

*In vivo*におけるヌクレオソーム動態の解明に向けたヒストンの
DNA 結合部位特異的の化学切断法の開発

Development of a chemical DNA cleavage method to analyze
the structure and dynamics of nucleosomes *in vivo*

博士(理学)学位申請論文

A dissertation submitted for Ph. D. degree

2019年2月

明星大学大学院・理工学研究科・化学専攻・博士後期課程

Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering,
Meisei University

布施 智博

Tomohiro FUSE

目次

略語一覧-----	1
緒論-----	2
第1章 部位特異的化学切断法と MNase 消化を組み合わせたパラレルマッピング法の開発とそれによる <i>in vivo</i> でのヌクレオソームの解析	
1.1 緒言-----	12
1.2 実験方法	
1.2.1 出芽酵母菌株とプラスミド-----	14
1.2.2 出芽酵母細胞核の調製-----	16
1.2.3 単離核におけるクロマチンの化学切断-----	16
1.2.4 単離核クロマチンの MNase 消化-----	17
1.2.5 ケミカルおよび MNase マッピングの検出-----	17
1.3 結果と考察	
1.3.1 モデル生物としての出芽酵母とヒストン遺伝子-----	18
1.3.2 出芽酵母の細胞核を基質とする H4 S47C 部位特異的化学切断の反応条件の確立-----	19
1.3.3 出芽酵母におけるヌクレオソームのパラレルマッピング法の開発-----	21
1.3.4 間接末端標識法による TRP1ARS1 のパラレルマッピング-----	25
1.3.5 TRP1ARS1 におけるヌクレオソームポジションの解析によるパラレルマッピングの検証-----	31
1.3.6 ヒストン H4 S47C 株におけるケミカルマッピングの再現性-----	33
1.3.7 高分解能プライマー伸長法による TRP1ARS1 におけるヌクレオソーム II の解析-----	33
1.3.8 高分解能プライマー伸長法による TRP1ARS1 におけるヌクレオソーム III と IV の解析-----	37
1.3.9 TRP1ARS1 ミニ染色体とゲノム <i>TRP1</i> 座におけるヌクレオソームポジションの比較-----	39
1.4 結論-----	43

第2章 高い安定性で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
の開発

2.1 緒言-----45

2.2 実験方法

2.2.1 出芽酵母菌株とプラスミド-----46

2.2.2 化学切断または MNase 消化によるヌクレオソームポジションの解析-----47

2.3 結果と考察

2.3.1 TALS ミニ染色体におけるヌクレオソームのパラレルマッピング-----47

2.3.2 spTALS1 ミニ染色体におけるヌクレオソームのパラレルマッピング-----53

2.3.3 spTALS2-4 ミニ染色体におけるヌクレオソームのケミカルマッピング-----54

2.3.4 ヌクレオソームの中心点 (dyad) のポジションとリンカーDNA 長の解析-----57

2.4 結論-----60

総括

総合的考察-----62

本研究の今後の展望-----64

謝辞-----68

引用文献-----69

研究業績目録-----80

略語一覽

ARS : Autonomously Replicating Sequence

ATAC-Seq : assay for Transposase Accessible Chromatin followed by high-throughput sequencing

ChIP : chromatin immunoprecipitation

ChIP-seq : chromatin immunoprecipitation with sequencing

DNase I : Deoxyribonuclease I

EDTA : 2-(2-[Bis(carboxymethyl)amino]ethyl)(carboxymethyl)aminoacetic acid

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HHF1, *HHF2* : histone H four 1 gene, histone H four 2 gene

HHT1, *HHT2* : histone H three 1 gene, histone H three 2 gene

HTA1, *HTA2* : histone H twoA 1 gene, histone H twoA 2 gene

HTB1, *HTB2* : histone H twoB 1 gene, histone H twoB 2 gene

HSR: nuclease hyper-sensitive region

HSRA, HSRB: nuclease hyper-sensitive region A, nuclease hyper-sensitive region B

KanMX : kanamycin resistance gene

MNase : micrococcal nuclease

MPE : methidiumpropyl-EDTA-Fe(II)

NFR : nucleosome free-region

NDR : nucleosome depleted region

NGS: next-generation sequencing

OD : optical density

OP : N-(1,10 phenanthroline-5-yl)iodoacetamide

PCR : polymerase chain reaction

PIPES : 1,4-piperazinediethanesulfonic acid

PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride

RICC-seq : ionizing radiation-induced spatially correlated cleavage of DNA with sequencing

SDS : sodium dodecyl sulfate

SHL : superhelix location

TAE : Tris-acetate-EDTA

TBE : Tris-borate-EDTA

Tris : 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

緒 論

DNA における塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御するエピジェネティクスは、生物個体の発生と細胞の分化、生体におけるホメオスタシスにおいて重要な役割を果たしている。一方、近年、エピジェネティクスの異常・破綻は、さまざまな疾患（がん、先天性心疾患、自閉症スペクトラム障害など）の原因となることがわかってきた。エピジェネティクスの分子機構にはクロマチンが重要な役割を果たしていると広く受け入れられて、世界中で研究が展開されている。

真核生物の細胞周期における間期の細胞では、遺伝情報を担うゲノム DNA はヒストンタンパク質などと会合し凝縮されて、クロマチンとして細胞核内に収納されている（図 1）。細胞分裂期ではクロマチンはさらに凝縮した染色体となる。細胞核の生化学的な解析や間期細胞核からの抽出物の電子顕微鏡観察によって¹⁻³⁾、クロマチン・染色体の基本単位構造としてヌクレオソームが 1974 年に発見された。

ヌクレオソームは、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 各 2 分子ずつから構成されるヒストン八量体のまわりに DNA が巻きついた複合体である。ヌクレオソームコア粒子の結晶構造は、1984 年に 7 Å の分解能で解析され、ヌクレオソームにおける超らせん DNA と各ヒストンの配置が示された⁴⁾。1997 年、2.8 Å の分解能で X 線結晶構造によって解析され、ヌクレオソームコア粒子の構造は原子レベルで明らかにされた⁵⁾。

図 2 に、ヒストン八量体を構成する 4 種類のコアヒストン分子とヌクレオソームの構造を示す。4 種類のコアヒストンはいずれも、Lys と Arg 残基に富んだ塩基性タンパク質であり、それらの構造は、フレキシブルな N 末端テール、中央の globular domain、C 末端テール、と共通的に捉えられる⁵⁻⁸⁾。中央の globular domain は、ヒストンフォールドと呼ばれ、3 本の α ヘリックス（図 2 上、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ）が折りたたまれてダンベル様の構造を形成する（図 2 中）。このヒストンフォールドは、H2A-H2B 二量体、H3-H4 二量体の形成に寄与し、H3-H4 二量体はさらに H3-H4 四量体となり、2 つの H2A-H2B 二量体と会合してヒストン八量体を形成する。ヒストン八量体に 145-147 bp の DNA が 1.65 回転巻き付

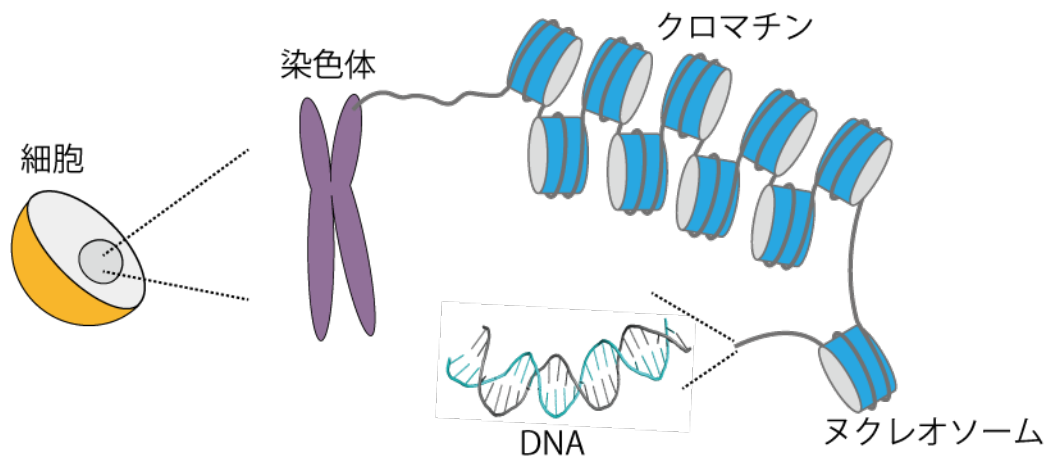


図1.クロマチンの階層構造

遺伝情報を担うゲノムDNAはヌクレオソームを形成し、数珠状に連なりクロマチンを構成している。分裂期にはさらに凝集した染色体を形成する。クロマチン・染色体は細胞核内へと収納されている。

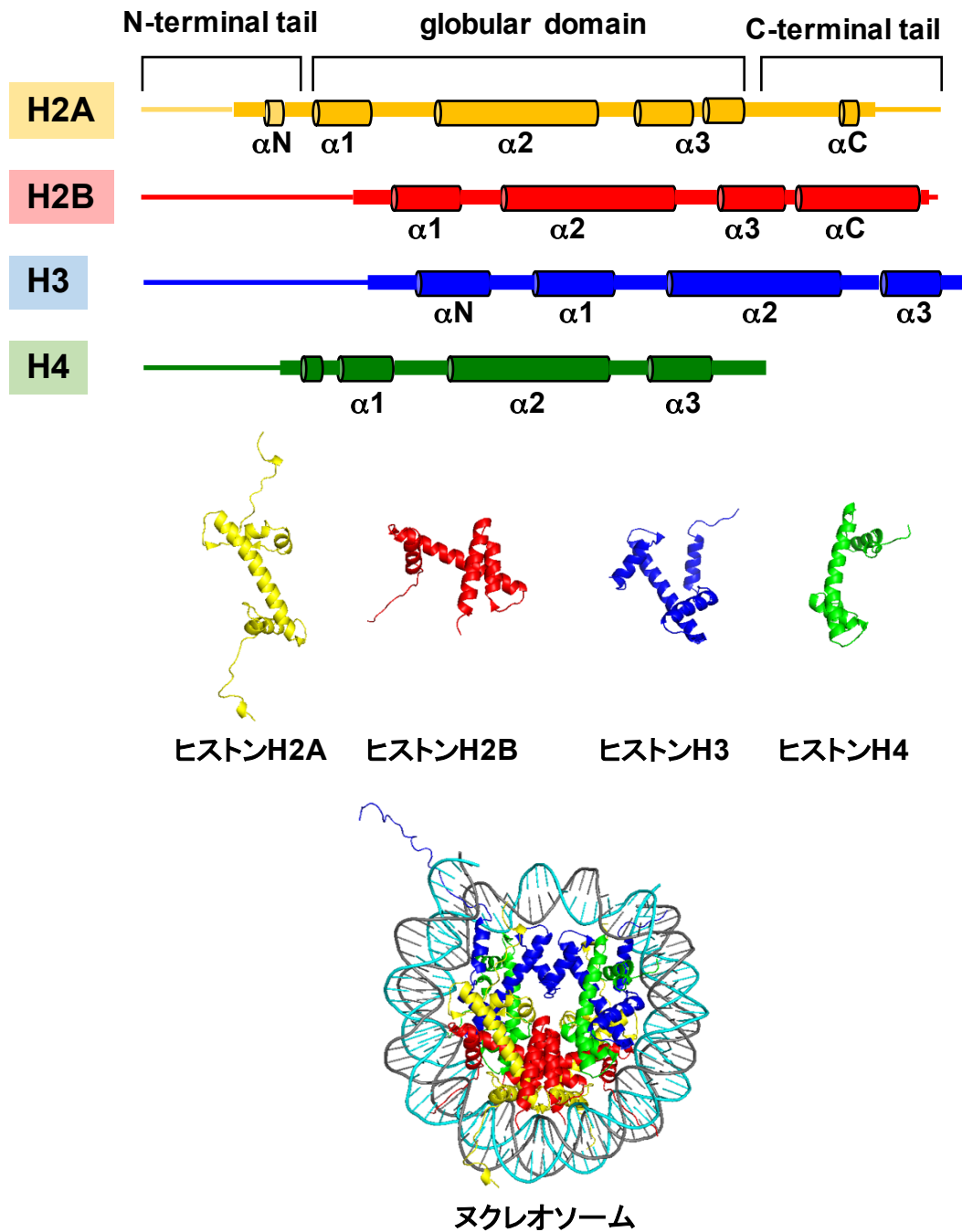


図2.ヒストンとヌクレオソームの構造
 ヒストンのドメイン構造を上部に示す。各ヒストンは $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ の3本のヘリックスからなる球状ドメイン、N末端テール、C末端テールからなる。ヒストンとヌクレオソームの結晶構造(PDB ID: 1AOI)を下に示す。

いて、ヌクレオソームが形成される (図 2 下)⁵⁻⁷⁾。一方、特定の立体構造をもたない、フレキシブルな N 末端テールはヌクレオソームから突き出して、さまざまな翻訳後修飾を受ける。この翻訳後修飾は、DNA の塩基配列によらない遺伝子発現制御機構であるエピジェネティクスの分子機構のひとつとして重要な役割を果たしていると考えられている。また、C 末端テールについては、H2A が他の 3 種類に比べて長く、フレキシブルなテールを有している。X 線結晶構造解析の結果から、ヌクレオソーム DNA がヒストン八量体に巻き付く入口と出口 (entry/exit site と呼ばれる) 付近から、H2A の C 末端テールは突き出ていると考えられている^{5,6,8)}。しかし、ヒストンの各テールはフレキシブルな性質のため、ヒストンテールの構造、DNA との相互作用は X 線結晶構造解析では明らかになっていない。

ヌクレオソームにおいて、右巻きの B 型二重らせん DNA がヒストン八量体に巻き付き、左巻きの超らせん DNA 構造を形成している (図 3)。ヌクレオソームはほぼ二回転対称 (pseudo 2-fold symmetry) な構造体であり、その対称軸は dyad axis と呼ばれる。Dyad axis は、ヒストン八量体に巻き付いた 145-147 bp の DNA の中央に位置する点を通るので、その dyad の DNA 部位を 0 として、ヌクレオソームにおける超らせん DNA の部位は、SHL (SuperHelix Location) として定義される^{4,5)}。図 3 に見るように、dyad からヌクレオソーム DNA の entry/exit sites に向かって、SHL は二重らせんの周期として +1~+7 または -1~-7 と位置づけられる。ヌクレオソームにおいて、SHL = ±0.5、±1.5、±2.5、±3.5、±4.5、±5.5、±6.5 付近で DNA はヒストン八量体と接触している。これに対して、SHL = ±1、±2、±3、±4、±5、±6 は、ヒストンと接触している側と反対側に位置することになる^{5,6)}。

ヌクレオソームの発見後、ゲノム DNA 上において形成されるヌクレオソームは特定の位置に形成されるか否か、という点が指摘された⁹⁾。多くの転写制御因子が特異的な塩基配列を認識して結合することに比べると、ヒストンは非特異的な DNA 結合タンパク質である。しかしながら、これまでの研究から、ゲノム DNA において機能的に重要な領域では、特定の位置にヌクレオソームが形成されることが多くの研究によって示された¹⁰⁻¹⁹⁾。図 4 に、ヌクレオソームポジショニングの考え方について模式的に示す。ある細胞の集団を対象とし

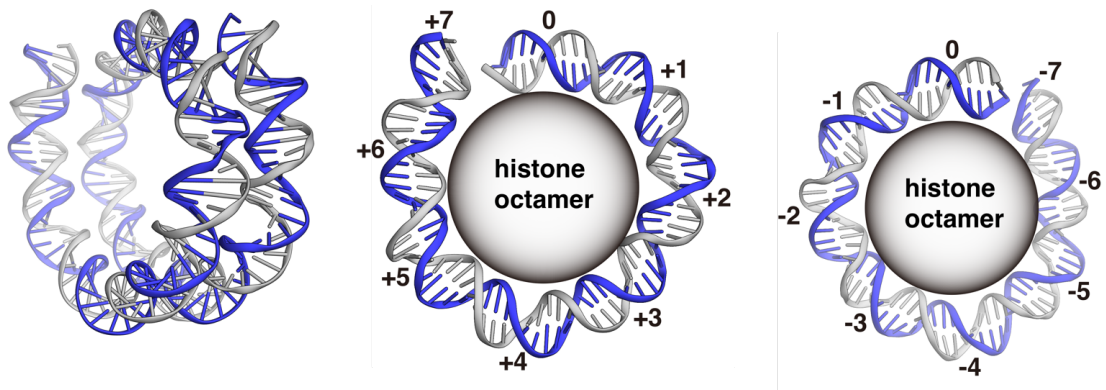


図3.ヌクレオソームの超らせん部位。
 ヌクレオソームにおいてDNAはヒストン8量体に1.65回転巻きついている(図左)。ヌクレオソームダイアドの位置を0として、らせんの周期ごとに+1.0から+7.0(図中央)および-1.0から-7.0(図右)として、それぞれ定義される。

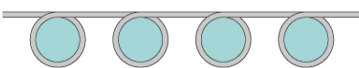
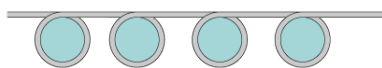
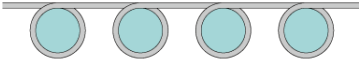
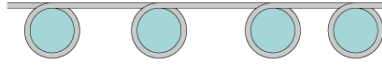




特定の位置にポジショニングしたヌクレオソーム	不規則な位置に形成されたヌクレオソーム
細胞1 	
細胞2 	
細胞3 	
細胞4 	

図4.ヌクレオソームポジショニング

細胞集団において決まった位置にヌクレオソームが形成される場合にヌクレオソームポジショニングしているという(図左)。一方、形成される位置が細胞ごと異なる場合にポジショニングしていないことを示す(図右)。

たとき、どの細胞においても、ゲノム DNA 上の特定の領域にヌクレオソームが形成されることをヌクレオソームがポジショニングしている（またはポジショニングしたヌクレオソームが形成される）という（図 4 左）。これに対して、細胞ごとに、ゲノム DNA 上でのヌクレオソームの位置（配置）が異なる場合は、ヌクレオソームはポジショニングしていないと判断される（図 4 右）。

ヌクレオソーム内に取り込まれた DNA の配列では、タンパク質制御因子の結合が阻害されるため、例えば、プロモーター上に形成されたヌクレオソームは、遺伝子の転写に対して阻害的に働くと考えられる^{10,11}。したがって、塩基配列特異的に DNA へ結合するタンパク質（特異的 DNA 結合因子）によって制御されるすべての細胞内過程の制御においてヌクレオソームのポジションは重要である。ヌクレオソームポジショニングは、遺伝子発現制御機構のひとつとして捉えられており¹²⁻¹⁴、ゲノムにおけるヌクレオソームの正確な位置を明らかにすることは重要である。

In vivo でのヌクレオソームポジションの決定は、単離した細胞核を試料として、核内クロマチンを *micrococcal nuclease* (MNase) により限定消化する方法がよく用いられてきた¹⁵⁻¹⁷。MNase はヌクレオソーム間のリンカー DNA を優先的に切断するので、MNase による切断パターンからヌクレオソームの配置を決定することができる。MNase による DNA の切断部位は、放射性同位体 ³²P で標識した DNA プローブを用いて間接末端標識で検出する方法が繁用されてきた¹⁵⁻¹⁸。また、Shimizu らは、MNase による切断断片を鋳型として、³²P で標識したプライマーを伸長させて、シーケンスゲル電気泳動で解析することによって、MNase による切断部位を塩基対レベルの分解能で検出する方法を報告した¹⁹。近年、高密度 DNA マイクロアレイまたは次世代シーケンサー (NGS) の発展により、MNase による切断部位をゲノムワイドで解析することが可能となり、出芽酵母、分裂酵母、ショウジョウバエ、マウス、ヒトなどさまざまな生物のゲノムにおけるヌクレオソームの解析が報告された²⁰⁻²⁷。

その一例として、図 5 に出芽酵母ゲノムにおいて転写されている遺伝子における典型的なヌクレオソームの配置パターンを示す。転写開始点 (transcription start site, TSS) の近傍においてポジショニングしたヌクレオソーム (+1 ヌクレ

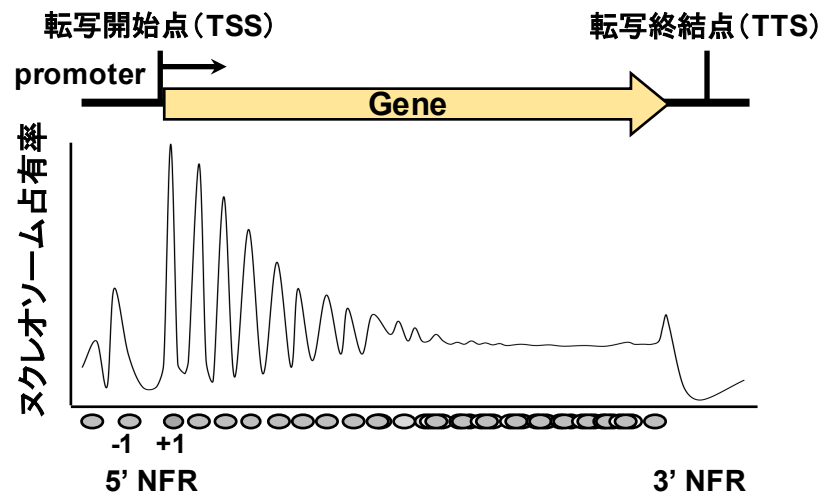


図5. 出芽酵母の遺伝子で見られるヌクレオソームポジショニング
 転写開始点近傍においてポジショニングした+1ヌクレオソームが形成される。遺伝子内部に向かっていくにつれ、占有率が低下する。(Ref. 28より引用、改変)

オソームと呼ばれる) が形成され、遺伝子内部に進むにつれてポジショニングしたヌクレオソームの占有率は低下していく²⁸⁾。一方、+1 ヌクレオソームから上流のプロモーター領域に向かってヌクレオソーム除去領域 (NFR: Nucleosome Free-Region または NDR: Nucleosome Depleted-Region と呼ばれる) がしばしば見られる。NFR の上流に形成されるヌクレオソームは、-1 ヌクレオソームと呼ばれる^{10,28)}。ヌクレオソームポジショニングのメカニズムには、塩基配列に依存した DNA の構造的性質、クロマチンリモデリング因子、転写、クロマチンの高次構造などが提唱されている^{18,29,30)}。しかし、ゲノムの機能発現に伴うヌクレオソームポジションの動態とその制御機構については、未だに不明な点が多い。

一方、MNase は特定の塩基配列に対して選択性を有し^{31,32)}、MNase によるヌクレオソーム解析法の短所として指摘されてきた³³⁾。MNase は、二本鎖 DNA では 5'-Np↓dTp-3' と 5'-Np↓dAp-3' 結合を優先的に攻撃し、5'-CATA-3' や 5'-CTA-3' などの A+T-rich 配列を優先的に切断する。一方で、G+C-rich な配列は切断しにくいという性質を有している。MNase 以外のヌクレオソーム解析法として、2012 年、Brogaard らはヒストン H4 を介した部位特異的切断法を開発し、出芽酵母ゲノムにおけるヌクレオソームの位置を決定した^{34,35)}。この方法では、ヌクレオソーム中央の dyad 近傍に接するヒストン H4 の Ser47 に Cys 点変異を導入し (S47C 変異)、その Cys 残基に N-(1,10 phenanthroline-5-yl)iodoacetamide を連結させ、銅イオンをキレートした後、H₂O₂ を添加するとフェントン反応によって発生した OH ラジカルがヌクレオソーム中央の DNA を切断する^{34,35)}。このほか、DNase I 切断部位の解析 (DNase-seq)³⁶⁾、transposase による網羅的オープンクロマチン領域解析 (ATAC-Seq、Assay for Transposase Accessible Chromatin followed by high-throughput sequencing)³⁷⁾、methidiumpropyl-EDTA と Fe(II)キレート錯体を用いたシーケンシング解析 (MPE-seq、methidiumpropyl-EDTA sequencing)³⁸⁾、電離放射線による切断部位の解析 (RICC-seq、ionizing radiation-induced spatially correlated cleavage of DNA with sequencing)³⁹⁾、High-resolution MNase-ChIP-Seq⁴⁰⁾ などの方法が報告されている。しかしながら、これまでの研究において、*in vivo* でのヌクレオソームの解析結果には意見の分かれる報告や曖昧な点を含めて今なお議論の余地がある^{30,41-43)}。したがって、よ

