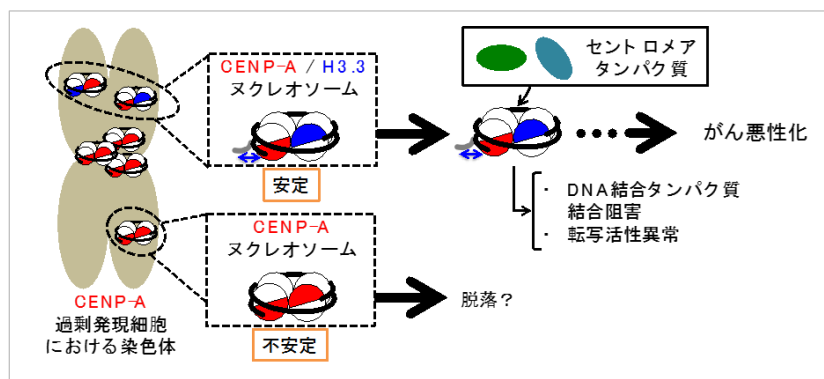
Crystal structure and stable property of the cancer-associated heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3.

Arimura Y, Shirayama K, Horikoshi N, Fujita R, Taguchi H, Kagawa W, Fukagawa T, Almouzni G, Kurumizaka H
 Sci. Rep. 2014 Nov 19;4:7115.
<http://www.nature.com/srep/2014/141119/srep07115/full/srep07115.html>

ヌクレオソームはクロマチンの基本構造ユニットであり、4種類のヒストン(H2A、H2B、H3、H4)各2分子ずつからなるヒストン8量体にDNAが巻き付いた構造体である。ヒストンにはアミノ酸配列が類似した亜種(バリエント)が多数存在し、ヒストンバリエントはヌクレオソームに取り込まれることでクロマチンの性質を変化させ、ゲノムDNA上で起こるイベントを制御すると考えられている。近年、様々ながん細胞において、ヒストンバリエントの発現異常や体細胞変異が見出されており、がん化やがんの悪性化にヒストンバリエントが関与するメカニズムが注目されている。CENP-Aはセントロメア領域に局在するヒストンH3バリエントで、正常細胞ではセントロメアの形成を主導する。一方、結腸がんなどの、ある種のがん細胞においては、CENP-Aが高発現し、セントロメア以外の領域にCENP-AとH3.3を1分子ずつヘテロに含

むヌクレオソーム (CENP-A/H3.3 ヌクレオソーム) が形成されることが、G. Almouzni と胡桃坂領域代表との共同研究によって報告されている (1)。

そこで本研究においては、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームの構造と形成メカニズムを明らかにするため、精製ヒストンを用いてヒトの CENP-A/H3.3 ヌクレオソームを試験管内で再構成し、X線結晶構造解析をはじめとする構造生物学的解析、および生化学的解析を行った。その結果、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームは、CENP-A ホモヌクレオソームよりも著しく安定であることを見いだした。一方、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームは CENP-A ホモヌクレオソームの特徴である“ヌクレオソーム末端に位置する DNA がフレキシブルである性質”および“セントロメアタンパク質 CENP-C への結合能”を保持していることが明らかになった。これらの性質によって、セントロメア以外の領域に形成された CENP-A/H3.3 ヌクレオソームにはセントロメアタンパク質の一部が集積し、さらに、この状態が安定に保持されてしまうと考えられる (図)。したがって、CENP-A/H3.3 ヌクレオソームの形成によって、不適切な領域へのセントロメア形成や、本来クロマチンに結合すべきである DNA 結合タンパク質の阻害が引き起こされると考えられた。それによって、転写などの DNA 機能発現に異常が生じることで、発がんやがんの悪性化につながる可能性が示唆された (図)。このように本研究は、がんの悪性化に寄与するとされているヌクレオソームの構造生物学的および生化学的特徴について初めて明らかにしたもので、今後、医療分野などへの貢献が期待される。



(1) Mislocalization of the centromeric histone variant CenH3/CENP-A in human cells depends on the chaperone DAXX., Lacoste N, Woolfe A, Tachiwana H, Gareau AV, Barth T, Cantaloube S, Kurumizaka H, Imhof A, Almouzni G., Mol. Cell. 2014 Feb 20;53(4):631-644.

②齊藤(典)班員らの論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。本成果は、熊本日日新聞 (H26. 11/12) に掲載されました。

Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells

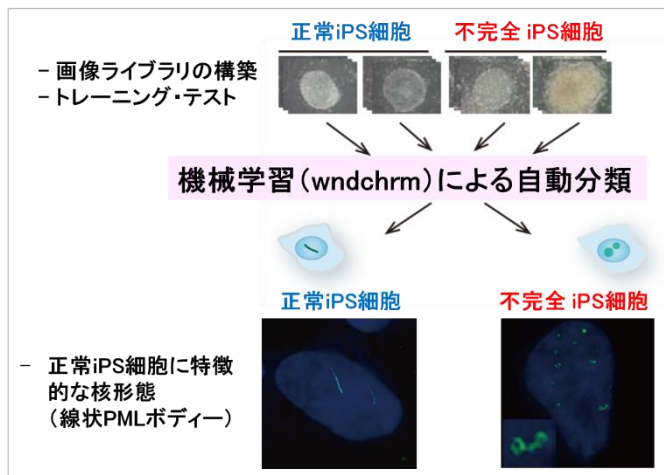
Tokunaga K, Saitoh N, Goldberg IG, Sakamoto C, Yasuda Y, Yoshida Y, Yamanaka S, Nakao M.

Sci. Rep. 2014 Nov 11;4:6996.

<http://www.nature.com/srep/2014/141111/srep06996/full/srep06996.html>

細胞核内は、転写や DNA の複製、修復などが効率的に行われることを反映して高度に組織化されており、核小体、PML ボディー、カハールボディーなどの様々な構造体が存在する。細胞核の形態は、細胞分化、ストレス応答、疾患など様々な状況で特徴的に変化し、細胞の状態を評価するよい指標であると考えられている。一方、再生医療などでは、細胞のリプログラミング状態を非侵襲性に評価できる技術が必要とされている。例えば、iPS 細胞は体細胞に規定の因子を導入することで作成できるが、その過程で正常にリプログラムされたコロニーと、リプログラムが不完全であったコロニーが混在するので、これらを正確に判別できることが重要である。近年、生物画像を目視のみで判断せずに、定量化して客観的に評価しようという機運が高まり、関連技術が発展している。パターン認識プログラム wndchrn (weighted neighbor distances using a compound hierarchy of algorithms representing morphology) は、形態による自動分類や推定、形態の類似度を自動計測するために開発された。我々は、wndchrn を用いて、生きた状態で、人工的な標識をしていないコロニー画像を用いて、正常なヒト iPS 細胞を不完全にリプログラムされた細胞から区別する、画像解析技術の確立を試みた。

まず、ヒトリプログラム細胞の位相差画像を多数取得し、画像ライブラリーを作成し、wndchrm による教師付き機械学習を行い、分別器を構築した。その結果、正常にリプログラムした iPS と、コロニー形成はしているものの適切にリプログラムされなかった、不完全 iPS 細胞を、高精度に分類することができた。また、正常 iPS と不完全 iPS の形態の違いはコロニーを形成する個々の細胞内にあることが示唆された。そこで我々は、様々な細胞核内構造形態の定量解析を行った。転写制御やストレス応答などに関わる核内構造体である PML ボディーは、一般的な体細胞では、直径 0.2~1 μm 程度の球状構造で存在する。大変めずらしいことに、正常 iPS では線状構造を形成しており、分化とともに球状に戻ってゆくことがわかった。また、超解像顕微鏡解析 (SIM; Structured Illumination Microscopy) により、不完全な iPS 細胞では、球状から線状への遷移状態の PML ボディーが形成されていることが示された。我々の研究により、細胞のリプログラミングの過程で細胞核の構造がダイナミックに、かつ特異的に変化していること、さらに、これらの特徴により細胞状態を高精度に分類できることが示された。



③大川班員と木村班員らによる領域内共同研究の論文が、Nucleic Acids Research 誌に掲載されました。

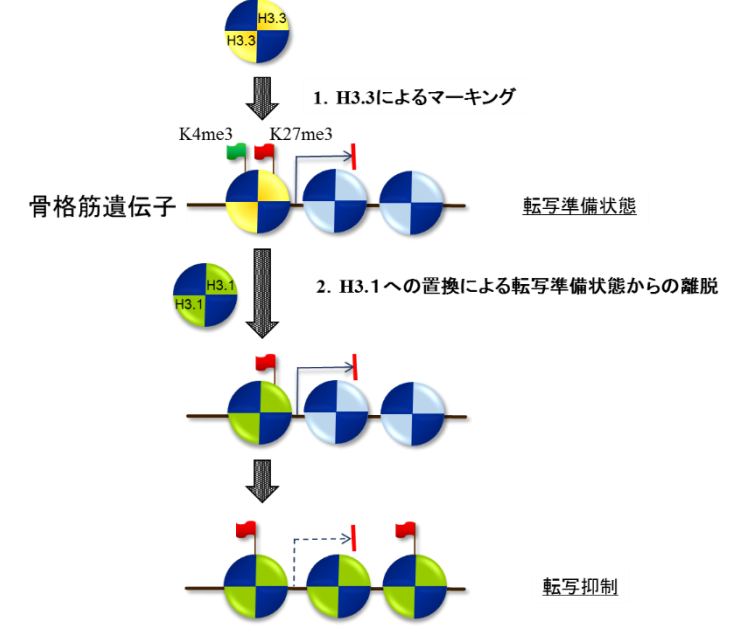
Incorporation of histone H3.1 suppresses the lineage potential of skeletal muscle.

Harada A, Maehara K, Sato Y, Konno D, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y

Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(2):775-86.

<http://nar.oxfordjournals.org/content/43/2/775.long>

細胞分化とは、23,000 もの遺伝子の中から分化に必要な特定の遺伝子群が選択され、適切に発現されることと捉えることができる。言い換えると、分化する能力 (分化能) を持つ細胞は、なんらかの形で“遺伝子を発現させる能力”を持っていると考えられる。この分化能は、遺伝子発現が行われる場であるクロマチン構造に規定されていると考えられてきたが、その実体は未だ不明な点が多い。今回、我々は、この分化能を規定するクロマチン構造に異なるヒストン H3 バリエントの量比が関わっていることを明らかとした。これまでに、我々は骨格筋分化をモデルとして、ヒストン H3 バリエントの 1 つである H3.3 が、骨格筋分化関連遺伝子のプロモーター領域をあらかじめマーキングすることが、その後の遺伝子発現のために必須であることを報告した。本論文では、取り込まれた H3.3 がどのように骨格筋分化を制御しているか更に解析を進めた。



マウス発生胚を用いて in vivo での骨格筋分化における H3.3 の取り込み及び H3K4me3 と H3K27me3 の修飾を次世代シーケンスによるクロマチン免疫沈降 (ChIPseq) により解析した結果、未分化段階では、骨格筋遺伝子のプロモーター領域に、H3.3 が取り込まれており、活性型 H3K4me3 と抑制型 H3K27me3 の両方の修飾を持つ双極性修飾 (bivalent state) を一過的に形成していた。そして、分化に伴い、抑制型 H3K27me3 が消失し、活性型 H3K4me3 が保持されることが明らかとなった。つまり、H3.3 の取り込みは発現可能な状態でありながらも、直接、遺伝子発現に結びつく訳ではないことが示唆された。そこで、骨格筋分化時に H3.1 と H3.3 の

骨格筋遺伝子上での取り込みバランスを強制的に変化させてみることにした。未分化段階の C2C12 細胞（骨格筋に分化する培養細胞）において GFP-H3.1 を強制発現させた結果、C2C12 細胞の骨格筋分化が抑制されることが分かった。ChIPseq 解析の結果、GFP-H3.1 強制発現細胞では H3.3 の減少と GFP-H3.1 の取り込みの増加が明らかとなった。逆に H3.3 を強制発現させた場合、骨格筋分化が亢進することが明らかとなった。次に、H3.3 あるいは H3.1 が取り込まれることで骨格筋遺伝子座のプロモーター領域のヒストン修飾にどのような影響を与えたか解析を行った。同様に ChIPseq 解析の結果、GFP-H3.1 を発現させた C2C12 細胞では、GFP-H3.1 への置換によって H3K4me3 修飾が減少し H3K27me3 修飾が上昇していた。これは双極性修飾の状態から抑制性修飾の状態に偏ることで分化能抑制を招いたことを示唆していた (図)。これらの結果は、骨格筋分化能は、クロマチンへの H3.3 の取り込みを介して確立され、H3 バリエーションの取り込み比によりヒストン修飾状態が調節されることを示している。ヒストンの選択的発現を制御することで様々な細胞分化能制御への応用が期待できる。

4. 平成 26 年度の成果

原著論文

領域内共同研究による論文が 22 報発表されました。

DNA binding properties of the actin-related protein Arp8 and its role in DNA repair.

Osakabe A, Takahashi Y, Murakami H, Otawa K, Tachiwana H, Oma Y, Nishijima H, Shibahara KI, [Kurumizaka H](#), [Harata M](#)
PLoS One. 2014 Oct 9;9(10):e108354.

Crystal structure and stable property of the cancer-associated heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3

Arimura Y, Shirayama K, Horikoshi N, Fujita R, Taguchi H, [Kagawa W](#), Fukagawa T, Almouzni G and [Kurumizaka H](#)
Sci Rep, 2014, 4: 7115

Distinct features of the histone core structure in nucleosomes containing the histone H2A.B variant

[Suqiyama M](#), Arimura Y, Shirayama K, Fujita R, Oba Y, Sato N, Inoue R, [Oda T](#), Sato M, Heenan RK and [Kurumizaka H](#)
Biophys J, 2014, 106(10): 2206-2213

Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1

Machida S, Takaku M, Ikura M, Sun J, Suzuki H, Kobayashi W, Kinomura A, Osakabe A, Tachiwana H, Horikoshi Y, Fukuto A, Matsuda R, Ura K, [Tashiro S](#), Ikura T and [Kurumizaka H](#)
Sci Rep, 2014, 4: 4863

Histone H4 Lys 20 monomethylation of the CENP-A nucleosome is essential for kinetochore assembly

[Hori T](#), Shang WH, Toyoda A, Misu S, Monma N, Ikeo K, Molina O, Vargiu G, Fujiyama A, [Kimura H](#), Earnshaw WC and Fukagawa T
Dev Cell, 2014, 29(6): 740-749

The CENP-O complex requirement varies among different cell types

Kagawa N, [Hori T](#), Hoki Y, Hosoya O, Tsutsui K, Saga Y, [Sado T](#) and Fukagawa T
Chromosome Res, 2014, 22(3): 293-303

Two arginine residues suppress the flexibility of nucleosomal DNA in the canonical nucleosome core

[Kono H](#), Shirayama K, Arimura Y, Tachiwana H and [Kurumizaka H](#)
PLoS One, 2015, 10(3): e0120635

Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells

Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, [Ohkawa Y](#), Sakata-Sogawa K, [Tokunaga M](#), Nagase T, Nozaki N, McNally JG and [Kimura H](#)
Nature, 2014, 516(7530): 272-275

Evaluation of chemical fluorescent dyes as a protein conjugation partner for live cell imaging

Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, [Kurumizaka H](#), Nozaki N and [Kimura H](#)
PLoS One, 2014, 9(9): e106271

Heterochromatin dynamics during the differentiation process revealed by the DNA methylation reporter mouse, MethylRO

Ueda J, Maehara K, Mashiko D, Ichinose T, Yao T, Hori M, Sato Y, [Kimura H](#), [Ohkawa Y](#) and [Yamagata K](#)
Stem Cell Reports, 2014, 2(6): 910-924

Biased assembly of the nuclear pore complex is required for somatic and germline nuclear differentiation in Tetrahymena

Iwamoto M, Koujin T, Osakada H, Mori C, Kojidani T, Matsuda A, [Asakawa H](#), [Hiraoka Y](#) and [Haraguchi T](#)
J Cell Sci, 2015, doi: 10.1242/jcs.167353

Fluorescence correlation spectroscopy with visible-wavelength superconducting nanowire single-photon detector

Yamashita T, Liu D, Miki S, Yamamoto J, [Haraguchi T](#), Kinjo M, [Hiraoka Y](#), Wang Z and Terai H
Opt Express, 2014, 22(23): 28783-28789

Externally Controllable Molecular Communication

Nakano T, Kobayashi S, Suda T, Okaie Y, [Hiraoka Y](#), [Haraguchi T](#)
IEEE J Sel Area Comm, 2014, 32 (12), 2417-2431, doi: 10.1109/JSAC.2014.2367667

Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

Asakawa H, Yang HJ, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, [Tokunaga M](#), Iwamoto M, [Hiraoka Y](#), [Haraguchi T](#)
Nucleus, 5(2):149-162

Nuclear actin activates human transcription factor genes including the OCT4 gene

Yamazaki S, Yamamoto K, [Tokunaga M](#), Sakata-Sogawa K and [Harata M](#)
Biosci Biotechnol Biochem, 2015, 79(2): 242-246

Incorporation of histone H3.1 suppresses the lineage potential of skeletal muscle

Harada A, Maehara K, Sato Y, Konno D, Tachibana T, [Kimura H](#) and [Ohkawa Y](#)
Nucleic Acids Res, 2015, 43(2): 775-786

Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1

Baba T, Otake H, Sato T, Miyabayashi K, Shishido Y, Wang CY, Shima Y, [Kimura H](#), Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, [Ohkawa Y](#), Suyama M, Chung BC and Morohashi K
Nat Commun, 2014, 5: 3634

Meiotic nuclear movements in fission yeast are regulated by the transcription factor Mei4 downstream of a Cds1-dependent replication checkpoint pathway

Ruan K, Yamamoto TG, [Asakawa H](#), Chikashige Y, Masukata H, [Haraguchi T](#) and [Hiraoka Y](#)
Genes Cells, 2015, 20(3): 160-172

Chromosomes rein back the spindle pole body during horsetail movement in fission yeast meiosis

Chikashige Y, Yamane M, Okamasa K, Mori C, Fukuta N, Matsuda A, [Haraguchi T](#) and [Hiraoka Y](#)
Cell Struct Funct, 2014, 39(2): 93-100

Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage

Liu NA, Sun J, Kono K, Horikoshi Y, Ikura T, Tong X, [Haraguchi T](#) and [Tashiro S](#)
FASEB J, 2015, doi: 10.1096/fj.14-265546

Reorganization of damaged chromatin by the exchange of histone variant H2A.Z-2

Nishibuchi I, Suzuki H, Kinomura A, Sun J, Liu NA, Horikoshi Y, Shima H, Kusakabe M, [Harata M](#), Fukagawa T, Ikura T, Ishida T, Nagata Y and [Tashiro S](#)
Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2014, 89(4): 736-744

Adhesion of suspension cells on a coverslip in serum-free conditions

Nakayama T, Mihara K, Kawata J, [Kimura H](#) and [Saitoh H](#)
Anal Biochem, 2014, 466(1-3)

その他 81 報の論文が発表されました。

Charge-neutralization effect of the tail regions on the histone H2A/H2B dimer structure

Saikusa K, Shimoyama S, Asano Y, Nagadoi A, Sato M, [Kurumizaka H](#), Nishimura Y and Akashi S
Protein Sci, 2015, doi: 10.1002/pro.2673

Mass spectrometric approach for characterizing the disordered tail regions of the histone H2A/H2B dimer

Saikusa K, Nagadoi A, Hara K, Fuchigami S, [Kurumizaka H](#), Nishimura Y and Akashi S
Anal Chem, 2015, 87(4): 2220-2227

Human tNASP promotes in vitro nucleosome assembly with histone H3.3

Kato D, Osakabe A, Tachiwana H, Tanaka H and [Kurumizaka H](#)
Biochemistry, 2015, 54(5): 1171-1179

A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye

Taguchi H, Horikoshi N, Arimura Y and [Kurumizaka H](#)
Methods, 2014, 70(2-3): 119-126

N-terminal phosphorylation of HP1alpha increases its nucleosome-binding specificity

Nishibuchi G, Machida S, Osakabe A, Murakoshi H, Hiragami-Hamada K, Nakagawa R, Fischle W, Nishimura Y, [Kurumizaka H](#), Tagami H and Nakayama J
Nucleic Acids Res, 2014, 42(20): 12498-12511

Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using Escherichia coli cells

Takahashi D, Sato K, Shimomuki M, Takata M and [Kurumizaka H](#)
Protein Expr Purif, 2014, 103: 8-15

FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair

Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugawara K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, [Kurumizaka H](#) and Takata M
Cell Rep, 2014, 7(4): 1039-1047

Defective FANCI binding by a fanconi anemia-related FANCD2 mutant

Sato K, Ishiai M, Takata M and [Kurumizaka H](#)
PLoS One, 2014, 9(12): e114752

Structure of human nucleosome containing the testis-specific histone variant TSH2B.

Urahama T, Horikoshi N, Osakabe A, Tachiwana H, [Kurumizaka H](#).
Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2014 Apr;70(Pt 4):444-9.

Local dynamics coupled to hydration water determines DNA-sequence-dependent deformability

Nakagawa H, Yonetani Y, Nakajima K, Ohira-Kawamura S, Kikuchi T, Inamura Y, Kataoka M and [Kono H](#)
Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2014, 90(2): 022723

Intensity of Diffracted X-rays from Biomolecules with Radiation Damage Caused by Strong X-ray Pulses

Kai T, Tokuhiga A, Moribayashi K, Fukuda Y, [Kono H](#), Go N
J. Phys. Soc. Jpn. 2014, 83: 094301 doi: 10.7566/JPSJ.83.094301

An annexin A1-FPR1 interaction contributes to necroptosis of keratinocytes in severe cutaneous adverse drug reactions

Saito N, Qiao H, Yanagi T, Shinkuma S, Nishimura K, Suto A, Fujita Y, Suzuki S, Nomura T, Nakamura H, Nagao K, [Obuse C](#), Shimizu H and Abe R
Sci Transl Med, 2014, 6(245): 245ra295

A novel method for purification of the endogenously expressed fission yeast Set2 complex

Suzuki S, Nagao K, [Obuse C](#), Murakami Y and Takahata S
Protein Expr Purif, 2014, 97: 44-49

CxxC-ZF domain is needed for KDM2A to demethylate histone in rDNA promoter in response to starvation

Tanaka Y, Umata T, Okamoto K, [Obuse C](#) and Tsuneoka M
Cell Struct Funct, 2014, 39(1): 79-92

Coordinated expression of H3K9 histone methyltransferases during tooth development in mice

Kamiunten T, Ideno H, Shimada A, Nakamura Y, [Kimura H](#), Nakashima K and Nifuji A
Histochem Cell Biol, 2015, 143(3): 259-266

Phenotype Specific Analyses Reveal Distinct Regulatory Mechanism for Chronically Activated p53

Kirschner K, Samarajiva SA, Cairns JM, Menon S, Perez-Mancera PA, Tomimatsu K, Bermejo-Rodriguez C, Ito Y, Chandra T, Narita M, Lyons SK, Lynch AG, [Kimura H](#), Ohbayashi T, Tavare S and Narita M
PLoS Genet, 2015, 11(3): e1005053

H3K36 Trimethylation-Mediated Epigenetic Regulation is Activated by Bam and Promotes Germ Cell Differentiation During Early Oogenesis in Drosophila

Mukai M, Hira S, Nakamura K, Nakamura S, [Kimura H](#), Sato M and Kobayashi S
Biol Open, 2015, 4(2): 119-124

Quantifying histone and RNA polymerase II post-translational modification dynamics in mother and daughter cells

Stasevich TJ, Sato Y, Nozaki N and [Kimura H](#)
Methods, 2014, 70(2-3): 77-88

Hierarchical molecular events driven by oocyte-specific factors lead to rapid and extensive reprogramming

Jullien J, Miyamoto K, Pasque V, Allen GE, Bradshaw CR, Garrett NJ, Halley-Stott RP, [Kimura H](#), Ohsumi K and Gurdon JB
Mol Cell, 2014, 55(4): 524-536

Nuclear dynamics of topoisomerase IIbeta reflects its catalytic activity that is regulated by binding of RNA to the C-terminal domain

Onoda A, Hosoya O, Sano K, Kiyama K, [Kimura H](#), Kawano S, Furuta R, Miyaji M, Tsutsui K and Tsutsui KM
Nucleic Acids Res, 2014, 42(14): 9005-9020

Nucleosomal regulation of chromatin composition and nuclear assembly revealed by histone depletion

Zierhut C, Jenness C, [Kimura H](#) and Funabiki H
Nat Struct Mol Biol, 2014, 21(7): 617-625

Loss of histone H4K20 trimethylation predicts poor prognosis in breast cancer and is associated with invasive activity

Yokoyama Y, Matsumoto A, Hieda M, Shinchi Y, Ogihara E, Hamada M, Nishioka Y, [Kimura H](#), Yoshidome K, Tsujimoto M and Matsuura N
Breast Cancer Res, 2014, 16(3): R66

DNA methylation reader MECP2: cell type- and differentiation stage-specific protein distribution

Song C, Feodorova Y, Guy J, Peichl L, Jost KL, [Kimura H](#), Cardoso MC, Bird A, Leonhardt H, Joffe B and Solovei I
Epigenetics Chromatin, 2014, 7: 17

Direct evidence for pitavastatin induced chromatin structure change in the KLF4 gene in endothelial cells

Maejima T, Inoue T, Kanki Y, Kohro T, Li G, Ohta Y, [Kimura H](#), Kobayashi M, Taguchi A, Tsutsumi S, Iwanari H, Yamamoto S, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Poh HM, Yamamoto K, Kawamura T, Mimura I, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Shibata H, Yoshinaka Y, Doi T, Asanuma A, Tanabe S, Tanaka T, Minami T, Hamakubo T, Sakai J, Nozaki N, Aburatani H, Nangaku M, Ruan X, Tanabe H, Ruan Y, Ihara S, Endo A, Kodama T and Wada Y
PLoS One, 2014, 9(5): e96005

Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced gammaH2AX accumulation

Nakatani T, [Yamagata K](#), Kimura T, Oda M, Nakashima H, Hori M, Sekita Y, Arakawa T, Nakamura T and Nakano T
EMBO Rep, 2015, doi: 10.15252/embr.201439427

Improved and robust detection of cell nuclei from four dimensional fluorescence images

Bashar MK, [Yamagata K](#) and Kobayashi TJ
PLoS One, 2014, 9(7): e101891

Deficiency of a lipid droplet protein, perilipin 5, suppresses myocardial lipid accumulation, thereby preventing type 1 diabetes-induced heart malfunction

Kuramoto K, Sakai F, Yoshinori N, Nakamura TY, Wakabayashi S, Kojidani T, [Haraguchi T](#), Hirose F and Osumi T
Mol Cell Biol, 2014, 34(14): 2721-2731

A facile preparation of glass-supported lipid bilayers for analyzing molecular dynamics

Ito Y, Sakata-Sogawa K and [Tokunaga M](#)
Anal Sci, 2014, 30(12): 1103-1106

Proteomic identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon

Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, [Yoneda Y](#), Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I and Naka T
Rheumatology (Oxford), 2015, 54(2): 349-358

Structural basis for the selective nuclear import of the C2H2 zinc-finger protein Snail by importin beta

Choi S, Yamashita E, [Yasuhara N](#), Song J, Son SY, Won YH, Hong HR, Shin YS, Sekimoto T, Park IY, [Yoneda Y](#) and Lee SJ
Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2014, 70(Pt 4): 1050-1060

Transcriptional program of Kpna2/Importin-alpha2 regulates cellular differentiation-coupled circadian clock development in mammalian cells

Umemura Y, Koike N, Matsumoto T, Yoo SH, Chen Z, [Yasuhara N](#), Takahashi JS and Yagita K
Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(47): E5039-5048

The linker histone in *Saccharomyces cerevisiae* interacts with actin-related protein 4 and both regulate chromatin structure and cellular morphology

Georgieva M, Staneva D, Uzunova K, Efremov T, Balashev K, [Harata M](#) and Miloshev G
Int J Biochem Cell Biol, 2015, 59: 182-192

SWR1 and INO80 chromatin remodelers contribute to DNA double-strand break perinuclear anchorage site choice

Horigome C, Oma Y, Konishi T, Schmid R, Marcomini I, Hauer MH, Dion V, [Harata M](#) and Gasser SM
Mol Cell, 2014, 55(4): 626-639

Nuclear actin filaments recruit cofilin and actin-related protein 3, and their formation is connected with a mitotic block

Kalendova A, Kalasova I, Yamazaki S, Ulicna L, [Harata M](#) and Hozak P
Histochem Cell Biol, 2014, 142(2): 139-152

Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells

Tokunaga K, [Saitoh N](#), Goldberg IG, Sakamoto C, Yasuda Y, Yoshida Y, Yamanaka S and Nakao M
Sci Rep, 2014, 4: 6996

Spatial re-organization of myogenic regulatory sequences temporally controls gene expression

Harada A, Mallappa C, Okada S, Butler JT, Baker SP, Lawrence JB, [Ohkawa Y](#) and Imbalzano AN
Nucleic Acids Res, 2015, 43(4): 2008-2021

MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex

Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, [Ohkawa Y](#), Conaway JW, Conaway RC and Hatakeyama S
Nat Commun, 2015, 6: 5941

A genome-wide analysis identifies a notch-RBP-Jkappa-IL-7Ralpha axis that controls IL-17-producing gammadelta T cell homeostasis in mice

Nakamura M, Shibata K, Hatano S, Sato T, [Ohkawa Y](#), Yamada H, Ikuta K and Yoshikai Y
J Immunol, 2015, 194(1): 243-251

Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation

Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, [Ohkawa Y](#), Kayama H, Kallies A, Nutt SL, Sakaguchi S, Takeda K, Kurosaki T and Baba Y
Immunity, 2014, 41(6): 1040-1051

SraTailor: graphical user interface software for processing and visualizing ChIP-seq data

Oki S, Maehara K, [Ohkawa Y](#) and Meno C
Genes Cells, 2014, 19(12): 919-926

Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells

Tamura I, [Ohkawa Y](#), Sato T, Suyama M, Jozaki K, Okada M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Sato S, Yamagata Y, Tamura H and Sugino N
Mol Endocrinol, 2014, 28(10): 1656-1669

