

TAF-I のサブタイプ依存的な  
ヒストン H1 シャペロン活性制御機構

2017

筑波大学

鍛谷香織

筑波大学

博士（医学）学位論文

1. はじめに.....	3
2. 研究背景.....	4
2-1 クロマチン構造.....	4
2-2 コアヒストンによるクロマチン構造の制御.....	4
2-3 ヒストン H1 によるクロマチン構造の制御.....	5
2-4 ヒストンシャペロンによるクロマチン構造の制御.....	7
2-5 Template activating factor (TAF) の同定.....	8
2-6 TAF-I の生化学的機能.....	8
2-7 TAF-I の生理機能.....	9
2-8 ヒストン H1 シャペロンとしての TAF-I.....	9
3. 本研究の目的.....	11
4. TAF-I のサブタイプ依存的なヒストン H1 シャペロン活性制御機構の解析 .....	12
4-1 緒言.....	12
4-2 材料と方法.....	12
4-2-1 TAF-I N末端領域変異体の組換えタンパク質発現ベクターの作製.....	13
4-2-2 組換え TAF-I タンパク質の調製.....	17
4-2-3 ヒストン H1 解離アッセイ及び DNA 結合アッセイ.....	18
4-2-4 TAF-I の N 末端領域と共通領域の結合アッセイ (ゲルシフト法).....	19
4-2-5 ヒストン H1 結合アッセイ (ゲルシフト法).....	19
4-2-6 ウェスタンブロッティング法.....	19
4-2-7 FIAsh ラベリング法.....	20
4-2-8 EDC/NHS クロスリンク法.....	20
4-2-9 グルタルアルデヒドクロスリンク法.....	20
4-3 実験結果.....	21
4-3-1 TAF-I $\alpha$ N 末端領域によるヒストン H1 シャペロン活性の阻害.....	21
4-3-2 TAF-I $\alpha$ N 末端領域に存在する塩基性アミノ酸のヒストン H1 シャペロ ン活性への影響.....	22
4-3-3 ゲルシフトアッセイによる TAF-I $\alpha$ N 末端領域と TAF-I 共通領域の相互 作用の検討.....	22
4-3-4 TAF-I $\alpha$ N 末端領域と $\alpha$ 237-257C 末端領域の相互作用の検討.....	23
4-3-5 TAF-I $\alpha$ の 2 量体構造中における N 末端領域と C 末端領域の相互作用の 検討.....	24

4-3-6	TAF-I $\Delta$ C3 を用いた TAF-I N 末端領域による阻害機構の解析 .....	25
4-3-7	TAF-I $\alpha$ の塩濃度依存的なヒストン H1 シャペロン活性の変化 .....	26
5.	考察 .....	28
5-1	TAF-I $\alpha$ N 末端領域特異的なヒストン H1 シャペロン活性の抑制機構 .....	28
5-2	TAF-I $\alpha$ N 末端領域が相互作用する C 末端領域 .....	28
5-3	TAF-I $\Delta$ C3 を用いた TAF-I N 末端領域によるヒストン H1 シャペロン活性制御 .....	29
5-4	塩濃度依存的な TAF-I $\alpha$ のヒストン H1 シャペロン活性の変化 .....	30
6.	総括と展望 .....	31
6-1	総括 .....	31
6-2	今後の展望 .....	31
	参考文献 .....	33
	図表 .....	39
	謝辞 .....	66

## 1. はじめに

ヒトをはじめとする真核細胞の核内には、遺伝情報をコードする染色体 DNA が塩基性タンパク質であるヒストンと結合し、クロマチン構造を形成している。このクロマチン構造は決して一様ではなく、必要に応じて染色体 DNA から遺伝情報が引き出されるよう厳密に制御されており、遺伝子の塩基配列の変化によらない遺伝子発現制御（エピジェネティクス）において中心的な役割を果たす。

クロマチン構造が持つ生物学的意義は、大きく分けて 2 つあると考えられる (Fig 1)。1 つは適切な時期に適切な遺伝情報を発現させるための制御である。多細胞生物では、同一のゲノム情報をもった細胞が、発生および分化の過程を経て異なる遺伝子発現パターンを確立することで特有の機能を持つ細胞になり、それらが集合してひとつの個体を形成する。細胞の増殖、分化、細胞死といった細胞運命の決定には、適切な時期に適切な遺伝情報を引き出す機構が不可欠である。遺伝情報の発現異常は、本来あるべき細胞の状態を攪乱する。たとえば完成したヒトの体では、骨髄、消化管、皮膚などの一部の細胞を除き、多くの細胞は、静止期に入り頻繁に増殖することなく、その組織を維持するために存在する。遺伝子の発現異常によりそれら制御を攪乱されたもっとも顕著な例ががんである。クロマチン構造の持つもう一つの生物学的意義は、ゲノム情報を保持する染色体の安定な維持、複製、および子孫への分配を厳密に制御することである。細胞周期におけるゲノム機能の発現は、細胞周期に依存して動的に変化するクロマチン構造により厳密に制御される。例えば、クロマチンは複製の際には順序良く複製関連因子が染色体 DNA 上を移動できるように構造が変化し、分裂期には高度に凝縮し、G1 期に入れば今度は脱凝縮する。いずれかのステップにミスが生じれば、染色体不安定化を引き起こし、安定な遺伝情報の複製と分配に異常をきたす。

クロマチンの基本骨格であるヒストンには、機能的に異なる多様なヒストンバリエントが存在することや、細胞内現象に応じて様々な翻訳後修飾を受けることなどは、クロマチン構造の制御が複雑であることを示す。そして、ヒストンシャペロン因子群をはじめとするクロマチン構造を制御するトランス作動性因子も多様性に富み、そのクロマチン構造制御機構を理解することは重要である。

## 2. 研究背景

### 2-1 クロマチン構造

クロマチン構造は染色体 DNA が 4 種類のコアヒストン H2A、H2B、H3、H4 で形成されるヒストンオクタマーに巻き付いた、ヌクレオソームを最小単位とする (Fig 2A)。さらに、ヌクレオソーム間のリンカー DNA 領域に、ヒストン H1 が結合し、クロマトゾームを形成する。ヒストン H1 はクロマチン繊維どうしを束ねて、よりコンパクトなクロマチン構造の形成を促進する。クロマチン構造は核内で様な構造をとっているわけではなく、その凝縮の度合いで 2 種類に分けられる。ヘテロクロマチンは高度に染色体 DNA が凝縮した電子密度の高い領域として定義される。転写装置や、転写因子等、転写活性化に関与する因子群は、高度にクロマチン構造が凝縮した DNA には立体障害により近づけないため、ヘテロクロマチンは基本的には転写不活性な領域と考えられている (Fig 2B)。一方で、DNA の密度が比較的緩いユークロマチンでは、転写活性化に関与する因子群がアクセスしやすく、転写活性化状態にある遺伝子が比較的多い。このように、クロマチン構造は、ただ染色体 DNA を小さく折りたたんで核の中に収めるだけではなく、その構造を変化させることで遺伝子発現の制御に積極的に関わっている。また、クロマチン構造のダイナミックな変化は細胞周期を通じても観察される。S 期には、全染色体 DNA の複製と並行して、新規合成 DNA 鎖へのヒストン配置が制御されており、エピジェネティックな情報も複製される。分裂期になると、S 期で複製された染色体 DNA は、クロマチン構造全体が凝縮し、さらにコンパクトな構造をとって娘細胞に分配され、G1 期に入ると転写反応の再開に向けて、クロマチン構造は速やかに脱凝縮する。

このようなクロマチン構造の制御には、ATP 依存性クロマチンリモデリング因子、ヒストン修飾酵素、及びヒストンシャペロン因子が主に必要であると考えられている。これら 3 つの因子群が、現象に応じて協調的に働くことで適切なクロマチン構造の変化をもたらすことができる。

### 2-2 コアヒストンによるクロマチン構造の制御

2-1 でも述べたように、クロマチン構造の最小単位はヌクレオソームである。コアヒストンはヒストン H3-H4 テトラマーと 2 つの H2A-H2B ダイマーからなる 8 量体を形成している。コアヒストンに約 146 bp の DNA が約 1 回転半巻き付いた構造がヌクレオソームである。コアヒストンによるクロマチン構造の制御を考える上でもっとも重要なのが、ヒストン修飾による制御であり、リン酸化、アセチル化、メチル化などその種類は多岐にわたる。ヒストンタンパク質はそれぞれ N 末端と C 末端側に構造をとらないテール領域をもち、多く

のヒストン修飾はテール領域で検出される。ヒストンテールの修飾はその組み合わせによって、クロマチンに異なる制御を誘導すると考えられており、これはヒストンコード仮説と呼ばれている (Strahl et al., 2000)。ヒストン修飾の分子機能として、一つは DNA とコアヒストンとの相互作用に直接干渉することが考えられる。例えば、転写活性化状態のマーカールとして知られるヒストンのアセチル化は、ヒストンテールの正電荷を打ち消すことで、DNA とヒストンとの相互作用を弱め、クロマチン構造を緩ませると考えられる。ヒストン修飾のもう一つの分子機能として、ヒストン修飾を特異的に認識する因子群を特異的にリクルートすることでクロマチン構造を制御することが挙げられる。例えばヘテロクロマチンのマーカールとして知られるヒストン H3K9 のメチル化では、Heterochromatin protein (HP) 1 が自身の持つクロモドメインを介して、この修飾基に特異的に結合することでヘテロクロマチン化が促進される。このようなヒストンコード仮説の元、これまでに非常に多数のヒストン修飾の付加酵素 (Writer)、除去酵素 (Eraser)、特異的結合因子 (Reader) が同定され、生化学的機能および生理機能が活発に解析されている。

### 2-3 ヒストン H1 によるクロマチン構造の制御

ヒトやマウスの体細胞では、それぞれ独立の遺伝子から転写される 7 種類のヒストン H1 バリエントが存在し、それらは S 期にのみ新規合成される複製依存型 (H1.1、H1.2、H1.3、H1.4 と H1.5) と、細胞周期を通して新規合成される複製非依存型 (H1.0、H1.X) に分けられる (Happel and Doenecke, 2009)。ヒストン H1 は 2-2 で述べたヌクレオソーム間のリンカー DNA に結合し、クロマチン構造維持においてコアヒストンとは異なる役割を持つ。古くより、ヒストン H1 は、クロマチンをより密な構造に変換することで、転写に抑制的に働くと考えられていた (Bresnick et al., 1992)。しかし近年、ヒストン H1 が転写に抑制的に働くだけでなく、遺伝子によっては活性化にも働くことが報告されている。マウスの 3 種類のヒストン H1 バリエント *H1c*、*H1d*、*H1e* (それぞれヒト *H1.2*、*H1.3*、*H1.4* のマウスホモログ) をトリプルノックアウトした ES 細胞の解析から、ハウスキーピング遺伝子である *Hox* 遺伝子群の発現が減少することが知られている (Zhang et al., 2012)。この報告は、ヒストン H1 が単純に抑制的なクロマチン構造を構築するだけでは無く、転写制御においてより複雑な機能をもつことを示唆する。

ヒストン H1 は大きく 3 つの機能ドメインに分かれており、winged-helix と呼ばれる構造をとる Globular domain (GD) と、その N 末端側と C 末端側に、それぞれ構造をとらない N-terminal tail domain (NTD) と C-terminal tail domain (CTD) から構成される (Fig 3A)。近年、ヒストン H1 の主要な DNA 結合ドメインである GD とヌクレオソームの共結晶構造が報告された (Zhou et al., 2015)。非常に興味深いことに、その結合様式には 2 種類のパターンがあり (Fig 3B)、On-dyad model では、2 つのヌクレオソームの間で GD 中の 2 ヶ所

の領域が DNA と結合する。このことで、2 つのヌクレオソームはより近接し、クロマチン構造はより凝縮した形態をとると想定される。一方で、Off-dyad model では、2 つのヌクレオームの間で、ヒストン H1 の GD が一方の領域のみで DNA と結合する。このことで、GD と結合していない側のヌクレオソームが距離を保つことで、On-dyad model よりも少し緩いクロマチン構造をとると想定される。これらから想定されることとして、ヒストン H1 が結合することで、必ずしも高度に凝縮した構造をとるわけではなく、一部緩やかな構造をとることを示している。

また、ヒストン H1 の特徴として、同じクロマチン構造タンパク質であるコアヒストンよりも DNA 上でダイナミックな脱着反応が起こることがあげられる。ヒストン H1 のダイナミクスは、遺伝子発現パターンの変化と相関性があることが報告されている。マウス由来繊維芽細胞に筋肉分化に重要な転写因子である Myogenin を発現させると、Myogenin の下流遺伝子の転写量が増加することが知られている。この条件下で、並行してヒストン H1 のダイナミクスの増加が観察されており (Gong et al., 2002)、ヒストン H1 の DNA からの脱着回数が増えたことでクロマチンがより弛緩した構造をとり、転写活性化因子のプロモーター領域へのアクセシビリティが増加したと予想される。さらに、細胞の分化やリプログラミングの過程においても、ヒストン H1 のダイナミクスが変化することが報告されている (Yellajoshyula et al., 2006; Jullien et al., 2010)。未分化な ES 細胞では、ヒストン H1 などのクロマチン構成因子のダイナミクスが高いレベルで観察されるが、分化誘導後には低下する。これは、分化に伴って、クロマチンがより弛緩した構造からヒストンが安定に結合した密な構造へ変化することを示唆しており、ES 細胞の遺伝子発現パターンの変化と確立に重要であると考えられる。

ヒストン H1 バリエーション間の機能的差異については、現在のところ不明な点が多い。筋分化の過程では、筋分化の抑制因子である Msx1 が特異的にヒストン H1b (ヒト H1.5 のマウスホモログ) と相互作用し、分化抑制を行うことが報告されている (Lee et al., 2004)。また、子宮がん由来細胞において、ヒストン H1.3 特異的な発現の亢進が観察されている (Medrzycki et al., 2013)。各ヒストン H1 バリエーションを個々にノックダウンした細胞のマイクロアレイ解析を行うと、それぞれのバリエーションで制御する遺伝子群が異なることが報告されている。また、ヒストン H1.2 をノックダウンした場合でのみ細胞内クロマチンのヌクレオソーム間の距離 (スペーシング) の変化が認められるなど、バリエーション間で機能的に差異があることが示唆されている (Sancho et al., 2008)。しかし、それぞれの機能的役割の違いについてはいまだ不明である。一方で、ヒストン H1c をシングル、あるいはヒストン H1c、H1e をダブルでホモノックアウトしたマウスを作製しても生存には影響はない。ヒストン H1c、H1e をダブルでホモノックアウトしたマウスの胸腺では、ヒストン H1<sup>o</sup>、H1a、H1b の発現量が増加しており、ヒストン H1 遺伝子の機能補償が起こっていることが想定されている。一方、ヒストン H1c、H1e、H1d をトリプルでホモノックアウトすると、胎生致死



となる (Fan et al., 2003)。よって、ヒストン H1 バリエントはそれぞれバリエント間で重複した機能と個々に特異的な機能の両方を持つことが推測される。

#### 2-4 ヒストンシャペロンによるクロマチン構造の制御

ヒストンシャペロンは、ヒストンに直接相互作用し、ATP の加水分解に非依存的に DNA とヒストンとの脱着を制御する因子として定義され、クロマチン構造の構築や解体に関与する因子群である。また DNA とヒストンの非特異的な凝集を抑制し、ヒストンタンパク質の生理活性を維持する機能ももつ。最初に同定されたヒストンシャペロンは、*X. laevis* 卵抽出液より同定されたヌクレオプラスミンである。DNA と塩基性タンパク質を混合した場合、凝集体を作り、ヌクレオソーム構造は形成されない。しかし、同じ反応をヌクレオプラスミン存在下で行った場合、ヒストンと DNA による非特異的な凝集体は解消され生理的なヌクレオソーム構造が形成される。

ヒストンシャペロンは、大きくコアヒストンを標的とするものと、ヒストン H1 を標的とするものに分類される。このうちコアヒストンシャペロン因子群は複製依存的にクロマチン構造制御に関わるタイプ（複製依存型）と、複製に依存せずにクロマチン構造制御に関わるタイプ（複製非依存型）の 2 種類に分類される。もっともよく解析されている複製依存型ヒストンシャペロンである Chromatin assembly factor (CAF) -1 は、DNA 複製フォークに局在し、新規合成鎖にヒストンを供給する機能を持つ。一方で、複製非依存型ヒストンシャペロンの代表的な例として、Histone regulatory homolog A (HIRA) があげられ、複製非依存的に合成されるヒストン H3.3 のシャペロンとして機能する。ヒストン H3.3 は、HIRA によって特異的な遺伝子のクロマチン上に取り込まれ、転写を活性化する (Tagami et al., 2004)。

コアヒストンと同じように、ヒストン H1 にもシャペロンが存在するが、コアヒストンシャペロンに比較すると解析は進んでいない。最初にヒストン H1 のシャペロン機能を持つことが生化学的に明らかとなったのは、これまでヒストン H2A-H2B のシャペロンとして報告されていた Nucleosome assembly protein-1 (NAP-1) である (Shintomi et al., 2005)。さらに、ヒストン H3-H4 の相互作用因子として、*X. laevis* 卵抽出液より同定された N1/N2 の哺乳類ホモログ Nuclear auto-antigenic sperm protein (NASP)

が、ヒストン H1 の相互作用因子として同定された。NASP もまたコアヒストンとヒストン H1 両方のシャペロンとしても機能することが報告され、コア及びヒストン H1 のどちらをターゲットとするかで機能ドメインが異なる (Osakabe et al., 2010)。また、哺乳類の体細胞内で、ヒストン H1 のダイナミクスを制御するヒストン H1 シャペロンとして Template Activating Factor-I (TAF-I) が同定された (Kato et al., 2011)。TAF-I もコアヒストンとヒストン H1 の両方に機能するヒストンシャペロンのひとつである。

## 2-5 Template activating factor (TAF) の同定

歴史的に、真核生物の転写および複製機構は、アデノウイルスや SV40 などの DNA ウィルスをモデルとした生化学的解析により明らかにされてきた。それにより、アデノウイルスゲノム DNA からの転写及び複製に必要なウィルス由来、宿主由来の因子が同定された。アデノウイルスゲノムは二本鎖直鎖状の DNA に、ウィルス由来の塩基性タンパク質であるコアタンパク質が結合したクロマチン様構造（アデノウイルスコア複合体）をとっている。このアデノウイルスコア複合体を鋳型とした場合、裸のウィルスゲノム DNA からの転写及び複製に必要な因子だけでは反応を促進するのは不十分であり、さらなる因子が必要である。そこで、アデノウイルスコア複合体からの複製を促進する因子として、非感染 HeLa 細胞抽出液より Template activating factor (TAF)-I, II, III が同定された (Matsumoto et al., 1993) (Fig 4)。TAF-I は $\alpha$ 及び $\beta$ の 2 つのサブタイプが存在し、TAF-I $\beta$ は白血病関連遺伝子である SET と同一である (Nagata et al., 1995) (Fig 5A)。TAF-I はアデノウイルスの塩基性コアタンパク質 VII と相互作用し、アデノウイルスコア複合体の構造変換を行うことで転写・複製を促進することが明らかとなっている (Kawase et al., 1996; Haruki et al., 2003)。TAF-II は NAP-1 と同一の因子であり、TAF-I と NAP-1 は同じ NAP-1 ファミリーに属し、機能的にも構造的にもよく似たタンパク質である (Park et al., 2006b; Muto et al., 2007)。TAF-III も 2 つのサブタイプが存在し、核小体局在タンパク質 B23.1、B23.2 と同一因子であった。

## 2-6 TAF-I の生化学的機能

TAF-I はアデノウイルスの塩基性コアタンパク質 VII を介してアデノウイルスコア複合体の構造変換を行うことで、転写・複製を促進する。その後の解析から、TAF-I は *X. laevis* 由来の精子クロマチンに対しても脱凝縮活性を持つことが明らかとなった。アフリカツメガエルの精子クロマチンは、アデノウイルスのコアプロテイン VII と相同性の高い精子特異的タンパク質 (Sperm specific protein; Sp1-Sp6) で構成されている。精子クロマチンと TAF-I を反応液中でインキュベーションすると、上清中に精子特異的タンパク質が検出されることから、TAF-I は精子特異的タンパク質を精子クロマチン上から解離させることで、脱凝縮を促進すると考えられる (Matsumoto et al., 1999a)。また TAF-I はコアヒストンに対しても、コアヒストンシャペロンとして機能することが明らかとなっている (Kawase et al., 1996; Matsumoto et al., 1999b)。その後、細胞内において TAF-I がモデルレポーター遺伝子からの転写をヒストンのアセチル化とは独立に促進することが報告された。この報告において、TAF-I は、コアヒストンに結合し、クロマチン構造を変換することで転写を促進するモデルが提唱されている (Kato et al., 2007)。

Fig 5A に示すように、TAF-I には N 末端領域のみ異なる TAF-I $\alpha$  及び $\beta$ の 2 つのサブタイプが存在する。TAF-I の発現量は子宮頸がん由来 HeLa 細胞において、細胞周期を通じて一定であることが報告されている (Nagata et al., 1998)。また、TAF-I サブタイプの発現パターンは細胞種間で大きく異なることが報告されている (Nagata et al., 1995) (Fig 5B)。TAF-I $\alpha$ と TAF-I $\beta$ は同一遺伝子座に存在し、それぞれ異なるプロモーターから転写され、1 番目のエクソンが異なっていることが報告されている (Asaka et al., 2007; Pippa et al., 2016)。TAF-I は 2 量体形成ドメインを介して、TAF-I $\alpha/\alpha$ および TAF-I $\beta/\beta$ のホモダイマーと、TAF-I $\alpha/\beta$ のヘテロダイマーを形成する。また TAF-I は C 末端側に酸性アミノ酸に富む領域をもつ。このような酸性アミノ酸のクラスターは多くのヒストンシャペロンに見出されており、NAP-1 や B23 も同様の領域をもつ。TAF-I の 2 量体形成能と C 末端酸性アミノ酸領域は、アデノウイルスコアの構造変換活性やヒストンシャペロン活性において必須であることが明らかとなっている。

## 2-7 TAF-I の生理機能

TAF-I は DNA-塩基性タンパク質複合体の構造変換活性以外にも、様々な機能を持つことが報告されており、TAF-I が関与する細胞内現象は多岐に渡る。いくつか例をあげると、脱リン酸化酵素 PP2A の阻害、ヒストンアセチル化酵素の阻害、アポトーシスの抑制、mRNA の輸送、細胞運動性の制御、細胞周期制御、DNA 修復など、多数の報告がある (Li et al., 1995; Seo et al., 2001; Beresford et al., 2001; Brennan et al., 2000; Klooster et al., 2007; Canela et al., 2003; Kalousi et al., 2015)。これらの報告は、TAF-I がクロマチン構造変換以外でも機能する多機能な因子であることを示す。

TAF-I はがん化に関与するとの報告もあり、がん遺伝子 (oncogene) と表されることも多い。前立腺がんを高発現する遺伝子として、マイクロアレイ解析から新規に同定された Prostate collagen triple helix (PCOTH) の発現により、TAF-I のリン酸化が亢進すること、また TAF-I の発現量の減少によりがん形質が抑制されることが報告されている (Anazawa et al., 2005)。また、複数の神経膠芽腫細胞株において TAF-I が高発現しており、TAF-I のノックダウンにより、細胞増殖の低下、アポトーシスの促進などが観察される (He et al., 2016)。これらの報告から、TAF-I がいくつかのがん細胞において、がん化を促進する能力を持つことが予測されるが、TAF-I の持つどの機能が関与するかについては現時点では不明である。

## 2-8 ヒストン H1 シャペロンとしての TAF-I

TAF-I の解析を進める中で、TAF-I が細胞内および試験管内の両面において、ヒストン

H1 のクロマチン結合活性を制御するヒストン H1 シャペロンとして機能することが明らかとなった (Kato et al., 2011) (Fig 6)。試験管内において、TAF-I は、ヒストン H1 をヌクレオソームに適切に配置し、クロマトゾーム形成を促進することが示されている。一方で、TAF-I はクロマトゾームからのヒストン H1 の解離にも関わる (Okuwaki et al., 2016)。さらに、Fluorescent Recovery After Photobleaching (FRAP) 法によるヒストン H1 の細胞内動態の解析より、TAF-I は細胞内においてもヒストン H1 のクロマチンからの解離、及び結合の両方向を制御することが示唆されている。

