

ヒストンリサイクリングの分子機構に関する シミュレーション・実験融合研究

長江 文立津

目次

要旨	5
第 1 章: レーンスイッチメカニズムによるヌクレオソーム再配置	7
序論	7
方法	9
AICG2+モデル	9
3SPN.2、3SPN.2C モデル	9
ヌクレオソームの粗視化モデル	10
DNA トランスロケースの粗視化モデル	11
シミュレーションの初期構造	12
シミュレーションの実行	12
実験に使用した DNA 配列とタンパク質	13
制限酵素アッセイ	14
ディープシーケンシングアッセイ	15
ヌクレオソーム形成の自由エネルギー計算	16
結果	17
DNA トランスロケースとヌクレオソームの衝突シミュレーション	17
アンラップされたヌクレオソームの構造緩和シミュレーション	18
制限酵素アッセイ	21
ディープシーケンシングアッセイ	24
考察	28
第 2 章: DNA トランスロケースによるヌクレオソームアンラッピング依存的な NAP1 による H2A/H2B 解離のメカニズム	30
序論	30
方法	32
粗視化分子動力学シミュレーション	32
ヌクレオソームと DNA トランスロケースの粗視化モデル	32
粗視化 NAP1 モデル	32
NAP1-H2A/H2B ダイマーの構造サンプリングシミュレーション	32
NAP1-H2A/H2B 間の結合自由エネルギー計算	32
H2A/H2B 解離シミュレーションの初期構造	32
シミュレーションのプロトコル	33
使用した DNA 配列、タンパク質	33
転写アッセイ-EMSA	34
転写アッセイ後サンプルの分画	34
マイクロコッカルヌクレアーゼアッセイ	34

結果	36
EMSA	36
中間位置バンドの同定	36
NAP1-H2A/H2B 複合体モデルの検証	39
NAP1 の C 末端テールの H2A/H2B との複合体形成における役割	40
NAP1 によるヌクレオソームからの H2A/H2B の解離	43
H2A/H2B の解離における NAP1 の C 末端領域の役割	45
考察	46
第 3 章: レプリソームによる H3/H4 テトラマーのリサイクルの分子機構.....	49
序論	49
方法	50
複製フォークとヒストンの粗視化分子構造.....	50
粗視化モデル間に適用したポテンシャル.....	52
粗視化分子動力学シミュレーション	53
MCM2 と H3/H4 テトラマー間の相互作用の最適化	53
使用した DNA、タンパク質	54
IN VITRO DNA 複製実験	54
ゲルシフトアッセイ	55
結果	56
H3/H4 テトラマーと結合した状態の複製フォークのモデリング	56
レプリソームは直接 H3/H4 テトラマーを新生鎖 DNA にリサイクルする	57
H3/H4 テトラマーは 2 つの経路でリサイクルされる	59
ラギング鎖上の RPA の数がストランドバイアスを制御する	63
POL E はリーディング鎖への H3/H4 テトラマーのリサイクル位置を制御する	68
考察	70
第 4 章:REPLI-PORE-SEQ による対称的なヒストンリサイクリングの最小構成要素の同定.....	73
序論	73
方法	73
使用した DNA、タンパク質	73
IN VITRO クロマチン複製実験.....	74
ナノポアシーケンシング実験.....	75
新生鎖分類の深層学習モデル構築.....	75
分類器のバイアス補正.....	77
DNA 配列依存的なヌクレオソームランドスケープの予測.....	79
G-QUADRUPLEX 形成位置予測	79
結果	80
ヒストンリサイクリングの試験管内再構成.....	80

ナノポアシーケンサーと深層学習による親ヒストン配置解析手法 (REPLI-PORE-SEQ) の開発	83
REPLI-PORE-SEQ によるヒストンリサイクリング解析.....	84
POL Δ、CTF4、CSM3/TOF1 のヒストンリサイクリング対称性への寄与.....	88
考察	90
結論	93
参考文献	95
謝辞	106

要旨

真核生物のゲノム DNA は、クロマチン構造を形成して階層的に折りたたまれている (Figure 1A)。ヌクレオソームはクロマチンの基本構造単位であり、4 種類のヒストンタンパク質 (H3, H4, H2A, H2B) 各 2 分子からなるヒストンオクタマーに、147 bp の DNA が約 1.7 周巻き付いて形成される¹ (Figure 1A)。ヌクレオソーム形成による特定の DNA 領域の遮蔽や、ヒストンへの化学修飾、ヒストンの亜種タンパク質 (ヒストンバリエント) との交換を通じて、細胞内での転写、DNA 複製、DNA 修復が調節されている^{2,3}。このような細胞機能を決定するヌクレオソームの配置は DNA 塩基配列に依存しない遺伝情報 (エピゲノム) として機能する。細胞が自己同一性を維持するためには、細胞分裂の前後でヌクレオソームの配置や化学修飾の状態が維持される必要がある。

転写・複製・DNA 修復の際には、転写装置やレプリソーム、エキソヌクレアーゼのような DNA トランスロケースが、遺伝情報の読み取り、コピー、損傷箇所の探索や切除を行う⁴。必然的に DNA トランスロケースはヌクレオソームと衝突するため、ヌクレオソームはゲノム上の障害物として機能する (Figure 1B)。転写・複製・DNA 修復とヌクレオソーム配置の維持を両立するためには、局所的にヒストンを DNA から解離させて DNA トランスロケースを進行させたあと、元の位置に再結合させる必要がある (ヒストンリサイクリング) (Figure 1B)。ヒストンシャペロンと呼ばれるヒストン結合タンパク質は、このヒストンリサイクリングの過程に関わることが知られている。とくに S 期においてレプリソームが DNA を複製する際には、解体されたヌクレオソームは 2 本ある新生鎖のうちどちらかに再形成される (Figure 1C)。2 つの娘細胞にエピゲノム情報が正しく継承されるためには、化学修飾を受けたヒストンが 2 つの新生鎖 (リーディング鎖・ラギング鎖) に均等にリサイクルされる必要がある (対称的なヒストンリサイクリング) (Figure 1C)。このようにヒストンリサイクリングは細胞の恒常性維持を根本で裏打ちするしくみである。しかしどのように DNA トランスロケースがヒストンシャペロンと協同してヌクレオソームを解体・再形成するのかは不明であり、ヒストンリサイクリングの分子機構は解明されていなかった。

本研究では粗視化分子動力学シミュレーションによる分子の運動の可視化と、試験管内再構成系を用いた生化学実験・ディープシーケンシング実験を組み合わせ、ヒストンリサイクリングの分子機構を探索した。まず、第 1 章では DNA トランスロケースがヌクレオソームと衝突した時のヌクレオソームのダイナミクスを探索した。そして、ヒストンシャペロン非存在下においては、DNA トランスロケースとの衝突をきっかけにして、「レーンスイッチメカニズム」にしたがってヌクレオソームが下流に移動し、ヌクレオソームの配置情報が失われることを明らかにした。次に第 2 章では、トランスロケースによって DNA が部分的にアンラップされたヌクレオソームから、ヒストンシャペロン Nap1 がヒストン H2A/H2B ダイマーを解離させること、つまり、ヒストンシャペロン存在下ではヌクレオソームの下流への移動が起こる前にヌクレオソームの解体が始まることを明らかにした。第 3・4 章では DNA 複製時のレプリソームによるヒストンリサイクリングに注目した。第 3 章ではレプリソームのサブユニットであるヒストンシャペロン Mcm2 が、ヒストン H3/H4 テトラマーを新生鎖に直接結合させる過程を可視化した。このことからレプリソーム単独でヒストンをリサイクルできることを明らかにした。第 3 章では、DNA 複製に最低限必要な要素のみを系に加えて粗視化分

子動力学シミュレーションを行ったため、対称的なヒストンリサイクリングに最低限必要な要素が全て含まれているわけではなく、その要素の同定という課題が残されていた。第4章ではクロマチン複製の試験管内再構成系とディープシーケンシングアッセイ、深層学習による分類モデルを組み合わせた実験手法「Repli-pore-seq」を開発して、対称的なヒストンリサイクリングに最低限必要な要素を同定した。

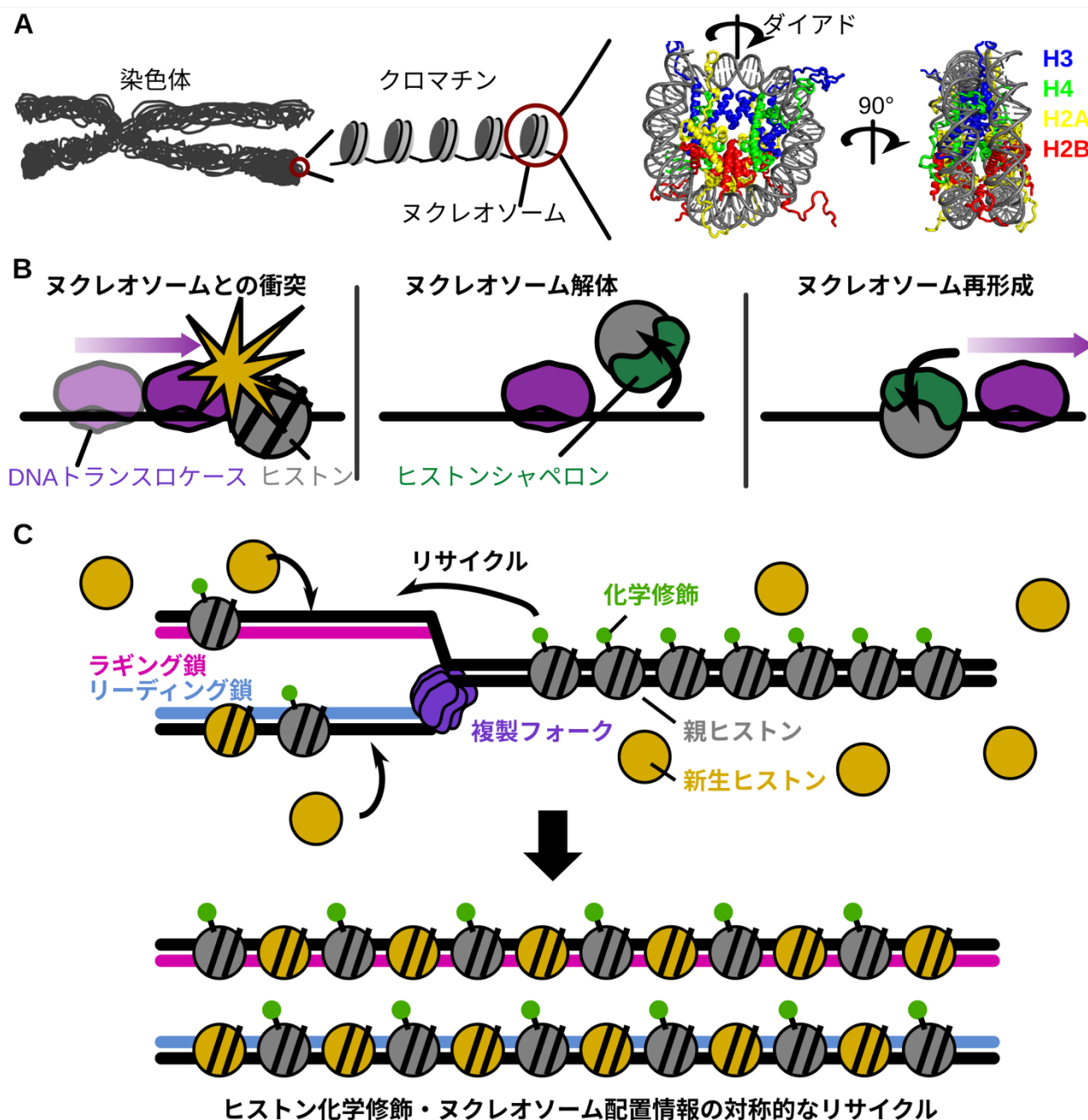


Figure 1: (A) 染色体、クロマチン、ヌクレオソームの階層構造。(B) DNA トランスロケースとヌクレオソームとの衝突、ヌクレオソーム解体・再形成の概略図。(C) DNA 複製時のヒストンリサイクリングの概略図。

第1章: レーンスイッチメカニズムによるヌクレオソーム再配置

序論

細胞内において、DNA トランスロケースはヒストンシャペロンというヒストン結合タンパク質とともに、ヌクレオソームをリポジショニング(再配置)したり、ヌクレオソームを分解したりする⁵。特に DNA トランスロケースとヌクレオソームとの相互作用は、ヌクレオソームリポジショニングにおいて中心的な役割を果たしていると考えられている。例えば先行研究⁶⁻¹³において著者らは、RNA ポリメラーゼ II はヒストンオクタマーと特異的な相互作用を介してヌクレオソームのリポジショニングを引き起こすことを示唆した。彼らは、RNA ポリメラーゼ II が静電相互作用を介してヒストンを保持しつつ、ヌクレオソームの位置を変えことなく転写を進めることができるとして、「Pol-II type mechanism」を提唱した (Figure 2)。

DNA トランスロケースとヌクレオソームとの衝突における、トランスロケースの役割を理解するためには、ヌクレオソームとの間に特異的な相互作用を考慮しないシンプルなモデルが必要である。先行研究において Studitsky と Felsenfeld らは、バクテリオファージの転写装置である SP6, T7 RNA ポリメラーゼを使って、ヌクレオソームに衝突させる実験を行った^{6,14,15}。制限酵素アッセイに基づく観察から、衝突後のヌクレオソームが元の位置から上流に移動していることが示唆された。同様の結果が RNA ポリメラーゼ III を使った実験でも得られたことから、彼らは、ヌクレオソームを上流に移動させるメカニズムとして、「Pol-III type mechanism」を提唱した¹⁶ (Figure 2)。しかし、これらのメカニズムを提唱した研究において用いた実験系は、ヌクレオソームを DNA の下流端に形成させて RNA ポリメラーゼと衝突させるというものであり、ヌクレオソームの下流への移動の余地はなかった。

核内での DNA トランスロケースとヌクレオソームとの衝突のモデルを立てて、評価するためには、DNA の端ではなく中央に再構成されたヌクレオソームを対象にする必要がある。Greene らは一分子蛍光観察によって、バクテリアのエキソヌクレアーゼである RecBCD と衝突したヌクレオソームが、RecBCD とともに下流へ移動することを観察した¹⁷。上述の実験系とは異なり、ヌクレオソームは DNA の端ではなく長さ 48.5 kbp の λ ファージ DNA 上にランダムに形成されていた。この実験からヌクレオソームが下流に移動する経路も存在することが明らかになった。しかし、一分子蛍光観察によって得られる空間解像度は~1 kbp 程度であり、分子機構を直接観察することは困難である。Luger らは生化学実験の結果から、トランスロケースが DNA 上を 1 bp 進むと、押すようにしてヌクレオソームを 1 bp 下流に移動させる「Pushing model」¹⁸を提唱したが、その分子機構は検証されていなかった。

本研究では粗視化分子動力学シミュレーションの結果から DNA トランスロケースによるヌクレオソームの下流への移動を実現する「レーンスイッチメカニズム」を提唱した。そしてこのヌクレオソームの移動が、DNA トランスロケースによるヌクレオソーム DNA のアンラッピングに依存して起こることを示した。さらに制限酵素アッセイとディープシーケンシングアッセイの生化学実験によって、「レーンスイッチメカニズム」によるヌクレオソームの下流側への移動を検証した。

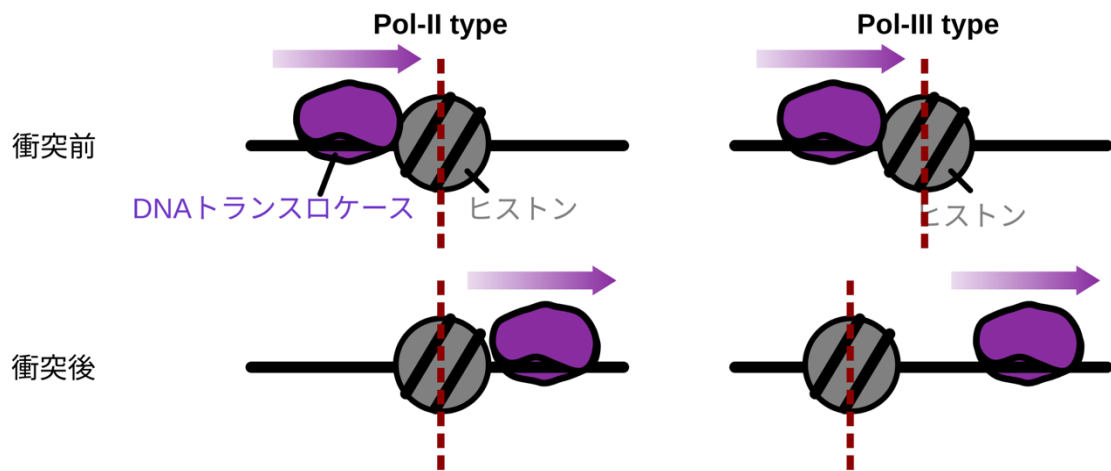


Figure 2: 「Pol-II type mechanism」と「Pol-III type mechanism」の概念図。DNA トランスロケースは紫、ヒストンはグレー、DNA は黒で表現。赤の破線はヌクレオソームの形成位置を示す。

方法

AICG2+モデル

タンパク質の粗視化力場として AICG2+を用いた。1 粒子で表現された 1 アミノ酸を全原子構造の C α 炭素上に配置する AICG2+力場のポテンシャル関数は以下のとおりである。

$$\begin{aligned}
 V_{AICG2+(R|R_0)} = & \sum_{ibd} K_{b,ibd} (b_{ibd} - b_{ibd,0})^2 + V_{loc}^{flp} + \sum_{j=i+2} \epsilon_{loc,ij} \exp\left(-\frac{(r_{ij} - r_{ij,0})^2}{2W_{ij}^2}\right) \\
 & + \sum_{j=i+3} \epsilon_{loc,ij} \exp\left(-\frac{(\phi_{ij} - \phi_{ij,0})^2}{2W_{\phi,ij}^2}\right) + \sum_{i < j-3}^{native} \epsilon_{go,ij} \left[5 \left(\frac{r_{ij,0}}{r_{ij}}\right)^{12} - 6 \left(\frac{r_{ij,0}}{r_{ij}}\right)^{10} \right] \\
 & + \sum_{i < j-3}^{non-native} \epsilon_{ev} \left(\frac{d}{r_{ij}}\right)^{12}
 \end{aligned}$$

AICG2+力場は与えられた参照構造を再現するようにパラメータが決定されている。第 1 項は隣接する粗視化粒子間の結合長ポテンシャルである。 K_b は全原子計算に基づくポテンシャルの強さのパラメータで、 b_{ibd} は結合距離、 $b_{ibd,0}$ は参照構造での結合距離である。第 2 項は Flexible local ポテンシャルである。これは主に天然変性タンパク質の結合角、二面角の振る舞いを表現する統計ポテンシャルである。このポテンシャルのパラメータは、Protein Data Bank (PDB) に登録されている構造のループ領域の結合角の確率分布 $P(\theta)$ と二面角の確率分布 $P(\phi)$ によって次式で表現される。

$$V_{loc}^{flp} = -k_B T \log\left(\frac{P(\theta)}{\sin \theta}\right) - k_B T \log P(\psi)$$

第 3 項は非変性領域の隣接する 3 粒子間にはたらくポテンシャルで結合角ポテンシャルの役割を果たす。 $\epsilon_{loc,ij}$ は強さパラメータで、 r_{ij} は粒子間距離、 $r_{ij,0}$ は参照構造での粒子間距離、そして W_{ij} はポテンシャルの及ぶ範囲を記述するパラメータである。第 4 項は非変性領域の隣接する 4 粒子間にはたらく二面角ポテンシャルである。 $\epsilon_{loc,ij}$ は強さパラメータで、 ϕ_{ij} は二面角、 $\phi_{ij,0}$ は参照構造での二面角、そして $W_{\phi,ij}$ はポテンシャルの及ぶ範囲を記述するパラメータである。第 5 項は参照構造において近接していた粗視化粒子間にかかる Lennard-Jones 型ポテンシャルである。 $\epsilon_{go,ij}$ は強さパラメータで、 r_{ij} は粒子間距離、 $r_{ij,0}$ は参照構造での粒子間距離である。第 6 項は粗視化粒子間の排除体積効果を記述するための斥力項である。 ϵ_{ev} は強さパラメータ、 r_{ij} は粒子間距離、 d は各粗視化粒子の粒子径である。

3SPN.2、3SPN.2C モデル

本研究では DNA の粗視化力場として 3SPN.2 と 3SPN.2C 力場¹⁹を用いた。どちらのモデルでも、1 つのヌクレオチドを 3 粒子で表現してリン酸、糖、塩基のそれぞれの質量重心に配置する。3SPN.2

力場のポテンシャル関数は次のとおりである。

$$V_{3SPN.2C} = \sum_i \left[k_1 (r_i - r_{i,0})^2 + 100k_2 (r_i - r_{i,0})^4 \right] + \sum_i k_a (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_i k_\phi \exp \left(\frac{-(\phi_i - \phi_{i,0})^2}{2\sigma_{\phi,i}^2} \right) \\ + V_{bstack} + V_{cstack} + V_{bp} + \sum_{i < j} \epsilon_r \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 + 1 \right]$$

3SPN.2 力場は、DNA の融解温度、二本鎖 DNA と一本鎖 DNA の持続長を再現しつつ、B 型 DNA の構造を安定化するようにパラメータが決定されている。第 1 項は結合長ポテンシャルである。 k_1 、 k_2 は強さパラメータ、 r_i は結合長、 $r_{i,0}$ は参照構造での結合長である。第 2 項は結合角ポテンシャルである。 k_a は強さパラメータ、 θ_i は結合角、 $\theta_{i,0}$ は参照構造での結合角である。第 3 項は二面角ポテンシャルである。 k_ϕ は強さパラメータ、 ϕ_i は二面角、 $\phi_{i,0}$ は参照構造での二面角、 $\sigma_{\phi,i}$ はポテンシャルの及ぶ範囲である。第 4、5、6 項は異なる塩基間にはたらくポテンシャルである。第 4 項 V_{bstack} は同じ DNA 鎖上で隣接する 2 つの塩基間にはたらくポテンシャルである。第 5 項 V_{cstack} はある塩基 i に隣接する塩基と、塩基 i と塩基対を形成する塩基との間にはたらくポテンシャルである。第 6 項 V_{bp} は塩基対を形成する塩基間にはたらくポテンシャルである。第 7 項は粒子間の排除体積効果を記述するポテンシャルで、 ϵ_r が強さパラメータ、 σ_{ij} が粒子径、 r_{ij} が粒子間距離である。

3SPN.2C 力場は 3SPN.2 力場を拡張して、二本鎖 DNA の配列依存的な曲げ弾性を再現するように調整した力場である。3SPN.2C ポテンシャルは、上述の 3SPN.2 ポテンシャルに次の二面角ポテンシャル項 $V_{dihedral,periodic}$ を追加したものである。

$$V_{dihedral,periodic} = \sum_i k_{\phi,periodic} [1 + \cos(\phi_i - \phi_{i,0})]$$

$k_{\phi,periodic}$ は強さパラメータ、 ϕ_i は二面角、 $\phi_{i,0}$ は参照構造での二面角である。

ヌクレオソームの粗視化モデル

ヌクレオソーム全体の粗視化構造は、ヒストンオクタマーの結晶構造¹ (PDBID: 1KX5²⁰) ととし Widom601 配列の DNA の結晶構造 (PDBID: 3LZ0²¹) をもとにして構築した。ヒストンオクタマーの粗視化モデルとして、上述の AICG2+モデル²² を使用した。また、DNA の粗視化モデルとして、3SPN.2C モデルを使用した¹⁹ (Figure 3)。DNA とヒストンとの間の相互作用は排除体積相互作用、静電相互作用、そして水素結合相互作用を表現する粗視化力場²³ の 3 つによって表現した。DNA が巻き付いていないヒストンオクタマーは、生理条件下のイオン濃度では 1 つの H3/H4 テトラマーと 2 つの H2A/H2B ダイマーに分解することが知られている^{24,25}。先行研究で、系の塩濃度に依存したヌクレオソームの分解を再現するように、H3/H4 テトラマーと H2A/H2B ダイマー間の相互作用パラメータをスケーリングしたモデルが構築された²⁶。本研究ではそれらのパラメータを使用した。ヒ

に固定した (Figure 5)。トランスロケースが DNA 上で移動する様は、トーラスの中央に最近接する粗視化 DNA 6 粒子に対して一定の力を加えることで表現した。粗視化 DNA 粒子に与える力の大きさは、バクテリアの RNA ポリメラーゼが DNA に与える力 (28 pN)²⁸ の半分である 14 pN に設定した。トランスロケースが DNA 上で停止している様は、トーラスの穴の中の粗視化 DNA 粒子を空間中に固定することで表現した (Figure 5)。

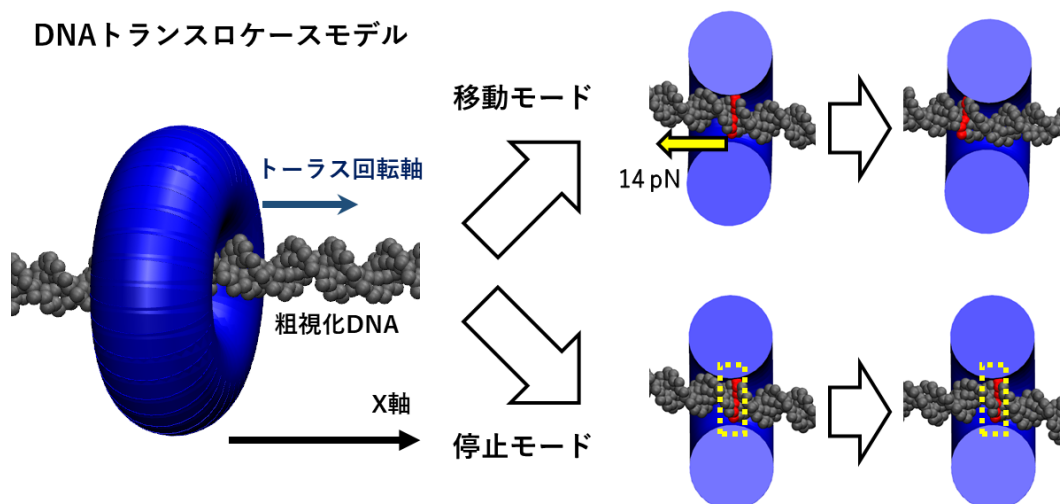


Figure 5: DNA トランスロケースの粗視化モデル。移動モードにおいてはトーラスの中央に最近接する粗視化 DNA 粒子（赤）に一定の力を加える。停止モードではトーラス中央に最近接する粗視化 DNA 粒子を空間中に固定する。

シミュレーションの初期構造

トランスロケースとヌクレオソームとの衝突シミュレーションの初期構造は図の通りである (Figure 6)。このシミュレーションで用いた DNA は、上述のヌクレオソーム粗視化モデルに巻き付いている 147 bp の DNA の両端に、それぞれ 32 bp と 96 bp のランダム配列を付加したものである (Figure 6 上)。以後、32 bp のリンカーDNA を上流、96 bp のリンカーDNA 側を下流と呼ぶ。また 601 配列の中央の塩基対を 0 として、上流の塩基対を負、下流の塩基対を正の整数で番号付けした。DNA 上の -92^{th} bp がトーラスの中央に位置するように、上流側の DNA をトーラスの穴に挿入した。

さらに本研究では、ヌクレオソームがリポジショニングするときの、ヌクレオソームの構造変化を調べるために、DNA トランスロケースによってアンラップしたヌクレオソームの構造緩和シミュレーションを行った。このときシミュレーションの初期構造として、上述の衝突シミュレーションでヌクレオソームがリポジショニングする直前の構造を用いた。ただし計算コスト軽減のために、DNA トランスロケースが通過した後の上流の DNA は切除した。トーラスの中央にある粗視化 DNA 粒子を空間中に固定して、トランスロケースがヌクレオソームから DNA をアンラップしたままになるようにした。

シミュレーションの実行

全ての粗視化分子動力学シミュレーションにおいて、CafeMol 3.2²⁹ を利用した。シミュレーション

の方程式系として Langevin 方程式を採用した。全てのシミュレーションを通して、温度を 300 K、塩強度を 300 mM、時間幅を 0.3 cafemol time (~ 14.7 fs) に設定して、80 回の独立なシミュレーションを 3×10^8 ステップに渡って実行した。

実験に使用した DNA 配列とタンパク質

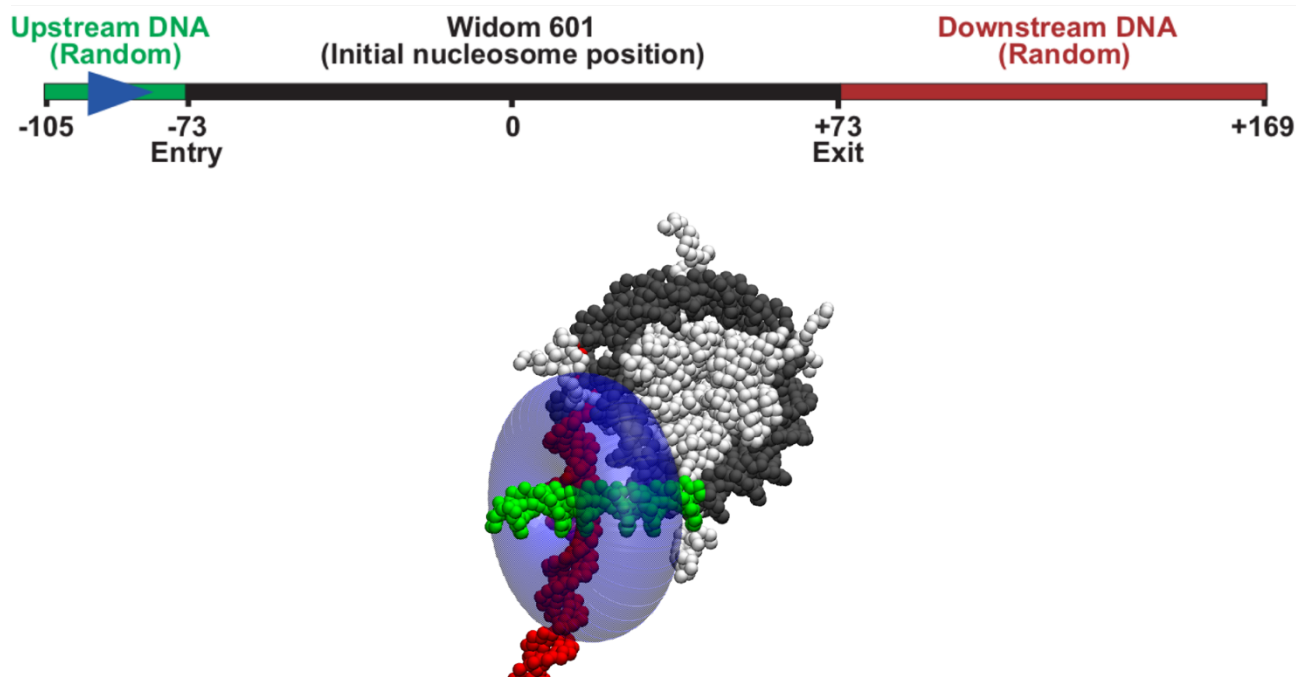


Figure 6: シミュレーションの初期構造。Widom601 配列の中央を 0 bp として、それより上流の塩基対を負の整数で、下流の塩基対を正の整数で番号付けした。Widom601DNA (黒) の上流の DNA を緑、下流の DNA を赤で表現した。

全ての生化学実験において、図で示した 498 bp の DNA を用いた (Figure 7)。この DNA 配列は、T7 プロモータに Widom601 配列を連結し、T7 プロモータの上流に 97 bp、Widom601 配列の下流に 234 bp のランダム配列をそれぞれ連結したものである。T7 プロモータは T7 RNA ポリメラーゼが転写開始時に DNA に結合するための領域で、Widom601 配列はヌクレオソームの位置決定配列である。

本研究では、T7 RNA ポリメラーゼを Widom601 配列上の所定の位置で停止させるために、オリジナルの Widom601 配列に対して改良を加えている。Widom601 配列の T7 プロモータに近いほうの端から T7RNA ポリメラーゼを停止させたい位置までの、非テンプレート配列に現れる Adenine をすべて Thymine に変換した。このとき、水溶液中に ATP を含まず、GTP, CTP, UTP のみを含むような反応系において、T7 RNA ポリメラーゼは非テンプレート配列に初めて Adenine が現れる位置で停止する。本研究では T7RNA ポリメラーゼを -54^{th} 、 -29^{th} 、 -14^{th} bp の 3 か所で停止させるために、3 種類の異なる DNA (T7_601_ -54^{th} 、T7_601_ -29^{th} 、T7_601_ -14^{th}) を用意した (Figure 7)。

全ての生化学実験において、*Saccharomyces cerevisiae* のヒストン H3, H4, H2A, H2B を用いた。これらヒストンはすでに確立された手法³⁰によって精製し、ヒストンオクタマーを再構成し、上述の DNA にヌクレオソームを再構成した。また、全ての生化学実験において、HiScribe T7 High Yield RNA synthesis kit (E2040S, New England BioLabs) 付属の T7 RNA ポリメラーゼを用いた。

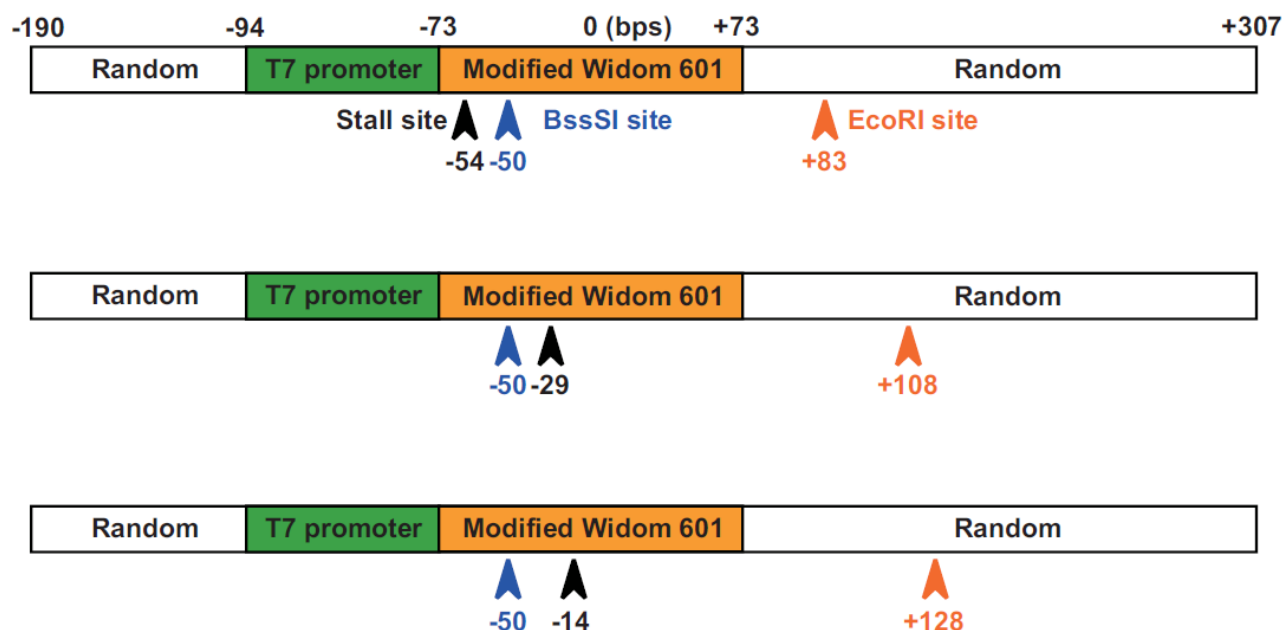


Figure 7: 使用した DNA 配列。上から T7_601_−54th、T7_601_−29th、T7_601_−14th。Widom601 配列（オレンジ）の中央を 0 bp として、上流側の塩基対を負の正数で、下流を正の整数で番号付けした。T7 RNA ポリメラーゼが停止する位置は黒矢印、BssSI、EcoRI の認識サイトはそれぞれ青、オレンジ色の矢印で示す。

制限酵素アッセイ

ヌクレオソームが T7RNA ポリメラーゼとの衝突によってリポジショニングを起こしたかどうかを、制限酵素を使って検出した。制限酵素は特定の DNA 塩基配列を認識して、DNA を切断する活性を持つ DNA 消化酵素である。しかし、ヌクレオソームを形成している DNA 領域は、DNA 消化酵素による切断から保護されることが知られている³¹。制限酵素が DNA を切断したかどうかはアガロースゲル電気泳動によって調べることができ、認識配列上にヌクレオソームが形成されているかどうかを検出できる³¹。

本研究で用いた 3 種類の DNA は全て、Widom601 配列の内部と下流のランダム配列の内部にそれぞれ BssSI と EcoRI の制限酵素サイトを 1 つずつ持つ。BssSI サイトは 3 種類ともに −50th bp の位置にあり、EcoRI サイトは T7_601_−54th、T7_601_−29th、T7_601_−14th のそれぞれで、+83th、+108th、+128th bp の位置にある (Figure 7)。BssSI サイトの位置はヌクレオソームが移動する前は溶媒中に露出せず、ヌクレオソームが移動した場合に露出するように選んだ。また、EcoRI サイトの位置は、ヌクレオソームが移動する前は溶媒中に露出しており、ヌクレオソームが移動した場合にヌクレオソームによって覆われるように選んだ (Figure 8)。

再構成したヌクレオソームと T7 RNA ポリメラーゼを反応させた後、転写産物や残りのヌクレオチドなどを遠心ろ過によって除去して、制限酵素による切断反応を行った。T7 RNA ポリメラーゼとの反応は、1 mM GTP, 1 mM CTP, 1 mM UTP (E2040S, New England BioLabs) の存在下、37°Cの温度で行った。転写反応の後、RNase If (M0243, New England BioLabs) によって合成された RNA を切断し、後の反応のために 10K MWCO Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter (UFC510024, Merck) を用いて反応液のバッファーを CutSmart Buffer (B7204, New England BioLabs) に交換した。反応液に BssSI-v2 (R0680, New England BioLabs)、または EcoRI-HF (R3101, New England BioLabs) を加えて 37°Cで 15 分間反応させた。Phenol:Chloroform:Isoamyl (25:24:1) (Nakalai Tesque) を使って反応液から DNA を抽出し、エタノール沈殿によって回収した。DNA サンプルは 1% TAE-アガロースゲルに泳動した。泳動後のゲルは SYBR Safe DNA Gel Stain (S33102, Thermo Fisher Scientific) を使って染色し、iBright FL 1500 イメージングシステム (Thermo Fisher Scientific) によって可視化した。データは Image J³² を用いて解析した。

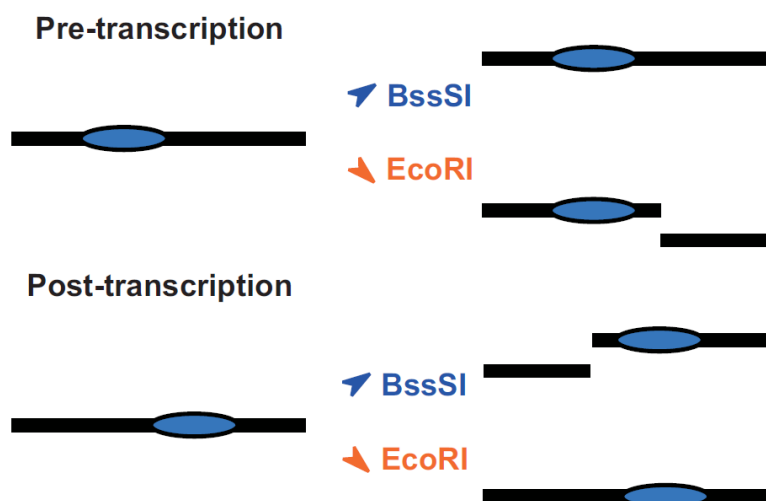


Figure 8: 制限酵素アッセイの概念図。転写前: BssSI の認識サイトがヌクレオソーム（青楕円）で覆われている。一方で EcoRI の認識サイトは露出している。転写後: ヌクレオソームが下流に移動した場合、BssSI の認識サイトが露出して、EcoRI の認識サイトがヌクレオソームに覆われる。

ディープシーケンシングアッセイ

T7 RNA ポリメラーゼとの衝突前後でのヌクレオソームの形成位置をナノポアシーケンサーで測定した (Figure 9)。上述のようにヌクレオソームを形成している DNA 領域は DNA 消化酵素による切断から保護される。マイクロコッカルヌクレアーゼは DNA を非特異的に切断するエンドヌクレアーゼで、ヌクレオソームを形成していない DNA 領域を高効率で切断する一方、ヌクレオソームを形成している領域の切断効率は低い。ヌクレオソームとマイクロコッカルヌクレアーゼを反応させることで、ヌクレオソームを形成している DNA 領域を切り出すことができる (Figure 9)³³。マイクロコッカルヌクレアーゼにより切り出した DNA の配列は、ナノポアシーケンサー³⁴を使うことで同定した。ナノポアシーケンサーは膜上に配置されたチャネルタンパク質を DNA 分子が通過する際の電流変化に基づいて DNA 塩基配列を解析する装置である。ナノポアシーケンサーによって得られたリードのうち、ヌクレオソーム形成領域の DNA として 146~170 bp の長さのリードを選び、解析に用

いた。

ディープシーケンシングアッセイにおいて、再構成したヌクレオソームと T7RNA ポリメラーゼとの反応、転写産物や残りのヌクレオチドの洗浄、そしてバッファーの交換は上述の制限酵素アッセイでの操作と同様に行った。マイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) (M0247S, New England BioLabs) と 30 分間室温で反応させた後、スピнкаラム (A9281, Promega) を用いて DNA 断片を精製した。ナノポアシーケンサーでこの精製 DNA 断片の配列を読むために、Ligation sequencing kit (SQK-LSK109, Oxford Nanopore Technologies) によって前処理を行った。シーケンス装置は MinION を使い、ナノポアフローセルのバージョンは R9.4.1 (FLO-MIN106, Oxford Nanopore Technologies) を使った。シーケンサーにより記録されたシグナルは、MinKNOW ソフトウェア (Oxford Nanopore Technologies) を用いて解析し、リードを得た。

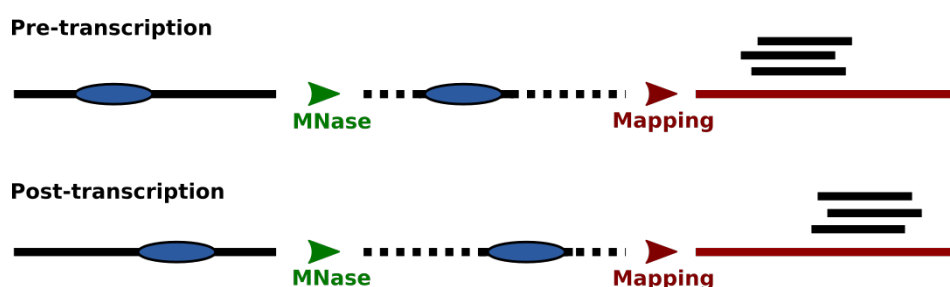


Figure 9: ディープシーケンシングアッセイの概念図。MNase がヌクレオソーム DNA よりもリンカー DNA を効率的に切断することで、ヌクレオソームを形成している DNA 領域が切り出される。ヌクレオソーム DNA をシーケンシングして参照配列 (赤) にマッピングする。各リードの中点をヌクレオソームダイアドの位置とみなすことで、ヌクレオソームの分布が得られる。

ヌクレオソーム形成の自由エネルギー計算

実験で用いた 498 bp の DNA 上にヌクレオソームが形成する際の自由エネルギーを、マルコフ状態モデルを使って計算した³⁵。このモデルのパラメータは様々な配列の DNA に巻いたヌクレオソーム構造に対して、300 K でのモンテカルロシミュレーションを行った結果^{36,37}に基づいている。自由エネルギー計算の際、H3/H4 テトラマーと結合している DNA 領域のみを考慮に入れた³⁸。

結果

DNA トランスロケースとヌクレオソームの衝突シミュレーション

DNA トランスロケースとヌクレオソームとの衝突を、粗視化モデルを使ってシミュレーションした。トランスロケースモデルが下流のヌクレオソームに向かって進むように、DNA の上流にトランスロケースモデルを配置した。

トランスロケースがヌクレオソームと衝突すると、トランスロケースはヌクレオソーム DNA をアンラップしながら DNA 上を移動した (Figure 10A)。図の青、オレンジ、緑の曲線は、それぞれトランスロケースの位置、トランスロケースがヌクレオソームからアンラップした DNA の位置、ヌクレオソームのダイアドの位置を各 MD ステップでプロットしたものである (Figure 10B)。トランスロケースとヌクレオソームとの間の排除体積相互作用によって、トランスロケースは自身の位置から 7 bp 下流の DNA をアンラップしながら DNA 上を移動した。トランスロケースが -60^{th} bp 付近と -30^{th} bp 付近に到達したとき、DNA とヒストンオクタマーとの強い相互作用によって、トランスロケースの移動は停滞した。トランスロケースの位置の分布より、トランスロケースは $-57^{\text{th}} \pm 2\text{bp}$ 付近と $-29^{\text{th}} \pm 5\text{bp}$ の位置で停滞することが分かった。これらの位置でトランスロケースが停滞することは、先行研究で報告されている実験結果^{39,40}と一貫している。

DNA トランスロケースが $-29^{\text{th}} \pm 5\text{bp}$ の位置での停滞を乗り越え、DNA をヌクレオソームのダイアドの位置 (0^{th} bp) 付近までアンラップしたとき、ヌクレオソームの位置が大きく下流側へ移動した (Figure 10B)。このようなヌクレオソームのリポジショニングは 80 本の独立なシミュレーション全てで観察できた。このリポジショニングによってヌクレオソームは大幅に下流へ移動し、その距離は 78~102 bp であった。移動後のヌクレオソーム構造を観察すると、初期構造では 601 配列の上流半分が結合していたヒストン領域に、代わりに 601 配列の下流半分が結合していた。一方、初期構造で 601 配列の下流半分が結合していたヒストン領域には、下流側のランダム配列が結合していた。

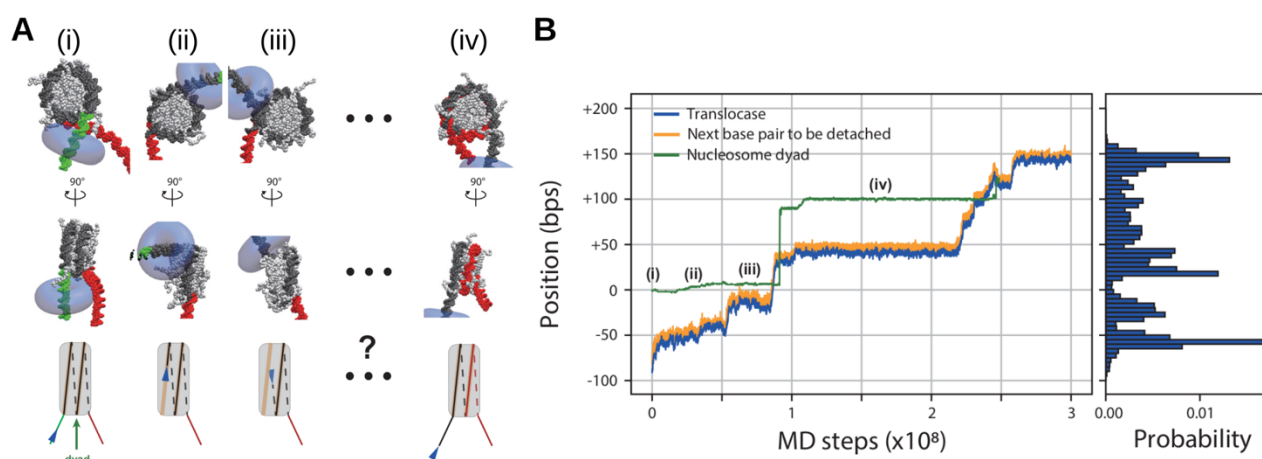


Figure 10: DNA トランスロケースとヌクレオソームの衝突シミュレーション。(A) 衝突シミュレーションのスナップショットと各構造の概念図。(B) 代表的なトラジェクトリ (左) とトランスロケースの位置の分布 (右)。(i) 衝突の直前。(ii) ヌクレオソームがアンラップし始めた瞬間。(iii) ヌクレオソームがリポジショニングする直前。(iv) リポジショニングした後。

