

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 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：2015～2016

課題番号：15H06691

研究課題名(和文) ヒストンバリエントH2A.Bのヒストン自己交換反応による精子核形成機構解析

研究課題名(英文) Project for revealing the mechanism of the histone exchange activity of testis specific histone variant H2A.B.

研究代表者

有村 泰宏 (ARMURA, Yasuhiro)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：80754697

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)：本課題の目的は、精巣特異的に発現するヒストンバリエントH2A.Bのヒストン自己交換反応のメカニズムと生物学的意義を解明することである。研究代表者は、H2A.Bを含むヌクレオソーム中のヒストンH2A.B-H2B複合体が、自発的に他のヒストン複合体と置き換わる“ヒストン自己交換反応”を発見していた。本課題では、生化学的、細胞生物学および構造生物学的解析を進めた。生化学的解析によって、ヒストン交換反応を担うドメインを同定した。続けて、このドメインが細胞内で果たす役割を解析した。さらに、X線結晶構造解析、X線小角散乱解析を推進し、ヒストン交換反応の中間体の構造情報を得た。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to reveal the mechanism of the histone exchange activity of testis specific histone variant H2A.B. Previously, I found that the H2A.B-H2B dimers are efficiently exchanged with the canonical H2A-H2B dimers within the nucleosome. In this project, I studied the mechanism by which histone H2A.B-H2B dimers are exchanged with the canonical H2A-H2B dimers. To do so, biochemical, structural, and cell biological analyses were performed. In biochemical analysis, the domain responsible for the histone exchange activity of H2A.B was determined by the swapping mutational analysis. To reveal the function of this domain in cells, fluorescence recovery after photobleaching assay was performed using cells expressing GFP-tagged H2A.B. I obtained structural information for the exchange-intermediate nucleosomes containing H2A.B by X-ray crystallography and small angle X-ray scattering methods.

研究分野：構造生物学

キーワード：クロマチン エピジェネティクス ヌクレオソーム ヒストン H2A.B

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞核内において、ゲノム DNA 上には“ヌクレオソーム”が数珠状に繰り返し形成されている。ヌクレオソームは、ヒストンタンパク質 8 量体に DNA が 1.65 回転巻き付いた構造であり、ヒストン 8 量体は 4 種類のヒストン (H2A、H2B、H3 および H4) 各 2 分子ずつで構成される。H2A、H2B、H3 は、ヒストンバリエーションとよばれる、独立した遺伝子座にコードされたアミノ酸配列の類似したタンパク質を数種ずつ有する。ヒストンバリエーションやヒストン翻訳後修飾などの存在により、ゲノム DNA 上には多種多様なヌクレオソームが形成されている。これらのヌクレオソームは、それぞれ構造や物理的安定性、結合可能なタンパク質などが異なると考えられており、転写・修復などのゲノム DNA 上で起こるイベントの多くが、このような性質の異なる多種多様なヌクレオソームを使い分けることで適切に制御されている。

精子形成過程の最終段階では、ヒストンの大部分がゲノム DNA から除かれ、プロタミンタンパク質に置き換えられる。このような大規模な変換に先立ち、精子形成過程の初期においては、特異的なヒストンバリエーションの発現や、特異的な翻訳後修飾の導入がみられるが、これらの機能的意義は未だ不明である。H2A.B (別名: H2A.Bbd) は哺乳類特異的なヒストン H2A バリエーションであり、精巣で高発現が確認されている。

研究代表者は、精巣に高発現するヒストン H2A バリエーションである H2A.B の機能解析から、H2A.B を含むヌクレオソーム中のヒストン H2A.B-H2B 複合体が、自発的に溶液中の他のヒストン複合体と置き換わる現象“ヒストン自己交換反応”を独自に発見していた。H2A.B は精子形成過程で重要な役割を果たすと考えられており、研究代表者は、H2A.B ヌクレオソームに特徴的なヒストン自己交換反応と精子形成過程における H2A.B の役割の関係を解明したいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者が見出した独自に発見した“ヒストンバリエーション H2A.B のヒストン自己交換反応”に着目し、精巣特異的に発現する H2A.B の、精子形成過程における機能の解明を目指す。具体的には、以下の 2 点について明らかにすることを目標とした。

