

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05957

研究課題名(和文) HMGBタンパク質とヒストンとのインタープレイによるクロマチン動態制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of chromatin dynamics involving an interplay between HMG proteins and histones

研究代表者

清水 光弘 (Shimizu, Mitsuhiro)

明星大学・理工学部・教授

研究者番号：80231364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物ゲノムの基盤構造であるヌクレオソームは、遺伝子の転写、DNAの複製・修復の過程で動的に変化している。本研究は、非ヒストン性タンパク質HMGBによるヌクレオソーム動態変化を明らかにすることを目的とする。本研究で開発した部位特異的の化学切断法による解析から、出芽酵母のリボソームタンパク質遺伝子の転写活性化において、転写因子Rap1とHmo1が協奏的にヌクレオソーム配置を決定するモデルを考案した。一方では、次世代シーケンサーを用いて、出芽ゲノムにおけるヌクレオソーム地図を高解像度で作成した。また、in vivoでのDNA配列によるヌクレオソーム形成を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロマチンの基盤ユニットであるヌクレオソームは、DNAの塩基配列変化を伴わない遺伝子発現制御機構であるエピジェネティクスのプラットフォームである。本研究において、細胞内でのヌクレオソームと非ヒストンタンパク質のDNA結合部位の新規解析法を確立し、遺伝子の転写制御におけるヌクレオソームと非ヒストンタンパク質の動態変化を明らかにした。本研究で確立したクロマチン構造の新規解析法はエピジェネティック制御機構の解明と、その破綻による疾患研究の新機軸の開拓へ繋がる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：The nucleosome is the fundamental unit of eukaryotic chromatin, and its structure dynamically changes during gene transcription, DNA replication and repair processes. The aim of this research is to clarify the mechanism of nucleosome dynamics by uncovering the interplay between nucleosomes and non-histone proteins. In the present study, we developed a novel method to analyze and nucleosome positions, and DNA binding sites of a non-histone protein Hmo1 (yeast HMG homolog) in the yeast genome. We suggested a model in which Rap1 recruits Hmo1 to deplete nucleosomes at the promoter region during transcriptional activation. Furthermore, we established a genome-wide mapping method of nucleosome positions using next-generation sequencing. These techniques are also useful for examining the effects of DNA sequences on nucleosome formation in vivo.

研究分野：分子生物学、生化学、分子遺伝学

キーワード：ヌクレオソーム ヒストン HMGBタンパク質 クロマチン動態制御 ゲノム機能発現 出芽酵母 ケミカルマッピング タンパク質-DNA相互作用

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物では、長大なゲノム DNA はヌクレオソームの連鎖として折りたたまれ、クロマチンとして細胞核内に収納されている。その一方で、クロマチンの高次構造は動的に変化して、遺伝子の転写、DNA 修復、細胞周期におけるゲノムの複製と染色体の凝縮などの調節に重要な役割を果たしている。このようなクロマチンの構造変化は、クロマチンリモデリング因子、ヒストンの翻訳後修飾のほか、非ヒストン性クロマチン構造タンパク質によって制御されている<sup>1)</sup>。

細胞核内に比較的多量に存在する非ヒストン性タンパク質として、HMGB (High-Mobility-Group Box) がある。HMGB は酵母からヒトまで広く保存され、クロマチンの構築とリモデリング、エピジェネティクス、敗血症・感染症の抑制や炎症メディエーターなどの多彩な機能を有することが報告されている<sup>2)</sup>。出芽酵母において HMGB タンパク質ホモログは 7 種類同定されているが<sup>3)</sup>、そのうち Hmo1、Nhp6A、Nhp6B は塩基配列非特異的 DNA 結合タンパク質として、遺伝子の転写制御、クロマチンリモデリング因子との相互作用、リンカーヒストンとしての機能などが報告されている<sup>3)</sup>。しかし、ヌクレオソームに対する HMGB タンパク質の作用機構については未だによくわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、遺伝子の転写における各ヒストン分子と HMGB との協奏的相互作用によるクロマチン・染色体の動態を明らかにすることを目的とする。出芽酵母ゲノムにおいて、ヌクレオソームを構成するヒストン H2A、H2B、H3、H4 ならびに HMGB タンパク質ホモログの各分子の DNA 結合部位を同定する。その結果に基づき、ヌクレオソーム配置の動的変化における HMGB タンパク質の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究の特色は、従来、研究代表者が確立したクロマチン構造解析技術を基盤として<sup>4-7)</sup>、出芽酵母において分子遺伝学・分子生物学的手法と化学的アプローチを組み合わせた方法<sup>8,9)</sup>にある。部位特異的的化学切断法とマイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) によるクロマチン構造の平行マッピングは、研究代表者らの確立した独自の解析手法である。