アンラップされたヌクレオソームの構造緩和シミュレーション

上述のシミュレーションで観察されたヌクレオソームの下流へのリポジショニングについて、リポジショニングの過程で起こるヌクレオソームの構造変化を調べた。そのために、下流にリポジショニングする直前のヌクレオソーム構造を初期構造にして、構造緩和シミュレーションを行った。上述の衝突シミュレーションでトランスロケースは、トーラスの中央に粗視化 DNA 粒子が入るたびに力を加えていた。しかし実際のトランスロケースは ATP 加水分解のサイクルに従って断続的に力を発生させる。ATP 加水分解はミリ秒～秒と比較的長い時間スケールで起こるため、実際のトランスロケースも同様の時間スケールで移動する。そのため衝突シミュレーションでのトランスロケースは実際のものよりもずっと速く移動する。このとき、トランスロケースはヌクレオソームと衝突して DNA をアンラップした後、ヌクレオソームの構造が十分緩和する前に次の力を加える。ヌクレ

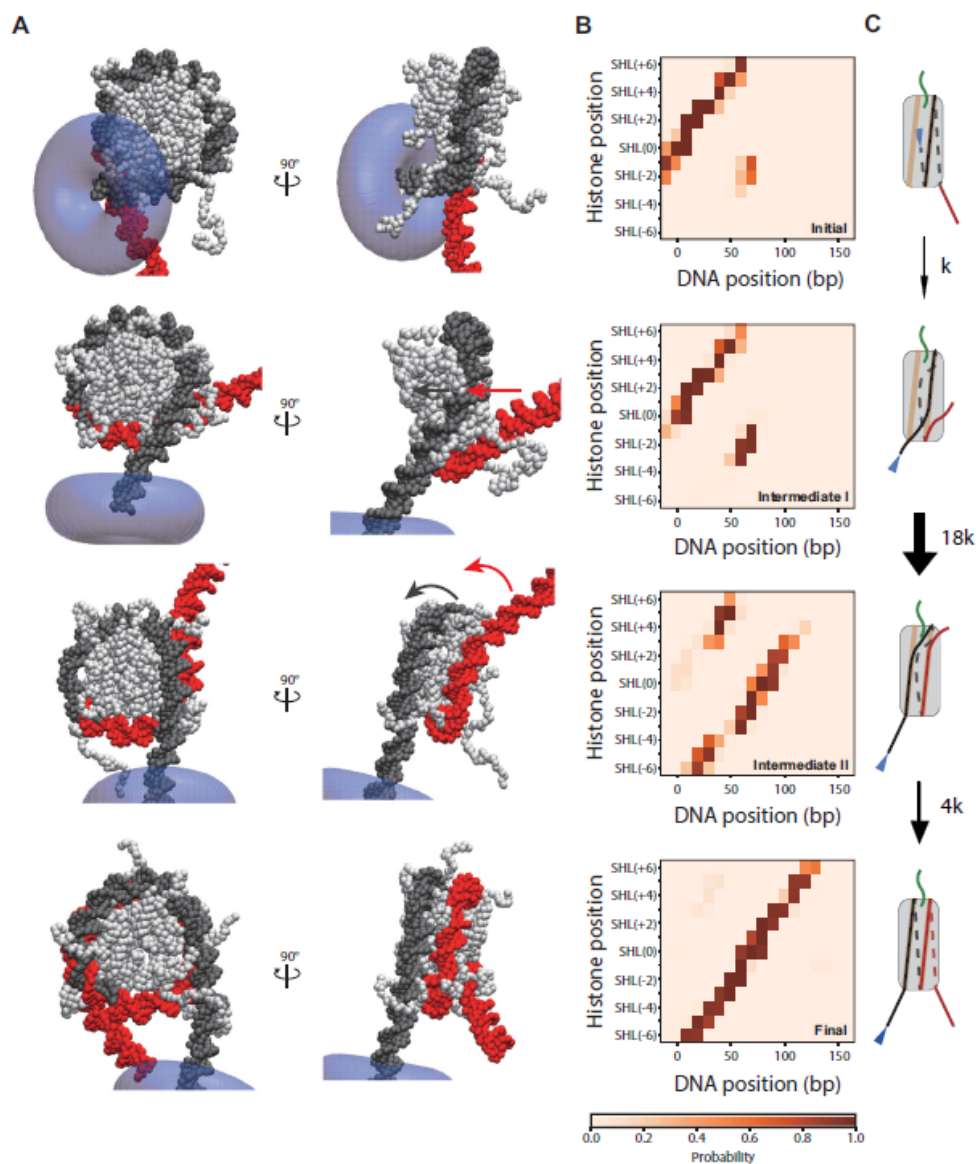


Figure 11: 部分的にアンラップしたヌクレオソームの構造緩和シミュレーション。上から初期構造、中間構造 1、中間構造 2、最終構造。(A) 代表的なスナップショット。(B) 各状態の DNA-ヒストン間コンタクトマップ。(C) 概念図。

オソームリポジショニングの際の構造遷移を調べるためには、実際のトランスロケースのように ATP 加水分解サイクルの待ち時間を設けて、リポジショニングが起こる直前の構造を十分に緩和させる必要がある。衝突シミュレーションのトラジェクトリからヌクレオソームがリポジショニングする直前の構造を取り出し、それを初期構造に用いて構造緩和シミュレーションを行った。ヌクレオソームがリポジショニングする直前、トランスロケースは -18^{th} bp の位置にあった。構造緩和シミュレーションでは、この -18^{th} bp の位置の DNA 粒子をトランスロケースに固定した。これは実際のトランスロケースが次の ATP 加水分解を待つ間 DNA 上で停止している様子を再現している。

構造緩和シミュレーションの結果、ヌクレオソームの構造は初期構造から大きく変化して、最終的にヌクレオソームは自発的に下流へ移動した (Figure 11)。80 本の独立なシミュレーションを行った結果、49 本でこのヌクレオソームの下流への移動を観察した (Figure 12)。さらにこの 80 本のシミュレーションで得られた構造を分類した。ヌクレオソームの構造を表現するものとして、DNA とヒストン間のコンタクトマップを用いた。まず粗視化 DNA を 10 bp ごとに分割して 18 の領域に分けた。ヒストンは DNA との結合領域を形成する粗視化アミノ酸のみに注目して、SHL(-6) から SHL(+6) までの 13 の領域に分けた。そして DNA の各領域とヒストンの各領域間でのコンタクトを 18×13 の行列によって表現した。そして、行列を平坦化して Principal Component Analysis (PCA) を行い、主成分軸の累積寄与率が 75% となる主成分 1 軸から 5 軸までの 5 次元空間に射影した。このようにして各ヌクレオソーム構造を、5 次元空間中の点で表現した。このヌクレオソーム構造を k-means 法によってクラスタリングした。このときクラスター数 k を決定するために、 k を 2 から 11 まで変えてクラスタリングを行い、Calinski-Harabasz 指標⁴¹を用いて最適クラスター数を決定した。クラスタリングの結果、シミュレーションで得られた構造は 7 個のクラスターに分類された (Figure 13A)。さらに 7 つのクラスターを、コンタクトマップの形に基づいて初期構造 (x1)、中間構造 (x3)、

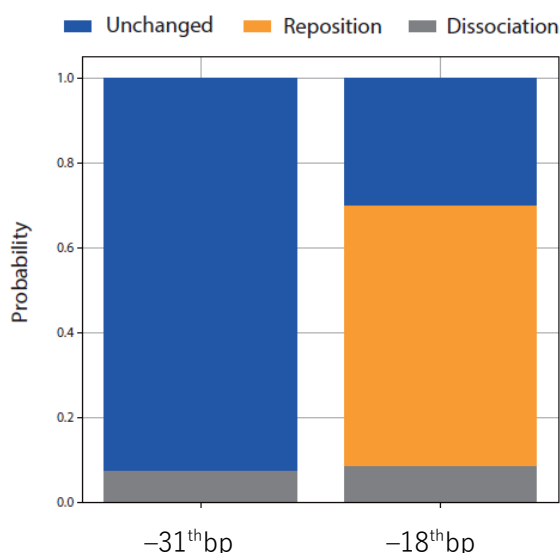


Figure 12: DNA が -31^{th} 、 -18^{th} までアンラップされたヌクレオソームの、 3×10^8 ステップ計算後の状態。ヌクレオソームの構造に変化が見られなかったトラジェクトリの割合を青、ヌクレオソームの解体が観察された割合をグレー、リポジショニングが観察されたものの割合をオレンジで色付けた。

最終構造 (x3) の 3 つにグループ分けした。3 つの中間構造のうち、1 つはリポジショニングを起こさない Off-pathway に属するもので、残りの 2 つはリポジショニングを起こす On-pathway に属するものであった (Figure 13B)。

分類した構造を見ると、ヌクレオソームは DNA とヒストンとのコンタクトを動的に変えながら移動していた (Figure 11A & B)。初期構造では、 -9^{th} bp から 59^{th} bp までの DNA が、SHL(-1.5) から SHL($+6.5$) までヒストンオクタマーに結合していた。DNA トランスロケースによって DNA がアンラップされて、図で示すヌクレオソームの DNA 結合レーンのうち、左側が溶媒に露出している。中間構造 I では、ヌクレオソームのダイアドに結合していた DNA (-9^{th} – 3^{rd} bp) が解離して、代わりに下流の DNA (59^{th} – 71^{st} bp) が結合した。中間構造 II では特に大規模な構造変化が起こった。図のヌクレオソームの DNA 結合レーンのうち右側に結合していた DNA (3^{rd} – 34^{st} bp) が、空いている左側に移動した。その移動に合わせて下流の DNA (71^{st} – 120^{th} bp) が右側の DNA 結合レーンに結合した。最終構造では、右側に取り残されていた DNA (34^{st} – 59 bp) が左側のレーンに移動して、それに合わせて下流の DNA (120^{th} – 145^{th} bp) が右側のレーンに結合した (Figure 11B & C)。

この一連のヌクレオソームの構造変化は不可逆的に起こっていた。シミュレーションのトラジェクトリに基づいて、各状態間の遷移速度を計算した。On-pathway 全体を通して初期構造から中間構造 I への遷移が律速であり、その遷移速度は $8.1 \times 10^{-9} \text{ step}^{-1}$ であった。この速度を k としたとき、中間構造 I から中間構造 II まで、中間構造 II から最終構造までの遷移速度はそれぞれ、 $19.7 \pm 6.4 \text{ k}$ 、 $4.0 \pm 4.9 \text{ k}$ であった (Figure 13B)。この結果は、ヌクレオソームの下流への移動においてヌクレオソームのダイアドに結合していた DNA が自発的にアンラップする過程がボトルネックになっていることを示唆している。

次にトランスロケースによるヌクレオソームのアンラップが不十分であるときには、ヌクレオソ

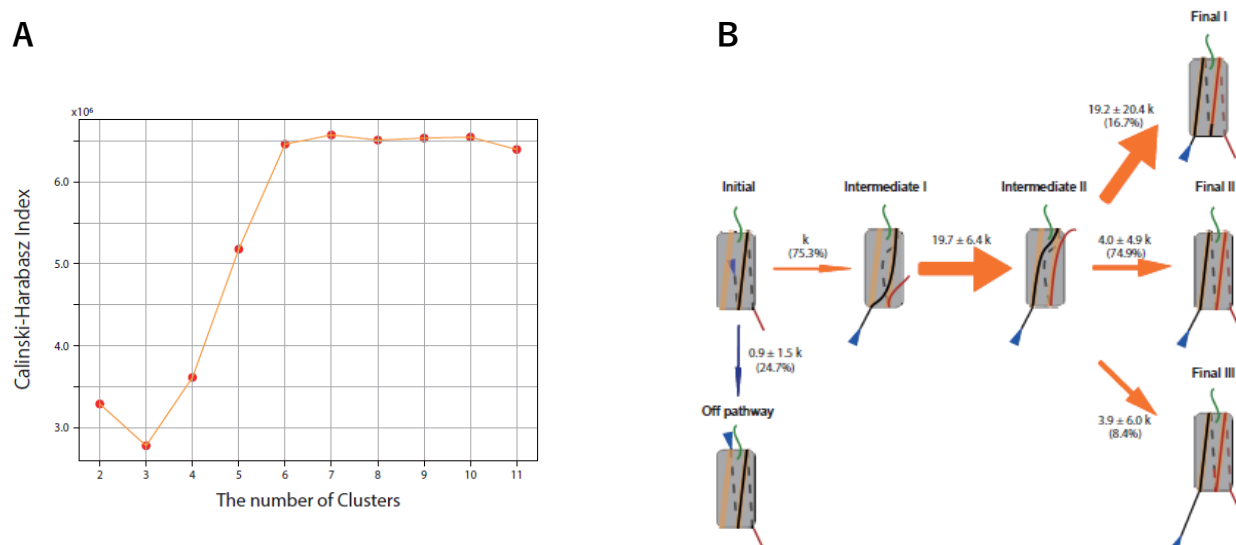


Figure 13: (A) Calinski-Harabasz 指標のプロット。(B) 分類された構造の概念図。初期構造から中間構造 1, 2 に移行する On-pathway (オレンジ) と、移行しない Off-pathway (青) に分かれる。

ームの下流への移動が起こらないことを観察した。トランスロケースとヌクレオソームとの衝突シミュレーションで、トランスロケースは $-29^{\text{th}} \pm 5\text{bp}$ の位置で停滞しやすいことを発見した。そこでトランスロケースが -31^{st} bp の位置までヌクレオソームをアンラップした状態の構造を初期状態として、80本の独立な構造緩和シミュレーションを行った。しかし、ヌクレオソームの下流への移動は全く観察されなかった。80本のうち74本のトラジェクトリではヒストンオクタマーは元の位置に結合したままで、下流への移動は観察されなかった (Figure 12)。また残り6本のトラジェクトリでは、ヒストン H2A/H2B ダイマーがヒストン H3/H4 テトラマーから解離した。これら2種類の構造緩和シミュレーションの結果は、トランスロケースが $-31^{\text{st}} \sim -18^{\text{th}}$ bp までヌクレオソームをアンラップしたときに初めてヌクレオソームの下流への移動が起こることを示唆している。

本研究で、ヌクレオソームの構造緩和シミュレーションの結果から得たヌクレオソームリポジショニングの分子機構を観察した。そしてそれを「レーンスイッチメカニズム」と名付けた。まず DNA トランスロケースはヌクレオソームと衝突すると、ヌクレオソームから DNA をアンラップしながら進む。トランスロケースがヌクレオソームのダイアドまで DNA をアンラップすると、「レーンスイッチメカニズム」による移動が開始する (Figure 11)。ヒストンオクタマーの側面に2つ平行に並んだ DNA 結合レーンのうち、トランスロケースによって左側のレーンが溶媒中に露出する。右側のレーンに結合していた DNA が解離して、空いている左側のレーンに再結合する (レーンスイッチ)。それに合わせて下流の DNA が右側のレーンに結合する。この過程を経て、ヌクレオソームの位置は下流へ大幅にシフトする (Figure 11C)。

制限酵素アッセイ

ヌクレオソームの下流への移動が、トランスロケースによる DNA アンラッピングに依存して起こることを生化学的に検証した。粗視化分子動力学シミュレーションによって、「レーンスイッチメカニズム」によるヌクレオソームの下流への移動を観察した。この下流への移動は、トランスロケースがヌクレオソームのダイアド付近まで DNA をアンラップすることで初めて可能になることが示された。このことを実験的に検証するために制限酵素アッセイをデザインした。トランスロケースのモデル分子として、T7 RNA ポリメラーゼを用いた。DNA は T7 プロモータと Widom601 配列を含む全長 498 bp のテンプレート DNA を用いた。ただしこの時用いた 601 配列は、T7 RNA ポリメラーゼが所定の位置で停止するように、T7 プロモータに近い側の端から停止したい位置までの非テンプレート鎖に現れる Adenine を Thymine に変えたものである (Figure 7)。そして ATP 非存在下で T7 RNA ポリメラーゼによる転写を行い、ヌクレオソームを形成している DNA 領域 (601 配列) 内部で、T7 RNA ポリメラーゼを停止させた。このセットアップは、ヌクレオソームが部分的にアンラップした、構造緩和シミュレーションの初期構造を模倣するものである。T7 RNA ポリメラーゼの停止位置を -54^{th} 、 -29^{th} 、 -14^{th} bp と変えるために、3種類の DNA (T7_601_ -54^{th} 、T7_601_ -29^{th} 、T7_601_ -14^{th}) を用意した (Figure 7)。ヌクレオソームが下流へ移動したかどうかは、2種類の制限酵素 (BssSI, EcoRI) での DNA 切断に基づいて判断した (Figure 8)。BssSI の認識サイトは 601 配列の内部、EcoRI の認識サイトは 601 配列より下流に置いた。それぞれ、ヌクレオソームの下流への移動によって露出、遮蔽される位置である。制限酵素サイトにヌクレオソームが形成されていると DNA の切断効率

が大きく低下する。したがって制限酵素処理後の非切断 DNA の割合は、その制限酵素サイトでのヌクレオソーム形成の割合と対応する。T7 RNA ポリメラーゼの転写前後でのヌクレオソームを制限酵素で処理して、切断 DNA と非切断 DNA をアガロースゲル電気泳動により分画した。そして、転写前後での非切断 DNA の割合を測定した。転写前後での非切断 DNA の割合の変化 $\Delta_{\text{occlusion}}$ を計算し、各制限酵素サイト上でのヌクレオソームの形成割合の変化を推定した。ある制限酵素サイトにおいて $\Delta_{\text{occlusion}} \ll 1$ ($\Delta_{\text{occlusion}} \gg 1$) のとき、T7 RNA ポリメラーゼの転写によってそのサイト上でのヌクレオソーム形成の割合が低下（増加）していると判断できる。

制限酵素アッセイの結果、T7 RNA ポリメラーゼによるヌクレオソームのアンラッピングに依存してヌクレオソームの下流への移動が起こることを観察した。まず T7_601_−54th、T7_601_−29th、T7_601_−14th の 3 種類の DNA について、ヌクレオソームを形成させずに制限酵素アッセイを行っ

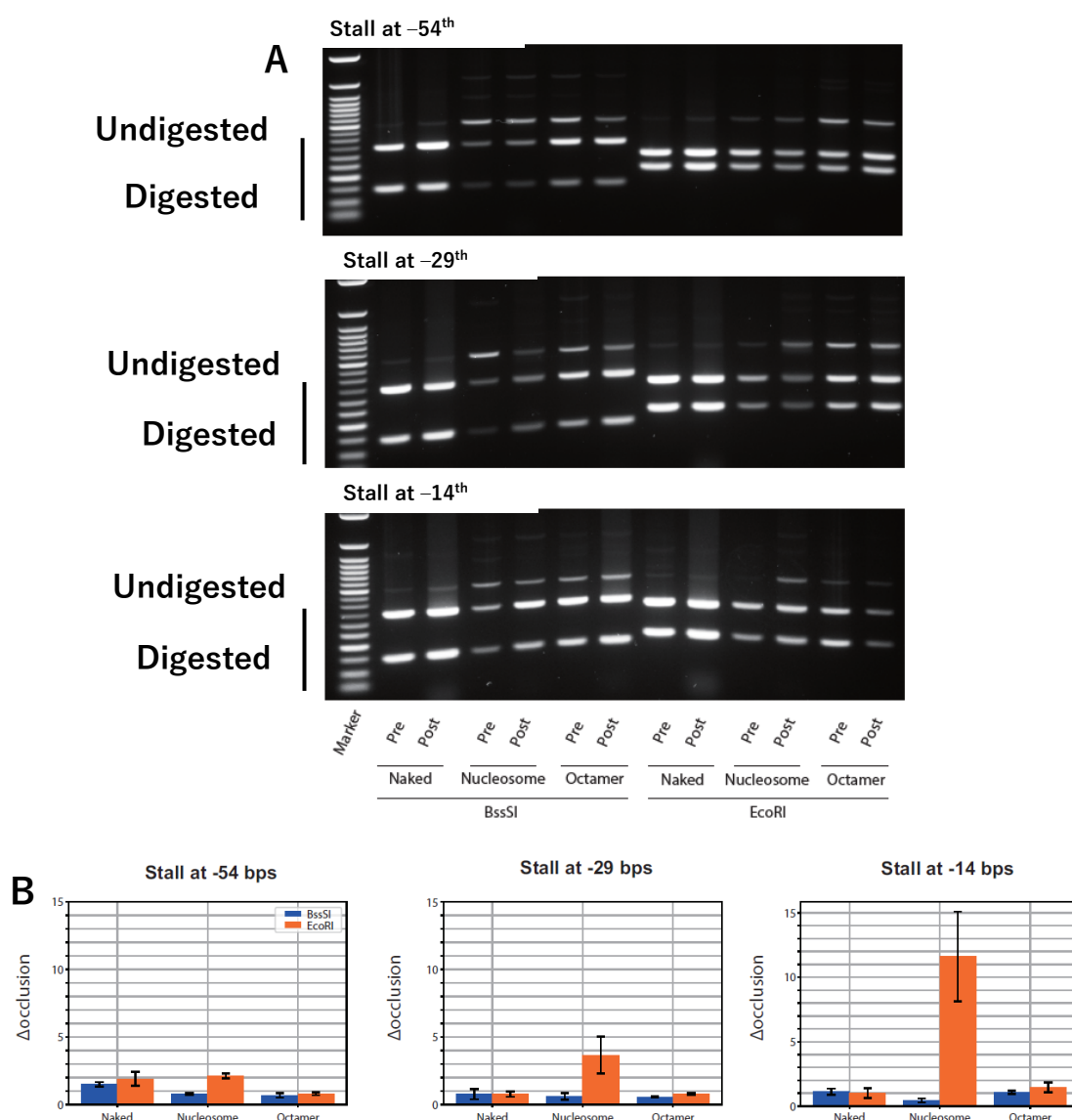


Figure 14: 制限酵素アッセイ。(A) 1%アガロース電気泳動像。DNA は Sybr-Safe によって染色した。(B) 転写前後での非切断 DNA の割合変化 ($\Delta_{\text{occlusion}}$)。(A) の制限酵素アッセイを 3 回独立に実行して解析した。エラーバーは標準偏差を示す。

た (Figure 14A、Naked)。 $\Delta_{\text{occlusion}}$ を計算すると、3 種類の DNA どれにおいても、EcoRI、BssSI サイトともに $\Delta_{\text{occlusion}} \sim 1$ であった (Figure 14B、Naked)。したがって T7 RNA ポリメラーゼが -54^{th} 、 -29^{th} 、 -14^{th} bp で停止したことは、制限酵素での各 DNA の切断に影響を与えなかった。次に 3 種類の DNA にヌクレオソームを形成させてから制限酵素アッセイを行った (Figure 14A、Nucleosome)。EcoRI サイトでの $\Delta_{\text{occlusion}}$ は、T7_601_ -54^{th} 、T7_601_ -29^{th} 、T7_601_ -14^{th} それぞれ、 2.1 ± 0.2 、 3.7 ± 1.4 、 11.6 ± 3.5 であった (Figure 14B、Nucleosome)。したがって T7 RNA ポリメラーゼの停止位置がダイアドの位置 (0^{th} bp) に近いほど、転写後において EcoRI サイト上にヌクレオソームが形成されやすくなることが示された。一方で、BssSI サイトでの $\Delta_{\text{occlusion}}$ は、T7_601_ -54^{th} 、T7_601_ -29^{th} 、T7_601_ -14^{th} それぞれで、 0.8 ± 0.1 、 0.6 ± 0.2 、 0.4 ± 0.2 であった (Fig.13B、Nucleosome)。したがって T7 RNA ポリメラーゼに停止位置がダイアドに近いほど、転写後において BssSI サイトが溶液中に露出しやすくなることが示された。特に T7 RNA ポリメラーゼが -14^{th} bp の位置で停止したときに、EcoRI サイトでの $\Delta_{\text{occlusion}}$ は 1 よりずっと大きい値をとり、BssSI サイトでの $\Delta_{\text{occlusion}}$ は小さい値をとっていた。さらに 3 種類の DNA についてヌクレオソームを形成させずに、DNA とヒストンオクタマーを混ぜたものを用いて制限酵素アッセイを行った。3 種類の DNA どれにおいても、EcoRI、BssSI サイトともに $\Delta_{\text{occlusion}} \sim 1$ であった (Figure 14AB、Octamer)。したがって、水溶液中に遊離したヒストンオクタマーは、BssSI、EcoRI サイトでの $\Delta_{\text{occlusion}}$ の変化に寄与しないことが示された。以上の制限酵素アッセイの結果は、T7 RNA ポリメラーゼが -14^{th} bp の位置までヌクレオソームをアンラップすると、ヌクレオソームが元の 601 配列上から下流の配列上へ移動することを示した。さらにこの結果は、上述の構造緩和シミュレーションで、DNA トランスロケースがヌクレオソームを -18^{th} bp の位置までアンラップしたときにヌクレオソームの下流への移動が観察されたこと (Figure 11 & Figure 12) と一貫する。

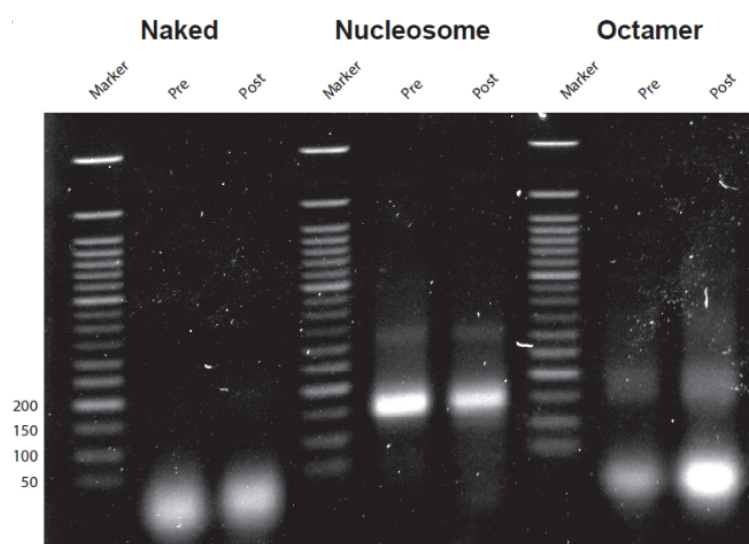


Figure 15: マイクロコッカルヌクレアーゼアッセイの 1%アガロースゲル電気泳動像。Naked DNA (ヌクレオソームを形成していない DNA)、Nucleosome、Octamer (DNA + 遊離ヒストンオクタマー) を基質にして転写アッセイを行い、マイクロコッカルヌクレアーゼと反応させた。

ディープシーケンシングアッセイ

ディープシーケンシングアッセイによって、ヌクレオソームの移動距離を測定して、シミュレーションの結果と一貫することを確認した。制限酵素アッセイでは、制限酵素サイト上でのヌクレオソームの有無しか検出できないため、高解像度でヌクレオソームの形成位置を測定することは難しい。そこで、マイクロコッカルヌクレアーゼを用いてヌクレオソーム形成領域の DNA のみ切り出し、ナノポアシーケンサーでその配列を読むことで、転写前後でのヌクレオソームの位置を直接測定した。転写反応は制限酵素アッセイと同様に ATP 以外のヌクレオチドが存在する条件で行い、T7 RNA ポリメラーゼを 601 配列上で停止させた。

まず、再構成したヌクレオソームを用いて、マイクロコッカルヌクレアーゼによってヌクレオソーム形成領域の DNA を切り出して (Figure 15)、その配列をシーケンシングした。得られたリードの長さの分布をとると、158 bp でピークが観察された (Figure 16A)。この長さはヌクレオソームを形成する DNA の長さに概ね一致する。さらにリードの中心をヌクレオソームの場所として定義してリファレンス DNA 配列上にマッピングすると、601 配列の中心にピークが現れた (Figure 16B)。このことからヌクレオソームが位置決定配列である 601 配列上に再構成されていることが確認できた。

次に転写反応によりヌクレオソームが分解していないことを確認した。転写反応前後のヌクレオソームをマイクロコッカルヌクレアーゼで処理して DNA を精製し、アガロースゲル電気泳動によってヌクレオソーム形成領域の DNA を観察した。転写前後で 150 bp の位置に明瞭な DNA バンドを観察した (Figure 15)。このことから、転写前後でヌクレオソームが十分存在していることが示された。

転写反応前後のヌクレオソームをマイクロコッカルヌクレアーゼで処理して、切り出した DNA をシーケンシングした。T7_601_−54th と T7_601_−14th の 2 種類の DNA を使って T7 RNA ポリメラーゼを −54th bp、−14th bp の位置に停止させて、それぞれの転写前後でのヌクレオソームの分布を測定した。転写後のヌクレオソームの分布を転写前のヌクレオソームの分布で正規化した。この正規

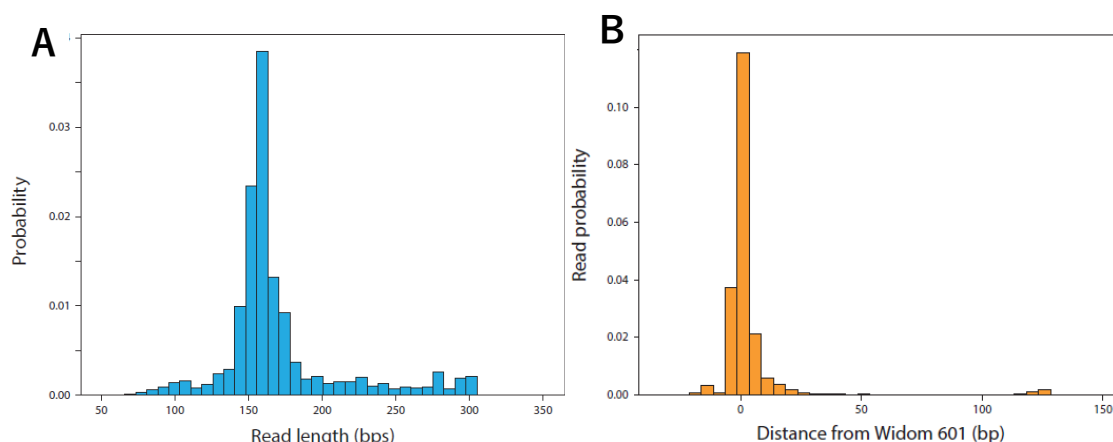


Figure 16: 再構成したヌクレオソームのディープシーケンシングの結果。(A) リード長分布。ガウスフィッティングの結果、ピーク位置は 158 bp であった。(B) ヌクレオソーム分布。Widom 601 の中心点を 0 bp として定義した。

化した分布は、T7 RNA ポリメラーゼとの衝突によって各位置でのヌクレオソームの形成割合がどの程度変化したかを示し、転写後に移動したヌクレオソームの分布に対応する。

T7 RNA ポリメラーゼが -14^{th} bp に停止したとき、 $+50^{\text{th}}$ bp と $+100^{\text{th}}$ bp 付近に、移動したヌクレオソームのピークが観察された (Figure 17B)。また、T7 RNA ポリメラーゼが -54^{th} bp 位置に停止したときには、 $+50^{\text{th}}$ bp 付近にのみピークが観察されて $+100^{\text{th}}$ bp 付近にはピークが観察されなかった (Figure 17A)。シミュレーションの予想では、トランスロケースとの衝突によってヌクレオソームは 78 ~ 102 bp 移動していた。したがって、T7 RNA ポリメラーゼが -14^{th} bp に停止したときに観察された 2 つのピーク ($+50^{\text{th}}$ bp、 $+100^{\text{th}}$ bp) のうち $+100^{\text{th}}$ bp のピークは、シミュレーションで推定した「レーンスイッチメカニズム」によるヌクレオソームの移動距離と一貫している。

一方で、 -54^{th} bp と -14^{th} bp で停止したときの両方で観察される $+50^{\text{th}}$ bp のピークは、ヌクレオソームが自発的に 601 配列から準安定な下流側の領域 (Figure 18) へスライディングしたことによるものであると結論した。「レーンスイッチメカニズム」以外のヌクレオソームが下流側へ移動するメカニズムの候補として、1) T7 RNA ポリメラーゼが 1 bp 分進むのに対してヌクレオソームも 1 bp 分進む、「Pushing model」、2) T7 RNA ポリメラーゼが 601 配列の途中で停止することで、601 配列上

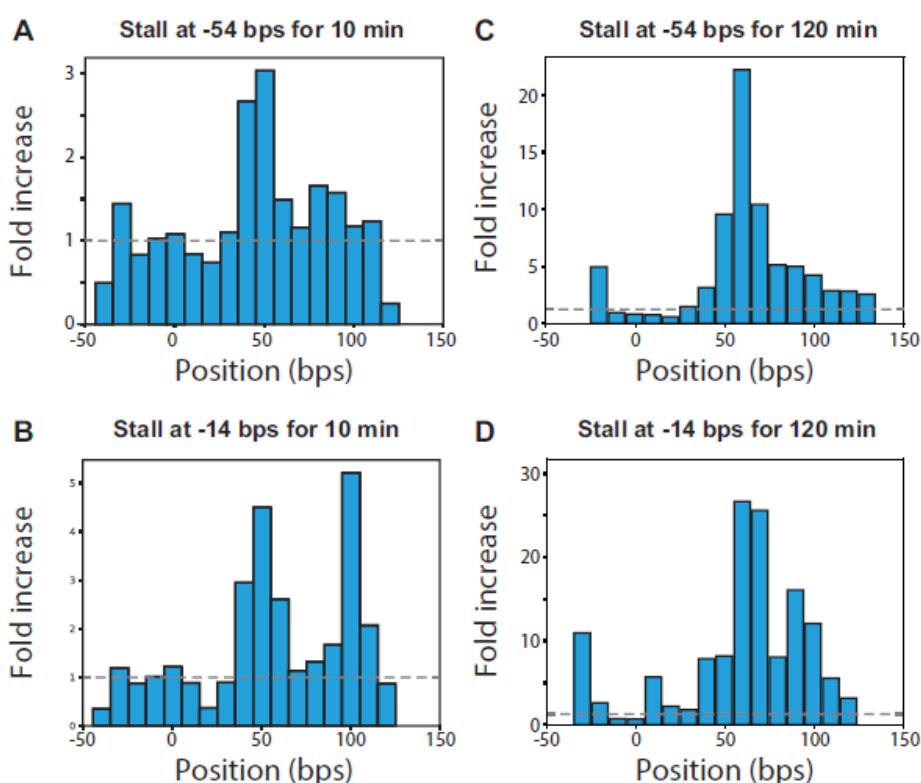


Figure 17: 転写前後でのヌクレオソーム分布の変化。(A) T7_601_ -54^{th} にヌクレオソームを再構成して、T7 RNAP で 10 分間反応。(B) T7_601_ -14^{th} にヌクレオソームを再構成して、T7RNAP で 10 分間反応。(C) T7_601_ -54^{th} にヌクレオソームを再構成して、T7RNAP で 120 分間反応。(D) T7_601_ -14^{th} にヌクレオソームを再構成して、T7RNAP で 120 分間反応。

でのヌクレオソームのポジショニングが不安定化して、代わりに準安定な下流+50 bp にスライディングする、「Spontaneous sliding model」が挙げられる (Figure 19)。Pushing モデルの場合、ヌクレオソームの移動距離は T7 RNA ポリメラーゼの移動距離と対応する。ヌクレオソームが -54^{th} bp、 -14^{th} bp で停止したときの移動距離は、それぞれ 19 bp、59 bp である。しかしこれは、 -54^{th} bp で停止したときには+50th bp の位置にのみピークがあり、+19th bp の位置にはピークがないことと矛盾する。「Spontaneous sliding model」の検証のため、理論モデルを使って、T7_601_ -54^{th} の DNA 上でのヌクレオソーム分布の自由エネルギーを計算した。601 配列上にヌクレオソームが形成されているときに自由エネルギーが最安定である一方で、そこから 50 bp 下流にも準安定な領域が存在していた (Figure 18)。このことは、「Spontaneous sliding model」による移動を支持する。さらに転写反応の時間を 10 min から 2 hour に延長してからディープシーケンシングアッセイを行って、同様にヌクレオソームの分布を解析した。T7 RNA ポリメラーゼを -14^{th} bp に停止させたときには、やはり+50th bp と+100th bp の位置にピークが現れたが、+100th bp のピークは+50th bp のものよりも低く現れた (Figure 17CD)。T7 RNA ポリメラーゼを -54^{th} bp に停止させたときには、+50th bp の位置にピークが鋭く現れた一方、+100th bp の位置にはピークが現れなかった。ヌクレオソームの自発的なスライディングは遅い過程であり、hour のオーダーで起こることが知られている。転写反応の時間を長くしたことによって、+50th bp のピークがより顕著に表れるようになったことも、+50th bp のピークが「Spontaneous sliding model」によるものであることを支持する (Figure 17 & Figure 19)。以上のことから、+50th bp のピークがヌクレオソームの準安定な領域 (Figure 18) への自発的なスライディングによるものであると結論付けた。そのような準安定な領域があるにも関わらず、T7 RNA ポリメラーゼが -14^{th} bp の位置までヌクレオソームをアンラップした時にのみ+100th bp のピークが観察されたことは、「レーンスイッチメカニズム」の存在を示唆している。

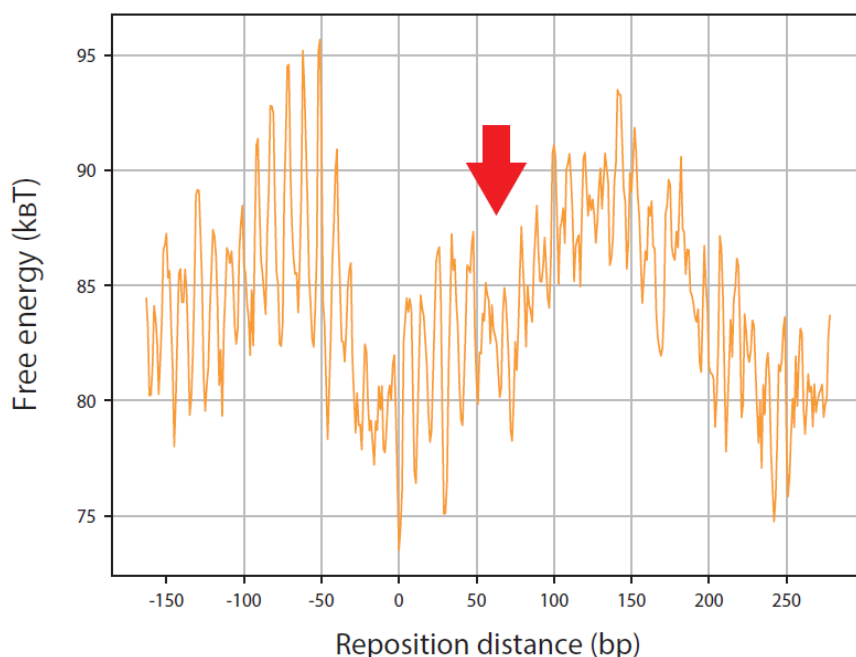


Figure 18: T7_601_54th DNA 上でのヌクレオソーム形成の自由エネルギーランドスケープ。Widom 601 配列の中心点を 0 bp として定義した。赤矢印はエネルギー極小となる点を示す。

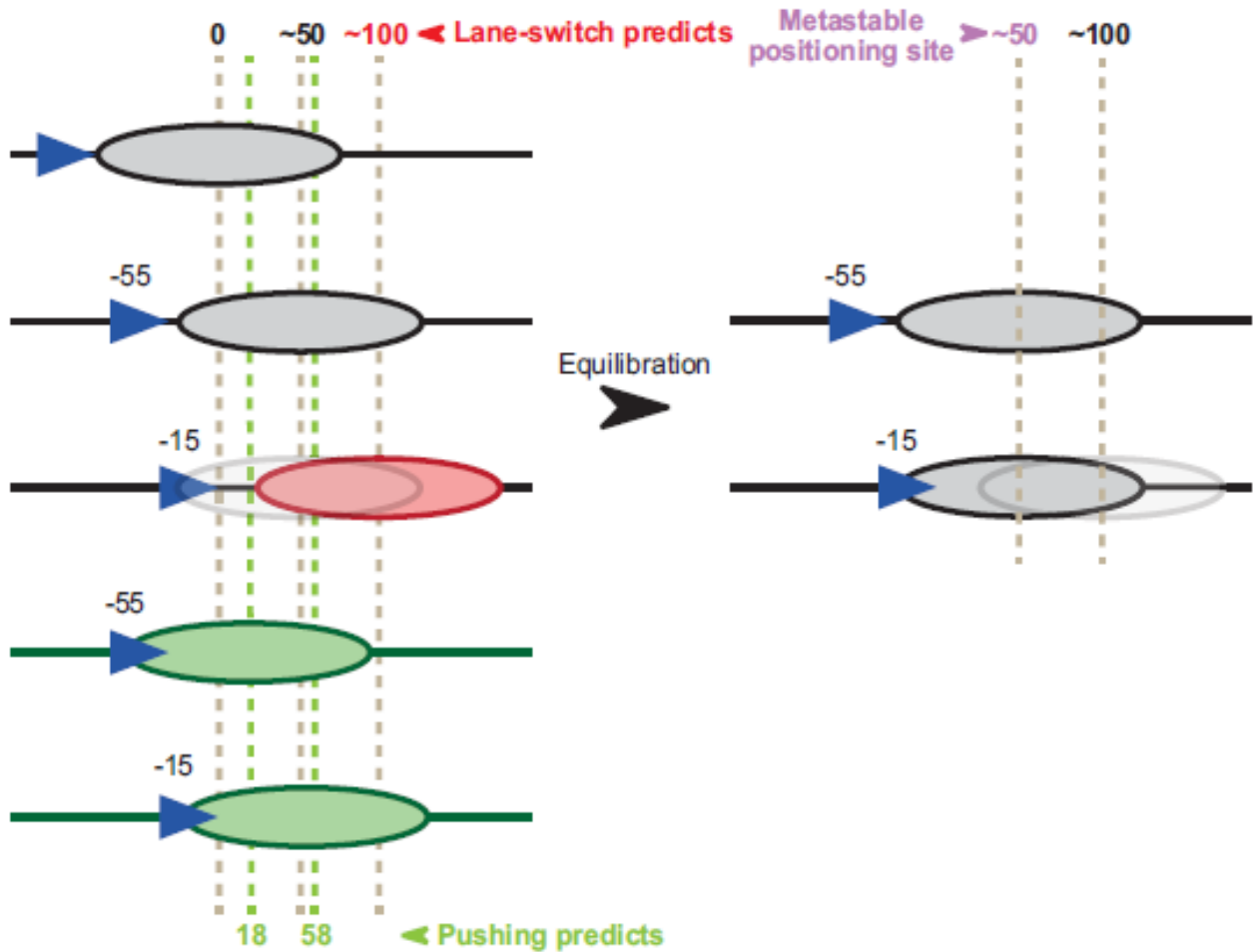


Figure 19: ディープシーケンシングアッセイの結果の解釈。T7 RNA ポリメラーゼが -14^{th} bp で停止した時ヌクレオソームは ~ 50 bp、 100 bp 下流に移動した（グレーの破線）。転写反応時間が短い時（右）は系が平衡に達しておらず、 ~ 100 bp 移動したヌクレオソーム（赤楕円）が比較的多く観察できる。反応時間を 2 時間に延長すると系が平衡に達し、ヌクレオソームは自発的なスライディングによって準安定な ~ 50 bp の位置に移動する（グレー楕円）。「Pushing model」でヌクレオソームが移動したと仮定すると、移動距離は T7RNA ポリメラーゼの移動距離に対応する。T7RNA ポリメラーゼが -54^{th} bp で停止した時ヌクレオソームは 19 bp 移動することになるが、これに対応するピークは見られなかった。また -14^{th} bp で停止したときの ~ 100 bp のピークが説明できない。

考察

本研究において、ヒストンシャペロン非存在下で DNA トランスロケースと衝突したヌクレオソームが下流に移動するメカニズムを分子レベルで解明した。まずトーラス型排除体積相互作用モデルを用いて DNA トランスロケースを粗視化して、ヌクレオソームの粗視化モデルと衝突させた。DNA トランスロケースがヌクレオソームと衝突すると、ヌクレオソームの DNA を末端からアンラップした。ヌクレオソーム DNA がダイアド付近までアンラップされると、「レーンスイッチメカニズム」によってヌクレオソームが下流に移動した。ヒストンオクタマーには DNA の結合レーンが 2 つあり、DNA のアンラッピングによって片方のレーンが露出する。隣のレーンに結合していた DNA が自発的に解離して、露出した結合レーンに再結合する（レーンスイッチ）。レーンスイッチによって露出したもう一方の結合レーンに対して下流の DNA が結合することで、ヌクレオソームの下流への移動が完了する。この DNA アンラッピング依存的なヌクレオソームの移動は、制限酵素アッセイとディープシーケンシングアッセイによって検証された。

先行研究では、様々な RNA ポリメラーゼを使って、衝突したヌクレオソームを乗り越えるメカニズムが提案されてきた。例えば RNA ポリメラーゼ II がヌクレオソームの位置を変えずに通り抜ける、Pol-II 型のメカニズム⁶⁻¹³や、RNA ポリメラーゼ III がヌクレオソームを上流に移動させて通り抜ける Pol-III 型のメカニズム^{6,14-16}が提唱された。Pol-II 型のメカニズムによるヌクレオソームの移動は、RNA ポリメラーゼ II とヒストンオクタマーとの間の特異的な静電相互作用によって実現していると考えられている。本研究のシミュレーションで用いた粗視化 DNA トランスロケースモデルは、排除体積相互作用のみを考慮しており、ヒストンオクタマーへの特異的な相互作用は除いている。さらに実験においては、ヒストンオクタマーとの進化的関係がない、バクテリオファージの T7 RNA ポリメラーゼを用いた。したがって本研究では DNA トランスロケースとヌクレオソームとの間に特異的な相互作用がはたらいっていないため、Pol-II 型のヌクレオソームリポジショニングは観察されなかったと考えられる。また、Pol-III 型のメカニズムによるヌクレオソームの上流への移動は、ヌクレオソームを DNA の下流端に再構成させたヌクレオソームを使った実験に基づいている。このような実験系では下流の DNA が存在しないため、初めからヌクレオソームの下流への移動の可能性が排除されている。一方で本研究では、ヌクレオソームを DNA の中央に配置して、上・下流の両方への移動が可能な条件でシミュレーション、実験を行った。したがって本研究ではヌクレオソームの下流にリンカーDNAがあり、ヌクレオソームが下流に移動する余地があるため、Pol-III 型のヌクレオソームリポジショニングは観察されなかったと考えられる。本研究では、「レーンスイッチメカニズム」によるヌクレオソームの下流への移動が、トランスロケースがヌクレオソームに対して非特異的に相互作用する際の分子機構であると結論づけた。しかし上述の Pol-II 型、Pol-III 型メカニズムの実験条件と本研究との比較から、本研究によってこれらのメカニズムの可能性が除外されたわけではない。DNA トランスロケースがヌクレオソームに衝突した後のヌクレオソームリポジショニングは、上・下流の DNA への移動可能性や、トランスロケースとヌクレオソームとの相互作用に依存していることが示唆された。

ヌクレオソームが下流へ移動する際の他のメカニズムとして、トランスロケースがヌクレオソーム

ムを 1 bp ずつ押すように移動させる「Pushing model」がすでに提唱されている。Gottesfeld、Luger らは、ヌクレオソームのダイアドに結合する小分子、ピロール-イミダゾールポリアミドの存在下で、T7 RNAP によるヌクレオソームのリポジショニングが阻害されることを報告していた¹⁸。そして彼らはこの結果が「Pushing model」を支持するものであると結論付けている。しかし彼らの研究では、このポリアミドがヌクレオソームのアンラッピングを阻害しているという可能性を除いていない。さらに T7 RNAP がヌクレオソームを押すことなく、DNA を部分的にアンラッピングできることが電子顕微鏡による直接観察や生化学的手法によって明らかになっている^{6,14,15}。そして本研究のディープシーケンシングアッセイによって、ヌクレオソームの下流への移動が「Pushing model」では説明できないことを示した。本研究において、「Pushing model」の存在を完全に排除したわけではないが、制限酵素アッセイとディープシーケンシングアッセイによって観察されたヌクレオソームの下流への移動は、「レーンスイッチメカニズム」によって説明できることを示した。

第2章：DNA トランスロケースによるヌクレオソームアンラッピング依存的な Nap1 による H2A/H2B 解離のメカニズム

序論

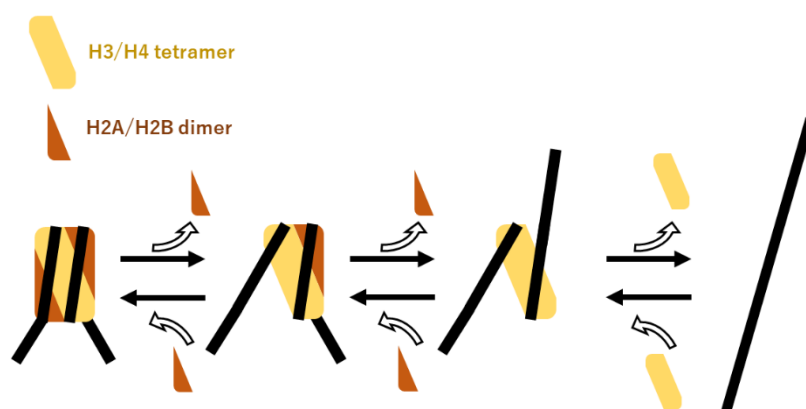


Figure 20: ヒストン交換の概念図。H2A/H2B ダイマー（茶）がはじめにヌクレオソームから解離して、H3/H4 テトラマー（黄）が最終的に DNA から解離する。ヌクレオソーム形成はその逆過程となる。

