

平成28年度 博士学位論文

アフリカツメガエル卵における
ヌクレオソームの形成を制御する
ヒストンシャペロンの解析

朱 睿斌

名古屋大学大学院
理学研究科 生命理学専攻

目次

要旨	3
1. 序論	6
1-1. クロマチンの構造と機能	
1-2. ヌクレオソーム形成の分子機序	
1-3. ヒストン H3-H4 シャペロンの構造と機能	
1-4. ツメガエル卵の無細胞系を用いたヌクレオソーム形成の分子機序の解析	
1-5. ツメガエル胞胚細胞におけるクロマチン構築の調節	
1-6. 本研究の目的	
2. 材料と方法	20
3. 結果	29
3-1. ツメガエル卵のヒストン H3-H4 シャペロン	
3-1-1. ツメガエル卵成熟に伴う HIRA タンパク質の量の増加	
3-1-2. ツメガエル卵におけるヒストン H3-H4 シャペロン複合体の構成	
3-1-3. ヒストン H3-H4 シャペロンのクロマチン局在	
3-2. 複製されたゲノム DNA へのヌクレオソーム形成における各々のヒストンシャペロンの役割	
3-2-1. Asf1、CAF-1 および HIRA のヌクレオソーム形成における役割	
3-2-2. HIRA 複合体と CAF-1 複合体のヌクレオソーム形成における役割の違い	
3-2-3. ヌクレオソーム形成における HIRA 複合体と CAF-1 複合体の寄与	
3-3. HIRA によるヌクレオソーム形成の分子機序	
3-3-1. DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成における HIRA の重要性	
3-3-2. HIRA-Asf1 複合体はヌクレオソーム形成に必要なかつ十分である	
3-3-3. DNA へのヒストン結合に寄与する HIRA の機能ドメインの解析	
3-3-4. DNA へのヒストン結合に寄与する HIRA の WD40 リピートの解析	

3-3-5.	CAF-1 の p60 サブユニットによる DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成の媒介	
3-3-6.	HIRA の B ドメインと p60 の B-like ドメインの Asf1 結合性の比較	
3-3-7.	DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成への p60 の WD40 と B-like ドメインの寄与	
3-4.	HIRA の核内局在の分子機序	
3-4-1.	HIRA は核内に局在し、クロマチンと結合する	
3-4-2.	HIRA の C 末端部分は核局在とクロマチン結合に必要である	
3-4-3.	Hir ドメインは HIRA のクロマチン結合に必要である	
4.	考察	7 2
4-1.	ツメガエル初期胚細胞におけるヒストン H3-H4 シャペロンのシステム	
4-2.	ツメガエル初期胚細胞における CAF-1 と HIRA 複合体制御・機能の違い	
4-3.	ツメガエル初期胚細胞のゲノム DNA 複製におけるヒストンシャペロンの役割	
4-4.	DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成における HIRA の分子機序	
4-5.	HIRA と CAF-1 のヌクレオソーム形成モジュールの違い	
4-6.	HIRA 複合体のクロマチン結合と核内蓄積の制御	
4-7.	まとめ	
参考文献		9 3
謝辞		1 1 2

要旨

真核細胞の染色体構造の構築と維持は、遺伝情報の保管と発現に極めて重要である。クロマチンの基本単位構造であるヌクレオソームは、DNA へのヒストンタンパク質の結合によって形成される。その形成は、ヒストンタンパク質と緊密に相互作用するヒストンシャペロンによって制御される。真核細胞のゲノム DNA の複製、修復や転写などの DNA プロセスと、精子クロマチンリモデリングやヘテロクロマチン構築などのクロマチン構造変化において、複数のヒストンシャペロンがヌクレオソームの形成に関与していると考えられているが、それらのヒストンシャペロンの役割とヌクレオソーム形成の分子機序に関しては不明な点が多く残されている。本学位論文研究では、迅速な細胞増殖に伴うクロマチン複製が効率的に行われるツメガエル初期胚の細胞内現象を試験管内で再現できる卵抽出液の無細胞系を用いて、複製されたゲノム DNA のクロマチン構築の際に、DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成を媒介するヒストン H3-H4 シャペロン Asf1、CAF-1 および HIRA の役割分担を明らかにするとともに、これまでに十分に解析が進んでいない、HIRA-Asf1 複合体によるヌクレオソーム形成の分子機序を解明することを目的とした。

まず、ツメガエル初期胚細胞のヒストン H3-H4 シャペロンの相互関係を検討するために、卵抽出液に内在しているヒストンシャペロンタンパク質の定量化を試みた。主要な 3 つのヒストンシャペロンのうち、Asf1 は HIRA と CAF-1 に比べて、過剰に存在していることが明らかとなった。一般的な培養細胞と比較して、CAF-1 に対する HIRA の相対量は卵核胞崩壊直後に急激に増加することが判明した。また、HIRA は細胞周期を通して Asf1 と安定的に結合しているのに対して、CAF-1 のごく一部分は間期にのみ Asf1 と相互作用することが示された。さらに、CAF-1 は PCNA に結合して、DNA 複製中のクロマチンに局在するが、HIRA のクロマチン結合は間期の間、維持されていることが分かった。これらの結果は、ツメガエル初期胚細胞において、Asf1 を中心とした CAF-1 及び HIRA、二つのヒストンシャペロン複合体が存在していることと、CAF-1-Asf1 複合体の形成は時間的・空間的な調節によって複製中の DNA 上に制限されるが、HIRA-Asf1 複合体の形成はこれらの制約を受けないことを示唆している。

次に、ゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成における Asf1、HIRA 及び CAF-1 の役割を検討するために、Asf1、CAF-1 及び HIRA もしくは CAF-1 と HIRA を同時に免疫除去した卵抽出液で複製されたゲノム DNA をヌクレアーゼ切断し、その断片のパターンの比較及び定量解析を行うことで、複製されたゲノム DNA 上のヌクレオソーム形成の状態を調べた。対照の卵抽出液では、複製直後のゲノム DNA の大部分が速やかにヌクレオソームを形成し、複製の後にもヌクレオソーム形成が継続的に進行する。Asf1 を免疫除去した卵抽出液では、DNA 複製時、及びその後のいずれのヌクレオソーム形成も強く抑制された。CAF-1 と HIRA を共に免疫除去したものでは、Asf1 の除去と同様のヌクレオソーム形成の抑制が観察された。しかし、CAF-1 の免疫除去卵抽出液では、DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成が抑制されたが、複製後のヌクレオソーム形成によって、複製されたゲノム DNA の大部分にヌクレオソームが形成された。この DNA 複製後のヌクレオソーム形成は HIRA タンパク質の量に依存することも示された。一方、HIRA を免疫除去した卵抽出液では、ゲノム DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成はほとんど影響を受けなかったが、DNA 複製の後で起こるヌクレオソーム形成はなされなかった。これらの結果は、ツメガエル初期胚細胞において、複製されたゲノム DNA のヌクレオソーム形成は、Asf1 を中心とした CAF-1 及び HIRA の両ヒストンシャペロン複合体によって媒介されること、および、CAF-1-Asf1 複合体は DNA 複製に共役したヌクレオソーム形成を促進するが、複製された DNA が完全にヌクレオソームを構築するためには HIRA-Asf1 による DNA 複製に共役しないヌクレオソームの形成が必要不可欠であることの 2 点を示唆している。

さらに、HIRA-Asf1 複合体によるヌクレオソーム形成の分子機序を明らかにするために、DNA 複製に共役していないヌクレオソーム形成に必要な HIRA 機能領域の同定を試みた。卵抽出液中に加えたプラスミド DNA のスーパーコイル活性を指標にして、HIRA のヌクレオソーム形成活性部位を探索したところ、進化的によく保存された HIRA の N 末の WD40 と B ドメインはヌクレオソーム形成を媒介するために必要かつ十分であることが示された。そのうち、WD40 ドメインの 7 つの WD リピート中の N 末側の 3 つ (WD1-3) が極めて重要であることも明らかとなった。これらの結果は、WD40 と B ドメインは HIRA による

ヌクレオソーム形成に十分であることを示唆している。また、同様な構造が保存された CAF-1 三量体の p60 サブユニットは DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成に極めて低い活性を示すことが見出された。HIRA と p60 のドメインの機能を比較したところ、B ドメインの Asf1 に対するアフィニティーの強さは HIRA のヌクレオソーム形成活性に相関することと、HIRA の WD40 ドメインはヌクレオソーム形成に決定的に重要であることが判明した。これらの結果は、HIRA の WD40 ドメインは DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成に中心的な役割を果たすこと、また、p60 のドメインはこのヌクレオソーム形成に適していないことを示唆している。従って、ヌクレオソーム形成を媒介する HIRA と CAF-1 の分子機序は異なると考えられる。

最後に、真核細胞の核内のゲノム DNA 上のヌクレオソーム形成制御に必要なとされるシャペロン複合体の核内局在に必要な HIRA のドメインを同定した。HIRA 複合体の核内蓄積には、Asf1 と結合する B ドメインは必要でなく、HIRA の N 末にある WD40 ドメインと C 末端の広範な領域が必要であることが示された。また、HIRA のクロマチン結合は C 末側の Hir ドメインに依存することが明らかとなった。これらの結果は、HIRA の N 末の領域がヌクレオソーム形成を媒介するのに対して、C 末は主にヒストンシャペロン複合体の細胞内局在の制御に関与することを示している。従って、HIRA の両末領域はそれぞれ異なる役割を果たすと考えられる。

本学位論文研究では、ゲノム DNA の複製に伴うヌクレオソーム形成におけるヒストンシャペロン Asf1、CAF-1 および HIRA の役割を明確に示した。また、ヌクレオソームの形成およびクロマチン結合に必要な HIRA の機能領域を同定し、HIRA-Asf1 複合体の分子機序を理解するための手がかりを初めて得た。さらに、ヌクレオソーム形成における HIRA と p60 の機能ドメインの比較によって、両ヒストンシャペロン複合体によるヌクレオソーム形成の分子機序の違いを示唆した。これらの成果は、ヒストンシャペロンによるヌクレオソーム構築の分子機序を解明していくための基盤となるものと期待される。

1. 序論

1-1. クロマチンの構造と機能

真核生物において、核の遺伝情報をコードするゲノム DNA は染色体に分納され、各々の染色体は一本の非常に長い二本鎖 DNA とそれに結合した様々なタンパク質からできている。真核生物のゲノム DNA とタンパク質の複合体はクロマチンと呼ばれ、その基本構造は DNA とヒストンから形成されるヌクレオソームである。ヌクレオソームの基本単位であるヌクレオソームコアの構造は、酵母からヒトまですべての真核生物に高度に保存されており、H2A-H2B 複合体と H3-H4 複合体の各々二分子ずつからなるコアヒストン八量体と、それに約 1.67 周巻きついた 146 bp の DNA からなっている (Luger et al., 1997; Tachiwana et al., 2011)。各々のヌクレオソームコアを繋ぐリンカー DNA に結合するヒストンはリンカーヒストンと呼ばれ (Wolffe, 1998; Woodcock et al., 2006)、コアヒストンが真核生物の間でよく保存されているのに対して、リンカーヒストンは保存性が低く、生物種または細胞種によって様々なバリエーションが存在する (Harvey and Downs, 2004; Wolffe et al., 1997)。ゲノム DNA は、正の電荷をもつヒストンと結合することでその負の電荷が中和され、細胞内において適切な構造と機能の調節が可能となると考えられる。また、ゲノム DNA はヒストンと結合してヌクレオソームコアが規則正しく配列された “beads on a string” 構造を形成して長さが凝縮され、さらにリンカーヒストン H1 およびコンデンシンなどのヒストン以外のクロマチン調節因子によってさらにコンパクトに折りたたまれて高次構造が構築される (Joti et al., 2012)。このような段階的な凝縮を経て、真核生物の長大なゲノム DNA がコンパクトな染色体となり、数 μm 程度の直径の細胞核に収納することが可能となる。また、ゲノム DNA にヒストンが結合することで、DNA への DNA ポリメラーゼや転写因子などのタンパク質らのアクセスが阻害されることも知られている (Jiang and Pugh, 2009)。

クロマチンの形成は、ゲノムの安定維持だけでなく、遺伝子の転写制御においても極めて重要である。各々のコアヒストンの N 末端領域は、安定なヘリックス構造を結成しており、それらを介してコアヒストン同士および DNA と結合し

てヌクレオソームコアを形成する。また、コアヒストンの N 末端の構造は不安定であり、DNA や他のコアヒストンと結合せず、ヌクレオソームコアから突出している(Arents et al., 1991; Biswas et al., 2011)。この構造は、ヒストンテールと呼ばれ、その配列中の特定のアミノ酸残基は、メチル化、アセチル化、ユビキチン化、リン酸化などの多様な翻訳後修飾を受け、転写の促進や抑制、クロマチンの凝縮や脱凝縮、DNA 損傷と修復、細胞周期進行などの過程において、異なる修飾パターンを示すことが知られている(Bannister and Kouzarides, 2011)。さらに、ヒストンテールの修飾を認識して様々な調節因子がクロマチン上に結合し、染色体構造、DNA 複製・修復や転写の調節に関わることが明らかにされている。ヒストンテールの修飾の組み合わせはヒストンコードと呼ばれ、エピジェネティックな制御の分子基盤と考えられている(Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000)。

1-2. ヌクレオソーム形成の分子機序

クロマチン構築におけるヌクレオソーム形成

上述したように、間期に核内で複製されたゲノム DNA は速やかにクロマチンとなり、分裂期に二つの娘細胞に均等に分配される。このような細胞周期の進行中に、ヌクレオソームはダイナミックな調節を受ける。例えば、ヌクレオソーム構造は DNA ポリメラーゼ複合体や RNA ポリメラーゼ複合体などの通過や、DNA 修復酵素のゲノム DNA へのアクセスを妨げるため、これらがゲノム DNA 上に結合・通過する前にヌクレオソームは解体され、その後に再び形成されることが考えられている。ゲノム DNA が複製される際に、鋳型 DNA 上のヌクレオソームは複製前に解体され、複製後に親鎖と娘鎖上に再形成される(Sogo et al., 1986)。また、複製された DNA 上にヌクレオソームが形成されることは、その後の分裂期における染色体分配に必要とされている(新富, 2005)。真核生物のゲノム DNA の複製については古くから研究がなされ、その分子機構がよく解明されているが、その一方で、それに伴うヌクレオソーム形成の分子機序については不明な点が多い。また、ヌクレオソーム形成には DNA 複製を伴わない場合があり、RNA ポリメラーゼ複合体の通過前後のヌクレオソームの解体と再形成、受精後の精子クロ

マチンにおけるプロタミンからヒストンへの置換、セントロメア形成におけるヒストン H3 バリエーションの置換などが知られている (Ahmad and Henikoff, 2002a; Akiyama et al., 2011; Henikoff et al., 2004; Loppin et al., 2005)。これらのプロセスにおいても、ヒストンがどの様に DNA に結合し、ヌクレオソームを形成するのかについてはほとんど明らかにされていない。

ヒストンシャペロンによるヒストンの制御

ヒストンは塩基性アミノ酸に富み、強い正電荷を持つため、単独で細胞内に存在すると、他の生体分子と不適切な静電的相互作用を起こすことや、ヒストン自身が不溶性の凝集体を形成する恐れがある。これを防ぐタンパク質に酸性アミノ酸に富むヒストンシャペロンが知られている。正電荷を持つヒストンと負電荷を持つ DNA を生理的条件下で混合すると、両者が強い静電的相互作用をおこして不規則な不溶性凝集体が形成される (図 1-1、右上)。一方、ヒストンシャペロンが存在するとヒストンと DNA の結合が調節され、ヌクレオソームが形成される (図 1-1、右下と Eitoku et al., 2008; Tyler, 2002)。このようなことから、細胞内において DNA と結合していないヒストンはヒストンシャペロンと結合して存在する必要があると考えられている。これまでに、出芽酵母、アフリカツメガエル、ヒトなどで各々のヒストンに対応する複数のヒストンシャペロンが同定されている (Eitoku et al., 2008; Loyola and Almouzni, 2004)。各々のヒストンシャペロンは翻訳直後のヒストンに結合し、細胞質におけるヒストンの蓄積、核内輸送、ヌクレオソーム形成の様々な段階においてヒストンの機能調節に関わると考えられている。ヌクレオソーム形成は、まず、DNA にヒストン H3-H4 四量体が結合し、続いてヒストン H2A-H2B 二量体が二つ結合してヌクレオソームコアが形成され、その後、各々のヌクレオソームコアを繋ぐリンカー DNA にリンカーヒストンが結合して完全なヌクレオソームが形成される。これら一連の反応は ATP に依存せずに進行することが明らかになっている (図 1-1 と Bharath, 2003)。また、細胞内において、これら一連の反応は、各々のヒストンに特異的なヒストンシャペロンによって調節されると考えられている。形成されたヌクレオソームはクロマチンリモデリング因子によってゲノム DNA 上の位置が調節され、成熟したクロマチンの高次構造が構築される (Haushalter and Kadonaga,

2003; Tyler, 2002)。ヒストン H2A や H2B のアミノ酸配列が多様性に富むのに対し、DNA と最初に結合するヒストン H3 や H4 は生物種間で高度に保存されていることから、ヒストン H3-H4 と DNA との結合制御はヌクレオソーム形成において最も重要なステップと考えられる。

H3-H4 を制御するヒストンシャペロン

ヒストン H3-H4 を構成するヒストン H4 は、ヒストンの中で最も生物種間の保存性が高い。ヒストン H3 については、これまでに H3.1、H3.2、H3.3、CENPA などのバリエーションが報告されている。これらの中で、哺乳類では G1/S 期に発現する H3.1 と全細胞周期で発現する H3.3 の二つのバリエーションについて興味深い報告がなされている。H3.1 と H3.3 は、136 アミノ酸のうち 5 ヶ所のアミノ酸が違うだけであるが、それらは細胞種により発現が異なり、また H3.1 と H3.3 を含むヌクレオソームが異なる遺伝子発現調節を受ける。そのため、ヌクレオソームを形成するヒストン H3 バリエーションの違いは、発生や細胞分化の過程における遺伝子発現調節に重要な役割を果たすと考えられている (Hake and Allis, 2006; Hake et al., 2006)。ヒストン H3-H4 の制御因子として、これまでに複数のヒストン H3-H4 シャペロンが報告されている (表 1-1)。これらのヒストンシャペロンは、ヒストン H3-H4 の蓄積や翻訳後修飾などのヒストンの代謝制御、DNA 複製、転写、細胞周期進行などの細胞機能の調節、また、ヌクレオソーム形成、精子クロマチンリモデリングやヘテロクロマチン構築などの染色体構造の調節に関与することが知られている (Eitoku et al., 2008)。

1-3. ヒストン H3-H4 シャペロンの構造と機能

ゲノム DNA とヒストン H3-H4 の結合を制御するヒストンシャペロンは複合体として働くことが知られ、その主要な分子として Asf1 (Anti Silencing Function 1)、CAF-1 (Chromatin Assembly Factor-1) と HIRA (Histone Regulatory homolog A) の 3 種類が報告されている (Ray-Gallet et al., 2002; Smith and Stillman, 1989; Tyler et al., 1999)。そのうち、Asf1 は、酵母からヒ

トまでの多くの真核生物からヒストンシャペロンとして報告されている(Le et al., 1997; Munakata et al., 2000; Ray-Gallet et al., 2007)。Asf1 は、N 末端領域に進化的に保存されたコアドメインをもち、C 末端側に酸性アミノ酸を多く含む多様性に富んだ領域をもっている(Daganzo et al., 2003; Umehara et al., 2002)。Asf1 の N 末端領域は免疫グロブリンフォールド構造を形成し、それを介してヒストン H3-H4 二量体と結合する(English et al., 2006; Natsume et al., 2007)。哺乳類においては、C 末端領域が異なる二種類の Asf1 バリエント (Asf1a と Asf1b) が存在する (表 1-1)。Asf1a と Asf1b は共に CAF-1 と結合性をもつが、Asf1a は HIRA とともに結合する。Asf1a/Asf1b と CAF-1 が結合したヒストンシャペロン複合体 (CAF-1-Asf1) は DNA 複製や修復に伴うヌクレオソーム形成を媒介し、Asf1a と HIRA からなる複合体 (Asf1-HIRA) は DNA 合成に依存しないヌクレオソーム形成を促進するとされている(Mello et al., 2002; Silljé and Nigg, 2001; Umehara and Horikoshi, 2003)。

DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成の制御機構の研究では、まず、SV40 ウイルス由来の DNA をヒト培養細胞抽出液に加え、複製された DNA の上のみ CAF-1 によるヌクレオソーム形成が起こることが示された(Smith and Stillman, 1989; Stillman, 1986)。次に、ヒトの CAF-1 が p150、p60、p48 の三つのサブユニットからなるヘテロ三量体であること、また CAF-1 は Asf1 やヒストン H3.1-H4 と結合することが明らかにされた(Kaufman et al., 1995; Verreault et al., 1996)。また、ヒト CAF-1-Asf1 複合体は DNA 複製だけではなく、DNA 修復に伴うヌクレオソーム形成にも関与することが報告された(Mello et al., 2002; Moggs et al., 2000)。さらに、酵母、ショウジョウバエやツメガエルにおいても CAF-1 がヌクレオソーム形成に働くことが示された(Kaufman et al., 1997; Quivy et al., 2001; Tyler et al., 2001)。CAF-1 の p150 は、p60、p48 および PCNA と直接結合することが示されている(Kaufman et al., 1995; Shibahara and Stillman, 1999; Tyler et al., 2001)。複製装置の構成因子である PCNA は、DNA ポリメラーゼ複合体を DNA 上に繋ぎ止めるためのクランプとして働く因子であり、CAF-1 はゲノム DNA 複製の際に PCNA と結合して複製装置に局在することが明らかにされている(Krude, 1995; Shibahara and Stillman, 1999)。p60 は、WD40 ドメインと二つの B-like ドメインを持ち、B-like ドメインは Asf1 との結

合に必要であると考えられている(Tyler et al., 2001)。p60 は細胞周期の進行によってリン酸化修飾状態が大きく変化し、CAF-1 のヌクレオソーム形成活性が抑制された分裂期において高リン酸化状態であることが示されていた(Keller and Krude, 2000; Marheineke and Krude, 1998)。一方、p48 は、CAF-1 のサブユニットとして働くだけでなく、HIRA 複合体、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ複合体、ヒストンメチルトランスフェラーゼ複合体や ATP 依存性ヌクレオソームリモデリング複合体など、数多くのヒストン・クロマチン調節複合体に含まれることが報告されている(Ahmad et al., 2003; Martínez-Balbás et al., 1998; Martini et al., 1998; Müller et al., 2002)。CAF-1 複合体に含まれている p48 は、直接ヒストン H4 と結合し、CAF-1 によるヌクレオソーム形成に必須であることが示された(Verreault et al., 1996)。さらに、ヒト培養細胞を用いた研究から、DNA 複製や修復の際には、CAF-1 が複製装置と結合することによって、新規合成された DNA 上へのヒストン H3.1-H4 の結合を媒介することでヌクレオソームが形成されると考えられている(図 1-2 A、DNA replication coupling と Tagami et al., 2004)。

一方、ヌクレオソーム形成は DNA の新規合成とは無関係にも起こり、その際には上記のものとは異なるヒストンシャペロン HIRA が用いられることが示されてきた。アフリカツメガエル卵抽出液の無細胞系を用いた研究から、HIRA が複製されていないプラスミド DNA へのヒストンの結合を促進することが示された(Ray-Gallet et al., 2002)。また、ヒトの培養細胞を用いて、HIRA は Asf1 と複合体を形成すること、ヒストン H3 バリエーションの H3.3 と選択的に結合すること、これら HIRA 複合体がゲノム DNA に局在してヒストン H3.3-H4 と DNA との結合を媒介することが示された(Lorain et al., 1998; Ray-Gallet et al., 2011; Tagami et al., 2004)。ショウジョウバエやマウスの受精卵においては、HIRA が脱凝縮した精子クロマチンに局在し、雄性ゲノム DNA へのヒストン H3.3-H4 の結合を促進することが報告された(van der Heijden et al., 2005; Loppin et al., 2005)。さらに、ゲノムの転写活性化領域にみられるヒストン H3 のバリエーションの置換において、H3.3 を含むヌクレオソーム形成に HIRA が必要であることが明らかにされた(Ahmad and Henikoff, 2002b)。これに加えて、HIRA はセントロメア、テロメアや PML ボディーなどに局在し、ヘテロクロマチン構造の構築

とそれに基づく転写抑制にも役割を果たすことが示された(Blackwell et al., 2004; Kaufman et al., 1998; Sharp et al., 2002; Zhang et al., 2005)。このようなことから、HIRA は、DNA の新規合成に依存せずにヌクレオソーム形成を媒介し、クロマチン構造の構築と維持、さらには遺伝子発現調節において極めて重要な役割を果たしていると考えられている (図 1-2 B、DNA replication independent)。

HIRA は真核生物に共通して存在するが、高等真核生物の HIRA が一つの分子として機能するのに対して、出芽酵母では Hir1 と Hir2、分裂酵母では Hip1 と Sml9、二つの分子からなることが知られている (表 1-1; (Sherwood et al., 1993)。出芽酵母の Hir1 には、高等真核生物の HIRA の N 末端領域と同様に、WD40 ドメインと B ドメインの二つの保存された領域が含まれ、他方 Hir2 には、高等真核生物の HIRA の C 末端領域と同様に Hir ドメインが含まれている(Kirov et al., 1998; Lamour et al., 1995)。酵母の Hir1/Hip1 や高等真核生物の HIRA の N 末端部分は、CAF-1 の p60 サブユニットと構造が類似している(Krawitz et al., 2002; Sanematsu et al., 2006; Tyler et al., 2001)。HIRA と p60 に共通する WD40 ドメインは、7つの WD ユニットから構成されたプロペラ状構造を形成し、タンパク質同士、あるいはタンパク質-DNA 結合を構築する基盤として機能すると考えられている(Kaufman et al., 1998; Tang et al., 2006)。In vitro の実験から、CAF-1 のサブユニット p48 は、WD40 ドメインを介して HIRA にも結合していることが示され(Ahmad et al., 2003)、また、B ドメインは、Asf1 と結合するために必要かつ十分なドメインであり、HIRA と CAF-1 は Asf1 の同じ領域を介して、相互排他的に Asf1 と結合することが示されている(Tang et al., 2006)。さらに、真核生物に共通する HIRA 複合体結合因子として、UBN1 (ubinuclein 1) と CABIN1 (calcineurin binding protein 1) が報告された(Rai et al., 2011; Tagami et al., 2004; Tang et al., 2012)。UBN1 は核内に局在し、転写因子と結合するタンパク質として同定されていたが(Aho et al., 2000)、近年の構造解析の結果から、HIRA と結合した UBN-1 は、ヒストン H3.3 バリエーションの特有アミノ酸残基と相互作用することで、HIRA 複合体のヒストンバリエーション選択的な結合に役割を果たしていることが示され、ヒストンシャペロン HIRA 複合体の重要な因子の一つであると考えられている(Daniel Ricketts et al., 2015)。一方、カル

シニューリンシグナル依存性な転写抑制因子である CABIN1 は、HIRA の C 末端領域の Hir ドメインを介して、HIRA と相互作用する (Han et al., 2003; Rai et al., 2011; Sun et al., 1998)。HIRA 複合体を形成するタンパク質は生物種間でよく保存されていることから、HIRA によるヌクレオソーム形成の機構は生物種間で共通であると考えられる。

以上のように、CAF-1 複合体および HIRA 複合体の各々が Asf1 と結合し、DNA とヒストン H3-H4 の結合を媒介することが明らかとなっている。CAF-1-Asf1 複合体は、その p150 サブユニットの PCNA への結合を介して DNA 複製装置に局在化し、DNA 複製に共役したヌクレオソーム形成を媒介することが判明しているものの、ヌクレオソーム形成において、Asf1 に結合したヒストンタンパク質が直接 DNA と相互作用するのかなどの分子機序の詳細については明らかにされていない。HIRA については、ヌクレオソーム形成の分子機序はもとより、クロマチンへの結合調節についても不明な点が多い。これまでに、様々な生物を用いてヌクレオソーム形成の分子機序が解析され、CAF-1 または HIRA と複合体を形成する多数の結合分子が同定されてきたが、それらのヌクレオソーム形成における役割については未だ充分には解析が進んでいない。

1-4. ツメガエル卵の無細胞系を用いたヌクレオソーム形成の分子機序の解析

ツメガエルの未受精卵を遠心して得られる卵抽出液の無細胞系は、精子クロマチンを添加することによって、細胞周期の進行に伴う細胞核の形成と崩壊、ゲノムの複製、DNA 修復、染色体の構築など、転写以外の多くの細胞内現象を試験管内で再現することができる (Lohka and Masui, 1983; Murray, 1991)。ツメガエル卵には、胞胚期の細胞の活発な DNA 複製と細胞分裂に備えるために、それらに必要とされるタンパク質が高濃度に蓄積されているため、ツメガエル卵では、他の細胞の細胞質抽出液に比べて高濃度のタンパク質を含む抽出液の調製が可能である。無細胞系は特定の分子の機能を解析する系としても優れている。無細胞系では特異抗体を用いて特定のタンパク質の選択的な免疫除去が可能であり、特定のタンパク質を免疫除去した卵抽出液へのタンパク質の戻し入れによる回復実験も容易なため、細胞周期の調節、染色体の構築やゲノム DNA の複製など

の多くの生命現象に関わる因子の同定と制御機構の解明が進んできた(Blow and Laskey, 1988; Hirano and Mitchison, 1994; Murray and Kirschner, 1989)。

ヌクレオソーム形成機構の解明においては、ツメガエル卵抽出液を用いた研究から、コアヒストン H3-H4 と H2A-H2B、リンカーヒストン B4 (H1 の初期胚バリエント)のヒストンシャペロンとして、それぞれ N1 と Nucleoplasmin、Nap1 (Nucleosome Assembly Protein 1)が報告されている(Kleinschmidt et al., 1986; Laskey et al., 1978; Shintomi et al., 2005)。ヒストン H3-H4 のシャペロンである N1 に関しては、卵抽出液から大量の N1-H3-H4 複合体が精製され、それによってヌクレオソームが形成できることも示されたが、ヌクレオソーム形成に長い時間が必要であることと、DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成には関与しないことが示されたことから、N1 はヌクレオソーム形成を直接媒介するよりも、ツメガエル卵に大量に存在するヒストン H3-H4 の細胞内蓄積に関与すると考えられている(Dilworth et al., 1987; Kleinschmidt et al., 1990; Philpott et al., 2000)。ヌクレオソーム形成に関わるヒストン H3-H4 のシャペロンとして、他の真核生物と同様に、ツメガエル卵から CAF-1-Asf1 と HIRA-Asf1、両複合体がそれぞれ同定された(Quivy et al., 2001; Ray-Gallet et al., 2002, 2007)。二本鎖環状プラスミド DNA を用いた解析から、CAF-1-Asf1 は複製されたプラスミド DNA 上におけるヌクレオソーム形成を促進し、HIRA-Asf1 は複製しないプラスミド DNA においてヌクレオソーム形成を媒介することが示された(Ray-Gallet et al., 2007)。

1-5. ツメガエル胞胚細胞におけるクロマチン構築の調節

ツメガエルの胞胚期の細胞では、ギャップ期 (G 期) がほとんどなく、S 期と M 期のみからなる、進行の速い細胞周期が十二回繰り返される(以下、胞胚細胞)。胞胚細胞では 30 分という極めて短い時間にゲノム DNA の複製とクロマチンの構築が完了する。発生が進み中期胞胚のステージに達すると (中期胞胚遷移、midblastula transition : MBT)、G1、G2 期が出現して細胞周期が長くなり、胚性の転写が活性化されて細胞分化が開始する(Newport and Kirschner, 1982)。

胞胚細胞の短時間での DNA 複製を可能とする機構として、胞胚細胞では DNA 複製開始点が多いことが知られている(Blow et al., 2001; Hyrien et al., 1995)。また、転写が行われないことや、DNA 損傷を検知して細胞周期を一時停止させる DNA 損傷チェックポイントが存在しないことなど、胞胚細胞ではゲノム DNA の迅速な複製を可能とする特異的なクロマチン制御が知られている(Dasso and Newport, 1990)。しかしながら、複製された DNA にヌクレオソームや高次のクロマチン構造を迅速に構築するための分子機構については、不明な点が多い。

