

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究

「遺伝子制御の基盤となるクロマチンポテンシャル」2018年度-2022年度

HP: <a href="https://www.nibb.ac.jp/potentia">https://www.nibb.ac.jp/potentia</a>
Twitter: <a href="https://twitter.com/CP\_Publicity">https://twitter.com/CP\_Publicity</a>



News Letter No.15 Sep, 2021

- 1. 公募研究紹介(秋光 信佳・加納 純子・中村 遼平)
- 2. 海外研究室訪問 (Elly Tanaka 研究室)
- 3. 第4回 領域会議・総括班会議レポート
- 4. ワークショップレポート
- 5. 成果紹介
- 6. その他
- 7. 今後の予定



# 1. 公募研究紹介

### 『核内RNAボディによるクロマチン制御と熱ストレス応答』

研究代表者:秋光 信佳(東京大学・アイソトープ総合センター・教授)

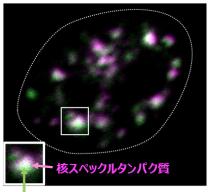
連携研究者:小野口 玲菜(東京大学・アイソトープ総合センター・特任助教)

熱ストレスに対して正常に応答し、生体内の恒常性を保つことは生物の生存において必要不可欠です。熱ストレス応答ではHSF1を介した転写制御が良く研究されてきましたが、クロマチン制御機構については不明な点が多く残されています。

我々は、タンパク質に翻訳されない長鎖ノンコーディングRNA(IncRNA)と呼ばれる機能性RNAに着目して、ストレス応答におけるIncRNAの機能を調べていました。当初は核スペックルに局在するMALAT1 IncRNAにフォーカスをあてて、低酸素応答におけるMALAT1の機能を調べていました。 紆余曲折の末、「通常は核スペックルに局在するMALAT1 IncRNAが熱ストレスに応答して核スペックルから離脱し、新規核内構造体(HiNoCo bodyと命名)を形成する」という新しい現象を発見しました(Onoguchi-Mizutani R., et al. J Cell Sci. in press)。 さらに、ChIRP法というIncRNAとゲノムDNAとの相互作用を調べる手法によって、MALAT1とゲノムDNAとの相互作用が熱ストレス依存的にダイナミックに変化することを発見しました。そこで、HiNoCo bodyによるクロマチン制御の可能性に注目するに至りました。

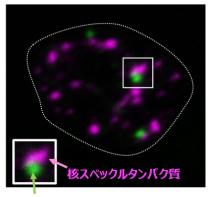
本研究は、HiNoCo bodyによる標的遺伝子発現制御並びにクロマチン制御の分子機構の解明を目的としています。具体的には、ATAC-seq, RNA-seq, ChIRP-seq, ChIP-seq, プロテオミクス解析などを駆使して、MALAT1 IncRNA, HiNoCo body構成タンパク質およびHiNoCo bodyの標的ゲノムDNA領域の熱ストレス依存的な三者間相互作用について網羅的に解析することを計画しています。さらに、熱ストレスがHiNoCo body形成を誘導するメカニズムの解明も目指します。本研究を通じて、従来の熱ストレス応答モデルでは想定されていなかった新しいストレス応答機構の提唱を目指すとともに、熱応答性の核内構造体という切り口からストレス応答におけるクロマチンポテンシャル制御機構の解明に迫りたいと考えています。

### 通常条件の細胞核

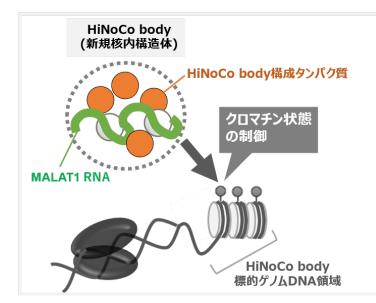


・ MALAT1 RNA (核スペックルに局在) MALAT1の局在変化

### 熱ストレス条件の細胞核



MALAT1 RNA (HiNoCo bodyを形成)



熱ストレス下における 「MALAT1」「HiNoCo body構成タンパク質」 「HiNoCo body標的ゲノムDNA領域」の 三者間相互作用の解明

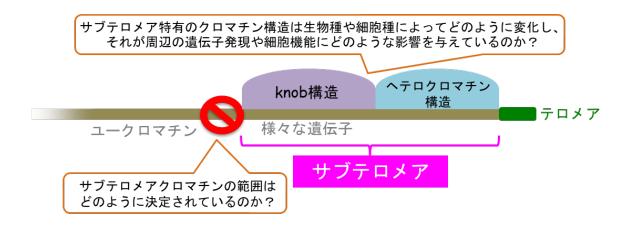
HiNoCo bodyを介した熱ストレス依存的な クロマチンポテンシャル制御の提唱



### 『サブテロメアクロマチンポテンシャル』

研究代表者:加納 純子(東京大学・大学院総合文化研究科・教授)

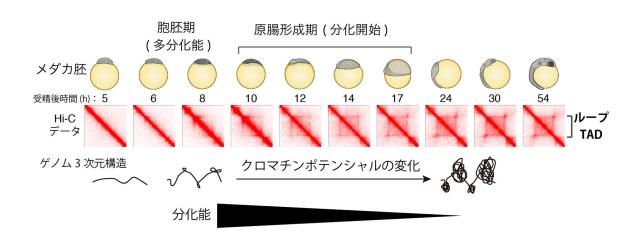
線状染色体の末端に存在するドメインであるテロメアに隣接してサブテロメアと呼ばれるドメインが存在します。サブテロメアは、長大な重複DNA配列が存在する等の実験手法的困難から、その機能がほとんど明らかにされてこなかった"染色体の未開の地"です。そこで我々はこれまでに、分裂酵母のサブテロメアに存在する二つの異なるクロマチン凝縮構造であるヘテロクロマチンとknobの形成機構を明らかにしてきました。しかし、両者の制御機構には未知な点がまだ多く残されています。本研究では特に以下の点について明らかにします。1) ヘテロクロマチン構造は遺伝子発現を抑制する効果をもたらすため、ヘテロクロマチンが無秩序に染色体に広がると細胞機能に甚大な異常が生じることになります。それを防ぐため、細胞にはヘテロクロマチンの範囲を限定するしくみが備わっていると考えられます。そこで、サブテロメアと隣接するユークロマチンの境界を決定する分子機構を明らかにします。2) 最近我々は、サブテロメアのDNA配列がゲノムの中で特に変化に富むことを明らかにしました。そこで、分裂酵母やヒトに進化的に最も近いチンパンジーなどを用いて、サブテロメアの特徴的なクロマチン構造が生物種あるいは細胞種によってどのように変化し、それがどのようにサブテロメア内外の遺伝子発現を制御しているのかを明らかにします。以上の研究により、サブテロメアのクロマチンポテンシャルの実体を解明します。



#### 『原腸形成期におけるTAD形成によるクロマチンポテンシャル変化』

研究代表者:中村 遼平(東京大学・理学系研究科・助教)

動物の染色体は受精直後、リプログラミングを受け、クロマチンの3次元構造が大規模に変化します。メダカの胚発生においては、転写が開始する時期の未分化な細胞(胞胚期)ではクロマチンループ(およびTAD)が存在しませんが、細胞の分化が開始する原腸形成期にループ構造が出現します。クロマチンループはゲノム領域間の相互作用を増幅あるいは制限すると考えられていることから、原腸形成期にできるクロマチンループは遺伝子ごとの転写のしやすさを変え、分化能を制限している可能性が考えられます。しかし、発生過程におけるクロマチンループの役割や、確立の制御メカニズムは明らかになっていません。これまでに、ループ形成において中心的な役割を持つコヒーシンやCTCFタンパク質は、まだループが形成されていない胞胚期でもクロマチンに結合していることが明らかになりました。したがって、初期胚のループ確立にはコヒーシンやCTCF以外の因子が寄与していることが示唆されます。そこで、本研究ではループ形成の制御因子の探索やループ構造の阻害実験によってメダカの原腸形成期におけるクロマチン3次元構造変化がどのように制御され、転写制御にどのように影響しているのかを解明することを目指します。



# 2. 海外研究室訪問

きました。

### **■**Elly Tanaka Laboratory/IMP

2021年4月から3か月間、オーストリア(ウィーン)にある Research institute of molecular pathologyのElly Tanaka研究室 に滞在させていただきました。日本での所属研究室とは大きく異な るプロジェクトに携わり、たくさんの刺激的な体験をすることがで

今回の滞在では組織再生を可能にする分子メカニズムの解明に取り組みました。我々哺乳類とは異なり、一部の両生類は高い再生能を有し組織レベルの再生を行うことが可能です。再生過程において、既に分化している細胞群は一度多分化能を獲得したのちに再び分化して分化細胞を生み出すという極めてダイナミックな分化能の変遷をたどります。この分化能の変遷が分子的にどのように規定されるのか研究を行いました。特に今回の滞在では、切断後に四肢を再生できるアホロートル(ウーパールーパー)と、不完全な再生を示すカエルを比較することで再生を制御する新規因子の同定を目指しまし



研究対象のアホロートル

た。結果をまとめるには至りませんでしたが、いくつかの予備的な結果を得ることができました。



シュテファン大聖堂

今回の滞在で最も刺激を受けたのは派遣先研究室のポスドクの皆さんの研究への姿勢です。派遣されてすぐに、派遣先研究室の研究員が研究室主催者としてのポジションを目指すための明確で大局的な視点を持って独立して研究を進めていることに気づきました。個々人がこれまで扱っていた分野を研究室に独自に持ち込むことで、これまでになかった研究領域を生み出していく様子はとても刺激的でした。この経験で、博士課程を卒業すればもう独立した研究者であるという自覚が不足していたのを痛感するとともに、近い将来自身が目指すべき姿を具体的にイメージすることができました。

本派遣は日本学術振興会、海外若手挑戦プログラムのサポートを受けました。最後になりましたが、派遣を快く後押ししてくれたボスの後藤さん、派遣を受け入れてくださったEllyさん、Elly研のみなさんに感謝申し上げます。

(東京大学・後藤研・岸グループ・D3・桑山尚大)

# 3. 第4回 領域会議・総括班会議レポート

2021年5月24日(月)-26日(水)にクロマチン潜在能第4回領域会議が中山潤一さん・小布施力史さんのオーガナイズによりオンラインで開催されました。本領域の計画研究および公募研究の代表者・分担者・研究協力者に、領域評価者や文部科学省学術調査官の先生方にも加わっていただき、約140名の参加がありました。

会議冒頭に木村宏領域代表から領域の狙いや課題について説明がなされ、昨年度行われた中間報告・評価も踏まえて、今後の領域の目標が確認されました。その後、3日間にわたり、計画研究代表者、計画研究分担者、公募研究代表者全員が口頭発表を行い、進捗状況を報告しました(合計36演題)。生きた細胞内でのクロマチン状態を可視化する技術開発や、それらを含む最先端の手法で計測したクロマチン状態の解析など、遺伝子制御に対してクロマチンが有する潜在能力を明らかにする様々な研究についての発表が行われました。それぞれの発表に数多くの質問が出ていつもながら活発な会議となりました。総括班会議では、領域としての今後の活動方針が議論され、コロナ禍においてもできる工夫についてアイディアを交換しました。

今回は、本年度から採択された後期の公募研究課題の代表者が参加するはじめての領域会議でした。公募研究代表者は前期からの継続と後期になった初めて参加される研究者が約半数ずつであり、継続性と新規性のバランスがとれた構成になっていると感じました。活発な議論が行われましたが、やはり対面での会議と比べると、これまでこの分野で多くの共同研究を生んできた「雑談」が減ってしまう印象が否めません。新しく加わってくれた公募研究代表者らと早く対面で集まって、同分野の良い伝統である幅広い共同研究が次々と生まれるような状況になることを期待しています。一方で、会議で集まらなくても地理的に離れた研究者と気軽にオンラインで議論できる環境が醸成されたことは共同研究にプラスに作用している面もあります。制約はありながらもできることを生かして領域研究を推進していきたいとの思いを新たにしました。





参加者の様子

# 4. ワークショップレポート

## ■第32回 細胞生物学ワークショップ オンライン&オンサイト

このワークショップは、若手研究者のバイオイメージング技術習得の促進を目的とした「蛍光顕微鏡の実機講習会」です。今年は、2021年8月2日(月)~8月6日(金)の日程で「第32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」(主催者:平岡泰、原口徳子)を開催しました。受講生として、全国の大学院生や若手研究者など33名が参加しました。本領域からは、講師・ディスカッションリーダーとして、木村宏



図1. オンライン参加の受講生と講師 (一部のみ)

(領域代表)、伊藤由馬(木村計画研究分担)、波多野裕(山縣計画研究室研究協力者)が参加したほか、受講生として、本領域計画研究の研究室から、若手研究者2名が参加しました。

このワークショップは、これまでは、全員が泊まり込んで、朝から晩まで、蛍光顕微鏡法について

の講義と実習に没頭する合宿形式でやってきました。しかし、去年、新型コロナウイルス感染症が拡大し、本ワークショップ始まって以来、初のオンライン開催を行いました(その時の様子は、ニュースレター12号で紹介されています)。受講生に対するアンケートの結果、オンラインでのワークショップは、意外にも大好評だったのですが、さらに予想に反してというか、やはりというか、実は、受講生の多くはオンサイト(対面方式)でのワークショップを希望していることが分かりました。そこで、今年は、なんとかオンサイトでの実習を行おうと準備を進めてきました。しかし、新型コロナウイ

午前中はオンラインで講義を行い、午後は、オンラインとオンサイトの2つで実習を行いました。使用した実機は、大阪大学大学院生命機能研究科の顕微鏡装置です。図2は、オンラインでの実習風景。上は実習中の講師。中央は配信している顕微鏡画面。下は実習配信中の実習室で、奥に説明中の実習講師、その後方に装置や講師の手元を撮影しているカメラの担当者、手前にそれらの配信画面の切り替えを行っているオーディオディレクターがいるのが分かります。実習している講師や、その手元、顕微鏡画面など、何台かのカメラで撮影し、必要に応じて画面を切り替えながら配信しました。