Acute hyperglycemia impairs functional improvement after spinal cord injury in mice and humans

Kobayakawa K, Kumamaru H, Saiwai H, Kubota K, [Ohkawa Y](#), Kishimoto J, Yokota K, Ideta R, Shiba K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Iwamoto Y and Okada S
Sci Transl Med, 2014, 6(256): 256ra137

Establishment of neutralizing rat monoclonal antibodies for fibroblast growth factor-2

Tanaka M, Yamaguchi M, Shiota M, Kawamoto Y, Takahashi K, Inagaki A, Osada-Oka M, Harada A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Iwao H and [Ohkawa Y](#)
Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 2014, 33(4): 261-269

Identification of myelin transcription factor 1 (MyT1) as a subunit of the neural cell type-specific lysine-specific demethylase 1 (LSD1) complex

Yokoyama A, Igarashi K, Sato T, Takagi K, Otsuka IM, Shishido Y, Baba T, Ito R, Kanno J, [Ohkawa Y](#), Morohashi K and Sugawara A
J Biol Chem, 2014, 289(26): 18152-18162

Hsc70 contributes to cancer cell survival by preventing Rab1A degradation under stress conditions

Tanaka M, Mun S, Harada A, [Ohkawa Y](#), Inagaki A, Sano S, Takahashi K, Izumi Y, Osada-Oka M, Wanibuchi H, Yamagata M, Yukimura T, Miura K, Shiota M and Iwao H
PLoS One, 2014, 9(5): e96785

Chromokinesin Kid and kinetochore kinesin CENP-E differentially support chromosome congression without end-on attachment to microtubules

Iemura K and [Tanaka K](#)
Nat Commun, 2015, 6: 6447

CLIP-170 recruits PLK1 to kinetochores during early mitosis for chromosome alignment

Amin MA, Itoh G, Iemura K, Ikeda M and [Tanaka K](#)
J Cell Sci, 2014, 127(Pt 13): 2818-2824

Foxa2 acts as a co-activator potentiating expression of the Nurr1-induced DA phenotype via epigenetic regulation

Yi SH, He XB, Rhee YH, Park CH, [Takizawa T](#), Nakashima K and Lee SH
Development, 2014, 141(4): 761-772

DBTMEE: a database of transcriptome in mouse early embryos

Park SJ, Shirahige K, [Ohsuji M](#) and Nakai K
Nucleic Acids Res, 2015, 43(Database issue): D771-776

The 19S proteasome subunit Rpt3 regulates distribution of CENP-A by associating with centromeric chromatin

Kitagawa T, Ishii K, Takeda K and [Matsumoto T](#)
Nat Commun, 2014, 5: 3597

The International Nucleome Consortium

[Tashiro S](#) and Lanctot C
Nucleus, 2015, 1-4, doi: 10.1080/19491034.2015.1022703

The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing the myeloid program

Itoh-Nakadai A, Hikota R, Muto A, Kometani K, Watanabe-Matsui M, Sato Y, Kobayashi M, Nakamura A, Miura Y, Yano Y, [Tashiro S](#), Sun J, Ikawa T, Ochiai K, Kurosaki T and Igarashi K
Nat Immunol, 2014, 15(12): 1171-1180

Smoking cessation reverses DNA double-strand breaks in human mononuclear cells

Ishida M, Ishida T, [Tashiro S](#), Uchida H, Sakai C, Hironobe N, Miura K, Hashimoto Y, Arihiro K, Chayama K, Kihara Y and Yoshizumi M
PLoS One, 2014, 9(8): e103993

X chromosome reactivation dynamics reveal stages of reprogramming to pluripotency

Pasque V, Tchieu J, Karnik R, Uyeda M, Sadhu Dimashkie A, Case D, Papp B, Bonora G, Patel S, Ho R, Schmidt R, Mckee R, [Sado T](#), Tada T, Meissner A and Plath K
Cell, 2014, 159(7): 1681-1697

Amplified and selective assay of collagens by enzymatic and fluorescent reactions

Yasmin H, Kabashima T, Rahman MS, Shibata T and [Kai M](#)
Sci Rep, 2014, 4: 4950

Carbon nanofiber-based luminol-biotin probe for sensitive chemiluminescence detection of protein

Baj S, Krawczyk T, Pradel N, Azam MG, Shibata T, Dragusha S, Skutil K, Pawlyta M and [Kai M](#)
Anal Sci, 2014, 30(11): 1051-1056

Effect of Atmospheric-Pressure Helium Plasma Jet on Cell Culture Medium

Takamura N, Wang D, Satoh T, Namihira T, [Saitoh H](#), Akiyama H
ELECTRON COMM JPN, 2014, 97(11): 65-73, doi: 10.1002/ecj.11636

SUMO-modification and elimination of the active DNA demethylation enzyme TDG in cultured human cells

Moriyama T, Fujimitsu Y, Yoshikai Y, Sasano T, Yamada K, Murakami M, Urano T, Sugasawa K and [Saitoh H](#)
Biochem Biophys Res Commun, 2014, 447(3): 419-424

The SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 localizes to etoposide-exposed mitotic chromosomes: implication for a novel DNA damage response during mitosis

Saito M, Fujimitsu Y, Sasano T, Yoshikai Y, Ban-Ishihara R, Nariai Y, Urano T and [Saitoh H](#)
Biochem Biophys Res Commun, 2014, 447(1): 83-88

Inhibition of protein SUMOylation by davidiin, an ellagitannin from *Davidia involucrata*

Takemoto M, Kawamura Y, Hirohama M, Yamaguchi Y, Handa H, [Saitoh H](#), Nakao Y, Kawada M, Khalid K, Koshino H, Kimura K, Ito A and Yoshida M
J Antibiot (Tokyo), 2014, 67(4): 335-338

Assay methods for small ubiquitin-like modifier (SUMO)-SUMO-interacting motif (SIM) interactions in vivo and in vitro using a split-luciferase complementation system

Hirohama M, Voet AR, Ozawa T, [Saitoh H](#), Nakao Y, Zhang KY, Ito A and Yoshida M
Anal Biochem, 2014, 448(92-94)

Construction of a mouse Aox1-Uba2 chimeric SUMO-E1 enzyme, mAU, and its expression in baculovirus-insect cells

Nakayama T, Yuasa E, Kanemaru A, Saito M and [Saitoh H](#)
Bioengineered, 2014, 5(2): 133-137

Genomic DNAs in a human leukemia cell line unfold after cold shock, with formation of neutrophil extracellular trap-like structures

Kawata J, Kikuchi M and [Saitoh H](#)
Biotechnol Lett, 2014, 36(2): 241-250

Antagonistic controls of chromatin and mrna start site selection by Tup family corepressors and the CCAAT-binding factor

Asada R, Takemata N, Hoffman CS, Ohta K and [Hirota K](#)
Mol Cell Biol, 2015, 35(5): 847-855

The POLD3 subunit of DNA polymerase delta can promote translesion synthesis independently of DNA polymerase zeta

[Hirota K](#), Yoshikiyo K, Guilbaud G, Tsurimoto T, Murai J, Tsuda M, Phillips LG, Narita T, Nishihara K, Kobayashi K, Yamada K, Nakamura J, Pommier Y, Lehmann A, Sale JE and Takeda S
Nucleic Acids Res, 2015, 43(3): 1671-1683

Development of a Targeted Flip-in System in Avian DT40 Cells

Kobayashi K, Fujii T, Asada R, Ooka M and [Hirota K](#)
PLoS One, 2015, 10(3): e0122006

Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end joining

Kobayashi S, Kasaishi Y, Nakada S, Takagi T, Era S, Motegi A, Chiu RK, Takeda S and [Hirota K](#)
Oncogene, 2014, doi: 10.1038/onc.2014.371

SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 plays a critical role in preventing chromosome loss

[Hirota K](#), Tsuda M, Murai J, Takagi T, Keka IS, Narita T, Fujita M, Sasanuma H, Kobayashi J and Takeda S
Genes Cells, 2014, 19(10): 743-754

RNA cytidine acetyltransferase of small-subunit ribosomal RNA: identification of acetylation sites and the responsible acetyltransferase in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*

Taoka M, Ishikawa D, Nobe Y, Ishikawa H, Yamauchi Y, Terukina G, Nakayama H, [Hirota K](#), Takahashi N and Isobe T
PLoS One, 2014, 9(11): e112156

RNase MRP cleaves pre-tRNA^{Ser}-Met in the tRNA maturation pathway

Saito Y, Takeda J, Adachi K, Nobe Y, Kobayashi J, [Hirota K](#), Oliveira DV, Taoka M and Isobe T
PLoS One, 2014, 9(11): e112488

Evolution of pre-existing versus acquired resistance to platinum drugs and PARP inhibitors in BRCA-associated cancers

Yamamoto KN, [Hirota K](#), Takeda S and Haeno H
PLoS One, 2014, 9(8): e105724

Molecular basis for SMC rod formation and its dissolution upon DNA binding

Soh YM, Burmann F, Shin HC, [Oda T](#), Jin KS, Toseland CP, Kim C, Lee H, Kim SJ, Kong MS, Durand-Diebold ML, Kim YG, Kim HM, Lee NK, Sato M, Oh BH and Gruber S
Mol Cell, 2015, 57(2): 290-303

Fidelity consequences of the impaired interaction between DNA polymerase epsilon and the GINS complex

Garbacz M, [Araki H](#), Flis K, Bebenek A, Zawada AE, Jonczyk P, Makiela-Dzbenka K and Fijalkowska IJ
DNA Repair (Amst), 2015, doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.007

Crystal structure of the homology domain of the eukaryotic DNA replication proteins Sld3/Treslin

Ito H, Muramatsu S, Shirakihara Y and [Araki H](#)
Structure, 2014, 22(9): 1341-1347

Smc5/6-mediated regulation of replication progression contributes to chromosome assembly during mitosis in human cells

Gallego-Paez LM, Tanaka H, Bando M, Takahashi M, Nozaki N, Nakato R, Shirahige K and [Hirota T](#)
Mol Biol Cell, 2014, 25(2): 302-317

Structural and functional analysis of Hikeshi, a new nuclear transport receptor of Hsp70s

Song J, Kose S, Watanabe A, Son SY, Choi S, Hong H, Yamashita E, Park IY, [Imamoto N](#) and Lee SJ
Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2015, 71(Pt 3): 473-483

Analytic 3D imaging of mammalian nucleus at nanoscale using coherent x-rays and optical fluorescence microscopy

Song C, Takagi M, Park J, Xu R, Gallagher-Jones M, [Imamoto N](#) and Ishikawa T
Biophys J, 2014, 107(5): 1074-1081

Ki67 antigen contributes to the timely accumulation of protein phosphatase 1gamma on anaphase chromosomes

Takagi M, Nishiyama Y, Taguchi A and [Imamoto N](#)
J Biol Chem, 2014, 289(33): 22877-22887

Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery

Booth DG, Takagi M, Sanchez-Pulido L, Petfalski E, Vargiu G, Samejima K, [Imamoto N](#), Ponting CP, Tollervey D, Earnshaw WC and Vagnarelli P
Elife, 2014, 3, e01641

The *Schizosaccharomyces pombe* Hikeshi/Opi10 protein has similar biochemical functions to its human homolog but acts in different physiological contexts

Oda Y, Kimura M, Kose S, Fasken MB, Corbett AH and [Imamoto N](#)
FEBS Lett, 2014, 588(10): 1899-1905

A novel facility for 3D micro-irradiation of living cells in a controlled environment by MeV ions

Mackel V, Meissl W, Ikeda T, Clever M, Meissl E, Kobayashi T, Kojima TM, [Imamoto N](#), Ogiwara K and Yamazaki Y
Rev Sci Instrum, 2014, 85(1): 014302

英文総説

領域内共同研究による英文総説が 1 報発表されました。

Visualization of epigenetic modifications in preimplantation embryos

Kimura H and Yamagata K
Methods Mol Biol, 2015, 1222: 127-147

その他 11 報の英文総説が発表されました。

Nucleosome organization and chromatin dynamics in telomeres

Ichikawa Y, Nishimura Y, [Kurumizaka H](#) and Shimizu M
Biomol Concepts, 2015, 6(1): 67-75

Histone modification sensors in living cells

Kimura H and Sato Y
Optical Probes in Biology (Jin Zhang, Sohun Mehta, and Carsten Schultz ed), CRC Press, 2015

Histone modifications associated with cancer cell migration and invasion

Hieda M, Matsuura N and [Kimura H](#)
Methods Mol Biol, 2015, 1238: 301-317

Live CLEM imaging to analyze nuclear structures at high resolution

[Haraguchi T](#), Osakada H and Koujin T
Methods Mol Biol, 2015, 1262: 89-103

Current view of the potential roles of proteins enriched on the inactive X chromosome

Nakajima T and Sado T
Genes Genet Syst, 2014, 89(4): 151-157

Reconstitution of nucleocytoplasmic transport using digitonin-permeabilized cells

Kose S, Funakoshi T and Imamoto N
Methods Mol Biol, 2015, 1262: 291-303

Novel approaches for the identification of nuclear transport receptor substrates

Kimura M, Thakar K, Karaca S, Imamoto N and Kehlenbach RH
Methods Cell Biol, 2014, 122: 353-378

Analysis of nucleocytoplasmic transport in digitonin-permeabilized cells under different cellular conditions

Furuta M, Kose S, Kehlenbach RH and Imamoto N
Methods Cell Biol, 2014, 122: 331-352

Cell-fusion method to visualize interphase nuclear pore formation

Maeshima K, Funakoshi T and Imamoto N
Methods Cell Biol, 2014, 122: 239-254

Nucleocytoplasmic transport under stress conditions and its role in HSP70 chaperone systems

Kose S and Imamoto N
Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(9): 2953-2960

Biological significance of the importin-beta family-dependent nucleocytoplasmic transport pathways

Kimura M and Imamoto N
Traffic, 2014, 15(7): 727-748

Control of nuclear size by NPC proteins

Takagi M and Imamoto N
Adv Exp Med Biol, 2014, 773: 571-591

和文総説・著書（分担執筆）

22 報

特許

4 件（出願中を含む）

アウトリーチ活動

43 件

受賞

木村 宏
2014 年 7 月 8 日 大阪大学総長顕彰

大川 恭行
2014 年 11 月 1 日 九州大学研究活動表彰

滝沢 琢己
2015 年 3 月 14 日 川野財団 第 15 回小児医学川野賞（小児基礎医学分野）

一般公開シンポジウム第2弾
生き物と細胞の設計図
～ DNA・クロマチン・核～
新学術領域「動的クロマチン構造と機能」

日時：2015年1月12日(祝)
開場 12:30 / 開演 13:00～17:30
会場：千理ライフサイエンスセンター
北區南、イビルーム（新学術領域のサイエンスホール（有料駐車場有り））
主催：新学術領域「動的クロマチン構造と機能」
連絡先：山縣 一夫（大阪大学）06-6879-8372
参加費無料・事前登録不要・入場随時

セッション1「DNA・クロマチン・核の「発見」方法」
■DNAレベルで見える生命の設計図
■研究先：大阪府立大学・理工学研究所
■DNAの設計図をどうやって見るとDNAを捉えて不詳を解く
■一夫（大阪大学・理化学研究所）
■DNAの設計図の設計図をどうやって見ると不詳を解く
■山縣 一夫（大阪大学・理工学研究所）

セッション2「DNA・クロマチン・核のなりたちと仕組み」
■研究先：大阪府立大学・理工学研究所
■研究先：大阪府立大学・理工学研究所
■核に分子を渡して変化させる
■研究先：理化学研究所
■研究先：理化学研究所・遺伝子設計と設計図
■研究先：大阪府立大学・理工学研究所

セッション3「DNA・クロマチン・核研究の最新情報」
■DNAの設計図をどうやって見ると
■大阪府立大学・理工学研究所
■研究先：理化学研究所
■研究先：理化学研究所・遺伝子設計と設計図
■研究先：大阪府立大学・理工学研究所

5. 今後の予定

① 本領域の国際シンポジウムが開催されます。

“Chromatin Structure, Dynamics, and Function”

<http://www.knt-ec.net/2015/iscsdf/>

日時：2015年8月23-26日

会場：淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）

※参加申し込み・演題登録などの詳細についてはウェブサイトをご覧ください。

Invited speakers:

Frederic Berger (GMI, Austria)

Kerstin Bystricky (Univ. Toulouse, France)

Philippe Collas (Univ. Oslo, Norway)

Jessica Downs (University of Sussex, UK)

Roland Foisner (MFPL, Austria)

Peter Fraser (Babraham Inst., UK)

Martin W. Hetzer (Salk Inst., USA)

Anthony Imbalzano (Univ. Mass, USA)

Joachim Lingner (EPFL, Switzerland)

Michael Guy Poirier (Ohio State Univ., USA)

Kannanganattu V. Prasanth (Univ. Illinois, USA)

Maria-Elena Torres-Padilla (IGBMC, France)

Paul A. Wade (NIEHS, NIH, USA)

International Symposium on
**Chromatin Structure, Dynamics,
and Function**
August 23-26, 2015

Registration and abstract deadline: Jun 30, 2015
<http://www.knt-ec.net/2015/iscsdf/>
Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan
<http://www.yumebutai.org/english/index.html>

Organizers
Hitoshi Kurumizaka (Waseda Univ.)
Hiroshi Kimura (Tokyo Tech.)
Tokuko Haraguchi (NICT)

Overseas Invited Speakers
Frederic Berger (GMI, Austria)
Philippe Collas (Univ. Oslo, Norway)
Roland Foisner (MFPL, Austria)
Peter Fraser (Babraham Inst., UK)
Martin W. Hetzer (Salk Inst., USA)
Anthony Imbalzano (Univ. Massachusetts, USA)
Joachim Lingner (EPFL, Switzerland)
Michael Guy Poirier (Ohio State Univ., USA)
Kannanganattu V. Prasanth (Univ. Illinois, USA)
Maria-Elena Torres-Padilla (IGBMC, France)
Paul A. Wade (NIEHS, NIH, USA)

Supported by
Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas "Chromatin Structure,
Dynamics and Function" from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and
Technology, and Communications Technology (NICT), Japan

② 本領域の班会議が開催されます。

日時：2015年5月7-9日

会場：ルスツリゾート（北海道虻田郡留寿都村）

編集後記：本号は年度末に発行する予定でしたが、諸事に忙殺されてかないませんでした。書類を早目に片づけられる能力が欲しいです。昨年度はたくさんの成果が得られ、皆様のご活躍がうかがわれます。また、領域内共同研究による成果も多く発表されています。今年度は中間評価もありますので、引き続き頑張っていきたいと思います。

Hiki

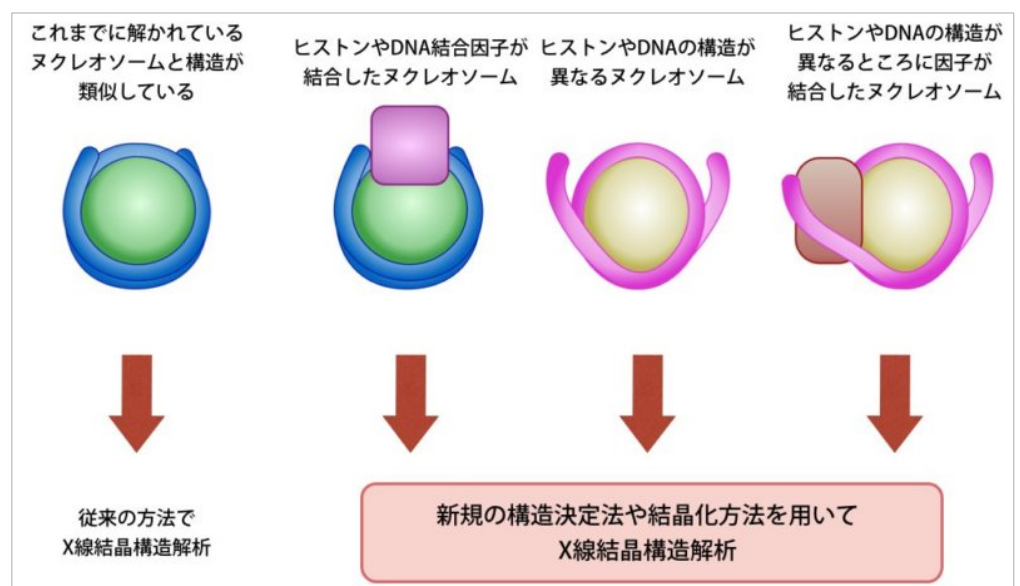
1. 公募研究の紹介：明星大学・香川 亘、国立遺伝学研究所・荒木 弘之
2. クロマチン動構造 第3回 領域会議の報告
3. 受賞：米田悦啓計画研究代表が紫綬褒章を受章しました。
4. 成果紹介：①齊藤(典)計画研究代表らの領域内共同研究による論文が、Nature Comm 誌に掲載されました。
 ②原口計画研究代表らの領域内共同研究による論文が、PNAS 誌に掲載されました。
5. 寄稿：オックスフォード大学・野島孝之
6. 今後の予定

1. 公募研究の紹介

【ヌクレオソームの多様な構造を解析する技術の開発】

研究代表者：香川 亘（明星大学 理工学部）

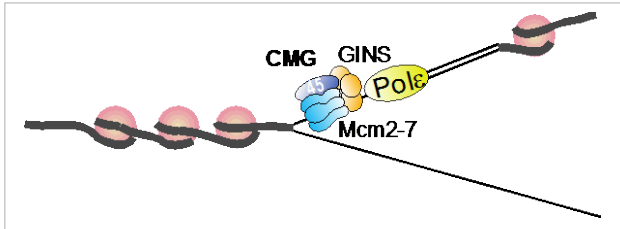
クロマチン構造のダイナミクスを研究する上で、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームに起こる構造変化を原子レベルで明らかにすることは重要な課題である。これを可能にしてくれる X 線結晶構造解析は、現在生体分子の立体構造を原子分解能で明らかにする最も強力な方法であるが、機能的な状態（構造）で生体分子を結晶化することは依然としてボトルネックとなっている。ヌクレオソームの X 線結晶構造解析については、これまでの研究により数多く報告されているが、そのほとんどが結晶中で同じ並び方をしており、ヌクレオソームの外側に巻きついている DNA が密にパッキングしている。近年、ヌクレオソームは、それを構成するヒストンと DNA、そして結合因子によって多様な構造を形成することが明らかになりつつある。本研究では、このような機能的で多様なヌクレオソーム構造やヌクレオソームとその結合因子との複合体の構造解析を、X 線結晶構造解析法を用いて行うための新たな結晶化方法や解析方法の開発を行っている。本研究を通じて、新たな構造解析技術を創出し、領域内で行われている様々な X 線結晶構造解析に役立てることができればと考える。



【DNA 複製フォークでのクロマチン構造維持機構】

研究代表者：荒木 弘之（国立遺伝学研究所）

染色体上のクロマチン構造は、DNA 複製時に確実に保持される。これは複製因子とクロマチン構造に関わる因子が協調して働き、複製時にクロマチン構造を維持しているためだと考えられているが、その詳細な機構は明らかではない。我々は、出芽酵母の *in vitro* DNA 複製系と精製タンパク質からなる再構成系を用いてこの問題に挑戦している。



DNA 複製がおこる複製フォークでは左図に示すように、ヘリカーゼが先頭になり DNA の 2 本鎖 DNA を 1 本鎖にほどく。真核生物の複製ヘリカーゼは、ヘリカーゼ活性のコアとなる Mcm2-7 ヘテロヘキサマーに Cdc45 タンパク質と GINS ヘテロヘキサマーが強く結合した Cdc45-Mcm2-7-GINS (CMG) 複合体であり、リーディング

鎖の鋳型上を 3'→5'に移動する。我々は、ヘリカーゼとヌクレオソームの関係を調べるため、出芽酵母ヒストンからヌクレオソームを再構築し、精製した CMG 複合体を用いてヘリカーゼ活性を測定した。その結果、ヌクレオソームはヘリカーゼの活性を阻害することが分かった。これはリーディング鎖合成を担う DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ) を加えて DNA 合成を行わせても同様であった。次に、複製フォークにあることが知られているヒストンシャペロン yFACT を精製して加えたが効果はなかった。現在は、種々のヒストンシャペロンの効果とともに、*in vitro* 複製系でのクロマチン化した鋳型の挙動を調べており、複製フォークでのヌクレオソームの挙動の詳細が明らかになることを期待している。

2. クロマチン動構造 第 3 回 領域会議の報告

⇒北海道にも新緑の季節が訪れる 5 月に、7 日から 9 日の日程で、クロマチン動構造の領域会議が、北海道ルスツリゾートで開催されました。計画研究及び公募研究からの 72 名の参加に加えて、評価委員として森川耿右、柴田武彦、木村暁の各先生、および学術調査官として水品善之、嶋田睦の両先生に参加いただき、爽やかな森の空気のなかで領域会議が開始されました。領域代表の挨拶に続き、計画研究、公募研究あわせて 33 題の研究結果が報告されました。個々の研究内容については、ニュースレターや領域ホームページ、あるいは公表論文として追々紹介されるものと思いますが、全体的に見て、昨年度から大幅に領域内共同研究が増加していることと、論文として公表される本領域の研究が増えてきたことが印象的でした。すべての報告について、活発な質疑応答が行われたことは言うまでもなく、その質疑応答の中から新たな共同研究の芽が見出された報告も一つや二つではありませんでした。

領域会議第 2 日には、総括班会議が、総括班員の他、評価委員および学術調査官の先生方も参加して行われました。領域主催の集会として、第 3 回「クロマチン動構造」若手のワークショップ (2015 年 7 月 29 日、早稲田大学)、クロマチン動構造国際会議(2015 年 8 月 23 日-26 日、淡路夢舞台国際会議場)、第 4 回班会議 (2016 年 7 月頃、北海道)、第 3 回一般公開シンポジウム (2016 年 8 月頃、東京) について、開催準備状況の報告や、開催に向けた意見交換などが行われました。評価委員の先生方には、本領域の活動の評価をお願いし、「領域内共同研究が上手く進んでおり、研究成果の論文としての公表も順調である」、「領域全体の連携や活性化が感じられる」、「ニュースレターなどの広報やアウトリーチが活発である」等、全体としてこれまでの活動について高い評価をいただきました。一方で、「多様な研究成果を普遍的原理に収斂させる努力」といった宿題もいただき、今後はこのような意識を持ちつつ領域活動を展開する必要を感じました。また、今年度は本領域が中間評価の対象となることから、中間評価報告書やヒアリングについての準備状況の確認や、意見交換が行われました (中間評価に向けての具体的な対応は、領域会議終了後の総括班会議で

も行われました)。水品、嶋田両学術調査官には、総括班員の疑問に答える形で中間評価に関する有用な情報提供をいただきました。この場を借りて、感謝いたします。

研究成果報告や会議の合間には、コーヒープレーク、意見交換会、フリーディスカッションなどが、タイミング良く、かつ場所を変えてスケジュールされており、北海道のリゾート地の開放的な雰囲気と相まって、領域内メンバーのオープンな情報交換や若手の交流が大いに活性化されました。このような素晴らしい領域会議をオーガナイズしてくれた小布施班員と研究室メンバーに感謝します。



3. 受賞

米田悦啓計画研究代表が紫綬褒章を受章しました。紫綬褒章は、科学技術分野における発明・発見や、学術及びスポーツ・芸術文化分野において優れた業績を挙げた者に対して、天皇陛下から授与されるものです。

4. 成果紹介

① 齊藤(典)計画研究代表らによる論文が、Nature Communication 誌に掲載されました。これは、大川計画研究代表との領域内共同研究による成果です。

A cluster of non-coding RNAs activates the ESR1 locus during breast cancer adaptation

Tomita S, Abdalla MOA, Fujiwara S, Matsumori H, Maehara K, Ohkawa Y, Iwase H, Saitoh N, and Nakao M.

Nat. Comm. 6: 6966, 2015.

