

## 研究終了報告書

### 「DNA カーテンによるエピゲノム修飾継承の一分子計測」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：寺川 剛

#### 1. 研究のねらい

真核生物では細胞分裂にともなって、DNA 配列情報だけでなく、ヌクレオソームを構成するヒストンの末端化学修飾(エピゲノム修飾)も娘細胞に継承されることが知られている。また、ヒストン化学修飾は、DNA 複製装置とヌクレオソームの衝突にともなって親DNAから解離したヒストンが、複製された2本の娘DNAに再結合し、ヌクレオソームを再形成することによって継承されるとされてきた。しかし、DNA 複製装置とヌクレオソームの衝突にともなうヒストンの解離・再結合(ヒストンリサイクル)は可視化されたことがなかった。したがって、ヒストンリサイクルの実現可能性、それに必要最低限の分子コンポーネント、そしてその分子機構はわかっていなかった。

それらを明らかにするために本研究では、真核生物(出芽酵母)のDNA複製装置とヌクレオソームの衝突を*in vitro*で再構成し、その反応をDNAカーテン法による1分子蛍光イメージングとナノポアシーケンシングによって可視化することで、ヒストンリサイクルの実現可能性を検証し、必要最低限の分子コンポーネントを明らかにしようと考えた。また、分子動力学シミュレーションによって、ヒストンリサイクルにおけるタンパク質・DNA間相互作用と時間変化をつぶさに明らかにし、その分子機構を明らかにしようと考えた。

本研究により、ヒストンリサイクルに必要最低限の分子コンポーネントが明らかになれば、人工細胞にエピゲノム修飾継承を実装できるようになることが期待される。真核生物のエピゲノム修飾継承では、2つの娘細胞への継承が対称な場合(未分化維持)と非対称な場合(細胞分化)があることが知られている。しかし、対称・非対称継承を決定する分子コンポーネントや分子機構は明らかになっていない。本研究でヒストンリサイクルを可視化する方法が確立されれば、それらの分子コンポーネントや分子機構を明らかにし、分化可能な人工細胞を創出できることが期待される。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

本研究では、「(A) *in vitro* におけるヒストンリサイクルの再構成」、「(B) DNA カーテン法を用いたヒストンリサイクルの1分子蛍光イメージング」、「(C) ナノポアシーケンシングを用いたヒストンリサイクルの MNase-seq アッセイ(村山泰斗氏との領域内共同研究)」、「(D) ヒストンリサイクルの分子動力学シミュレーション」に取り組んだ。これらの研究で、ヒストンリサイクルの実現可能性を検証し、それに必要最低限の分子コンポーネント、そしてその分子機構を明らかにすることができた。また、さきがけ研究をきっかけとして始まった領域外共同研究として「(E) DNA 複製装置の組み立て過程の高速原子間力顕微鏡計測」に取り組んだ。

### (2) 詳細

#### 研究テーマ A「*in vitro* におけるヒストンリサイクルの再構成」

本研究では、DNA 複製装置の再構成に必要な 18 種類のタンパク質とヌクレオソームの再構成に必要なヒストンオクタマーの精製を行った。ヌクレオソームを再構成した DNA 基質上に、DNA 複製装置を再構成して、Mcm10 を添加によって複製を開始させた。次に、反応産物を MNase で処理し、アガロースゲル電気泳動で解析した。その結果、ヒストンリサイクルに由来するバンド約 100 塩基対のバンドを観察することができた。この結果は、DNA 複製装置とヌクレオソームの衝突にともなってヒストンがリサイクルされることを示した。また、今回用いた 18 種類のタンパク質がヒストンリサイクルに必要な最低限の分子コンポーネントであることがわかった。

#### 研究テーマ B「DNA カーテン法を用いたヒストンリサイクルの1分子蛍光イメージング」

DNA カーテンは、ガラス基板上にナノ描画したパターンに、DNA を整列固定したものである。1視野で約 1000 本の DNA をイメージングできるため、反応確率が低い DNA 複製装置再構成のようなプロセスの 1 分子イメージングに最適である。本研究では、まず、 $\lambda$ ファージのゲノム DNA (48 キロ塩基対) 上に、5 個程度のヌクレオソームを再構成し、これらを用いて DNA カーテンを作成した。これを 1 分子蛍光イメージングすると、ヌクレオソームのシグナルを観察することができた。また、DNA カーテン上に DNA 複製装置を再構成すると、複製装置のシグナルを観察することができた。これらの結果は、期待通りの再構成を行うことができていることを示した。

#### 研究テーマ C「ナノポアシーケンシングを用いたヒストンリサイクルの MNase-seq アッセイ」

ナノポアシーケンサは、DNA 中で鎖状に連なったヌクレオチドのそれぞれがナノポアを通過する際に生じさせる電気信号の変化から DNA 配列を決定する装置である。研究テーマ A で、DNA 複製装置とヌクレオソームの衝突の反応産物を MNase で処理した結果、ヒストンリサイクルを示す約 100 塩基対のバンドを観察することができたため、これをナノポアシーケンサ解析することで、ヒストンが再結合した DNA 上の位置を定量することができると考えた。