細胞内において DNA トランスロケースはヌクレオソームと衝突する。このときにヒストンの交換が起こることが知られている^{42,43}。先行研究の出芽酵母の ChIP 解析により、転写が活性化している遺伝子のプロモータ領域やコーディング領域において、新たに合成されたヒストンが取り込まれていることが示された⁴⁴。特に H2A/H2B ダイマーは H3/H4 テトラマーに比べて高い確率で交換する。また質量分析を用いた Hela 細胞の網羅的解析によって、DNA 複製依存的なヒストンの交換が観察された⁴⁵。この研究では DNA 複製後、古い H2A/H2B ダイマーと新しく合成された H2A/H2B ダイマーがシャッフルされた状態でヌクレオソームを形成していることが示された。

ヒストンシャペロンは、転写、複製、DNA 修復時のヒストン交換において中心的な役割を果たしている^{5,46,47}。ヒストンシャペロンは酸性アミノ酸に富むタンパク質で、塩基性アミノ酸に富むヒストンに結合する。多くのヒストンシャペロンは ATP 加水分解非依存的に、ヌクレオソームからヒストンを解離させたり、新たに合成されたヒストンを DNA 上に配置したりする機能を持つ。こうしたヒストンシャペロンが DNA トランスロケースと協調してはたらいて、転写、複製、DNA 修復時におけるヒストン交換を制御することが知られている^{5,46,47}。ヒストン交換は、ヌクレオソームからのヒストンの解離と、DNA へのヒストンの配置の 2 つのステップからなる (Figure 20)。ヌクレオソームからヒストンが解離する際、まず H2A/H2B ダイマーの解離が先行して、次に H3/H4 テトラマーの DNA からの解離が起こることが観察された^{24,48}。したがって転写、複製、DNA 修復時のヒストン交換において、ヒストンシャペロンが H2A/H2B ダイマーの解離を促進させることが示唆された。

Nap1 は H2A/H2B ダイマーに結合し、ヌクレオソームの形成と分解を促進するヒストンシャペロンである⁴⁹。Nap1 は生理活性条件下でホモダイマーを形成するヒストンシャペロンである⁵⁰。当初、Nap1 はヌクレオソーム形成を誘導するタンパク質として同定された⁵¹。しかしその後の研究で、単独、もしくはクロマチンリモデリングや転写の過程で Nap1 がヌクレオソームの分解を誘導することが示された⁵²⁻⁵⁵。また、Nap1 は C 末端に酸性アミノ酸に富む天然変性領域をもつ。この Nap1 の C

末端領域はヌクレオソームから H2A/H2B を解離する過程に重要な役割を果たしていることが示唆された⁵²。一方でヌクレオソームの形成過程において、この領域は必要ない⁵⁶。

Levchenko らは、T7 RNA ポリメラーゼによる転写時に Nap1 が H2A/H2B の解離を促進することを示した⁵⁴。しかし T7 RNA ポリメラーゼによる転写のどの段階で Nap1 が H2A/H2B の解離を促進するのか、そして Nap1 がどのように H2A/H2B の解離に寄与するのかは明らかになっていなかった。Nap1-H2A/H2B 複合体の結晶構造解析から、H2A/H2B と Nap1 の結合界面が、ヌクレオソーム形成時の DNA との結合界面と重複していることが示された^{57,58} (Figure 21)。したがって、Nap1 と DNA は H2A/H2B との結合に関して競合していることが示唆された。このことは、Nap1 がヌクレオソーム中の H2A/H2B と相互作用するためには、ヌクレオソーム DNA と H2A/H2B との間の結合が解消される必要があることを意味している。そこで本研究では、まず DNA トランスロケースによるヌクレオソームのアンラップが、Nap1 によるヌクレオソームからの H2A/H2B 解離を可能にするという仮説を立てた。そして、T7 RNA ポリメラーゼによるヌクレオソームの部分なアンラップが、Nap1 によるヌクレオソームからの H2A/H2B の解離を促進するかどうかを生化学実験によって検証した。また、Nap1 による H2A/H2B 解離のダイナミクスを調べるために、粗視化分子動力学シミュレーションを行った。まず Nap1-H2A/H2B 複合体の粗視化モデルを検証した後、この複合体形成における Nap1 の C 末端領域の寄与を調べた。さらに DNA トランスロケースによってアンラップされたヌクレオソームの粗視化モデルを用いて、Nap1 による H2A/H2B 解離のシミュレーションを行った。この H2A/H2B 解離シミュレーションと、Nap1-H2A/H2B 複合体の解析に基づいて、Nap1 がヌクレオソームから H2A/H2B を解離させるメカニズムを提唱した。

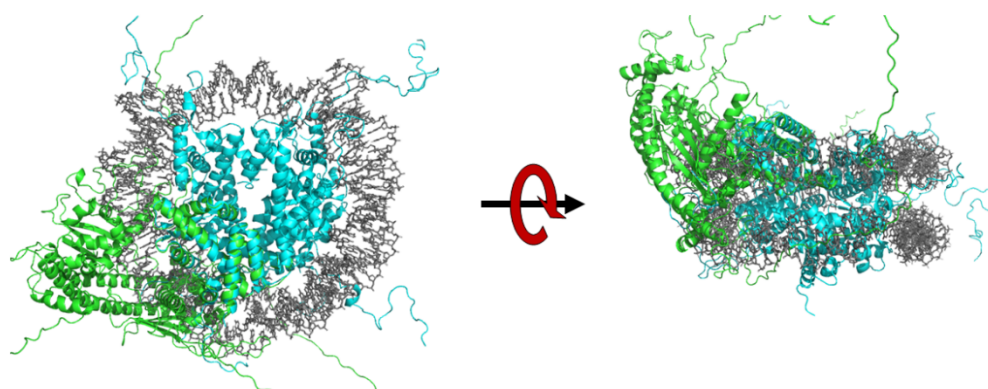


Figure 21: ヌクレオソーム (1KX5、青) と Nap1-H2A/H2B 複合体 (5G2E、緑) の結晶構造。Nap1-H2A/H2B 複合体の H2A/H2B をヌクレオソーム中の H2A/H2B に重ね合わせた。Nap1 とヌクレオソーム DNA (グレー) が立体的に重なっており、互いに H2A/H2B との結合に関して競合している。

方法

粗視化分子動力学シミュレーション

ヌクレオソームと DNA トランスロケースの粗視化モデル

ヌクレオソームと DNA トランスロケースの粗視化モデルは第 1 章と同じものを用いた。

粗視化 Nap1 モデル

本研究で用いた Nap1 モデルは、Nap1 ダイマーの結晶構造 (PDBID: 2Z2R⁵⁹) を基にして構築した。粗視化モデルはヒストンと同様に 1 アミノ酸を 1 粒子で表現する AICG2+モデル²²を使用した。Nap1 とヌクレオソームとの間の相互作用は排除体積相互作用、静電相互作用によって表現した。Nap1 ダイマーは 284th ~ 309th 残基に β ヘアピン構造を持つが、H2A/H2B と複合体を形成するとこの領域が変性することが知られている⁵⁸。そのため本研究ではこの領域を天然変性領域として扱った。また Nap1 は N 末端と C 末端側に天然変性領域をもつ。2Z2R の全原子構造でモデリングされていないこれらの領域は、Modeller⁶⁰ を用いてモデリングした。Nap1 がもつ天然変性領域上のアミノ酸の電荷は、pH 7 の溶液中での電荷に基づいて整数で与えた。非変性領域の表面電荷については、RESPAC 法²⁷を用いて全原子構造の表面電荷に基づいて最適化した。

Nap1-H2A/H2B ダイマーの構造サンプリングシミュレーション

まず、Nap1 ダイマーと H2A/H2B ダイマーとの複合体の結晶構造 (PDBID: 5G2E⁵⁸) に基づいて、上述の Nap1 粗視化モデルと H2A/H2B 粗視化モデルとの結合構造をモデリングした。Nap1 とヒストン間の相互作用は排除体積相互作用と静電相互作用を用いた。

Nap1-H2A/H2B 間の結合自由エネルギー計算

Nap1 と H2A/H2B との結合の自由エネルギー曲線を計算するために、アンブレラサンプリングを行った。反応座標として、Nap1 の非変性領域の重心と H2A/H2B の非変性領域の重心との間の距離を用いた。反応座標を 25 Å から 111 Å まで 2 Å 刻みで 44 個のウィンドウに分割して、調和振動子ポテンシャルをバイアスポテンシャルとして加えた。各ウィンドウで 5 本の独立なシミュレーションを 10^8 ステップ実行して重心間距離の分布を計算し、WHAM⁶¹ を用いて自由エネルギー曲線を計算した。

H2A/H2B 解離シミュレーションの初期構造

DNA トランスロケースとヌクレオソームの初期構造として、DNA トランスロケースがヌクレオソームから DNA をアンラップした状態で停止している構造を使った (Figure 22)。これは、Chapter 1 の構造緩和シミュレーションで用いたものと同じである。このときトランスロケースは -31st bp の位置にあるため、「レーンスイッチメカニズム」によるヌクレオソームの下流への移動は起こらない。本研究では Nap1 ダイマーがヌクレオソームに結合した後のダイナミクスに注目するため、予め Nap1 ダイマーとヌクレオソームとが結合した状態の構造を作った (Figure 22)。トランスロケースによるヌクレオソームアンラッピングによって H2A/H2B と DNA との結合界面は溶媒中に露出していた

(Figure 22 左)。この領域に Nap1 を結合させるため、Nap1 モデルをこの露出した結合界面に近づけた状態で 10^6 ステップの計算を行った。この短い計算によって得られた、Nap1 がヌクレオソームに結合した直後の構造を初期構造として用いた (Figure 22 右)。

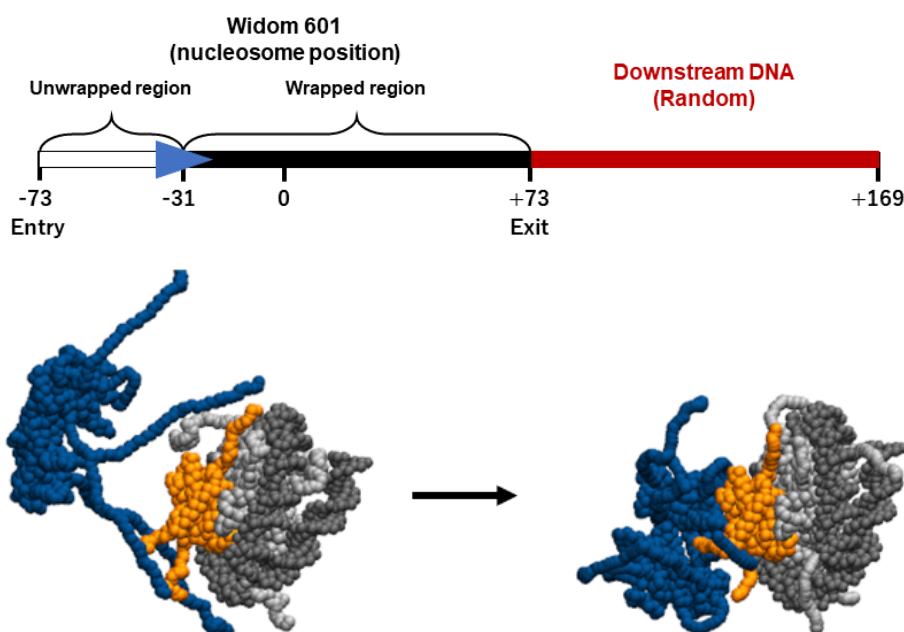


Figure 22: シミュレーションで用いた DNA 配列と初期構造 [Nap1 がヌクレオソームに結合する前(左)と結合した後 (右)]。H2A/H2B はオレンジ、他のヒストンはグレー、ヌクレオソーム DNA は黒、下流 DNA は赤、Nap1 は青で色付けした。図中では DNA トランスロケースと下流 DNA は省略。

シミュレーションのプロトコル

全ての粗視化分子動力学シミュレーションにおいて、CafeMol 3.2²⁹を利用した。シミュレーションの方程式系として Langevin 方程式を採用した。全てのシミュレーションを通して、温度を 300 K、塩強度を 300 mM、時間幅を 0.3 cafemol time (~ 14.7 fs) に設定した。H2A/H2B 解離シミュレーションでは、50 本の独立なシミュレーションを 3×10^8 ステップ行った。Nap1 と H2A/H2B ダイマーの構造サンプリングシミュレーションでは 20 本の独立なシミュレーションを 10^8 ステップ、アンブレラサンプリングでは 5×44 の独立なシミュレーションを 10^8 ステップ実行した。

使用した DNA 配列、タンパク質

本研究では、第 1 章で説明した 498 bp の DNA を用いた (Figure 7)。T7 RNA ポリメラーゼによってヌクレオソームを部分的にアンラップして H2A/H2B ダイマーを露出させるために、T7_601_–14th のテンプレート DNA を使った (Figure 7)。ヒストンについても、第 1 章と同様に *Saccharomyces cerevisiae* のヒストン H3 (H3V35C), H4, H2A, H2B (H2BT119C) を用いて、ヌクレオソームを再構成した³⁰。T7 RNA ポリメラーゼについては、第 1 章と同様に HiScribe T7 High Yield RNA synthesis kit (E2040S, New England BioLabs) 付属の T7 RNA ポリメラーゼを用いた。

本研究では、*Saccharomyces cerevisiae* の Nap1 をすでに確立された手法^{62,63}に基づいて精製した。His⁶-Nap1 タンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) 株で大量発現させた。この His⁶-Nap1 を Ni-NTA アガロース (141-09764, 富士フイルム和光純薬株式会社) によって精製した。精製したタンパク質溶液のうち、半分をトロンビン (T4648-1KU, Sigma aldrich) と反応させて His⁶ タグを切除してから、陰イオン交換カラム (17115401, Cytiva) を用いて最終精製を行った。もう半分の His⁶-Nap1 は後の His⁶ タグプルダウンで使うため、そのまま陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで最終精製した。

転写アッセイ - EMSA

Nap1 の存在下、非存在下において、再構成したヌクレオソームを T7 RNA ポリメラーゼと反応させた。上述の DNA とヒストンを用いて、塩透析法によってヌクレオソームを再構成した。Nap1 は終濃度が 6 μ M になるように反応液に加えた。T7 RNA ポリメラーゼを -14th bp で停止させるために、1 mM GTP, 1 mM CTP, 1 mM UTP (E2040S, New England BioLabs) を含むバッファー中で、37°C で 10 分間反応させた。T7_601_-14th の DNA は、ダイアドから -69 bp の位置で初めてシトシンが非テンプレート配列に出現する。T7 RNA ポリメラーゼを -69th bp で停止させるために、1 mM GTP, 1 mM UTP (E2040S, New England BioLabs) を含むバッファー中で、37°C で 10 分間反応させた。

ヌクレオソームが部分的に壊れた構造 (サブヌクレオソーム) と正常なヌクレオソーム、Naked DNA を分離するために、転写アッセイ後の反応液を 6% 非変性 TBE-ポリアクリルアミドゲルを用いて分画した。10.5 mA の定電流条件で 4°C、150 分間の泳動を行った後、SYBRTM Gold Nucleic Acid Gel Stain (S11494, Thermo Fisher Scientific) を用いて染色した。染色ゲルを iBright FL 1500 イメージングシステム (Thermo Fisher Scientific) によって可視化した。

転写アッセイ後サンプルの分画

サンプル中の DNA-タンパク質複合体を分析するために、分取電気泳動装置 (1702908, Bio-Rad) を用いて、サンプルを分画し回収した。回収した各フラクションに含まれている DNA-タンパク質複合体を、Native-PAGE と SDS-PAGE によって解析した。この実験では Nap1 の代わりに His⁶-Nap1 を使って上述の転写アッセイを行った。反応液に Ni-NTA アガロースを加えて、4°C で 30 分間転倒混和した。500 x g で 5 分間遠心して上清を回収した。このサンプルを、4% 非変性 TBE-ポリアクリルアミドゲルの入った分取電気泳動装置にアプライした。泳動条件は、4°C で 2 時間、400 V の定電圧条件であり、フラクションは 300 μ l/min で 10 分ごとに回収した。回収したフラクションを、30K MWCO Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter (UFC503096, Merck) を使って濃縮した。各フラクションの 1/10 量を Native-PAGE で、残りを SDS-PAGE によって解析した。非変性ゲルは SYBRTM Gold Nucleic Acid Gel Stain で染色し、変性ゲルは EzStain Silver (AE-1360, ATTO) を用いて銀染色を行った。

マイクロコッカルヌクレアーゼアッセイ

転写アッセイで生じたサブヌクレオソームの同定のために、マイクロコッカルヌクレアーゼで反応液を処理して、切断されずに残った DNA 断片の長さを解析した。上述の転写アッセイの後、第 1

章で行った制限酵素アッセイやディープシーケンシングアッセイと同様に、転写産物や残りのヌクレオチドの洗浄、そしてバッファーの交換を行った。マイクロコッカルスクレアーゼ (M0247S, New England BioLabs) と加えて 30 分間室温で反応させた後、スピнкаラム (A9281, Promega) を用いて DNA 断片を精製した。e-PAGEL (2331830, ATTO) とトリス-グリシンバッファーを使って Native-PAGE を行い、DNA 断片を分画した。ゲルは SYBRTM Gold Nucleic Acid Gel Stain で染色した。

結果

EMSA

DNA トランスロケースがヌクレオソームを部分的にアンラップした時に、Nap1 がヌクレオソームの分解を促進するかどうかを調べた。第 1 章で用いた全長 498 bp の DNA (T7_601_14th) にヌクレオソームを再構成した。このヌクレオソームテンプレートに対して、T7 RNA ポリメラーゼを使って ATP 非存在下で転写反応を行い、ヌクレオソームを部分的にアンラップした。このとき反応系には Nap1 を過剰量加えて、T7 RNA ポリメラーゼによって部分的にアンラップしたヌクレオソームと反応させた。転写反応後のサンプルを非変性条件でポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分画した (Figure 23A)。Nap1 非存在下では、転写前後ともに B1 と B3 のシグナルが明瞭に観察された (Figure 23A レーン 5、6)。Naked DNA を基質に用いた場合、B3 のシグナルのみが観察されたため、B1 のシグナルがヌクレオソーム、B3 のシグナルが Naked DNA に対応していることが示された (Figure 23A レーン 1-4)。Nap1 存在下では、転写前は Naked DNA (B3) とヌクレオソーム (B1) のシグナルのみであったのに対して、転写後には中間位置に新たなバンド (B2) が出現した (Figure 23A レーン 7、8)。Nap1 存在下での B2 バンドの出現が T7 RNAP によるヌクレオソームアンラッピングに依存することを確かめるため、ATP と CTP 非存在下で転写反応を行い、T7 RNA ポリメラーゼをダイアドから -69th bp の位置で停止させた。-14th bp で停止した条件と比べて、-69th bp で停止した条件では B2 バンドがほとんど観察されなかった (Figure 23B)。したがって Nap1 存在下での B2 バンドの出現は T7 RNA ポリメラーゼによる -14th bp までのアンラップに依存することが示された。

中間位置バンドの同定

上述の EMSA で出現した B2 バンドの分子組成を調べるために、H3 と H2B を蛍光色素で標識したヌクレオソームを用いて転写アッセイを行った。H3V35C、H2BT119C 変異体を精製してそれぞれに AlexaFluor 647、AlexaFluor 488 を共役結合させた。野生型の精製 H4、H2A と混合して再構成したヒストンオクタマーを用いてヌクレオソームを再構成した。転写アッセイの結果、AlexaFluor 647 と AlexaFluor 488 のシグナルが B2 バンドに共局在していた (Figure 23C)。B2 バンドのそれぞれの蛍光シグナルを定量するために、インプットのヌクレオソームのバンドに含まれる蛍光シグナルで正規化した。H3 に対応する AlexaFluor 647 のシグナルは H2B に対応する AlexaFluor 488 の 2 倍のシグナル強度を示した (Figure 23D)。この結果は B2 バンドが、H3、H4 がそれぞれ 2 分子、H2A、H2B がそれぞれ 1 分子含まれているヘキサソームに由来していることを示唆する。

B2 のバンドがヘキサソームであることを確かめるために、分取電気泳動によって転写アッセイ後のサンプルを分画した。そして、分画したサンプルに含まれている分子を SDS-PAGE によって分析した。まず、分画したサンプルを非変性ポリアクリルアミドゲルに流して EMSA で観察し、B3 (Naked DNA)、B2、B1 (ヌクレオソーム) のバンドが分離できていることを確認した。B3 はフラクション 6、B2 はフラクション 7、B1 はフラクション 8 で溶出し始めた (Figure 24A)。とくに注目するフラクション 7 では、ヌクレオソームに対応する B1 のバンドはほとんど観察されなかった。したがって分取電気泳動法によって、中間位置のバンドに含まれる DNA-タンパク質複合体とヌクレオソームとを分離できた。次に各フラクション中の分子を SDS-PAGE で分離し、銀染色法によって可視化し

た (Figure 24A)。B2 が溶出したフラクション 7 では、ヒストン H3、H4、H2A、H2B の 4 種類のバンドが観察された。ヌクレオソームが溶出したフラクション 8 でも同様に H3、H4、H2A、H2B の 4 種類のバンドが観察された (Figure 24A)。フラクション 7 に含まれる DNA-ヒストン複合体を推定するために、ヒストン H2A のシグナルと H4 のシグナルを比較した。このときフラクション 7 の H2A、H4 のシグナルは、それぞれフラクション 8 の H2A、H4 のシグナルで正規化した。フラクシ

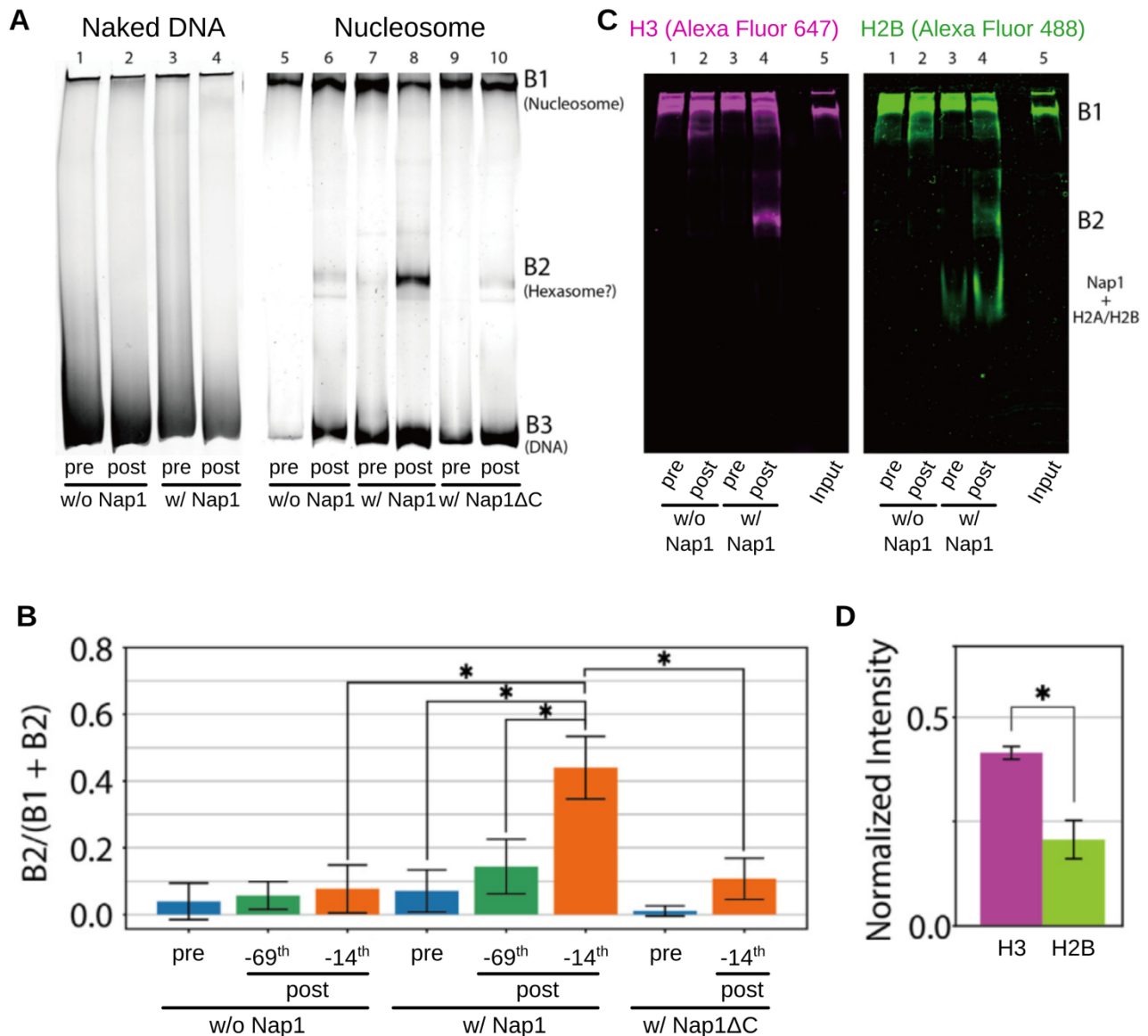


Figure 23: 転写アッセイ後の産物の EMSA。 (A) Naked DNA を基質に用いた場合 (レーン 1-4)、ヌクレオソームを基質に用いた場合 (レーン 5-10)。「pre」は転写前、「post」は転写後を表す。DNA は Sybr-Safe によって染色した。 (B) B1 と B2 のバンドシグナル強度の和で正規化した B2 のシグナル強度。エラーバーは標準偏差を表す。アスタリスクは Student の t 検定での p 値が 0.05 を下回ることを意味する。 (C) H3-AlexaFluor 647 と H2B-AlexaFluor488 を用いてヌクレオソームを使った転写アッセイの結果。 (D) Input の蛍光シグナルで正規化した B2 バンドの蛍光シグナル強度。エラーバーは標準偏差を表す。アスタリスクは Student の t 検定での p 値が 0.05 を下回ることを意味する。

ョン7のH2Aのシグナル強度はH4のシグナル強度の55%であった (Figure 24B)。このことから、フラクション7にはH3/H4ダイマー2分子に対してH2A/H2Bダイマーが1分子含まれており、ヘキサソームが形成されていることが示された。

さらにヘキサソーム形成を確かめるために、転写アッセイ後の産物をマイクロコッカルヌクレアーゼで処理して残ったDNA断片の長さを調べた。マイクロコッカルヌクレアーゼによって切り出したDNAを非変性ポリアクリルアミドゲル上で観察して、生じたDNA切断産物の長さを推定した。Nap1非存在下、転写前後のサンプルでは154 bp、158 bpの位置にバンドが観察された (Figure 24C)。Nap1存在下、転写前後のサンプルでは、152 bp、151 bpの位置にバンドが観察された (Figure 24C)。これは第1章で行ったディープシーケンシングアッセイによって得られたヌクレオソームDNAの長さで一貫している (Figure 16A)。またNap1存在下、転写後のサンプルでは120 bpの位置にもバンドが観察された (Figure 24)。DNA-ヒストン複合体で、150 bp未満の長さのDNAが巻き付いた構造体として代表的なものとしては、上述のヘキサソームと、H3/H4ダイマー2分子がDNAに巻き付

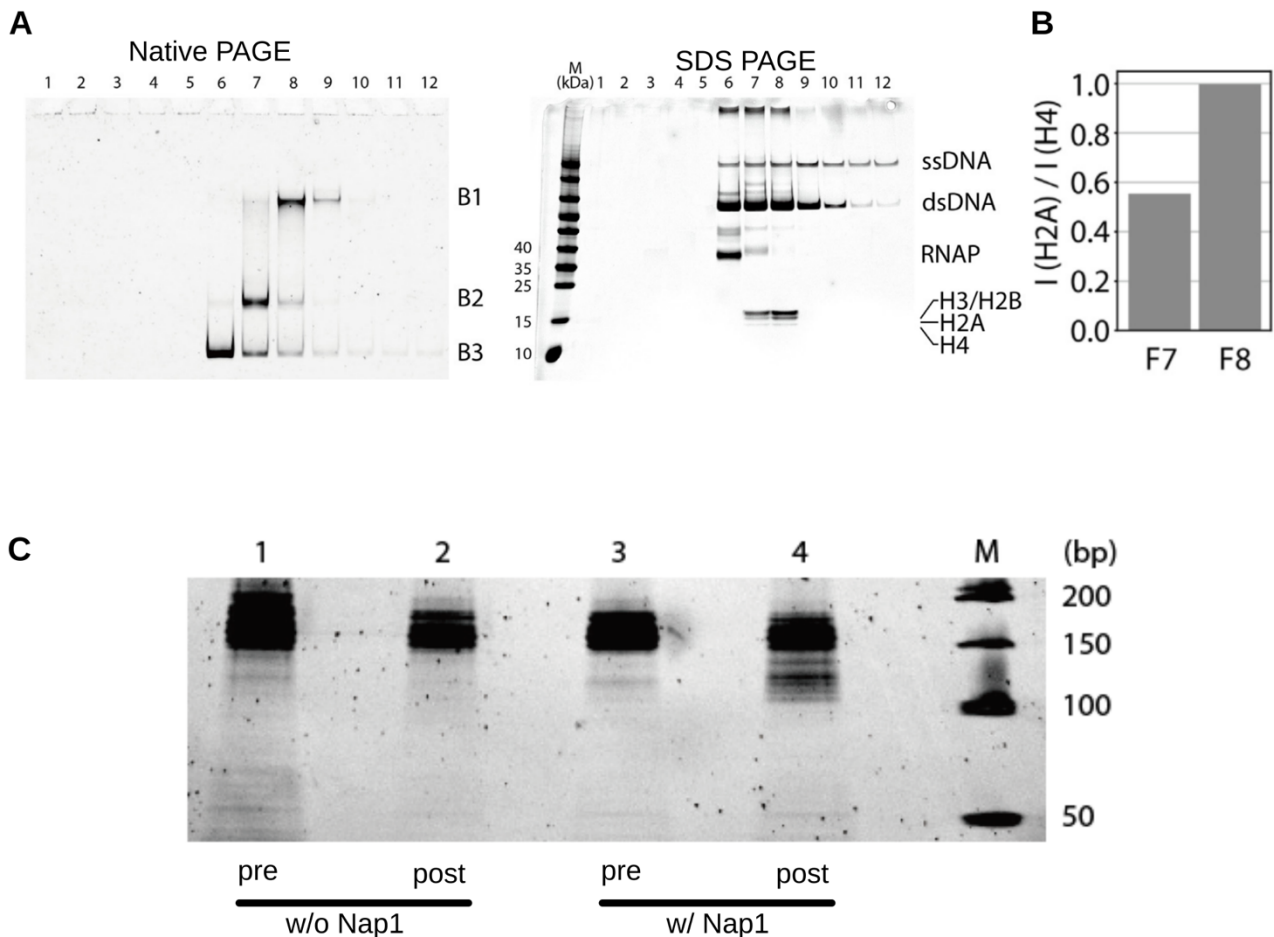


Figure 24: 転写アッセイにおけるヘキサソーム形成の検証。(A) 分取電気泳動によるB2バンドの分画。分取電気泳動装置からの溶出液を半分に分けてそれぞれNative-PAGE(左)、SDS-PAGE(右)で解析。NativeゲルはSYBR-Safeで染色し、SDSゲルは銀染色を行った。(B)(A)のSDSゲルにおけるH2AとH4のシグナル強度比。フラクション8のシグナル強度比が1になるように正規化した。(C) 転写アッセイ産物のマイクロコッカルヌクレアーゼアッセイ。SYBR-Safeによって染色した。

いたテトラソームがある。先行研究から、ヘキサソームをマイクロコッカルヌクレアーゼで処理して得られる DNA 断片の長さは 115 bp であることがすでに知られている⁶⁴。一方でテトラソームをマイクロコッカルヌクレアーゼで処理して得られる DNA 断片の長さは~73 bp であることが知られている^{65,66}。以上のことから、T7 RNA ポリメラーゼによって部分的にアンラップされたヌクレオソームから、Nap1 が H2A/H2B ダイマーを解離させることが示された。

先行研究より、Nap1 は O/N でヌクレオソームから H2A/H2B ダイマーを解離させることが示されており、この活性には Nap1 の C 末端テールが中心的な役割を果たしている⁵²。Nap1 の C 末端テールが本研究の実験系において H2A/H2B ダイマーの解離に寄与するかどうかを検証するために、C 末端を切除した Nap1 (Nap1 Δ C) を用いて転写アッセイを行った。T7 RNA ポリメラーゼによるアンラッピングに関わらず、Nap1 Δ C 存在下ではヘキサソーム (B2) が出現しなかった (Figure 23A & B)。したがって Nap1 の C 末端テールは、部分的にアンラップされたヌクレオソームから H2A/H2B ダイマーを解離させるのに寄与していることが示された。

Nap1-H2A/H2B 複合体モデルの検証

Nap1 が H2A/H2B ダイマーを部分的にアンラップしたヌクレオソームから解離させる過程を調べる前に、Nap1 と H2A/H2B ダイマーの結合シミュレーションを行った。分子間相互作用として静電相互作用と排除体積相互作用のみを適用したモデルを使って、Nap1-H2A/H2B 複合体で観察される結合様式を再現できることを検証した。Nap1 と H2A/H2B 間の結合様式は、重水素交換質量分析 (H/DX-MS) や X 線結晶解析を用いた研究によって構造レベルで調べられている^{57,58}。これらの研究では、Nap1 と H2A/H2B の非変性領域間での結合様式が高い解像度で調べられている。一方で、天然変性領域を介した結合についての情報はほとんど得られていない。そのため粗視化モデルの検証において、まずは Nap1 の N 末端領域、C 末端領域を切除したモデル (Nap1 Δ NC) と、H2A/H2B の天然変性領域を切除したモデル (H2A Δ NC/H2B Δ N) を使ってシミュレーションを行った。初期構造は結晶構造 (PDB ID: 5G2E⁵⁸) の Nap1-H2A/H2B 複合体構造に基づいてモデリングした。

Nap1 Δ NC と H2A Δ NC/H2B Δ N の間で、シミュレーション中にコンタクトが観察された割合を残基ごとに計算した。Nap1 Δ NC は 195–202th 残基、304–310th 残基、321–351th 残基で顕著にコンタクトを形成しており、この領域では Nap1-H2A/H2B 複合体の結晶構造においてコンタクトが観察されている (Figure 25A & C)。一方で H2A は 16–21th 残基、24–38th 残基、39–49th 残基、70–82th 残基、H2B は 37–40th 残基、50–60th 残基、80–93th 残基、118–125th 残基で Nap1 とコンタクトを形成していた (Figure 25B & C)。H2A の 16–21th 残基、24–38th 残基、70–82th 残基と H2B の 37–40th 残基、50–60th 残基、118–125th 残基は Nap1-H2A/H2B 複合体の結晶構造においてコンタクトが観察されている (Figure 25B & C)。一方で H2A の 39–49th 残基、H2B の 80–93th 残基の領域は結晶構造においてコンタクトが観察されていない。しかし先行研究の H/DX MS より、これらの領域で水素-重水素交換速度が低下することが示されている⁵⁷。また H2B の 80–93th 残基領域内への変異によって Nap1 との結合親和性が低下することも示されている⁵⁷。以上の結果から、静電相互作用と排除体積相互作用のみで Nap1-H2A/H2B 間の結合様式を十分に再現していると結論づけた。

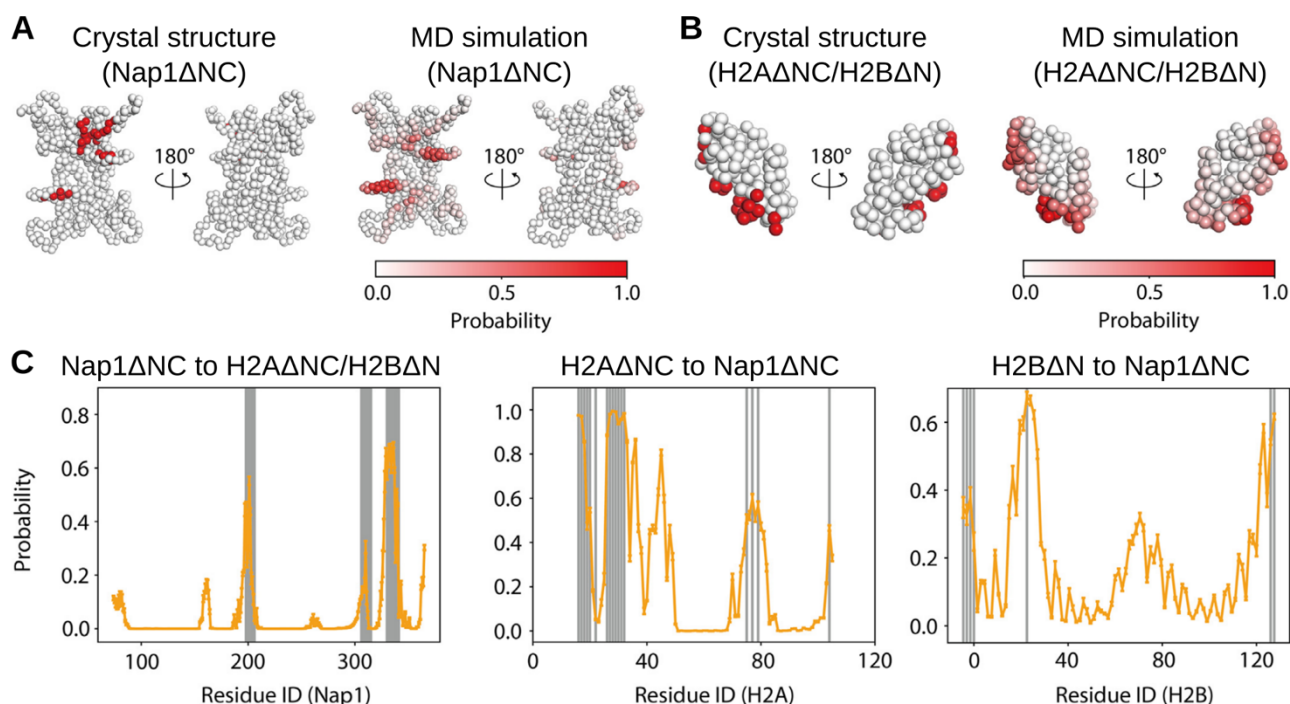


Figure 25: 粗視化 Nap1、H2A/H2B ダイマーモデルの検証。(A) Nap1 Δ NC (74–365) の粗視化構造。結晶構造 (PDB ID: 5G2E) において H2A Δ NC (16–105) /H2B Δ N (37–125) とコンタクトを形成している残基を赤で示す (パネル左)。分子動力学シミュレーションによってコンタクトが観察された残基を赤の濃淡で示す (パネル右)。(B) H2A Δ NC/H2B Δ N の粗視化構造。結晶構造 (PDB ID: 5G2E) において Nap1 Δ NC とコンタクトを形成している残基を赤で示す (パネル左)。分子動力学シミュレーションによってコンタクトが観察された残基を赤の濃淡で示す (パネル右)。(C) 分子動力学シミュレーションで観察されたコンタクト確率のプロット。パネル左は Nap1 Δ NC の残基ごとに H2A Δ NC/H2B Δ N とコンタクトを形成した割合を示す。パネル中央は H2A Δ NC の残基ごとに Nap1 Δ NC とコンタクトを形成した割合を示す。パネル右は H2B Δ N の残基ごとに Nap1 Δ NC とコンタクトを形成した割合を示す。グレーの縦線は結晶構造 (PDB ID: 5G2E) においてコンタクトを形成している残基を示している。エラーバーは 20 本の独立なシミュレーションから計算した標準偏差である。

Nap1 の C 末端テールの H2A/H2B との複合体形成における役割

次に Nap1 の C 末端テールが H2A/H2B ダイマーとの相互作用においてどのような役割を持つのかを分子動力学シミュレーションによって調べた。全長の H2A/H2B ダイマーモデルと全長の Nap1 モデルを用いて、結合シミュレーションを 20 本独立に 1×10^8 ステップ実行した。Nap1 と H2A/H2B ダイマーの互いにコンタクトを形成した割合を計算すると、Nap1 は C 末端テールを介して H2A/H2B ダイマーと強く相互作用する一方で、N 末端テールではほとんど相互作用が見られなかった (Figure 26A & C)。さらに H2A の N 末端テールと C 末端テール、H2B の N 末端テールはいずれも Nap1 と相互作用していた (Figure 26C)。したがって Nap1 の C 末端テールは H2A/H2B ダイマーとの複合体形成に寄与していることが示された。さらに Nap1 Δ C (1–365) モデルを用いて同様のシミュレーションを実行すると、C 末端テールを欠損した Nap1 では H2B の 80–97th 残基とのコンタクトが失われていることが示された (Figure 26B & C)。以上のことから、Nap1 の C 末端テールは H2A/H2B との相互作用を強化して複合体形成を安定化する可能性が示唆された。

Nap1 と H2A/H2B ダイマーとの複合体形成における C 末端テールの役割をさらに定量的に理解するために、Nap1 と H2A/H2B ダイマーとの重心間距離を反応座標としてアンブレラサンプリングを行い、反応座標に沿った結合自由エネルギープロファイルを計算した。また同様の計算を Nap1 Δ C-H2A/H2B 複合体に対しても行った (Figure 26D)。まずそれぞれのエネルギープロファイルの深さを計算すると、Nap1-H2A/H2B 複合体では -19.3 kcal/mol, Nap1 Δ C-H2A/H2B 複合体では -12.6 kcal/mol であった。したがって Nap1 の C 末端領域は、Nap1-H2A/H2B 複合体の結合親和性に寄与していることが示された。また自由エネルギーが最小となる重心間距離に注目すると、Nap1-H2A/H2B 複合体では 35.3 Å、Nap1 Δ C-H2A/H2B 複合体では 29.1 Å であった (Figure 26D)。このことは、Nap1 Δ C と比べて Nap1 は 6.4 Å 離れた位置で H2A/H2B ダイマーと安定して結合していることが示している。さらにエネルギープロファイルの幅を比較すると、Nap1-H2A/H2B 複合体は重心間距離が 101 Å に至るまで自由エネルギーが単調増加し、 101 Å より離れるとプラトーに達した (Figure 26D)。一方 Nap1 Δ C-H2A/H2B 複合体は 58.3 Å の位置で自由エネルギーがプラトーに達した (Figure 26D)。したがって、Nap1 Δ C に比べて Nap1 は H2A/H2B に対して長距離に渡って相互作用することが示された。このことは、Nap1 が C 末端テールを介して、離れた位置にある H2A/H2B ダイマーとも比較的安定に結合を形成できることを示唆する。

アンブレラサンプリングによる自由エネルギープロファイルの精度を検証した。先行研究⁶⁷から、Nap1 と H2A/H2B ダイマーとの結合親和性は -11.1 kcal/mol であることが示されている。この値は上述の計算による推定値 (-19.3 kcal/mol) よりも大きい。上述のシミュレーションでは塩濃度を 300 mM として設定しているが、先行研究では 350 mM の塩濃度条件下で実験を行っているため、この条件の違いが実測値と推定値の違いを反映している可能性が示唆された。シミュレーションにおいて、 350 mM の条件で同様にアンブレラサンプリングによってエネルギープロファイルを計算すると、自由エネルギー差は -12.2 kcal/mol であった。したがってアンブレラサンプリングによる自由エネルギープロファイルは実際の実験値を反映していると結論づけた。

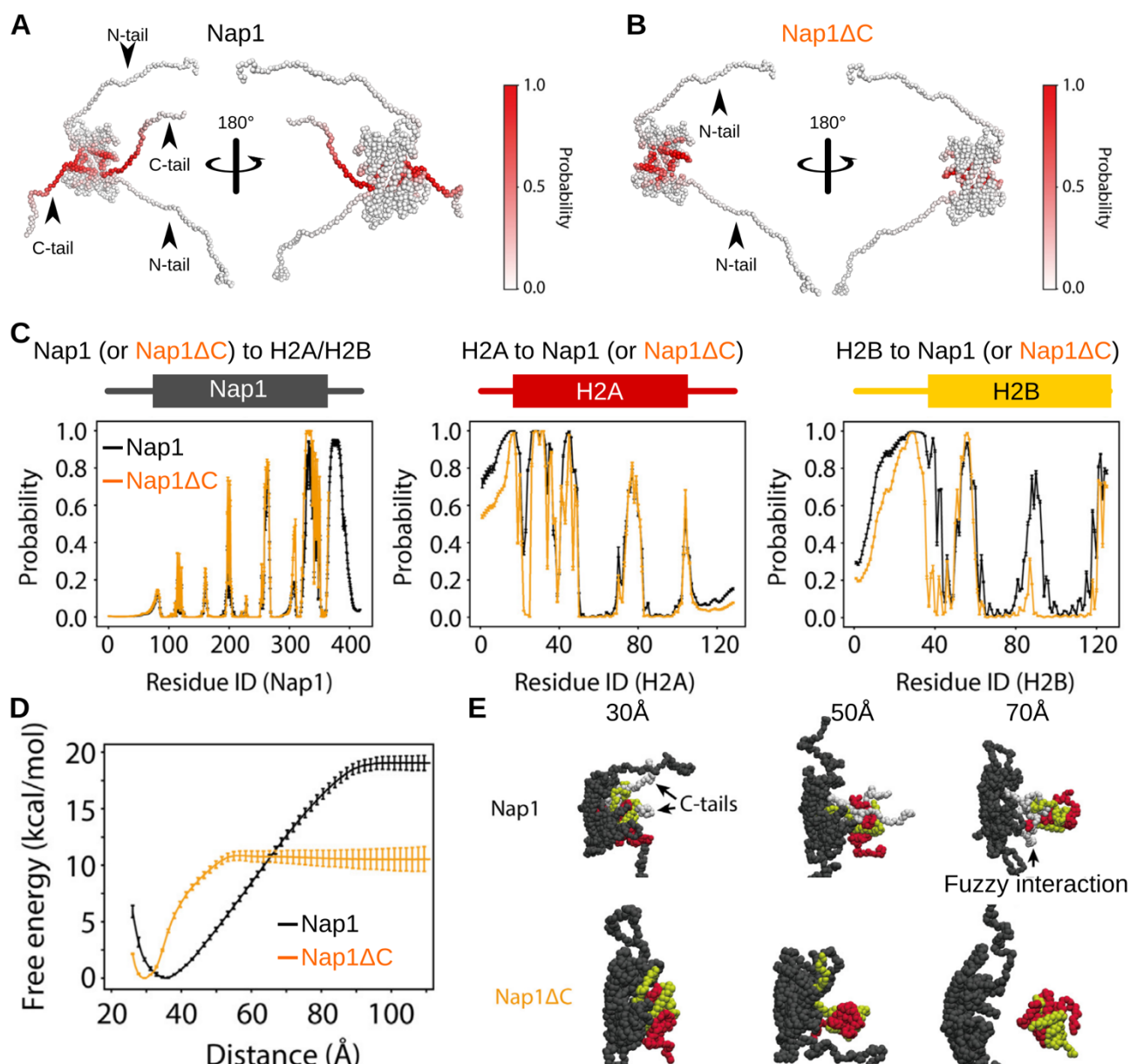


Figure 26: Nap1 (Nap1 Δ C) と H2A/H2B ダイマーとの複合体形成シミュレーション。(A & B) Nap1 (A) と Nap1 Δ C (B) の粗視化構造。分子動力学シミュレーションによって H2A/H2B ダイマーとコンタクトを形成した残基を赤の濃淡で示す。(C) シミュレーション中で Nap1 (黒) あるいは Nap1 Δ C (オレンジ) と H2A/H2B ダイマーと間でコンタクトを形成する確率。左のパネルは Nap1 (Nap1 Δ C) の残基ごとの確率。中央、右のパネルはそれぞれ H2A、H2B の残基ごとの確率。エラーバーは 20 本の独立したシミュレーションから計算した標準偏差に対応する。(D) Nap1 と H2A/H2B ダイマー間相互作用の自由エネルギープロファイル。Nap1-H2A/H2B 間相互作用は黒、Nap1 Δ C-H2A/H2B 間相互作用はオレンジでプロットした。エラーバーは 3 つの独立したシミュレーションごとに推定した自由エネルギープロファイルから計算した標準偏差を示す。(E) アンブレラサンプリングシミュレーションの代表構造。Nap1 (Nap1 Δ C) と H2A/H2B ダイマーとの重心間距離が 30Å、50Å、70Å のときの構造。Nap1 (Nap1 Δ C) を黒、H2A を赤、H2B を黄色で色分けした。

