

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12608

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05154

研究課題名（和文）動的ゲノム構造をつくるメガダルトン複合体の構造機能解明

研究課題名（英文）Structural analysis of megadalton complexes in the dynamic genome

研究代表者

野澤 佳世（Nozawa, Kayo）

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：10808554

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 25,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、試験管内再構成系を用いて、DNAループを構成するコヒーシン・タンパク質が転写に与える影響を評価した。また、クロマチンの単位であるヌクレオソームとコヒーシンの複合体の複合体について、クライオ電子顕微鏡解析に取り組んだ。また、本課題で用いたヌクレオソーム再構成技術を用いて、新規のクロマチンユニットであるH3-H4オクタソームのクライオ電子顕微鏡単粒子解析を行い、筆頭者として学術雑誌PNAS誌に報告することができた。加えて融合研究では、クライオ電子顕微鏡解析に特化した、人工細胞作製技術を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、DNAループの異常が各種のガンに関係していることが報告され、中でもガン原遺伝子のの上流で多数のDNAループがクラスターを作るスーパーエンハンサー構造の解明が待たれているが、本研究はその解明にも大きく貢献すると考えられる。加えて、融合研究で構築する人工細胞可視化システムでは、細胞内容物のバックグラウンドが全くない状態で、核膜に裏打ちされたゲノム構造を解明することができる。これまで核膜の構造がDNAループの転写活性化機構に与える影響は全く明らかになっていないため、本研究を通じて早老症などの遺伝子疾患に関しても新たな知見が得られる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to elucidate the molecular mechanism of how cohesin is involved in transcriptional regulation using an in vitro system. We reconstituted a transcription complex containing RNA polymerase II and cohesin on a nucleosome template that mimics the chromatin structure. We also used cryo-electron microscopy to understand the complex formation of cohesin and nucleosome. In addition, we reported that a nucleosome-like structure (H3-H4 octasome) can be formed with just two types of histones, H3 and H4 (Nozawa et al., 2022). In the collaborative project, we tried to artificially reconstruct the DNA-loop structure anchored to the nuclear membrane by incorporating recombinant proteins and DNA in liposomes. Since there was no established method that enabled cryo-EM observation of soluble proteins or nucleic acids inside liposomes, we optimized a protein encapsulation method in liposomes for cryo-EM analysis.

研究分野：タンパク質・核酸の立体構造解析

キーワード：クライオ電子顕微鏡解析 クロマチン構造 RNAポリメラーゼII 遺伝子発現制御 メガダルトン複合体

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命の部品であるタンパク質の情報は遺伝子 DNA に保存され、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の働きによって、設計図となる mRNA へと抽出される。mRNA の合成は、Pol II が種々の転写因子と共同しながら、開始・伸長・終結の転写サイクルをコントロールすることで可能になる。しかし、Pol II や転写因子だけでは、細胞の分化や生育、発生状態に応じた転写制御を行うことはできない。転写メディエーター (MED) は、転写開始領域から数キロから 1 Mbp もの長鎖 DNA を経てエンハンサー DNA とプロモーター DNA を物理的に繋ぐ DNA ルーピング機構によって、Pol II を含む転写マシーナリーを転写開始領域にリクルートし、ほとんどすべての遺伝子を活性化する重要な転写コファクターである。野澤は、本研究の前段階としてドイツ・マックス・プランク研究所の Patrick Cramer 博士のもとで、分裂酵母 MED の機能最小単位である 16 サブユニット cMED について、タンパク質の共発現系を構築し、X 線結晶構造解析を行うことで cMED がプロモーター側で Pol II の転写開始に関わることを明らかにした (Nozawa., TR, Schneider., P, Cramer., *Nature* 2017)。しかし、アクチベーター・タンパク質群を介してエンハンサー DNA をリクルートするテール・モジュールや DNA ループを解除するキナーゼ・モジュールに関する知見は非常に乏しい上に、高等真核生物特有の DNA ループ構造についてはほとんど解明が進んでいない。加えて、近年の報告により、DNA ループの機能範囲は Topologically Associating Domains というクロマチン構造によって規定されており、その形成には姉妹染色分体結合を媒介するリング状タンパク質であるコヒーシンが関係していることも分かってきた。MED の膨大なインタラクトームの解析からは、MED とヌクレオソームやヒストンシャペロン、クロマチンリモデリング因子の相互作用も報告され、DNA ループの全貌は複雑化している。

