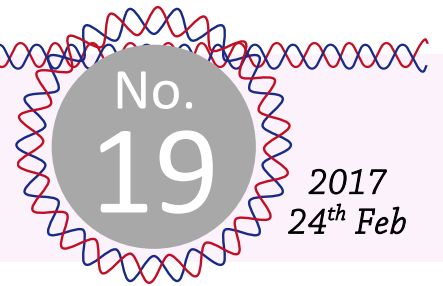


クロマチン動構造

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp>

News Letter



1. 成果紹介

- ① 河野らによる論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。
- ② 木村らによる領域内共同研究による論文が、Journal of Molecular Biology 誌に掲載されました。
- ③ 上田・山縣らによる領域内共同研究による論文が、Cell Reports 誌に掲載されました。
- ④ 胡桃坂領域代表らによる領域内共同研究による論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。

2. 学会報告：2016 Workshop on the Molecular and Physical Biology of Chromosomes

3. 国際活動支援班からの活動報告：Colorado/München/Basel

4. 受賞報告：加納公募研究代表が日本遺伝学会奨励賞を受賞しました。

5. 今後の予定

1. 成果紹介

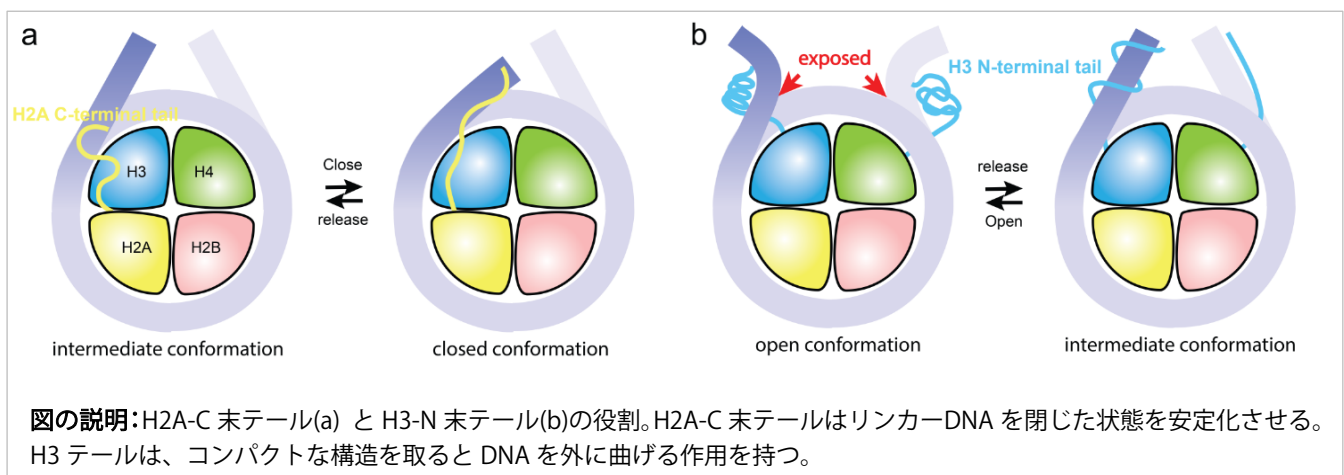
① 河野 (計画研究代表) らによる論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。

Distinct Roles of Histone H3 and H2A Tails in Nucleosome Stability

Li Z*, Kono H*

Scientific Reports 6:31437, DOI:10.1038/srep31437 (2016)
<http://www.nature.com/articles/srep31437>

ヌクレオソームに巻き付いた DNA は、呼吸するかのように開いたり閉じたりしていることが知られている。今回、コンピュータシミュレーションにより、この動きと H3 テールと H2A の C 末テールが深く関わっていることを見出した。H2A-C 末テールについては、基本的にリンカー DNA を閉じた状態を安定化すること、また、テールがリンカー DNA を触ると閉じた状態になり、ヌクレオソームコアに近い DNA の部分を触ると開いた状態になることが分かった。一方、H3 テールについては、テールが触る DNA の位置と DNA 開閉との相関は見られなかった。しかし、H3 テール構造と DNA の構造に次のような興味深い構造変化の関係が見られた。H3 テールがコンパクトな構造を取ると DNA を外側に曲げ、DNA に巻き付くもしくは DNA に沿って貼りつくことと DNA を硬く直線的にすることがシミュレーション結果から分かった。今後は、ヒストンの翻訳後修飾が、テール及び DNA の構造変化にどのような影響を与えるのかについて詳細に調べて行きたい。