Nap1 によるヌクレオソームからの H2A/H2B の解離

ヌクレオソームと Nap1 の粗視化モデルを用いて、Nap1 が H2A/H2B ダイマーを部分的にアンラップしたヌクレオソームから解離させる過程をシミュレーションした。その結果、DNA トランスロケースとヌクレオソームが衝突すると、トランスロケースはヌクレオソームから DNA をアンラップした。第 1 章の衝突シミュレーションから、ヌクレオソームのアンラップの過程で、トランスロケースは $-57^{\text{th}} \pm 2\text{bp}$ 付近と $-29^{\text{th}} \pm 5\text{bp}$ の位置で停滞することがわかっている (Figure 10B)。トランスロケースが $-29^{\text{th}} \pm 5\text{bp}$ の位置で停滞しているとき、ヌクレオソームを構成する H2A/H2B の DNA 結合領域は溶媒中に露出する (Figure 27A)。この露出した H2A/H2B の DNA 結合領域に対して Nap1 を近づけた状態を初期構造にして、50 本の独立したシミュレーションを 3×10^8 ステップずつ行った。すべてのトラジェクトリにおいて、Nap1 は露出した H2A/H2B の結合界面に結合した (Figure 27A)。90% (45/50) のトラジェクトリで、Nap1 は結合した H2A/H2B と共に、ヌクレオソームから解離した (Figure 27A & B)。一方で Nap1 の非存在下において、H2A/H2B の解離が観察されたトラジェクトリは全体の 7.5% (6/80) であった (Figure 27B)。また、DNA が完全に巻き付いているヌクレオソームと Nap1 を配置して、20 本の独立なシミュレーションを 3×10^8 ステップずつ実行した (Figure 27C)。全てのトラジェクトリにおいて、Nap1 はヌクレオソームに結合せず H2A/H2B の解

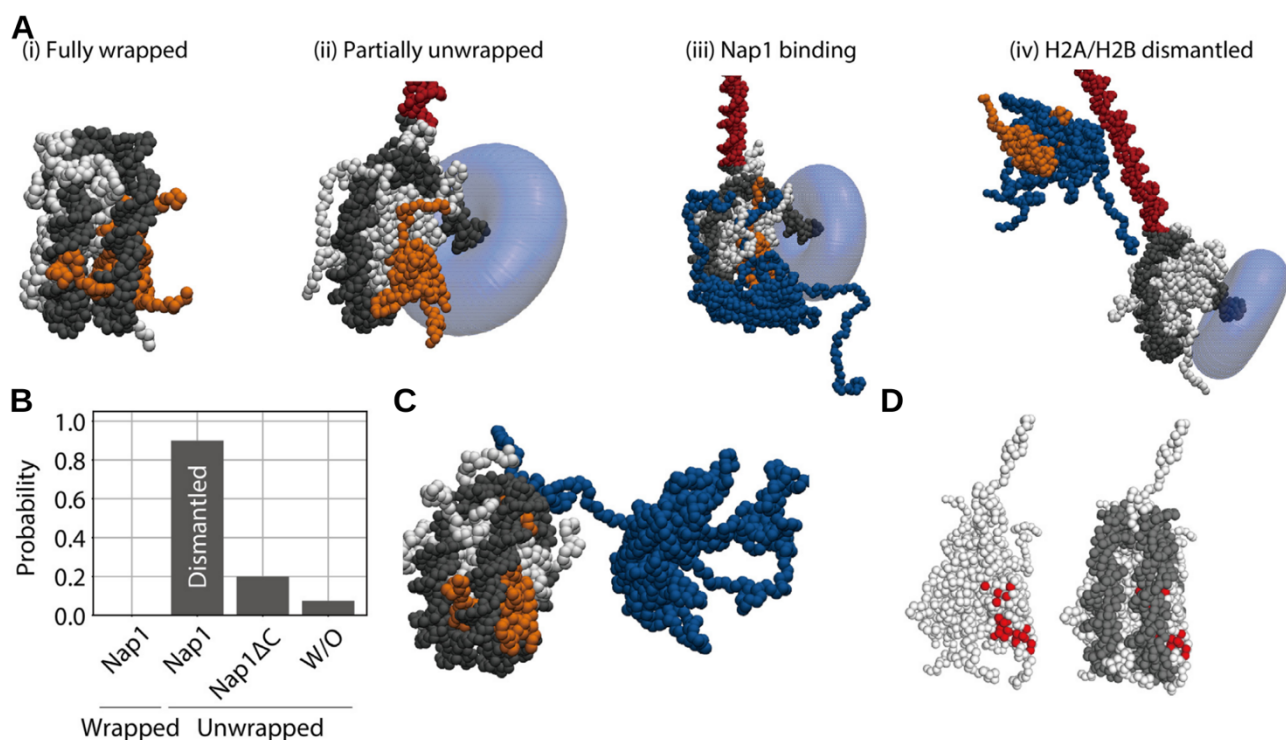


Figure 27: Nap1 によるヌクレオソーム解体のシミュレーション。(A) Nap1 (青) が H2A/H2B ダイマー (オレンジ) を解離するまでのスナップショット。(i) DNA が完全に巻き付いたヌクレオソーム。(ii) DNA トランスロケースによって部分的にアンラップされたヌクレオソーム。(iii) Nap1 が露出した H2A/H2B ダイマーに結合した状態。(iv) Nap1 が H2A/H2B ダイマーを解離させた後。(B) H2A/H2B ダイマーの解離が観察された割合。(C) DNA が完全に巻き付いたヌクレオソームと Nap1 のシミュレーションのスナップショット。(D) ヒストンオクタマーとヌクレオソームの粗視化構造。結晶構造 (PDB ID: 5G2E) で Nap1 と相互作用する H2A/H2B ダイマーの残基を赤で示す。

離も観察されなかった (Figure 27B)。これは Nap1 と相互作用する H2A/H2B ダイマーの界面が DNA によって遮蔽されていることと一貫する (Figure 27D)。したがって Nap1 は DNA トランスロケースによってアンラップされていないヌクレオソームを解体しなかった。一方で Nap1 はアンラッピングによってヌクレオソームから露出した H2A/H2B ダイマーを解離させた。この結果は生化学実験の結果と一貫する (Figure 23 & Figure 24)。

Nap1 によるヌクレオソーム解体のメカニズムを調べるために H2A/H2B ダイマーとその他の分子との間のポテンシャルエネルギーを計算した。DNA がヒストンオクタマーに完全に巻き付いている時、H2A/H2B ダイマーと相互作用するヘキサソーム (DNA、H3/H4 テトラマー、反対側の H2A/H2B ダイマー) との間のポテンシャルエネルギーは -58.3 ± 4.1 kcal/mol であった (Figure 28A & B, i)。DNA トランスロケースがヌクレオソームをアンラップしているとき、DNA とヒストンとの相互作用が部分的に失われて、ポテンシャルエネルギーは -24.3 ± 2.5 kcal/mol まで増加した (Figure 28A & B, ii)。Nap1 が露出した H2A/H2B ダイマーに結合すると、H2A/H2B ダイマーとヘキサソーム、Nap1 との間のポテンシャルエネルギーは -67.9 ± 6.3 kcal/mol まで減少し (Figure 28A & B, iii)、H2A/H2B ダイマーの解離によって -52.8 ± 5.3 kcal/mol まで増加した (Figure 28A & B, iv)。したがって H2A/H2B ダイマーは、部分的にアンラップされたヌクレオソームの中にある状態 (-24.3 ± 2.5 kcal/mol) より Nap1 と複合体を形成している状態 (-52.8 ± 5.3 kcal/mol) のほうが安定であることが示された。

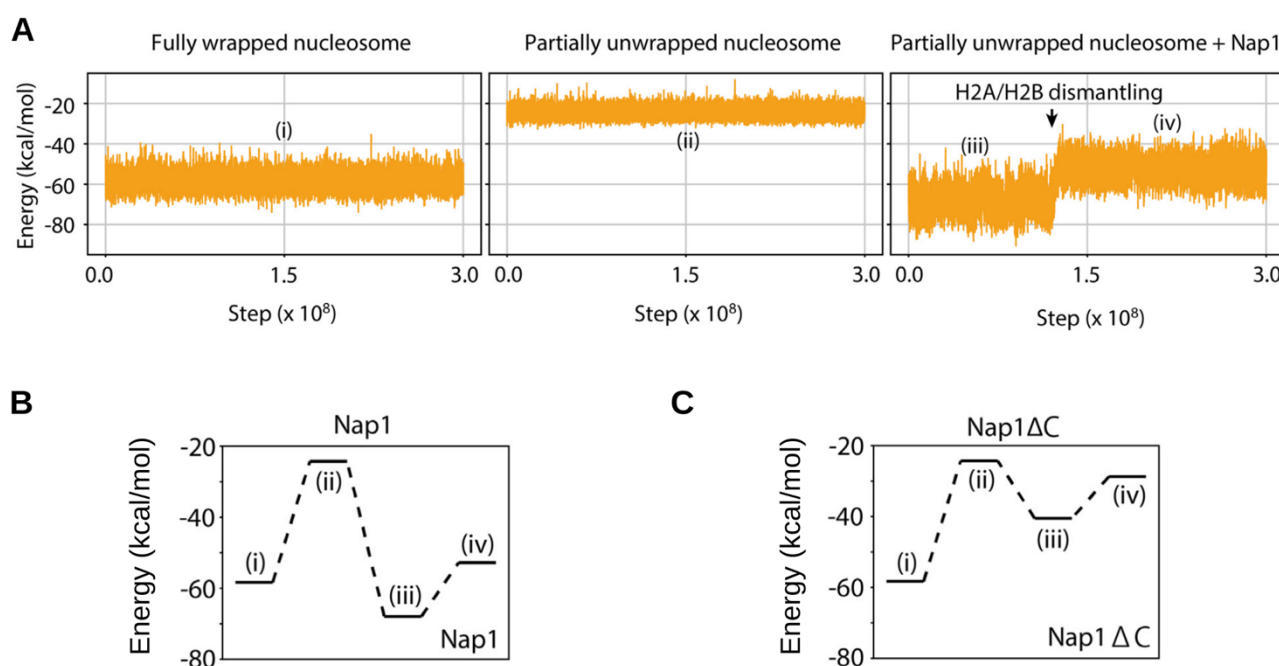


Figure 28: H2A/H2B ダイマーとヘキサソーム (DNA、H3/H4 テトラマー、H2A/H2B ダイマー)、Nap1 との間のポテンシャルエネルギー。(A) DNA が完全に巻き付いたヌクレオソーム (左)、DNA トランスロケースによって部分的にアンラップしたヌクレオソーム (中央)、部分的にアンラップして Nap1 が結合した状態のヌクレオソーム (右) のシミュレーションにおけるポテンシャルエネルギーの時間発展。状態 (i) –(iv) は Figure 26A と対応している。(B & C) Nap1 (B)、Nap1 Δ C (C) を用いたシミュレーションにおける、状態 (i) –(iv) の平均ポテンシャルエネルギー。

H2A/H2B の解離における Nap1 の C 末端領域の役割

上述の生化学実験の結果より、Nap1 Δ C は T7 RNA ポリメラーゼによってアンラップされたヌクレオソームから H2A/H2B ダイマーを解離しなかった。Nap1 の C 末端テールの H2A/H2B ダイマー解離における役割を調べるために、Nap1 Δ C のモデルを用いて H2A/H2B 解離シミュレーションを行った。50 本の独立なシミュレーションのうち、38% (19/50) のトラジェクトリで H2A/H2B の解離を伴わずに Nap1 Δ C がヌクレオソームから解離した。さらに H2A/H2B の解離が観察されたのは 20% (10/50) であった (Figure 27B)。これらのことから Nap1 の C 末端領域は露出した H2A/H2B への結合の維持と、H2A/H2B のヌクレオソームからの解離の 2 つの役割を持っていることが示唆される。

Nap1 の C 末端テールのヌクレオソーム解体における役割を調べるために、H2A/H2B ダイマーとヘキサソーム (DNA+H3/H4 テトラマー + H2A/H2B ダイマー)、Nap1 Δ C との間のポテンシャルエネルギーを調べた。Nap1 Δ C が露出した H2A/H2B ダイマーと相互作用しているときのポテンシャルエネルギーは -40.5 ± 4.2 kcal/mol であった (Figure 28C, iii)。一方 Nap1 Δ C が H2A/H2B ダイマーを解離させた後のポテンシャルエネルギーは -28.7 ± 2.9 kcal/mol であり (Figure 28C, iv)、これは H2A/H2B ダイマーが部分的にアンラップされたヌクレオソームの中にある状態 (-24.3 ± 2.5 kcal/mol) と同程度であった (Figure 28C, ii & iv)。したがって Nap1 の C 末端テールは H2A/H2B ダイマーとの

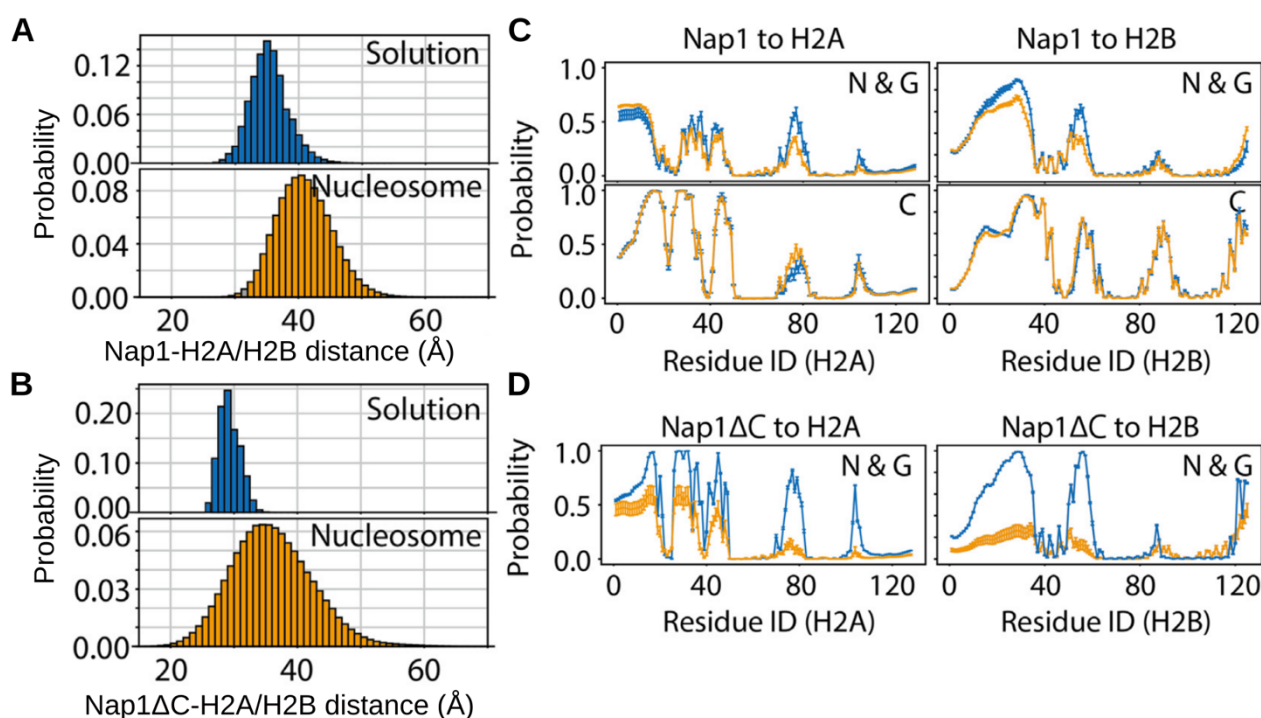


Figure 29: Nap1 とヌクレオソーム中の H2A/H2B ダイマーへの結合様式の解析。(A & B) Nap1 (A) あるいは Nap1 Δ C (B) と、遊離した H2A/H2B ダイマー (青) あるいはヌクレオソーム中の H2A/H2B ダイマー (オレンジ) 間の重心間距離の分布。(C & D) Nap1 (C) あるいは Nap1 Δ C (D) と遊離 (青) あるいはヌクレオソーム中 (オレンジ) の H2A/H2B ダイマーとの間のコンタクト確率。N & G は Nap1 の N 末端テールと構造領域、C は Nap1 の C 末端テールに対するコンタクト確率のプロット。

複合体形成を安定化する役割をもち、この安定化効果がヌクレオソームからの H2A/H2B ダイマーの解離に寄与していることが示された。

Nap1 のヌクレオソームから露出した H2A/H2B ダイマーへの結合に関して、C 末端テールの役割を調べるために、Nap1 とヌクレオソーム中の H2A/H2B ダイマー間の重心間距離を計算した。ヌクレオソームから露出した H2A/H2B ダイマーに対して、Nap1 は $40.6 \pm 4.3 \text{ \AA}$ 、Nap1 ΔC は $35.5 \pm 6.2 \text{ \AA}$ 離れた位置で結合していた (Figure 29A & B)。一方で遊離している H2A/H2B ダイマーに対しては、Nap1 と Nap1 ΔC はそれぞれ $35 \text{ \AA}$ 、 $29 \text{ \AA}$ 離れた位置で最も安定に結合することから (Figure 26D, Figure 29A & B)、Nap1 と Nap1 ΔC はどちらもヌクレオソーム中の H2A/H2B ダイマーに対して最安定な位置から $5\text{--}6 \text{ \AA}$ 離れた位置で結合することが示された。上述の自由エネルギープロファイルの結果 (Figure 26D) から、Nap1 の C 末端テールは離れた位置にある H2A/H2B ダイマーとの複合体形成を安定化するのに寄与していた。実際に Nap1、Nap1 ΔC が H2A/H2B ダイマーに対して $40.6 \pm 4.3 \text{ \AA}$ 、 $35.5 \pm 6.2 \text{ \AA}$ 離れた位置で結合しているときの自由エネルギー差はそれぞれ 0.9 kcal/mol 、 3.4 kcal/mol であった (Figure 26D)。このことから Nap1 の C 末端テールは、Nap1 とヌクレオソーム中の H2A/H2B との相互作用を安定化する効果があることが示された。

さらにこの露出した H2A/H2B ダイマーへの結合の安定化について詳細に調べるために、Nap1 の N 末端テールと天然構造領域に対してコンタクトを形成した割合と、Nap1 の C 末端テールに対してコンタクトを形成した割合を H2A/H2B ダイマーの残基ごとに計算した。ヌクレオソーム中の H2A/H2B ダイマーの Nap1 の N 末端テールと天然構造領域への結合頻度は、H2A/H2B ダイマーが溶媒中に遊離しているときに比べて減少しており、Nap1 ΔC に対してはそのコンタクト頻度がより大きく減少していた (Figure 29C & D)。とくに H2A の 73–82th 残基と H2B の 1–36th 残基、49–60 残基でこの減少が見られた (Figure 29C & D)。したがってこれらの残基はヌクレオソーム中にあるときに H3/H4 テトラマーや DNA など他の分子からの立体障害を受けて遮蔽されることが示された。一方で Nap1 の C 末端テールへの結合は溶媒中に遊離している時とヌクレオソーム中とで変化が見られなかった (Figure 29C)。したがって Nap1 の C 末端テールは天然編成領域として柔軟に構造を変えることで、ヌクレオソーム中にあるかどうかに関わらず H2A/H2B ダイマーとの結合を安定化することが示された。

考察

本研究において、DNA トランスロケースがヌクレオソームを部分的にアンラップしているとき、Nap1 がヌクレオソームの解体を促進することを示した。DNA トランスロケースがヌクレオソームと衝突すると DNA がアンラップされて H2A/H2B ダイマーが溶媒中に露出する (Figure 30, i & ii)。Nap1 は DNA が完全に巻き付いているヌクレオソームに対して結合しないが、H2A/H2B ダイマーの露出によってヌクレオソームに結合して、その解離を促進した。さらにこの過程において Nap1 の C 末端の天然変性領域 (C 末端テール) が中心的な役割を果たしていることを示した (Figure 30, iii & iv)。ヌクレオソームがアンラッピングされている状態であっても、H2A/H2B ダイマーの結合界面は DNA や他のヒストンからの立体障害によって部分的に遮蔽されている。そのため Nap1 の構造領域

は露出した H2A/H2B ダイマーに対して十分な相互作用を維持できない。一方で Nap1 の C 末端テールは柔軟に構造を変えることで、遮蔽されている界面であっても相互作用を維持することができるため、露出した H2A/H2B ダイマーへの結合を強化することが示された (Figure 30, iii)。さらに Nap1 の C 末端テールは遊離した H2A/H2B ダイマーとの複合体形成の安定化にも寄与しており、H2A/H2B ダイマー解離の駆動力となることを明らかにした (Figure 30, iv)。

先行研究において、完全に DNA が巻き付いたヌクレオソームの H2A/H2B ダイマーと溶液中の H2A.Z/H2B ダイマーとの交換反応を、Nap1 が低温 (4 度) 条件下で 10 時間かけて触媒することが報告された。本研究のシミュレーションで扱える時間スケールはマイクロ秒～ミリ秒スケールであるため、完全に DNA が巻き付いたヌクレオソームからの H2A/H2B ダイマーの解離を観察することはできなかった。しかし本研究の結果から、DNA トランスロケースによるヌクレオソーム DNA のアンラッピングが、Nap1 による H2A/H2B ダイマー解離を促進する役割を持つことが示唆された。さらに別の先行研究において、Nap1 は正の超らせんをもつ環状 DNA に再構成されたヌクレオソームの解離を促進することが示された。生理条件下では RNA ポリメラーゼの DNA 開裂によって進行方向に正のトポロジカルストレスを発生させることが知られており、このストレスとヌクレオソーム DNA のアンラッピングが Nap1 による H2A/H2B ダイマーの解離を相乗的に促進する可能性がある。Nap1 によるヌクレオソーム解体におけるトポロジカルストレスの寄与については、将来的に本研究で用いた粗視化分子動力学シミュレーションと生化学実験を用いて検証が可能である。

先行研究において、Nap1 が、ATP 依存的にクロマチン構造を制御する因子がクロマチンリモデラーと協働してヌクレオソーム分解を誘導することが示された^{53,68-71}。それらの中で、Nap1 が、RSC というクロマチンリモデラーと共にはたらいてヌクレオソームからヒストンを完全に解離させることが、生化学的手法に基づいて示された⁵³。また ChIP-CHIP 法による分裂酵母のゲノム解析から、細胞内では Nap1 が Chd1 というクロマチンリモデラーと共局在して、転写開始点のヌクレオソームの除去に寄与することが示された⁶⁹。さらにこうしたクロマチンリモデラーは、ATP 加水分解のサイクルの中でヌクレオソームをアンラップすることが知られている^{68,70,71}。したがって、本研究では DNA トランスロケースがヌクレオソームをアンラップする役割を担っていたが、クロマチンリモデラーも同様の役割を果たすと考えられる。

Nap1 以外にもヌクレオソームからヒストンを解離させるはたらきをもつヒストンシャペロンが存在する。FACT は Spt16 (SPT16) と Pob3 (SSRP1) からなるヘテロダイマーで、クロマチンテンプレート転写を促進するタンパク質 (FACilitates Chromatin Transcription) として同定された⁷²。磁気ピンセットを用いた一分子計測によって、ヌクレオソームの末端 DNA に力を加えて人工的にアンラップさせた状態で、FACT がヌクレオソームの分解を促進することが示された⁷³。またクライオ電子顕微鏡によって、ヌクレオソームが RNA ポリメラーゼ II によってアンラップされているときに、負電荷に富む Spt16 の C 末端テールが露出した H2A/H2B ダイマーに結合している構造が得られた⁷⁴。Nap1 や FACT だけでなく、多くのヒストンシャペロンは共通して負電荷に富む天然変性領域を持っている^{5,47,49}。したがって、本研究で明らかにした H2A/H2B の解離の仕組みは、Nap1 以外のヒスト

ンシャペロンにも共通している可能性がある。

第 1 章において、DNA トランスロケースによる DNA アンラッピングがヌクレオソームダイアド付近まで達すると、ヌクレオソームは「レーンスイッチメカニズム」によって下流に移動することが示された。第 2 章においては、アンラッピングがヌクレオソームダイアドまで達するよりも前に H2A/H2B ダイマーが溶媒中に露出するため、Nap1 がヌクレオソームの解体を促進することが示された。したがって Nap1 は「レーンスイッチメカニズム」に対して抑制的に機能する。「レーンスイッチメカニズム」によるヌクレオソームの移動は、ヌクレオソームの配置情報を失わせる要因になりうるため、細胞の生存・恒常性維持にとって負の側面をもつ。したがってヒストンシャペロンは、ヌクレオソーム分解によって DNA トランスロケースの移動を助けるだけでなく、ヌクレオソーム配置情報の変更を防ぐ役割をもつことが示唆される。その場合分解したヌクレオソームを再形成するメカニズムが必要になるが、この再形成に関して第 3 章で議論する。

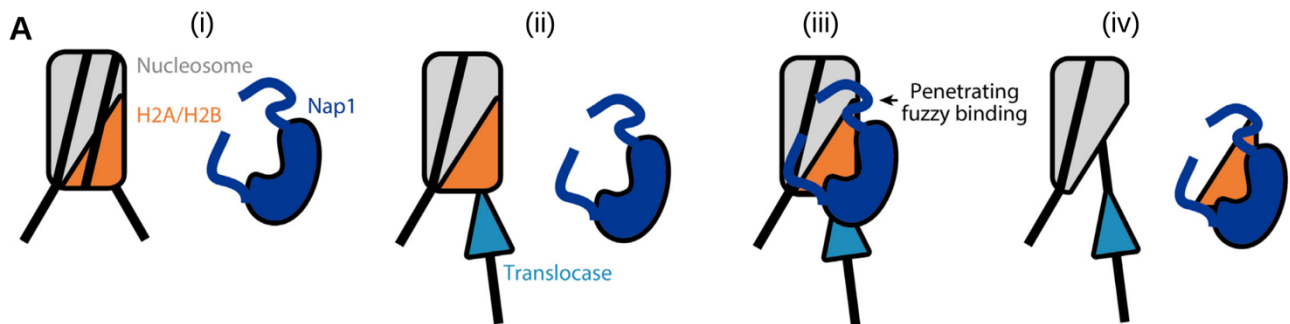


Figure 30: DNA トランスロケースによって部分的にアンラップしたヌクレオソームから、Nap1 が H2A/H2B ダイマーを解離させる過程の概念図。(i) DNA が完全に巻き付いている状態のヌクレオソーム。Nap1 は H2A/H2B ダイマーに結合できない。(ii) DNA トランスロケースによって部分的にアンラップされた状態のヌクレオソーム。(iii) 露出した H2A/H2B ダイマーに対して Nap1 が結合した状態。Nap1 の C 末端テールが柔軟に構造を変えて H2A/H2B ダイマーに結合している。(iv) Nap1 が H2A/H2B ダイマーを解離させた状態。

第3章: レプリソームによる H3/H4 テトラマーのリサイクルの分子機構

序論

エピゲノム情報の継承は DNA 複製と共役して起こる^{42,75-81}。DNA 複製後に親 DNA 鎖に結合していたヒストン（親ヒストン）が新生鎖上に再結合する過程（ヒストンリサイクリング）がこのエピゲノム継承の第一段階である^{42,75-82}。新生鎖上に結合した親ヒストンの配置や化学修飾に基づいて、クロマチンリモデラーやヒストン修飾酵素のはたらきによって新生クロマチンが組織化される^{42,78-81}。そのためエピゲノム情報が2つの娘細胞に均等に継承されるためには、DNA 複製時に親ヒストンを2つの新生鎖に対称的にリサイクルする必要がある（Figure 1C）⁸³⁻⁸⁶。

レプリソームと呼ばれるタンパク質複合体は、二本鎖 DNA を一方向に開裂しながら進み、生じた一本鎖 DNA を鋳型として相補鎖 DNA を合成することによって DNA 複製を実行する^{42,82,87}。二本鎖 DNA の開裂は CMG（Cdc45、Mcm2-7、GINS からなるタンパク質複合体）というヘリカーゼによって触媒され、DNA の合成は主に3種類の DNA ポリメラーゼ α 、 δ 、 ϵ （Pol α 、Pol δ 、Pol ϵ ）によって触媒される^{42,82,87,88}。また RPA と呼ばれる一本鎖 DNA 結合タンパク質が CMG の開裂によって生じた一本鎖 DNA に結合することで、ポリメラーゼによって合成されるまでの間に一本鎖 DNA が DNA 消化酵素によって切断されるのを防ぐ⁸²。そして Ctf4、Csm3/Tof1、Mrc1 といった補助タンパク質が CMG に結合して複製関連タンパク質の足場として機能することで効率の良い DNA 複製を支えている^{82,87,89}。レプリソームはゲノム DNA 上を一方向に移動してヌクレオソームと衝突し、DNA 複製を実行するために親ヒストンを DNA から解離させてヌクレオソームを一時的に解体する^{42,45,75-82}。そして親ヒストンを新生鎖のどちらかに再結合させてリサイクルを完了する^{42,75-82}。このようにヒストンリサイクリングはレプリソームとヌクレオソームとの衝突をきっかけにして起こる現象である。

ディープシーケンシング技術を用いた先行研究より、細胞内において複数の複製関連タンパク質がヒストンリサイクリングの対称性に寄与することが示されている⁹⁰⁻¹⁰⁰。Mcm2 は CMG のサブユニットの1つであり、N 末端にヒストン H3/H4 テトラマーへの結合ドメインを持つ^{101,102}。この Mcm2 のヒストンへの結合活性を失活させるとラギング鎖へのヒストンリサイクリングが阻害される^{91,92}。またレプリソームの構成要素である Ctf4⁹²、Pol α ^{92,93}、Pol δ ^{93,94}、PCNA⁹⁴、Tof1⁹⁵ も同様にラギング鎖へのヒストンリサイクリングに寄与していることが示された。一方で Pol ϵ のサブユニットである Dpb3 と Dpb4 はリーディング鎖へのヒストンリサイクリングに寄与している⁹⁰。Mrc1 はリーディング鎖とラギング鎖へのヒストンリサイクリングの両方に寄与しており、変異を導入する領域ごとにヒストンリサイクリングへの影響が異なるため、複数のヒストンリサイクリング経路に関与することが示唆された^{96,97}。さらにヒストンシャペロン FACT はレプリソームの前方で親ヒストンと結合して、リーディング鎖とラギング鎖の両方へのリサイクルに寄与する^{98,99}。これらのタンパク質を多重変異させた変異体を用いた研究（Mcm2、Dpb4、FACT、Mrc1）から、変異によるヒストンリサイクリングへの影響は加算的であり、複数のヒストンリサイクリングの経路が共存していることが示された^{96,97,99}。以上から、ヒストンリサイクリングの対称性はこれらの複数の経路の釣り合いによって成立していることが示唆される。しかし1つ1つのヒストンリサイクリング経路の分子機構が不明

であるため、ヒストンリサイクリングの対称性を実現するメカニズムの全容は解明されていない。

第 1、2 章で用いた DNA トランスロケースモデルはヒストンとの特異的な相互作用を考慮しないシンプルなものである。ヒストンリサイクリングは上述のように複数のタンパク質によって制御されているため、ヒストンリサイクリングをシミュレーションするためにはレプリソームをあらわに扱う必要がある。レプリソームの構成要素のうち、すでに構造が同定されていて、かつ DNA 複製に最低限必要である要素のみモデリングして、粗視化分子動力学シミュレーションを実行した。シミュレーション結果から、Mcm2 の N 末端テールが H3/H4 テトラマー（親ヒストン）を新生鎖に直接結合させることを明らかにした。このリサイクルの過程で、レプリソームのサブユニットの 1 つである Cdc45 の酸性ループ領域が H3/H4 テトラマーと相互作用することを新たに発見した。この Cdc45 との結合を経由するリサイクル経路では H3/H4 テトラマーはリーディング鎖に、Cdc45 との結合を経由しない経路ではラギング鎖にリサイクルされることが観察された。またラギング鎖の一本鎖 DNA 領域に蓄積する RPA がラギング鎖へのヒストンリサイクリングを制御することを示し、ヒストンリサイクリングの対称性が RPA によって調節される可能性を示唆した。さらに Pol ϵ はレプリソームから伸長するリーディング鎖の向きを変えることによって、リサイクル後の H3/H4 テトラマーの配置を変化させることが示された。本研究において、粗視化分子動力学シミュレーションを用いてヒストンリサイクリング経路を可視化するとともに、ヒストンリサイクリングにおける Cdc45 や RPA、Pol ϵ の役割について実験的な検証が可能な仮説を提唱した。

方法

複製フォークとヒストンの粗視化分子構造

本研究で用いるレプリソームモデルはヘリカーゼサブユニットである CMG (Cdc45, Mcm2-7, GINS) と、DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ)、一本鎖 DNA 結合タンパク質 (RPA) からなる (Figure 31A & B)。このレプリソームが Y フォーク DNA 上に組み立てられた状態を複製フォークと呼ぶ (Figure 31B)。さらに本研究では 4 種類あるヒストン (H3, H4, H2A, H2B) のうち、H3/H4 テトラマーのリサイクルに注目した。以下にこれらのタンパク質の粗視化構造の構築手順について説明する。

CMG の粗視化構造は、CMG の Cryo-EM 構造 (PDB ID: 6U0M¹⁰³) をもとに構築した。この Cryo-EM 構造は Cdc45 (1-650)、Mcm2 (1-868)、Mcm3 (17-738)、Mcm4 (177-838)、Mcm5 (24-693)、Mcm6 (103-840)、Mcm7 (1-729)、Sld5 (3-294)、Psf1 (1-208)、Psf2 (3-200)、Psf3 (3-193) の 11 種類のタンパク質サブユニットから構成される (Figure 31A)。本研究ではこの CMG の Cryo-EM 構造での構造未決定領域 [Cdc45 (166-217, 437-457)、Mcm2 (1-200, 707-736)、Mcm3 (58-90, 142-150, 332-337, 571-650)、Mcm4 (213-220, 470-497, 731-740, 780-792, 839-850)、Mcm5 (104-129, 212-234, 306-318, 340-345, 644-646)、Mcm6 (246-259, 415-427, 484-509)、Mcm7 (32-58, 159-188, 217-219, 387-392)、Sld5 (3-53, 111-120, 239-247)、Psf2 (33-49)、Psf3 (30-32, 59-67, 142-161)] を天然変性領域として扱った (Figure 31A)。天然変性領域の初期構造決定には MODELLER⁶⁰ を用いた。以下に説明するその他のタンパク質の天然変性領域の初期構造も同様に MODELLER によって決定した。

Pol ε の粗視化構造は 2 種類の Pol ε の Cryo-EM 構造 (PDBID: 6WJV¹⁰⁴, PDBID: 6HV9¹⁰⁵) をもとに構築した。6WJV は全長 Pol ε の Cryo-EM 構造であり、Pol2 (1–2222), Dpb2 (1–689), Dpb3 (1–201), Dpb4 (1–196) から構成される (Figure 31A)¹⁰⁴。6HV9 は CMG と Pol2 の C 末端ドメイン (1308–2222) と Dpb2 の N 末端ドメイン (1–90) の複合体の Cryo-EM 構造であり¹⁰⁵、全長 Pol ε と CMG との相互作用を定義するために用いた。これら Cryo-EM 構造での構造未決定領域 [Pol2 (1–30, 91–107, 215–233, 664–677, 1187–1269, 1393–1403, 1748–1783, 1977–1993, 2033–2042, 2073–2099, 2122–2127), Dpb2 (91–169, 195–206, 234–265, 368–377, 557–597), Dpb3 (1–8, 94–201), Dpb4 (1–17, 125–196)] を天然変性領域として扱った (Figure 31A)。

RPA の粗視化構造構築のために全長 RPA の参照構造を予測した。RPA 全長構造は X 線結晶解析 (PDB ID: 5OMB, 1JMC, 4OU0) や NMR (PDBID: 1YNX)、Cryo-EM (PDB ID: 6I52) によって決定された 5 つの部分構造を MODELLER で予測した天然変性領域で連結することで構築した。RPA は Rfa1 (1–621), Rfa2 (1–273), Rfa3 (1–122) から構成される (Figure 31A)。5 つの部分構造の構造未決定領域 [Rfa1 (133–180, 420–441), Rfa2 (1–31, 183–204)] を天然変性領域として扱った (Figure 31A)。Rfa1 は DNA 結合ドメイン F (DBD-F) (1–132, PDB ID: 5OMB¹⁰⁶)、DBD-A (181–294, PDB ID: 1YNX¹⁰⁷)、DBD-B (295–419, PDB ID: 1JMC¹⁰⁸)、DBD-C (442–619, PDB ID: 6I52¹⁰⁹) を連結して構築した。Rfa2 は DBD-D (32–182, PDB ID: 6I52¹⁰⁹) と Winged helix ドメイン (205–273, PDB ID: 4OU0¹¹⁰) を連結して構築した。Rfa3 は DBD-E (1–122, PDB ID: 6I52¹⁰⁹) に基づいて構築した。Rfa1、Rfa2、Rfa3 はそれぞれ DBD-C、DBD-D、DBD-E を介してヘテロ三量体を形成して、一本鎖 DNA に結合す

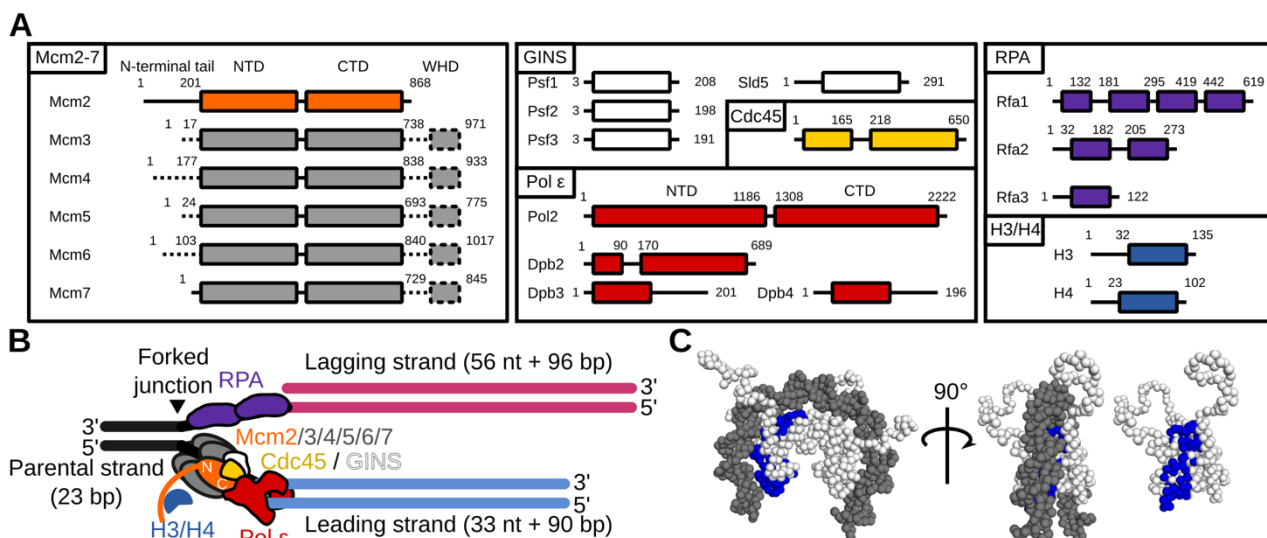


Figure 31: レプリソームの粗視化モデル構築。(A) レプリソームモデルを構成するタンパク質とそのドメイン構成。実線は天然変性領域、破線は構造未決定のためシミュレーションモデル中では排除した領域。長方形は構造領域。(B) 複製フォーク初期構造の概念図。黒線は親 DNA、マゼンタはラギング鎖、シアンはリーディング鎖を示す。オレンジ、グレー、白、黄、赤、青、紫で表現した分子はそれぞれ Mcm2、Mcm3/4/5/6/7、GIN5、Cdc45、Pol ε、H3/H4 テトラマー、RPA を示す。(C) テトラソームと H3/H4 テトラマーの粗視化構造。結晶構造 (PDB ID: 4UUZ) で観察された、Mcm2 の N 末端テールと結合している残基を青色で示す。

る¹⁰⁹。構築した全長の Rfa1、Rfa2、Rfa3 の構造を、このヘテロ三量体の Cryo-EM 構造に重ね合わせることで複合体化して全長 RPA 構造を予測した。

H3/H4 の粗視化構造は第 1 章、第 2 章で用いたヌクレオソーム粗視化構造と同様に、ヌクレオソームの X 線結晶構造 (PDB ID: 1KX5²⁰) をもとに構築した (Figure 3 & Figure 31A)。H3 の N 末端テール (1-32) と H4 の N 末端テール (1-23) を天然変性領域として扱った (Figure 31A)。

DNA の粗視化構造は Y フォーク DNA の Cryo-EM 構造 (PDB ID: 6U0M¹⁰³) に、3DNA¹¹¹ を用いて構築した B 型二本鎖 DNA 構造を連結することによって構築した。この Y フォーク構造の親 DNA は 23 bp の二本鎖 DNA からなる (Figure 31B)。リーディング鎖は 90 bp の二本鎖 DNA と 33 スクレオチドの一本鎖 DNA からなる (Figure 31B)。そしてラギング鎖は 96 bp の二本鎖 DNA と 16~56 スクレオチドの一本鎖 DNA からなる (Figure 31B)。ラギング鎖の一本鎖 DNA の長さは系の RPA の数に依存して変化し、系に RPA が含まれない時には 16 スクレオチド、RPA が 1 つの時は 36 スクレオチド、2 つの時は 56 スクレオチドに設定した。

粗視化モデル間に適用したポテンシャル

タンパク質モデルには AICG2+ポテンシャル²² を適用する一方で、DNA モデルには 3SPN.2 ポテンシャル¹¹² を適用した。各モデル間の相互作用として静電相互作用と排除体積相互作用を適用した。さらに RPA とラギング鎖の一本鎖 DNA との間の相互作用を表現するため、RPA-DNA 複合体の Cryo-EM 構造 (PDBID: 6I52¹⁰⁹) に基づいてアミノ酸粒子とヌクレオチド粒子間でコンタクトを定義して、Lennard-Jones 型ポテンシャルを加えた。同様にして Pol2 の触媒活性ドメインと DNA との間の相互作用を表現するために、X 線結晶構造 (PDB ID: 4M8O¹¹³) に基づいてコンタクトを定義して、Lennard-Jones 型ポテンシャルを加えた。Mcm2 の N 末端テール (1-200) は H3/H4 テトラマーに対する結合ドメインをもち、Mcm2-H3/H4 複合体の X 線結晶構造 (PDB ID: 4UUZ¹⁰¹) が同定されている (Figure 31C)。Mcm2 と H3/H4 テトラマー間の相互作用として、この構造を参照構造として用いた AICG2+ポテンシャルを加えた。DNA と H3/H4 テトラマーとの間の相互作用は静電相互作用と排除体積相互作用のほかに、水素結合相互作用を表現するポテンシャル²³ を加えた。水素結合ポテンシャルのパラメータは、ヌクレオソームの参照構造とヌクレオソームの塩濃度依存的な DNA アンラッピングダイナミクスを再現するように、先行研究において最適化されたものを用いた^{23,26}。

分子間の静電相互作用をモデリングするために Debye-Hückel 型のポテンシャルを用いた。このときの粗視化アミノ酸粒子の表面電荷は RESPAC 法²⁷ によって全原子構造の静電ポテンシャルを再現するように最適化した。天然変性領域の構造は一意に決まらないことから RESPAC 法による電荷最適化が適用できないため、天然変性領域のリジンとアルギニンには+1e、アスパラギン酸とグルタミン酸には-1e、その他のアミノ酸には 0e の電荷を割り振った。DNA のリン酸基の電荷として、DNA 間相互作用の計算には-0.6e、DNA-タンパク質間相互作用の計算には-1e を用いた。この操作によって DNA 表面でのカウンターイオン凝縮の効果を表現しつつ、タンパク質との結合による表面からのカウンターイオンの開放を表現した。

粗視化分子動力学シミュレーション

以上の粗視化構造と粗視化力場に基づいて、Langevin 方程式系を用いて分子の運動の時間発展を記述した。すべてのシミュレーションを通して、温度を 300 K、塩濃度を 300 mM、粒子の摩擦係数を 0.843、時間刻み幅を 0.3 cafemol-time unit (~ 14.7 fs) に設定した。すべての粗視化分子動力学シミュレーションは CafeMol3.2²⁹ を利用して実行した。

Mcm2 と H3/H4 テトラマー間の相互作用の最適化

Mcm2 の N 末端テールは H3/H4 テトラマーの DNA 結合ドメインに対して相互作用する (Figure 31C)。上述の通り、Mcm2-H3/H4 複合体の X 線結晶構造 (PDB ID: 4UUZ¹⁰¹) に基づいて AICG2+ポテンシャルを加えることで Mcm2 と H3/H4 テトラマーとの間の相互作用を表現した。第 1 章で述べた AICG2+ポテンシャルの第 5 項の $\epsilon_{go,ij}$ は相互作用の強さを決定するパラメータである。この値をスケールして Mcm2 の N 末端テールと H3/H4 の結合解離シミュレーションを実行して、Mcm2 と H3/H4 との結合自由エネルギー ΔG を算出した。シミュレーションで算出した ΔG が先行研究¹⁰¹での測定値 (-10.4 kcal/mol) を再現するように $\epsilon_{go,ij}$ を設定した。

Mcm2 の N 末端テールと H3/H4 との結合解離を効率よくサンプリングするために、温度レプリカ交換シミュレーションを行った。レプリカ数は 10、各レプリカの温度を 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 に設定した。Mcm2 の N 末端テールと H3/H4 を半径 100 Å の球状壁の中央に配置してからレプリカ交換シミュレーションを 1×10^9 ステップ実行し、レプリカ間の交換が十分行われていることを確認した (Figure 32A & B)。Mcm2 と H3/H4 の結合状態を定義するため、Mcm2 と H3/H4 のアミノ酸粒子間での最近接距離を各シミュレーションスナップショットで計算した。最近接距離が 10 Å 以内であるときに結合状態、10 Å を超えるときに解離状態として定義した (Figure 32A)。 $\epsilon_{go,ij}$ を 0.65、0.70、0.75 倍にスケールしてそれぞれ 5 つずつ独立なレプリカ交換シミュレーションを実行して結合自由エネルギーを計算した ($\Delta G^{0.65} = -5.3 \pm 0.1$ kcal/mol, $\Delta G^{0.70} = -10.0 \pm 0.3$ kcal/mol, $\Delta G^{0.75} = -15.7 \pm 0.5$ kcal/mol)。 $\epsilon_{go,ij}$ を 0.70 倍にスケールしたときに先行研究での実測値 (-10.5 kcal/mol) に最も近かったため、すべてのシミュレーションにおいて Mcm2 と H3/H4 との間の AICG2+ポテンシャルのスケール値は 0.70 を用いた。

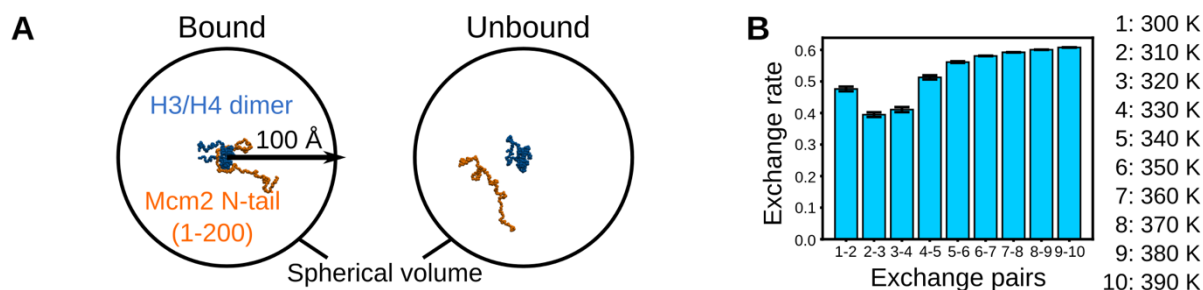


Figure 32: H3/H4 ダイマーと Mcm2 の N 末端テール (1-200) の温度レプリカ交換シミュレーション。(A) Mcm2 の N 末端テールと H3/H4 ダイマーが結合状態 (左) にあるときと解離状態 (右) にあるときの代表構造。円はシミュレーションの球状壁を示す。(B) 各レプリカ間の交換比率。エラーバーは 3 本の独立したシミュレーション結果の標準偏差を示す。

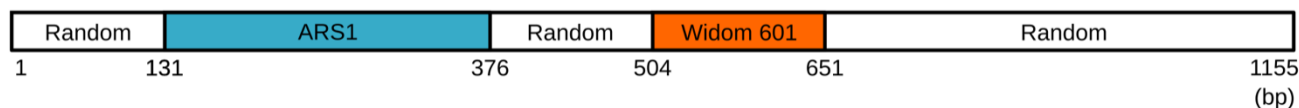


Figure 33: 生化学実験に使用した DNA 配列。ARS1 配列で複製フォークによる DNA 合成が開始し、Widom 601 配列上にヌクレオソームが形成される。

使用した DNA、タンパク質

すべての生化学実験において図で示した 1155 bp の DNA (ARS1-W601) を用いた (Figure 33)。この DNA は複製開始認識配列 (ARS1) の下流にヌクレオソームの位置決定配列である Widom 601 を配置したものである (Figure 33)。この DNA 断片は化学合成されて pEX-A2J2 ベクターにクローニングされており、PCR によって増幅した。