り詳細かつ正確にヌクレオソームの位置を決定し、その動態を解析する方法の確立が強く求められている。

さらに、最近、ヒストン八量体に 145-147 bp が 1.65 回転巻き付いた、標準的なヌクレオソームとは異なる多様なヌクレオソーム構造が報告された。それらは、不安定で脆弱なヌクレオソーム (fragile nucleosome)^{27,41,44)}や、標準的なヒストン八量体とは異なるヒストン組成の subnucleosome^{38,45)}、asymmetric nucleosome^{46,47)}、hexasome^{48,49)}、hemisome⁵⁰⁻⁵²⁾、overlapping dinucleosomes⁵³⁻⁵⁵⁾、ヌクレオソームの前駆体と考えられている prenucleosome⁵⁶⁾、リンカーDNA が突出した proto-chromatosome⁵⁷⁾などである。これらの多様なヌクレオソームに関する研究は緒についたところであり、ゲノムにおける多様なヌクレオソームの構造、動態と形成機構についてはほとんど分かっていない。

本研究は、*in vivo* でのヌクレオソームの多様な構造と動態を解明することを目指して、ヌクレオソームのポジションをより詳細に解析する実験系を開発することを目的とした。従来、ヌクレオソームの解析に用いられてきた MNase による切断部位と、ヒストン H4 の S47C を介した部位特異的の化学切断部位を直接的に比較解析することによって、ヌクレオソームのポジションをより詳細かつ正確に決定できる、と著者は考えた。本論文の第 1 章では、MNase マッピングに用いる基質と同じ出芽酵母細胞核に対して H4 特異的の化学切断を行う条件を検討した。間接末端標識法とプライマー伸長法により H4 特異的の切断部位を検出するアッセイ系を確立し、MNase による切断部位とヒストン H4 を介した特異的の切断部位を並行して解析するパラレルマッピング法を提案した。この方法を出芽酵母ミニ染色体 TRP1ARS1 ならびに出芽酵母 *TRP1* 遺伝子座の解析に適用し、個々のヌクレオソームの構造的性質が異なることを示した⁵⁸⁾。第 2 章では、ヌクレオソームポジションの解析をより詳細に行うための系として、従来よく用いられてきた出芽酵母ミニ染色体の塩基配列と長さを改変して、高度にポジショニングした出芽酵母ミニ染色体を構築した⁵⁹⁾。本論文で確立した出芽酵母ミニ染色体の系とパラレルマッピング法を基盤として、さらに詳細な解析法への展開について、今後の展望においてまとめた。以下、これらの内容について述べる。

第1章 部位特異的化学切断法と MNase 消化を組み合わせたパラレルマッピング法の開発とそれによる *in vivo* でのヌクレオソームの解析

1.1 緒言

緒論で述べたように、従来、MNase はヌクレオソームのマッピングに繁用されてきた¹⁵⁻¹⁹⁾。ヌクレオソーム間のリンカーDNA 領域は MNase によって優先的に切断される一方で、ヒストン八量体に巻き付いた DNA 領域は MNase による切断から保護される傾向にある。それゆえ、MNase による切断パターンを、naked DNA とクロマチン試料との間で比較することによってヌクレオソームの位置を決定することができる。近年、細胞核内のクロマチンを MNase により消化し、単離されたモノヌクレオソームサイズの DNA 断片が次世代シーケンサー (NGS) による大規模なパラレルシーケンシング (MNase-seq) または高密度 DNA マイクロアレイによって解析され、ゲノム全体にわたるヌクレオソームのポジションが決定された²⁰⁻²⁷⁾。しかし、緒論で述べたように、MNase は、塩基配列に依存して DNA を切断する³¹⁻³³⁾。すなわち、naked DNA において A・T 塩基対の 5'側は優先的に切断される一方で、G+C に富んだ配列は切断されにくい。また、MNase はエンドヌクレアーゼ活性に加え、切断後の DNA 末端を消化するエキソヌクレアーゼ活性をも有している。したがって、ヌクレオソームに隣接したリンカーDNA の配列が MNase によって消化されにくいとき、ヌクレオソームの正確な位置を推論することは難しくなる。その結果として、MNase 消化により生じたモノヌクレオソームサイズの DNA 断片には、塩基配列依存的に消化されるバイアスが存在し、ヌクレオソームポジションと占有率の判断に影響を与えている可能性が指摘されている^{42,58,60)}。

一方では、MNase によって引き起こされる潜在的なバイアスの存在を評価するために、*in vitro* で再構成したクロマチンを基質として解析したところ、MNase によるヌクレオソームのマッピングにおいて実質的なバイアスはほとんどないと結論された⁶¹⁾。したがって、MNase によるバイアスがマッピングの結果に強く影響するか否かについては、相反する報告が存在する。MNase のマッピングの結果をより正確に解釈するために、クロマチン免疫沈降を組み合わ

せた MNase titration assay⁶²⁾、MPE-seq (メチジウムプロピル EDTA と Fe²⁺錯体から生じる OH ラジカルで細胞核クロマチンを消化した後、得られた DNA 断片を NGS で解析)³⁸⁾、MNase/exonuclease III digestion mapping⁶³⁾が、最近、報告されており、これらの方法と MNase-seq との併用が有効であると議論されている。

OH ラジカルは DNA の糖の部分攻撃するので⁶⁴⁾、MNase と比較して DNA 配列の選択性は少ない。Fe²⁺と H₂O₂を用いるフェントン反応で発生した OH ラジカルは、タンパク質の特異的な DNA 結合部位のフットプリントやヌクレオソーム DNA のらせん周期の解析などに広く使用されてきた⁶⁵⁻⁶⁷⁾。特定のアミノ酸残基を介した特異的 OH ラジカル切断は、*in vitro*において、ヒストン H4 の S47C 変異 (H4 S47C)⁶⁸⁾、ヒストン H2B の T87C 変異⁶⁹⁾、ヒストン H1⁰ の G101C 変異⁷⁰⁾に適用された。これらの方法では、鉄イオンの配位試薬をアミノ酸残基に結合させるため、各ヒストンにおける標的アミノ酸残基は Cys 残基に置換された。Brogaard らは H4 S47C 変異株を構築し、出芽酵母において塩基対レベルの分解能でヌクレオソーム中央部位を直接的に決定するゲノムワイドなケミカルマッピング法を開発した^{34,35,71)}。彼女らは H4 S47C 残基が位置するヌクレオソームの dyad 周囲で起こる特異的な化学切断から得られた DNA 断片からモノヌクレオソームサイズの DNA 断片を精製し、次世代シーケンサー (NGS) を用いてゲノムワイドで出芽酵母を解析した³⁴⁾。さらに、同様の方法で、分裂酵母⁷²⁾とマウスの胚性幹細胞⁷³⁾におけるゲノムワイドでのヌクレオソームのケミカルマップを報告した。

MNase または OH ラジカルの消化によって得られたモノヌクレオソームサイズ断片の NGS 解析は、ヌクレオソーム分布のゲノムワイドでの全体像を得るために優れた方法である。しかし、MNase または化学切断によってヌクレオソームは必ずしも均一に切断されないため、サイズ選択で精製された DNA 断片の集団には偏りがあり、ある領域のヌクレオソーム DNA 断片が欠落する可能性がある。また、*In vivo*での局所的なクロマチン構造は、染色体上の位置によって異なることや DNA の転写、複製、修復、組換えといった生物学過程に反応して多様に変化する。実際に、個々のヌクレオソームの MNase への感受性に変化があると報告された^{27,41-44)}。すなわち、あるヌクレオソームは優先的に

MNase によって消化されるという事実は、ヌクレオソームの構造的性質と安定性が均一ではなく、ゲノムにおいてヌクレオソームの構造は動的に変化しているという考えを支持する。加えて、NGS 解析では技術的なバイアスがしばしば存在し、DNA 断片の末端修復、アダプターライゲーション、DNA 断片のサイズ選択、そして PCR 増幅などの NGS ライブラリー調製の各ステップが、バイアスのかかる潜在的な要因であることが指摘されている^{74,75)}。

本章では、*in vivo* でのヌクレオソームのポジションをより正確にかつ詳細に決定するために、まず、MNase によるマッピングの基質と同じ細胞核を用いて、ヒストン H4 の S47C 残基を介した部位特異的な化学切断法を確立した⁵⁸⁾。出芽酵母ミニ染色体 TRP1ARS1 ならびにゲノム *TRP1* 座におけるヌクレオソームのポジションについて、MNase 消化と化学切断法からそれぞれ得られた DNA 断片を間接末端標識法またはプライマー伸長法で並行して解析した。MNase による切断部位からリンカー DNA 部位を、H4 S47C を介した化学切断部位からヌクレオソーム dyad を求め、それぞれから決定されるヌクレオソームのポジションを比較解析した。以下、本論文では、ヌクレオソームポジションを MNase 消化から決定することを MNase マッピングと呼び、H4 S47C を介した OH ラジカルによる切断から決定することをケミカルマッピングと呼ぶ。従来のゲル電気泳動法を用いて、MNase とケミカルのパラレルマッピングにより、MNase マッピング単独の結果と比較して、より正確にヌクレオソームの位置を決定することができた。さらに、ポジショニングした個々のヌクレオソームは構造的性質が異なることが示された。

1. 2 実験方法

1. 2. 1 出芽酵母菌株とプラスミド

本章で使用した出芽酵母株のリストを表 1-1 に示す⁵⁸⁾。BY4742 を由来とする Mat-alpha-YDR007W と Mat-alpha-YBR009C は Open Biosystems より購入した。Brogaard らが構築した H4 S47C 株 (MYA-4902) は ATCC より購入した。MYA-4902 株の *TRP1* 遺伝子を、選択マーカー *KanMX* (カナマイシン耐性遺伝子カセット) で破壊して MHS3001 を構築した。BY4742 の遺伝的背景を持つ

表1-1 本研究で使用した出芽酵母株⁽⁵⁸⁾

Strains	Genotypes	Source
BY4741	<i>MAT a his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0</i>	Open Biosystems
BY4742	<i>MAT α his3 Δ1 leu2 Δ0 lys2 Δ0 ura3 Δ0</i>	Open Biosystems
Mat-alpha-YBR009C	<i>MAT α his3 Δ1 leu2 Δ0 lys2 Δ0 ura3 Δ0 hhf1::KanMX</i>	Open Biosystems
Mat-alpha-YDR007W	<i>MAT α his3 Δ1 leu2 Δ0 lys2 Δ0 ura3 Δ0 trp1::KanMX</i>	Open Biosystems
MYA-4902	<i>MAT a his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 hhf1::S47C hhf2::URA3</i>	ATCC
MHS3001	<i>MAT a his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0 trp1::KanMX hhf1::S47C hhf2::URA3</i>	this study
MHS3002	<i>MAT α his3 Δ1 leu2 Δ0 lys2 Δ0 ura3 Δ0 trp1::KanMX hhf1::S47C hhf2::URA3</i>	this study
FY23	<i>MAT a ura3-52 trp1 Δ63 leu2 Δ1</i>	CSHL* ¹
FY24	<i>MAT α ura3-52 trp1 Δ63 leu2 Δ1</i>	CSHL* ¹
MHS3003	<i>MAT a ura3-52 trp1 Δ63 leu2 Δ1 hhf2::KanMX</i>	this study
MHS3004	<i>MAT α ura3-52 trp1 Δ63 leu2 Δ1 hhf1::S47C</i>	this study
MHS3005	<i>MAT a ura3-52 trp1 Δ63 leu2 Δ1 hhf1::S47C hhf2::KanMX</i>	this study
MHS3006	<i>MAT α ura3-52 trp1 Δ63 leu2 Δ1 hhf1::S47C hhf2::KanMX</i>	this study

*¹ Strains were obtained from the Yeast Genetics course at Cold Spring Harbor Laboratory.

MAT α の H4 S47C 株を獲得するために、Mat-alpha-YBR009C と MHS3001 とを接合させて二倍体を作製した後、飢餓条件下で培養し孢子形成させた。得られた孢子から四分子解析⁷⁶⁾により、*hhf1::S47C* と *hhf2::URA3* を有する MHS3002 株を獲得した。FY23 と FY24 に *hhf2::KanMX* と *hhf1::S47C* を導入した MHS3003 (MAT α) と MHS3004 (MAT α) を構築した。さらに、MHS3003 と MHS3004 とを掛け合わせて、四分子分析⁷⁶⁾によって同質遺伝系統 (isogenic) な MHS3005 (MAT α) と MHS3006 (MAT α) を得た。

プラスミド TALS-pBR Δ RI⁷⁷⁾を *EcoRI* で消化した後、自己環状化により TRP1ARS1-pBR Δ RI を構築した⁵⁸⁾。TRP1ARS1-pBR Δ RI から pBR322 部分を除くために *HindIII* で消化した。回収した TRP1ARS1 断片を連結し、出芽酵母細胞に導入した。

1. 2. 2 出芽酵母細胞核の調製

出芽酵母細胞核は過去の報告に従って以下のように調製した^{19,78)}。TRP1ARS1 プラスミドを導入した出芽酵母株を SC-Trp 培地 (0.67 % yeast nitrogen base with amino acids, 2 % glucose, 0.2 % of tryptophan-drop-out mix) 1 L において OD₆₀₀ = 1.0~1.5 に達するまで培養した。1L の培養液に、アジ化ナトリウム (NaN₃) とフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) をそれぞれ最終濃度 0.13 % と 0.5 mM になるように加えた。出芽酵母細胞を集菌した後、その細胞を S-buffer (1.4 M D-sorbitol, 40 mM HEPES, pH 7.5, 0.5 mM MgCl₂, 0.13 % NaN₃, 1 mM PMSF) で 1 回洗い、遠心分離で回収した細胞を S-buffer で再懸濁した。出芽酵母細胞を zymolyase (ナカライテスク) で処理してスフェロプラストにした。スフェロプラストをホモジナイズにより破碎し、二段階遠心分離によって単離核を調製した。

1. 2. 3 単離核におけるクロマチンの化学切断

1 L の培養液から得られた単離核を 4 ml の Labeling buffer (1 M D-sorbitol, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM

spermine)に再懸濁した。0.7 mM N-(1,10 phenanthroline-5-yl)iodoacetamide (Biotium cat #92015) の dimethylsulfoxide 溶液を、終濃度 0.14 mM となるように核懸濁液に加えた。N-(1,10 phenanthroline-5-yl)iodoacetamide を Cys 残基に連結させるラベリング反応は、暗所で 4 °C、1 時間、ローター回転させながら行った。反応後、細胞核を 4,000 × g で遠心し、3 ml の labeling buffer に再懸濁した。細胞核は labeling buffer で 4 回洗浄し、次に 3 ml の mapping buffer (1 M D-sorbitol, 2.5 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine) で再懸濁した。最終濃度が 10 mM となるように CuCl₂ を加え、室温で 5 分間インキュベートした。4,000 × g で 10 分間遠心し、3 ml の mapping buffer で 3 回洗浄した。核を 1.625 ml の mapping buffer で再懸濁し、最終濃度 5.9 mM 3-メルカプトプロピオン酸となるように加え、室温で 5 分間インキュベートした。化学反応は 0.4 M H₂O₂ を最終濃度 6 mM になるように加えた。反応液の一部 (330 μl) を 5 分毎に 2 μl の 0.5 M ネオクプロインと混和して反応を停止し、20 分まで行った⁵⁸⁾。核ペレットを 200 μl の mapping buffer に再懸濁した後、DNA を精製した。ゲノム DNA の化学切断反応の進行はアガロースゲル電気泳動によって解析した。

1. 2. 4 単離核クロマチンの MNase 消化

過去の報告に従って、単離核の MNase 消化を以下のように行った^{19,77,79-81)}。核ペレットを 2 ml の digestion buffer (10 mM HEPES, pH 7.5, 0.5 mM MgCl₂, 0.05 mM CaCl₂, 1 mM PMSF) に懸濁した。核懸濁液を 200 μl ずつ分注し、段階希釈した MNase (10 から 0.625 units/ml) を加え、37 °C で 10 分間インキュベートした。コントロールとして精製した DNA を 10 倍から 60 倍低い濃度の MNase で消化した。MNase によるゲノム DNA の消化の程度は、アガロースゲル電気泳動によって確認した。

1. 2. 5 ケミカルおよび MNase マッピングの検出

化学切断による DNA 部位または MNase による切断部位は、間接末端標識法

またはプライマー伸長法によって解析した^{19,77,79-81})。TRP1ARS1 における *EcoRV-HindIII* 断片 (ポジション 388 から 619)、*NheI-StuI* 断片 (ポジション 830 から 1041) を PCR によって調製した⁵⁸)。これらの断片を鋳型として、*BcaBest* Labeling kit (TAKARA) と [α -³²P]dCTP (6000 Ci/mmol、PerkinElmer NEG513Z) を用いてランダムプライミング法によって間接末端標識法の放射性プローブを作製した。

プライマー伸長法に使用したプライマーとして以下を使用した⁵⁸)。NII_top_primer (top strand のポジション 919 to 954)、5'-TTG ATT GTA CAG GAA AAT ATA CAT CGC AGG GGG TTG-3'； NII_bot_primer (bottom strand のポジション 1,285 to 1,251)、5'-GAG GCT GAT GGT GTT TAT GCA AAG AAA CCA CTG TG-3'； NIII_top_primer (top strand のポジション 1,098 to 1,133)、5'-CATACC TCT CTC CGT ATC CTC GTA ATC ATT TTC TTG-3'； NIII_bot_primer (bottom strand のポジション 93 to 59)、5'-TGC CTT TGT GTG CTT AAT CAC GTA TAC TCA CGT GC-3'； NIV_top_primer (top strand のポジション 1,338 to 1,372)、5'-TTG ATA ATT AGC GTT GCC TCA TCA ATG CGA GAT CC-3'； NIV_bot_primer (bottom strand のポジション 297 to 260)、5'-ATT TTT ATA TGC TTT TAC AAG ACT TGA AAT TTT CCT TG-3')。 [γ -³²P]ATP (6000 Ci/mmol、PerkinElmer NEG502Z) を用いて T4 ポリヌクレオチドキナーゼによりプライマーの 5'末端をラベルして、プライマー伸長法に使用した。

間接末端標識法とプライマー伸長法の結果は、Typhoon FLA 7000 biomolecular imager (GE Healthcare UK Ltd) で検出した。

1. 3 結果と考察

1. 3. 1 モデル生物としての出芽酵母とヒストン遺伝子

遺伝学と分子生物学的手法を駆使できる出芽酵母は、従前より、真核生物のモデルとして世界中で用いられている。出芽酵母の実験室株には、一倍体の **a** 細胞と α 細胞、二倍体の **a**/ α 細胞がある。一倍体と二倍体はそれぞれ独立に栄養増殖する。**a**/ α の二倍体細胞は飢餓条件下におかれると、減数分裂を開始して1つの子嚢を形成し、その中に4つの一倍体の子嚢胞子が形成される。子嚢から

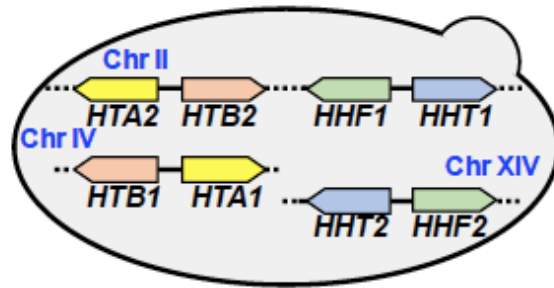
4つの子嚢胞子を取り出して、栄養増殖させて解析することができる（四分子分析）⁷⁶⁾。本章で構築した一倍体株 MHS3002、MHS3005、MHS3006 は、長浜バイオ大学・向由起夫博士にご協力いただき、四分子分析によって得られた⁵⁸⁾。

出芽酵母ゲノムには、4種類のコアヒストンの遺伝子がそれぞれ2コピーずつ存在する。図 1-1 に、出芽酵母ゲノムにおける各ヒストンの遺伝子座を模式的に示す。ヒストン H2A の遺伝子は *HTA1* と *HTA2*、H2B の遺伝子は *HTB1* と *HTB2*、H3 の遺伝子は *HHT1* と *HHT2*、H4 の遺伝子は *HHF1* と *HHF2* である。図 1-1 上に示すように、出芽酵母の野生株 (WT 株) では、2 番染色体 (Chr II) に *HTA1* と *HTB2* および *HHF1* と *HHT1* が、4 番染色体 (Chr IV) に *HTB1* と *HTA1*、14 番染色体 (Chr XIV) に *HHT2* と *HHF2* が座している。H2A と H2B、H3 と H4 の遺伝子は divergent promoter から転写される。

本論文において使用した出芽酵母株のリストを表 1-1 に示す。ケミカルマッピングを行うために、本研究において、H4 S47C 株の一倍体の組を 2 セット構築した⁵⁸⁾。図 1-2 下に、MHS3001 (*MATa*) と MHS3002 (*MATα*) ならびに MHS3005 (*MATa*) と MHS3006 (*MATα*) である。いずれも *hhf1::S47C* 変異を有するが、MHS3001 と MHS3002 はそれぞれ BY4741 と BY4742 の誘導体であり、*hhf2* は *URA3* に置換されている。MHS3005 と MHS3006 はそれぞれ FY23 と FY24 の誘導体であり、*hhf2* は *KanMX* (カナマイシン耐性遺伝子カセット) で置換されている。これらの H4 S47C 株を用いて、以下の実験を行った。

1. 3. 2 出芽酵母の細胞核を基質とする H4 S47C 部位特異的的化学切断の反応条件の確立

1. 1 の緒言で述べたように、MNase は塩基配列選択性のエンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼ活性を持つことから³¹⁻³³⁾、ヌクレオソームのマッピングではしばしば問題となっている。MNase マッピング法の短所を補うために、本論文において、Brogaard らによって報告された方法^{34,35)}を基盤とし、部位特異的的化学切断法を単離核に適用する条件を確立した。化学切断法では、出芽酵母のヒストン H4 の 47 番目の Ser 残基が Cys 残基に置換された H4 S47C 株を



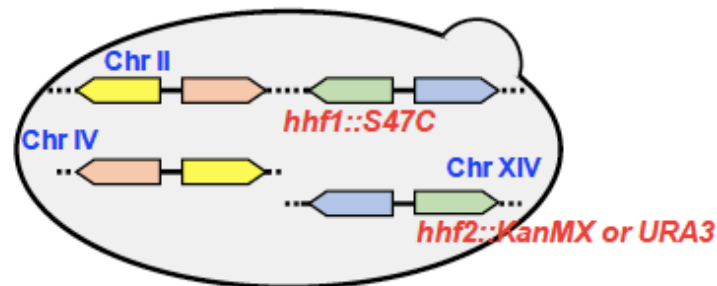
野生 (WT) 株

H2A: *HTA1*, *HTA2* (Histone HTwo A)

H2B: *HTB1*, *HTB2* (Histone HTwo B)

H3: *HHT1*, *HHT2* (Histone HThree)

H4: *HHF1*, *HHF2* (Histone HFour)



ヒストンH4 S47C株

H2A: *HTA1*, *HTA2* (Histone HTwo A)

H2B: *HTB1*, *HTB2* (Histone HTwo B)

H3: *HHT1*, *HHT2* (Histone HThree)

H4: *hhf1::S47C*, *hhf2::KanMX or URA3*

図1-1. 出芽酵母の野生株とH4 S47C株のゲノムにおけるコアヒストンの遺伝子座。
野生株では、各コアヒストンの遺伝子はゲノムあたり2コピー存在し、H2Aの遺伝子はHTA1とHTA2、H2Bの遺伝子はHTB1とHTB2、H3の遺伝子はHHT1とHHT2、H4の遺伝子はHHF1とHHF2である。H4 S47C株では、HHF1にS47C変異を導入し、HHF2をKanMXまたはURA3で置換・破壊した。

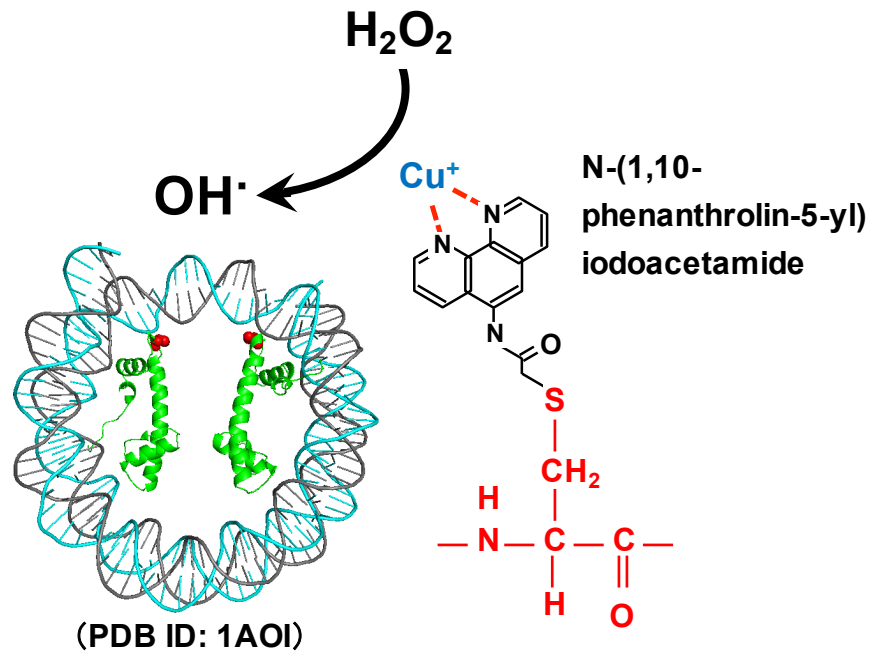
必要とする（表 1-1、図 1-1）。図 1-2 に H4 S47C を介した化学切断法の原理を示す。H4 の 2 つの S47C 残基（図中に赤丸で示す）は対称的に SHL ± 0.5 の DNA 付近に接しており dyad axis に近傍に位置する^{34,35,68}。ラベル試薬 N-(1, 10-phenanthroline-5-yl)iodoacetamide を H4 の S47C 残基に共有結合させる。次に、塩化銅と過酸化水素水を加えることによって、フェントン反応により OH ラジカルが局所的に発生し、ヌクレオソーム中央付近の DNA が切断される（図 1-2）^{34,35}。

