

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890023

研究課題名(和文) 高次クロマチンにおける相同組換え反応の解析

研究課題名(英文) The homologous recombination reaction in chromatin

研究代表者

町田 晋一 (Machida, Shinichi)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：50732195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：相同組換えは、DNA二重鎖切断損傷の主要な修復経路であり、さらには減数分裂期における遺伝的多様性の創出に機能する。相同組換えは、高次に折り畳まれたクロマチン構造上で行われるが、クロマチン構造と相同組換えの関係の詳細は明らかになっていない。本研究では、減数分裂期に発現するリンカーヒストンバリエントが、体細胞型のH1バリエントと比較して、緩んだクロマチンを形成し、相同組換えの進行に機能することを明らかにした。さらに、構造生物学的および生化学的解析により、DNA二重鎖切断損傷応答に機能するヒストンのモノユビキチン化修飾によるクロマチン構造変換機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：Homologous recombination functions in mitotic DNA double-strand break repair and meiotic genetic recombination. In eukaryotic nucleus, homologous recombination occurs in higher ordered chromatin. However, how the chromatin architecture involved in homologous recombination reaction has not been elucidated. In this study, we revealed that the testis-specific H1 variant H1T forms less compacted chromatin and weakly inhibited the homologous recombination reaction as compared to the representative H1 variant. In addition, we clarify how the mono-ubiquitination of histone, which is required for DNA double-strand break repair, regulates the chromatin structure.

研究分野：生化学

キーワード：クロマチン 相同組換え リンカーヒストン ヒストン修飾 RAD51 RAD54

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム DNA はクロマチン構造を形成することで、核内に収納されている。クロマチンは、ヌクレオソームと呼ばれる、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 からなるヒストン 8 量体の周りに DNA が巻き付いた円盤状の構造体を基本構成単位としている。さらに、細胞核内に存在する大部分のヌクレオソームには、リンカーヒストンである H1 が結合し、高次に折り畳まれたクロマチン構造が形成されている。細胞内のクロマチンは、日常的に細胞の機能障害の原因となる DNA 損傷を受けている。特に、遺伝情報を失い易い DNA 二重鎖切断損傷は、正確かつ速やかに修復されなくてはならない。その DNA 二重鎖切断損傷の主要な修復経路として、相同組換えを介した修復経路が知られている。相同組換えは、損傷を受けた領域と相同な配列を無傷の DNA 鎖から検索し、対合(相同的対合反応)させることで、損傷領域を正確に修復する機構である。RAD51 は相同組換えにおいて中心的な役割を果たすタンパク質であり、相同鎖検索及び相同的対合を触媒する。これまでの RAD51 依存的な相同組換え反応の解析は、クロマチンを形成していない naked DNA を用いた生化学的手法により行われてきた。そのため、高次に折り畳まれたクロマチン構造中での相同組換えの反応機構の詳細は明らかになっていない。よって、生体内での相同組換えを理解するには、高次のクロマチン構造と相同組換えの関係を明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高次クロマチン構造上での相同組換え反応機構を明らかにすることである。クロマチンの高次構造を制御すると要因して、ヒストンバリエーションやヒストンの翻訳後修飾が知られている。しかし、ヒストンバリエーション及びヒストン修飾体を含む多様なクロマチンの高次構造が相同組換えに及ぼす影響は明らかになっていない。そこで、本研究では、これら要因と相同組換えの関係を解明することで、生体内で実際に引き起こされる相同組換えの反応機構を理解することを目指した。

3. 研究の方法

ヒストンバリエーション及びヒストン修飾体が形成する多様なクロマチンの高次構造が相同組換え反応に及ぼす影響を解析するために、ヒストンバリエーション及びヒストン修飾体を含むクロマチンを試験管内で再構成し、生化学的および構造生物学的な解析を行った。ヒストンバリエーションについては、ヒトで 11 種類ものバリエーションが報告されているリンカーヒストン H1 のバリエーションに着目した。特に、精母細胞で高発現している H1T および体細胞型の H1.0 および H1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5 をリコンビナントタンパク質と