この実験を行うためには、テンプレート DNA と複製された DNA を「見分ける」手法が必要で

ある。そこでまず、ビオチン化ヌクレオチドが取り込まれた DNA と取り込まれていない DNA をナノポアシーケンシングし、電気信号を取得した。これらの電気信号を用いてディープニューラルネットワークのパラメータを機械学習した。結果としてビオチン化ヌクレオチドが取り込まれた DNA と取り込まれていない DNA を 98.7% の精度で「見分ける」分類器を作成することができた。

次に、ビオチン化ヌクレオチドを使って複製反応を起こすことで、複製された DNA にビオチン化ヌクレオチドが取り込まれるようにした。そして、DNA 複製装置とヌクレオソームの衝突の反応産物を MNase で処理したものをナノポアシーケンシングした。上記の分類器を用いてビオチン化ヌクレオチドが取り込まれた複製後の DNA 配列を取り出してテンプレート DNA 上にマッピングした結果、ヒストンは衝突地点の約 50 塩基対上流にリサイクルされることがわかった。また、配列情報からリーディング鎖とラギング鎖のどちらにヒストンがリサイクルされているかを解析した結果、リーディング鎖により多くのヒストンがリサイクルされていることがわかった。本研究では、*in vitro* における DNA 複製装置とヌクレオソームの衝突にともなうヒストンリサイクルで、ヒストンがリサイクルされる鎖の種類（リーディング鎖またはラギング鎖）と DNA 上の位置を定量する手法を確立することができた。

#### 研究テーマ D「ヒストンリサイクルの分子動力学シミュレーション」

本研究では、トランスロケース (DNA 複製装置を模したもの) とヌクレオソームの衝突の分子動力学シミュレーションを行い、その結果を制限酵素アッセイと MNase アッセイで検証することにより、ヌクレオソームが、トランスロケースとの衝突に伴って、「レーン・スイッチ機構」に基づいて、下流に再配置されることを明らかにすることができた [成果リスト 1, *Nucleic Acid Research* (2021) 49:9066]。この機構では、トランスロケースがヒストンに巻き付く DNA を部分的に引き剥がし、露出した DNA 結合領域 (レーン) に残りの DNA が再結合して、下流への再配置が起きる。この結果は、DNA 複製装置とヌクレオソームの単純な衝突が、ヒストンリサイクルを引き起こさないことを示唆した。

また、本研究では電気泳動と分子動力学シミュレーションにより、ヒストンシャペロン Nap1 の存在下でトランスロケースとヌクレオソームが衝突すると、H2A/H2B ヘテロ2量体の解離が誘導され、ヘキサソームが形成されることを明らかにした。これらの結果は、Mcm2-7 のヒストンシャペロン活性が、「レーン・スイッチ機構」によるヌクレオソームの下流への再配置を防ぎ、エピゲノム修飾継承に重要な役割を果たすことを示唆した [*Nucleic Acid Research* 投稿中]。

さらに、本研究では DNA 複製装置 (Mcm2-7、Cdc45、GINS、Pol  $\epsilon$  の複合体) と H3/H4 ヒストンオクタマーと複製された DNA の複合体の分子動力学シミュレーションを行った。その結果、初期構造で Mcm2 に結合していたヒストンオクタマーが、複製された DNA に結合 (ヒストンリサイクル) する様子を観察することができた。また、このシミュレーション条件では、リーディング鎖とラギング鎖にほぼ等確率でヒストンオクタマーが結合することがわかった。また、Cdc45 とヒストンオクタマーの静電相互作用を無くすと、リーディング鎖への結合確率が著しく減少した

ことから、この相互作用がヒストンリサイクルに重要であることが示唆された。さらに、ラギング鎖に RPA を結合させると、ラギング鎖への結合確率が著しく減少したことから、RPA の結合がヒストンリサイクルを抑制することが示唆された。また、Pol  $\epsilon$  による DNA の曲げがリーディング鎖へのヒストンリサイクルを促進することも示唆された。これらのシミュレーション結果は、ヒストンリサイクルの詳細な分子機構を明らかにした。

### 3. 今後の展開

本研究では、*in vitro* における DNA 複製装置とヌクレオソームの衝突にともなうヒストンリサイクルで、ヒストンがリサイクルされる鎖の種類(リーディング鎖またはラギング鎖)と DNA 上の位置を定量する手法を確立することができた。この手法を用いて解析した結果、必要最低限の分子コンポーネントによるヒストンリサイクルでは、多くのヒストンはリーディング鎖にリサイクルされることがわかった。この結果は、細胞内で両方の鎖にほぼ均等にリサイクルされるという知見とは一致しない。このことは、必要最低限以外の分子コンポーネントが均等なリサイクルを実現していることを示唆している。本研究で確立した手法を用いた今後の研究で、5 年以内を目途にそれらの分子コンポーネントが明らかになることが期待される。