一方、細胞核の内側には、ラミン・タンパク質が網目構造 (ラミナ) を形成すると同時に、ラミナ自体がゲノム DNA やゲノム DNA を巻き取る構造基盤であるヌクレオソームのコア・ヒストンと直接的に相互作用することで、核膜にゲノムを連結している。近年、ヒトやマウスでは全ゲノムの 4 割がラミナと相互作用していることが報告され、核膜がクロマチン構造の組織化やゲノム複製、遺伝子転写を時空間的に調節していることが明らかとなった。核膜とクロマチンの相互作用の破綻はヒトでは、早老症を招くことが知られており、そのメカニズムの解明が待たれている。上述した DNA ループも核膜孔複合体を介して核膜付近に存在していることが示唆されており、核膜構造をも考慮に入れたゲノム機能の理解が必要だが、その全貌は全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、クライオ電子顕微鏡解析によって DNA ループの形成機構を解明することを目的としている。DNA ループは、総分子量がメガダルトン以上にも及ぶ巨大タンパク質・核酸の複合体であり、構造生命科学の大きな挑戦の一つである。近年、個別の転写メディエーターサブユニットの変異が 10 種類以上の異なる組織のガンに関係していることが報告され、中でもガン原遺伝子の近位で多数の DNA ループがクラスターを作り、遺伝子の異常な活性化を招くスーパーエンハンサー構造の解明が待たれているが、本研究は、その解明に大きく貢献すると考えられる。また、本研究で構築する DNA ループの試験管内再構成系を発展させれば、生体内の機能未知の DNA 配列の遺伝子活性化能力を測定できるようになるだけでなく、その構造情報をもとに、任意の遺伝子制御機能を持った DNA ループを設計し、ゲノム編集より複雑なゲノム機能を細胞に与えることも可能になると考えている。加えて、従来の DNA 配列をターゲットとした遺伝子操作技術では、反復配列を標的とすることは難しいが、DNA ループ構造を加味することで、効率的に標的的反復配列を編集する技術が実現する可能性もある。

また融合研究では、人工細胞・人工核を電子顕微鏡解析試料の器として利用する新たな技術プラットフォームも開発する。これまでの構造生物学の多くは、精製タンパク質に対して行われてきたが、本システムでは、細胞内容物のバックグラウンドが全くない状態で、膜に裏打ちされた分子構造を高分解能で観察できる可能性がある。これまで、DNA ループの転写活性化と核膜構造の関係性を明らかにした前例はないため、早老症などの遺伝子疾患に関しても、新たな機構が提唱される可能性がある。本システムは、構造生物学のボトルネックを解消すると同時に人工細胞を高分解能でモニタリングすることも可能であり、人工細胞の改変も加速させると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、分裂酵母を対象に遺伝子のオン・オフを規定する①DNA ループを構成する 40 種類以上の精製タンパク質を調製し、それらを試験管内で混合することで、DNA ループを *in vitro* 再構成する。②では再構成した DNA ループ上で Pol II の転写を走らせることで、DNA ループが転写に与える影響を RNA 量から評価する。そして、③では DNA ループ自体の構造と DNA ループ上で起こる多段階の転写反応をクライオ電子顕微鏡解析によって明らかにする。また、④融合研究によって、核膜に見立てた人工細胞内に、野澤が再構成した DNA ループ複合体とラミン・タンパク質、クロマチン関連因子を包埋することで、核膜にアンカーされたクロマチン構造を再現し、クライオ電子顕微鏡解析することを計画した。人工細胞には、蛍光標識を利用

して定量的に RNA 量を評価するシステムも導入することで、ゲノム構造と転写活性の相関を明らかにすることを計画した。

4. 研究成果

研究課題①～③については、初年度にクロマチン構造を模倣したヌクレオソーム・テンプレートをを用いた試験管内転写系に、DNA ループを構成するコヒーシン・タンパク質とそのローダー・タンパク質を加えることで、これらの因子が転写に及ぼす影響を評価した。その結果、コヒーシンとローダー存在下では、Pol II がヌクレオソームを乗り越える効率が、10 倍近く増大することが明らかになった。これは、野澤がこれまで検証してきた cMED による転写促進の約倍であり、染色体構造タンパク質が転写活性を直接制御するという未報告の結果だった。また、コヒーシンとローダーのヌクレオソーム結合能をゲルシフトアッセイによって検証したところ、これまで裸の DNA 領域を好むと考えられていたコヒーシンがリンカーDNA を含ないヌクレオソームへの結合能を有することを見出した。これに伴い 2 年目以降は、コヒーシン、Pol II、ヌクレオソームを中心に計画を進めた。

2 年目には、自身の研究室の立ち上げと並行してコヒーシン、ローダー、ヌクレオソームの 3 者複合体のクライオ電子顕微鏡解析を実施した。その結果、予備的な電子密度からヌクレオソームのアシディックパッチと結合するコヒーシン複合体の立体構造を観察することができた (図 1)。これまでコヒーシンのヌクレオソーム結合については、ほとんど議論がなされていなかったため、この構造自体が分野に与える影響は大きいと考えられる。このデータとクロスリンク質量分析法によって得られた同複合体の相互作用マップを照らし合わせたところ、コヒーシン・ローダーを構成する Mis4 や Rad21 サブユニットがアシディックパッチに面していることが示唆された。また、コヒーシンの DNA 押し出し活性を止めて電子顕微鏡像自体の解像度を上げるために、複数の ATP 非加水分解アナログ存在下での試料調製条件の検討も行った。加えて、本課題で構築したヌクレオソーム再構成技術を用いて、新規のクロマチンユニットである H3-H4 オクタソームのクライオ電子顕微鏡単粒子解析を行い、筆頭著者として学術雑誌 *PNAS* 誌に報告することができた (図 2)。

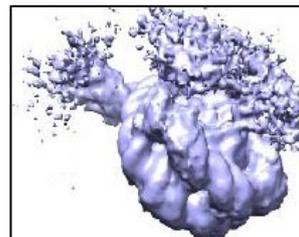


図 1 コヒーシン-ヌクレオソーム複合体の密度

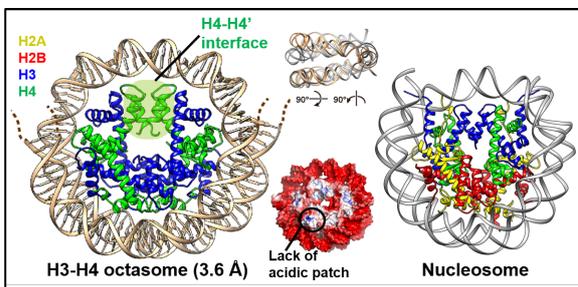


図 2 H3-H4 オクタソームの電子顕微鏡構造

最終年度では、ATP-AlFx を用いて動きを止めコヒーシンとヌクレオソームの複合体についても大量調製を行い、その試料について cryoEM のデータセットを取得した。加えて、コヒーシン複合体によって、転写が促進された転写複合体を観察するために、転写テンプレートの配列と添加するヌクレオチドを限定することで Pol II を任意の位置で止めた試料も作成し、cryoEM のデータセットを取得した。今後は、それぞれの複合体の構造解析を行いたいと考えている。