して精製し、これら H1 を含むクロマチンを再構成した。さらに、再構成したクロマチンを基質として、相同的対合反応への影響を解析した。並行して、H1 バリエーションを含むクロマチンの高次構造を分析超遠心により解析した。ヒストン翻訳後修飾に関しては、ヒストンに約 8.5 kDa ものタンパク質が付加されるモノユビキチン化修飾に着目した。ユビキチン化ヒストンは、ジスルフィド結合により、特定のヒストンのアミノ酸残基にユビキチンを化学的に付加することで合成した。さらに、合成したユビキチン化ヒストンを含むモノヌクレオソームを試験管内で再構成し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により、結晶化を行った。さらに、得られた単結晶を用いて、大型放射光施設 SPring-8 および Photon Factory で X 線回折データを取得し、ユビキチン化ヌクレオソームの立体構造を決定した。並行して、ユビキチン化ヒストンを含むクロマチンの生化学的解析を行い、その物理化学的性質を解析した。

4. 研究成果

(1) リンカーヒストンバリエーション

精母細胞で高発現している H1T および体細胞型の H1.0 および H1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5 をリコンビナントタンパク質として高純度に精製した。さらに、これら H1 バリエーションを含む高次クロマチンを試験管内で再構成し、試験管内相同組換え反応解析系により、H1 バリエーションが相同組換えに及ぼす影響を解析した。その結果、H1T は体細胞型の H1 バリエーションと比較して、相同組換え反応の抑制効果が著しく弱いことを明らかにした。さらに、H1T を含む再構成クロマチンを用いて、分析超遠心法によるクロマチン高次構造解析を行った。その結果、H1T を含むクロマチンは、体細胞型の H1.2 と比較して、緩んだクロマチンを形成することが明らかになった。以上の研究結果から、H1T は折り畳みの程度の低いクロマチン構造を形成し、相同組換えの進行に機能することが明らかになった。

(2) ユビキチン化ヒストン

DNA 二重鎖切断損傷修復に関与するヒストンのユビキチン化によるクロマチン構造制御機構の解析を行った。モノユビキチン化ヒストンは、ジスルフィド結合により、特定のヒストンのアミノ酸残基にユビキチンを化学的に付加することで合成した。特に、DNA 二重鎖切断損傷修復に関与するヒストン H2B の 120 番目のリジンのモノユビキチン化(H2Bub120)に着目し、試験管内にて合成した。並行して、転写活性化に関与することが知られている H4 の 31 番目のリジンのモノユビキチン化(H4ub31)も合成した。これらユビキチン化ヒストンを含むヌクレオソームを、塩透析法により、試験管内で再構成した。再構成したヌクレオソームを用いて、八

ンギングドロップ蒸気拡散法により、結晶化を行った。H2Bub120 もしくは H4ub31 を含むヌクレオソームでは、構造解析可能な良質な結晶を得ることができなかった。そこで、H2Bub120 および H4ub31 を含むヌクレオソームを再構成し、結晶化を行ったところ、良質な単結晶を得ることに成功した。さらに、得られた単結晶を用いて、大型放射光施設 SPring-8 および Photon Factory で X 線回折データを取得し、ユビキチン化ヌクレオソームの立体構造を 3.3 Å の分解能で決定した。決定したユビキチン化ヌクレオソームの立体構造中では、ユビキチンの電子密度は観察されなかった。しかし、隣り合ったヌクレオソーム間にユビキチンが存在するスペースが存在した。よって、ヒストンに結合したユビキチンはヌクレオソーム間のスペースでフレキシブルに運動し、ヌクレオソーム間の相互作用を抑制することで、クロマチンの高次構造形成を抑制することが示唆された。そこで、ユビキチン化ヒストンを含むポリヌクレオソームを再構成し、分析超遠心法によりクロマチンの形態解析を行った。その結果、H2Bub120 もしくは H4ub31 を含むポリヌクレオソームは、クロマチンの高次構造形成を阻害することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Machida, S., Sekine, S., Nishiyama, Y., Horikoshi, N., Kurumizaka, H., Structural and biochemical analyses of monoubiquitinated human histones H2B and H4. *Open Biology*, Royal Society Publishing, 査読有, in press (2016)

Kobayashi, W., Takaku, M., Machida, S., Tachiwana, H., Maehara, K., Ohkawa, Y., and Kurumizaka, H. Chromatin architecture may dictate the target site for DMC1, but not for RAD51, during homologous pairing. *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, 査読有, Vol. 6, Article number: 24228 (2016), doi:10.1038/srep24228

Kujirai, T., Horikoshi, N., Sato, K., Maehara, K., Machida, S., Osakabe, A., Kimura, H., Ohkawa, Y. and Kurumizaka, H. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press, 査読有, gkw202 (2016), doi:10.1093/nar/gkw202

Takaku M., Grimm S.A. Shimbo T., Perera L., Menafra R., Stunnenberg H.G., Archer T.K., Machida S., Kurumizaka H. and Wade

P.A. GATA3-dependent cellular reprogramming requires activation-domain dependent recruitment of a chromatin remodeler. *Genome Biology*, Springer Nature, 査読有, Vol 17, 36 (2016), doi:10.1186/s13059-016-0897-0.