TAF-I がヒストン H1 シャペロンとして、特定の遺伝子の転写制御に関わることがいくつか報告されている。Human T-cell leukemia Virus (HTLV) -1 のプロモーターをモデルとして用いた細胞内での転写では、TAF-I が HTLV-1 プロモーター上からヒストン H1 を剥がすことで転写を促進することが明らかになっている (Zhang et al., 2015)。一方で、Interferon-stimulated-gene (ISG) プロモーターからの転写を、TAF-I がヒストン H1 を ISG プロモーター上へ結合させることで抑制することが報告されている (Kadota et al., 2014)。これらの報告から、TAF-I が特定の遺伝子座において、ヒストン H1 の解離または結合を促進することで、転写制御に関わることが示唆された。しかしながら、TAF-I がどのように遺伝子特異的にヒストン H1 のクロマチンからの解離と、クロマチンへの配置を制御しているか、その分子機構の詳細は現在のところ不明である。細胞内において、TAF-I がヒストン H1 の中でも、ヒストン H1.1 との結合に対し特異性を持つ可能性が示唆されている (Zhang et al., 2016)。一方で、TAF-I はヒストン H1.0 及び H1.X と細胞内で相互作用するとの報告もある (Okuwaki et al., 2016)。上記二つの報告は、ヒト骨肉腫由来細胞とヒト子宮頸がん由来細胞という異なる細胞種を用いており、細胞種間で TAF-I が主に相互作用するヒストン H1 バリエントが異なる可能性が考えられる。TAF-I は異なるヒストン H1 バリエントを介して、細胞種特異的な遺伝子発現パターンの確立に関わる可能性が示唆される。また、TAF-I は 2 つのサブタイプが存在し、そのヒストン H1 シャペロン活性は TAF-I $\beta$ と比較し、TAF-I $\alpha$ では弱い。細胞種間での TAF-I のサブタイプの発現量比の違いは、ヒストン H1 によるクロマチンからの転写制御を介してそれぞれの細胞に適した遺伝子発現パターンの確立に関わる可能性も考えられる。

このように、TAF-I はヒストン H1 シャペロンとして、転写をはじめとする多くの核内反応に関わる可能性が示唆される。

### 3. 本研究の目的

序論でも述べたように、TAF-I は $\alpha$ 及び $\beta$ の2つのサブタイプが存在するが、アデノウイルスコア複合体や精子クロマチンなどの DNA-塩基性タンパク質複合体からの構造変換活性、及びヒストンシャペロン活性は、いずれの場合においても TAF-I $\beta$ と比較して TAF-I $\alpha$ の方が弱い (Nagata et al., 1995; Kawase et al., 1996; Matsumoto et al., 1999a; Kato et al., 2011)。同一の遺伝子座にコードされているがプロモーターがそれぞれ別であること、また細胞種特異的にサブタイプ間の発現パターンが異なることから、サブタイプの発現パターンにより TAF-I 2 量体の構成比を変化させることで、TAF-I 全体としての活性が制御されている可能性が考えられる。このことから、本研究では、TAF-I のサブタイプ間に活性差をもたらす分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 4. TAF-I のサブタイプ依存的なヒストン H1 シャペロン活性制御機構の解析

### 4-1 緒言

TAF-I のヒストン H1 シャペロン活性には、2 量体形成活性と C 末端側に存在する酸性領域が必須であり、TAF-I $\alpha$ はその両方を TAF-I $\beta$ と同様に保持している。しかし、TAF-I $\alpha$ は TAF-I $\beta$ よりもヒストン H1 シャペロン活性が弱い。このことから、TAF-I $\alpha$ と $\beta$ の発現パターンが細胞ごとに異なることで、TAF-I のホモ及びヘテロ 2 量体の構成比が変化してヒストン H1 シャペロン活性が調節され、細胞あるいは組織特異的な遺伝子発現パターンの確立に寄与する可能性が示唆されるが、その生理的意義は明らかではない。そこで、TAF-I サブタイプのヒストン H1 シャペロン活性に差をもたらす分子機構を明らかにすることとした。

ヒストン H1 は、シャペロン非存在下では DNA と非特異的に相互作用して、規則性のない乱雑な集合体（非特異的凝集体）を形成しやすい。実際の細胞内では、ヒストン H1 シャペロンがヒストン H1 と DNA の非特異的な結合を抑制し、かつヒストン H1 を適切なクロマチン DNA 上に配置することで、染色体安定性の維持や適切な遺伝子発現制御に関わると考えられる。また、ヒストン H1 の動態はクロマチン結合性の強弱と相関し、動態の早いヒストン H1 はクロマチン結合性の弱さを反映する。FRAP 法による体細胞核内のヒストン H1 の動態解析から、ヒストン H1 は（1）比較的早い動態のヒストン H1=クロマチンと非特異的に結合したヒストン H1、（2）比較的遅い動態のヒストン H1=クロマチンと安定に結合したヒストン H1、そして（3）ほとんど動態変化の見られないヒストン H1=クロマチンと不動の結合をしたヒストン H1、の 3 種類に分類されると考えられている (Raghuram et al., 2009)。TAF-I は主にクロマチンと非特異的に結合したヒストン H1 の動態制御に関わることから、ヒストン H1 と DNA やクロマチンの非特異的相互作用を抑制し、遊離型ヒストン H1 量を増やすことで、結果として適切なクロマチン部位へのヒストン H1 の配置を促進するのではないかと考えられる。このように、ヒストン H1 の DNA からの解離を促進する機能は、TAF-I のヒストン H1 シャペロンとしての機能を考えるうえで非常に重要である。また、TAF-I $\alpha$ は、DNA とヒストン H1 との非特異的凝集体からのヒストン H1 解離活性が TAF-I $\beta$ と比較して弱いことが示唆される (Kato et al., 2011)。そこで本研究では、TAF-I サブタイプ間におけるヒストン H1 シャペロン活性の制御機構の違いを明らかにするため、ヒストン H1 の DNA からの解離を定量的に検出できるアッセイ系を構築して TAF-I の機能を検証することとした。

### 4-2 材料と方法

すべての試薬は表記のない限り、MilliQ 純水製造装置 (MILLIPORE) で 18.0  $\Omega$ M 以上

の蒸留水を用いて調製した。滅菌は試薬によりオートクレーブ SS-240 (TOMY) によるオートクレーブ滅菌またはフィルター (Millex-GP Filter Unit 0.22  $\mu$ M Pore Size, MILLIPORE) 滅菌を行った。

#### 4-2-1 TAF-I N末端領域変異体の組換えタンパク質発現ベクターの作製

TAF-I $\alpha$  N末端領域の欠損変異体 (TAF-I $\alpha$ 6, 18, 24, 32) の大腸菌発現ベクターは、それぞれ以下のプライマーを用いた PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法によって作製した。

TAF-I $\alpha$ 6 5' 側

5'-CTCGGATCCGATATCGCTAGCCAGTCTCCACTCCC-3'

TAF-I $\alpha$ 18 5' 側

5'-CTCGGATCCGATATCGCTAGCCCACCTCCCTGCTCT -3'

TAF-I $\alpha$ 24 5' 側

5'-CTCGGATCCGATATCGCTAGCCCGGAGGAGCACTC-3'

TAF-I $\alpha$ 32 5' 側

5'-CTCGGATCCGATATCGCTAGCGGCTTGCCCGAAGAA-3'

これらのプライマーの 5' 末端には *Bam*H I、*Eco*R V 及び *Nhe* I の順で制限酵素サイトを導入した。

TAF-I 3' 側 (全ベクター共通)

5'-GCGAATTCTTAGTCATCTTCTCCTTCATCC-3'

このプライマーの 5'末端には *Eco*R I サイトを導入した。

これら 5'側と 3'側のプライマーセットを用いて PCR を行った。鋳型にはヒスチジンタグ融合タンパク質発現用プラスミド pET28a に組み込まれた TAF-I $\alpha$ の cDNA 配列を用いた。PCR には KOD plus polymerase (TOYOBO) を用い、説明書に記載された標準的な温度サイクル設定及び反応条件で行った。得られた PCR 産物を *Bam*H I 及び *Eco*R I で消化し、アガロース電気泳動にて分離後、Fast gene Gel/PCR purification kit (日本ジェネティクス) を用いて精製することで *Bam*H I 及び *Eco*R I により切断された末端を有するインサート DNA を調製した。ベクターは pET28a を *Bam*H I 及び *Eco*R I で消化後、アルカリリンホスファターゼ (TaKaRa) にて 5'末端の脱リン酸化処理を行い、インサート DNA と同様の方法で精製した。これらを Ligation High (TOYOBO) を用いて連結反応を行い、pET28a-TAF-I $\alpha$ 6、 $\alpha$ 18、 $\alpha$ 24 及び $\alpha$ 32 を得た。

TAF-I $\alpha$  N末端領域点変異体は下記の5'側と3'側のプライマーセットを用いて、2段階PCR法にて作製した。1回目のPCRでは、TAF-I遺伝子を前半(5'側)と後半(3'側)の2つに分けてcDNAを増幅した。TAF-I遺伝子前半部分の5'側プライマーと後半部分の3'側プライマーは、それぞれ鋳型としたcDNAがクローン化されているベクター側の配列を用い、各変異体の作製で共通に使用した。プライマーの配列を以下に示す。

各変異体の作製に共通して使用

TAF-Iの前半の5'側 (pGEX 5' primer)

5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'

TAF-Iの後半の3'側 (pGEX 3' primer)

5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'

各変異体の作製に個別に使用

TAF-I $\alpha$ KR2sA 前半の3'側

5'-GAGTGGAGACTGGGCTGCAGGGGCCAT-3'

TAF-I $\alpha$ KR2sA 後半の5'側

5'-ATGGCCCTGCAGCCCAGTCTCCACTC-3'

TAF-I $\alpha$ KR4sA 前半の3'側

5'-AGGAGGTGGTGCTGGTGCCGCCGCTTGAGGCGGGAG-3'

TAF-I $\alpha$ KR4sA 後半の5'側

5'-CCACTCCCGCCTCAAGCGGCGGCACCAGCACCACCTCCT-3'

pGEX6p-1-TAF-I $\alpha$ を鋳型とした場合、TAF-I $\alpha$  cDNAの5'側には *BamH* I、3'側には *EcoR* Iが特異的な制限酵素サイトとして使用できるように設計した。前半はTAF-I 5'側プライマーと、各前半の3'側、後半はTAF-Iの3'側プライマーと各後半の5'側プライマーを用いてPCRを行った。TAF-I $\alpha$  cDNAの前半と後半それぞれのPCR産物を、アガロース電気泳動を行い精製した。TAF-I前半部分PCR産物の3'側領域と後半部分PCR産物の5'側領域は一部オーバーラップしているため、精製した前半と後半のPCR産物を混合し、さらにTAF-I 5'側及びTAF-I 3'側のプライマーを用いてPCRを行うことで、目的の位置に点変異を導入したTAF-I cDNA全長のPCR産物を得た。得られたPCR産物を *BamH* I及び *EcoR* Iで消化し、アガロース電気泳動で分離後、精製を行い、これをインサートDNAとした。ベクター側は、pGEX-6p-1を *BamH* I及び *EcoR* Iで消化後、アルカリリンフォスファターゼ (TaKaRa)にて5'末端の脱リン酸化処理を行い、インサートDNAと同様の方法にて精製してベクターDNAを調製した。これらをLigation High (TOYOBO)を用いて連結し、pGEX6p-1-TAF-I $\alpha$ KR2sA及び $\alpha$ KR4sAを得た。さらにpGEX6p-1-TAF-I $\alpha$ KR6sAについて、



鋳型に pGEX-TAF-I $\alpha$ KR4sA を、プライマーセットに KR2sA の作製に用いたものを使用し、上記と同じ手順で作製した。

GST を融合した TAF-I N 末端領域変異体の発現ベクターは、以下のプライマーを用いた PCR 法にて作製した。用いたプライマーを以下に示す。

TAF-I $\beta$ -N-ter 3' 側

側 5'-TTTGAATTCTTATGAGGTCTCGTC-3'

TAF-I $\alpha$  and  $\alpha$ KR6sA-N-ter 3' 側

5'-TTTGAATTCTTATCCCTTCTTCGG-3'

5' 側のプライマーは、鋳型 cDNA がクローン化されているベクター側の配列を含む pGEX 5' primer を用い、各変異の作製で共通に使用した。増幅後の TAF-I cDNA の 5' 側には *Bam*H I サイトが挿入され、3' 側にはプライマー由来の *Eco*R I サイト (プライマー内下線部) が挿入される。上記プライマーセットと、鋳型 DNA としてそれぞれ pGEX6p-1-TAF-I $\beta$ 、 $\alpha$ 、及び  $\alpha$ KR6sA を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物は、*Bam*H I 及び *Eco*R I で消化し、アガロース電気泳動で分離後、精製を行い、これをインサート DNA とした。ベクターは pGEX6p-1 を *Bam*H I 及び *Eco*R I で消化し、TAF-I 点変異体作製時と同じ方法にて調製した。インサート DNA とベクターDNA を Ligation High (TOYOBO) を用いて連結し、pGEX6p-1-TAF-I $\beta$ -Nter、 $\alpha$ -Nter、及び  $\alpha$ KR6sA-N-ter を得た。

TAF-I $\alpha$  Cys タグ変異体の発現ベクターは、以下に示すプライマーを用いた PCR 法にて、2 つのシステイン (システインペア) を目的の場所に挿入することで作製した。TAF-I $\alpha$  cDNA 中のシステインペアの挿入の位置を境に、前半 (5' 側) と後半 (3' 側) の 2 つに分けて PCR を行い、ベクターと 2 つのインサート DNA を連結することで全長 TAF-I $\alpha$  Cys タグ変異体の cDNA を得た。TAF-I 遺伝子前半部分の 5'側プライマーと後半部分の 3'側プライマーは、鋳型とした cDNA がクローン化されているベクター側の配列を用い、各変異体の作製で共通に使用した。以下に用いたプライマーの配列を示す。

各変異体の作製に共通して使用

TAF-I $\alpha$ の前半の 5' 側 (pGEX 5' primer)

5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'

TAF-I $\alpha$ の後半の 3' 側 (pGEX 3' primer)

5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'

各変異体の作製に個別に使用

TAF-I $\alpha$ -Ncc 前半の 3' 側

5'-ACAGCAGCCTGGACAGCAGCTAGCGATATCGGATCC-3'

TAF-I $\alpha$ -Ncc 後半の 5' 側

5'-AAGAAGAAACCAAGACCACCT-3'

TAF-I $\alpha$ -Ccc1 前半の 3' 側

5'-ACAGCATCCTTCTCCTTCTTCATCATCCATATC -3'

TAF-I $\alpha$ -Ccc1 後半の 5' 側

5'-GAAGAAGATGATGATGATGAAGAG-3'

TAF-I $\alpha$ -Ccc2 前半の 3' 側

5'-ACAGCATTCCTCCTCCTTCATCATCATCATC-3'

TAF-I $\alpha$ -Ccc2 後半の 5' 側

5'-GGATTAGAAGATATTGACGAAGAAGGG-3'

TAF-I $\alpha$ -Ccc3 前半の 3' 側

5'-ACAGCAACCTTCATCCTCATCCCCTTCTTCGTC-3'

TAF-I $\alpha$ -Ccc3 後半の 5' 側

5'-GAAGAAGATGAAGATGATGATGAAGGG-3'

TAF-I $\alpha$ -Ccc4 前半の 3' 側

5'-ACAGCATTCATCATCATCTTCATCTTCTTCACC-3'

TAF-I $\alpha$ -Ccc4 後半の 5' 側

5'-GGGGAGGAAGGAGAGGAGGATGAAGGA-3'

各変異体の作製で個別に用いた前半の 3'側プライマーのそれぞれに、下線で示すようにシステインのコードンをペアで導入した。各プライマーは使用前に T4 polynucleotide kinase (TOYOBO) を用いて、5' 末端をリン酸化させてから PCR に用いた。鋳型に用いた pGEX6p-1-TAF-I $\alpha$  cDNA 領域の 5' 側に *Bam*H I サイト、3' 側に *Eco*R I サイトがあり、増幅した PCR 産物ではそれぞれの制限酵素サイトがユニークに使えるようになっている。得られた PCR 産物は、前半側を *Bam*H I、後半側を *Eco*R I にて消化し、アガロース電気泳動にて分離後、精製してインサート DNA とした。ベクターは pGEX6p-1 を *Bam*H I 及び *Eco*R I で消化し、TAF-I 点変異体作製時と同じ方法にて調製した。ベクターDNA とそれぞれの変異体の前半側、及び後半側のインサート DNA を混合して、Ligation High (TOYOBO) を用いて連結し、pGEX6p-1-TAF-I $\alpha$ -Ncc、Ccc1、Ccc2、Ccc3 及び Ccc4 をそれぞれ得た。

システインペアを N 末端領域にシングルで挿入しベクターpGEX6p-1-TAF-I $\alpha$ -Ncc を鋳型とし、先述のプライマーセットを用いて、システインペアを N 末端領域と C 末端領域にダブルで導入した変異体を作成した。以下にそれぞれのベクター作製に用いたプライマーセッ

トを示す。

pGEX6p-1-TAF-I $\alpha$ -Ncc/Ccc1 (プライマー : Ccc1)

pGEX6p-1-TAF-I $\alpha$ -Ncc/Ccc2 (プライマー : Ccc2)

pGEX6p-1-TAF-I $\alpha$ -Ncc/Ccc3 (プライマー : Ccc3)

pGEX6p-1-TAF-I $\alpha$ -Ncc/Ccc4 (プライマー : Ccc4)

各 DNA の作製手順は、システインペアをシングルで挿入したベクターの作製方法に従った。これにより、pGEX6p-1-TAF-I $\alpha$ -Ncc/Ccc1、Ncc/Ccc2、Ncc/Ccc3 及び Ncc/Ccc4 を得た。

#### 4-2-2 組換え TAF-I タンパク質の調製

組換えタンパク質 His-TAF-I $\beta$ 、 $\Delta$ N1、 $\alpha$ 、 $\alpha$ 6、 $\alpha$ 18、 $\alpha$ 24、 $\alpha$ 32、 $\alpha$  $\Delta$ C3 及び $\beta$  $\Delta$ C3 は、それぞれ pET-28a-TAF-I $\beta$ 、 $\Delta$ N1、 $\alpha$ 、 $\alpha$ 6、 $\alpha$ 18、 $\alpha$ 24、 $\alpha$ 32、 $\alpha$  $\Delta$ C3 及び $\beta$  $\Delta$ C3 発現ベクターを用いて調製した。これら発現ベクターを BL21 (DE3) 株に導入して形質転換後、液体培地にて培養した。600 nm の濁度がおよそ 0.6 になったところで Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加しタンパク質の合成誘導をかけ、さらに 2 時間培養した。大腸菌を遠心機にて回収し、Binding バッファー (20 mM Tris-HCl [pH7.9], 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole) に懸濁した。氷上にて懸濁液の超音波処理を行い、細胞の破碎液を遠心して不溶性画分を除いた。この上清に His-bind resin (Novagen) を加え、1 時間 4°C でローテーションした。遠心後、Wash バッファー (20 mM Tris HCl, 0.5 M NaCl, 60 mM imidazole) にてレジンを洗浄したのち、SDS サンプルバッファー (62.5 mM TrisHCl [pH6.8], 0.25% SDS, 145 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% Glycerol) と混合、95°C にて 5 分間ヒートインキュベーションを行った。得られたサンプルは 10% SDS-PAGE に展開後、ゲルの一部を染色して TAF-I タンパク質のマーカーとし、全長のタンパク質だけを切り出した。切り出したゲルはよく破碎し、溶出バッファー (50 mM Hepes-NaOH [pH8.0], 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% NP-40) に懸濁後、室温にて 30 分間ローテーションした。溶液を遠心し、ゲル断片を除いた上清はアセトン沈殿を行った。得られたペレットを 6 M グアニジン塩酸で変性した後、バッファー A (50 mM TrisHCl pH7.4, 50 mM KCl, 12.5 mM MgCl, 1mM EDTA, 0.1% NP-40, 20% Glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)、および TAF-I バッファー (20 mM TrisHCl pH7.9, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10% Glycerol) で段階的に透析を行うことでタンパク質を復元した (変性 - 再生法)。透析後の各タンパク質は -80°C にて保存した。

組換えタンパク質 His-TAF-I $\beta$ PME は、pET14b-TAF-I $\beta$ PME 発現ベクターを用いて、当研究室で確立した手法によって調製した (Saito et al., 1999)。

組換えタンパク質 TAF-I $\beta$ 、 $\Delta$ N1、 $\alpha$ 、 $\alpha$ KR2sA、 $\alpha$ KR4sA、 $\alpha$ KR6sA、TAF-I $\alpha$ -Ncc、Ccc1、Ccc2、Ccc3、Ccc4、Ncc/Ccc1、Ncc/Ccc2、Ncc/Ccc3、Ncc/Ccc4、GST-TAF-I $\beta$ -Nter、GST-TAF-I $\alpha$ -N-ter 及び GST-TAF-I $\alpha$ KR6sA-N-ter はそれぞれの cDNA を pGEX6p-1 にクローン化した発現ベクターを用いて調製した。これら発現ベクターを BL21 (DE3) 株に導入して形質転換後、液体培地にて培養した。600 nm の濁度がおよそ 0.6 になったところで IPTG を添加しタンパク質の合成誘導をかけ、さらに 2 時間培養した。大腸菌を遠心機にて回収し、GST Binding バッファー (50 mM Tris-HCl [pH7.9], 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA) に懸濁した。氷上にて懸濁液の超音波処理を行い、細胞の破碎液を遠心して不溶性画分を除いた。この上清に Glutathione Sepharose resin (GE Healthcare) を加え、4°C で 1 時間ローテンションした。遠心後、GST binding バッファーにてレジンを洗浄した。GST-TAF-I $\beta$ -N-ter、 $\alpha$ -N-ter 及び  $\alpha$ KR6sA-N-ter は、溶出バッファー (50mM Tris-HCl [pH7.9], 40 mM reduced glutathione) で溶出後、TAF-I バッファーで透析を行った。rTAF-I $\beta$ 、 $\Delta$ N1、 $\alpha$ 、 $\alpha$ KR2sA、 $\alpha$ KR4sA、 $\alpha$ KR6sA、rTAF-I $\alpha$ -Ncc、Ccc1、Ccc2、Ccc3、Ccc4、Ncc/Ccc1、Ncc/Ccc2、Ncc/Ccc3、Ncc2/Ccc4 及び Ncc/Ccc1 は、PreScission protease (GE healthcare) を添加し PreS バッファー (50 mM Tris-HCl [pH7.9], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) 中で GST タグを切断したのち、変性 - 再生操作を行い精製した。精製後のタンパク質は -80°C にて保管した。

#### 4-2-3 ヒストン H1 解離アッセイ及び DNA 結合アッセイ

アッセイに用いた DNA は以下のプライマーを用いて PCR 法にて作製した。

5S 147 bp 5' 側 (-73~-51)

5'-GGATTTATAAGCCGATGACGTCA-3'

5S 147 bp 3' 側 (+54~+74)

5'-AGTACTAACCGAGCCCCTATGC-3'

鋳型として sea urchin 由来の 5S rRNA gene をタンデムに含むプラスミド (pB1000-Uless/strider, J. Svejstrup 博士より分与) を用い、PCR を行った。増幅された 147 bp の DNA を 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開後、エチジウムブロマイドにて DNA を染色し、目的の長さの DNA のみを切り出し、精製を行った。His タグを融合した histone H1.1 (His-H1.1) は、当研究室で報告した手法に従って調製した (Kato et al., 2011)。

DNA と His-H1.1 を混合し室温で 15 分間インキュベートした。得られた DNA と His-H1.1 の複合体に、各種組換え TAF-I タンパク質を加え、さらに 30°C で 30 分間インキュベートした。得られたサンプルは 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開し、核酸染色試薬 GelRed

(Nacalai tesque) にて DNA を検出した。TAF-I と DNA の結合試験は、DNA と TAF-I タンパク質を TAF-I バッファー中、30°C で 30 分間インキュベーションしたのち、サンプルを 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開し、GelRed にて DNA を染色した。

#### 4-2-4 TAF-I の N 末端領域と共通領域の結合アッセイ (ゲルシフト法)

GST、GST-TAF-I $\beta$ -N-ter、 $\alpha$ -N-ter 及び $\alpha$ -KR6sA-N-ter 変異体と His-TAF-I $\Delta$ N1 あるいは GST、GST-TAF-I $\alpha$ -N-ter と His-TAF-I $\Delta$ N1 $\Delta$ C3 変異体を TAF-I バッファー中で混合し、30°C で 30 分間インキュベートした。サンプルは 6% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開後、銀染色と抗 GST 抗体および抗 His 抗体を用いたウエスタンブロットングを行い、各タンパク質を検出した。