Brogaard らは、この方法を出芽酵母のスフェロプラストを溶解した懸濁液（spheroplast lysate）に対して適用した^{34,35}。これに対して、著者は、MNase によるマッピングと同じ基質である細胞核に対して、この反応を行うための条件を検討した。本研究において確立した化学切断反応条件と Brogaard らの反応条件との比較を図 1-3 に示す（実験条件の異なる箇所を赤字で示した）⁵⁸。両者を比較して大きな違いは、著者が確立した条件では、細胞核懸濁液に添加するラベル試薬 N-(1, 10-phenanthroline-5-yl)iodoacetamide と塩化銅の濃度はそれぞれ 140 μM と 10 μM であり、Brogaard らの実験条件と比較すると、それぞれを 1/10 と 1/15 に減少させることができた。特に、ラベル化試薬は比較的高価であるので、実験経費節約をもたらした。

1. 3. 3 出芽酵母におけるヌクレオソームの平行マッピング法の開発

図 1-4 に平行マッピングのスキームを示す。出芽酵母細胞から核を調製するまでの過程は共通であり、細胞核懸濁液を基質として MNase 消化または化学切断反応を行い、それぞれから DNA を精製する。切断された DNA を間接末端標識法またはプライマー伸長法によって同一ゲル上で解析するという方法である。したがって、化学切断によるヌクレオソームの中央 (dyad) と MNase によるリンカー DNA 部位というヌクレオソームの両側面が同時に検出できる。

H4 S47C を介した部位特異的的化学切断法で調製した DNA 断片のアガロースゲル電気泳動の結果を図 1-4 示す。MNase による切断 (lanes 1-4) では、MNase 濃度が高くなるにつれてゲノム DNA が切断され、約 160-180 bp の倍数付近にバンドが観察された。これらのバンドはヌクレオソーム間のリンカーが優先的



● **Histone H4 S47C**

図1-2.ヒストンH4のS47C残基を介した部位特異的的化学切断法の原理。
 ヒストンH4のSer47をCysに変異(S47C)した部位を赤丸で示す。Cys残基に
 N-(1,10 phenanthrolin-5-yl)iodoacetamideを連結させ、銅イオンをキレートし
 た後、過酸化水素を加えると、局所的にOHラジカルが発生しヌクレオソーム
 dyad近傍を切断する。(Refs. 34、35より引用、改変)

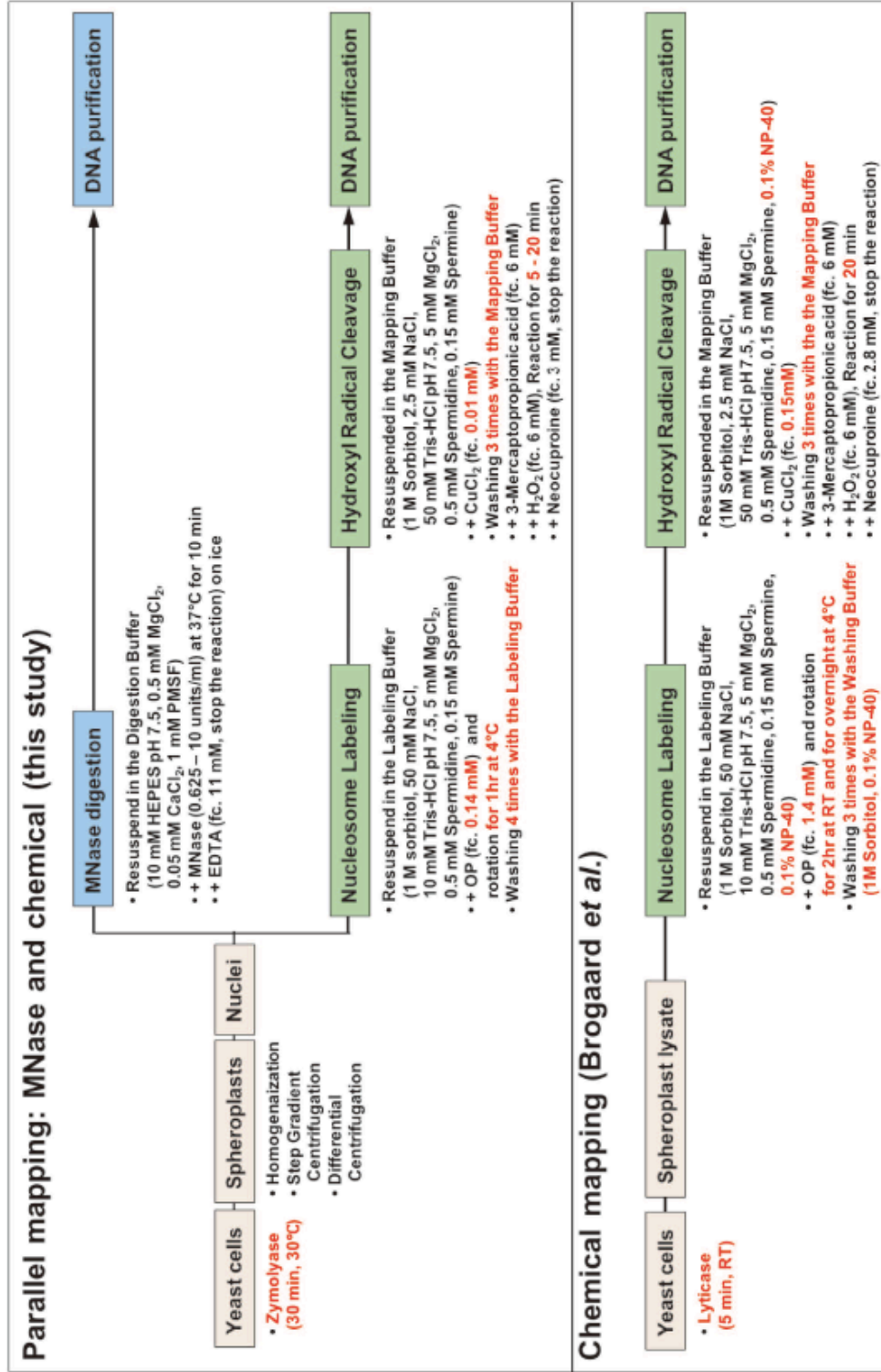


図1-3. 本研究とBrogaard *et al.* (refs. 34 and 35)のサンプルの調製法の手順
 本研究(パネル上)とBrogaard *et al.* (パネル下)で実験手順および条件の異なる部分を赤字で示す。OPはN-(1,10phenanthroline-5-yl)iodoacetamide、PMSFはphenylmethanesulfonyl fluoride、fcは終濃度 (final concentration)を示す。(Ref. 58より引用、改変)

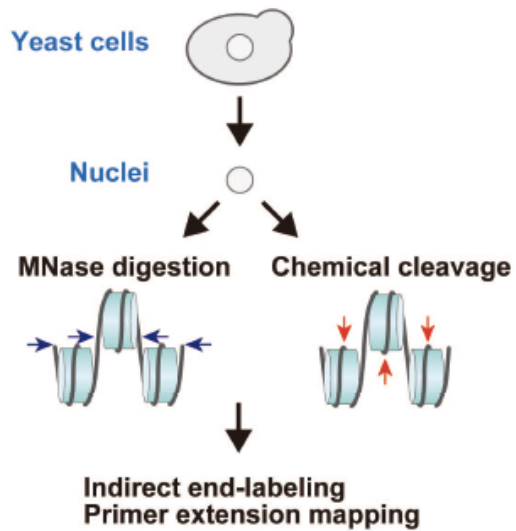
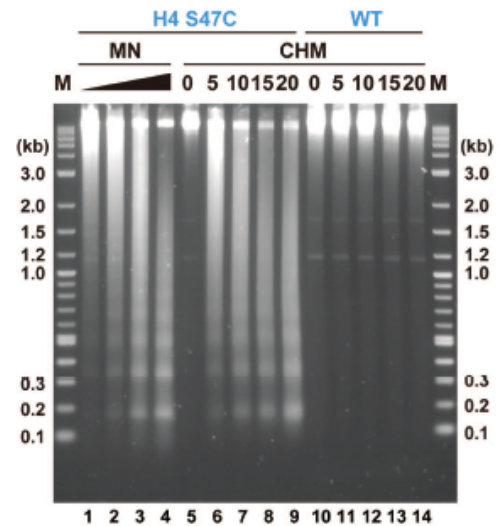
A**B**

図1-4.(A)本研究における*in vivo*でのヌクレオソームの平行マッピングの概要図。培養した出芽酵母細胞から細胞核を単離し、クロマチンを消化するためMNaseまたは化学切断法を行った。青と赤の矢印はそれぞれMNaseと化学切断法での切断部位を示す。消化したクロマチンから精製したDNAは切断部位を検出するため間接末端標識法またはプライマー伸長法に使用した。(B) MNaseまたは化学切断法によって消化したゲノムDNAの1.3%アガロースゲル電気泳動の結果。MN、CHMはそれぞれMNase消化と化学切断サンプルを示す。H4 S47C株はMHS3002、WTはMat-alpha-YDR007W株をそれぞれ用いて行った。(Ref. 58より引用、改変)

に切断された結果を示しており、このパターンはヌクレオソームラダーと呼ばれる。

一方、OH ラジカルによる切断では、反応時間が長くなるにつれて、H4 S47C 株においてゲノム DNA が断片化された (図 1-4、lanes 5-9)。野生株 (WT 株) では、このようなゲノム DNA の切断は検出されず (図 1-4、lanes 10-14)、この切断反応はヒストン H4 の S47C 残基に依存して引き起こされていることが示された。OH ラジカル消化により見られたヌクレオソームラダーが MNase 消化によるラダーに匹敵するほど明瞭であるという結果は、化学切断反応条件の至適度の高さを示している。また、本研究の結果は、MNase の代わりに OH ラジカル切断がテトラヒメナの核に適用された最近の報告⁸²⁾とよく対応している。次の項で、間接末端標識法およびプライマー伸長法によって、部位特異的 化学切断と MNase による切断部位を検出した結果について述べる。

1. 3. 4 間接末端標識法による TRP1ARS1 のパラレルマッピング

MNase とケミカルによるパラレルマッピングを評価するため、以前にヌクレオソームの位置が詳細に調べられている出芽酵母ミニ染色体 TRP1ARS1^{15,16,83)} のクロマチン構造を解析した。TRP1ARS1 ミニ染色体は出芽酵母 IV 番染色体の一部 (461,740~463,192) の 1,453 bp の DNA 断片を環状して得られたもので、*TRP1* 遺伝子と *ARS1* を含んでいる。Thoma ら¹⁵⁾によって、TRP1ARS1 は 7 つのヌクレオソーム (I~VII) と二つのヌクレアーゼ感受性領域 (HSRA and HSRB、nuclease hyper-sensitive region A and B) がマップされた (図 1-5A)。

H4 S47C 株に TRP1ARS1 を導入し、単離した核に対して MNase または H4 S47C を介した化学切断反応によって限定消化した。MNase マッピングではコントロールとして、naked DNA サンプルを MNase で消化した。部位特異的 化学切断のバックグラウンドを検証するため、コントロールとして野生株を使用した。MNase による消化または化学切断反応の後、それらの DNA を精製した、間接末端標識を行うために、制限酵素 *EcoRV*、*HindIII*、または *NheI* によって消化した。図 1-5B に、*EcoRV*、*HindIII* または *NheI* 部位からの間接末端標識によるマッピングの結果をまとめた。*EcoRV*、*HindIII* または *NheI* 部位からの間接末端標識法の raw data を図 1-6A~C に示す。MNase によるヌクレオソームの

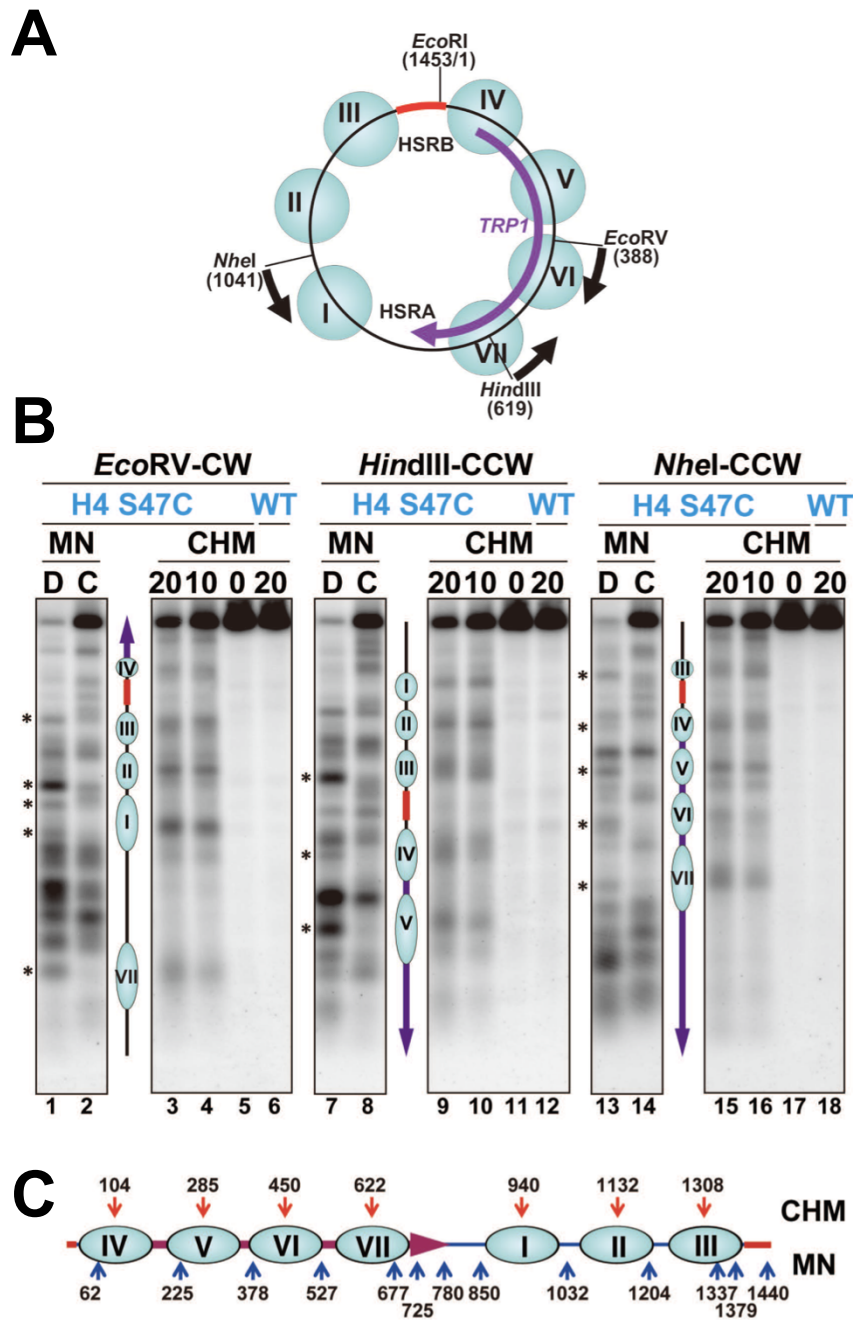


図1-5. (A) TRP1ARS1ミニ染色体のクロマチン構造。間接末端標識法は*EcoRV* (387)、*HindIII* (619)、*NheI* (1041)のいずれかからマップした。ポジション1はヌクレアーゼ超感受性領域(HSRB)内の*EcoRI*部位(GAATTC)の最初のA塩基とした。TRP1ARS1の全長は1,453 bp。ヌクレオソーム(水色楕円)、TRP1遺伝子のORF(紫の矢印)、HSRB(赤色)マッピングの方向(黒の矢印)を示す。(B)間接末端標識法によるTRP1ARS1におけるヌクレオソームポジションの解析。MNとCHMはそれぞれMNaseと化学切断法によって消化されたサンプルを示す。MNaseによるマッピングにおいて、DとCはnaked DNAとクロマチンサンプルをそれぞれ消化したサンプルを示す。化学切断法では反応時間を0、10、20分と変化させて行った。asterisk (*)はnaked DNAで切断されている部位がクロマチンで保護されている部位を示す。これらのゲルの全体図を図1-6で示す。(C) TRP1ARS1におけるMNaseと化学切断法のまとめ。赤と青の矢印はそれぞれ化学切断とMNaseの切断部位を示す。(Ref. 58より引用、改変)

A

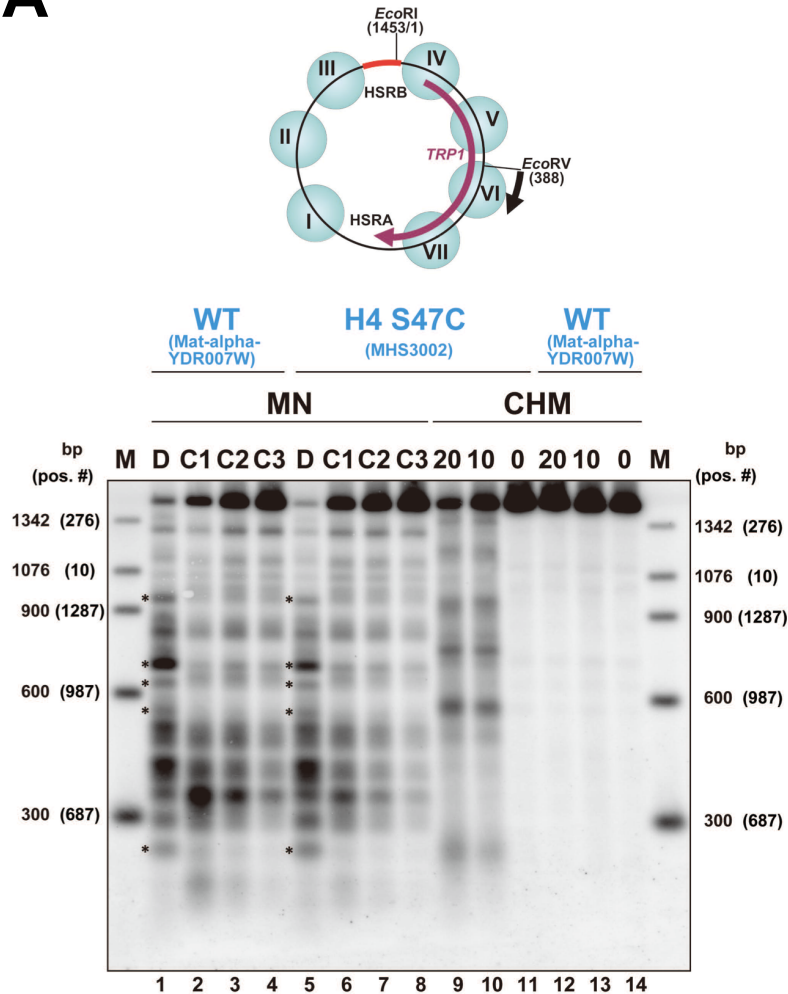


図1-6A.間接末端標識法によるヌクレオソームマッピング(*EcoRV*-CW)
 MNaseと化学切断法のサンプルを*EcoRV*消化し、間接末端標識法により切断部位を*EcoRV*から時計回りの方向に検出した。TRP1ARS1の全長は1,453 bpであり、ヌクレアーゼ超感受性領域のGAATTC(*EcoRI*)の最初のA塩基をポジション1とした。TRP1遺伝子のORF(紫矢印)、HSRB(赤)、マッピングの方向(黒矢印)で示す。レーンのラベルC1、C2、C3はクロマチンサンプル、Dはnaked DNAを段階希釈したMNaseによって消化したサンプルを示す。0、10、20は化学切断法における反応時間(分)を示す。Naked DNAでMNaseによる切断部位がクロマチンサンプルで保護されている部位をasteriskで示す。マーカーのサイズはゲルの両側にbp(position numbers)を示す。(Ref. 58より引用、改変)

B

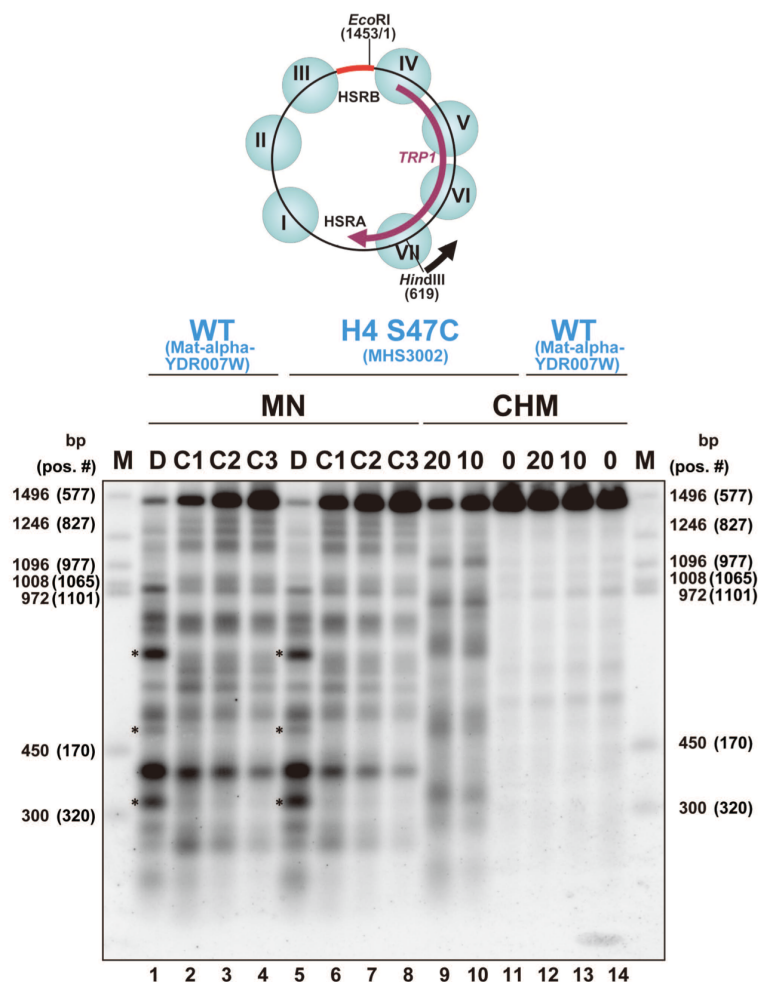


図1-6B.間接末端標識法によるヌクレオソームマッピング(*HindIII*-CCW) MNaseと化学切断法のサンプルを*HindIII*消化し、間接末端標識法により切断部位を*HindIII*から反時計回りの方向に検出した。TRP1ARS1の全長は1,453 bpであり、ヌクレアーゼ超感受性領域のGAATTC(*EcoRI*)の最初のA塩基をポジション1はとした。TRP1遺伝子のORF(紫矢印)、HSRB(赤)、マッピングの方向(黒矢印)で示す。レーンのラベルC1、C2、C3はクロマチンサンプル、Dはnaked DNAをMNase消化したサンプルを示す。0、10、20は化学切断法における反応時間(分)を示す。Naked DNAでMNaseによる切断部位がクロマチンサンプルで保護されている部位をasteriskで示す。マーカーのサイズはゲルの両側にbp (position numbers)を示す。(Ref. 58より引用、改変)