【目的 I H2A.B のヒストン自己交換反応の生物学的意義の解明】

研究代表者は、H2A.B がヒストン自己交換活性を有し、ゲノム DNA 上に短時間しか留まらないのであれば、H2A.B はこれらの精巣特異的なヌクレオソームの形成を促進するのではないかと考えた。具体的には、H2A.B が、精巣特異的なヒストンバリエーションや翻訳後修飾を含むヒストンと優先的に交換され

る。もしくは H2A.B が他のヒストンと置き換わる前に、H2A.B ヌクレオソームの構造に特異的に翻訳後修飾が導入される。これらによって、精巣特異的なヌクレオソームの形成が促進されるのではないかと考えていた。これらの仮説について、生化学的、構造生物学および細胞生物学的解析によって検証した。

【目的 II H2A.B 自己交換反応の分子機構の解明】 H2A.B ヌクレオソームは能動的に H2A-H2B 複合体を取り込み、H2A.B-H2B 複合体をヌクレオソームの外に排出する機構を持つと考えられる。しかし、H2A.B のヒストン自己交換反応を担うアミノ酸領域が未解明な点、詳細な H2A.B ヌクレオソームの立体構造が未解明な点などが、H2A.B のヒストン自己交換反応の分子機構モデル構築を妨げてしている。そこで申請者は生化学的解析および X 線結晶構造解析によって、これらの点を明らかにし、H2A.B 自己交換反応の分子機構を解明する。

## 3. 研究の方法

H2A.B のヒストン自己交換反応が精子形成過程において果たす生物学的意義および、H2A.B のヒストン自己交換反応の分子機構を明らかにするため、*in vitro* 再構成ヌクレオソームを用いた生化学的・構造生物学解析および、細胞生物学解析を行った。*in vitro* 再構成ヌクレオソームは、リコンビナントタンパク質として精製したヒストンを用いて、高純度のものを調製し、使用した。

まず、H2A.B のヒストン自己交換反応の生物学的意義の解明するため、ヒストン交換反応における特異性・選択性について *in vitro* 再構成ヌクレオソームを用いたヒストン交換試験により解析した。さらに、翻訳後修飾導入効率への H2A.B の影響を解析するために、H2A.B ヌクレオソーム中における、各ヒストンテールのアクセシビリティを解析した。

次に、ヒストン自己交換反応の分子メカニズムを明らかにするため、生化学的解析、細胞生物学解析、および構造生物学解析を推進した。生化学解析においては、H2A.B のヒストン自己交換反応を担うアミノ酸領域を同定するために、H2A と H2A.B のドメイン交換変異体を数種類作製し、これらを含むヌクレオソームのヒストン交換活性を解析した。生化学的解析から得られた機能モデルを検証するために細胞生物学解析を行った。さらに、X 線結晶構造解析および、X 小角散乱解析をおこない、ヒストン交換反応の中間体ヌクレオソームの構造を解析した。

## 4. 研究成果

【研究内容 I H2A.B 交換反応における選択性の解析】 H2A.B のヒストン交換反応における特異性・選択性について生化学的解析を行った。具体的には、様々なヒストンバリエ

ントを含むヌクレオソームおよび、ヒストン H2A-H2B 複合体を再構成し、様々な組み合わせで混合した後に、ヒストン交換反応の有無をゲル・モビリティ・シフト・アッセイによって解析した。その結果、ヒストン交換反応は H2A.B を含むヌクレオソーム特異的に起こる現象であり、交換される相手にヒストンバリエーションの選択性がないことを明らかにした。

【研究内容 II H2A.B と翻訳後修飾の関係性解析】H2A.B ヌクレオソームが、翻訳後修飾の導入に関与しうるかを解析するために、数多くの翻訳後修飾が導入される H3.1 テール領域に着目した。試験内で再構成した H2A ヌクレオソームおよび H2A.B ヌクレオソームを用いて、H3.1 テール領域へのタンパク質分解酵素のアクセシビリティを比較した。その結果、H2A.B ヌクレオソーム中では H3.1 テール領域のアクセシビリティが主要型のヌクレオソームよりも高いことがあきらかになった。H2A.B ヌクレオソーム中の H3.1 テール領域のアクセシビリティの高さは、翻訳後修飾の導入されやすい環境を形成に寄与する可能性がある。