#### 4-2-5 ヒストン H1 結合アッセイ (ゲルシフト法)

GST タグを融合したヒストン H1.1 (GST-H1.1) は、当研究室で報告した手法に従って調製した (Kato et al., 2011)。His-TAF-I 及び GST-H1.1 を TAF-I バッファー中で混合し、30°C で 30 分間インキュベートした。TAF-I バッファーは、NaCl 濃度が異なる 100、250、400 mM の 3 種類を準備し、それぞれのサンプルの結合反応に用いた。サンプルは 6% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開後、抗 GST 抗体および抗 His 抗体を用いたウエスタンブロットングを行い、各タンパク質を検出した。

#### 4-2-6 ウエスタンブロットング法

非変性ポリアクリルアミドゲルにて展開後のゲルを、SDS-PAGE 電気泳動用バッファー (25 mM Tris [hydroxyl] aminomethane, 192 mM Glycine, 0.1% SDS) に浸し、振盪器上で 15 分間インキュベーション後、4°C で 45 V 30 分間、90 V 60 分間電圧をかけて PVDF メンブレンへタンパク質を転写した。メンブレンはあらかじめメタノールで処理し、トランスファーバッファー (25 mM Tris [hydroxyl] aminomethane, 192 mM Glycine, 20% Methanol) に浸した。転写後のメンブレンは、5% Milk/TBS-T (24.8 mM Tris [hydroxyl] aminomethane, 18.3 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween 20) にて 30 分間ブロッキングを行った。1 次抗体は 5% Milk/TBS-T にて希釈し、メンブレンを浸して室温で 1 時間反応させた。その後、メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄し、TBS-T で希釈した 2 次抗体に浸し室温で 10 分間反応させた。反応後、メンブレンを 10 分間 3 回 TBS-T にて洗浄し、Chemi-Lumi One (Nacalai tesque) で発光させ、LAS4000 (Fuji film) にて検出した。

#### 4-2-7 FIAsh ラベリング法

Cys タグを導入した TAF-I タンパク質と、10  $\mu$ M FIAsh EDT<sub>2</sub> 及び 8  $\mu$ M EDT を FIAsh ラベリングバッファー (10 mM Hepes-NaOH [pH8.0], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl [pH 7.9]) 中で混合し、室温で 30 分間インキュベーションした。インキュベーション後、サンプルの蛍光強度を Varioskan (Thermo Fisher) にて測定した (Fluorescent emission at 535 $\pm$ 5nm)。実験は独立に 3 回行い、標準偏差を算出した。

#### 4-2-8 EDC/NHS クロスリンク法

各 GST-TAF-I-N-ter タンパク質と酸性アミノ酸ペプチドをバッファー (20 mM Hepes-NaOH [pH7.9], 80 mM NaCl, 0.1 mM DTT) 中で混合し、30°C で 30 分インキュベーション後、EDC および NHS を加えさらに室温で 30 分インキュベーションした。SDS サンプルバッファーを加えて、95°C で 5 分間熱処理することでクロスリンク反応を停止させ、10% SDS-PAGE で展開して CBB 染色を行った。

#### 4-2-9 グルタルアルデヒドクロスリンク法

各 TAF-I タンパク質を GA バッファー (20 mM Hepes-NaOH [pH 8.0], 150 mM NaCl) 中で 0.05% グルタルアルデヒドと混合し、室温で 5 分インキュベートした。クロスリンク反応を SDS サンプルバッファーを添加して停止させたのち、10% SDS-PAGE で展開し銀染色を行った。

## 4-3 実験結果

### 4-3-1 TAF-I $\alpha$ N 末端領域によるヒストン H1 シャペロン活性の阻害

本研究では、TAF-I のサブタイプ特異的なヒストン H1 シャペロン活性の制御機構の解明を目的とし、TAF-I が DNA からのヒストン H1 の解離を促進する活性（ヒストン H1 解離活性）に焦点を当て、その試験管内アッセイ系を構築した。TAF-I のヒストン H1 解離活性は C 末端の酸性アミノ酸領域依存的であり、ヒストン H1 シャペロン活性に相関する。本アッセイ系では、ヒストン H1 と DNA を混合して室温で 15 分インキュベーションを行い、非特異的凝集体を形成させたのち TAF-I を添加した (Fig 7A)。TAF-I によって、ヒストン H1 が非特異的凝集体から遊離することで、解離した DNA 量の増加が観察される。サンプルを非変性ポリアクリルアミドで展開し、解離した DNA 量を比較することで、TAF-I のヒストンシャペロン活性を測定できる (Fig 7B)。

TAF-I $\alpha$ 及び $\beta$ で異なるのはそれぞれの N 末端領域のみである。そこで、TAF-I $\alpha$ および $\beta$ の N 末端領域のうち、どちらが TAF-I サブタイプ間のヒストン H1 シャペロン活性差を生み出す要因となるかを明らかにするため、TAF-I $\alpha$ と TAF-I $\beta$ の組換えタンパク質を作製し (Fig 8A および 8B)、ヒストン H1 の DNA からの解離活性を検証した (Fig 9)。その結果、TAF-I $\alpha$  によるヒストン H1 の解離活性は、 $\beta$ と比較して弱いことが観察された (Fig 9、レーン 3-4 と 7-8 の比較)。これより、TAF-I $\beta$ は TAF-I $\alpha$ に比較して高いヒストン H1 シャペロン活性を持つことが示唆された。次に TAF-I $\alpha$ と $\beta$ のヒストン H1 シャペロン活性の差が、どちらかの N 末端領域によって、抑制されることで生じるのかあるいは促進されることで生じるのかを検討するため、TAF-I の N 末端領域を欠損した変異体 TAF-I $\Delta$ N1 (Okuwaki et al., 1998) のヒストン H1 シャペロン活性を検証した。その結果、TAF-I $\beta$ とほぼ同等の活性を持つことが観察された (Fig9、レーン 3-4 と 5-6 の比較)。以上の結果より、TAF-I $\alpha$  N 末端領域は、自身のヒストン H1 シャペロン活性に対し、抑制的に機能することが明らかになった。

次に、TAF-I $\alpha$  N 末端領域内のヒストン H1 シャペロン活性に阻害的に働くアミノ酸配列を同定するため、TAF-I $\alpha$  N 末端領域の部分欠損変異体 TAF-I $\alpha$ 6、 $\alpha$ 18、 $\alpha$ 24 および $\alpha$ 32 をそれぞれ作製し (Fig 8A 及び 8B)、ヒストン H1 解離アッセイを行った。その結果、TAF-I $\alpha$ 6 変異体では TAF-I $\alpha$ WT と比較し、わずかに活性の上昇が見られた (Fig 9、レーン 7-8 と 9-10)。さらに、TAF-I $\alpha$ 18、 $\alpha$ 24 および $\alpha$ 32 変異体では、TAF-I $\alpha$ WT と比較して大きく活性の上昇が見られ、TAF-I $\beta$ とほぼ同等の活性を示した (Fig 9、レーン 3-4 と 11-16)。以上の結果より、TAF-I $\alpha$ の N 末端から 1-17 アミノ酸の領域にヒストン H1 シャペロン活性を阻害する領域が含まれることが明らかとなった。

また、本実験の結果が TAF-I とヒストン H1 の結合ではなく、TAF-I と DNA の結合に依存している可能性について検証するため、TAF-I と DNA の結合活性を検討した (Fig 10)。

その結果、本実験の条件下では、TAF-I $\alpha$ 及び $\beta$ のいずれも DNA との結合は確認できなかった。以上より、本実験で観察された TAF-I のサブタイプ依存的なヒストン H1 シャペロンの活性差は、TAF-I のヒストン H1 への作用にのみ依存することが示唆された。

#### 4-3-2 TAF-I $\alpha$ N 末端領域に存在する塩基性アミノ酸のヒストン H1 シャペロン活性への影響

TAF-I $\alpha$  N 末端領域は TAF-I $\beta$  N 末端領域と比較して、塩基性アミノ酸に富むことが特徴である (Fig 11)。そこで、TAF-I $\alpha$  N 末端領域によるヒストン H1 シャペロン活性の抑制が、1-17 番アミノ酸配列中の塩基性アミノ酸に依存するかを検証するため、これら 6 つの塩基性アミノ酸をアラニンに置換した変異体を作製し、そのヒストン H1 シャペロン活性を検討した (Fig 12A)。TAF-I $\alpha$  の Lys4 及び Arg5 をアラニンに置換した TAF-I $\alpha$ KR2sA では、TAF-I $\alpha$  WT と比較し、ヒストン H1 シャペロン活性がわずかに高い様子が観察された (Fig 12C、レーン 7-8 と 9-10 の比較)。さらに Lys13-Lys15 及び Arg17 を置換した TAF-I $\alpha$ KR4sA 変異体では、KR2sA 変異体よりもさらにヒストン H1 シャペロン活性の上昇が観察され、6ヶ所すべてを置換した TAF-I $\alpha$ KR6sA 変異体では、ほぼ TAF-I $\beta$  WT と同等の活性が観察された (Fig 12C、レーン 7-8 とレーン 12-14 の比較、及びレーン 3-4 とレーン 12-14 の比較)。以上の結果より、TAF-I $\alpha$  N 末端領域の 1-17 アミノ酸配列中に存在する 6 つの塩基性アミノ酸は、TAF-I $\alpha$  のヒストン H1 シャペロン活性の抑制に重要であることが明らかとなった。

#### 4-3-3 ゲルシフトアッセイによる TAF-I $\alpha$ N 末端領域と TAF-I 共通領域の相互作用の検討

TAF-I $\alpha$  N 末端領域は、TAF-I とヒストン H1 との結合にも、ヒストン H1 シャペロン活性にも必須の領域ではない (Kato et al., 2011)。しかしながら、実験 4-3-1 及び 4-3-2 の結果より、TAF-I $\alpha$  の N 末端領域に存在する塩基性アミノ酸によって、ヒストン H1 シャペロン活性が抑制されている可能性が示唆された。TAF-I $\beta$  の C 末端酸性領域欠損変異体の X 線結晶構造解析より、TAF-I はアンチパラレルに 2 量体を形成し、その N 末端領域と C 末端領域は、近接することが示唆されている (Muto et al., 2007) (Fig 13A)。これより、TAF-I 2 量体中で、TAF-I $\alpha$  の塩基性に富んだ N 末端領域は、酸性アミノ酸に富んだ C 末端領域と相互作用することで、その活性を抑制する可能性が考えられる (Fig 13B)。本仮説を実証するため、まず TAF-I $\alpha$  N 末端領域が、C 末端酸性アミノ酸領域を含む、TAF-I サブタイプ間で共通の領域に結合するかを検証した。

はじめに、TAF-I の N 末端領域のみを GST タンパク質に融合した GST-TAF-I-Nter と、TAF-I の N 末端領域のみを欠いた His-TAF-I $\Delta$ N1 の相互作用をゲルシフトアッセイにより



検討した (Fig 14A 及び 14B)。GST-TAF-I-N-ter 及び His-TAF-I $\Delta$ N1 を混合し、インキュベーション後、6% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開した。もし両者が結合した場合、複合体の移動度はそれぞれのタンパク質を単独で泳動した場合より遅くなり、バンドシフトが観察される。それぞれのタンパク質を単独で泳動した場合と比較し (Fig 14B、レーン 1-5)、GST-TAF-I $\alpha$  N-ter と混合することで、His-TAF-I $\Delta$ N1 の移動度の遅れが観察された (Fig 14B、レーン 5 と 9-11 の比較)。これは His-TAF-I $\Delta$ N1 が GST-TAF-I $\alpha$  N-ter と相互作用し複合体を形成した結果と考えられる。一方、GST-TAF-I $\beta$  と混合したレーンでは His-TAF-I $\Delta$ N1 のバンドシフトは観察されなかった (Fig 14B レーン 5 と 15-17 の比較)。これより、TAF-I の N 末端領域と共通領域との相互作用は、TAF-I $\alpha$  特異的であることが明らかとなった。さらに、この His-TAF-I $\Delta$ N1 の移動度の遅れは、GST-TAF-I $\alpha$ KR6sA と混合した場合では観察されなかった (Fig 14B、レーン 5 と 12-14 の比較)。以上の結果より、TAF-I $\alpha$  特異的に N 末端領域と TAF-I の共通領域が相互作用すること、またその相互作用は TAF-I $\alpha$  N 末端領域に存在する塩基性アミノ酸に依存することが明らかとなった。

そこで次に、TAF-I 共通領域中のどの領域が TAF-I $\alpha$  N 末端領域と相互作用するかを検討した。TAF-I のヒストン H1 シャペロン活性に必須な C 末端領域は酸性アミノ酸に富んでいるため、塩基性アミノ酸に富む TAF-I $\alpha$  N 末端領域と静電的相互作用により結合する可能性が高い。そこで、TAF-I の N 末端領域と C 末端領域の両方を欠いた His-TAF-I $\Delta$ N1 $\Delta$ C3 変異体と、GST-TAF-I $\alpha$ -N-ter との相互作用を Fig 14 と同様の方法で検討した (Fig 15A および 15B)。その結果、GST-TAF-I $\alpha$  N-ter と混合しても His-TAF-I $\Delta$ N1 $\Delta$ C3 の移動度の遅れは観察されなかった (Fig 15B、レーン 3-5)。以上の結果より、TAF-I $\alpha$  N 末端領域は C 末端領域に相互作用する可能性が示唆された。

#### 4-3-4 TAF-I $\alpha$ N 末端領域と $\alpha$ 237-257C 末端領域の相互作用の検討

TAF-I $\alpha$  の N 末端領域が C 末端領域と直接的に相互作用するかを検討するため、GST-TAF-I-N-ter と、酸性アミノ酸に富む TAF-I C 末端領域の一部 ( $\alpha$ 237-257、 $\beta$ 224-244) の領域を用いた相互作用解析を行った (Fig 16A)。相互作用をクロスリンカー試薬である 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) 及び N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) を用いて、TAF-I $\alpha$  N 末端領域と  $\alpha$ 237-257C 末端領域間の結合を観察した (Fig 16B)。このクロスリンカーは、アミノ基とカルボキシル基がほぼゼロ距離で近接した場合のみ、両者の間に架橋を形成する (Grabarek et al., 1990; Marintcheva et al., 2008)。まず、 $\alpha$ 237-257C 末端領域単独では、クロスリンカーの存在の有無にかかわらずバンドは検出されない (Fig 16B レーン 1-4)。次に GST-TAF-I $\alpha$ -N-ter 単独の場合、クロスリンカーの存在の有無に関わらず、バンドに顕著な変化はみられなかった (Fig 16B、レーン 5-8)。一方、GST-TAF-I $\alpha$ -N-ter に  $\alpha$ 237-257C 末端領域を加えた場合、

クロスリンカーの濃度依存的にバンドのシフトが観察された (Fig 16B、レーン 9-12)。一方、GST-TAF-I $\beta$ -N-ter では、クロスリンカーの濃度依存的なバンドシフトは観察されなかった (Fig 16B、レーン 13-16 と 17-20)。以上の結果より、TAF-I $\alpha$  N 末端領域のみが直接 TAF-I の $\alpha$ 237-257C 末端領域に相互作用することが明らかとなった。

#### 4-3-5 TAF-I $\alpha$ の2量体構造中における N 末端領域と C 末端領域の相互作用の検討

実験 4-3-3 および 4-3-4 の結果より TAF-I $\alpha$  N 末端領域が自身の C 末端領域へ結合する可能性が示唆された。しかしこれらの実験では TAF-I $\alpha$ が 2 量体構造をとったときにも、その N 末端領域と C 末端領域が相互作用するかどうかは結論づけられない。そこで 2 量体構造を形成する全長 TAF-I $\alpha$ の N 末端領域及び C 末端領域の相互作用について FAsH ラベリング法により検証した。FAsH-EDT<sub>2</sub>は、Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys からなるテトラシステインモチーフを特異的に認識し結合すると蛍光を発する (Fig 17A) (Griffin et al., 1998)。そこで、TAF-I $\alpha$  N 末端領域と C 末端領域それぞれに1か所ずつシステインペアを導入した変異体を作製することにした (Fig 17B)。もし、FAsH-EDT<sub>2</sub>存在下で、TAF-I $\alpha$  N 末端領域と C 末端領域それぞれのシステインペアが近接していた場合 (6-8Å)、FAsH-EDT<sub>2</sub>がこれらシステインペア間に架橋を形成して蛍光を発するため、その蛍光強度を測定することで両領域が近接するかを検討することができる (Hisaoka et al., 2014)。TAF-I $\alpha$  N 末端領域点変異体のヒストン H1 解離アッセイの結果 (Figs 8 および 9) をもとに、N 末端領域には Lys13 から Arg17 の塩基性アミノ酸クラスターの N 末端側に 1 カ所導入した (Fig 17C)。一方で、TAF-I $\alpha$ の C 末端領域については、C 末端領域中で連続して酸性アミノ酸が並ぶ領域を指標に 4 ヶ所選び、システインペアを導入した (Fig 17C)。

本実験を始める前に、各 Cys タグ変異体が野生型 TAF-I $\alpha$ と同様に、2 量体形成活性とヒストン H1 シャペロン活性を維持していることを確認した。2 量体形成は TAF-I のヒストン シャペロン活性に必須である。TAF-I $\alpha$  WT、各 Cys タグ変異体、及び 2 量体を形成できない TAF-I の点変異体 TAF-I $\beta$ PME (Fig 18A) をグルタルアルデヒド存在下でクロスリンク後、10% SDS-PAGE に展開し、銀染色でタンパク質を検出してその分子量を比較した (Fig 18B) (Miyaji-Yamaguchi et al., 1999)。TAF-I は SDS-PAGE 上では約 45 kDa の分子量を示す。グルタルアルデヒド存在下で 2 量体を形成した場合、90 kDa 付近にバンドが観察される。本実験の結果、すべての Cys タグ変異体は、クロスリンクによって TAF-I $\alpha$  WT と同様の分子量を示したことから、すべての Cys タグ変異体が WT と同様に 2 量体を形成できることが確認された (Fig 18B、レーン 2 と 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 の比較)。一方、TAF-I $\beta$ PME はグルタルアルデヒドによる分子内架橋によって小さく折りたたまれると予想されており、実際にクロスリンク後に本来の分子量よりも小さい位置に観察された (Fig 18B レーン 19 と 20 の比較)。この結果より、本実験で観察された Cys タグ TAF-I $\alpha$ 変異体のバンドパター

ンの変化は、確かに 2 量体形成によるものであることが確認された。以上の結果より、Cys タグ TAF-I $\alpha$ 変異体は TAF-I $\alpha$ WT と同様に 2 量体を形成できることが明らかになった。次に、各 Cys タグ TAF-I $\alpha$ 変異体のヒストン H1 シャペロン活性をヒストン H1 解離活性で検討した (Fig 19)。その結果、Cys タグ TAF-I $\alpha$ 変異体のいくつかは、TAF-I $\alpha$ WT と比較し活性の上昇 (Fig 19、レーン 4 と 9、12 の比較)、あるいは減少 (Fig 19、レーン 4 と 13 の比較)が見られたものの、全体的には野生型 TAF-I $\alpha$ との間に顕著な活性差は見られないと判断した。以上の結果より、Cys タグ TAF-I $\alpha$  変異体を用いて分子内相互作用を検証するのは妥当であると結論付けた。

そこで、それぞれの Cys タグ TAF-I $\alpha$ 変異体と F<sub>1</sub>AsH-EDT<sub>2</sub>を混合し、インキュベーション後、蛍光強度を測定した。TAF-I $\alpha$ の C 末端領域一か所のみシステインペアを導入した変異体 Ccc1、Ccc2、Ccc3 及び Ccc4 では、タンパク質濃度に依存した蛍光強度の増加は見られなかった (Fig 20B)。予想に反し、TAF-I $\alpha$ の N 末端領域一か所のみシステインペアを導入した Ncc では、C 末端領域のみシステインペアを導入した変異体と比較し、わずかにタンパク質濃度依存的な蛍光強度の増加が見られた。さらに、TAF-I $\alpha$ の C 末端領域のみシステインペアを導入した変異体と比較し、Ncc/Ccc2、Ncc/Ccc3 及び Ncc/Ccc4 もタンパク質濃度依存的な蛍光強度の増加が見られ、Ncc とほぼ同等の蛍光強度を示した。Ncc でタンパク質濃度依存的な蛍光強度の増加が観察された理由として、通常、塩基性に富んだ TAF-I $\alpha$ の N 末端領域同士が近接する可能性は考えにくい。TAF-I の N 末端領域が隣接する 2 量体形成領域は、 $\alpha$ -ヘリックス同士が逆平行に疎水性相互作用をした結果、2 量体形成領域の親水面上に酸性アミノ酸が並ぶことが示唆されている (Muto et al., 2007)。そのため、TAF-I $\alpha$ の 2 量体間の N 末端領域同士が、両方とも 2 量体形成領域上に予期せず引き寄せられた結果、近接した配置をとったのかもしれない。一方で、Ncc/Ccc1 は Ncc 及び Ccc1 と比較し、タンパク質濃度依存的に、他の変異体よりも相対的に高い蛍光強度の増加がみられた。以上の結果より、TAF-I $\alpha$  N 末端領域は 2 量体構造をとった場合にも、C 末端領域に相互作用する可能性が示唆された。また、TAF-I $\alpha$  N 末端領域中の Lys13 は、主に C 末端領域中の Glu246 と近接することから、それぞれの決まった領域間で相互作用する可能性が示唆された。

#### 4-3-6 TAF-I $\Delta$ C3 を用いた TAF-I N 末端領域による阻害機構の解析

実験 4-3-5 までの結果から、TAF-I $\alpha$ の N 末端領域は、C 末端領域に相互作用することでその活性を抑制する可能性を明らかにしてきた。また、X 線結晶構造解析の結果から、TAF-I 2 量体中で、一方の TAF-I の N 末端領域が、もう一方の TAF-I の C 末端領域と近接する可能性が示唆されている (Muto et al., 2007)。そこで、TAF-I N 末端領域が、実際に TAF-I 2 量体中で TAF-I のヒストン H1 シャペロン活性を制御するかを検討するため、C 末端領域の欠損した TAF-I $\Delta$ C3 変異体と TAF-I $\beta$ とのヘテロ 2 量体を作製し、そのヒストン H1 シャペ

ロン活性を検討した。TAF-IのC末端領域はヒストンH1シャペロン活性に必須であるため、TAF-I $\Delta$ C3はヒストンH1シャペロン活性を持たない (Kato et al., 2011)。TAF-I $\beta$  WTがTAF-I $\Delta$ C3とヘテロ2量体を形成した場合、ヘテロ2量体の活性はTAF-I $\beta$  WTホモ2量体よりも低くなる。これまでの結果から、TAF-I $\beta$  WTがTAF-I $\alpha\Delta$ C3とヘテロ2量体を形成した場合、TAF-I $\alpha\Delta$ C3のN末端領域がTAF-I $\beta$  WTのC末端領域に結合して、そのヒストンH1シャペロン活性を抑制すると考えられる。従って、TAF-I $\beta$  WTとTAF-I $\alpha\Delta$ C3のヘテロ2量体のヒストンH1シャペロン活性は、TAF-I $\beta\Delta$ C3とTAF-I $\beta$ WTのヘテロ2量体よりも弱くなると予想される (Fig 21)。