### (1) 出芽酵母変異株の作製

本研究では、ヌクレオソームを構成するヒストン H2A、H2B、H3、H4 ならびに出芽酵母 HMGB ホモログ Hmo1 を解析対象タンパク質とした。これらの野生型遺伝子は全て出芽酵母プラスミド pRS306 にクローニングした。次に、出芽酵母ヌクレオソームならびにヒト HMGB-DNA 複合体の結晶構造を参照して、各タンパク質分子において DNA に近接するアミノ酸残基を選び、それらの残基を Cys に変異した遺伝子を作製した。二段階遺伝子置換法を用いて、各解析対象タンパク質の遺伝子座に Cys 変異を導入した出芽酵母株を構築した。

### (2) 部位特異的的化学切断と MNase による平行マッピング

Cys 変異株から単離した細胞核を試料として、導入した Cys 残基に N-(1,10-phenanthroline-5-yl)iodoacetamide を連結して OH ラジカルを局所的に発生させて DNA を切断した。一方では、単離核を MNase で消化し、リンカー DNA 部位で切断されたクロマチン DNA 断片を調製した。

### (3) ヌクレオソーム配置と HMGB タンパク質の DNA 結合部位の同定

得られた DNA 断片をサンプルとして、アガロースゲル電気泳動・サザンロットと間接末端標識法によって、ゲノムにおける個々の遺伝子座のヌクレオソームの配置、解析対象タンパク質の DNA 結合部位を検出した。一方では、部位特異的的化学切断または MNase 消化により得られた、50~250 bp の DNA 断片をライブラリ化し、次世代シーケンサー (NGS) によりゲノムワイドで解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 出芽酵母リボソームタンパク質遺伝子 (RPG) における Hmo1 の結合とヌクレオソーム動態

Hmo1 はリボソームタンパク質遺伝子群 (RPGs) の転写制御に関与するという報告<sup>10)</sup>を参考にして、出芽酵母ゲノムの *RPS5* と *RPS11B* 座を解析した。ヒストン H4-S47C を介した化学切断と MNase 切断部位のマッピングから、*RPS5* と *RPS11B* 座のプロモーター領域から遺伝子の転写領域 (gene body) において -2 から +4 ヌクレオソームの配置を決定した (転写開始点近傍に位置するヌクレオソームを +1 ヌクレオソームと定義する)。-1 と +1 ヌクレオソームの間のプロモーター領域において、*RPS5* では約 500 bp、*RPS11B* では約 320 bp のヌクレオソームフリー領域が同定された。Hmo1 はヌクレオソームフリー領域内の複数の部位に結合することが示された。

飢餓条件下では RPGs の転写が約 20% に低下する。そこで、飢餓条件 (孢子形成培地) で転写抑制状態における Hmo1 の結合とヌクレオソームの配置を調べた。飢餓条件では、*RPS5*、*RPS11B* 座において、-1 ヌクレオソーム ~ -3 ヌクレオソームの位置はほとんど変化していなか

ったが、+1ヌクレオソーム~+4のヌクレオソームの並びが約90bp上流側にシフトした。一方、栄養増殖条件に比較して、飢餓条件ではHmo1の結合は著しく低下することがわかった。