Machida S., Hayashida R., Takaku M., Fukuto A., Sun J., Kinomura A., Tashiro S. and Kurumizaka H. Relaxed Chromatin Formation and Weak Suppression of Homologous Pairing by the Testis-Specific Linker Histone H1T. *Biochemistry*, American Chemical Society, 査読有, Vol. 55, pp637-646 (2016), doi:10.1021/acs.biochem.5b01126.

Klein B.J., Muthurajan U.M., Lalonde M.E., Gibson M.D., Andrews F.H., Hepler M., Machida S., Yan K., Kurumizaka H., Poirier M. G., Côté J., Luger K. and Kutateladze T.G. Bivalent interaction of the PZP domain of BRPF1 with the nucleosome impacts chromatin dynamics and acetylation. *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press, 査読有, Vol. 44, pp472-484. (2015)

Okimoto S., Sun J., Fukuto A., Horikoshi Y., Matsuda S., Matsuda T., Ikura T., Kurumizaka H., Miyamoto Y., Oka M., Yoneda Y., Kiuchi Y., and Tashiro S. hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair. *Genes to Cells*, Wiley-Blackwell, 査読有, Vol. 20, pp681-694 (2015), doi:10.1093/nar/gkv1321

Kobayashi W., Sekine S, Machida S., and Kurumizaka H. Green fluorescent protein fused to the C-terminal end of RAD51 specifically interferes with secondary DNA binding by the RAD51-ssDNA complex. *Genes & Genetic Systems*, Genetics Society of Japan, 査読有, Vol. 89, pp169-179 (2014), doi:10.1266/ggs.89.169.

Nishibuchi G., Machida S., Osakabe A., Murakoshi H., Hiragami-Hamada K., Nakagawa R., Fischle W., Nishimura Y., Kurumizaka H., Tagami H., and Nakayama J. N-terminal phosphorylation of HP1 increases its nucleosome-binding specificity. *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press, 査読有, Vol. 42, pp12498-12511. (2014), doi:10.1093/nar/gku995

[学会発表](計 6 件)

町田晋一, 林田亮太, 高久誉大, 福戸敦

彦, 孫継英, 木野村愛子, 田代聡, 胡桃坂仁志, 精巢特異的リンカーヒストンバリエント H1T による高次クロマチン構造形成と相同組換え反応への影響, 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, 宮城・松島, 2016 年 1 月

Machida S., Nishiyama Y., and Kurumizaka H. The biochemical analyses of the chromatin containing mono-ubiquitinated nucleosomes, Chromatin Structure, Dynamics, and Function, Awaji, Japan, October 2015

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. Nap1 is required for the homologous recombination reaction in higher-order chromatin containing histone H1, THE 4D NUCLEOME, Hiroshima, Japan, December 2014

町田晋一, 高久誉大, 井倉正枝, 孫継英, 鈴木秀和, 小林航, 木野村愛子, 越阪部晃永, 立和名博昭, 堀越保則, 福戸敦彦, 松田涼, 浦聖恵, 田代聡, 井倉毅, 胡桃坂仁志, Nap1 は高次クロマチンでの相同組換えを促進する, 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・宮島, 2014 年 12 月

町田晋一, 林田亮太, 加藤大貴, 越阪部晃永, 小林航, 胡桃坂仁志, リンカーヒストンバリエント H1T の相同組換えにおける機能, 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014 年 10 月

Machida S., Hayashida R., and Kurumizaka H. Biochemical analyses of the RAD51-mediated homologous pairing in chromatin containing the linker histone variant, H1T, 3R Symposium, Gotenba, Japan, November 2014

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
該当なし

取得状況(計 0 件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
胡桃坂研究室ホームページ :

<http://www.eb.waseda.ac.jp/kurumizaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
町田 晋一 (Machida, Shinichi)
早稲田大学 理工学術院 助教
研究者番号 : 50732195

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし