

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06522

研究課題名(和文)革新的なクロマチン基盤膜を用いたクライオ電子顕微鏡3次元構造解析

研究課題名(英文)Cryo-EM analysis using chromatin substrate film on the grid

研究代表者

滝沢 由政 (Takizawa, Yoshimasa)

東京大学・定量生命科学研究所・准教授

研究者番号：00434291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物のゲノムDNAは、ヌクレオソームを最小単位としたクロマチン構造をとることにより細胞核内に収納されている。クライオ電顕解析は、近年様々な技術革新が行われてきたが、急速凍結試料グリッド作製には、複合体の安定化や凍結条件の最適化など試料ごとに多くの課題が残されている。本研究課題では、クライオ電顕を用いたクロマチン構造解析における急速凍結試料作製の効率化、高品質化のため、クロマチン基盤膜グリッドの作製を目的としている。研究実績として、グリッド上の基盤となるグラフェンシートをグリッドに貼り、ヌクレオソームを吸着させることでグリッド上で濃縮および安定化させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、クロマチン基盤膜グリッドを作製することにより、クライオ電子顕微鏡によるクロマチン構造解析の効率化および高品質化を図ることを目的としている。本研究を行った結果、グラフェンシートを貼ったグリッド上で、ヌクレオソームを化学固定することなく粒子の崩壊を防ぎ、クライオ電顕で観察することが可能となった。本研究により、クロマチン基盤膜グリッドの基礎ができたことにより、ヌクレオソームおよび高次クロマチンの構造解析だけでなく、エピゲノム情報を導入したクロマチンやクロマチン結合因子複合体などの構造解析の促進が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic cells, the genomic DNA is tightly packed into the nucleus by forming the chromatin. The basic repeating unit of chromatin is nucleosome, which contains ~147 base pairs of DNA and two copies of four core histones, H2A, H2B, H3, and H4. Recently, cryo-EM analysis is an indispensable technique for structural biology. However it is still challenging to reproducibly obtain the suitable cryo-EM grid of chromatin sample for the single particle analysis. To efficiently prepare the suitable grid of chromatin sample for single-particle cryo-EM analysis, I have attempted to generate the chromatin substrate film grid, which is directly attached the chromatin on the cryo-EM grid. In this approach, I covered a single layer graphene film on the cryo-EM grid and applied the nucleosome. I successfully concentrated the nucleosome on the cryo-EM grid with a graphene film. It will be useful for further structural studies of the chromatin.

研究分野：構造生物学

キーワード：クロマチン ヌクレオソーム クライオ電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物は、膨大な量のゲノム DNA を、クロマチン構造をとることにより、細胞核内に収納している。クロマチンの基本単位は、4 種のヒストンタンパク質(H2A, H2B, H3, H4)が 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体に DNA が巻き付いたヌクレオソーム構造である。ヌクレオソームがリンカー DNA により数珠状に繋がり、更に高度に折りたたまれることにより、高次クロマチン構造が形成されている。高次クロマチンは、様々なヒストン修飾やヒストンの亜種であるヒストンバリエーションにより高度に制御されており、転写、複製、修復などの重要な核内イベントに深く関与している(図 1)。

私はこれまでに、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を使い、結晶化が困難なヘテロクロマチン基本構造複合体やネイティブ DNA 配列を含むヌクレオソーム構造など試験管内再構成された様々なクロマチンの 3 次元構造解析を行ってきた。クロマチン構造解析に有用な手法であるクライオ電子顕微鏡法は、画像撮影やコンピュータ解析の自動化、高速化が進んでいる一方、試料作製は、精製条件の検討、急速凍結試料グリッドの作製条件検討に多くの時間を割く必要があるとともに、試料濃度や安定性の問題により、クライオ電子顕微鏡による観察が難しい試料も多く存在し、クロマチン構造解明の障壁となっている。

