

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05013

研究課題名(和文)透過性細胞を用いた複製および転写におけるクロマチンダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Analysis of chromatin dynamics during replication and transcription using permeabilized cells

研究代表者

立和名 博昭 (Tachiwana, Hiroaki)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がん生物部・研究員

研究者番号：70546382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物において遺伝情報であるDNAはクロマチンと呼ばれる構造を形成して細胞核内に収納されている。クロマチンは構造を変化させることで使われる遺伝子と使われない遺伝子に分ける機能する。クロマチンの構造を変化させる因子として、クロマチンの主要構成因子であるヒストンの多様性がある。ヒストンにはアミノ酸配列が似ている亜種(バリエーション)が存在し、取り込まれることによりクロマチンの構造と機能を特徴付ける。しかし、各ヒストンバリエーションがどのようにクロマチンの特定の領域に取り込まれるかは明らかとなっていない。本研究では、クロマチンの構造がヒストンの取り込みを制御していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は遺伝子発現制御機構に関する重要な因子であるヒストンバリエーションが、どのようにしてゲノムDNA中に取り込まれるかを明らかにした。遺伝子発現の異常は多くの疾患の原因となっている。そのため、その制御機構の解明が重要だと考えられている。本研究はゲノムDNAが形成しているクロマチン構造とその構成因子であるヒストンバリエーションに着目して、クロマチン構造を介した遺伝子発現制御機構の研究を行なった。本研究の成果は、遺伝子発現制御機構の解明に貢献し、疾患の制御にも繋がる次のアイデアの創出が期待される。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotes, DNA is stored in the cell nucleus by forming a structure called chromatin. Chromatin regulates gene expression, which enables to produce cells with different functions, by changing its structure. A factor that alters the structure of chromatin is the diversity of histones, which are major components of chromatin. The structure and function of chromatin correlate with incorporated histone subtypes (histone variant), which has a similar amino acid sequence to the canonical histone. However, it is not clear how each histone variant is deposited to a specific region of chromatin. In this study, we found that the structure of chromatin regulates histone incorporations.