② 木村 (計画研究代表)、浅川 (計画研究分担)、山縣 (計画研究分担)、上田 (公募研究代表)、原口 (計画研究代表)、平岡 (公募研究代表)、胡桃坂領域代表らによる領域内共同研究の論文が、Journal of Molecular Biology 誌に掲載されました。

A Genetically Encoded Probe for Live-Cell Imaging of H4K20 Monomethylation

Sato Y*, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Ohtsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura A, Kurumizaka H, Kimura H*

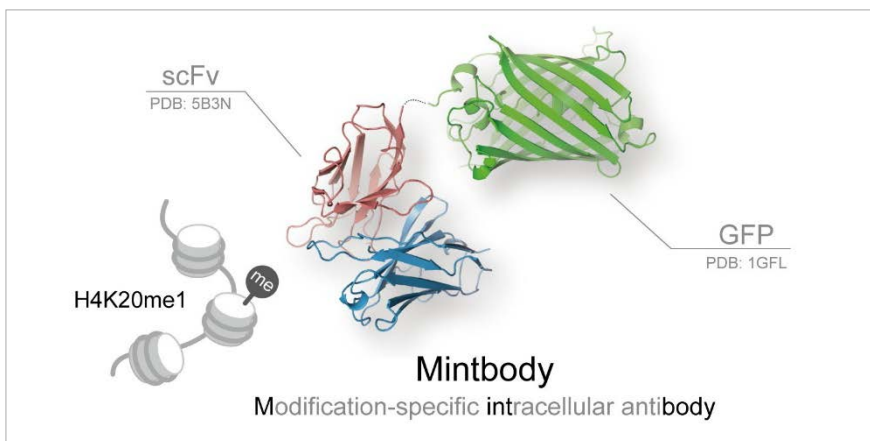
J Mol Biol. 2016 Oct 9;428(20):3885-3902. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.010.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283616303059>

従来、ヒストン修飾の検出法として、細胞を固定した後に修飾特異的抗体を反応させる方法が用いられている。しかしこの方法では、一個の細胞の中で修飾が変化していく過程を追うことは出来ない。例えばヘテロな細胞集団に紛れているごく少数の細胞に注目したい時、修飾のライブイメージングが出来ると便利である。我々はこれまで、修飾特異的抗体由来の生細胞プローブを開発し、蛍光顕微鏡を用いてヒストン修飾を観察・定量するシステムを樹立してきた。特に抗体の可変領域を single-chain variable fragment (scFv) として蛍光蛋白質を融合して細胞内に発現させたプローブ modification-specific intracellular antibody (mintbody) は、遺伝子改変動物を作製することで個体レベルの解析に応用可能である。

ヒストン H4 リシン 20 モノメチル化修飾 (H4K20me1) は、DNA 損傷修復や遺伝子発現制御、また X 染色体の不活性化などに関与することが報告されている。今回我々は、H4K20me1 特異的抗体 (CMA421/15F11) から mintbody の作製に成功した。CMA421 はもともと親和性・特異性の優れた抗体である (K_D 値 5.2×10^{-11} M)。リコンビナント scFv は、親和性は低下したものの (K_D 値 2.5×10^{-7} M)、高い特異性は維持されていた。さて問題は細胞内での標的特異性であるが、まず酵母の変異体を用いた解析により H4K20 メチル化特異的であることを明らかにした。また、培養細胞に SUV420H1 を発現させて H4K20me1 レベルを低下させた際に、H4K20me1-mintbody の核への集積が減少したことから、H4K20 メチル化の中でも H4K20me2 や H4K20me3 ではなく H4K20me1 に特異的であることが証明できた。