ルス感染症の拡大は止まらず、やはり、今年も、オンラインを基本

として行いました。







図2. オンライン配信の様子

夕方は、グループに分かれてdiscussionを行い、 その日の復習をしました。

今年、我々が何とか実現したかったのは、オンサイト(対面式)での実習です。これを実現するため、感染対策として、オンサイト参加する受講生を、アクセスが容易な阪大生だけに絞り、さらに、ひとつの実習に参加できる人数を5人まで絞った上で、実習を行いました。その様子を、図3に示します。やはり、オンサイトでの実習は、参加者が生き生きと活動しているのが分かります。改めて、その価値を実感しました。特に、「デジタル画像解析」の実習では、オンラインでは、一度、分からなくなると置いてきぼりとなってしまいます。が、今年は、オンサイト受講生を広い講義室に集めて、オンライン配信しながら、オンサイトでも同時に実習



図3. オンサイト実習の様子

を行いました(図3の下)。オンサイトでは、同じ部屋にはTAがいるので、分からない箇所があっても、個別に教えて貰うことができます。また、講師の示す画面を見ながら、自分のパソコンで解析をすることができるようにしました。

オンラインでも、解析用パソコンとは別に配信用の端末を用意してもらいました。この点は、去年、 提起された「配信画面を見ながら、同じパソコンで解析をやるのが難しかった」という問題に答えた ものです。

以下に、受講生のアンケート結果を紹介します(次ページ;図4)。「このワークショップは有意義でしたか?」との質問に、一人を除く、ほぼ全員が「有意義だった」と回答しました。画像解析実習では、「ImageJを普段多く利用してなかったため、細かく教われてよかった。初心者向けに顕微鏡演習を解説してくれたのでとても良かった。」という声があったものの、「説明(進行)が速かった気がしました」との声も寄せられました。オンライン実習をうけた人へ「オンサイトで受講してみたかった」と答えています。その理由として、「オンサイトの方が質問しやすい」「実習は実際に自分の手を動かしてみないと分からない」「PCの画像をずっと見ていると疲れる」といった意見が出ていました。また、オンサイトで実習を受けた人へ「オンサイトとオンライン、どちらが受講しやすかったですか?」と聞いたところ、15人中14人が「オンサイト」と答えました。また、オンライン参加者か

らは、「オンサイトで参加したかった。とても楽しそうだった」という意見もありました。やはり、オンサイトの実習は重要だと思いました。その他、「オンデマンド配信で復習できるようにしてもらえたらより理解を深められる」、「出来ればTAじゃなくてもう一度受講生として参加したい」、「平野先生の授業が大変わかりやすかった」などなど、様々なご意見を頂きました。

本ワークショップに参加して下さった全ての皆さまに 心より感謝します。

(大阪大学・原口徳子)

(後記:オンサイトでの開催は、新型コロナウイルスの感染を拡大させてしまうのではないかと、とても心配しました。しかし、その後、講師や受講生に感染者がでることもなく、終了することができました。実は、開催中に、「同居している親族に、感染者・濃厚接触者がでたので」と、オンサイトに来るのを自粛して下さった方達がいました。彼らの、この勇気と良識に満ちた行動によって、WSが支えられたのだと、心より感謝申し上げます。)



図4.アンケート結果(一部)

### ディスカッションリーダーから頂いたご意見・ご感想

[東京工業大学・伊藤由馬]

本ワークショップの5日間を通して講師としてオンライン参加し、グループディスカッション等を担当しました。毎日午前中の講義も受講生と一緒に聴講し、第一線で活躍されている研究者や技術者のお話が聞ける大変貴重な機会であることを改めて実感しました。今回の実習は実地とオンラインのハイブリッドで、特に光学系の組み立てでは実際に受講生が組み立てる様子をオンラインでも見ることができ、より現場の雰囲気を体験できました。グループディスカッションでは、その日の重要な点を議論して、受講生自身の顕微鏡観察の方法や工夫を共有しました。中には実習で理解を深め、これまでの顕微鏡の使い方の間違いに気づいた受講生もおられました。コロナ禍は未だ収束しませんが、昨年の完全オンラインワークショップの経験を踏まえた、より進化したワークショップに参加できて非常に有意義でした。多大な労力を要する実地とオンラインのハイブリッドワークショップを、完全な形で開催して頂きました講師やスタッフの皆様に深く感謝いたします。

#### 受講生の感想

#### [広島大学・落合研・新谷学文]

私はこのワークショップに現地で参加したいとの思いがあり、去年の参加を見送りました。しかし今年も現地参加は叶わず…オンラインで参加しました。オンラインとはいえ、ワークショップの内容は非常に濃く、ついていくのに必死でした。もし現地で参加していたら、体力がもたなかったかもしれないと思いました。このワークショップを通して学んだことは多数ありますが、一番記憶に残っているのは、「見たいものは真ん中に置け」ということです。視野の中心と周辺でどれだけ収差の影響が現れるか、具体的な説明がありとてもわかりやすかったです。当たり前といえば当たり前のことなのかもしれませんが、講義を受けてなぜそうしなければならないのか、理解できました。講義・実習・議論を重ねる度に、わかることがぐんぐん増えていく楽しみを感じたワークショップでした。このような貴重な機会を提供してくださった先生方、スタッフの皆様、また一緒に議論を深めた参加者の皆様に深く感謝いたします。