【研究内容 III H2A.B 自己交換活性を担うアミノ酸領域の決定】H2A.B の自己交換反応の分子機構を明らかにするため、H2A と H2A.B 間のドメイン交換変異体を含む再構成ヌクレオソームを用いた生化学的解析をおこなった。その結果、H2A.B の C 末端側に存在する、H2A.B に特異的なアミノ酸配列がヒストン交換反応を担うことを明らかにした。

【研究内容 IV H2A.B ヌクレオソームの構造生物学的解析】H2A.B の自己交換反応の分子機構を明らかにするため構造生物学的解析を推進した。X 線結晶構造解析に関しては各種条件検討の後、回折試験をおこない 7Å 程度の分解能の X 線回折像を得た。さらに、ヒストン交換反応にともなう構造変化をリアルタイムで解析するために、X 線小角散乱解析を用いたリアルタイム計測試験を行い、ヒストン交換反応中間体のヌクレオソームの構造を解析した。

【研究内容 V H2A.B 交換反応の細胞生物学的解析】生化学的解析によって見出された、ヒストン自己交換活性を担うドメインが、細胞内でのヒストン H2A.B の動態に及ぼす影響を解析した。そのために、研究内容 III において作成した、H2A.B 変異体に GFP を融合したタンパク質を発現させたヒト培養細胞を用いて FRAP 解析をおこなった。

平成 27 年度-28 年度の研究期間内において、これらの解析を推進し、原著論文 3 報を報告

し、国際学会ポスター発表 1 件、国内学会ポスター発表 4 件を発表した。さらに日本語総説 1 報を執筆した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1). 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.

2). Crystal structures of heterotypic nucleosomes containing histones H2A.Z and H2A.  
Horikoshi N, Arimura Y, Taguchi H, Kurumizaka H.  
Open Biol. 2016 Jun;6(6).  
pii: 160127.  
doi: 10.1098/rsob.160127.

3). 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, Kurumizaka H.  
Open Biol. 2015 Oct;5(10).  
pii: 150128.  
doi: 10.1098/rsob.150128.

〔学会発表〕(計 5 件)

1). Yasuhiro Arimura, Mamiko Noda, Risa Fujita, Masae Ikura, Masaaki Sugiyama, Hiroshi Kimura, Tsuyoshi Ikura, and Hitoshi Kurumizaka, 「Cancer-associated histone mutations affect the structure and stability of the nucleosome」, 『the 4th Cold Spring Harbor Asia conference on Chromatin, Epigenetics and Transcription』, Suzhou, China, May 9-13, 2016 (国際学会ポスター発表)

2). 有村泰宏、堀越直樹、胡桃坂仁志、「ヒストンバリエーションをヘテロに含むヌクレオソームの試験管内再構成」、『「細胞を創る」研究会 9.0』、早稲田大学 国際会議場 井深大記念ホール、2016 年 11 月 21-22 日(国内学会ポスター発表)

3). 有村泰宏、西村正宏、胡桃坂仁志「ヌクレオソームが転写因子 p53 の結合に与える影響の生化学的解析」、『第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会』、かず

さアカデミアホール, 2017年1月12日(国内学会ポスター発表)

4).

有村泰宏、野田真美子、藤田理紗、井倉正枝、杉山正明、木村宏、井倉毅、胡桃坂仁志、「がんゲノムデータベースより見出されたヒストン点変異がヌクレオソーム構造および細胞に及ぼす影響の解析」、『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』、P66、松島、2016年1月、(国内学会口頭発表)

5).

有村泰宏、矢島成人、白山一義、野田真美子、藤田理紗、胡桃坂仁志、「ヒストンバリエント H2A.B は、ヌクレオソーム中で自らを他の H2A バリエントと置き換える」、『第38回日本分子生物学会、第88回日本生化学会』、P198、神戸、2015年12月、(国内学会口頭発表)

〔図書〕(計 1 件)

1).

堀越直樹、有村泰宏、胡桃坂仁志  
担当: ヒストン H2A バリエントによる細胞機能制御  
編: 永井厚志、巽浩一郎、桑野和義、高橋和久  
Annual Review 呼吸器 2016、中外医学社、2016年、p20-27

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

受賞 1 件

1). the 4th Cold Spring Harbor Asia conference on Chromatin, Epigenetics and Transcription, Fellowship for symposia and conferences 2nd Prize

6. 研究組織

(1)研究代表者

有村 泰宏 (ARIMURA Yasuhiro)

早稲田大学、先進理工学研究科、助教

研究者番号: 80754697