こうして無事に特異性が検証された H4K20me1-mintbody を使って、不活性 X 染色体 (inactive X chromosome; Xi) のライブイメージングを行った。mintbody は、細胞周期を通して Xi に結合し、Xi の生細胞プローブとして機能した。また、複製マーカー (Proliferating cell nuclear antigen; PCNA) と共に発現させることで、Xi の複製タイミングを明らかにした。さらに、線虫に H4K20me1-mintbody を発現させて発生過程におけるクロマチン構造の変化を観察できた。クロマチン制御における H4K20me1 の役割はまだ明らかでない部分が多いが、今回の mintbody プローブが機能解明に役立つと期待される。

今回は幸運にも細胞内で機能する mintbody が得られたが、たいていの場合は scFv の細胞内発現はうまくいかず、細胞質で凝集体を形成してしまう。抗体は本来細胞外へ分泌されるものなので、細胞内の環境では折り畳みの効率や安定性が著しく低下することが原因であると考えられる。H4K20me1-mintbody では、フレームワーク領域内のわずか 1 アミノ酸の違いにより、細胞内での安定性が著しく低下することが明らかとなった。結晶構造解析の結果、イムノグロブリンフォールド内の疎水性相互作用をより安定化させるようなアミノ酸置換により細胞内機能が改善することがわかった。今回得られた知見を道しるべとして、今後より多くの scFv の細胞内発現を成功させて、色々な修飾に対する mintbody を生み出していきたい。



③ 上田 (公募研究代表)、山縣 (計画研究分担)、大川 (計画研究代表)、木村 (計画研究代表)、胡桃坂領域代表らによる領域内共同研究の論文が、Cell Reports 誌に掲載されました。

Testis-Specific Histone Variant *H3t* Gene is Essential for Entry into Spermatogenesis.

Ueda J*, Harada A, Urahama T, Machida S, Maehara K, Hada M, Makino Y, Nogami J, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tanaka H, Tachiwana H, Yao T, Yamada M, Iwamoto T, Isotani A, Ikawa M, Tachibana T, Okada Y, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Yamagata K*

Cell Reports. 2017 Jan 17; 18(3): 593-600. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.065.
[http://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247\(16\)31772-7](http://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247(16)31772-7)

加齢と共にいずれはなくなる卵子とは異なり、年を経ても精子は存在する。これは、精巣の中に精子の“もと”となる幹細胞が存在し、それが自分と同じ幹細胞を作り出す細胞分裂 (自己複製) と、精子を作り出す細胞分化の両方の機能があるためである。この幹細胞の仕組みに何らかの異常が生じると、精子を作ることが出来なくなり最終的には無精子症となる。このたび、マウスをモデルに精子幹細胞が分裂はするが分化に異常が生じて結果的に無精子症になるメカニズムを明らかにした。

ヒストンタンパク質には異型種 (バリエーション) が存在し、各々が独自の機能や組織特異性を持っていることが明らかとなっている。精巣にのみ発現するヒトの *H3T* 遺伝子は今から約 20 年前 (1996 年) に発見されており、2010 年に胡桃坂仁志領域代表のグループによって立体構造と生化学的性質が解明された (Tachiwana, H., *et al.*, *PNAS*, 2010)。しかし、*H3T* 遺伝子の生体内での機能は長らく不明のままであった。その理由は、ゲノムプロジェクトが 2002 年に完了していたにも関わらず、ヒトの *H3T* に相当する遺伝子がマウスで見付かっていなかったからだ。このような中、2015 年に大川恭行計画班員のグループによって新規のヒストン遺伝子のバリエーションが多数発見され、偽遺伝子だと考えられていたものの一つが *H3t* 遺伝子であることが明らかとなった (Maehara, K., Harada, A., *et al.*, *Epigenetics & Chromatin*, 2015)。