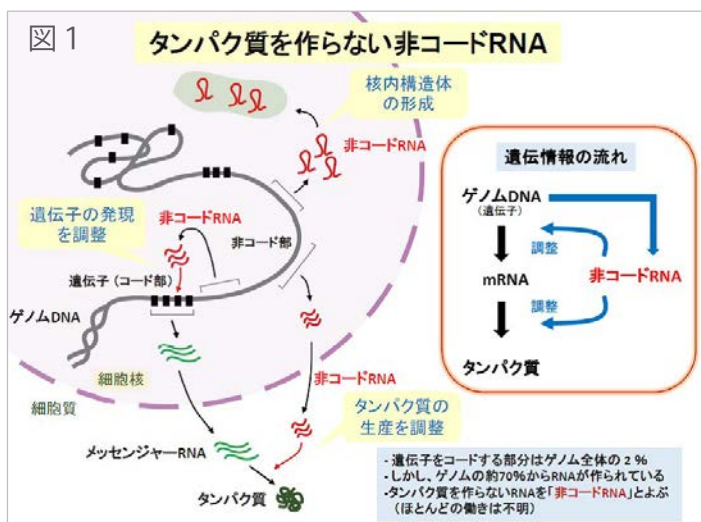
<http://www.nature.com/ncomms/2015/150429/ncomms7966/full/ncomms7966.html>

乳がんの増殖・発生には、女性ホルモンのエストロゲンと、エストロゲンの働きを介在するエストロゲン受容体 (ER) が鍵となります。乳がんの約 60~70%は ER を発現する、ER 陽性と呼ばれるタイプです。この種類の乳がん細胞はエストロゲンの存在下で増殖するので、エストロゲンを阻害するようなホルモン治療が有効です。しかし、ホルモン治療が長期にわたると乳がん細胞の性質が変化して、エストロゲンがない状態でも増殖できるようになり、疾患が頻繁に再発することが大きな問題となっています。この治療耐性の原因のひとつに、ER が過剰に発現されることが示唆されていましたが、詳細は不明で、しくみを理解することが再発防止への重要なステップになると期待されてきました。

ゲノム DNA には、mRNA へと転写されて将来タンパク質となるコード領域と、タンパク質をコードして

いない非コード領域があります (図 1)。近年まで非コード領域は、RNA に転写されることもなく、そこからタンパク質が産生されることもないため、存在意義が全く不明でジャンク (ガラクタ) DNA とよばれることもありました。

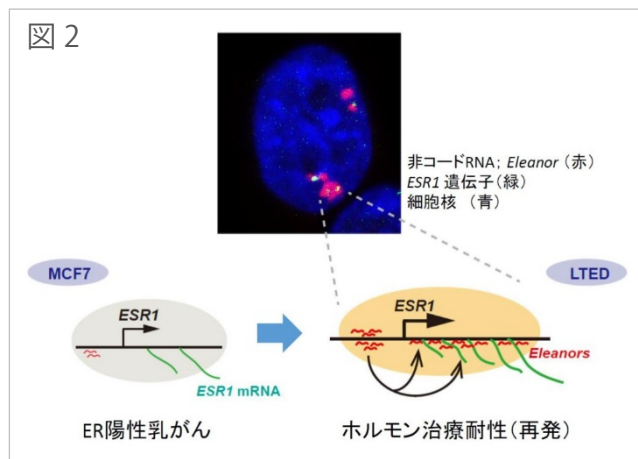
本研究グループは、ER 陽性乳がんのモデル細胞 MCF7 と、再発モデル細胞 LTED (Long Term Estrogen Deprivation) を使い、RNA-Seq と呼ばれる大規模塩基配列解析を駆使して、それぞれの細胞内で生産される RNA を網羅的に調べました。その結果 LTED 細胞では、ER をコードしている ESR1 遺伝子座からさ



かに mRNA が転写されると協調して、非コード領域から大量の RNA が産生されていることを発見し、この非コード RNA を Eleanor (エレノア) と命名しました。顕微鏡観察したところ、Eleanor は、細胞核内の ESR1 遺伝子が転写されている場からみつくように蓄積し、大きな RNA のかたまり (RNA クラウド) を種とする、新規の核内構造体を形成していました (図 2)。この Eleanor RNA クラウドは、ER 陽性の乳がん患者さん由来の標本でも顕著に観察されました。細胞内で Eleanor を作れないようにすると、ESR1 遺伝子の活性が減り、乳がん細胞は増殖できなくなりました。興味深いことに、ポリフェノール的一种であるレスベラトロールを細胞に投与すると、Eleanor の産生が抑えられ、それにより ER の産生が著しく低下し、同様に、乳がん細胞の増殖を停止させることができました。

本研究では、クロマチンに相互作用して転写活性な核内構造体を形成する非コード RNA、Eleanor を発見しました。さらに、非コード RNA を介した、新たな遺伝子の転写活性のメカニズムを明らかにしました。この成果は、難治性・再発性乳がんを攻略する鍵であるエストロゲン受容体の発現の機序を解明したことから、新しい診断および治療法の確立につながるものです。

本研究の内容は毎日新聞、熊本日日新聞、日刊工業新聞、産経新聞、NHK ニュース、KAB ニュース、RKK ニュース、日経電子版などで報道されました (H27. 4/29~5/8)。



② 原口計画研究代表らによる論文が、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 誌に掲載されました。これは、平岡公募研究代表との領域内共同研究による成果です。

BAF is a cytosolic DNA sensor that leads to exogenous DNA avoiding autophagy.

Kobayashi S, Koujin T, Kojidani T, Osakada H, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112(22): 7027-7032, 2015
<http://www.pnas.org/content/112/22/7027.full.pdf?with-ds=yes>

細胞が、細菌感染やウイルス感染を受けた場合には、外から入ってきたそれらの“異物”を迅速に捉えて、適切に処理することが、その生存に極めて重要なことである。一方、遺伝子治療を行いたい場合や、効率よく遺伝子改変を行いたい場合には、用意した DNA を何らかの方法で細胞内に入れる必要がある。これまで、DNA が、細胞の外から細胞の内に入ってきた時に、細胞がどのように応答するかについては、ほとんどわかっていなかった。今回、我々は、数マイクロメートルの人工ビーズに DNA を結合させた DNA ビーズを細胞質内に入れ、その挙動を可視化することに成功した。細胞に侵入した DNA ビーズは、まず、酸性のエンドソームに取り込まれるが、その状態では、本当の意味で細胞内 (細胞質内: タンパク質が合成される場所) に入ったとは言えない。細胞質とは膜で隔たれたエンドソーム内に留まっているからである。我々は、DNA ビーズに、特殊な試薬 (環境の酸性度を蛍光の有無で識別できる試薬: pHrodoTM) を結合させ、その蛍光を経時的に観察することによって、DNA ビーズが酸性エンドソームから、中性の細胞質に入った瞬間を捉えることに成功した。DNA ビーズが細胞質内に入るとすぐに (秒のオーダーで)、細胞内に存在するバリアーツオートインテグレーションファクター (BAF) と呼ばれるタンパク質が、DNA に結合することを発見した。この解析により、BAF が、細胞質に侵入した DNA を捉える DNA センサー分子として働くことが初めて明らかになった。

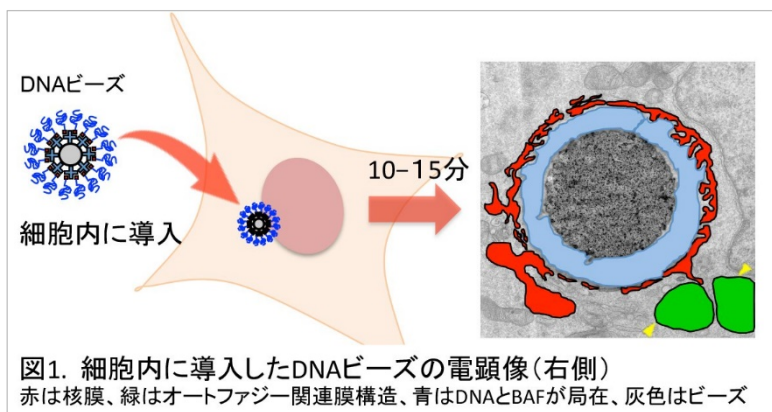
次に、DNA ビーズに BAF が集合すると、10-15 分程度で、ビーズ周辺に核膜に似た膜構造が形成されることが分かった (図 1)。ほぼ同時期に、オートファジー膜も、DNA ビーズ周辺に集まったが、核膜に似た膜が形成されたビーズでは、オートファジー膜はビーズを“喰う”ことはなく、次第になくなっていった。BAF の量を減少させた細胞では、このような効果 (BAF 集積による核膜形成と、その後のオートファジー膜回避) は見られなかった。これらの結果は、BAF 依存的に形成される核膜によってオートファジーが回避されることを示している。

今回の発見は、細胞内に入った DNA がどのような運命を辿るか、その最初の部分を解き明かしたものである。BAF は、クロマチン結合因子として知られ、ウイルス感染の際には生体防御システムとして働くと考えられている分子である。一方、オートファジーもまた、細菌感染の際に細胞内免疫として働くと考えられている。今回の研究からは、DNA が細胞質内に侵入した場合には、細胞は、オートファジーによる分解よりも、核膜で DNA を囲い込んで閉じ込めてしまうことを優先するということが分かったのである。

ウイルス感染を防ぐことを目指す場合には、人為的に外来 DNA を排除することが求められる。一方、遺伝子治療の場合には、人為的に外来 DNA を細胞核内に伝送することが求められる。いずれの場合であっても、

細胞の性質を正しく理解する必要がある。今回の研究成果は、細胞内のクロマチンの機能や構造の維持のメカニズムとして重要な知見を与えてくれるだけでなく、安全・安心な感染症治療・遺伝子治療、高効率な遺伝子デリバリーを実現する上で有用な知見を提供するものと考えられる。

本研究の成果は、毎日新聞、朝日新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞、Yahoo!ニュースなど、多数の新聞・ネットニュースで報道されました。



5. 寄稿

次世代新生 RNA ワールドへ

オックスフォード大学サーウイリアムダン病理学研究所
野島孝之 (taka.nojima@path.ox.ac.uk)

Mammalian NET-seq reveals genome-wide nascent transcription coupled to RNA processing

Nojima T, Gomes T, Grosso AR, Kimura H, Dye MJ, Dhir S, Carmo-Fonseca M and Proudfoot NJ
Cell 161, 526-540, 2015

RNA ポリメラーゼ II (Pol II) による転写は単純ではない。その一因として、Pol II 最大サブユニットのカルボキシル末端 (C-terminal domain, CTD) の生化学的性質が挙げられる。Pol II CTD は特徴的なリピート構造 YSPTSPS (ヒトでは 52 回、酵母では 26 回繰り返す) を有しており、転写サイクルにおいて複雑にリン酸化状態を変化させる (Heidemann et al., 2013)。そのリン酸化状態の変化は、試験管内反応やクロマチン沈降法を主とした多くの報告から、RNA プロセシング複合体をリクルートするために重要であると示唆されている (Moore and Proudfoot, 2009)。ただ、RNA プロセシングは RNA が転写されてすぐに起きると考えられており、その中間産物は非常に分解されやすいため、現存の方法ではその姿を正確に捉えることは困難であった。筆者は、転写と共役した RNA プロセシングを解析することを目標に、2013 年から解析系の開発を始めた。

近年の目覚ましい高速シーケンサーの発達により、多くの生物種の転写産物の情報が比較的簡単に手に入るようになってきた。しかしながら、多くの解析は安定的な転写産物を検出することを目的としており、今まさに転写されている RNA (新生 RNA) については情報が少なかった。新生 RNA の代表的解析方法としては、Lis らが開発した Global Run On sequencing (GRO-seq) (Core and Lis, 2008) やその改良法である Precision Run On sequencing (PRO-seq)

(Kwak et al., 2013) が挙げられる。これらは、培養細胞から核を単離し、修飾塩基と共に Run On 転写反応を行うことによって、新生 RNA を標識、精製する方法である。これらの方法により、Pol II は一時停止と解除を繰り返しながら遺伝子上を前進していることが明らかになっている。また、酵母では Native Elongating Transcript sequencing (NET-seq) 法が Weissman 研究室から報告されている (Churchman and Weissman, 2011)。NET-seq 法では、Flag タグが付加された Pol II サブユニットの ORF が酵母ゲノムに挿入されている株から、Flag 免疫沈降にて Pol II 転写複合体を単離することによって、複合体中の新生 RNA を一塩基レベルで調べることができる。

これら上記した反応系は、新生 RNA の動態を調べる方法として優れているが、CTD のリン酸化と共に調べることができない。理論的には、酵母 NET-seq 法に修飾 Pol II 抗体を適用し、様々な CTD リン酸化状態特異的な新生 RNA を見分けることができそうではあるが、どういうわけか Flag タグ抗体以外は用いることができない。しかも、哺乳類細胞を用いて NET-seq 法を確立した例は今までなかった。幸運にも筆者は、試行錯誤の末、哺乳類細胞用の NET-seq 法の開発に成功し、その方法を mammalian NET-seq (mNET-seq) 法と名付けることができた。

では、mNET-seq 法で何がわかるのか？ mNET-seq 法では、酵母 NET-seq 法同様、Pol II 複合体中の新生 RNA を一塩基の解像度で、転写方向特異的 (センス鎖/アンチセンス鎖) にマッピングすることができる。この方法の最も大きな利点としては、あらゆる Pol II 抗体が使えること、すなわち酵母 NET-seq 法で不可能であった、Pol II 複合体中に含まれる新生 RNA を CTD リン酸化状態特異的に区別できることである。驚いたことに、CTD リピートの 5 番目のセリン (S5) に対する抗体で mNET-seq 法を行うとエクソンの 3' 末端に一塩基ピークが検出される。詳細な解析により、このピークはスプライシングの中間産物であることがわかった。つまり、多くのスプライシングは転写と共役して起きており、中間産物である上流エクソンは CTD S5 のリン酸化によって転写複合体に保持されていることがわかった。

さらに、CTD リピートの 2 番目のセリン (S2) に対する抗体を用いると、転写終結点 (TES) 直後にピークが観察される。これは、我々が報告した転写終結のための Pol II 一時停止を支持している (Nojima et al., 2013; Skourti-Stathaki et al., 2011)。興味深いことに、ポリ A 付加複合体構成因子 (CPSF73, CstF64/CstF64 tau) をノックダウンすることにより、TES 直後のピークが減少し、転写終結障害 (Termination defect) が検出されるようになる。この結果から、ポリ A 付加複合体は正しく転写を終結させるため、Pol II の転写スピードを TES で遅く調節していることが示唆された。mNET-seq 法はこれらの他にも、マイクロ RNA 前駆体生合成のキネティクスや転写開始点における新生 RNA 代謝の新しいモデルを提唱した。ここではすべてで説明することができないので、筆者の論文を是非ご覧いただきたい。

今回の報告はオックスフォード大学の Nick Proudfoot 研究室とリスボン大学の Carmo-Fonseca 研究室の共同研究の成果である。筆者が解析系を立ち上げ、軌道に乗り始めた際にバイオインフォマティシャンが突然去った時は青ざめたが、Nick が主催した学会で Carmo と出会い、共同研究まで漕ぎ着けることができたのは非常に幸運であった。現在筆者は、今回の論文で報告することができなかった、転写と共役したスプライシング機構のより詳細な解析、その他のリン酸化 Pol II CTD (Y1P, T4P, S7P など) 特異的な新生 RNA プロファイルや分解されやすいノンコーディング RNA の発現制御などを中心に解析しているところである。mNET-seq 法により、今まで覗くことができなかった、Pol II CTD コードが織りなす新生 RNA ワールドへの扉は今開かれたばかりである。mNET-seq 法が新生 RNA 研究のスタンダードとなり、未だに謎多き哺乳類遺伝子発現の全貌を明らかに出来る日を楽しみにしている。

References

- Churchman, L.S., and Weissman, J.S. (2011). Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature* 469, 368-373.
- Core, L.J., and Lis, J.T. (2008). Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science* 319, 1791-1792.
- Heidemann, M., Hintermair, C., Voss, K., and Eick, D. (2013). Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochim Biophys Acta* 1829, 55-62.
- Kwak, H., Fuda, N.J., Core, L.J., and Lis, J.T. (2013). Precise maps of RNA polymerase reveal how promoters direct initiation and pausing. *Science* 339, 950-953.
- Moore, M.J., and Proudfoot, N.J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136, 688-700.
- Nojima, T., Dienstbier, M., Murphy, S., Proudfoot, N.J., and Dye, M.J. (2013). Definition of RNA polymerase II CoTC terminator elements in the human genome. *Cell Rep* 3, 1080-1092.
- Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N.J., and Gromak, N. (2011). Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination. *Mol Cell* 42, 794-805.



図. mNET-seq 法 の 概 念

mNET-seq 法は特定の Pol II 抗体を用いることにより、特定のリン酸化 CTD Pol II 複合体に含まれる新生 RNA を単離することが出来る。オレンジの浮き輪が着いた船はリン酸化 CTD 抗体ピーズ、オレンジのドットが付いた黒い魚はリン酸化 CTD 複合体、赤線は新生 RNA を表している。S, 転写開始点、E, 転写終結点

6. 今後の予定

① 第25回 細胞生物学ワークショップ

蛍光顕微鏡トレーニングコース1-初級から中級-

7月27-31日(月-金) 国立研究開発法人 情報通信研究機構 未来ICT研究所

(オーガナイザー: 原口 徳子、平岡 泰 講師: 木村 宏)

http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131103/CellMagic/workshop/25workshop.pdf

② 第3回 クロマチン動構造 若手の会 ワークショップ

クロマチン研究最前線 -海外での研究生活で学んだことを活かして-

7月29日(水) 早稲田大学 先端生命医科学センター TWIns

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/workshop/20150729.html>

③ クロマチン動構造国際会議

“Chromatin Structure, Dynamics, and Function”

8月23-26日(日-水) 淡路夢舞台国際会議場

<http://www.knt-ec.net/2015/iscsdf/>

演題登録×切: 7月17日(金) ※延長しました

参加登録×切: 7月31日(金)

Overseas invited speakers:

Frederic Berger (GMI, Austria)

Kerstin Bystricky (Univ. Toulouse, France)

Philippe Collas (Univ. Oslo, Norway)

Jessica Downs (University of Sussex, UK)

Roland Foisner (MFPL, Austria)

Peter Fraser (Babraham Inst., UK)

Martin W. Hetzer (Salk Inst., USA)

Anthony Imbalzano (Univ. Mass, USA)

Joachim Lingner (EPFL, Switzerland)

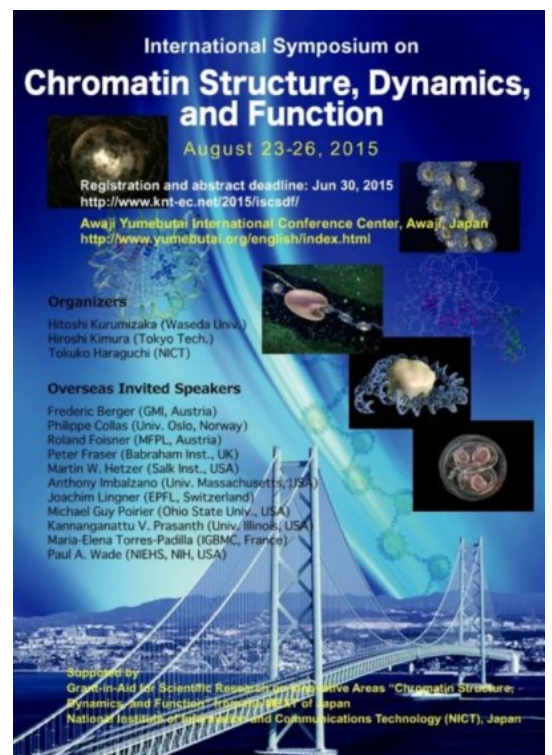
Michael Guy Poirier (Ohio State Univ., USA)

Kannanganattu V. Prasanth (Univ. Illinois, USA)

Timothy J. Stasevich (Colorado State University, USA)

Maria-Elena Torres-Padilla (IGBMC, France)

Paul A. Wade (NIEHS, NIH, USA)



④ Chromatin and Epigenetics -Dr. Robert T. Simpson memorial meeting-

8月29日(土) 早稲田大学 先端生命医科学センター TWIns

http://www.eb.waseda.ac.jp/kurumizaka/memorial_meeting15-2.html

講演者: Paul Wade, Kerstin Bystricky, 網代 廣三, 清水 光弘, 木村 宏, 胡桃坂 仁志

編集後記: 梅雨の季節となりましたが、皆様いかがおすごでしょうか。私は高い湿度のせいか、筆の進みも湿りがちです。。。第3回領域会議や中間報告用の書類作成では、皆様には大変お世話になりました。国際会議もよろしくお願ひします(演題登録は、まだ間に合います!)

Hiki

※公募要領が公開されました。奮ってご応募ください。

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/essential.html>

1. 公募研究の紹介: がん研究会・広田 亨 (※2015年7月本領域終了)
2. クロマチン動構造国際シンポジウムの報告
3. 受賞: 木村宏計画研究代表が Robert Feulgen Prize を受賞しました。
4. 成果紹介:
 - ① 平岡 (公募研究)らの領域内共同研究による論文が、Nat Commun 誌に掲載されました。
 - ② 新富 (公募研究) らによる論文が、Nat Cell Biol 誌に掲載されました。
 - ③ 大川 (計画研究)らの領域内共同研究による論文が、Epigenetics Chromatin 誌に掲載されました。
5. 今後の予定

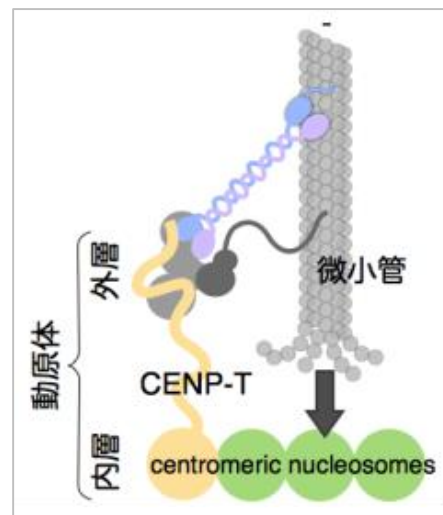
1. 公募研究の紹介

【セントロメア・クロマチンの動構造の分子基盤と意義】

研究代表者：広田 亨 (財団法人 がん研究会 がん研究所)

セントロメアは、細胞分裂において染色体動態の制御中枢を担う特殊な染色体ドメインであり、微小管と相互作用をするための動原体が形成されます。われわれは先行研究で、分子イメージング法を応用して、動原体は伸張と収縮を繰り返すダイナミックな構造体であることを見出しました。つづく本研究では、この「染色体ストレッチング」と呼ぶこの現象に焦点を絞り、セントロメアの動的な構造変化の分子機構とその生物学的意義の解明を進めました。その結果、動原体のストレッチングは、動原体の構成因子 CENP-T の長大な天然変性領域の関与が明らかになりました。つまり、この可変ドメインが動原体の内層と外層を繋ぐスプリングとなっていることで、微小管の重合・脱重合によって動原体も伸張・収縮をすることを突き止めました。そしてその知見をベースにして、ストレッチング運動を人為的に操作する実験系を作り出すことに成功しました。それを活用することで、動原体構造の変化がいかんM期チェックポイント信号を制御するのかについて鋭意解析を進めており、動原体の制御機構に「クロマチン動構造」という新たな視点の導入を試みています。

(広田研究代表が他領域の計画代表となられたため、本公募研究は 2015年7月をもって終了しました)



2. クロマチン動構造国際シンポジウムの報告



クロマチン動構造国際シンポジウム (International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics and Function)を開催しました。

日程：2015年8月23-26日

場所：淡路夢舞台国際会場（兵庫県淡路市）

オーガナイザー：

胡桃坂仁志、木村宏、原口徳子

主催・共催：

本新学術領域、情報通信研究機構、
公益財団法人 井上科学振興財団、
公益財団法人 内藤記念科学振興財団、
公益財団法人 テルモ科学技術振興財団、
公益財団法人 兵庫県国際交流協会

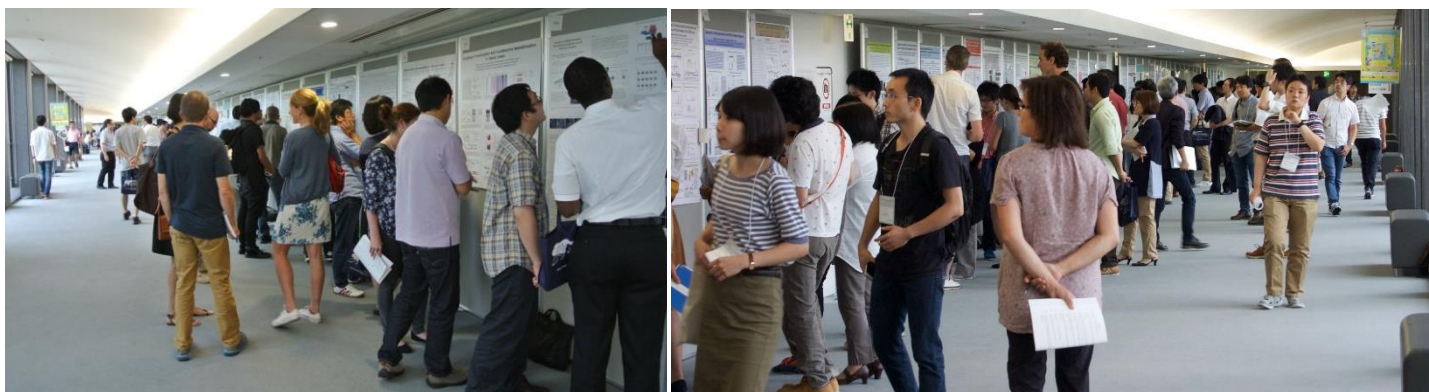
動的クロマチン構造と機能をテーマとした国際シンポジウムを開催しました。海外から22名（うち、15名が招待演者）、国内から125名の計147名が参加しました。参加国は、日本はもちろんのこと、米国、イギリス、ドイツ、フランス、ノルウェー、オーストリア、スイスなど10カ国以上に及びます。また、国内参加者として、沖縄大学院大学（OIST）や京大、理研などから、外国籍の研究者が多数参加していることが印象的でした。会議では、クロマチンの動的な構造や機能について、原子構造から動物個体まで様々な階層における最新の研究成果の発表（口演45題、ポスター70題）をもとに、活発な議論を行いました。また、休憩時間や“深夜のセッション”でも個々の研究に対する深い議論や共同研究の話が進んだようで、有意義な国際会議になりました。海外演者も含め、多くの参加者に大変好評を博しました。

📍国際学会に参加して

2015年8月23日から26日まで、兵庫県淡路島の淡路夢舞台にて開催された、“International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function”に参加しました。本会議には、クロマチン研究分野の最前線でご活躍されている著名な研究者が海外からも多くご出席されており、国際会議初参加であった私は、今まで参加していた学会とは異なる空気に当初は驚いたものの、とても新鮮で、非常に充実した有意義な4日間を過ごすことができました。

著名な先生方によるプレゼンテーションは、どの発表も迫力があり感銘を受けました。特に印象に残っているのは、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームと転写因子の結合モードについて解析された Michael Guy Poirier 先生の発表で、生化学的解析とシミュレーションを組み合わせる





ことで、転写因子がヌクレオソームに対してどのように結合しているのか明らかにする手法は明快でとても美しかったです。質疑応答の時間には、質問者が後を絶たず活発な議論が行なわれ、会場全体の熱の高まりを感じました。白熱した議論はプレゼンテーション後も収まることを知らず、夜のディスカッションタイムまで続きました。ディスカッションタイムでは発表中に質問できなかった学生も積極的に質問しており、大いに盛り上がった会は毎日深夜まで続きました。

日頃から論文で名前を拝見する先生方と直接お話できたことも貴重な経験でした。2日目に行われたポスター発表では、Frederic Berger 先生をはじめとする著名な先生方の前で発表し、緊張と興奮で体中から汗が吹き出てきましたが、先生方から研究テーマに関する重要なご指摘をいただくだけでなく、今研究していることが今後の人生に影響していくのでよく励むようにとの暖かい励ましもいただくことができました。Hi-C 法を用いたクロマチン三次元構造の解明に取り組んでいる Peter Fraser 先生から、二倍体細胞を用いたクロマチン三次元構造の解明に向けた最前線の研究内容を拝聴できたことも、忘れることのできない経験です。語学的にも内容的にも稚拙な私の質問に対して丁寧に聞いて答えて下さる姿勢に、感動すら覚えました。

最終日は台風一過の雲ひとつない晴天に恵まれ、Paul A. Wade 先生と互いの文化について語り合いました。ウィーン在住の Roland Foisner 先生とは、昼食の際にオーストリア伝統的なカツレツである Schnitzel と日本のトンカツの違いについて盛り上がりました。

本会議を通して、海外でご活躍されているさまざまな研究者の方々に研究内容から研究生活、文化に至るまで直接お話を聞くことができ、海外でのサイエンスをより身近に感じ、自身が将来海外のラボに加わることを強く意識するようになりました。また、クロマチンが生命現象の根幹を担う重要な構造体であることを再認識し、日々の研究に邁進しようと思いを新たにしました。

(早稲田大学・胡桃坂研・博士後期課程一年・田口 裕之)

3. 受賞

木村宏・計画研究代表が Robert Feulgen Prize を受賞しました。Robert Feulgen Prize は、国際組織化学学会 (The Society for Histochemistry) により、組織化学・細胞化学分野で新規の方法の開発や新規の発見を行った研究者に与えられる賞で、細胞内の DNA を組織化学的に定量検出する方法 (フォイルゲン染色) の発見者の名を冠しています。

この国際賞が 1971 年に創設されて以来、日本人で初の受賞となりました。授賞式と受賞講演 (写真) は、ウィーンで開催された 24th Wilhelm Bernhard Workshop / 57th Symposium of Society for Histochemistry (8 月 17 日-22 日) において執り行われました。



4. 成果紹介

① 平岡（公募研究）と原口（計画研究代表）、浅川（計画研究分担）、木村（計画研究代表）らによる領域内共同研究の論文が、Nature Communications 誌に掲載されました。

Highly condensed chromatins are formed adjacent to subtelomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast.

Matsuda A, Chikashige Y, Ding DQ, Ohtsuki C, Mori C, Asakawa H, Kimura H, Haraguchi T, Hiraoka Y.

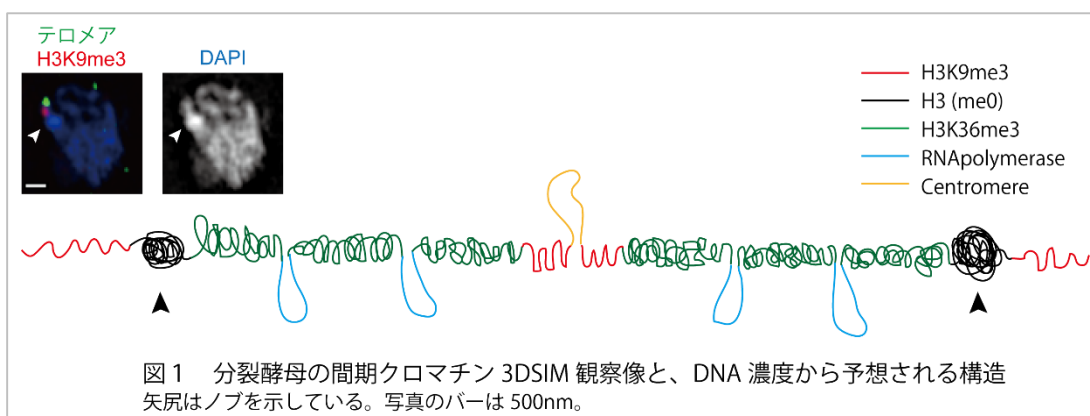
Nat Commun. 6:7753, 2015.