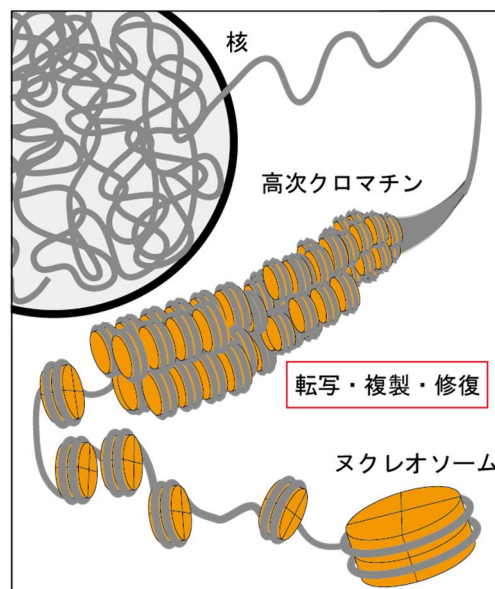


図 1. ゲノム DNA はクロマチン構造により高度に折りたたまれており、転写、複製、修復に関与している。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、クライオ電子顕微鏡法によるクロマチン構造解析の障壁となっている急速凍結グリッド作製の効率化および高品質化を図るため、クロマチンを基盤膜に固定したグリッドであるクロマチン基盤膜グリッドを創出することを目的としている。クロマチン基盤膜グリッドを用いることができれば、ヌクレオソームおよび高次クロマチンの構造解析だけでなく、エピゲノム情報を導入したクロマチンやクロマチン結合因子複合体などの構造解析も飛躍的に促進することができる。

## 3. 研究の方法

### (1) 試験管再構成ヌクレオソームの調製

まず基盤膜に結合させるヌクレオソームや様々なクロマチンの調製を行った。ヌクレオソームの再構成は、リコンビナントタンパク質として精製した 4 種類のヒストンと DNA を用い、塩透析法を用いることで、効率よくヌクレオソームを再構成することができる。また、ヌクレオソームに結合する因子として、多様なタンパク質の精製も行った。作製された様々なクロマチン試料は、クライオ電子顕微鏡単粒子解析により、立体構造を取得した。

### (2) 単層グラフェングリッドの作製

クロマチンをグリッド上に吸着させるため、クライオ電子顕微鏡グリッドに単層グラフェンシートを貼ったグラフェングリッドを作製した。また、グラフェングリッドとは別のアプローチとして、ストレプトアビジンモノレイヤーを用いたグリッドの作製も試みた。

### (3) グラフェングリッド上のクロマチンのクライオ電子顕微鏡観察

作製されたグラフェングリッドに親水化処理を行い、精製されたヌクレオソームをのせ、液体エタンにより急速凍結を行った。グラフェングリッドの親水化条件や急速凍結条件を検討することにより、良質な薄氷の張ったグリッドを作製した。

## 4. 研究成果

クロマチン基盤膜グリッドに固定するための多様なクロマチンの作製を行った。特に、高次クロマチン構造の理解に重要なトリヌクレオソームのクライオ電子顕微鏡解析に成功した(Takizawa et al, Structure, 2020)。解析を行った試料は、全て通常型のヒストン H3 を含む H3 ヌクレオソームで構成されるトリヌクレオソームおよびセントロメア特異的 H3 ヒストンバリエーションを含む CENP-A ヌクレオソームが真ん中に入ったトリヌクレオソームを作製した。クライオ電子顕微鏡単粒子解析の結果、CENP-A ヌクレオソームが真ん中に入ったトリヌクレオソームは、全て通常型である H3 ヌクレオソームで構成されているトリヌクレオソームと比べて、CENP-A ヌクレオソームの配向が異なっていることが明らかとなった。トリヌクレオソームを基盤膜グリッドに固定することができれば、そこに様々なクロ

マチン結合因子をグリッド上で結合させることができ、高次クロマチン構造の理解が進むことが期待される。また、パイオニア転写因子 GATA3 とヌクレオソーム複合体構造 (Tanaka, Takizawa et al, Nature Commun, 2020), 自然免疫に関与する cGAS-ヌクレオソーム複合体構造 (Kujirai,...Takizawa et al, Science, 2020)、ヒストン H4 メチルトランスフェラーゼ SET8-ヌクレオソーム複合体構造 (Ho, Takizawa et al, Life Sci Alliance, 2021) をクライオ電子顕微鏡単粒子解析により明らかにした。解析を行った試料は、クロマチン構造の制御に重要な役割を果たしていると考えられ、これらのクロマチンを基盤膜グリッドに固定することができれば、これらの複合体上に更に結合する様々なクロマチン結合因子をグリッド上で結合させることができ、クロマチン構造の理解が進むことが期待される。ストレプトアビジンモノレイヤーグリッドの作製を行った結果、クライオ電子顕微鏡用グリッドの上にストレプトアビジンのモノレイヤー結晶を再現性よく形成させることができた。加えて、ストレプトアビジンモノレイヤーグリッド上にビオチン化 DNA を持つヌクレオソームを結合させ、クライオ電子顕微鏡で観察することにも成功した。ただし、ストレプトアビジンモノレイヤーグリッド上でヌクレオソームを急速凍結させたときの氷の厚さや再現性にはまだ検討の余地が残っている。

基盤膜グリッドとして、単層グラフェンを貼ったグリッドの作製を試みた。クライオ電子顕微鏡により単層グラフェンがグリッド上に高効率で張られていることを確認した (図 2)。また、作製できた単層グラフェングリッドにヌクレオソームを結合させることにより、低濃度のヌクレオソームのクライオ電子顕微鏡観察に成功した。ヌクレオソームは、急速凍結を行う際に、溶液の気液界面に晒されることが原因と思われる粒子の崩壊が高頻度で起こるため、ヌクレオソームの化学固定を行うことにより粒子を安定化させる。本研究で得られたグラフェングリッドを使用し、急速凍結したヌクレオソームは、化学固定を行わずに粒子の崩壊を防ぐことに成功した。本研究により、クロマチン基盤膜グリッドの基礎ができたことにより、ヌクレオソームおよび高次クロマチンの構造解析だけでなく、エピゲノム情報を導入したクロマチンやクロマチン結合因子複合体などの構造解析の促進が期待できる。

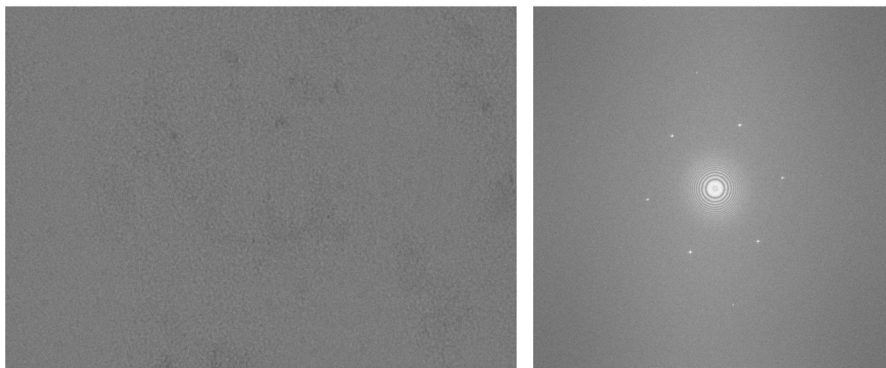


図 2 グラフェングリッドの作製(左) グラフェングリッドの電子顕微鏡像 (右) グラフェングリッドの電子顕微鏡像の FFT

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Echigoya Kenta, Koyama Masako, Negishi Lumi, Takizawa Yoshimasa, Mizukami Yuka, Shimabayashi Hideki, Kuroda Akari, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Nucleosome binding by the pioneer transcription factor OCT4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11832
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68850-1	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 -
1. 著者名 Tanaka Hiroki, Takizawa Yoshimasa, Takaku Motoki, Kato Daiki, Kumagawa Yusuke, Grimm Sara A., Wade Paul A., Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Interaction of the pioneer transcription factor GATA3 with nucleosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-17959-y	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 -
1. 著者名 Kujirai Tomoya, Zierhut Christian, Takizawa Yoshimasa, Kim Ryan, Negishi Lumi, Uruma Nobuki, Hirai Seiya, Funabiki Hironori, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 370
2. 論文標題 Structural basis for the inhibition of cGAS by nucleosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 455 ~ 458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abd0237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ho Cheng-Han, Takizawa Yoshimasa, Kobayashi Wataru, Arimura Yasuhiro, Kimura Hiroshi, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Structural basis of nucleosomal histone H4 lysine 20 methylation by SET8 methyltransferase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202000919	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 -

1. 著者名 Takizawa Yoshimasa, Ho Cheng-Han, Tachiwana Hiroaki, Matsunami Hideyuki, Kobayashi Wataru, Suzuki Midori, Arimura Yasuhiro, Horii Tetsuya, Fukagawa Tatsuo, Ohi Melanie D., Wolf Matthias, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Cryo-EM Structures of Centromeric Tri-nucleosomes Containing a Central CENP-A Nucleosome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 44 ~ 53.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2019.10.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Shoko, Takizawa Yoshimasa, Hoshikawa Fumika, Dacher Mariko, Tanaka Hiroki, Tachiwana Hiroaki, Kujirai Tomoya, Iikura Yukari, Ho Cheng-Han, Adachi Naruhiko, Patwal Indu, Flaus Andrew, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Cryo-EM structure of the nucleosome core particle containing Giardia lamblia histones	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8934 ~ 8946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab644	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirai Seiya, Tomimatsu Kosuke, Miyawaki-Kuwakado Atsuko, Takizawa Yoshimasa, Komatsu Tetsuro, Tachibana Taro, Fukushima Yutaro, Takeda Yasuko, Negishi Lumi, Kujirai Tomoya, Koyama Masako, Ohkawa Yasuyuki, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Unusual nucleosome formation and transcriptome influence by the histone H3mm18 variant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 72 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab1137	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yoshimasa Takizawa, Cheng-han Ho, Hiroaki Tachiwana, Matthias Wolf, Hitoshi Kurumizaka
2. 発表標題 Structural analysis of higher-order chromatin containing CENP-A nucleosome
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滝沢由政,
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によるクロマチン構造基盤の解析
3. 学会等名 CBI学会2019年大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝沢由政, 何承翰, 立和名博昭, Matthias Wolf, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 セントロメア特異的CENP-Aヌクレオソームを含む高次クロマチンのクライオ電子顕微鏡構造解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝沢由政, 何承翰, 小林航, 石井初芽, 平野里奈, 有村泰宏, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 モノメチルトランスフェラーゼSET8-ヌクレオソーム複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takizawa Y, Ho C-H, Kobayashi W, Ishii H, Arimura Y, Kurumizaka H
2. 発表標題 Chromatin structure and dynamics as the platform for DNA repair
3. 学会等名 4th DNA Repair/Replication Structures and Cancer Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滝沢由政, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 クロマチンアトラス解明に向けたクライオ電子顕微鏡施設
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takizawa Y, Sato S, Ho C-H, Danev R, Kurumizaka H
2. 発表標題 Sub-2 angstrom resolution structure of human nucleosome obtained by cryo-EM
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takizawa Y, Hatazawa S, Kurumizaka H
2. 発表標題 Cryo-EM structures of chromatin units from nucleus
3. 学会等名 The 30th Hot Spring Harbor International Symposium
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鯨井智也, 滝沢由政, 胡桃坂仁志	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 イメージング時代の構造生命科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

## 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			
英国	National University of Ireland Galway			
米国	NIEHS			
米国	The Rockefeller University			