今回我々は、偽遺伝子だと思われていた *H3t* 遺伝子がタンパク質をコードし、精子幹細胞が分化すると *H3t* が発現し (図)、精子を作るのに必要不可欠であることを明らかにした。ところが、成熟した精子からは *H3t* タンパク質が消えていた。*H3t* を失ったマウスは見かけ上全く正常に発育し健康だったが、雄が無精子症となり、完全に不妊になることが明らかとなった。このことから、*H3t* 遺伝子は精子を作るために特化した (精子作りが完了するとなくなる) ヒストンタンパク質をコードしていると考えられる。さらに、このヒストンタンパク質と DNA の複合体の構造解析から、体細胞に存在する通常のヒストン-DNA 複合体に比べて、その結合がやや弱いことが明らかとなり、この精巣だけで見られる特殊なヒストンの化学的性質が精子幹細胞から精子が形成されない原因であったと推測される。

ヒストン H3 タンパク質は様々な翻訳後修飾を受けて、エピジェネティクスに深く関わるということが知られているが、翻訳後修飾酵素の基質であると考えられてきたヒストン H3 タンパク質にも多様性があり、ある特

定の細胞種 (今回の場合は精子) への分化に必須の役割を果たしているという事実は、エピジェネティクスの階層性を考える上で今後重要な概念になってくるものと考えられる。

本研究の成果は日刊工業新聞、毎日新聞、産経新聞、朝日新聞、中日新聞、日経新聞、東海テレビ、NHK (中部 7 県) などに取り上げられた。

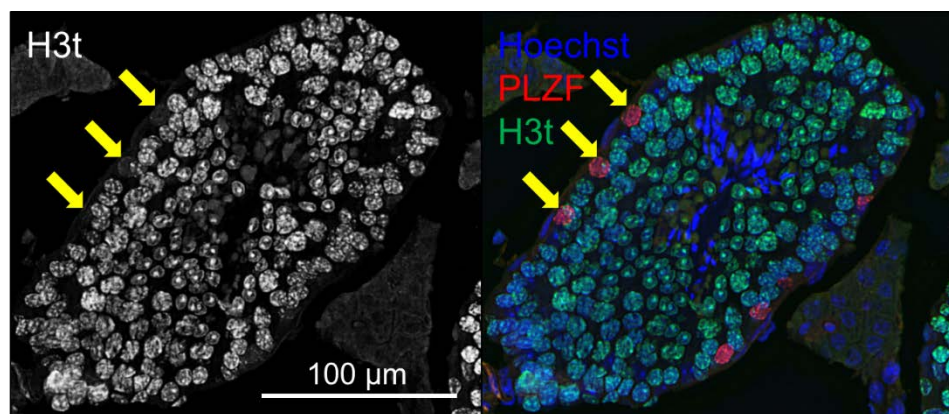


図. *H3t* に対する特異的抗体を用いた精巣切片の免疫染色画像。幹細胞 (PLZF 陽性細胞、赤色) に *H3t* タンパク質は発現しておらず、分化した細胞に発現している (緑色)。

④ 胡桃坂領域代表と菅澤 (公募研究代表) らによる領域内共同研究の論文が、Scientific Reports 誌に掲載されました。

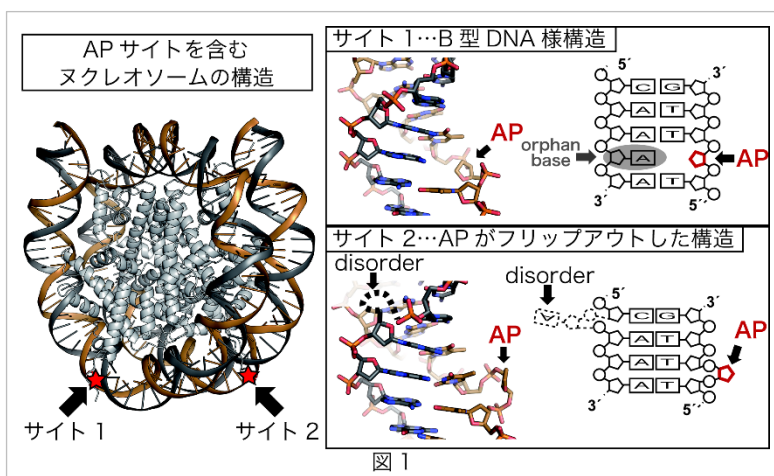
Polymorphism of apyrimidinic DNA structures in the nucleosome.