<http://www.nature.com/ncomms/2015/150724/ncomms8753/full/ncomms8753.html>

これまで、染色体末端（テロメア）周辺は遺伝子発現が抑制されているので、凝縮したクロマチン領域と考えられてきた。しかし今回、分裂酵母の染色体を超分解能顕微鏡法のひとつである3次元縞構造照明法（3D-SIM）で観察した結果、テロメア周辺は緩んだクロマチン構造を持ち、高度に凝縮した領域は、それに隣接した領域であることがわかった。従来の顕微鏡の分解能では見分けることができない微小なテロメア領域と隣接する凝縮領域が、今回の超分解能観察により、初めて識別が可能になった。以下に、その結果を解説する。

分裂酵母は3本の染色体を持つ。分裂酵母を固定後に、染色体とヒストン翻訳後修飾を、それぞれ DAPI と抗ヒストン抗体で染色し 3D-SIM 法で観察し、DNA 濃度に対するヒストン翻訳後修飾の量を定量した。DNA 濃度の計測には、DAPI 染色を用いた。その結果、DNA 濃度の高い凝縮した領域は、意外にもユークロマチン領域に多く存在することが知られた修飾ヒストン（H3K36me3、H3K9Ac、H3K4me2 など）から構成されていた。一方、DNA 濃度の最も低いゆるんだ領域は、意外にも、ヘテロクロマチンと定義されてきた転写不活性なヒストン修飾（H3K9me3、セントロメアマーカ Cnp1-GFP、テロメアマーカ Taz1-GFP）が存在していた。この結果は、分裂酵母のヘテロクロマチンが DNase に高い感受性を持ち、複製時期が早いという既存の報告と一致していた。以上の結果から、この生物では、転写不活性なサイレンシング領域は脱凝縮していると考えられる。さらに、サブテロメアのサイレンシング領域には、高度に凝縮した領域が隣接していることが分かった（図1）。この凝縮クロマチン体は、これまで記載が無かったため、「ノブ」と名付けた。ノブは、ほとんどのヒストン修飾抗体で染色されなかった。ヒストン修飾の少ない領域を、利用可能な全ゲノム ChIP データと見比べたところ、サブテロメア内側の約 50kb 程度に、これまでユークロマチンと考えられていたが、ヒストン修飾が少ない領域が存在することが分かった（図1）。IacO アレイを挿入して、この領域がノブであることを確認した。ノブ形成に必要な遺伝子を調査したところ、サイレンシングに必須の遺伝子である HP1 ホモログの swi6 や H3K9 のメチル化酵素の clr4 など欠損しても凝縮に変化がなかった。一方、H3K36 のメチル化酵素の set2 を欠損すると消失することが分かった。したがってノブは、既知のクロマチン凝縮とは異なる遺伝的経路により凝縮する全く新しいクロマチンであることが明らかになった。

本研究は、これまで凝縮したクロマチン領域と考えられてきたテロメアが、む



しるゆるんだクロマチン構造を取っていることを示したものであり、クロマチン構造と転写という機能との関係を明らかにする上で、画期的な成果である。3D-SIM 超分解能顕微鏡法によって、従来法では見分けることができなかった微小なテロメア領域と隣接する凝縮領域が異なることを見分けることが可能になり、これまでの常識を覆す発見をすることができた。本研究成果は、今後、遺伝子治療や再生医療分野などに貢献するものと期待される。

② 新富（公募研究）らによる論文が、Nature Cell Biology 誌に掲載されました。

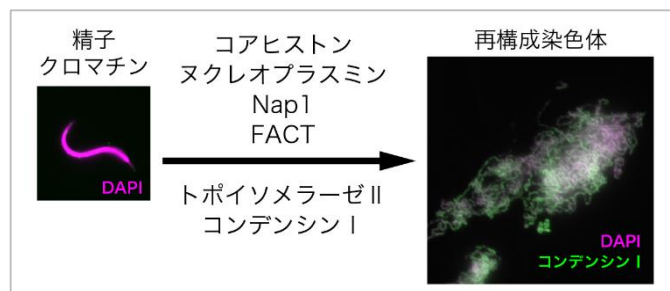
Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors.

Shintomi K, Takahashi TS, Hirano T.

Nat Cell Biol. 17, 1014-1023 (2015)

<http://www.nature.com/ncb/journal/v17/n8/full/ncb3187.html>

分裂期の細胞ではクロマチンから染色体が形作られる。この美しくダイナミックな現象がどのようにして実現されるのかを理解するために、私たちは、可能な限り少ない種類の精製タンパク質を用いて分裂期染色体を試験管内に再構成することに挑戦した。カエルの精子クロマチンを分裂期のカエル卵抽出液中でインキュベートすると、単一染色分体からなる染色体が作られる。この一連のプロセスを精製タンパクのみを用いて再現する条件を絞り込んだところ、コアヒストン、3種類のヒストンシャペロン（ヌクレオプラスミン、Nap1、FACT）トポイソメラーゼII、コンデンシンIだけで必要かつ十分だった（図）。この再構成系を用いて、初期胚型ヒストンバリエント H2A.X-F と FACT の組合せがヌクレオソームの不安定化をもたらし、トポイソメラーゼIIやコンデンシンIが働くために適した場を与える可能性が示唆された。さらに、染色体構築において最も重要な翻訳後修飾は、Cdk1によるコンデンシンIのリン酸化であることも明らかになった。今後、リンカーヒストン、様々なヒストンバリエントや変異体を再構成系に導入することによって、クロマチンの動的構造が染色体構築に与える影響を多角的に検討することが可能になるだろう。また、染色体再構成と受精卵における雄性前核形成とは多くの共通点を有することから、ICSIなど生殖支援技術の発展に役立つ知見が得られることも期待される。



③ 大川（計画研究代表）と、木村（計画研究代表）らによる領域内共同研究の論文が、Epigenetics & Chromatin 誌に掲載されました。

Tissue-specific expression of histone H3 variants diversified after species separation

Maehara K, Harada A, Sato Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kimura H and Ohkawa Y.

Epigenetics Chromatin 8:35, 2015.

<http://www.epigeneticsandchromatin.com/content/8/1/35>

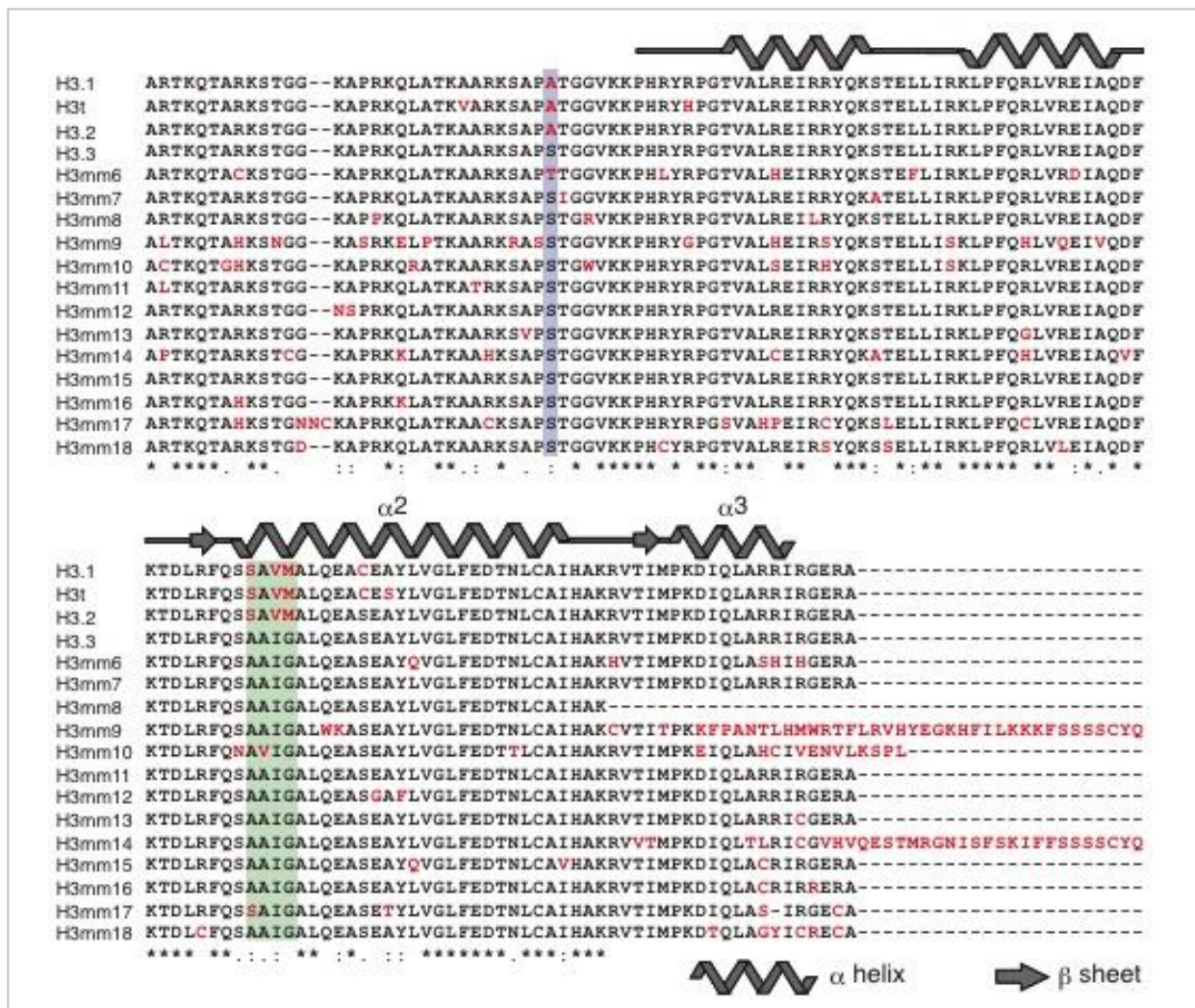
ヒストンには多くの亜種（バリエント）が存在しており、選択的な部位へのヒストンバリエントの取り込みは、クロマチン機能の調整に重要な役割を果たしている。ヒトでは、H3.3の変異が小児ガン発症の要因となり、またH3Tとよばれるヒストンバリエントが精子形成に関わるなど、ヒストンバリエント研究の重要性が認識され始めている。

私たちは、これまでに、ヒストンバリエント H3.3 が骨格筋分化運命決定およびその制御を行うことを明らかにしてきた。その過程で、H3.3 のアミノ酸配列に酷似した未知のヒストン様配列を検出し、未知のヒストン H3 のバリエントがまだ存在しているのではないかと考えた。

そこで、コンピュータを使ったゲノム配列の網羅的なヒストン様遺伝子の探索を行った結果、マウスに存在する新規の 14 種のヒストンバリエント遺伝子を同定した (図)。これら新規のバリエントについて、ゲノム上の取り込み位置や時期、遺伝子発現への影響を網羅的に解析した。その結果、14 種のうち 2 種のバリエント (H3mm7, H3mm11) は、骨格筋分化過程で取り込まれることで、分化後の遺伝子発現パターンを変容させることが分かった。また、H3t と名付けた新規バリエントについては、ゲノムの複製期に取り込まれるヒストンであることが判明し、配列との類似性から、ヒト H3T のホモログである可能性が示唆された。

さらに、系統学的な配列解析によって、多くのヒストンバリエントが種に固有なものであることが明らかとなった。マウス H3 バリエントのうち、H3t を除く 13 種はげっ歯類 (マウスやラット) の間でさえ保存性されていないマウス固有のバリエントであった。また今回同定したヒトの新規 H3 バリエントも、ヒト固有のヒストンバリエントであることが分かった。これら種固有のヒストンバリエントの存在が、ヒトやマウスなど、それぞれの種のもつ形質の固有性の決定要因のひとつとなっている可能性も考えられる。今後のさらなる詳細な解析から、各々のバリエント固有の機能的意義が明らかになってゆくと期待できる。

本研究は、本領域の設立当初よりスタートした共同研究の一部として、木村計画代表、山縣計画分担、胡桃坂領域代表との濃密なディスカッションを経て、発表に至ることができた。



5. 今後の予定

第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会 (合同開催)

日程：2016 年 1 月 12 日 (火) - 1 月 14 日 (木)

会場：松島一の坊 (宮城県宮城郡松島町高城字浜 1-4; JR 仙台駅から電車で 25 分)

<http://www.ichinobo.com/matsushima/>

田中 (公募研究)、原田 (計画研究分担) が世話人代表を務めます。詳細は改めて本領域ホームページに掲載予定です。

編集後記：この夏は殺人的に忙しかったですが、私にとってメインイベントだった国際シンポジウムは、おかげさまで盛況に終わりほっとしております。季節は秋を迎えて過ごしやすくなりましたが、学会&研究費申請シーズンの到来です。最近、肩の痛みがとれませんが、なんとか気力で乗り切ってみようと思います。

Hiki

1. 学会報告

- ① 2015 Conference on nucleocytoplasmic transport (Sant Feliu de Guíxols, Spain)
- ② EMBO conference “Nuclear Structure and Dynamics” (L’Isle sur la Sorgue, France)

2. 成果紹介:

- ① 浅川 (計画研究分担)らの領域内共同研究による論文が、J Cell Biol 誌に掲載されました。
- ② 佐渡 (公募研究代表)らによる論文が、Development 誌に掲載されました。

3. 今後の予定

1. 学会報告

① 2015 Conference on nucleocytoplasmic transport (Sant Feliu de Guíxols, Spain)

2015年9月18日から23日まで、スペインのバルセロナ空港から北に約100キロ、バスで約2時間の海岸沿いの街 Sant Feliu de Guíxols にて“2015 Conference on nucleocytoplasmic transport (オーガナイザー: Ed Hurt (Heidelberg University), Valérie Doye (Institut Jacques Monod), and Susana Rodriguez-Navarro (CIPF))”が開催されました。本会議は1992年の第1回開催(イタリア)以来、世界の核-細胞質間輸送や核膜孔の研究者(ほとんどがPI)が集まり2年に一度、ほぼ定期的に行われています。



日本からは本領域の米田悦啓計画研究代表(医薬健栄研)、原口徳子計画研究代表(情報通信研究機構)、平岡泰公募研究代表(大阪大学)、今本尚子公募研究代表(理研;他の新学術領域の計画代表となったため2015年7月に終了)、に加えて、宮本洋一さん(医薬健栄研)ならびに筆者が参加し、それぞれ口頭発表を行いました。参加者は約80名で、発表は5日間、9セッションに分けて60演題ほどという、ゆったりとしたスケジュールで会が進みました。このカンフェレンスでもう一つ特徴的なのは基本的に皆、未発表の最新データを盛り込むということです。発表者は事前に演題のタイトルをオーガナイザーに送るのみで、開催当日まで誰が参加して、どのような発表を行うか、その内容は(順番も)一切知らされません(当然アブストラクトも存在しません)。それゆえ、発表内容の詳細については触れませんが、演題としては核膜孔複合体の構造、形成、性状の解析に関するものが一番多く、個々の核膜孔構成因子(ヌクレオポリン)の機能、核-細胞質間の物質輸送制御、核ラミナの話などがそれに続きました。構造解析から病態との関連に至るまで、本当



に幅広いテーマでの発表があり、やはり第一線の科学者達による最新の成果発表はそれぞれ大変聴きごたえがあり、この分野の研究の流れを肌で感じる事が出来ま

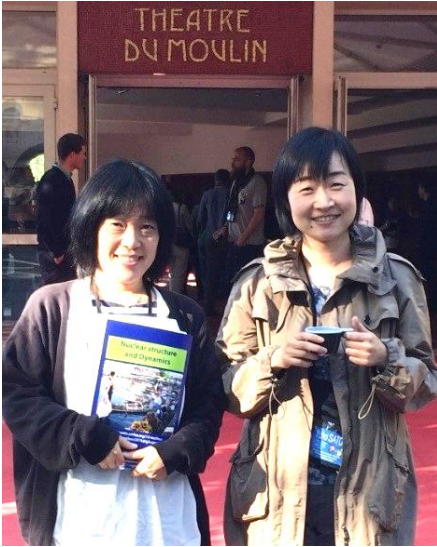
した。発表後のディスカッションも白熱する場面が続き、特に、核膜孔複合体を分子が通過するメカニズムに関しては今日に至るまで様々なモデルが存在することもあり、特に熱い議論が展開されました。また、ポスターセッションのほうは毎日夜の7時から行われ遅くまで盛んなディスカッションが続きました。海は大変に透明で、また強い日差しの中に街の建物が映える光景は、本当にきれいでした。スペインという場所がらのせいかもしれませんが、このようなりラックスした環境の中、サイエンスの世界にどっぷりとつかることができる経験は、本当に素晴らしいものであると感じました。

(医薬健栄研 岡 正啓)

② EMBO conference “Nuclear Structure and Dynamics” (L’Isle sur la Sorgue, France)

2015年10月7～11日にフランスL’Isle sur la Sorgueで開催された、EMBO conference “Nuclear Structure and Dynamics”に参加しました。私は今回が初めての単身ヨーロッパ行きで不安でいっぱいだったので、マルセイユ空港の会場行きシャトルバス乗り場で計画研究代表・斉藤典子さんの姿を見つけることができた時は、心底ほっとしました。本学会はMontpellier CNRSのMarcel Méchaliさん主催で、今回が6回目となります。20か国以上からの参加者238名が南フランスのリゾートに滞在し、秋の気配が忍び寄る美しい自然の中、ゆったりとした雰囲気プログラムが進められました。会期中寝食を共にすると言っても、やはりPIはPI同士、若手は若手同士で盛り上がりましてまいがちだと思いますが、本学会では中盤に、各テーブルにPIを配置した6～7人のグループでのランチセッションが設けられ、大学院生やポスドクが他ラボのPIからじかにキャリアやラボ運営について聞けるという貴重な体験ができました。本学会の演題をざっくりと見渡すと、昔ながらの生化学的手法による解析、次世代シーケンサーを駆使したデータ、超解像顕微鏡、ゲノム構造を予測する理論生物学等がバランスよく取り上げられていました。またCarl WuさんとTom Misteliさんによりそれぞれイメージングを駆使した内容の基調講演が行われました。口頭演題の中での最頻出キーワードは、おそらくTADs (Topologically Associating Domains) だったと思います。Hi-C解析の結果から得られたTADsを、ゲノム編集やモデリングにより多角的に理解しようとする内容が多くみられました。私にとって印象的だった口演は、Harvard大学の若手研究者Alistair Boettigerさんの発表です。彼は、ショウジョウバエゲノムの三次元構造を超解像顕微鏡で可視化し、エピジェネティックマークと構造の関連付けを試みていました。とても説得力のあるプレゼンテーションで圧倒されました。

今回私には、自分のポスター発表の他に二つの課題がありました。一つ目は、現在論文執筆中の新しいmintbodyプローブのデータを、雑誌の編集者にアピールすること。二つ目は、ドイツMax Plank Institute (MPI) のグループとの共同研究において、miscommunicationによりこんがらがっ



口頭発表を終えた齊藤典子さんと。

てしまった糸を円満にほどくこと、です。英語力が未熟なわたしにとっては、どちらも高いハードルでした。一つ目の課題は、幸運なことに夕食のテーブルである雑誌の編集者と同席し、翌日にポスターを説明する約束をとりつけることができました。彼女のコメントはとても教育的で、明確にすべきいくつかの点について提案した後に、「メールでドラフトを送ってちょうだい」と言ってくれました。二つ目の課題は、MPIのあるグループに送った我々の蛍光標識 Fab が、別グループで別の目的に使われていてさらに Fab をリクエストしてきた事について説明を求めるといふ、少し難しいものでした。しかし実際に会ってみると当のポスドクは非常に Nice guy で、彼が Fab を使って実験を開始するまでの経緯の説明が足りなかったことについて、とても申し訳なかったと率直に謝罪しました。私の懐疑心はすっかり晴れ、そのあと数回会話を

するうちに、彼が四六時中研究の事を考えていて、私よりもよっぽど Fab の価値と可能性を理解していることを知りました。そして目の前の実験に追われてあまり先を見通せていない自分が恥ずかしくなってしまうました。ということで、無事に学会での二つのタスクを終え、あらたな課題を胸にしまい込んで帰国の途に就きました。とても実りの多い学会でした。余談ですが、学会が始まる少し前に遅まきながら Facebook を始めてみたのですが、学会で出会った海外の同志と未永く友達付き合いを続けるうえで、とても役に立ちそうです。（東京工業大・木村研究室 佐藤 優子）

2. 成果紹介

① 浅川（計画研究分担）と原口（計画研究代表）と平岡（公募研究代表）らによる領域内共同研究の論文が、*Journal of Cell Biology* 誌に掲載されました。

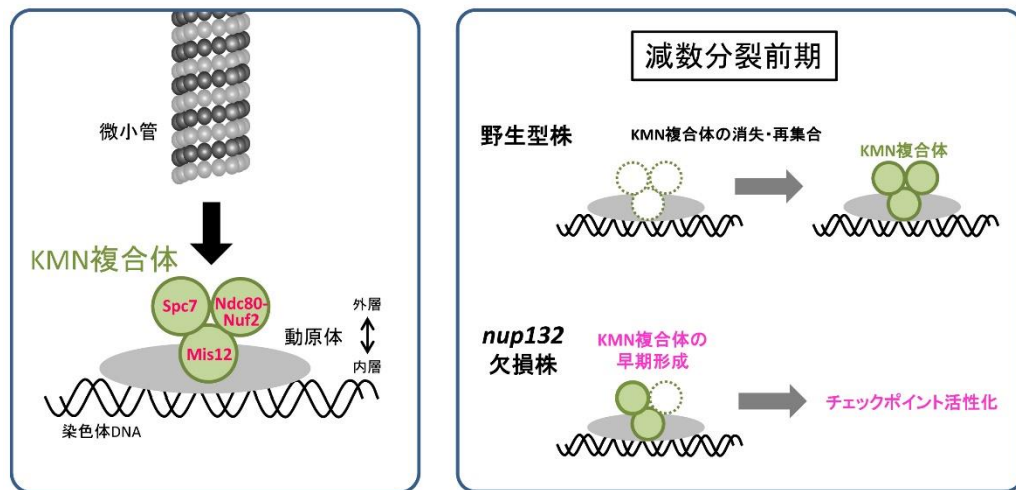
Nup132 modulates meiotic spindle attachment in fission yeast by regulating kinetochore assembly.

Yang H-J, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y.

J. Cell Biol. 211(2), 295-308 (2015) PMID: 26483559, doi: 10.1083/jcb.201501035
<http://jcb.rupress.org/content/211/2/295.abstract>

本論文は、核膜孔複合体を構成する Nup132 タンパク質が、減数分裂期の特殊なセントロメア構造の形成に重要な働きをすることを示した論文である。減数分裂は生殖細胞の形成時に特異的に見られる染色体分配様式であり、次世代へのゲノムの継承に必須である。減数分裂の特徴のひとつは2回の連続した染色体分配である。ヒトでいえば、精子や卵子のような生殖細胞が作られるときの細胞分裂がこれに該当する。第一分裂では、まず、父と母のそれぞれから由来した同種類の染色体同士（相同染色体）が2つに分離・分配され、次に、第二分裂では姉妹染色体（複製によって2倍になった染色体）が2つに分離・分配される。これまでに、この分配様式の違いはセントロメア構造の違いが原因となることが分かっていたが、その構造的な違いを生む仕組みや因子については分かっていなかった。そこで我々は、分裂酵母を用いて、その仕組みや関与する因子について検討

した。分裂酵母では、減数分裂前期にキネトコアの外層構造を構築する KMN 複合体 (図, 左) がセントロメアからいったん離れ、その後、第一分裂直前にセントロメアに再集合することが重要であることが分かっていた。KMN 複合体は、KNL1/Spc7 が Mis12 複合体および Ndc80 複合体と相互作用することによって形成される、より大きなタンパク質複合体である (図, 左)。今回、我々は、核膜孔複合体を構成するタンパク質のそれぞれを欠失した細胞での染色体の挙動を観察し、Nup132 を欠損した細胞では、KMN 複合体の再集合に異常があることが分かった (欠失株では、Mis12 および Spc7 が通常よりもずっと早い時期にセントロメアに集合する) (図, 右)。さらに Nup132 欠損細胞では、減数第一分裂において、スピンドル・アセンブリー・チェックポイント機構が活性化されることがわかった。これらのことから、Nup132 の機能が、減数第一分裂に必要な特殊なセントロメア構造の構築と、スピンドルとキネトコアの正常な接着に重要であることが分かった。これらの発見は、減数分裂期の染色体分配に核膜孔複合体が関与することを初めて示したものであり、正常な生殖細胞 (卵子や精子など) が形成される仕組みの一端を示したものである。



② 佐渡 (公募研究代表) らによる論文が、Development 誌に掲載されました。

A new *Xist* allele driven by a constitutively active promoter is dominated by *Xist* locus environment and exhibits the parent-of-origin effects.

Amakawa Y, Sakata Y, Hoki Y, Arata S, Shioda S, Fukagawa T, Sasaki H, Sado T.

Development. 142(24), 4299-4308 (2015)
<http://dev.biologists.org/content/142/24/4299.long>

哺乳類のメスは、X染色体の本数の差に由来する雌雄間の遺伝子量の差を補償する為、2本あるX染色体のうち一方をほぼ全域にわたって不活性化にします。このX染色体不活性化にはX染色体にコードされるノンコーディングRNAである*Xist*が重要な役割を果たします。*Xist*は転写されるとそのX染色体をシスに覆い、染色体全域に渡るヘテロクロマチン化を誘導すると考えられています。今回我々は、多くの細胞腫で構成的な転写活性を示すことが知られるCAGプロモーターによって制御される改変アレル (*Xist*^{CAG}) を新たに作製しました。この*Xist*^{CAG}アレルを父親から受け継いだ胚では、インプリント型不活性化によって父方X染色体が選択的に不活性化される胚体外組織のみならず、通常ランダム型不活性化が起こる胚体組織でも全ての細胞で父方X染色体が不活性化されていました。一方、このアレルを母親から受け継いだ胚は、着床直後に致死となりました。そのような胚は、*Xist* RNAの転写を抑える役割を持つと考えられる*Xist*のアンチセンスRNA、*Tsix*の機能欠損アレルを母親から受け継いだ胚と酷似していたことから、母方X染色体からの*Xist*の異所的発現が致死の原因と考えられます。

今回の論文で我々は、この *Xist*^{CAG} アレルを父親と母親のどちらから受け継ぐかによって、着床前胚における *Xist*^{CAG} の転写開始時期が異なることを見出し、報告しました。*Xist*^{CAG} は父親から受け継いだ場合には 4~8 細胞期に発現が始まるのに対し、母親から受け継いだ場合には胚盤胞期までその発現が認められませんでした。この発現亢進時期のずれは、*Xist* 遺伝子座の転写される準備が父方 X 染色体では整っているのに対し、母方 X 染色体では整っていないことを示しているのかもしれない。こうした観察から私たちは、母方 X 染色体上の *Xist* 遺伝子座では父方 X 染色体上の *Xist* 遺伝子座に比べ転写因子がアクセスできないクロマチン構造が形成されているのではないかと考えています。こうした考え方は、卵割初期の胚において、母方 X 染色体上で *Xist* を抑制する *Tsix* の発現が認められる前でも、母方 *Xist* の発現が抑制されている仕組みとして、従来から言われる DNA メチル化のようなインプリントを想定する必要は必ずしもないことを示唆しています。

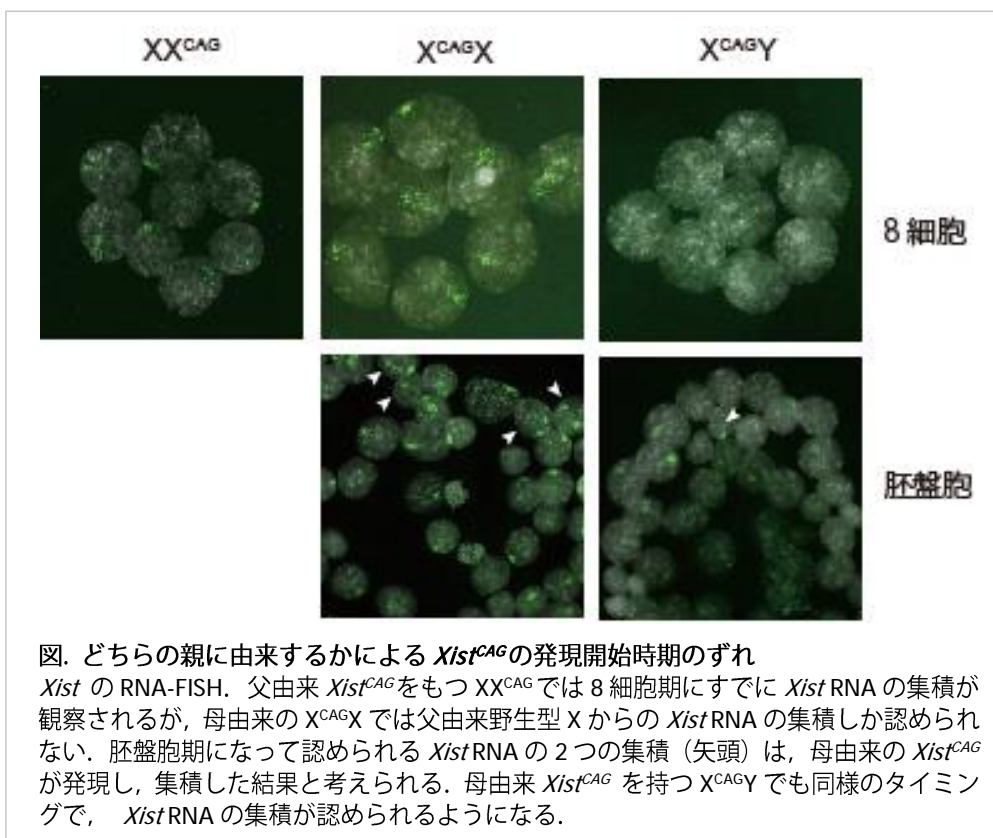


図. どちらの親に由来するかによる *Xist*^{CAG} の発現開始時期のずれ
Xist の RNA-FISH. 父由来 *Xist*^{CAG} をもつ XX^{CAG} では 8 細胞期にすでに *Xist* RNA の集積が観察されるが、母由来の X^{CAG}X では父由来野生型 X からの *Xist* RNA の集積しか認められない。胚盤胞期になって認められる *Xist* RNA の 2 つの集積 (矢頭) は、母由来の *Xist*^{CAG} が発現し、集積した結果と考えられる。母由来 *Xist*^{CAG} を持つ X^{CAG}Y でも同様のタイミングで、*Xist* RNA の集積が認められるようになる。