ツメガエル卵抽出液の無細胞系を用いた当研究室の先行研究において、DNA 複製に伴うクロマチン構築の仕組みが解析されてきた(新富, 2005)。これまでに、ツメガエルの卵においても、CAF-1 が PCNA と相互作用し、DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成を促進することが確認されたが、意外なことに、CAF-1 を免疫除去した卵抽出液においても、複製されたゲノム DNA 上のヌクレオソーム形成が大幅には抑制されないことが示された。一方、Asf1 を免疫除去した卵抽出液では、複製された DNA のヌクレオソーム形成が著しく抑制されたことから、ツメガエル卵には、ゲノム DNA の複製に伴うヌクレオソーム形成に、CAF-1 以外の Asf1 と結合するシャペロンが関与していることが示唆された。前述したように、ツメガエル卵に HIRA が存在していることが報告されていることから、その候補として HIRA-Asf1 複合体が考えられたが、ツメガエル卵抽出液において HIRA-Asf1 がゲノム DNA の複製に伴うヌクレオソーム形成に関与するのかわについては検証されていない。また、ヌクレオソーム形成における CAF-1 と HIRA の役割分担、また両シャペロンによるヌクレオソーム形成の分子機序についても研究がなされていない。

1-6. 本研究の目的

上述したように、ツメガエルの胞胚細胞では、速い細胞周期の進行に伴い速やかな DNA 複製とクロマチン構造構築が必要と考えられ、それに対応して、DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成制御に CAF-1 複合体と HIRA 複合体が共に役割を果たすことが予想された。しかし、ヌクレオソーム形成に関与すると考えられる Asf1、CAF-1 と HIRA の役割分担が明らかではなかった。また、CAF-1-Asf1

と HIRA-Asf1 両複合体はヌクレオソーム形成を媒介することが知られているが、その分子機序がほとんど解明されていなかった。さらに、両ヒストンシャペロンによって媒介されるヌクレオソームコアの基礎構造は同一であるため、それらの分子機序に共通点が存在することが予想されている。そこで、本学位論文研究では、ツメガエル胞胚細胞のゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成における、ヒストン H3-H4 シャペロン Asf1、CAF-1 と HIRA の役割を明らかにするとともに、これまでに十分に解析が進んでいない HIRA-Asf1 複合体によるヌクレオソーム形成の分子機序を解明し、CAF-1-Asf1 複合体の分子機序と比較することを目的とした。

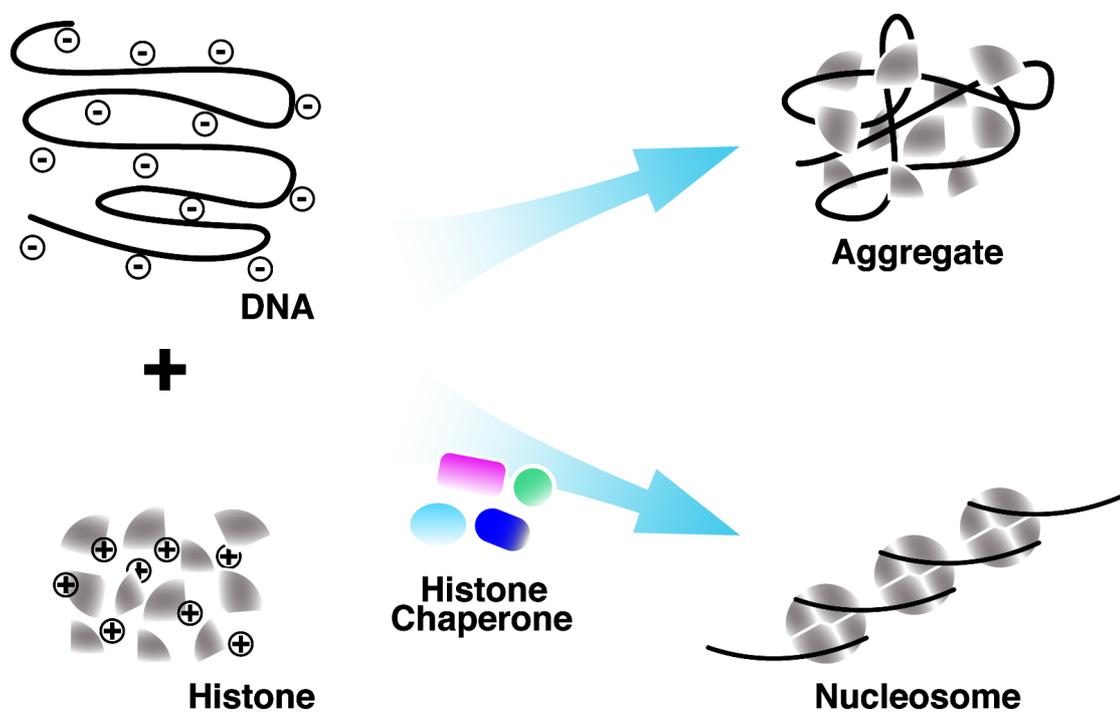


図 1-1. ヌクレオソーム形成におけるヒストンシャペロンの役割

試験管内で正電荷を持つヒストンタンパク質と負電荷を持つ DNA を混合すると、直ちに凝集体が形成される (上)。ヒストンシャペロンが共存すると、ヒストンタンパク質と DNA の結合が制御され、ヌクレオソームの形成が促進される (下)。

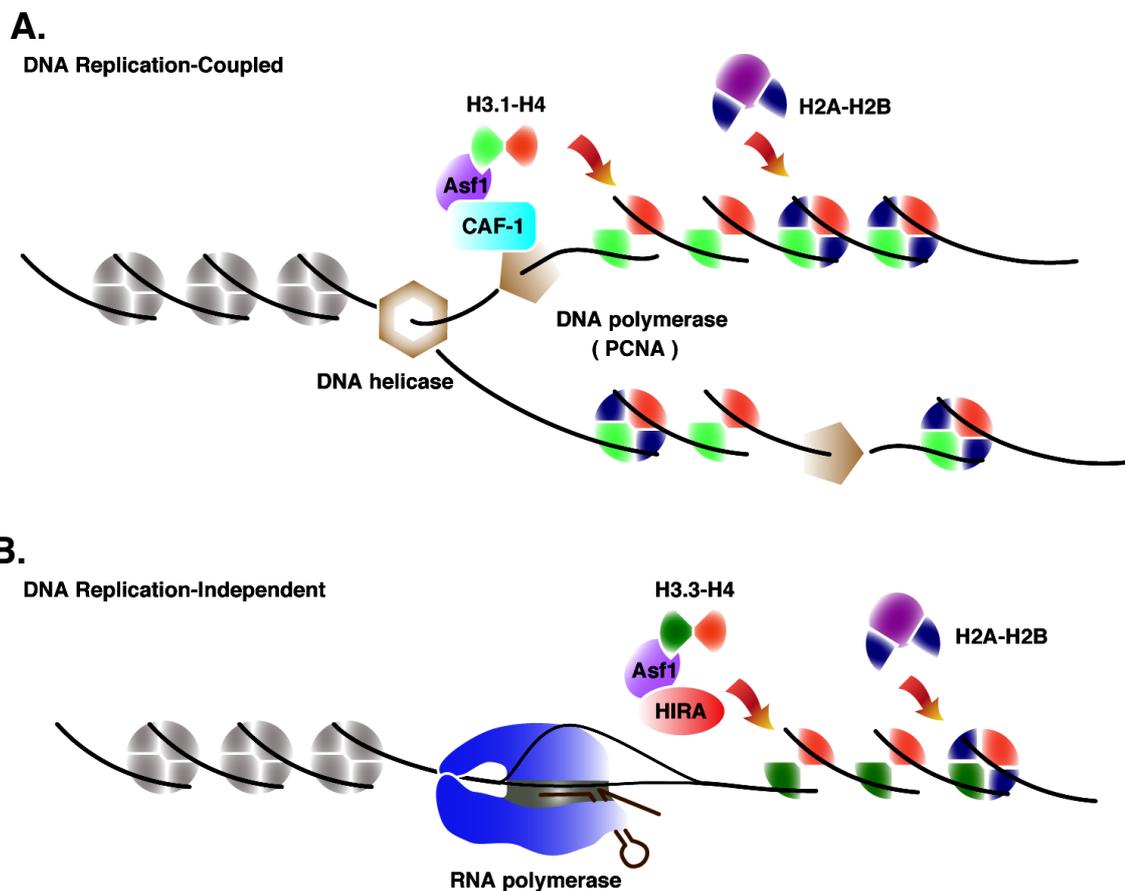


図 1-2. 哺乳類培養細胞のヌクレオソーム形成におけるヒストン H3-H4 シャペロンの役割分担

(A) DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成をモデル図で示す。DNA 複製の際に、CAF-1-Asf1/H3.1-H4 複合体が DNA ポリメラーゼ補助因子 PCNA と結合し、ヒストンシャペロンによって複製直後の DNA へのヒストン H3.1-H4 の結合が促進され、DNA 複製依存的なヌクレオソームが形成される。

(B) DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成をモデル図で示す。例として、転写の際に、HIRA-Asf1/H3.3-H4 複合体がヒストンシャペロンの働きによって転写後の DNA へのヒストン H3.3-H4 の結合を促進し、DNA 複製非依存なヌクレオソームが形成される。

表 1-1. 真核生物のヒストン H3-H4 の主要なシャペロン、その相互作用因子および機能

Chaperone	Family and Homologues	Interactions	Related Function
N1/N2	NASP (Hs, Mm), N1/N2 (XI), Hif1 (Sc)	histone H3-H4	Storage of H3/H4 pools
CIA/Asf1	CIA-I, II/Asf1a, b (Hs, Mm) CIA/Asf1 (XI, Dm, Sc) Cia1 (Sp)	histone H3-H4 CAF-1p60 (Hs), p105 (Dm), cac2 (Sc) HIRA (Hs), Hir1, Hir2 (Sc), Hip1, Slim9 (Sp), Sas4, Sas2 (Sc)	DNA replication DNA repair DNA recombination Gene silencing / anti-silencing Regulation of HAT activity Cell senescence
CAF-1	p150, p60, p48 (Hs, Mm, XI) p180, p105, p55 (Dm) Cac1/Rlf2, Cac2, Cac3/Msi1 (Sc)	Asf1a, b (Hs), Asf1 (XI, Dm, Sc) PCNA (Hs, XI) HP1 (Hs) HAT1, HDAC1 (Hs)	Histone H3.1 deposition DNA replication DNA repair Telomere silencing Cell cycle regulation
HIRA	HIRA (Hs, Mm, XI, Dm) Hir1, Hir2/Spt1 (Sc) Hip1, Sml9 (Sp)	Asf1a (Hs), Asf1 (XI, Sc), Cia1 (Sp) CAF-1p48 (Hs) CABIN-1 (Hs, Mm), yemanuclein (Dm), Hpc2 (Sc) UBN-1 (Hs, Mm), Hir3 (Sc) HDAC2 (Hs) Pax3, Pax7 (Hs)	Sperm chromatin decondensation Histone H3.3 deposition Transcriptional regulation Heterochromatin assembly Cell senescence Gene silencing cell cycle regulation

(Hs) *H. sapiens*, (Mm) *M. musculus*, (XI) *X. laevis*, (Dm) *D. melanogaster*, (Sc) *S. cerevisiae*, (Sp) *S. pombe*

2. 材料と方法

2-1. アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)

雄および雌のアフリカツメガエルを専門業者（城北生物教材、浜松生物教材）より購入し、水温 19-23°C で飼育した。

2-2. 精子クロマチンの調製

0.2% MS-222 (ethyl m-aminobenzoate methanesulfonate) で麻酔した雄のツメガエルを解剖して精巣を摘出した。氷冷した MMR (100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.5) 中で精巣をホモゲナイズすることで精子粗懸濁液を得た。遠心 (500 × g, 5 min, 4°C) によって精巣組織片を沈殿させ、精子を含む上清を回収した。さらに、遠心 (1,500 × g, 10 min, 4°C) によって精子を沈殿させて、22°C の SMH (250 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.5) に懸濁した。得られた精子懸濁液に lysolecithin (終濃度 0.05%) を加えて室温でインキュベートし、原形質膜および核膜を透過処理し、氷冷した 3% BSA/SMH を添加することで反応を停止させた。氷冷した 0.4% BSA/SMH で精子クロマチンを 3 回洗浄した後、 1.0×10^8 精子/ml の密度になるように精子クロマチンを SMH に懸濁し、分注して液体窒素中で凍結し、-80°C で保存した。

2-3. 卵抽出液の調製

雌のツメガエルに、産卵誘起の3-7日前に50単位の血清性性腺刺激ホルモン PMSG (セロトロピン、あすかアニマルヘルス)、産卵前日に500単位の胎盤性性腺刺激ホルモン HCG (ゴナトロピン、富士製薬) を注射し、0.8% NaCl 水溶液中で産卵させ、注射後12-15時間に卵を採取した。分裂期卵抽出液の調製は、

Yamamotoらの方法で行った(Yamamoto et al., 2005)。未受精卵を2.5% thioglycolic acid-NaOH (pH 8.2) で処理することでゼリー層を除いた後に、M-EB (100 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.5) で十分洗浄した。cytochalasin B (0.1 mg/ml)を含むM-EBを満たした遠心チューブに除ゼリーした未受精卵を移し、遠心(1,000 × g, 10 sec, 4°C)によって卵をバックし、余分なバッファーを除いた。その後、遠心(15,000 × g, 10 min, 4°C)によって卵を破砕し、中間層の細胞質画分を回収した。これにenergy mix (500 mM creatine phosphate, 50 mM ATP, 50 mM MgCl₂) を2%体積加え、再び遠心することで回収した細胞質画分を分裂期卵抽出液として用いた。未受精卵の抽出液(分裂期)に終濃度0.4 mM のCaCl₂を添加し、22°Cで30分間インキュベートしたものを間期卵抽出液として用いた。また、分裂期または間期の卵抽出液を超遠心(150,000 × g, 90 min, 4°C)し、膜及びリボソーム画分を除いた卵抽出液の可溶性画分(high-speed supernatant of extracts, HSS)を調製した。

2-4. 核質画分の調製

精子クロマチン(1,000 /μl)を間期卵抽出液に添加して22°Cでインキュベートし、核を形成させた。卵抽出液を9倍体積の氷冷したEB(100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.5)を用いて希釈し、氷上で10分間インキュベートした後、500 μlの氷冷した30% sucrose/EBの上に重層して遠心(7,000 × g, 10 min, 4°C)し、回収した核を氷冷したEBで2回洗浄したものを核(全核質画分)とした。この核を氷冷した0.25% Triton X-100/EBで2回洗浄し、不溶性核画分を回収してクロマチン画分とした。このクロマチン画分をdigestion buffer(12.5 mM CaCl₂, 0.32% Triton X-100 /EB)に懸濁し、マイクロコッカルヌクレアーゼ(MNase, 1,000 U/ml)を加え、22°Cで5分間インキュベートした。氷冷した0.25% Triton X-100/EBで2回洗浄した後、クロマチン結合タンパク質を含まない不溶性核画分として回収した。各サンプルを1.0 × 10⁴ 核/μlの濃度になるように、1×LSB(2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.01%

Bromophenol Blue, 62.5 mM Tris-HCl, pH 8.0)を加え、加熱 (95°C, 5 min) してタンパク質を抽出し、SDA-PAGEに用いた。

2-5. 卵母細胞の細胞質サンプルの調製

0.2% MS-222で麻酔した雌のツメガエルから摘出した卵巣の断片を、0.2% collagenase Type-1 (Wako) を含むMMR中で22°Cで緩やかに2時間転倒攪拌することにより得られた未成熟卵母細胞を、MMRで3回洗浄したのちLeibovitz's L-15培地 (70% Leibovitz's L-15 medium (GIBCOBRL), 50 units/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.5) 中で16°Cで16時間インキュベートした(Newport and Kirschner, 1982)。未成熟卵母細胞(Dumont, 1972)を各成長段階で選別して回収した。StageVIの未成熟卵母細胞を10 µg/ml progesterone/MMRで10分間処理し、卵成熟を誘起し、22°Cでインキュベートして卵成熟開始後の様々な時間で卵母細胞を回収した。各々の成長段階の未成熟卵母細胞と卵成熟開始後の卵母細胞について、それぞれ5個の卵を4°CのM-EBの中で先太チップを用いてホモゲナイズした後に、遠心 (15,000 × g, 10 min, 4°C) して回収した細胞質画分に1×LSBを加えて加熱 (95°C, 5 min) し、SDA-PAGEに用いた。1レーンあたり卵0.5個分のサンプルを電気泳動した。

2-6. cDNAクローニング

アフリカツメガエル未受精卵から単離した全RNAを鋳型としてfirst-strand cDNAを合成し、PCRの鋳型として用いた。HIRA (Xenbase: XB-GENE-976075) とCABIN1 (Xenbase: XB-GENE-6486843) は、既報のcDNAに基づいてプライマーを設計し、PCRによってcDNAを単離した。Asf1 (Genebank accession: BC056123) 及びCAF-1p150 (Genebank accession: AAK31811)、p60 (Genebank accession: DQ192574) のcDNAは、当研究室の岩渕万里博士と理化学研究所の新富圭史博士より供与を受けた。

2-7. 大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の調製

アフリカツメガエルのHIRAのC末端断片 (HIRAC613, 401-1013 aa) のcDNAをpET30プラスミド (Novagen) に挿入した。アフリカツメガエルAsf1全長cDNAをpET21プラスミド (Novagen) に挿入した。これらプラスミドでBL21 (DE3) を形質転換したのち、各々の6 x His融合タンパク質を発現させた。大腸菌破砕物上清からHis・Bind® Resin (Novagen) を用いて、リコンビナントタンパク質をアフィニティー精製した。アフリカツメガエルCAF-1p150のC末端断片

(p150C357, 540-896 aa) cDNAをpGEX4T3プラスミド (GE Healthcare) に挿入したプラスミドでBL21を形質転換し、GST融合タンパク質を発現させた。大腸菌破砕物上清からGlutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) を用いてリコンビナントタンパク質をアフィニティー精製した。これら融合タンパク質を、卵内在性ヒストンシャペロンの定量に用いた。

HIRAの部分断片 (HIRA_B, 357-457 aa) 、アフリカツメガエルCABIN1のC末端断片 (CABIN1Nt, 1-937 aa) 、および、アフリカツメガエルp60の全長 (p60, 1-569 aa) 及びC末端断片 (p60_B, 380-569 aa) をコードするcDNA を各々pGEX-6Pプラスミド (GE Healthcare) に挿入したプラスミドでBL21を形質転換した。これらGST融合タンパク質を発現させ、Glutathione Sepharose 4B に結合させ、GSTプルダウン実験に用いた。

GSTおよびHis融合タンパク質を大腸菌で共発現させる手法で、タンパク質複合体を調製した。HIRAの全長、HIRA変異体、p60、HCとCH変異体をコードするcDNAをpGEX-6Pプラスミドに挿入した。Asf1 cDNAをpCDFDuet-1プラスミド (Novagen) に挿入した。Rosetta 2 (DE3, Novagen)をpGEX-6PとpCDFDuet-1で形質転換し、リコンビナントタンパク質を共発現させた。大腸菌破砕物上清からGlutathione Sepharose 4Bを用いて、リコンビナントタンパク質複合体をアフィニティー精製した後、Vivaspin 2 (10 kDa, Sartorius)を用いて、遠心 (12,000 × g, 20°C) によってピーク溶出画分を濃縮し、分注して4°Cで保存した。

2-8. 卵抽出液における外来性タンパク質の発現

HIRAの全長および変異体のcDNAをpRNT3-FLAGプラスミド (pBS-RNTを改変、当研究室 ; (Lemaire et al., 1995))に挿入した。また、IBB (importin β -binding of importin α ; (Kose et al., 1997)) 配列を各々のHIRAに融合した。これらを鋳型にしてmMESSAGE mMACHINE T3 kit® (Ambion) を用いて、*in vitro*でmRNAを合成した。卵抽出液にmRNAを加えて22°Cでインキュベートし、FLAGを融合したHIRAリコンビナントタンパク質を発現させた。

2-9. 抗体

His-HIRA (494-685 aa) 、 GST-HIRA (401-1013 aa) のリコンビナントタンパク質及びHIRAのC末端合成ペプチド (LFTEYQEQLDILRDK ; 999-1013 aa) をウサギに免疫して、抗HIRAポリクローナル抗体を作製した。

抗CAF-1p150、抗CAF-1p60、抗Asf1、抗N1、抗Nap-1及び抗HP1 γ 抗体は、当研究室で作製されたポリクローナル抗体を使用した。抗原は以下の配列 : [His-p150C537 (540-896 aa) 、 GST-p60C325 (245-569 aa) 、 His-Asf1 (1-200 aa) 、 His-N1(1-663 aa)、 His-NAP-1 (1-393 aa) 及びHis-HP1 γ (1-175 aa) のリコンビナントタンパク質、 Asf1のC末端合成ペプチド

(SKGLAAALNTLPENSMD ; 182-198 aa) 及びCAF-1p150のC末端合成ペプチド (TIECKINLNDSAVLAS;835-847 aa) 。さらに、抗ツメガエルリンカーヒストンB4抗体(Ohsumi et al., 1993)と抗ツメガエルlamin LIII抗体 (Hasebe et al., 2011)を使用した。

抗Histone H3 (abcam, 1791)、抗phospho-Ser 10 Histone H3 (Active Motif, 39254) ポリクローナル抗体及び抗PCNA (BioLegend, PC10) 、抗tubulin- α (BioLegend, 10D8)、抗Flag (sigma, M2) 、抗GST (Wako, 5A7) 及び抗His₆ (Wako, 9F2) モノクローナル抗体は購入して使用した。

2-10. 免疫除去と免疫沈降

抗血清を等体積のProtein G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) と室温で1時間混和し、抗体をビーズに結合させた。抗体ビーズをTBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCL, pH 7.5) で洗浄した後、EBで平衡化して使用した。対照として、等量の免疫前血清もしくはnormal rabbit IgG (Sigma) を用いて対照抗体ビーズを作製した。卵抽出液に、その1/2体積の抗体ビーズを混和し、時々攪拌しながら氷上で30分間インキュベートした後に、遠心 (1,000 × g, 3 min, 4°C) によってビーズを沈殿させ、上清を回収した。この操作を2回行った後の上清を免疫除去卵抽出液として用いた。免疫沈降の場合は、卵抽出液に等体積の抗体ビーズを加え、時々攪拌しながら氷上で1時間インキュベートした。ビーズを0.25% Triton X-100/EBで3回洗浄した後に、等量の2 × LSBを加えて加熱 (95°C, 5 min) することによってタンパク質を抽出し、SDA-PAGEに用いた。

2-11. 電気泳動とウエスタンブロッティング

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は、Laemmliの方法を改変し(Laemmli, 1970)、15%、12.5%、10%もしくは7.5%の分離ゲル、4.5%の濃縮ゲルを用いて、泳動バッファー (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) 中で行った。

ウエスタンブロッティングは、Towbinらの方法に従って行った(Towbin et al., 1979)。SDS-PAGEした後、タンパク質を転写バッファー (100 mM Tris, 192 mM glycine, 0.05% SDS, 20% methanol) 中でニトロセルロース (Pall corporation) もしくはPVDFメンブレン (Millipore) に転写した。転写後のメンブレンを10% skim milkを含むTBSに浸し、室温で30分間振盪してブロッキングした。その後、室温で1時間もしくは4°Cで一晩、TBS或いはTBS-T (0.1% Tween 20/TBS) を用いて希釈した一次抗体と反応させた。反応後のメンブレンをTBSで洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼで標識した二次

抗体 (Dako) と室温で1時間反応させた。シグナルの検出には、それぞれEz WestLumi plus (ATTO)、BCIP/NBT phosphatase substrate (KPL) を用いた。

2-1 2. 内在性ヒストンシャペロンタンパク質の定量

BSA (ウシ血清アルブミン、既知濃度) 溶液と各々のヒストンシャペロンタンパク質溶液をSDS-PAGEした後、CBB (Commassie Brilliant Blue) で染色し、画像撮影装置Ez-Capture II (ATTO) および 画像解析ソフトImageJを用いて各々のバンドのシグナル強度を計測した。BSAの濃度とシグナル強度に基づいて、ヒストンシャペロン溶液の濃度を算出した。このヒストンシャペロンタンパク質溶液を卵抽出液で希釈したサンプルを、各々の抗体を用いてウエスタンブロッティングした。抗原タンパク質の濃度とシグナル強度から、卵抽出液に含まれる内在性の各々のヒストンシャペロンの濃度を算出した。

2-1 3. プラスミドDNAスーパーコイルアッセイ

各々のヒストンシャペロンタンパク質が免疫除去された卵抽出液に、環状プラスミドDNA (pBluescript II SK, Stratagene) を加えて、24°Cで様々な時間インキュベートした後、等量のTermination Mix (100 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, 1 mg/ml Proteinase K, 2% SDS, 80 mM Tris-HCl, pH 8.0) を添加して37°Cで1時間インキュベートした。フェノール-クロロホルム混合液 (50% TE (250 mM EDTA, 1 M Tris-HCl, pH 8.0) saturated phenol, 48% chloroform, 2% isoamyl alcohol) を用いてタンパク質を除去し、エタノール沈殿して回収したプラスミドDNAをTEに溶かした後、1.5%アガロース-TAE(200 mM Tris, 100 mM acetic acid, 50 mM EDTA-NaOH, pH 8.0)ゲルで電気泳動した後、GelRed (Biotium) で染色した。回復実験を行う場合には、HIRAまたはAsf1を免疫除去した卵抽出

液にHIRA/Asf1複合体を加えて、24°Cで30分間ブレインキュベートした後、環状プラスミドDNAを加えて、スーパーコイルアッセイを行った。

2-14. ゲノムDNA複製の定量

間期卵抽出液に精子クロマチン (1,000 / μ l) と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (0.1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)を添加し、22°Cでインキュベートした。様々な反応時間の後に、卵抽出液を9倍体積のstop solution(10 mM EDTA, 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% Bromophenol Blue, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)に希釈して10分間氷冷することで反応を停止させた。サンプルを37°Cで1時間インキュベートして除タンパク処理した後、フェノール-クロロホルム混合液を用いてタンパク質を除去し、エタノール沈殿して回収したゲノムDNAを0.8%アガロースゲル-TAEゲルで電気泳動した。ゲルを乾燥させた後、Typhoon FLA 7000 (GE healthcare)を用いたオートラジオグラフィによって、ゲノムDNAに取り込まれた $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を測定し、DNA複製量とした。

2-15.ヌクレオソーム形成活性の検定

間期卵抽出液に精子クロマチン (1,000 / μ l) を加え、22°Cでインキュベートして核を形成させてDNA複製を進行させた。連続ラベル法では、インキュベート開始とともに $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (0.1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)を加えてラベルした。パルスラベル法では、インキュベート開始後60分に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (0.2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)を加えて15分間ラベルをした後に、dCTP (1 mM) を加えて $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ の取り組みを阻害した。様々な反応時間の後に、卵抽出液を4倍量のdigestion buffer(12.5 mM CaCl_2 , 0.32% Triton X-100 /EB)に懸濁した。様々な濃度のマイクロコッカールヌクレアーゼ (MNase) を加え、22°Cで5分間インキュベートした後、Termination Mixを加えて反応を停止させて、さらに37°Cで1時間インキュベートした。フェノール-クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって回収したDNA断片を6%ポリ

アクリルアミド-TBE(90 mM Tris, 90 mM boric acid, 20 mM EDTA-NaOH, pH 8.0)ゲルで電気泳動した。Typhoon FLA 7000を用いたオートラジオグラフィーによって、DNAの切断パターンの解析及びシグナル強度の定量を行った。

3. 結果

3-1. ツメガエル卵のヒストン H3-H4 シャペロン

3-1-1. ツメガエル卵成熟に伴う HIRA タンパク質の量の増加

これまでに、ツメガエル卵における Asf1、HIRA および CAF-1 の各々の存在が報告されているが (Quivy et al., 2001; Ray-Gallet et al., 2002, 2007)、その濃度や存在比は明らかにされていない。まず、それについて、各々に対する特異抗体と組換えタンパク質を用いた定量ウエスタン解析によって検討した。卵ではほとんどの p150 サブユニットが CAF-1 複合体を形成していることから (新富, 2005)、CAF-1 については最大サブユニットである p150 を定量解析した。His-Asf1 (全長)、His-HIRAC613 (401-1013 aa)、GST-p150C357 (540-896 aa) を大腸菌で発現させたのち、His・Bind Resin ビーズもしくは Glutathione Sepharose 4B ビーズを用いてアフィニティー精製し、精製タンパク質溶液の濃度を求めた。これらの既知濃度の組換えタンパク質を卵抽出液に添加してウエスタン解析し、ツメガエル卵抽出液に含まれる各々のヒストンシャペロンタンパク質の濃度を測定した (図 3-1)。10% 卵抽出液と様々な濃度の His-Asf1 を含むタンパク質溶液を混合したサンプルについて、抗 Asf1 抗体 (抗原: Asf1 の C 末端ペプチド) を用いてウエスタンブロッティングを行い、His-Asf1 の検量線から求めた卵抽出液に含まれる内在性 Asf1 の濃度は 504 nM (± 37 nM, n= 6) であった (図 3-1 A)。同様の手法で抗 HIRA 抗体 (抗原: GST-HIRAC613) を用いて求めた内在性 HIRA タンパク質の濃度は、9.74 nM (± 1.45 nM, n= 7) であった (図 3-1 B)。また、卵抽出液中の p150、すなわち CAF-1 の濃度は、4.60 nM (± 0.56 nM, n= 7) であった (図 3-1 C、抗原: p150 の C 末端ペプチド)。これらの結果から、ツメガエル卵における Asf1 の濃度は HIRA や CAF-1 の 50 倍以上であること、また、HIRA の濃度は CAF-1 より高いことが判明した (図 3-2 B と 3-3 C)。

ツメガエル卵では CAF-1 より HIRA の濃度が高かったことから、分化後の体細胞についてもそれらの存在比を調べることにした。ツメガエル腎臓上皮由来培養細胞 (A6) の全細胞抽出液と卵抽出液からサンプルを調製し、両サンプル中の Asf1 の量を揃えて定量ウエスタン解析した (図 3-2 A)。卵抽出液の希釈系列と各々のバンド強度を比較するこ

とで、A6 細胞抽出液サンプル中の HIRA および CAF-1 の相対濃度を測定した（データ未掲載）。卵抽出液、A6 細胞抽出液の各々における Asf1 の濃度に対する CAF-1（CAF-1/Asf1）と HIRA（HIRA/Asf1）の比率を算出し、その相対値で比較した。その結果、Asf1 に対する HIRA と CAF-1 の相対値は、卵抽出液では 1.9%と 0.9%、A6 細胞抽出液では 1.4%と 1.8%となり、A6 細胞では Asf1 に対する HIRA の相対量が低く、CAF-1 の相対量が多いことが分かった（図 3-2 B）。次に、各々の抽出液における CAF-1 に対する HIRA の存在比（HIRA/CAF-1）は、卵抽出液では 2.11（1.9% / 0.9%）であるのに対し、A6 細胞抽出液においては 0.78（1.4% / 1.8%）となった。以上のことから、卵における HIRA/CAF1 の値は A6 細胞の 2.7 倍となり、ツメガエルの受精卵や胞胚期における HIRA の相対濃度は他の細胞より高いことが示唆された。

これまでの研究から、ツメガエル卵母細胞では、成熟期に、いくつかのタンパク質の量が増加することが示されている（Iwabuchi et al., 2000; Sheets et al., 1994）。そこで、ヒストンシャペロンが卵成熟期に何らかの発現調節を受けるかを検討した。異なる成長ステージにある未成熟卵母細胞を集め、各々のヒストンシャペロンのウエスタン解析を行ったところ（stage II～VI; 図 3-2 C、レーン 3-7）、HIRA/Asf1 と CAF-1/Asf1 の値はそれぞれ 0.8%と 0.7%となり、成長ステージによらずほぼ一定であったが、興味深いことに HIRA/Asf1 の値は成熟卵のものと較べて非常に低く、A6 細胞に近い値であった。次に、十分に成長した未成熟卵（stage VI）を集めてプロゲステロンで処理し、卵成熟を開始させた（5 - 360 min; 図 3-2 C、レーン 8-16）。プロゲステロン処理から 120 分以降には、卵に GVBD（減数第一分裂中期に進行することによる卵核胞崩壊）が起こって成熟斑が出現し始め、180 分後にはほとんどの卵に成熟斑が出現した。CAF-1 は分裂期にリン酸化され電気泳動上の移動度が小さくなることが報告されていたことから（Keller and Krude, 2000; Marheineke and Krude, 1998）、180 分では卵が減数第一分裂中期以降へ進行していることが確認された（図 3-2 C、p150 と p60、レーン 13-16）。プロゲステロン処理後 360 分の間に、ヒストン H3-H4 とそのヒストンシャペロンである N1、Asf1、CAF-1 やリンカーヒストン B4 とそのヒストンシャペロンである Nap1 などのタンパク質の量はほぼ一定であった（図 3-2 C、レーン 8-16）。これに対し、HIRA の量は、GVBD 前（5 - 120 min）と後（180 - 360 min）で大きく変化し、GVBD 後には CAF-1 に対する HIRA の相対量が増大した（図 3-2 C、HIRA、レーン 8-12 と 13-16 を比較する）。成熟卵の抽出液の希釈系列（図 3-2 C、レーン 17-22）とバ