Osakabe A, Arimura Y, Matsumoto S, Horikoshi N, Sugasawa K, Kurumizaka H*

Sci Rep. 2017 Jan 31;7:41783. doi: 10.1038/srep41783.
<http://www.nature.com/articles/srep41783>

脱塩基部位 (apurinic/apyrimidinic site : AP site) は、DNA から塩基が脱落する DNA 損傷で、真核生物の細胞では 1 日あたり数万箇所もの AP site がゲノム DNA 上に形成されている。AP site が生じると、通常、その向かいには相補する塩基を持たない塩基(orphan base)が生じることになる。AP site の修復に関わる酵素である AP エンドヌクレアーゼは、orphan base を認識して AP site に特異的に結合し、5'側のホスホジエステル結合を加水分解することが知られていた。しかし、AP site が、クロマチンの基盤構造であるヌクレオソームにどのように収納されているのかは明らかになっていなかった。

本研究では、AP site の安定化アナログであるテトラヒドロフラン (THF) を対称的な 2 箇所の位置に導入した DNA を用いてヌクレオソームを再構成し、その立体構造を X 線結晶構造解析によって 2.5 Å の分解能で明らかにした。驚くべきことに、結晶構造中で 2 箇所の AP site はそれぞれ異なる構造を形成していた。1 つ目の AP site (図 1、サイト 1) は、これまでの DNA の構造解析でも観察されていた通り、B 型 DNA 様の構造で、orphan base が形成されていた。



一方で、2 つ目の AP site (図 1、サイト 2) では、リン酸およびデオキシリボース残基が DNA 2 重らせん構造からフリップアウトするとともに、本来の orphan base が隣の塩基と新たに塩基対を形成することで、いわゆる inchworm 構造を形成していた。今回使用した DNA は 5'-TTTT-3'の連続配列の中に AP site を導入しているため、サイト 2 において、本来 orphan base を形成するはずのアデニン塩基が、1 つ隣の塩基対の相補鎖のチミン塩基と塩基対を形成することができたと考えられた (図 2)。そのため、AP site を含まない DNA 鎖では、AP site から数えて 2 塩基離れたところに位置するチミン塩基と対合するはずであったアデニン塩基がフリップアウトしていた (図 2)。

今回報告した AP site を 2 箇所含む 145 塩基対の DNA を用いて再構成したヌクレオソームでは、2 つの AP site のうち、片方のみが inchworm 構造を形成していた。一方で、147 塩基対の DNA を含むヌクレオソームの構造中では 2 つの AP site の両方が inchworm 構造を形成することが、プレリミナリーな解析から明らかになっている。このことから、我々は、ヌクレオソーム中で塩基配列が連続した部位に AP site が導入された場合は、inchworm 構造が優先的に形成されると考えている。

AP site が inchworm 構造を形成した場合、orphan base が形成されないために、AP エンドヌクレアーゼ

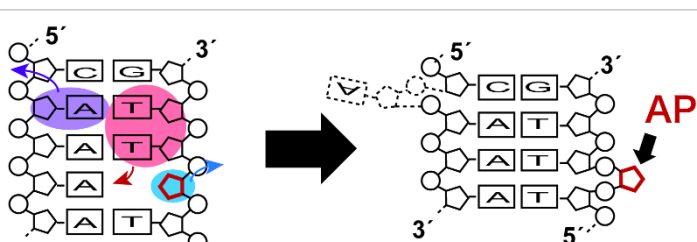


図 2

によって AP site に鎖切断を導入し、修復を開始することが困難になると考えられる。細胞内において、inchworm 構造を形成した AP site は、ヌクレオソーム中では修復されないのか、それとも inchworm 構造を修復するための特別な機構が存在するのか、今後の解析が期待される。