#### [大阪大学・生命機能研究科・田邊春樹]

昨年受講生として参加した細胞生物学ワークショップに今年はTAとして参加させていただいた。全て オンラインで行なわれた昨年と異なり、今年はオンライン+オンサイトのハイブリッドで行われた。 TAということで会場の準備から参加し、受講生からは見えないワークショップの裏側を垣間見た。講 義パートはオンラインで行われた。基礎からしっかりとした講義を改めて聴くことができた。特に フーリエ面についてや超解像顕微鏡、FCSなど昨年の理解が甘かった範囲が浮き彫りとなり、復習と なった。昨年よりも受講生からの質問が積極的で私にとってもさらに勉強になった。自らも質問する ことで受講生からも質問がしやすいようにしたつもりである。総合討論ではそれぞれの実際の研究で 用いる顕微鏡や手法について講義の内容から生かせることを話し合った。講義を受け、意識するよう になった共焦点顕微鏡のパラメータをシェアしたり、他の受講生からの疑問を全員で考えるなど充実 した時間であった。実習パートはオンライン、オンサイトのハイブリッドで行われた。昨年は全てオ ンラインで行われた実習であったが、今年はオンサイト実習に参加させていただいた。単レンズを用 いた顕微鏡の組み立てや観察時の対物レンズの比較、パラメータの比較を実際に見て楽しみながら学 ぶことができた。オンサイトではオンラインよりもパラメータの設定の変更などがコメントしやすく、 気軽な疑問もすぐに質問することができるよい環境であった。受講生の設定したオーバーナイトのラ イブセルイメージングもうまく撮れており、学んだ内容の実践ができた。FRAPにおいては、メインの 実験に加えて通常の条件では速すぎて観測できないGFP蛍光の回復をなんとか捉えようと試みた。Y軸 のスキャンを極力狭めてブリーチ回数を大幅に増やすとこれを捉えることができ感動した。このよう な遊び実験もオンサイトならではと感じ楽しめた。オンラインではついていくことが難しかった画像 解析などもその場で質問しながら進めることができ、TAの立場でありながら受講生とともに学ばせて もらった。全体を通して内容の濃いワークショップであるのでTAとして参加したことで基礎<mark>からの理</mark> 解がさらに深まったと感じる。昨年体験できなかった実習に全てオンサイト参加することができ、実 践的な内容を楽しめた。今後自身の研究にも生きる貴重な体験を得ることができた。

# 5. 成果紹介

■ 胡桃坂仁志計画研究代表、杉山正明計画研究分担、柴田幹大公募研究代表らの論文が Communications Biology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。

Histone variant H2A.B-H2B dimers are spontaneously exchanged with canonical H2A-H2B in the nucleosome

† Hirano R, Arimura Y, Kujirai T, <u>Shibata M</u>, Okuda A, Morishima K, Inoue R, <u>Sugiyama M, \*Kurumizaka H</u>.

Commun Biol. 2021 Feb 12. doi: 10.1038/s42003-021-01707-z.

https://www.nature.com/articles/s42003-021-01707-z#disgus thread

精子の形成過程では、クロマチン構造が大きく変化する。この精子形成時には、H2AのヒストンバリアントであるH2A.Bが発現しクロマチンに取り込まれる。H2A.Bの遺伝子を欠失させると、精子形成過程のクロマチン構造が変化するため、H2A.Bはクロマチン構造や機能に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、H2A.Bがクロマチン構造と動態をどのように制御するかについては未だ不明な点が多く残されている。

本論文では、精製したヒストンとDNAをもとに、H2A.Bを含むヌクレオソームを試験管内で再構成

し、その構造と動態を生化学的解析、高速原子間力顕微鏡解析(柴田幹大公募研究代表との共同研究)、そして X線小角散乱解析(杉山正明研究分担との共同研究)に よって解明した。その結果、H2A.Bを含むヌクレオソームが、ヒストンの複合体の一部が解離したような"開いた"構造を取ること、そしてH2A.Bが主要型のヒストン H2Aと自発的に置き換わるという特異的な性質を持つことを明らかにした。これらの発見を統合すると、H2A.Bを含むヌクレオソームが"開いた"構造を取ることで主要型ヒストンが結合しやすくなり、H2A.Bが押し出されて ヒストンが置き換わると考えられる。

本研究で明らかになった"開いた"構造は、ヌクレオ ソームの動態として全く新しい知見であり、新たなクロ マチンポテンシャルの可能性を示すものである。本研究 で得られた知見は精子形成メカニズム解明に必要不可欠 な基盤を提供する。