ンド強度を比較した結果、GVBD 前と較べて GVBD 後には HIRA の量が約3倍に増加することが明らかとなった。ツメガエル卵成熟期には mRNA の転写が行われないことから、翻訳調節の機構により卵成熟期に HIRA のタンパク質量が急激に増加すると考えられる。以上のことから、成熟卵の相対的に高い HIRA の存在量は卵成熟期のタンパク質の翻訳促進によってもたらされることが示唆された。

3-1-2. ツメガエル卵におけるヒストン H3-H4 シャペロン複合体の構成

ツメガエル卵において、ヒストンシャペロン Asf1、HIRA および CAF-1 がどのような複合体を形成しているのか、また、これらのヒストンシャペロンと、ヒストンやヒストンの蓄積に関わる N1 との結合がどのように制御されているのかについては明らかではない。そこで、各々の特異抗体による免疫共沈降実験を行って、各々のタンパク質間の結合性について検討した。Asf1、HIRA または CAF-1 (p150 サブユニット) に対する抗血清と Protein G Sepharose ビーズを反応させ、抗体ビーズを作製した。対照実験 (Δ Mock) には、非特異的ウサギ抗体を結合させたビーズを用いた。各々のヒストンシャペロンが完全に除かれる量の抗体ビーズを卵抽出液と反応させ (卵抽出液とビーズを等体積で混合)、反応後の卵抽出液 (extracts、図 3-3 A) と免疫沈降物 (IP、図 3-3 B) についてウエスタン解析した。反応後の抽出液では各々のヒストンシャペロンがそれぞれ卵抽出液から完全に除かれたことを確認した (図 3-3 A、 Δ Asf1、 Δ HIRA および Δ p150)。

これまでの報告 (English et al., 2006; Natsume et al., 2007; 新富, 2005) に一致して、Asf1 の免疫沈降物には分裂期、間期のいずれにおいてもヒストン H3 が検出され (図 3-3 B、レーン 5-6)、Asf1 は細胞周期に依存せずにヒストンに直接に結合することが示された。興味深いことに、Asf1 はヒストンシャペロン N1 と結合性を持つことも示された (図 3-3 B、レーン 5-6)。N1 はツメガエル卵に存在する大量のヒストン H3-H4 と結合し、ヒストンの細胞内蓄積に関与すると考えられている (Kleinschmidt et al., 1986)。しかし、HIRA と CAF-1 の沈降物からは N1 が検出されなかったことから (図 3-3 B、レーン 7-10)、N1 は HIRA や CAF-1 複合体に含まれない、すなわち N1 と結合したヒストン H3-H4 は HIRA または CAF-1 によるヌクレオソーム形成に直接には関与しないことが示唆された。代わりに、ヒストンを結合した Asf1 は、HIRA または CAF-1 と

相互作用することから (図 3-3 B、レーン 5-6)、ヌクレオソーム形成において、Asf1 は、HIRA または CAF-1 と複合体を形成し、各々のヒストンシャペロン複合体にヒストンを供給すると考えられる。従って、N1、CAF-1 や HIRA のいずれとも結合性を持つ Asf1 は、それらのヒストンシャペロン間でのヒストンの受け渡しに重要な役割を果たすことが示唆された。

Asf1 は CAF-1 と HIRA のいずれとも結合性をもつが、CAF-1 は間期の Asf1 免疫沈降物にのみ検出され、分裂期のものには検出されなかった (図 3-3 B、レーン 5-6)。このことから、CAF-1 と Asf1 の結合は細胞周期により制御され、間期にのみ CAF-1-Asf1 複合体の形成が起こることが示唆された (図 3-3 C、interphase)。また、Asf1 沈降物に含まれる CAF-1 の量は全体に較べてごくわずかであり (図 3-3 B、レーン 6 と 10)、Asf1 を除いた卵抽出液 (Δ Asf1) にはほとんどの CAF-1 が存在していたことから (図 3-3 A、レーン 2)、間期の卵抽出液において、Asf1 と結合する CAF-1 はそのごく一部であることが示唆された (図 3-3 C、interphase)。さらに、間期の CAF-1 沈降物にヒストン H3 と PCNA が検出されたことは (図 3-3 B、レーン 10)、CAF-1-Asf1-H3 複合体は間期に PCNA と結合して DNA 複製フォークに局在し、DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成を媒介するとする知見と一致した (Shibahara and Stillman, 1999; Tagami et al., 2004)。一方、Asf1 沈降物には細胞周期によらず HIRA が検出され、また、それらの量は、HIRA 沈降物中に存在する HIRA の量と変わらなかった (図 3-3 B、レーン 5-6 と 7-8)。このことから、卵抽出液において全ての HIRA は Asf1 と恒常的に複合体を形成していることが示唆された (図 3-3 C、M phase と interphase)。また、 Δ Asf1 に HIRA が検出されなかったのに対して、 Δ HIRA には Asf1 のほとんどが残存していた (図 3-3 A、レーン 2-3)。この結果は、卵抽出液には Asf1 が HIRA の約 50 倍の濃度で存在するため、HIRA-Asf1 複合体に含まれる Asf1 は全体のごく一部であるためと推察される (図 3-3 C)。CAF-1-Asf1 複合体にヒストンが含まれていると同様に、HIRA-Asf1 複合体にもヒストンが含まれると予想されたが (Tagami et al., 2004)、HIRA の免疫沈降物からはヒストン H3 がほとんど検出されなかった (図 3-3 B、レーン 7-8)。その理由として、抗 HIRA 抗体により HIRA-Asf1 複合体とヒストンとの結合性が競合的に阻害された可能性が考えられる。

以上の結果から、ツメガエル卵において、ヌクレオソームの形成を促進するとされる二つのヒストンシャペロンのうち、HIRA は細胞周期を通じて Asf1 と恒常的に複合体を

形成して存在する一方、CAF-1 のごく一部は間期にのみ Asf1 と相互作用することが示された。(図 3-3 C)。

3-1-3. ヒストン H3-H4 シャペロンのクロマチン局在

ゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成に各々のヒストンシャペロンが果たす役割を明らかにするため、クロマチン上の Asf1、CAF-1、HIRA および N1 の動態を解析した。分裂期の卵抽出液にシクロヘキシミドと精子クロマチンを加え、CaCl₂を添加することにより卵抽出液を賦活して細胞周期を間期に移行させた。この抽出液では間期が維持され、賦活後約 30 分に核が形成されると速やかに DNA 複製が開始する。賦活後 120 分の抽出液に、分裂期の卵抽出液可溶性画分 (M-HSS) を添加してインキュベーションすることにより、抽出液を分裂期に移行させた。様々な時間後に卵抽出液からクロマチンを回収してウェスタン解析を行った。細胞周期の進行は、ヒストン H3 の 10 番目のセリン (H3S10) のリン酸を検出する特異抗体で確認した (図 3-4、H3S10 は分裂期にリン酸化され、間期に脱リン酸化される)。賦活後 60 分のクロマチンに PCNA が最も多く見られたため、この時間のクロマチンでゲノム DNA の複製が最も盛んに行われていること (図 3-4、レーン 8)、その後の時間のクロマチンでは PCNA が減少したことから、90~120 分までには DNA 複製がほぼ終了していると推定された (図 3-4、レーン 9-10)。CAF-1 (p150 と p60 サブユニット) のクロマチン結合は、PCNA と挙動が一致し、賦活後 60 分のクロマチンに最も多く検出され (図 3-4、60 min、レーン 8)、複製終了後や分裂期のクロマチンにはほとんど検出されなかった (図 3-4、90-240 min、レーン 9-14)。これに対し、Asf1 と HIRA は、賦活直後から DNA 複製のピークにかけてクロマチンに結合し (図 3-4、5-60 min、レーン 4-8)、複製がほぼ終了したクロマチンにもある程度結合し続けていた (図 3-4、90 と 120 min、レーン 9-10)。また、卵抽出液を分裂期に移行させると、Asf1 と HIRA はクロマチンから解離することが示された (図 3-4、135-240 min、レーン 11-14)。また、卵におけるヒストン H3-H4 の細胞内蓄積に関わると考えられる N1 は、クロマチンと結合性を持たないことが示された (図 3-4)。以上のことから、CAF-1 は DNA 複製に伴って PCNA と同調してクロマチンに結合するのに対して、Asf1 と HIRA は間期を通じてクロマチンに結合し続けて

いることが示され、CAF-1 と HIRA の両ヒストンシャペロン複合体のクロマチンとの結合状態が異なることが明らかとなった。これらのクロマチン局在の違いから、各々のヒストンシャペロン複合体が複製されたゲノム DNA のヌクレオソーム形成において異なる役割を果たすことが示唆された。

3-2. 複製されたゲノム DNA へのヌクレオソーム形成における各々のヒストンシャペロンの役割

3-2-1. Asf1、CAF-1 および HIRA のヌクレオソーム形成における役割

Asf1、CAF-1 および HIRA の各々を分裂期卵抽出液から免疫除去し、ゲノム DNA が複製される際のヌクレオソーム形成における各々の役割を検討した。対照実験には非特異的なウサギ抗体結合ビーズを用い (Δ Mock)、CAF-1 複合体の免疫除去には抗 p150 抗体結合ビーズを用いて行った (Δ p150)。免疫除去操作後には、いずれのタンパク質も各々 90%以上が卵抽出液から除去された (図 3-5 A、 Δ Asf1、 Δ HIRA および Δ p150)。また、抗 HIRA と抗 p150 抗体ビーズで同時に処理することにより、HIRA と CAF-1 が共に除去されることを確認した (図 3-5 A、 Δ HIRA Δ p150)。 Δ Asf1 では、Asf1 とともに HIRA のほとんどが除かれており (図 3-5 A、 Δ Asf1)、分裂期卵抽出液において HIRA のほとんどが Asf1 と恒常的に複合体を形成しているためと考えられた (図 3-3)。これに対して、 Δ HIRA では、ほとんどの Asf1 が除かれずに卵抽出液に残ったことから (図 3-5 A、 Δ HIRA)、Asf1 の大部分は HIRA と結合せずに単独で存在することが示された (図 3-3)。また、 Δ HIRA と同様に、 Δ p150 もしくは Δ HIRA Δ p150 では、Asf1 のほとんどが卵抽出液から除かれなかったことが分かった (図 3-5 A、 Δ p150 と Δ HIRA Δ p150)。この結果は、分裂期卵抽出液における CAF-1 が Asf1 と複合体を形成しないためと考えられる (図 3-3)。

各々のヒストンシャペロンを免疫除去した分裂期卵抽出液に [α - 32 P]dCTP と精子クロマチンを加え、CaCl₂を添加して卵抽出液を賦活し、ゲノム DNA の複製を進行させた。賦活後の各時間に卵抽出液を採取して、ゲノム DNA をアガロースゲルで電気泳動したのち、オートラジオグラフィによってゲノム DNA に取り込まれた [α - 32 P]dCTP の量を測

定して DNA 複製の進行を調べた。対照卵抽出液における賦活後 210 分 (Δ Mock, 210 min) のゲノム DNA への $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 取り込み量を 100%として、各々の相対値を比較した (DNA 複製率、図 3-5 B)。アフィジコリン (30 μM) を添加した卵抽出液 (Δ Mock+Aph) では、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ の取り込みがほとんど見られなかったことから (図 3-5 B、 Δ Mock+Aph)、ゲノム DNA への $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ の取り込みは DNA の複製に依存する反応であることが示された。卵抽出液における DNA 複製の進行や量については、いずれのヒストンシャペロンを除いても対照とほとんど差がなかったことから、これらのヒストンシャペロンタンパク質はゲノム DNA の複製には関与しないことが示された (図 3-5 B、 Δ Asf1、 Δ HIRA、 Δ p150 と Δ HIRA Δ p150)。

次に免疫除去後の卵抽出液を用いて、ゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成において、ヒストンシャペロンの各々が果たす役割について検討した。各々のヒストンシャペロンを免疫除去した分裂期卵抽出液に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ と精子クロマチン加え、賦活して DNA 複製を進行させた。図 3-5 B の実験によりゲノム DNA の複製が終了していると考えられる賦活後 120 分に、卵抽出液からクロマチンを回収し MNase (50, 100 と 200 U/ml) で処理して得られたゲノム DNA 断片を 6%アクリルアミドゲルで電気泳動したのち、オートラジオグラフィーを行って DNA 断片の解析を行った (図 3-6 A)。対照実験 (Δ Mock) では、ヌクレオソームの単量体、二量体および三量体 (約 150bp、330bp および 500bp) に対応する規則的な DNA ラダーが観察され、複製されたゲノム DNA 上に規則的にヌクレオソームが形成されたと考えられた (図 3-6 A、レーン 1-3 と 13-15)。一方、 Δ Asf1 では、規則的なラダーパターンが見られなくなり、ゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成が著しく阻害されていることが示された (図 3-6 A、レーン 4-6 と 16-18)。これに対し、 Δ p150 においては、先行研究 (新富, 2005) で示されたように、ヌクレオソーム単量体および二量体に対応する DNA ラダーが見られたが、三量体に相当するバンドが検出されなかった (図 3-6 A、レーン 10-12)。また、 Δ HIRA においても、 Δ p150 と類似するラダーパターンが観察され (図 3-6 A、レーン 7-9)。この結果は、CAF-1 と HIRA のいずれか一つを卵抽出液から除いても、複製に伴うゲノム DNA のヌクレオソーム形成の大部分が行われることが示された。一方、 Δ HIRA Δ p150 では、卵抽出液に Asf1 が十分に存在するにもかかわらず (図 3-5 A、 Δ HIRA Δ p150)、複製されたゲノム DNA へのヌクレオソーム形成が行われなかった (図 3-6 A、レーン 19-21)。このことから、複製されたゲノム DNA のヌクレオソーム形成には、HIRA

複合体または CAF-1 複合体による形成機構がそれぞれ独立して関与していること、また、二つのヌクレオソーム形成機構がはたらく DNA の部位にはほとんど特異性がないことが示唆された。また、Asf1 は、HIRA と CAF-1 各々の形成機構に必須だが、単独ではヌクレオソームの形成を媒介できないことが示された。

3-2-2. HIRA 複合体と CAF-1 複合体のヌクレオソーム形成における役割の違い

ゲノム DNA の複製に伴うヌクレオソーム形成において、HIRA 複合体および CAF-1 複合体が果たす役割の違いについて解析するため、各々のヒストンシャペロンを免疫除去した卵抽出液に精子クロマチン加え、賦活して DNA 複製を進行させた。DNA 複製活性の最も高い賦活後 60 分 (図 3-4 と 3-5 B) に、卵抽出液に [α - 32 P]dCTP を添加して 15 分間ゲノム DNA をパルスラベルした後、過剰量の dCTP (1 mM) を加えて [α - 32 P]dCTP の取り込みを停止させたのち、135 分間チェイスインキュベーションした。パルスラベル直後 (75 min) とチェイスインキュベーション後 (210 min) に卵抽出液から回収したクロマチンを、上記の実験 (図 3-6 A) と同様に MNase (50, 100 と 200 U/ml) で処理した後、回収したゲノム DNA 断片のラダーパターンを解析した。対照実験 (Δ Mock) では、75 min にはヌクレオソームの単量体と二量体に相当する二本の明瞭なバンドが検出された (図 3-6 B、レーン 1-3、monomer と dimer)。チェイスインキュベーションを行った後 (210 min) には、それらに加えてヌクレオソーム三量体に対応する DNA 断片のバンドも検出された (図 3-6 B、レーン 4-6、trimer)。これらの結果は、ゲノム DNA 複製中にヌクレオソームが迅速に形成される、すなわち、DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成機構があること、また、チェイスインキュベーションの間にゲノム DNA 複製に共役しないヌクレオソームの形成が媒介されることを示唆した。つまり、複製されたゲノム DNA へのヌクレオソーム形成は、DNA 複製に共役するものと共役しないものの二段階に分かれてなされることが示唆された。 Δ Asf1 では、75 min と 210 min のサンプルのいずれにも明瞭な DNA ラダーが検出されず、複製されたゲノム DNA へのヌクレオソーム形成が著しく阻害されたことから (図 3-6 B、レーン 7-12)、Asf1 は DNA 複製に共役するまたは DNA 複製された後のいずれのヌクレオソーム形成機構においても必要であることが明らかとなった。 Δ HIRA では、75min のサンプルには対照実

験とほぼ同様のラダーパターンが見られたが(図3-6B、レーン13-15と1-3比較)、210 min のサンプルにはヌクレオソーム三量体に相当するバンドが検出されなかった(図3-6B、レーン16-18)。このことは、HIRA の除去により DNA 複製後のヌクレオソーム形成が充分に行われなくなり、複製されたゲノム DNA へのヌクレオソーム形成が不完全であることを示唆する。一方、 $\Delta p150$ では、75 min においては $\Delta Asf1$ と同様に DNA ラダーが不明瞭であったが(図3-6B、レーン19-21と7-8比較)、チェイスインキュベーション後の 210 min にはヌクレオソーム単量体および二量体に対応するバンドが検出された(図3-6B、レーン22-24)。すなわち、CAF-1 の除去によって DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成は阻害されたが、DNA 複製の後にヌクレオソーム形成が部分的に補完された。以上の結果から、卵抽出液におけるゲノム DNA が複製される際に、CAF-1-Asf1 複合体は DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成を促進し、他方、HIRA-Asf1 複合体は複製された DNA 鎖へのヌクレオソーム形成に寄与することが明らかとなった。

3-2-3. ヌクレオソーム形成における HIRA 複合体と CAF-1 複合体の寄与

上記の実験から、HIRA-Asf1 複合体と CAF-1-Asf1 複合体は卵抽出液におけるゲノム DNA 複製の際に、各々異なる段階でヌクレオソーム形成に寄与することが示された。これら二つのヌクレオソーム形成機構がゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成に各々どの程度寄与するのかを明らかにするため、複製されたゲノム DNA に形成されるヌクレオソームの量を定量した。各々のヒストンシャペロンを免疫除去した分裂期の卵抽出液に精子クロマチン加え、賦活してゲノム DNA の複製を進行させた。上記の実験(図3-6B)と同様に、賦活後 60 分の卵抽出液に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を添加して 15 分間ゲノム DNA をパスララベルし、パスララベル前と後(60 min と 75 min) のゲノム DNA への $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ の取り込みを測定して、ゲノム DNA 複製量とした(図3-7A)。ヒストンシャペロンの各々がゲノム DNA の複製に関与しないため(図3-5B)、いずれのタンパク質が除かれても DNA 複製量は対照実験(ΔMock)と差がなかった(図3-7B)。次に、パスララベル直後(75 min)とチェイスインキュベーション後(210 min)のクロマチンを回収して、MNase(1000 U/ml)で十分に処理した後にゲノム DNA 断片を回収し

て 6%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、ヌクレオソーム単量体由来する DNA 断片 (monomer) に取り込まれた [α - 32 P]dCTP を測定し、これをヌクレオソームが形成された新規合成 DNA の量とした (図 3-7 C)。これに基づき、[複製されたゲノム DNA の量]に対する[ヌクレオソームが形成された新規合成 DNA の量]の割合を算出し、対照実験 (Δ Mock) のチェイスインキュベーション後 (210 min) の値を 100%としてグラフにした (ヌクレオソーム形成率、図 3-7 D)。対照実験では、パスララベル直後 (75 min) のヌクレオソーム形成率は 74%であった (図 3-7 D、 Δ Mock)。これにより、大部分のヌクレオソームは DNA 複製直後に迅速に形成されており、また、DNA 複製が完了した後もヌクレオソームが形成されることが示された。従って、複製されたゲノム DNA へのヌクレオソーム形成は二つの段階により充分に行われると考えられる。Asf1 の免疫除去により、75 min のヌクレオソーム形成率は 33%と低く、210 min においても増加が見られなかった (図 3-7 D、 Δ Asf1)。この結果から、ゲノム DNA が複製される際に、Asf1 はいずれの段階のヌクレオソーム形成に必要であることが示された。それに対して、CAF-1 (p150 サブユニット) を免疫除去した卵抽出液では、ヌクレオソーム形成率は 75 min に 44%と対照実験に較べて有意に低かったが、210 min には 75%まで増加した (図 3-7 D、 Δ p150)。このことは、CAF-1 の除去により DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成は阻害されたが、複製後の DNA 上でヌクレオソームが充分に形成されることを確認した(新富, 2005)。一方、 Δ HIRA では、75 min では対照実験 74%よりやや低い値となったが有意な差はなかった (62%, $p=0.09$, $n=3$; 図 3-7 D、 Δ HIRA, 75 min)。このことから、DNA 複製に共役して行われるヌクレオソーム形成への HIRA の寄与は少ないと考えられた。また、210 min における Δ HIRA のヌクレオソーム形成率は対照実験の 78%に留まった (図 3-7 D、 Δ HIRA, 210 min)。これらの結果から、HIRA を除去した卵抽出液では、DNA 複製後のヌクレオソーム形成が阻害され、複製されたゲノム DNA へのヌクレオソーム形成が不完全であることが明らかとなった。さらに、HIRA と CAF-1 両複合体を同時に除いた卵抽出液では、Asf1 が充分に存在するにもかかわらず (図 3-5 A、 Δ HIRA Δ p150)、 Δ Asf1 とほぼ同等にヌクレオソーム形成率が著しく阻害された (ヌクレオソーム形成率は、75 min では 37%、210min では 41%となる ; 図 3-7 D、 Δ HIRA Δ p150)。この結果は、Asf1 は、単独ではヌクレオソームの形成を促進できないことを支持している。以上の結果から、ゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成の大部分は CAF-1-Asf1 複合体による DNA 複製に共役する機構により行われたが、

HIRA-Asf1 複合体による DNA 複製に共役しない形成機構によりすべてのヌクレオソーム形成が補完されることが明らかとなった。また、ゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成に大きく寄与する DNA 複製に形成機構が阻害されても、ヌクレオソーム形成の大部分は DNA 複製の後になされうることから、HIRA-Asf1 複合体によるヌクレオソーム形成は、複製されたゲノム DNA のヌクレオソーム形成に補完的に寄与すると考えられる。

しかし、 $\Delta p150$ では、ヌクレオソーム形成率はチェイスインキュベーションをすることにより上昇したものの、対照実験の 78%に留まった (図 3-7 D、 $\Delta p150$, 210 min)。この原因として、CAF-1 に依存するヌクレオソーム形成が損なわれたことによる可能性、またはヒストン H3-H4 シャペロンの総量が減少したことによる可能性が考えられた。そこで、CAF-1 を除いた卵抽出液 ($\Delta p150$) の HIRA の量を増加させ、ヌクレオソームの形成率に及ぼす影響を検討した。HIRA-Flag の mRNA を卵抽出液に添加して翻訳させ、卵抽出液中 HIRA の量をほぼ二倍に増加させたのち、CAF-1 を免疫除去した (図 3-8 A)。この卵抽出液を用いて、複製されたゲノム DNA の量 (図 3-8 B) に対するヌクレオソームが形成された新規合成 DNA 量 (図 3-8 C) の割合を算出し、対照実験 ($\Delta Mock$) のチェイスインキュベーション後 (210 min) の値を 100%としてグラフにした (ヌクレオソーム形成率、図 3-8 D)。上記の実験 (図 3-7 D) と同様に、 $\Delta p150$ では、パルスラベル直後 (75 min, 51%)、チェイスインキュベーション後 (210 min, 82%) のいずれにおいてもヌクレオソーム形成率は対照実験に較べて有意に低かった (図 3-8 D、 $\Delta p150$)。一方、 $\Delta p150$ において HIRA を増加させた場合のヌクレオソーム形成率は、75 min では低かったが (75 min, 62%)、210 min では対照実験と同等レベルとなった (図 3-8 D、 $\Delta p150$ +HIRA-Flag)。従って、ゲノム DNA 複製において、CAF-1-Asf1 複合体がなくても、HIRA-Asf1 複合体が充分にあればヌクレオソーム形成に大きな支障をきたさないことが示された。以上の結果から、HIRA-Asf1 複合体は DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成を促進し、複製されたゲノム DNA のヌクレオソーム形成を補償すること、しかも、HIRA-Asf1 複合体は、十分量存在すれば、単独でもすべてのヌクレオソーム形成を媒介することが可能であることが示唆された。このことにより、ツメガエル胚細胞に存在する HIRA-Asf1 複合体は初期胚発生の過程で複製されたゲノム DNA へのヌクレオソーム形成の促進に重要な役割を果たすことが強く示唆された。

3-3. HIRA によるヌクレオソーム形成の分子機序

3-3-1. DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成における HIRA の重要性

ツメガエル卵抽出液において、HIRA-Asf1 複合体が DNA 複製反応に共役しないヌクレオソーム形成を促進することが示された。このヌクレオソーム形成における HIRA の役割の重要性をさらに検討するため、環状プラスミド DNA を用いたスーパーコイルアッセイを行った。スーパーコイル型の環状プラスミド DNA を卵抽出液に加えると、トポイソメラーゼ II により速やかにスーパーコイルが解消され、リラックス型の環状プラスミドとなる。これにヒストンが結合してヌクレオソームが形成されると、環状プラスミド DNA にねじりが導入され、ねじりの数（ヌクレオソームの数）によって電気泳動上の移動度が増加することを利用し、ヌクレオソーム形成活性を評価した。本実験では、DNA 複製が起こらない間期の卵抽出液可溶性画分 (I-HSS) を用いた。各々のヒストンシャペロンを免疫除去した I-HSS にスーパーコイル型環状プラスミド DNA (pBluescript II SK+) を加えてインキュベートしたのち、卵抽出液から回収したプラスミド DNA をアガロースゲルで電気泳動した (図 3-9 A)。対照実験 (Δ Mock) では、スーパーコイル型 (form I) の環状プラスミド DNA (input、図 3-9 A、レーン 1) が卵抽出液に添加した直後 (5 min) にリラックス型となって移動度が減少し (form Ir)、120 min では再びスーパーコイル型となり (図 3-9 A、レーン 2-4)、ヌクレオソーム形成が起こっていることが示された。 Δ p150 では、対照実験と同様にスーパーコイル型が速やかに形成され (図 3-9 A、レーン 11-13)、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成には CAF-1 が関与しないことが示された。一方、 Δ HIRA では、210 min になってもほぼリラックス型のままであり、ヌクレオソーム形成がほとんど起こらなかったことが分かった (図 3-9 A、レーン 8-10)。これらの結果から、プラスミド DNA への DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成には HIRA が必要であること、CAF-1 が存在しなくても HIRA によりヌクレオソームが十分に形成されることが明らかとなった。さらに、 Δ Asf1 では、環状プラスミド DNA はほぼリラックス型のままであり、すなわち、ヌクレオソーム形成はほとんど起こらなかった (図 3-9 A、レーン 5-7)。しかし、卵抽出液において、全ての HIRA は Asf1 と複合体を形成しており、Asf1 を免疫除去すると HIRA も卵抽出液から除かれる (図 3-3 A と 3-5 A、 Δ Asf1)。一方、ツメガエル卵における

HIRA の濃度は Asf1 の約 1/50 であり、HIRA を免疫除去してもほとんどの Asf1 が卵抽出液に残される (図 3-3 A と 3-5 A、 Δ HIRA)。従って、 Δ HIRA では Asf1 が充分に存在するにも関わらずヌクレオソームを形成できないことから、ツメガエル卵抽出液において、HIRA と Asf1 が形成された複合体は DNA へのヒストン結合を促進するが、HIRA と結合していない Asf1 はしないことが示された。以上の結果から、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成には Asf1 は必要であるが不十分であり、Asf1 と結合した HIRA 複合体が本質的に重要であること示された。

次に、異なる細胞周期における HIRA-Asf1 複合体のヌクレオソーム形成活性の有無を検討するために、間期または分裂期の卵抽出液可溶性画分を用いてスーパーコイルングアッセイを行った。図 3-9 A と同様に、間期卵抽出液における対照実験 (間期、 Δ Mock) では、スーパーコイル型の環状プラスミド DNA (input、図 3-9 B、レーン 1) が卵抽出液に添加した直後 (5 min) にリラックス型となり、60 min では再びスーパーコイル型となった (図 3-9 B、レーン 2-4)。分裂期の対照実験でも (分裂期、 Δ Mock)、同様なプラスミド DNA の変化が見られたが (図 3-9 B、レーン 8-10)、スーパーコイル型の形成は間期に対して遅れ、240 min でもスーパーコイル型ではないものも検出された (図 3-9 B、レーン 10)。これらの結果から、分裂期の卵抽出液でもヌクレオソームが形成されること、しかし、その形成率は間期の卵抽出液に較べて低いことが明らかとなった。一方、Asf1 の免疫除去処理により、HIRA-Asf1 複合体が除かれた間期または分裂期の卵抽出液では、240 min になっても、プラスミド DNA がリラックス型のままであった (図 3-9 B、レーン 5-7 と 11-13)。従って、各々の卵抽出液で行われたスーパーコイル形成は HIRA-Asf1 複合体によるものであることが確認された。すなわち、卵抽出液において、HIRA-Asf1 複合体の DNA 複製に共役しないヌクレオソームの形成活性は細胞周期を通じて維持されることと、分裂期に較べて、間期における HIRA-Asf1 複合体の活性が高いことが示唆された。

3-3-2. HIRA-Asf1 複合体はヌクレオソーム形成に必要なかつ十分である

上記の実験により DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成に HIRA-Asf1 複合体が必要であることが示されたが、 Δ HIRA では HIRA 以外の何らかの分子が共に除かれたこ

とにより、ヌクレオソーム形成が起こらない可能性が考えられた。そこで、ヌクレオソーム形成における HIRA-Asf1 複合体の十分性について検討するため、 Δ HIRA に精製した外来性 HIRA タンパク質を加えてスーパーコイル形成が促進されるか検討することにした。大腸菌や昆虫細胞 (Sf9 細胞) の発現系を用いて HIRA タンパク質の発現・精製を試みたが、HIRA はそれらの細胞内でも精製後にも不溶性の凝集を形成しやすく、充分量の可溶性タンパク質を回収できなかった (データ未掲載)。他方、卵内在性の HIRA のすべては Asf1 と結合しており、機能的な HIRA は Asf1 との複合体の形でなら調製可能だと期待され、HIRA-Asf1 複合体を大腸菌で発現・精製することにした。GST-HIRA と His-Asf1 を大腸菌に共発現させたところ、大腸菌破碎後の可溶性画分に両タンパク質が得られたことから、複合体 (rec-HIRA-Asf1) を Glutathione Sepharose 4B ビーズで回収したのち段階的にビーズから溶出し (図 3-10 B, FL)、濃縮して以下の実験に用いた。

Δ HIRA または Δ Asf1 に rec-HIRA-Asf1 を加えて 30 分間インキュベートした (図 3-9 C)。これらの卵抽出液に、環状プラスミド DNA を加えてスーパーコイルアッセイを行った。対照実験 (Δ Mock) では 120 min にプラスミド DNA はスーパーコイル型となったのに対し (図 3-9 D、レーン 2-4), Δ HIRA と Δ Asf1 では 240 min になってもリラックス型のままであり、ヌクレオソーム形成がほとんど起こらなかった (図 3-9 D、レーン 5-7 と 11-13)。一方、rec-HIRA-Asf1 を添加した Δ HIRA と Δ Asf1 ではプラスミド DNA が 120 min にスーパーコイル型となり、ヌクレオソームが対照実験と同様に形成された (図 3-9 D、レーン 8-10 と 14-16)。これらの結果から、HIRA-Asf1 複合体はヌクレオソーム形成に必要なかつ十分であることが示された。次に、 Δ HIRA に加える rec-HIRA-Asf1 の濃度を段階的に変えて同様の実験を行ったところ (図 3-9 E)、プラスミド DNA のスーパーコイル形成の速度は rec-HIRA-Asf1 の濃度に依存することが示された (図 3-9 F)。従って、ツメガエル卵における DNA 複製に共役しないヌクレオソームの形成は HIRA-Asf1 複合体の濃度に依存することが明らかとなった。卵抽出液における HIRA の全ては Asf1 と恒常的に結合して存在するが、他方、HIRA と結合していない Asf1 は過剰に存在する。このことから、ツメガエル卵または初期胚細胞における HIRA タンパク質の発現レベルの上昇はヌクレオソーム形成の促進をもたらすものと推測される。