2. 学会報告

“2016 Workshop on the Molecular and Physical Biology of Chromosomes”に参加して



図1. 下村博士がクラゲを捕獲したとされるヨットハーバー

ヨンの一つにしており、Shinya Inoue が長年開催してきた顕微鏡のコースがイメージングの分野では有名で、イメージング分野の研究者にとって、まさに聖地のような研究所です。筆者は、ずっと以前、約30年前に顕微鏡のコースに応募して、締め切りを過ぎているという理由で断られて以来、初めて憧れの聖地にやってきました。ボストンから北に車で2時間 Woods Hole に到着し、徒歩で MBL の敷地にはいると、Lecture Hall の屋根の上で星条旗が半旗になっているのに気付く、9月11日であることに思い至りました (図1)。

会議は11日の夜のセッションから始まり、16日の朝まで、9つのセッションが開かれ、約40演題の口頭発表が行われました。アメリカをはじめ、カナダ、イギリス、フランス、ドイツ、スイス、オーストリア、日本などから、この分野の第一線で活躍する研究者が参加しました。日本からは、筆者を含めて4名が参加しました。この会議は、一般に参加を呼びかけず、招待された者だけが集まる非公開の会議です。私が呼ばれたのは、Nancy Kleckner が「そろそろ新しいデータが出ている頃だろうと思って」ということでした (私の発表は図2のとおり)。ほとんどの発表は未発表の内容で、アブストラクトは求められず非公開であるため、個別の発表の内容の詳細に紹介することはしませんが、大まかにいうと、イメージングや3C・HiCのほか polymer model に基づく染色体の核内配置に関する研究や、in vitro での染色体再構築の話などが繰り広げられました。印象に残ったのは、染色体と核質の間の “phase separation” という考えや表面化学など物理化学や数理学に基礎を置く、様々な新しい概念に接することができ、知性と感性を刺激する日々でした。(大阪大学 平岡 泰)

☞2016年9月11日から16日まで、アメリカ東海岸にある Woods Hole Marine Biological Laboratory (ウズホール海洋生物学研究所) で “2016 Workshop on the Molecular and Physical Biology of Chromosomes” が開催されました。オーガナイザーは、Nancy Kleckner、Kiyoshi Mizuuchi、Job Dekker、Francois-Xavier Barre、Claire Wyman の面々。本会議は、染色体や細胞核の物性について分子生物学と数理生物学の観点から研究する研究者が集う分野融合的な会議で、本領域からは公募班員の平岡泰が参加しました。

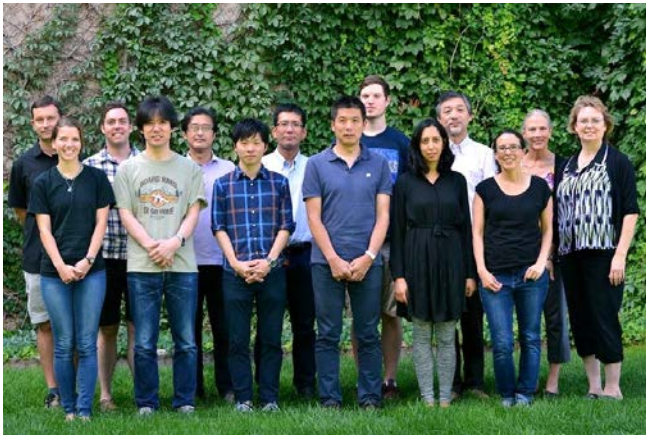
Marine Biological Laboratory (MBL) は、様々な講習会を科学コミュニティーに提供することをミッシ



図2. 参加者の間で「太陽の塔」が話題になった筆者のタイトルバック

3. 国際活動支援班からの活動報告

■ Colorado chromatin meeting



2016年8月8日、アメリカ合衆国のコロラド州フォートコリンズにて開催されました Colorado Chromatin Meeting に参加しました。このミーティングは本領域と、コロラド州立大、コロラド大学デンバー校、コロラド大学ボルダー校の研究者から構成される Institute for Genome Architecture and Function との共同シンポジウムとして開催されました。本領域からは、九州大学の^{大川恭行}先生、東京工業大学の^{木村宏}先生、佐藤優子さん、量子科学技術研究開発機構の^{河野秀俊}先生、東北大学の^{原田昌彦}先生、早稲田大学の^{胡桃坂仁志}先生、加藤大貴（筆者）が参加し、