すべての生化学実験において *Saccharomyces cerevisiae* のヒストン H3, H4, H2A, H2B を用いた。このヒストンはすでに確立されている手法を用いて精製した^{30,114}。精製ヒストンを用いてヒストンオクタマーを再構成した。このヒストンオクタマー再構成の過程までは著者が担当した。再構成したヒストンオクタマーと ARS1-W601 DNA を使って、ヌクレオソームを再構成した。この再構成の過程は国立遺伝学研究所の村山泰斗准教授と同研究室の遠藤静子技術補佐員が担当した。反応バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.08% NP40, 2 M NaCl] に 27.7 nM の ARS1-W601 DNA と 354 nM のヒストンオクタマーを混合して、10 時間かけてバッファーの NaCl 濃度が 0.2 M になるまで透析を行った。再構成反応後、次の複製反応のためにバッファー交換を行って、最終的なバッファー組成を 25 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.04% NP40 に調製した。

複製タンパク質の精製は、国立遺伝学研究所の村山泰斗准教授と同研究室の遠藤静子技術補佐員が担当した。20 種類の複製タンパク質 (ORC, Cdc6, Mcm2-7/Cdt1, DDK, S-CDK, Sld2, Sld3/7, Dpb11, Cdc45, GINS, PCNA, RFC, Mcm10, RPA, DNA polymerase α , DNA polymerase δ , DNA polymerase ϵ , Ctf4, Csm3/Tof1, Mrc1) はすでに確立されている手法によって精製された^{114,115}。ゲルシフトアッセイで用いた Cdc45-7HIS のみ、すでに確立されている手法に従って著者が精製を行なった¹¹⁶。

In vitro DNA 複製実験

再構成したヌクレオソームを用いた DNA 複製実験は国立遺伝学研究所の村山泰斗准教授と同研究室の遠藤静子技術補佐員が担当した。再構成したヌクレオソーム DNA を MCM ローディングバッファー [25 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM KOAc, 1 mM dithiothreitol (DTT), 5 mM ATP, 7.5 mM Mg(OAc)₂, 5% Glycerol, 0.01% NP40, 0.1 mg/mL BSA] で 2 倍希釈して、15 nM ORC, 60 nM Mcm2-7/Cdt1, 30 nM Cdc6 を混合して 30°C で 15 分間反応させた。さらに終濃度 50 nM の DDK を加えてさらに 30°C で 15 分間反応させた。反応液を複製反応バッファー [25 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 60 mM KOAc, 1 mM DTT, 5 mM ATP, 7.5 mM Mg(OAc)₂, 5% Glycerol, 0.01% NP40, 0.1 mg/mL BSA, 0.1 mM CTP, 0.1 mM GTP, 0.1 mM TTP, 40 μ M dATP, 40 μ M dCTP, 40 μ M dGTP, 25 μ M dTTP, 15 μ M biotin-

dUTP]で4倍希釈して、5 nM S-CDK, 30 nM Sld2, 20 nM Sld3/7, 30 nM Dpb11, 40 nM Cdc45, 12.5 nM GINS, 20 nM Csm3/Tof1, 10 nM Mrc1, 20 nM Ctf4, 20 nM RFC, 20 nM PCNA, 100 nM RPA, 5 nM Pol α , 2 nM Pol ϵ , 10 nM Pol δ , 5 nM Mcm10 を加えて 30°Cで 20 分間反応させた。

複製反応後の反応液に NaCl と CaCl₂ をそれぞれ終濃度が 50 mM、2mM になるように混合し、MNase を終濃度 1 U/ μ L になるように加えて 30°Cで 30 分間反応させて DNA を消化した。4 μ L の 0.5 M EDTA と 2 μ L の 10% SDS、1 μ L の 20 mg/mL プロテアーゼ K を反応液に混合して 37°Cで 20 分間静置して、DNA 消化反応を停止した。

MNase による DNA 消化反応後の反応液に 1/6 量のゲルローディングバッファー [15% (w/v) ficol, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) , 0.05% orange G]を加えて、7.5% Tris-Glycine ポリアクリルアミドゲルにアプライした。非変性条件 [EzRun TG buffer (ATTO)]、定電流条件 [21 mA]、室温で 65 分間電気泳動を行った。泳動後のゲルを 0.5×TBE 中で 5 分間静置した後、80V の定電圧、4°Cで Zeta-Probe メンブレン(Bio-Rad) に 50 分間転写した。UV イルミネーターによってメンブレン上にビオチン化された DNA をクロスリンクして、Blocking solution (Cytiva) 内で室温で 20 分間静置した。メンブレン上のビオチン付き DNA に、Dylight680 を共役したストレプトアビジンを加えて 30 分間静置した。メンブレンを TBS-T バッファー[TBS, 0.1 % (w/v) Tween 20 and 0.01 % (w/v) SDS]で 3 回洗浄してから、ChemiDoc Touch imager (Bio-Rad) によって可視化した。

ゲルシフトアッセイ

反応バッファー[25 mM HEPES-KOH (pH7.5) , 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 0.05% Tween20, 150, 300, or 750 mM KCl]に終濃度 0.5 μ M Cdc45-7HIS と 0 ~ 2 μ M の H3/H4 テトラマーを加えて容量が 20 μ L になるように反応液を調製し、30°Cで 15 分間静置した。反応液を 10 μ L ずつ 2 つに分けて、一方を 5–20% トリス-グリシンポリアクリルアミドゲルに、もう一方を 5–20% SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライして、常温で 21mA の定電流条件で 75 分間電気泳動した。ゲルは Coomassie Brilliant Blue (EzStain Aqua, ATTO) を用いて染色し、iBright FL 1500 Imaging system を用いて記録、Image J を用いて解析した。

結果

H3/H4 テトラマーと結合した状態の複製フォークのモデリング

レプリソームが H3/H4 テトラマーを新生鎖に結合させる過程を観察するために、レプリソームとヒストンの粗視化モデルを構築した (Figure 34)。レプリソームモデルは、ヘリカーゼサブユニットである CMG (Cdc45、Mcm2-7、GINS)、DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ)、一本鎖 DNA 結合タンパク質である RPA から構成され、Y フォーク型 DNA にドッキングして複製フォークを形成させた (Figure 31B & Figure 34)。Pol ϵ は触媒サブユニット Pol2 の C 末端を介して CMG にドッキングすることがすでに知られており、その複合体構造も同定されている¹⁰⁵。また CMG を構成するサブユニットの 1 つである Mcm2 は N 末端テール (1-200) にヒストン結合ドメインを持ち、Mcm2 の N 末端テールと H3/H4 との間の複合体構造がすでに同定されている¹⁰¹。さらに先行研究より RPA は主にラギング鎖の一本鎖 DNA に集積していることが示されており¹¹⁷、RPA と一本鎖 DNA との複合体構造がすでに同定されている¹⁰⁹。これらの構造情報をもとに Material & Methods で説明した手順にしたがって CMG、Pol ϵ 、RPA、H3/H4 テトラマー、Y フォーク DNA の初期構造を構築し、H3/H4 テトラマーと結合した状態の複製フォークの粗視化構造をモデリングした (Figure 34)。この粗視化構造において、タンパク質はアミノ酸 1 分子を 1 粒子で表現して C α 炭素の座標に配置することで粗視化し、DNA はヌクレオチド 1 分子を塩基、糖、リン酸基の 3 粒子で表現してそれぞれの質量重心の座標に配置することで粗視化した。分子間相互作用として静電相互作用と排除体積相互作用を適用した。それに加えて、タンパク質モデル内、DNA モデル内、DNA-Pol ϵ 間、DNA-RPA 間、Mcm2-H3/H4 間の相互作用は Material & Methods で説明した手順によってモデリングした。

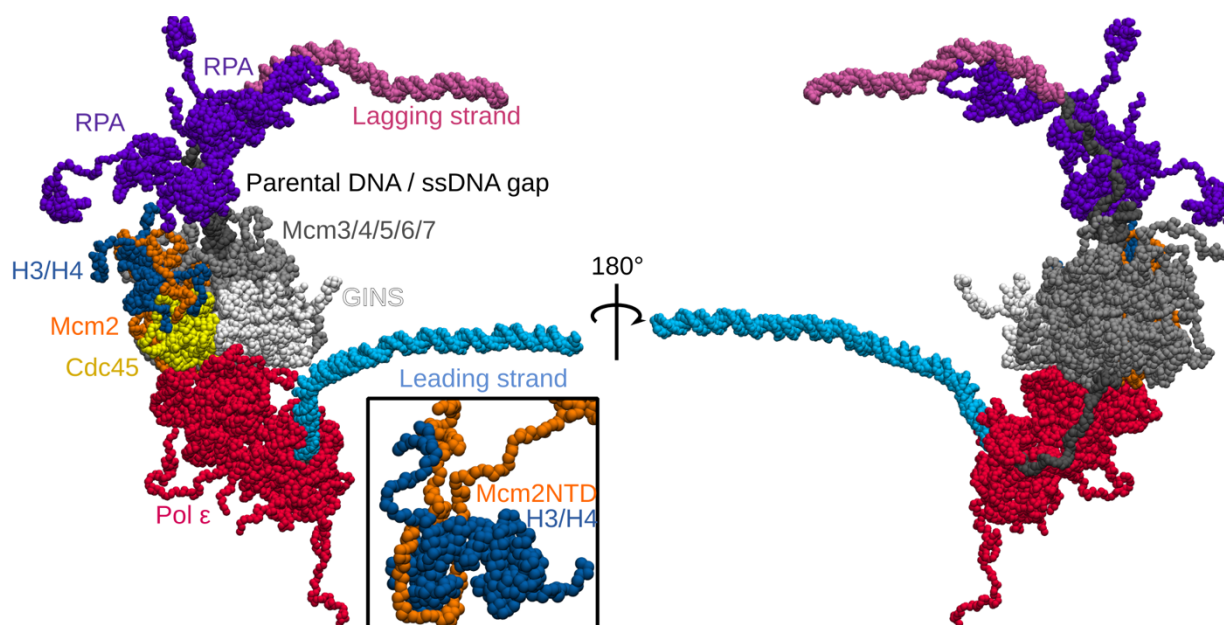


Figure 34: 複製フォーク粗視化モデルの初期構造。親 DNA は黒、ラギング鎖はマゼンタ、リーディング鎖はシアンで色付けした。Mcm2 はオレンジ、Mcm3/4/5/6/7 はグレー、GINS は白、Cdc45 は黄、Pol ϵ は赤、RPA は紫、H3/H4 テトラマーは青で色付けした。Mcm2 の N 末端テールは H3/H4 テトラマーに結合している状態からシミュレーションを開始した (挿入図)。

レプリソームは直接 H3/H4 テトラマーを新生鎖 DNA にリサイクルする

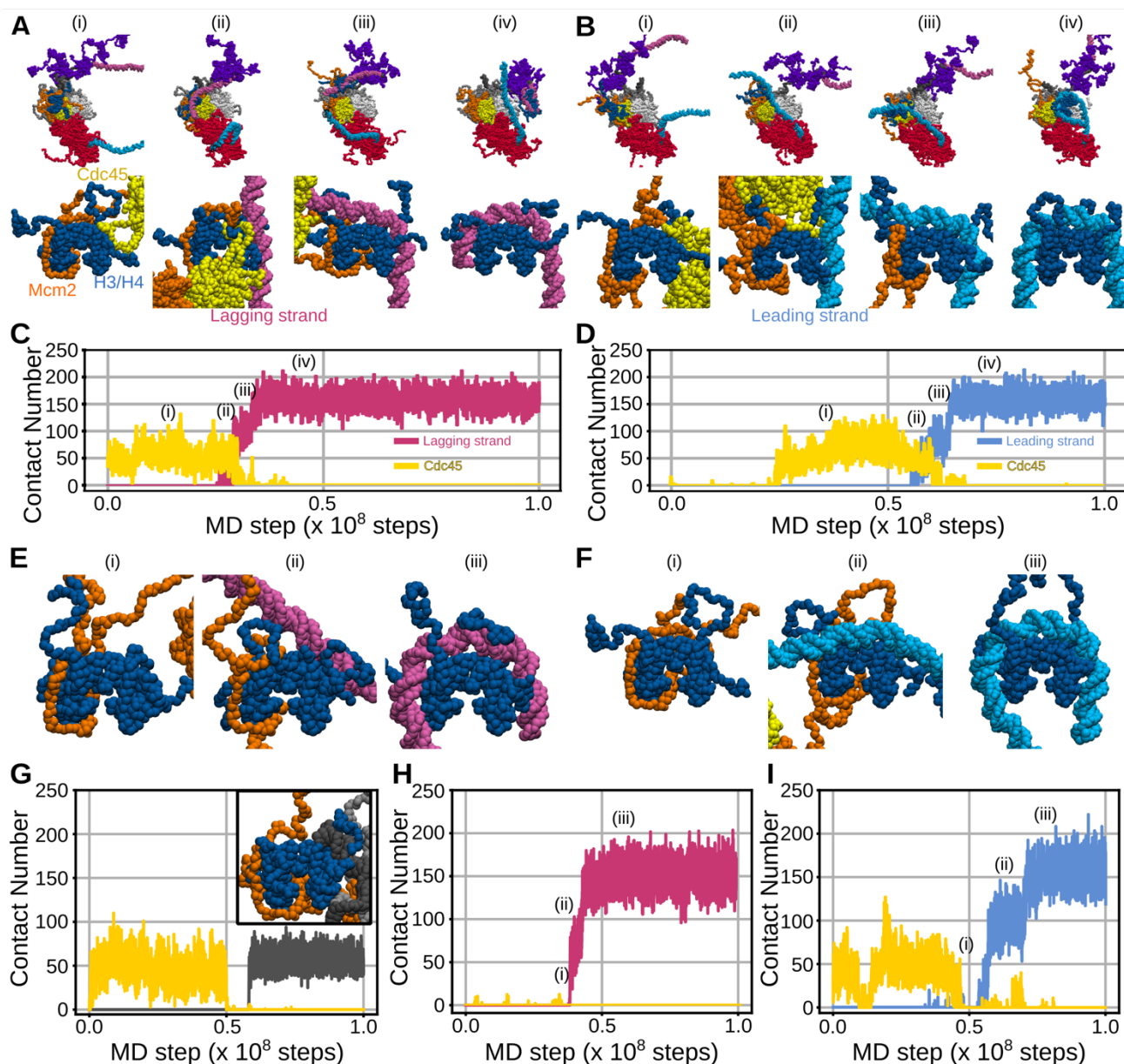


Figure 35: 複製フォークによる H3/H4 テトラマーのリサイクル。(A & B) Mcm2 の N 末端テールが Cdc45 との結合を経由して H3/H4 テトラマーをラギング鎖 (A)、リーディング鎖 (B) にリサイクルするまでの過程。(i) は Mcm2 と Cdc45 が H3/H4 テトラマーと結合している状態。(ii) は露出する H3/H4 テトラマーの界面に新生鎖が結合した状態。(iii) は Cdc45 が H3/H4 テトラマーから解離した状態。(iv) はリサイクルが完了した状態。(C & D) ラギング鎖 (マゼンタ)、リーディング鎖 (シアン)、Cdc45 (黄) とコンタクトを形成する H3/H4 テトラマーの残基数。図の(i) –(iv) は (A)、(B) の状態(i) –(iv) と対応している。(E & F) Mcm2 の N 末端テールが Cdc45 との結合を経由せずに H3/H4 テトラマーをラギング鎖 (E)、リーディング鎖 (F) にリサイクルするまでの過程。(i) は Mcm2 が H3/H4 テトラマーと結合している状態。(ii) は露出する H3/H4 テトラマーの界面に新生鎖が結合した状態。(iii) はリサイクルが完了した状態。(G–I) ラギング鎖 (マゼンタ)、リーディング鎖 (シアン)、親 DNA (黒)、Cdc45 (黄) とコンタクトを形成する H3/H4 テトラマーの残基数。(G) の挿入図は、親 DNA に H3/H4 テトラマーが結合した後の代表構造。

H3/H4 テトラマーと結合した状態の複製フォーク粗視化構造を初期構造に用いて、独立した 100 本の分子動力学シミュレーションを 1×10^8 ステップずつ実行した。20% (20/100) のトラジェクトリで Mcm2 の N 末端テールが H3/H4 テトラマーを直接新生鎖に結合させた (Figure 35A-F)。26% (26/100) のトラジェクトリでは H3/H4 テトラマーの親 DNA 鎖への結合が観察され (Figure 35G)、残りの 54% (54/100) のトラジェクトリでは H3/H4 テトラマーはどの DNA にも結合しなかった。これらの 54% のトラジェクトリで、H3/H4 テトラマーは Mcm2 に結合したままであった。以上のシミュレーションから、レプリソームは親ヒストンを直接新生鎖 DNA にリサイクルする活性を持つことが示唆された。

DNA 複製の試験管内再構成系を用いた先行研究¹¹⁸において、DNA 複製と共役して親 DNA 鎖上にあるヒストンが新生鎖にリサイクルされることが示された。しかしこの実験系ではレプリソームのほかにヒストンシャペロン FACT が含まれているため、レプリソーム単体でヒストンをリサイクルできるかどうかは不明である。上述のシミュレーションで観察したレプリソームによるヒストンリサイクリングを検証するため、試験管内再構成したレプリソームをヌクレオソームに衝突させて、ヒストンシャペロン非存在下でヌクレオソームが新生鎖に再形成されるかどうかを確かめた。複製反応の基質として、複製開始認識配列 (ARS1) とヌクレオソームの位置決定配列 (Widom 601) を持つ 1155bp の DNA (ARS1-W601) を用意した (Figure 33 & Figure 36A)。塩透析法によって ARS1-W601 DNA にヌクレオソームを再構成して、20 種類の複製タンパク質 (ORC, Cdc6, Mcm2-7/Cdt1, DDK, S-CDK, Sld2, Sld3/7, Dpb11, Cdc45, GINS, PCNA, RFC, Mcm10, RPA, DNA polymerase α , DNA polymerase δ , DNA polymerase ϵ , Ctf4, Csm3/Tof1, Mrc1) を用いてレプリソームを再構成した (Figure

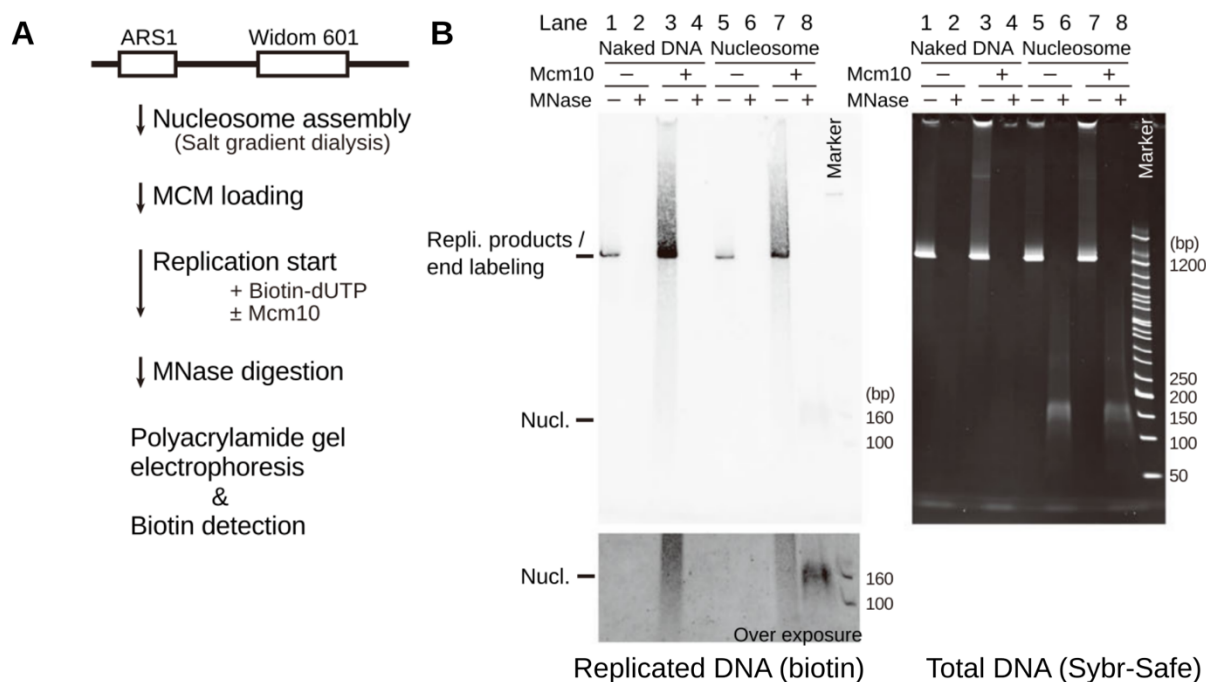


Figure 36: ヌクレオソーム DNA の in vitro 複製実験。(A) in vitro 複製実験の概略図。(B) 複製実験・MNase 処理後の産物の電気泳動像。DNA 合成依存的に新生鎖に取り込まれた biotin-dUTP に基づいて、新生鎖 DNA 断片を蛍光ウェスタンブロットで可視化した (左)。また全 DNA を Sybr-Safe で可視化した (右)。

36A)。反応液にヌクレオチドアナログである biotin-dUTP を加えて 30°C で 20 分間反応させ、DNA 合成依存的にビオチンを新生鎖に取り込ませることで新生鎖を標識した。MNase で処理する前に複製産物である DNA を電気泳動すると、ヌクレオソーム存在下であっても DNA 複製が完了したことが確認できた (Figure 36B, レーン 7)。MNase によって複製産物を切断すると、150 bp のビオチン化 DNA 断片が観察された (Figure 36B, レーン 8)。このビオチン化 DNA 断片は Naked DNA をテンプレートに用いた場合には観察されなかったため (Figure 36B, レーン 4)、この断片はヌクレオソームに由来すると考えられる。また反応液中の Pol ϵ は、エキソヌクレアーゼ活性によって DNA 基質の 3' 末端を消化したあとに自身のポリメラーゼ活性によって再度ヌクレオチドを取り込むことが知られている (エンドラベリング) (Figure 36B, レーン 1 & 5)。このエンドラベリングによって DNA に biotin-dUTP が取り込まれた可能性を排除するために、DNA 複製の開始に不可欠な Mcm10 を除いた条件下で同様の実験を行い、反応産物を MNase で消化した。Mcm10 非存在下では 150 bp のビオチン DNA 断片が観察されなかったため、この DNA 断片はエンドラベリングではなく DNA 複製依存的に生じたものであることが示された (Figure 36B, レーン 6)。したがってシミュレーションの条件と同様に FACT の非存在下であっても、レプリソームによるヒストンリサイクリングが起こることが実証された。

H3/H4 テトラマーは 2 つの経路でリサイクルされる

100 本の全てのシミュレーショントラジェクトリにおいて、H3/H4 テトラマーは Mcm2 の N 末端テールのほかに Cdc45 と相互作用していた (Figure 37A)。Mcm2 の N 末端テールは H3/H4 テトラマーの DNA 結合界面のうち半分を覆っており、残りの界面は溶媒中に露出している (Figure 34)。H3/H4 テトラマーはこの溶媒中に露出した界面で Cdc45 と相互作用していた (Figure 35A & B, i)。Cdc45 は酸性アミノ酸に富む天然変性領域 (184–205) で H3/H4 テトラマーと相互作用しており、シミュレーション中で平均 9×10^6 ステップにわたって結合状態を維持していた (Figure 37A & B)。この酸性ループ領域の酸性アミノ酸の電荷をすべて 0e に変更してシミュレーションを 50 本独立に実行すると、Cdc45 と H3/H4 テトラマーとの結合は 1×10^5 ステップ以上維持できないことが示された (Figure 37B)。このことから、Cdc45 と H3/H4 テトラマーとの相互作用は Cdc45 の酸性ループを介した静電相互作用に依存していることが示された。新生鎖へのヒストンリサイクリングを示した 20 本のトラ

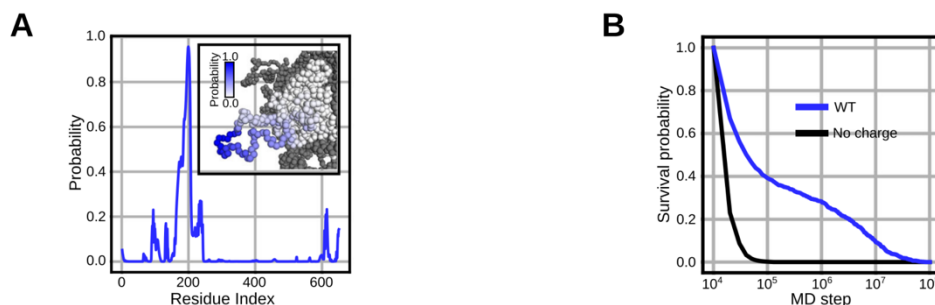


Figure 37: シミュレーション中で観察された、Cdc45 と H3/H4 テトラマーとの相互作用。(A) Cdc45 が H3/H4 テトラマーとコンタクトを形成した割合。挿入図は Cdc45 の粗視化構造で、コンタクト割合に基づいて粗視化粒子を青の濃淡で色付けした。(B) シミュレーション中で Cdc45 (WT: 青、No charge (酸性ループの電荷を 0e に変更): 黒) が H3/H4 テトラマーと結合を持続する確率。

ジェクトリのうち、20% (4/20) のトラジェクトリにおいて新生鎖は Cdc45 から解離している状態の H3/H4 テトラマーに結合した。残りの 80% (16/20) のトラジェクトリにおいて、新生鎖は Cdc45 と結合している状態の H3/H4 テトラマーに結合した。このことから H3/H4 テトラマーの新生鎖へのリサイクル経路として、Cdc45 との結合を経由する経路と経由しない経路の 2 つがあることがわかった。

シミュレーションで観察した Cdc45 と H3/H4 テトラマーとの相互作用を実験的に検証するために、ゲルシフトアッセイを行なった。試験管内で再構成した H3/H4 テトラマーと、精製した Cdc45 を混ぜて 30°C で 15 分間静置し、非変性条件と変性条件のそれぞれでポリアクリルアミドゲル電気泳動を実行した。H3/H4 テトラマーは正電荷に富むタンパク質であるため、非変性条件において H3/H4 テトラマーはゲルに侵入しなかった (Figure 38A & B)。非変性条件において Cdc45 のシグナルはゲル上に観察されるが、反応液中の H3/H4 テトラマーの濃度が上昇するにつれて Cdc45 のシグナルが減少した (Figure 38A & B)。Cdc45 が H3/H4 テトラマー 1 分子と複合体を形成した場合の正

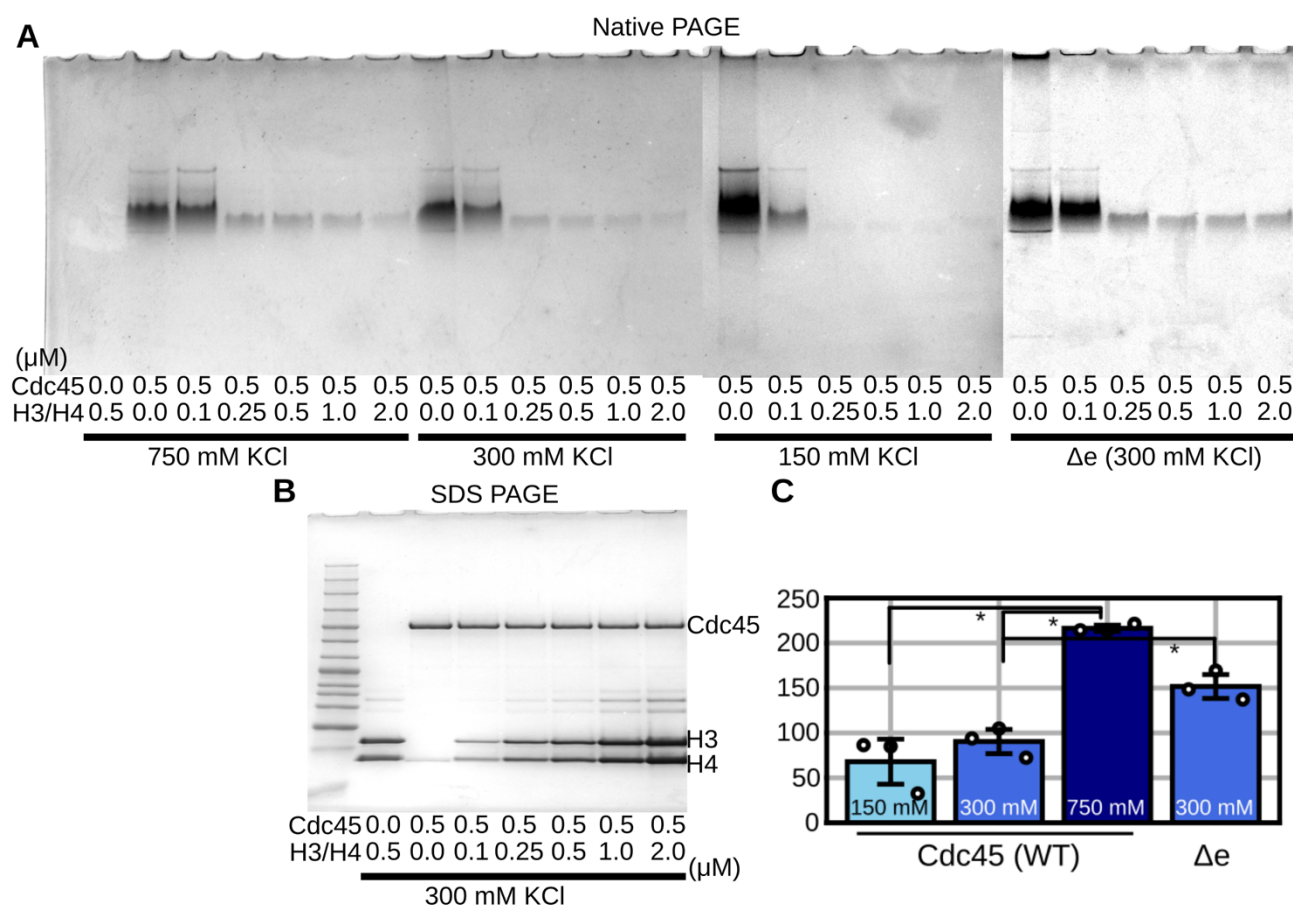


Figure 38: Cdc45 と H3/H4 テトラマー複合体形成検証。(A) KCl 濃度 750 mM、300 mM、150 mM における Cdc45 と H3/H4 テトラマーの混合物の Native ゲル電気泳動像と、KCl 濃度 300 mM における Cdc45 Δe と H3/H4 テトラマーの混合物の Native ゲル電気泳動像。タンパク質は CBB によって染色した。(B) KCl 濃度 300 mM における Cdc45 と H3/H4 テトラマーの混合物 SDS ゲル電気泳動像。(C) Cdc45 と H3/H4 テトラマーとの見かけの結合解離定数。エラーバーは 3 回の反復実験から得られた標準偏差であり、アスタリスクは Welch の両側 t 検定の結果から p 値が 0.05 を下回るものを示す。

味電荷は+40eであるため、電気泳動によってゲルに入らない。したがって H3/H4 テトラマー添加による Cdc45 シグナルの減少は、H3/H4 テトラマーとの複合体形成によって非結合状態の Cdc45 の量が減少したためであると考えられる。

Cdc45 と H3/H4 テトラマーとの複合体形成が静電相互作用に依存していることを確かめるため、反応液中の塩濃度を変更してゲルシフトアッセイを実行した (Figure 38A)。Cdc45 のシグナルの減少に基づいて見かけの解離定数を推定すると、150 mM KCl の条件では 68 ± 25 nM、300 mM KCl の条件では 90 ± 14 nM、750 mM KCl の条件では 216 ± 4 nM であった (Figure 38C)。この解離定数の塩濃度依存性から、Cdc45 と H3/H4 テトラマーとの複合体形成には静電相互作用が寄与していることが示された。

さらに Cdc45 の酸性ループ領域 (184–205) が複合体形成に寄与していることを確かめるために、この領域中のアスパラギン酸とグルタミン酸をそれぞれアスパラギンとグルタミンに置換した変異体 (Δe) を精製し、300 mM KCl 条件でゲルシフトアッセイを実行した (Figure 38A)。変異体の見かけの解離定数は 152 ± 13 nM であり、野生型 Cdc45 に比べて親和性が低いことが示された (Figure 38C)。このことからシミュレーションで観察されたように、Cdc45 の酸性ループを介した静電相互作用が H3/H4 テトラマーとの相互作用に寄与していることが示された。

シミュレーションで観察された 2 種類のヒストンリサイクリング経路において、H3/H4 テトラマーがラギング鎖とリーディング鎖のどちらにリサイクルされたのかに注目した。Cdc45 を経由する経路では、75% (12/16) でリーディング鎖、25% (4/16) でラギング鎖にリサイクルされた (Figure 39)。一方で Cdc45 を経由しない経路では、25% (1/4) でリーディング鎖、75% (3/4) でラギング鎖にリサイクルされた (Figure 39)。上述の Cdc45 の酸性ループ領域の電荷を 0e に変更した 50 本のシミュレーションにおいて、ラギング鎖へのリサイクルが 2 本観察された一方で、リーディング鎖へのリサイクルは観察されなかった (Figure 39)。このことから Cdc45 と H3/H4 テトラマーとの結合は、リーディング鎖へのヒストンリサイクリングを促進することが示された。

ヒストンリサイクリングの過程で Mcm2 の N 末端テールは H3/H4 テトラマーを直接新生鎖に渡

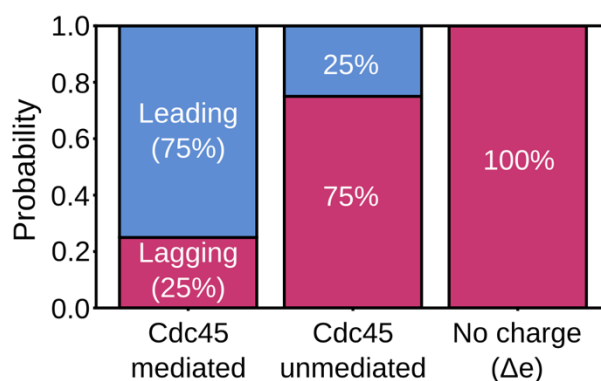


Figure 39: ヒストンリサイクリングが観察されたトラジェクトリのうち、ラギング鎖、リーディング鎖にリサイクルされた割合。

す。シミュレーション中でラギング鎖とリーディング鎖が H3/H4 テトラマーを探索する範囲は異なるため、ヒストンリサイクリングの鎖バイアスは、この新生鎖の運動範囲の違いを反映していると考えられる。

ラギング鎖とリーディング鎖の運動範囲を定量化するために、Mcm2-7 複合体の質量重心からラギング鎖、リーディング鎖の末端までのベクトルを計算した。Mcm2-7 の回転軸の方向を Z 軸とし

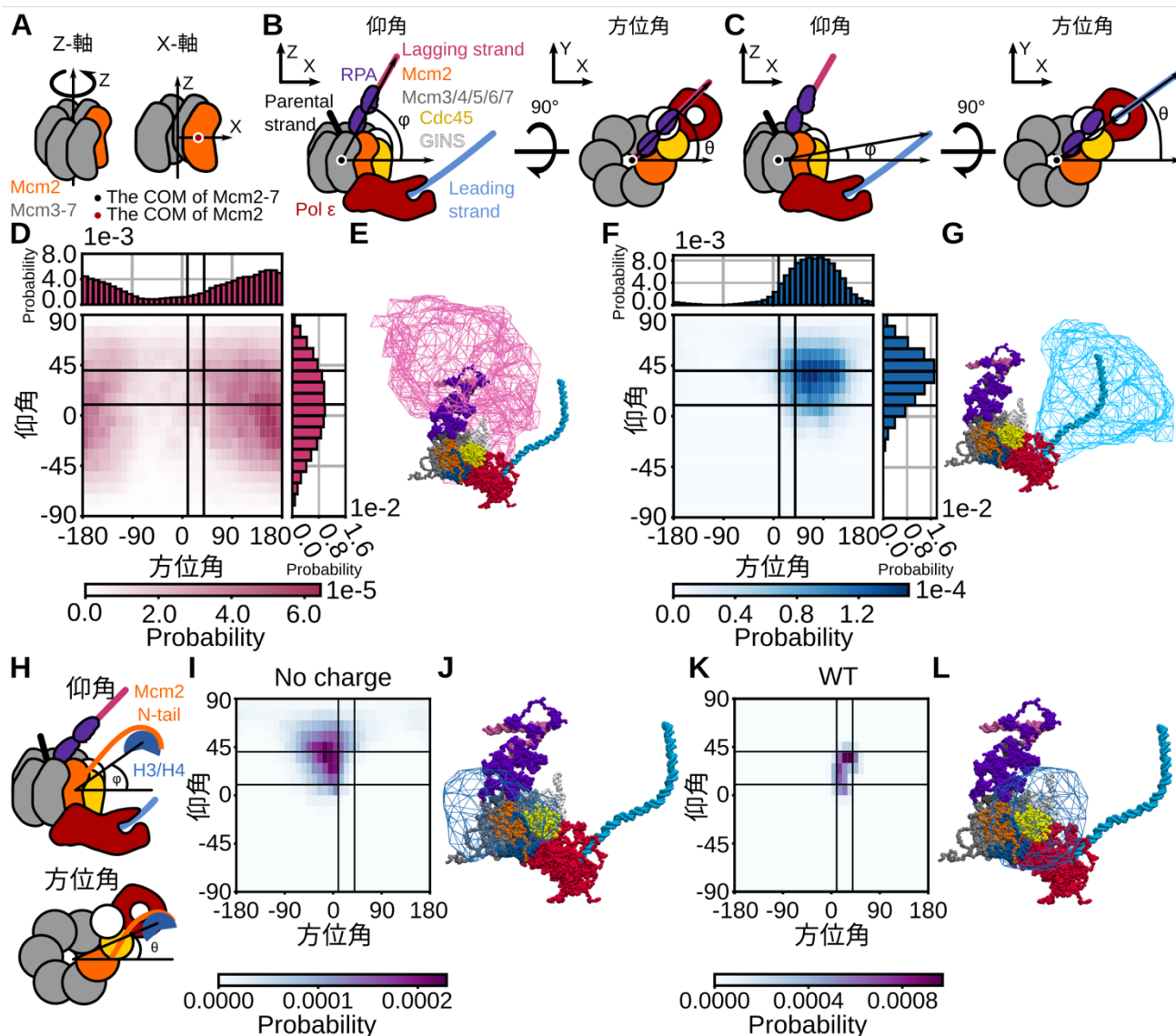


Figure 40: ラギング鎖、リーディング鎖、H3/H4 テトラマーの運動範囲解析。(A) X 軸、Z 軸の定義。(B & C) ラギング鎖 (B) とリーディング鎖 (C) の方向ベクトルの仰角、方位角の定義。(D & F) ラギング鎖 (D) とリーディング鎖 (F) の方向ベクトルの仰角・方位角分布。(E & G) ラギング鎖 (E) とリーディング鎖 (G) の等値面 (0.0001 [$\text{\AA}^3$])。 (H) H3/H4 テトラマーの方向ベクトルの仰角、方位角の定義。(I & K) Cdc45 の酸性ループの電荷がない条件 (I, No charge) と野生型条件 (K, WT) における H3/H4 テトラマーの方向ベクトルの仰角・方位角分布。(J & L) No charge 条件 (J) と WT 条件 (L) における H3/H4 テトラマーの等値面 (0.0001 [$\text{\AA}^3$])。 (D, F, I, K) における黒実線で囲まれた領域は (K) において H3/H4 テトラマーの方向ベクトル分布のピークが見られる範囲 (仰角・方位角ともに 10° – 40°) を示す。

て定義し、X 軸は Z 軸から Mcm2 の質量重心に下ろした垂線として定義した (Figure 40A)。Y 軸は X 軸と Z 軸の両方に垂直な軸として定義した。X-Y 平面を基準とした新生鎖ベクトルの仰角を φ 、方位角を θ と定義した (Figure 40B & C)。シミュレーション中でヒストンリサイクリングが観察されるまでの間、ラギング鎖ベクトルの仰角は $4^\circ \pm 36^\circ$ 、方位角は $160^\circ \pm 79^\circ$ であった (Figure 40D)。わずかに仰角が正の値をとっているのは、CMG による立体障害を反映していると考えられる (Figure 40D & E)。また方位角の偏りは、ラギング鎖と Mcm2-7 との相互作用を反映していると考えられる。シミュレーション中においてラギング鎖は Mcm3、Mcm5、Mcm7 の Zinc Finger ドメインと強く相互作用していた (Figure 41A & B)。これは先行研究の Cryo-EM 構造の結果と一貫している。一方でリーディング鎖ベクトルの仰角は $35^\circ \pm 23^\circ$ 、方位角は $67^\circ \pm 52^\circ$ であった (Figure 40F)。この角度の偏りは Pol ϵ の触媒サブユニット Pol2 の N 末端ドメインがリーディング鎖を曲げて向きを固定していることに由来する (Figure 34, Figure 40F & G)。

同様に座標系を定義して (Figure 40H)、Mcm2-7 の質量重心から H3/H4 テトラマーの質量重心までのベクトルを計算して、Mcm2 と結合している状態の H3/H4 テトラマーの運動範囲を定量化した。H3/H4 テトラマーが Cdc45 と結合していない状態では、H3/H4 テトラマーベクトルの仰角は $43^\circ \pm 20^\circ$ 、方位角は $-11^\circ \pm 48^\circ$ であった (Figure 40I & J)。一方で H3/H4 テトラマーが Cdc45 と結合している状態では、仰角は $25^\circ \pm 13^\circ$ 、方位角は $25^\circ \pm 12^\circ$ であった (Figure 40K & L)。したがって Cdc45 は H3/H4 テトラマーの運動範囲を偏らせることが示された。ラギング鎖、リーディング鎖の運動範囲と H3/H4 テトラマーの運動範囲の重なる確率を計算すると、ラギング鎖は 0.14%、リーディング鎖は 0.70%であった (Figure 40D, F & K)。このことから、Cdc45 を経由するヒストンリサイクリング経路において、Cdc45 が H3/H4 テトラマーの運動範囲を偏らせることによって、H3/H4 テトラマーがラギング鎖よりもリーディング鎖に接触する確率を上げることが示された。

ラギング鎖上の RPA の数がストランドバイアスを制御する

先行研究において、ラギング鎖の合成開始を担う Pol α の濃度とラギング鎖に集積する RPA の数

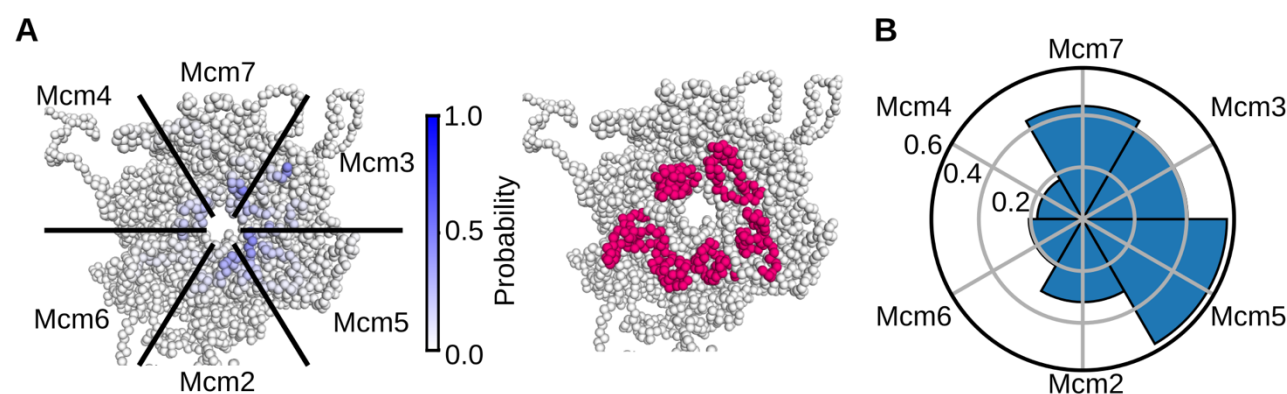


Figure 41: Mcm2-7 とラギング鎖の一本鎖 DNA との間のコンタクト形成。(A) Mcm2-7 粗視化構造を N 末端側から見た図。ラギング鎖とコンタクトを形成している Mcm2-7 の残基を青の濃淡で示す (左)。MCM サブユニットの Zinc finger ドメインをピンク色で色付けした (右)。(B) MCM サブユニットごとの、ラギング鎖とコンタクトを形成する割合。

が負の相関をもつことが示されており^{119,120}、一分子蛍光顕微鏡を用いた研究から、生理条件下に近い 70 nM Pol α 条件において 1.5 ± 0.3 個の RPA がラギング鎖に集積することが知られている¹¹⁹。一方で細胞内環境ではラギング鎖合成の進行具合に依存して RPA の数が変動する¹²⁰。ラギング鎖上の RPA の数がヒストンリサイクリングに与える影響を調べるために、RPA の数を 0 個、1 個に変えて 1×10^8 ステップの分子動力学シミュレーションをそれぞれ 50 本、100 本独立に実行した (Figure 42A & B)。RPA の数に関わらず Cdc45 を経由する経路と経由しない経路の両方でヒストンリサイクリングが観察された (Figure 42C–F)。

RPA が 0 個のとき、56% (28/50) のトラジェクトリでは新生鎖へ、2% (1/50) のトラジェクトリでは親 DNA 鎖へ H3/H4 テトラマーが結合した。残りの 42% (21/50) ではどの DNA にも結合しないままであった。ヒストンリサイクリングが観察されたトラジェクトリのうち、54% (15/28) は Cdc45 を経由する経路を介して、46% (13/28) は Cdc45 を経由しない経路を介して H3/H4 テトラマーが新生鎖にリサイクルされた。Cdc45 を経由する経路では 73% (11/15) でリーディング鎖へのリサイクルが観察され、Cdc45 を経由しない経路では全てのトラジェクトリ (13/13) でラギング鎖へのリサイクルが観察された (Figure 42F)。

RPA が 1 個のとき、38% (38/100) のトラジェクトリでは新生鎖へ、23% (23/100) のトラジェクトリでは親 DNA 鎖へ H3/H4 テトラマーが結合した。残りの 39% (39/100) ではどの DNA にも結合しないままであった。ヒストンリサイクリングが観察されたトラジェクトリのうち、61% (23/38) は Cdc45 を経由する経路を介して、39% (15/38) は Cdc45 を経由しない経路を介して H3/H4 テトラマーが新生鎖にリサイクルされた。Cdc45 を経由する経路では 65% (15/23) でリーディング鎖へのリサイクルが観察され、Cdc45 を経由しない経路では 80% (12/15) でラギング鎖へのリサイクルが観察された (Figure 42F)。

シミュレーションの結果より、RPA の数を上昇させるとラギング鎖にリサイクルされる割合が減少することが示された (Figure 42E & F)。Cdc45 を経由する経路では、RPA の数に関わらず H3/H4 テトラマーがリーディング鎖に偏ってリサイクルされた (Figure 42F)。一方で Cdc45 を経由しない経路では H3/H4 テトラマーはラギング鎖に偏ってリサイクルされ、RPA の数が増えるとその偏りが減少した (Figure 42F)。このことから RPA のラギング鎖への集積は、Cdc45 を経由しない経路でのラギング鎖へのリサイクルを阻害することが示された。先行研究¹²⁰より、ラギング鎖の一本鎖 DNA 長は Pol α の濃度に依存して 0 から 2000 まで広く分布していることから、ラギング鎖上の RPA の数も同様に広く分布していると考えられる。これらから、Pol α によるラギング鎖合成開始速度の調節がリサイクルの鎖バイアスを制御する可能性が示唆された。

RPA の数がラギング鎖へのリサイクルを阻害するメカニズムを調べるために、まず上述の座標系を用いて RPA が 0、1、2 個の条件での H3/H4 テトラマーと新生鎖の運動範囲を解析した。RPA が 0、1、2 個の時、Cdc45 と結合していない状態の H3/H4 テトラマーの仰角はそれぞれ $35^\circ \pm 23^\circ$ 、 $39^\circ \pm 22^\circ$ 、 $39^\circ \pm 19^\circ$ 、方位角はそれぞれ $-13^\circ \pm 44^\circ$ 、 $-18^\circ \pm 50^\circ$ 、 $-18^\circ \pm 34^\circ$ であった (Figure 43A–C)。一方で Cdc45 と結合している状態の H3/H4 テトラマーの仰角はそれぞれ $9^\circ \pm 13^\circ$ 、 $19^\circ \pm 13^\circ$ 、 $25^\circ \pm 12^\circ$ 、方位角はそれぞれ $20^\circ \pm 11^\circ$ 、 $7^\circ \pm 12^\circ$ 、 $25^\circ \pm 13^\circ$ であった (Figure 43D–F)。RPA が 0、1、2 の時のラ