3-3-3. DNA へのヒストン結合に関与する HIRA の機能ドメインの解析

DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成の媒介に中心的な役割を果たす HIRA 複合体について、これまでの研究から、ヒストンと直接に結合できる Asf1 以外にも、UBN1、p48 や CABIN1 などの因子が HIRA と相互作用し、ヒストンシャペロン複合体に含まれることが報告されたにもかかわらず (Ahmad et al., 2003; Banumathy et al., 2009; Rai et al., 2011)、ヌクレオソーム形成における機能的な役割は明らかにされていない。そこで、ヌクレオソーム形成における HIRA 複合体の分子機序を解明するために、スーパーコイルアッセイにより、DNA-ヒストン結合の媒介に必要な HIRA の機能ドメインの解析を行った。HIRA タンパク質は真核生物の間で高度に保存され、出芽酵母では、WD40 リピートと B ドメインを含む HIRA の N 末領域に近似する Hir1 と、Hir ドメインを含む C 末領域に近似する Hir2 の二つの分子に分かれている (図 3-10A)。HIRA の B ドメインは Asf1 との結合に必須であることから (Tang et al., 2006)、B ドメインを各々含む HIRA の両末端領域 (Nt と Ct) の変異体を作製した (図 3-11)。GST-FL-HIRA (全長)、GST-Nt-HIRA または GST-Ct-HIRA と His-Asf1 を大腸菌で共発現させ、各々から rec-HIRA-Asf1 複合体を精製した (図 3-10B)。次に、HIRA を免疫除去した卵抽出液 (Δ HIRA) に各々の rec-HIRA-Asf1 を加えたプレインキュベートした後、環状プラスミド DNA を加えて 240 分間インキュベーションしてスーパーコイル形成について調べた (図 3-10C)。対照実験 (Buffer、組み換えタンパク質溶出バッファーを加えた Δ HIRA) では、240 min においてほとんどのプラスミド DNA がリラックス型であったが (図 3-10C、レーン 2-4)、rec-FL-HIRA-Asf1 を添加した場合は、時間経過に伴いスーパーコイル型が生じ、ヌクレオソーム形成が回復した (図 3-10C、レーン 5-7)。また、WD40 リピートを含む rec-Nt-HIRA-Asf1 を添加した場合には、FL と同様にスーパーコイルが形成され (図 3-10C、レーン 11-13)、HIRA の N 末端領域のみによって、DNA へのヒストンの結合を媒介できることが明らかとなった。それに対して、rec-Ct-HIRA-Asf1 を加えた卵抽出液では、スーパーコイルの形成が見られず (図 3-10C、レーン 8-10)、HIRA の N 末にある WD40 リピートはヌクレオソーム形成に必須であることが示された。

これらの結果により、HIRA-Asf1 複合体によるヌクレオソーム形成には、HIRA の B

ドメインに加えて、WD40 リピートが必要であることが示された (図 3-1 1)。HIRA の B ドメインは Asf1 の結合を介してヒストンシャペロン複合体へのヒストンタンパク質の供給に関与すると考えられることから、HIRA の N 末端のほとんどを占める WD40 リピートは DNA へのヒストン結合の調節に関与すると考えられる。

3-3-4. DNA へのヒストン結合に寄与する HIRA の WD40 リピートの解析

これまでに報告されたほとんどの WD40 リピートタンパク質の WD リピートユニットの数は 7 個であり、各々のユニットが集合して形成する環状のプロペラ構造はタンパク質複合体形成の足場として機能すると考えられている (Xu and Min, 2011)。また、特定の WD40 リピートユニットが特異的な相互作用部位になって、特定のタンパク質と結合することが示されている。そこで次に、HIRA の WD40 リピートを構成する 7 個のユニットについて (図 3-1 0 A)、HIRA-Asf1 複合体によるヌクレオソーム形成にどのユニットが必要とされるのかについて検討した。まず、N 末側 3 つ (WD1-3) または C 末側 3 つの WD リピートユニット (WD5-7) の欠損変異体 (Δ WD1-3 と Δ WD5-7、図 3-1 1) と Asf1 の複合体を大腸菌で発現・精製し、それらを Δ HIRA に添加してスーパーコイルアッセイを行った。その結果、 Δ WD5-7 では、全長 FL-HIRA と同様にスーパーコイルが形成された (図 3-1 0 D、レーン 4-5 と 8-9)。それに対して、 Δ WD1-3 では、240 分後においてもプラスミド DNA のスーパーコイル形成は起こらなかった (図 3-1 0 D、レーン 6-7)。これらの結果から、ヌクレオソーム形成に WD1-3 の 3 つのリピートユニットが重要な役割を果たしていることが判明した。こちら 3 つのリピートユニットの重要性をさらに検討するために、ユニット 1、2 または 3 を単独または二重欠損させた変異体を用いて (図 3-1 1)、スーパーコイルアッセイを行った。各ユニット単独の欠損ではスーパーコイルが形成され、ヌクレオソーム形成に支障はなかったことから (Δ WD2、図 3-1 0 E、レーン 8-1 0; Δ WD1 と Δ WD3、3-1 0 F、レーン 3-6)、DNA へのヒストンの結合において、WD1-3 のうち複数のリピートユニットが重複した機能を持つことが示唆された。また、ユニット 1 と 3 の二重欠損変異体 (Δ WD1 Δ WD3) を添加した卵抽出液では、スーパーコイルの形成が見られず、ヌクレオソーム形成が回復できないことが示された (図 3-1 0 G、レーン 1 1-1 3)。それに対して、ユニット

1と2 (Δ WD1-2) もしくは2と3 (Δ WD2-3) の二重欠損変異体を添加したものでは、スーパーコイル形成は FL-HIRA と較べて遅れたが最終的には形成された (図3-10G、レーン5-7と8-10、レーン2-4と比較する)。これらの結果から、HIRA の WD40 リピートのうち N 末の3つのユニットがプラスミド DNA へのヒストン結合に大きく寄与することと、ユニット1と3の二つのユニットは最も中心的な役割、ユニット2は補助的な役割を果たすことが示唆された。

以上の結果により、HIRA-Asf1 複合体による DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成には、HIRA の B ドメインと特定の WD40 リピートユニットらが必要とされることが示され (図3-11)、これらのドメインはヌクレオソーム形成を媒介するヒストンシヤペロン複合体の機能的中心部であることが示唆された。

3-3-5. CAF-1 の p60 サブユニットによる DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成の媒介

WD40 リピートと B ドメインから構成された部分領域は HIRA タンパク質または Hir 複合体に高度に保存されているだけでなく、同様な構造は CAF-1 の p60 でも保存されている。そこで、p60 が HIRA の N 末と同様に DNA 複製に共役しないヌクレオソームの形成を媒介できるかについて調べることにした。

HIRA-Asf1 複合体 (図3-10B) と同様に、GST-p60 と His-Asf1 を大腸菌に共発現させたところ、大腸菌破碎後の可溶性画分に両タンパク質が得られたことから、rec-p60-Asf1 複合体を Glutathione Sepharose 4B ビーズで回収したのち段階的にビーズから溶出し、濃縮して以下の実験に用いた。対照として、rec-Nt-HIRA-Asf1 を調製して用いた。 Δ Asf1 に rec-Nt-HIRA-Asf1 または rec-p60-Asf1 を加えて30分間インキュベートした。これらの卵抽出液に、環状プラスミド DNA を加えてスーパーコイルアッセイを行った。rec-Nt-HIRA-Asf1 と同様に、rec-p60-Asf1 を添加した卵抽出液でもプラスミド DNA のスーパーコイル形成が見られた (図3-12B、レーン6-9)。しかし、rec-Nt-HIRA-Asf1 では、420 min にプラスミド DNA のほとんどがスーパーコイル型となったのに対し (図3-12B、レーン2-5)、rec-p60-Asf1 では、480 min になってもスーパーコイルの形成が不完全であることが明らかとなった (図3-12B、レーン6-

9)。また、抗 GST 抗体と抗 His 抗体を用いた定量ウエスタンブロッティングによって、卵抽出液に添加した GST-60 の量は GST-Nt-HIRA の量の約 18 倍で(図 3-1 2 C、上)、rec-p60-Asf1 複合体に含まれた His-Asf1 の量は rec-Nt-HIRA-Asf1 複合体の約 2.2 倍であることが示された(図 3-1 2 C、下)。少なくとも rec-Nt-HIRA-Asf1 の 2 倍以上の量の rec-p60-Asf1 複合体を加えたにもかかわらず、そのスーパーコイルの形成が遅れた。従って、p60 は DNA 複製に依存しないヌクレオソーム形成を媒介できるが、その活性は HIRA と較べて極めて低いことが示唆された。

3-3-6. HIRA の B ドメインと CAF-1p60 の B-like ドメインの Asf1 結合性の比較

DNA 複製に依存しないヌクレオソーム形成を媒介する HIRA は卵抽出液において恒常的に Asf1 と複合体を形成している一方、CAF-1 (p60) と Asf1 の結合は細胞周期に依存し、そして、その結合量は少ないことが示されている(図 3-3 B)。その原因を探るために、HIRA の B ドメインと p60 の B-like ドメインの Asf1 結合性を比較することにした。B ドメインを含む HIRA の部分領域 (GST-HIRA_B、357-479 aa) と B-like ドメインを含む p60 の C 末端領域 (GST-p60_B、380-569 aa) をそれぞれ GST タグと融合し(図 3-1 3 A)、大腸菌で発現させた。各々の組み換えタンパク質を Glutathione sepharose 4B に固定化し、分裂期または間期の卵抽出液と反応させ、ビーズに結合される Asf1 の有無を調べた。卵抽出液と反応する前の GST-HIRA_B ビーズに較べて、反応した後のビーズから Asf1 のシグナルが特異的に検出された(図 3-1 3 B、レーン 7-9)。また、分裂期および間期の卵抽出液において、ビーズに結合した Asf1 の量はほぼ同量であることから(図 3-1 3 B、レーン 8 と 9)、HIRA の B ドメインは細胞周期に通じて Asf1 と安定的に相互作用することが示された。一方、間期の卵抽出液と反応した GST-p60_B ビーズからは Asf1 のシグナルが検出されたが、分裂期の卵抽出液と反応したのものには検出されなかった(図 3-1 3 B、レーン 4-6)。さらに、GST-HIRA_B と結合した Asf1 に較べて、GST-p60_B に結合した量が少なく(図 3-1 3 B、レーン 6 と 9)、p60 の B-like ドメインは、B ドメインに較べて Asf1 に対するアフィニティーが低いことが示された。対照実験として用いた GST を固定化したビーズからは、Asf1 のシグナルを検出できなかった(図 3-1 3 B、レーン 1-3)。これらの結果から、ツメガエ

ル卵抽出液において、B ドメインを介した HIRA と Asf1 の相互作用は細胞周期に通じて安定であることと、p60 の B-like ドメインの Asf1 結合性は比較的強く、細胞周期に依存したものであることが明らかとなった。また、CAF-1 の p60 サブユニットが分裂期に特異的にリン酸化されることに一致して、分裂期の卵抽出液と反応した GST-p60_B タンパク質の電気泳動上の移動度が減少した (図 3-1 3 B、レーン 5)。従って、CAF-1 と Asf1 の相互作用は、細胞周期の進行に依存した p60 サブユニットのリン酸化・脱リン酸化状態によって調節されることが示唆された。

次に、p60 と Asf1 の結合に B-like ドメイン以外の領域の必要性を検討するために、p60_B (GST-p60_B) 部分領域と全長 p60 (GST-p60) を用いたプルダウン実験も行い、Asf1 との結合性を比較した。分裂期または間期の卵抽出液に、同量な GST-p60 または GST-p60_B 組み換えタンパク質を固定化した Glutathione sepharose 4B を加えて反応させ、ビーズに結合した Asf1 のシグナルを検出した。GST-p60_B と同様に、GST-p60 と Asf1 の結合は間期にしか見られないこと (図 3-1 3 C、レーン 1-2)、また、GST-p60 と Asf1 の結合量は GST-p60_B と同程度であることが示された (図 3-1 3 C、レーン 2 と 4)。従って、p60 と Asf1 の相互作用は B-like ドメインを介してなされることが示唆された。

以上の結果から、HIRA の B ドメインと p60 の B-like ドメインは、各々、Asf1 との結合に十分であることが明らかとなった。B ドメインと Asf1 の相互作用は安定だが、B-like ドメインの Asf1 結合性は、それに較べて強く、さらに、細胞周期に依存した B-like ドメイン周辺のアミノ酸残基のリン酸化・脱リン酸化修飾によって抑制されていることが示唆された。

3-3-7. DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成への p60 の B-like と WD40 ドメインの寄与

HIRA と比較して、p60 の DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成の活性が低いのは (図 3-1 2)、HIRA と p60 の機能ドメインの違いがその原因だと考えられる。そこで、p60 の各々のドメインの DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成への寄与を調べた。そのために、Nt-HIRA の B ドメインを B-like ドメインに置換した HC (HIRA WD40

+ CAF-1p60 B-like) 変異体と WD40 ドメインを p60 のものに置換した CH (CAF-1p60 WD40 + HIRA B) 変異体を作製した (図 3-1 4A)。各々の変異体を His-Asf1 と大腸菌で共発現し、複合体を調製した。対照として、HH (Nt-HIRA) と CC (p60) の複合体を調製した。各々の複合体に含まれている GST 融合タンパク質 (HH、CC、HC と CH) の濃度を一致するように複合体サンプルを希釈した。抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって、4つの GST 融合タンパク質の濃度を確認した (図 3-1 4B、上)。これらの複合体に含まれている His-Asf1 について、抗 His 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った (図 3-1 4B、下)。HH 複合体に含まれた His-Asf1 のバンド強度の検量線から各々の変異体複合体に含まれる His-Asf1 の相対濃度を求めた (図 3-1 4C)。HH に含まれた His-Asf1 の量を 1 とした場合、CC は 0.12 であることから、p60 の Asf1 アフィニティーが低いことが確認された。B ドメインを持つ CH の Asf1 アフィニティーは 0.75 であり、HH と較べてほとんど変化がないことが示された。一方、B-like ドメインを持つ HC は 0.19 しかなく、CC と同レベルであった。これらの結果から、変異体の Asf1 アフィニティーは、各々の Asf1 結合領域の由来によって決まることが示唆された。

次に、これらの変異体のヌクレオソーム形成活性について評価することにした。卵抽出液におけるスーパーコイルの形成速度はヒストンシャペロン複合体の濃度に依存することが示されている (図 3-9 E と F)。それを利用して、同量のプラスミド DNA にスーパーコイルを形成させるために必要な複合体の量を比較した。HC と CH 変異体の Asf1 アフィニティーは HH より低いため、添加したものに含まれる His-Asf1 の量を複合体の量とした。0.70 μM の HC 複合体を添加した Δ Asf1 卵抽出液では 360 min 後にプラスミド DNA のほとんどがスーパーコイル状になった (図 3-1 4D、レーン 1 3-1 4)。それに対して、360 min 後に同量の DNA にスーパーコイルを形成させるために 0.27 μM の HH 複合体で十分であることが示された (図 3-1 4D、レーン 2 と 4)。従って、同じ時間で同量なヌクレオソーム形成を媒介するために、HH 複合体の約 2.6 (0.70 μM / 0.27 μM) 倍の HC 複合体が必要であることが明らかとなった。つまり、HH 複合体のヌクレオソーム形成活性を 1 とした場合、HC 複合体の活性は 0.38 (1/2.6) であることが示された (図 3-1 4E)。HIRA の B ドメインを p60 の B-like ドメインを置換すると、Asf1 アフィニティーと共に HIRA のヌクレオソーム形成活性が低下することが示された。一方、2.37 μM の CH 複合体を添加した卵抽出液では、480 min 後にプラスミド DNA

がスーパーコイル状になった (図 3-1 4 D、レーン 1 5-1 7)。同様のスーパーコイル形成をもたらすためには、0.027 μ M の HH 複合体で十分なことが分かった (図 3-1 4 D、レーン 6、8 と 1 0)。従って、CH 複合体のヌクレオソーム形成活性は HH の 1/100 (0.01) 程度であることが判明した (図 3-1 4 E)。WD40 ドメインを置換した CH 変異体には十分な量の Asf1 が結合しているにもかかわらず、ヌクレオソーム形成活性が著しく減少することが示された。

以上の結果から、p60 の DNA 複製に共役しないヌクレオソームの形成活性が減少する原因として、HIRA と p60 の WD40 ドメインの違いが決定的であることと、また、WD40 ドメインが同じであれば、ヌクレオソーム形成活性は Asf1 に対するアフィニティーに量的に依存することが示唆された。

3-4. HIRA の核内局在の分子機序

3-4-1. HIRA は核内に局在しクロマチンと結合する

これまでの研究から、細胞内において、いくつかのヒストンシャペロンのヌクレオソーム形成活性がシャペロンのクロマチン局在によって制御されることが示されている (Krawitz et al., 2002; Liu et al., 2010; Muto et al., 2007; Zhang et al., 2016)。実際に、ツメガエル卵抽出液におけるゲノム DNA 複製の際に、HIRA-Asf1 複合体は核内のクロマチンと相互作用する (図 3-4)。従って、HIRA 複合体の細胞内局在やクロマチン結合は、ヌクレオソーム形成において極めて重要な調節だと考えられる。そこで、核内における HIRA タンパク質の挙動を調べるために、卵抽出液で形成された核を用いて、様々な核画分を調製した。分裂期の卵抽出液に精子クロマチンを加えて、CaCl₂によって賦活し、90 分間インキュベートした後、遠心により形成された核を回収し、全核画分を得た (図 3-1 5、レーン 3)。対照実験では、精子クロマチンを加えない卵抽出液についても同様の操作を行い、核画分への細胞質混入の有無を評価する対照サンプルも作製した (図 3-1 5、レーン 2)。次に、得られた核に対して、界面活性剤 (0.25% TX-100/EB) を用いて、核膜を透過処理し、可溶性核画分を洗い流して、不溶性核画分を得た (図 3-1 5、レーン 4)。さらに、不溶性核画分を MNase (1000 U/ml) で処理して DNA を消

化し、クロマチンを除いた不溶性核画分を得た (図 3-1 5、レーン 5)。各々の核画分のサンプルについて、ウエスタンブロッティングを行った。核質に含まれる Nucleoplasmin、クロマチンに結合するヒストン H3 と核ラミナを構成する Lamin LIII を各々の画分のマーカーとして用いた。Nucleoplasmin のシグナルは全核画分にしか検出されなかったが (図 3-1 5、レーン 3)、ヒストン H3 はクロマチンを含む不溶性核画分からも検出された (図 3-1 5、レーン 3 と 4)。それに対して、Lamin LIII のシグナルはすべての核画分サンプルから検出され、しかも、クロマチンを含むと含まない不溶性核画分における Lamin LIII のシグナルは同程度であった (図 3-1 5、レーン 3-5)。

これらの画分と卵抽出液サンプルについて、抗 HIRA 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。コントロールと較べて、全核画分から強い HIRA シグナルが検出され、HIRA タンパク質が核内に蓄積されていることが示された (図 3-1 5、レーン 3)。さらに、可溶性核画分を洗い流した後の不溶性核画分からも HIRA のシグナルが検出されたが、そのシグナル強度は全核画分に較べて低いことから、核内に蓄積された HIRA タンパク質の一部が核内の不溶性構造物に結合していることが分かった (図 3-1 5、レーン 3 と 4)。また、クロマチンを除くと、不溶性核画分の HIRA シグナルも著しく減少することから、そのほとんどがクロマチンに結合していることが判明した (図 3-1 5、レーン 4 と 5)。従って、ツメガエル卵抽出液において、HIRA タンパク質は積極的に核内に輸送・蓄積され、その一部がクロマチンに結合することが示された。

3-4-2. HIRA の C 末端部分は核局在とクロマチン結合に必要である

次に、核への局在や核内クロマチンとの結合に関わる HIRA の調節領域について解析した。Flag を付加した HIRA の全長 (FL) または変異体 (図 3-1 7、Ct、Nt または ΔB) の mRNA を *in vitro* で合成し、卵抽出液に加えて翻訳させたのち、各々の HIRA がほぼ同量発現したことを抗 Flag 抗体によるウエスタン解析で確認した (図 3-1 6 A、Egg extract)。これらの卵抽出液に精子クロマチンを加えて賦活し、90 分間インキュベートしたのち、遠心により形成された核を回収して核画分を得た (図 3-1 6 A、Nuclear fraction、sp+)。精子クロマチンを添加せずに同様の操作を行い、核画分への細胞質混入の有無を評価した (図 3-1 6 A、Nuclear fraction、sp-)。また、回収した核を界面活性

剤で洗浄し、核質を除いたものをクロマチン画分とした（図 3-16A、Chromatin fraction）。卵抽出液、核画分およびクロマチン画分について、抗 Flag または抗 H3 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。核画分のウエスタン解析の結果、外来性の HIRA-Flag が核画分（sp+）のみに検出されたことから、外来性 HIRA も核局在性を示し（図 3-16A、レーン 8-9）、またクロマチン画分にも検出されたことから、クロマチンに結合することが示された（図 3-16A、レーン 22）。次に、各々の画分の HIRA-Flag のシグナル強度を測定し、各々の HIRA 変異体の核局在性とクロマチン結合性を検討した。核とクロマチンの回収量はヒストン H3 の量で定量化し、各々の画分の HIRA-Flag 量の補正に用いた（図 3-16A）。HIRA-Flag の卵抽出液での翻訳量に対する核画分量（Nuclear fraction の sp+から sp-を引いた値）の割合を核局在量とし、全長 HIRA（FL）を 1.00 としたときの相対値で表した（図 3-16A、Relative nuclear accumulation）。また、HIRA-Flag の核画分に含まれる量に対するクロマチン画分に含まれる量の割合をクロマチン結合量とし、FL の値を 1.00 としたときの相対値で表した（図 3-16A、Relative chromatin binding）。まず、HIRA-Asf1 複合体の核局在やクロマチン結合が、HIRA によってなされるのか、または Asf1、またはヒストンなどの Asf1 結合分子を介してなされるのかを明らかにするため、B ドメインの欠損変異体である ΔB と FL を比較した。その結果、 ΔB 変異体の核局在量とクロマチン結合量は各々 1.28 と 1.20 であった（図 3-16A、レーン 20-21 と 28）。 ΔB 変異体は Asf1 と結合できないが（データ未掲載）、野生型と同様に核内に局在し、クロマチンに結合することが示された。このことから、HIRA 複合体の核局在やクロマチン結合は Asf1 や Asf1 結合分子に依存せず、HIRA によって制御されていることが示唆された（図 3-17）。

HIRA の内部配列のいずれの領域が核局在に関与するのか、Nt と Ct を用いて検討した。その結果、Ct の核局在量は FL の半分程度であった（0.46、図 3-16A、レーン 12-13）、一方、Nt の核局在量は FL と較べて著しく減少することが分かった（0.17、図 3-16A、レーン 16-17）。これらの結果から、HIRA の C 末端領域のシャペロン複合体の核局在への寄与がより高いことが明らかとなった（図 3-17、Nuclear Accumulation）。次に、核に局在した HIRA のクロマチン結合性について検討したところ、Ct は FL の半分程度であったのに対し（0.62、図 3-16A、レーン 24）、Nt は FL に較べて著しく低くなった（0.15、図 3-16A、レーン 26）。しかし、前述したように、Nt の核局在量が著しく少ないことから、クロマチン結合量も少ないため、クロマ

チン結合性を判定することが難しい。そこで、これら変異体の核内移行を促進するため、各々の HIRA-Flag (FL、Ct と Nt) に IBB (importin- β 結合ペプチド配列) を融合して、上記と同様の実験を行った (図 3-16A、IBB+)。いずれの HIRA-Flag においても IBB+では、IBB-と比較して核局在量が 10 倍以上に増加した (図 3-16A、レーン 10-11、14-15 と 18-19)。一方、HIRA 全長(FL)に IBB を付加した FL-IBB では、核局在量は著しく増加したにもかかわらず (IBB+、14.42)、クロマチン結合量は FL と大きな差はなかった (IBB+、1.33、図 3-16A、レーン 23)。このことから、核内における HIRA のクロマチン結合は、核局在量に比例した一定の値となることが判明した (図 3-16A、レーン 22-23)。同様に、Nt と Ct においても、IBB を付加したもののクロマチン結合相対値は、付加しないものの値とほとんど変わらなかった (図 3-16A、レーン 24-27)。これらの結果から、HIRA の C 末端側の領域は、クロマチン結合においても重要な役割を果たすことが明らかとなった (図 3-17、Chromatin Binding)。以上のように、HIRA の C 末端側は、核局在にもクロマチン結合にも中心的な役割を果たすことが示された。

次に、HIRA の C 末端領域についてさらに詳細な解析を行った。核局在に必要な領域を探すために、C 末端領域を脊椎動物間で配列の保存性の低い Ct1 (494-685 aa) と、保存性の高い Ct2 (686-850 aa) および Ct3 (851-1013 aa) の 3 つの領域に分け (図 3-17)、各々を欠損させた変異体について HIRA-Flag の mRNA を合成し、卵抽出液に添加して翻訳させた (Δ Ct1、 Δ Ct2 および Δ Ct3、図 3-16B、Egg extract)。これら抽出液に精子クロマチンを加え、前述の方法で核局在量を調べた結果、 Δ Ct1 は FL とほぼ同等であったが (1.36、図 3-16B、レーン 7-8)、 Δ Ct2 と Δ Ct3 では著しく低くなった (0.28 と 0.13、図 3-16B、レーン 9-12)。これらの結果から、よく保存された Ct2 と Ct3 の二つの領域が HIRA の核局在に関与することが明らかとなった (図 3-17、Nuclear Accumulation)。同様に、核に局在した HIRA のクロマチン結合性について検討したところ、 Δ Ct1 は FL とほぼ同等であったのに対し (0.81、図 3-16B、レーン 14)、 Δ Ct2 と Δ Ct3 は FL に較べて著しく低くなった (0.05 と 0.39、図 3-16B、レーン 15-16)。これらの結果から、Ct2 と Ct3 の二つの領域が HIRA のクロマチン結合にも重要な役割を果たすことが示された (図 3-17、Chromatin Binding)。以上の結果から、進化的に保存された HIRA の二つの C 末端領域は、クロマチン結合と核局在の両方の制御に関与することが明らかとなった。

3-4-3. Hir ドメインは HIRA のクロマチン結合に必要である

HIRA の C 末端側領域には全真核生物間でよく保存された Hir 領域が存在され、また、Hir 領域はヒト培養細胞における HIRA と CABIN1 の結合に必要であることが示されている (Rai et al., 2011)。そこで、ツメガエルの HIRA-CABIN1 相互作用における Hir ドメインの必要性について検討した。GST と融合した CABIN1 の N 末 (GST-CABIN1Nt, 1-937aa) を Glutathione sepharose 4B に固定化し、卵抽出液と反応させてプルダウン実験を行った。卵抽出液と反応する前のビーズに較べて、反応した後のビーズから HIRA のシグナルが特異的に検出された (図 3-1 8 A, GST-CABIN1Nt)。対照実験として用いた GST を固定化したビーズからは、HIRA を検出できなかった (図 3-1 7 A, GST)。これらの結果から、ツメガエル卵においても、HIRA と CABIN1 が相互作用して複合体を形成していることが示唆された。また、全長 HIRA (FL) または Hir ドメイン欠損変異体 (Δ Hir) の mRNA を卵抽出液に加えて翻訳させたのち、GST-CABIN1Nt ビーズを用いてプルダウン実験を行った。卵抽出液において、FL と同程度に発現しているにもかかわらず、CABIN1Nt に結合した Δ Hir の量は、FL に較べて著しく少なかった (図 3-1 7 B)。 Δ Hir と CABIN1Nt の結合性が低いことから、ツメガエル CABIN1 との相互作用にも、HIRA の Hir ドメインが必要であることが示された。次に、Hir 領域と核局在性およびクロマチン結合との関連についても検討した。その結果、CABIN1 と結合しない Δ Hir の核局在量は FL とほぼ同等であったが (0.94、図 3-1 7 C、レーン 3-6)、クロマチン結合量は著しく少なかった (0.21、図 3-1 7 C、レーン 7-8)。以上の結果から、HIRA の核局在に Hir 領域は関与しないが、クロマチン結合は Hir ドメインを介して行われることが明らかとなった (図 3-1 8 D)。また、このヒストンシャペロン複合体のクロマチン結合は、CABIN1 によって調節される可能性が示唆された。従って、HIRA の Hir ドメインは HIRA-Asf1 複合体の核内蓄積に不必要だが、クロマチン結合に必要であることが明らかとなった。

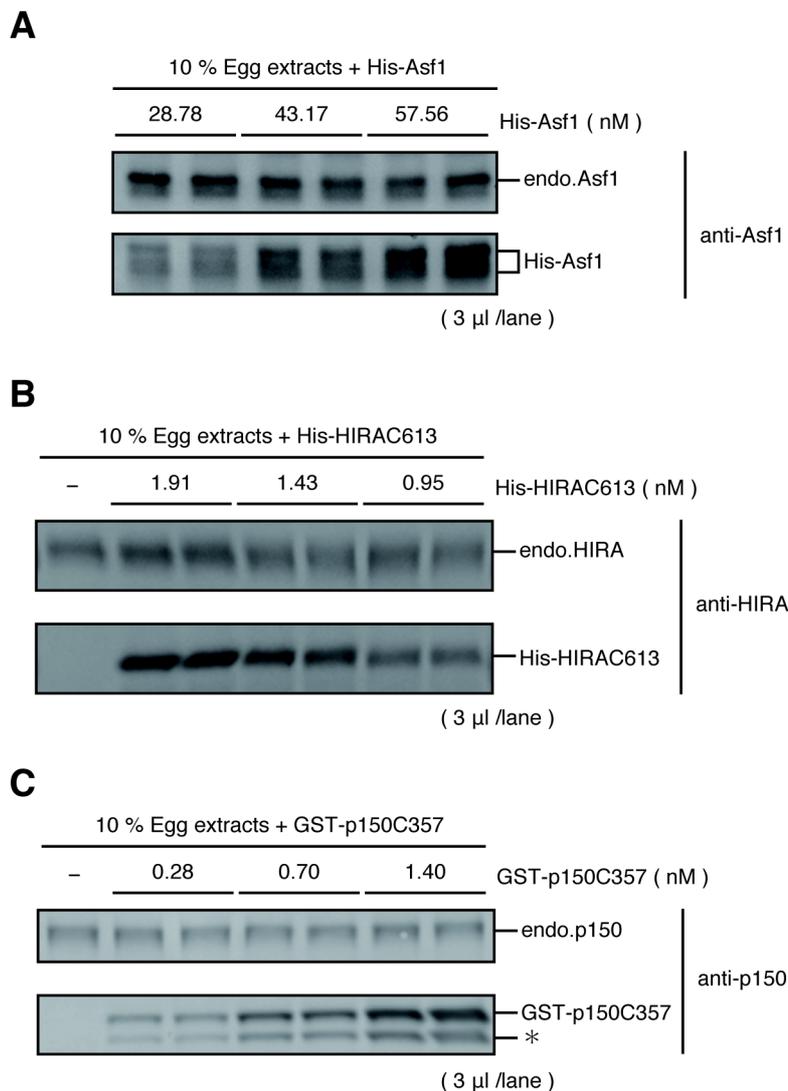


図 3-1 . ツメガエル卵抽出液の内在性ヒストン H3-H4 シャペロンの定量化

(A-C) 10 倍に希釈した卵抽出液 (10% Egg extracts) が組み換えタンパク質 His-Asf1 (28.78~57.56 nM、A)、His-HIRAC613 (0.95~1.91 nM、B) 及び GST-p150C357 (0.28~1.40 nM、C) とそれぞれ混合したサンプルを SDS-PAGE (3 μ l/lane) した後、抗 Asf1 (抗原: C 末ペプチド)、抗 HIRA (抗原: GST-HIRAC613) 及び抗 p150 (抗原: C 末ペプチド) 抗体を用いてウエスタン解析した。内在性タンパク質と組み換えタンパク質の移動度はパネルの右に示す。組み換えタンパク質の濃度とバンド強度から作成した検量線に基づいて、卵抽出液における各々の内在性ヒストンシャペロンタンパク質の濃度を算出した。*は GST-p150C357 の分解産物を示す (C)