3. 今後の予定

第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会 (合同開催)

日程：2016 年 1 月 12 日 (火) - 1 月 14 日 (木)

会場：松島一の坊 (宮城県宮城郡松島町高城字浜 1-4; JR 仙台駅から電車で 25 分)

田中 (公募研究代表)、原田 (計画研究分担) が世話人代表を務めます。

※参加登録は締め切りました。

編集後記：先日、領域の中間評価がありました。その結果はまだ届いていませんが、数々の実績に裏打ちされた領域代表の発表は素晴らしく、ヒアリングの雰囲気は良かったと思います。国際活動支援班も無事採択されました。皆様ご協力ありがとうございました。そうこうしているうちに、気がつけば今年もすりと過ぎ去りつつあります。いつものことながらなんとなく落ち着かない気分になりますが、年末年始を利用して少しまとまった時間で久しぶりに実験を試みようかともひそかに考えております。皆さんも良いお年をお迎えください。来年もどうぞよろしく申し上げます。

Hiki

1. 「クロマチン動構造 前半戦」 胡桃坂仁志領域代表
2. 国際活動支援班が発足しました。
3. 成果紹介:
 - ① 胡桃坂領域代表らの領域内共同研究による論文が、Open Biology 誌に掲載されました。
 - ② 胡桃坂領域代表らの領域内共同研究による論文が、Sci Rep 誌に掲載されました。
 - ③ 米田(計画研究代表)、岡(計画研究分担)らの領域内共同研究による論文が、eLife 誌に掲載されました。
4. 今後の予定

1. 「クロマチン動構造 前半戦」 胡桃坂仁志領域代表



富士山五合目にて

2015 年度にて、新学術領域研究「動的クロマチン構造と機能」は前半戦を終えます。本領域から発表された論文数は 2015 年 6 月時点で 162 報、そのうち 33 報が領域内での共同研究の成果でした。なかには世界的にインパクトを与える研究成果もありました。それらの成果を中間報告書として取りまとめて 6 月に文科省へ提出し、10 月 16 日にはヒアリングも実施されました。その結果が 2016 年 2 月に公表され、本領域は「A」評価をいただくことができました。これも本領域内外の多くの研究者の皆様からのご支援と叱咤激励の賜物と、心より感謝申し上げます。評価コメントなどは、以下のサイトにて閲覧できます。

http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/hojyo/chukan-jigohyouka/1366612.htm

評価コメントの中に、以下のようなものがございました。

『異なる階層の研究者の共同研究の推進により、個々の成果のみならず階層横断的な共同研究成果も上げており高く評価できる。これは「動的クロマチン構造」という一定の方向性を持った目的意識、コンセプトの共有が浸透し、順調に研究が進展していることを示しており、新たな学問分野創成が期待される。』

これはまさに、本領域の目指す「共同研究を基軸とした学際的な分野の発展」が具現化されつつあるとの評価であり、今後の領域研究にとって大きな励みとなります。後半戦も、本領域の特色を最大限に生かし、領域参加者の皆さまと共にクロマチン動構造研究のより一層の発展を目指していきたいと考えております。

2. 国際活動支援班が発足しました。

国際共同研究加速基金（国際活動支援班）の公募が行われ、「クロマチン動構造」の提案が採択されました。国際共同研究加速基金（国際活動支援班）は、国際共同研究の推進や海外ネットワークの形成（国際的に評価の高い海外研究者の招聘やポストドクターの相互派遣等）の促進を目的としています。H27年度は、国際共同研究や海外ネットワーク形成のための研究員の派遣や招聘を行っています。

📧 海外派遣報告

2015年11月末から2週間ほど、フランス・トゥールーズ第三大学・Kerstin Bystrickyさんの研究室を訪問しました。パリでテロ事件があった直後でしたが、トゥールーズ市内はすっかり落ち着いており、郊外のキャンパスにある宿舎では安心して過ごすことが出来ました。Bystricky研究室では、DNA配列特異的結合タンパク質を利用した可視化法を独自に開発し、特定の遺伝子座の動態をライブイメージングで追っています。今回私は、我々の翻訳後修飾特異的Fabを用いた可視化法（FabLEM）を、彼女らの系へ導入できるかどうか検討するために訪れました。Fabのヒト培養細胞への導入は、ラボの人たちの前で一度デモンストレーションをすると、「百聞は一見に如かず」ですぐに要領を得てくれました。そのあと共に顕微鏡観察を重ねるうちに、現時点での問題点と達成すべき目標が明らかになり、今後フランスと日本でそれぞれどうプロジェクトを進めていくかなどを議論することが出来ました。共同研究をととても良い形で始めることが出来たと思います。

トゥールーズで2週間過ごした後、ドイツ・ドレスデンのマックスプランク研究所に3日間滞在し、Nadine Vastenhouwさんの研究室でLight-sheet顕微鏡を使って、Fabを導入したゼブラフィッシュ初期胚の観察をさせてもらいました。現代的なデザインの建物と、地下の巨大ゼブラフィッシュ飼育施設に気後れする暇もなく、顕微鏡観察・プレゼンテーション・ミーティング・ディスカッションに奔走し、大変有意義な時間を過ごしました。

帰国後は、ヨーロッパの人たちに負けまいと、すぐに実験を再開して、両研究室と頻りに連絡をとりながら課題を進めています。今回の海外派遣で得られた貴重な体験を、今後も国際的な共同研究の発展に大いに役立てていきたいです。
(東工大・木村研究室 佐藤優子)

3. 成果紹介

① 胡桃坂領域代表と大川（計画研究代表）らの領域内共同研究による論文が、Open Biology 誌に掲載されました。

Influence of DNA methylation on positioning and DNA flexibility of nucleosomes with pericentric satellite DNA

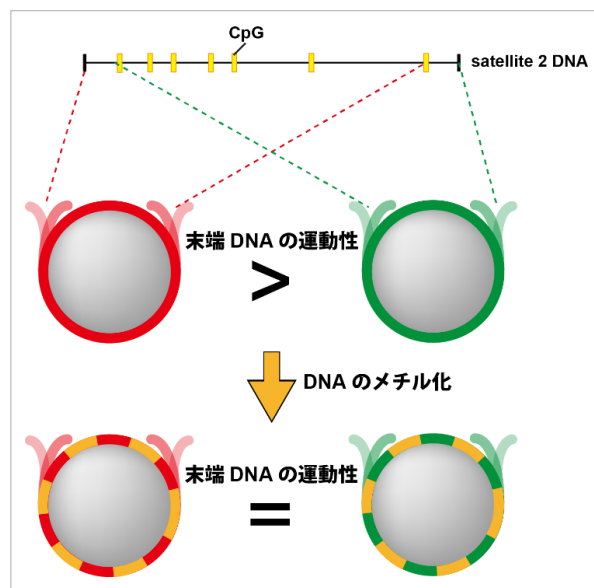
Osakabe A, Adachi F, Arimura Y, Maehara K, Ohkawa Y and Kurumizaka H

Open Biology 2015 5: 150128

<http://rsob.royalsocietypublishing.org/content/5/10/150128>

DNAのメチル化は、重要なエピジェネティックマークの1つである。真核生物においては、CpGダイヌクレオチドのシトシン塩基がメチル化されることが示されており、これが発生や分化と密接に関与していることが明らかにされている。さらに、DNAのメチル化の異常ががん細胞で検出されていることから、DNAのメチル化はゲノムDNAの恒常性維持に重要であることが指摘されている。

る。これまでに、ある種のがん細胞で、ペリセントロメアのサテライト DNA 領域におけるメチル化レベルの減少と、それに伴うヘテロクロマチン構造の不安定化が報告された。しかし、DNA のメチル化がクロマチンの構造へ与える影響は未だ不明であった。そこで本論文では、肝臓がんで低メチル化が報告されているサテライト 2 配列に着目し、クロマチンの基盤構造であるヌクレオソームを用いた生化学および構造生物学的手法によって、DNA メチル化のヌクレオソーム構造と安定性への影響を解析した。サテライト 2 配列を含む再構成ヌクレオソームのポジションを次世代シーケンサーによって解析した結果、DNA のメチル化によってヌクレオソームのポジションが変化することが明らかになった。次に、溶液中におけるヌクレオソームの末端 DNA の運動性を、マイクロコッカルヌクレアーゼを用いた生化学的解析によって評価した。その結果、ヌクレオソームの末端 DNA の運動性が、各ポジションに依存して異なることが示された。さらに、このポジションによるヌクレオソーム末端 DNA の運動性の違いが、DNA のメチル化によって解消されることが明らかになった。一方で、DNA メチル化は、ヌクレオソーム構造には大きな影響を与えないことが X 線結晶構造解析の結果から明らかにされた。これらのことから、DNA のメチル化は、ヌクレオソームのポジションの違いによる末端 DNA の運動性の差異を解消することによって、安定なクロマチンの形成を誘起することが示唆された (図)。これらの結果は、DNA のメチル化異常が原因となる発がんのメカニズムを理解する上で興味深い。



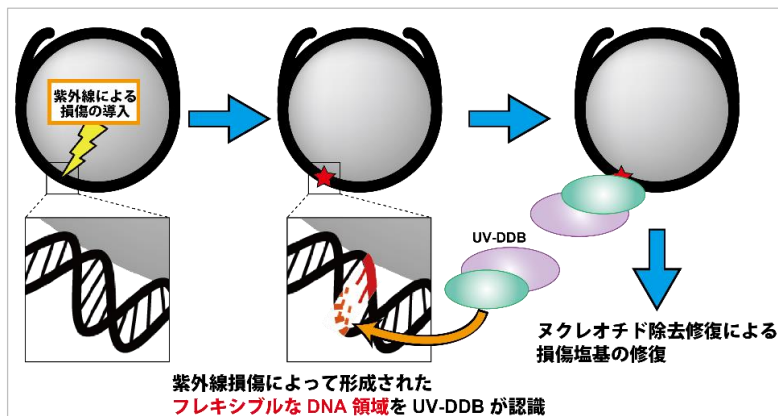
② 胡桃坂領域代表と香川（公募研究代表）らの領域内共同研究による論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。

Structural basis of pyrimidine- pyrimidone (6–4) photoproduct recognition by UV-DDB in the nucleosome

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

Scientific Reports 2015 5: 16330
<http://www.nature.com/articles/srep16330>

遺伝情報を担うゲノム DNA は、内外的要因によって日々損傷を受ける。その中でも、紫外線は CPD や 6-4 光産物などの塩基架橋損傷を導入することが知られている。この塩基損傷を修復するために、生物はヌクレオチド除去修復と呼ばれる修復機構を獲得している。ヌクレオチド除去修復関連因子群の変異は、色素性乾皮症(XP)の原因として特定されている。真核生物では、ヌクレオチド除去修復反応はクロマチン上で起こると考えられるが、クロマチンにおける損傷塩基の収納機構および認識機構は依然不明であった。そこで本論文では、特定の箇所に 6-4 光産物を導入した DNA を用いて、紫外線損傷塩基を含むヌクレオソームを試験管内で再構成した。再構成ヌクレオソームから得られた単結晶を用いて X 線結晶構造解析を行った結果、導入された紫外線損傷塩基周辺の DNA が非常にフレキシブルになっていることが明らかになった。さらに、ヌクレオソーム中の損傷塩基の認識機構を明らかにするために、DNA 損傷を認識するタンパク質である UV-DDB を用い



て生化学的解析を行った。その結果、UV-DDB は、紫外線損傷の導入によってフレキシブルになった DNA 領域を特異的に認識するというメカニズムを新たに明らかにした (図)。本研究により、色素性乾皮症発症のメカニズムの解明やその治療への応用のための重要な知見を得た。本研究成果は、日経産業新聞 (2015 年 11 月 25 日掲載) に報道された。

③ 岡 (計画研究分担)、米田 (計画研究代表)、大川 (計画研究代表)、木村 (計画研究代表) らによる領域内共同研究が *eLife* 誌に掲載されました。

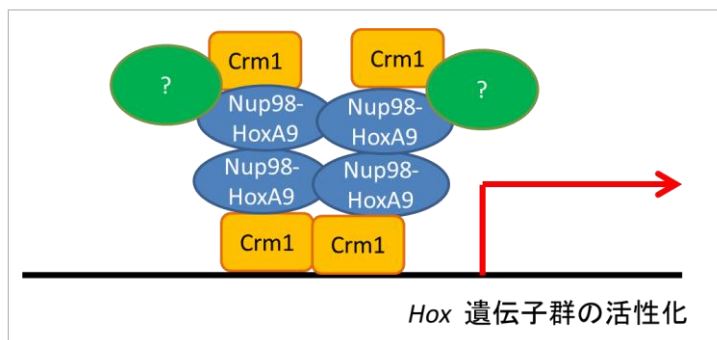
Chromatin-prebound Crm1 recruits Nup98-HoxA9 fusion to induce aberrant expression of Hox cluster genes

Oka M, Mura S, Yamada K, Sangel P, Hirata S, Maehara K, Kawakami K, Tachibana T, Ohkawa Y, Kimura H, Yoneda Y

eLife 2016; 5: e09540
<http://elifesciences.org/content/5/e09540v1>

核と細胞質間の物質輸送の通過点として機能する核膜孔複合体は、ヌクレオポリンと呼ばれる約 30 種類のタンパク質で構成される。ヌクレオポリンの一つである Nup98 の遺伝子は白血病で染色体の転座により様々な遺伝子との融合遺伝子を形成し、さらに、その遺伝子産物である Nup98 融合タンパク質の発現が白血病を引き起こす事が知られている。Nup98 と転写因子 HoxA9 との融合タンパク質 Nup98-HoxA9 は核内で特徴的なドット構造を形成することが知られていたが、その機能はこれまで不明のままであった。

我々は Nup98-HoxA9 のドット構造が核内でランダムに局在するのではなく、DAPI 染色で強く染まるヘテロクロマチン領域の近傍 (特に条件的ヘテロクロマチン) に局在することを見いだした。また Nup98-HoxA9 をマウス ES 細胞で発現させると、細胞分化に重要な働きをするホメオボックス (Hox) 遺伝子群の発現が選択的に活性化されることが分かった。そこで Nup98-HoxA9 のゲノム上での結合部位を解析した結果、ES 細胞では Nup98-HoxA9 が 4 つすべての Hox 遺伝子クラスター領域 (Hox-A, -B, -C, -D) に集積していることが明らかとなった。したがって Nup98-HoxA9 の結合によって局所的な遺伝子発現の活性化が引き起こされていることが示唆された。さらに、Nup98 と相互作用することが知られている核外輸送因子 Crm1 (Chromosome region maintenance 1; あるいは Exportin1/Xpo1 と呼ばれる) があらかじめ Hox 遺伝子クラスター領域に結合しており、Nup98-HoxA9 をリクルートしていることが明らかになった (図)。Nup98-HoxA9 を発現する白血病は予後が悪いことが知られており、本研究成果により新たな作用機序を持つ治療薬の開発が期待できる。



4. 今後の予定

第3回 ヒストンバリエーション研究会

日時：平成28年2月28日(日)13時より

場所：早稲田大学 先端生命医科学センターセミナールーム3

※参加申し込み・事前登録不要



**第3回
ヒストンバリエーション研究会**

平成28年2月28日(日)13時より
早稲田大学 先端生命医科学センター セミナールーム3

13:00-14:20	14:35-15:50	16:10-17:00
名古屋市立大学 中山 潤一 Gregor Mendel Institute 河島 友和 東北大学 日下部 将之	筑波大学 奥脇 暢 九州大学 前原 一満 早稲田大学 田口 裕之	東北薬科大学 関 政幸 広島大学 田代 聡

問い合わせ先：胡桃坂 仁志 (早稲田大学理工学術院、構造生物・創薬研究所)
E-mail: kurumizaka@waseda.jp TEL:03-5369-7315
共催：早稲田大学総合研究機構、新学術領域研究 動的クロマチン構造と機能

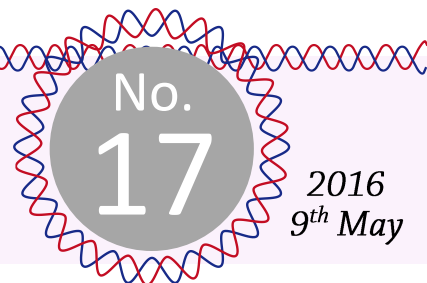
編集後記：中間評価も無事終了し、本新学術領域は後半戦を迎えようとしています。A+をいただけなかったのは残念ですが、後半で更なる成果を上げて、最終評価では最高の評価をいただけるように頑張っていきたいと思います。とは言うものの、今年は年明け早々にインフルエンザ様の病に倒れてしまいました（熱が出はじめてすぐに検査した結果は陰性でしたが、その後39度の熱が二日間続きました）。これを戒めとして、いまさらですが少しずつ体力をつけるべく何かはじめようかなと思っています。年度末は何かとたてこんで体力が落ちてしまいがちだと思いますので、皆様もお気を付けてお過ごしください。

Hiki

クロマチン動構造

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp>

News Letter



1. 研究組織一覧
2. 成果紹介:
 - ① 胡桃坂領域代表らの領域内共同研究による論文が、NAR 誌に掲載されました。
 - ② 河野 (計画研究代表) らによる論文が、PLoS Comput Biol 誌に掲載されました。
3. 異動のお知らせ
4. 今後の予定

1. 研究組織一覧

新学術領域「動的クロマチン構造と機能」の平成 28 年度は、22 名の公募研究を迎えてスタートしました。計画研究でも所属の変更等があります。

総括班	研究代表者	胡桃坂 仁志				
	連携研究者	木村 宏	小布施 力史	原口 徳子	米田 悦啓	徳永 万喜洋
		河野 秀俊	斉藤 典子	大川 恭行	原田 昌彦	
研究協力者(評価者)	森川 耿右	笹井 理生	柴田 武彦	木村 暁	西村 善文	

国際活動支援班	研究代表者	胡桃坂 仁志			
	研究分担者	木村 宏			
	連携研究者	小布施 力史	原口 徳子	米田 悦啓	徳永 万喜洋
河野 秀俊		斉藤 典子	大川 恭行	原田 昌彦	

計画研究 研究課題	代表者・分担者	所属・職名
再構成ヌクレオソームを用いた動的クロマチン構造の解明	胡桃坂 仁志	早稲田大学・理工学術院・教授
	堀 哲也 (分担)	大阪大学・生命機能研究科・准教授
シミュレーション計算による動的クロマチンのダイナミクス解析	河野 秀俊	量子科学技術研究開発機構・グループリーダー
ヘテロクロマチンの構造と機能の理解	小布施 力史	北海道大学・先端生命科学研究院・教授
計測と再構築による生細胞内クロマチンダイナミクスの高次元的理解	木村 宏	東京工業大学・細胞制御工学研究ユニット・教授
	山縣 一夫 (分担)	近畿大学・生物理工学部・准教授
クロマチン機能を保証する核膜の構造と分子基盤	原口 徳子	情報通信研究機構・主任研究員
	浅川 東彦 (分担)	大阪大学・生命機能研究科・准教授
1 分子 in vivo イメージング超解像ナノ解析によるクロマチン動作原理解明	徳永 万喜洋	東京工業大学・生命理工学研究科・教授
核膜孔複合体構成因子・核輸送因子によるクロマチン動態制御の解明	米田 悦啓	医薬基盤・健康・栄養研究所・理事長
	岡 正啓 (分担)	医薬基盤・健康・栄養研究所・プロジェクトリーダー
	安原 徳子 (分担)	日本大学・文理学部・准教授
核内構造体とのインタープレイによるクロマチン動構造の制御	斉藤 典子	熊本大学・発生医学研究所・准教授
	原田 昌彦 (分担)	東北大学・農学研究科・准教授
細胞分化にともなうクロマチン変動メカニズムの解明	大川 恭行	九州大学・生体防御医学研究所・教授

公募研究 研究課題	代表者	所属・職名
選択的遺伝子領域の動的ヘテロクロマチン化誘導機構	落合 恭子	東北大学・医学系研究科・助教
新規分子CAMPを含むヘテロクロマチン結合複合体によるゲノム安定性維持機構	田中 耕三	東北大学・加齢医学研究所・教授
クロマチン構造変化の可視化によるニューロン分化遺伝子群制御機構の解明	岸 雄介	東京大学・薬学系研究科・助教
DNA修復とクロマチン制御の統合的理解によるがん治療への応用	細谷 紀子	東京大学・医学系研究科・講師
人工触媒システムを用いたヒストンアシル化の機能解析	川島 茂裕	東京大学・薬学系研究科・研究員
ヌクレオソーム動構造とそのエピジェネティック制御の分子シミュレーション研究	高田 彰二	京都大学・理学研究科・教授
セントロメアにおけるクロマチン構造制御の分子基盤	有吉 真理子	京都大学・工学研究科・研究員
量子ビーム散乱法の協奏的利用による機能性ヌクレオソームの溶液構造解析	杉山 正明	京都大学・原子炉実験所・教授
ヒストンH2AXの交換反応を介した損傷クロマチンダイナミクス	井倉 毅	京都大学・放射線生物研究セ・准教授
染色体上の非コードRNAが動的クロマチン構造を制御する仕組み	平岡 泰	大阪大学・生命機能研究科・教授
サブテロメアクロマチン構造の動的制御メカニズム	加納 純子	大阪大学・蛋白質研究所・准教授
クロマチン動構造を介したDNA損傷修復制御の分子基盤	菅澤 薫	神戸大学・バイオシグナル研究セ・教授
ゲノム修復における動的クロマチン構造変換	田代 聡	広島大学・原爆放射線医学研究所・教授
非コードRNAによるクロマチン・高次ゲノム構造制御機構の解明	廣田 耕志	首都大学東京・理工学研究科・教授
HP1による動的クロマチン構造変換の制御	中山 潤一	名古屋市立大学・システム自然科学研究科・教授
ヌクレオソームの多様な構造を解析する技術の開発	香川 亘	明星大学・理工学部・准教授
分裂酵母CENP-Aヌクレオソームと動原体の再構築	佐藤 政充	早稲田大学・理工学術院・准教授
ヒストンバリエントに基づくクロマチンの機能の推定	浜田 道昭	早稲田大学・理工学術院・准教授
雄性不妊及び発がん過程のクロマチン動態解析	上田 潤	中部大学・実験動物教育研究セ・助教
ヘテロクロマチン形成とクロマチン環境	佐渡 敬	近畿大学・農学部・教授
時空間的核アクチン重合化制御によるクロマチン構造と転写状態の変動	宮本 圭	近畿大学・生物理工学部・講師
ヒストンを基盤とした染色体構築メカニズムの解明	新富 圭史	理化学研究所・研究員

2. 成果紹介

① 胡桃坂領域代表と大川（計画研究代表）および木村（計画研究代表）らの領域内共同研究による論文が、*Nucleic Acids Research* 誌に掲載されました。

Structure and function of human histone H3.Y nucleosome.

Kujirai T, Horikoshi N, Sato K, Maehara K, Machida S, Osakabe A, [Kimura H](#), [Ohkawa Y](#), [Kurumizaka H](#).

Nucleic Acids Research (2016) doi: 10.1093/nar/gkw202
<http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2016/03/25/nar.gkw202.long>

遺伝子発現はクロマチンの構造変換によって制御されている。生体内には、さまざまなヒストンバリエントが存在し、これらがクロマチンの構造変換における重要な因子であると考えられている。H3.Yは、H3.3から派生した霊長類特異的なヒストンH3バリエントとして2010年に発見された。先行研究において、培養細胞では、H3.Yは、転写が活発なユークロマチンに存在し、ノックダウン解析から、H3.Yは転写の活性化に関与していることが考えられていた。しかし、これまでにH3.Yがクロマチン構造に与える影響については不明であった。本論文では、H3.Yについて本領域における共同研究により構造生物学的、生化学的、細胞生物学的解析を行い、H3.Yによるクロマチン構造変換機構を明らかにした。

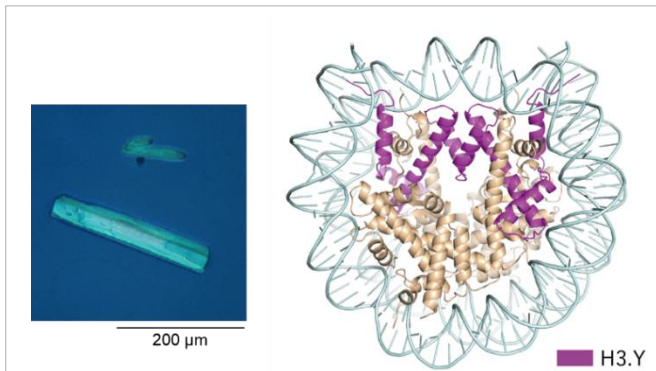


図 1. H3.Y を含むヌクレオソームの結晶及び立体構

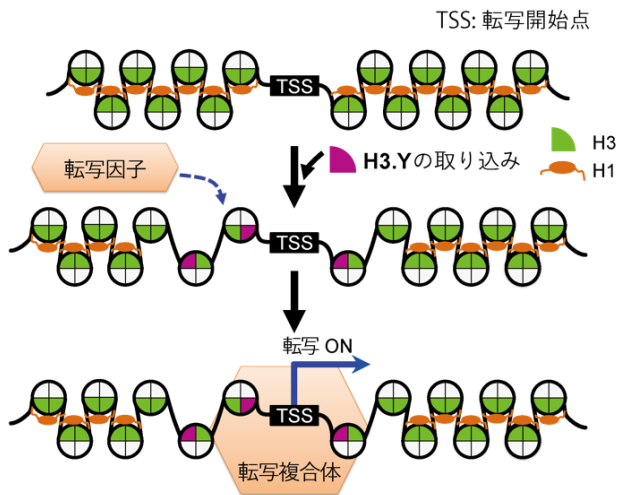


図 2. H3.Y によるクロマチン制御モデル

まず、H3.Yを含むヌクレオソームを試験管内において再構成し、結晶構造解析を行った(図1)。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.Y特異的なアミノ酸がヌクレオソームのDNA末端付近に集中しており、ヒストンとDNAとの結合様式が異なる可能性が示唆された。そこで、DNA末端の運動性について生化学的手法を用いて解析を行った結果、H3.YヌクレオソームではDNA末端の運動性が高く、通常型のヌクレオソームと比較してDNAが緩んだ構造を形成することが示された。また、H3.Yを含むヌクレオソームは、クロマチンを高次に凝集させるリンカーヒストンH1の結合に対して阻害的に働くことが明らかになった。このようにH3.Yヌクレオソームは、リラックスしたクロマチン構造の形成を促進することが示唆された。興味深いことに、H3.Yを含むヌクレオソームは、通常型のヌクレオソームと比較して高い熱安定性を有することが明らかとなった。さらに、これらの性質は、細胞内においてH3.Yの主要な形態であると予測されているH3.Y/H3.3ヘテロヌクレオソームにおいても保存されていることも明らかとなった。また、H3.Yのゲノム上での局在解析から、H3.Yは転写開始点周辺に局在することが明らかになった。以上の結果から、H3.Yは転写開

始点近傍において安定的にクロマチンに留まり、リラックスしたクロマチン構造を形成することで転写の活性化を維持するというモデルを提唱した(図2)。これらの結果は、多様なヒストンバリエーションによるクロマチン制御機構を解明する上で大変意義深い発見であると考えられる。

② 河野(計画研究代表)らによる論文が、PLOS Computational Biology 誌に掲載されました。

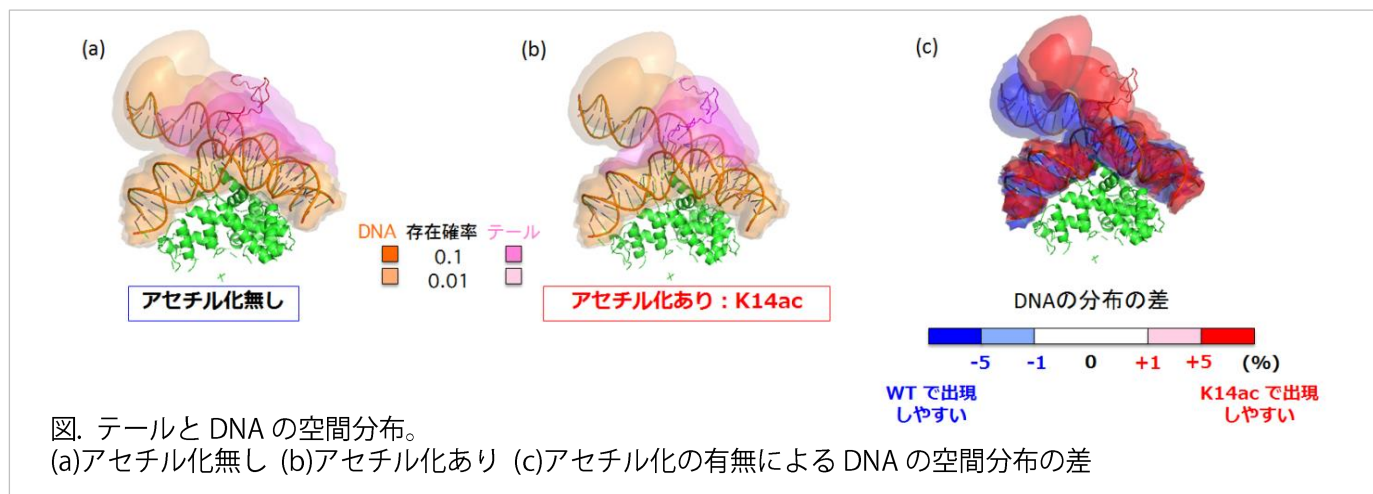
H3 Histone Tail Conformation within the Nucleosome and the Impact of K14 Acetylation Studied Using Enhanced Sampling Simulation.

Ikebe J, Sakuraba S, Kono H.