本実験では、TAF-Iのヘテロ2量体を作製するため、タンパク質の変性-再生法を用いた。精製した一定量のTAF-I $\beta$ ホモ2量体に対し、TAF-I $\alpha\Delta$ C3あるいはTAF-I $\beta\Delta$ C3ホモ2量体を任意の割合で混合し、ホモ2量体を変性した後、再生操作によりTAF-I2量体を再構成させた。この方法により、TAF-Iのホモ2量体とヘテロ2量体が混合したサンプルを得ることができる。各サンプルに含まれるTAF-I $\beta$  WTとTAF-I $\alpha\Delta$ C3またはTAF-I $\beta\Delta$ C3の量比は、SDS-PAGEで展開してCBB染色により確認した (Fig 22A)。調製したサンプルを、非変性ポリアクリルアミドゲルに展開してCBB染色を行い、ホモ2量体及びヘテロ2量体の割合を定量した (Fig 22B及び22C)。これにより、再構成したTAF-Iのサンプルは、それぞれのホモ及びヘテロ2量体がほぼ同程度の割合で含まれることを確認した。本実験では、TAF-I $\alpha\Delta$ C3及び $\beta\Delta$ C3のそれぞれのN末端領域が、TAF-I $\beta$  WT C末端領域へおよぼす影響を検討するため、TAF-I $\beta$  WTが一定量含まれる条件でヒストンH1解離アッセイを行った。その結果、TAF-I $\beta$  WTの活性は、それぞれTAF-I $\alpha\Delta$ C3及びTAF-I $\beta\Delta$ C3の量依存的に低下した (Fig 23、レーン4と5-8及びレーン10と11-14)。しかしながら、TAF-I $\beta$ WTに対する活性抑制効果は、TAF-I $\beta\Delta$ C3と比較しTAF-I $\alpha\Delta$ C3の方が高い様子が観察された (Fig 23、レーン4-7とレーン9-12)。TAF-I $\alpha\Delta$ C3ホモ2量体単独 (Fig 23、レーン3)、及びTAF-I $\beta\Delta$ C3ホモ2量体単独 (Fig 23、レーン9) の場合ではどちらもヒストンH1の解離活性を示さなかったことから、これらの結果はTAF-I $\beta$  WTとTAF-I $\Delta$ C3がヘテロ2量体を形成したためであると推測された。以上の結果より、Fig 21に示すとおり、TAF-Iヘテロ2量体中のTAF-I $\alpha\Delta$ C3のN末端領域が、TAF-I $\beta$  WTのヒストンH1シャペロン活性を抑制することが示唆された。同時に、この結果により、サブタイプ特異的な分子内相互作用により、TAF-IのヒストンH1シャペロン活性が2量体構成比に依存して制御される可能性が強く示唆された。

#### 4-3-7 TAF-I $\alpha$ の塩濃度依存的なヒストンH1シャペロン活性の変化

これまで、TAF-Iの変異体を用いた解析から、TAF-I $\alpha$ のN末端領域はC末端領域に相互作用することで、自身のヒストンH1シャペロン活性を抑制することを示してきた。しかし、

これらの結果はすべて TAF-I $\alpha$ 変異体を用いた解析から間接的に実証しただけであり、野生型 TAF-I $\alpha$ を用いての実証は出来ていない。そのため、野生型 TAF-I $\alpha$ の N 末端領域と C 末端領域の相互作用を任意に調節してヒストン H1 シャペロン活性への影響を検証する実験系の構築が必要である。そこで、TAF-I $\alpha$  WT の N 末端領域と C 末端領域が静電的相互作用により結合する可能性が高いことに着目した。静電的相互作用のうち、イオン間相互作用は一般的に塩濃度を上げることで弱めることができる。そこで、まず初めに、塩濃度が TAF-I $\alpha$  N 末端領域と C 末端領域の相互作用に与える影響を検討するため、Fig14 と同様に GST-TAF-I $\alpha$ -N-ter と His-TAF-I $\Delta$ N1 を用いたゲルシフトアッセイを行った (Fig 24)。塩濃度はそれぞれ、100 mM から 500 mM まで 100 mM 単位で変化させて検討した。その結果、TAF-I $\alpha$  N 末端領域と TAF-I 共通領域との相互作用は、300 mM 以上の NaCl 存在下で弱くなることが観察された (Fig 24、レーン 11-15)。次に TAF-I $\alpha$ の塩濃度依存的なヒストン H1 シャペロン活性の変化を検討した。ゲルシフトアッセイの結果をもとに、100 mM、250 mM、400 mM NaCl の条件下でヒストン H1 解離アッセイを行った。その結果、100 mM NaCl 条件下と比較し、250 mM、400 mM と塩濃度を上げるのに伴って、TAF-I $\alpha$ のヒストン H1 シャペロン活性が上昇する様子が観察された (Fig 25、レーン 7-9)。以上の結果より、TAF-I $\alpha$ の N 末端領域と C 末端領域が解離したことで TAF-I $\alpha$ のヒストン H1 シャペロン活性が上昇したと考えられる。最後に、GST タグを融合したヒストン H1 (GST-H1.1, Fig 26A) と TAF-I の相互作用における塩濃度依存性を、ゲルシフトアッセイにより検討した。ヒストン H1 解離アッセイと同じく、100 mM、250 mM 及び 400 mM の NaCl 濃度で検討したところ、いずれの塩濃度の条件下においても、TAF-I $\alpha$ 及び TAF-I $\beta$ とヒストン H1 との結合活性はほとんど変わらず保持されていた (Fig 26B、レーン 11-13 及び 14-16)。これより、ヒストン H1 解離アッセイの結果は、ヒストン H1 と TAF-I の結合活性が塩濃度によって変化したことによるものではないことが示唆された。以上の結果より、TAF-I $\alpha$ の N 末端領域と C 末端領域の相互作用が高塩濃度条件下により解離したことで、TAF-I $\alpha$ のヒストン H1 シャペロン活性が上昇したと考えられる。これにより、TAF-I $\alpha$ の N 末端領域が C 末端領域に相互作用することにより、その活性を抑制するという仮説が強く支持されたと考える (Fig 27)。

## 5. 考察

### 5-1 TAF-I $\alpha$ N 末端領域特異的なヒストン H1 シャペロン活性の抑制機構

これまで、TAF-I の N 末端領域の構造は報告されているが、その機能は明らかにされていない。TAF-I $\beta$ については、TAF-I $\beta$ の酸性領域欠損体の X 線結晶構造解析が報告されており (Muto et al., 2007)、その N 末端領域は $\alpha$ -ヘリックス構造を形成している。対して、TAF-I $\alpha$ の構造は決定されてはいないが、N 末端領域に存在する 37 アミノ酸のうち 10 アミノ酸がプロリンであることから、TAF-I $\beta$ のように $\alpha$ -ヘリックスは取らないことが予想される (Park and Luger, 2006a)。また、TAF-I $\beta$ については、N 末端領域が Nuclear export signal (NLS) として機能し、その制御はリン酸化によって行われているとの報告がある (Yu et al., 2013)。TAF-I $\alpha$ もまた TAF-I $\beta$ と同様に主に核に局在するが、TAF-I $\alpha$ の N 末端が NLS として機能するかは不明である。TAF-I の共通領域にも NLS として機能するアミノ酸配列が報告されており、TAF-I $\alpha$ は共通領域の NLS によって核局在する可能性が高い (Qu et al., 2007)。本研究は、生化学的な解析を通して、TAF-I $\alpha$ の N 末端領域の分子機能を明らかにした初めての報告である。

本研究の解析結果より、TAF-I $\alpha$ の N 末端領域は自身のヒストン H1 シャペロン活性に対し、抑制的に働くことが明らかとなった (Fig 9)。またその抑制活性は、TAF-I $\alpha$  N 末端領域に存在する塩基性アミノ酸に依存することが明らかとなった (Fig 12)。TAF-I $\alpha$  N 末端領域中の Lys4、Arg5、Lys13-15、Arg17 は、ヒストン H1 シャペロン活性の抑制に関わる (Fig 11)。一方、TAF-I $\alpha$ の N 末端領域中の Lys35、Lys36 はヒストン H1 シャペロン活性の抑制には関与しない。

### 5-2 TAF-I $\alpha$ N 末端領域が相互作用する C 末端領域

TAF-I $\alpha$  N 末端領域は TAF-I $\beta$ と比較して塩基性アミノ酸に富む (Fig 11)。このことから、TAF-I $\alpha$  N 末端領域が酸性アミノ酸に富む C 末端領域へ直接相互作用し、ヒストン H1 シャペロン活性を抑制するのではないかと予想し実験を行った。ゲルシフトアッセイの結果より、TAF-I $\alpha$ の N 末端領域は TAF-I の共通領域に相互作用することが明らかになった (Fig 14B、レーン 5 と 9-11 の比較)。この相互作用は TAF-I $\beta$  の N 末端領域では観察されない、TAF-I $\alpha$  特異的な活性である。また、TAF-I $\alpha$  N 末端領域と TAF-I の共通領域の相互作用は TAF-I $\alpha$  の N 末端領域点変異体 TAF-I $\alpha$ KR6sA-N-ter では観察されなかった (Fig 14B、レーン 5 と 12-14 との比較)。このことから、TAF-I $\alpha$  N 末端領域に存在する塩基性アミノ酸依存的な相互作用であることが示唆された。これらの結果は、TAF-I $\alpha$ KR6sA のヒストン H1 シャペロン活性が、TAF-I $\beta$ とほぼ同等である結果とよく合致する。また、TAF-I の N 末端及び C 末

端領域欠損変異体 TAF-IΔN1ΔC3 では、TAF-Iα N 末端領域変異体との相互作用が見られなくなることから、TAF-Iα N 末端領域のターゲット領域は C 末端領域であると考えられた (Fig 15B、レーン 2 と 3-5 の比較)。さらに、TAF-Iα N 末端領域と C 末端領域の直接の相互作用を検討するため、TAF-I N 末端領域と TAF-I C 末端領域の一部であるα237-257C 末端領域の架橋実験を行った。その結果、TAF-Iα N 末端領域が特異的に C 末端領域と直接相互作用することが明らかとなった (Fig 16B、レーン 10-12 と 18-20 の比較)。さらに、2 量体構造をとった TAF-Iαでも同様に N 末端領域と C 末端領域が相互作用するかを検討するため、TAF-Iαにシステインペアを導入した変異体を作製し、FlAsH ラベリングアッセイを行った。この結果より、2 量体構造をとった場合に、TAF-Iα の N 末端領域と C 末端領域が近接することが明らかとなった (Fig 20B)。興味深いことに、TAF-Iαの N 末端領域と C 末端領域は主には決まった領域の間で相互作用する可能性が示唆された。TAF-Iα N 末端領域に 1 ヶ所、及び C 末端領域 4 ヶ所にシステインペアを導入し、各残基が近接するかを検討すると、TAF-Iα の N 末端領域中の Lys13 は主に C 末端領域中の Glu246 に近接する (Fig 20)。この領域には、TAF-Iα N 末端領域と C 末端領域の直接の相互作用を検証した際に用いた α237-257C 末端領域の配列も含まれている (Fig 16)。

TAF-Iβのコアヒストンシャペロン活性は酸性アミノ酸残基の数に依存するのではなく、226-248 アミノ酸領域 (TAF-Iαの 239-261) が必須であることが明らかとなっている (Kawase et al., 1996)。今回 TAF-Iα N 末端領域中の Lys13 が近接する C 末端領域の一部は、このコアヒストンシャペロン活性に必須の領域と重複する。また、TAF-I は試験管内においてアデノウイルスコアタンパク質複合体からの転写および複製を、ウイルスコアタンパク質 VII と結合しその構造を変換することで促進するが、その TAF-I 側の結合領域も、今回明らかとなった N 末端領域が優先的に結合する領域と重複する (Gyurcsik et al., 2006)。2 次構造予測では、TAF-I の C 末端領域は特定の構造を取らないと予想される。この領域がどのような機能を持つかは現在のところ不明だが、C 末端領域の酸性アミノ酸配列の中でも、それぞれ機能的に異なるサブドメインが存在する可能性が考えられる。今回 TAF-Iα N 末端領域が主に相互作用すると示唆された C 末端の領域は、酸性アミノ酸クラスターの中でも TAF-I がヒストンシャペロンとして機能する場合に最も重要なサブドメインとして機能しているのかもしれない。

### 5-3 TAF-IΔC3 を用いた TAF-I N 末端領域によるヒストン H1 シャペロン活性制御

TAF-Iα N 末端領域が C 末端領域に相互作用し、自身のヒストン H1 シャペロン活性を抑制する可能性が示唆された。TAF-I はホモあるいはヘテロ 2 量体を形成するが、X 線結晶構造解析の結果から、TAF-I の N 末端領域は 2 量体中のもう一方の TAF-I の C 末端領域に近接することが示唆されている (Muto et al., 2007)。このことから、TAF-I 2 量体中の TAF-Iα

の N 末端領域が、もう一方の TAF-I の C 末端領域に相互作用してその活性を抑制する可能性が考えられる。本研究ではこの仮説について、TAF-I $\Delta$ C3 と TAF-I $\beta$ を用いたヘテロ 2 量体を作製し、そのヒストン H1 シャペロン活性を比較することで検討した (Fig 21)。タンパク質の変性 - 再生操作を行って、TAF-I のそれぞれのヘテロ 2 量体とホモ 2 量体を混合したサンプルを作製し、ヒストン H1 シャペロン活性を検討したところ、結果は予想した通り、TAF-I $\alpha$  $\Delta$ C3 とヘテロ 2 量体を形成した TAF-I $\beta$ の活性は、TAF-I $\beta$  $\Delta$ C3 とヘテロ 2 量体を形成した TAF-I $\beta$ より抑制効果が強いという結果を得た (Fig 23)。この結果より、TAF-I $\alpha$ の N 末端領域は、2 量体中で、もう一方の TAF-I に対し、ヒストン H1 シャペロン活性の抑制効果を示すことが明らかとなった。

#### 5-4 塩濃度依存的な TAF-I $\alpha$ のヒストン H1 シャペロン活性の変化

TAF-I $\alpha$ の N 末端領域と C 末端領域の結合様式は、塩基性アミノ酸と酸性アミノ酸領域の相互作用であることから、イオン間相互作用であると推測された。そこで、塩濃度依存的な TAF-I $\alpha$ の N 末端領域と C 末端領域の相互作用の変化を検討したところ、高塩濃度の条件下において TAF-I $\alpha$  N 末端領域と C 末端領域の相互作用が弱まることを確認した (Fig 24)。この塩濃度条件下で、TAF-I $\alpha$ のヒストン H1 シャペロン活性を検討したところ、塩濃度の上昇に伴い、TAF-I $\alpha$  WT のヒストンシャペロン活性の上昇が観察された (Fig 25)。これらの結果は、塩濃度の増加に伴う TAF-I $\alpha$ の N 末端領域と C 末端領域の解離と、TAF-I $\alpha$ のヒストン H1 シャペロン活性の上昇に相関性が見られることを示している。また、この塩濃度条件下では TAF-I とヒストン H1 の相互作用にはほとんど影響は見られなかった (Fig 26)。以上の結果は、TAF-I $\alpha$  N 末端領域が C 末端領域に相互作用することで、そのヒストン H1 シャペロン活性が抑制されるという結果を強く支持する。さらに、TAF-I $\alpha$ の N 末端領域と C 末端領域の結合及び解離を制御する機構によって、TAF-I $\alpha$ のヒストン H1 シャペロン活性を調節することが出来る可能性を示唆している。そのような機構としては、TAF-I $\alpha$  N 末端領域特異的な相互作用分子の存在や、リン酸化などの翻訳後修飾が想定され、今後細胞内での TAF-I $\alpha$  及び $\beta$ の解析を行っていく上で、この点についても明らかにする必要がある。



## 6. 総括と展望

### 6-1 総括

本研究では TAF-I のサブタイプ間におけるヒストン H1 シャペロン活性の差から、その制御機構に焦点を当て解析を行った。その結果、TAF-I $\alpha$  N 末端領域が自身の C 末端領域に相互作用すること、その相互作用は、TAF-I $\alpha$  N 末端領域の塩基性アミノ酸依存的であり、TAF-I $\beta$ では観察されないことを明らかにした。また、TAF-I $\alpha$  N 末端領域に変異を導入し、C 末端領域との相互作用を弱めると、TAF-I $\beta$ とほぼ同等のヒストン H1 シャペロン活性を示す。このことから、TAF-I $\alpha$  の N 末端領域は C 末端領域に相互作用することで、自身のヒストン H1 シャペロン活性を抑制することを明らかにした。

### 6-2 今後の展望

本研究では、TAF-I のサブタイプ間におけるヒストン H1 シャペロン活性の違いに焦点を当て、新規の活性制御機構を明らかにした。TAF-I のサブタイプ間の発現パターンが細胞特異的に異なることから、サブタイプの 2 量体構成比によって TAF-I の活性が調節され、それによりヒストン H1 を介した転写制御が行われている可能性が考えられる。今後は、TAF-I のサブタイプの発現パターンの変化に伴う遺伝子発現の変化を、ヒストン H1 のターゲット遺伝子に焦点を当て解析を行う予定である。これには、TAF-I とヒストン H1 が標的とする遺伝子について、次世代シーケンスやマイクロアレイなどを用いて網羅的に解析する必要がある。また、発生や分化に伴う遺伝子発現パターンの変化や、ホルモンなどの細胞外刺激に応答する遺伝子発現などに着目し、TAF-I サブタイプとヒストン H1 によって制御される遺伝子群を、TAF-I の生理機能という観点からも明らかにしていく必要がある。

また、ヒストン H1 シャペロンのヒストン H1 バリエーション特異性も、今後検証すべきポイントである。以前の報告において、細胞内でヒストン H1.1 は TAF-I $\alpha$ 及び $\beta$ の両方と結合する。一方、ヒストン H1.0 は、細胞内で TAF-I $\beta$ と主に結合し、TAF-I $\alpha$ とはほとんど結合しない (Kato et al., 2011)。現時点で詳細は不明だが、過去の報告から TAF-I はヒストン H1 の CTD に結合することが明らかになっており、この領域はヒストン H1 バリエーション間および種間で保存性の高い GD と比較して、アミノ酸配列の多様性が高い領域であることが知られている。このことから、TAF-I のサブタイプ間でヒストン H1.1 の CTD は同様に認識できるが、TAF-I $\alpha$ がヒストン H1.0 の CTD を認識しづらい可能性が示唆される。TAF-I のサブタイプは、ヒストン H1 シャペロン活性の差だけでなく、結合するヒストン H1 バリエーションの選択性が異なることによっても、遺伝子発現制御の多様性に関与するのかもしれない。

TAF-I はがん化に関わる遺伝子であることが想定されており、その発現量の亢進が、前立

腺癌細胞等いくつかのがん細胞で報告されている。どのようにがん化に関与するかは不明な点が多いが、TAF-I のヒストン H1 シャペロン活性の抑制、あるいは亢進が細胞増殖に関わる可能性も十分に考えられる。ヒストンタンパク質の制御（代謝）異常は、染色体の不安定性や遺伝子発現の異常をもたらす、それはいずれがん化にもつながりうる可能性がある。TAF-I とヒストン H1 により制御される遺伝子群には、細胞のがん化に関与する遺伝子が含まれることも十分に想定される。がんの進行と TAF-I サブタイプの発現パターンの変化の相関性を追うことで、細胞のがん化と TAF-I のヒストン H1 シャペロンとしての機能の関連性も明らかにできる可能性が考えられる。今後このような視点からの解析を行っていくことで、TAF-I サブタイプの発現パターンの変化が、がんの進行の指標の一つとなる可能性も期待できる。

また序論でも述べたように、TAF-I はクロマチン制御因子としてのみならず、様々な細胞機能に関わる多機能なタンパク質である。本研究では TAF-I のヒストン H1 シャペロン活性にのみ主眼を置いたが、本研究により明らかとなった TAF-I サブタイプ依存的な機能制御機構が、TAF-I の他の機能の制御にも関わる可能性は十分に考えられる。今後そのような視点でも研究を進めていきたいと考えている。

## 参考文献

- Anazawa, Y., Nakagawa, H., Furihara, M., Ashida, S., Tamura, K., Yoshioka, H., Shuin, T., Fujioka, T., Katagiri, T., Nakamura, Y. (2005). PCOTH, a novel gene overexpressed in prostate cancers, promotes prostate cancer growth through phosphorylation of oncoprotein TAF-I $\beta$ /SET. *Cancer Res.* **65**, 4578-4586
- Asaka, M.N., Murano, K., Nagata, K. (2008). Sp1-mediated transcription regulation of TAF-I $\alpha$  gene encoding a histone chaperone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 665–670.
- Beresford, P. J., Zhang, D., Oh, D. Y., Fan, Z., Greer, E. L., Russo, M. L., Jaju, M., Lieberman, J. (2001). Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J. Biol. Chem.* **276**, 43285-43293.
- Brennan, C.M., Gallouzi, I.E., Steitz, J.A. (2000). Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J. Cell Biol.* **151**,1-14
- Bresnick, E.H., Bustin, M., Marsaud, V., Richard-Foy, H., Hager, G.L. (1992). The transcriptionally-active MMTV promoter is depleted of histone H1. *Nucleic Acids Res.* **20**, 273–278.
- Canela, N., Rodriguez-Vilarrupla, A., Estanyol, J. M., Diaz, C., Pujol, M. J., Agell, N., Bachs, O. (2003). The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 1158-1164.
- Fan, Y., Nikitina, T., Morin-Kensicki, E.M., Zhao, J., Magnuson, T.R., Woodcock, C.L., Skoultschi, A.I. (2003). H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4559–4572.
- Gong, M., Ni, J.H., Jia, H.T. (2002). Increased exchange rate of histone H1 on chromatin by exogenous myogenin expression. *Cell Res.* **12**, 395-400.
- Grabarek, Z., Gergely, J. (1990). Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal. Biochem.* **185**,131-135.
- Griffin, B.A., Adams, S.R., Tsien, R.Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**, 269–272.

Gyurcsik, B., Haruki, H., Takahashi, T., Mihara, H., Nagata, K. (2006). Binding modes of the precursor of adenovirus major core protein VII to DNA and template activating factor I: implication for the mechanism of remodeling of the adenovirus chromatin. *Biochemistry* **45**, 303–313.

Happel, N., Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* **431**, 1–12.

Haruki, H., Gyurcsik, B., Okuwaki, M., Nagata, K. (2003). Ternary complex formation between DNA-adenovirus core protein VII and TAF-I $\beta$ /SET, an acidic molecular chaperone. *FEBS Lett.* **555**, 521–527.

Hashimoto, H., Takami, Y., Sonoda, E., Iwasaki, T., Iwano, H., Tachibana, M., Takeda, S., Nakayama, T., Kimura, H., Shinkai, Y. (2010). Histone H1 null vertebrate cells exhibit altered nucleosome architecture. *Nucleic Acids Res.* **38**, 3533–3545.

He, K., Shi, L., Jiang, T., Li, Q., Chen, Y., Meng, C. (2016). Association between SET expression and glioblastoma cell apoptosis and proliferation. *Oncol. Lett.* **12**, 2435–2444.

Hisaoka, M., Nagata, K., Okuwaki, M. (2014). Intrinsically disordered regions of nucleophosmin/B23 regulate its RNA binding activity through their inter- and intra-molecular association. *Nucleic Acids Res.* **42**, 1180–1195.

Jullien, J., Astrand, C., Halley-Stott, R.P., Garrett, N., Gurdon, J.B. (2010). Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 5483–5488.

Kadota, S., Nagata, K. (2014). Silencing of IFN-stimulated gene transcription is regulated by histone H1 and its chaperone TAF-I. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7642–7653.

Kalousi, A., Hoffbeck, A.S., Selemenakis, P.N., Pinder, J., Savage, K.I., Khanna, K.K., Brino, L., Dellaire, G., Gorgoulis, V.G., Soutoglou, E. (2015). The nuclear oncogene SET controls DNA repair by KAP1 and HP1 retention to chromatin. *Cell Rep.* **11**, 149–163.

Kato, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Okuwaki, M., Nagata, K. (2007). Histone acetylation-independent transcription stimulation by a histone chaperone. *Nucleic Acids Res.* **35**, 705–715.

- Kato, K., Okuwaki, M., Nagata, K. (2011). Role of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. *J. Cell. Sci.* **124**, 3254–3265.
- Kawase, H., Okuwaki, M., Miyaji, M., Ohba, R., Handa, H., Ishimi, Y., Fujii-Nakata, T., Kikuchi, A., Nagata, K. (1996). NAP-I is a functional homologue of TAF-I that is required for replication and transcription of the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *Genes Cells* **1**, 1045–1056.
- Klooster, J.P., Leeuwen, I., Scheres, N., Anthony, E.C., Hordijk, P.L. (2007). Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO J.* **26**, 336-345
- Lee, H., Habas, R., Abate-Shen, C. (2004). Msx1 cooperates with histone H1b for inhibition of transcription and myogenesis. *Science* **304**, 1675–1678.
- Li, M., Guo, H., Damuni, Z. (1995). Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochem.* **34**,1988-1996.
- Marintcheva, B., Marintchev, A., Wanger, G., Richardson, C.C. (2008). Acidic C-terminal tail of the ssDNA-binding protein of bacteriophage T7 and ssDNA compete for the same binding surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 1855–1860.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Kikuchi, A., Tsujimoto, M. (1999a). Sperm chromatin decondensation by template activating factor I through direct interaction with basic proteins. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6940–6952.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Okuwaki, M., Tsujimoto, M. (1999b). Histone- and chromatin-binding activity of template activating factor-I. *FEBS Lett.* **463**, 285–288.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Ui, M., Hanaoka, F. (1993). Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA replication. *J. Biol. Chem.* **268**, 10582–10587.
- Medrzycki, M., Zhang, Y., McDonald, J., Fan, Y. (2013). Profiling of linker histone variants in ovarian cancer. *Front Biosci.* **17**, 396-406.