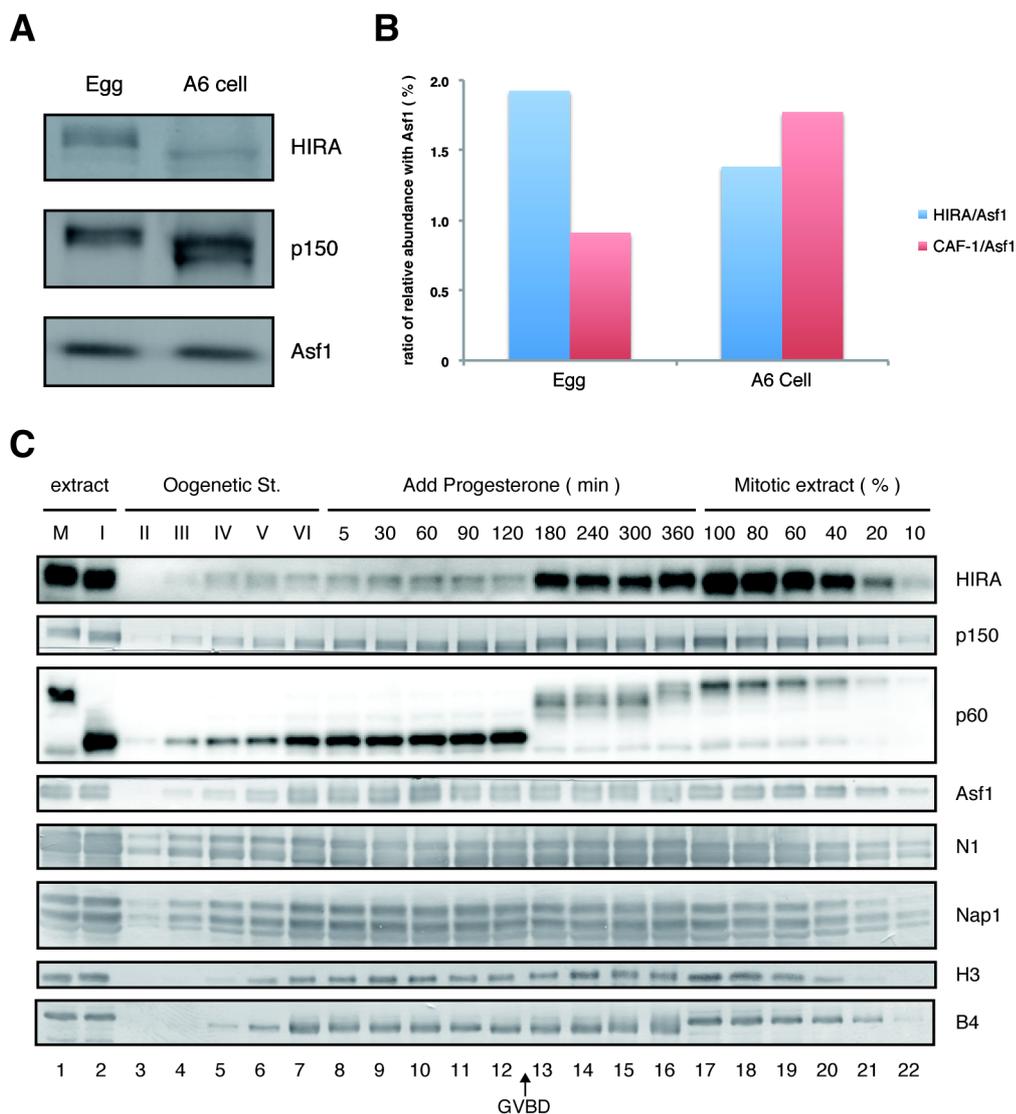


図 3-2. 初期胚細胞及び培養細胞におけるヒストンシャペロン量の変化

(A-B) 卵抽出液および培養細胞 (A6) 全細胞抽出液についてウエスタン解析した (A)。卵および A6 細胞において、各々の Asf1 に対する HIRA と CAF1 の相対量値を Asf1 の濃度が 100 としてグラフに示した (B)。(C) 各成長段階の卵母細胞 (stage II~VI、レーン 3-7) 及び成熟過程の卵細胞 (5 - 360 min; レーン 8-16) のサンプル (0.5 eggs / lane) を示された抗体を用いてウエスタ解析した。分裂期 (M) または間期 (I) の卵抽出液 (レーン 1-2)、分裂期卵抽出液の希釈系列 (レーン 17-22) も同時に解析した。

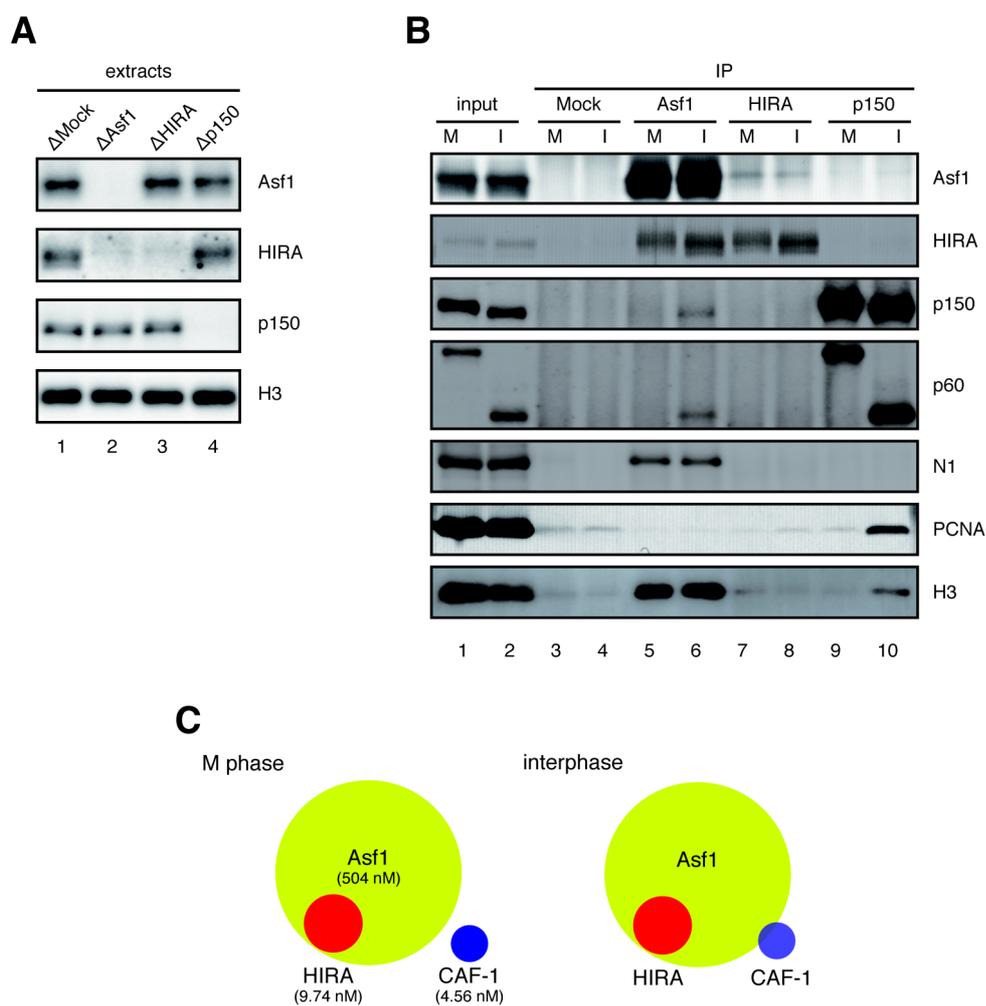


図 3-3. 卵抽出液におけるヒストン H3-H4 シャペロン複合体の相互関係

(A-B) 分裂期 (M) または間期 (I) の卵抽出液を各ヒストンシャペロンに対する特異抗体ビーズを用いて免疫沈降を行った。非特異的ウサギ抗体を対照 (Δ Mock) として用いた。免疫除去処理した後の卵抽出液 (間期、A) 及び免疫沈降処理前卵抽出液 (input, M と I) と沈降物 (IP、B) を図に示した各種抗体を用いてウェスタン解析した。(C) 卵抽出液に含まれる各ヒストンシャペロンの量とその相互作用をモデル図に示す。HIRA と CAF-1 に対して過剰量の Asf1 が卵抽出液に含まれ、HIRA は CAF-1 の約 2 倍量存在する。全ての HIRA は細胞周期を通じて Asf1 と結合し、CAF-1 の一部分が間期にのみ Asf1 と結合する。

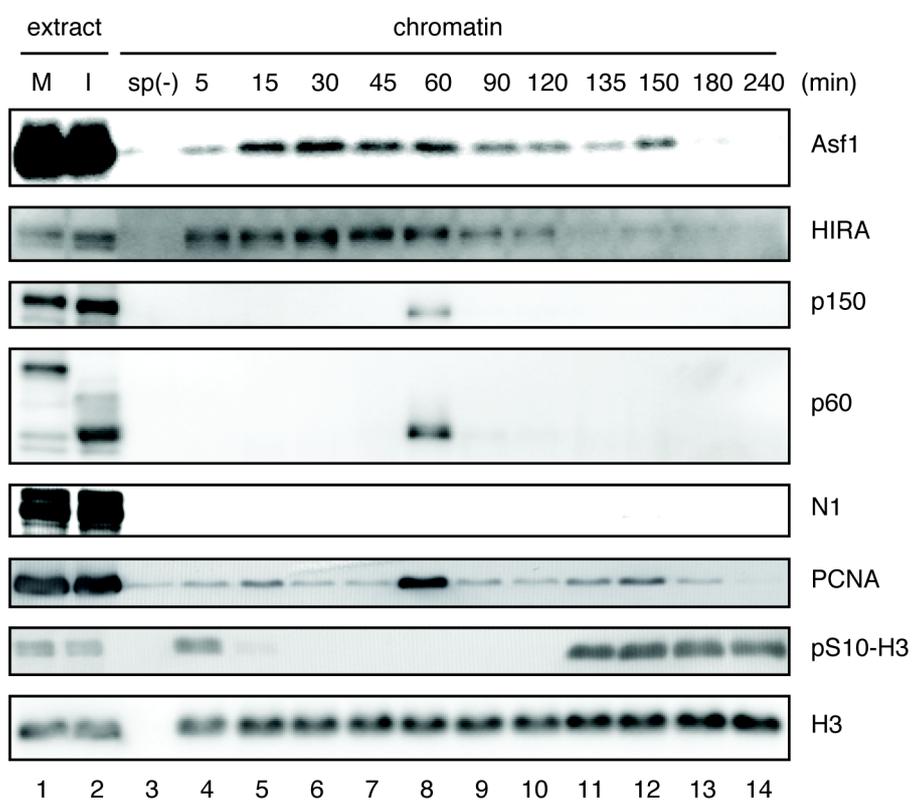


図 3-4. 卵抽出液におけるヒストン H3-H4 シャペロンのクロマチン局在
 分裂期卵抽出液に精子クロマチンとシクロヘキシミドを加えて、CaCl₂ を添加し賦活して細胞周期を間期に移行させた。賦活後 120 分後に同量の分裂期卵抽出液可溶性画分 (M-HSS) を加えて、細胞周期を分裂期に移行させた。図に示した様々なインキュベーション時間後にクロマチンを回収し、クロマチン結合タンパク質をウエスタン解析した。ヒストン H3S10 のリン酸化状態 (pS10-H3) を細胞周期の指標として示す。

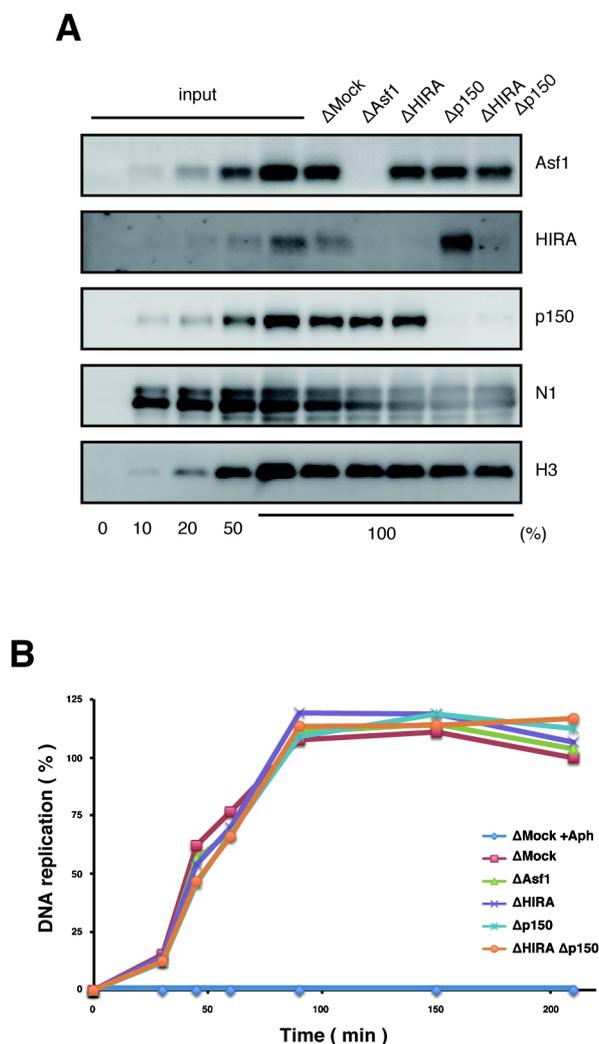


図 3-5. ヒストン H3-H4 シャペロンはゲノム DNA の複製には必要ではない

(A) 特異抗体ビーズを用いて分裂期卵抽出液から各ヒストンシャペロンを選択的に免疫除去した。各々の免疫除去卵抽出液についてウェスタン解析した。(B) 免疫除去処理した卵抽出液に精子クロマチンと $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP を加えて、 CaCl_2 を添加し賦活させた。様々な時間経過後にゲノム DNA を回収して電気泳動し、オートラジオグラフィーにより複製されたゲノム DNA に取り込まれた放射線同位元素の量を計測して、対照実験 (Δ Mock) 賦活後 210 min の値を 100%としてグラフ化した。アフィジコリン (30 nM) を加えた卵抽出液 (Δ Mock +Aph) についても同様に解析した。

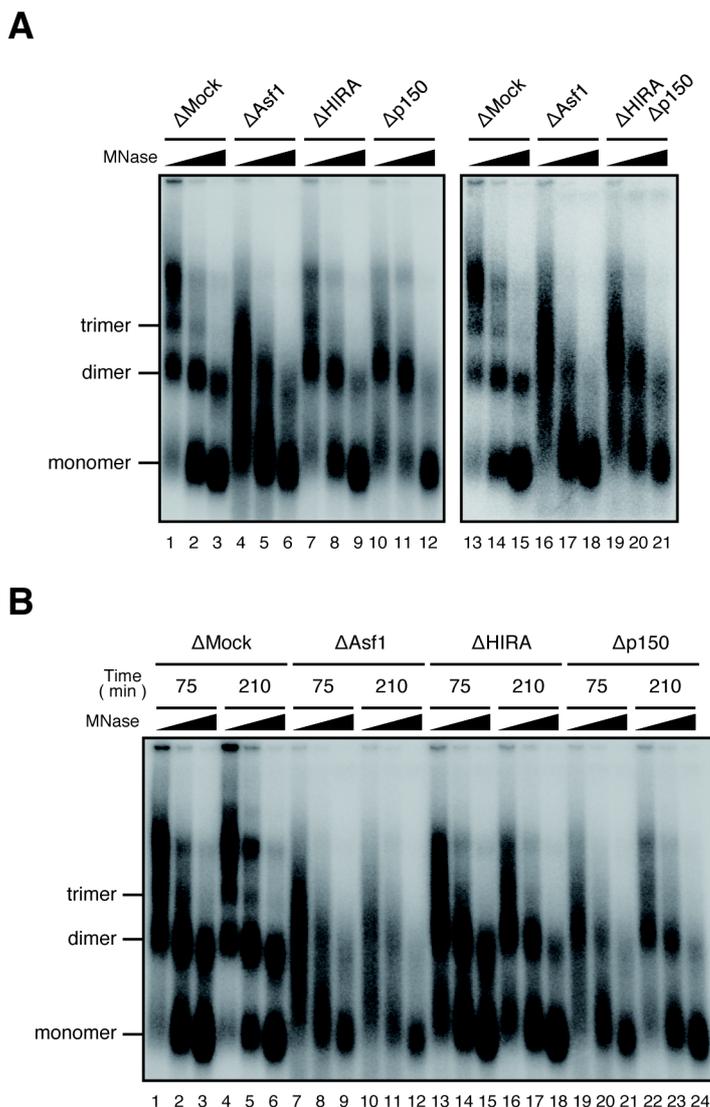


図 3-6. ゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成におけるヒストンシャペロンの役割

免疫除去処理した分裂期卵抽出液に精子クロマチンを加えて、 CaCl_2 を添加し賦活させた。

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP を添加して複製されたゲノム DNA を標識した。賦活した直後に 120 分間の連続ラベル (A)、もしくは、賦活した 60 分後に 15 分間パルスラベルしたのち、135 分間チーヌインキュベーション (75 と 210 min、B) を行ってからクロマチンを回収し、MNase (50, 100 と 200 U/ml) で処理して得られたゲノム DNA 断片を 6% アクリルアミドゲルで電気泳動した後に、オートラジオグラフィを行い、DNA ラダーパターンを解析した。ヌクレオソーム単量体、二量体及び三量体に対応する DNA 断片の移動度をパネルの左に示す。

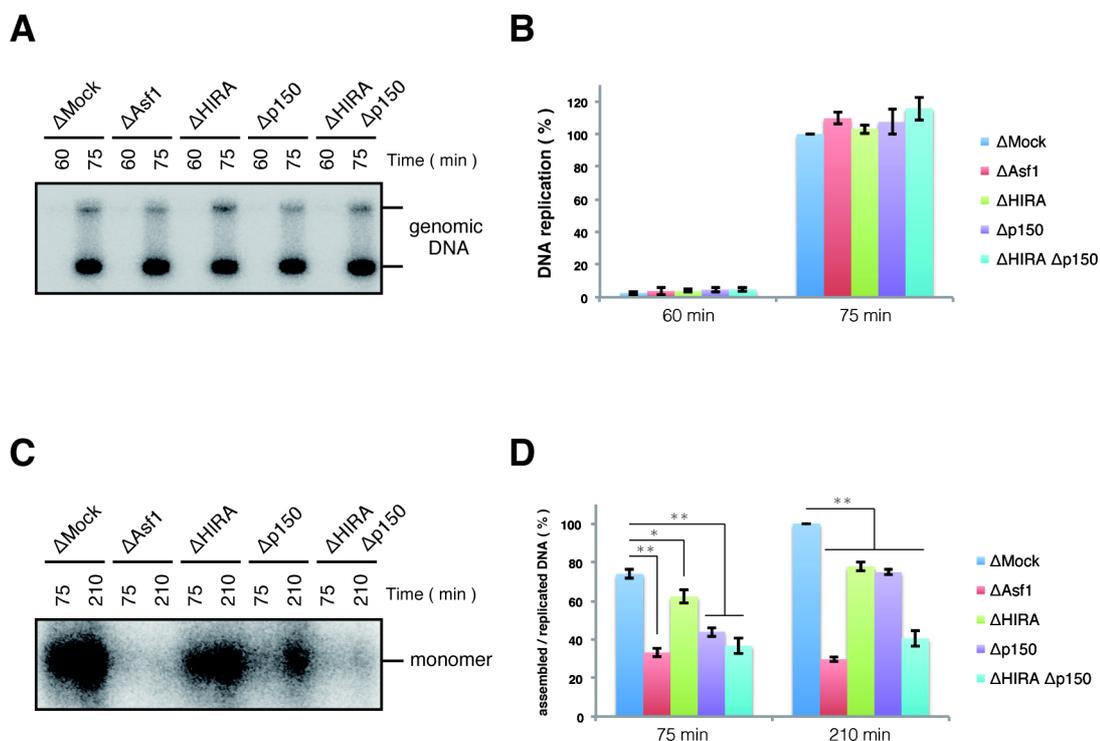


図 3-7. HIRA と CAF-1 の両方は複製されたゲノム DNA 上のヌクレオソーム形成に必要である

免疫除去処理した分裂期卵抽出液に精子クロマチンを加えて、CaCl₂ を添加し賦活させた。賦活した 60 分に [α -³²P] dCTP を添加して 15 分間パルスラベルしたのち、135 分間チェーシンキュベーションを行った。(A) パルスラベルの前後 (60 と 75 min) に回収したゲノム DNA をアガロースゲルで電気泳動し、オートラジオグラフィを行った。(B) ゲノム DNA に取り込まれた [α -³²P] dCTP の量を測定し、DNA 複製量としてグラフ化した (Mean \pm S.E., n= 4)。(C) パルスラベル直後とチェーシンキュベーション後 (75 と 210 min) にクロマチンを回収し、MNase (1000 U/ml) で十分に処理して得られた DNA 断片を電気泳動し、オートラジオグラフィによってヌクレオソーム単量体に相当する DNA 断片シグナルを検出した。(D) ゲノム DNA への [α -³²P] dCTP 取り込み量 (DNA 複製量) に対する、ヌクレオソームを形成した DNA への取り込み量の割合を算出し、ヌクレオソーム形成率の指標としてグラフ化した (Mean \pm S.E., n= 4, *, p= 0.09; **, p< 0.03 (student t-test))。

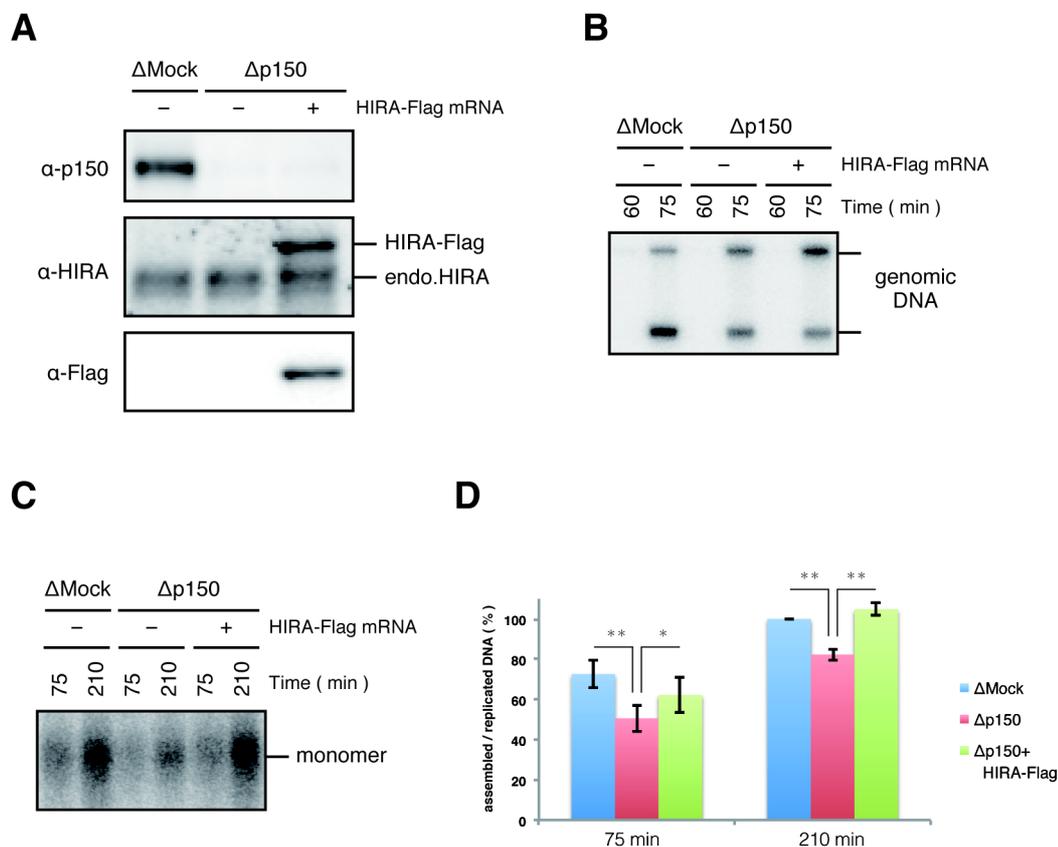


図 3-8. HIRA の量の増加によるヌクレオソーム形成の促進

分裂期卵抽出液に HIRA-Flag の mRNA を加えて発現させたのち、抗 p150 抗体ビーズを用いて CAF-1 を免疫除去した。(A) 各々の卵抽出液をウエスタン解析した。図 3-7 と同様に、パルスラベラーチェースインキュベートを行った。ゲノム DNA (B) と MNase で十分に処理した DNA 断片 (C) を電気泳動し、オートラジオグラフィーによって解析した。(D) ゲノム DNA への $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP 取り込み量 (DNA 複製量) に対する、ヌクレオソームを形成した DNA への取り込み量の割合を算出し、ヌクレオソーム形成率の指標としてグラフ化した (Mean \pm S.E., n = 3, *, p = 0.11; **, p < 0.01 (student t-test))。

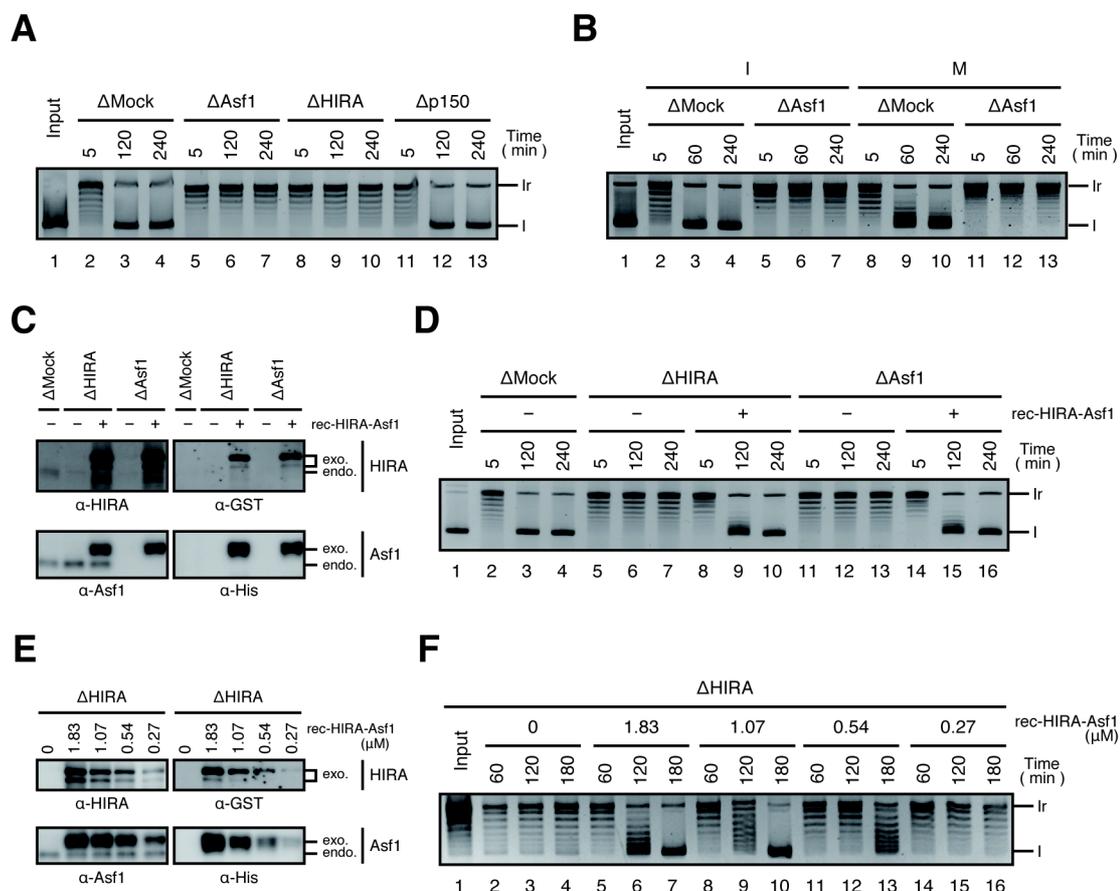


図 3-9. HIRA-Asf1 複合体は DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成に必要である

(A) 各々のヒストンシャペロン免疫除去間期卵抽出液可溶性画分 (I-HSS) にプラスミド DNA (pBluescriptII SK+) を加えてインキュベートし、図に示したインキュベーション時間後に DNA を回収し、反応前の DNA (input) と共に電気泳動した。リラックス (Ir) およびスーパーコイル (I) DNA の移動度をパネルの右に示す。(B) Asf1 と免疫除去した間期 (I) または分裂期 (M) の HSS にプラスミド DNA を加えてスーパーコイリングアッセイを行った。(C-D) Asf1 または HIRA の免疫除去 I-HSS に rec-HIRA-Asf1 を加えて 30 分間インキュベーションしたものをウエスタン解析した (C)。プラスミド DNA を卵抽出液に加えてスーパーコイリングアッセイを行った。反応前の DNA (input) と共に電気泳動した (D)。(E-F) HIRA の免疫除去 I-HSS に様々な濃度の rec-HIRA-Asf1 を加えて (E)、スーパーコイリングアッセイを行った。5 分間プレインキュベーションしたリラックス DNA (input) と共に電気泳動した (F)。

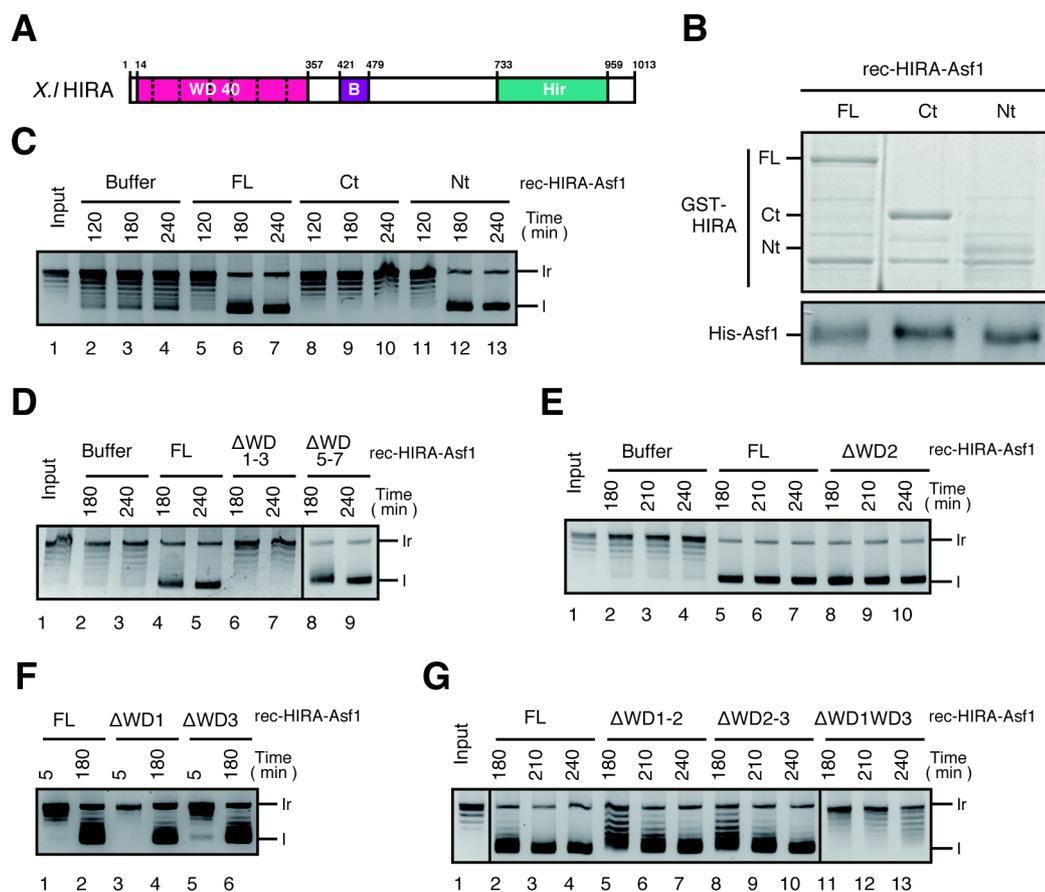


図 3-10. HIRA の N 末端領域は DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成に十分である

(A) ツメガエル HIRA のモデル図である。真核生物の HIRA でよく保存されている 3 つのドメイン (WD40: WD40 リピート、B: B ドメインと Hir: Hir ドメイン) を示す。(B) 各々の rec-HIRA-Asf1 (FL、Ct および Nt) を大腸菌で共発現させ、Glutathione Sepharose 4B を用いて精製したのに対して SDS-PAGE (上) または抗 His 抗体を用いウエスタン解析 (下) を行った。各々の移動度を左に示す。(C-G) HIRA 免疫除去 I-HSS に各々の rec-HIRA-Asf1 を加えて 30 分間インキュベーションしたのち、プラスミド DNA を加えてスーパーコILING アッセイを行った。図に示したインキュベーション時間後に DNA を回収し、5 分間プレインキュベーションしたリラックス DNA (input、各パネル、レーン 1) と共に電気泳動した。対照実験 (Buffer) には、rec-HIRA-Asf1 の溶出バッファーを加えたものを使用した。