PLOS Computational Biology 2016 Mar 11;12(3): e1004788. doi:10.1371/journal.pcbi.1004788
<http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1004788>

H3 テールは、テールの中でも最もよく研究されている対象であり、アセチル化は基本的に転写を活性化することが報告されている。アセチル化がヌクレオソーム構造に与える影響を調べるために、アセチル化ありなしの状態でのH3 テールの構造を調べた。これまでのシミュレーション計算では、テール部分のみを切り出した計算しかなされてこなかったが、今回初めてヌクレオソーム存在化でのテールの構造多様性を明らかにした。計算の結果、アセチル化ありなしに関わらずテールはDNAに張り付いた構造をとること、テールのアルギニンは80%以上の確率でDNAと相互作用しているがリジンは適度に溶媒に露出すること、テールの位置によってリンカーDNAの開き具合が変わること、アセチル化によってテールのヘリックス構造形成率があがることなどが分かった。これらを統合して考えると、H3 テールのアセチル化によってテールがコンパクトな構造をとり、転写活性を促すようにリンカーDNAの束縛を緩めてヒストンコアから開かせる

効果があることが分かった。今後は、アセチル化の効果に加算性があるのか、または、場所依存性があるのか、といった観点で研究を進めていきたいと考えている。



3. 異動のお知らせ

大川 恭行【所属】九州大学 生体防御医学研究所 トランスクリプトミクス分野【職名】教授
 ひとこと：この度同じ九州大学内の別部局、生体防御医学研究所に異動しました。トランスクリプトミクス分野として、助教の原田哲仁さん、前原一満さんの両名とともに活動して参ります。今後ともご指導ご鞭撻のほど宜しくお願いします。また、NGS解析につきましても今後とも精力的に行って参りますので共同研究等お気軽にお声掛けいただけましたら幸甚です。

安原 徳子【所属】日本大学 文理学部 生命科学科【職名】准教授
 ひとこと：この度、小さいながら研究室を運営することになりました。引き続き、動物細胞の核輸送と高次生命現象の関係について研究に尽力致します。皆さま、今後ともご指導くださいますよう、よろしくお願い致します。

4. 今後の予定

- ① 第4回「動的クロマチン構造と機能」領域会議
 日時：平成28年7月7日(木)–9日(土)
 場所：北海道虻田郡留寿都村 ルスツリゾート
- ② 第27回 細胞生物学ワークショップ（蛍光顕微鏡実機講習会）
 日時：平成28年8月1日(月)–5日(金)
 場所：情報通信研究機構、未来ICT研究所（神戸市）
 応募要項（掲載予定）：http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131103/CellMagic/
 応募期間：6月10日(金)–30日(木)
- ③ Colorado Chromatin Meeting
 日時：平成28年8月8日(月)9:00-17:00
 場所：Colorado State University Lory Student Center Theatre
<https://vprnet.research.colostate.edu/IGAF/upcoming-events/colorado-chromatin-meeting-2016/colorado-chromatin-meeting-information/>
- ④ 一般公開シンポジウム「遺伝子のすがた～からだの中で起こる不思議～」
 日時：平成28年8月21日(日)13:00-17:00
 場所：早稲田大学 国際会議場 井深大記念ホール

編集後記：4月から新しい学生が加わり、ラボが大分賑やかになりました。研究の面白さを伝えていければと思っておりますが、まずはメールの書き方から指導しています。一年後にどれだけ成長しているのか楽しみです（自分も含めて）。 HiKi

1. 平成 28 年度 クロマチン動構造領域会議・クロマチン動構造ワークショップ開催報告
2. 成果紹介
 - ① 齊藤らによる論文が、Nucleus 誌に掲載されました。
 - ② 原口らによる領域内共同研究による論文が、FEBS Letters 誌に掲載されました。
 - ③ 平岡らによる領域内共同研究による論文が、Genes to Cells 誌に掲載されました。
3. 学会報告:
4. 国際活動支援班からの活動報告
5. 今後の予定

1. 平成 28 年度クロマチン動構造領域会議・クロマチン動構造ワークショップを開催しました



7月7日-9日に、クロマチン動構造の領域会議と、クロマチン動構造ワークショップが、北海道留寿都で開催されました。計画研究と公募研究の研究代表者・分担者、および各研究室の若手研究者に加え、評価委員と学術調査員の先生方合わせて総勢84名が参加し、研究発表と活発な議論が行なわれました。

領域会議では、計画研究と公募研究を合わせて36題の発表があり、それぞれの発表について議論と共同研究の可能性についての検討が行われました。また、若手のポスター発表を中心としたワークショップでは31題のポスター発表があり、夜遅くまで熱い議論が続きました。ポスター発表終了後、参加者の投票による優秀発表賞が以下の若手研究者に授与されました(五十音順)。磯部真也(北海道大学)、伊藤由馬(東京工業大学)、日下部将之(東北大学)、佐藤優子(東京工業大学)、清水将裕(京都大学)



領域会議中に開催された総括班会議では、評価委員の先生方から領域の活動に対して以下のようなコメントをいただきました。

- ・領域内の連携が密に形成されていることは高く評価できる。領域内の連携形成には、胡桃坂領域代表が領域ネットワークの核となり、再構成ヌクレオソームの提供や、共同研究の実施などを積極的に行っていることが大きく貢献していると考えられる。引き続き多様な領域内共同研究が進展することを期待したい。
- ・公募研究の採択によって、理論研究が充実した。これらの研究が領域の進展に大いに貢献することが期待される。

- ・今後、インフォマティクスとシミュレーションの両方のタイプの理論研究が、ともにクロマチン研究にとって重要性を増すと思われる。この分野の研究者は日本でもまだ少なく、広報活動などを通じて、若手に刺激を与えて欲しい。
- ・前回の領域会議に比べて、研究の進展が感じられた。たとえば、ヒストンバリエーションを含むヌクレオソームの安定性・不安定性の分子構造を基礎にした理解などのダイナミクス解析が進み、また分化などの高次生命機能とのつながりも見えてきている。
- ・当該領域の総括班会議に出席して、これまで経験したことがないほど議論が活発であり、各班員が緊密なコミュニケーションで繋がっていることを実感した。即ち、計画研究の間の緊密な連携プレイが、この領域の高い実績につながっているものと推測する。



本領域会議は、参加者が講演会場に隣接したホテルに宿泊する形で行なわれたことにより、若手研究者も交えた活発な論議が夜遅くまで続けられました。それが新たな共同研究へのアイデアの醸成につながるなど、本領域の活性化にも大いに寄与する会議となりました。

2. 成果紹介

① 齊藤 (計画研究代表) らによる論文が、Nucleus 誌に掲載されました。

Loss of the integral nuclear envelope protein SUN1 induces alteration of nucleoli.

Matsumoto A, Sakamoto C, Matsumori H, Katahira J, Yasuda Y, Yoshidome K, Tsujimoto M, Goldberg IG, Matsuura N, Nakao M, Saitoh N*, Hieda, M*

Nucleus 2016, 7: 68-83. doi: 10.1080/19491034.2016.1149664. PMID: 26962703
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19491034.2016.1149664?journalCode=kncl20>

古くよりがん細胞では、クロマチンや核膜、核内構造の特徴的な変化が観察され、核異型とよばれてきた。しかしこれらの形態は複雑かつ不均一で、通常の画像解析では変化の度合いを客観的に定量することが極めて困難であった。一方、教師付き機械学習アルゴリズムウインチャーム (wndchrm) は、多数の形態特徴関数を駆使した統計解析を自動で行うもので、例えば正常とがん細胞がとりうるあらゆる形態を含む画像群、つまりポピュレーションを対象とした解析に適している。

LINC (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) 複合体は、SUN タンパク質を含む核膜タンパク質の集合体で、核膜と細胞骨格を連結する。最近になって、LINC 構成タンパク質は乳がん組織で顕著に減少していることがわかった。そこで私たちは、ヒト乳腺上皮において、LINC の欠損がクロマチン・核形態にどのように影響するかについて定量的な解析を行った。ヒト乳腺由来細胞株 MCF10A で LINC 構成タンパク質である SUN1、SUN2、

Lamin A/C をノックダウンし、臨床病理で頻用されるパピニコロウ染色やクロマチンを可視化する DAPI 染色を施し、その画像データセットを用いて細胞形態変化を定量した。その結果、ウイ

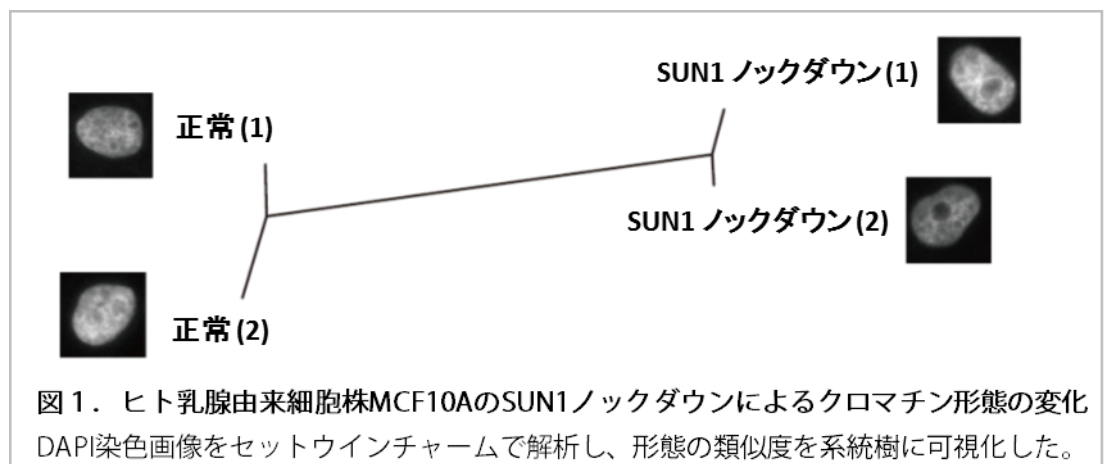
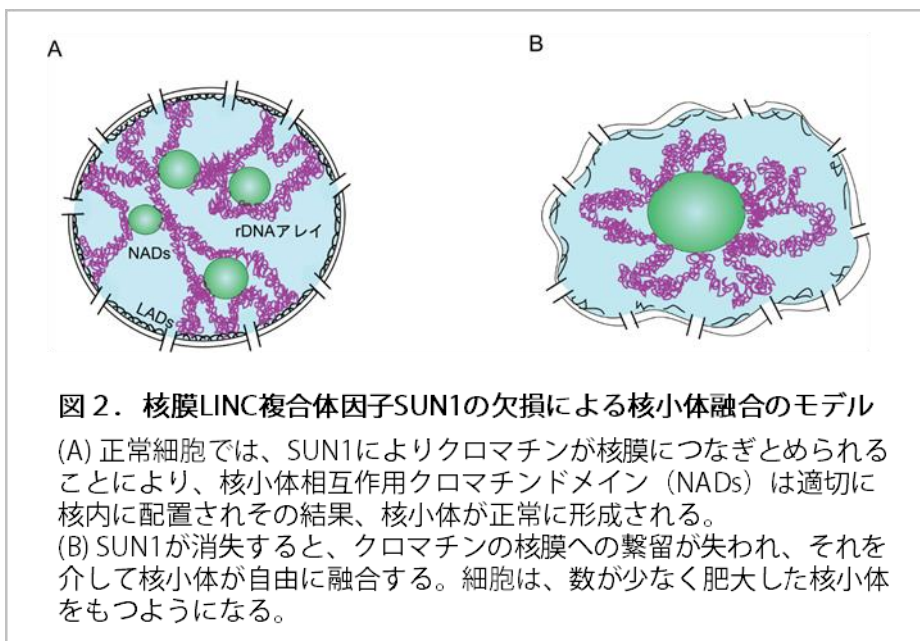


図1. ヒト乳腺由来細胞株MCF10AのSUN1ノックダウンによるクロマチン形態の変化
 DAPI染色画像をセットウインチャームで解析し、形態の類似度を系統樹に可視化した。

ンチャームでは効率的に変化が認識され (図 1)、ほぼ 100%の精度で SUN1 ノックダウン細胞を分類することができた。特に SUN1 のノックダウンでは、変化が核小体に局在することを見出し、詳細解析により、核小体の数が減少したり肥大すること、rRNA 合成が低下することを明らかにした。さらに乳がん組織では、SUN1 の発現量と核小体の大きさに相関があることを示した。

本研究では、ウインチャームによる偏りのない形態の定量によって、LINC 複合体と核小体の予期しない連携 (図 2) を新たに見出し、これらが乳がん診断のよい指標となることを提唱した。



② 原口 (計画研究代表) と平岡 (公募研究代表) らによる領域内共同研究の論文が、FEBS Letters 誌に掲載されました。

Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells

Tsuchiya M, Ogawa H*, Koujin T, Kobayashi S, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T*.

FEBS Lett. 2016, Jun 18. doi: 10.1002/1873-3468.12262. [Epub ahead of print]
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.12262/abstract;jsessionid=00EC0A5B50FC3E3EEBA34EA A2A01BD0D.f04t02>

細胞に、外来遺伝子 (DNA) をトランスフェクション法で導入するときに、遺伝子の発現効率が低くて困ったことはないだろうか。特に、ES 細胞(胚性幹細胞)や MEF 細胞 (マウス胎性線維芽細胞) では、そのようなケースが多い。それを改善する方法として、p62 タンパク質を減少させる方法が有効であることを発見した。さらに、独自に開発した DNA ビーズを使った実験系により、p62 の減少が遺伝子導入効率を上昇させるメカニズムの一端を明らかにした。

一般的には、正常なマウスの MEF 細胞では外来遺伝子の発現効率が低い (図 1 左側)。しかし、p62 をノックアウトしたマウスの MEF 細胞では、その発現効率が 10~20 倍程度上昇した。また、p62 ノックアウト MEF 細胞に p62 を発現させると、その発現効率は減少した。さらに、正常マウス胚の ES 細胞から、p62 を siRNA 処理により減少させると、発現効率は 5 倍程度上昇した。これらの結果は、p62 が、外来遺伝子の導入・発現効率を低下させていることを示している。p62 は、転写の制御因子として知られているが、オートファジーの制御因子であるとも考えられている。我々は、p62 と外来遺伝子発現との関係を調べるために、外来 DNA として DNA ビーズを細胞内に入れて、DNA と p62 の挙動を観察した。DNA ビーズは、直径 2.8 マイクロメートルのプラスチックビーズの表面に二重鎖 DNA (約 8 Kbp) を結合させたものである。細胞内に入れた DNA ビーズは、エンドソームを通過して細胞内に取り込まれ、エンドソーム崩壊によって細胞質内に入る。正常細胞では、細胞質内に入るとすぐに、DNA ビーズ周辺にオートファジー膜が集合してくるのに対して、p62 を siRNA 処理で減少させた細胞では、オートファジー膜集合が減弱していた。すな

わち、p62は、外来DNAが細胞質に入ったときに、その周辺にオートファジー膜を誘導することで、外来DNAの分解を誘導することが分かった。

今回の発見は、細胞内に入ったDNAがどのような運命を辿るかを明らかにしたものであり、p62の量を調節することで、細胞内に導入したDNAの運命を人為的に変化させられることを示している。今後は、p62の活動を変化させることにより、細胞内に導入したDNAビーズあるいはクロマチンビーズの細胞内動態の解析に活かしていきたい。また、遺伝子治療では、外来DNAを細胞核内に効率良く伝送することが求められるが、高効率な遺伝子デリバリーを実現する上で有用な知見を提供するものである。

本研究の成果は、日刊工業新聞に取り上げられたほか、毎日新聞、京都新聞、徳島新聞、奈良新聞、エキサイトなど、多数のネットニュースで報道された。

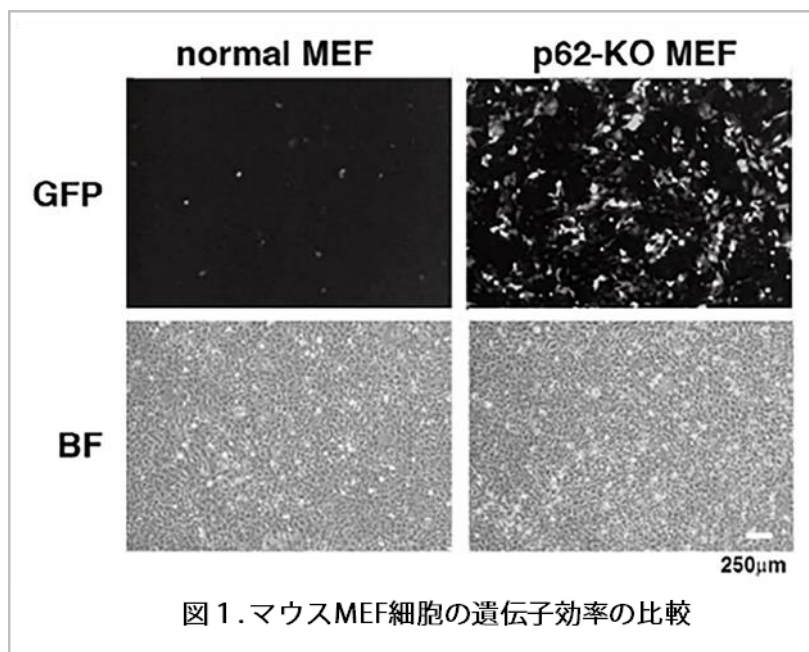


図1. マウスMEF細胞の遺伝子効率の比較

③ 平岡（公募研究代表）と原口（計画研究代表）、浅川（計画分担者）らによる領域内共同研究の論文が、Genes to Cells誌に掲載されました。

Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions.

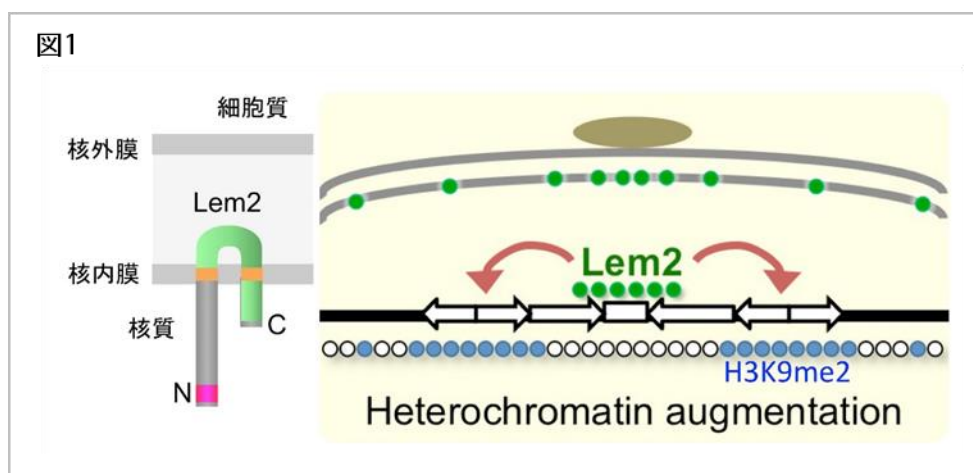
Tange Y, Chikashige Y, Takahata S, Kawakami K, Higashi M, Mori C, Kojidani T, Hirano Y, Asakawa H, Murakami Y*, Haraguchi T*, Hiraoka Y*.

Genes Cells. 2016, Jun 23. doi: 10.1111/gtc.12385.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gtc.12385/abstract>

核膜は、クロマチン機能に重要な働きをされると考えられているが、その分子メカニズムは、これまで不明であった。我々は、分裂酵母を用いて、核膜タンパク質がセントロメア機能と構造に重要な働きをすることを発見した。強調しておきたいのは、この働きは、栄養状態に依存するということである。すなわち、富栄養環境では、核膜タンパク質のLem2は、セントロメアのヘテロクロマチン形成を増強するが、貧栄養環境

ではそのような増強は起こらない。本論文は、栄養環境によって、細胞がクロマチン構造を変える仕組みの一端を明らかにしたものである。

核膜タンパク質のLem2は、酵母からヒトまで保存されているタンパク質である。まず、我々は、Lem2タンパク質のN末端とC末端が核内に突き出し



ていることを免疫電顕で明らかにした (図 1 左)。Lem2 を欠損させると、分裂酵母細胞は、ミニ染色体の高頻度脱落と増殖の低下を起こした。その理由を、クロマチン免疫沈降法により詳しく調べたところ、セントロメアヘテロクロマチンの形成不全を起こしていることが分かった。興味深いことに、これらの表現型は、富栄養の完全培地でのみ見られ、貧栄養の合成最小培地では見られなかった。さらに、これら栄養に依存する Lem2 欠損表現型は、偶発的に起こる 40Kbp もしくは 10Kbp の染色体領域の重複により回復することがわかった (重複領域の両端にはレトロトランスポゾンの LTR 配列があり、LTR 配列間での組換えにより重複を生じた)。

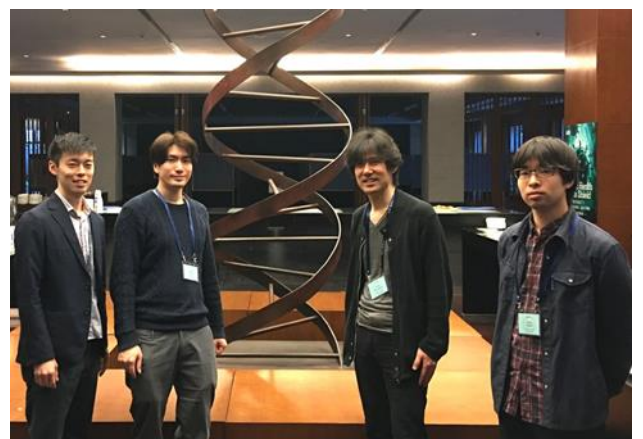
栄養に依存する表現型を理解するために、セントロメアヘテロクロマチン状態への栄養の影響を調べたところ、富栄養状態では、ヒストン H3K9 ジメチルの蓄積が起こるのに対して、Lem2 欠損株では起こらないことが分かった (図 1 右)。栄養状態の変化に対応してヘテロクロマチンが強化されるという知見はこれまでになく、新しい発見である。今後、細胞が栄養を感知してクロマチン構造を動的に変化させることによって、クロマチン機能を制御していく分子メカニズムを明らかにしていきたい。

3. 学会報告

“Cold Spring Harbor Asia meeting, Chromatin Epigenetics and Transcription”

2016 年 5 月 9 日から 13 日まで、中国の上海から 60 マイル西にある蘇州市にて“Cold Spring Harbor Asia meeting, Chromatin Epigenetics and Transcription”が開催されました。本会議は、今回で 4 回目の開催となり、2 年に一度ずつ開催されています。日本からは招待公演として九州大学の佐々木裕之先生と早稲田大学の胡桃坂仁志先生が発表を行いました。本領域からは、中部大学の上田潤先生、胡桃坂研究室の堀越直樹さん、有村泰宏さん、鯨井智也 (筆者) がポスター発表を行いました。学会参加者は総勢約 500 名と大規模で、また発表は 5 日間で 10 セッション、演題数は口頭発表では 57 演題、ポスター発表では 139 演題あり、連日夜 9 時過ぎまで発表が行われました。演題のプログラムはクロマチン形成から始まり、植物のエピジェネティクス、クロマチン構造と non-coding RNA、シスエレメント、クロマチン修飾と、幅広い分野を網羅した内容となっていました。

今回のミーティングでは、最新の研究成果を発表することが推奨されており、つい最近発表された論文についての内容が多く見られました。世界の著名な研究者達による発表は、どの発表についてもとても充実して大変興味深い内容であり、実際に著者自身による発表を聞いたことは大変感激でした。中でも印象に残ったことは、Danny Reinberg 博士や Robert Kingston 博士をはじめとして、Polycomb repressive complex (PRC) に関する発表が多いことでした。多くの研究者が PRC に注目しており、またそれに関連してヒストンのアミノ酸変異とがんの関係に世界の関心が集まっていることを実感しました。また、次世代シーケンシングを用いた、新規のエピジェネティクス解析技術についても発表がありました。Xing-Dong Fu 博士は non-coding RNA が結合しているクロマチン領域の同定方法、Steven Henikoff 博士は複製直後のクロマチン領域の新たな同定方法を発表しており、これらの技術をもちいたエピジェネティクス分野の新展開が楽しみになりました。ポスター発表では、お昼過ぎから夕方まで時間が取られており、大変活発なディスカッションが繰り広げられ、会場は熱気に満ち溢れていました。初めての海外学会への参加であった私にとって、未熟な英語であっても時間を忘れて夢中でディスカッションできたこと、科学を通して外国人とコミュニケーション



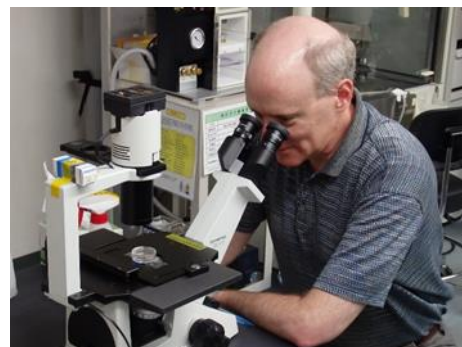
DNAの前で撮影
(左から堀越さん、有村さん、胡桃坂先生、筆者)

ーションできたことは大変貴重な経験でした。特に、中国の学生の研究に対する熱心な姿勢には圧倒されました。近年の中国の科学の著しい勢いは、この熱心な姿勢が原動力になっているだろうと感じるとともに、自分も頑張らなくては、と強く感じました。

学会の会場となった Dushu Lake World Hotel は、湖畔に面した立派な庭園を有しており、休憩時間には気持ち良く散歩しながら研究についてゆったりと考えることができました。また、アメリカの Cold Spring Harbor 研究所にもある DNA 二重らせん構造や、タンパク質の立体構造を模倣したオブジェが設置しており、研究の歴史を感じながら最前線の研究を考える機会となりました。(早稲田大学・胡桃坂研 鯨井 智也)

4. 国際活動支援班からの活動報告

■海外研究者も参加するトレーニングコース「生細胞・核構造イメージングトレーニングコース」の実施
原口（計画研究代表）が開発した生細胞高分解能イメージング技術 (Live CLEM 法) は、蛍光顕微鏡法と電子顕微鏡法を組み合わせたイメージング法であり、生きた細胞における分子ダイナミクスを、ナノメートルオーダーの細胞構造との関係で解析することができる優れた方法である。シカゴ大学 (米国) の Aaron P. Turkewitz 教授から、Live CLEM 法に関する詳細なノウハウを教えて欲しいと依頼を受け、「生細胞・核構造イメージングトレーニングコース」として同教授を研究室に受入れ、共同研究を実施した。Turkewitz 教授は、2016 年 3 月 13 日に来日し、同 5 月 15 日まで、約 2 ヶ月間に渡って滞在し、Live CLEM 法を修得した。Live CLEM 法は、主に蛍光顕微鏡法と電子顕微鏡法の 2 つからなる。それぞれの技法の習得には、時には、大変な時間が掛かるものであるが、Turkewitz 教授は、それぞれを短期間のうちに修得し、さらによりよい方法になるためのアイデアを提供してくれた。また、単に Live CLEM 法についての議論をただけでなく、研究内容に踏み込んで議論を行い、今後の展開を考える上で大きな進展をもたらした。



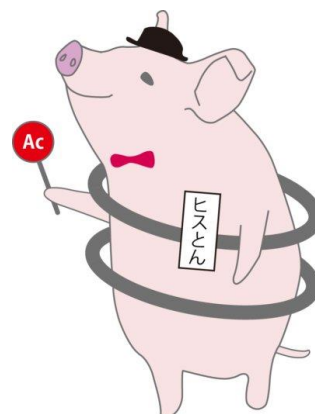
実験中の Turkewitz 教授

5. 今後の予定

一般公開シンポジウム「遺伝子のすがた～からだの中で起こる不思議～」

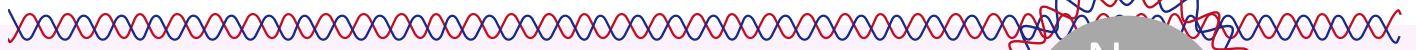
日時：平成 28 年 8 月 21 日 (日) 13:00 -17:00

場所：早稲田大学 国際会議場 井深大記念ホール



編集後記：厳しい残暑のなか、いかがお過ごしでしょうか？私は、国内外の出張、論文や書類の提出、各種会議や講義、実習、ヒアリングなどを抱え、特に厳しい夏を過ごしました。上手くいかなかったと思われるものもありますが、研究室のメンバーや共同研究者の皆様のおかげで、目標は概ね達成できたと思います。9月に入ると再び出張が入ってきますが、8月後半は少し落ち着いて研究や学生の指導、講義の準備などに取り組むことが出来そうです。

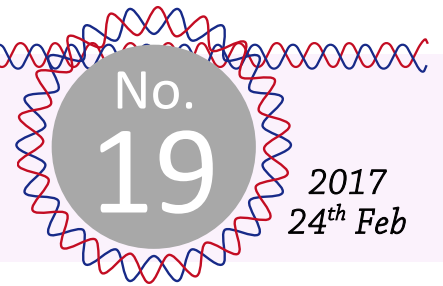
HiKi



クロマチン動構造

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp>

News Letter



1. 成果紹介

- ① 河野らによる論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。
- ② 木村らによる領域内共同研究による論文が、Journal of Molecular Biology 誌に掲載されました。
- ③ 上田・山縣らによる領域内共同研究による論文が、Cell Reports 誌に掲載されました。
- ④ 胡桃坂領域代表らによる領域内共同研究による論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。