RPGsの転写制御にRap1とFhl1-Sfp1-Ifh1などの転写因子が関与している。さらに、Hmo1の結合と転写との関係を明らかにするために、RPS11Bのプロモーター領域のRap1結合部位またはFhl1結合部位を破壊した出芽酵母株を作製した。Rap1結合部位を破壊した株では、+1と+2ヌクレオソームの位置が上流に移動し、Hmo1の結合が大きく減少した。この結果は、RPS11BのプロモーターにRap1が結合できなくなると、Hmo1がリクルートされなくなることを示唆している。その結果、ヌクレオソームフリー領域が狭くなり、+1ヌクレオソームの位置が変化すると考察した。一方、Fhl1の結合部位を破壊した株では、ヌクレオソームの配置は野生株とRap1結合部位の変異株におけるパターンを重ねたものとはほぼ一致し、Hmo1の結合が減少した。すなわち、Fhl1が結合しないとヌクレオソーム配置の動態変化は不完全であることが推察される。

以上の結果から、RPGの転写活性化機構において、Rap1がプロモーター領域上流に結合するとHmo1がリクルートされてヌクレオソームフリー領域が形成され、転写が活性化されるというモデルを考案した。

## (2) 高解像度ケミカルマッピングによるヌクレオソーム配置のゲノムワイド解析

ヌクレオソームはヒストン8量体の周りを145-147bpのDNAが1.7回転巻き付いた複合体である。出芽酵母ゲノムにおいてヌクレオソームを構成する4種類のヒストンのDNA結合部位を特異的に化学切断する新規の方法(Chem-seq)を確立し(島根大学・加藤太陽博士との共同研究)、以下の成果を得た。

①ヌクレオソームのゲノムワイドでの新規マップ法の開発:NGS解析によって、出芽酵母の細胞核内のヌクレオソームDNAにおけるH2A、H2B、H2Cによる特異的な切断部位を決定した。ヒストンH2AとH2Bによるケミカルマップは報告例がなく、塩基対レベルの高分解能でヌクレオソームにおけるH2A-H2B二量体の動態を解析する新規のChem-seq法を確立することに成功した。

②ヌクレオソーム動態の解明:出芽酵母の5,542遺伝子におけるH2Aによる切断部位とその強度の解析から、転写に関連した特殊なヌクレオソーム構造の存在が示唆された。また、出芽酵母ゲノムの全ヌクレオソームにおけるH2Bの切断部位のパターンは、少なくとも3種類の多様なヌクレオソーム構造が存在する可能性を示している。

以上の結果は、*in vivo*でのヌクレオソームの構造と動態に関して、塩基対レベルの高分解能での解析を可能にした。また、本研究により得られたヌクレオソームマップは、従来のMNaseやChIP-seq、H4-S47CとH3-Q85Cによるマップとともに、遺伝子の転写、DNAの修復、組換え、複製の研究者の新たなリソースとして高い価値があるものと考えられる。この方法をHmo1の部位特異的の化学切断法と組み合わせ、Hmo1とヒストンとのインタープレイの機能動態の解析へと研究を展開している。

## (3) DNAの塩基配列に依存したヌクレオソーム形成の評価

本研究で確立した部位特異的の化学切断法を用いて、*in vivo*におけるDNA配列とヌクレオソーム形成との関係を調べた。着目したトリヌクレオチド反復配列(TRS)はマイクロサテライトのメンバーであり、多くの真核生物ゲノムに大量かつ非ランダムに分布している。TRS配列は全部で10種類あるが、ゲノムにおけるTRSの長さはさまざまであり、いくつかのTRS配列の伸長は遺伝性神経疾患に関係している。TRSのゲノム内での偏った分布の原因や動的な性質については、未だによくわかっていない。