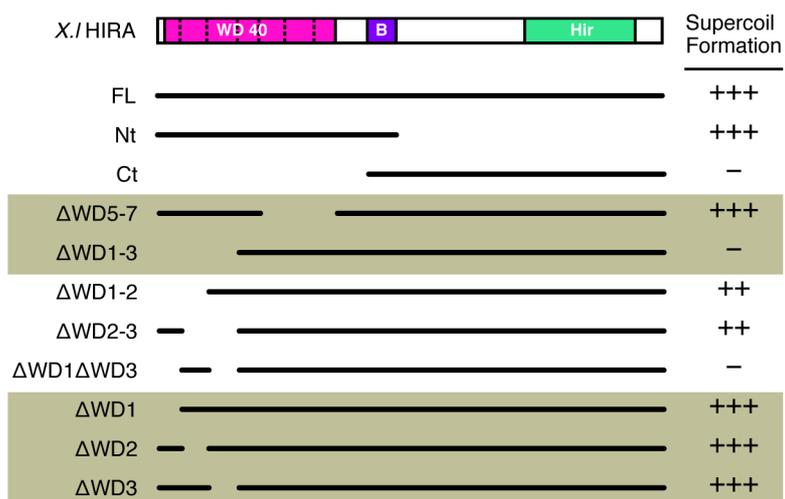


図 3-1 1. HIRA の WD40 と B ドメインは DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成に必要である

図 3-1 1 に基づいて、解析に用いた各種ツメガエル HIRA 欠損変異体のスーパーコイル形成活性をパネルの右に示した。180 分 (+++)、210 分 (++) 及び 240 分 (+) までに 90%以上のプラスミド DNA がスーパーコイル状になったもの、240 分 (—) でもスーパーコイルが形成されなかったものをそれぞれ示した。

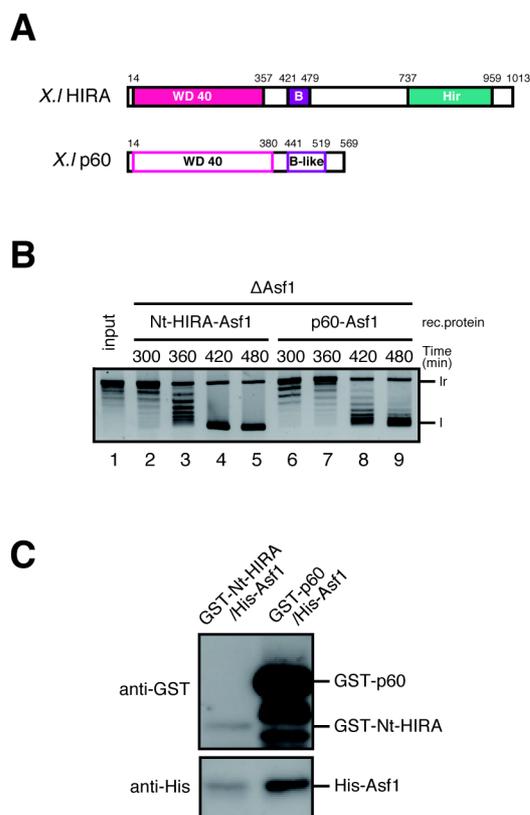


図 3-1 2. CAF-1 の p60 サブユニットも DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成を媒介できる

(A) ツメガエル HIRA と p60 のモデル図である。真核生物の p60 でよく保存されている WD40 リピート (WD) と B-like ドメイン (B-like) を示す。(B) rec-Nt-HIRA-Asf1 及び rec-p60-Asf 複合体を大腸菌で共発現させ、Glutathione Sepharose 4B を用いて精製した。HIRA 免疫除去 I-HSS に各々の複合体を加えて 30 分間インキュベーションしたのち、プラスミド DNA を加えてスーパーコイリングアッセイを行った。図に示したインキュベーション時間後に DNA を回収し、5 分間プレインキュベーションしたリラックス DNA (input、レーン 1) と共に電気泳動した。(C) 多くの複合体を添加した卵抽出液のサンプルに対して抗 GST 抗体 (上) または抗 His 抗体 (下) を用いウエスタン解析を行った。各々のタンパク質の移動度を左に示す。

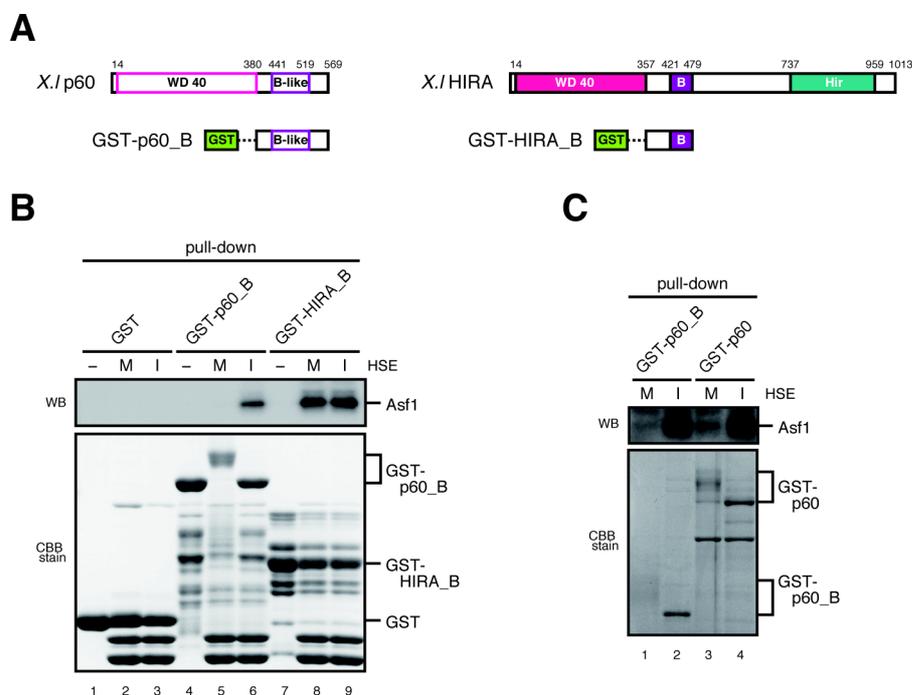


図3-13. p60のB-likeドメインのAsf1結合性はHIRAのBドメインに較べて低い

(A) Bドメインを含むHIRAの部分領域(GST-HIRA_B, 357-479 aa)とB-likeドメインを含むp60のC末端領域(GST-p60_B, 380-569 aa)をそれぞれGSTタグと融合し(図3-13A)、大腸菌で発現させ、Glutathione Sepharose 4Bに固定化させた。(B) 卵抽出液にGST、GST-HIRA_BまたはGST-p60_B結合ビーズをと加えて反応した。反応前(-)と分裂期(M)または間期(I)卵抽出液と反応した後のビーズに結合するタンパク質について抗Asf1抗体を用いたウエスタン解析(上)及びSDS-PAGE(下)を行った。(C) 卵抽出液にGST-p60_BとGST-p60(1-569 aa)結合ビーズをと加えて反応した。分裂期(M)または間期(I)卵抽出液と反応した後のビーズに結合するタンパク質について抗Asf1抗体を用いたウエスタン解析(上)及びSDS-PAGE(下)を行った。

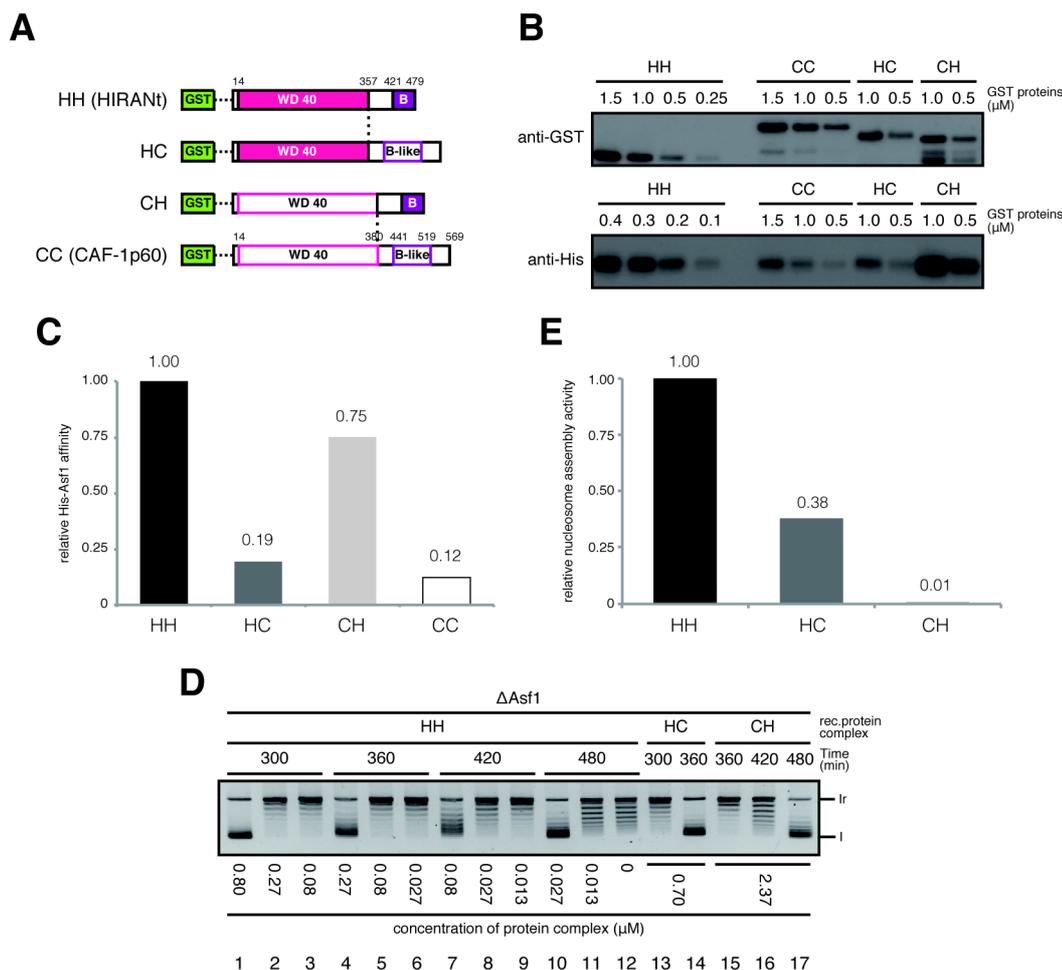


図 3-14. p60 の WD40 ドメインは DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成に適していない

(A) HIRA(Nt)の WD40 と B ドメインを p60 の WD40 と B-like ドメインにそれぞれ置換した変異体をモデル図で示す。(B) 各々の変異体 (HH、HC、CH と CC) が His-Asf1 と大腸菌で共発現させ、Glutathione Sepharose 4B を用いて精製したのに対して抗 GST 抗体 (上) または抗 His 抗体 (下) を用いウエスタン解析を行った。(C) 各々の変異体に結合した His-Asf1 の量を算出し、Asf1 結合性の指標としてグラフ化した。(D) Δ Asf1 に各々の複合体 (HH、0.80 μ M、0.27 μ M、0.08 μ M、0.027 μ M と 0.013 μ M ; HC、0.70 μ M ; CH、2.37 μ M) を加えて、30 分間インキュベーションしたのち、プラスミド DNA を加えてスーパーコILINGアッセイを行った。図に示したインキュベーション時間後に DNA を回収し、5 分間プレインキュベーションしたリラックス DNA (input) と共に電気泳動した。(E) 各々の濃度の HH 複合体のスーパーコイル形成速度に基づいて、同速の形成を媒介するために必要な HC と CH 複合体の濃度を算出した。その逆数はヌクレオソーム形成活性指標としてグラフ化した。

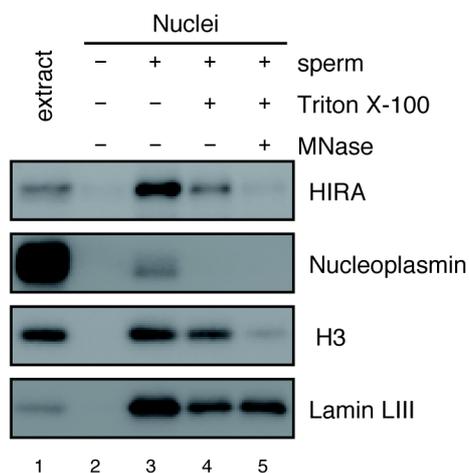


図 3-15. HIRA は卵抽出液において核内に局在し、クロマチンと結合する
 卵抽出液に精子クロマチンを加えて、賦活させてから 90 分間反応した。遠心により核を回収して全核画分を得た（レーン 3）。回収した核を界面活性剤（0.25% Triton X-100）で洗浄し、不溶性核画分を得た（レーン 4）。不溶性核画分を MNase（1000 U/ml）で十分に処理して、クロマチン結合タンパク質を除いた不溶性核画分を得た（レーン 5）。卵抽出液に精子クロマチンを加えず同様な操作により対照のサンプルも調製した（レーン 2）。卵抽出液と各核画分サンプルについてウエスタンブロッティングを行った。

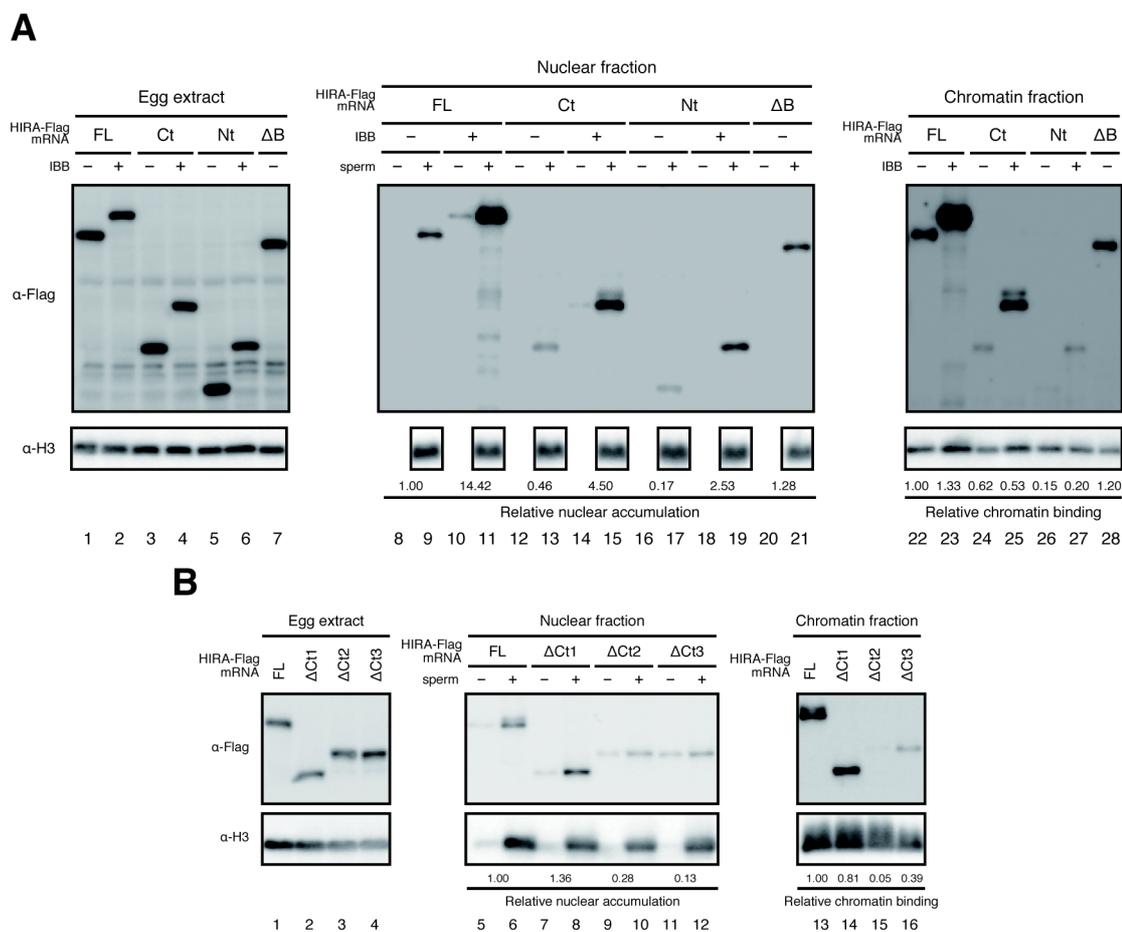


図 3-16. HIRA の C 末は核局在とクロマチン結合に必要である

(A-B) HIRA-Flag (IBB+または IBB-) の mRNA を卵抽出液に加えて翻訳させたのち、精子クロマチンを加えて賦活させてから 90 分間反応した。遠心により核を回収して核画分 (Nuclear fraction, sp+) を得た。精子クロマチンを加えず同様な操作により細胞質混入 (Nuclear fraction, sp-) を得た。回収した核を界面活性剤で洗浄し、クロマチン画分とした (Chromatin fraction)。各々の HIRA-Flag の翻訳量に対する核画分量 (sp+から sp-を引いたもの) の相対値を核内蓄積量とし、核画分量に対するクロマチン画分量の相対値をクロマチン結合量として算出し、全長 HIRA の値が 1.00 とした相対値をパネルの下に示した。

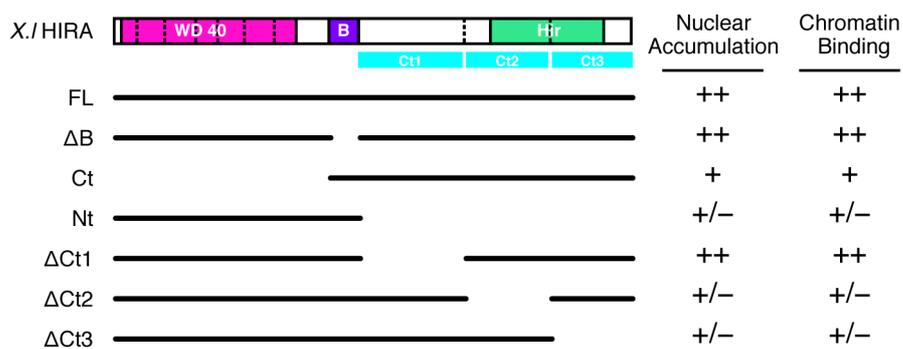


図 3-17. HIRA の C 末は核局在とクロマチン結合に必要である

各々の HIRA 変異体の核内蓄積活性とクロマチン結合活性は、それぞれ核内蓄積及びクロマチン結合の相対値 (++: >0.8; +: >0.4; +/-: <0.4、図 3-16) に基づいて、パネルの右に示した。

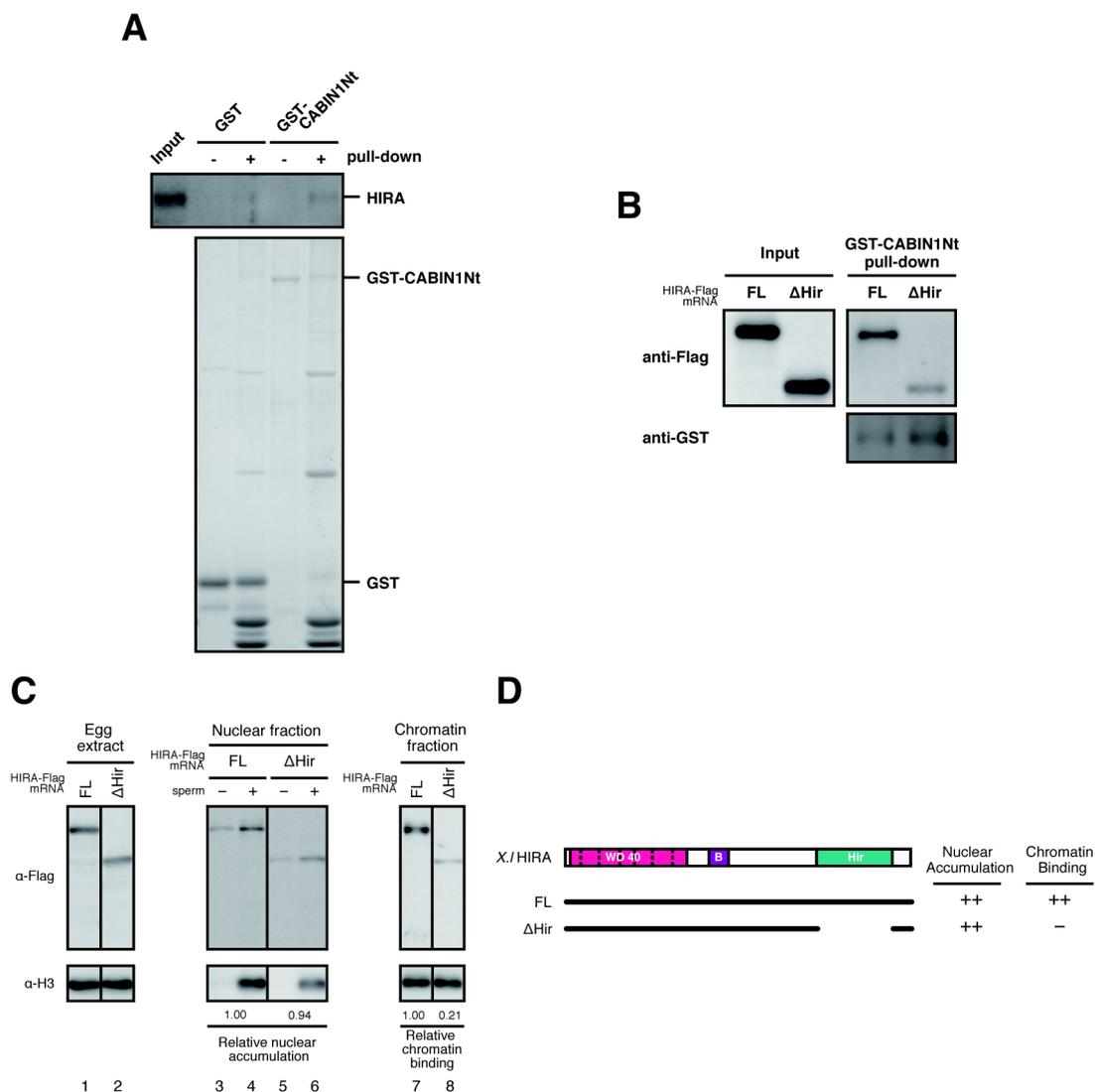


図 3-18. Hir ドメインは HIRA の CABIN1 結合とクロマチン局在に必要である

(A) 卵抽出液に GST または GST-CABIN1Nt 結合ビーズをと加えて反応した。反応前 (-) と後 (+) のビーズに結合するタンパク質についてウエスタン解析(上)及び SDS-PAGE(下)を行った。(B) 全長 HIRA (FL) または ΔHir 変異体の mRNA を卵抽出液に加えて翻訳させたのち、GST-CABIN1Nt 結合ビーズを加えて反応する。卵抽出液 (Input) とビーズ結合タンパク質をウエスタン解析した。(C-D) 図 3-13 と同様に、全長 HIRA (FL) または ΔHir 変異体の核内蓄積量とクロマチン結合量を算出し、全長 HIRA の値が 1.00 とした相対値をパネルの下に示した (C)。各々の HIRA 変異体の核内蓄積活性とクロマチン結合活性は、それぞれ核内蓄積及びクロマチン結合の相対値核に基づいて、パネルの右に示した (D)。

4. 考察

本学位論文研究では、ツメガエル初期胚細胞におけるヒストン H3-H4 シャペロンについて解析し、ゲノム DNA の複製に伴うヌクレオソーム形成におけるヒストンシャペロン HIRA または CAF-1 複合体の役割分担について検討した。また、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成を媒介する際のヒストンシャペロン HIRA-Asf1 複合体の分子機序を解明するために、ヌクレオソーム形成の媒介活性とヒストンシャペロン複合体の細胞内局在に必要な HIRA の機能領域を同定した。さらに、ヌクレオソーム形成に大きく寄与すると思われる HIRA と CAF-1 の p60 サブユニットの機能ドメインとその制御の違いについて比較した。

4-1. ツメガエル初期胚細胞におけるヒストン H3-H4 シャペロンのシステム

ツメガエル卵が受精後に、迅速な DNA 複製と細胞分裂を繰り返すことで、速やかに細胞の数を増やすことが知られている。DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成には、大量のヒストンタンパク質が必要となる。一般的な体細胞では DNA 複製に応じて S 期にヒストンが合成されるが(Heintz, 1991)、速い分裂周期の進行を遂行するために、ツメガエル成熟卵には大量のヒストンタンパク質が予め蓄積されている。これらのヒストンタンパク質を制御するものとして、ツメガエル卵からは、N1、Asf1、CAF-1 及び HIRA などの主要なヒストン H3-H4 シャペロンが同定されている (Kleinschmidt et al., 1986; Quivy et al., 2001; Ray-Gallet et al., 2002, 2007)。本研究の結果から、これらのヒストンシャペロンから構成されたツメガエル初期胚細胞のヒストン H3-H4 の調節システムが示された (図 4-1)。ツメガエル卵抽出液には約 3.33 μM のヒストン H3-H4 タンパク質が含まれている (岡谷、未発表)、そのうち約 90%が N1 に結合している (データ未掲載)。しかし、N1 は卵抽出液中のクロマチンと相互作用せず (図 3-4)、CAF-1 または HIRA 複合体に含まれず (図 3-3 B)、DNA 複製に共役するまたは共役しないヌクレオソーム形成を効率的に媒介することもできない (図 3-6)。従って、N1 は初期胚細胞においてヒストンタンパク質の蓄積に中心的な役割を果たしているが、ヌクレオソームの形成には寄与しないと考えられた。その代わりに、ツメガエル初期胚細胞におけるヌ

ヌクレオソーム形成は、主に HIRA-Asf1 と CAF-1-Asf1 の二つの複合体によってなされる (図 3-6)。そのうち、Asf1 はヒストン H3-H4 と直接に結合する (図 3-3 B)。一般的な体細胞では、Asf1 は間期において新規合成されたヒストン H3-H4 タンパク質と直接結合し、ヒストンの転写後化学修飾や核輸送に関与することが知られている (Avvakumov et al., 2011; Hansen et al., 2010; Keck and Pemberton, 2012)。ツメガエル卵抽出液では、Asf1 は CAF-1 または HIRA のほかに、N1 とともに結合性を持つことから (図 3-3 B)、ツメガエル卵細胞における Asf1 はヒストン貯蔵シャペロンからヌクレオソーム形成媒介シャペロンへのヒストンの受け渡しに中心的な役割を果たすことが示唆された。さらに、ツメガエルの卵細胞と培養細胞 (A6) には、CAF-1 または HIRA の 50 倍以上の量の Asf1 が存在していることが明らかとなり (図 3-1 と 3-2)、未分化細胞、分化した細胞のいずれにおいても、Asf1 は主要なヒストンシャペロンとして、ヒストンの様々な挙動を制御することが示唆された。Asf1 と免疫除去した卵抽出液には、十分な量の CAF-1 が残っているにもかかわらず、DNA 複製に共役するヌクレオソームの形成が著しく抑制されたことから、迅速なヌクレオソーム形成には Asf1 が必要だと考えられる。同様に、Asf1 は酵母、ショウジョウバエ胚や HeLa 細胞抽出液におけるヌクレオソーム形成に寄与する (Green et al., 2005; Mello et al., 2002; Tyler et al., 1999)。従って、Asf1 はヌクレオソーム形成に必須なヒストンシャペロンであるといえる。しかし、ツメガエル卵抽出液において、Asf1 単独では、DNA 複製に共役するまたは共役しない、いずれのヌクレオソームの形成についても、それを媒介するには十分ではないことが示された (図 3-6 と 3-9 A)。従って、Asf1 により供給されたヒストンは CAF-1 もしくは HIRA に受け渡され、CAF-1 もしくは HIRA によって DNA への結合が媒介されると考えられる。すなわち、HIRA または CAF-1 はヌクレオソーム形成における DNA へのヒストンの結合を媒介するために重要なシャペロンであり、Asf1 はヒストン H3-H4 を供給するためにそれらのヒストンシャペロンと複合体を形成することが極めて重要であると考えられる。

これらのヒストン H3-H4 シャペロンのうち、N1 と Asf1 は酸性アミノ酸に富み、強いマイナス静電荷を持つことによって、ヒストンと結合してそのプラス静電荷を中和し、細胞内に安定的に存在するために必要なヒストンシャペロンである。しかし、これらのヒストンシャペロンはヌクレオソームの形成を効率的に媒介できない (Philpott et al., 2000)。このようなタイプのヒストンシャペロンと異なって、CAF-1 または HIRA は全

体として中性もしくは塩基性を示し、ヒストン H3-H4 二量体と直接には結合しないが (English et al., 2006)、ヌクレオソーム形成におけるヒストンの動態を制御するヒストンシャペロンと考えられている。以上のことから、ツメガエル初期胚細胞において、ヒストン H3-H4 の蓄積からヒストンシャペロン複合体への供給、そして、ヌクレオソーム形成における DNA への結合が複数のヒストンシャペロン複合体によって精密にコントロールされるというモデルが考えられる(図 4-1)。ツメガエルにおいて、長期間、減数第一分裂に停止する未成熟卵母細胞にも大量のヒストンが蓄積される (図 3-2 C)。また、受精後の初期胚発生では、迅速なゲノム DNA 複製に伴う速やかなヌクレオソーム形成が要求される。よって、ツメガエル初期胚細胞におけるヒストン H3-H4 の制御機構は、大量のヒストンの蓄積と迅速なヌクレオソーム形成の両面に対応するため、他の細胞とは異なった面をもつかもしれない。また、近年では、ヒトの培養細胞を用いた研究から、N1 の相同体である NASP が細胞内のヒストンタンパク質と相互作用する知見も得られている。こうした点を考慮すると、このモデルは、ツメガエルの初期胚細胞だけではなく、すべての真核細胞に適用できるものと考えられる。

4-2. ツメガエル初期胚細胞における CAF-1 と HIRA 複合体制御・機能の違い

ツメガエルにおいても、ヌクレオソーム形成を促進できるヒストンシャペロンとして、CAF-1-Asf1 と HIRA-Asf1 の二つの複合体が報告されている (Quivy et al., 2001; Ray-Gallet et al., 2002)。本研究では、ツメガエル初期胚細胞のヌクレオソーム形成における両ヒストンシャペロン複合体の形成や活性制御の違いが示された。ツメガエル卵抽出液において、HIRA-Asf1 複合体は細胞周期に通じて恒常的に存在し、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成を媒介することが示された (図 3-3 B と 3-9 B)。それに加えて、大腸菌を用いた *in vitro* 再構築系で、ヌクレオソーム形成活性を持つ HIRA-Asf1 複合体が得られたことから (図 3-10 B)、HIRA は直接 Asf1 と結合し、安定した活性を持つヒストンシャペロン複合体を形成することが示された。ヒト Asf1 タンパク質の構造解析から、Asf1 との結合は HIRA の B ドメインが必要であることが示されていた (Tang et al., 2006)。同様に、ツメガエル卵抽出液を用いたプルダウン実験から、ツメガエル HIRA の B ドメインは細胞周期に通じて Asf1 親和性を維持することが示された (図 3-

1 1 B)。また、HIRA の B ドメイン以外の領域の欠損は、HIRA と Asf1 の相互作用に影響しないことも示され (図 3-1 0 B)、HIRA-Asf1 複合体の構築は HIRA の B ドメインに依存することが確認された。これらの結果から、真核細胞における安定的な HIRA-Asf1 複合体はヌクレオソーム形成活性を恒常的に維持することが示唆された。

HIRA 複合体は特有の量的制御を受け、卵成熟に伴い、GVBD 後に急激な量の増加が見られた (図 3-2 C)。Asf1 は HIRA の量の約 5 0 倍存在するため、HIRA の量の増加は HIRA-Asf1 複合体の増加をもたらす。その結果、ツメガエルの培養細胞に較べて、卵細胞では、Asf1 に対する HIRA-Asf1 複合体の相対量が大きい (図 3-2 A と B)。ツメガエル卵成熟過程において、ほとんどの遺伝子の転写が抑制されているため、HIRA の量の増加はタンパク質翻訳の活性化によるものだと考えられる。このように、卵成熟に伴う翻訳の活性化によって、含有量が増加するタンパク質として、CycB1、Wee1 や Mos などが報告されている (Iwabuchi et al., 2000; Murakami and Vande Woude, 1998; Sheets et al., 1994)。これらのタンパク質の翻訳の鋳型である母性 mRNA は、未成熟卵母細胞では 3'UTR のポリ (A) 鎖が短く、翻訳活性が抑制されているが、卵成熟に伴い、ポリ (A) 鎖が伸長され、タンパク質の翻訳が活性化されることが知られている。卵成熟期におけるポリ (A) 鎖伸長反応は、mRNA の 3'UTR にある特有な CPE (Cytoplasmic polyadenylation element) モチーフに結合する CPEB (CPE-Binding protein) が強く関与することが報告されている (Charlesworth et al., 2000; Iwabuchi et al., 2000; Sheets et al., 1994)。ツメガエルのゲノムデータベース (Xenbase; JGIv7b.000110886_41109-86219) によると、HIRA の mRNA の 3'UTR にも CPE モチーフ (UUUUAUU) が存在することから (データ未掲載)、卵成熟期の細胞周期の進行に伴うポリ (A) 鎖伸長反応により HIRA の翻訳活性が高められる可能性が示された。さらに、卵抽出液中に mRNA を用いて外来性 HIRA タンパク質を翻訳すると、ゲノム DNA におけるヌクレオソームの形成がより促進されることが明らかとなった (図 3-8)。従って、ツメガエル初期胚細胞において、恒常的に存在する HIRA-Asf1 複合体はヌクレオソーム形成活性を安定的に維持すること、また、卵成熟に伴う HIRA タンパク質の翻訳によって HIRA-Asf1 複合体の量が増加、卵または初期胚細胞全体のヌクレオソーム形成活性が高められることが示唆された。