以下、プレスリリース情報です。

H2A.B-H2B H2A-H2B 二量体 二量体 ヒストンが自発的に 置き換わる H2A.B ヌクレオソー H2A ヌクレオソーム H2A-H2B H2A-H2B ヒストンは自発的に 置き換わらない H2A ヌクレオソーム H2A ヌクレオソーム 本研究で明らかとなったヌクレオソームの構造 (高速原子間力顕微鏡で観察) H2A ヌクレオソーム H2A.B ヌクレオソーム H3-H4 H2A-H2B H2A.B-H2B 二量体 ヒストン八量体に DNA ヌクレオソームの構造

本研究で明らかとなったヌクレオソームの新規ヒストン交換活性

http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/pressrelease/210216/

■立和名博昭連携研究員、斉藤典子計画研究代表、胡桃坂仁志計画研究代表、大川恭行計画研究分担、木村宏領域代表らの論文がeLife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。

Chromatin structure-dependent histone incorporation revealed by a genomewide deposition assay

† <u>Tachiwana H</u>, Dacher M, Maehara K, Harada A, Seto Y, Katayama R, <u>Ohkawa Y</u>, <u>Kimura H</u>, <u>Kurumizaka H</u>,\*<u>Saitoh N</u>. eLife. 2021 May 10. doi: 10.7554/eLife.66290.

https://elifesciences.org/articles/66290

クロマチンの主要構成因子であるヒストンには、相同性の高いが多型ではない亜種ヒストンバリアントが存在する。ヒストンの化学修飾と同様に、ヒストンバリアントはその存在がクロマチンの構造と機能に影響を与える。そのため、ヒストンバリアントがクロマチンに取り込まれる機構を明らかにすることは、クロマチンによるエピジェネティックな制御を解明するために重要である。主要型のヒストン H2A, H2B, H3, H4 は、DNA複製に伴いクロマチンが倍加する際に新たにクロマチンに取り込まれる(DNA複製依存的な取り込み)。一方で、ヒストンバリアントの一部は、DNA複製には依存せずにクロマチン中のヒストンと置き換わることで、クロマチンに取り込まれる(DNA複製非依存的な取り込み)。ヒストンの取り込みの解析は動態を解析することになるため、その機構を明らかにするためには生化学的に解析が必要である。これまでにタグ付きのヒストンを一過的に発現誘導することや低分子化合物で標識することで、ヒストンの動態を解析することが行われてきた。しかし、発現誘導してからヒストンが取り込まれるまでのタイムラグがあることや、新規に取り込まれたヒストンをゲノムワイドに解析するためには大量の細胞が必要であるなど問題があった。

今回、木村宏領域代表が以前に発表していた研究成果を参考にして、生細胞を固定せずに界面活性剤により処理して細胞膜と核膜に孔を開けた透過性細胞のクロマチンを基質としてヒストンの取り込みを解析する実験系 RhIP(Reconstituted histone complex Incorporation into chromatin of Permeabilized cell) アッセイを構築した。RhIP アッセイでは透過性細胞のクロマチンに試験管内再構成したヒストン複合体を反応させ、ヒストンの取り込みを生化学的に解析する。また、試験管内再構成したヒストン複合体は大腸菌を用いて発現させる際にエピトープタグを付加させることで、内在性のヒストンと区別を可能とし、新たに取り込まれたヒストンのみを解析することができる。

RhIP アッセイにてヒストンの取り込みを解析したところ、DNA複製非依存的なヒストンの取り込みは弛緩したユークロマチンで効率が高いが、ヘテロクロマチンでは効率が著しく低いことが分かった。DNA複製依存的なヒストンの取り込みはユークロマチンとヘテロクロマチンでの効率の差はなく、DNA複製と共役してクロマチンに取り込まれる主要型ヒストンはヘテロクロマチンに取り込まれるが、DNA複製と共役してクロマチンに取り込まれないヒストンバリアントはヘテロクロマチンに局在できないことが分かり、ヒストンの種類に依存することが分かった。

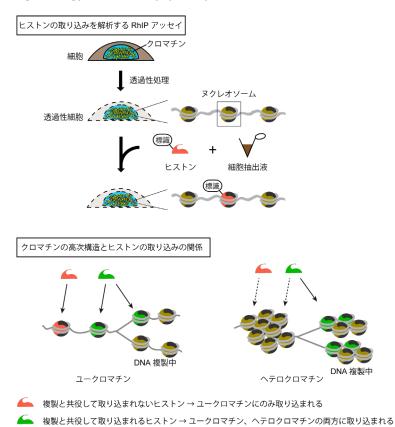
これらのことから、クロマチンの高次構造がヒストンの取り込みを制御していることが明らかとなった。さらに、ヒストンH2AのバリアントであるH2A.Z を透過性細胞のクロマチンにH2A.Z を反応させたところ、転写が行われている遺伝子の転写開始点およびエンハンサーに特異的に取り込まれた。これは内在性のH2A.Z と同様の局在のパターンであったことから、取り込みの時点でH2A.Z はDNA配列ではなくクロマチン上のエピゲノム情報を認識して集積していることが分かった。