本研究では、ヒストンリサイクルに必要な最低限の分子コンポーネントを明らかにすることができた。また、上述のように再構成系におけるヒストンリサイクルでは、多くのヒストンがリーディング鎖にリサイクルされることもわかった。この再構成系を将来的に創出されるだろう人工細胞で発現させることで、10 年以内を目途に非対称なエピゲノム修飾を実装可能であると考えられる。分化可能な人工細胞創出のインパクトは大きい。

### 4. 自己評価

本さがけ研究の目的は、ヒストンリサイクルの実現可能性、それに必要最低限の分子コンポーネント、そしてその分子機構を明らかにすることであった。当初は DNA カーテン法を用いてこれを行うつもりであったが、残念ながら他グループに先を越されてしまったことから、より精度の高い計測を求められることとなった。そこで重点をおいて研究を進めてきた研究テーマ C「ナノポアシーケンシングを用いたヒストンリサイクルの MNase-seq アッセイ」と研究テーマ D「ヒストンリサイクルの分子動力学シミュレーション」では、当初の期待をはるかに上回る精度で、ヒストンリサイクルに必要な最低限の分子コンポーネント、およびその分子機構を明らかにすることができた。本さがけ研究で確立した、ナノポア MNase-seq アッセイは、今後ヒストンリサイクルの分子機構研究に広く応用されていくと考えられ、科学技術への波及効果は大きい。分化可能な人工細胞の創出に向けて、独創的・挑戦的かつ国際的に高水準の先駆的な基礎研究を推進でき、革新的技術のシーズを世界に先駆けて創出できたと考えている。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:5件

1. F Nagae, GB Brandani, S Takada, T Terakawa “The lane-switch mechanism for nucleosome repositioning by DNA translocase” <i>Nucleic Acid Research</i> (2021) 49 (16) : 9066-9076
DNA トランスロケース(DNA 複製装置を模したものとヌクレオソームの衝突の分子動力学シミュレーションを行い、その結果を制限酵素アッセイとMNaseアッセイで検証することにより、ヌクレオソームが、トランスロケースとの衝突に伴って、「レーン・スイッチ機構」に基づいて、下流に再配置されることを明らかにした。この結果は、DNA 複製装置とヌクレオソームの単純な衝突が、ヒストンリサイクルを引き起こさないことを示唆した。
2. H Koide, N Kodera, S Bisht, S Takada, T Terakawa “Modeling of DNA binding to the condensin hinge domain using molecular dynamics simulations guided by atomic force microscopy” <i>PLoS computational biology</i> (2021) 17 (7) : e1009265
コンデンシンは、染色体凝縮をつかさどる分子モーター (DNA トランスロケース) である [Terakawa et al. <i>Science</i> (2017) 358:672]。本研究では、酵母コンデンシンの高速原子間力顕微鏡観察を行い、そのデータを粗視化分子動力学シミュレーションに同化することで、ヒンジ領域に DNA が結合した新しい構造をモデリングした。この研究で培った技術が、研究テーマ E「DNA 複製装置の組み立て過程の高速原子間力顕微鏡計測」につながった。
3. K Inoue, S Takada, T Terakawa “Coarse-grained molecular dynamics simulations of base-pair mismatch recognition protein MutS sliding along DNA” <i>Biophysics and Physicobiology</i> (2022) 19 : e190015
MutS は、DNA 塩基対ミスマッチの修復をつかさどる DNA 結合タンパク質である。本研究では、MutS が DNA 上をスライディングしながらミスマッチを探索する過程を、粗視化分子動力学シミュレーションによって調べた。その結果、MutS が DNA の長軸に対して回転しながら拡散すること、および DNA の長軸周りの回転を抑制すると MutS の拡散が遅くなることがわかった。この研究で培ったシミュレーション技術が、研究テーマ D「ヒストンリサイクルの分子動力学シミュレーション」につながった。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Fritz Nagae, Giovanni B. Brandani, Shoji Takada, Tsuyoshi Terakawa “DNA translocases reposition a nucleosome by the unwrap-shift-rewrap mechanism” (2021) RIKEN BDR Symposium (ポスター発表)
2. Fritz Nagae, Giovanni B. Brandani, Shoji Takada, Tsuyoshi Terakawa “DNA translocase repositions a nucleosome by the lane-switch mechanism” (2021) 20th IUPAB Congress (ポスター発表)
3. Tsuyoshi Terakawa “Nucleosome repositioning dynamics upon collision with a translocase” (2021) 第 44 回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. Tsuyoshi Terakawa “トランスロケースとの衝突に伴うヌクレオソームの運命: エピゲノム継承の解明に向けて” (2022) 第 15 回エピジェネティクス研究会年会 (招待講演)
5. Fritz Nagae, Shoji Takada, Tsuyoshi Terakawa “Nap1 dismantles a H2A/H2B dimer from a

partially unwrapped nucleosome” (2022) 第 60 回日本生物物理学会年会 (ポスター発表)