安定的な HIRA-Asf1 複合体の形成に対して、CAF-1 と Asf1 は間期の卵抽出液でのみ相互作用することが示され、CAF-1-Asf1 複合体は間期に形成され、分裂期には解離する

ことが明らかとなった (図 3-3 B)。先行研究から、ヒトの CAF-1p60 サブユニットに含まれる B-like ドメインが CAF-1-Asf1 の相互作用に寄与することが報告されていた。ツメガエル p60 の B-like ドメインを含む部分領域 (p60_B) を用いたプルダウン実験では、GST-p60_B への Asf1 の結合は間期にのみ見られ、分裂期には見られなかった (図 3-1 2 B)。また、分裂期の卵抽出液でインキュベートした GST-p60_B タンパク質の電気泳動上の移動度が減少することも示された。これらの結果から、分裂期において、B-like 配列とその周辺領域の構造の変化やアミノ酸の化学修飾によって、Asf1 との相互作用が阻害されることが示唆された。CAF-1 の p60 サブユニットは CDK コンセンサス配列 (S/T-P-X-K/R または S/T-P) を持つ、分裂期に高リン酸化され、間期に低リン酸化/脱リン酸化されることが知られている (図 3-2 C、3-3 と (Keller and Krude, 2000; Marheineke and Krude, 1998; 新富, 2005)。また、この分裂期におけるリン酸化は、CAF-1 と Asf1 の結合性の抑制に関わることが示唆されている (新富, 2005)。従って、CAF-1 と Asf1 の相互作用は細胞周期の進行に依存し、特に、p60 サブユニットの B-like ドメインのリン酸化・脱リン酸化修飾状態に依存すると考えられる。CAF-1 による DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成には Asf1 が必要不可欠であることから、分裂期の卵抽出液においては、CAF-1 はヌクレオソーム形成活性をもたないことが示唆された。ヒト培養細胞を用いた研究においても、分裂期における CAF-1 はヌクレオソーム形成を促進できないことが示されている (Marheineke and Krude, 1998)。これらのことから、CAF-1 の Asf1 との結合活性とヌクレオソーム形成活性は細胞周期に依存し、間期に促進され、分裂期に抑制されると考えられ、よって、CAF-1-Asf1 複合体によるヌクレオソーム形成は DNA が複製される間期に限定されていることになる。

間期の卵抽出液において、ほとんどすべての HIRA が Asf1 と結合するのに対し、Asf1 と相互作用する CAF-1 はほんの一部であることが示された (図 3-3 B)。その結果に一致して、同モル数の HIRA の B ドメインと p60 の B-like ドメインを用いたプルダウン実験では、B ドメインに結合する Asf1 の量は、B-like ドメインに較べて多い (図 3-1 2 B)。また、間期の卵抽出液においても、CAF-1 の Asf1 とのアフィニティーが比較的に低いことが示唆された。この結果から p60 の Asf1 との結合は B-like ドメイン以外の領域を介する可能性も考えられたが、p60 と、その B-like 領域を HIRA の B ドメインに置換したものをを用いたプルダウン実験で、両者に結合した Asf1 の量を比較した結果、ほぼ同量であることが分かった (図 3-1 2 C)。以上の結果から、p60 と Asf1 の相互作

用は B-like ドメインに依存すること、卵抽出液で形成された CAF-1-Asf1 複合体は、B-like ドメインの性質を反映して不安定であることが示唆された。先行研究では、卵抽出液と比較して、クロマチン上に局在した CAF-1 はより高い Asf1 親和性を持つことが示されている (新富, 2005)。同様に、ショウジョウバエにおいても、CAF-1 と Asf1 は染色体に共局在することが報告されている (Tyler et al., 2001)。従って、CAF-1 と Asf1 の相互作用はクロマチンにおいてさらに安定化されると考えられる。また、CAF-1 は、その p150 サブユニットが PCNA と直接に結合することによって、DNA 複製フォークに局在することが報告されている (Shibahara and Stillman, 1999)。従って、CAF-1-Asf1 複合体の結合性は CAF-1 の DNA 複製フォークへの局在によって制御されと考えられる。よって、CAF-1 ヘテロ三量体において、p150 と PCNA の結合、あるいは p60 の化学修飾は、CAF-1 の Asf1 との親和性に影響すると考えられる。その分子機序は、CAF-1-Asf1 複合体の形成とヌクレオソーム形成の媒介を考えるために極めて重要であり、これからの重要な検討課題といえる。以上のことから、CAF-1-Asf1 複合体の形成は、CAF-1 の細胞周期依存性なリン酸化修飾とクロマチン (DNA 複製フォーク) への局在によって制御され、そのヌクレオソーム形成活性は時間・空間的に DNA 複製に共役するように調節されていると考えられる。

以上のようなヌクレオソーム形成における CAF-1 または HIRA 複合体構築の制御の違いは、両ヒストンシャペロン複合体の役割の違いに関連するものといえる。すなわち、細胞周期の進行と DNA 複製フォークへの局在に依存する調節により、CAF-1 によるヌクレオソーム形成は間期における DNA 複製の際に限られる。それに対して、HIRA によるヌクレオソーム形成は、卵成熟期における翻訳量の増加で促進されていることから、初期胚発生における迅速なゲノム DNA 複製と細胞分裂に対応したものであることが示唆された。ツメガエル卵抽出液における HIRA のクロマチン局在は、ゲノム DNA 複製にかけて結合量が増加し、複製完了後も間期の間は維持されること (図 3-3)、これに一致して、DNA 複製後のヌクレオソーム形成は HIRA によってなされることが明らかとなった (図 3-6 と 3-7)。さらに、DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成を媒介する CAF-1 がなくても、HIRA の量が充分にあれば複製されたゲノム DNA のヌクレオソーム形成を遂行できることも示された (図 3-9)。すなわち、HIRA は初期胚細胞における複製されたゲノム DNA のヌクレオソーム形成に大きく寄与するといえる。

これまでに HIRA はヒストン H3-H4 シャペロンとして、マウスとショウジョウバエの

受精後の精子クロマチンリモデリングにおいて、重要な役割を果たすことが報告されている (van der Heijden et al., 2005; Loppin et al., 2005)。マウスやショウジョウバエと異なって、ツメガエルの精子クロマチンには予めヒストン H3-H4 が含まれているため、受精卵における精子クロマチンリモデリングにはヒストン H3-H4 のシャペロンが必要ないと考えられていた (Ohsumi and Katagiri, 1991)。しかし、本研究では、HIRA は卵抽出液に添加された直後の精子クロマチン上に局在することが明らかとなり (図 3-4)、脱凝縮した精子クロマチンにヒストン H3-H4 の不足分を補うために、HIRA が必要であることが示唆された。これらの結果から、ツメガエル初期胚細胞において、HIRA は DNA 複製の有無に関わらず、ゲノム DNA へのヌクレオソーム形成を媒介し、クロマチン構造の構築と維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

4-3. ツメガエル初期胚細胞のゲノム DNA 複製におけるヒストンシャペロンの役割

真核生物のゲノム DNA が複製される際に、複製された DNA 上にヌクレオソームが速やかに形成され、そして、形成された規則正しいヌクレオソームを基づいてクロマチンの高次構造が構築される。本研究では、ツメガエル卵抽出液を用いて、複製されたゲノム DNA のクロマチン再構築におけるヒストンシャペロンの役割分担が明らかにされた。まず、ツメガエル卵抽出液においては、大部分のヌクレオソームがゲノム DNA 複製に共役し、複製された直後の DNA 上に形成される (図 3-6 B)。それに加えて、成熟なクロマチン高次構造を構築するために、DNA 複製後のヌクレオソーム形成も必要不可欠である (図 3-6 B)。従って、初期胚細胞における迅速なゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成は、DNA 複製に共役するものと共役しないものの二段階に分けてなされることが示された。

卵抽出液から HIRA-Asf1 複合体を免疫除去しても、大部分のヌクレオソーム形成が複製直後に正常になされることから (図 3-7 B、 Δ HIRA)、HIRA は DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成への寄与は小さいことが示された。すなわち、CAF-1-Asf1 複合体は、DNA 複製反応に共役するヌクレオソーム形成のほとんどを媒介し、短時間で複製された大部分のゲノム DNA のヌクレオソーム形成を媒介できることから、そのヌクレオソーム形成活性は高いといえる。これは、ツメガエル初期胚細胞では、迅速にゲノム DNA

複製を完了させるために、通常な体細胞に較べて数多くの複製開始点を利用して DNA 複製を遂行していることと関連すると考えられる(Hyrien et al., 1995)。しかし、ゲノム DNA の複製に伴うヌクレオソーム形成には、CAF-1 によるヌクレオソーム形成だけでは不十分であることが本研究で示された(図 3-7)。CAF-1 は PCNA と相互作用して DNA 複製装置に共役して働くと考えられ(図 3-3)、その活性は一過性であり、CAF-1-Asf1 複合体は複製装置が通過した後の DNA 上のヌクレオソーム形成を媒介できない可能性がある。例えば、異なる複製開始点から複製された二つの DNA 断片らを連結した後のヌクレオソーム形成は、CAF-1-Asf1 複合体によって完了できないと考えられる。従って、ゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成は複製に共役するまたは共役しない二段階に分けて行う必要があるといえる。このことは、ツメガエル初期胚細胞だけではなく、すべての真核細胞に共通したメカニズムと考えられる。

本研究では、DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成の不足を補うために、HIRA-Asf1 複合体は複製終了後にもクロマチンに局在し続け(図 3-3)、複製に共役しないヌクレオソームの形成を媒介することが示唆された(図 3-6B と 3-7)。さらに、CAF-1 がなくても、十分量の HIRA があれば複製されたゲノム DNA におけるヌクレオソーム形成が充分に行われることが示された(図 3-8)。このことから、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成の活性は、HIRA-Asf1 複合体に量的に依存することが示唆された。従って、DNA 複製が盛んなツメガエル初期胚細胞には、他の細胞に較べて、HIRA が相対的に多く含まれていることは、速い DNA 複製に同調した迅速なヌクレオソーム形成を媒介するのに適しているといえる。これらの結果から、HIRA-Asf1 複合体は、複製されたゲノム DNA のヌクレオソーム形成を確実に完了させ、ヌクレオソームが規則正しく配列されたクロマチン構造が再構築されるのを保証していると考えられる。

まとめると、DNA 複製に共役する CAF-1-Asf1 複合体は効率良くヌクレオソームの形成を媒介できるが、その機能は DNA 複製に特化したものであるのに対し、HIRA-Asf1 複合体は DNA 複製に共役せず、DNA へのヒストンの結合を直接に媒介する。この二つの経路によって、すべての DNA 上の迅速かつ正確なヌクレオソーム形成が保証され、それに基づいてクロマチンの高次構造が構築されると考えられる(図 4-2)。同様に、Hela 細胞のゲノム DNA 複製においても、CAF-1 は複製された直後の DNA 上にヌクレオソーム形成を媒介し、HIRA はヌクレオソームフリー DNA 上のヌクレオソーム形成を DNA 複製に共役せずに媒介することが示唆されている(Ray-Gallet et al., 2011)。よって、ヌクレ

オソーム形成を媒介するヒストンシャペロン複合体が真核生物において進化的に高度に保存されているだけでなく、そのヌクレオソーム形成における役割分担もすべての真核細胞に共通のものと考えられる。

4-4. DNA複製に共役しないヌクレオソーム形成における HIRA の分子機序

ヌクレオソームの形成を媒介する二つのヒストン H3-H4 シャペロンのうち、HIRA-Asf1 複合体は細胞周期を通じて存在し、ヌクレオソーム形成活性を恒常的に維持することから、HIRA-Asf1 複合体は空間的または時間的な制約がなく、すべてのゲノム DNA のヌクレオソーム形成を促進できるといえる。また、HIRA-Asf1 複合体によるヌクレオソーム形成は、DNA 複製と共役した調節が必要ない分、CAF-1 によるものよりしくみが単純であろうと期待される。

本研究では、ツメガエル卵抽出液におけるプラスミド DNA のスーパーコイリング活性によって、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成を誘起した。これを用いた解析により、HIRA-Asf1 複合体が DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成を媒介することが確認された (図 3-9 A と (Ray-Gallet et al., 2007))。また、そのヌクレオソームの形成は HIRA のタンパク質量に依存して行われることから (図 3-9 E と F)、HIRA の調節によって DNA にヒストンが結合することが明らかとなった。すなわち、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成において、HIRA が本質的に重要であることが判明した。また、ヌクレオソーム形成に必要な HIRA の機能領域を解析した結果、WD40 ドメインと B ドメインから構成された N 末端領域はヌクレオソーム形成に十分であることが示された (図 3-1 1)。そのうち、B ドメインは、Asf1 と相互作用するために必須である (図 3-1 2 B と Tang et al., 2006)。しかし、Asf1 は直接ヒストン H3-H4 二量体と結合するが (図 3-3 B と (English et al., 2006; Natsume et al., 2007)、単独ではヌクレオソーム形成を媒介することができず (図 3-6 と 3-9)、ヒストンシャペロン複合体へのヒストン供給に重要な役割を果たすと考えられる。従って、HIRA の WD40 ドメインは、DNA へのヒストンの結合を媒介すると考えられる。WD40 リピートは、複数の立体構造が類似している WD リピートユニットから構成されたタンパク質同士間の相互作用の構築基盤であり、ヒストンシャペロン、ヒストンメチルトランスフェラーゼやクロマチンリモ

デリリング複合体などの複数のヒストン・クロマチン調節因子に存在することが知られている (Qian et al., 1993; Tyler et al., 1996; Wysocka et al., 2005; Xue et al., 1998)。それにもかかわらず、ヌクレオソーム形成における WD40 リピートの機能については、これまでほとんど検討がなされてこなかった。近年の研究から、ヒト HIRA タンパク質の WD40 ドメインの 5 番目の WD リピート (WD5) は、進化的に保存された HIRA 複合体の構成因子である UBN-1 と相互作用することが示された (Banumathy et al., 2009)。さらに、UBN-1 はヒストン H3.3 変異体の特有なアミノ酸残基を認識・結合することで、ヒストンシャペロン複合体のヒストン変異体の選択に重要な役割を果たすことが示唆された (Daniel Ricketts et al., 2015)。また、CAF-1 三量体構成因子の一つである p48 は HIRA の WD40 ドメインと相互作用し、HIRA-Asf1 複合体にも含まれること (Ahmad et al., 2003; Verreault et al., 1996)、結晶構造解析によって p48 は H3-H4 二量体と直接に結合できることが示された。p48 は、ヒストンシャペロンだけではなく、ヒストンメアセチル化酵素 (HAT1)、脱アセチル化酵素 (HDAC1)、チルトランスフェラーゼ (ESC-E(Z)) やヌクレオソームリモデリング複合体 (NURF) などの複数のヒストン・クロマチン調節複合体に属することも報告されていることから (Martínez-Balbás et al., 1998; Martini et al., 1998; Müller et al., 2002; Tyler et al., 1996)、ヒストンの挙動を制御する重要な因子であると考えられている。これらのことから、HIRA の WD40 ドメインは、ヒストン H3-H4 と相互作用し、ヌクレオソーム形成におけるヒストンの調節に役割を果たすものと考えられる。

本研究ではヌクレオソーム形成に必要な WD リピートを同定したところ、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成の媒介に HIRA の 1 番目から 3 番目 (WD1-3) のリピートは必要だが、5 番目から 7 番目 (WD5-7) は必須ではないことが明らかとなった (図 3-10D)。また、ヌクレオソーム形成に必要な 3 つの WD リピート (WD1-3) についてのさらなる解析の結果、WD1 と WD3 があれば、野生型 HIRA と同様にヌクレオソームの形成を媒介できるが (図 3-10E、 Δ WD2)、両 WD リピートを同時に欠損した変異体は、ヌクレオソーム形成活性を持たないことが示された (図 3-10G、 Δ WD1WD3)。このことから、WD1 と WD3 は DNA へのヒストンの結合に必要かつ十分であることが明らかとなった。そのうえ、WD1 または WD3 だけでも、ヌクレオソーム形成活性を部分的に回復できることから (図 3-10G、 Δ WD1-2 と Δ WD2-3)、これらの WD リピートはヌクレオソーム形成において重複した役割を果たすことが示唆された。一方、WD2

リピートは、ヌクレオソームの形成を単独では媒介できないが（図 3-10G、 Δ WD1WD3）、WD1 または WD3 を欠損した変異体に十分なヌクレオソーム形成活性を維持するために必要であることも示された（図 3-10F、 Δ WD1 と Δ WD3）。この結果から、ヌクレオソーム形成において、WD1 と WD3 リピートが主に機能し、WD2 リピートは補助的な役割を果たすことが示唆された。以上のことから、ヌクレオソーム形成におけるヒストンタンパク質の制御には WD1 と WD3 が最も重要であることが示唆された。従って、WD1-3 リピートと相互作用するヒストン調節因子はヌクレオソーム形成における DNA へのヒストン結合の媒介に大きく寄与すると考えられる。これらの WD リピートに結合する因子を同定することは、ヌクレオソーム形成の分子機序を解明するための重要な一歩になる。一方、これまでの研究から、WDR5 や p48 などのいくつかの WD40 リピートタンパク質が、特定の WD リピートを介してヒストンタンパク質と直接に相互作用することが報告されており（Couture et al., 2006; Song et al., 2008）、WD1-3 リピートが直接にヒストンタンパク質と相互作用する、すなわち、HIRA の WD40 ドメインが直接にヒストンの挙動を調節する可能性も考えられる。いずれの分子機序においても、HIRA タンパク質の N 末は、ヒストンシャペロン複合体の構築に必要な足場となっているだけでなく、ヒストンの供給と DNA への結合の媒介という二つの機能をはたしており、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成の機能的な中心部分であるといえる。HIRA の WD40 リピートと B ドメインのアミノ酸配列、そして、両ドメイン間のリンカー領域のアミノ酸配列の長さは進化的に高度に保存されていることから（分裂酵母では Hir1 に保存される）、このヌクレオソーム形成における HIRA の構造、機能的特質はツメガエルだけではなく、その他の生物種でも維持されていると考えられる。従って、真核生物においてコアヒストン H3-H4 が高度に保存されているのに対応して、DNA 複製に共役しないヌクレオソームの形成を媒介する HIRA の分子機序も保存されていることが示唆される。

4-5. HIRA と CAF-1 のヌクレオソーム形成モジュールの違い

WD40 リピートと B ドメインから構成されたヌクレオソーム形成モジュールは、HIRA タンパク質または Hir 複合体にだけに保存されているのではなく、CAF-1 複合体にも同様

の構造が含まれている。すなわち、CAF-1 の p60 サブユニットは WD40 リピートと、B ドメインに類似する B-like ドメインを持っている。それにもかかわらず、卵抽出液における内在性 CAF-1 複合体は DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成を媒介できない (図 3-6 と 3-9A)。しかし、p60 単独では、その活性が HIRA と較べて極めて低いものの、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成を媒介できることが示された (図 3-12)。従って、CAF-1 による DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成の分子機序は、HIRA による DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成の分子機序と、共通の面と異なる面をもつことが示唆された。

HIRA の B ドメインに比較して、卵抽出液における p60 の B-like ドメインの Asf1 アフィニティーが極めて低いことが示された (図 3-13B)。このことは、卵抽出液中の CAF-1 複合体はほとんど Asf1 と結合していないことと一致した。また、HH と HC 変異体の比較から、ヌクレオソーム形成活性が各々の変異体に結合した Asf1 に量的に依存することが示唆された (図 3-14)。よって、卵抽出液における CAF-1 と結合する Asf1 の量が少ないため、DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成に必要なヒストンタンパク質が十分に供給されないと考えられる。一方、CAF-1 複合体は DNA 複製フォークに局在することで、その Asf1 とのアフィニティーが高められることから (考察 4-2 に参考)、CAF-1 のヌクレオソーム形成活性は DNA 複製に依存すると考えられる。

さらに、HH と CH 変異体の比較から、HIRA の WD40 ドメインは、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成の活性に決定的に重要であることが示唆された (図 3-14)。よって、HIRA の WD40 ドメインとの違いは p60 のヌクレオソーム形成活性の低下の最も重要な原因であると考えられる。CAF-1 ヘテロ三量体が形成される際に p150 は p60 に結合し (Kaufman et al., 1995)、ヒストンタンパク質と相互作用できる p48 は p150 と相互作用することが知られている (Tyler et al., 2001)。さらに、近年の研究から、p150 はヒストン(H3-H4)₂ 四量体の形成に寄与することも報告されている (Liu et al., 2016)。従って、p60 以外の CAF-1 サブユニットもヒストンの挙動の制御に寄与すると考えられる。しかし、ツメガエル卵抽出液中のほとんどの p150 は CAF-1 複合体を形成し、添加した p60 や CH 変異体に p150 が結合できないため (データ未掲載)、本研究では、p60 の WD40 ドメインがもつヌクレオソーム形成活性を測定するための条件が最適化されていなかった可能性も考えられる。また、CAF-1 によるヌクレオソーム形成は DNA 複製に依存するものであることから、DNA へのヒストンの結合を媒介するために、

DNA 複製フォークに CAF-1 複合体が局在化すること、もしくは複製フォークに含まれる因子が必要であることも考えられる。DNA 複製フォークに局在化することで、CAF-1 複合体の Asf1 とのアフィニティーが高められる可能性が考えられ (考察 4-2 に参考)、同様に、PCNA と p150 サブユニットの結合は、p60 の WD40 ドメインを含む CAF-1 複合体の立体構造の変化やヒストンまたはヒストン調節因子との親和性の増加を引き起して、WD40 ドメインによるヌクレオソーム形成活性を高める可能性が考えられる。一方、DNA 複製フォークの構成因子である MCM2 がヒストン H3-H4 と相互作用し、ヒストンシャペロンのような役割を果たすことも報告されている (Richet et al., 2015)。従って、CAF-1 複合体がこれらの DNA 複製フォークの構成因子と相互作用することで、ヌクレオソーム形成活性が高められる可能性も考えられる。本研究の結果は、いずれの分子機序においても、卵抽出液では、CAF-1p60 の WD40 ドメインが DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成には適していないことを示している。

以上のことから、HIRA 及び CAF-1 のヌクレオソーム形成活性は、複合体に結合した Asf1 の量、つまり、供給されたヒストンの量に量的に依存すること、また、HIRA の WD40 ドメインはヌクレオソーム形成に極めて重要であることが示された。従って、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成には HIRA の WD40 と B ドメインが中心的な役割を果たし、この領域に、HIRA による DNA へのヒストン結合を媒介するしくみが備わっていることが判明した。一方、CAF-1 による DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成の分子機序は重要な課題として残されている。

4-6. HIRA 複合体のクロマチン結合と核内蓄積の制御

ヌクレオソーム形成において、ヒストンシャペロンはヌクレオソーム形成の場に局在化し、DNA へのヒストンの結合を媒介する。これまでの研究から、ヌクレオソーム形成サイトへの局在は、いくつかのヒストンシャペロンのヌクレオソーム形成活性の制御に重要な役割を果たすことが知られている (Krawitz et al., 2002; Liu et al., 2010; Muto et al., 2007; Zhang et al., 2016)。本研究では、HIRA はツメガエル卵抽出液中に形成された核内に蓄積し、そして、クロマチンに局在することが確認された (図 3-15)。同様に、複数の体細胞を用いた研究から、HIRA は核内に蓄積すること (Blackwell et al.,

2004; Hall et al., 2001; Sherwood et al., 1993)、また、クロマチン上のヌクレオソーム形成サイトに局在することが示されている(Ray-Gallet et al., 2011; Schneiderman et al., 2012)。従って、HIRA は、未分化または分化した真核細胞において、積極的に核内に局在するといえる。これらの核内局在は、HIRA-Asf1 複合体のヌクレオソーム形成活性の調節に役割を果たすと予測される。

本研究では、HIRA は卵抽出液に添加された直後の精子クロマチンに局在し、ゲノム DNA が複製される際に、そして、完了された後にも局在し続けることが明らかとなった(図 3-4)。このことから、HIRA 複合体のクロマチン局在は、DNA 複製反応に共役せず、クロマチン全体にわたった広範囲に結合することが示唆された。ヒトの培養細胞やショウジョウバエ細胞においても、HIRA はヌクレオソームが形成されていなかったゲノム DNA に局在し、そのサイトへのヒストンの結合を促進することが知られている(Ray-Gallet et al., 2011; Schneiderman et al., 2012)。従って、HIRA のクロマチン局在は、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成に対応し、ヒストンシャペロン複合体のヌクレオソーム形成活性を制御すると考えられる。また、一連の欠損変異体を用いた解析から、HIRA のクロマチン局在には N 末の WD40 ドメインと B ドメインが必要なく、C 末の Hir ドメインが必要であることが明らかとなった(図 3-17 と 3-18C)。Hir ドメインは、すべての真核生物に進化的に保存され(分裂酵母では Hir2 に保存される、(Kirov et al., 1998; Lamour et al., 1995))、HIRA 複合体の構成因子である CABIN1 と相互作用に必要であることが知られている(Rai et al., 2011; Tagami et al., 2004)。卵抽出液を用いたプルダウン実験から、Hir ドメインがツメガエル HIRA の CABIN1 との結合に大きく寄与することも示された(図 3-18D)。従って、HIRA のクロマチン結合は CABIN-1 に依存する可能性が示唆された。CABIN1 は酵母からヒトまで保存され、いくつかの細胞では HIRA と共局在することが報告されているが(Nashun et al., 2015; Rai et al., 2011; Ray-Gallet et al., 2011)、そのシャペロン機能に関してはほとんど解明されていない。一方、近年の研究から、CABIN1 はカルシニューリンシグナル伝達経路において、遺伝子転写抑制因子として重要な役割を果たしていることが示されている(Sun et al., 1998; Youn and Liu, 2000)。CABIN1 は、同じく遺伝子転写抑制因子である MEF-2 と相互作用し、MEF-2 を介して DNA に結合していることが報告されている(Han et al., 2003)。以上の結果から、HIRA 複合体は CABIN-1 を介して直接に裸の DNA 分子に結合ことが示唆される。ヌクレオソームが形成されていない裸の DNA と直接に結

合し、ヌクレオソーム形成の場所を速やかに決定することは、DNA複製に共役しないヌクレオソーム形成を媒介する HIRA-Asf1 複合体に適したしくみだと考えられる。このモデルは、ヒト培養細胞を用いた研究と一致することから、すべての真核生物に共通と考えられる。しかし、MEF-2 は転写調節因子であり、一般的に DNA 上の A/T-rich *cis*-element に結合すると言われているため、ゲノム全体に渡って局在する HIRA-Asf1 複合体にはその他の DNA・クロマチン結合因子が存在する可能性も考えられる。よって、結合因子の同定は、真核生物の HIRA-Asf1 または Hir-Asf1 複合体のクロマチン局在の分子機序を理解するための重要課題である。以上の結果から、HIRA のクロマチン・DNA 局在はヌクレオソーム形成活性に必要なと考えられるが、HIRA のヌクレオソーム形成のための機能ユニット (WD40 と B ドメイン) はその細胞内局在制御には関与しないことが明らかとなった。従って、HIRA のヌクレオソーム形成活性とクロマチン・DNA 結合活性は、それぞれ異なる領域によって担われているといえる。クロマチン局在に寄与する Hir ドメインは進化的に高度に保存されているが、酵母の Hir 複合体では、ヌクレオソーム形成の機能ユニットが保存された Hir1 ではなく、別のサブユニット (Hir2) に存在する。そのため、高等真核生物の HIRA タンパク質は進化の過程で異なる二つのタンパク質が融合されたものである可能性が示唆される。従って、Hir ドメインはクロマチンへの HIRA の局在を調節する機能ユニットと考えることができ、その局在の分子機序も、ヌクレオソーム形成のための機能ユニットと同様に保存されている可能性が考えられる。

次に、卵抽出液における HIRA の核内蓄積に必要なドメインの同定を試みたところ、HIRA の核内蓄積は Asf1 と相互作用する B ドメインが必要ではないことが示された (図 3-16A)。培養細胞のヒストンタンパク質が発現・核輸送される際に、Asf1 がヒストンシャペロンとして、ヒストンと直接に結合して調節することが報告されている。Asf1 と結合したコアヒストン H3-H4 二量体が、importin-4 もしくは Kap123 との相互作用によって核内に輸送される (Campos et al., 2010; Keck and Pemberton, 2012)。しかし、HIRA の核輸送は Asf1 との結合は不必要であるため、HIRA がヒストンタンパク質と異なる経路によって核内に蓄積されることが示唆された。変異体を用いたさらなる解析の結果、HIRA の核内蓄積は主に N 末の WD40 ドメインと C 末の部分領域 (Ct2 と Ct3) に依存することが明らかとなった (図 3-16B)。出芽酵母の Hir1 と Hir2 タンパク質には核局在シグナル (NLS) が存在し、それを介してそれぞれ核内に輸送されると考え

られている(Sherwood et al., 1993)。しかし、ツメガエルを含む多細胞真核生物の HIRA タンパク質には機能的な核局在シグナルが見いだされない。従って、高等真核生物の HIRA 複合体の核内局在の分子機序は単細胞真核生物(酵母)の Hir 複合体と異なって、進化の過程において新たに獲得したものかもしれない。本研究では HIRA の核内蓄積に必要な最少領域の同定まで至らなかった。その原因として、HIRA-Asf1 複合体の核内蓄積は、核内輸送だけではなく、核外輸送や核マトリックスへの結合など複数のプロセスによって制御される可能性が考えられる。これからの研究では、HIRA 複合体の核内蓄積の分子機序について、ツメガエル以外の高等真核生物においてさらなる検討が必要である。

また、本研究から HIRA の C 末によく保存された領域は、HIRA-Asf1 複合体の核内蓄積とクロマチン結合の両方に寄与することが示された。そのうち、Hir ドメインは HIRA のクロマチン結合に必要であるが、ヒストンシャペロン複合体の核局在に必要ではないことから(図 3-1 8 C)、ヒストンシャペロン複合体の二つの核内局在は各々の分子機序によって独自に制御されることが示唆された。さらに、核内における HIRA のクロマチン結合量は、核内蓄積量に比例した一定の値となることが判明した(図 3-1 6 A、IBB+ と IBB-を比較する)。このことから、ツメガエル初期胚細胞における速いヌクレオソーム形成に備えて、HIRA が細胞核内に積極的に蓄積し、充分量のヒストンシャペロン複合体を用意する必要性が示唆された。つまり、HIRA-Asf1 複合体の核内蓄積により、より多くのシャペロン複合体がヌクレオソームの形成されていない DNA に結合することで、より多くのヌクレオソーム形成が媒介されることが考えられる。一方、先行研究から、DNA 複製フォークへの CAF-1 の局在は、CAF-1 と Asf1 の結合性、そして、ヒストンシャペロンとしたヌクレオソーム形成活性に必要であることが示されている(Zhang et al., 2016; 新富, 2005)。しかし、クロマチンに結合しない HIRA の N 末は、Asf1 と恒常的に相互作用し、そして、ヌクレオソームの形成を媒介することから(図 3-1 0 B と C)、HIRA のクロマチン結合は、ヒストンシャペロン複合体の安定化、そして、ヌクレオソーム形成の媒介に関与しないと考えられる。HIRA-Asf1 複合体は、真核細胞の遺伝子の転写、精子クロマチンリモデリングやヘテロクロマチン構築などの様々な DNA プロセスにおける DNA 複製に共役しないヌクレオソームの形成を媒介することが報告されている。DNA 複製に特化した CAF-1 と異なり、HIRA は、様々なプロセスにおいて、ヌクレオソームが形成されていない DNA を正確に認識し、そのサイトへのヒストン結合