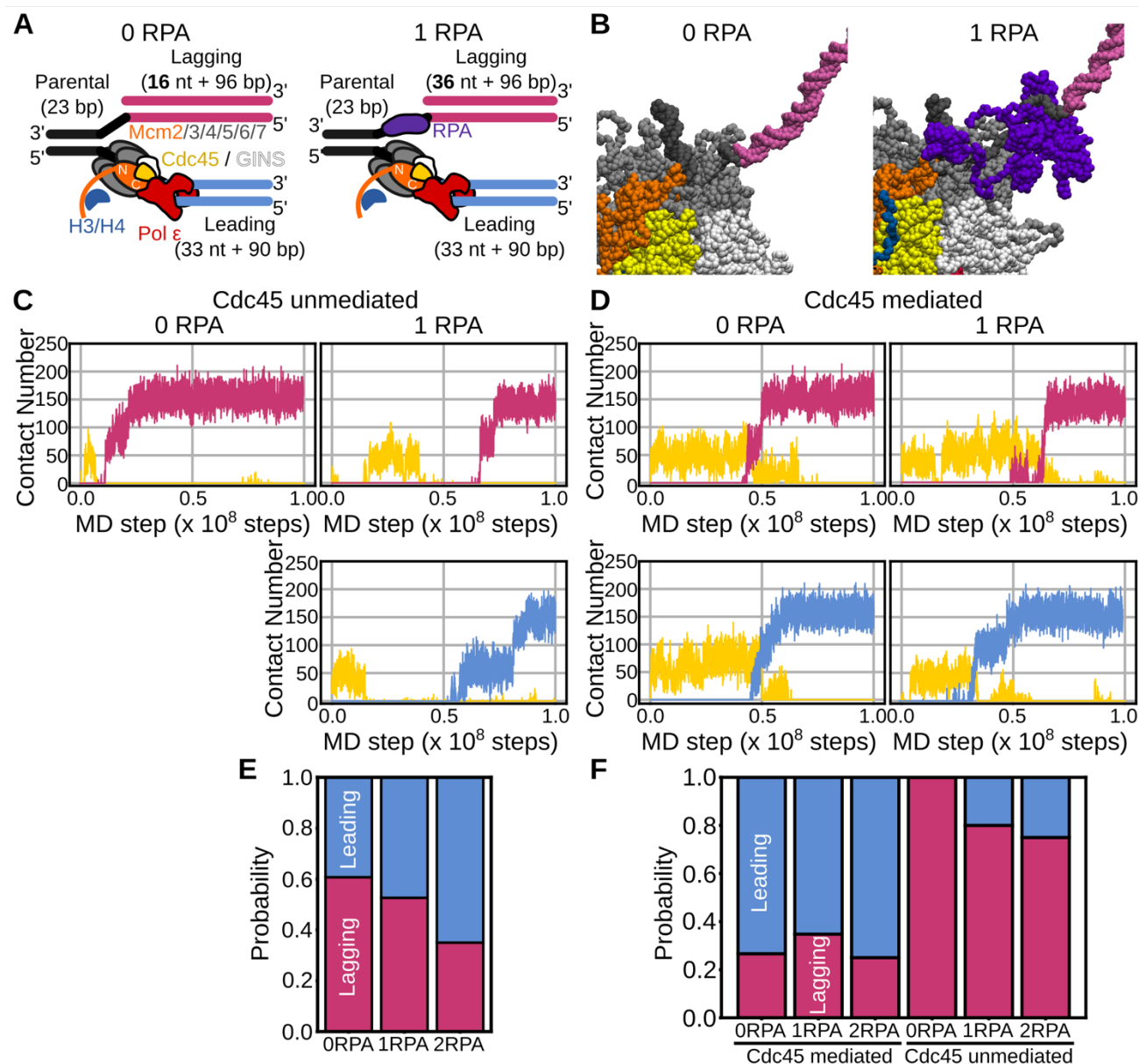


Figure 42: RPA が 0、1 個の条件での複製フォークによる H3/H4 テトラマーリサイクルシミュレーション。

(A & B) RPA が 0 個 (左)、1 個 (右) の条件での初期構造の概念図 (A) とラギング鎖の一本鎖 DNA 部分の拡大図 (B)。(C & D) Cdc45 を経由しない経路 (C) と経由する経路 (D) における、ラギング鎖 (マゼンタ)、リーディング鎖 (シアン)、Cdc45 (黄) とコンタクトを形成する H3/H4 テトラマーの残基数。パネル左は RPA が 0 個、右は 1 個の条件。(E) RPA の数ごとの、ラギング鎖、リーディング鎖にリサイクルされた割合。(F) RPA の数、経路ごとのリサイクル割合。

ギング鎖の仰角は $30^\circ \pm 30^\circ$ 、 $20^\circ \pm 33^\circ$ 、 $4^\circ \pm 36^\circ$ 、それぞれ方位角は $160^\circ \pm 81^\circ$ 、 $149^\circ \pm 80^\circ$ 、 $160^\circ \pm 79^\circ$ であった (Figure 43G-I)。さらに H3/H4 テトラマーの運動範囲に関して角度方向だけでなく動径方向に注目して、フォークジャンクション (ラギング鎖とリーディング鎖の分岐点) から H3/H4 テトラマーまでの空間距離を計算した (Figure 44A)。RPA が 0、1、2 の時、Cdc45 と結合していない H3/H4 テトラマーはそれぞれ $133 \pm 32\text{\AA}$ 、 $129 \pm 35\text{\AA}$ 、 $137 \pm 25\text{\AA}$ であり、Cdc45 と結合している H3/H4 テトラマーはそれぞれ $150 \pm 14\text{\AA}$ 、 $150 \pm 15\text{\AA}$ 、 $150 \pm 15\text{\AA}$ であった (Figure 44B)。以上の解析から、H3/H4 テトラマーとラギング鎖の運動範囲は RPA の数によって大きく変動しなかった。

次に H3/H4 テトラマーがラギング鎖にリサイクルされる瞬間における、フォークジャンクション

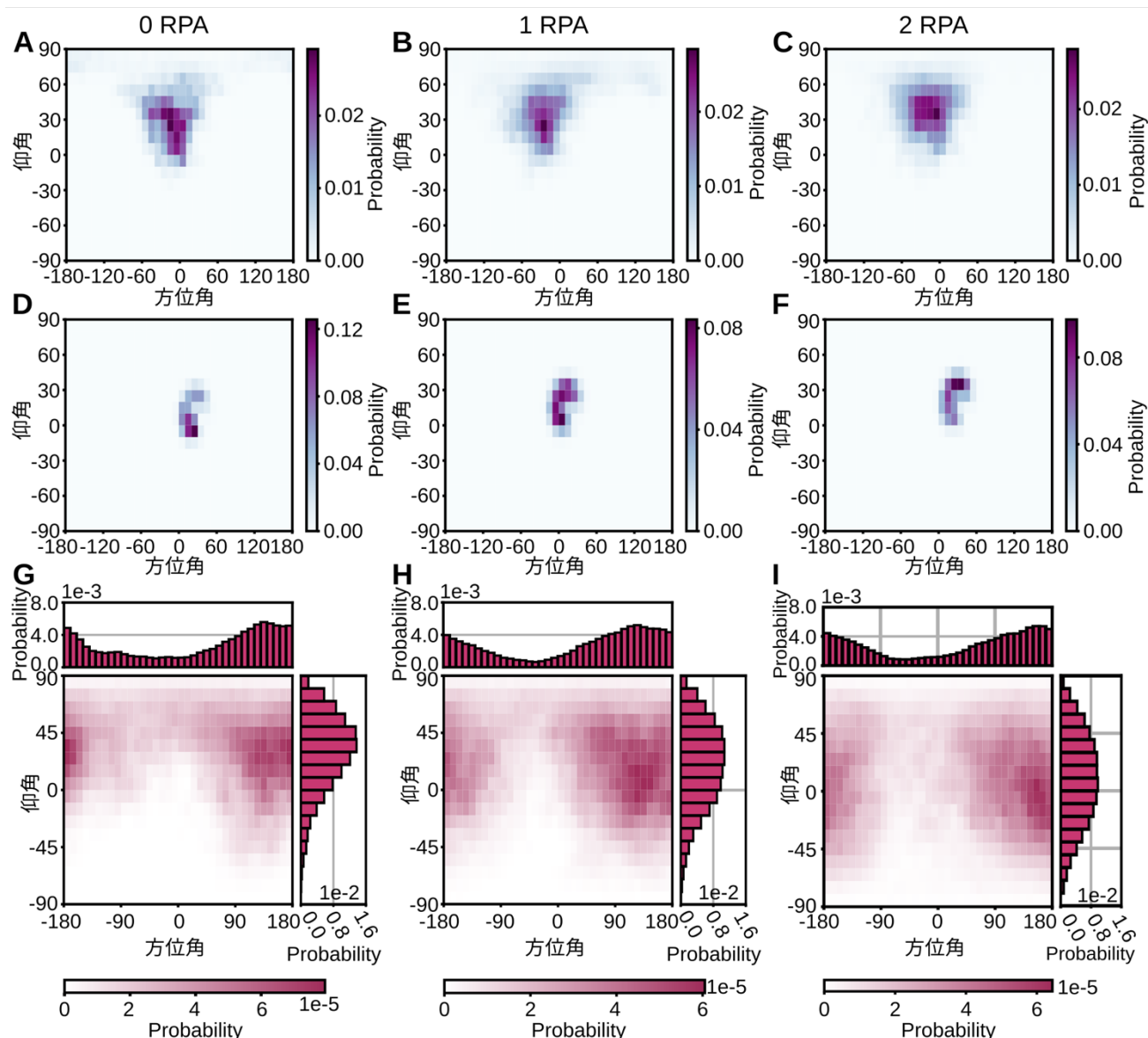


Figure 43: RPA が 0 (A,D,G)、1 (B,E,H)、2 個 (C,F,I) の条件における、H3/H4 テトラマーとラギング鎖の運動範囲解析。(A-C) Cdc45 と結合していない状態の H3/H4 テトラマーの方向ベクトルの分布。(D-F) Cdc45 と結合している状態の H3/H4 テトラマーの方向ベクトルの分布。(G-I) ラギング鎖の方向ベクトルの分布。

から H3/H4 テトラマーまでの空間距離を計算した。RPA が 0、1、2 のとき、Cdc45 と結合していない状態の H3/H4 テトラマーはフォークジャンクションから $89 \pm 31 \text{Å}$ 、 $121 \pm 29 \text{Å}$ 、 $134 \pm 14 \text{Å}$ の距離にあるときにラギング鎖に結合した (Figure 44C)。RPA がいない時にはこの距離は 60Å から 160Å まで幅広く分布している (Figure 44C)。またフォークジャンクションから伸びるラギング鎖の一本鎖 DNA の長さは、RPA が 1、2 個結合しているときそれぞれ 110Å 、 160Å であった (Figure 44D)。したがってフォークジャンクションから 110Å 、 160Å までの距離にある H3/H4 テトラマーは、ラギング鎖の二本鎖 DNA と接触する頻度が低下する。したがって RPA は H3/H4 テトラマーがラギング鎖に接触する頻度を減らすことによってラギング鎖へのリサイクルを阻害することが示された。一方で Cdc45 と結合している状態の H3/H4 テトラマーはフォークジャンクションから $150 \pm 3 \text{Å}$ 、 $159 \pm 13 \text{Å}$ 、 $150 \pm 16 \text{Å}$ の距離にあるときにラギング鎖に結合していた (Figure 44C)。Cdc45 を経由する経

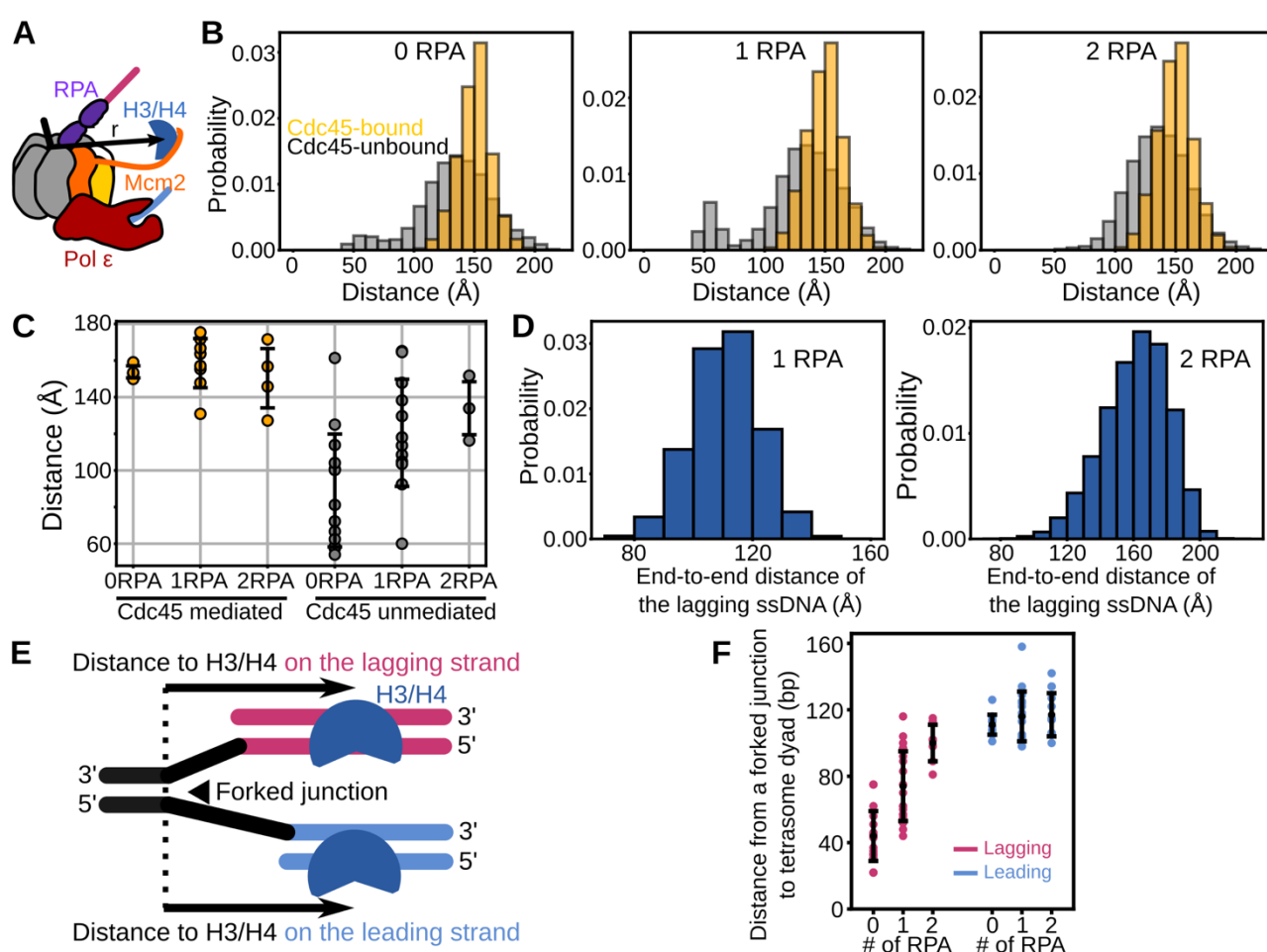


Figure 44: H3/H4 テトラマーの方向ベクトル、リサイクル位置の解析。(A) フォークジャンクションから H3/H4 テトラマーまでの距離計算の概念図。(B) Cdc45 に結合していない状態 (黒) と結合している状態 (オレンジ) のフォークジャンクション-H3/H4 テトラマー間距離分布。(C) RPA が 1、2 個の条件でのラギング鎖の一本鎖 DNA の末端間距離。(D) H3/H4 テトラマーが新生鎖にリサイクルされる瞬間における、フォークジャンクションから H3/H4 テトラマーまでの距離。エラーバーは標準偏差を示す。(E) H3/H4 テトラマーのリサイクル位置の概念図。(F) RPA の数が 0、1、2 個の条件における、ラギング鎖 (マゼンタ)、リーディング鎖 (シアン) へのリサイクル位置。

路においては、RPA の数に関わらずフォークジャンクションから離れた位置の H3/H4 テトラマーだけがリサイクルされるために、RPA による立体障害の影響を受けにくいことが示された。

H3/H4 テトラマーは新生鎖のどの場所にリサイクルされるのかを調べるために、フォークジャンクションの塩基からリサイクル直後のテトラソームのダイアドの位置の塩基までのヌクレオチド数（配列距離）を計算した（Figure 44E）。RPA が 0、1、2 のとき、ラギング鎖の配列距離はそれぞれ 43 ± 15 、 74 ± 21 、 100 ± 11 bp で、リーディング鎖の配列距離はそれぞれ 111 ± 6 、 116 ± 15 、 117 ± 13 bp であった（Figure 44F）。したがって、RPA の数に比例してラギング鎖の二本鎖 DNA 領域が上流側にシフトすることで、リサイクルされた H3/H4 テトラマーの配列上での場所も上流側に移動した。

Pol ϵ はリーディング鎖への H3/H4 テトラマーのリサイクル位置を制御する

レプリソーム粗視化構造において、Pol ϵ は CMG に結合してリーディング鎖を一定の向きに固定する。この Pol ϵ の結合による H3/H4 テトラマーのリサイクルへの影響を調べるために、系から RPA と Pol ϵ を除いて 50 本の独立なシミュレーションを実行した（Figure 45A）。Pol ϵ を除くと、リーディング鎖の方向の固定が解除されることで（Figure 45A）、リーディング鎖ベクトルの仰角は $-24^\circ \pm 33^\circ$ 、方位角は $-178^\circ \pm 95^\circ$ を向くようになった（Figure 45B & C）。Pol ϵ の有無によって H3/H4 テトラマーの運動範囲が変化するかどうかを確かめると、H3/H4 テトラマーベクトルの仰角は $17^\circ \pm 27^\circ$ 、方位角は $12^\circ \pm 32^\circ$ であり、Pol ϵ がある時（仰角 $15^\circ \pm 19^\circ$ 、方位角 $15^\circ \pm 26^\circ$ ）と比べてほとんど変化しなかった（Figure 45D & E）。

50 本のトラジェクトリのうち、74% (37/50) において H3/H4 テトラマーの新生鎖への結合が観察され、6% (3/50) で親 DNA 鎖への結合が観察された。残りの 20% (10/50) では H3/H4 テトラマーはどの DNA にも結合しないままであった。新生鎖へのリサイクルが観察されたトラジェクトリのうち、38% (14/37) は Cdc45 を経由する経路、62% (23/37) は Cdc45 を経由しない経路であった。Cdc45 を経由する経路において、H3/H4 テトラマーは 79% (11/14) の割合でリーディング鎖にリサイクルされた（Figure 45F）。一方で Cdc45 を経由しない経路において、H3/H4 テトラマーは 91% (21/23) の割合でラギング鎖にリサイクルされた（Figure 45F）。このように、経路ごとの鎖バイアスは Pol ϵ が CMG に結合している時の結果と同様であった（Figure 45F）。したがって Pol ϵ によるリーディング鎖の方向固定は鎖バイアスに影響しないことが示された。

Pol ϵ によるリーディング鎖の運動範囲の変化が H3/H4 テトラマーのリサイクル位置に与える影響を調べるために、フォークジャンクションからリサイクル後のテトラソームのダイアドの位置までの配列距離を計算した。Pol ϵ 非存在下においてラギング鎖の配列距離は 40 ± 11 bp であり、Pol ϵ 存在下の距離（ 43 ± 15 bp）とほとんど変わらなかった（Figure 45G）。その一方でリーディング鎖の配列距離は 78 ± 13 bp であり、Pol ϵ 存在下よりも 33 bp 下流にシフトしていた（Figure 45G）。Pol ϵ の結合はリーディング鎖の方向を固定するだけでなく、リーディング鎖の一本鎖 DNA 領域を引き伸ばしている（Figure 45A）。これによってリーディング鎖の一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の境界（ssDNA-dsDNA ジャンクション）の空間配置が Pol ϵ によって変更される。実際に、ssDNA-dsDNA ジャンク

ジョンから Cdc45 までの距離を測定すると、Pol ϵ 存在下では $202 \pm 18 \text{\AA}$ 、Pol ϵ 非存在下では $129 \pm 26 \text{\AA}$ であった (Figure 45H & I)。Pol ϵ 存在下と比較すると、Pol ϵ 非存在下において H3/H4 テトラマーは ssDNA-dsDNA ジャンクションに近い位置のリーディング鎖 DNA 領域に結合していた (Figure 45G-I)。以上のことから Pol ϵ はリーディング鎖の空間配置を変更することによって H3/H4 テトラマーのリサイクル位置を制御することが示された。

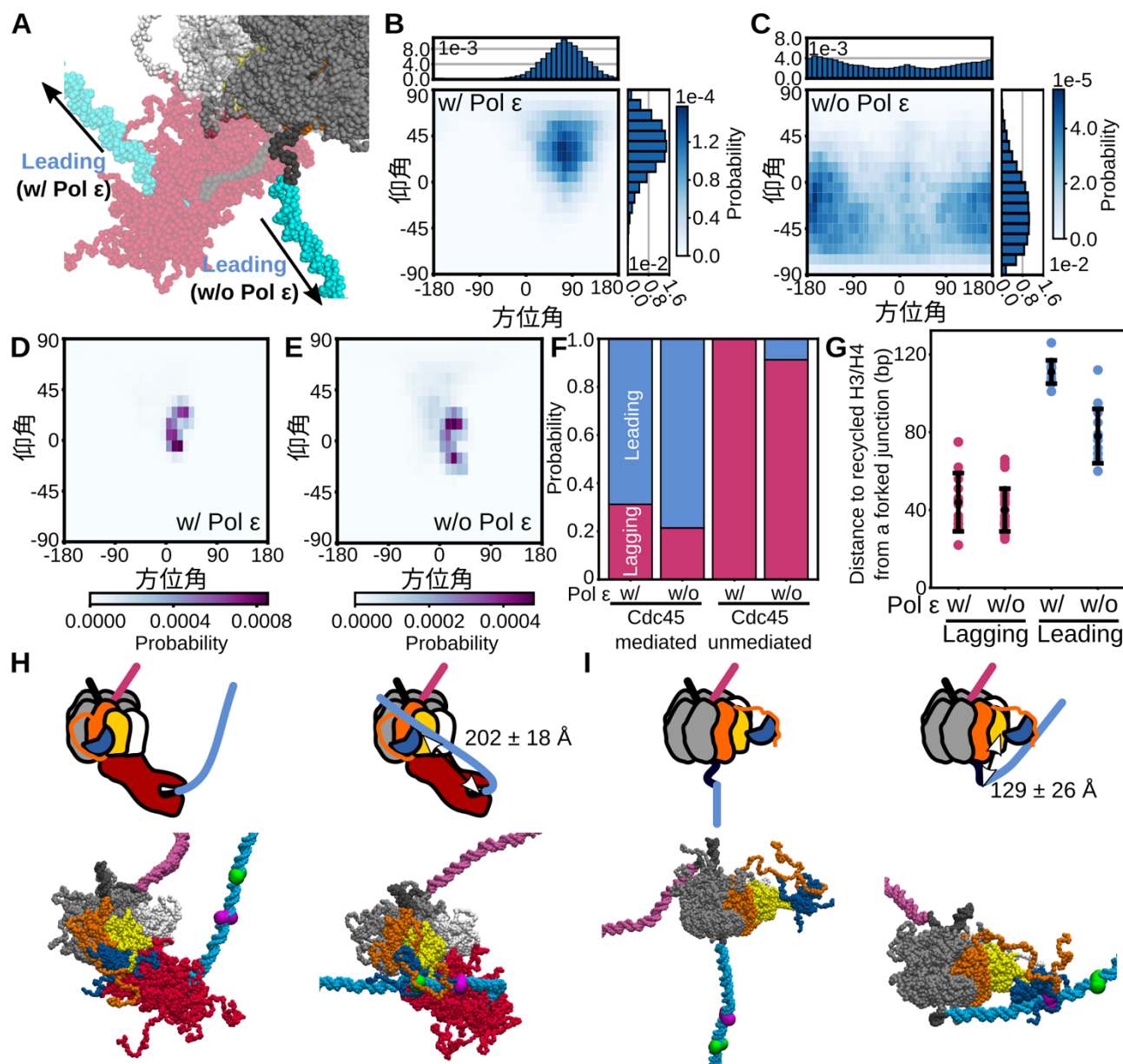


Figure 45: Pol ϵ がない条件での H3/H4 テトラマーリサイクルシミュレーション。(A) Pol ϵ がある条件 (半透明) とない条件 (不透明) のレプリソーム粗視化構造。(B&C) Pol ϵ がある条件 (B) とない条件 (C) でのリーディング鎖の方向ベクトルの角度分布。(D) H3/H4 テトラマーがラギング鎖、リーディング鎖にリサイクルされた割合。(E&F) Pol ϵ がある条件 (E) とない条件 (F) での H3/H4 テトラマーの方向ベクトルの角度分布。(G) H3/H4 テトラマーのリサイクル位置。(H&I) Pol ϵ がある条件 (H) とない条件 (I) におけるレプリソームの初期構造 (左) とリサイクルの瞬間の代表構造 (右)。リーディング鎖上の紫と緑の球は、それぞれフォークジャンクションから 78、111 bp の位置にある塩基対を示す。

考察

本研究では出芽酵母のレプリソーム (Mcm2-7, Cdc45, GINS, Pol ϵ , RPA) の粗視化モデルを構築して、分子動力学シミュレーションを用いて複製フォークにおけるヒストン H3/H4 テトラマーのリサイクル過程を可視化した。レプリソームのサブユニットである Mcm2 の N 末端テールは、H3/H4 テトラマーとの結合ドメインを持ち、直接 H3/H4 テトラマーを新生鎖にリサイクルした。実際に DNA 複製の試験管内再構成系を用いたヌクレオソームの複製実験によって、ヒストンシャペロンの非存在下であってもレプリソーム単独でヒストンリサイクリングを起こすことを検証した。またシミュレーション結果から、ヒストンリサイクリングには Cdc45 と H3/H4 テトラマーの結合を経由する経路と経由しない経路の 2 つがあることを発見した。Cdc45 を経由する経路でのリサイクルはリーディング鎖バイアスを示し、Cdc45 を経由しない経路でのリサイクルはラギング鎖バイアスを示した。さらにラギング鎖の一本鎖 DNA 上への RPA の集積が、Cdc45 との結合を経由しないリサイクル経路においてラギング鎖へのリサイクルを阻害することを発見した。そして Pol ϵ のリーディング鎖への結合は鎖バイアスに影響を示さない一方で、H3/H4 テトラマーのリーディング鎖上へのリサイクル位置を上流側にシフトさせることが示された。

本研究の粗視化モデルにおいて、静電相互作用を介した Cdc45 と H3/H4 テトラマーとの結合がリーディング鎖へのリサイクルに寄与していることを新たに発見した。シミュレーションとゲルシフトアッセイ実験の両方で Cdc45 と H3/H4 テトラマーの安定な複合体形成を実証した。先行研究により、Cdc45 の酸性ループ領域のチロシン残基 (T189 と T195) は S 期のチェックポイントに関わるキナーゼ Rad53 によってリン酸化されることが示されている¹¹⁶。酸性ループへのリン酸化は Cdc45 の正味電荷を負に傾けることで H3/H4 テトラマーとの相互作用の安定化に寄与すると予想される。一方で S 期チェックポイント活性化によって Rad53 がリン酸化のために Cdc45 にリクルートされると、H3/H4 テトラマーとの相互作用が排除される可能性も考えられる。将来的に、Cdc45 の酸性ループへの変異体を使って H3/H4 テトラマーとの相互作用を変更し、eSPAN や SCAR-seq、第 4 章の Repli-pore-seq などのシーケンシング実験によってリサイクルの鎖バイアスを測定できれば、本研究で発見・示唆したヒストンリサイクリングの分子機構が実証できると考えられる。

本研究では粗視化分子モデル間に静電相互作用と排除体積相互作用が適用されており、水素結合相互作用や疎水性相互作用などのタンパク質間相互作用を無視している。先行研究により H3/H4 テトラマーと RPA の複合体形成が観察されており¹²¹、これは本研究のシミュレーション系では観察されていない。将来的に X 線結晶構造解析や Cryo-EM などによって RPA と H3/H4 テトラマーとの間の複合体構造が同定されて、RPA と H3/H4 テトラマー間の相互作用をモデリングできれば、シミュレーションの精度を向上して新たなヒストンリサイクリング経路を観察できる可能性がある。

Xenopus laevis の卵抽出液のレプリソームを用いた一分子蛍光顕微鏡実験¹²²より、ヒストンリサイクリングの効率が溶液中に遊離している新生ヒストンの濃度に依存することが示されている。このことは親ヒストンと新生ヒストンがリサイクル経路を共有・競合していることを示している。本研究では H3/H4 テトラマーがすでに Mcm2 に結合しており、親 DNA 鎖から解離している状態からシ

ミュレーションが開始されている。シミュレーションにおいては親ヒストンと新生ヒストンが区別されていないため、親ヒストンと新生ヒストンが本研究で発見した経路を共有する可能性が示唆される。

先行研究より、転写抑制領域においては親ヒストンが効率よく密に新生鎖にリサイクルされる一方で、転写活性領域においてはその効率が低く、新生鎖上に分散してリサイクルされることが示されている¹²³。また別の研究で、親ヒストンが空間的に近接する位置にある DNA に自由拡散によってリサイクルされるという仮説を立て、この自由拡散が転写活性領域での親ヒストンの分散を説明することが示されている¹²⁴。本研究のシミュレーションにおいて、Mcm2 の N 末端テールと結合した H3/H4 テトラマーや新生鎖が空間的に近接した位置まで互いに拡散することによってリサイクルが起こることが示された。したがって本研究で観察したリサイクル経路は上述の自由拡散モデルの仮説を支持している。また一分子蛍光顕微鏡を用いた先行研究¹²⁵より、DNA がループを形成することによって、DNA の持続長を超えた位置であってもヌクレオソームの拡散がおこなうことが実証されている。これらのことから、本研究で観察されたリサイクル経路は転写活性領域での親ヒストンの分散に寄与している可能性が示唆される。

本研究では、シミュレーション系と実験系の両方においてヒストンシャペロンが含まれておらず、レプリソーム単体でヒストンを新生鎖にリサイクルすることを示した。一方で本研究のシミュレーションにおいて、新生鎖へのヒストンリサイクリングのほかに親 DNA への再結合を示すトラジェクトリも観察された。一度 H3/H4 テトラマーが DNA に結合すると、シミュレーション中で H3/H4 テトラマーの DNA からの解離は観察されなかった。したがってヒストンリサイクリングを効率よく実現するためには、Mcm2 のように直接新生鎖への結合を担う分子の他に、親 DNA からの H3/H4 テトラマーの解離を促進する分子も必要であることが示唆された。DNA 複製の試験管内再構成系を用いた先行研究において、ヌクレオソームが密に形成されている場合には、ヒストンシャペロン FACT が DNA 複製に必要不可欠であることが示された¹¹⁸。さらに別の先行研究によって S 期の出芽酵母から精製したレプリソームの Cryo-EM 構造が解かれており、FACT がレプリソームの前方でヒストンヘキサマー (H3/H4 テトラマー + H2A/H2B ダイマー) を親 DNA から解離させることが示唆された⁹⁵。以上から、FACT はヒストンの親 DNA への再結合を阻害することでリサイクル効率を上げるはたらきがあることが示唆された。

SCAR-seq⁹¹ や eSPAN⁹² といったディープシーケンシング技術を用いた先行研究から、細胞内環境において Mcm2 の N 末端テールがヒストンのラギング鎖へのリサイクルに寄与していることが示された。粗視化分子動力学シミュレーションによって、Mcm2 の N 末端テールが H3/H4 テトラマーを直接ラギング鎖にリサイクルする過程を可視化することに成功した。しかし本研究において、Cdc45 を経由する経路では Mcm2 の N 末端テールは主にリーディング鎖に H3/H4 テトラマーをリサイクルすることを示した。このことから、本研究のシミュレーション系に含まれていない他の因子が、Cdc45 を経由する経路の鎖バイアスを変更したり、Cdc45 を経由する経路としない経路のバランスを制御したりする可能性が示唆される。近年の SCAR-seq や eSPAN を用いた研究によってヒストンリサイ

クリングに寄与する因子が複数同定されており、Ctf4⁹²、Pol α ^{92,93}、Pol 32^{93,94} (Pol δ サブユニット)、PCNA⁹⁴、Tof1⁹⁵、Mrc1^{96,97}、FACT^{98,99} がラギング鎖へのリサイクルに、Dpb3/4 (Pol ϵ)⁹⁰ がリーディング鎖へのリサイクルを制御することが示されている。将来的に本研究の系に欠けているサブユニットを加えることによって、Mcm2 や Cdc45 によるリサイクル経路との関係性を明らかにして、ヒストンリサイクリングのより詳細な分子機構をボトムアップ的に解明することが期待される。

第4章:Repli-pore-seq による対称的なヒストンリサイクリングの最小構成要素の同定

序論

第3章の序論ですでに述べたように、細胞集団のディープシーケンシング実験によってヒストンリサイクリングの対称性に寄与するタンパク質が複数同定されている⁹⁰⁻¹⁰⁰。細胞内にはクロマチンリモデラー、ヒストン修飾酵素、転写装置などのDNAトランスロケースのような、DNA複製非依存的にヌクレオソームの状態を変化させうる因子が含まれている^{17,43,126,127}。したがって従来のディープシーケンシング実験では、レプリソームがリサイクルしたヒストンだけを解析することは困難であった。

一方で第3章ではDNA複製に必要なCMGとPol ϵ 、RPAのみをシミュレーション系に加えてヒストンリサイクリング経路の可視化を行ったが、これだけではクロマチンDNAの複製には不十分であることが知られている。さらにシミュレーションはMcm2とCdc45によるヒストンリサイクリングの経路を明らかにしたが、上述のように実際のヒストンリサイクリングにおいてはDpb3/4やFACT、Mrc1などの複数のタンパク質によるヒストンリサイクリング経路が加算的に機能してリサイクルの対称性が実現していると考えられている^{96,97,99}。したがってヒストンリサイクリングの分子機構を明らかにするためには、まず対称的なヒストンリサイクリングの最小構成要素を同定する必要がある。

本研究ではまず精製した複製タンパク質とヒストンを用いてヒストンリサイクリングを試験管内で再構成した。そしてナノポアシーケンサーを用いたディープシーケンシングと深層学習による分類モデルを組み合わせて、新生鎖にリサイクルされたヒストンの配置、対称性を解析する手法、「Repli-pore-seq」を開発した。この解析手法と30種類以上の精製タンパク質を用いて、対称的なヒストンリサイクリングを試験管内で再現することに成功した。Repli-pore-seqの結果から、ヒストンリサイクリングの過程で、ヒストンはヘキサソームやテトラソームとして新生鎖にリサイクルされることが示された。またリーディング鎖とラギング鎖は同一のDNA配列であるにも関わらず、GCリッチな領域においてリーディング鎖とラギング鎖の間でヒストン配置にズレが見られた。さらにラギング鎖成熟に必要な因子であるFen1/Cdc9はヒストンリサイクリングの対称性に影響を与えないことを示した。そしてPol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1は新生鎖へのヌクレオソーム形成には必要ではない一方で、Pol δ はヒストンリサイクリングの対称性に、Ctf4とCsm3/Tof1はリサイクル後のヒストン配置に寄与していることが示された。

方法

使用したDNA、タンパク質

実験で用いたDNAやタンパク質の精製は、国立遺伝学研究所の村山泰斗准教授と同研究室の遠藤静子技術補佐員が担当した。全ての生化学実験において4.1-kbpのプラスミドDNA(pARS-4.1)を用いた。このプラスミドは出芽酵母の複製開始点認識配列(ARS1)をもつ。4種類のヒストン(H3, H4, H2A, H2B)と25種類の複製タンパク質(ORC, Cdc6, Mcm2-7/Cdt1, DDK, S-CDK, Sld2, Sld3/7,

Dpb11, Cdc45, GINS, PCNA, RFC, Mcm10, RPA, DNA polymerase α , DNA polymerase δ , DNA polymerase ϵ , Ctf4, Csm3/Tof1, Mrc1, and Fen1/Cdc9)、そしてヒストンシャペロン FACT, Nap1 とクロマチンリモデラー ISW1a はすでに確立された手法によって精製された¹¹⁴。

In vitro クロマチン複製実験

クロマチン複製実験は、国立遺伝学研究所の村山泰斗准教授と同研究室の遠藤静子さんが担当した。まず 4 nM の pARS-4.1 プラスミド DNA と 17.3 nM の ISW1a、3 μ M の Nap1 と 5 mM ATP を混合して 10 分間氷上で静置した。その後 MicroSpin S-400 HR Column (Cytiva) を用いて脱塩、溶液中に遊離しているヒストンの除去を行なってヌクレオソーム再構成を完了した。この処理により、再構成溶液は次の反応のために MCM ローディングバッファー[25 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM KOAc, 1 mM DTT, 5 mM ATP, 7.5 mM Mg(OAc)₂, 5% glycerol, 0.01% (w/v) NP-40, and 0.1 mg/mL BSA]に交換された。この反応液に 20 nM ORC, 50 nM Cdc6, 60 nM Mcm2-7/Cdt1 を加えた後、30°C で 15 分間静置して、DDK を終濃度 40 nM になるように加えてさらに 30°C で 15 分間静置した。反応液を複製反応バッファー[25 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM KOAc, 1 mM DTT, 5 mM ATP, 7.5 mM Mg(OAc)₂, 5% glycerol, 0.01% (w/v) NP-40, 0.1 mg/mL BSA, 0.1 mM CTP, 0.1 mM GTP, 0.1 mM TTP, 40 μ M dATP, 40 μ M dCTP, 40 μ M dGTP, 25 μ M dTTP, and 15 μ M biotin-dUTP]で 3 倍希釈した。さらに終濃度 5 nM の S-CDK, 30 nM Sld2, 20 nM Sld3/7, 30 nM Dpb11, 40 nM Cdc45, 12.5 nM GINS, 20 nM Csm3/Tof1, 20 nM Ctf4, 10 nM Mrc1, 20 nM RFC, 20 nM PCNA, 100 nM RPA, 5 nM Pol α , 10 nM Pol δ , 20 nM Pol ϵ , 40 nM FACT, 200 nM Nhp6A, 5 nM Mcm10 を反応液に加えて複製反応を開始した。反応は 30°C で 20 分間行った。反応完了後、NaCl と CaCl₂ をそれぞれ終濃度が 50 mM、2 mM になるように反応液に加えたあと、マイクロコッカスヌクレアーゼ (MNase) を終濃度 1 U/ μ L になるように加えて 30°C で 30 分間静置し、DNA 消化反応を行った。DNA 消化反応の終結のため、EDTA を 15 mM、SDS を 0.1 (w/v) %、プロテアーゼ K を 0.5 mg/mL になるように反応液に加えて 37°C で 20 分間反応させた。

MNase による DNA 消化反応後の DNA は非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した。反応液に 1/5 量のゲルローディング色素[15% (w/v) ficol, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 0.05% orange G]を加えて 7.5%ポリアクリルアミドゲルにローディングした。泳動バッファーは EzRun TG buffer (ATTO) を用いて、室温で、21mA の定電流条件下で 65 分間泳動した。泳動後のゲルを 0.5 $\times$ TBE バッファー中で 5 分間静置してから、Zeta-Probe メンブレン(Bio-Rad) に 80V の定電圧、4°C で、50 分間転写した。UV イルミネーターによってメンブレン上にビオチン化された DNA をクロスリンクして、Blocking solution (Cytiva) 中で、室温で、20 分間静置した。メンブレン上のビオチン付き DNA に、Dylight680 を共役したストレプトアビジンを加えて 30 分間静置した。メンブレンを TBS-T バッファー[TBS, 0.1% (w/v) Tween 20 and 0.01% (w/v) SDS]で 3 回洗浄してから、ChemiDoc Touch imager (Bio-Rad) によって可視化した。

MNase による DNA 消化反応前の DNA はアルカリ変性アガロースゲル電気泳動によって解析した。反応液に 1/5 量のゲルローディングバッファー[0.3 M NaOH, 6 mM EDTA, 36% (w/v) Glycerol, 0.25% (w/v) orange G, 50 mM EDTA]を加えて、0.8%アガロースゲルにローディングした。変性条件

[50 mM NaOH, 1 mM EDTA]かつ 3.6 V/cm の定電圧条件下において 4°C で 2 時間電気泳動した。泳動後のゲルを 0.5 × TBE バッファー中で 10 分間静置してから、DNA をナイロンメンブレン (Hybond-N+, Cytiva) に 80V の定電圧、4°C で、50 分間転写した。メンブレン上のビオチン化された DNA は上述の方法でクロスリンクして可視化した。

ナノポアシーケンシング実験

ナノポアシーケンシング実験は著者が担当した。NEBNext® Companion Module for Oxford Nanopore Technologies® Ligation Sequencing (New England Biolabs) を用いて、MNase 反応後の DNA 断片の修復、5'末端のリン酸化、3'末端へのアデニン付加処理を施した。さらに Ligation Sequencing Kit V14 (SQK-LSK 114, Oxford Nanopore Technologies®) を用いて、末端処理後の DNA にシーケンシングのアダプタータンパク質を連結し、ライブラリーの調製を行った。MinION R10.4.1 フローセル (FLO-MIN114, Oxford Nanopore Technologies®) にライブラリーをローディングして電流値を測定した。得られた電流値の DNA 塩基配列への翻訳には Guppy ベースコーラー (Oxford Nanopore Technologies®) を用いた。

新生鎖分類の深層学習モデル構築

新生鎖 DNA を分類する深層学習モデルの構築は著者が担当した。上述のクロマチン複製実験において、新生鎖には biotin-dUTP が取り込まれる。この biotin-dUTP の取り込まれた DNA を深層学習モデルによって分類した。学習データ構築のための DNA 断片は、pARS-4.1 プラスミドをテンプレートとして用いた PCR によって合成した。プライマーは、5'-CCATTGTCTCCACACCTCC-3' と 5'-CCATTGTCTCCACACCTCC-3' の 2 つを用いた。DNA 断片にビオチン化された塩基を取り込ませるために、200 μM の dGTP, dCTP, dATP と 100 μM の dTTP, biotin-dUTP を含む反応液で PCR を実行した。非ビオチン化 DNA の合成のため、200 μM の dGTP, dCTP, dATP, dTTP を含む反応液で PCR を実行した。

PCR で合成した非ビオチン化 DNA とビオチン化 DNA に対してナノポアシーケンシングを実行して、得られた電流値シグナルを学習データ構築に用いた。DNA のナノポアへの 1 塩基ずつの取り込みに対応して、電流値シグナルは階段状に変化する (Figure 46A)。この階段状の変化に基づいてシグナルを断片化した (Figure 46A)。それぞれの断片をイベントと呼び、各イベントは断片化されたシグナルの平均値、標準偏差、持続時間をもつ。イベント列のサイズが 600 を超える場合、600 の連続したイベント列をランダムに抜き出した。一方でイベント列のサイズが 600 を下回る場合、イベントサイズが 600 になるようにパディングを施した。このパディング値は後述の学習時に無視される。このようにして電流値の時系列データを 3 × 600 のイベントの列に変換した。非ビオチン化 DNA のイベント列を 0、ビオチン化 DNA のイベント列を 1 とラベリングした。非ビオチン化 DNA とビオチン化 DNA のイベント列をそれぞれ 538705 個ずつ生成して合わせてデータセットとして用いた。全 1077410 個のイベント列から、非ビオチン化 DNA とビオチン化 DNA 由来のイベント列をそれぞれ等確率で無作為に 969669 個取り出して学習データとして、残りをテストデータとした。

3 × 600 のイベント列はまず Depthwise convolution (DSC) 層、Pointwise-convolutional (PSC) 層、Batch normalization (BN) 層、ReLU activation (ReLU) 層に入力された (Figure 46B)。この出力は 8 列の残差ブロックに LSTM を接続したネットワークに入力された (Figure 46B)。各残差ブロックにおいて、まず 1 セットの DSC-PSC-BN 層に値が入力された (Figure 46B)。この DSC-PSC-BN 層の出力値は、これを 4 セットの DSC-PSC-BN-ReLU 層に入力した場合の出力値と連結することによって残差ネットワークを構築した (Figure 46B)。8 列の残差ブロックの出力値は 128 の隠れ層をもつ LSTM ネットワークに入力された後、平滑化、全結合されて、シグモイド関数による活性化を経てスカラー値に変換された (Figure 46B & C)。学習モデルの予測値と正解値との損失を計算するためにクロスエントロピーを用いた。パラメータ最適化アルゴリズムとして Adam[学習率 0.001、エポック数 1000、バッチサイズ 1024]を用いた。学習モデルの出力は 0 から 1 の間の浮動小数点数であり、出力値が 0.5 を下回る場合には非ビオチン化 DNA、0.5 以上の場合はビオチン化 DNA とした。

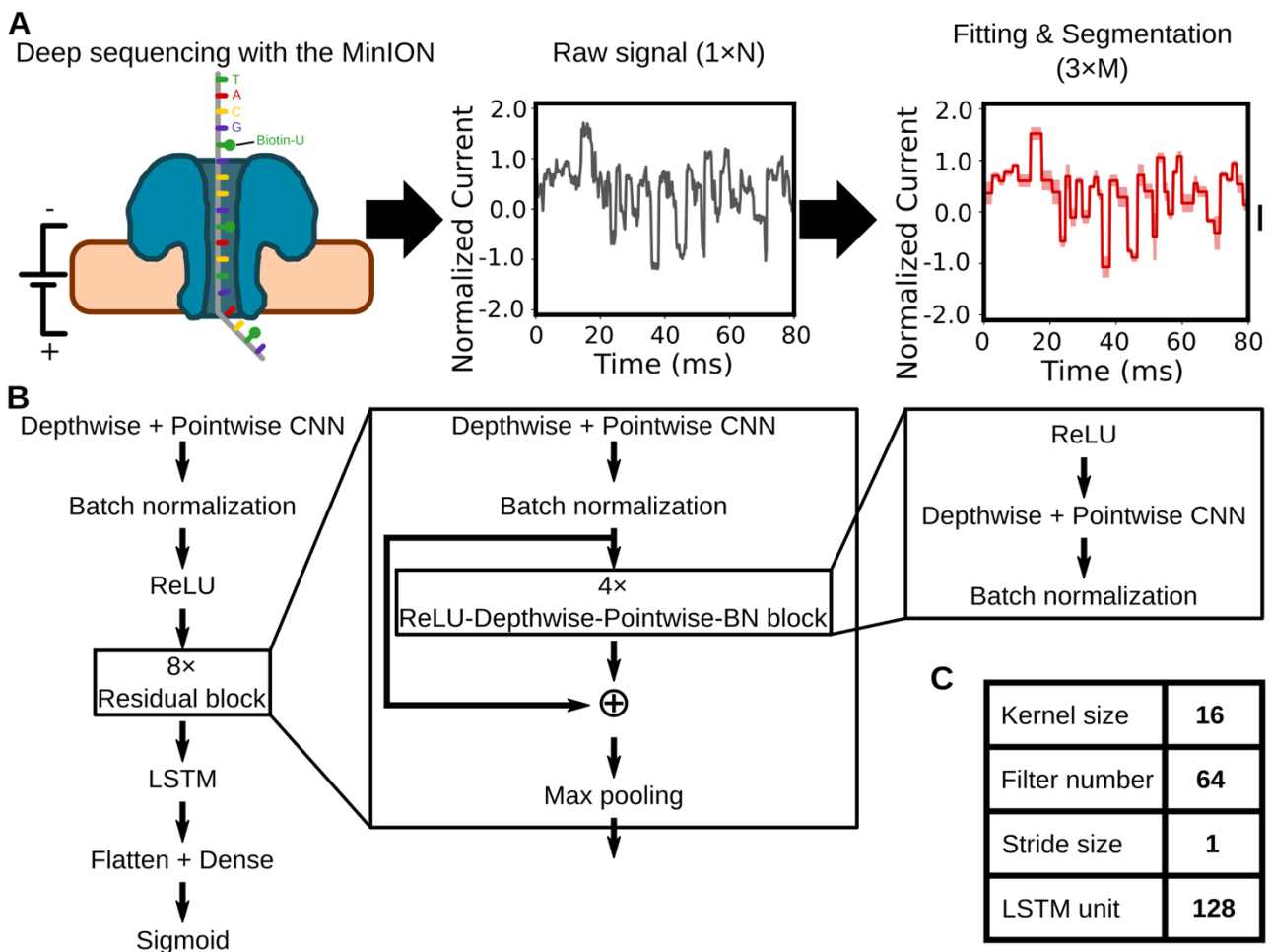


Figure 46: 新生鎖 (ビオチン化 DNA) の分類のための深層学習モデル。(A) 学習・分類のためのデータセット構築。Oxford Nanopore Technologies の MinION によるシーケンシングの概念図 (左) と、代表的な測定データ (中央)、フィッティングデータ (右)。赤実線は各イベントにおける平均電流値、ピンク色はその標準偏差を示す。(B) 深層学習モデルのアーキテクチャ。(C) 深層学習モデルのパラメータ。Kernel size、Filter number、Stride size は全 CNN レイヤーのパラメータ、LSTM unit は LSTM の隠れ層の数。