研究分野：生化学

キーワード：クロマチン ヒストン エピジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

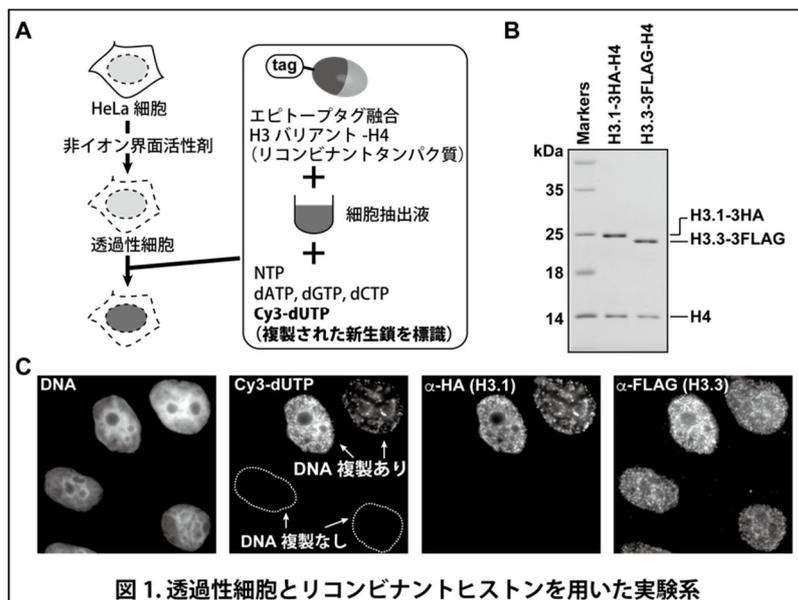
真核生物のゲノム DNA は、クロマチン構造を形成して核内に収納されている。クロマチンは一様な構造を形成しているのではなく、多様な構造を形成することで機能している。さらに、クロマチンは、その構造を発生、細胞周期、外部刺激などにもとないダイナミックに変換する。このクロマチンのダイナミクスは、DNA 配列によらない遺伝子発現機構であるエピジェネティクスの根幹となっている。実際に、クロマチンには転写が活発に行われている状態(ユークロマチン)と抑制されている状態(ヘテロクロマチン)が存在する。これらに加え、セントロメアやテロメア領域などの特定の機能を担っているクロマチン領域も存在する。このようにクロマチンのダイナミクスは細胞の機能発現において重要である。これらクロマチン構造の違いは、相互作用因子の違いに起因する。実際に、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームを構成するヒストンタンパク質(H2A、H2B、H3 および H4)は翻訳後修飾を受けるが、その種類はクロマチンの状態により異なる。さらに、ヒストンバリエントと呼ばれる主要型のヒストンと相同性が高いヒストンがクロマチン中へ取り込まれることにより、クロマチンの状態が変化する。これらのことより、クロマチンの主要構成因子であるヒストンのダイナミクスの解析が、クロマチンの構造と機能の解析に必要であると考えられた。基本的には同じタンパク質であるオールド・ヒストンと新規合成ヒストンを識別できる状態のクロマチンを調製することが不可欠となる。しかし、これまでに有用な実験系は存在しなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、クロマチンのダイナミクスの解析を通してエピジェネティクス機構を解明することである。特に、本研究では複製と転写におけるクロマチンのダイナミクスに焦点を絞る。DNA 複製において、複製フォークの進行に伴いヌクレオソームは壊れ、崩壊したヌクレオソームの再形成および新規に合成されたヒストン(新規合成ヒストン)の取り込みが行われる。このときに鋳型となるクロマチン上に取り込まれていたヒストン(オールド・ヒストン)は、エピジェネティックな情報を翻訳後修飾もしくはヒストンバリエントそれ自身として持っている。これらのエピジェネティックな情報が新規合成ヒストンにも受け継がれ、細胞分裂を経て失われないことは、細胞の恒常性維持にとって必須なことである。さらに、転写のオン・オフは、ヒストン修飾やヒストンバリエントがエピジェネティックなマークとなり形成されるクロマチン構造によって制御されている。そこで、本研究では複製および転写におけるヒストンの動態を解析することでクロマチンのダイナミクスを理解し、エピジェネティクス機構の解明につなげる。

### 3. 研究の方法

研究代表者が確立した透過性細胞とリコンビナントタンパク質を組み合わせた以下に示す RhIP アッセイを用いて、クロマチンのダイナミクスを解析した(図 1A)。RhIP アッセイでは、リコンビナントタンパク質として発現させ、精製したヒストンタンパク質を用いる。この時に N 末端もしくは C 末端にエピータグ(HA、FLAG もしくは V5)を付加させておく。精製したヒストンと複合体を形成するヒストン(H3 の場合は H4、H2A の場合は H2B)は、エピータグを付加せずにリコンビナントタンパク質として精製を行う。これらのヒストンタンパク質を用いて、試験管内においてヒストン複合体(H3-H4 もしくは H2A-H2B)を再構成する。次に培養細胞を非イオン界面活性剤により処理し、細胞膜に孔をあけた透過性細胞を調製する。この透過性細胞に、ヒストン複合体を細胞抽出液とともに添加することで、ヒストン複合体を透過性細胞のクロマチン中に取り込ませる。このとき、外から加えるヒストン複合体はエピータグが付加されているため、市販の抗エピータグ抗体を用いて、検出もしくは



回収することが可能である。さらに、エピトープタグにより内在性のヒストンと区別することができ、内在性がオールド・ヒストン、外から加えたエピトープタグ融合ヒストン複合体が新規合成ヒストンとなる。本実験系の有効性を確認した実験を以下に示す。細胞内において H3.1-H4 は DNA 複製依存的にクロマチンに取り込まれ、H3.3-H4 は複製非依存的にクロマチンに取り込まれるという異なるダイナミクスを示す。そこで、本実験系において、このダイナミクスの違いが再現されるかどうかを検証した。まず、H3.1 および H3.3 の C 末端にそれぞれ 3HA と 3FLAG を融合させたタンパク質の精製を行い、試験管内において H4 との複合体を再構成した（図 1B）。この複合体を細胞抽出液と混ぜ、HeLa 細胞より作製した透過性細胞に加えた。このとき、DNA 複製をモニターするために、各種ヌクレオチドと Cy3-dUTP を加えた。反応後、HA および FLAG に対する抗体を用いた免疫染色法によって H3.1-3HA および H3.3-3FLAG を検出した（図 1C）。その結果、H3.1-3HA は、Cy3-dUTP のシグナルと重なるパターンを示し、H3.3-3FLAG は Cy3-dUTP のシグナルと関係なく検出された。このことより、外から加えた H3.1-3HA-H4 複合体は DNA 複製依存的に、H3.3-3FLAG-H4 複合体は DNA 複製非依存的にクロマチンに取り込まれ、内在性のヒストンと同じダイナミクスを示すことが分かった。この結果より、本実験系の有効性が確認された。

#### 4. 研究成果

4 種類のヒストンタンパク質(H2A、H2B、H3、H4)は H2A-H2B 複合体および H3-H4 複合体を形成している。ヒストン H2A には相同性の高いノンアレリックなバリエーションが存在し、各 H2A バリエーションはクロマチンに取り込まれることで、クロマチンの構造と機能に多様性をもたらすことが知られている。本研究では、主要型の H2A とそのバリエーションである H2A.Z および H2A.X のダイナミクスを解析した。そのために、これらの H2A を H2B との複合体として精製した。まず、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質として H2A、H2A.Z、H2A.X および H2B を発現させ、それぞれアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。その後、等モルずつ各 H2A と H2B を変性状態下で混合し、透析により変性剤を除去することで複合体を試験管内再構成した（図 2）。後の実験で細胞に存在する内在性のヒストンと区別するために、エ

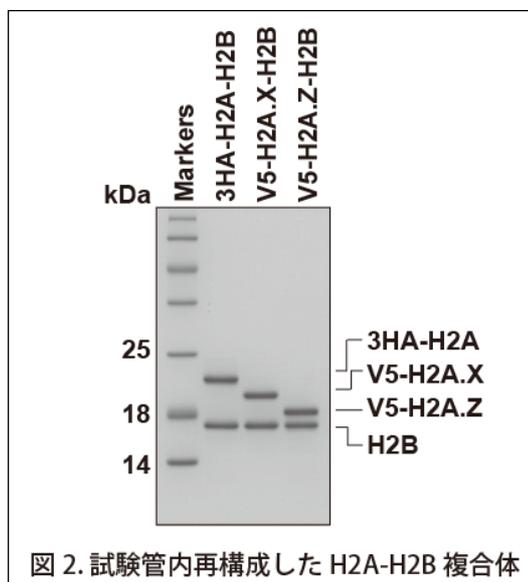


図 2. 試験管内再構成した H2A-H2B 複合体

ピトープタグを付加させた。次に、これらを透過性細胞に加え、クロマチンに取り込ませた。そして、どのゲノム領域に取り込まれているかを ChIP-seq 法により解析した。その結果、これらの H2A-H2B 複合体は細胞周期に関係なく凝集度の低いユークロマチンに取り込まれることが明らかとなった。さらに凝集度の高いヘテロクロマチンは DNA 複製に共役した機構でのみヒストンの取り込みが起こることを見出した。また H2A-H2B と H2A.X-H2B 複合体は複製依存的および非依存的どちらでもクロマチンへ取り込まれ、これらはクロマチンへの取り込みにおいては区別されていないことが分かった。一方で H2A.Z は複製依存的にクロマチンに取り込まれることなく、複製非依存的にのみユークロマチンに取り込まれることが明らかとなった。さらに変異体を用いた解析を行い複製依存的なヒストンのクロマチンへの取り込みに必要なアミノ酸の同定にも成功した。その結果、DNA 複製に共役してヒストンが取り込まれるために必要な結合タンパクの認識配列が主要型 H2A と H2A.X には存在するが、H2A.Z には存在しないことが分かった。以上の結果から、クロマチン構造とヒストン配列の組み合わせにより、ヒストンの取り込みが制御され、クロマチンの構造と機能の多様性がうまれていることが明らかとなった。