Miyaji-Yamaguchi, M., Okuwaki, M., Nagata, K. (1999). Coiled-coil structure-mediated dimerization of template activating factor-I is critical for its chromatin remodeling activity. *J. Mol. Biol.* **290**, 547–557.

Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T., Horikoshi, M. (2007). Relationship between the structure of SET/TAF-I $\beta$ /INHAT and its histone chaperone activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 4285–4290.

Nagata, K., Kawase, H., Handa, H., Yano, K., Yamasaki, M., Ishimi, Y., Okuda, A., Kikuchi, A., Matsumoto, K. (1995). Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 4279–4283.

Nagata, K., Saito, S., Okuwaki, M., Kawase, H., Furuya, A., Kusano, A., Hanai, N., Okuda, A., Kikuchi, A. (1998). Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. *Exp. Cell Res.* **240**, 274–281.

Okuwaki, M., Nagata, K. (1998). Template activating factor-I remodels the chromatin structure and stimulates transcription from the chromatin template. *J. Biol. Chem.* **273**, 34511–34518.

Okuwaki, M., Abe, M., Hisaoka, M., Nagata, K. (2016). Regulation of cellular dynamics and chromosomal binding site preference of linker histone H1.0 and H1.X. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 2681–2696.

Osakabe, A., Tachiwana, H., Matsunaga, T., Shiga, T., Nozawa, R., Obuse, C., Kurumizaka, H. (2010). Nucleosome formation activity of human somatic nuclear autoantigen sperm protein (sNASP). *J. Biol. Chem.* **285**, 11913–11921.

Park, Y.J., Luger, K. (2006a). Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 549–558.

Park, Y.J., Luger, K. (2006b). The structure and function of nucleosome assembly protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 1248–1253.

Pippa, R., Dominguez, A., Malumbres, R., Endo, A., Arriazu, E., Marcotegui, N., Guruceaga, E., Odero, M.D. (2016). MYC-dependent recruitment of RUNX1 and GATA2 on the SET oncogene promoter enhances PP2A inactivation in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget.9840.

- Qu, D., Zhang, Y., Ma, J., Guo, K., Li, R., Yin, Y., Cao, X., Park, D.S. (2007). The nuclear localization of SET mediated by  $\text{imp}\alpha 3/\text{imp}\beta$  attenuates its cytosolic toxicity in neurons. *J. Neurochem.* **103**, 408-422
- Raghuram, N., Carrero, G., Th'ng, J., Hendzel, M.J. (2009). Molecular dynamics of histone H1 Dynamics. *Biochem. Cell Biol.* **87**, 189–206.
- Saito, S., Miyaji-Yamaguchi, M., Shimoyama, T., Nagata, K. (1999). Functional domains of template-activating factor-I as a protein phosphatase 2A inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 471–475.
- Sancho, M., Diani, E., Beato, M., Jordan, A. (2008). Depletion of human histone H1 variants uncovers specific roles in gene expression and cell growth. *PLoS Genet.* **4**, e1000227.
- Seo, S.B., McNamara, P., Heo, P., Turner, A., Lane, W.S., Chakravarti, D. (2001). Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* **104**, 119-130.
- Shintomi, K., Iwabuchi, M., Saeki, H., Ura, K., Kishimoto, T., Ohsumi, K. (2005). Nucleosome assembly protein-1 is a linker histone H1 chaperone in *Xenopus* eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 8210–8215.
- Strahl, B.D., Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**, 51-61.
- Yellajoshyula, D., Brown, D.T. (2006). Global modulation of chromatin dynamics mediated by dephosphorylation of linker histone H1 is necessary for erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 18568–18573
- Yu, G., Yan, T., Feng, Y., Liu, X., Xia, Y., Luo, H., Wang, J.-Z., Wang, X. (2013). Ser9 phosphorylation causes cytoplasmic detention of I2PP2A/SET in Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* **34**, 1748–1758.
- Zhang, P., Branson, O.E., Freitas, M.A., Parthun, M.R. (2016). Identification of replication-dependent and replication-independent linker histone H1 complexes: Tpr

specifically replication-dependent linker histone stability. *Biochem. J.*, doi:  
10.1186/s12858-0-16-0074-9

Zhang, Q., Giebler, H.A., Isaacson, M.K., Nyborg, J.K. (2015). Eviction of linker histone H1 by NAP-family histone chaperones enhances activated transcription. *Epigenetics Chromatin* **8**, 30.

Zhang, Y., Liu, Z., Medrzycki, M., Cao, K., Fan, Y. (2012). Reduction of Hox gene expression by histone H1 depletion. *PLoS ONE* **7**, e38829.

Zhou, B., Jiang, J., Feng, H., Ghirlando, R., Xiao, S., Bai, Y. (2015). Structural mechanisms of nucleosome recognition by linker histones. *Mol. Cell*, **59**, 628-638.



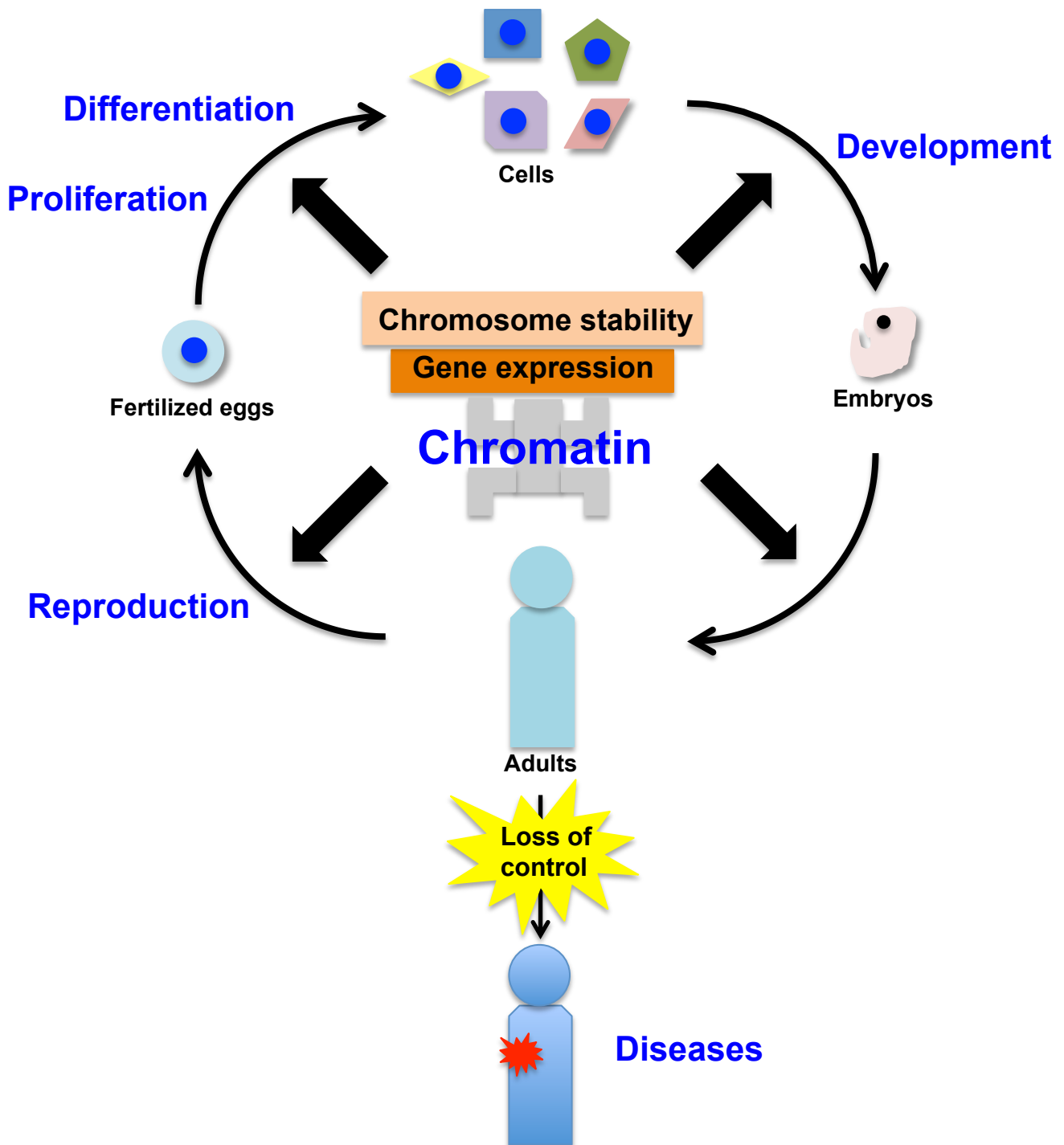


Fig.1 クロマチン構造の生物学的意義

クロマチン構造には大きく分けて2つの生物学的意義があり、一つは遺伝子発現制御、もう一つは染色体の安定性の保持である。受精卵から細胞は増殖、分化し、器官形成を経て個体を形成する。そして老化し、時にがんなどを患うが、再生することもある。そして個体は次世代に遺伝情報を伝える。これらの過程には、厳密な遺伝子発現制御、安定な染色体の維持が必須であり、クロマチン構造制御はそれらの制御に重要である。

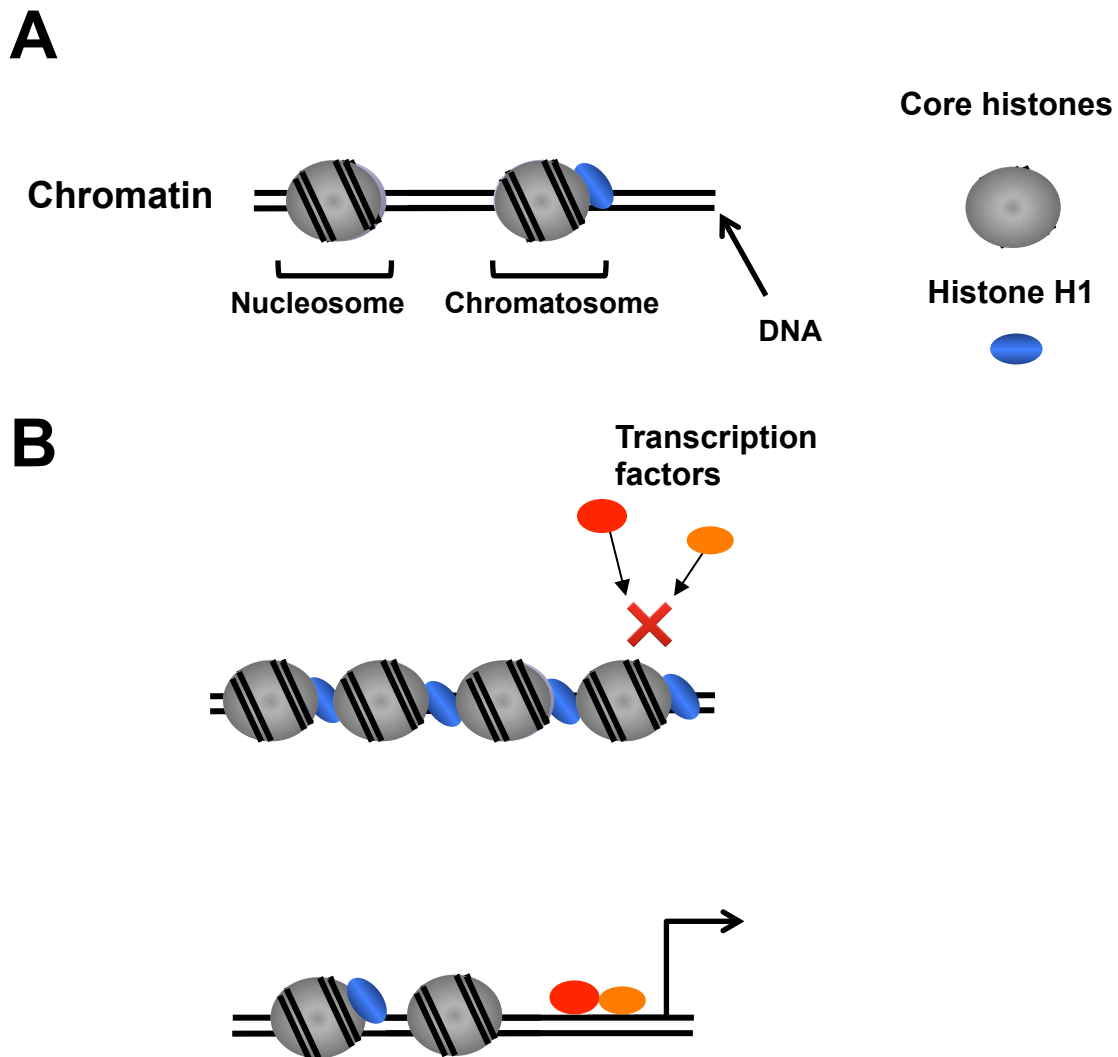
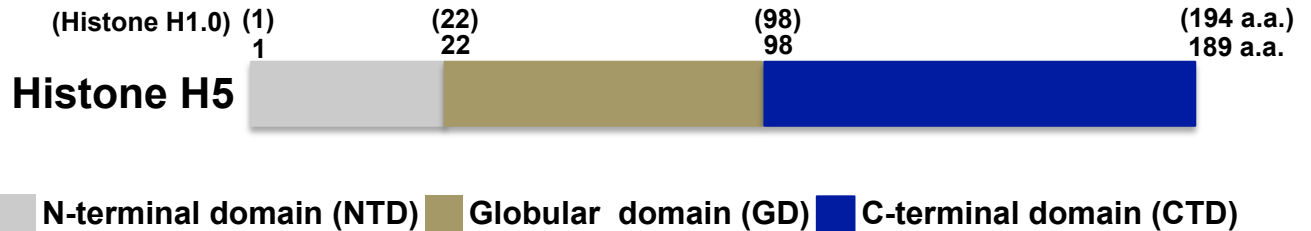
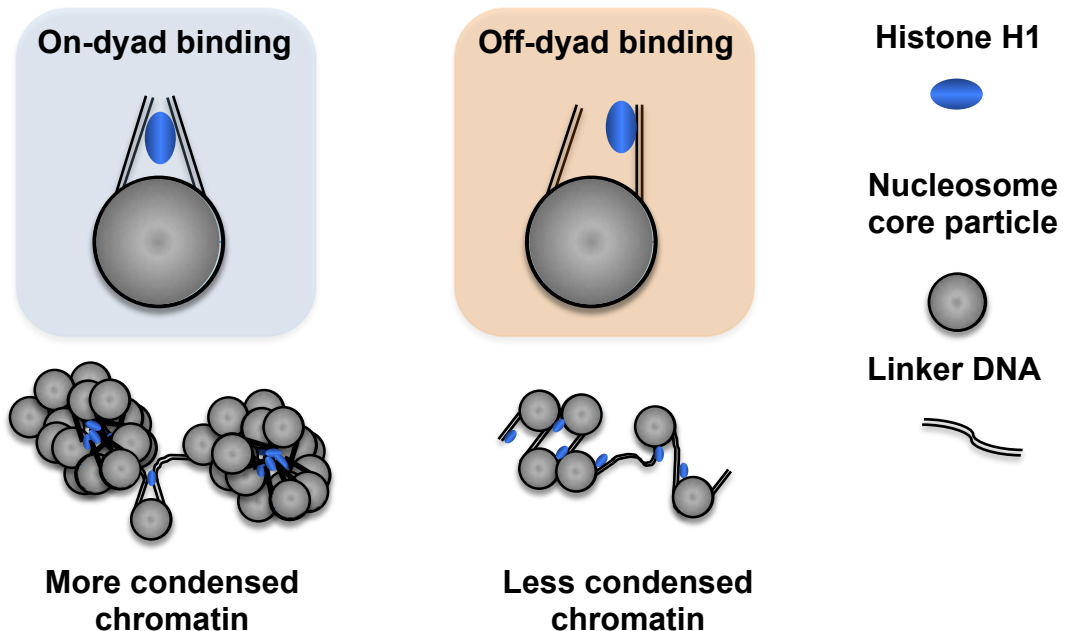


Fig.2 クロマチン構造

(A) コアヒストンに染色体DNAが巻きついたものをヌクレオソームと呼び、クロマチン構造の最小単位となる。ヌクレオソーム間をつなぐリンカーDNA領域にリンカーヒストンH1が結合してクロマトゾームを形成する。(B) 一般的に、転写制御因子等の転写活性化因子は凝縮したクロマチン構造へは立体障害で近づくことができず、一方で緩やかな領域には比較的アクセスしやすい。クロマチン構造は動的に変動することで、遺伝子発現をコントロールする。

**A****B**

Zhou *et al.* Mol. Cell  
2015, 59, 628-638より改変

Fig.3 リンカーヒストンH1構造概要

(A) ヒストンH1の模式図を示す。ヒストンH1は大きく3つの機能ドメインに分かれており、winged helix構造をとるGlobular domain (GD)と、N末端とC末端側に構造を取らないN-terminal domain(NTD)とC-terminal domain(CTD)が存在する。(B) ヌクレオソームとチキン由来ヒストンH5(ヒトヒストンH1.0ホモログ)のGDとヌクレオソームの結晶構造解析の結果からのモデル図。2つのヌクレオソームの間のリンカー領域に、GD中の2カ所で結合する on-dyad binding(left)では、2つのヌクレオソームが近接し、より密なクロマチン構造をとると想定される。一方、GD中の1カ所で結合するoff-dyad binding(right)では、GDと結合していない側のヌクレオソームが距離を保つことで、少し緩いクロマチン構造をとると予想される。

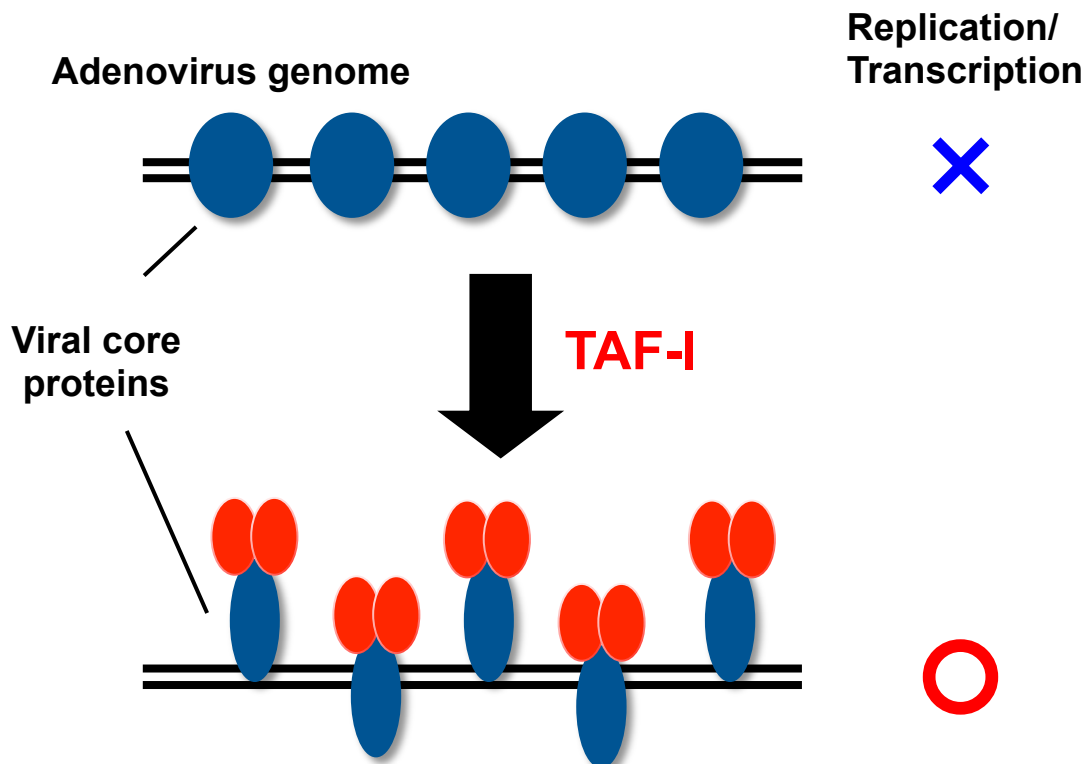
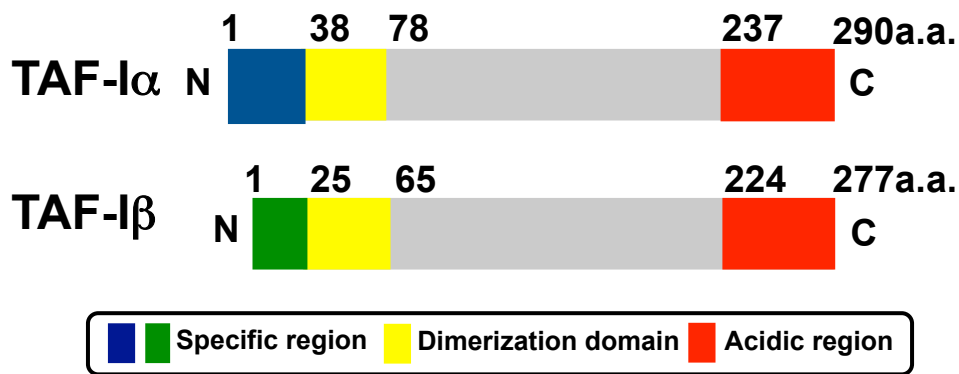


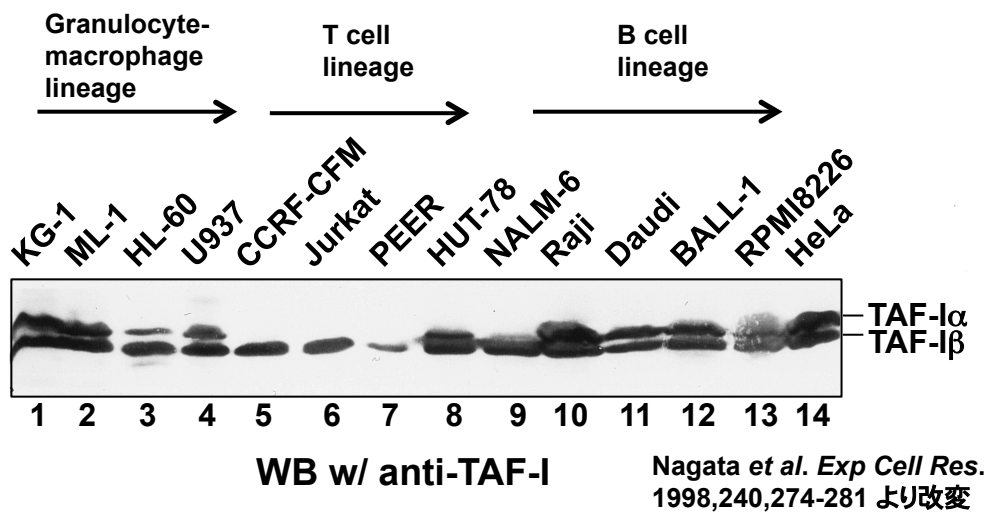
Fig.4 Template activating factor (TAF)-Iの同定

アデノウイルスゲノムは二本鎖DNAに塩基性のウイルスコアタンパク質が結合したアデノウイルスコアタンパク質複合体(Adコア)と呼ばれる真核細胞クロマチン様の構造をとる。裸のゲノムを鋳型とした複製反応を促進する因子では、Adコアからの複製は促進されない。Adコア、複製促進活性を指標に非感染HeLa細胞抽出液よりTAF-Iが同定された。TAF-Iは、塩基性コアタンパク質VIIに結合し、DNAとコアタンパク質VIIの結合モードを変化させることでAdコアの構造変換を行い、複製及び転写を促進する。