本研究では、ポジショニングしたヌクレオソームから構成される出芽酵母ミニ染色体を用いて、全10種類のTRSをヌクレオソームの中央に挿入し、ヒストンH4-S47C部位特異的の化学切断によりTRSのヌクレオソーム形成への影響を検討した。その結果、(AAT)<sub>12</sub>と(ACT)<sub>12</sub>は強いヌクレオソーム促進配列、(AGG)<sub>12</sub>と(CCG)<sub>12</sub>はヌクレオソーム排除配列として作用することが示された。また、局所的なヒストン結合親和性スコア解析から、(AGG)<sub>12</sub>を除くTRSのヌクレオソーム形成は主にヒストンオクタマーに対する親和性によって決定されると結論づけられた。これらの知見は、ゲノムにおけるTRSのヌクレオソーム形成能力を理解するためのフレームワークとなるものと考えられる。

さらに、ケミカルマッピングを基盤として、DNA配列によるヌクレオソーム配置の予測法の確立と、ヌクレオソーム配置に対するヒストンとDNAとの局所的親和性の寄与を含めた新規モデルの構築を島根大・加藤太陽博士との共同研究で進めている。

## (4) 研究の総括と今後の展望

本研究において、出芽酵母細胞核を試料としてヌクレオソームを構成するコアヒストン4種類とHMGBタンパク質ホモログであるHmo1の部位特異的の化学切断法を確立した。従来法であるリンカーDNA部位を優先的に切断するMNase法と組み合わせ、出芽酵母ゲノムにおけるRPGsにおけるヌクレオソーム配置とHmo1の結合部位を同定し、転写因子との協奏的な相互作用によりヌクレオソームフリー領域が形成されると考えられた。現在、解析途中にあるHMGBホモログのNhp6はクロマチンリモデリング因子FACTの相互作用因子であり、FACT

を含めて遺伝子の転写活性化におけるヌクレオソーム動態変化の解明へと研究を展開する。

一方では、ヒストンの部位特異的の化学切断法はヌクレオソーム形成と DNA 配列との解析に有効であることを実証するとともに、出芽酵母ゲノムにおけるヌクレオソームの新規の高解像度マッピング法である Chem-seq 法を確立した。今後、Chem-seq 法と MNase-seq とを組み合わせたゲノムワイドでのヌクレオソームの平行マッピングと、ゲル電気泳動による個々の遺伝子座の解析を駆使することによって、出芽酵母ゲノムでのヌクレオソームの機能動態の分子機構の理解がさらに進むことが期待できる。また、HMG などの非ヒストンタンパク質によるヌクレオソーム動態変化の解析は、エピジェネティック制御機構の解明とその破綻による疾患の分子機構の研究に対する新機軸の開拓に繋がることが期待される。