2. 学会報告：2016 Workshop on the Molecular and Physical Biology of Chromosomes

3. 国際活動支援班からの活動報告：Colorado/München/Basel

4. 受賞報告：加納公募研究代表が日本遺伝学会奨励賞を受賞しました。

5. 今後の予定

1. 成果紹介

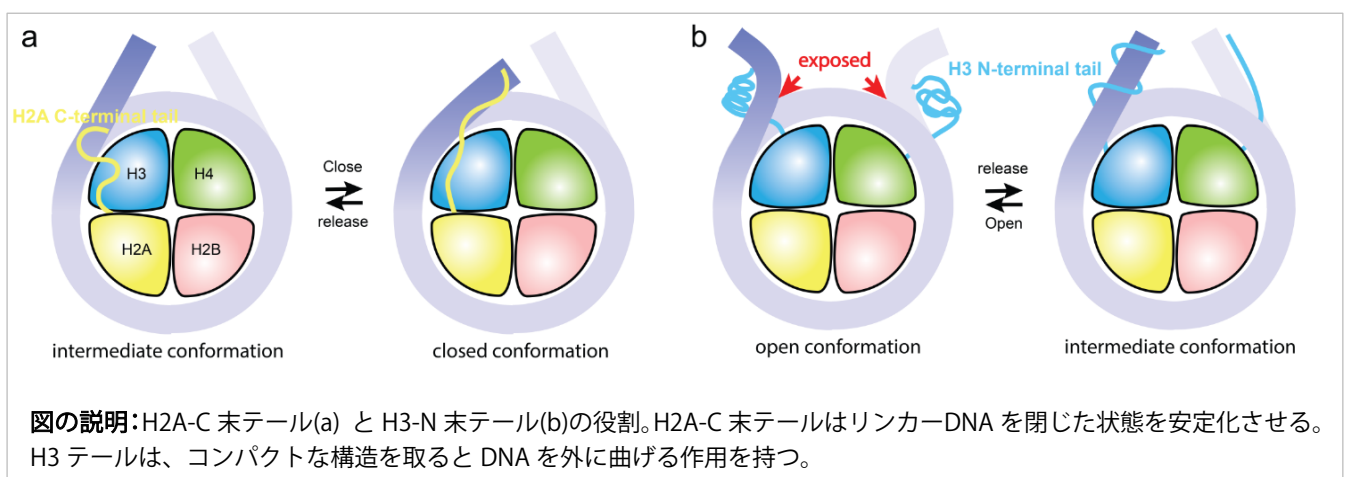
① 河野 (計画研究代表) らによる論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。

Distinct Roles of Histone H3 and H2A Tails in Nucleosome Stability

Li Z*, Kono H*

Scientific Reports 6:31437, DOI:10.1038/srep31437 (2016)
<http://www.nature.com/articles/srep31437>

ヌクレオソームに巻き付いた DNA は、呼吸するかのように開いたり閉じたりしていることが知られている。今回、コンピュータシミュレーションにより、この動きと H3 テールと H2A の C 末テールが深く関わっていることを見出した。H2A-C 末テールについては、基本的にリンカーDNA を閉じた状態を安定化すること、また、テールがリンカーDNA を触ると閉じた状態になり、ヌクレオソームコアに近い DNA の部分を触ると開いた状態になることが分かった。一方、H3 テールについては、テールが触る DNA の位置と DNA 開閉との相関は見られなかった。しかし、H3 テール構造と DNA の構造に次のような興味深い構造変化の関係が見られた。H3 テールがコンパクトな構造を取ると DNA を外側に曲げ、DNA に巻き付くもしくは DNA に沿って貼りつくことと DNA を硬く直線的にすることがシミュレーション結果から分かった。今後は、ヒストンの翻訳後修飾が、テール及び DNA の構造変化にどのような影響を与えるのかについて詳細に調べて行きたい。



② 木村 (計画研究代表)、浅川 (計画研究分担)、山縣 (計画研究分担)、上田 (公募研究代表)、原口 (計画研究代表)、平岡 (公募研究代表)、胡桃坂領域代表らによる領域内共同研究の論文が、Journal of Molecular Biology 誌に掲載されました。

A Genetically Encoded Probe for Live-Cell Imaging of H4K20 Monomethylation

Sato Y*, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Ohtsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura A, Kurumizaka H, Kimura H*

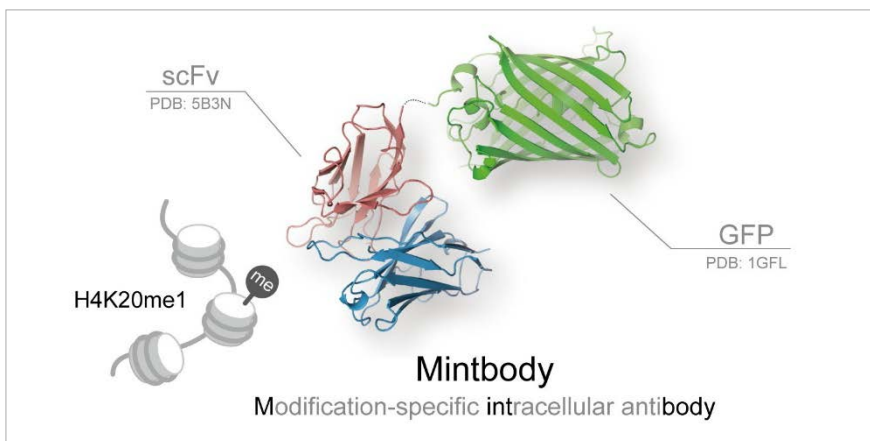
J Mol Biol. 2016 Oct 9;428(20):3885-3902. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.010.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283616303059>

従来、ヒストン修飾の検出法として、細胞を固定した後に修飾特異的抗体を反応させる方法が用いられている。しかしこの方法では、一個の細胞の中で修飾が変化していく過程を追うことは出来ない。例えばヘテロな細胞集団に紛れているごく少数の細胞に注目したい時、修飾のライブイメージングが出来ると便利である。我々はこれまで、修飾特異的抗体由来の生細胞プローブを開発し、蛍光顕微鏡を用いてヒストン修飾を観察・定量するシステムを樹立してきた。特に抗体の可変領域を single-chain variable fragment (scFv) として蛍光蛋白質を融合して細胞内に発現させたプローブ modification-specific intracellular antibody (mintbody) は、遺伝子改変動物を作製することで個体レベルの解析に応用可能である。

ヒストン H4 リシン 20 モノメチル化修飾 (H4K20me1) は、DNA 損傷修復や遺伝子発現制御、また X 染色体の不活性化などに関与することが報告されている。今回我々は、H4K20me1 特異的抗体 (CMA421/15F11) から mintbody の作製に成功した。CMA421 はもともと親和性・特異性の優れた抗体である (K_D 値 5.2×10^{-11} M)。リコンビナント scFv は、親和性は低下したものの (K_D 値 2.5×10^{-7} M)、高い特異性は維持されていた。さて問題は細胞内での標的特異性であるが、まず酵母の変異体を用いた解析により H4K20 メチル化特異的であることを明らかにした。また、培養細胞に SUV420H1 を発現させて H4K20me1 レベルを低下させた際に、H4K20me1-mintbody の核への集積が減少したことから、H4K20 メチル化の中でも H4K20me2 や H4K20me3 ではなく H4K20me1 に特異的であることが証明できた。

こうして無事に特異性が検証された H4K20me1-mintbody を使って、不活性 X 染色体 (inactive X chromosome; Xi) のライブイメージングを行った。mintbody は、細胞周期を通して Xi に結合し、Xi の生細胞プローブとして機能した。また、複製マーカー (Proliferating cell nuclear antigen; PCNA) と共に発現させることで、Xi の複製タイミングを明らかにした。さらに、線虫に H4K20me1-mintbody を発現させて発生過程におけるクロマチン構造の変化を観察できた。クロマチン制御における H4K20me1 の役割はまだ明らかでない部分が多いが、今回の mintbody プローブが機能解明に役立つと期待される。

今回は幸運にも細胞内で機能する mintbody が得られたが、たいていの場合は scFv の細胞内発現はうまくいかず、細胞質で凝集体を形成してしまう。抗体は本来細胞外へ分泌されるものなので、細胞内の環境では折り畳みの効率や安定性が著しく低下することが原因であると考えられる。H4K20me1-mintbody では、フレームワーク領域内のわずか 1 アミノ酸の違いにより、細胞内での安定性が著しく低下することが明らかとなった。結晶構造解析の結果、イムノグロブリンフォールド内の疎水性相互作用をより安定化させるようなアミノ酸置換により細胞内機能が改善することがわかった。今回得られた知見を道しるべとして、今後より多くの scFv の細胞内発現を成功させて、色々な修飾に対する mintbody を生み出していきたい。



③ 上田 (公募研究代表)、山縣 (計画研究分担)、大川 (計画研究代表)、木村 (計画研究代表)、胡桃坂領域代表らによる領域内共同研究の論文が、Cell Reports 誌に掲載されました。

Testis-Specific Histone Variant *H3t* Gene is Essential for Entry into Spermatogenesis.

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*

Cell Reports. 2017 Jan 17; 18(3): 593-600. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.065.
[http://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247\(16\)31772-7](http://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247(16)31772-7)

加齢と共にいずれはなくなる卵子とは異なり、年を経ても精子は存在する。これは、精巣の中に精子の“もと”となる幹細胞が存在し、それが自分と同じ幹細胞を作り出す細胞分裂 (自己複製) と、精子を作り出す細胞分化の両方の機能があるためである。この幹細胞の仕組みに何らかの異常が生じると、精子を作ることが出来なくなり最終的には無精子症となる。このたび、マウスをモデルに精子幹細胞が分裂はするが分化に異常が生じて結果的に無精子症になるメカニズムを明らかにした。

ヒストンタンパク質には異型種 (バリエーション) が存在し、各々が独自の機能や組織特異性を持っていることが明らかとなっている。精巣にのみ発現するヒトの *H3T* 遺伝子は今から約 20 年前 (1996 年) に発見されており、2010 年に胡桃坂仁志領域代表のグループによって立体構造と生化学的性質が解明された (Tachiwana, H., *et al.*, *PNAS*, 2010)。しかし、*H3T* 遺伝子の生体内での機能は長らく不明のままであった。その理由は、ゲノムプロジェクトが 2002 年に完了していたにも関わらず、ヒトの *H3T* に相当する遺伝子がマウスで見付かっていなかったからだ。このような中、2015 年に大川恭行計画班員のグループによって新規のヒストン遺伝子のバリエーションが多数発見され、偽遺伝子だと考えられていたものの一つが *H3t* 遺伝子であることが明らかとなった (Maehara, K., Harada, A., *et al.*, *Epigenetics & Chromatin*, 2015)。

今回我々は、偽遺伝子だと思われていた *H3t* 遺伝子がタンパク質をコードし、精子幹細胞が分化すると *H3t* が発現し (図)、精子を作るのに必要不可欠であることを明らかにした。ところが、成熟した精子からは *H3t* タンパク質が消えていた。*H3t* を失ったマウスは見かけ上全く正常に発育し健康だったが、雄が無精子症となり、完全に不妊になることが明らかとなった。このことから、*H3t* 遺伝子は精子を作るためだけに特化した (精子作りが完了するとなくなる) ヒストンタンパク質をコードしていると考えられる。さらに、このヒストンタンパク質と DNA の複合体の構造解析から、体細胞に存在する通常のヒストン-DNA 複合体に比べて、その結合がやや弱いことが明らかとなり、この精巣だけで見られる特殊なヒストンの化学的性質が精子幹細胞から精子が形成されない原因であったと推測される。

ヒストン H3 タンパク質は様々な翻訳後修飾を受けて、エピジェネティクスに深く関わるということが知られているが、翻訳後修飾酵素の基質であると考えられてきたヒストン H3 タンパク質にも多様性があり、ある特

定の細胞種 (今回の場合は精子) への分化に必須の役割を果たしているという事実は、エピジェネティクスの階層性を考える上で今後重要な概念になってくるものと考えられる。

本研究の成果は日刊工業新聞、毎日新聞、産経新聞、朝日新聞、中日新聞、日経新聞、東海テレビ、NHK (中部 7 県) などに取り上げられた。

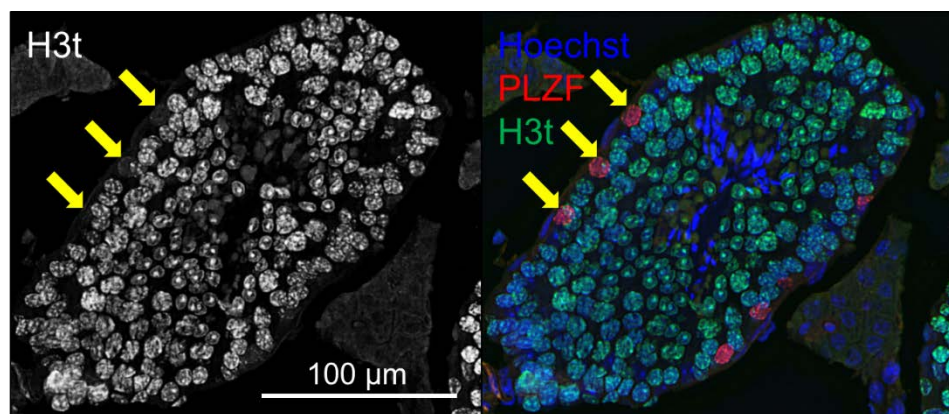


図. *H3t* に対する特異的抗体を用いた精巣切片の免疫染色画像。幹細胞 (PLZF 陽性細胞、赤色) に *H3t* タンパク質は発現しておらず、分化した細胞に発現している (緑色)。

④ 胡桃坂領域代表と菅澤 (公募研究代表) らによる領域内共同研究の論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。

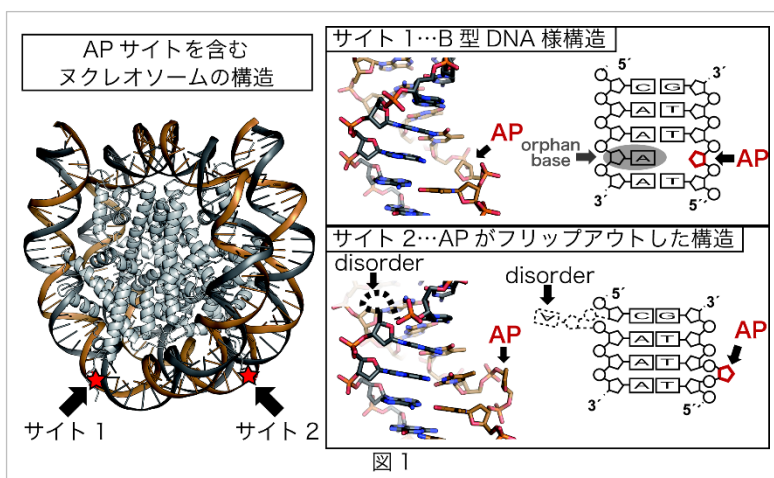
Polymorphism of apyrimidinic DNA structures in the nucleosome.

Osakabe A, Arimura Y, Matsumoto S, Horikoshi N, Sugasawa K, Kurumizaka H*

Sci Rep. 2017 Jan 31;7:41783. doi: 10.1038/srep41783.
<http://www.nature.com/articles/srep41783>

脱塩基部位 (apurinic/apyrimidinic site : AP site) は、DNA から塩基が脱落する DNA 損傷で、真核生物の細胞では 1 日あたり数万箇所もの AP site がゲノム DNA 上に形成されている。AP site が生じると、通常、その向かいには相補する塩基を持たない塩基(orphan base)が生じることになる。AP site の修復に関わる酵素である AP エンドヌクレアーゼは、orphan base を認識して AP site に特異的に結合し、5'側のホスホジエステル結合を加水分解することが知られていた。しかし、AP site が、クロマチンの基盤構造であるヌクレオソームにどのように収納されているのかは明らかになっていなかった。

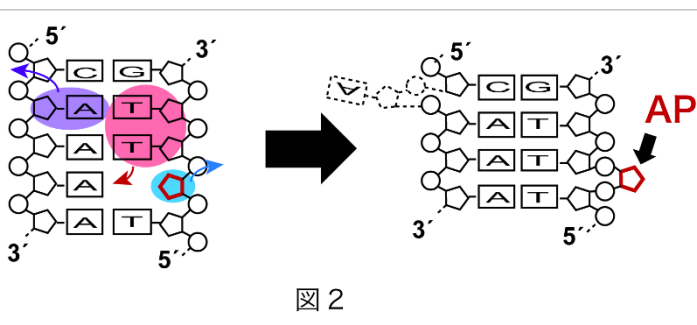
本研究では、AP site の安定化アナログであるテトラヒドロフラン (THF) を対称的な 2 箇所の位置に導入した DNA を用いてヌクレオソームを再構成し、その立体構造を X 線結晶構造解析によって 2.5 Å の分解能で明らかにした。驚くべきことに、結晶構造中で 2 箇所の AP site はそれぞれ異なる構造を形成していた。1 つ目の AP site (図 1、サイト 1) は、これまでの DNA の構造解析でも観察されていた通り、B 型 DNA 様の構造で、orphan base が形成されていた。



一方で、2 つ目の AP site (図 1、サイト 2) では、リン酸およびデオキシリボース残基が DNA 2 重らせん構造からフリップアウトするとともに、本来の orphan base が隣の塩基と新たに塩基対を形成することで、いわゆる inchworm 構造を形成していた。今回使用した DNA は 5'-TTTT-3'の連続配列の中に AP site を導入しているため、サイト 2 において、本来 orphan base を形成するはずのアデニン塩基が、1 つ隣の塩基対の相補鎖のチミン塩基と塩基対を形成することができたと考えられた (図 2)。そのため、AP site を含まない DNA 鎖では、AP site から数えて 2 塩基離れたところに位置するチミン塩基と対合するはずであったアデニン塩基がフリップアウトしていた (図 2)。

今回報告した AP site を 2 箇所含む 145 塩基対の DNA を用いて再構成したヌクレオソームでは、2 つの AP site のうち、片方のみが inchworm 構造を形成していた。一方で、147 塩基対の DNA を含むヌクレオソームの構造中では 2 つの AP site の両方が inchworm 構造を形成することが、プレリミナリーな解析から明らかになっている。このことから、我々は、ヌクレオソーム中で塩基配列が連続した部位に AP site が導入された場合は、inchworm 構造が優先的に形成されると考えている。

AP site が inchworm 構造を形成した場合、orphan base が形成されないために、AP エンドヌクレアーゼ



によって AP site に鎖切断を導入し、修復を開始することが困難になると考えられる。細胞内において、inchworm 構造を形成した AP site は、ヌクレオソーム中では修復されないのか、それとも inchworm 構造を修復するための特別な機構が存在するのか、今後の解析が期待される。

2. 学会報告

“2016 Workshop on the Molecular and Physical Biology of Chromosomes”に参加して



図1. 下村博士がクラゲを捕獲したとされるヨットハーバー

ヨンの一つにしており、Shinya Inoue が長年開催してきた顕微鏡のコースがイメージングの分野では有名で、イメージング分野の研究者にとって、まさに聖地のような研究所です。筆者は、ずっと以前、約30年前に顕微鏡のコースに応募して、締め切りを過ぎているという理由で断られて以来、初めて憧れの聖地にやってきました。ボストンから北に車で2時間 Woods Hole に到着し、徒歩で MBL の敷地にはいると、Lecture Hall の屋根の上で星条旗が半旗になっているのに気付き、9月11日であることに思い至りました(図1)。

会議は11日の夜のセッションから始まり、16日の朝まで、9つのセッションが開かれ、約40演題の口頭発表が行われました。アメリカをはじめ、カナダ、イギリス、フランス、ドイツ、スイス、オーストリア、日本などから、この分野の第一線で活躍する研究者が参加しました。日本からは、筆者を含めて4名が参加しました。この会議は、一般に参加を呼びかけず、招待された者だけが集まる非公開の会議です。私が呼ばれたのは、Nancy Kleckner が「そろそろ新しいデータが出ている頃だろうと思って」ということでした(私の発表は図2のとおり)。ほとんどの発表は未発表の内容で、アブストラクトは求められず非公開であるため、個別の発表の内容の詳細に紹介することはしませんが、大まかにいうと、イメージングや3C・HiCのほか polymer model に基づく染色体の核内配置に関する研究や、in vitro での染色体再構築の話などが繰り広げられました。印象に残ったのは、染色体と核質の間の“phase separation”という考えや表面化学など物理化学や数理科学に基礎を置く、様々な新しい概念に接することができ、知性と感性を刺激する日々でした。(大阪大学 平岡 泰)

☞2016年9月11日から16日まで、アメリカ東海岸にある Woods Hole Marine Biological Laboratory (ウズホール海洋生物学研究所) で “2016 Workshop on the Molecular and Physical Biology of Chromosomes” が開催されました。オーガナイザーは、Nancy Kleckner、Kiyoshi Mizuuchi、Job Dekker、Francois-Xavier Barre、Claire Wyman の面々。本会議は、染色体や細胞核の物性について分子生物学と数理生物学の観点から研究する研究者が集う分野融合的な会議で、本領域からは公募班員の平岡泰が参加しました。

Marine Biological Laboratory (MBL) は、様々な講習会を科学コミュニティーに提供することをミッシ

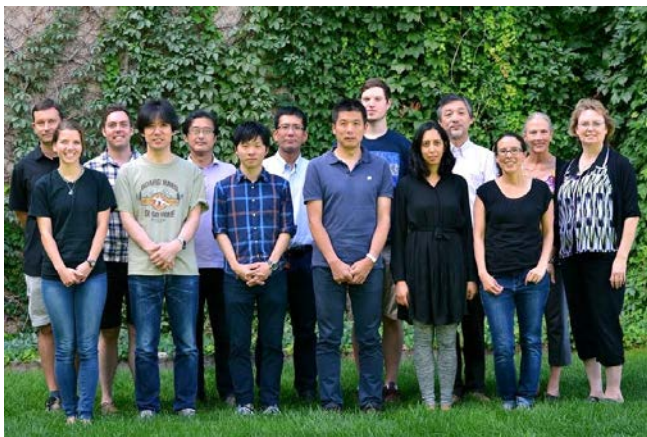
A framework of meiotic chromosomes for homologous pairing



図2. 参加者の間で「太陽の塔」が話題になった筆者のタイトルバック

3. 国際活動支援班からの活動報告

■ Colorado chromatin meeting



2016年8月8日、アメリカ合衆国のコロラド州フォートコリンズにて開催されました Colorado Chromatin Meeting に参加しました。このミーティングは本領域と、コロラド州立大、コロラド大学デンバー校、コロラド大学ボルダー校の研究者から構成される Institute for Genome Architecture and Function との共同シンポジウムとして開催されました。本領域からは、九州大学の^{大川}恭行先生、東京工業大学の^{木村}宏先生、佐藤優子さん、量子科学技術研究開発機構の^{河野}秀俊先生、東北大学の^{原田}昌彦先生、早稲田大学の^{胡桃坂}仁志先生、加藤大貴（筆者）が参加し、

コロラド界隈のクロマチンの研究者と密にディスカッションをしました。また、コロラドの学生も多数参加し、活発な議論が行われました。演題としては、ヒストン修飾やクロマチン構造、non-coding RNA、ヒストンシャペロンなど、クロマチンに関する幅広い研究内容が発表されました。未発表データも多く紹介され、クロマチン研究の第一線の研究室での現在の研究の様子を知ることができ、大変刺激を受けました。特に Tingting Yao 博士のヒストンのユビキチン修飾の認識に関する発表や、Karolin Luger 博士の古細菌のクロマチン構造に関する発表などが印象に残りました。その他にもセントロメアに関する発表や、ヒストンシャペロン Spn1 や CAF1 に関する発表、HOTAIR などの non-coding RNA に関する発表など、興味深い発表がたくさんありました。また、昼にはポスター発表の時間が設けられました。私はポスター発表をさせていただきました。初めての海外学会で不安もありましたが、とてもアグレッシブに質問してくださる方や親切にアドバイスをしてくださる方が多く、大変有意義な時間を過ごすことができました。また、第一線で活躍される先生方とディスカッションをすることができ、大変刺激を受けました。発表されている方々が、とても熱く自身の研究を紹介し、オーディエンスも熱く議論しているのが印象的でした。

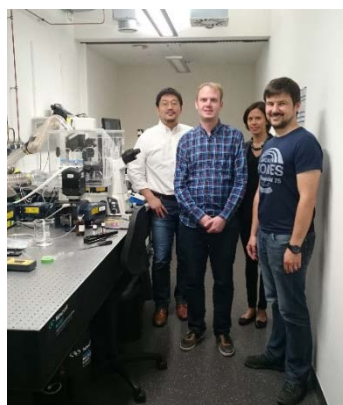
ミーティングが行われたフォートコリンズは、文化と自然が共存しており、とても美しい街並みでした。このような環境で存分に研究に関するディスカッションができたのは、とても良い経験になりました。

（早稲田大学・胡桃坂研 加藤大貴）

■ München

2016年9月1日から約1週間、本新学術領域の木村（東工大）と山縣（近畿大）が、ヘルムホルツセンター（Helmholtz Zentrum München）、Institute of Epigenetics and Stem Cells の Maria-Elena Torres-Padilla 博士の計らいにより、ドイツ・ミュンヘンに滞在しました。その間、木村と山縣は、セミナーを行ったほか、ヘルムホルツセンターやミュンヘン大学（Ludwig Maximilian University of Munich）の多くのクロマチン研究者と情報交換を行いました。また、山縣は、Torres-Padilla 博士の研究室で哺乳動物初期胚のイメージング手法に関する技術指導を行いました。更なる交流を行うため、2017年秋に本新学術領域とヘルムホルツセンターとの合同シンポジウムの計画が進むなど、非常に有益な滞在でした。

（近畿大学 山縣一夫）



■ Swiss-Japan Symposium “Chromatin Structure and Dynamics”

2017年1月20日にスイス、バーゼルの Friedrich Miescher Institute (FMI) で開催された、Japan-Swiss Symposium “Chromatin Structure and Dynamics” に参加しました。FMI は製薬企業である Novartis 社の研究所であり、細胞核から核酸を発見した Johannes Friedrich Miescher 博士の名前から命名された由緒ある、今回のシンポジウムテーマである Chromatin Structure and Dynamics の論議の場としては理想的な研究所です。研究所の入り口には Miescher 博士の写真が飾られ、その前方には FMI の実績を示す数多くの最近の論文が並び、圧倒される一方で、その中には日本人研究者の名前もいくつか見られ、誇らしくも感じました。本領域からは阪大・平岡泰教授、東工大・木村宏教授、早稲田大・胡桃坂仁志教授、神戸大・菅澤薫教授、東北大・原田昌彦准教授が参加し口頭発表を行いました。また、胡桃坂研の有村泰宏助教、小山昌子助教と原田研の山崎祥他（筆者）は若手研究者としてショートトークを行いました。また FMI からは、6 題の講演がありました。



筆者を含め、発表内容には DNA 損傷修復に関する演題が多くありました。FMI 所属の発表者である Michael Hauer 博士 (Susan Gasser Lab) は DNA 損傷に応答したヒストンの分解について報告し、同研究室の Ishan Deshpande 博士は、ssDNA へ RPA が結合するための Platform 構造として、Mec1-Ddc2 ダイマーの重要性を発表していました。DNA 損傷修復を専門にする研究者は本領域にも多くいらっしゃいますが、最近では修復過程に加え、細胞核内の Platform のような「修復の場」が注目され始めているように感じます。このシンポジウムの FMI 側のオーガナイザーであり、また FMI 所長である Susan Gasser 博士は、出芽酵母を用いて、ヘテロクロマチン領域の損傷を受けた DNA が、ユークロマチン領域、さらには核膜の NPC まで relocation した後に修復されるモデルを提唱し、適切な修復の場の重要性について指摘しています。今回の発表者を含む Gasser Lab の研究は、複数の変異出芽酵母を用いた解析に基づいており、改めてモデル生物としての出芽酵母の有用性について考えさせられました。その一方で、脊椎動物由来のより大きな細胞核内の修復場を発見することができれば、詳細な DNA 損傷修復メカニズムを解明するブレイクスルーになるのではないかと筆者は考えています。

FMI 所属の発表者としては、菅澤研究室出身の Syota Matsumoto 博士 (Nicolas Thomä lab) も参加していました。Matsumoto 博士は FMI に所属してからの期間は短いとのことでしたが、DDB2 が DNA 損傷部位を認識する構造に関する素晴らしい発表をされ、同じ若手研究者としては負けられない気持ちと共に、とても良い刺激になりました。

シンポジウム翌日以降も、日本からの参加者と FMI 研究者との研究打合せが随時行なわれ、今回のシンポジウムが、今後のスイスと日本の国際共同研究の進展にも大いに寄与することが期待されます。

シンポジウムの期間はスイスでも記録的な寒波に見舞われ、夜には-10℃以下と厳しい冷え込みでした。しかし、会場となった FMI の近くにはライン川が流れ、哲学者のニーチェや心理学者のユングを生み出したスイス最古のバーゼル大学があり、このような歴史がある環境で、最先端のクロマチン研究について議論できたことを嬉しく思います。最後になりますが、今回のシンポジウムの FMI 側のとりまとめをしていただいた Kenji Shimada 博士 (Gasser Lab) に、感謝いたします。



(東北大学・原田研 山崎祥他)

4. 受賞報告

加納純子・公募研究代表が遺伝学会奨励賞を受賞しました。授賞式は日本遺伝学会 第 88 回大会 (9 月 7・8 日) において行われました。



5. 今後の予定

■ 3 領域合同若手勉強会

クロマチン動構造に加えて以下の 2 領域との合同開催になります。

- ・生殖エピゲノム (篠原班) <http://reprod-epigenome.biken.osaka-u.ac.jp/>
- ・ステムセルエイジング (岩間班) <http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/molmed/stemcellaging/>

日時：平成 29 年 6 月 7 日 (水) ～ 9 日 (金)

場所：紀州・白浜温泉むさし (<http://www.yado-musashi.co.jp/>)

※詳しくは 3 月末にクロマチン動構造ホームページでご案内いたします。

編集後記：長らくご無沙汰しておりましたが、ようやく 19 号を発行することができました。年末・年始の休みも、溜まっていた宿題を片付けるのに精一杯かつ体調不良で、結局年賀状を出しそびれてしまいました。この間、領域から多くの論文が発表されたため、今回はいつもより多目に紹介しています。また、昨年度採択された国際活動支援班のサポートにより、多くの国際活動が展開されました。本領域の残りもあと 1 年と少しですが、引き続きよろしく申し上げます。

HiKi

1. 成果紹介

- ① 胡桃坂領域代表らによる論文が、Science 誌に掲載されました。
- ② 佐渡らによる領域内共同研究による論文が、Development 誌に掲載されました。

2. 国際活動支援班の活動報告

- ① 海外研究者も参加するトレーニングコースの実施
- ② HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium

3. 若手の会からの活動報告

4. 学会報告

- ① EMBO workshop “Awakening of the Genome; maternal-to-zygotic transition”
- ② The 9th International Fission Yeast Meeting “Pombe2017”
- ③ The Pleiotropic Nuclear Envelope

5. 一般公開シンポジウム開催報告

1. 成果紹介

① 胡桃坂 (領域代表)、杉山 (公募研究)、河野 (計画研究代表)、大川 (計画研究代表)らによる領域内共同研究の論文が、Science 誌に掲載されました。

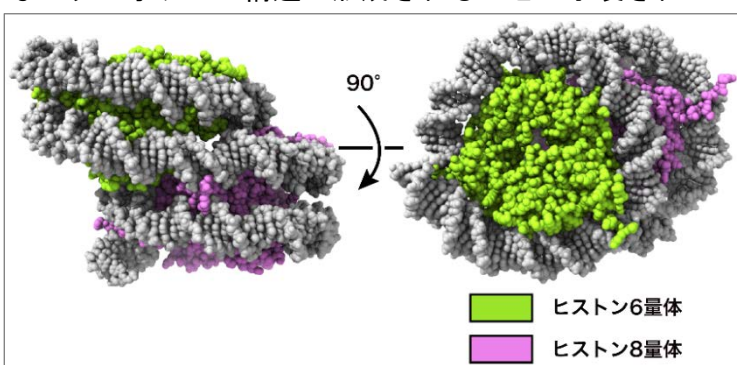
Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome.