研究課題④については、Alexa488 標識した蛍光ヌクレオソームと脂質、ミネラルオイルを用いて人工細胞の作製を試みた。得られた試料について、共焦点顕微鏡による観察を行ったところ、人工細胞中に充分量のヌクレオソームが包埋されていることが確認された。しかし、この人工細胞についてクライオ電子顕微鏡による高分解能観察を行ったところ、界面通過法で作成した大きなリポソームのほとんどが試料凍結のステップで壊れてしまうこと、僅かに残ったリポソームも糖類のバックグラウンドが高く、粒子の観察が困難であることが分かった。そこで、クライオ電子顕微鏡観察のコントロール・タンパク質としてグルタミン酸合成酵素 (GlnA) を調製し、人工細胞の作成条件の検討を実施した。その結果、脂質の組成を変更し、フィルム水和法と Mini-Extruder を使用してリポソームのサイズを最適化することで、クライオ電子顕微鏡観察に適した人工細胞作製法を構築することができた (図 3)。今後は、上述したリコンビナント・タンパク質を人工細胞内に包埋する方法とは別に、タンパク質の無細胞合成系 (Pure system) を包埋して、人工細胞内で Lamin A や emerin、BAF タンパク質を合成させて、核内構造を再現するプロジェクトにも着手したいと考えている。

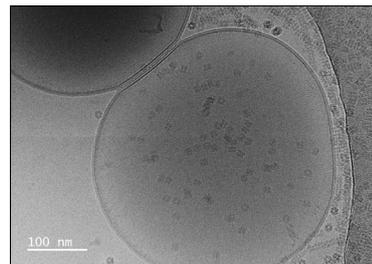


図 3 人工細胞の電子顕微鏡写真

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 K, Nozawa., Y, Takizawa., L, Pierrakeas., C, Sogawa-Fujiwara., K, Saikusa., S, Akashi., E, Luk., H, Kurumizaka.	4. 巻 19
2. 論文標題 Cryo-electron microscopy structure of the H3-H4 octasome: a nucleosome-like particle without histones H2A and H2B	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2206542119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 M, Nishimura., Y, Takizawa., K, Nozawa., H, Kurumizaka.	4. 巻 1
2. 論文標題 Structural basis for p53 binding to its nucleosomal target DNA sequence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgac177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 野澤 佳世、胡桃坂 仁志
2. 発表標題 遺伝子発現を制御するゲノム構造の試験管内再構成技術電子顕微鏡解析
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 15.0（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野澤 佳世、胡桃坂 仁志
2. 発表標題 ゲノム三次構造が遺伝子発現に与える影響
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kayo Nozawa
2. 発表標題 Structural and biochemical analysis of a novel structural unit of chromatin
3. 学会等名 20th Surugaidai International Symposium & Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野澤佳世
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡解析から明らかになった新しいサブヌクレオソーム・H3-H4オクタソームの構造機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 日本生物物理学会 共催 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kayo Nozawa
2. 発表標題 Cryo-electron microscopic analysis reveal a nucleosome-like particle without histones H2A and H2B, H3-H4 octasome
3. 学会等名 International Symposium on Chromatin Architecture: Structure and Function (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野澤佳世
2. 発表標題 遺伝子発現を制御する超分子複合体の構造機能解析
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Gen Kumakura, Yutetsu Kuruma, Kayo Nozawa
2. 発表標題 Structural and functional analysis of reconstituted chromatin encapsulated in artificial cells
3. 学会等名 "Structure, Function and Dynamics" international conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryunosuke Odaka, Yasuto Murayama, Kayo Nozawa
2. 発表標題 Functional and structural analysis of nucleosome transcription by RNAPII with cohesin/Sccl loading complex
3. 学会等名 "Structure, Function and Dynamics" international conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>世界初・ゲノムDNAを巻き取る新しい基本単位H3-H4オクタソームを発見 https://www.titech.ac.jp/news/2022/065033</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------