#### 【今後の展望】

透過性細胞にすることにより、ヒストンの取り込みを生化学的に解析することが可能となった。また、RhIP アッセイではヒストンの取り込みには細胞抽出液が必要であったことから、細胞抽出液からヒストンの取り込みに関わる因子を同定することにより未だ明らかではないヒストンの取り込み機構の解明が期待される。また、H2A.Z がクロマチン上の転写活性化に関わるエピゲノム情報を認識して、クロマチンに取り込まれる性質を利用することにより、抗がん剤などの薬剤によって引き起こされるエピゲノム情報の変化を捉えられることが考えられ、薬剤の作用機序の解明に応用できることが考えられる。

以下、ニュースリリース情報です。

https://www.jfcr.or.jp/laboratory/pickup/index.html



文章と図は、がん研究所プレスリリースより改訂

■小布施力史計画研究分担の論文が Cell Reports誌に掲載されました。

# Protein Phosphatase 1 acts as a RIF1 effector to suppress DSB resection prior to Shieldin action

† Isobe SY, Hiraga SI, Nagao K, Sasanuma H, Donaldson AD, and \*Obuse C Cell Rep. 2021 Jul 13. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109383.

https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(21)00781-6

放射線などで生じたDSBを修復する仕組みとして、細胞はNHEJとHRの2つの経路を備えている。これらのNHEJによる修復とHRによる修復は、直す二本鎖切断の状況や場所によって、得意、不得意がある。例えば、DNA複製の阻害で引き起こされる二本鎖切断は、NHEJでは正常に修復できないのでHRで修復する必要がある。一方、HRによる修復は鋳型にする相同染色体が必要なため、細胞分裂に先立ってDNA複製が行われた後にしか機能しない。また、ヒトのDNAには反復配列などの良く似た塩基配列が数多く存在しており、それらの間でHRが起こってしまうと、染色体転座や欠損という変異を引き起こすこともある。そのため、実際の生物の細胞では2つの修復経路が巧みに使い分けられている。

二本鎖切断を2つの経路のどちらで修復するかは、DNAの「削り込み」を行うか(HR)、行わないか(NHE」)によって決まる。放射線などにより二本鎖切断が生じると、切断面には、MRE11、RAD50、NBS1という3つのタンパク質から成り立つ、MRNと呼ばれる削り込みを行う酵素が集まってくる(図:紫色のパックマン)。そして、CtIPというタンパク質(図:青色の丸顔)が、リン酸化(リン酸の印が付加)することによって、MRNに結合する。すると、MRNの酵素は活性化されて、HRによる修復のために必要な一本鎖DNAを露出するための削り込みを開始する(図上・中)。この仕組みに競合するようにはたらくのが、RIF1タンパク質である(図:緑の丸顔)。切断面にRIF1タンパク質が結合すると、削り込みが行われずNHE」による修復が選択される。最近の報告から、切断面に存在するRIF1にシールディン(Shieldin)というタンパク質(図:お相撲さん)が結合すると、削り込み途中の一本鎖DNAに集まることで、削り込みの「伸展」が止まり、削り込み部分を埋め戻すことで、HRによる修復を抑制してNHE」による修復が選択されることが明らかになった。

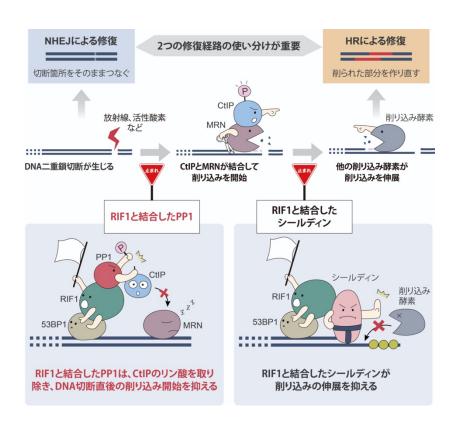
一方、削り込みが開始する前にもNHEJによる修復が起こることも知られている。シールディンは削り込み開始後の一本鎖DNAに結合してはたらくので、私たちは、RIF1にはシールディンの他にも結合するタンパク質があって、MRNによる削り込みの開始を抑制しているのではないかと考えた。

そこで本研究では、シールディン以外のRIF1に結合するタンパク質を質量分析により探索することにした。その結果、PP1という脱リン酸化酵素(図:赤い丸顔)がRIF1に結合するタンパク質として見出された。このPP1に着目して解析したところ、二本鎖切断が生じた直後のRIF1のはたらきにPP1が関与していることがわかった。具体的には、PP1がRIF1に結合して働くと、CtIP(図:青い丸顔)に付加されているリン酸(図:Pと書かれたピンクの玉)がはずされ、MRNに結合して削り込みの反応を活性化するという本来の働きができなくなる(図下・左)。すなわち、RIF1に結合したPP1はMRNによるDNAの削り込みの開始を抑制していることがわかった。