分類器のバイアス補正

分類器は一定の割合で非ビオチン化 DNA をビオチン化されているものとして誤検出する。したがって Mcm10+ の反応条件でビオチン化されたものとして判定されたリードは、「真にビオチン化された」リードと「実際にはビオチン化されていないが誤分類された」リードの混合である。したがって「真にビオチン化された」リードのアンサンブルを得るためには、ビオチン化 DNA として判定されたリードのアンサンブルから誤分類のリードの寄与を除いて補正する必要がある。

まず一回のシーケンシング実験によって得られた全てのリード数を N 、分類器によってビオチン化 DNA として判定されたリードを $N_{Positive}$ 、非ビオチン化 DNA として判定されたリードを $N_{Negative}$ 、誤分類されたリードを $N_{False-Positive}$ 、ビオチン化されたリードの真の数を $N_{Biotinylated}$ 、非ビオチン化リードの真の数を $N_{Unbiotinylated}$ と定義すると、次の式が成立する。

$$N = N_{Positive} + N_{Negative}$$

$$N = N_{Biotinylated} + N_{Unbiotinylated}$$

$$N_{Positive} = N_{Biotinylated} + N_{False-Positive}$$

全リードのうち、分類器によってビオチン化 DNA として判定される割合を $r_{Positive}$ と定義すると、次の式が成立する。このとき $r_{False-Positive}$ 、 $r_{Biotinylated}$ をそれぞれ誤分類されたリードの割合とビオチン化されたリードの真の割合として定義する。

$$r_{positive} = \frac{N_{Positive}}{N} = \frac{N_{Biotinylated}}{N} + \frac{N_{False-Positive}}{N} = r_{Biotinylated} + r_{False-Positive} \quad (1)$$

$$r_{Biotinylated} = \frac{N_{Biotinylated}}{N}, r_{False-Positive} = \frac{N_{False-Positive}}{N} \quad (2)$$

一方で分類器が非ビオチン化リードを一定の割合 α で誤分類するとき、 $r_{False-Positive}$ は次の式を満たす。

$$r_{False-Positive} = \alpha \frac{N_{Unbiotinylated}}{N} = \alpha r_{Unbiotinylated} \quad (3)$$

$$r_{Unbiotinylated} = \frac{N_{Unbiotinylated}}{N} = \frac{N - N_{Biotinylated}}{N} = 1 - r_{Biotinylated} \quad (4)$$

式 1-4 から次の関係性が成立する。

$$r_{\text{positive}} = r_{\text{Biotinylated}} + \alpha(1 - r_{\text{Biotinylated}})$$

$$r_{\text{Biotinylated}} = \frac{r_{\text{positive}} - \alpha}{1 - \alpha} \quad (5)$$

とくに、Mcm10 が存在しない反応条件では DNA 合成に依存したビオチンの取り込みが起こらないため、この条件における $r_{\text{Biotinylated}}$ は 0 である。式 1、3、4 から、次の関係が成り立つ。

$$\alpha = r_{-, \text{False-Positive}} = r_{-, \text{Positive}}$$

このとき $r_{-, \text{False-Positive}}$ と $r_{-, \text{Positive}}$ はそれぞれ Mcm10 が存在しない条件での誤分類リードの割合とビオチン化 DNA と判定されたリードの割合である。したがって誤分類割合 α は、Mcm10- の条件で得られたリードのうち分類器によってビオチン化されたものとして判定される割合 $r_{-, \text{Positive}}$ として得られる。

次に「真にビオチン化された」リードのアンサンブルを推定した。本研究では得られたリードに基づいて、リード長（ヌクレオソームフットプリントのサイズ）やリードの midpoint（ヌクレオソームの配置）の確率分布を得た。確率変数を X としたときに、ビオチン化 DNA として判定されたリードから得られる確率分布を P_{Positive} 、「真にビオチン化された」リードから得られる分布を $P_{\text{Biotinylated}}$ 、誤分類リードから得られる分布を β と定義する。ある確率変数 $X = x$ において、ビオチン化 DNA として判定されたリードの数、「真にビオチン化された」リードの数、誤分類リードの数をそれぞれ $n_{\text{Positive}}(x)$ 、 $n_{\text{Biotinylated}}(x)$ 、 $b(x)$ とすると、次の関係が成立する。

$$n_{\text{Positive}}(x) = n_{\text{Biotinylated}}(x) + b(x) \quad (6)$$

$$n_{\text{Positive}}(x) = N_{\text{positive}} P_{\text{Positive}}(x) \quad (7)$$

$$n_{\text{Biotinylated}}(x) = N_{\text{Biotinylated}} P_{\text{Biotinylated}}(x) \quad (8)$$

$$b(x) = N_{\text{False-positive}} \beta(x) \quad (9)$$

式 1-4, 6-9 より次の関係式が成立する。

$$N_{\text{Positive}} P_{\text{Positive}}(x) = N_{\text{Biotinylated}} P_{\text{Biotinylated}}(x) + N_{\text{False-Positive}} \beta(x)$$

$$\frac{N_{\text{Positive}}}{N} P_{\text{Positive}}(x) = \frac{N_{\text{Biotinylated}}}{N} P_{\text{Biotinylated}}(x) + \frac{N_{\text{False-Positive}}}{N} \beta(x)$$

$$\begin{aligned}
r_{\text{Positive}}P_{\text{Positive}}(x) &= r_{\text{Biotinylated}}P_{\text{Biotinylated}}(x) + r_{\text{False-Positive}}\beta(x) \\
&= r_{\text{Biotinylated}}P_{\text{Biotinylated}}(x) + \alpha r_{\text{Unbiotinylated}}\beta(x) \\
&= r_{\text{Biotinylated}}P_{\text{Biotinylated}}(x) + \alpha(1 - r_{\text{Biotinylated}})\beta(x)
\end{aligned} \tag{10}$$

$$P_{\text{Biotinylated}}(x) = \frac{r_{\text{positive}}}{r_{\text{Biotinylated}}}P_{\text{Positive}}(x) - \frac{\alpha(1 - r_{\text{Biotinylated}})}{r_{\text{Biotinylated}}}\beta(x) \tag{11}$$

したがって式 5, 11 より、次の式が得られた。

$$\begin{aligned}
P_{\text{Biotinylated}}(x) &= \frac{r_{\text{Positive}}(1 - \alpha)}{r_{\text{Positive}} - \alpha}P_{\text{Positive}}(x) + \frac{\alpha(r_{\text{Positive}} - 1)}{r_{\text{Positive}} - \alpha}\beta(x) \\
&= AP_{\text{Positive}}(x) + (1 - A)\beta(x)
\end{aligned} \tag{12}$$

$$A = \frac{r_{\text{Positive}}(1 - \alpha)}{r_{\text{Positive}} - \alpha} \tag{13}$$

上述の通り、Mcm10 が存在しない反応条件では $r_{-, \text{Biotinylated}} = 0$ と $r_{-, \text{Positive}} = \alpha$ が成り立つ。式 10 より次の関係式が成立する。

$$r_{-, \text{Positive}}P_{-, \text{Positive}}(x) = \alpha P_{-, \text{Positive}}(x) = \alpha\beta(x)$$

$$\beta(x) = P_{-, \text{Positive}}(x)$$

したがって $\beta(x)$ は Mcm10- の条件で、分類器によってビオチン化 DNA と判定されたリードの確率分布 $P_{-, \text{Positive}}(x)$ に対応する。そして α は Mcm10- の条件でビオチン化 DNA として判定されたリードの割合である。以上のことから、Mcm10- と Mcm10+ の条件で測定・分類したリードの情報だけを用いて、関係式 12 と 13 に従い「真にビオチン化された」リードのアンサンブルを推定した。

DNA 配列依存的なヌクレオソームランドスケープの予測

pARS1-4.1 プラスミド上でのヌクレオソーム形成位置の予測は著者が担当した。このプラスミド DNA 上にヌクレオソームを形成する際の自由エネルギーは、第 1 章のヌクレオソーム形成の自由エネルギーランドスケープ計算と同じアルゴリズム、パラメータを用いて行なった。

G-quadruplex 形成位置予測

pARS1-4.1 プラスミド上での G-quadruplex 形成位置 (PQS) の予測は著者が担当した。参照配列上での PQS は pqsfinder によって予測した。予測アルゴリズムのパラメータは、各 PQS サイトでのスコア関数の値と G4-seq のシグナル値との相関が最大化するように遺伝的アルゴリズムを用いて最適化された。

結果

ヒストンリサイクリングの試験管内再構成

ヒストンリサイクリングを試験管内で再現するために、プラスミド DNA 上にヌクレオソームを再構成して、複製タンパク質 (ORC, Cdc6, Mcm2-7/Cdt1, DDK, S-CDK, Sld2, Sld3/7, Dpb11, Cdc45, GINS, PCNA, RFC, Mcm10, RPA, DNA polymerase α , DNA polymerase δ , DNA polymerase ϵ , Ctf4, Csm3/Tof1, Mrc1) とヒストンシャペロン FACT を用いて DNA 複製反応を行った (Figure 47A)。4183 bp のプラスミド DNA に、精製したヒストン (H3, H4, H2A, H2B)、ヒストンシャペロン Nap1、クロマチンリモデラー ISW1a を混合して、DNA 上に密にヌクレオソームを再構成させた (Figure 47A)。再構成したヌクレオソームをゲル濾過・脱塩カラムによって精製したあと、ORC、Cdc6、Mcm2-7/Cdt1 を加えて DNA 複製のヘリカーゼである Mcm2-7 を DNA 上にローディングした (Figure 47A)。その後、DDK、S-CDK、Sld2、Sld3/7、Dpb11、Cdc45、GINS、PCNA、RFC、Mcm10、RPA、DNA polymerase α 、DNA polymerase δ 、DNA polymerase ϵ 、Ctf4、Csm3/Tof1、Mrc1 と FACT を反応液に加えて複製反応を開始した (Figure 47A)。新生鎖 DNA を標識するために、反応液にはヌクレオチドアナログである Biotin-dUTP を加えた (Figure 47A)。Biotin-dUTP はチミンの代わりに確率的に新たに合成された DNA に取り込まれる。30°C 20 分間反応させ、複製産物を塩基性条件で一本鎖 DNA に変性させてゲル電気泳動を行った (Figure 47A)。リーディング鎖がプラスミド DNA の半分の長さ (2 kb) まで合成されていることから、DNA 合成が完了していると考えられる (Figure 47B & C)。しかし FACT を系から除いて複製反応を行うと DNA 合成はほとんど観察されなかった (Figure 47B & C)。これは先行研究¹¹⁸の結果と一貫しており、FACT が本研究の実験系においてクロマチン複製に必須であると考えられる。

ヌクレオソーム再構成後に溶媒中に遊離ヒストンが含まれていないことを確かめるために、ゲル濾過処理後の溶出を SDS-PAGE によって解析した。再構成反応時に DNA が含まれている条件では、溶出にヒストンが含まれていたが、DNA が含まれていない条件ではヒストンが溶出中にほとんど出現しなかった (Figure 47D, レーン 5 & 7)。このことからゲル濾過処理によって溶媒中の遊離ヒストンはほとんど除去されたと考えられる。

ヌクレオソーム再構成の手法として、上述の Nap1 と ISW1a の酵素活性を用いる手法と、バッファーを高塩濃度から低塩濃度に透析して再構成する手法 (塩透析法) の 2 種類がある。先行研究より、Nap1 と ISW1a を用いて再構成した場合は等間隔かつ均一にヌクレオソームが形成されるが、塩透析法で再構成した場合は不規則にヌクレオソームが形成されることが知られている¹²⁸⁻¹³⁰。ヌクレオソームの初期配置がクロマチン複製の効率に与える影響を調べるために、塩透析法によって再構成したヌクレオソームを用いてクロマチン複製実験を行った。プラスミド DNA とヒストンを等モル比で混合して再構成した場合には DNA 複製の完了が観察された (Figure 47E)。しかしプラスミド DNA に対して 2 倍量のヒストンを混合して再構成した場合、DNA 複製はほとんど観察されなかった (Figure 47E)。Nap1 と ISW1a を用いて再構成した場合はプラスミド DNA に対して 100 倍量のヒストンを混合しており、密にヌクレオソームを形成させている。このことからヒストンリサイクリングを効率よく観測するためには塩透析法よりも Nap1 と ISW1a で再構成させたヌクレオソームの

方が適していると考えられる。以降、クロマチン化 DNA は全て Nap1 と ISW1a によって再構成した。

クロマチン複製実験後に反応産物を MNase で切断してヌクレオソーム DNA のみを切り出した。MNase による切断後の DNA を Tris-Glycine の非変性ゲルに泳動して、DNA に取り込まれたビオチンに対して蛍光ウェスタンブロッティングを行うと、150 bp の位置にビオチン DNA のシグナルが観察された (Figure 48A, レーン 4)。この DNA 長はヌクレオソーム DNA の長さ (147 bp) と一貫して

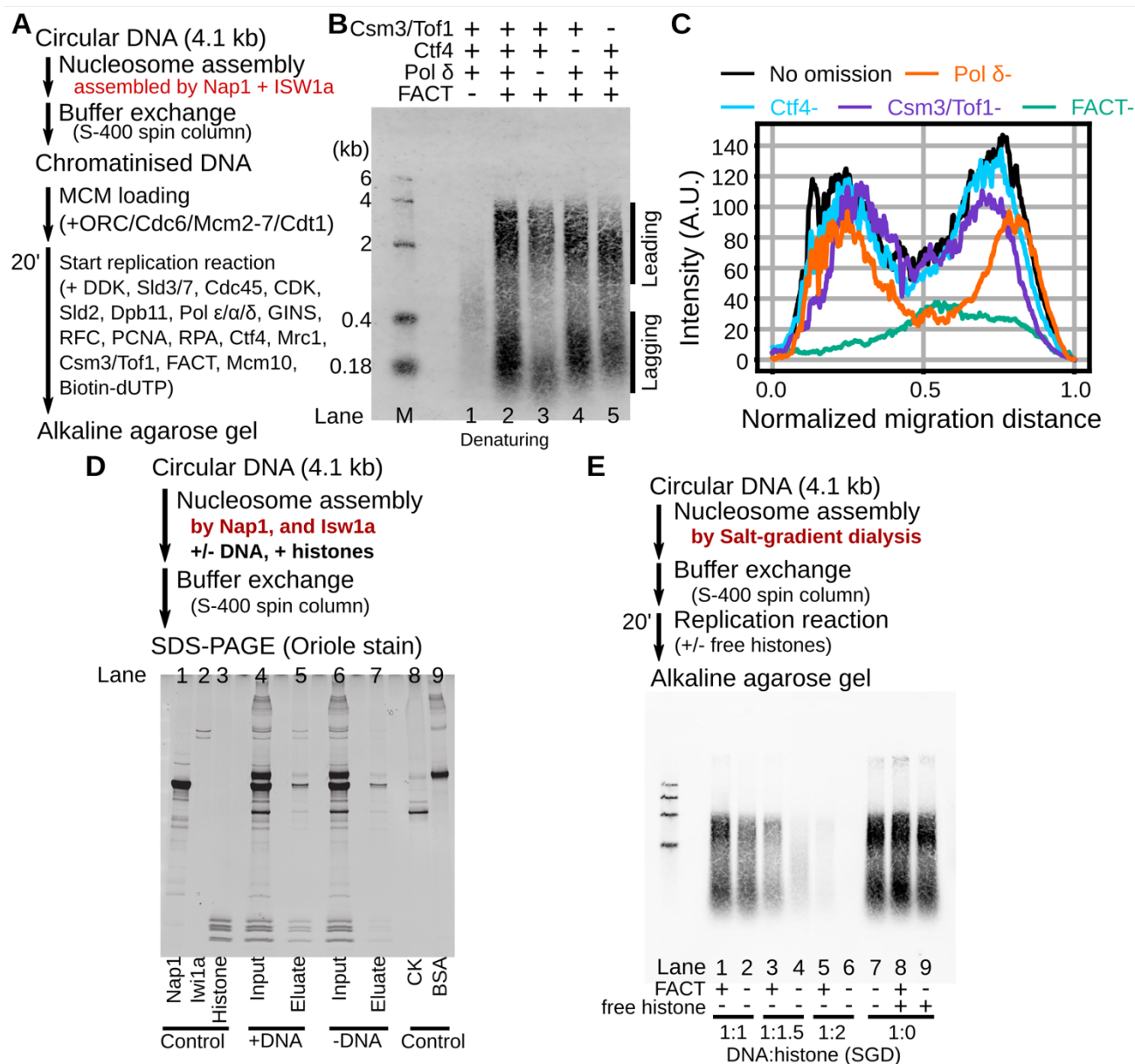


Figure 47: クロマチン複製の試験管内再構成。(A) プラスミド DNA (pARS1-4.1kb) へのヌクレオソーム再構成と DNA 複製反応の手順。(B) 複製反応産物のアルカリゲル電気泳動像。レーン M はマーカーを示す。(C) ゲル (B) のビオチンシグナル強度のレーンプロファイル。(D) ヌクレオソーム再構成後のバッファー交換ステップでの溶出タンパク質。-DNA の条件での溶出が溶媒中に遊離しているタンパク質に対応する。(E) 塩透析法 (SGD) によるヌクレオソーム再構成と複製産物のアルカリゲル電気泳動像。

いる。ヌクレオソームを再構成せずに DNA 複製実験を行って複製産物を MNase 処理しても、この 150 bp のバンドは出現しなかった (Figure 48A, レーン 2)。さらに DNA 複製開始に必要な不可欠な Mcm10 を除いて同様の操作を行なった場合 (Mcm10⁻)、150 bp のビオチン化 DNA のシグナルが出現しなかった (Figure 48A, レーン 3)。以上のことから、反応液中の遊離ヒストンは除去されているにもかかわらず、DNA 複製反応後にヌクレオソームが新生鎖 DNA 上に形成されていることが示された。したがって精製した複製タンパク質と FACT を用いることで、ヒストンリサイクリングを試験管内で再構成することに成功した。

次に複製タンパク質のうち DNA 複製に必要な不可欠ではない因子 (Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1) について、クロマチン複製や新生鎖へのヌクレオソーム形成への寄与を調べた。Pol δ は細胞内でラギング鎖合成を担う DNA ポリメラーゼであるが^{131,132}、試験管内再構成系を用いた先行研究^{133,134}より、Pol δ 非存在下では Pol α がラギング鎖合成を行うことができることが示されている。Ctf4 と Csm3/Tof1 はレプリソームの先頭に結合して、Pol α や FACT などのタンパク質をレプリソームにリクルートするための足場として機能することが知られている^{92,95,135-137}。これらのタンパク質を上述の試験管内再構成系から除いてクロマチン複製反応を実行した。複製産物のアルカリゲル電気泳動の結果より、

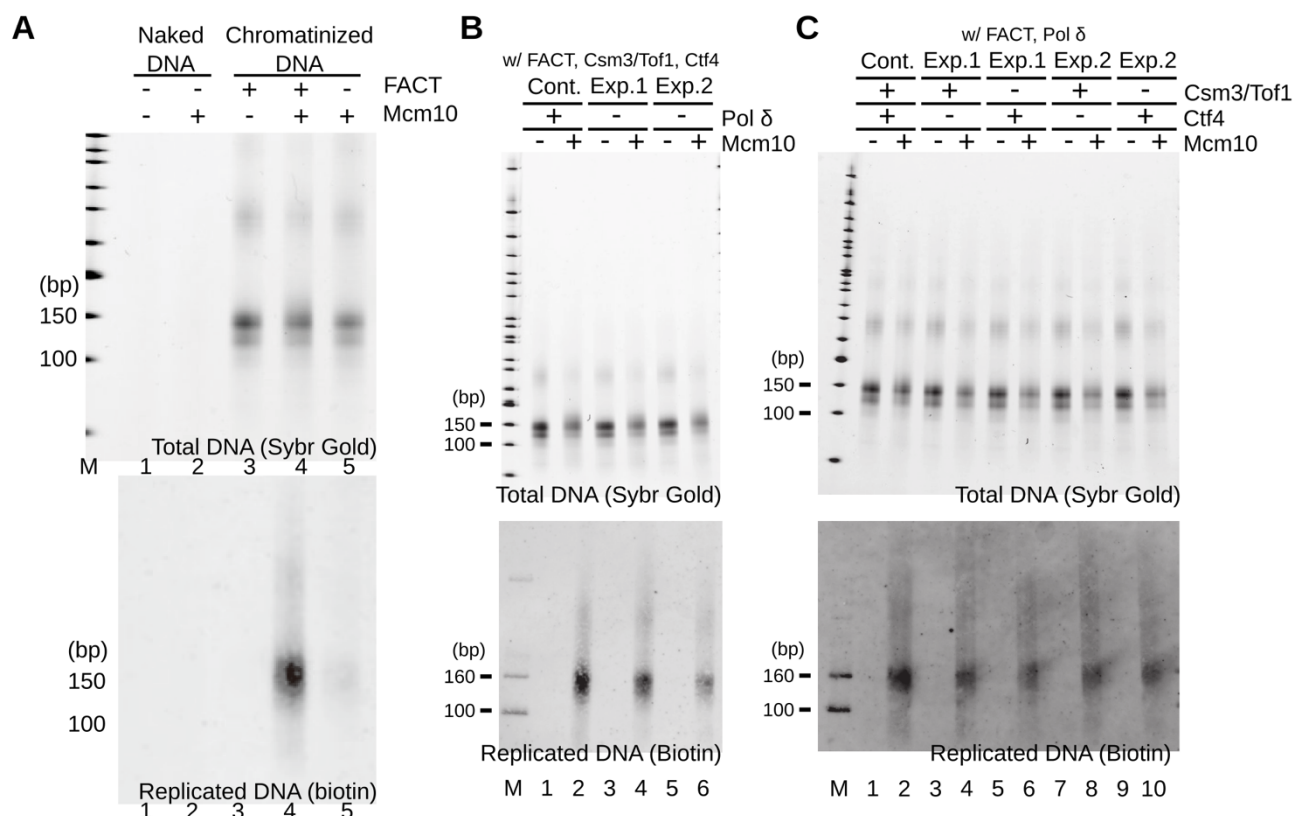


Figure 48: クロマチン複製産物の MNase アッセイ。(A) ヌクレオソームを形成させていない DNA (Naked DNA) と形成させた DNA (Chromatinized DNA) を基質に用いて複製、MNase 処理した後の DNA 断片の Native ゲル電気泳動像。(B) Pol δ 非存在下 (-) における複製産物の MNase 処理後断片の Native ゲル電気泳動像。2 回の反復実験 (Exp.1 & 2) を行った。(C) Csm3/Tof1 もしくは Ctf4 非存在下 (-) における複製産物の MNase 処理後断片の Native ゲル電気泳動像。2 回の反復実験 (Exp.1 & 2) を行った。(A-C) 全 DNA は Sybr-Gold によって、新生鎖はビオチンに対する蛍光ウェスタンブロットによって可視化した。

Ctf4 や Csm3/Tof1 を除いた条件 (Ctf4⁻、Csm3/Tof1⁻) では、リーディング鎖とラギング鎖の合成パターンに大きな変化が見られなかった (Figure 47B & C)。一方で Pol δ を除いた条件 (Pol δ ⁻) ではラギング鎖合成量とラギング鎖 DNA 長の両方が減少していた (Figure 47B & C)。この結果は先行研究で行われたヌクレオソーム非存在下での試験管内再構成実験の結果と一貫している¹³³。MNase 処理後の複製産物の非変性ゲル電気泳動の結果より、Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 の有無に関わらず 150 bp のビオチン化 DNA のシグナルが観察された (Figure 48B & C)。以上のことから Pol δ の除去によってラギング鎖合成効率は減少するものの、Pol δ と Ctf4、Csm3/Tof1 の除去によってクロマチン複製と新生鎖におけるヌクレオソーム形成 (ヒストンリサイクリング) に影響はほとんど見られなかった。

ナノポアシーケンサーと深層学習による親ヒストン配置解析手法 (Repli-pore-seq) の開発

試験管内再構成系においてヒストンがリーディング鎖とラギング鎖のどちらにリサイクルされたのか、あるいはそれぞれの DNA 上のどの場所にリサイクルされたのかを調べるために、ナノポアシーケンシングと深層学習モデルを組み合わせた解析手法 (Repli-pore-seq) を開発した (Figure 49A)。まず上述の試験管内再構成系を用いたクロマチン複製反応と MNase 処理を実行してヌクレオソーム DNA を切り出した (Figure 49B)。全ての DNA 基質で複製反応が完了するとは限らないため、MNase 処理の DNA は元のプラスミド DNA 由来の断片と DNA 複製後のビオチン化 DNA 断片の混合物である (Figure 49B)。従来のシーケンシング手法では、新生鎖 DNA のみを解析するために免疫沈降によって新生鎖 DNA を回収、精製する。しかし試験管内再構成系ではインプット量が少なく、免疫沈降によってサンプルが失われてしまうためシーケンシングに必要な量の DNA が回収できなかった。新生鎖 DNA の精製を行わずに配列解析を行うために、Oxford Nanopore Technologies のナノポアシーケンサー (MinION) を用いてシーケンシング実験を行った (Figure 49C)。ナノポアシーケンシングは、定電圧条件下で一本鎖 DNA 分子がポリマー膜に埋め込まれたチャネルを通過する際に発生する電流変化に基づいて DNA 配列を解析する手法である。この電流変化はチャネル分子を通過しているヌクレオチドの種類によって異なり、DNA に取り込まれた Biotin-dUTP は典型的な塩基 (A、T、G、C) とは異なる電流シグナルパターンを示すことが知られている^{138,139}。ナノポアシーケンサーによって測定した電流値シグナルから Biotin-dUTP の取り込みを判定することで、精製を行わずに新生鎖 DNA の配列情報のみを抽出した (Figure 49C)。

電流値シグナルに基づいて DNA への Biotin-dUTP の取り込みを判定するために、深層学習モデルを用いた分類器を開発した (Figure 49C)。分類器は LSTM ネットワークと残差ブロックを組み合わせることで構築した (Figure 46B)。分類器の学習セットを準備するため、プラスミド DNA を PCR で増幅して非ビオチン化 DNA とビオチン化 DNA を用意した。それぞれの DNA に対してナノポアシーケンシング実験を行い、非ビオチン化 DNA とビオチン化 DNA のリードをそれぞれ測定した。各リードに対応する電流の時系列シグナルを電流値の階段状の変化に基づいて分割し、各セグメントの電流値平均、標準偏差、持続時間を計算した (Figure 46A)。この操作によって電流値の時系列データをセグメント列に変換して、非ビオチン化 DNA 由来のセグメント列を 0、ビオチン化 DNA 由来のセグメント列を 1 とラベリングした。この手順にしたがってデータセットを用意して、9:1 に

分割して前者を学習セット、後者をテストセットとした。分類器はセグメント列を入力として、0 以上 1 以下のスカラー値を出力するようにデザインした。

分類器の分類精度を評価するためにテストセットの分類を行った。出力値 0.5 を下回るセグメント列を非ビオチン化 DNA、0.5 以上のセグメント列をビオチン化 DNA と定義することによってリードを分類し、正解ラベルと分類ラベルを比較した (Figure 49D)。分類器の正確度は 98% であり、適合率 (ビオチン化 DNA として判定されたリードのうち、実際にビオチン化 DNA であった割合) は 99% であった (Figure 49D)。

Repli-pore-seq によるヒストンリサイクリング解析

本研究のヒストンリサイクリングの試験管内再構成系に対して Repli-pore-seq を行い、新生鎖上に形成されたヌクレオソーム DNA の配列解析を行った。Mcm10⁻ (複製開始因子) の条件と Mcm10⁺

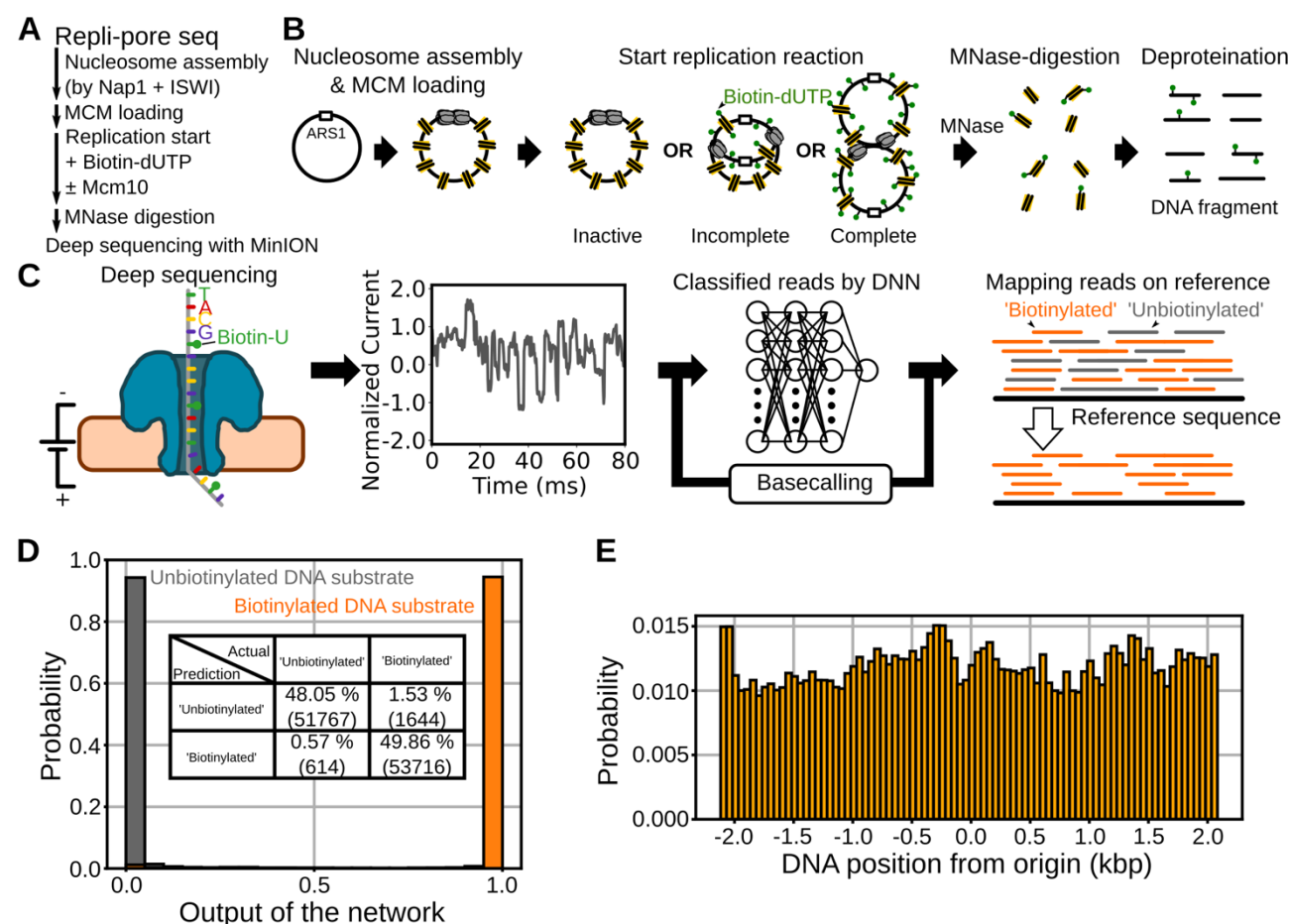


Figure 49: Repli-pore-seq の開発と評価。(A) Repli-pore-seq のプロトコル。(B & C) Repli-pore-seq の概念図。クロマチン複製の試験管内再構成と MNase アッセイステップ (B) と、MinION によるナノポアシーケンシング、電流値データに基づいた新生鎖 (ビオチン化 DNA) の分類 (C)。(D) テストセットの出力値分布。非ビオチン化 DNA 由来のデータをグレー、ビオチン化 DNA 由来のデータをオレンジで色付けた。挿入図は分類器の正解ラベルと予測ラベルの混同行列。(E) 超音波処理で剪断した DNA 断片のリード分布。200 bp 以下の長さのリードの midpoint をリード位置として定義した。

の条件で Repli-pore-seq を行くと、それぞれ 0.5%、11.6% のリードが「ビオチン化 DNA」として判定された (Figure 50A)。Mcm10 がいない条件では DNA 複製が開始されないため (Figure 47B)、Mcm10⁻ の条件で「ビオチン化 DNA」として分類された 0.5% のリードは、非ビオチン化 DNA の誤分類によるものである。したがって Mcm10⁺ の条件で分類された 11.6% のリードは、真にビオチン化されたリードと誤分類リードの混合である。Materials & Methods の「分類器のバイアス補正」の項で示した手順に従って、真にビオチン化されたリードのアンサンブルを推定した。以下、真にビオチン化されたリードを新生鎖リード、Mcm10⁻ の条件で測定した全リードを親 DNA 鎖リードと呼ぶ。

まず親 DNA 鎖リードと新生鎖リードのリード長を計算することで、リサイクル前後におけるヌクレオソームの状態を調べた。親 DNA 鎖のリード長分布を 2 つのガウス分布でフィッティングすると、それぞれのピーク位置は 144 ± 19 bp、 275 ± 31 bp であり、ヌクレオソーム 1 つ分と 2 つ分にそれぞれ対応していた (Figure 50B)。一方で新生鎖のリード長分布を同様にフィッティングすると、 121 ± 45 bp、 245 ± 41 bp であった (Figure 50B)。先行研究⁶⁴より、ヌクレオソームから H2A/H2B ダイマーが 1 つ分脱離した構造はヘキサソームと呼ばれ、約 120 bp 分の DNA がヒストンヘキサマー (H3/H4 テトラマー + H2A/H2B ダイマー) に巻き付くことが知られている。このことからこれらのピークは新生鎖上の DNA-ヒストン複合体はヘキサソームに対応していることが考えられる。また親 DNA 鎖と新生鎖のリード長分布を比較すると、40–120 bp のフラクションが増加していた (Figure

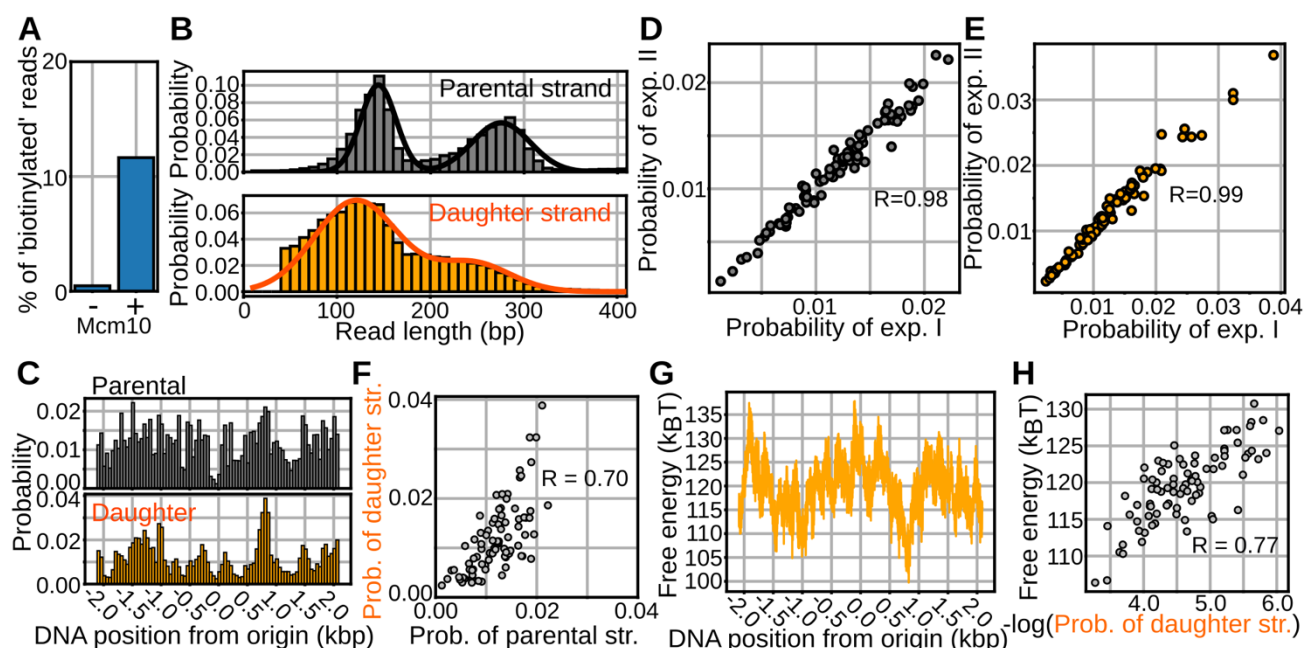


Figure 50: クロマチン複製の試験管内再構成系の Repli-pore-seq 解析。(A) 分類器によってビオチン化 DNA として判定されたリードの割合。(B) 親 DNA 鎖リード (黒) と新生鎖リード (オレンジ) のリード長分布。実線は 2 つのガウス関数でのフィッティング (C) 親 DNA (黒) と新生鎖上 (オレンジ) でのヒストン分布。(D & E) 親 DNA (D) と新生鎖 (E) 上でのヒストン分布に関して、2 回の反復実験間での相関。(F) 親 DNA と新生鎖 DNA 上でのヒストン分布間での相関。(G) pARS1-4.1kb プラスミド DNA 配列上でのヌクレオソーム形成の自由エネルギーランドスケープ。(H) 新生鎖 DNA 上でのヒストン分布 (C) の対数とヌクレオソーム形成の自由エネルギーランドスケープ (G) 間での相関。

50B)。以上のことから、ヒストンリサイクリングの過程で親 DNA 上にあったヌクレオソームから H2A/H2B ダイマーが解離することが示唆された。

次に親 DNA 鎖と新生鎖上のヒストン分布を計算した。ヒストンの配置は 200 bp 以下のリードの中点として定義した。親 DNA 鎖と新生鎖上のリード分布は一樣ではなく、とくに複製開始認識配列 (ARS1) 周辺の占有率は低かった (Figure 50C)。プラスミド DNA を超音波処理によって剪断したサンプルをシーケンシングした場合のリード分布は一樣であることから (Figure 49E)、親 DNA 鎖と新生鎖 DNA 上のリード分布はシーケンサーのバイアスによるものではなくヒストンの分布を反映していることが示された。この親 DNA 鎖と新生鎖 DNA 上でのヒストン分布は再現性があり、独立に実行した反復実験の結果と比較すると、親 DNA 鎖の分布の相関係数は 0.98、新生鎖の分布の相関係数は 0.99 であった (Figure 50D & E)。親 DNA 鎖と新生鎖の分布を比較すると相関係数は 0.70 であり、ヒストンは親 DNA 上での分布を保存して新生鎖にリサイクルされることが示された (Figure 50F)。ヒストン分布の決定要因を調べるために、プラスミド DNA 配列上でのヌクレオソーム形成の自由エネルギーランドスケープをマルコフモデル³⁵によって予測した (Figure 50G)。新生鎖上でのヒストン配置の確率分布の対数をとって、予測した自由エネルギーランドスケープと比較すると、

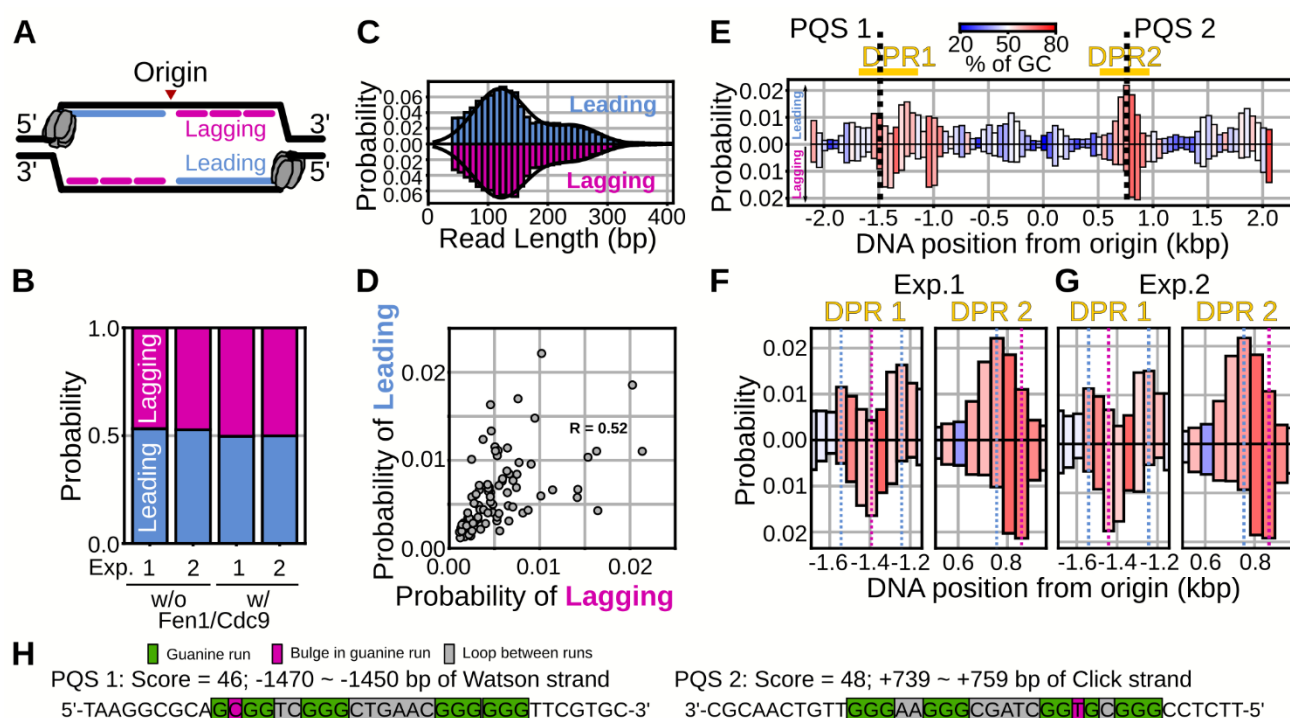


Figure 51: ヒストンリサイクリングにおけるリーディング鎖、ラギング鎖へのヒストン分配解析。(A) 複製フォーク進行の概念図。(B) Fen1/Cdc9 無し (w/o) と有り (w/) の条件でのリーディング鎖とラギング鎖 DNA 断片の割合。(C) リーディング鎖とラギング鎖 DNA 断片のリード長分布。(D) ラギング鎖とリーディング鎖上でのヒストン分布の相関。(E) リーディング鎖とラギング鎖上でのヒストン分布。各ビンの GC 含量に基づいて色付けした。ヒストン配置のズレが観察された領域 (Discordant Positioning Region, DPR) を黄色で示す。グアニン四重鎖を形成しうる配列 (Potentially G-quadruplex forming sequence, PQS) を黒の破線で示す。(F & G) DPR の拡大図。2 回の反復実験の結果 (F は Exp.1、G は Exp.2)。ビンの色は (E) の GC 含量と同じ。(H) pARS1-4.1kb 中の PQS 配列。

相関係数は 0.77 であった (Figure 50H)。したがって新生鎖上でのヒストン分布は DNA 配列に依存していることが示された。

ナノポアシーケンサーは一本鎖 DNA の配列を直接解析しているため、得られた配列がリーディング鎖由来であるのかラギング鎖由来であるのかを、複製開始点からの位置と方向に基づいて分類できる (Figure 51A)。2 回独立に行なった Repli-pore-seq 実験のそれぞれで、53.2%と 52.7%の新生鎖がリーディング鎖として、46.8%と 47.3%がラギング鎖として分類された (Figure 51B)。リーディング鎖とラギング鎖のリード長を計算するとそれぞれ 120 ± 43 bp、 121 ± 46 bp であり、リーディング鎖とラギング鎖間でほとんど変化が見られなかった (Figure 51C)。したがって本研究で再構成されたヒストンリサイクリング系において、ヒストンは対称的に分配された。

リーディング鎖とラギング鎖間でのヒストン分布を比較すると相関係数は 0.52 であり、完全には一致していなかった (Figure 51D)。特に複製起点から -1.65 kbp から -1.15 kbp までの領域と、0.55 kbp から 0.95 kbp までの領域において、リーディング鎖とラギング鎖の間でヒストン配置パターンにずれが見られた (Figure 51E-G)。このパターンのずれが見られた領域を Discordant Positioning Region (DPR) と名付けて、上述の 2 つの領域を DPR1、DPR2 と定義した。DPR1 においてリーディング鎖上にはヒストン配置のピークが 2 つ観察された (Figure 51F & G)。一方でラギング鎖上には、この 2 つのピーク位置の間にヒストン配置のピークが 1 つ観察された (Figure 51F & G)。DPR2 においてはリーディング鎖上のピークがラギング鎖上でのピークから 100 bp 離れた位置に観察された (Figure 51F & G)。リーディング鎖とラギング鎖とで DNA 塩基配列は同一であるため、上述の自由エネルギーランドスケープではこの配置のずれを説明できない。そのためこの配置のズレは熱力学的ではなく速度論的に決定されていると考えられる。DPR は GC 含量が高くグアニン四重鎖 (G4) が形成されうる領域と重複しており (Figure 51E)、このような領域においてはヘリカーゼとポリメラーゼの進行の共役が失われることが知られている¹⁴⁰⁻¹⁴²。後述で考察するように、ヒストン配置のずれはこのヘリカーゼとポリメラーゼの進行速度の「ずれ」を反映していると考えられる。

DNA 複製においてラギング鎖は断続的に合成される。このときに合成される DNA 断片は岡崎フ

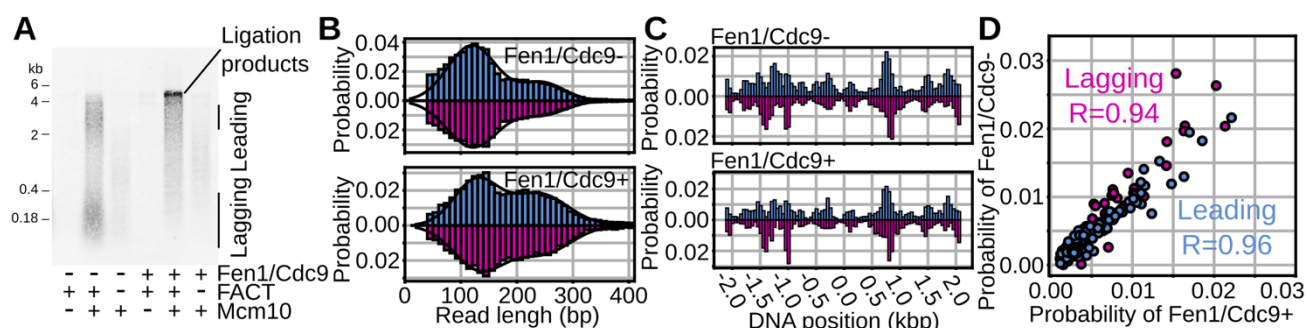


Figure 52: Fen1/Cdc9 存在下でのクロマチン複製と Repli-pore-seq の結果。(A) クロマチン複製の反応産物のアルカリゲル電気泳動像。(B) Fen1/Cdc9 非存在下 (上、Fig.50C と同じ) と存在下 (下) での新生鎖のリード長分布。(C) Fen1/Cdc9 非存在下 (上、Fig.50E と同じ) と存在下 (下) でのヒストン分布。(D) Fen1/Cdc9 存在下と非存在下でのヒストン分布 (C) の相関。

ラグメントと呼ばれ、最終的に岡崎フラグメントの連結によってラギング鎖合成が完了する（ラギング鎖成熟）。本研究の試験管内再構成系においてはこのラギング鎖成熟の因子である Fen1/Cdc9 が含まれていないにも関わらず、ヒストンはラギング鎖とリーディング鎖に対称的に分配された（Figure 51B）。Fen1/Cdc9 によるクロマチン成熟がヒストンリサイクリングに与える影響を調べるために、Fen1/Cdc9 存在下でクロマチン複製を行って Repli-pore-seq による解析を行った。まず Fen1/Cdc9 はヌクレオソームの存在下であってもラギング鎖、リーディング鎖を連結して DNA 合成を完了することを確認した（Figure 52A）。リーディング鎖とラギング鎖のリード長はそれぞれ 131 ± 41 bp、 130 ± 43 bp であり、ラギング鎖成熟の有無に関わらず大きな変化は見られなかった（Figure 52B）。また 2 回の反復実験において、リーディング鎖の割合は 49.9%と 49.7%、ラギング鎖の割合は 50.1%と 50.3%であった（Figure 51B）。したがってラギング鎖成熟条件下でもヒストンは対称的にリサイクルされた。さらにリーディング鎖とラギング鎖上でのヒストン分布を Fen1/Cdc9 の有無で比較すると、それぞれの相関係数は 0.96 と 0.94 であった（Figure 52C-D）。したがってラギング鎖成熟の有無によって、新生鎖上にリサイクルされたヒストンの配置は変化しなかった。以上の結果から、Fen1/Cdc9 によるラギング鎖成熟は対称的なヒストンリサイクリングに必須ではないことが示された。

Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 のヒストンリサイクリング対称性への寄与

上述のクロマチン複製のゲル電気泳動の結果より、Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 はクロマチン複製や新生鎖へのヒストン結合に厳密に必要なではなかった（Figure 47B, Figure 48B & C）。一方でこれらはヒストンリサイクリングの分配率や配置に寄与している可能性がある。これらの因子のヒストンリサイクリングへの影響を調べるために、Pol δ^- 、Ctf4 $^-$ 、Csm3/Tof1 $^-$ の条件で Repli-pore-seq を行った。

Pol δ^- 、Ctf4 $^-$ 、Csm3/Tof1 $^-$ のそれぞれで、MNase 処理後のラギング鎖 DNA 断片の長さは 125 ± 43 、 128 ± 49 、 127 ± 42 bp で、リーディング鎖 DNA 断片の長さは 124 ± 40 、 118 ± 45 、 124 ± 35 bp であった（Figure 53A）。したがって Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 の除去によってリード長に変化は見られない。このことは上述のゲル電気泳動の実験結果と一致している。また Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 が存在する条件と同様に、親 DNA 鎖と新生鎖のリード長の分布を比較すると、40–120 bp のリードのフラクションが増加していた（Figure 50B & Figure 53A）。以上のことから、Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 の有無に関わらず、ヒストンリサイクリングの過程で H2A/H2B の解離が起こっていることが示された。

次に Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 のヒストンリサイクリングの対称性に与える影響を調べた。Pol δ^- 、Ctf4 $^-$ 、Csm3/Tof1 $^-$ のそれぞれで、新生鎖リードのうち 61.9%、55.0%、52.9%がリーディング鎖であった（Figure 53B）。この分配率には再現性があり、独立に実行した反復実験より、Pol δ^- 、Ctf4 $^-$ 、Csm3/Tof1 $^-$ のそれぞれで新生鎖リードのうち 62.0%、55.0%、53.0%がリーディング鎖であった（Figure 53B）。したがって Pol δ^- の条件ではリーディング鎖バイアスを示す一方で、Ctf4 $^-$ と Csm3/Tof1 $^-$ の条件では鎖バイアスは弱くほとんど対称的であった。この反復実験間で新生鎖上でのヒストン配置分布を比較すると、どの条件でも $R \sim 0.9$ の高い相関を示した（Figure 53C）。また Pol δ^- のヒストン配置分布を Pol δ^+ の条件で比較すると、ヒストンが配置される確率が参照配列全体を通して減少していた（Figure 53D）。このことは Pol δ^- 条件下でラギング鎖合成量が減少していたことと一貫する。

以上のことから Pol δ はリサイクルの対称性に寄与している一方で、Ctf4 や Csm3/Tof1 はその寄与が小さいことが示された。

次に Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 のヒストン配置に与える影響を調べた。まずそれぞれの因子が無い条件と有る条件で、リーディング鎖とラギング鎖それぞれのヒストン配置の確率分布を計算した。因子が有る条件と無い条件との間の確率分布の比 (Fold change, FC) を計算した。Pol δ -、Ctf4 -、Csm3/Tof1 - のそれぞれの条件において、ラギング鎖の 14%、18%、30% の場所で、リーディング鎖の 5%、26%、26% の場所で $\log_2$ FC の値が 0.5 以上を示した (Figure 53E & F)。特に、-0.5 から 0.5 kbp までの領域と 1.0 から 1.5 kbp までの領域において、ラギング鎖とリーディング鎖の両方で高い

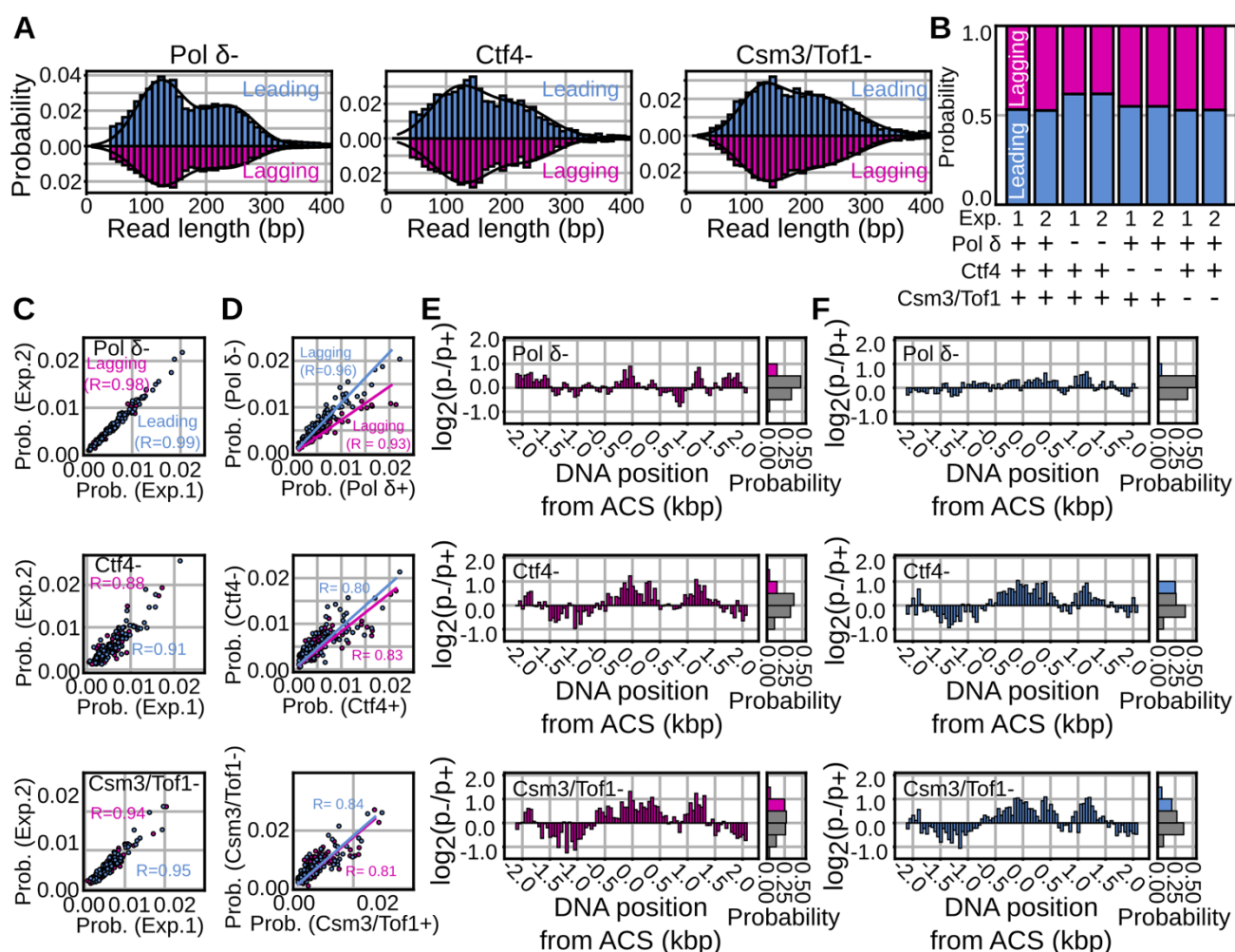


Figure 53: Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 のヒストンリサイクル対称性への寄与。(A) Pol δ - (左)、Ctf4- (中央)、Csm3/Tof1- (右) の反応条件における Repli-pore-seq の新生鎖リード長分布。(B) リーディング鎖とラギング鎖 DNA 断片の割合。(C) Pol δ - (上)、Ctf4- (中央)、Csm3/Tof1- (下) の反応条件における 2 回の反復実験間でのヒストン分布の相関。(D) Pol δ - (上)、Ctf4- (中央)、Csm3/Tof1- (下) の反応条件におけるヒストン分布と、Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 存在下の反応条件でのヒストン分布との間の相関。(E & F) Pol δ - (上)、Ctf4- (中央)、Csm3/Tof1- (下) の反応条件における、ラギング鎖 (E)、リーディング鎖 (F) のヒストン分布の $\log_2$ FC プロット。各プロット右のヒストグラムについて、 $\log_2$ FC の値が 0.5 を下回るビンをグレー、0.5 以上のビンをマゼンタ (E) かシアン (F) で色付けした。

log₂FC の値を示した (Figure 53E & F)。これらの領域はヌクレオソーム形成の自由エネルギーランドスケープにおいて、エネルギー的に不安定な場所に対応している (Figure 50G)。以上のことから Ctf4 と Csm3/Tof1 はヒストンのリサイクル配置に寄与することが示された。

考察

本研究において 25 種類の精製タンパク質からヒストンリサイクリングを試験管内で再構成して、ディープシーケンシングと深層学習を組み合わせた解析手法 (Repli-pore-seq) によってヒストンリサイクリング再構成系の詳細な解析を行った。親 DNA 上に結合していたヒストンは DNA 複製と共役してリーディング鎖かラギング鎖に均等に分配された。このときヌクレオソームは H2A/H2B ダイマーが解離した構造 (ヘキサソームかテトラソーム) としてリサイクルされる傾向が見られた。またリーディング鎖とラギング鎖上のヒストン配置分布を比較すると、どちらも同一の DNA 配列であるにも関わらず、それぞれの鎖上でのヒストン配置にズレが見られた。またラギング鎖成熟に必要な因子である Fen1/Cdc9 は対称的なヒストンリサイクリングに必要では無いことを示した。また Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 は新生鎖へのヌクレオソーム形成に必要では無い一方で、Pol δ はリサイクルの対称性に、Ctf4 と Csm3/Tof1 はヒストンのリサイクル位置の制御に寄与していることが示された。将来的に、本研究で同定した対称的なヒストンリサイクリングの最小構成要素に基づいて第 3 章のシミュレーション系に不足している要素を加えることによって、対称的なヒストンリサイクリングを実現する分子機構を明らかにすることができると考えられる。

岡崎フラグメントの連結はラギング鎖成熟に必要な不可欠な過程である。ラギング鎖成熟において、岡崎フラグメントを伸長する Pol δ が隣接する岡崎フラグメントと衝突すると、その 5'末端がテンプレート鎖から解離してフラップ構造を形成する。Fen1 がこのフラップ構造を除去して、Cdc9 が隣接した 2 つの岡崎フラグメントを連結する。先行研究より、岡崎フラグメントの隣接する点はヌクレオソームのダイアドを中心に分布していることが知られており、この分布はヒストンシャペロン Rtt106 と CAF-1 によるヌクレオソーム形成や、Pol δ のプロセシビティに依存している¹⁴³⁻¹⁴⁵。また先行研究より、Fen1/Cdc9 はヌクレオソームの有無に関わらずフラップ構造の除去や岡崎フラグメントの連結を行うことができることが示されている^{146,147}。本研究より Fen1/Cdc9 はヒストンリサイクリングの分配率や配置に影響を与えないことが示された。これらのことから、ヒストンリサイクリングはラギング鎖成熟よりも前に起こる現象であり、ラギング鎖成熟はヒストンがもつエピゲノム情報を損なうことなく進行することが示唆された。

eSPAN を用いた研究から、Ctf4 の欠失変異⁹²や、Tof1 の Mcm2 との相互作用に関わる残基への変異⁹⁵によってラギング鎖へのリサイクルが阻害されることが示されている。一方で本研究では Ctf4 や Csm3/Tof1 の欠失によるリサイクルの対称性への影響は小さかった。この違いは、試験管内再構成系に含まれていない未知の因子が Ctf4 や Csm3/Tof1 と協調してラギング鎖へのリサイクルに機能する可能性を示唆している。将来的にこの未知の要因が明らかになることで、ヒストンリサイクリングを実現するメカニズムを包括的に理解できることが期待される。

ヒストンに書き込まれたエピゲノム情報の継承は、世代を超えてクロマチン構造が維持されるために必要なメカニズムである。例えば H3K9me3 のようなヒストンへの化学修飾状態は、ヘテロクロマチン構造の維持のために対称的に継承される必要がある^{84,96,97}。ヒストンリサイクリングはクロマチン構造を維持するメカニズムの第一段階であり、新生クロマチンへの新生ヒストンの取り込みと化学修飾を経てエピゲノム情報が回復することによって、クロマチン構造の維持が完了する（クロマチン成熟）。このクロマチン成熟には Asf1 や CAF-1 のようなヒストンシャペロンや、ヒストン修飾酵素、HP1 やリンカーヒストン、SMC タンパク質などクロマチン構造組織化に関わる分子が必要である^{42,78-80}。こうした分子を試験管内再構成系に新たに加えることによって、クロマチン成熟を再構成して Repli-pore-seq によって成熟過程のクロマチン構造を解析できる。このように本研究で開発した実験手法はヒストンリサイクリングだけでなくクロマチン組織化の分子機構を解明するためのツールとしても有効である。

ヒストンリサイクリング位置の解析から、特定の領域（DPR）においてリーディング鎖とラギング鎖の間でヒストン配置パターンにずれが見られた。DPR は GC 含量が高く、グアニン四重鎖が形成しうる領域であった。先行研究より、GC 含量の高い配列やグアニン四重鎖が形成されている DNA 領域においてヘリカーゼやポリメラーゼの速度低下が観察され、ヘリカーゼとポリメラーゼの機能の共役が失われることが示されている¹⁴⁰⁻¹⁴²。また別の研究から、ヒストンリサイクリングの対称性がリーディング鎖とラギング鎖の合成タイミングによって制御される可能性が示唆されている^{148,149}。これらのことから、本研究で観察されたヒストン配置のずれは DPR におけるリーディング鎖とラギング鎖の合成タイミングのずれを反映しているという仮説が導かれる。将来的に、一分子測定実験や分子動力学シミュレーションによって、複製フォークにおけるリーディング鎖とラギング鎖の合成とヒストンリサイクリングとの間の関係を直接観察することができれば、この仮説を検証できる。

Repli-pore-seq は真核生物 DNA 複製系の試験管内再構成と、ナノポアシーケンシング、深層学習による分類を組み合わせた学際的な実験手法である。試験管内再構成は細胞の生存に不可欠なタンパク質への変異や欠失を導入して実験を行うことができる点で優れた手法である。しかし再構成した DNA 複製やヒストンリサイクリングの反応効率が低いいため、新生鎖の収量が少ない。したがって微量な新生鎖を免疫沈降などの手法で精製するとサンプルがロストしてしまい、シーケンシング実験に用いることが困難であった。さらに再構成に必要なタンパク質精製のコストの高さのために反応系のスケールを大きくすることが難しい。これらの問題を解決するため、本研究では深層学習による分類を用いて新生鎖のシグナルを計算機によって「精製」した。このように Repli-pore-seq は免疫沈降による精製を省くことができるため、反応効率が低く反応スケールの小さい系に対しても用いることができる。本研究の手法は、ディープシーケンシング解析を試験管内再構成に対して適用したという点において先進的である。

第3章で提唱したヒストンリサイクリングにおける Cdc45 の役割は、将来的に Cdc45 などの変異体タンパク質を用いてヒストンリサイクリングを試験管内再構成して、Repli-pore-seq でヒストンの配置、対称性を解析することによって検証することができる。また第4章で同定した対称的なヒス

トシリサイクリングの最小構成要素のうち、第 3 章のシミュレーション系に不足している要素を加えて計算を実行することができれば、ヒストシリサイクリング経路をさらに発見・可視化できる。シミュレーションによって複数のヒストシリサイクリング経路とその関連タンパク質を発見し、Repli-pore-seq によってその変異体の影響を調べることができれば、対称的なヒストシリサイクリングを実現するメカニズムの全容を解明できる。このようにシミュレーションと実験手法を相補的に組み合わせることで、ヒストシリサイクリングの分子機構をボトムアップ的に理解できる。本研究を通じて、細胞分化や恒常性維持を裏打ちするエピゲノム継承のメカニズムを統一的に解明するためのフレームワークを構築することができた。

結論

本研究では粗視化分子動力学シミュレーションと試験管内再構成系を使った生化学実験・ディープシーケンシング実験を相補的に用いて、ヒストンリサイクリングの分子機構を解明した。

第1章では、ヒストンシャペロン非存在下で DNA トランスロケースがヌクレオソームを下流に移動させるメカニズム、「レーンスイッチメカニズム」を提唱した。DNA トランスロケースは、ヌクレオソームと衝突するとヌクレオソームから DNA をアンラップする。DNA トランスロケースがヌクレオソームのダイアド付近までヌクレオソームをアンラッピングすると、「レーンスイッチメカニズム」による移動が開始する。ヒストンオクタマーの側面に2つ平行して並ぶ DNA の結合レーン (I, II) のうち、DNA トランスロケースによってレーン I の領域が溶媒中に露出する。そしてレーン II 上にある DNA が解離してレーン I に再結合する。この乗り換え (スイッチ) の結果、空いたレーン II に下流側のリンカー DNA が結合することで、最終的にヌクレオソームの 78–102 bp 下流への移動が完了する。制限酵素アッセイより、DNA トランスロケースがヌクレオソームをダイアド付近までアンラップした時にヌクレオソームが下流に移動することを検証した。さらにディープシーケンシングアッセイによって、DNA トランスロケースとの衝突の後にヌクレオソームが 100 bp 下流に移動していることを実験的に実証した。したがってヒストンシャペロンの非存在下では DNA トランスロケースとの衝突によってヌクレオソームが下流に移動するため、ヌクレオソームの位置情報が失われてしまうことが示唆された。以上の研究結果は *Nucleic Acids Research* 誌 (<https://doi.org/10.1093/nar/gkab664>, 2021, Vol. 49, 16(20), pp.9066–9076) に掲載された。

第2章では、DNA トランスロケースとヌクレオソームとの衝突後、ヒストンシャペロン Nap1 が H2A/H2B ダイマーをヌクレオソームから解離させることを示した。DNA トランスロケースがヌクレオソームと衝突してダイアド付近まで DNA をアンラップするよりも前に、ヌクレオソーム中の H2A/H2B が溶媒中に露出した。Nap1 はこの露出した界面を介して、ヌクレオソーム中の H2A/H2B ダイマーに結合した。Nap1 と H2A/H2B ダイマーが静電相互作用を介して強く結合することでヌクレオソームが不安定化し、ヌクレオソームからの H2A/H2B ダイマーの解離が完了した。Nap1 の C 末端領域はヌクレオソーム中の H2A/H2B との結合と、解離後の Nap1-H2A/H2B 複合体の安定化に寄与していた。このことから Nap1 の C 末端領域は H2A/H2B ダイマーをヌクレオソームから解離させるうえで中心的な役割を果たす。したがって、DNA トランスロケースとの衝突によってヌクレオソームが下流に移動するより前に、ヒストンシャペロンがヌクレオソームの解体を促進することが示された。以上の研究結果は *Nucleic Acids Research* 誌 (<https://doi.org/10.1093/nar/gkad396>, 2023, Vol. 51, 11(23), pp.5351–5363) に掲載された。

第3章では、レプリソームの構成要素のうち DNA 複製に最低限必要な要素のみに注目して、ヒストンリサイクリングにおけるヌクレオソーム再形成過程を可視化した。シミュレーションから、レプリソームのサブユニットである Mcm2 の N 末端テールが H3/H4 テトラマーを直接新生鎖に結合させることを観察した。この過程で、レプリソームのサブユニットの1つである Cdc45 の酸性ループ領域が H3/H4 テトラマーと結合することを新たに発見した。この Cdc45 との結合を経由するリサイ

クル経路では H3/H4 テトラマーはリーディング鎖に、Cdc45 との結合を経由しない経路ではラギング鎖にリサイクルされることが観察された。またラギング鎖の一本鎖 DNA 領域に蓄積する RPA がラギング鎖へのヒストンリサイクリングを制御することを示し、ヒストンリサイクリングの対称性が RPA によって調節される可能性を示唆した。さらに Pol ϵ はレプリソームから伸長するリーディング鎖の向きを変えることによって、リサイクル後の H3/H4 テトラマーの配置を変化させることが示された。粗視化分子動力学シミュレーションを用いてヒストンリサイクリング経路を可視化するとともに、ヒストンリサイクリングにおける Cdc45 や RPA、Pol ϵ の役割についての仮説を提唱した。以上の研究結果は *Nature Communications* 誌 (<https://doi.org/10.1038/s41467-024-53187-4>, 2024, Vol. 15:9485) に掲載された。

第 4 章では 25 種類の精製タンパク質からヒストンリサイクリングを試験管内で再構成した。またリサイクルされたヒストンの配置と対称性を解析するために、ディープシーケンシングと深層学習を組み合わせた解析手法 (Repli-pore-seq) を開発した。そして Repli-pore-seq による解析を用いて、対称的なヒストンリサイクリングの最小構成要素を同定した。この最小構成系において、ヌクレオソームは H2A/H2B ダイマーが解離した構造 (ヘキサソームかテトラソーム) としてリサイクルされる傾向が見られた。またリーディング鎖とラギング鎖上のヒストン配置分布を比較すると、どちらも同一の DNA 配列であるにも関わらず、それぞれの鎖上でのヒストン配置にズレが見られた。またラギング鎖成熟に必要な因子である Fen1/Cdc9 は対称的なヒストンリサイクリングに必要では無いことを示した。さらに Pol δ 、Ctf4、Csm3/Tof1 は新生鎖へのヌクレオソーム形成に必要では無い一方で、Pol δ はリサイクルの対称性に、Ctf4 と Csm3/Tof1 はヒストンのリサイクル位置の制御に寄与していた。以上の研究結果は *bioRxiv* (<https://doi.org/10.1101/2024.11.18.624094>) において公開されている。

参考文献

1. Luger, K. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **389**, 10 (1997) .
2. Lai, W. K. M. & Pugh, B. F. Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 548–562 (2017) .
3. Martire, S. & Banaszynski, L. A. The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 522–541 (2020) .
4. Singleton, M. R., Dillingham, M. S. & Wigley, D. B. Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 23–50 (2007) .
5. Hammond, C. M., Strømme, C. B., Huang, H., Patel, D. J. & Groth, A. Histone chaperone networks shaping chromatin function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 141–158 (2017) .
6. Bednar, J., Studitsky, V. M., Grigoryev, S. A., Felsenfeld, G. & Woodcock, C. L. The Nature of the Nucleosomal Barrier to Transcription: Direct Observation of Paused Intermediates by Electron Cryomicroscopy. *Molecular Cell* **10**.
7. Kireeva, M. L. *et al.* Nucleosome Remodeling Induced by RNA Polymerase II. *Molecular Cell* **9**, 541–552 (2002) .
8. Walter, W., Kireeva, M. L., Studitsky, V. M. & Kashlev, M. Bacterial Polymerase and Yeast Polymerase II Use Similar Mechanisms for Transcription through Nucleosomes. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 36148–36156 (2003) .
9. Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M. & Bustamante, C. Nucleosomal Fluctuations Govern the Transcription Dynamics of RNA Polymerase II. *Science* **325**, 626–628 (2009) .
10. Kulaeva, O. I. *et al.* Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 1272–1278 (2009) .
11. Bintu, L. *et al.* The elongation rate of RNA polymerase determines the fate of transcribed nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 1394–1399 (2011) .
12. Chang, H.-W. *et al.* Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription. *Nucleic Acids Research* **42**, 1619–1627 (2014) .
13. Gaykalova, D. A. *et al.* Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, E5787–E5795 (2015) .

14. Clark, D. J. & Felsenfeld, G. A Nucleosome Core Is Transient of the Path of a Transcribing. 12.
15. Studitsky, V. M., Clark, D. J. & Felsenfeld, G. Overcoming a nucleosomal barrier to transcription. *Cell* **83**, 19–27 (1995) .
16. Studitsky, V. M. Mechanism of Transcription Through the Nucleosome by Eukaryotic RNA Polymerase. *Science* **278**, 1960–1963 (1997) .
17. Finkelstein, I. J., Visnapuu, M.-L. & Greene, E. C. Single-molecule imaging reveals mechanisms of protein disruption by a DNA translocase. *Nature* **468**, 983–987 (2010) .
18. Gottesfeld, J. M., Belitsky, J. M., Melander, C., Dervan, P. B. & Luger, K. Blocking Transcription Through a Nucleosome with Synthetic DNA Ligands. *Journal of Molecular Biology* **321**, 249–263 (2002) .
19. Freeman, G. S., Hinckley, D. M., Lequieu, J. P., Whitmer, J. K. & de Pablo, J. J. Coarse-grained modeling of DNA curvature. *The Journal of Chemical Physics* **141**, 165103 (2014) .
20. Davey, C. A., Sargent, D. F., Luger, K., Maeder, A. W. & Richmond, T. J. Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1.9Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **319**, 1097–1113 (2002) .
21. Vasudevan, D., Chua, E. Y. D. & Davey, C. A. Crystal Structures of Nucleosome Core Particles Containing the ‘601’ Strong Positioning Sequence. *Journal of Molecular Biology* **403**, 1–10 (2010) .
22. Li, W., Wang, W. & Takada, S. Energy landscape views for interplays among folding, binding, and allostery of calmodulin domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 10550–10555 (2014) .
23. Niina, T., Brandani, G. B., Tan, C. & Takada, S. Sequence-dependent nucleosome sliding in rotation-coupled and uncoupled modes revealed by molecular simulations. *PLoS Comput Biol* **13**, e1005880 (2017) .
24. Chen, Y. *et al.* Asymmetric unwrapping of nucleosomal DNA propagates asymmetric opening and dissociation of the histone core. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, 334–339 (2017) .
25. Eickbush, T. H. & Moudrianakis, E. N. The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry* **17**, 4955–4964 (1978) .
26. Brandani, G. B., Tan, C. & Takada, S. The kinetic landscape of nucleosome assembly: A coarse-grained molecular dynamics study. *PLoS Comput Biol* **17**, e1009253 (2021) .

27. Terakawa, T. & Takada, S. RESPAC: Method to Determine Partial Charges in Coarse-Grained Protein Model and Its Application to DNA-Binding Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 711–721 (2014) .
28. Wang, M. D. *et al.* Force and Velocity Measured for Single Molecules of RNA Polymerase. *Science* **282**, 902–907 (1998) .
29. Kenzaki, H. *et al.* CafeMol: A Coarse-Grained Biomolecular Simulator for Simulating Proteins at Work. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 1979–1989 (2011) .
30. *Single Molecule Enzymology: Methods and Protocols*. vol. 778 (Humana Press, Totowa, NJ, 2011) .
31. Polach, K. J. & Widom, J. Mechanism of Protein Access to Specific DNA Sequences in Chromatin: A Dynamic Equilibrium Model for Gene Regulation. *Journal of Molecular Biology* **254**, 130–149 (1995) .
32. Abràmoff, M. D. Image Processing with ImageJ. 7.
33. Schones, D. E. *et al.* Dynamic Regulation of Nucleosome Positioning in the Human Genome. *Cell* **132**, 887–898 (2008) .
34. Jain, M. *et al.* Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat Biotechnol* **36**, 338–345 (2018) .
35. Tompitak, M., Barkema, G. T. & Schiessel, H. Benchmarking and refining probability-based models for nucleosome-DNA interaction. *BMC Bioinformatics* **18**, 157 (2017) .
36. Eslami-Mossallam, B., Schram, R. D., Tompitak, M., van Noort, J. & Schiessel, H. Multiplexing Genetic and Nucleosome Positioning Codes: A Computational Approach. *PLoS ONE* **11**, e0156905 (2016) .
37. Olson, W. K., Gorin, A. A., Lu, X.-J., Hock, L. M. & Zhurkin, V. B. DNA sequence-dependent deformability deduced from protein-DNA crystal complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 11163–11168 (1998) .
38. van der Heijden, T., van Vugt, J. J. F. A., Logie, C. & van Noort, J. Sequence-based prediction of single nucleosome positioning and genome-wide nucleosome occupancy. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, E2514–E2522 (2012) .
39. Chang, H.-W., Pandey, M., Kulaeva, O. I., Patel, S. S. & Studitsky, V. M. Overcoming a nucleosomal barrier to replication. *Sci. Adv.* **2**, e1601865 (2016) .
40. Kireeva, M. L. *et al.* Nature of the Nucleosomal Barrier to RNA Polymerase II. *Molecular Cell* **18**, 97–108 (2005) .

41. Calinski, T. & Harabasz, J. A dendrite method for cluster analysis. *Comm. in Stats. - Theory & Methods* **3**, 1–27 (1974) .
42. Alabert, C. & Groth, A. Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 153–167 (2012) .
43. Venkatesh, S. & Workman, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 178–189 (2015) .
44. Jamaï, A., Imoberdorf, R. M. & Strubin, M. Continuous Histone H2B and Transcription-Dependent Histone H3 Exchange in Yeast Cells outside of Replication. *Molecular Cell* **25**, 345–355 (2007) .
45. Xu, M. *et al.* Partitioning of Histone H3-H4 Tetramers During DNA Replication–Dependent Chromatin Assembly. *Science* **328**, 94–98 (2010) .
46. Gurard-Levin, Z. A., Quivy, J.-P. & Almouzni, G. Histone Chaperones: Assisting Histone Traffic and Nucleosome Dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 487–517 (2014) .
47. Pardal, A. J., Fernandes-Duarte, F. & Bowman, A. J. The histone chaperoning pathway: from ribosome to nucleosome. *Essays in Biochemistry* **63**, 29–43 (2019) .
48. Böhm, V. *et al.* Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface. *Nucleic Acids Research* **39**, 3093–3102 (2011) .
49. Eitoku, M., Sato, L., Senda, T. & Horikoshi, M. Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 414–444 (2008) .
50. Park, Y.-J. & Luger, K. The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 1248–1253 (2006) .
51. Ishimi, Y., Kojima, M., Yamada, M. & Hanaoka, F. Binding mode of nucleosome-assembly protein (AP-I) and histones. *Eur J Biochem* **162**, 19–24 (1987) .
52. Park, Y.-J., Chodaparambil, J. V., Bao, Y., McBryant, S. J. & Luger, K. Nucleosome Assembly Protein 1 Exchanges Histone H2A-H2B Dimers and Assists Nucleosome Sliding*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 1817–1825 (2005) .
53. Lorch, Y., Maier-Davis, B. & Kornberg, R. D. Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 3090–3093 (2006) .

54. Levchenko, V., Jackson, B. & Jackson, V. Histone Release during Transcription: Displacement of the Two H2A–H2B Dimers in the Nucleosome Is Dependent on Different Levels of Transcription-Induced Positive Stress. *Biochemistry* **44**, 5357–5372 (2005) .
55. Kuryan, B. G. *et al.* Histone density is maintained during transcription mediated by the chromatin remodeler RSC and histone chaperone NAP1 in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 1931–1936 (2012) .
56. Fujii-Nakata, T., Ishimi, Y., Okuda, A. & Kikuchi, A. Functional Analysis of Nucleosome Assembly Protein, NAP-1. *J. Biol. Chem.* **267**, 20980–20986 (1992) .
57. D’Arcy, S. *et al.* Chaperone Nap1 Shields Histone Surfaces Used in a Nucleosome and Can Put H2A-H2B in an Unconventional Tetrameric Form. *Molecular Cell* **51**, 662–677 (2013) .
58. Aguilar-Gurrieri, C. *et al.* Structural evidence for Nap1-dependent H2A–H2B deposition and nucleosome assembly. *EMBO J* **35**, 1465–1482 (2016) .
59. Park, Y.-J., McBryant, S. J. & Luger, K. A β -Hairpin Comprising the Nuclear Localization Sequence Sustains the Self-associated States of Nucleosome Assembly Protein 1. *Journal of Molecular Biology* **375**, 1076–1085 (2008) .
60. Fiser, A. & Šali, A. Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. in *Methods in Enzymology* vol. 374 461–491 (Elsevier, 2003) .
61. Kumar, S., Rosenberg, J. M., Bouzida, D., Swendsen, R. H. & Kollman, P. A. THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* **13**, 1011–1021 (1992) .
62. Tóth, K. F., Mazurkiewicz, J. & Rippe, K. Association States of Nucleosome Assembly Protein 1 and Its Complexes with Histones. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 15690–15699 (2005) .
63. Crickard, J. B., Moevus, C. J., Kwon, Y., Sung, P. & Greene, E. C. Rad54 Drives ATP Hydrolysis-Dependent DNA Sequence Alignment during Homologous Recombination. *Cell* **181**, 1380-1394.e18 (2020) .
64. Arimura, Y., Tachiwana, H., Oda, T., Sato, M. & Kurumizaka, H. Structural Analysis of the Hexasome, Lacking One Histone H2A/H2B Dimer from the Conventional Nucleosome. *Biochemistry* **51**, 3302–3309 (2012) .

65. Dong, F. & van Holde, K. E. Nucleosome positioning is determined by the (H3-H4) 2 tetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 10596–10600 (1991) .
66. Tomschik, M., Karymov, M. A., Zlatanova, J. & Leuba, S. H. The Archaeal Histone-Fold Protein HMf Organizes DNA into Bona Fide Chromatin Fibers. *Structure* **9**, 1201–1211 (2001) .
67. Andrews, A. J., Downing, G., Brown, K., Park, Y.-J. & Luger, K. A Thermodynamic Model for Nap1-Histone Interactions. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 32412–32418 (2008) .
68. Kassabov, S. R., Zhang, B., Persinger, J. & Bartholomew, B. SWI/SNF Unwraps, Slides, and Rewraps the Nucleosome. *Molecular Cell* **11**, 391–403 (2003) .
69. Walfridsson, J., Khorosjutina, O., Matikainen, P., Gustafsson, C. M. & Ekwall, K. A genome-wide role for CHD remodelling factors and Nap1 in nucleosome disassembly. *EMBO J* **26**, 2868–2879 (2007) .
70. van Vugt, J. J. F. A. *et al.* Multiple Aspects of ATP-Dependent Nucleosome Translocation by RSC and Mi-2 Are Directed by the Underlying DNA Sequence. *PLoS ONE* **4**, e6345 (2009) .
71. Tokuda, J. M. *et al.* The ATPase motor of the Chd1 chromatin remodeler stimulates DNA unwrapping from the nucleosome. *Nucleic Acids Research* **46**, 4978–4990 (2018) .
72. Formosa, T. & Winston, F. The role of FACT in managing chromatin: disruption, assembly, or repair? *Nucleic Acids Research* **48**, 11929–11941 (2020) .
73. Chen, P. *et al.* Functions of FACT in Breaking the Nucleosome and Maintaining Its Integrity at the Single-Nucleosome Level. *Molecular Cell* **71**, 284-293.e4 (2018) .
74. Farnung, L., Ochmann, M., Engholm, M. & Cramer, P. Structural basis of nucleosome transcription mediated by Chd1 and FACT. *Nat Struct Mol Biol* **28**, 382–387 (2021) .
75. Zion, E. H., Chandrasekhara, C. & Chen, X. Asymmetric inheritance of epigenetic states in asymmetrically dividing stem cells. *Current Opinion in Cell Biology* **67**, 27–36 (2020) .
76. Escobar, T. M., Loyola, A. & Reinberg, D. Parental nucleosome segregation and the inheritance of cellular identity. *Nat Rev Genet* **22**, 379–392 (2021) .
77. Urban, J. A., Ranjan, R. & Chen, X. Asymmetric Histone Inheritance: Establishment, Recognition, and Execution. *Annu. Rev. Genet.* **56**, 113–143 (2022) .
78. Fitz-James, M. H. & Cavalli, G. Molecular mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Nat Rev Genet* **23**, 325–341 (2022) .

79. Grewal, S. I. S. The molecular basis of heterochromatin assembly and epigenetic inheritance. *Molecular Cell* **83**, 1767–1785 (2023) .
80. Allshire, R. C. & Madhani, H. D. Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 229–244 (2018) .
81. Stewart-Morgan, K. R., Petryk, N. & Groth, A. Chromatin replication and epigenetic cell memory. *Nat Cell Biol* **22**, 361–371 (2020) .
82. Zhang, W., Feng, J. & Li, Q. The replisome guides nucleosome assembly during DNA replication. *Cell Biosci* **10**, 37 (2020) .
83. Wenger, A. *et al.* Symmetric inheritance of parental histones governs epigenome maintenance and embryonic stem cell identity. *Nat Genet* **55**, 1567–1578 (2023) .
84. Nathanailidou, P. *et al.* Specialized replication of heterochromatin domains ensures self-templated chromatin assembly and epigenetic inheritance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **121**, e2315596121 (2024) .
85. Tian, C. *et al.* Impaired histone inheritance promotes tumor progression. *Nat Commun* **14**, 3429 (2023) .
86. Foltman, M. *et al.* Eukaryotic Replisome Components Cooperate to Process Histones During Chromosome Replication. *Cell Reports* **3**, 892–904 (2013) .
87. Attali, I., Botchan, M. R. & Berger, J. M. Structural Mechanisms for Replicating DNA in Eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **90**, 77–106 (2021) .
88. Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J. J. & Botchan, M. R. Activation of the MCM2-7 Helicase by Association with Cdc45 and GINS Proteins. *Molecular Cell* **37**, 247–258 (2010) .
89. Patel, J. A. & Kim, H. The TIMELESS effort for timely DNA replication and protection. *Cell. Mol. Life Sci.* **80**, 84 (2023) .
90. Yu, C. *et al.* A mechanism for preventing asymmetric histone segregation onto replicating DNA strands. *Science* **361**, 1386–1389 (2018) .
91. Petryk, N. *et al.* MCM2 promotes symmetric inheritance of modified histones during DNA replication. *Science* **361**, 1389–1392 (2018) .
92. Gan, H. *et al.* The Mcm2-Ctf4-Pol α Axis Facilitates Parental Histone H3-H4 Transfer to Lagging Strands. *Molecular Cell* **72**, 140-151.e3 (2018) .

93. Tian, C. *et al.* DNA polymerase delta governs parental histone transfer to DNA replication lagging strand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **121**, e2400610121 (2024) .
94. Serra-Cardona, A. *et al.* The PCNA–Pol δ complex couples lagging strand DNA synthesis to parental histone transfer for epigenetic inheritance. *Sci. Adv.* **10**, eadn5175 (2024) .
95. Li, N. *et al.* Parental histone transfer caught at the replication fork. *Nature* (2024) doi:10.1038/s41586-024-07152-2.
96. Yu, J. *et al.* A replisome-associated histone H3-H4 chaperone required for epigenetic inheritance. *Cell* **187**, 5010-5028.e24 (2024) .
97. Charlton, S. J. *et al.* The fork protection complex promotes parental histone recycling and epigenetic memory. *Cell* **187**, 5029-5047.e21 (2024) .
98. Wang, X. *et al.* The N-terminus of Spt16 anchors FACT to MCM2–7 for parental histone recycling. *Nucleic Acids Research* **51**, 11549–11567 (2023) .
99. Fang, Y. *et al.* Coordination of histone chaperones for parental histone segregation and epigenetic inheritance. *Genes Dev.* **38**, 189–204 (2024) .
100. Karri, S. *et al.* Defective transfer of parental histone decreases frequency of homologous recombination by increasing free histone pools in budding yeast. *Nucleic Acids Research* **52**, 5138–5151 (2024) .
101. Richet, N. *et al.* Structural insight into how the human helicase subunit MCM2 may act as a histone chaperone together with ASF1 at the replication fork. *Nucleic Acids Research* **43**, 1905–1917 (2015) .
102. Huang, H. *et al.* A unique binding mode enables MCM2 to chaperone histones H3–H4 at replication forks. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 618–626 (2015) .
103. Yuan, Z. *et al.* DNA unwinding mechanism of a eukaryotic replicative CMG helicase. *Nat Commun* **11**, 688 (2020) .
104. Yuan, Z., Georgescu, R., Schauer, G. D., O'Donnell, M. E. & Li, H. Structure of the polymerase ϵ holoenzyme and atomic model of the leading strand replisome. *Nat Commun* **11**, 3156 (2020) .
105. Goswami, P. *et al.* Structure of DNA-CMG-Pol epsilon elucidates the roles of the non-catalytic polymerase modules in the eukaryotic replisome. *Nat Commun* **9**, 5061 (2018) .
106. Deshpande, I. *et al.* Structural Basis of Mec1-Ddc2-RPA Assembly and Activation on Single-Stranded DNA at Sites of Damage. *Molecular Cell* **68**, 431-445.e5 (2017) .

107. Park, C.-J. Solution structure of the DNA-binding domain of RPA from *Saccharomyces cerevisiae* and its interaction with single-stranded DNA and SV40 T antigen. *Nucleic Acids Research* **33**, 4172–4181 (2005) .
108. Bochkarev, A., Pfuetzner, R. A., Edwards, A. M. & Frappier, L. Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. *Nature* **385**, 176–181 (1997) .
109. Yates, L. A. *et al.* A structural and dynamic model for the assembly of Replication Protein A on single-stranded DNA. *Nat Commun* **9**, 5447 (2018) .
110. Feldkamp, M. D., Mason, A. C., Eichman, B. F. & Chazin, W. J. Structural Analysis of Replication Protein A Recruitment of the DNA Damage Response Protein SMARCAL1. *Biochemistry* **53**, 3052–3061 (2014) .
111. Lu, X.-J. & Olson, W. K. 3DNA: a versatile, integrated software system for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures. *Nat Protoc* **3**, 1213–1227 (2008) .
112. Hinckley, D. M., Freeman, G. S., Whitmer, J. K. & de Pablo, J. J. An experimentally-informed coarse-grained 3-site-per-nucleotide model of DNA: Structure, thermodynamics, and dynamics of hybridization. *The Journal of Chemical Physics* **139**, 144903 (2013) .
113. Hogg, M. *et al.* Structural basis for processive DNA synthesis by yeast DNA polymerase ϵ . *Nat Struct Mol Biol* **21**, 49–55 (2014) .
114. Murayama, Y. *et al.* Coordination of cohesin and DNA replication observed with purified proteins. *Nature* **626**, 653–660 (2024) .
115. Yeeles, J. T. P., Deegan, T. D., Janska, A., Early, A. & Diffley, J. F. X. Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature* **519**, 431–435 (2015) .
116. Can, G., Kauerhof, A. C., Macak, D. & Zegerman, P. Helicase Subunit Cdc45 Targets the Checkpoint Kinase Rad53 to Both Replication Initiation and Elongation Complexes after Fork Stalling. *Molecular Cell* **73**, 562-573.e3 (2019) .
117. Serra-Cardona, A. *et al.* A mechanism for Rad53 to couple leading- and lagging-strand DNA synthesis under replication stress in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **118**, e2109334118 (2021) .
118. Kurat, C. F., Yeeles, J. T. P., Patel, H., Early, A. & Diffley, J. F. X. Chromatin Controls DNA Replication Origin Selection, Lagging-Strand Synthesis, and Replication Fork Rates. *Molecular Cell* **65**, 117–130 (2017) .

119. Lewis, J. S. *et al.* Tunability of DNA Polymerase Stability during Eukaryotic DNA Replication. *Molecular Cell* **77**, 17-25.e5 (2020) .
120. Ercilla, A. *et al.* Physiological Tolerance to ssDNA Enables Strand Uncoupling during DNA Replication. *Cell Reports* **30**, 2416-2429.e7 (2020) .
121. Liu, S. *et al.* RPA binds histone H3-H4 and functions in DNA replication–coupled nucleosome assembly. *Science* **355**, 415–420 (2017) .
122. Gruszka, D. T., Xie, S., Kimura, H. & Yardimci, H. Single-molecule imaging reveals control of parental histone recycling by free histones during DNA replication. *Sci. Adv.* **6**, eabc0330 (2020) .
123. Escobar, T. M. *et al.* Active and Repressed Chromatin Domains Exhibit Distinct Nucleosome Segregation during DNA Replication. *Cell* **179**, 953-963.e11 (2019) .
124. Singh, A. & Chakrabarti, S. Diffusion controls local versus dispersed inheritance of histones during replication and shapes epigenomic architecture. *PLoS Comput Biol* **19**, e1011725 (2023) .
125. Brennan, L. D., Forties, R. A., Patel, S. S. & Wang, M. D. DNA looping mediates nucleosome transfer. *Nat Commun* **7**, 13337 (2016) .
126. Goehring, L., Huang, T. T. & Smith, D. J. Transcription–Replication Conflicts as a Source of Genome Instability. *Annu. Rev. Genet.* **57**, 157–179 (2023) .
127. Gómez-González, B. & Aguilera, A. Transcription-mediated replication hindrance: a major driver of genome instability. *Genes Dev.* **33**, 1008–1026 (2019) .
128. Chacin, E. *et al.* Establishment and function of chromatin organization at replication origins. *Nature* **616**, 836–842 (2023) .
129. Oberbeckmann, E. *et al.* Ruler elements in chromatin remodelers set nucleosome array spacing and phasing. *Nat Commun* **12**, 3232 (2021) .
130. Azmi, I. F. *et al.* Nucleosomes influence multiple steps during replication initiation. *eLife* **6**, e22512 (2017) .
131. Clausen, A. R. *et al.* Tracking replication enzymology in vivo by genome-wide mapping of ribonucleotide incorporation. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 185–191 (2015) .
132. Daigaku, Y. *et al.* A global profile of replicative polymerase usage. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 192–198 (2015) .

133. Yeeles, J. T. P., Janska, A., Early, A. & Diffley, J. F. X. How the Eukaryotic Replisome Achieves Rapid and Efficient DNA Replication. *Molecular Cell* **65**, 105–116 (2017) .
134. Devbhandari, S., Jiang, J., Kumar, C., Whitehouse, I. & Remus, D. Chromatin Constrains the Initiation and Elongation of DNA Replication. *Molecular Cell* **65**, 131–141 (2017) .
135. Safaric, B. *et al.* The fork protection complex recruits FACT to reorganize nucleosomes during replication. *Nucleic Acids Research* **50**, 1317–1334 (2022) .
136. Baretić, D. *et al.* Cryo-EM Structure of the Fork Protection Complex Bound to CMG at a Replication Fork. *Molecular Cell* **78**, 926-940.e13 (2020) .
137. Jones, M. L., Aria, V., Baris, Y. & Yeeles, J. T. P. How Pol α -primase is targeted to replisomes to prime eukaryotic DNA replication. *Molecular Cell* **83**, 2911-2924.e16 (2023) .
138. Georgieva, D., Liu, Q., Wang, K. & Egli, D. Detection of base analogs incorporated during DNA replication by nanopore sequencing. *Nucleic Acids Research* **48**, e88–e88 (2020) .
139. Müller, C. A. *et al.* Capturing the dynamics of genome replication on individual ultra-long nanopore sequence reads. *Nat Methods* **16**, 429–436 (2019) .
140. Nandakumar, D., Pandey, M. & Patel, S. S. Cooperative base pair melting by helicase and polymerase positioned one nucleotide from each other. *eLife* **4**, e06562 (2015) .
141. Williams, S. L. *et al.* Replication-induced DNA secondary structures drive fork uncoupling and breakage. *The EMBO Journal* **42**, e114334 (2023) .
142. Casas-Delucchi, C. S., Daza-Martin, M., Williams, S. L. & Coster, G. The mechanism of replication stalling and recovery within repetitive DNA. *Nat Commun* **13**, 3953 (2022) .
143. Smith, D. J. & Whitehouse, I. Intrinsic coupling of lagging-strand synthesis to chromatin assembly. *Nature* **483**, 434–438 (2012) .
144. Osmundson, J. S., Kumar, J., Yeung, R. & Smith, D. J. Pif1-family helicases cooperatively suppress widespread replication-fork arrest at tRNA genes. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 162–170 (2017) .
145. Yadav, T. & Whitehouse, I. Replication-Coupled Nucleosome Assembly and Positioning by ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Enzymes. *Cell Reports* **15**, 715–723 (2016) .
146. Chafin, D. R. Human DNA ligase I efficiently seals nicks in nucleosomes. *The EMBO Journal* **19**, 5492–5501 (2000) .

147. Huggins, C. F. *et al.* Flap Endonuclease 1 Efficiently Cleaves Base Excision Repair and DNA Replication Intermediates Assembled into Nucleosomes. *Molecular Cell* **10**, 1201–1211 (2002) .
148. Ziane, R., Camasses, A. & Radman-Livaja, M. The asymmetric distribution of RNA polymerase II and nucleosomes on replicated daughter genomes is caused by differences in replication timing between the lagging and the leading strand. *Genome Res.* **32**, 337–356 (2022) .
149. Nagae, F., Murayama, Y. & Terakawa, T. Molecular mechanism of parental H3/H4 recycling at a replication fork. *Nat Commun* **15**, 9485 (2024) .

謝辞

本研究の遂行のすべての場面でお世話になった寺川剛先生に深く感謝を申し上げます。また粗視化モデルの構築やシミュレーション結果解析、結果の考察において実りのある議論をして頂いた、高田彰二先生、Giovanni B. Brandani 先生に深く感謝を申し上げます。

また第3章、第4章の研究においてDNA複製実験を担当していただき、かつ研究遂行のサポートをしていただいた国立遺伝学研究所の村山泰斗准教授、遠藤静子さんに深く感謝を申し上げます。さらにヒストン精製やヌクレオソーム再構成の手順についてご指導賜りました東京大学定量生命科学研究所、胡桃坂仁志先生に謝意を述べさせていただきます。ありがとうございました。