**A**



**B**



**Fig.5 Template activating factor (TAF)-I**

(A) TAF-IはN末端のみ異なる $\alpha$ 及び $\beta$ の2つのサブタイプが存在する。TAF-Iは2量体形成領域を介して、ホモあるいはヘテロ2量体を形成する。C末端領域には、酸性アミノ酸領域が存在する。2量体形成能と、酸性領域はTAF-Iの構造変換活性及びヒストンシャペロン活性に必須である。(B) TAF-I $\alpha$ 及び $\beta$ は同一遺伝子座から転写されるが、そのプロモーターは各々異なっており、サブタイプの発現パターンは細胞株によって異なることが報告されている。図は、分化ステージの異なる各種血球細胞株におけるTAF-I $\alpha$ と $\beta$ の発現を示す。しかしながら、TAF-Iが2つのサブタイプをもつ生物学的意義は明らかではない。

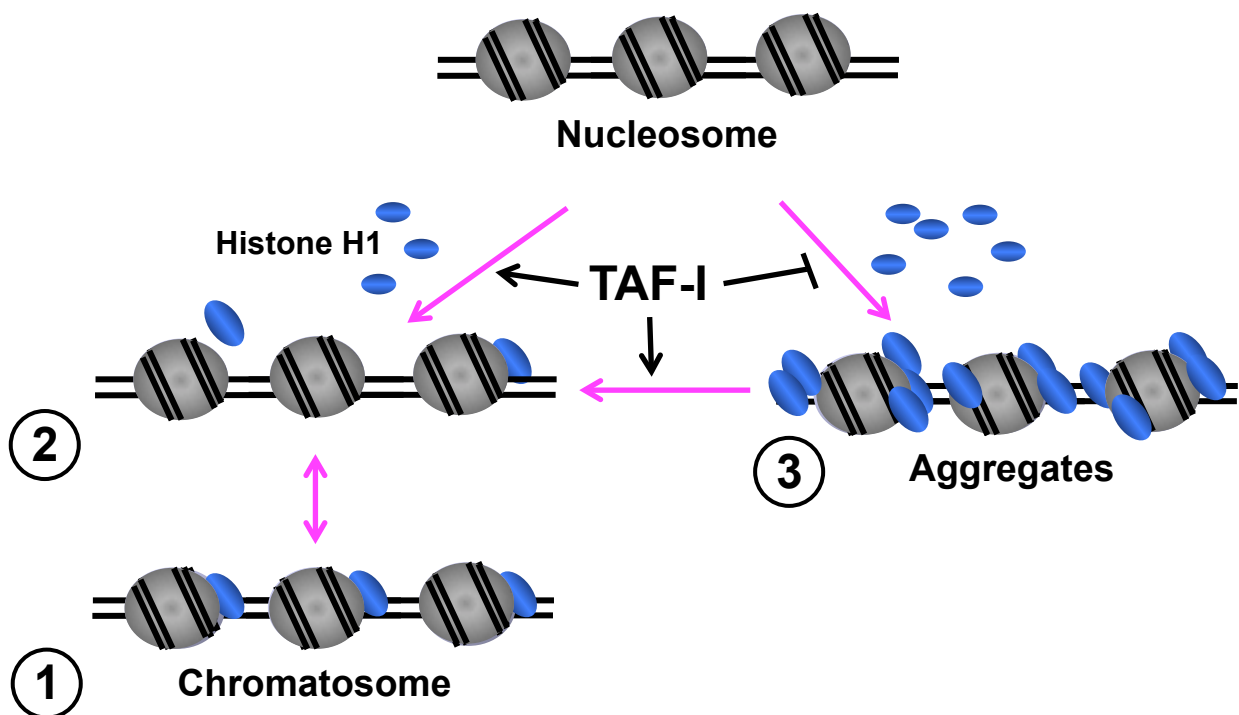


Fig.6 ヒストンH1シャペロンTAF-IはヒストンH1のDNAからの脱着を制御する因子である

TAF-IはヒストンH1シャペロンとして、①クロマトゾームの形成、②クロマトゾームの解体および③ヒストンH1とDNA(クロマチン)との非特異的相互作用の抑制に関わる。

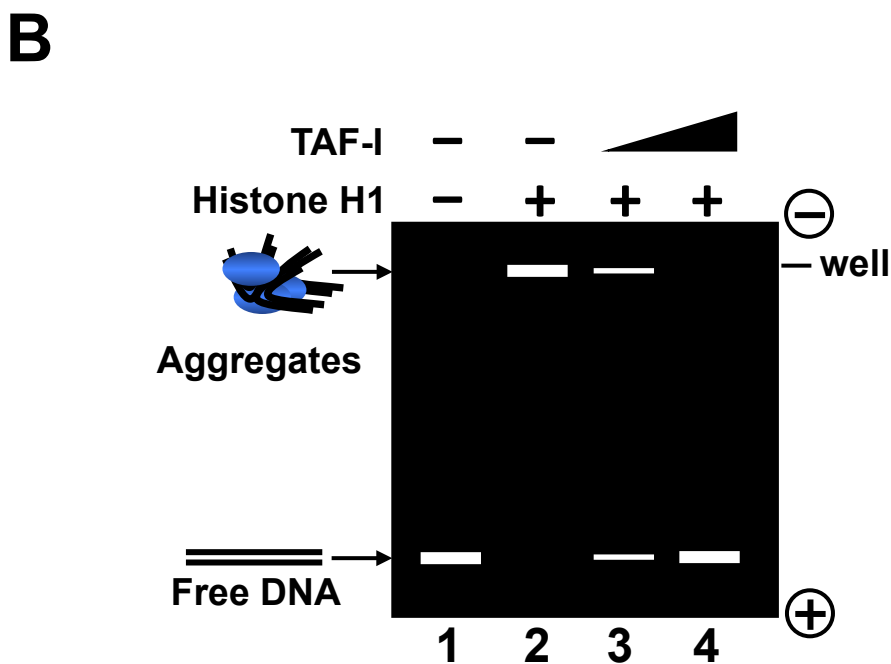
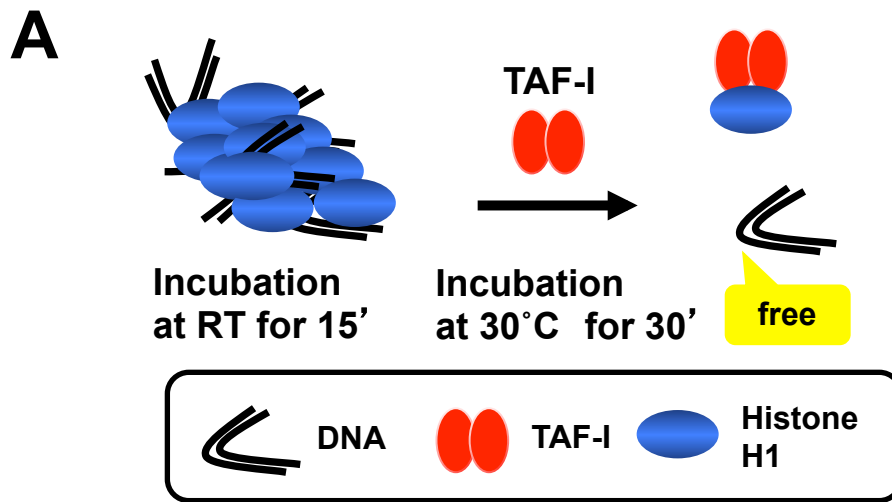


Fig.7 ヒストンH1解離アッセイ

(A) ヒストンH1解離アッセイの概要を示した。DNAとヒストンH1のみを混合すると、両者は非特異的凝集体を形成する。そこへ、TAF-Iを添加すると、TAF-IのヒストンH1シャペロン活性依存的に、非特異的凝集体からヒストンH1が解離することで非特異的凝集体が解消する。(B) サンプルを5% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開すると、フリーのDNAはゲルに侵入し、移動する(レーン1)。一方で、非特異的凝集体はゲルに侵入することができず、wellの位置から移動することができない(レーン2)。本実験では、非特異的凝集体の解消によって現れるフリーのDNAを検出することで、TAF-IのヒストンH1シャペロン活性を評価した(レーン3,4)。

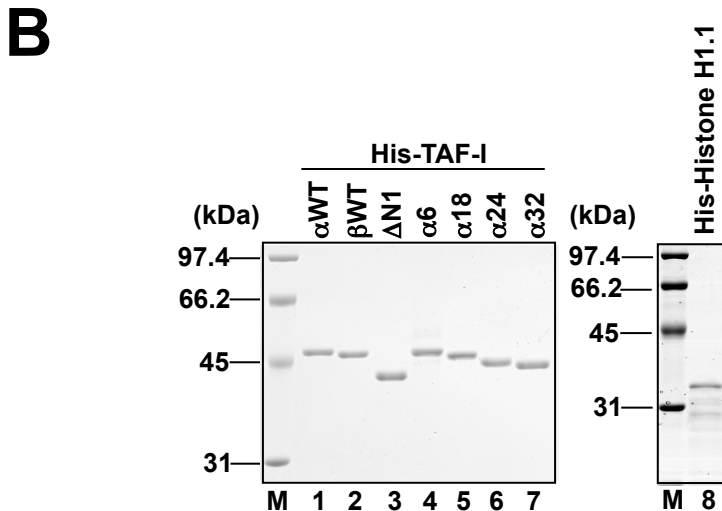
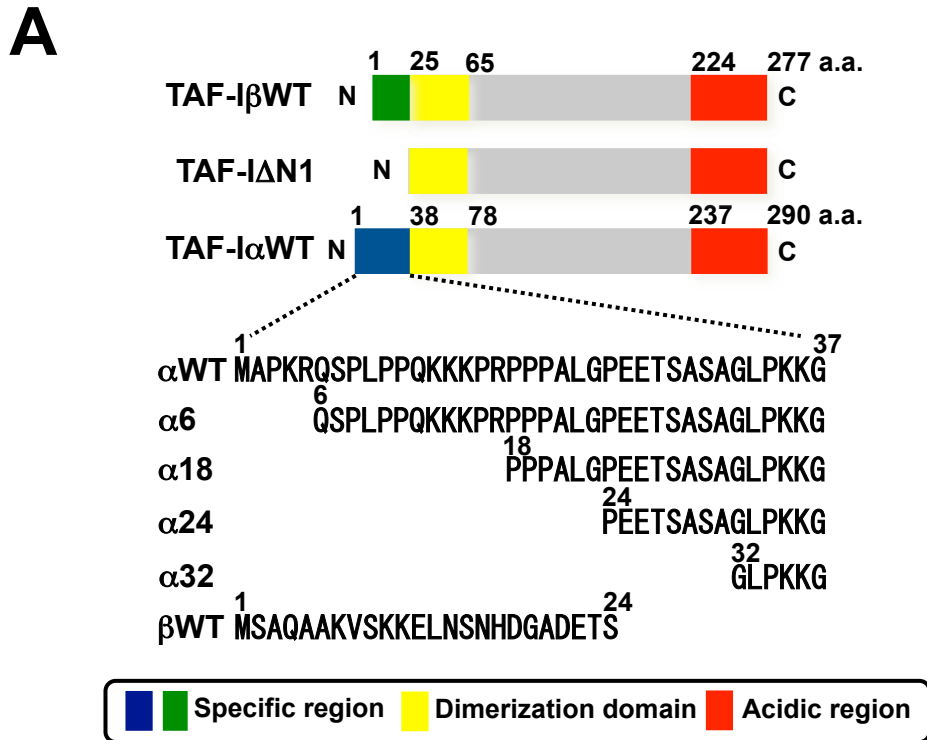


Fig.8 TAF-I N末端領域欠損変異体

(A) 今回作製したTAF-I $\alpha$  N末端領域欠損変異体の模式図を示した。TAF-I $\alpha$  N末端側から、それぞれ5、17、23、31アミノ酸ずつ削った4種類の変異体を作成した。(B) 精製したHis-TAF-I $\beta$ 、 $\Delta$ N1、 $\alpha$ 及びN末端領域欠損変異体を10% SDS-PAGEに、His-Histone H1.1を12.5% SDS-PAGEにそれぞれ展開し、CBB染色にて検出した。



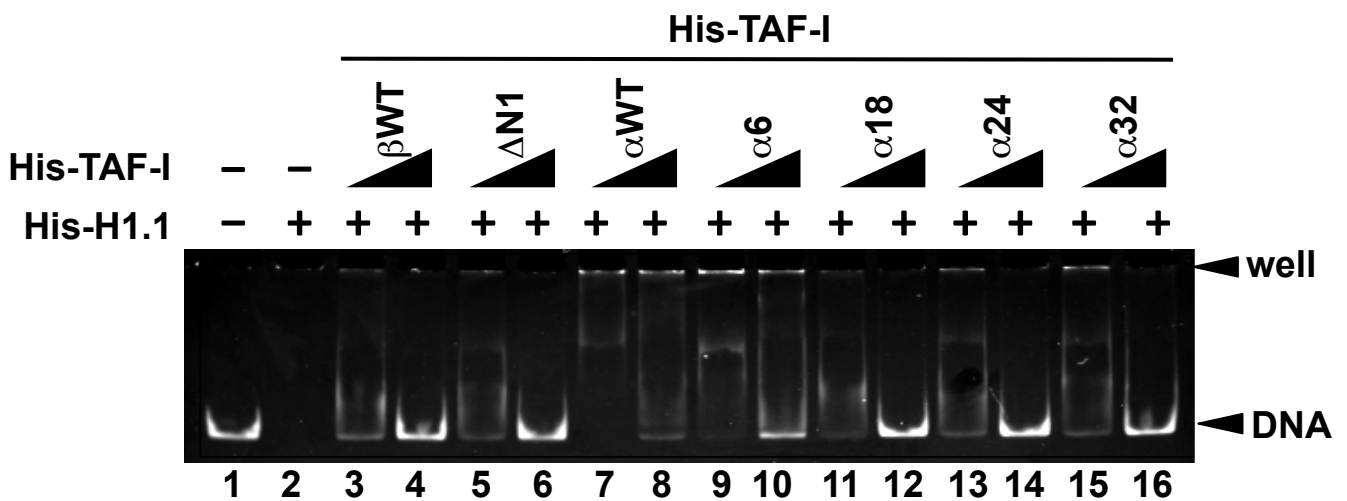


Fig.9 TAF-I N末端領域のヒストンH1シャペロン活性への影響

TAF-I $\alpha$ 、 $\beta$ 及びTAF-I N末端領域の欠損変異体( $\Delta$ N1, $\alpha$ 6, $\alpha$ 18, $\alpha$ 24, $\alpha$ 32)を用いて、ヒストンH1解離アッセイを行いH1シャペロン活性を検討した。DNA (0.52pmol)とhisotne H1(3.85 pmol)を混合し、室温でインキュベーションして非特異的凝集体を形成させた。異なる量のTAF-I (0.87 pmol, 3.48 pmol)の存在下でさらにインキュベーション後、5% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開し、GelRedでDNAを染色した。

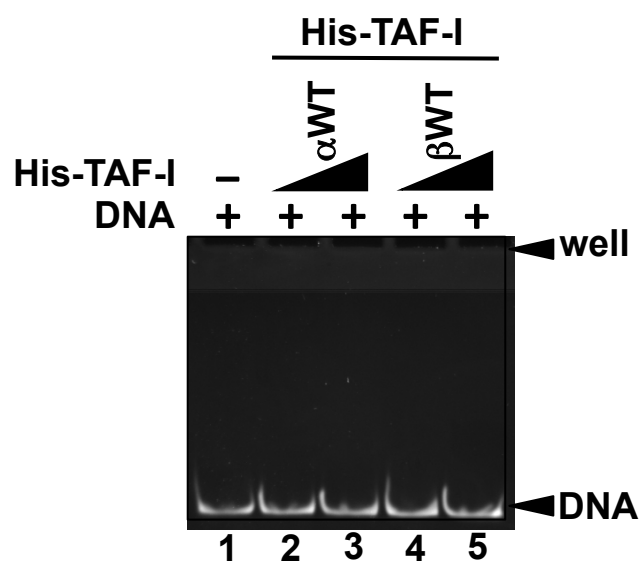


Fig.10 TAF-IのDNA結合活性の検討

TAF-I $\alpha$ 及びTAF-I $\beta$  (0.87, 3.48 pmol)とDNA (0.52 pmol)を混合し、5% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開後、GelRedにてDNAを染色した。

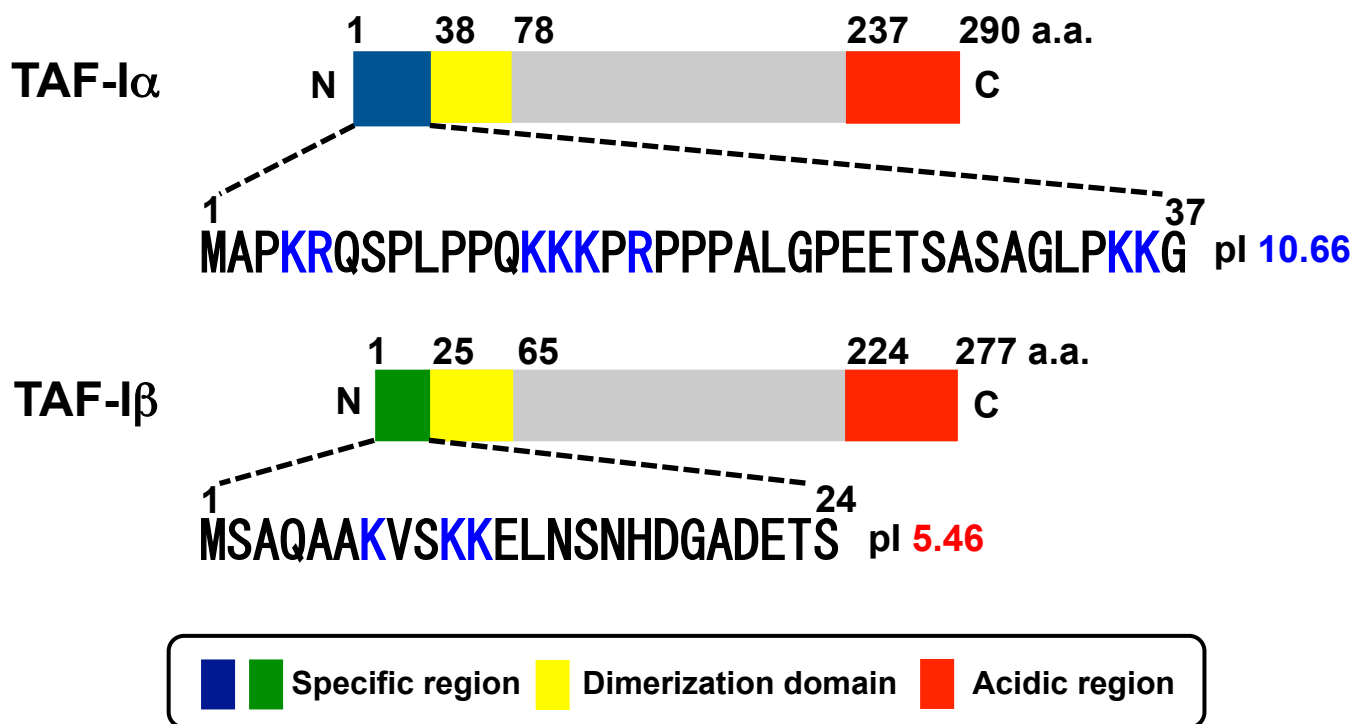


Fig.11 TAF-IのN末端領域のアミノ酸配列

模式図の下にTAF-IのN末端領域のみのアミノ酸配列及びその等電点(pI)を示した。TAF-I $\alpha$ のN末端領域はTAF-I $\beta$ と比較して塩基性アミノ酸に富む。

**A**

TAF-I $\alpha$

1 37

WT MAPKRQSP LPPQKKKPRPPPALGPEETSASAGLPKKG

KR2sA MAPAAQSP LPPQKKKPRPPPALGPEETSASAGLPKKG

KR4sA MAPKRQSP LPPQAAAPRPPPALGPEETSASAGLPKKG

KR6sA MAPAAQSP LPPQAAAPRPPPALGPEETSASAGLPKKG

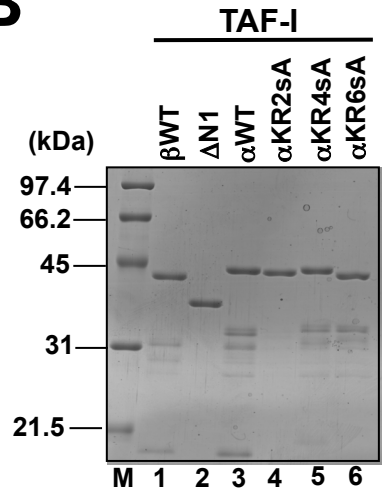
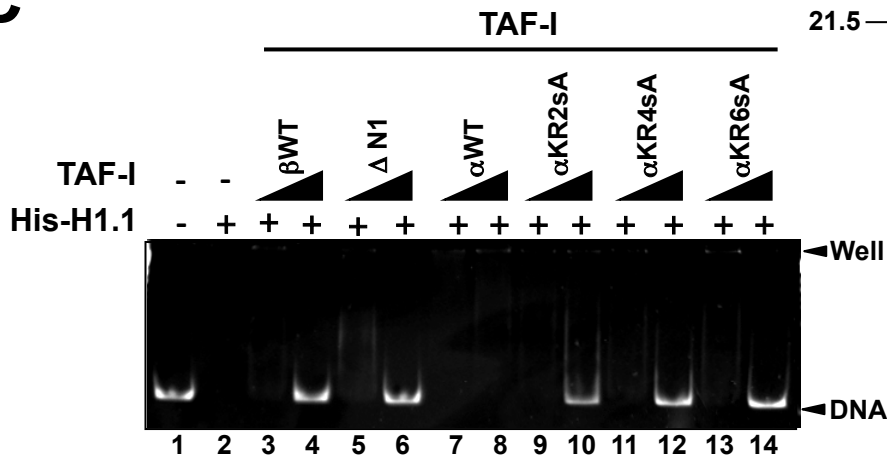
**B****C**

Fig.12 TAF-I $\alpha$  N末端領域中の塩基性アミノ酸のヒストンH1シャペロン活性への影響

(A) TAF-I $\alpha$  N末端領域のアミノ酸配列を示した。今回解析した塩基性アミノ酸を青色で示した。各TAF-I $\alpha$  N末端領域変異体のアラニンに置換した箇所を赤色で示した。(B) 精製したTAF-I $\alpha$ のアラニン置換点変異体を10% SDS-PAGEに展開し、CBB染色にてタンパク質を検出した。(C) TAF-I $\alpha$ 点変異体を0.9、3.5 pmol用いて、Fig10と同様の方法にて、H1解離アッセイを行った。

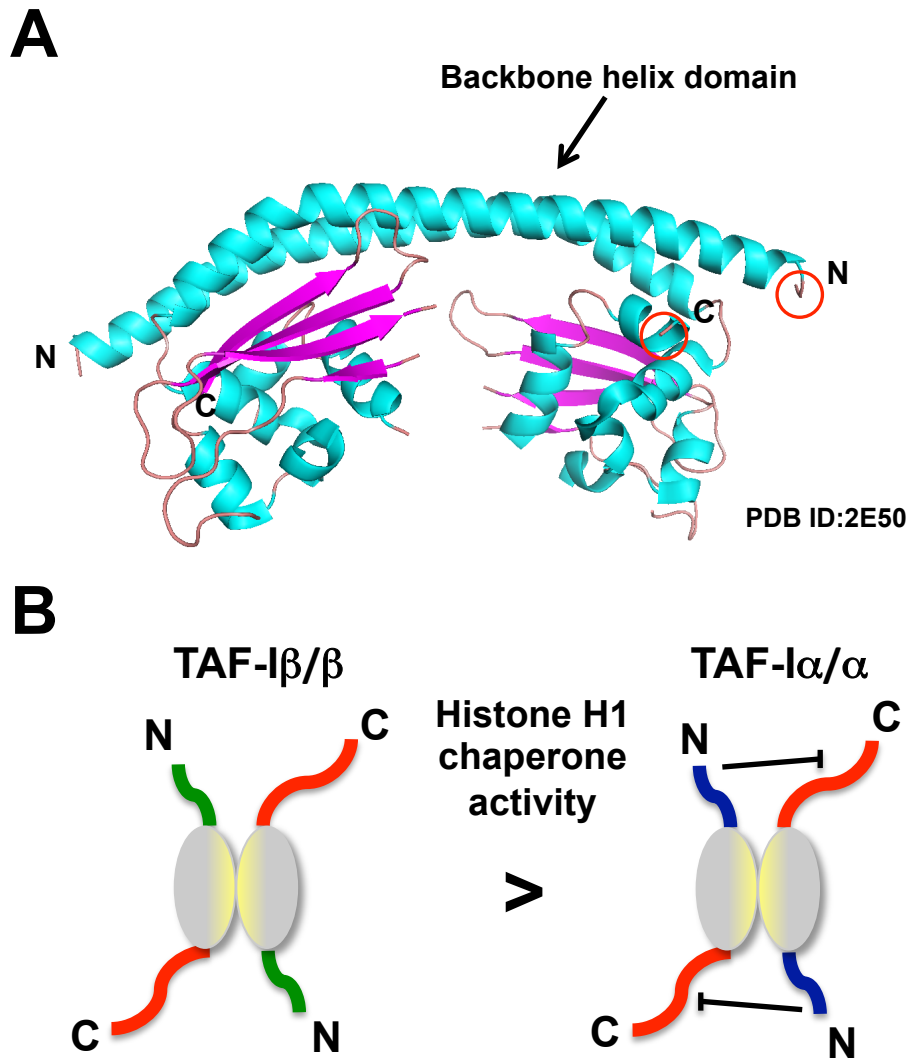


Fig.13 TAF-I N末端領域とC末端領域は構造上近接している

(A) hTAF-I $\beta$  C末端領域欠損変異体の結晶構造を示す(参照論文は下に示した)。2分子のTAF-Iが2番目の $\alpha$ -ヘリックスでお互いに逆平行に疎水性相互作用したbackbone helix domain(2量体形成領域)により2量体を形成する。TAF-IのN末端領域とC末端領域を赤丸で示した。TAF-IのN末端領域は、もう一方のTAF-IのC末端領域と構造上近くに位置することが推測される。(B) 予想したTAF-I $\alpha$ のヒストンH1シャペロン活性の抑制機構をイラストで示した。TAF-I $\alpha$ の塩基性に富んだN末端領域は、自身のC末端領域に相互作用することでその活性を抑制するのではないかと仮説を立てた。