コロラド界隈のクロマチンの研究者と密にディスカッションをしました。また、コロラドの学生も多数参加し、活発な議論が行われました。演題としては、ヒストン修飾やクロマチン構造、non-coding RNA、ヒストンシャペロンなど、クロマチンに関する幅広い研究内容が発表されました。未発表データも多く紹介され、クロマチン研究の第一線の研究室での現在の研究の様子を知ることができ、大変刺激を受けました。特に Tingting Yao 博士のヒストンのユビキチン修飾の認識に関する発表や、Karolin Luger 博士の古細菌のクロマチン構造に関する発表などが印象に残りました。その他にもセントロメアに関する発表や、ヒストンシャペロン Spn1 や CAF1 に関する発表、HOTAIR などの non-coding RNA に関する発表など、興味深い発表がたくさんありました。また、昼にはポスター発表の時間が設けられました。私はポスター発表をさせていただきました。初めての海外学会で不安もありましたが、とてもアグレッシブに質問してくださる方や親切にアドバイスをしてくださる方が多く、大変有意義な時間を過ごすことができました。また、第一線で活躍される先生方とディスカッションをすることができ、大変刺激を受けました。発表されている方々が、とても熱く自身の研究を紹介し、オーディエンスも熱く議論しているのが印象的でした。

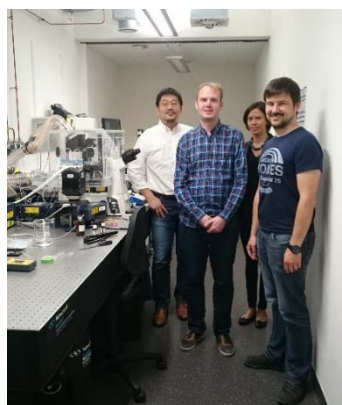
ミーティングが行われたフォートコリンズは、文化と自然が共存しており、とても美しい街並みでした。このような環境で存分に研究に関するディスカッションができたのは、とても良い経験になりました。

（早稲田大学・胡桃坂研 加藤大貴）

■ München

2016年9月1日から約1週間、本新学術領域の木村（東工大）と山縣（近畿大）が、ヘルムホルツセンター（Helmholtz Zentrum München）、Institute of Epigenetics and Stem Cells の Maria-Elena Torres-Padilla 博士の計らいにより、ドイツ・ミュンヘンに滞在しました。その間、木村と山縣は、セミナーを行ったほか、ヘルムホルツセンターやミュンヘン大学（Ludwig Maximilian University of Munich）の多くのクロマチン研究者と情報交換を行いました。また、山縣は、Torres-Padilla 博士の研究室で哺乳動物初期胚のイメージング手法に関する技術指導を行いました。更なる交流を行うため、2017年秋に本新学術領域とヘルムホルツセンターとの合同シンポジウムの計画が進むなど、非常に有益な滞在でした。

（近畿大学 山縣一夫）



■ Swiss-Japan Symposium “Chromatin Structure and Dynamics”

2017年1月20日にスイス、バーゼルの Friedrich Miescher Institute (FMI) で開催された、Japan-Swiss Symposium “Chromatin Structure and Dynamics” に参加しました。FMI は製薬企業である Novartis 社の研究所であり、細胞核から核酸を発見した Johannes Friedrich Miescher 博士の名前から命名された由緒ある、今回のシンポジウムテーマである Chromatin Structure and Dynamics の論議の場としては理想的な研究所です。研究所の入り口には Miescher 博士の写真が飾られ、その前方には FMI の実績を示す数多くの最近の論文が並び、圧倒される



一方で、その中には日本人研究者の名前もいくつか見られ、誇らしくも感じました。本領域からは阪大・平岡泰教授、東工大・木村宏教授、早稲田大・胡桃坂仁志教授、神戸大・菅澤薫教授、東北大・原田昌彦准教授が参加し口頭発表を行いました。また、胡桃坂研の有村泰宏助教、小山昌子助教と原田研の山崎祥他（筆者）は若手研究者としてショートトークを行いました。また FMI からは、6 題の講演がありました。