を速やかに媒介する分子機序が必要とされることから、HIRA のクロマチン結合の調節機構は多様であると予想される。

4-7. まとめ

クロマチンの基本単位構造であるヌクレオソームが厳密に保存されるヌクレオソームコアと多様性に富むヒストンテールに分かれて、それぞれ真核生物の遺伝情報の保全と遺伝子発現の調節に大きく寄与する。ヌクレオソームは、DNA 複製、転写や組み換えなどのプロセスにおいて、解離と再形成が繰り返される。これまでに、ヌクレオソーム形成における DNA へのヒストン H3-H4 結合の促進因子として、DNA 複製に依存する CAF-1-Asf1 複合体と依存しない HIRA-Asf1 複合体の二つのヒストンシャペロンが同定されているが、細胞の様々なプロセス（特にゲノム DNA の複製）においてどの様な役割を分担するのか明確にされなかった。また、これらのヒストンシャペロンがヌクレオソーム形成における DNA へのヒストンの結合を媒介すると知られているが、その分子機序がほとんど解明されなかった。

本学位論文研究では、ツメガエル初期胚細胞におけるゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成について検討した結果、複製されたゲノム DNA 上に完全なヌクレオソーム形成には、CAF-1 と HIRA 両複合体が共に必要であることが示された。これらの二つのヒストンシャペロン複合体が真核生物で高く保存されていることから、この役割分担はツメガエル初期胚細胞だけではなく、すべての真核生物に適用できる可能性が示された。また、DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成を媒介する HIRA の分子機序を解析した結果、HIRA がヌクレオソーム形成を媒介するヌクレオソーム形成モジュールとヒストンシャペロン複合体の細胞内局在を制御するクロマチン局在モジュールからなることが示唆された。上記のように、本研究から得られた知見は、ヌクレオソーム形成におけるヒストンシャペロンの役割分担とその形成促進の分子機序を示し、ヌクレオソーム形成におけるヒストンシャペロンの機能を全面的に理解するために大きく寄与する。従来の DNA 複製に依存するまたは依存しないヌクレオソーム形成の概念を一新し、DNA 複製反応に共役しない形成もゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成に不可欠であることを示した。また、これまでに知られなかったヒストンシャペロンによるヌクレオソ-

ム形成の分子機序を解明するための手がかりを得た。本学位論文研究の結果を踏まえて、
今後は、その他の真核細胞におけるヒストンシャペロンの役割分担のされ方を検討し、
ヒストンシャペロンのヌクレオソーム形成活性と細胞内局在を制御する調節因子の同定
を試みる必要がある。

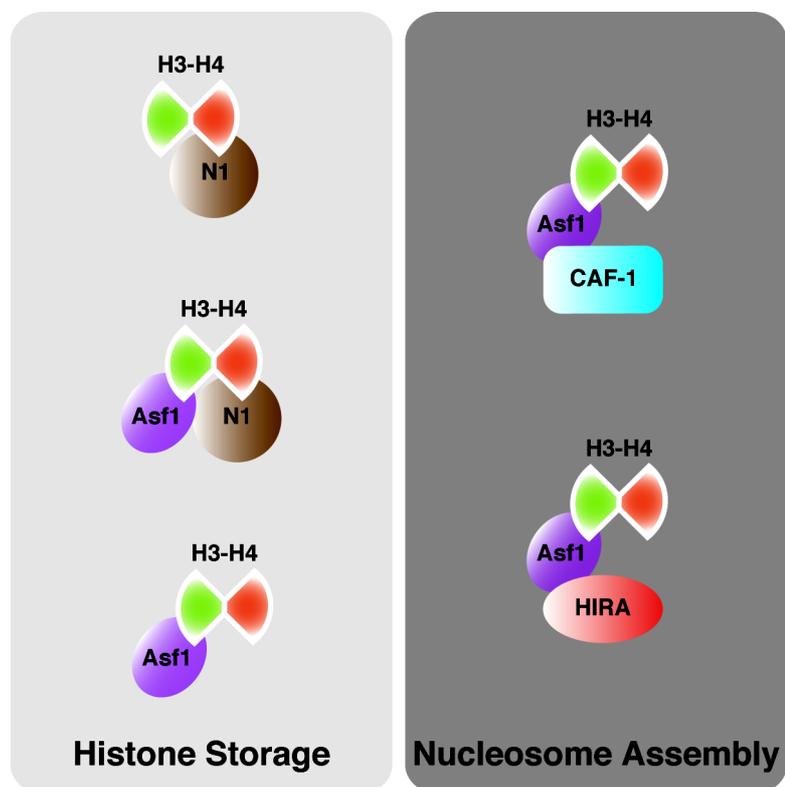


図 4-1. ツメガエル卵におけるコアヒストン H3-H4 シャペロン

ツメガエル卵におけるコアヒストン H3-H4 シャペロンの役割をモデル図で示す。N1 と Asf1 が単独もしくは複合体を形成して、細胞内の大量のヒストンタンパク質を貯蓄する(左)。Asf1 はヒストンと結合した Asf1 は HIRA または CAF-1 と相互作用し、二つのヒストンシャペロン複合体を形成し、ヌクレオソーム形成を媒介する (右)。

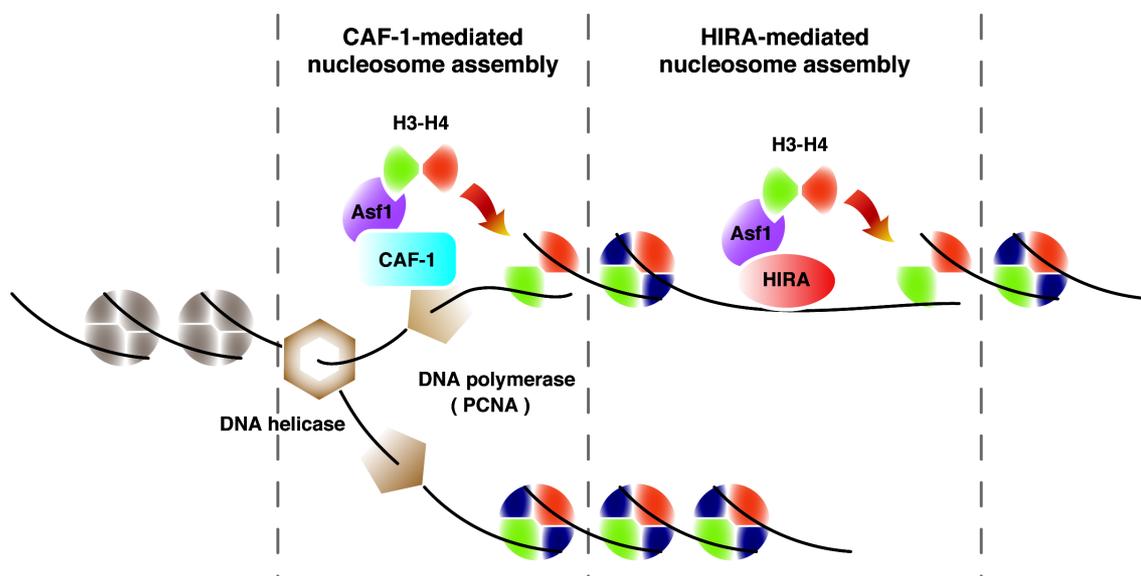


図 4-2. ゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成における CAF-1 と HIRA の役割

ゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成における HIRA 及び CAF-1 複合体の役割をモデル図で示す。CAF-1 複合体は、PCNA との相互作用を介して DNA 複製装置に協調し、複製された直後の DNA へのヒストン結合を媒介する (CAF-1-mediated nucleosome assembly)。HIRA 複合体は、DNA 複製装置が通過した後に、フリーな DNA 上のヌクレオソーム形成を促進する (HIRA-mediated nucleosome assembly)。

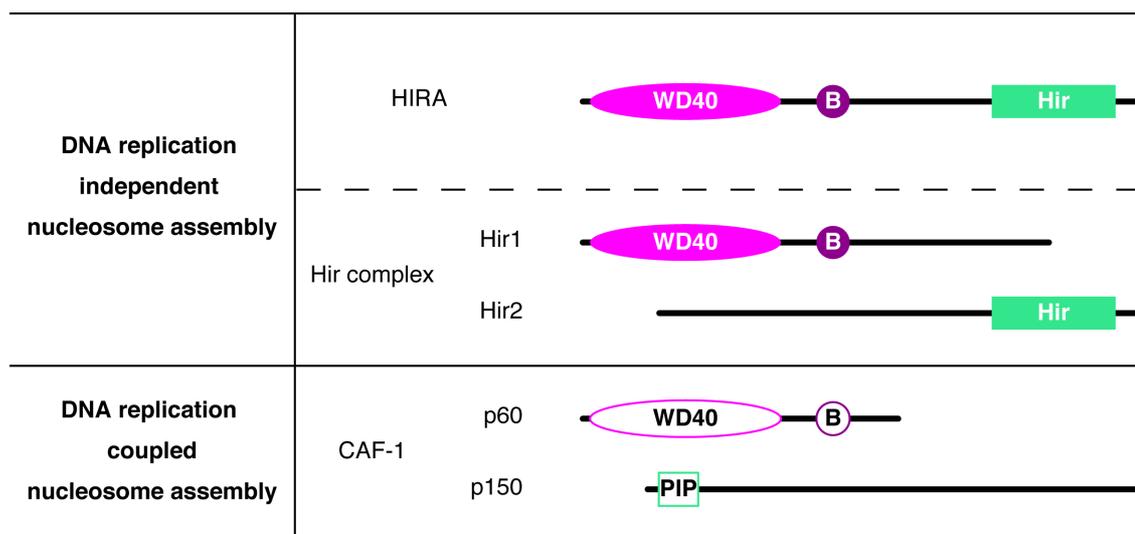


図 4-3. ヒストン H3-H4 シャペロンのヌクレオソーム形成とクロマチン結合の機能モジュール

高等真核生物の HIRA の WD40-B ドメインは Asf1 と結合し、RI-ヌクレオソームの形成を媒介するヌクレオソーム形成モジュールであり、Hir ドメインは HIRA のクロマチン結合モジュールだと考えられる。両機能モジュールはそれぞれ *S.cerevisiae* の Hir 複合体の Hir1 と Hir2 タンパク質に高度に保存されている。同様なモジュールが RC-ヌクレオソーム形成を媒介する CAF-1 複合体にも存在する。p60 には WD40 と B-like ドメインが存在し、p150 は PIP モチーフを介して PCNA と直接に結合し、DNA 複製するクロマチンに局在する。

参考文献

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002a). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* *9*, 1191–1200.

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002b). Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99 Suppl 4*, 16477–16484.

Ahmad, A., Takami, Y., and Nakayama, T. (2003). WD dipeptide motifs and LXXLL motif of chicken HIRA are necessary for transcription repression and the latter motif is essential for interaction with histone deacetylase-2 in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *312*, 1266–1272.

Aho, S., Buisson, M., Pajunen, T., Ryoo, Y.W., Giot, J.F., Gruffat, H., Sergeant, A., and Uitto, J. (2000). Ubinuclein, a novel nuclear protein interacting with cellular and viral transcription factors. *J. Cell Biol.* *148*, 1165–1176.

Akiyama, T., Suzuki, O., Matsuda, J., and Aoki, F. (2011). Dynamic replacement of histone H3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLoS Genet.* *7*, e1002279.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 10148–10152.

Avvakumov, N., Nourani, A., and Côté, J. (2011). Histone chaperones:

modulators of chromatin marks. *Mol. Cell* 41, 502–514.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.

Banumathy, G., Somaiah, N., Zhang, R., Tang, Y., Hoffmann, J., Andrade, M., Ceulemans, H., Schultz, D., Marmorstein, R., and Adams, P.D. (2009). Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells. *Mol. Cell. Biol.* 29, 758–770.

Bharath, M.M.S., Chandra, N.R., and Rao, M.R.S. (2003). Molecular modeling of the chromatosome particle. *Nucleic Acids Res.* 31, 4264–4274.

Biswas, M., Voltz, K., Smith, J.C., and Langowski, J. (2011). Role of histone tails in structural stability of the nucleosome. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002279.

Blackwell, C., Martin, K.A., Greenall, A., Pidoux, A., Allshire, R.C., and Whitehall, S.K. (2004). The *Schizosaccharomyces pombe* HIRA-like protein Hip1 is required for the periodic expression of histone genes and contributes to the function of complex centromeres. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4309–4320.

Blow, J.J., and Laskey, R.A. (1988). A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* 332, 546–548.

Blow, J.J., Gillespie, P.J., Francis, D., and Jackson, D.A. (2001). Replication origins in *Xenopus* egg extract are 5–15 kilobases apart and

- are activated in clusters that fire at different times. *J. Cell Biol.* *152*, 15–25.
- Campos, E.I., Fillingham, J., Li, G., Zheng, H., Voigt, P., Kuo, W.-H.W., Seepany, H., Gao, Z., Day, L.A., Greenblatt, J.F., and Reinberg, D. (2010). The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1343–1351.
- Charlesworth, A., Welk, J., and MacNicol, A.M. (2000). The temporal control of Wee1 mRNA translation during *Xenopus* oocyte maturation is regulated by cytoplasmic polyadenylation elements within the 3'-untranslated region. *Dev. Biol.* *227*, 706–719.
- Couture, J.-F., Collazo, E., and Trievel, R.C. (2006). Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 698–703.
- Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Lam, W.M., Skordalakes, E., Zhang, R., Franco, A.A., Brill, S.J., Adams, P.D., Berger, J.M., and Kaufman, P.D. (2003). Structure and Function of the Conserved Core of Histone Deposition Protein Asf1. *Curr. Biol.* *13*, 2148–2158.
- Daniel Ricketts, M., Frederick, B., Hoff, H., Tang, Y., Schultz, D.C., Singh Rai, T., Grazia Vizioli, M., Adams, P.D., and Marmorstein, R. (2015). Ubinuclein-1 confers histone H3.3-specific-binding by the HIRA histone chaperone complex. *Nat. Commun.* *6*, 7711.
- Dasso, M., and Newport, J.W. (1990). Completion of DNA replication is monitored by a feedback system that controls the initiation of mitosis in vitro: Studies in *Xenopus*. *Cell* *61*, 811–823.

Dilworth, S.M., Black, S.J., and Laskey, R. a (1987). Two complexes that contain histones are required for nucleosome assembly in vitro: role of nucleoplasmin and N1 in *Xenopus* egg extracts. *Cell* *51*, 1009–1018.

Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* *136*, 153–179.

Eitoku, M., Sato, L., Senda, T., and Horikoshi, M. (2008). Histone chaperones: 30 Years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 414–444.

English, C.M., Adkins, M.W., Carson, J.J., Churchill, M.E.A., and Tyler, J.K. (2006). Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell* *127*, 495–508.

Green, E.M., Antczak, A.J., Bailey, A.O., Franco, A. a, Wu, K.J., Yates, J.R., and Kaufman, P.D. (2005). Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1. *Curr. Biol.* *15*, 2044–2049.

Hake, S.B., and Allis, C.D. (2006). Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the “H3 barcode hypothesis”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 6428–6435.

Hake, S.B., Garcia, B. a, Duncan, E.M., Kauer, M., Dellaire, G., Shabanowitz, J., Bazett-Jones, D.P., Allis, C.D., and Hunt, D.F. (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J. Biol. Chem.* *281*, 559–568.

- Hall, C., Nelson, D.M., Ye, X., Baker, K., DeCaprio, J.A., Seeholzer, S., Lipinski, M., and Adams, P.D. (2001). HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 1854–1865.
- Han, A., Pan, F., Stroud, J.C., Youn, H.D., Liu, J.O., and Chen, L. (2003). Sequence-specific recruitment of transcriptional co-repressor Cabin1 by myocyte enhancer factor-2. *Nature* *422*, 730–734.
- Hansen, J.C., Nyborg, J.K., Luger, K., and Stargell, L.A. (2010). Histone chaperones, histone acetylation, and the fluidity of the chromogenome. *J. Cell. Physiol.* *224*, 289–299.
- Harvey, A.C., and Downs, J.A. (2004). What functions do linker histones provide? *Mol. Microbiol.* *53*, 771–775.
- Hasebe, T., Kajita, M., Iwabuchi, M., Ohsumi, K., and Ishizuya-Oka, A. (2011). Thyroid hormone-regulated expression of nuclear lamins correlates with dedifferentiation of intestinal epithelial cells during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Dev. Genes Evol.* *221*, 199–208.
- Haushalter, K.A., and Kadonaga, J.T. (2003). Chromatin assembly by DNA-translocating motors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 613–620.
- van der Heijden, G.W., Dieker, J.W., Derijck, A.A.H.A., Muller, S., Berden, J.H.M., Braat, D.D.M., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2005). Asymmetry in Histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech. Dev.* *122*, 1008–1022.

Heintz, N. (1991). The regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta* *1088*, 327–339.

Henikoff, S., Furuyama, T., and Ahmad, K. (2004). Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet.* *20*, 320–326.

Hirano, T., and Mitchison, T.J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* *79*, 449–458.

Hyrien, O., Maric, C., and Mechali, M. (1995). Transition in specification of embryonic metazoan DNA replication origins. *Science* *270*, 994–997.

Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T.M., Sawada, W., and Kishimoto, T. (2000). Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts. *EMBO J.* *19*, 4513–4523.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074–1080.

Jiang, C., and Pugh, B.F. (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 161–172.

Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., Kamada, F., Hihara, S., Takata, H., Ishikawa, T., and Maeshima, K. (2012). Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. *Nucleus* *3*, 404–410.

Kaufman, P.D., Kobayashi, R., Kessler, N., and Stillman, B. (1995). The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: A molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* *81*, 1105–1114.

Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1997). Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes Dev.* *11*, 345–357.

Kaufman, P.D., Cohen, J.L., and Osley, M.A. (1998). Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chromatin assembly factor I. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 4793–4806.

Keck, K.M., and Pemberton, L.F. (2012). Histone chaperones link histone nuclear import and chromatin assembly. *Biochim. Biophys. Acta* *1819*, 277–289.

Keller, C., and Krude, T. (2000). Requirement of Cyclin/Cdk2 and protein phosphatase 1 activity for chromatin assembly factor 1-dependent chromatin assembly during DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* *275*, 35512–35521.

Kirov, N., Shtilbans, A., and Rushlow, C. (1998). Isolation and characterization of a new gene encoding a member of the HIRA family of proteins from *Drosophila melanogaster*. *Gene* *212*, 323–332.

Kleinschmidt, J.A., Dingwall, C., Maier, G., and Franke, W.W. (1986). Molecular characterization of a karyophilic, histone-binding protein:

cDNA cloning, amino acid sequence and expression of nuclear protein N1/N2 of *Xenopus laevis*. *EMBO J.* *5*, 3547–3552.

Kleinschmidt, J.A., Seiter, A., and Zentgraf, H. (1990). Nucleosome assembly in vitro: separate histone transfer and synergistic interaction of native histone complexes purified from nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.* *9*, 1309–1318.

Kose, S., Imamoto, N., Tachibana, T., Shimamoto, T., and Yoneda, Y. (1997). Ran-unassisted nuclear migration of a 97-kD component of nuclear pore-targeting complex. *J. Cell Biol.* *139*.

Krawitz, D.C., Kama, T., and Kaufman, P.D. (2002). Chromatin assembly factor I mutants defective for PCNA binding require Asf1 / Hir proteins for silencing. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 614–625.

Krude, T. (1995). Chromatin assembly factor 1 (CAF-1) colocalizes with replication foci in HeLa cell nuclei. *Exp. Cell Res.* *220*, 304–311.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.

Lamour, V., Lecluse, Y., Desmaze, C., Spector, M., Bodescot, M., Aurias, A., Osley, M.A., and Lipinski, M. (1995). A human homolog of the *S. cerevisiae* HIR1 and HIR2 transcriptional repressors cloned from the DiGeorge syndrome critical region. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 791–799.

Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., and Finch, J.T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* *275*, 416–420.

- Le, S., Davis, C., Konopka, J.B., and Sternglanz, R. (1997). Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 1029–1042.
- Lemaire, P., Garrett, N., and Gurdon, J. (1995). Expression cloning of Siamois, a xenopus homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis. *Cell* *81*, 85–94.
- Liu, W.H., Roemer, S.C., Zhou, Y., Shen, Z.J., Dennehey, B.K., Balsbaugh, J.L., Liddle, J.C., Nemkov, T., Ahn, N.G., Hansen, K.C., Tyler, J., and Churchill, M.E. (2016). The Cac1 subunit of histone chaperone CAF-1 organizes CAF-1-H3/H4 architecture and tetramerizes histones. *elife* *5*, 213–221.
- Liu, Y., Huang, H., Zhou, B.O., Wang, S.S., Hu, Y., Li, X., Liu, J., Zang, J., Niu, L., Wu, J., Zhou, J.Q., Teng, M., and Shi, Y. (2010). Structural analysis of Rtt106p reveals a DNA binding role required for heterochromatin silencing. *J. Biol. Chem.* *285*, 4251–4262.
- Lohka, M.J., and Masui, Y. (1983). Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science* *220*, 719–721.
- Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurençon, A., Karr, T.L., and Couble, P. (2005). The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature* *437*, 1386–1390.
- Lorain, S., Quivy, J.P., Monier-Gavelle, F., Scamps, C., Lécuse, Y., Almouzni, G., and Lipinski, M. (1998). Core histones and HIRIP3, a

novel histone-binding protein, directly interact with WD repeat protein HIRA. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 5546–5556.

Loyola, A., and Almouzni, G. (2004). Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* *1677*, 3–11.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251–260.

Marheineke, K., and Krude, T. (1998). Nucleosome assembly activity and intracellular localization of human CAF-1 changes during the cell division cycle. *J. Biol. Chem.* *273*, 15279–15286.

Martínez-Balbás, M.A., Tsukiyama, T., Gdula, D., and Wu, C. (1998). *Drosophila* NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 132–137.

Martini, E., Roche, D.M., Marheineke, K., Verreault, A., and Almouzni, G. (1998). Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. *J. Cell Biol.* *143*, 563–575.

Mello, J.A., Silljé, H.H.W., Roche, D.M.J., Kirschner, D.B., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2002). Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep.* *3*, 329–334.

Moggs, J.G., Grandi, P., Quivy, J., Jónsson, Z.O., Hübscher, U., and

- Becker, P.B. (2000). A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1206-1218
- Müller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E., and Simon, J.A. (2002). Histone methyltransferase activity of a drosophila polycomb group repressor complex. *Cell* *111*, 197–208.
- Munakata, T., Adachi, N., Yokoyama, N., Kuzuhara, T., and Horikoshi, M. (2000). A human homologue of yeast anti-silencing factor has histone chaperone activity. *Genes to Cells* *5*, 221–233.
- Murakami, M.S., and Vande Woude, G.F. (1998). Analysis of the early embryonic cell cycles of *Xenopus*; regulation of cell cycle length by *Xe-wee1* and *Mos*. *Development* *125*, 237–248.
- Murray, A.W. (1991). Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol.* *36*, 581–605.
- Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* *339*, 275–280.
- Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T., and Horikoshi, M. (2007). Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4285–4290.
- Nashun, B., Hill, P.W.S., Smallwood, S.A., Dharmalingam, G., Amouroux, R., Clark, S.J., Sharma, V., Ndjetehe, E., Pelczar, P.,

- Festenstein, R.J., Kelsey, G., and Hajkova, P. (2015). Continuous histone replacement by Hira is essential for normal transcriptional regulation and de novo DNA methylation during mouse oogenesis. *Mol. Cell* *60*, 611–625.
- Natsume, R., Eitoku, M., Akai, Y., Sano, N., Horikoshi, M., and Senda, T. (2007). Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4. *Nature* *446*, 338–341.
- Newport, J., and Kirschner, M. (1982). A major developmental transition in early xenopus embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* *30*, 675–686.
- Ohsumi, K., and Katagiri, C. (1991). Characterization of the ooplasmic factor inducing decondensation of and protamine removal from toad sperm nuclei: Involvement of nucleoplasmin. *Dev. Biol.* *148*, 295–305.
- Ohsumi, K., Katagiri, C., and Kishimoto, T. (1993). Chromosome condensation in *Xenopus* mitotic extracts without histone H1. *Science* *262*, 2033–2035.
- Ohsumi, K., Yamamoto, T.M., and Iwabuchi, M. (2006). Oocyte extracts for the study of meiotic M-M transition. *Methods Mol. Biol.* *322*, 445–458.
- Philpott, A., Krude, T., and Laskey, R.A. (2000). Nuclear chaperones. *Semin. Cell Dev. Biol.* *11*, 7–14.
- Qian, Y.W., Wang, Y.C., Hollingsworth, R.E., Jones, D., Ling, N., and Lee, E.Y. (1993). A retinoblastoma-binding protein related to a negative

regulator of Ras in yeast. *Nature* *364*, 648–652.

Quivy, J.P., Grandi, P., and Almouzni, G. (2001). Dimerization of the largest subunit of chromatin assembly factor 1: importance in vitro and during *Xenopus* early development. *EMBO J.* *20*, 2015–2027.

Rai, T.S., Puri, A., McBryan, T., Hoffman, J., Tang, Y., Pchelintsev, N.A., van Tuyn, J., Marmorstein, R., Schultz, D.C., and Adams, P.D. (2011). Human CABIN1 is a functional member of the human HIRA/UBN1/ASF1a histone H3.3 chaperone complex. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 4107–4118.

Ray-Gallet, D., Quivy, J.P., Scamps, C., Martini, E.M.D., Lipinski, M., and Almouzni, G. (2002). HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol. Cell* *9*, 1091–1100.

Ray-Gallet, D., Quivy, J.-P., Silljé, H.W.W., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2007). The histone chaperone Asf1 is dispensable for direct de novo histone deposition in *Xenopus* egg extracts. *Chromosoma* *116*, 487–496.

Ray-Gallet, D., Woolfe, A., Vassias, I., Pellentz, C., Lacoste, N., Puri, A., Schultz, D.C., Pchelintsev, N.A., Adams, P.D., Jansen, L.E.T., and Almouzni, G. (2011). Dynamics of histone H3 deposition in vivo reveal a nucleosome gap-filling mechanism for H3.3 to maintain chromatin integrity. *Mol. Cell* *44*, 928–941.

Richet, N., Liu, D., Legrand, P., Velours, C., Corpet, A., Gaubert, A., Bakail, M., Moal-Raisin, G., Guerois, R., Compper, C., Besle, A., and Guichard, B. (2015). Structural insight into how the human helicase subunit MCM2 may act as a histone chaperone together with ASF1 at

the replication fork. *Nucleic Acids Res.* *43*, 1905–1917.

Sanematsu, F., Takami, Y., Barman, H.K., Fukagawa, T., Ono, T., Shibahara, K.-I., and Nakayama, T. (2006). Asf1 is required for viability and chromatin assembly during DNA replication in vertebrate cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 13817–13827.

Schneiderman, J.I., Orsi, G.A., Hughes, K.T., Loppin, B., and Ahmad, K. (2012). Nucleosome-depleted chromatin gaps recruit assembly factors for the H3.3 histone variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 19721–19726.

Sharp, J.A., Franco, A.A., Osley, M.A., and Kaufman, P.D. (2002). Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* *16*, 85–100.

Sheets, M.D., Fox, C.A., Hunt, T., Vande Woude, G., and Wickens, M. (1994). The 3'-untranslated regions of *c-mos* and cyclin mRNAs stimulate translation by regulating cytoplasmic polyadenylation. *Genes Dev.* *8*, 926–938.

Sherwood, P.W., Tsang, S. V, and Osley, M.A. (1993). Characterization of HIR1 and HIR2, two genes required for regulation of histone gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 28–38.

Shibahara, K., and Stillman, B. (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* *96*, 575–585.

Shintomi, K., Iwabuchi, M., Saeki, H., Ura, K., Kishimoto, T., and

- Ohsumi, K. (2005). Nucleosome assembly protein-1 is a linker histone chaperone in *Xenopus* eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 8210–8215.
- Silljé, H.H.W., and Nigg, E.A. (2001). Identification of human Asf1 chromatin assembly factors as substrates of Tousled-like kinases. *Curr. Biol.* *11*, 1068–1073.
- Smith, S., and Stillman, B. (1989). Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell* *58*, 15–25.
- Sogo, J.M., Stahl, H., Koller, T., and Knippers, R. (1986). Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. *J. Mol. Biol.* *189*, 189–204.
- Song, J.-J., Garlick, J.D., and Kingston, R.E. (2008). Structural basis of histone H4 recognition by p55. *Genes Dev.* *22*, 1313–1318.
- Stillman, B. (1986). Chromatin assembly during SV40 DNA replication in vitro. *Cell* *45*, 555–565.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41–45.
- Sun, L., Youn, H.-D., Loh, C., Stelow, M., He, W., and Liu, J.O. (1998). Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity* *8*, 703–711.
- Tachiwana, H., Osakabe, A., Shiga, T., Miya, Y., Kimura, H., Kagawa,

- W., and Kurumizaka, H. (2011). Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* *67*, 578–583.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* *116*, 51–61.
- Tang, Y., Poustovoitov, M. V, Zhao, K., Garfinkel, M., Canutescu, A., Dunbrack, R., Adams, P.D., and Marmorstein, R. (2006). Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 921–929.
- Tang, Y., Puri, A., Ricketts, M.D., Rai, T.S., Hoffmann, J., Hoi, E., Adams, P.D., Schultz, D.C., and Marmorstein, R. (2012). Identification of an ubinuclein 1 region required for stability and function of the human HIRA/UBN1/CABIN1/ASF1a histone H3.3 chaperone complex. *Biochemistry* *51*, 2366–2377.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 4350–4354.
- Tyler, J.K. (2002). Chromatin assembly. *Eur. J. Biochem.* *269*, 2268–2274.
- Tyler, J.K., Bulger, M., Kamakaka, R.T., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1996). The p55 subunit of *Drosophila* chromatin assembly factor 1 is homologous to a histone deacetylase-associated protein. *Mol. Cell.*

Biol. *16*, 6149–6159.

Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* *402*, 555–560.

Tyler, J.K., Collins, K.A., Prasad-Sinha, J., Amriott, E., Bulger, M., Harte, P.J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (2001). Interaction between the *Drosophila* CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6574–6584.

Umehara, T., and Horikoshi, M. (2003). Transcription initiation factor IID-interactive histone chaperone CIA-II implicated in mammalian spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* *278*, 35660–35667.

Umehara, T., Chimura, T., Ichikawa, N., and Horikoshi, M. (2002). Polyanionic stretch-deleted histone chaperone *cia1/Asf1p* is functional both in vivo and in vitro. *Genes to Cells* *7*, 59–73.

Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* *87*, 95–104.

Wolffe, A.P. (1998). *Chromatin: Structure and Function*, third edition. Academic Press.

Wolffe, A.P., Khochbin, S., and Dimitrov, S. (1997). What do linker histones do in chromatin? *BioEssays* *19*, 249–255.

Woodcock, C.L., Skoultchi, A.I., and Fan, Y. (2006). Role of linker

histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res.* *14*, 17–25.

Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H., and Allis, C.D. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* *121*, 859–872.

Xu, C., and Min, J. (2011). Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell* *2*, 202–214.

Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Côté, J., and Wang, W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell* *2*, 851–861.

Youn, H.D., and Liu, J.O. (2000). Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. *Immunity* *13*, 85–94.

Zhang, K., Gao, Y., Li, J., Burgess, R., Han, J., Liang, H., Zhang, Z., and Liu, Y. (2016). A DNA binding winged helix domain in CAF-1 functions with PCNA to stabilize CAF-1 at replication forks. *Nucleic Acids Res.* *44*, 5083–5094.

Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., Pehrson, J.R., Berger, J.M., Kaufman, P.D., and Adams, P.D. (2005). Formation of macroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev.*

Cell 8, 19–30.

新富圭史 (2005). アフリカツメガエル初期胚におけるクロマチン基本構造構築の制御機構.

謝辞

CAF-1 の cDNA と抗体を提供して下さった理化学研究所の新富圭史博士、IBB 配列の cDNA を提供して下さった理化学研究所の今本尚子博士に深く感謝致します。本研究の全般にわたり懇切な指導、親身な助言を賜り、生物学者としての物事の考え方をご教授頂きました大隅圭太教授に心より感謝を捧げます。数多くの有益な助言および丁寧な実験技術の指導を頂きました岩渕万里講師に深く感謝致します。研究生活のあらゆる局面でサポートして頂きました赤坂茉莉博士に感謝致します。本研究に協力してくれた吉田一成君、尾口裕介君及び西野春菜さんに心から感謝致します。常日頃よりお互いの研究について有意義な議論をしてくれた小田春佳さん、濱崎省吾君をはじめ、名古屋大学大学院理学研究科卵細胞生物学グループの諸氏に心よりお礼を申し上げます。日本での生活・研究をサポートして下さった公益信託ヤマハ発動機国際友好基金、公益財団法人日揮・実吉奨学会、公益財団法人旭硝子奨学会及び独立行政法人日本学生支援機構に感謝致します。