さらに、H2A.Z はユークロマチン領域の中でも転写開始点周辺のクロマチンに特異的に取り込まれることが分かった。このことは、クロマチンに取り込まれる H2A.Z-H2B 複合体に結合する因子群の中に、転写開始点を認識する因子が含まれることを示している。現在までに、転写開始点を規定している因子は不明であるが、H2A.Z が転写開始点近傍に取り込まれる本実験系を用いることにより、明らかにできることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fujita Risa, Yamamoto Tatsuro, Arimura Yasuhiro, Fujiwara Saori, Tachiwana Hiroaki, Ichikawa Yuichi, Sakata Yuka, Yang Liying, Maruyama Reo, Hamada Michiaki, Nakao Mitsuyoshi, Saitoh Noriko, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Nucleosome destabilization by nuclear non-coding RNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0784-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Dacher Mariko, Tachiwana Hiroaki, Horikoshi Naoki, Kujirai Tomoya, Taguchi Hiroyuki, Kimura Hiroshi, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Incorporation and influence of Leishmania histone H3 in chromatin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 11637-11648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz1040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takizawa Yoshimasa, Ho Cheng-Han, Tachiwana Hiroaki, Matsunami Hideyuki, Kobayashi Wataru, Suzuki Midori, Arimura Yasuhiro, Hori Tetsuya, Fukagawa Tatsuo, Ohi Melanie D., Wolf Matthias, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Cryo-EM Structures of Centromeric Tri-nucleosomes Containing a Central CENP-A Nucleosome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 44-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2019.10.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Osakabe Akihisa, Lorkovic Zdravko J, Kobayashi Wataru, Tachiwana Hiroaki, Yelagandula Ramesh, Kurumizaka Hitoshi, Berger Frederic	4. 巻 46
2. 論文標題 Histone H2A variants confer specific properties to nucleosomes and impact on chromatin accessibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 7675 ~ 7685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Arimura Yasuhiro, Tachiwana Hiroaki, Takagi Hiroki, Hori Tetsuya, Kimura Hiroshi, Fukagawa Tatsuo, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 The CENP-A centromere targeting domain facilitates H4K20 monomethylation in the nucleosome by structural polymorphism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08314-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Tatsuro, Sakamoto Chiyomi, Tachiwana Hiroaki, Kumabe Mitsuru, Matsui Toshiro, Yamashita Tadatashi, Shinagawa Masatoshi, Ochiai Koji, Saitoh Noriko, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through Eleanor non-coding RNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-33227-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 立和名博昭、ダッシェマリコ、前原一満、原田哲仁、大川恭行、木村宏、胡桃坂仁志、斉藤典子
2. 発表標題 高次クロマチン構造依存的なヒストン取り込み機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tachiwana H, Ueda K, Kurumizaka H, Saitoh N
2. 発表標題 Analyzing H2A.Z functions in cancer progression
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立和名博昭、ダッシェマリコ、前原一満、原田哲仁、大川恭行、木村宏、胡桃坂仁志、斉藤典子
2. 発表標題 クロマチン高次構造によるヒストンの取り込み制御機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tachiwana H, Dacher M, Harada A, Maehara K, Ohkawa Y, Kimura H, Kurumizaka H, Saitoh N
2. 発表標題 Analysis of histone incorporation at the DNA sequence-level using permeabilized cells and reconstituted histone complexes.
3. 学会等名 EMBO Workshop: Chromatin and Epigenetics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Tachiwana, Hiroshi Kimura, Hitoshi Kurumizaka, Noriko Saitoh
2. 発表標題 Analysis of histone dynamics using permeabilized cells and reconstituted histone complexes
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立和名 博昭、ダッシェ マリコ、原田哲仁、木村宏、大川恭行、胡桃坂仁志、斉藤典子
2. 発表標題 クロマチンの高次構造とヒストンダイナミクスの解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Tachihana, Midori Suzuki, Yoshimasa Takizawa, Matthias Wolf, Hitoshi Kurumizaka
2. 発表標題 Structural analysis of the centromere specific nucleosome.
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 立和名博昭、原田哲仁、大川恭行、木村宏、斉藤典子、胡桃坂仁志
2. 発表標題 透過性細胞と再構成ヒストン複合体によるヒストン動態の解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 立和名博昭	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 186
3. 書名 実験医学別冊 あなたのタンパク質精製、大丈夫ですか？ 貴重なサンプルをロスしないための達人の技	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----