C

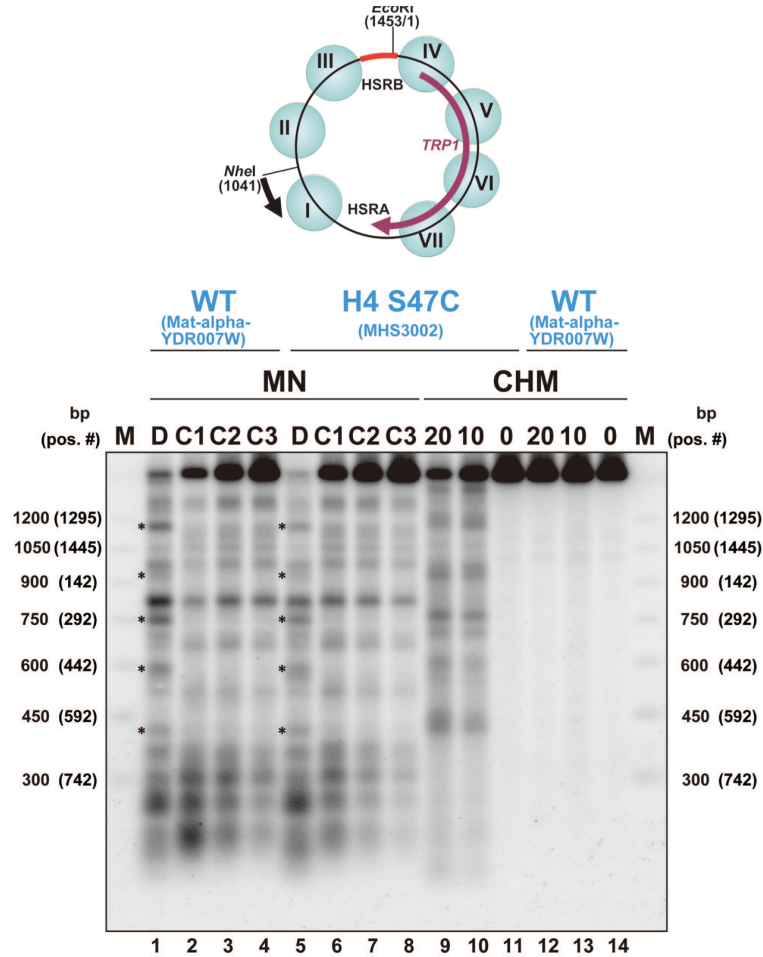


図1-6C.間接末端標識法によるヌクレオソームマッピング(*NheI*-CCW)
 MNaseと化学切断法のサンプルを*NheI*消化し、間接末端標識法により切断部位を*NheI*から反時計回りの方向に検出した。TRP1ARS1の全長は1,453 bpであり、ヌクレアーゼ超感受性領域のGAATTC(*EcoRI*)の最初のA塩基をポジション1とした。TRP1遺伝子のORF(紫矢印)、HSRB(赤)、マッピングの方向(黒矢印)で示す。レーンのラベルC1、C2、C3はクロマチンサンプル、Dはnaked DNAをMNase消化したサンプルを示す。0、5、10、15、20は化学切断法における反応時間(分)を示す。Naked DNAでMNaseによる切断部位がクロマチンサンプルで保護されている部位をasteriskで示す。マーカのサイズはゲルの両側にbp(position numbers)を示す。(Ref. 58より引用、改変)

ポジションの解析は、一般的には、核を MNase で消化したクロマチン試料と naked DNA を消化した試料における MNase の切断部位を比較することによって決定される。

例えば、*EcoRV* 部位から時計回りのマッピングにおいて、naked DNA で見られる MNase の切断部位はクロマチン試料では保護されている。クロマチン試料における MNase による切断部位はリンカーDNA に相当すると考えられる。MNase 消化から保護された領域をゲルの下からヌクレオソーム I から IV と帰属した (図 1-5B、lanes 1、2)。*EcoRV* 部位からのマッピングで見られた MNase 消化から保護される領域、すなわちヌクレオソームに帰属される領域は、*HindIII* または *NheI* 部位からのマッピングにおいても首尾一貫して検出された (図 1-5B、lanes 7、8、13、14)。ヌクレアーゼ感受性領域 HSRA と HSRB はそれぞれヌクレオソーム I から VII と III から IV の間に観察された。

TRP1ARS1 の DNA を鋳型として PCR により DNA サイズマーカー断片を製作した。これらのバンドの泳動距離から検量線を作成し、MNase による切断部位を決定した (図 1-5C、上向きの青矢印)。これらの切断部位は、過去の報告とよく一致した。また、野生株と H4 S47C 株の MNase 消化パターンもよく一致した。これらの結果から、H4 S47C 変異は、ヌクレオソームポジショニングにはほとんど影響を及ぼさないことが確認された。

一方、部位特異的ケミカルマッピングに関して、H4 S47C 残基を介して発生した OH ラジカルはヌクレオソーム dyad の近くの DNA を切断する。図 1-5B に示されるように、反応時間 10 分と 20 分の試料において、TRP1ARS1 におけるヌクレオソームが検出された (図 1-5B、lanes 3、4、9、10、15、16)。重要なことは、化学切断のコントロールとしての野生株では、はっきりとしたバンドは観察されず、全反応時間を通してそれは変化なかった (図 1-5B、lanes 5、6、11、12、17、18 および図 1-6A~C)。OH ラジカル切断部位は、ヌクレオソーム I、II、V、VI、VII として MNase 消化から保護された領域の真ん中に観察された。これに対して、ヌクレオソーム III と IV は MNase の保護領域の中央に位置せず、HSRB の側に近かった。それぞれのゲルにおける化学切断部位の位置を算出し、MNase の切断部位とともに、図 1-5C と表 1-2 にまとめた。

1. 3. 5 TRP1ARS1 におけるヌクレオソームポジションの解析によるパラレルマッピングの検証

H4 S47C によるケミカルマッピングの信頼性を検証するために、TRP1ARS1 におけるヌクレオソームのポジションについて、MNase とケミカルマッピングとの結果 (図 1-5B) を比較した。まず、ケミカルマッピングの切断部位からヌクレオソームの中心点 (dyad) を決定した。一方、MNase マッピングでは、MNase による切断部位からリンカーDNA を決定し、リンカーDNA 間の保護された領域の中央部位をヌクレオソームの中心点 (dyad) として求めた (表 1-2、TRP1ARS1 minichromosome のカラム参照)。TRP1ARS1 ミニ染色体におけるヌクレオソーム I と VI の中心点 (dyad) のポジションは、MNase とケミカルマッピングとの間でよく一致した。ヌクレオソーム II、V、VII では、MNase とケミカルマッピングによって決定された中心点 (dyad) のポジションの差は 20 bp 以内であった。ヌクレオソーム II、V、VII では、MNase から保護された領域が 150 bp 以上とヌクレオソーム DNA の 145-147 bp より大きいため、ヌクレオソームが必ずしも保護領域の中央には位置しておらず、むしろ保護領域のどちらか一方に寄っている可能性もあり、保護領域の中央部位が中心点 (dyad) とならない可能性がある。すなわち、MNase から保護される領域が 150 bp より大きい場合には、ヌクレオソームのポジションは曖昧になることを示している。

ヌクレオソーム III と IV の中心点 (dyad) ポジションについて、表 1-2 に示すように、MNase とケミカルマッピングで決定された位置の差異は、ヌクレオソーム III では 37 bp、IV では 40 bp であった。他のヌクレオソームにおける結果と比較すると、ヌクレオソーム III と IV のポジションに関する MNase とケミカルマッピングとの間の差異は大きかった。ヌクレオソーム III と IV がケミカルマッピングによって決定したポジションに配置されたとすると、これらのヌクレオソームの HSRB 側が MNase 感受性であることになる。事実、ヌクレオソーム III の MNase 保護領域は 132 bp しかなく、ヌクレオソームサイズより小さい。これは、ヌクレアーゼ感受性領域に隣接したヌクレオソームは不安定で、よりダイナミックであることを示唆しているかもしれない。あるいは、MNase とケミカルマッピングで決定されたヌクレオソームの中心点 (dyad) の差異は、これらのヌクレオソームが安定にポジショニングしておらず、多重的

表1-2 間接末端標識法を用いたパラレルマッピングによって解析した切断部位のまとめ⁵⁸⁾

Mapping method	Chemical (CHM)		MNase (MN)			
	TRP1ARS1 minichromosome	Genomic <i>TRP1</i> locus	TRP1ARS1 minichromosome		Genomic <i>TRP1</i> locus	
	Cleaved sites as nucleosome center ^{*1}	Cleaved sites as nucleosome center ^{*2}	Cleaved sites as linker DNA ^{*1}	Midpoint between the cleaved sites	Cleaved sites as linker DNA ^{*2}	Midpoint between the cleaved sites
Nuc IV	104 (461,843)	117 (461,856)	62 (461,801)		62 (461,801)	
				144 (461,883)		139 (461,878)
Nuc V	285 (462,024)	284 (462,023)	225 (461,964)		216 (461,955)	
				302 (462,041)		296 (462,035)
Nuc VI	450 (462,189)	449 (462,188)	378 (462,117)		376 (462,115)	
				453 (462,192)		455 (462,194)
Nuc VII	622 (462,361)	613 (462,352)	527 (462,266)		534 (462,273)	
				602 (462,341)		604 (462,343)
HSRA			677 (462,416)		673 (462,412)	
			725 (462,464)		736 (462,475)	
			780 (462,519)		790 (462,529)	
			850 (462,589)		885 (462,624)	
Nuc I	940 (462,679)	950 (462,689)		941 (462,680)		982 (462,721)
			1,032 (462,771)		1,079 (462,818)	
Nuc II	1,132 (462,871)	1,143 (462,882)		1,118 (462,857)		1,154 (462,893)
			1,204 (462,943)		1,228 (462,967)	
Nuc III	1,308 (463,047)	1,329 (463,068)		1,271 (463,010)		1,304 (463,043)
			1,337 (463,076)			
HSRB					1,379 (463,118)	
			1,379 (463,118)		1,453 (463,192)	

^{*1} The position numbers of bp in the DNA sequence of TRP1ARS1 are shown together with their corresponding coordinates in chromosome IV, in parentheses. The cleaved sites were determined from the results of Fig. 2: For Nuc II, III, IV and V, determined as averages of measurements in the mappings from the *Eco* RV, *Hin* dIII and *Nhe* I sites, for Nuc I, determined as averages of measurements in the mappings from the *Eco* RV and *Hin* dIII sites, for Nuc VI and VII, determined by the mapping from the *Nhe* I site. The variations in measurements are the averages \pm 20 bp.

^{*2} The position numbers of base-pairs in the DNA sequence of TRP1ARS1 are shown together with their corresponding coordinates in chromosome IV, in parentheses. The cleaved sites were determined from the results of Fig. 5: for Nuc I, II and III, determined in the mapping from the *Eco* RV site, for Nuc IV to VII, determined in the mapping from the *Nhe* I site.

な位置に形成されている (multiple, alternative overlapping nucleosome arrays または redundant positions と呼ばれる) ^{17,30,84-86}ことが考えられる。この点については、次の 1.3.5 項の高分解能プライマー伸長法の結果のところで議論する。

次に、ヌクレオソームフリーと考えられている HSRB 領域 (MNase 超感受性領域) の長さについて調べた。過去に報告された MNase マッピングの結果によれば、HSRB 領域は約 180 bp と帰属された ¹⁵⁾。この結果は、本研究における MNase マッピングの結果ともよく一致している。しかし、ケミカルマッピングでは、ヌクレオソーム III と IV の中心点 (dyad) はそれぞれ 1,308 と 104 であった。標準的なヒストン八量体で構成されたヌクレオソームを仮定するとヌクレオソームフリー領域は 105 bp と決定される。すなわち、MNase 単独のマッピングではヌクレオソームフリー領域のサイズを大きく見積もってしまう可能性が潜在的にある。したがって、MNase と化学切断によるパラレルマッピング法は、間接末端標識法によるヌクレオソームマッピングを改良した方法であると言えよう。

1. 3. 6 ヒストン H4 S47C 株におけるケミカルマッピングの再現性

本論文で確立したケミカルマッピングの再現性をチェックするために、1.3.4 項で用いた H4 S47C 株 (MHS3002) とは親株の異なる MHS3006 株を用いて TRPARS1 ミニ染色体におけるヌクレオソームのケミカルマッピングを行った。MHS3002 と MHS3006 の遺伝的背景は、それぞれ BY4742 株と FY24 株である。MHS3002 と MHS3006 における TRP1ARS1 ミニ染色体のケミカルマッピングの結果を図 1-7 に示す。H4 を介した化学的切断部位は、両者の間でよく一致した。したがって、H4 S47C 株の構築ならびに化学切断の実験条件は再現性がある。

1. 3. 7 高分解能プライマー伸長法による TRP1ARS1 におけるヌクレオソーム II の解析

間接末端標識での化学切断部位の結果をより詳細に解析するために、間接末

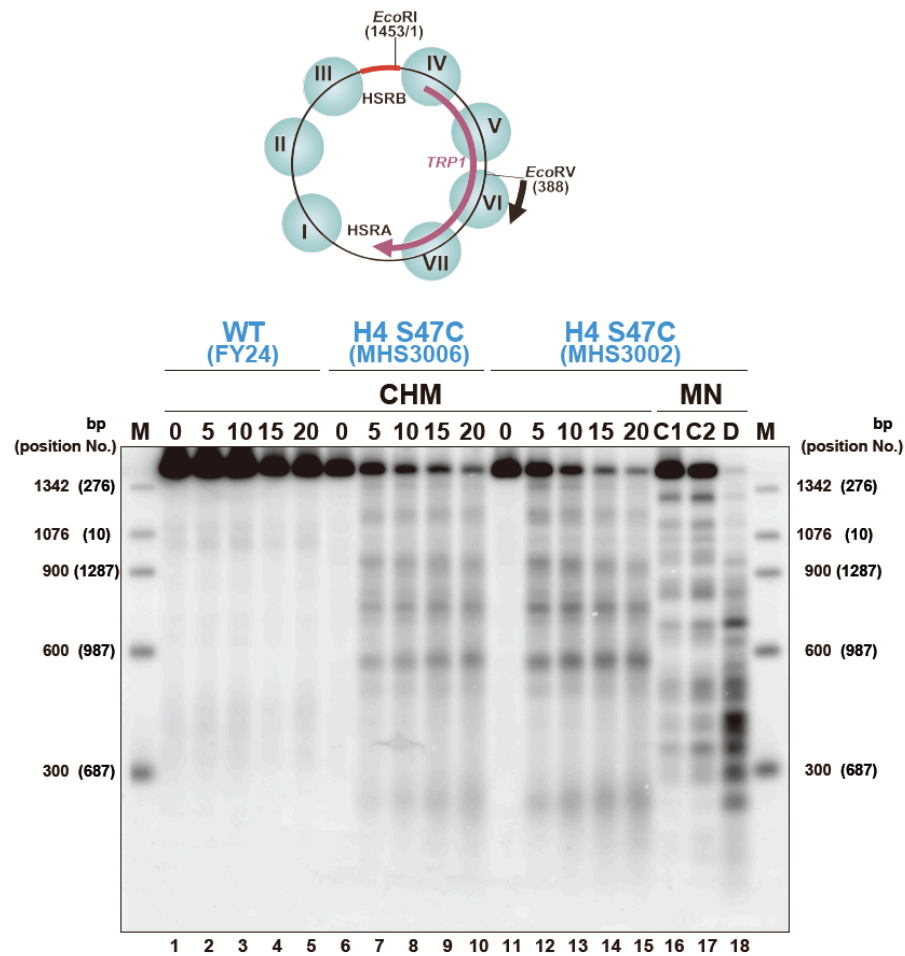


図1-7. BY4742とFY24の遺伝的背景を持つH4 S47C株の間接末端標識法によるヌクレオソームマッピング。
 MNaseと化学切断法のサンプルをEcoRV消化し、間接末端標識法により切断部位をEcoRVから時計回りの方向に検出した。TRP1遺伝子のORF(紫矢印)、HSRB(赤)、マッピングの方向(黒矢印)で示す。レーンのラベルC1、C2、C3はクロマチンサンプル、Dはnaked DNAを段階希釈したMNaseによって消化したサンプルを示す。0、10、20は化学切断法における反応時間(分)を示す。マーカのサイズはゲルの両側にbp(position numbers)を示す。(Ref. 58より引用、改変)

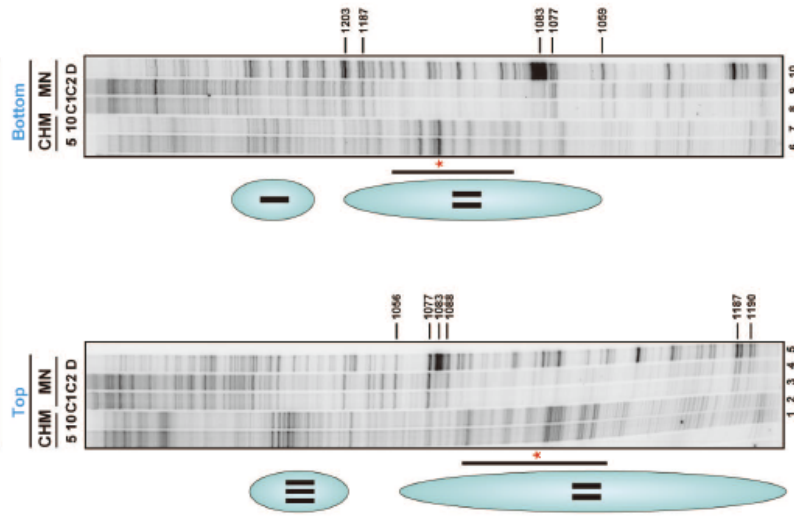
端標識で使用了なものと同じの試料に対して、シーケンスゲルを用いるプライマー伸長法で解析した。化学切断法において、OH ラジカルは糖を酸化的に攻撃しデオキシリボヌクレオチドの除去を引き起こして、DNA 鎖が切断される。一方の鎖の塩基配列を有するプライマーを伸長させると、他方の鎖が鋳型となり、その鋳型鎖での切断部位でプライマーの伸長が停止する。5'末端を ^{32}P で標識したプライマーの伸長産物をシーケンスゲル電気泳動で検出することにより、塩基対レベルで切断部位を検出できる。

まず、ヌクレオソーム II について、MNase と化学切断部位をプライマー伸長法で解析した (図 1-8)。MNase マッピングについて見ると、top strand と bottom strand の両方の結果において、クロマチン試料 (図 1-8A, C1, C2) において 1,077 と 1,187 との間の領域 (109 bp) は、naked DNA と比較して明確に保護されており、ヌクレオソーム II は安定にポジショニングしていることが示された。明確に保護された領域はヌクレオソームサイズの 145 bp でなく、109 bp 前後であった。この結果は、このヌクレオソームの中央から離れた周辺領域に対して MNase が接近可能であることを示唆する。したがって、もし MNase 優先的切断配列がヌクレオソーム周辺領域に取り込まれたならば、ヌクレオソームコア内でさえ切断するであろう。この結果は MNase マッピングのさらなる短所を明らかにした。すなわち、MNase によって保護される領域が 145 bp よりも狭いとき、ヌクレオソームのどちらの端側が MNase に感受性が高いのか分からないので、ヌクレオソーム中央点 (dyad) のポジションを決定することはできない。

ヌクレオソーム II の領域において、いくつかの化学切断部位が、両方の鎖における MNase 保護領域の中央付近に検出された。その切断パターンは、過去の報告³⁴⁾と一致して、top と bottom strands との間で異なっていた。TRP1ARS1 の塩基配列は、出芽酵母 IV 番染色体の一部と同一の配列である。そこで、島根大・医学部・加藤太陽博士のご協力を得て、Brogaard ら³⁴⁾によって報告されたゲノム遺伝子座における化学切断強度と比較解析した。間接末端標識法によって決定された切断部位を red asterisk で示し、図 1-8A における black bar で示した領域を ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) でデンストメータ的に解析した (図 1-8B、Primer extension のプロファイル)。Brogaard らによる解析の raw data³⁴⁾ か

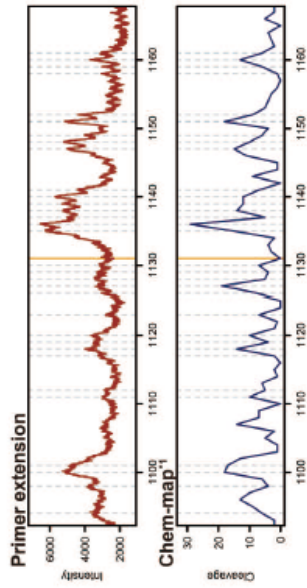
A

Nuc II



B

Top strand



Bottom strand

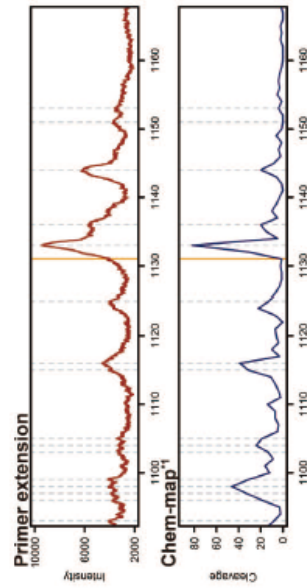


図1-8. (A) プライマー伸長法によるTRP1ARS1のヌクレオソームIIIにおけるMNaseと化学切断法による切断部位の解析。ゲル上のラベル5と10は化学切断法の反応時間を示す。C1、C2はクロマチンサンプル、Dはnaked DNAを段階希釈したMNaseによって消化したサンプルを示す。水色楕円はヌクレオソーム、赤のasteriskは間接末端標識法で決定したヌクレオソームIIの中心部位を示す。黒色バーの領域をデンストメーターにより定量した結果をBIIに示す。(B) プライマー伸長法とBrogaard *et al.* (ref. 12)における化学切断部位の比較。プライマー伸長法による解析をパネル上(Primer extension)、Brogaard *et al.*による解析(ref. 12)をパネル下(Chem-map*)に示す。Chem-mapにおける塩基のポジシオンはTRP1ARS1 (TRP1ARS1のポジシオンIはIV番染色体における461,740)に換算した。オレンジの線と灰色の破線はBrogaard *et al.* (ref. 34, 35)によって決定されたダイアドのポジションを示す。(Ref. 58より引用、改変)

らゲノムにおけるヌクレオソーム II に相当する領域の切断部位を視覚化した (図 1-8B、Chem-map^{*1}のプロファイル)。Top strand と bottom strand における化学切断強度は、Primer extension と Chem-map^{*1} との間でよく一致した。これ Brogaard らの解析から、TRP1ARS1 におけるヌクレオソーム II に相当するヌクレオソームの中心点 (dyad) は 1,131 に帰属された (orange vertical line)³⁴⁾。この値は、間接末端標識法で決定された 1,132 の中心点 (dyad) と極めてよく一致した⁵⁸⁾。したがって、アガロースゲルは DNA 断片の分解能は比較的低いという事実はあるが、アガロースゲルを用いた間接末端標識法によるケミカルと MNase マッピングは、ヌクレオソームのポジションを決定する有用な方法であると結論づけられる。

1. 3. 8 高分解能プライマー伸長法による TRP1ARS1 におけるヌクレオソーム III と IV の解析

1. 3. 4 項と 1. 3. 5 項の間接末端標識による解析結果で述べたように、ヌクレオソーム III と IV では、それらの HSRB 側の 4 分の 1 は MNase に対して高い感受性があるという特徴を示した。このことを調べるために、ヌクレオソーム III と IV の領域をプライマー伸長法によって解析した (図 1-9)。ヌクレオソーム III では、MNase 消化から明確に保護された領域は、top strand と bottom strand でそれぞれ 74 bp と 65 bp であり、ヌクレオソーム II と比較して狭かった。一方、化学切断部位を含む領域は約 75 bp であり、ヌクレオソーム II と比較して広がった。同様に、ヌクレオソーム IV における MNase 保護領域は、top strand と bottom strand でそれぞれ 87 bp と 80 bp となった。ヌクレオソーム IV の化学切断部位も広く見られた。したがって、ヌクレオソーム III と IV の MNase と化学切断部位のパターンはヌクレオソーム II と異なっていた。

このヌクレオソーム II と III および IV との違いの説明の一つとして、ある DNA 領域において、ヌクレオソームのポジショニングは安定ではなく、多重的な位置にヌクレオソームが形成されている、multiple, alternative overlapping positions^{17,30,84-86)}の可能性である。ヌクレオソーム III と IV に隣接した HSRB 領域に、ヌクレオソームが移動可能と考えられるからである。TRP1ARS1 にお

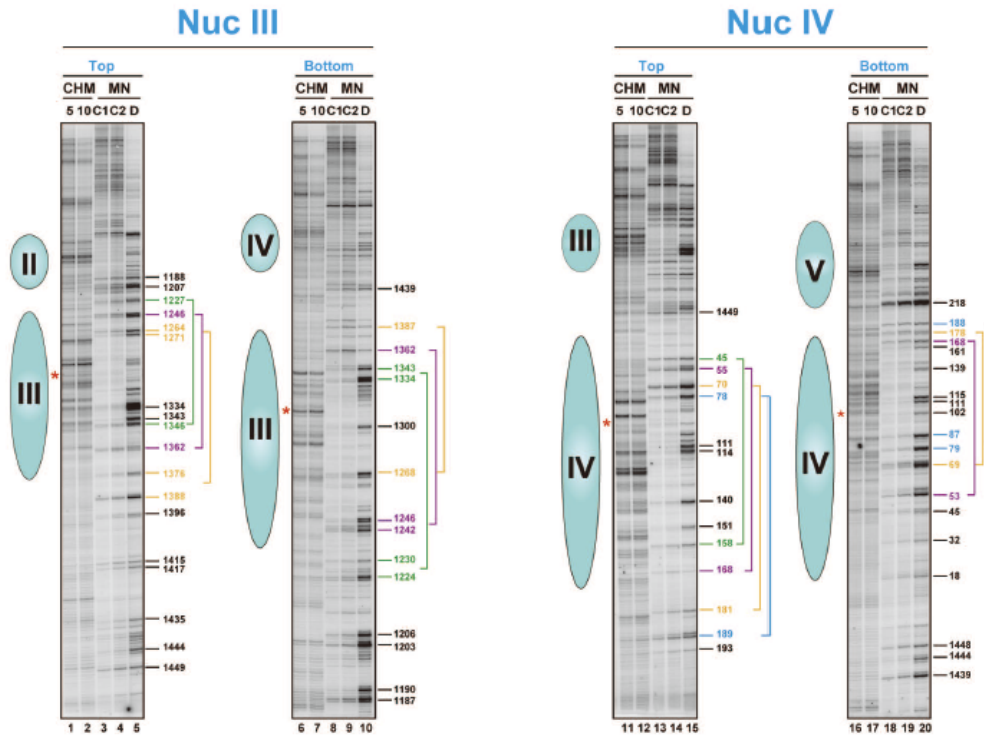


図1-9.プライマー伸長法によるTRP1ARS1におけるヌクレオソームIIIとIVの化学切断法とMNaseの切断部位の解析。ラベル5と10は化学切断の反応時間(分)、C1とC2はクロマチンサンプル、Dはnaked DNAをそれぞれMNaseで消化したサンプルを示す。ヌクレオソームIIIのトップとボトムストランドにおける切断部位はNucIII_bot_primerとNucIII_top_primerでそれぞれ検出し、ヌクレオソームIVのトップとボトム鎖における切断部位はNucIV_bot_primerとNucIV_top_primerでそれぞれ検出した。それぞれゲルの横の水色楕円はヌクレオソームの位置を示し、red asteriskは間接末端標識法で決定したヌクレオソーム中心部の位置を示す。ゲルの右側の数字はヌクレオソームIIIとVIでのMNaseの特徴的な切断部位を示す。マルチに存在するヌクレオソームの各枠をそれぞれ緑、紫、黄色、シアンで示す。それぞれの色はトップとボトムストランドで対応する。(Ref. 58より引用、改変)

ける positions 1-102 は構成的に発現している *TRP1* 遺伝子のプロモーター領域であり、その転写によって、ヌクレオソーム III と IV のポジションが乱される可能性がある。

この可能性を考察するために、MNase の明確な保護領域が約 110 bp であるというヌクレオソーム II の結果を基にすると、ヌクレオソーム III には MNase による切断においていくつかのフレームが存在すると解釈することができる。ヌクレオソーム III における複数のフレームとして、図 1-9 の top strand では 1,227 から 1,346 (green bracket)、1,246 から 1,362 (purple bracket)、1,264/1,271 から 1,376/1,388 (yellow bracket)、bottom strand では 1,224/1,230 から 1,334/1,343 (green bracket)、1,242/1,246 から 1,362 (purple bracket)、1,268 から 1,387 (yellow bracket)} が帰属される (bottom strand における各フレームも同じ色の brackets で示す)。同様に、ヌクレオソーム IV では、図 1-9 の top strand では、45 から 158 (green bracket)、55 から 168 (purple bracket)、70 から 181 (yellow bracket)、78 から 189 (cyan bracket)、bottom strand では 53 から 168 (purple bracket)、69 から 178 (yellow bracket)、79/87 から 188 (cyan bracket) が帰属される (bottom strand における各フレームも同じ色の brackets で示す)。。したがって、*TRP1ARS1* ミニ染色体上でヌクレオソーム III と IV は多重的な位置 (multiple, alternative overlapping positions)^{17,30,84-86)}に形成され、その redundant なポジショニングにより化学切断部位が広い範囲におよんでいる可能性がある。もう 1 つの可能性は、ヌクレオソームフリー領域に隣接してサブヌクレオソームが形成されることが提唱されているように⁴⁵⁾、ヌクレオソームフリー領域に隣接したヌクレオソームが標準的な構造とは異なる可能性である。加えて、多様に変化したヌクレオソーム構造が転写されている遺伝子のプロモーターにおいて動的に形成されている可能性も考えられる。

1. 3. 9 *TRP1ARS1* ミニ染色体とゲノム *TRP1* 座におけるヌクレオソームポジションの比較

ミニ染色体とゲノムにおけるヌクレオソームポジションを比較するため、野生型 *TRP1* 遺伝子を有する H4 S47C 株 (MYA-4902) における *TRP1* 遺伝子座周

図のクロマチン構造を調べた。TRP1ARS1 の DNA 配列は IV 番染色体の 461,740 から 463,192 の間の二つの *EcoRI* の間の配列と一致する。この領域を 2 方向から間接末端標識法によって解析した。図 1-10 に示すように、1 つは *EcoRV* 部位から *NsiI* 部位への方向（図 1-10 上、青矢印）であり、もう 1 つは *NheI* 部位から *SacI* 部位への方向（図 1-10 上、赤矢印）である。図 1-10 のケミカルと MNase マッピングは TRP1ARS1 のヌクレオソーム I から VII に対応するヌクレオソームが、ゲノム *TRP1* 座周囲においてポジショニングしていることを明らかにした。さらに、ゲノムにおけるこれらのヌクレオソームの中心点 (dyad) のポジションは TRP1ARS1 とよく一致した (p. 32、表 1-2)。これらの結果は、DNA の塩基配列が、これらのヌクレオソームのポジショニングの主な決定要因であるという考え方を支持する。

さらに、島根大・医学部・加藤太陽博士のご協力を得て、過去に報告されているゲノムワイドのケミカルマッピングならびに MNase-seq の結果⁸⁷⁾と本研究の結果とを比較した。まず、本論文において間接末端標識法を用いて MNase 消化と化学切断によって決定された TRP1ARS1 ミニ染色体と *TRP1* 遺伝子座におけるヌクレオソームポジションは、過去の MNase-seq によって同定されたヌクレオソームマッピングの結果⁸⁷⁾と一致した。さらに、ヌクレオソーム I から III の中心点 (dyad) について、本研究による間接末端標識法の結果と Brogaard らによるゲノムワイドのケミカルマップ (Chem-map)³⁴⁾との間で良い一致を示した。これと対照的に、ヌクレオソーム IV と VII の中心点 (dyad) は Brogaard らの Chem-map³⁴⁾では明確に検出されなかったが、それらのヌクレオソームは、本研究のゲノム *TRP1* 遺伝子座の間接末端標識法で検出された。*TRP1* 遺伝子は構成的に発現しているので、*TRP1* 遺伝子のコード領域においてヌクレオソーム IV から VII の構造と配置はダイナミックに変化していると推察される。この考え方と一致して、MNase-seq 解析⁸⁷⁾におけるリードを 100 bp から 147 bp の長さに広げると、ヌクレオソーム V から VII のピークは、より不明瞭になった (図 1-11、MNase-seq*3 の 100 bp ext と 147 bp ext)。従って、*TRP1* 遺伝子座において、転写されているヌクレオソームでは DNA が部分的に解離し、ヒストン H4 の S47C 残基の周囲に局所的に発生する OH ラジカルの到達範囲を超えている可能性がある。その結果、Brogaard らによって解析されたモノヌクレ

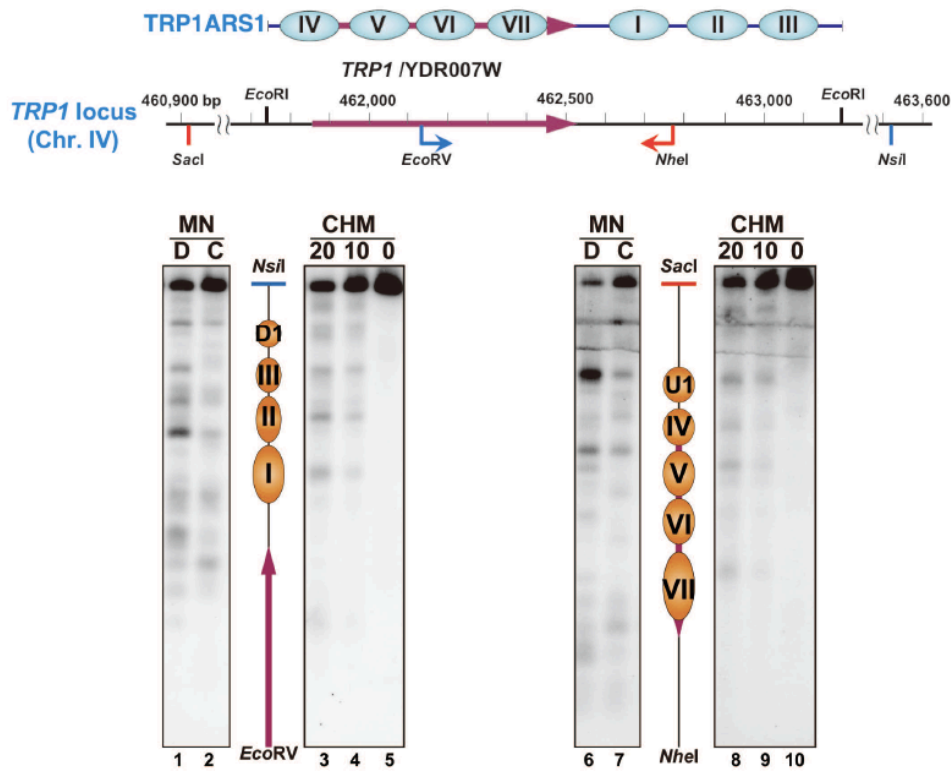


図1-10. 間接末端標識法によるゲノム *TRP1* 遺伝子座における MNase と化学切断法の解析。
 IV 番染色と *TRP1ARS1* における *TRP1* 遺伝子の位置は図上部に示す。 *EcoRV* と *NsiI* または *NheI* と *SacI* の二重消化したサンプルを使用した。切断部位は *EcoRV-HindIII* プローブと *NheI-StuI* プローブを使用して、それぞれ *EcoRV* (左) と *NheI* (右) からヌクレオソームをマップした。0、10、20は化学切断法での反応時間、DとCはそれぞれnaked DNAとクロマチンサンプルをMNase消化したサンプルを示す。IからVIIでラベルしたオレンジ楕円のヌクレオソームは *TRP1ARS1* のIからVIIに対応した。U1とD1でラベルしたヌクレオソームは *TRP1ARS1* 配列の領域の上流と下流のヌクレオソームを示す。(Ref. 58より引用、改変)

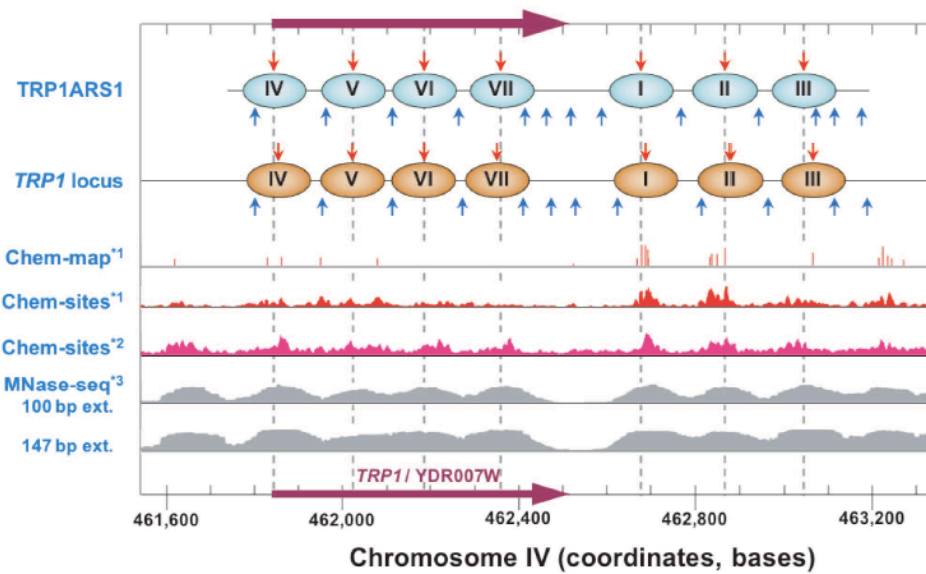


図1-11.本研究で決定したTRP1ARS1とTRP1遺伝子座におけるヌクレオソームの位置とChem-mapとMNase-seqで決定されたTRP1遺伝子座との比較。
 Chem-map^{*1}: Brogaard *et al.* (ref. 34)によって決定されたダイアドポジションを赤色の垂直のバーで示す。バーの高さはそれぞれのダイアドのヌクレオソームのスコアを示す。
 Chem-sites: ワトソン鎖とクリック鎖の両方の化学切断のpileup viewを示す。Brogaard *et al.* (ref. 34)をChem-site^{*1}、Henikoff *et al.* (ref. 52)をChem-site^{*2}でそれぞれ示す。
 MNase-seq^{*3}: Tsankov *et al.* (ref. 86)によって解析されたヌクレオソームポジションを示す。(Ref. 58より引用、改変)

オソームサイズの DNA の分画は、*TRP1* 領域のヌクレオソームに由来する DNA 断片の全てを含んでいない可能性が考えられる。よって、Brogaard らによる報告された Chem-map³⁴⁾では、これらのヌクレオソームは失われやすいことが考察できる。

この可能性を調べるために、Henikoff ら⁵²⁾によって報告されたゲノムワイドのケミカルマップのデータ (Chem-site*2) も調べた。図 1-11 に両者の結果を視覚化した。興味深いことに、Brogaard らによる結果 (Chem-site*1)³⁴⁾と比較して、ヌクレオソーム IV から VII の領域の化学切断部位は Henikoff らによる結果 (Chem-site*2)⁵²⁾では、より明瞭に検出された (図 1-11)。Chem-site*1 と Chem-site*2 の化学切断部位のプロファイルにおける差異を理解するために、これらの解析に使用された DNA 断片の長さを調べた。Brogaard らが使用した DNA 断片の長さの 98% は 100-200 bp の範囲であった³⁴⁾。一方、Henikoff らで解析された DNA 断片はより長い DNA 断片を含めて広く分布しており⁵²⁾、彼らの解析には長いリンカー DNA を有するヌクレオソームの断片が含まれていると考えられる。したがって、Brogaard ら³⁴⁾と Henikoff ら⁵²⁾による化学切断部位のプロファイルにおける差異は、解析に用いられた DNA 断片の長さの分布における違いによって説明できる。以上をまとめると、NGS 解析に使用される DNA 断片の長さは化学切断部位のプロファイルに影響を与えよう。これに関連して、DNA のサイズ選択なしで部分消化した試料を用いた間接末端標識法では、転写されている *TRP1* 遺伝子において、ヌクレオソーム IV から VII での特異的的化学切断を検出できたことを明記したい。間接末端標識法によって検出されたヌクレオソーム IV から VII の化学切断のシグナルは、上流の U1 ヌクレオソームと比較して弱かった (図 1-10、lanes 8-10) ことは、上述の一連の解釈と一致する。

1. 4 結論

本章において、著者は、ゲル電気泳動法をベースとして、出芽酵母細胞核を基質とする部位特異的的化学切断と MNase 消化によるパラレルマッピング法を確立し、*in vivo* でのヌクレオソームのポジションと動的性質を解析することに

成功した⁵⁸⁾。過去の MNase マッピング単独の結果と比較して、本研究で確立したパラレルマッピングによってヌクレオソームの配置はより正確に決定された。本法では、ヌクレオソームの中心点 (dyad) は化学切断によって決定される一方で、MNase のアクセシビリティから、ヌクレオソームの構造的性質と動態を明らかにすることが期待される。実際に、著者は、TRP1ARS1 ミニ染色体とゲノム *TRP1* 遺伝子座において、個々のヌクレオソームの構造と動態は、ヌクレオソームの位置とその置かれている環境に強く依存することを示した。本法では、NGS の技術を必要とせず、そのかわりに繁用されている、安価な電気泳動装置を使用する。実際に、ゲノム全体のマッピングデータは常に必要とは限らず、むしろ、ある特異的遺伝子座を対象に、多くの変異細胞やさまざまな条件下での培養の実験がしばしば必要となる。そのような実験の解析に対して、本論文で確立した間接末端標識法によるパラレルマッピングは有用な方法となることが大いに期待される。

第2章 高い安定性で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の開発

2.1 緒言

緒論で述べたように、エピジェネティクスは発生と細胞の分化、生物におけるホメオスタシスに関与して、エピジェネティクスの異常はがんなどの疾患に密接に関連している⁸⁸⁾。ヌクレオソームのポジショニングやクロマチンの動態は遺伝子の発現のみならず、エピジェネティックな制御に関与することが広く受け入れられている^{12,13,89,90)}。ヒストンの翻訳後修飾、クロマチンリモデリング、DNA 構造、転写など複数の要因がゲノムにおけるヌクレオソームポジショニングに関与することが提唱されてきた^{11,29,30,91)}。事実、DNA のメチル化酵素、ヒストン修飾酵素、クロマチンリモデリング因子のようなエピジェネティック制御に関与する因子を標的とした多くの薬剤が開発されつつあり、現在、がん治療の臨床試験が行われている⁹²⁾。

加えて、標準的なヌクレオソームとは異なる多様なヌクレオソーム構造が報告されているが^{45-57,93)}、ゲノムにおける多様なヌクレオソームの構造、動態と形成機構についてはほとんど分かっていない。細胞核内におけるヌクレオソームの動態やヌクレオソームポジショニングの分子機構を理解することは、クロマチン機能とエピジェネティックな制御機構の解明に必須であるが、これらを研究するための適切な実験系は未だ発展途上にある。ヌクレオソームに対する薬剤の詳細な反応、多様なヌクレオソームの動態とポジショニングの分子機構を調べるためには、*in vivo* で安定にポジショニングしたヌクレオソームの系が必要である。

著者は、このようなアッセイ系には出芽酵母ミニ染色体の実験系^{15,16)}が有用となるのではないかと考えた。事実、TRP1ARS1 ミニ染色体とその誘導体である TALS ミニ染色体は、ヌクレオソーム形成に及ぼす DNA 配列の影響、ヌクレオソームに対する転写因子の結合などを調べるために利用されてきた^{58,77,79,94-99)}。著者は、第1章において、部位特異的 OH ラジカルと MNase 消化を利用したパラレルマッピングを確立した。著者は、このパラレルマッピング

法を用いて、出芽酵母ミニ染色体における個々のヌクレオソームではその占有率と安定性が異なることを見出した。本章では、DNA の塩基配列を改変することによって、出芽酵母ミニ染色体におけるヌクレオソームポジショニングの安定性を改善することを目的とした。

2. 2 実験方法

2. 2. 1 出芽酵母菌株とプラスミド

TALS プラスミドは、Roth らによって構築された¹⁶⁾。大腸菌でプラスミドの構築を行うために、TALS プラスミド断片をプラスミド pBR322 の *Hind*III 部位に挿入した TALS-pBR322ΔRI を用いた⁷⁷⁾。以下のようにして、superior-positioning-TALS から命名した、spTALS1~spTALS4 を構築した⁵⁹⁾。

spTALS1-pBR322ΔRI では、TALS に含まれる pUC19 の DNA 配列部分を取り除くため、2つの *Eco*RI 部位間の 358 bp 領域を、*STE6* の上流配列を含む 378 bp 断片 (-457 から-83、翻訳開始の塩基対を+1 と定義) によって置換することによって構築した。

spTALS2-pBR322ΔRI は、spTALS1-pBR322ΔRI を鋳型とし、5'末端に *STE6* プロモーター領域の配列を-83 から-66 まで伸ばしたプライマーを用いるインバース PCR 法によって構築した。

spTALS3-pBR322ΔRI では、*TRP1* プロモーターの領域を広げるために、spTALS1 における *STE6* の-391~-457 を、*TRP1* の-104 から-170 に置き換えた。

spTALS4-pBR322ΔRI では、spTALS1-pBR322ΔRI を鋳型とし、5'末端に *STE6* プロモーター領域の配列を-83 から-66 まで伸ばしたプライマーを用いるインバース PCR 法によって構築した。

構築した全てのプラスミドは塩基配列決定によって、それらの構築を確かめた。spTALS1~spTALS4 の塩基配列は、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録した。Accession numbers は、spTALS1、spTALS2、spTALS3、spTALS4 について、それぞれ LC424430、LC424431、LC424432、LC424433 である。

pBR322ΔRI の DNA 断片を *Hind*III 消化で取り除き、TALS または spTALS1~spTALS4 断片を自己環状化して、MHS3006 株に形質転換によって導

入した。MHS3006 株の遺伝子型は、以下のとおりである (p. 15、表 1-1 も参照)⁵⁸⁾。 [*MAT α ura3-52 trp1 Δ 63 leu2 Δ 1 hhf1::S47C hhf2::KanMX*]

2. 2. 2 化学切断または MNase 消化によるヌクレオソームポジションの解析

過去に報告された方法にしたがって^{19,58,98)}、TALS または spTALS1~spTALS4 を導入した MHS3006 株の細胞から核を単離した。また、単離核を基質とするヒストン H4 S47C 部位特異的的化学切断または MNase 消化、間接末端標識法による切断部位の解析、Typhoon FL7000 biomolecular imager (GE Healthcare UK Ltd) による結果の可視化については、第 1 章ならびに過去の論文に記述した⁵⁸⁾。

2. 3 結果と考察

2. 3. 1 TALS ミニ染色体におけるヌクレオソームの平行マッピング

図 2-1 に示すように、Roth らは、出芽酵母ミニ染色体 TRP1ARS1 (1,453 bp) を骨格とし、その *EcoRI* 部位に、*STE6* プロモーター配列 (-244 から-118) と pUC19 プラスミド由来の *lac* プロモーターを含む 358 bp の断片を挿入して、TALS を構築した¹⁶⁾。TRP1ARS1 は、出芽酵母 IV 番染色体由来の 103 bp の *TRP1* プロモーター領域を含む *TRP1* 遺伝子と ARS1 (Autonomously Replicating Sequence 1) から構成されている。なお、TRP1ARS1 ミニ染色体におけるヌクレオソームのポジションの詳細な解析結果は、第 1 章および過去の論文⁵⁸⁾で述べた (p. 26、図 1-5B および p. 32、表 1-2 参照)。*STE6* 遺伝子は、出芽酵母の **a** 細胞特異的遺伝子であり、*STE6* の転写は、**a** 細胞では活性化されているが、 α 細胞では α 2//Mcm1 リプレッサーによって抑制されている。過去に報告された TALS の MNase マッピング結果では、 α 2//Mcm1 リプレッサーが α 2 オペレーターに結合し、Tup1-Ssn6 コリプレッサーや Isw2 クロマチンリモデリング複合体の作用によって、ポジショニングしたヌクレオソームが α 2 オペレーターに隣接して形成されることが示された^{16,19,97,100-102)}。

本章において、まず、TALS におけるヌクレオソームのポジションを平行マッピング法で再検証した。第 1 章で述べてように、MNase は優先的にリン

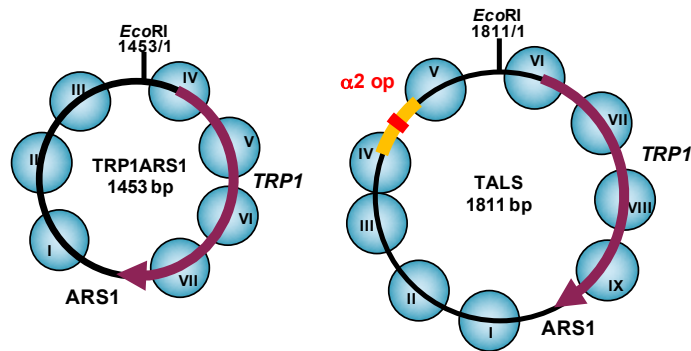
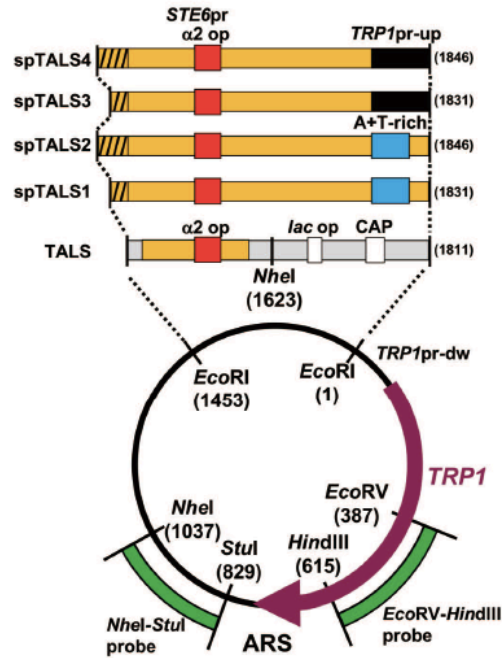


図2-1. TALSとspTALS1-4のマップ

出芽酵母IV番染色体由来のTRP1ARS1環状DNAを黒色の円で示す。TALSはTRP1ARS1の二つのEcoRI部位の間に127 bpのSTE6のプロモーターの配列(-244から-118)(黄色)とlacオペレーターとCAPサイトを含むpUC19(灰色)を含んでいる358 bpを挿入したものである。a2オペレーター、lacオペレーター、CAPサイト、A+Tに富んだ領域をそれぞれボックスで示す。ARSは自律複製配列(autonomously replicating sequence)。制限酵素部位の位置をEcoRI(1/1453)、EcoRV(387)、HindIII(615)、NheI(1037/1623)、Stul(829)で示す。下にTRP1ARS1とTALSミニ染色体におけるヌクレオソームの配置を示す。(Ref. 59より引用、改変)

カーDNA を切断するが、G+C に富んだ配列よりも A+T に富んだ配列に対して優先性を示す³¹⁻³³)。ケミカルマッピングでは、ヒストン H4 の S47C 残基の周りに局所的に発生した OH ラジカルがヌクレオソームの中心点 (dyad) 近傍の DNA 骨格を切断する^{34,35})。したがって、MNase とケミカルマッピングを組み合わせることによって、より詳細にヌクレオソームのポジションを決定することが可能である (図 2-2A)⁵⁸)。

図 2-2B に、間接標識末端法を用いたパラレルマッピングによる TALS におけるヌクレオソームのポジションの解析結果を示す。第 1 章で述べたように、一般に、MNase で切断される部位はリンカーDNA またはヌクレオソームフリー領域であると解釈され、naked DNA の切断パターンと比較して、約 140-150 bp の MNase から保護された領域はヌクレオソームと帰属された (図 2-2B、lanes 2-4)。これに対して、OH ラジカルの切断部位は、MNase の切断から保護された領域の中央に検出された (図 2-2B、lanes 5-9)。その結果、TALS におけるヌクレオソーム I から IV のポジションは化学切断部位を中心に ± 72 bp の領域として正確に帰属することができた (表 2-1)。この結果は、以前の解析結果とよく一致したが、従来の MNase マッピングでは分からなかった、以下の 2 つの点が新たに明らかになった。

1 つは、以前の MNase マッピングによって¹⁶)、ヌクレオソーム V と VI の間に暫定的にヌクレオソームが帰属されたが (図 2-2B、lanes 4 と 5 の間のヌクレオソームアレイにおける点線の楕円)、本研究における化学切断法では検出されなかった (図 2-2B、lanes 6-9) ことである。すなわち、この暫定的に帰属されたヌクレオソームは存在しないことが実証された。この領域では、naked DNA とクロマチンの両サンプルにおいて MNase での切断が見られなかったため、不明瞭なヌクレオソームの帰属になったと言える。

2 つめは、さらに重要なことに、TALS ミニ染色体において、ヌクレオソーム IV の占有率がヌクレオソーム I から III のそれよりも低いことが、それらの化学切断部位のバンド強度から明らかになった (図 2-2B、lanes 5-9)。過去の MNase や DNase I マッピングによればヌクレオソーム IV は $\alpha 2$ オペレーターに隣接して正確にポジションしているので^{19,77,79})、この結果は予想外であった。MNase や DNase I などの酵素によるマッピングはヌクレオソームのポジション

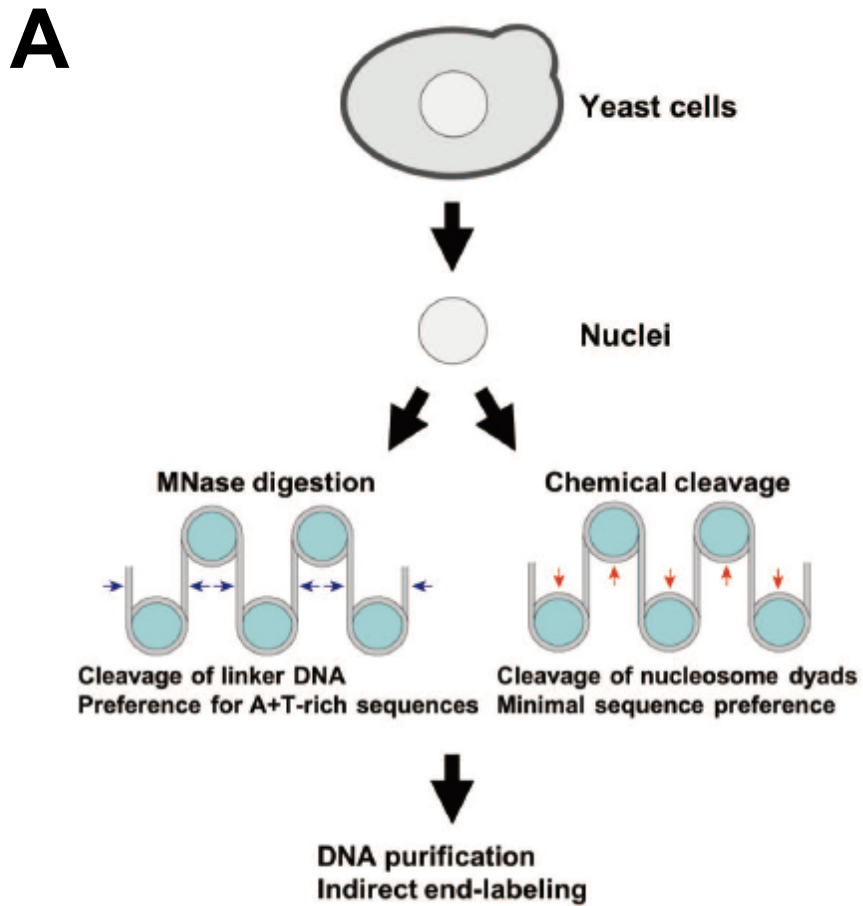


図2-2 (A) *In vivo*における化学切断法とMNase消化によるパラレルマッピングのスキーム。
出芽酵母から単離した核におけるクロマチンがMNaseまたは化学切断法によって処理される。
MNaseはヌクレオソーム間のリンカーDNAが切断される。一方、化学切断ではヌクレオソームダイアド
近傍のDNAが切断される。MnaseはA+Tに富んだ配列に嗜好性を有するが、化学切断では配列への
依存性が少ない。(Ref. 59より引用、改変)

B

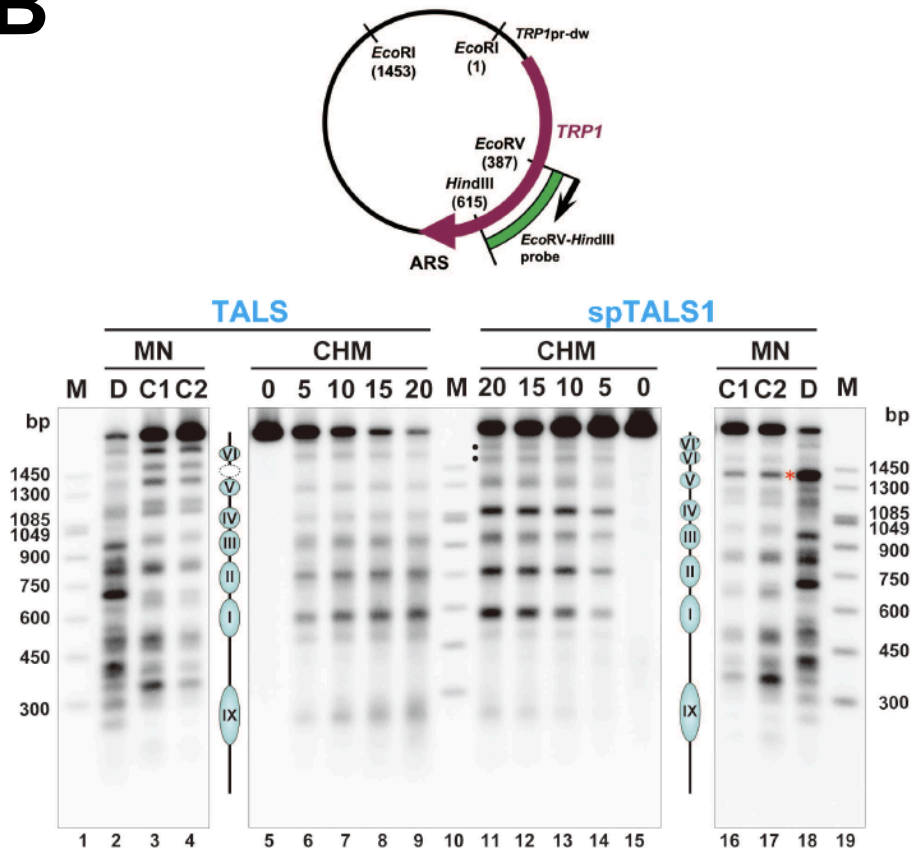


図2-2(B).間接末端標識法によるTALSおよびspTALS1のヌクレオソームポジショニングの解析。*EcoRV*から時計回りの方向に*EcoRV-HindIII*プローブを用いて切断部位をマップした。DとCはそれぞれnaked DNAとクロマチンサンプルをMNaseで消化したサンプルを示す。0、5、10、15、20は化学切断法における反応時間(分)を示す。TALSにおいて白いdotsで示すヌクレオソームはRoth *et al.*で報告されたTALSにおいて仮に置かれていたヌクレオソームを示す。spTALS1において見られたヌクレオソームVIIに由来する二つの切断部位を黒色ドット(レーン11)で示す。レーン17と18の間のred asteriskはspTALS1におけるA+Tに富んだ領域を示す(Ref. 59より引用、改変)。

表2-1 H4 S47C部位を介した化学切断法で決定したヌクレオソームの中心点(dyad)⁵⁹⁾

The dyad position of nucleosome									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
TALS	946	1131	1301	1458	1685	126	286 / 344	469	623
spTALS1	939	1127	1322	1481	1690	52 / 170	348	465 / 506	624
spTALS2	948	1130	1328	1497	1712	43 / 159	343	462 / 497	617
spTALS3	947	1134	1329	1481	1741	99	283 / 342	459 / 509	620
spTALS4	943	1129	1325	1492	1748	102	289 / 344	465 / 503	618

についての情報を与えるが、その占有率についての情報は得られない。したがって、H4 S47C 残基を介した化学切断法の利点は、切断された DNA のバンドの強度からヌクレオソームの占有率を直接判断できることである。

化学切断法により、TALS におけるヌクレオソーム III と IV の中心点 (dyad) は、それぞれ 1,301 と 1,458 に決定された (表 2-1)。ヌクレオソーム DNA が 146 bp と仮定すると、この結果はヌクレオソーム II と IV との間のリンカー DNA は 10 bp と算出される。それは報告されている出芽酵母の平均的リンカー DNA の長さ⁹¹⁾である 18 bp よりも短い。この結果は、ヌクレオソーム III の形成がヌクレオソーム IV の形成を妨げていることを意味しているかもしれない。すなわち、ヌクレオソーム III が IV よりも優先的に形成されると、ヌクレオソーム III の端から $\alpha 2$ オペレーターまでの領域はヌクレオソーム IV の形成に十分な長さではないのかも知れない。

2. 3. 2 spTALS1 ミニ染色体におけるヌクレオソームの平行マッピング

TALS におけるヌクレオソーム IV の安定性を改善するために、spTALS1 を構築した。spTALS1 のデザインでは、1) ヌクレオソームは、一般的に、大腸菌由来の DNA 配列を好まず、酵母由来の DNA 配列をより強く好むこと²⁹⁾、2) TALS におけるヌクレオソーム III と IV の間のリンカー DNA 長が出芽酵母の平均リンカー DNA 長 (~ 18 bp)⁹¹⁾より短いこと、の 2 つを考慮した。まず、TALS の配列で大腸菌プラスミド pUC19 に由来する部分を、出芽酵母の *STE6* の上流配列 (-457 から -83) に置換することによって除いた。次に、spTALS1 において *EcoRI* 部位間の領域の挿入配列を 358 bp から 378 bp へと長くした (図 2-1)。

図 2-2B に、TALS とともに、spTALS1 の平行マッピングの結果を示す。TALS の結果 (lanes 5-9) と比較して、spTALS1 (lanes 11-15) におけるケミカルマッピングでは、ヌクレオソーム IV のバンドのみならず、ヌクレオソーム I と II のバンドの強度も増大し、それらはより明瞭になった。ヌクレオソーム I から V に対応する領域は MNase 消化から保護された (lane 16-18)。しかしながら、ヌクレオソーム I、II、IV と比較して、ヌクレオソーム III に由来する化

学切断部位のバンドはぼやけて弱かった。したがって、spTALS1 はヌクレオソーム I から IV のアレイを安定にポジショニングするという本研究の目的に対して十分とは言えなかった。

2. 3. 3 spTALS2-4 ミニ染色体におけるヌクレオソームのケミカルマッピング

spTALS1 におけるヌクレオソームのポジショニングを改良するために、spTALS2 では *EcoRI* 部位間の挿入配列を 378 bp から 393 bp の長さに延長した (図 2-1)。spTALS2 のクロマチン構造を H4 S47C 部位特異的の化学切断法で解析した (図 2-3)。図 2-3A では *EcoRV* 部位から反時計回りにヌクレオソーム I から VI を、図 2-3B では *NheI* 部位から時計回りにヌクレオソーム IX から III を検出した (ただし、図 2-3B の TALS において *EcoRI* 間に挿入された 358 bp に *NheI* 部位が存在するため、TALS ではヌクレオソーム IX から VI までが検出された)。

図 2-3A における lanes 10 と 16 に見るように、spTALS2 におけるヌクレオソーム III に由来するバンドは spTALS1 と比較してより明瞭になり、ヌクレオソーム I、II、IV のバンドパターンは、spTALS1、spTALS2 と同様であった。この結果は、ヌクレオソーム III が spTALS1 では redundant position で形成されているのに対して、spTALS2 では non-redundant position で安定に形成されたことを示している。

一方、ヌクレオソーム VI に着目すると、TALS と spTALS1、spTALS2 ではその形成が異なっていた。すなわち、ヌクレオソーム VI は主として 1 つのポジションで形成されるのに対して、spTALS1 と spTALS2 では 2 つのポジションで排他的に形成された (図 2-3A、lanes 9 と 10 との間の dots および図 2-3B、lanes 33 と 34 との間のドット)。spTALS1 における、この領域の MNase マッピングの結果を見ると (図 2-2B、lanes 16-18、red asterisk で示す)、*STE6* における 45 bp の A+T に富んだ領域 (spTALS1: 1,764-1,808, spTALS2: 1,779-1,823) は、クロマチンと naked DNA の両方の試料において、MNase によって強く切断されており、それはヌクレオソーム V と VI との間に位置する。この結果は、この A+T に富んだ領域がヌクレオソームの外側、すなわちヌクレオソームに

A

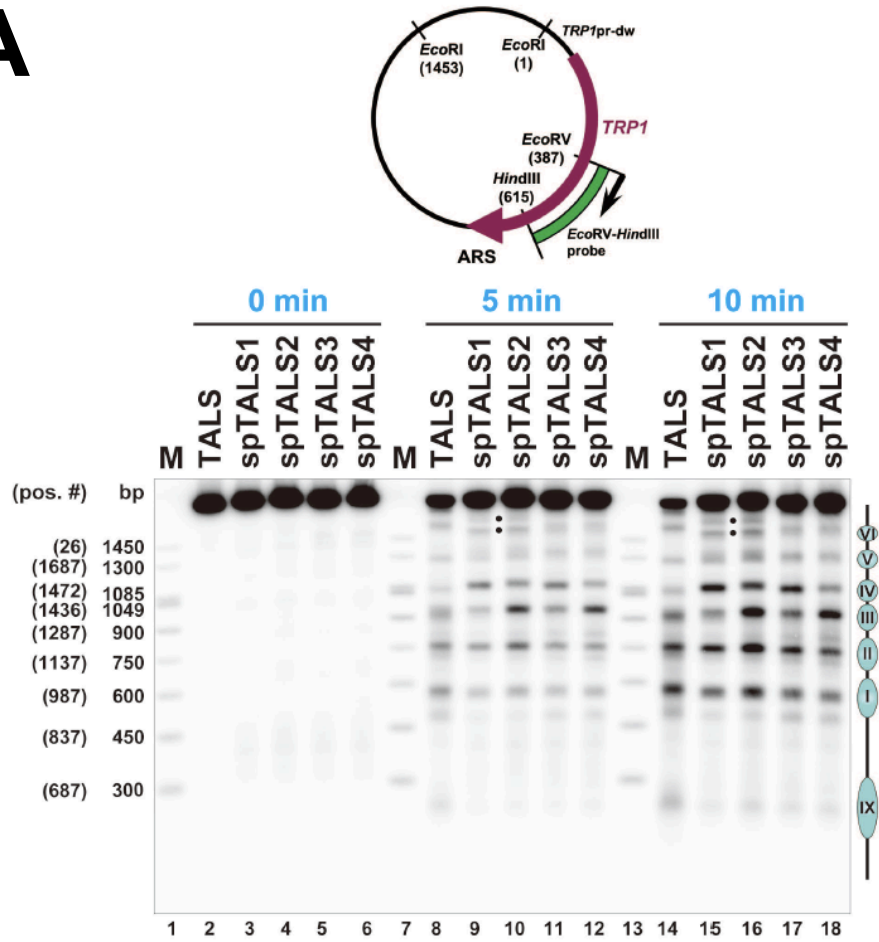


図2-3(A).間接末端標識法によるTALSおよびspTALS1-4のヌクレオソームポジションの解析。化学切断法によって調製した各サンプルをEcoRVで消化し、EcoRV-HindIIIプローブを用いて間接末端標識法により検出した。ミニ染色体のヌクレオソームの位置を右側に示した。spTALS1,2の間のdotsはヌクレオソームVIIに由来する二つの切断部位を示す。(Ref. 59より引用、改変)

B

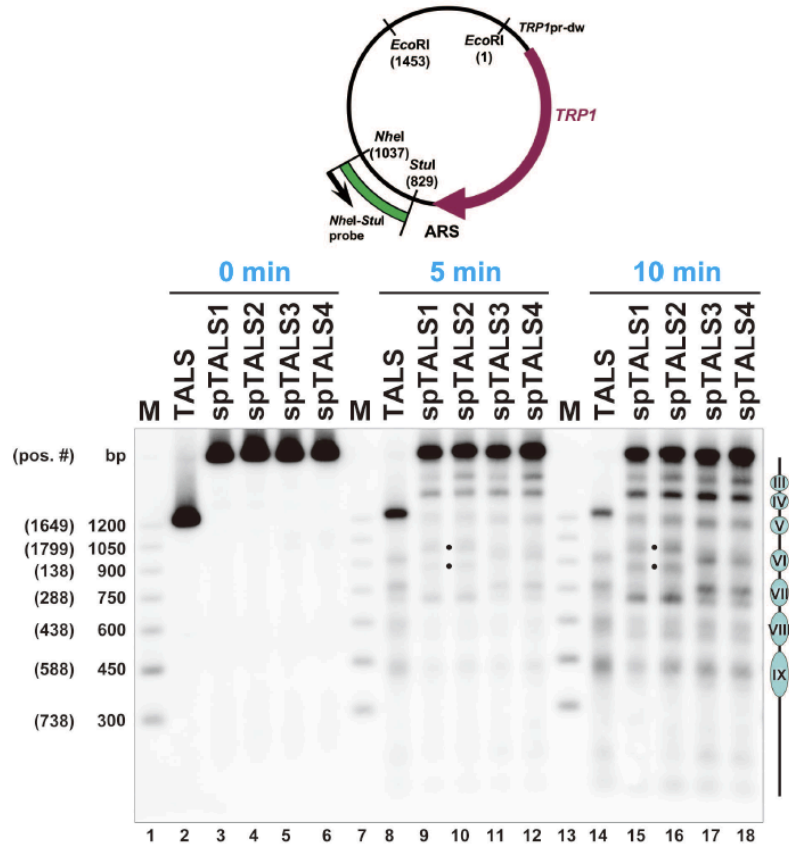


図2-3(B).間接末端標識法によるTALSおよびspTALS1-4のヌクレオソームポジションの解析。化学切断法によって調製した各サンプルをNheIで消化し、NheI-StuIプローブを用いて間接末端標識法により検出した。ミニ染色体のヌクレオソームの位置を右側に示した。spTALS1, 2の間のdotsはヌクレオソームVIIに由来する二つの切断部位を示す。(Ref. 59より引用、改変)

取り込まれにくいことを示している。

そこで、TALS と同じように、spTALS1 と spTALS2 のヌクレオソーム VI を 1 つのポジションにするために、spTALS1 と spTALS2 における *STE6* 由来の 45 bp の A+T に富んだ領域を *TRP1* のプロモーター領域を延長（図 2-1、*TRP1*pr-up、-170 から-104）することによって置換して取り除き、spTALS1 と spTALS2 からそれぞれ spTALS3 と spTALS4 を構築した。その結果、spTALS3 と spTALS4 におけるヌクレオソーム VI は、TALS のそれとほぼ同じ 1 つのポジションに形成された（図 2-3A、lanes 17 と 18 および図 2-3B、lanes 35 と 36）。したがって、*TRP1* 領域におけるヌクレオソームの配置に関して、spTALS3 と spTALS4 は TALS とほぼ同じになった。

また、ケミカルマッピングの結果（図 2-3A）は、spTALS3 と spTALS4 におけるヌクレオソーム I から IV のアレイの配置が spTALS1 と spTALS2 のそれと同様であることを示した。したがって、spTALS1 と spTALS2 における *E. coli* DNA の除去および *EcoRI* 部位の間の挿入配列の伸長がヌクレオソーム I から IV までのポジショニングを改善したと結論づけられる。

さらに、*TRP1* の遺伝子内領域にあるヌクレオソーム V から IX を *NheI* 部位からの反時計回りのケミカルマッピングの結果から解析した（図 2-3B）。ヌクレオソーム V から IX の化学切断部位のバンドは、同じレーンにあるヌクレオソーム III と IV のバンドと比較して相対的に弱く見られた（図 2-3B、lanes 27-30、33-36）。この結果は、*TRP1* 遺伝子の coding region とプロモーターにおけるヌクレオソーム V から IX は安定に形成されておらず、むしろ遺伝子の転写によってヌクレオソームの構造がダイナミックに変化するという考え方⁵⁸⁾を支持する。

2. 3. 4 ヌクレオソームの中心点(dyad)のポジションとリンカーDNA 長の解析

図 2-3 の結果に基づいて、DNA サイズマーカー（TALS を鋳型として PCR で作製）の泳動距離から検量線を作成し、各ミニ染色体における化学切断部位（バンドの中央）から個々のヌクレオソームの中心点（dyad）のポジションを算出した。それらの結果を表 2-1 と図 2-4 にまとめた。ヌクレオソーム I と II に関

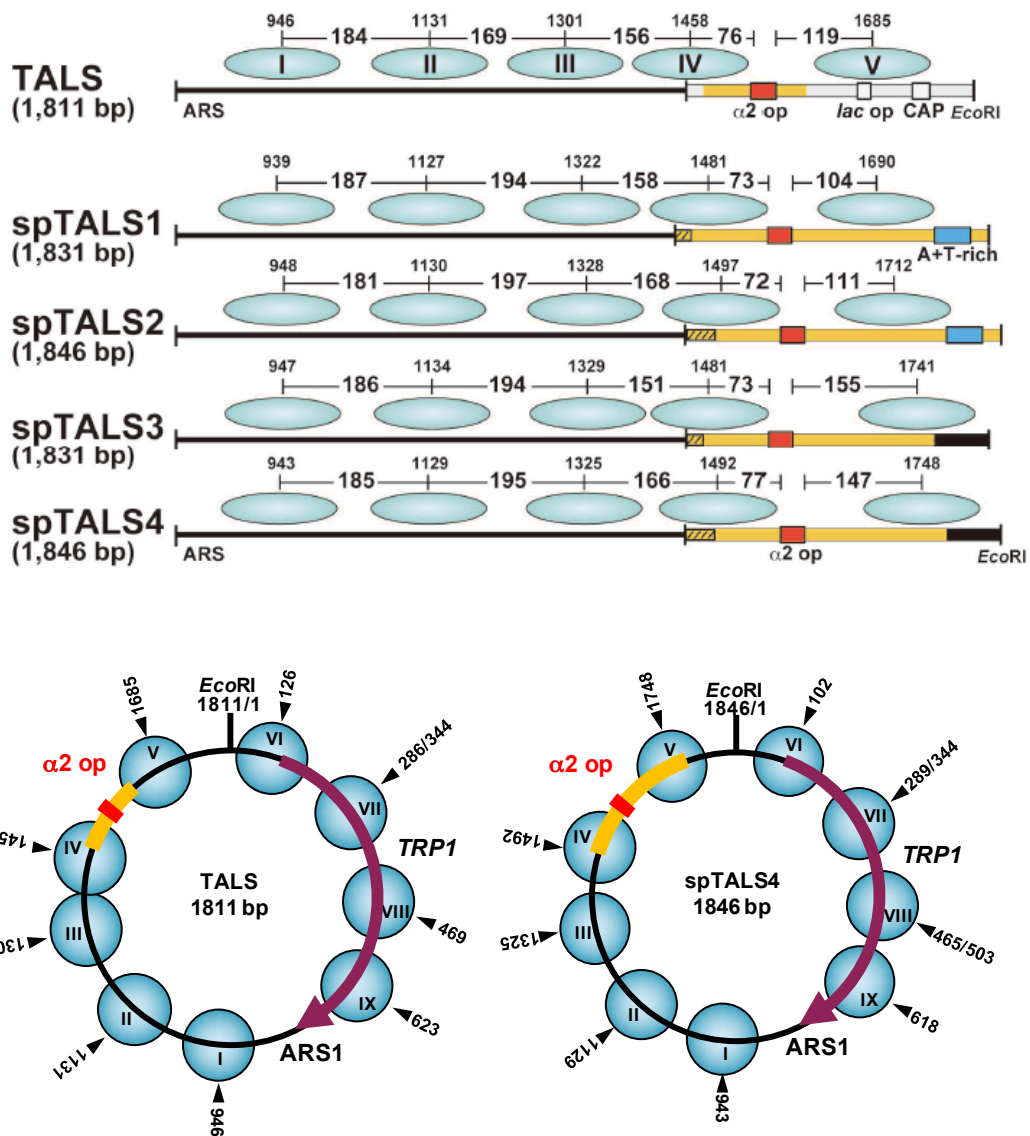


図2-4. TALSおよびspTALS1-4のヌクレオソームポジションのまとめ
 水色楕円はヌクレオソームの位置を示す。ヌクレオソームのダイアドのポジションは間接末端標識法での化学切断部位で決定した。下にTALSとspTALS4ミニ染色体におけるヌクレオソームの配置を示す(表2-1参照)(Ref. 59より引用、改変)

して、TALS と spTALS1～spTALS4 の全てのミニ染色体において、ヌクレオソームの中心点 (dyad) のポジションはアガロースゲル電気泳動の分解能を踏まえると、ほぼ同じ値であった。すなわち、ヌクレオソーム I と II のポジションは、それぞれ $943 \pm 4-5$ と $1,130 \pm 3-4$ であった。これらの結果は、ヌクレオソームポジショニングの主要な決定因子として ARS1 が境界として作用するという考えを支持する。

ヌクレオソーム III の中心点 (dyad) は、spTALS1～spTALS4 においてほぼ同じであり、それは $1,325 \pm 3-4$ であったが、TALS のヌクレオソーム III ($1,301$) とは異なっていた。ヌクレオソーム IV の中心点 (dyad) は、TALS と spTALS1～spTALS4 において $1,458 \sim 1,497$ であり、一見、それぞれのミニ染色体ごとに異なっているように見える。しかし、 $\alpha 2$ オペレーターの端からヌクレオソーム IV の中心点 (dyad) までの距離は全てのミニ染色体においてほぼ一定であった。この結果は、 $\alpha 2$ /Mcm1 リプレッサーが、Ssn6-Tup1 コリプレッサーと Isw2 クロマチンリモデリング因子複合体と協調して、ヌクレオソームを積極的にポジショニングするというモデル^{16,19,97,100-102)} で矛盾なく説明できる。

さらに、二つの隣接するヌクレオソームの中心点 (dyad) 間の長さ (図 2-4) から 146 bp を引くことによって、リンカーDNA の長さを決定した。ヌクレオソーム I と II との間、リンカーDNA の長さは、TALS と spTALS1～spTALS4 においてほとんど同じだった (38 ± 3 bp)。ヌクレオソーム II と III との間、リンカーDNA の長さは、TALS の 23 bp と比較して、spTALS1～spTALS4 ($49 \pm 1-2$ bp) で増加した。ヌクレオソーム III と IV との間、リンカーDNA の長さは、TALS、spTALS1 と spTALS3 では 5-12 bp と出芽酵母の平均リンカーDNA 長 (18 bp) より短かったが、EcoRI 部位間の挿入配列を長くした spTALS2 と spTALS4 ではそれぞれ 22 bp と 20 bp に増加した。

従って、ヌクレオソーム II と III の間のリンカーDNA の長さの増加は、EcoRI 部位と $\alpha 2$ オペレーターとの間の 20 bp の伸長によって引き起こされた可能性が高い。また、ヌクレオソーム III と IV は、さらに追加で 15 bp 伸長 (合計 35 bp の伸長) したことに起因すると考察された。以上の結果から、ヌクレオソーム II と III の間のリンカーDNA の増加が spTALS1～spTALS4 におけるヌクレオソーム IV の安定な形成をもたらしたと解釈した。一方、ヌクレオソーム III

は spTALS1 と spTALS3 で redundant なポジションに形成されたが、spTALS2 と spTALS4 では non-redundant なポジションに形成された。この事実はヌクレオソーム III と IV の間のリンカーDNA の長さの増加が、ヌクレオソーム III の安定なポジショニングを引き起こしたことを示唆する。したがって、適切なリンカーDNA の長さは、ヌクレオソームポジショニングにおいて重要であると考察した。

2. 4 結論

本章では、DNA の配列とリンカーDNA の長さを操作することによって出芽酵母ミニ染色体の系を改良し、*in vivo* において高度にポジションしたヌクレオソームを形成することに成功した⁵⁹⁾。著者は、TALS から 4 種類の誘導体を作製し、ヌクレオソームの形成とポジショニングを解析した結果、spTALS2 と-4 は、TALS、spTALS1 と spTALS3 に比較して、ヌクレオソームのポジショニングの安定性がより優れていると結論する。ヌクレオソーム I から IV は高度にポジションする一方で、ヌクレオソーム V から IX は *TRP1* 遺伝子の転写の影響で相対的に不安定だった。本章で構築した *in vivo* の系はヌクレオソームの構造的性質とダイナミクスの解析のみならず、ヒストンアセチル化—脱アセチル化酵素、ヒストンのリジンのメチル化—脱メチル化酵素、ブロモドメインのリガンドなどのようなエピジェネティック制御タンパク質に影響を及ぼす因子の解析にも有用であると考えられる。

エピジェネティクスの異常はがんに共通して認められ⁸⁸⁾、ヒストン修飾酵素、クロマチンリモデラーおよび転写因子を標的とする化学予防的アプローチががんの研究分野で現在進行中である⁹²⁾。本研究で開発した出芽酵母ミニ染色体は、これらの薬剤が、ヒストン修飾酵素およびクロマチンリモデラーの活性の変化に伴うヌクレオソームの変動に及ぼす影響を調べるために利用されることが期待される。例えば、ある特定のエピジェネティック制御因子の阻害剤を出芽酵母の培地に添加することで、ミニ染色体のヌクレオソーム変化に及ぼすその影響は、本システムを用いて検出することができるであろう。さらに、薬物作用の効果は、野生株とともに、エピジェネティック制御遺伝子の変異株

を調べることができる。したがって、高度にポジショニングしたヌクレオソームから構成される本ミニ染色体システムは、エピジェネティック治療薬の詳細な作用を評価し、*in vivo* でのエピジェネティック異常とヌクレオソーム動態との関係を解明するための有用なツールとなることを期待する。

総括

総合的考察

ヒトゲノム DNA の塩基配列の解読終了後に残された重要な問題の 1 つは、DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御するエピジェネティクスの分子機構である。エピジェネティクス、クロマチンのそれぞれの研究の歴史は古いですが、この 10-20 年間に、クロマチンはにおいてエピジェネティクスにおいて中心的役割を果たしていることが明らかになった^{13,89,90}。緒論で述べたように、エピジェネティクスの分子機構として、DNA メチル化のほかに、ヒストンの翻訳後修飾、クロマチンリモデリングとヌクレオソームのポジショニングの動態、クロマチン高次構造の変化が提唱されてきた^{11-13,89,90}。これらの分子機構を研究するための手法についても、この 10-20 年の間に大きく発展している。

2003 年のヒトゲノム解析終了当時では、ヒトゲノム解読にかかるコストは約 27 億ドルだったが、2017 年にはイルミナ社は 100 ドルの費用で、約 1 日でヒトのゲノムを解析できる新製品を発表した (<https://techcrunch.com/2017/01/10/illumina-wants-to-sequence-your-whole-genome-for-100/>)。この技術進歩の背景には、次世代シーケンサー (NGS) の開発が大きな要因である。近年、クロマチン解析においても、NGS はとても強力で有効な解析手段として幅広く使用されている³⁰。例えば、細胞核内クロマチンを MNase でモノヌクレオソームサイズまで分解し、その DNA 断片の塩基配列を NGS で決定する手法 (MNase-seq) は、さまざまな生物種のクロマチンにおけるヌクレオソームの全般的状況の解明に大きな寄与をしている^{57,87,103}。

一方、2000 年代初頭に確立されたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) によって回収した DNA 断片を NGS で解析する ChIP-seq もまた世界中で繁用されている^{40,104,105}。しかし、MNase の固有的性質や抗体の品質に影響される点などの短所がある点³¹⁻³³)や、NGS による解析にはライブラリー調製時のバイアス、実験費用の問題とバイオインフォマティクス解析の専門性が要求されることなど、NGS 関連実験を遂行するうえでの障壁も存在する^{74,75}。

また、ヌクレオソームの細胞核内動態、多様なヌクレオソームの構造と形成

機構、エピジェネティック創薬の応用などの研究を考えると、全ゲノムを対象とする方法に加えて、均質なクロマチン構造の人工的なアッセイ系の開発が有効であると思われる。

2012年に、Brogaardらが開発したヒストンH4のS47C残基を介する部位特異的化学切断法は、画期的な方法の一つである^{34,35)}。この方法では、局所的にOHラジカルを発生させ、ヌクレオソームの中心点(dyad)近傍のDNAを切断するという方法である。OHラジカルにはDNAに対する塩基特異性がほとんどないので、MNaseよりも均質的にクロマチンを切断できるという大きな利点がある。Wangらのグループは化学切断されたモノヌクレオソームサイズのDNA断片をNGSで解析し、出芽酵母、分裂酵母、マウスにおけるヌクレオソーム配置の全体像を明らかにした^{34,72,73)}。

このような研究背景を踏まえて、本論文の結果を総括する。

第1章では、著者は、まず、H4 S47Cを介した部位特異的化学切断法に着目し、細胞核をMNaseで限定消化するマッピング法と組み合わせて、通常の実験手法でヌクレオソームのポジションをより正確にかつ詳細に解析する方法を開発することを考えた。すなわち、出芽酵母をモデル生物として、細胞核を単離する。細胞核を基質として、MNaseまたは化学切断法によりクロマチンを限定消化し、調製した試料を同一ゲル上で電気泳動法により両者を並行して解析するという、パラレルマッピング法を確立した。この方法は、通常分子生物学・生化学の実験室で行うことができ、NGSなどの特別な装置やバイオインフォマティクス解析も必要ではない。ある特定の遺伝子座の解析に着目する研究では、NGSによるゲノム全体の解析が常に必要とは限らない場合も多いと考えられ、むしろ変異体や実験条件などを変えて、一つの遺伝子座の解析を行うという場合にはより適した実験手法である。出芽酵母ミニ染色体TRP1ARS1とゲノムTRP1遺伝子座を例として、ヌクレオソームのポジションとその動態の解析に極めて有効であることを実証した。ヌクレオソームはその配置や転写などの影響を受け、個々のヌクレオソームでその構造的性質や動態が異なることが示された⁵⁸⁾。

第2章では、著者は、ヌクレオソームの細胞核内動態、多様なヌクレオソームの構造と形成機構、エピジェネティック創薬の応用などの研究へ展開するた

めには、ゲノムワイドを対象とする方法に加えて、均質なクロマチン構造の人工的なアッセイ系の開発が有効であると考えた。従来よく用いられてきた出芽酵母ミニ染色体に着目し、それを基盤としてより高度に安定に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のアッセイ系を構築した。第1章で確立したパラレルマッピング法を、従来よく使用されてきた出芽酵母ミニ染色体のヌクレオソームの解析に適用したところ、MNase 単独のマッピングでは知り得なかった事実を明らかにした。そこで、DNA の塩基配列とリンカーDNA 長を改変して、より安定に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構築することができた⁵⁹⁾。今後、ヒストンの翻訳後修飾、クロマチンリモデリング因子複合体などによるヌクレオソームの構造変換機構、非標準型ヌクレオソームの多様な構造と動態の解明に有用であることが期待できる。一方では、エピジェネティック制御因子に作用する薬物のヌクレオソーム構造に及ぼす影響、エピジェネティック創薬のスクリーニングなどに利用されることも大いに期待できる。

本研究の今後の展望

本論文における成果を基にして、*in vivo* でのヌクレオソームの多様な構造と動態を解明することを目的として、現在、ヒストン H4 の S47C 残基に加えて、4種類のコアヒストンの局所的な DNA 結合部位を化学切断法で検出する方法の開発に着手している。すなわち、第1章で確立したパラレルマッピング法を4種類のコアヒストンの DNA 結合部位に適用して、ヌクレオソームの動態の新たな解析法として発展させることを目指している。そのためには、ヌクレオソームにおいて DNA と接触することが予想される残基に Cys 変異を導入する必要がある。これまでに報告されたヌクレオソームの結晶構造などを参考に^{5,8,106)}、各コアヒストン分子に導入する Cys 変異のデザインを図6に示す。第1章で述べたように、出芽酵母の一倍体ゲノムには各コアヒストンの遺伝子は2コピーずつ存在する。一方のヒストン遺伝子に Cys 変異を導入し、他方のヒストン遺伝子は *KanMX* または *URA3* 遺伝子で置換破壊し、Cys 変異導入ヒストンのみが発現する株を構築する。

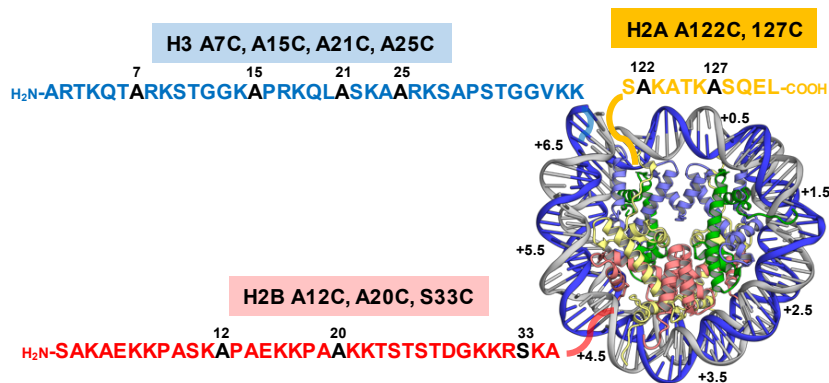
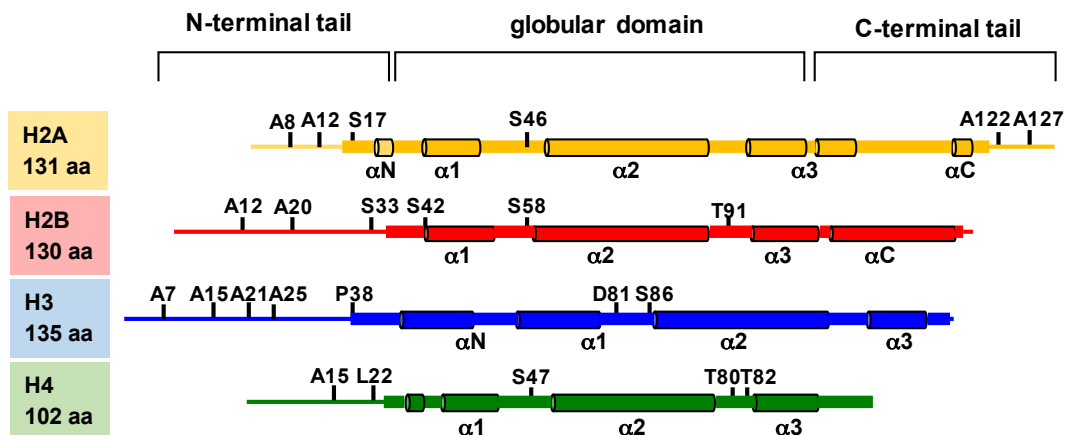


図6. 各ヒストンへ導入したCys変異のデザイン (Fuse et al. unpublished)
 H4 S47Cを介した化学切断法を4種のコアヒストンに適用するため図上のように
 変異導入部位をデザインした。H2BとH3のN末端テールおよびH2AのC末端
 テールは図下の位置でヌクレオソームから突出している。

これまでに構築したいくつかの株に対して、部位特異的的化学切断法を適用し、ゲノム DNA の切断の有無を調べた。その一例として、ヒストン H3 の P38C 残基を介した化学切断の予備的な結果を図 7 に示す。図 7 は、H4 S47C 株をコントロールとして、H3 P38C 株を用いて、第 1 章で確立した方法によって切断したゲノム DNA のアガロースゲル電気泳動の結果である。反応時間とともに、ゲノム DNA が切断されて、ヌクレオソームラダーが検出された。したがって、ヒストンの DNA 接触部位のアミノ酸残基に Cys 変異を導入すれば、化学切断法でそのアミノ酸残基の DNA 結合部位を検出できることが示された。図 6 に示すように、DNA が巻き付いたヌクレオソームコアの球状ドメインやヌクレオソームコアから突き出したヒストンテールにおける各ヒストンの局所的な DNA との相互作用を明らかにできることを確信する。

今後、各ヒストンのさまざまな Cys 変異導入株を構築し、それぞれについて DNA 部位特異的切断解析を行う計画である。この実験では、ゲル電気泳動による解析に加えて、現在、次世代シーケンサー (NGS) による各ヒストンの DNA 結合部位のゲノムワイド解析を計画している。これまでに、H4 S47C 残基を介した化学切断法や MNase による消化のゲノムワイド解析から、ヌクレオソーム単位のゲノム地図は示されているが、ヌクレオソームを構成する各コアヒストンの DNA 結合の挙動については未だ不明である。また、ヒストンテールの DNA との相互作用については、X 線結晶構造解析では検出されていない。これらの課題に対して、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 の局所的な DNA 結合状態をゲノムワイドで明らかにすることによって、多様なヌクレオソームの構造的特徴と形成機構を解明できると考えている。さらに、第 2 章で開発した spTALS ミニ染色体を各ヒストンの変異株に導入し、高度にポジションングしたヌクレオソームにおける各ヒストン分子の DNA 結合状態を明らかにすることによって、*in vivo* でのヌクレオソームの動態を解明できるであろう。以上、本論文の成果を基盤として、クロマチンとエピジェネティクス分野において新たな視点からの研究が展開されることを期待する。

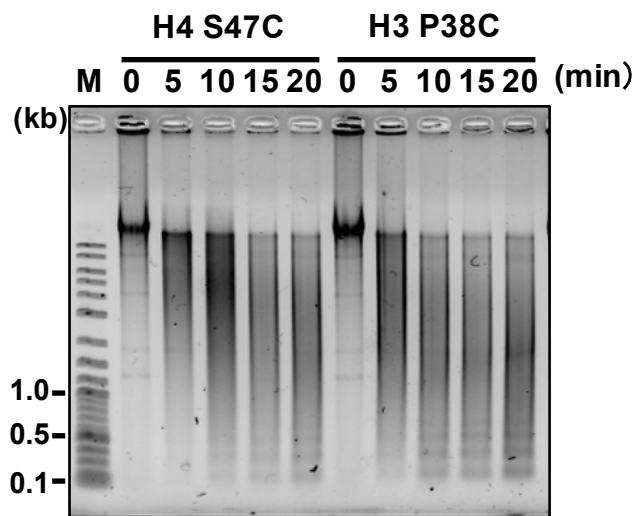


図7. 化学切断法によるCys変異を導入したヒストンH3株におけるゲノムの限定消化
H4 S47C株とH3 P38C株(38番目のプロリンをシステインに置換した株)を用いて化学切断法を行い、得られたDNAを精製した後にアガロースゲル電気泳動を行った。H3 P38C株においても反応時間につれてゲノムDNAが切断された(Fuse et al. unpublished)。0、5、10、15、20は化学切断法における反応時間を示す。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました明星大学・理工学部・教授 清水光弘先生に心より深く感謝いたします。

本研究において、バイオインフォマティクス解析をはじめ、多くのご指導とご支援を賜りました島根大学・医学部・助教 加藤太陽先生、出芽酵母の変異株構築における四分子分析においてご指導とご支援を賜りました長浜バイオ大学・教授 向由起夫先生に深く感謝いたします。

本研究をまとめるにあたり、数多くのご助言とご指導ならびに激励を賜りました東京大学・定量生命科学研究所・教授 胡桃坂仁志先生、実験を遂行するにあたり、その手ほどきから数多くのご助言と親切なご指導をいただきました(公財)がん研究会がん研究所・博士研究員 市川雄一博士、放射性同位体を使用する実験の遂行において、ご指導とご支援をいただきました東京薬科大学・薬学部・教授 柳田顕郎先生に心より感謝いたします。

本研究における実験の一部をお手伝いいただいた清水研究室の勝俣光司氏、諸星皓哉氏、三輪大貴氏、釋拓也氏をはじめ、清水研究室の皆様にご挨拶を申し上げます。

ヒストンの DNA 結合部位への Cys 変異導入に関するご助言や英論文作成におけるご指導をはじめ、多大なご支援を賜りました明星大学・理工学部・准教授 香川亘先生、三研究室合同ゼミ・研究発表会をはじめ、研究活動において数多くのご助言とご指導・ご支援を賜りました明星大学・理工学部・准教授 須賀則之先生に深く感謝いたします。大学院で研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りました明星大学大学院理工学研究科化学専攻の先生方に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- 1) Hewish DR, Burgoyne LA. Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **52**, 504–510 (1973).
- 2) Olins AL, Olins DE. Spheroid chromatin units (*v* bodies). *Science*, **183**, 330–332 (1974).
- 3) Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, **184**, 868–871 (1974).
- 4) Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*, **311**, 532–537 (1984).
- 5) Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251–260 (1997).
- 6) McGinty RK, Tan S. Nucleosome structure and function. *Chem. Rev.*, **115**, 2255–2273 (2015).
- 7) Cutter AR, Hayes JJ. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett.*, **589**, 2914–2922 (2015).
- 8) White CL, Suto RK, Luger K. Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J.*, **20**, 5207–5218 (2001).
- 9) Kornberg R. The location of nucleosomes in chromatin: specific or statistical. *Nature*, **292**, 579–580 (1981).
- 10) Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell*, **128**, 707–719 (2007).
- 11) Rando OJ, Winston F. Chromatin and transcription in yeast. *Genetics*, **190**, 351–387 (2012).
- 12) Lai WKM, Pugh BF. Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 548–562 (2017).

- 13) Becker PB, Workman JL. Nucleosome remodeling and epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a017905–a017905 (2013).
- 14) Cairns BR. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature*, **461**, 193–198 (2009).
- 15) Thoma F, Bergman LW, Simpson RT. Nuclease digestion of circular TRP1ARS1 chromatin reveals positioned nucleosomes separated by nuclease-sensitive regions. *J. Mol. Biol.*, **177**, 715–733 (1984).
- 16) Roth SY, Dean A, Simpson RT. Yeast alpha2 repressor positions nucleosomes in TRP1/ARS1 chromatin. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2247–2260 (1990).
- 17) Clark DJ. Nucleosome positioning, nucleosome spacing and the nucleosome code. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **27**, 781–793 (2010).
- 18) Thoma F. Nucleosome positioning. *Biochim. Biophys. Acta*, **1130**, 1–19 (1992).
- 19) Shimizu M, Roth SY, Szent-Gyorgyi C, Simpson RT. Nucleosomes are positioned with base pair precision adjacent to the alpha2 operator in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **10**, 3033–3041 (1991).
- 20) Yuan G-C, Liu Y-J, Dion MF, Slack MD, Wu LF, Altschuler SJ, Rando OJ. Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*, **309**, 626–630 (2005).
- 21) Lee W, Tillo D, Bray N, Morse RH, Davis RW, Hughes TR, Nislow C. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat. Genet.*, **39**, 1235–1244 (2007).
- 22) Lantermann AB, Straub T, Strålfors A, Yuan G-C, Ekwall K, Korber P. *Schizosaccharomyces pombe* genome-wide nucleosome mapping reveals positioning mechanisms distinct from those of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 251–257 (2010).
- 23) Valouev A, Johnson SM, Boyd SD, Smith CL, Fire AZ, Sidow A. Determinants of nucleosome organization in primary human cells. *Nature*, **474**, 516–520 (2011).

- 24) Li Z, Schug J, Tuteja G, White P, Kaestner KH. The nucleosome map of the mammalian liver. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 742–746 (2011).
- 25) Batta K, Zhang Z, Yen K, Goffman DB, Pugh BF. Genome-wide function of H2B ubiquitylation in promoter and genic regions. *Genes Dev.*, **25**, 2254–2265 (2011).
- 26) Henikoff JG, Belsky JA, Krassovsky K, MacAlpine DM, Henikoff S. Epigenome characterization at single base-pair resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 18318–18323 (2011).
- 27) Chereji RV, Kan T-W, Grudniewska MK, Romashchenko AV, Berezikov E, Zhimulev IF, Guryev V, Morozov AV, Moshkin YM. Genome-wide profiling of nucleosome sensitivity and chromatin accessibility in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1036–1051 (2016).
- 28) Jiang C, Pugh BF. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 161–172 (2009).
- 29) Struhl K, Segal E. Determinants of nucleosome positioning. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 267–273 (2013).
- 30) Chereji RV, Clark DJ. Major determinants of nucleosome positioning. *Biophys. J.*, **114**, 2279–2289 (2018).
- 31) Dingwall C, Lomonosoff GP, Laskey RA. High sequence specificity of micrococcal nuclease. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2659–2673 (1981).
- 32) Hörz W, Altenburger W. Sequence specific cleavage of DNA by micrococcal nuclease. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2643–2658 (1981).
- 33) Ocampo J, Cui F, Zhurkin VB, Clark DJ. The proto-chromatosome: A fundamental subunit of chromatin? *Nucleus*, **7**, 382–387 (2016).
- 34) Brogaard K, Xi L, Wang J-P, Widom J. A map of nucleosome positions in yeast at base-pair resolution. *Nature*, **486**, 496–501 (2012).
- 35) Brogaard KR, Xi L, Wang J-P, Widom J. A chemical approach to mapping nucleosomes at base pair resolution in yeast. *Methods Enzymol.*, **513**, 315–334 (2012).
- 36) Zhong J, Luo K, Winter PS, Crawford GE, Iversen ES, Hartemink AJ.

- Mapping nucleosome positions using DNase-seq. *Genome Res.*, **26**, 351–364 (2016).
- 37) Buenrostro JD, Giresi PG, Zaba LC, Chang HY, Greenleaf WJ. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat. Methods*, **10**, 1213–1218 (2013).
- 38) Ishii H, Kadonaga JT, Ren B. MPE-seq, a new method for the genome-wide analysis of chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, E3457–65 (2015).
- 39) Risca VI, Denny SK, Straight AF, Greenleaf WJ. Variable chromatin structure revealed by in situ spatially correlated DNA cleavage mapping. *Nature*, **541**, 237–241 (2016).
- 40) Wal M, Pugh BF. Genome-wide mapping of nucleosome positions in yeast using high-resolution MNase ChIP-Seq. *Methods Enzymol.*, **513**, 233–250 (2012).
- 41) Kubik S, Bruzzone MJ, Jacquet P, Falcone J-L, Rougemont J, Shore D. Nucleosome stability distinguishes two different promoter types at all protein-coding genes in yeast. *Mol. Cell*, **60**, 422–434 (2015).
- 42) Chereji RV, Ocampo J, Clark DJ. MNase-sensitive complexes in yeast: Nucleosomes and non-histone barriers. *Mol. Cell*, **65**, 565–576.e4 (2017).
- 43) Kubik S, Bruzzone MJ, Albert B, Shore D. A Reply to ““MNase-sensitive complexes in yeast: Nucleosomes and non-histone barriers,”” by Chereji et al. *Mol. Cell*, **65**, 578–580 (2017).
- 44) Weiner A, Hughes A, Yassour M, Rando OJ, Friedman N. High-resolution nucleosome mapping reveals transcription-dependent promoter packaging. *Genome Res.*, **20**, 90–100 (2010).
- 45) Rhee HS, Bataille AR, Zhang L, Pugh BF. Subnucleosomal Structures and Nucleosome Asymmetry across a Genome. *Cell*, **159**, 1377–1388 (2014).
- 46) Ramachandran S, Zentner GE, Henikoff S. Asymmetric nucleosomes flank promoters in the budding yeast genome. *Genome Res.*, **25**, 381–390 (2015).

- 47) Chen Y, Tokuda JM, Topping T, Meisburger SP, Pabit SA, Gloss LM, Pollack L. Asymmetric unwrapping of nucleosomal DNA propagates asymmetric opening and dissociation of the histone core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **114**, 334–339 (2017).
- 48) Arimura Y, Tachiwana H, Oda T, Sato M, Kurumizaka H. Structural analysis of the hexasome, lacking one histone H2A/H2B dimer from the conventional nucleosome. *Biochemistry*, **51**, 3302–3309 (2012).
- 49) Azegami N, Saikusa K, Todokoro Y, Nagadoi A, Kurumizaka H, Nishimura Y, Akashi S. Conclusive evidence of the reconstituted hexasome proven by native mass spectrometry. *Biochemistry*, **52**, 5155–5157 (2013).
- 50) Dalal Y, Furuyama T, Vermaak D, Henikoff S. Structure, dynamics, and evolution of centromeric nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 15974–15981 (2007).
- 51) Furuyama T, Codomo CA, Henikoff S. Reconstitution of hemisomes on budding yeast centromeric DNA. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5769–5783 (2013).
- 52) Henikoff S, Ramachandran S, Krassovsky K, Bryson TD, Codomo CA, Brogaard K, Widom J, Wang J-P, Henikoff JG. The budding yeast Centromere DNA Element II wraps a stable Cse4 hemisome in either orientation in vivo. *eLife*, **3**, e01861 (2014).
- 53) Ulyanova NP, Schnitzler GR. Human SWI/SNF generates abundant, structurally altered dinucleosomes on polynucleosomal templates. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 11156–11170 (2005).
- 54) Engholm M, de Jager M, Flaus A, Brenk R, van Noort J, Owen-Hughes T. Nucleosomes can invade DNA territories occupied by their neighbors. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 151–158 (2009).
- 55) Kato D, Arimura Y, Mizukami Y, Horikoshi N, Saikusa K, Akashi S, Nishimura Y, Park S-Y, Nogami J, Maehara K, Matsumoto A, Kono H, Inoue R, Sugiyama M, Kurumizaka H. Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. *Science*, **356**, 205–208 (2017).

- 56) Fei J, Torigoe SE, Brown CR, Khuong MT, Kassavetis GA, Boeger H, Kadonaga JT. The prenucleosome, a stable conformational isomer of the nucleosome. *Genes Dev.*, **29**, 2563–2575 (2015).
- 57) Cole HA, Cui F, Ocampo J, Burke TL, Nikitina T, Nagarajavel V, Kotomura N, Zhurkin VB, Clark DJ. Novel nucleosomal particles containing core histones and linker DNA but no histone H1. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 573–581 (2016).
- 58) 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**, e0186974 (2017).
- 59) Fuse T, Yanagida A, Shimizu M. The yeast minichromosome system consisting of highly positioned nucleosomes *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 289–294 (2019).
- 60) Chung H-R, Dunkel I, Heise F, Linke C, Krobitch S, Ehrenhofer-Murray AE, Sperling SR, Vingron M. The effect of micrococcal nuclease digestion on nucleosome positioning data. *PLoS ONE*, **5**, e15754–8 (2010).
- 61) Allan J, Fraser RM, Owen-Hughes T, Keszenman-Pereyra D. Micrococcal nuclease does not substantially bias nucleosome mapping. *J. Mol. Biol.*, **417**, 152–164 (2012).
- 62) Mieczkowski J, Cook A, Bowman SK, Mueller B, Alver BH, Kundu S, Deaton AM, Urban JA, Larschan E, Park PJ, Kingston RE, Tolstorukov MY. MNase titration reveals differences between nucleosome occupancy and chromatin accessibility. *Nat. Comms.*, **7**, 11485 (2016).
- 63) Nikitina T, Wang D, Gomberg M, Grigoryev SA, Zhurkin VB. Combined micrococcal nuclease and exonuclease III digestion reveals precise positions of the nucleosome core/linker junctions: Implications for high-resolution nucleosome mapping. *J. Mol. Biol.*, **425**, 1946–1960 (2013).
- 64) Balasubramanian B, Pogozelski WK, Tullius TD. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen

- atoms of the DNA backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 9738–9743 (1998).
- 65) Hayes JJ, Tullius TD, Wolffe AP. The structure of DNA in a nucleosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 7405–7409 (1990).
- 66) Tullius TD, Dombroski BA. Hydroxyl radical “footprinting”: high-resolution information about DNA-protein contacts and application to lambda repressor and Cro protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 5469–5473 (1986).
- 67) Cons BM, Fox KR. High resolution hydroxyl radical footprinting of the binding of mithramycin and related antibiotics to DNA. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 5447–5459 (1989).
- 68) Flaus A, Luger K, Tan S, Richmond TJ. Mapping nucleosome position at single base-pair resolution by using site-directed hydroxyl radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 1370–1375 (1996).
- 69) Ferreira H, Somers J, Webster R, Flaus A, Owen-Hughes T. Histone tails and the H3 α N helix regulate nucleosome mobility and stability. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 4037–4048 (2007).
- 70) Hayes JJ. Site-directed cleavage of DNA by a linker histone-Fe(II) EDTA conjugate: localization of a globular domain binding site within a nucleosome. *Biochemistry*, **35**, 11931–11937 (1996).
- 71) Voong LN, Xi L, Wang J-P, Wang X. Genome-wide Mapping of the Nucleosome landscape by micrococcal nuclease and chemical mapping. *Trends Genet.*, **33**, 495–507 (2017).
- 72) Moyle-Heyrman G, Zaichuk T, Xi L, Zhang Q, Uhlenbeck OC, Holmgren R, Widom J, Wang J-P. Chemical map of *Schizosaccharomyces pombe* reveals species-specific features in nucleosome positioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 20158–20163 (2013).
- 73) Voong LN, Xi L, Sebeson AC, Xiong B, Wang J-P, Wang X. Insights into nucleosome organization in mouse embryonic stem cells through chemical mapping. *Cell*, **167**, 1555–1570.e15 (2016).
- 74) Meyer CA, Liu XS. Identifying and mitigating bias in next-generation

- sequencing methods for chromatin biology. *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 709–721 (2014).
- 75) van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias. *Exp. Cell Res.*, **322**, 12–20 (2014).
- 76) Sherman F, Fink GR, Hicks JB. *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, (1986).
- 77) 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).
- 78) Szent-Gyorgyi C, Isenberg I. The organization of oligonucleosomes in yeast. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 3717–3736 (1983).
- 79) Ichikawa Y, Morohashi N, Nishimura Y, Kurumizaka H, Shimizu M. Telomeric repeats act as nucleosome-disfavouring sequences *in vivo*. *Nucleic Acids Research*, **42**, 1541–1552 (2014).
- 80) Tanase J-I, Morohashi N, Fujita M, Nishikawa J-I, Shimizu M, Ohshima T. Highly efficient chromatin transcription induced by superhelically curved DNA segments: The underlying mechanism revealed by a yeast system. *Biochemistry*, **49**, 2351–2358 (2010).
- 81) Morohashi N, Yamamoto Y, Kuwana S, Morita W, Shindo H, Mitchell AP, Shimizu M. Effect of sequence-directed nucleosome disruption on cell-type-specific repression by alpha2/Mcm1 in the yeast genome. *Eukaryotic Cell*, **5**, 1925–1933 (2006).
- 82) Chen X, Gao S, Liu Y, Wang Y, Wang Y, Song W. Enzymatic and chemical mapping of nucleosome distribution in purified micro- and macronuclei of the ciliated model organism, *Tetrahymena thermophila*. *Sci. China Life Sci.*, **59**, 909–919 (2016).
- 83) Thoma F, Simpson RT. Local protein-DNA interactions may determine nucleosome positions on yeast plasmids. *Nature*, **315**, 250–252 (1985).

- 84) Shen CH, Leblanc BP, Alfieri JA, Clark DJ. Remodeling of yeast *CUP1* chromatin involves activator-dependent repositioning of nucleosomes over the entire gene and flanking sequences. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 534–547 (2001).
- 85) Cole HA, Howard BH, Clark DJ. Activation-induced disruption of nucleosome position clusters on the coding regions of Gcn4-dependent genes extends into neighbouring genes. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9521–9535 (2011).
- 86) Cole HA, Nagarajavel V, Clark DJ. Perfect and imperfect nucleosome positioning in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**, 639–643 (2012).
- 87) Tsankov A, Yanagisawa Y, Rhind N, Regev A, Rando OJ. Evolutionary divergence of intrinsic and trans-regulated nucleosome positioning sequences reveals plastic rules for chromatin organization. *Genome Res.*, **21**, 1851–1862 (2011).
- 88) Zoghbi HY, Beaudet AL. Epigenetics and Human Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a019497 (2016).
- 89) Almouzni G, Cedar H. Maintenance of Epigenetic Information. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, (2016).
- 90) Turner BM. The adjustable nucleosome: an epigenetic signaling module. *Trends Genet.*, **28**, 436–444 (2012).
- 91) Jansen A, Verstrepen KJ. Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **75**, 301–320 (2011).
- 92) Ahuja N, Sharma AR, Baylin SB. Epigenetic therapeutics: A new weapon in the war against cancer. *Annu. Rev. Med.*, **67**, 73–89 (2016).
- 93) Koyama M, Kurumizaka H. Structural diversity of the nucleosome. *J. Biochem.*, **163**, 85–95 (2018).
- 94) Suter B, Livingstone-Zatchej M, Thoma F. Chromatin structure modulates DNA repair by photolyase *in vivo*. *EMBO J.*, **16**, 2150–2160 (1997).
- 95) Fink M, Imholz D, Thoma F. Contribution of the serine 129 of histone H2A to chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 3589–3600 (2007).
- 96) Fink M, Thompson JS, Thoma F. Contributions of histone H3 nucleosome core surface mutations to chromatin structures, silencing and DNA repair.

- PLoS ONE*, **6**, e26210 (2011).
- 97) Morohashi N, Nakajima K, Kurihara D, Mukai Y, Mitchell AP, Shimizu M. A nucleosome positioned by alpha2/Mcm1 prevents Hap1 activator binding *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **364**, 583–588 (2007).
- 98) Ichikawa Y, Morohashi N, Tomita N, Mitchell AP, Kurumizaka H, Shimizu M. Sequence-directed nucleosome-depletion is sufficient to activate transcription from a yeast core promoter *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **476**, 57–62 (2016).
- 99) Balasubramanian B, Morse RH. Binding of Gal4p and bicoid to nucleosomal sites in yeast in the absence of replication. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2977–2985 (1999).
- 100) Roth SY, Shimizu M, Johnson L, Grunstein M, Simpson RT. Stable nucleosome positioning and complete repression by the yeast alpha2 repressor are disrupted by amino-terminal mutations in histone H4. *Genes Dev.*, **6**, 411–425 (1992).
- 101) Fazio TG, Gelbart ME, Tsukiyama T. Two distinct mechanisms of chromatin interaction by the Isw2 chromatin remodeling complex *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 9165–9174 (2005).
- 102) Zhang Z, Reese JC. Ssn6-Tup1 requires the ISW2 complex to position nucleosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **23**, 2246–2257 (2004).
- 103) Schwartz U, Németh A, Diermeier S, Exler JH, Hansch S, Maldonado R, Heizinger L, Merkl R, Längst G. Characterizing the nuclease accessibility of DNA in human cells to map higher order structures of chromatin. *Nucleic Acids Res.*, (2018).
- 104) Arrigoni L, Richter AS, Betancourt E, Bruder K, Diehl S, Manke T, Bönisch U. Standardizing chromatin research: a simple and universal method for ChIP-seq. *Nucleic Acids Res.*, **44**, e67–e67 (2016).
- 105) Lorzadeh A, Bilenky M, Hammond C, Knapp DJHF, Li L, Miller PH, Carles A, Heravi-Moussavi A, Gakkhar S, Moksa M, Eaves CJ, Hirst M. Nucleosome density ChIP-seq identifies distinct chromatin modification

signatures associated with MNase accessibility. *Cell Rep.*, **17**, 2112–2124 (2016).

- 106) Richmond TJ, Davey CA. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, **423**, 145–150 (2003).

研 究 業 績 目 録				
著書, 学術論文等の名称	単著, 共著の 別	発行又は発表の 年月	発行所, 発表雑誌等又は発 表学会等の名称	概 要
【論文】 1. Parallel mapping with site-directed hydroxyl radicals and micrococcal nuclease reveals structural features of positioned nucleosomes <i>in vivo</i> .	共著	2017年10月	<i>PLoS One</i> , 12, e0186974 (2017).	Tomohiro Fuse, Koji Katsumata, Koya Morohoshi, Yukio Mukai, Yuichi Ichikawa, Hitoshi Kurumizaka, Akio Yanagida, Takeshi Urano, Hiroaki Kato, Mitsuhiro Shimizu.
2. The yeast minichromosome system consisting of highly positioned nucleosomes <i>in vivo</i> .	共著	2019年2月 (J-STAGE, 早期公開、2018年12月)	<i>Biological and Pharmaceutical Bulletin</i> , 42, 289-294	Tomohiro Fuse, Akio Yanagida, Mitsuhiro Shimizu
【学会発表】 1. <i>In vivo</i> でポジショニングしたヌクレオソームの化学切断法による解析	共著	第37回日本分子生物学会年会	2014年11月25-27日、横浜	布施智博、市川雄一、勝俣光司、向由起夫、胡桃坂仁志、清水光弘
2. マイクロサテライト配列におけるヌクレオソーム形成の <i>in vivo</i> での評価	共著	第37回日本分子生物学会年会	2014年11月25-27日、横浜	勝俣光司、井手上翔、蝦名瑠衣、渡邊耀吉、布施智博、市川雄一、胡桃坂仁志、清水光弘
3. 出芽酵母ミニ染色体における601配列と5S rDNAのヌクレオソームポジショニングの解析	共著	第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015)	2015年12月1-4日、神戸	布施智博、林俊樹、市川雄一、向由起夫、胡桃坂仁志、清水光弘
4. 出芽酵母ミニ染色体において転写活性化と抑制状態の <i>PHO5</i> のヌクレオソームポジシヨンの解析	共著	第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015)	2015年12月1-4日、神戸	諸星皓哉、勅使川原裕太、布施智博、清水光弘
5. トリヌクレオチドリピート配列におけるヌクレオソーム形成の <i>in vivo</i> での評価	共著	第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015)	2015年12月1-4日、神戸	勝俣光司、栗原陽平、布施智博、市川雄一、胡桃坂仁志、清水光弘
6. 出芽酵母ミニ染色体においてポジショニングしたヌクレオソームの構造的特徴: 化学切断法とMNaseによる解析	共著	第89回日本生化学会大会	2016年9月25-27日、仙台	布施智博、勝俣光司、諸星皓哉、向由起夫、市川雄一、胡桃坂仁志、清水光弘
7. トリヌクレオチドリピート配列による <i>in vivo</i> でのヌクレオソーム形成の促進と阻害	共著	第89回日本生化学会大会	2016年9月25-27日、仙台	勝俣光司、布施智博、市川雄一、胡桃坂仁志、清水光弘

著書、学術論文等の名称	単著, 共著の 別	発行又は発表の 年月	発行所、発表雑誌等又は発 表学会等の名称	概 要
8. 出芽酵母 <i>PI05</i> の転写活性化と抑制に伴うヌクレオソームポジションの解析	共著	第 89 回日本生化学会大会	2016 年 9 月 25-27 日、仙台	諸星皓哉、 <u>布施智博</u> 、清水光弘
9. <i>In vivo</i> においてポジショニングに依存したヌクレオソーム構造の多様性	共著	第 89 回日本生化学会大会	2016 年 9 月 25-27 日、仙台	<u>布施智博</u> 、勝俣光司、諸星皓哉、栗原陽平、勅使川原裕太、林俊樹、清水光弘
10. 出芽酵母ミニ染色体 TRPIARS1 においてポジショニングに依存したヌクレオソームの多様性：化学切断法と MNase による解析	共著	第 39 回日本分子生物学会年会	2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜	<u>布施智博</u> 、勝俣光司、諸星皓哉、向由起夫、市川雄一、胡桃坂仁志、加藤太陽、浦野健、清水光弘
11. 出芽酵母 TRPIARS1 ミニ染色体におけるヌクレアーゼ感受性領域の形成に及ぼす DNA 配列の影響	共著	第 39 回日本分子生物学会年会	2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜	林俊樹、 <u>布施智博</u> 、加藤太陽、浦野健、清水光弘
12. <i>In vivo</i> でヌクレオソーム形成を促進または阻害するトリヌクレオチドリビート配列	共著	第 39 回日本分子生物学会年会	2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜	勝俣光司、小川峻史、 <u>布施智博</u> 、市川雄一、胡桃坂仁志、加藤太陽、浦野健、清水光弘
13. 遺伝的疾患に関与する C ₆ GC ₆ GC と CCTG リビートにおけるヌクレオソーム形成の <i>in vivo</i> での評価	共著	第 39 回日本分子生物学会年会	2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜	栗原陽平、勝俣光司、 <u>布施智博</u> 、加藤太陽、浦野健、清水光弘
14. 出芽酵母 <i>PI05</i> の転写活性化と抑制に伴う +1 ヌクレオソームの解析	共著	第 39 回日本分子生物学会年会	2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜	諸星皓哉、今井洸志、 <u>布施智博</u> 、香川亘、清水光弘
15. <i>In vivo</i> におけるヒストン H3 テールと DNA との相互作用：新規化学切断法の開発	共著	第 39 回日本分子生物学会年会	2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜	勅使川原裕太、諸星皓哉、 <u>布施智博</u> 、清水光弘
16. ヒストンの DNA 結合部位特異的的化学切断法による <i>in vivo</i> での多様なヌクレオソーム構造の解析法の開発	共著	2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)	2017 年 12 月 6~9 日、神戸	<u>布施智博</u> 、林俊樹、橋高勇利、森田聖、香川亘、胡桃坂仁志、清水光弘
17. 出芽酵母ミニ染色体のヌクレオソームにおけるヒストン H2B の N 末端テールと DNA との相互作用の解析	共著	2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)	2017 年 12 月 6~9 日、神戸	林俊樹、 <u>布施智博</u> 、末政亮、清水光弘
18. 出芽酵母ミニ染色体のヌクレオソームにおけるヒストン H2A の C 末端テールの DNA 結合	共著	2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)	2017 年 12 月 6~9 日、神戸	栗原陽平、 <u>布施智博</u> 、具志堅一生、胡桃坂仁志、清水光弘
19. 部位特異的的化学切断法によるヒストンバリエント H2A.Z ヌクレオソーム解析法の開発	共著	2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)	2017 年 12 月 6~9 日、神戸	今井洸志、 <u>布施智博</u> 、諸星皓哉、村木秀一郎、香川亘、原田昌彦、胡桃坂仁志、清水光弘

著書, 学術論文等の名称	単著, 共著の別	発行又は発表の年月	発行所, 発表雑誌等又は発表学会等の名称	概要
20. 部位特異的的化学切断法による <i>in vivo</i> でのヒストン H3 テールとリンカーDNA との相互作用の解析	共著	2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)	2017 年 12 月 6~9 日, 神戸	勅使川原裕太、布施智博、諸星皓哉、今井洸志、釋拓也、市來智裕、清水光弘
21. ヌクレオソーム DNA 座標特異的的化学切断法の開発	共著	第 35 回 染色体ワークショップ・第 16 回 核ダイナミクス研究会	2017 年 12 月 20~22 日, 西尾	布施智博、勅使川原裕太、林俊樹、今井洸志、香川亘、清水光弘
22. ヒストン H2A の C 末端テールはヌクレオソームの entry/exit sites からリンカーDNA の領域に結合する	共著	第 41 回日本分子生物学会年会	2018 年 11 月 28~30 日, 横浜	布施智博、香川亘、柳田顕郎、胡桃坂仁志、清水光弘
23. 出芽酵母ミニ染色体におけるヒストン H4 の N 末端テールとヌクレオソーム DNA との相互作用	共著	第 41 回日本分子生物学会年会	2018 年 11 月 28~30 日, 横浜	高附宏暢、布施智博、柳田顕郎、清水光弘
24. 出芽酵母ゲノムにおけるヒストンバリエント H2A.Z を含むヌクレオソームの解析	共著	第 41 回日本分子生物学会年会	2018 年 11 月 28~30 日, 横浜	今井洸志、布施智博、香川亘、柳田顕郎、胡桃坂仁志、清水光弘
25. 出芽酵母ヒストン-DNA 結合部位のゲノムワイド解析によるヌクレオソームの配置と動態の考察	共著	第 41 回日本分子生物学会年会	2018 年 11 月 28~30 日, 横浜	布施智博、加藤太陽、香川亘、浦野健、大川恭行、清水光弘