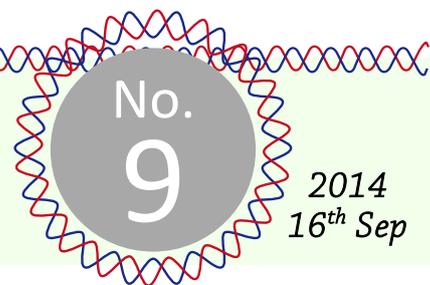


# クロマチン動構造

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

## News Letter

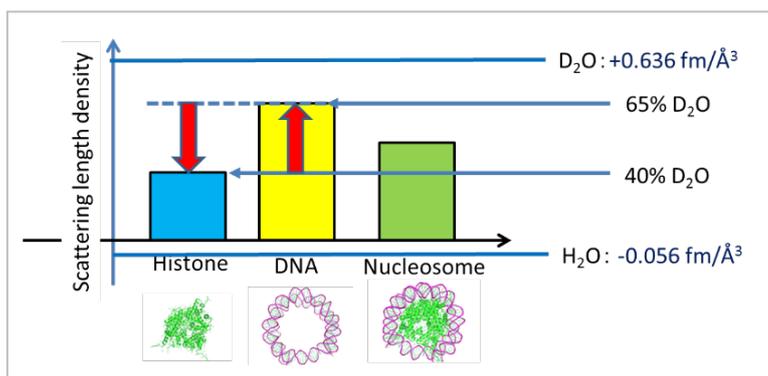


1. 公募班の研究紹介: 京都大学・松本 智裕、京都大学・杉山 正明
2. クロマチン動構造班会議・若手の会ワークショップの報告
3. 学会報告: ①Plant Genome Stability and Change、②CSHL Meeting: Nuclear Organization & Function
4. 成果紹介: 堀班員らの領域内共同研究による論文が、Developmental cell 誌に掲載されました。
5. 寄稿: ロックフェラー大学・船引 宏則
6. 異動のお知らせ
7. 今後の予定

## 1. 公募班の研究紹介

### 【CV-SANS 法による変異型ヌクレオソームの詳細構造解析】

研究代表者: 杉山 正明 (京都大学 原子炉実験所)



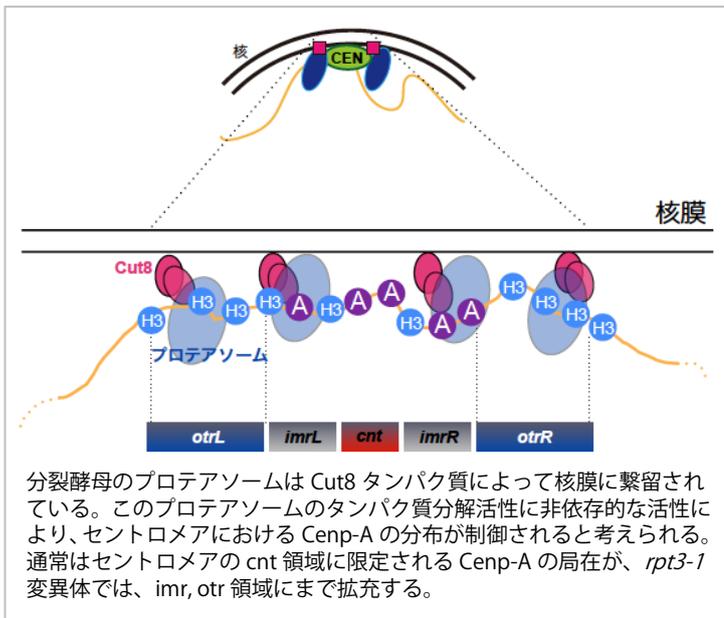
小角散乱法は低分解能ではあるが溶液中での生体分子構造を直接観測することが可能な手法である。プローブとして中性子線を用いる場合、中性子散乱における軽水素と重水素の散乱能違いを利用することができる。例えば軽水の散乱能(負)と重水の散乱能(正)は大きく異なり、両者を適当に混合することで溶媒に任意の散乱能を与えることができる。一方、生体高分子もその構成原子の違いにより散乱能が異なり、DNA とタンパク質の散乱能はそれぞれ 65%と

40%の重水の散乱能と一致する。したがって、両者の複合体であるヌクレオソームを 65%(または 40%)重水溶液中で観測すれば、複合体中のヒストン(または DNA) のみの構造を測定することができる(コントラスト変調中性子小角散乱法: CV-SANS)。筆者と胡桃坂研の共同研究チームはこの手法により H2A.B を含む変異型ヌクレオソームにおいて、ヒストンテールの配置が通常型のヌクレオソームと異なっている事を見出した。今後は他の変異型ヌクレオソームの動的構造変異の観測に適用したい。さらに、この「特定の生体分子を浮き上がらせる手法」は多くのクロマチン繊維中の単一のクロマチンの構造観測も原理的には可能である。この手法の実現の可能性も検討していきたい。

### 【核膜アンカーに依存したセントロメアクロマチン制御機構の解析】

研究代表者: 松本 智裕 (京都大学 放射線生物研究センター)

ほとんどの真核生物で、セントロメアは染色体あたり 1 箇所存在し、その大きさも厳密に制限されている。ヒストン H3 バリエーションである CENP-A は、セントロメアの一領域に局在し動原体形成の根幹をなす。CENP-A の局在をセントロメアの一領域に制限する機構が存在すると予測されるがその実体は不明であった。この機構の解明を目的として、分裂酵母を用いて Cnp1/CENP-A を過剰発現時に高温感受性を示す変異体のスクリーニングを行った。変異体の一つの原因遺伝子が 19S プロテアソーム調節サブユニット(19S RP)の構成因子、Rpt3 であることを明らかになった。分裂酵母 Cnp1 の局在領域はセントロメアの中央コア領域 10-20



kbに制限されているが、*rpt3-1* 変異体セントロメアにおいては40-70 kbに広がっていた。分裂酵母Rpt3は主に核膜に局在するが、変異Rpt3-1は核膜局在が低下し、さらにセントロメアに対する結合も同様に低下した。Rpt3がセントロメアに結合することによってCnp1の取り込みの制御がなされ、結果として適切なCnp1の局在領域が制限されると考えられる。Rpt3を含むプロテアソームは、タンパク質分解活性に非依存的なクロマチンリモデリング活性により、転写制御やDNA損傷修復に機能することが種々の生物で示されている。おそらく、本研究で示したプロテアソームによるCnp-Aヌクレオソームの分布制御も、類似の作用機序によるものであると考えられる。

## 2. クロマチン動構造班会議・若手のワークショップの報告

### 新学術領域研究「クロマチン動構造」第2回班会議・総括班会議報告

「クロマチン動構造」第2回班会議が、7月3日から5日の日程で、北海道サホロリゾートホテルで開催されました。今年度から公募班の研究もスタートし、計画班代表、計画班分担の報告も合わせて、32題の研究報告がありました。参加者も58名と、第1回班会議と比べて大幅に増えたと同時に、今回は若手シンポジウムから引き続いての開催となったこともあり、学生や若手研究者の参加者数と存在感が増していました。公募研究の開始によって、クロマチン動構造をさらに多様な手法と対象から解明する研究が報告されました。すべての報告について、活発な質疑応答が行われ、その中には新たな共同研究の可能性も多く指摘されました。また、「アウトリーチを考える」と題した特別講演を、高崎健康福祉大学・片山豪博士が行いました。講演では、高校生のセントラルドグマの理解を深めるための転写・翻訳を可視化する教材を例に意義や問題点、さらに本領域における先端研究を教材化する意義についても紹介がありました。今後、本領域でもこのようなアウトリーチ活動を活発に展開していく必要性を感じました。これらの講演の合間に設けられたコーヒブレーク、意見交換会、フリーディスカッションでは、じっくりと腰を据えた班員間の意見交換が頻繁に行われ、今後の活発な共同研究によりクロマチン動構造の理解がさらに深まることへの期待が感じられました。班会議の期間中、2回の総括班会議が開かれ、第2回一般公開シンポジウム(2015年1月12日、千里ライフサイエンスセンター)、第3回班会議(2015年5月14日~16日、北海道)、クロマチン動構造国際会議(2015年8月23日-26日、淡路夢舞台国際会議場)について、日程と開催地を決定し、その概要についても意見交換がされました。

また、参加した評価委員からは、本領域の活動と今回の班会議について、以下のコメントがありました。「班員の研究分野のバランスが良い。質疑応答も活発で、厳しい意見が出ることもあったが、全体的な雰囲気は良かった。」「グループ間の緊密な共同研究・ネットワークをもとに成果が着実につつある。」「本領域外への情報発信の積極的な姿勢がうかがえた。」「情報公開や公開シンポジウムを積極的に進めている。」「班会議の場で若手研究者に研究室マネジメントのノウハウを伝えていくことも必要ではないか。」

班会議期間中には北海道の大自然に触れる企画も用意されており、参加者はそれぞれに北の大地に癒され、また新たな研究活力をインスパイアされて、それぞれの研究室に戻っていききました。最後に、今回の班会議をオーガナイズした小布施班員と研究室メンバーの皆様、お疲れ様でした。

(東北大学・原田昌彦)



## 第2回 若手の会「クロマチン動構造 若手交流ワークショップ」



班会議に先立ち、同じサホロリゾートにて若手の会主催の「クロマチン動構造 若手交流ワークショップ」が開催されました。今回が実質的には初めての交流会となりましたが、自己紹介を兼ねた研究紹介、研究不正をテーマにした座談会、英語論文作成講座、エクスカッション、と充実した内容でおこなわれました。開催後のアンケートでは87%が「とても良かった/良かった」という感想でした。

2014年7月2・3日の2日間に渡り、北海道の十勝サホロリゾートにて、本領域の第2回若手の会「若手交流ワークショップ」が開催されました。第1日目には本ワークショップに参加した27名の若手会のメンバーが口頭発表をしました。今年度から、若手の会に多くの新メンバーが加わったこともあり、冒頭に自己紹介を含めた形式で発表が進められました。今回は27名もの大勢の若手研究者が発表するだけあって、研究手法も様々でした。超解像顕微鏡を用いたイメージング技術、質量分析を用いたプロテオミクス解析、試験管内でのヌクレオソーム再構成系、ChIP-seqなど各ラボ独自の手法を駆使して研究が進められており、聴衆は発表に終始惹き付けられていました。どの発表においても研究の導入部分から現状までが丁寧に説明されていたため、質疑応答も活発に交わされ、今後の研究の発展が大きく期待されました。以下に発表のいくつかを紹介します。

真核生物のゲノムDNAは、ヒストン8量体の周囲にDNAが巻き付いたヌクレオソームを構造基盤とし、それらが更に高度に折り畳まれたクロマチンとして核内に収納されています。発生・分化が進み、個体が形成されていく過程では、ヒストン修飾の変動に伴ってクロマチン構造も動的に変化し、遺伝子発現が調節されています。佐藤優子会員は、ヒストン修飾の生体イメージングを可能にすることで、個体発生に伴うヒストン修飾のダイナミクスについて報告し、それらヒストン修飾の変動のタイミングと転写との関連性について議論が展開されました。また、ヒストンバリエーションの組み合わせによっても、クロマチンの構造や機能が制御されており、ヒストンバリエーションの過剰発現や変異は発がん等の原因となることも明らかになりつつあります。有村泰宏会員はヒストンバリエーションおよび変異型ヒストンを含むヌクレオソームを試験管内で再構成し、生化学的・構造学的解析から、ヌクレオソームレベルでのクロマチン構造について報告しました。

ヒストン修飾やバリエーションのほかに、DNAのメチル化状態によってもクロマチン構造や転写調節は制御されています。上田潤会員はメチル化されたDNAを認識するMBD1タンパク質にレポーターを融合した遺伝子を全身性発現するマウス個体とライブイメージングを組み合わせることにより、発生過程を通してDNAのメチル化状態を視覚的に示しました。今後は、細胞分化時においてDNAのメチル化状態により構成されるヘテロクロマチンの動態を解析することなどが期待されています。

細胞がストレスにさらされDNA損傷が生じた場合においても、クロマチン構造は動的に制御されることが注目されています。真核生物には二重鎖DNA切断損傷の修復機構として、相同組換え修復や非相同末端結合修復が備わっており、特に相同組換え修復はDNA損傷を正確に修復するために必須な機構です。しかし、修復時のクロマチンの高次構造の変化や修復が行われる場所については未解明な点が多く残されています。堀越保則会員、福戸敦彦会員は超解像顕微鏡を用いて従来の光学顕微鏡の10倍もの分解能を実現させ、核内ドメインの詳細な構造解析を可能にしました。これにより、損傷クロマチン動態を詳細に解析し、DNA損傷の修復機構の解明に取り組んでいることを報告しました。発表後の懇親会では発表時間内だけでは終えることのできなかったディスカッションや普段の研究生活などについても話が及び、和やかな雰囲気ですることができました。懇親会後半になると、山縣一夫先生（大阪大学）を囲んでの座談会が行われ、研究の取り組み方について深く議論しました。

2日目には木村宏先生（東京工業大学）による「英語で正確に表現するために」と題した英語論文作成講座が開催されました。ここでは、英語論文作成時において、主張の表現の仕方や誤りがちな微妙なニュアンスの違い、更にはパラグラフを意識することの大切さを



教わりました。講座を終えたあとには、サホロの美しい自然を散策し、若手研究者間の交流を深めました。本ワークショップでは若手研究者による活発な発表や質疑応答のみならず、英語論文の作成講座、研究の取り組み方についての議論なども行われ、我々参加者にとって、今後の研究生活において大変有意義な会となりました。(東京大学・大杉研 渡邊大士)

### 3. 学会報告

#### Plant Genome Stability conference 2014



2014年7月17-21日まで、“Plant Genome Stability and Change 2014”が開催されました。本領域からは、招待講演者として胡桃坂仁志領域代表が参加し、小林(胡桃坂班)がポスター発表者として参加しました。本会議は、アメリカ西海岸、アシロマの“Asilomer conference center”で行われました。アシロマと言えば、1975年にポール・バークらによって行われた、アシロマ会議を思い浮かべる方が多いかと思います。その科学史で有名な場所での、ミーティングに参加できたことは非常に感慨深く、過去を想像せずにはいられませんでした。

ミーティングは約100人程度の小規模で行われ、日本からの参加者も数多く見られました。また、国内企業の方が最新の技術や知識の吸収のために、訪れている様子が伺えました。本会議では、題名どおり、植物におけるゲノムの安定的維持及び、次世代への遺伝的継承について活発に議論がなされました。セッションは主に、「クロマチン構造」、「減数分裂」、「DNA 損傷応答及び修復」の三項目にわかれ、議論が交わされました。まず、ミーティングはPlenary speakerとしてHenikoff博士を迎え、始まりました。Henikoff博士は酵母や線虫をはじめとした、CenH3 特異的なクロマチン構造に関する報告をしました。減数分裂のセッションでは、ChIP-seq法を用いたゲノムワイドな解析が目立ち、組換えホットスポットやキアズマの形成部位に関する報告がなされていました。Pawlowski博士は、トウモロコシの組換えホットスポットにおいては、既に動物細胞で組換えホットスポットのマーカーと知られている、H3K4me3のヒストン翻訳後修飾が見られることを報告しました。また、Chales博士は、シロイヌナズナにおけるRAD51及びDMC1の機能的差異を遺伝学的解析及び細胞学的解析から示しました。さらに、胡桃坂代表は、イネにおけるRAD51及びDMC1両者の機能的差異を生化学的解析より示しました。DNA損傷応答のセッションでは、転写因子であるSOG1の報告が興味深いものでした。SOG1は動物細胞におけるp53と類似した機能を有しているのですが、そのアミノ酸の保存性は低く、植物独自の進化的変遷を辿っていることが示されました。会議の後半では、植物におけるゲノム編集技術に関する報告がなされました。特に、近年急速に発達しているCRISPER/Cas9を用いたゲノム編集技術の改良や応用例について議論が交わされ、ポスターセッションでも特にこのゲノム編集技術に関する報告が多い印象でした。植物は、酵母と比較してノックアウト株を作製するのに時間を要することから、効率的なゲノム編集技術の重要だと言えます。

今回は植物の学会への初参加でしたが、ポスター発表では海外の研究者の方々に興味を持って頂き、助言を頂くなど大変貴重な体験を経ることができました。また、会議を通して、植物は動物とは異なる独自の進化を遂げていることから、動物からは知り得ない生命現象を発見しうる宝庫であるように感じました。今回のミーティングは、自分の中の視野が大きく開けた有意義なものとなりました。また機会があれば是非参加してみたいと思います。(早稲田大学・胡桃坂研 小林航)

#### Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Nuclear Organization & Function

2014年8月19日から23日まで、アメリカニューヨーク州ロングアイランドにあるCold Spring Harbor研究所で開催された“2014 meeting on Nuclear organizations & Function”に参加致しました。研究所は、多くの緑と海に囲まれた非常に自然豊かな場所にあり、建築物にはDNAのらせん構造やリボソームのタンパク合成を模した工夫などがあり、研究の歴史と創造性を感じました。休憩時間に散歩するにもとても気持ちがよく、この様な環境であれば研究にも集中でき、アイディアもたくさん浮かぶのではないかと思います。



ミーティング会場からワイン&チーズへの散策道。  
キャンパスは緑にあふれていました。

ミーティングの内容は、細胞周期と DNA 修復、核膜や核膜孔複合体、核内 RNA、エピジェネティクス、発生と疾患など多岐に渡り、動物に限らず、植物を対象にした研究もありました。私は細胞核内構造体の形成と機能に関心があり、特に核小体に関する発表が興味深かったです。核小体の形成にはポリメラーゼ I による rRNA の転写が必要ですが、Maiwen Caudron-Herger 博士らは、アクチノマイシン D によるポリメラーゼの阻害によっても核小体構造が変化することから、単離した核小体の RNAseq を行い、核小体形成に関わる因子として Alu 配列をもつ RNA (AluRNAs) を同定しました。AluRNAs は、核小体タンパクである B23/NPM や C23/NCL と結合し、rRNA の転写活性にも関与していました。これまでに、rDNA から転写されるノンコーディング RNA が、

rDNA のヘテロクロマチン構造の維持や核小体ストレス応答に関わるということが報告されています。今回、rDNA 以外の領域からも核小体の形成や機能に関わる RNA が転写されることが明らかになり、核小体とその外部とのインタープレイによって機能することが示されました。これ以外にも、Hi-C や ChIA-PET による解析データや、ゲノム編集を応用し CRISPR labeling によってクロマチン動態を可視化するなど、新規技術を用いた研究も印象的でした。Lamina Associated chromatin Domains (LADs) を同定した Bas van Steensel 博士は、一細胞レベル行った DamID の結果を報告されました。近年、一細胞や一分子レベルでの遺伝子発現や核内局在の追跡が可能になったことに驚くと同時に、膨大に得られるデータの統計処理など、今後はドライな解析技術の理解と習得が必要であることを、改めて実感しました。

ポスター発表も、とても活発に行われていました。私にとっては海外で初めての発表でしたが、拙い英語ながら、夢中で説明しディスカッションができたこと、異なる国や分野であってもサイエンスを共有できたことは、とても貴重な経験になりました。今回は日本人の参加も多く、アメリカやヨーロッパでの研究や生活の違いについて、話を聞くことができたのも大変貴重でした。またミーティング全体を通して、女性研究者の発表がとても多かったことも印象的でした。どの方も意欲的に研究され、そしてエレガントで、とても励みになりました。

(熊本大学・齊藤(典)研 松森はるか)



蛋白質 3次元モデル像の前にて

## 4. 成果紹介

① 堀班員らの論文が、Developmental cell 誌に掲載されました。これは、木村班員との領域内共同研究による成果です。

### Histone H4 Lys 20 mono-methylation of the CENP-A nucleosome is essential for kinetochore assembly

Hori T, Shang W H, Toyoda A, Misu S, Monma N, Ikeo K, Molina O, Vargiu G, Fujiyama A, Kimura H, Earnshaw W C and Fukagawa T.

Developmental Cell, 2014, 29; 740–749.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580714002810>

動原体は、遺伝情報を安定に次世代細胞へ維持・継承する過程で重要な役割を担う。動原体が形成されるセントロメアのゲノム領域には、ヒストン H3 のバリエーションである CENP-A が存在し、セントロメア形成において重要な働きをしていることがすでに指摘されている。しかし、CENP-A が取り込まれるだけでは、機能的なセントロメアの形成には十分ではない。これまで我々の研究グループは、ニワトリ DT40 細胞を用いた染色体工学技術を活用して実験的にネオセントロメアを誘導すること、およびセントロメアタンパク質の異所局在化による人工セントロメアを作成することに成功し、セントロメア構築メカニズムの一端を明らか

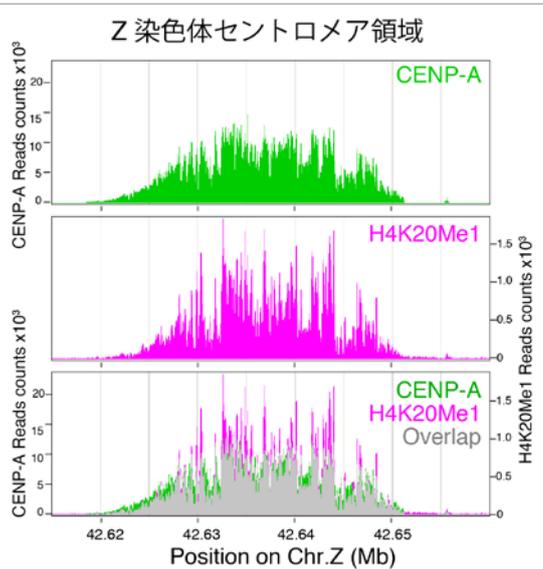


図 1. CENP-A と良く似たピークパターンを示す H4K20me1 修飾

ニワトリ Z 染色体のセントロメア領域の ChIP-seq マッピング。ヒストン修飾 H4K20me1 は、セントロメア特異的ヒストンバリエント CENP-A と極めて良く似たピークパターンを示す。

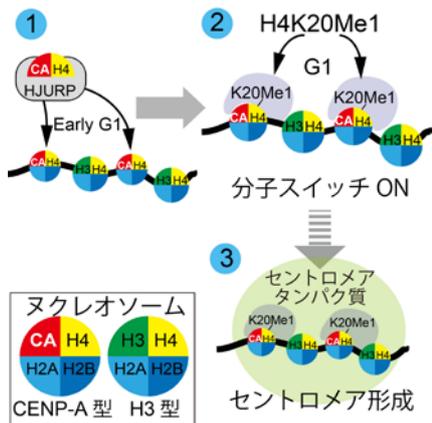


図 2. セントロメア形成のモデル

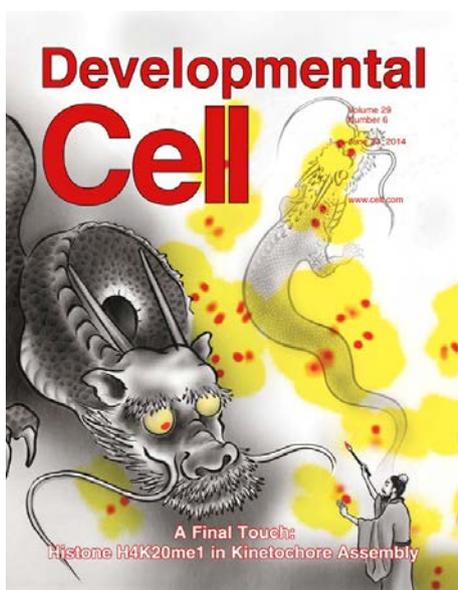
1) CENP-A が HJURP の介在でセントロメア領域へ取り込まれる。2) CENP-A ヌクレオソーム内の H4 の 20 番目のリシン残基がモノメチル化される (分子スイッチ ON)。3) 分子スイッチを引き金にセントロメア形成がおこる。

にしてきた。今回、これら実験系をさらに活用し、セントロメア構築の分子スイッチとして機能するヒストン修飾を見いだした。

はじめに、各種ヒストン修飾抗体を利用した網羅的 ChIP-seq 解析を行ない、CENP-A と極めて良く似たピークパターンを示すヒストン修飾「ヒストン H4 の 20 番目の Lys 残基のモノメチル化 (H4K20me1)」を見いだした (図 1)。詳細な生化学的解析を行なった結果、細胞周期の G1 期初期に CENP-A がクロマチンに取り込まれた後、CENP-A ヌクレオソーム内の H4K20 が速やかにモノメチル化されることが明らかになった (図 2)。この H4K20me1 修飾がセントロメア形成にどのように関わるかをさらに解析した。これを調べるため、セントロメア領域の H4K20me1 修飾を特異的に除去できる実験法を開発した。まず、H4K20me1 修飾の脱メチル化酵素 (PHF8) とセントロメアタンパク質 CENP-U との融合タンパク質を発現させ、セントロメア領域へ特異的に局在させた。その結果、セントロメア領域の H4K20me1 修飾を特異的になくすことに成功した。セントロメア領域で H4K20me1 修飾が起きない細胞では、セントロメア形成の目印となる CENP-A は存在した。しかし、セントロメア上に構築される構造体 (キネトコア) タンパク質である CENP-H や CENP-T が局在しなくなっていることがわかった。CENP-H や CENP-T が存在しないことでセントロメアの機能は失われ、染色体分配の異常が多数観察された。この実験から H4K20me1 修飾は、機能的なセントロメア形成に必須であると結論できた。

これらの実験結果から考察し、「セントロメア領域に CENP-A が取り込まれた後、すぐに CENP-A ヌクレオソームの H4K20 がモノメチル化される。そして、このメチル化が分子スイッチとして働き、CENP-H や CENP-T の集合を促して機能的なセントロメアが形成される」というモデルを提出した (図 2)。また、これら研究成果が評価され、掲載誌の表紙に選ばれた。

この分子スイッチを操作することによって、将来的にはがんをはじめとする染色体分配不全が原因でおこる各種遺伝性疾患の解明・治療も可能になることが期待できる。



#### 本研究成果の掲載誌の表紙

画家がキャンバスにむけて竜の絵を書いている。目に最後の筆をいれると竜がキャンバスからとびだす「画竜点睛」のイメージ。このコンセプトは、H4K20me1 による分子スイッチを引き金にセントロメア形成がおこる、というコンセプトと類似している。

## 5. 寄稿

### 無茶すぎて誰もやらなかったヒストン H3/H4 を *Xenopus* 卵抽出液から除去するプロジェクトの顛末記 — 木村宏班員との共同研究の成果報告 —

船引 宏則 (ロックフェラー大学)

#### Nucleosomal regulation of chromatin composition and nuclear assembly revealed by histone depletion.

Zierhut C., Jenness C., Kimura, H., and Funabiki, H.  
Nat. Struct. Mol. Biol. 2014, 21; 617-625.

光陰矢のごとし。染色体の研究を京都大学の柳田充弘教授の下で始めて 24 年。大学院時代は、染色体分離異常をおこす分裂酵母温度感受性変異株の解析が主な研究テーマの一つであった。不思議なことであるが、ヒストンは染色体構成タンパク質の主成分であるものの、当時、ヒストンの事は研究室でほとんど話題にならなかった。例外的に、セントロメアのヌクレオソーム構造をマイクロコッカルヌクレアーゼ処理法で解析されている大学院生がおられたり、短期間 FISH 法を学ぶために訪問されていた Robin Allshire さんが、セントロメアのヘテロクロマチン構造におけるヒストンアセチル化などの研究について話されたぐらいだ。

2002 年にロックフェラー大学で研究室を立ち上げ、たまたま翌 2003 年に染色体パッセンジャー複合体 (Chromosomal Passenger Complex; CPC) の新規サブユニット Dasra (Borealin) を発見したのが (Samapth et al., 2004, Cell)、私がヒストンを研究するきっかけになったことは間違いない。しかし、CPC のキナーゼサブユニットである Aurora B が M 期にヒストン H3 の 10 番目のセリン残基 (H3S10) をリン酸化することを David Allis さんが 1999 年に発表されていたということは、発表当時は大して気にとめていなかった。ところが、偶然は重なるもので、その Allis さんが 2003 年の春からロックフェラー大の教授として赴任されてこられ、早速お話させていただく機会に恵まれた。Allis さんのヒストン修飾への情熱に、私もすっかり感化されてしまい、さっそく秘蔵の抗メチル化ヒストン H3 抗体を使ったトライアル実験を試してみたことが、Aurora B の H3S10 のリン酸化が、H3 の 9 番目のメチル化を認識する HP1 を乖離する、という発見につながった (Fischle et al, 2005, Nature)。

ここにたって、漸くヒストンの M 期染色体構造や機能における役割がほとんど分かっていないことに気付いたのだが、我が研究室で使っている *Xenopus* 卵抽出液系でヒストンを操作するのはあまりにも難しいと思われた。何しろ、卵抽出液にヒストンは高濃度で含まれているし、免疫除去法を使うにしても大量の質の良い抗ヒストン抗体が必要だろう。しかし、もっと低濃度で存在していて、しかもタンパク質配列の進化的保存度が比較的ゆるいターゲットへの抗体ですら、天に祈る気持ちで作成しているのに、極めて高度に配列が保存されているヒストンに強いアフィニティをもつ抗体が簡単にできるとも思えなかった。さらに、例えヒストンを除去したとしても、もし一緒にヒストン結合タンパク質と一緒に除かれてしまえば、ヒストン除去による特異的な効果を検証するには極めて難しいと考えられた。一方で、もしこの技術的なハードルを乗り越えれば、*Xenopus* 卵抽出液の系でしか検証できないヒストンの機能にアプローチできるのではないかとも思った。*Xenopus* 卵抽出液では、様々なクロマチン機能を、転写非依存的に再構成できるからである。生きた細胞のシステムでは、ヒストン操作は転写に対する影響は免れないので、例え M 期染色体機能に影響が出たとしても、転写異常による二次的な効果を否定することは難しい。

そんなことを考えていた 2007 年、ポスドクとして研究室に参入した Christian Zierhut に、ぼそっと「ヒストン H3 を卵抽出液から除去できて、さらに組み換えタンパク質で再構成できれいんだけどねえ」とつぶやいたら、Christian が真に受けてしまった。色々調べてみて、histone H3/H4 とシャペロン ASF1 の X 線結晶解析構造が決定されているのなら、ASF1 をアフィニティベイトとすれば H3/H4 を除去できるのではないかと主張した。様々な試行錯誤の末に、ヒト IgG の Fc 断片と ASF1 の融合タンパク質を卵抽出液に加えれば、protein A-beads によって極めて効果的に H3/H4 を除去することが分かった。そして、この方法によって H3/H4 を除去した卵抽出液では、スピンドルが形成されないことも分かった。ところが、この喜びは一瞬で砕け散ることになる。なんと、H3/H4 とともに CPC も除去されてしまっていたのだ。我々は CPC はスピンドル形成に必須であることを既に示していたので (Samapth et al., 2004, Cell)、CPC が除去されてしまったらスピンドルが形成されなくとも不思議ではない。何よりも、H3/H4 除去とともに他のヒストン結合タンパク質も除去されるのではないのかという当初の不安が的中してしまったことになった。しかし、捨てる神あれば拾う神あり。この CPC と H3/H4 の強い結合という知見が、CPC の Survivin サブユニットと、H3 の 3 番目のスレオニン残基(H3T3)のリン酸化との結合を発見する契機となった (Kelly et al., 2010, Science)。

さて、話は再び2007年に戻る。渡邊嘉典さん（東大）と深川竜郎さん（国立遺伝研）が、横浜で開かれた分子生物学学会年会のワークショップに招待して下さいました。その学会会場でたまたまお会いしたのが木村宏さん（阪大）である。木村さんとは、私が大学院生時代に染色体ワークショップを通して仲良くさせてもらっていたのが、以降あまり研究がクロスロードすることは無かった。その時、学会会場で木村さんに見せて頂いたのが、野崎直仁さん（現、モノクローナル抗体研究所）と作成されておられた数々のヒストン修飾に対するモノクローナル抗体のリストである。しかも、「どれでも、使ってくれていいよ」とおっしゃるではないか。早速、いくつかの抗体を頂き、間接蛍光などに使わせていただいた。ただ、この時は、これを利用してヒストンの免疫除去をするという発想はでなかった。

ASF1によるH3/H4除去法の問題点はCPCの共除去という点だけにとどまらなかった。ほぼ、1ヶ月に1度程度の割合で、ASF1を精製する必要があったのだ。そろそろ、潮時かなとも思ったときに、ふと木村さんのモノクローナル抗体のことが頭によぎり、2011年の3月、木村さんにコンタクトをとってみることにした。「木村さんのモノクローナル抗体の中に、H3/H4をXenopus卵抽出液から除去できるものがないか試させていただくことはできないでしょうか？」なんと、木村さん2つ返事で快諾していただき、早速いくつかの抗体を見繕って送って下さった。そのうち、H4の12番目のリジン残基のアセチル化（H4K12ac）抗体が、見事にH3/H4を除去することができた。以降、木村さんには何十ミリグラムという単位のアフィニティ精製された抗体を供給していただくことになる。

2011年にH3/H4を除去するプロトコルを確立したものの、組み換えH3/H4を加え直して表現型を相補しなくては使い物にならない。ところが、これが全くうまくいかなかった。まず、H3/H4のヘテロ4量体を卵抽出液に加えると、ドミナントネガティブ的に精子核の核形成を阻害してしまった。既知のH3/H4シャペロンは、H3/H4とともに一部しか除去されなかったため、残存シャペロンで何とかできるだろうという考えが甘かったようである。シャペロンの一つ、N1とあらかじめ結合させた状態でH3/H4を加えると、ドミナントネガティブ的效果は中和されたものの、組み換えヒストンをヌクレオソームに取り込ませることはできなかった。

さて、どうしたものか。この2011年、私がUCSFのAndrew Murrayラボでポスドクをしていたときからの友人であるAaron Straight (Stanford)が、セントロメア特異的なH3類似タンパク質CENP-Aと、H4、H2A、H2Bを用いてin vitroでヌクレオソームを作らせたものをビーズに結合させ、それをXenopus卵抽出液に加えるとキネトコアをビーズ上に形成することができるという画期的な論文を発表していた（Guse et al., 2011, Nature）。Aurora Bによるスピンドルチェックポイント制御に興味をもっていたので、ポスドクのDavid WynneをStraightラボに派遣し、その方法をマスターさせていた。「これが使えるのではないか？」つまり、ヌクレオソームをあらかじめin vitroで作らせたものを $\Delta$ H3/H4エキストラクトに加えれば、ヌクレオソーム形成のステップで起こっていた問題を回避できるはずである。

このやり方で、組み換えH3、H4、H2A、H2Bを用いたヌクレオソームをビーズに結合させ（ヌクレオソームビーズ）、M期の $\Delta$ H3/H4エキストラクトに加えると、ビーズからスピンドルが形成された（図）。一方、単なるDNAビーズを加えても、何も起こらない。スピンドル形成という複雑なプロセスを、組み換えヒストンを使って再構成できたということは、このH3/H4除去法によってはCPCを初めとする多くのヒストンタンパク質に影響がなかったということだ！間期ではヌクレオソームビーズ上に核膜形成が観察された。おもしろいことに、核膜の結合自体には、ヌクレオソームは必要でなく、DNAだけで充分であるが、核膜孔の形成にはヌクレオソームが必要であった。さらにChristianは、ヌクレオソームが核膜孔形成に必要なのはRCC1とELYSという二つのタンパク質がヌクレオソームに直接結合する必要があることを示した。

足かけ7年かけて作り上げたシステムであるが、これによって、ヌクレオソームがクロマチン構成タンパク質に直接及ぼす影響を生理的条件下で検証することが可能になった。質量分析法を組み合わせることで、タンパク質のクロマチン結合に際して、ヌクレオソームの正負両方の効果をシステムティックに解析でき、そのパイロット的な解析結果を報告することができた。今後は、ヒストンの配列や修飾を直接操作するなどして、ヒストンおよびヒストン修飾の細胞周期における様々な役割を様々な角度から検証していきたいと思っている。これからさらにクリアすべき技術的問題もあるが、クロマチン構造のヒストン修飾の役割を生物物理学的手法を用いて解析することも検討している。もしこのシステムに興味をもち、共同研究やポ

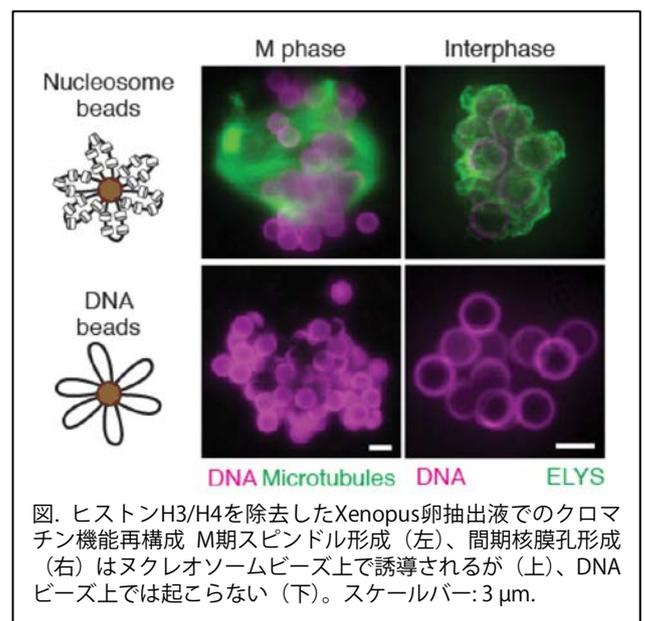


図. ヒストンH3/H4を除去したXenopus卵抽出液でのクロマチン機能再構成 M期スピンドル形成（左）、間期核膜孔形成（右）はヌクレオソームビーズ上で誘導されるが（上）、DNAビーズ上では起こらない（下）。スケールバー: 3  $\mu$ m.

スドクとしての研究参加に興味がある方がおられれば、是非、ご一報いただきたい。

最後になりましたが、このプロジェクトのキーとなる抗体を快く提供して下さった木村宏さん、また抗体の作成、精製に携わった野崎直仁さん、木村研の佐藤優子さん、林陽子さんに、感謝いたします。

## 6. 異動のお知らせ

---

名前：木村 宏

所属：東京工業大学 生命理工学研究科 生体システム専攻

身分：教授

E-mail：hkimura(a)bio.titech.ac.jp 【(a)をアットマークに変換して下さい】

コメント：大阪大学在籍中は、大変お世話になりました。7月1日から東工大に着任しました。RNA ポリメラーゼやヒストン修飾の生細胞動態を中心に、クロマチン動構造の研究を引き続き進めていく予定です。今後ご指導の程よろしくお願ひ致します。

## 7. 今後の予定

---

①第 52 回 日本生物物理学学会年会

期間：9月 25-27 日

場所：札幌コンベンションセンター

本領域協賛のシンポジウム「生命現象の基本に迫る動的クロマチン構造・機能研究の最前線 (Studies of dynamic chromatin structure and function to understand fundamentals of life)」(オーガナイザー：徳永・原口)があります。詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.aeplan.co.jp/bsj2014/index.html>

②第 87 回 日本生化学会大会

期間：10月 15-18 日

場所：京都国際会館・グランドプリンスホテル京都

米田班員(計画班)が大会会頭を務めます。また、本領域共催のシンポジウム「動くクロマチン構造」を追う(オーガナイザー：胡桃坂・大川)があります。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.aeplan.co.jp/jbs2014/j/index.html>

③The 9th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair)

期間：11月 17-21 日

場所：御殿場高原ホテル(静岡)

胡桃坂領域代表が組織委員会に参加している他、複数の班員の講演が予定されています。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://3r2014.com/index.html>

④ 第 32 回 染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会(合同開催)

期間：12月 15-17 日

場所：安芸グランドホテル(広島)

田代班員(公募班)と斉藤班員(計画班)がオーガナイザーを務めます。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/chrom/chrnc/>

⑤ The 4D Nucleome 2014

期間：12月 17-20 日

場所：安芸グランドホテル(広島)

田代班員(公募班)がオーガナイザー代表を務めるほか、木村班員(計画班)も組織委員会に参画しています。

詳しくはこちらをご覧ください。

[http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/chrom/en/4d\\_nucleome\\_2014.html](http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/chrom/en/4d_nucleome_2014.html)

編集後記：7月発行の前号から少し間が空き、すっかり夏も過ぎ去ってしまいましたが、皆様お変わりなくお過ごしでしょうか。このところ(20年近く?)ほとんど運動していなかったのですが、最近、坂道を歩く時間が長くなったおかげで、若干体が締まってきたような気がしています。研究にも体力が必要なので、これを機に少しは体力維持のことも考えていきたいと思っていますが、どうなることか。

HiKi