Kato D, Osakabe A, Arimura Y, Mizukami Y, Horikoshi N, Saikusa K, Akashi S, Nishimura Y, Park SY, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Matsumoto A, Kono H, Inoue R, Sugiyama M, Kurumizaka H.

Science. 2017 Apr 14;356(6334):205-208. doi: 10.1126/science.aak9867.

<http://science.sciencemag.org/content/356/6334/205.long>

クロマチンの基盤構造であるヌクレオソームは、4種のヒストン (H2A、H2B、H3、H4) 各2分子ずつで構成されるヒストン8量体の周りにDNAが1.65回転巻きついた円盤状の構造体である。遺伝子発現の際などには、クロマチンリモデリング因子によって、生体内におけるヌクレオソームの形成部位の再配置が生じることが知られる。この際、再配置されたヌクレオソームが隣のヌクレオソームと衝突し、H2A、H2Bが3分子ずつと、H3、H4が4分子ずつからなるヒストンの14量体の周りにDNAが巻きついた特殊なヌクレオソーム構造が形成されることが示唆されていた。この複合体をオーバーラッピングダイヌクレオソームと呼んでいる。



一方で、この複合体の立体構造の詳細については、不明であった。本論文では、試験管内でオーバーラッピングダイヌクレオソームを再構成し、X線結晶構造解析の手法によって、3.14 Åの分解能でオーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造を明らかにした (図)。この構造中では、ヒストン6量体にDNAが巻きついたヘキサソームと、ヒス

トンの8量体にDNAが巻きついたオクタソームが重なり合い、ヒストン14量体にDNAが左巻きに3回転巻きついた特殊な立体構造を形成していることがわかった。また、この立体構造中では、2つのヌクレオソームユニットが向き合う面から、各1分子ずつのH2A、H2Bが解離することによって、2つのヌクレオソームユニットが重なり合うことが可能になっていた。さらに、ゲノム解析によって、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成部位を調べたところ、転写開始点の直下の領域で、オーバーラッピングダイヌクレオソームが形成されることを示唆する結果が得られた。

本論文によって、通常のヌクレオソーム（ヒストン8量体にDNAが巻きついたヌクレオソーム）とは異なる特殊なヌクレオソームの原子分解能での立体構造が世界で初めて明らかになった。この成果は、朝日新聞、日刊工業新聞、日経産業新聞、科学新聞などに掲載され、テレ朝 news で取り上げられました。

② 佐渡 (公募研究)、小布施 (計画研究代表)らによる領域内共同研究の論文が、Development 誌に掲載されました。

Defects in dosage compensation impact global gene regulation in the mouse trophoblast.

*Sakata Y, *Nagao K, Hoki Y, Sasaki H, Obuse C, Sado T.

Development. 2017 Aug 1;144(15):2784-2797. doi: 10.1242/dev.149138.

<http://dev.biologists.org/content/144/15/2784.long>

(* equally contributed)

ほ乳類のメスは胚発生の初期に2本あるX染色体のうち一方を不活性化することで、これを1本しか持たないオスとの間にあるX連鎖遺伝子量の差を補償している。典型的なエピジェネティック制御機構として知られるこのX染色体不活性化には、X連鎖のノンコーディングRNAであるXistが中心的な役割を果たす。Xist RNAには種間で保存された反復配列が複数存在する。そのうち5'領域に存在するAリピートは、Xist RNAが有する転写抑制機能に必須であることがES細胞を用いた解析から明らかにされている。しかし、これまで生体内での機能は評価されていなかった。今回我々は、Aリピートを含む5'領域を欠失した改変Xist RNAを発現するマウスを新たに作製し、胎盤組織におけるX染色体不活性化への影響をアレル特異的なRNA-seqによって解析した。

この改変RNAは、正常なXist RNA同様X染色体全体を覆うものの、大多数のX連鎖遺伝子の発現は抑制されておらず、Aリピートが生体内においても不活性化に必須の機能ドメインである事が、今回初めて明らかになった。しかし、一部のX連鎖遺伝子に関しては、Aリピートがなくても転写が抑制されており、この改変RNAが限定的ながら染色体の不活性化を引き起こす能力を持つことがわかった(図)。さらに、X染色体不活性化の破綻がもたらすX連鎖遺伝子の発現異常は常染色体連鎖遺伝子発現にも大きく影響する事がトランスクリプトームの詳細な解析から明らかとなった。すなわち、雌の体細胞における遺伝子量補償機構は、雌雄間におけるX連鎖遺伝子量の差を補償するのみならず、ゲノム全体に及ぶ、より広範な遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。これは、X染色体不活性化の生物学的意義を考えるうえでも極めて興味深いものと言える。

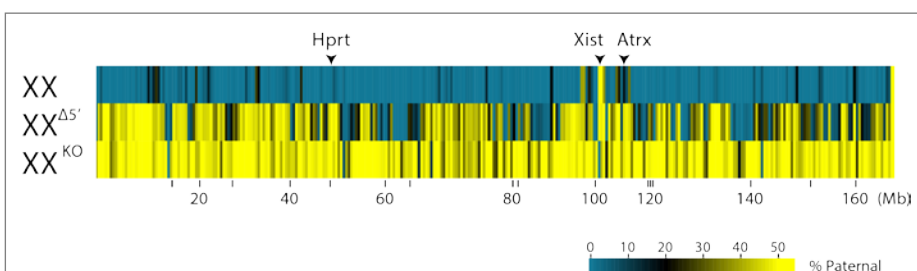


図. アレル特異的 RNA-seq による X 染色体ワイドな発現解析

改変 Xist RNA に覆われた X 染色体 (Xp) における X 連鎖遺伝子の発現頻度をヒートマップで表した。青は Xp からの転写がなく、黄色になるほど Xp からの転写が認められ、不活性化が破綻している事を示す。

2. 国際活動支援班の活動報告

① 海外研究者も参加するトレーニングコースの実施2

昨年度、原口（計画研究代表）が開発した生細胞高分解能イメージング法（Live CLEM 法）を修得するために来日したシカゴ大（米国）の Aaron P. Turkewitz 教授が再来日し、共同研究を目的とした「生細胞・核構造イメージングトレーニングコース」に参加した（2017年5月20日-29日）。今回の来日では、Turkewitz 教授だけでなく、大学院生の Daniela Sparvoli も参加し、実習を行った（図1左）。

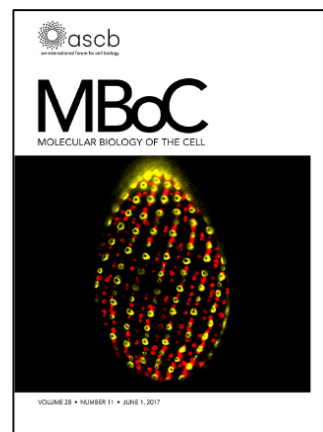


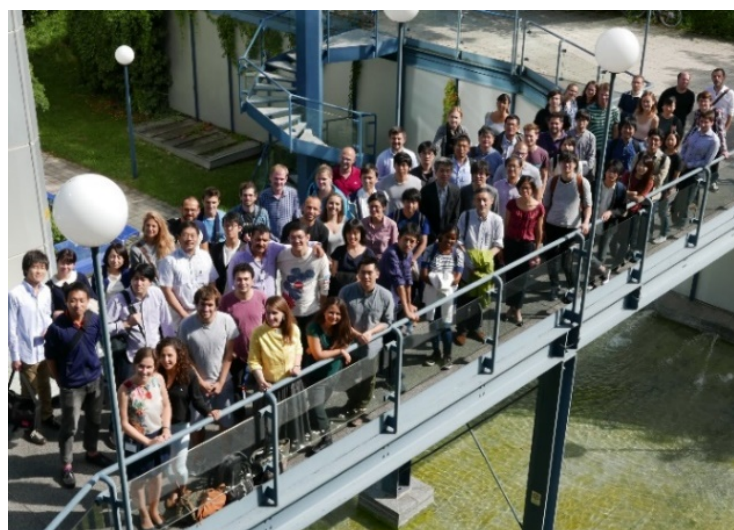
図1 実習風景（左）とジャーナル表紙（右）

Live CLEM 法は、蛍光顕微鏡法と電子顕微鏡法を組み合わせたイメージング法であり、生きた細胞における分子ダイナミクスを、ナノメートルオーダーの細胞構造との関係で解析することができる優れた方法である。テトラヒメナ細胞は水中を自由に泳ぎ回るために、生きたままの状態では細胞を観察することが困難であったが、原口らのグループはアガロースに包埋する方法で問題を解決し、生細胞観察および Live CLEM 観察することに成功している（Iwamoto et al, 2015）。Turkewitz 教授は、昨年度のトレーニングコースに参加して、このイメージング技術を習得した。この共同研究の成果は、Mol Biol Cell, 2017年6月号で報告した（Kaur et al., 2017; 表紙に採択、図1右）。今回の来日では、技術の習得はもちろんのこと、それに加えて研究内容および問題点に踏み込んで議論を重ねることができた。今回の来日で多くのヒントが得られており、今後の展開を考える上で大きな進展をもたらした。（その後、この関連の論文が Current Biology に掲載されることになりました）

（情報通信研究機構 未来 ICT 研究所 原口 徳子）

② HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium

2017年9月4-5日、ヘルムホルツセンターミュンヘン（Helmholtz Zentrum München）の Epigenetics and Stem Cells 研究所で開催された”HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium”に参加しました。この会は Maria Elena Torres-Padilla 博士（Epigenetics and Stem Cells 研究所）、本学術領域の木村宏（東工大）と山縣一夫（近畿大）がオーガナイザーとして開催した合同シンポジウムです。



本領域からは木村・山縣に加え、胡桃坂仁志（早稲田大）、大川恭行（九州大）、小布施力史（大阪大）、佐渡敬（近畿大）、石内崇士（九州大）、宮本圭（近畿大）、河野秀俊（量子科学技術研究開発機構）、原田昌彦（東北大）、斉藤典子（がん研究所）と各研究室の学生および研究員が合計27人、ヘルムホルツセンターから Maria Elena Torres-Padilla 博士と Robert Schneider 博士を始め7人のPIとその他研究員が合計19人の、総勢46人が発表しました。参加者は60人以上いて、会場は熱気に満ち溢れていました。演題数は口頭発表が20題、ポスター

発表が 27 題で構成され、口頭発表ではクロマチン構造や non-coding RNA、ヒストン修飾、エピジェネティクスなど、幅広い分野における最新の知見から技術開発まで、第一線で活躍されている研究者の発表が行われました。中でも興味深かった研究を 2 つ紹介致します。Maria Elena Torres-Padilla 博士は、これまで不明であったマウス受精卵での特定のレトロトランスポゾン活性化の役割を解明するため、エピゲノム編集により、受精直後におけるレトロトランスポゾン LINE1 転写活性がクロマチンの脱凝集・再凝集を促進し、その後の発達プロセスに寄与していることを明らかにしました。斉藤典子博士は、乳がんの再発過程において、エストロゲン受容体の ESR1 遺伝子活性化に、新規の non-coding RNA「エレノア」が関与しているという、その作用機序を発見しました。エレノアの発現量を操作することで、将来的に新たな診断法や治療法開発、創薬研究の貢献に役立つと期待されています。どの講演もオーディエンス側からの質問が絶えず、活発な議論が交わされました。ポスター発表は両日も 2 時間ほど設けられており、研究者どうしが直接近い距離で互いの研究について意見交換をしていました。海外研究者の斬新かつ独創的な発想および質問・的確なアドバイス、研究に対する熱心な姿勢には非常に感銘を受け、見習うべき姿がたくさんありました。私は初めて海外の学会でポスター発表をさせていただき、英語で国外の研究者と積極的に意見交換を行う機会を得ることができました。今回のポスター発表を通じて、私が行っている研究の重要性を改めて考えるだけでなく、頂いた指摘をもとに研究をどのように発展させるかを考えました。また、データから得られる結論は何かを常に考えながら研究を行うことの重要性、積極的な姿勢や謙虚さ、コミュニケーション力の大切さについて学ぶ機会がありました。翌日に再び研究所を訪問し、施設内見学および研究ディスカッションを行いました。見学では Andreas Ettinger 博士と Adam Burton 博士にマニピュレーターおよび live-cell imaging 機器の説明をしていただきました。その後、Máté Borsos さんという学生にディスカッションしていただきました。研究をさらに発展させることに加え、ディスカッションができるレベルまで英語を上達させる必要があると改めて実感しました。今回できた繋がりを今後も継続していきたいです。

(近畿大・山縣研 鈴木由華)



3. 若手の会からの活動報告

2017 年 6 月 7-9 日に「動的クロマチン構造と機能」「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」「ステムセルエイジングから解明する疾患原理」の 3 領域合同若手勉強会が和歌山県西牟婁郡白浜町の紀州・白浜温泉 むさしで開催されました。参加者が総勢 93 名と大規模な勉強会になりました。発表は 52 題が口頭&ポスター、11 題がポスターのみで行われ、活発な議論が交わされました。全演題が終了した後に参加者の投票によって優秀発表賞が決定されました。今回は京極博久(理化学研究所/生殖・北島



写真 1. 口頭発表の様子

班)、佐田亜衣子(筑波大学/STEMセル・佐田班)、藤田理紗(早稲田大学/クロマチン・胡桃坂班)の3名が受賞しました。

企画1では合同若手勉強会に参加した38研究室の紹介が行われました。3分間という短い時間でしたが、研究室の立地や研究内容などそれぞれの特色や雰囲気を知ることができました。企画2では企画1で興味を持った研究室との自由討論会を行いました。企画1の最後に行ったアンケート結果を元にして参加者は9つのテーブルにそれぞれ座り、その中で交流会をしました。若手研究者同士や研究代表者と研究の話はもちろん、将来の話や悩みなどを夜遅くまで話しました。2日目に行った自由討論では他の所属機関の人と交流を深めるために宿周辺の観光地を訪れました。議論は毎日夜遅くまで続き、日付が変わる頃まで会場に残っている方も多数いました。また、それでも時間が足りずに、食事中や入浴中、部屋に戻ってから話し込んでいた様子も見られました。本会議は3領域合同で行われたことにより、それぞれの分野の背景が色濃くでていた発表が多い印象でした。しかし、篠原領域長の言葉にあったようにやや、エピジェネティクスのメカニズムに偏った印象があり、今後は若手ならではの斬新な発想が求められることを考えさせられる会議となりました。



写真2. 優秀発表賞受賞者(右から3人)



写真3. 企画1の様子

(近畿大学・山縣研 波多野裕、藤村雪乃)

4. 学会報告

① EMBO workshop “Awakening of the Genome; maternal-to-zygotic transition”



2017年4月23-26日、ドイツ・ドレスデンで行われたEMBO workshop “Awakening of the Genome; maternal-to-zygotic transition”に参加しました。ドレスデンにあるマックスプランク研究所(MPI-CBG)のNadine Vastenhouwが胚ゲノム活性化(Zygotic genome activation; ZGA)関連の研究者たちと初めて開いたミーティングでした。卵が受精した後に、胚ゲノムが活性化されるタイミングが何によって制御されるのか、いくつかの要因はみつっていますが、全貌はまだ明らかになっていません。対象とするシステムは、マウス、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエの他、アフリカツメガエル、線虫、ウニ、シロイヌナズナ、

ヒト、と多岐にわたり、受精前後の卵の話をも3日間みっちり聞きました。講演者は、2人のノーベル賞受賞者(John GurdonとEric Wieschaus)のほか、胚ゲノムの転写制御について最前線で活躍する研究者たちが各国から集いました。日本からの参加者は私一人でしたが、Nadineのグループと2年ほど前から共同研究をしていて、会場であるMPI-CBGは一度訪問したことがあったので、それほど心細くはありませんでした。主なトピックは母性由来mRNAの分解の制御、胚ゲノムからの転写開始機構で、特に後者の方はクロマチンレベルでの解釈が不可欠となっている状況がよくわかりました。手法も多様で、生化学やRNA-seq、超解像顕微鏡解析のほか、多くの演題でHi-C、ChIP-seq、モデリング等の解析が行われていました。口頭発表もポスターも、未発表データが多く、議論が白熱する場面もありました。私は胚ゲノム活

性化におけるヒストン修飾動態の発表をしました。ライブイメージングの動画を色々な方に見てもらいたかったので、ショートトークに選ばれたのは本当にうれしかったです。質問をたくさん受け、上手には答えられませんでした。これから論文を書こうとしているので大変勉強になりました。

ドレスデンは横浜より10度ほど気温が低く、ショートトークの緊張感もあり会期中はずっと気を引き締めていました。最終日に発表が終わりようやく顔を上げて旧東ドイツの渋い街並みを眺める余裕ができました。また少しずつ研鑽を積んで、“Nice talk!”と言われる発表をしたいです。

(東京工業大学・木村研 佐藤優子)

② The 9th International Fission Yeast Meeting “Pombe2017”

2017年5月14-19日の日程で、“Pombe2017”（オーガナイザー: Gordon Chua, Dallon Young, Paul Young）が開催されました。場所はカナダのバンフで、カナディアン・ロッキーの国立公園内にある町です。この町にあるバンフセンターという宿舎付きの施設で会議がおこなわれました（写真1）。今回の会議の時期は気候としてはとても寒く、昼間でも時折雪がちらつくほどでした。この会議は、分裂酵母を研究する研究者が世界中から集まり、2年に一度開催される国際会議です。（ちなみに前回は、神戸で開催され、本領域の公募研究代表者である平岡がオーガナイザーを務めました）。今回の会議では、14日の夜から19日朝まで、15の口頭発表のセッションと2つのポスター発表



写真1（左）カナディアンロッキーに囲まれたバンフ。中央下の建物群が会場のバンフセンター。左下が市街地。（右上）会議施設で撮影した関係者のスナップ。（右下）会場周辺によく出没した野生のシカ。数頭が毎日出没し参加者を和ませた。現地では elk と呼ばれている。撮影（すべて）：平野泰弘（平岡研）

のセッションが開かれ、計168演題の発表が行われました。参加者は183名で、カナダを始め欧米、中東、アジアの多数の国から、各分野の第一線で活躍する研究者や若手研究者が参加しました。日本からも約30名が参加しています。本領域からは、計画研究分担者の浅川をはじめ、計画研究代表の原口、公募研究代表者の平岡、加納、川島、廣田のラボから代表者またはラボメンバーが参加しました。今回の会議では、分裂酵母のコミュニティにおいて伝統的に盛んなクロマチンや細胞周期についての最新の研究成果を多く目にすることができました。また、分裂酵母の会議ですので、この細胞を用いた細胞骨格・代謝・

シグナル伝達など、他分野の最新の知見にも触れることができました。今回の会議では“Tools & Techniques”と名付けられたワークショップがあり、新しい手法や定番と思われる手技についても安く速く確実に結果が出るような工夫が紹介され、参考になりました。このような情報共有は、参加者が同じ生物を扱うこの会議ならではのものだと思います。次回は2019年7月にスペイン・バルセロナで開催されることも発表されました。

ところで、今回の会議では参加者のうち私を含む14名が初日の夜にエレベーターに閉じ込められるという事件が起きました。一同は初日の発表が終わった夜、宿



写真2（左）扉がついに開いたところ。（右）救出された参加者。左側が筆者。撮影：Hui-Ju Yang（平岡研）。

泊施設に戻ってエレベーターに乗ったのですが、いつまで経っても目的の階に到着しません。閉じ込められたうちの1人である地元の学生さんがインターホンを通して連絡を取り、スマホでもレスキューに直接連絡してくれました。ところが、助けを待つ間も室温は上がり続けます。中にいた妊婦さん（この人も参加者）も不調を訴えます。一同で励まし合いながら、天井を押し破ろうとしたり、扉を少しこじあけて空気を入れ換えたり、できる限りのことはしましたが、結局は救出を待つしかありませんでした。エレベーターが止まってからおよそ45分後、ついに14名は救出されるのですが（写真2）、この出来事のおかげで今回の会議はより一層印象深いものになったのです。（大阪大学 浅川東彦）

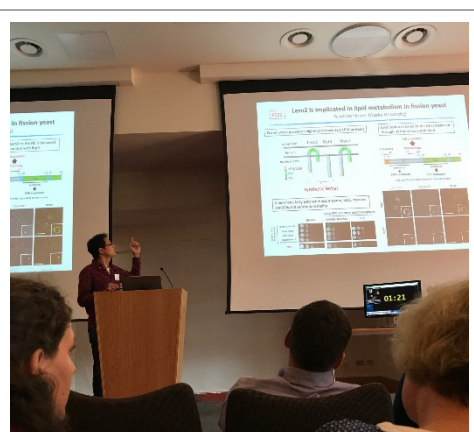
③ The Pleiotropic Nuclear Envelope

2017年8月22-25日にスコットランドの首都エジンバラで開催された The Pleiotropic Nuclear Envelope（オーガナイザー：Eric Schirmer、Sue Shackleton、Edgar Gomes の3氏）に参加しました。エジンバラはエジンバラ城を中心に中世から発展した古都で、今でもイギリス王室が避暑で滞在するほど夏でも涼しく、猛暑続きの日本から訪れると季節が一気に進んでしまった印象を受けます。例年8月は Edinburgh International Festival が開催されていて（ほぼ1ヶ月続くお祭りです！）、そこかしこにパフォーマーが繰り出し、メインストリートである Royal Mile は歩くのが困難なほど活気に溢れています。

ミーティングタイトルの“Pleiotropic”はあまり聞き慣れない単語（筆者雑感）ですが、ライフサイエンス辞書によると「多面的な、多面発現性の」という日本語訳となっています。すなわち、核膜に関連した研究であれば何でもありの、核膜を愛し（これは間違いのない）、核膜に愛された研究者（ちょっと違うかも）が一堂に会する空前絶後のミーティングです。参加者は約100名で、地元イングランドやアメリカを中心に、フランス、ノルウェー、ドイツ、イタリア、スウェーデンなど欧米各国と日本から核膜研究の第一線で活躍する研究者が参加しました。日本からは筆者と原口徳子計画研究代表（情報通信研究機構）、平岡泰公募研究代表（大阪大学）の3名が参加しましたが、先に「と日本」と述べたようにアジア全体で見ても参加者はこの3名しかおらず、欧米諸国の関心の高さとの温度差を感じずにはいられませんでした。ミーティングは22日の Susan Gasser 氏の keynote talk から始まり、8つのセッションに分けられた34題の口頭発表と50題のポスター発表が行われました。現在この分野では、ラミンや核膜タンパク質に起因する核膜病の基礎・臨床研究、核膜による遺伝子発現制御を介した細胞分化運命決定機構の解析、核膜を介した化学的（核膜孔複合体の物質通過）および機械的（細胞骨格とラミナをつなぐ LINC 複合体による力学的刺激）情報伝達の分子メカニズムの解析がトレンドとなっており、いずれも核膜タンパク質によるクロマチンの機能制御が研究の



活気に溢れた Royal Mile



ショートトークでの発表の様子
（原口氏提供）

柱の1つとなっています。Susan Gasser、Eric Schirmer、Wendy Bickmore、Philippe Collas 各氏らによって精力的に進められている、「どの核膜タンパク質がいつ、どの細胞で発現し、それがどのようなクロマチン因子と時空間的に相互作用することで細胞の運命を決定付けるか」という問いは未だ重要であり続けており、今後も研究が必要な部分であると感じました。一方で、これまでほとんど研究されてこなかった脂質膜としての核膜（ここでの核膜は nuclear envelope ではなく nuclear membrane の意）に関するセッションも設けられるなど、核膜研究の新展開を予感させる、まさしく pleiotropic な議論が活発に行われました。原口氏の発表はトークに選ばれ、核膜形成に働く因子について人工ビースを使った最新の成

果を発表しましたが、手法の斬新さに多くの注目が集まりました。筆者はポスター発表とショートトーク（ポスターの中から選ばれ、2分のプレビューを行う）を行いました。今回の発表が核膜タンパク質と脂質の関連を示唆するものであったためか、多くの方にポスターを訪れてもらえ、自身の研究を大きく展開させるような大変有益な情報交換をすることができました。論文で読んで内容は知っていても、直接議論するとやはり熱量が違います。鉄は熱いうちに打てということで、ここで筆を置き、膨らんだ妄想を確かめるべく実験に戻ります。

最後に、このミーティングへの参加は国際活動支援班にサポート頂きました。ご快諾いただいた胡桃坂代表に感謝を申し上げます。
（大阪大学・平岡研 平野泰弘）

5. 一般公開シンポジウム開催報告

遺伝子研究の最前線
ミクロの世界に秘められた生命の謎にせまる

新学術領域「動的クロマチン構造と機能」
一般公開シンポジウム
平成30年 1月8日(月) 13:00~17:30 (12:00開場)

山縣 一夫 開会の挨拶—イントロダクション
近畿大学 生物理工学部 准教授

第一部 13:15~
原口 徳子 「人工核を造って細胞核を知る」
国立研究開発法人 情報通信研究機構 未来ICT研究所 主任研究員
米田 悦啓 「核と細胞質の対話を担う分子から遺伝子の機能を探る」
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 理事長
木村 宏 「生きた細胞で見る遺伝子の読み取り」
東京工業大学 科学技術創成研究院 教授

第二部 14:40~
大川 燕行 「ゲノムから遺伝子を選ばれる仕組み」
九州大学 生体防御医学研究所 教授
徳永 万喜洋 「1分子超解像顕微鏡でわかってきたクロマチンのダイナミックな姿」
東京工業大学 生命理工学部 教授
小布施 力史 「遺伝子の傷をどうやって直すか」
大阪大学 大学院 理学研究科 生物科学専攻 教授

第三部 16:05~
斉藤 典子 「乳がん細胞核のかたち」
公益財団法人 がん研究会がん研究所 部長
河野 秀俊 「スーパーコンピュータでみる分子の形と動き」
国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 グループリーダー
胡桃坂 仁志 「形からみる遺伝子のはたらき」
早稲田大学 理工学術院 教授

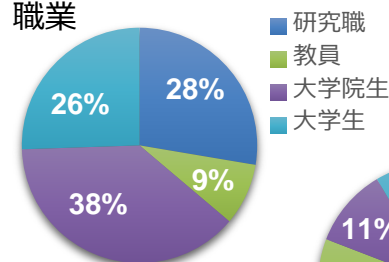
参加無料 申込不要 どなたでもご自由にご参加ください！

早稲田大学 早稲田キャンパス 国際会議場 井深大記念ホール
〒169-0051 東京都新宿区西早稲田1丁目20-14
東京メトロ東西線 早稲田駅より徒歩10分、都電荒川線早稲田駅より徒歩5分
都営バス高田馬場駅～西早稲田 バス停より徒歩5分

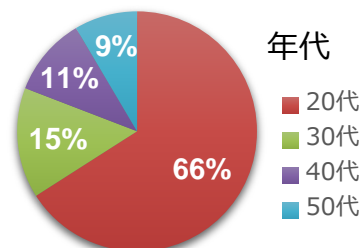
主催：文部科学省科学研究費補助金 新学術領域「動的クロマチン構造と機能」
お問い合わせ先：早稲田大学 胡桃坂仁志(kurumizaka@waseda.jp)
公益財団法人 がん研究会 立和名博昭(hiroaki.tachiwano@jcr.or.jp)

1月8日、早稲田大学国際会議場井深記念ホールにて、一般公開シンポジウム第4弾「遺伝子研究の最前線-ミクロの世界に秘められた生命の謎にせまる-」を開催しました。天候の悪いなか、たくさんの方々に足を運んでいただき、活発な議論が行われました。アンケートの結果、おおむね好評でした。

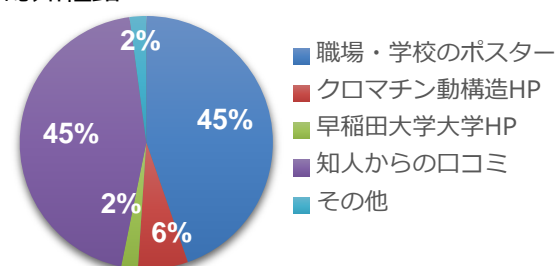
職業



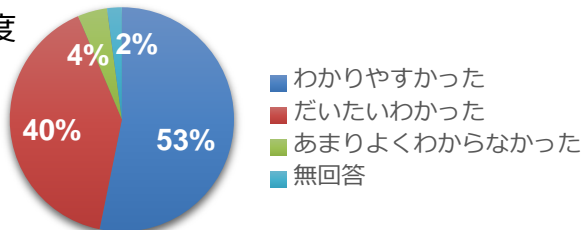
年代



認知経路



理解度



次回参加希望



編集後記：長い間発行が滞ってしまい、申し訳ありませんでした。業務に追われる日々が続いております。そうこうしているうちに、新学術領域「クロマチン動構造」の終了も近づいてきました。あっという間に4年半が過ぎましたが、多くの論文や共同研究が生まれ、非常に成果の挙がった領域だったと思います。ニュースレターは3月にもう一度発行予定ですが、4月以降にも成果をまとめた最終号の発行を予定しています。

HiKi