<引用文献>

1. Lai W.K.M., Pugh B.F., Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18(9):548-562 (2017). doi: 10.1038/nrm.2017.47.
2. Yang H., Daniel J., Antoine D.J., Andersson U., Kevin K.J. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* 93, 865-73 (2013). doi: 10.1189/jlb.1212662.
3. Vizoso-Vázquez Á., Barreiro-Alonso A., Rico-Díaz A., Lamas-Maceiras M, Rodríguez-Belmonte E., Becerra M., González-Siso M.I., Cerdán M.E. HMGB proteins from yeast to human. Gene regulation, DNA repair and beyond. In *Old Yeasts: New Questions* Volume 1, Chapter 7, (Eds, Lucas C., Pais C.) IntechOpen, London, UK, (2017) doi: 10.5772/intechopen.70126
4. Shimizu M., Roth S.Y., Szent-Gyorgyi C., Simpson R.T. Nucleosomes are positioned with base pair precision adjacent to the alpha 2 operator in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 10, 3033-3041 (1991). doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb07854.x.
5. Shimizu M., Mori T., Sakurai T., Shindo H. Destabilization of nucleosomes by an unusual DNA conformation adopted by poly(dA)•poly(dT) tracts *in vivo*. *EMBO J.*, 19, 3358-3365 (2000). doi: 10.1093/emboj/19.13.3358.
6. 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). doi: 10.1093/nar/gkt1006.
7. Ichikawa Y., Morohashi N., Tomita N., Mitchell A.P., 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). doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.063.
8. 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(10):e0186974 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0186974.
9. Fuse T., Yanagida A., Shimizu M. The yeast minichromosome system consisting of highly positioned nucleosomes *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.*, 42, 289-294 (2019). doi: 10.1248/bpb.b18-00732.
10. Kasahara K., Ohyama Y., Kokubo T. Hmo1 directs pre-initiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region. *Nucleic Acids Res.*, 39, 4136-4150 (2011). doi: 10.1093/nar/gkq1334.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroaki Kato, Mitsuhiro Shimizu, Takeshi Urano	4. 巻 22:322
2. 論文標題 Chemical map-based prediction of nucleosome positioning using the Bioconductor package nuCpos.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12859-021-04240-2	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 Koji Katsumata, Yuichi Ichikawa, Tomohiro Fuse, Hitoshi Kurumizaka, Akio Yanagida, Takeshi Urano, Hiroaki Kato, Mitsuhiro Shimizu	4. 巻 556
2. 論文標題 Sequence-dependent nucleosome formation in trinucleotide repeats evaluated by in vivo chemical mapping	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 179-184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.155.	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 清水光弘, 加藤太陽	4. 巻 52
2. 論文標題 ヌクレオソームポジショニングのゲノムワイド解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 503-507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 清水光弘, 加藤太陽	4. 巻 4
2. 論文標題 ヌクレオソームポジショニングのゲノムワイド解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 86-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水光弘, 加藤太陽, 市川雄一, 布施智博, 林俊樹, 浦野健, 斉藤典子
2. 発表標題 出芽酵母ヒストンH2A-H2B結合部位の高解像度ケミカルマッピングによるヌクレオソーム配置のゲノムワイド解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤太陽、清水光弘、浦野健
2. 発表標題 ケミカルハイブリッドモデルによるヌクレオソーム配置予測
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高附宏暢、柳田顕郎、清水光弘
2. 発表標題 出芽酵母RPS5とRPS11Bのプロモーター領域におけるHMG蛋白質Hmo1の結合とヌクレオソームの解析
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 讓原秀隆、今井洸志、布施智博、柳田顕郎、胡桃坂仁志、香川亘、清水光弘
2. 発表標題 出芽酵母ゲノムにおけるヒストンバリエントH2A.Zヌクレオソームの動態：部位特異的的化学切断法による解析
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 高附宏暢、布施智博、柳田顕郎、清水光弘
2. 発表標題 In vivoでポジショニングしたヌクレオソームにおけるヒストンH4のN末端テールのDNA結合部位：部位特異的の化学切断法による解析
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 清水光弘
2. 発表標題 出芽酵母ゲノムにおけるヒストン - DNA結合部位からのヌクレオソーム動態の考察
3. 学会等名 平成31年度国立遺伝学研究所研究会「クロマチン・核構造の形成とダイナミクスによるゲノム制御」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 讓原秀隆、野上亮弘、高附宏暢、柳田顕郎、香川亘、清水光弘
2. 発表標題 出芽酵母セントロメアにおけるヒストンH3バリエントCse4による部位特異的の化学切断
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 高附宏暢、布施智博、柳田顕郎、清水光弘
2. 発表標題 出芽酵母RPS5、RPS11B座におけるHMGBホモログHmo1のDNA結合部位の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

化学専攻修士生の修士論文成果がBBRC誌に掲載されました  
<https://www.meisei-u.ac.jp/2021/2021041602.html>

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
研究協力者	加藤 太陽  (Kato Hiroaki)		
研究協力者	高附 宏暢  (Takatsuki Hironobu)		
研究協力者	布施 知博  (Fuse Tomohiro)		
研究協力者	市川 雄一  (Ichikawa Yuichi)		
研究協力者	勝俣 光司  (Katsumata Koji)		



6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	胡桃坂 仁志  (Kurumizaka Hitoshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関