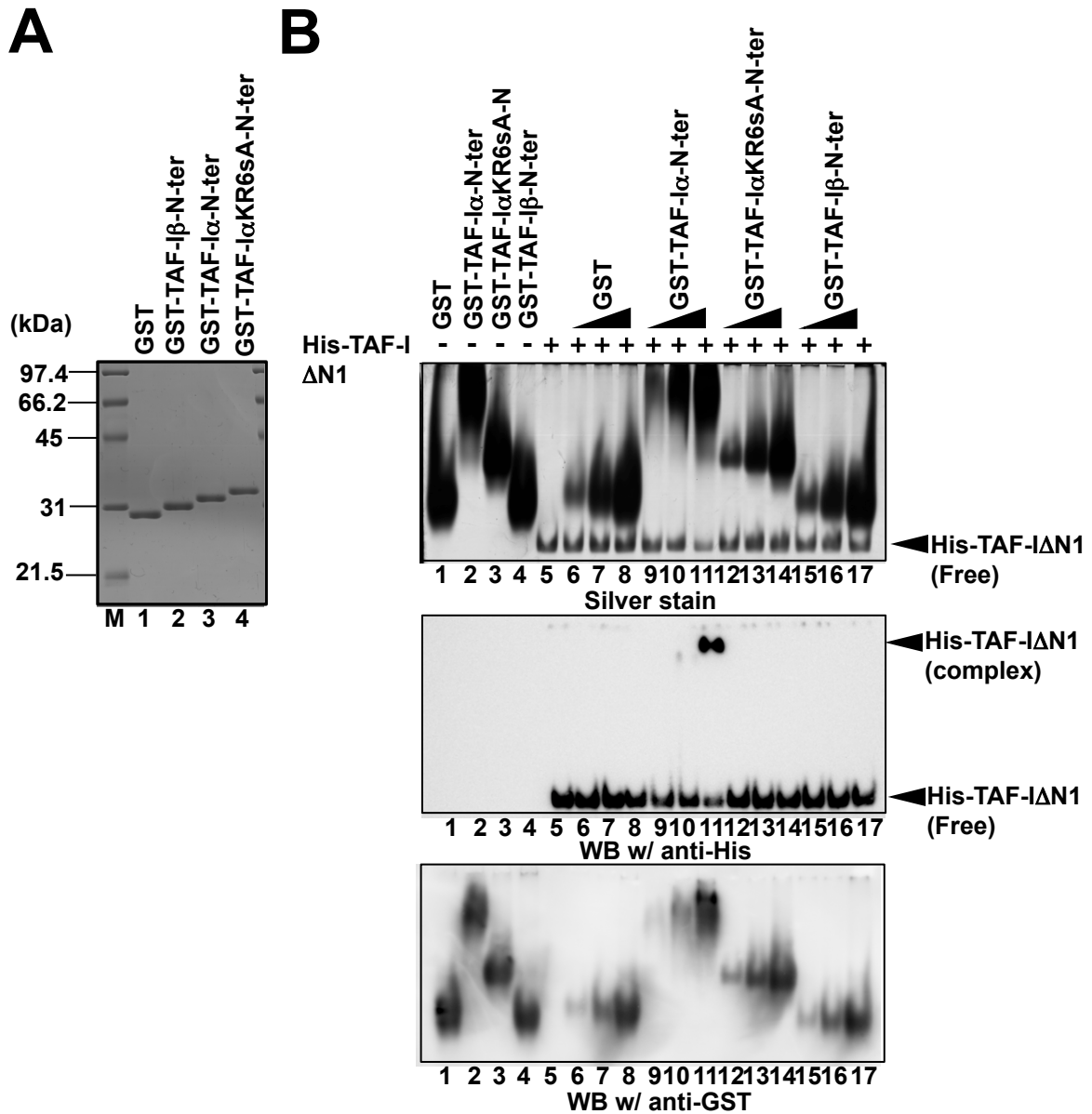


Fig.14 TAF-I N末端領域とTAF-I 共通領域の相互作用の検討

(A)精製したGST及びGST-TAF-I N末端領域変異体タンパク質を12.5% SDS-PAGEに展開し、CBB染色にて検出した。(B) GST-TAF-I N末端領域変異体とHis-TAF-I N末端領域欠損変異体 (His-TAF-I $\Delta$ N1)の相互作用をゲルシフトアッセイにより検討した。His-TAF-I $\Delta$ N1 (12 pmol)と各GSTタンパク質(レーン6-8、9-11、12-14、15-17がそれぞれ12、36、108 pmol)を混合し、インキュベーション後、6% 非変性ポリアクリルアミドゲルにて展開した。タンパク質は銀染色(上段)及び抗His抗体(中段)と抗GST抗体(下段)を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。

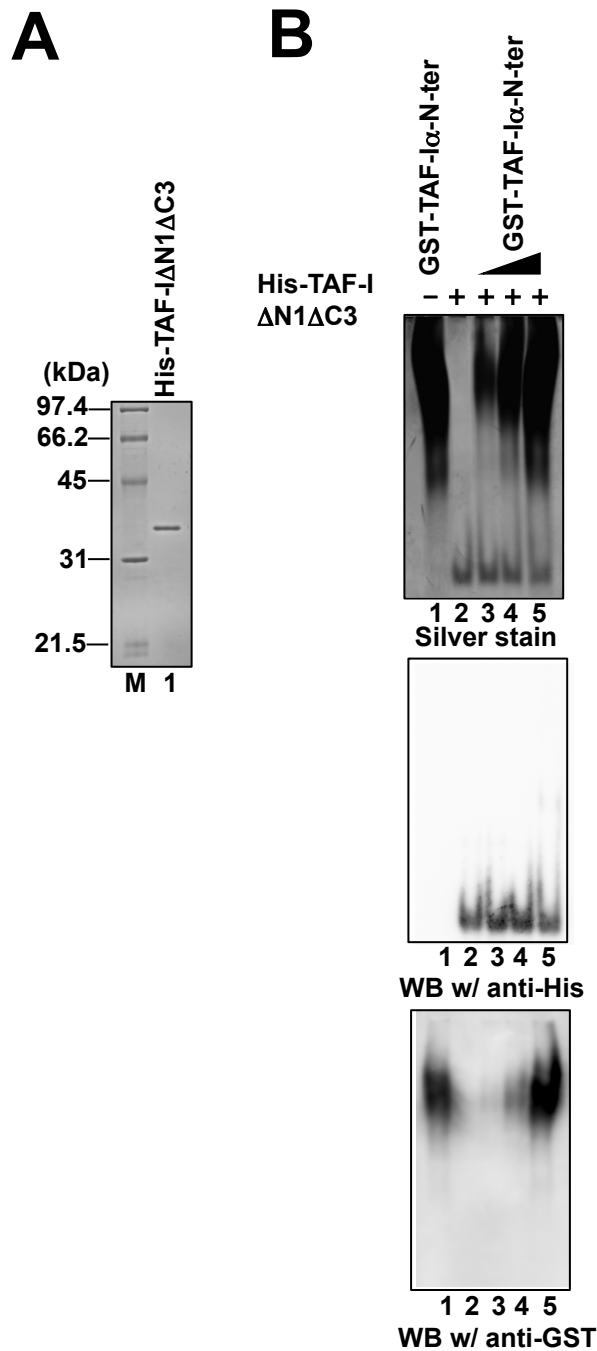


Fig.15 TAF-I N末端領域とTAF-I N末端及びC末端領域欠損変異体の相互作用の検討

(A) 精製したTAF-I N及びC末端領域欠損変異体タンパク質(His-TAF-IΔN1ΔC3)を15% SDS-PAGEに展開しCBB染色にて検出した。(B) GST-TAF-I N末端領域変異体とHis-TAF-IΔN1ΔC3との相互作用の有無をゲルシフトアッセイにより検討した。His-TAF-IΔN1ΔC3(12 pmol)とGST-TAF-Iα-N-ter (12、36、108 pmol)を混合し、インキュベーション後、6% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開した。タンパク質は銀染色(上段)及び抗His抗体(中段)、抗GST抗体(下段)を用いたウエスタンブローディングにより検出した。

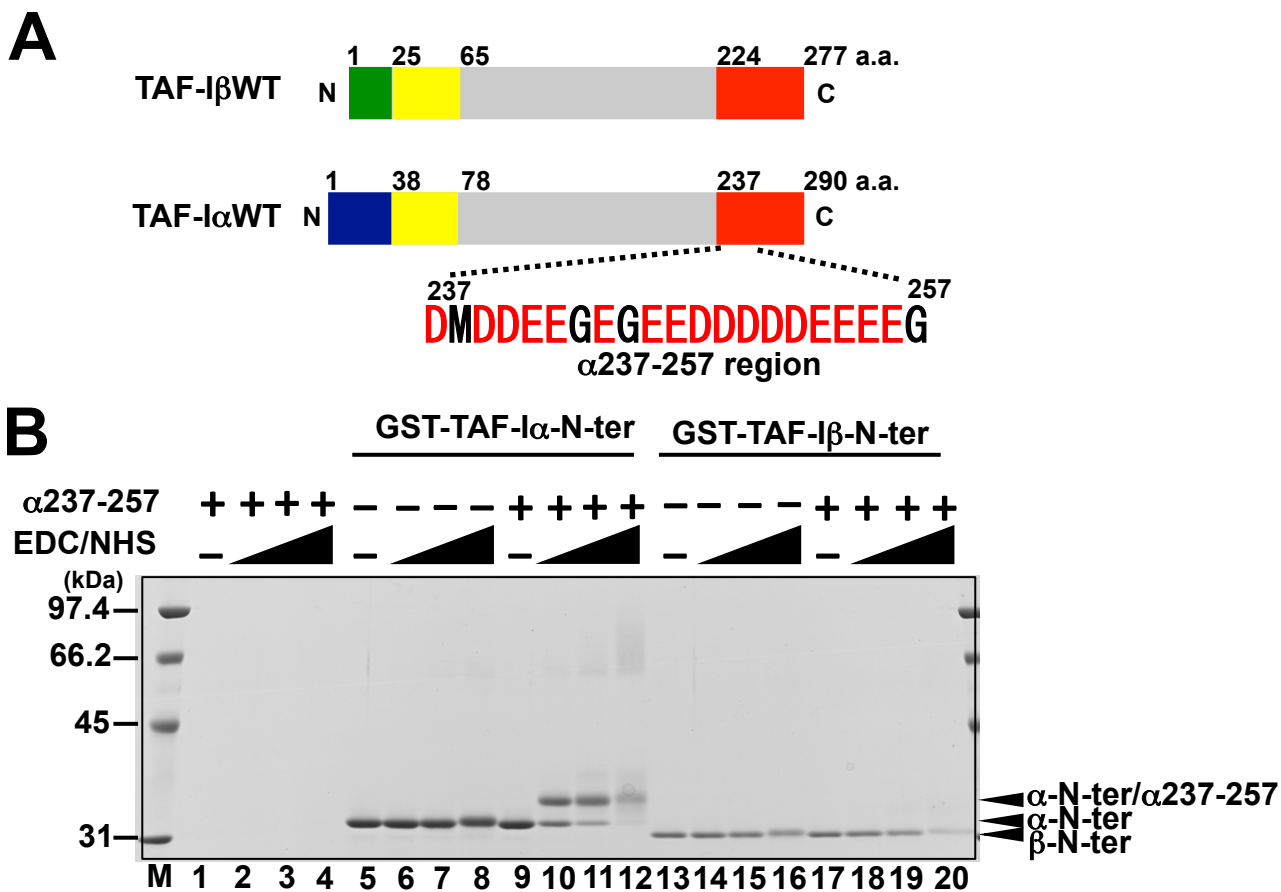


Fig.16 EDC/NHSクロスリンカーを用いたTAF-I N末端領域とTAF-I C末端領域の相互作用の検討

(A) 本実験に用いた $\alpha$ 237-257C末端領域( $\alpha$ 237-257)の配列を示す。 $\alpha$ 237-257はTAF-IのC末端領域の一部である。(B) GST-TAF-I-N-terと $\alpha$ 237-257の相互作用を2.5、5、10 mM EDC/NHS存在下で検討した。サンプルは10% SDS-PAGEに展開し、CBB染色にてタンパク質の検出を行った。



**A**

.....Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys.....  
 (Tetra cysteine motif)

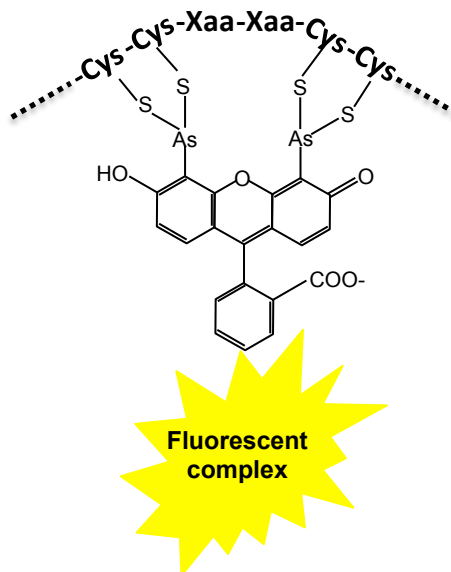
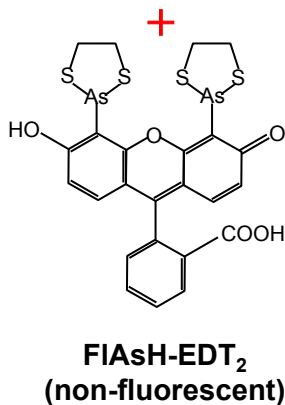
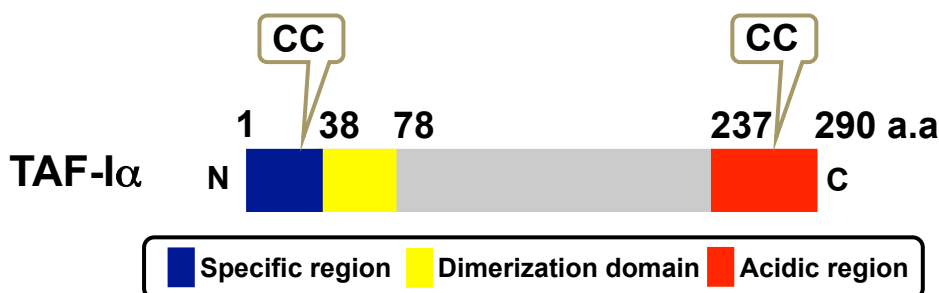
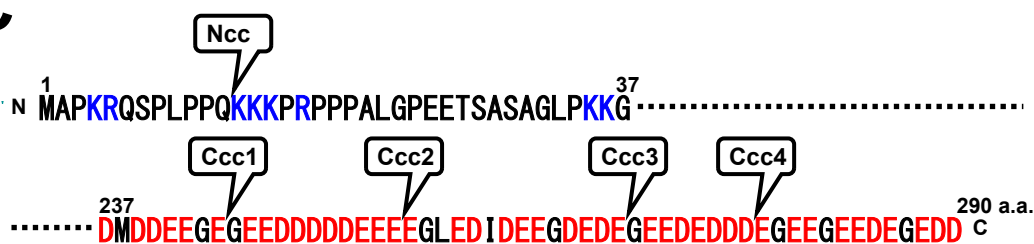
**B****C**

Fig.17 FIAshラベリングアッセイとTAF-IのCysタグ変異体作製法

(A) 二砒素標識試薬であるFIAsh-EDT<sub>2</sub>はテトラシステインモチーフ(Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys)を認識し、結合すると蛍光を発する。(B) 本研究では、システインペア(CC)を全長TAF-IαのN及びC末端領域それぞれ導入し、その蛍光強度を測定することで、両領域の結合を検討した。(C) TAF-IαのN及びC末端領域のアミノ酸配列と、システインペアを導入した位置を示す。TAF-Iα N末端領域中の塩基性アミノ酸の隣に1カ所、C末端領域中の酸性アミノ酸が長く並ぶ領域2カ所の、それぞれN側とC側の4カ所に導入した(Cysタグ変異体)。

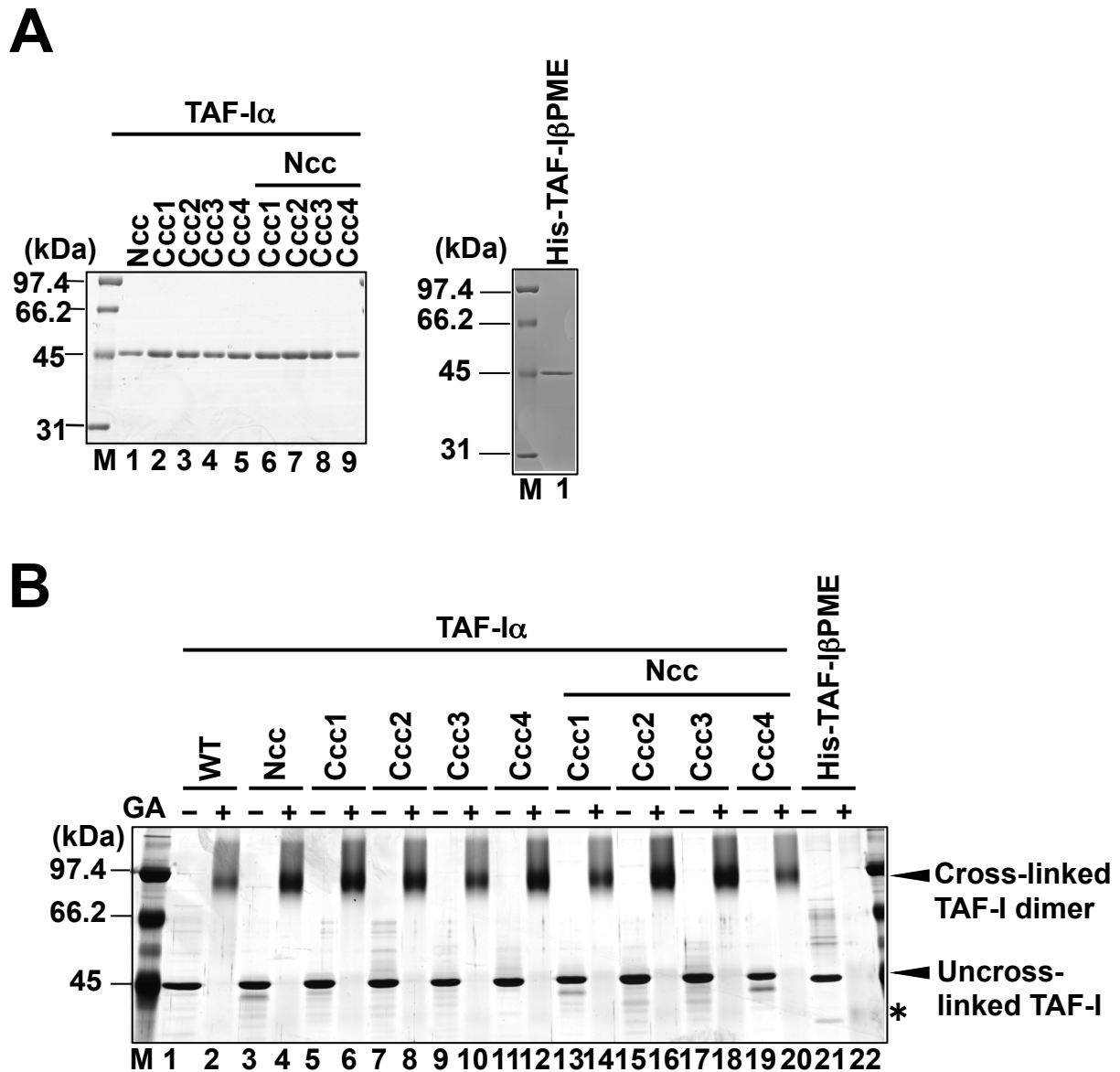


Fig.18 TAF-I $\alpha$ WTとCysタグ変異体の2量体形成活性の比較

(A) 精製したCysタグ変異体及びHis-TAFI $\beta$ PMEをそれぞれ10% SDS-PAGEに展開し、CBB染色にてタンパク質を検出した。(B) グルタルアルデヒドクロスリンクアッセイの結果を示す。TAF-I $\alpha$ WT、TAF-I $\beta$ PME及び各CysタグTAF-I $\alpha$ タンパク質(400 ng)をグルタルアルデヒド(GA)非存在下(-)あるいは存在下(+)で5分反応後、SDS dyeにて反応を停止させた。サンプルは10% SDS-PAGEに展開後、銀染色にてタンパク質を検出した。\*はTAF-I $\beta$ PMEで特異的に観察されるクロスリンクされたTAF-Iモノマーである。

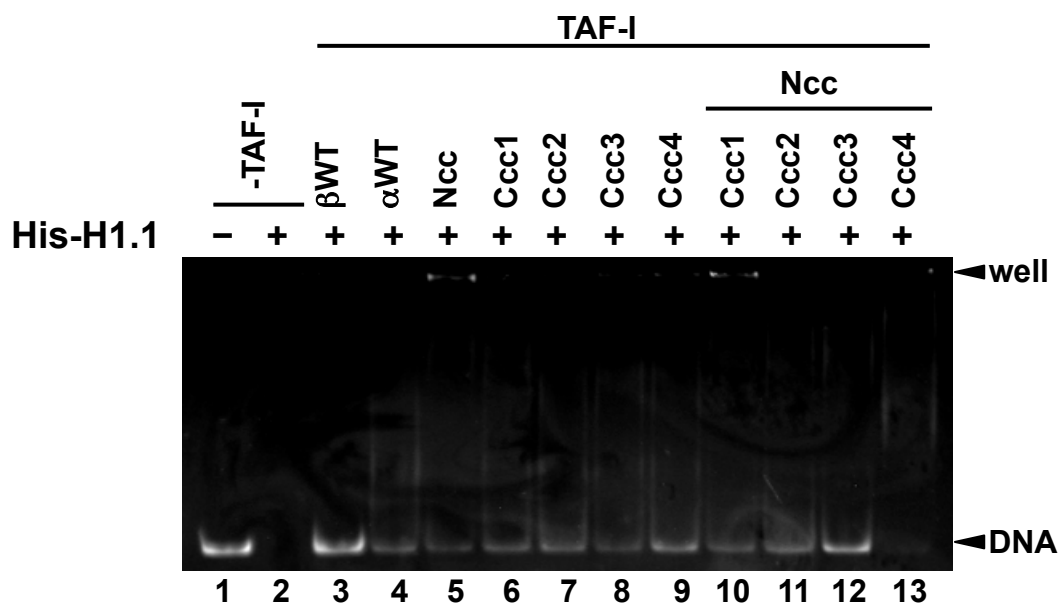


Fig.19 TAF-I $\alpha$ WTとCysタグ変異体のヒストンH1解離活性の比較

TAF-I $\alpha$  WTと各CysタグTAF-I $\alpha$ 変異体を用いたヒストンH1解離活性の比較。DNA (0.52pmol) とヒストンH1 (3.85 pmol)を混合後、各TAF-Iタンパク質(3.48 pmol)を加えた。サンプルは5% 非変性ポリアクリルアミドゲルで展開しDNAを検出した。