筆者を含め、発表内容には DNA 損傷修復に関する演題が多くありました。FMI 所属の発表者である Michael Hauer 博士 (Susan Gasser Lab) は DNA 損傷に応答したヒストンの分解について報告し、同研究室の Ishan Deshpande 博士は、ssDNA へ RPA が結合するための Platform 構造として、Mec1-Ddc2 ダイマーの重要性を発表していました。DNA 損傷修復を専門にする研究者は本領域にも多くいらっしゃいますが、最近では修復過程に加え、細胞核内の Platform のような「修復の場」が注目され始めているように感じます。このシンポジウムの FMI 側のオーガナイザーであり、また FMI 所長である Susan Gasser 博士は、出芽酵母を用いて、ヘテロクロマチン領域の損傷を受けた DNA が、ユークロマチン領域、さらには核膜の NPC まで relocation した後に修復されるモデルを提唱し、適切な修復の場の重要性について指摘しています。今回の発表者を含む Gasser Lab の研究は、複数の変異出芽酵母を用いた解析に基づいており、改めてモデル生物としての出芽酵母の有用性について考えさせられました。その一方で、脊椎動物由来のより大きな細胞核内の修復場を発見することができれば、詳細な DNA 損傷修復メカニズムを解明するブレイクスルーになるのではないかと筆者は考えています。

FMI 所属の発表者としては、菅澤研究室出身の Syota Matsumoto 博士 (Nicolas Thomä lab) も参加していました。Matsumoto 博士は FMI に所属してからの期間は短いとのことでしたが、DDB2 が DNA 損傷部位を認識する構造に関する素晴らしい発表をされ、同じ若手研究者としては負けられない気持ちと共に、とても良い刺激になりました。

シンポジウム翌日以降も、日本からの参加者と FMI 研究者との研究打合せが随時行なわれ、今回のシンポジウムが、今後のスイスと日本の国際共同研究の進展にも大いに寄与することが期待されます。

シンポジウムの期間はスイスでも記録的な寒波に見舞われ、夜には-10℃以下と厳しい冷え込みでした。しかし、会場となった FMI の近くにはライン川が流れ、哲学者のニーチェや心理学者のユングを生み出した



スイス最古のバーゼル大学があり、このような歴史がある環境で、最先端のクロマチン研究について議論できたことを嬉しく思います。最後になりますが、今回のシンポジウムの FMI 側のとりまとめをしていただいた Kenji Shimada 博士 (Gasser Lab) に、感謝いたします。

(東北大学・原田研 山崎祥他)

4. 受賞報告

加納純子・公募研究代表が遺伝学会奨励賞を受賞しました。授賞式は日本遺伝学会 第 88 回大会 (9 月 7・8 日) において行われました。



5. 今後の予定

■ 3 領域合同若手勉強会

クロマチン動構造に加えて以下の 2 領域との合同開催になります。

- ・生殖エピゲノム (篠原班) <http://reprod-epigenome.biken.osaka-u.ac.jp/>
- ・ステムセルエイジング (岩間班) <http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/molmed/stemcellaging/>

日時：平成 29 年 6 月 7 日 (水) ～ 9 日 (金)

場所：紀州・白浜温泉むさし (<http://www.yado-musashi.co.jp/>)

※詳しくは 3 月末にクロマチン動構造ホームページでご案内いたします。

編集後記：長らくご無沙汰しておりましたが、ようやく 19 号を発行することができました。年末・年始の休みも、溜まっていた宿題を片付けるのに精一杯かつ体調不良で、結局年賀状を出しそびれてしまいました。この間、領域から多くの論文が発表されたため、今回はいつもより多目に紹介しています。また、昨年度採択された国際活動支援班のサポートにより、多くの国際活動が展開されました。本領域の残りもあと 1 年と少しですが、引き続きよろしく申し上げます。

HiKi