今回の私たちの発見から、細胞の中でDNAの二本鎖切断が起こると、DNAの切断面に集まった RIF1は、PP1を介して二本鎖切断直後にDNA末端の削り込みの「開始」を防ぐことと、削り込みの途中で、シールディンを介して削り込みの「伸展」を防ぐ、という2つの異なる方法によりHRに向かわせるDNA末端の削り込みを段階的に制御しているという、二本鎖切断直後の初動対応の様子が見えてきた。

以下、プレスリリース情報です。

https://www.sci.osaka-u.ac.jp/ja/wp-content/uploads/2021/07/pr20210714\_1.pdf



文章と図は、大阪大学プレスリリースより改訂

# 6. その他

■立和名博昭連携研究員が2021年(令和3年)日本生化学会奨励賞を受賞されました。大変おめでとうございます。

http://www.jbsoc.or.jp/support/encouragement

# 7. 今後の予定

# ■第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ

(当領域研究 共催)

日 時: 2021年10月22日(金)-23日(土) (オンライン開催)

**当領域研究者世話人**: 西谷 秀男(兵県大)、田中 克典(関学大)、小布施 力史(阪大)

事前参加・演題登録受付:2021年9月24日(金) 締め切り

要旨提出:2021年10月8日(金) 締め切り

発表は全て口頭発表とし、shortトーク(10-15分)とlongトーク(20-25分)

(それぞれディスカッション5分程度)を設けます。

参加登録(Google Form): https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLScfj-

ootoWOIPDXe4lpENksfwG6zCLJZmHFbR3936 tIvWlg/viewform

### ■第94回 日本生化学会大会

日 時: 2021年11月3日(水)-5日(金) (Web開催)

会 頭: 深水 昭吉(筑波大)

事前参加登録受付:2021年9月30日(木) 締め切り

Homepage: <a href="https://www2.aeplan.co.jp/jbs2021/index.html">https://www2.aeplan.co.jp/jbs2021/index.html</a>

### 当領域共催シンポジウム

「クロマチン構造による遺伝子発現制御機構」

オーガナイザー:胡桃坂 仁志(東大)、立和名 博昭(がん研)

# ■第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会

(当領域研究 共催)

日 時: オンライン口頭発表・ポスターディスカッション:2021年12月21日(火)~22日(水)

オンラインポスター閲覧:2021年12月18日(土)~23日(木)

**当領域研究者世話人**:木村宏(東工大)、落合博(広大)

参加・演題登録受付: 2021年11月14日(日) 締め切り

Homepage: <a href="https://www.chwsnudy.hiroshima-u.ac.jp/WP/">https://www.chwsnudy.hiroshima-u.ac.jp/WP/</a>

### ■第44回 日本分子生物学会年会

日 時: 2021年12月1日(水)-3日(金) (オンライン+オンサイト開催)

会場: オンライン+パシフィコ横浜

年会長: 塩見 美喜子(東大)

Late-breaking abstract受付: 2021年9月30日(木) 17:00 締め切り

事前参加登録受付: 2021年10月6日(金) 17:00 締め切り

Homepage: <a href="https://www2.aeplan.co.jp/mbsj2021/">https://www2.aeplan.co.jp/mbsj2021/</a>

#### 当領域研究者による指定シンポジウム

「RNAによる核内構造体とクロマチンの制御」

オーガナイザー: 胡桃坂 仁志(東大)、岩崎 由香(慶應大)

#### 当領域研究者によるワークショップ

「細胞スケールでの空間サイズの制御とその意味の理解」

日 時: 2021年12月1日(木) 09:00~11:15

オーガナイザー: 木村 暁(遺伝研)、原 裕貴(山口大)

「核小体から考える隔離系から混雑系の化学への発展」

日 時: 2021年12月2日(木) 09:00~11:15

オーガナイザー: 井手 聖(遺伝研)、斉藤 典子(がん研)

「種の個性を生み出す原動力とは何か?」

日 時: 2021年12月2日(木)15:45~18:00

オーガナイザー: 服部 佑佳子(京大)、中川 真一(北大)

「RNAと相分離の切っても切れない関係」

日 時: 2021年12月2日(木) 15:45~17:15

オーガナイザー: 山崎 智弘(阪大)、山崎 啓也(東大)

「細胞核を造る)〜再構成的アプローチによるクロマチン、染色体、細胞核の理解〜」

日 時: 2021年12月3日(金) 09:00~11:15

オーガナイザー: 山縣 一夫(近大)、原口 徳子(阪大)

#### 編集後記

東京2020オリンピック・パラリンピックでは、いくつかの競技がここ有明で行われました。日本を含め世界中の若い世代の悲喜こもごもがすぐそこで起きている、と感じ、研究の若手にも幸あれと願うのでした。 (NS)。

オリンピック・パラリンピックイヤーとなり、無観客やコロナ渦での中、自分の中では思った以上に、熱狂的な8月を過ごしました。ふと気が付くと、秋の模様になり慌てて、ニュースレターを編集しました・・・(TF)。