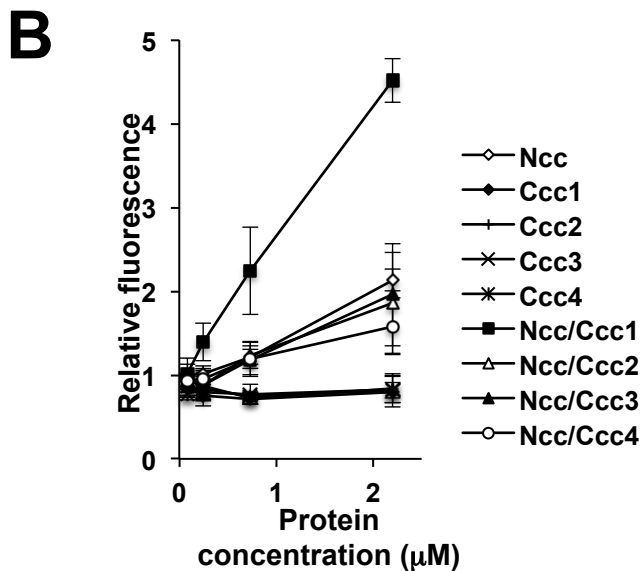
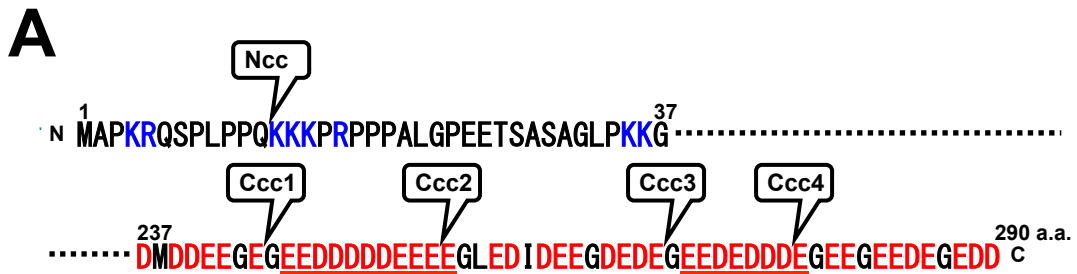


Fig.20 FIAsH ラベリングアッセイによるN末端領域とC末端領域の相互作用の検討

(A) 各 TAF-1α Cysタグ変異体のシステインペアの導入位置を示す。(B) FIAsHラベリングアッセイの結果を示す。タンパク質濃度はそれぞれ81.5、245、734 nM、2.2 μMの条件下でアッセイを行った。縦軸は81.5 nM TAF-1α-Nccの蛍光強度を1とした時の各サンプルの蛍光強度を相対値で示す。実験は独立に3回行い、標準偏差を算出した。

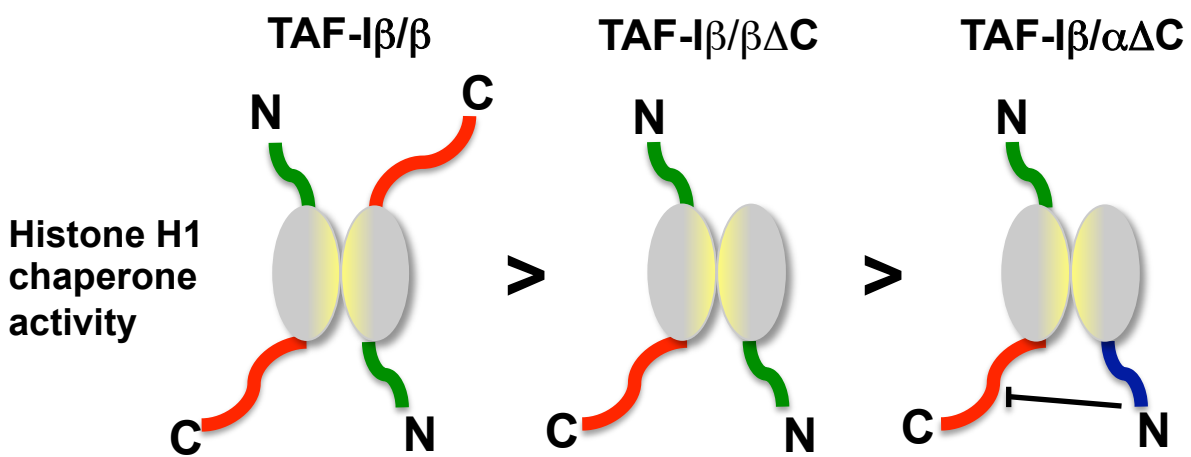


Fig.21 TAF-1ΔC3変異体によるヒストンH1シャペロン活性制御のワーキングモデル

C末端領域欠損変異体TAF-1ΔC3はヒストンH1シャペロン活性を持たない。そのため、TAF-1β WTとヘテロ2量体を形成した場合、その活性はTAF-1β WTのホモ2量体と比較し弱い。これまでの結果より、TAF-1β WTがTAF-1αΔC3とヘテロダイマーを形成すると、TAF-1α N末端領域がパートナーのTAF-1β WT C末端領域に結合し、その活性を抑制すると予想される。一方で、TAF-1β N末端領域はC末端領域への結合活性を持たないため、TAF-1β WTの活性を抑制しない。この仮説が正しければ、上記のようなヒストンH1シャペロン活性の差が観察される。

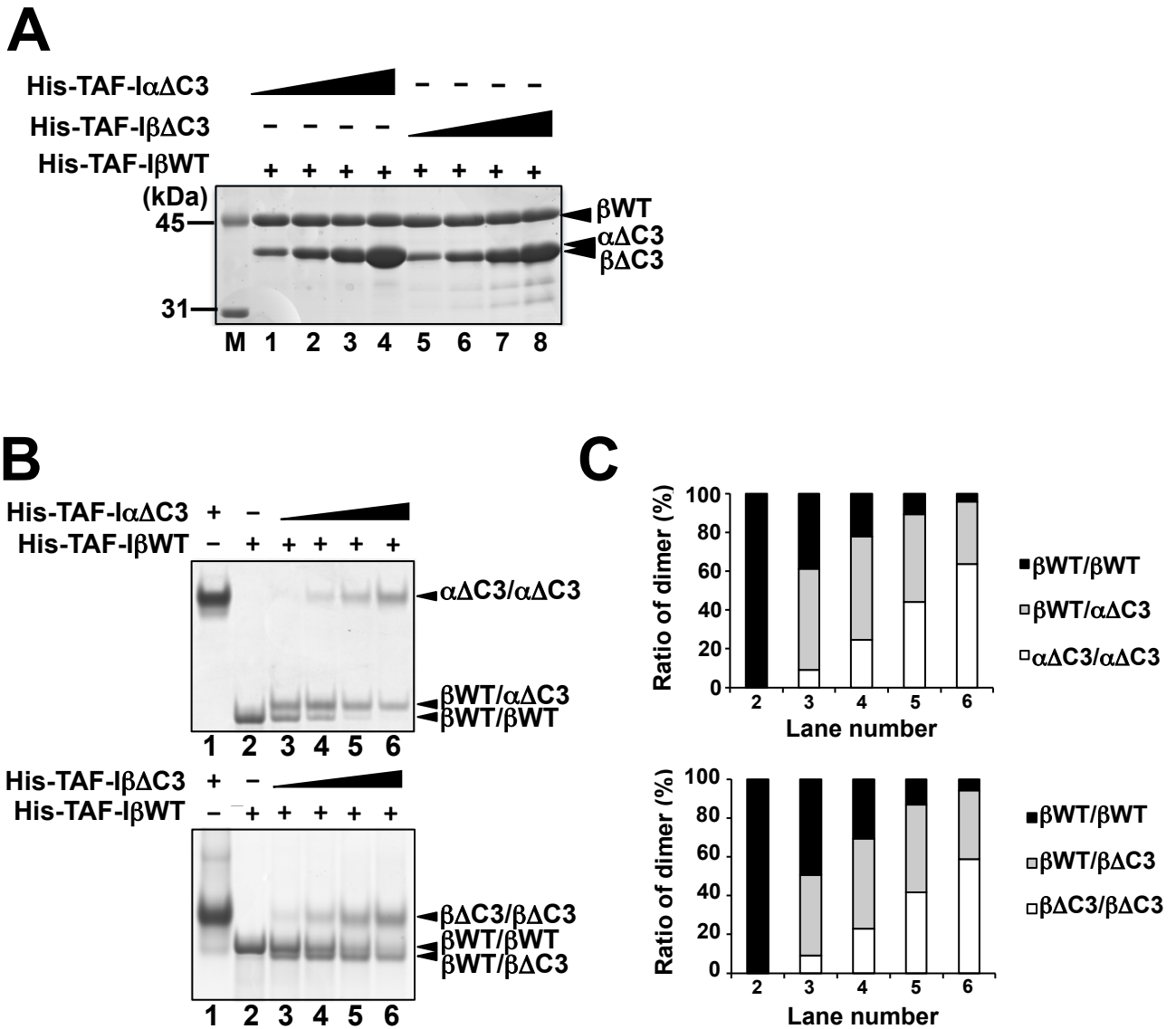


Fig.22 変性-再生法によるTAF-I $\beta$  WTとTAF-I $\Delta$ C3変異体のヘテロ2量体の再編成

TAF-I $\beta$ に対し、TAF-I $\Delta$ C3を $\times 0.4$ 、 $\times 0.8$ 、 $\times 1.6$ 、 $\times 3.2$ の割合で混合後、変性-再生法によってホモ2量体を解体し、再形成させることでホモ及びヘテロ2量体が混合したサンプルを作製した。(A) TAF-I $\beta$ WTがサンプル間で一定量(14.7 pmol)含まれるように調整し、10% SDS-PAGEに展開後、CBB染色でタンパク質を検出した。(B) (A)のサンプルを、上のパネルでは5%、下のパネルでは6% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開し、CBB染色でタンパク質を検出した。(C) (B)の結果をImage Jにて定量しグラフ化した。

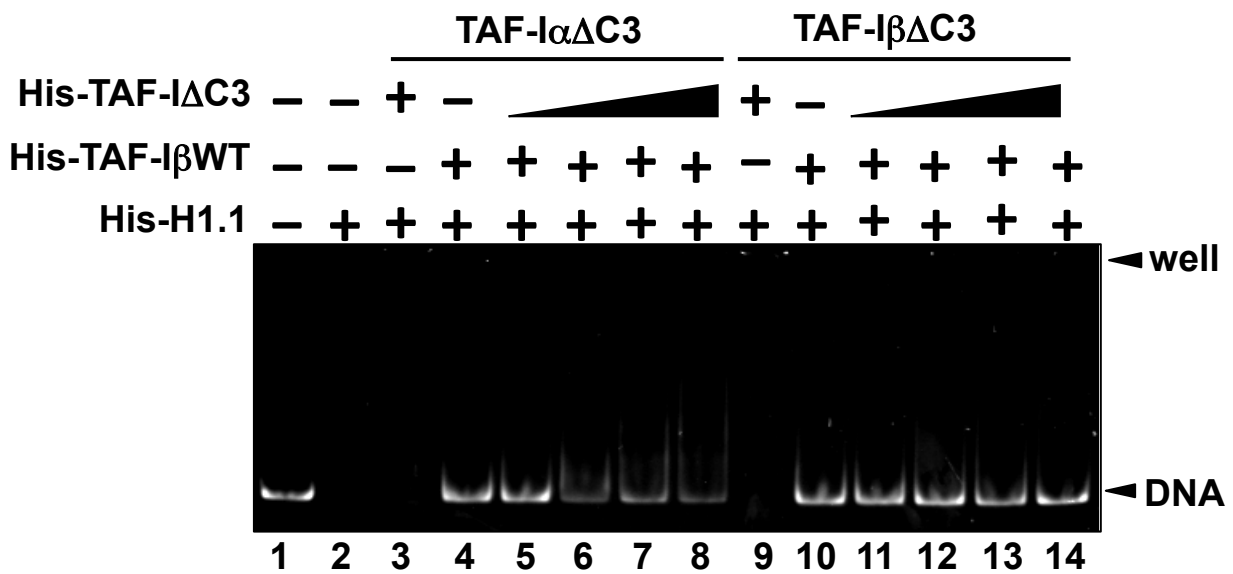


Fig.23 TAF-I $\Delta$ C3によるTAF-I $\beta$ WTのヒストンH1シャペロン活性制御

TAF-I $\Delta$ C3変異体のTAF-I $\beta$  WTのヒストンH1シャペロン活性への影響をヒストンH1解離アッセイにて検討した。各サンプルはTAF-I $\beta$ WTの量が一定量(3.5 pmol)に対し、TAF-I $\Delta$ C3が1.4、2.8、5.6そして11.1 pmol (レーン5-8及びレーン11-14)含まれるように調整した。TAF-I $\alpha$  $\Delta$ C3単独(レーン3)及びTAF-I $\beta$  $\Delta$ C3単独(レーン9)はそれぞれ11.1pmol加えた。サンプル中に含まれるTAF-Iのホモ及びヘテロ2量体の割合はFig22にて定量した通りである。サンプルは5% 非変性ポリアクリルアミドゲルに展開し、DNAをGelRedにて検出した。

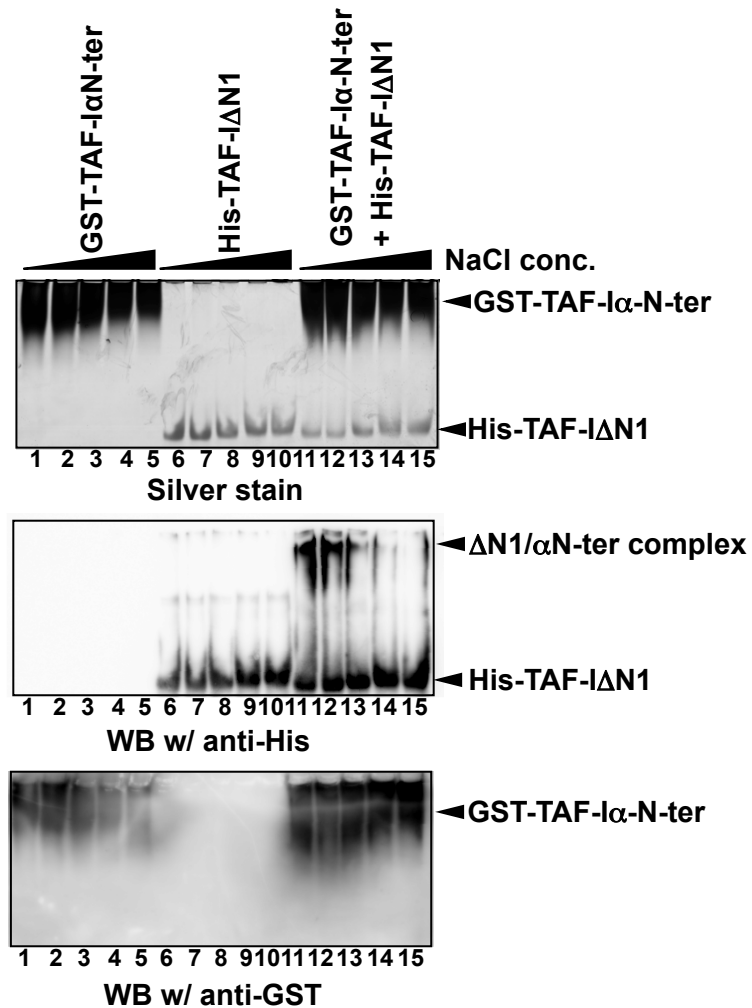


Fig.24 TAF-I $\alpha$  N末端領域とTAF-I共通領域の相互作用に対する塩濃度の影響

TAF-I $\alpha$  N末端領域とC末端領域の結合活性に対する塩濃度の影響を、100、200、300、400、500 mM NaCl濃度の条件下で、ゲルシフトアッセイを行い確認した。タンパク質を銀染色(上段)及び抗His抗体(中段)及び抗GST抗体(下段)を用いたウエスタンブローディングにより検出した。



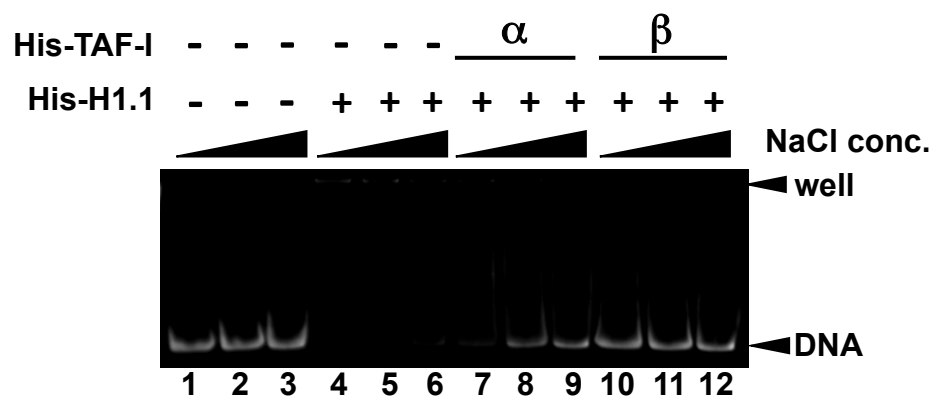


Fig.25 TAF-I $\alpha$ のヒストンH1シャペロン活性に対する塩濃度の影響

TAF-I $\alpha$ のヒストンH1シャペロン活性に対する塩濃度の影響を、100、250、400 mMのNaCl濃度の条件下でヒストンH1解離アッセイを行い検討した。DNAの検出はGelRedにて行った。

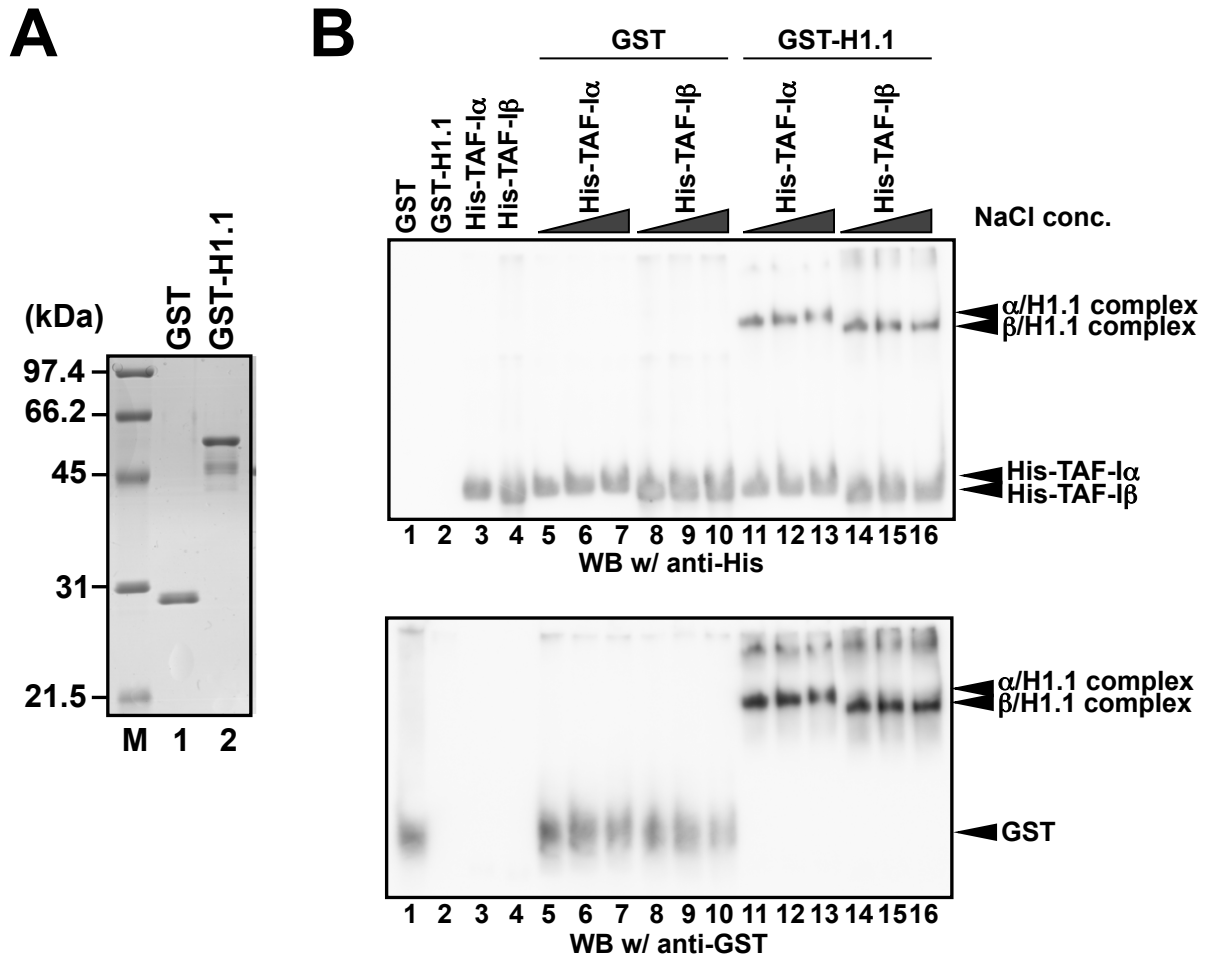


Fig.26 TAF-IとヒストンH1の相互作用に対する塩濃度の影響

(A) 精製したGST、GST-H1.1タンパク質をSDS-PAGEに展開しCBB染色にて検出した。(B) TAF-IとヒストンH1の相互作用に対する塩濃度の影響を、100、250、400 mM NaCl濃度の条件下でゲルシフトアッセイを行い検討した。タンパク質は抗His抗体及び抗GST抗体によるウエスタンブロッティングにより検出した。

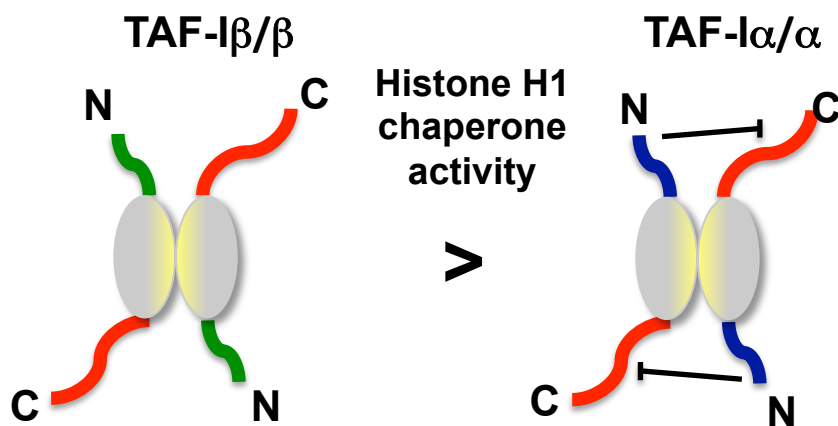


Fig.27 TAF-Iのサブタイプ依存的なヒストンH1シャペロン活性制御機構

本研究では、TAF-Iのサブタイプ依存的なヒストンH1シャペロン活性の制御機構を明らかにした。TAF-I $\alpha$ の塩基性アミノ酸に富むN末端領域は、TAF-I 2量体中のもう一方のTAF-Iの酸性アミノ酸に富むC末端領域に相互作用することでヒストンH1シャペロン活性を抑制する。この制御機構は、TAF-Iサブタイプの発現バランスによって全TAF-Iの活性を制御するために必要と推測される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、多大なご援助とご指導を賜った筑波大学の永田恭介学長に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、日々の多大な討論と研究のご指導をいただきました筑波大学の加藤広介助教に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、日々のサポート、学位論文及び発表のご指導をいただきました筑波大学の川口敦史助教に深く感謝いたします。

論文を投稿するにあたり、英語の文法のご指導をいただきました MECC (Medical English Communications Center、筑波大学) Bryan J.Mathis 助教に深く感謝いたします。

日々の研究生活において、多大なご支援をいただいた筑波大学分子ウイルス学研究室の皆様 に深く感謝いたします。

これまでの私を支えてくださった両親、友人に深く感謝いたします。