

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06614

研究課題名(和文)複製新生鎖へのクロマチン形成機構の探索：AFMによる新生鎖クロマチンの可視化解析

研究課題名(英文) Study on the mechanisms of the chromatin formation on newly synthesized daughter strands: visualization and analyses of the chromatin formed on daughter strands using atomic force microscopy

研究代表者

日詰 光治 (HIZUME, Kohji)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：10378846

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)：ヒストンシャペロンといわれているDNA複製因子のDpb3-Dpb4やMcm2のN末端領域(Mcm2N)は、本研究における生化学的解析においては、ヌクレオソーム形成能を示さなかった。Mcm2Nとヒストンとの相互作用をプルダウンアッセイで調査したところ、ヒトのMcm2についての報告と同様に、ヒストンH3-H4に強い親和性を示した。また、Mcm2Nとヌクレオソームとの相互作用は全く検出されなかった。このことは、ヌクレオソームの内部に位置するヒストンにはMcm2Nはアクセスできず、複製フォークの進行により解離した鋳型鎖ヌクレオソームから遊離したヒストンをMcm2Nが捕捉しうる特徴を示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒストンを鋳型鎖から新生鎖に受け渡す複製因子は、ヒストンと十分な親和性で相互作用する必要があり、かつ、新生鎖に譲渡するためにその相互作用は一定条件で解消される必要もある。また、鋳型鎖から新生鎖への方向性をもって、ヒストンを移動させなければならない。本研究において検出されたMcm2Nとヒストンとの結合様式の解析を進めることで、例えば液-液相分離などで重要な“緩い結合”が、生理的な意義をもつ代表例として他の事例の解釈にも応用される知見となりうる。

研究成果の概要(英文)：Some of the proteins consisting of the replisomes, such as Dpb3-Dpb4 or Mcm2, have been reported as "histone chaperon." I performed the biochemical assay to test if these factors show the activity as histone chaperon, but neither Dpb3-Dpb4 nor Mcm2 N-terminal region (Mcm2N) didn't assemble nucleosomes from DNA and core histones. Next, I measured the interaction between Mcm2N and histones and found strong interaction of Mcm2N with H3-H4, as reported by some groups using human Mcm2 protein. Interestingly, I also found that Mcm2N does not interact with the reconstituted nucleosome, suggesting that Mcm2N can not access H3-H4 in a nucleosome. These results suggest that Mcm2N are involved in capturing histones released from template strands to provide them to newly synthesized strands but not involved in the dissociation of nucleosome on template strands.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 ヌクレオソーム クロマチン ヒストン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

長年の分子生物学的解析により DNA 複製に必須な因子はすべて同定され、現在は各因子の分子機能解析が活発に進められてきた。とりわけ、DNA 複製におけるクロマチンの振る舞いに着目した研究が盛んに行われている。

鋳型鎖のヌクレオソーム構造は、複製ヘリカーゼである CMG 複合体が DNA 上を進行してくると DNA 上から解離する (申請者ら、未発表)。鋳型鎖のコアヒストン (特にヒストン H3-H4 テトラマー) はアセチル化やメチル化などの翻訳後修飾を受けており、それが転写活性制御などの情報を担っているため、適切に新生鎖に継承されるメカニズムが存在すると考えられる。鋳型鎖コアヒストンは、leading 鎖と lagging 鎖との双方で再利用され、それに加えて新生コアヒストンも利用されることで新生鎖に適切な密度でヌクレオソームが形成される。

新生コアヒストンを利用したヌクレオソーム形成には CAF1 や Asf1 といったヒストンシャペロンが機能していることが示されてきた (Groth et al., 2005, Mol. Cell など)。一方、鋳型鎖コアヒストンの再利用に関与する因子について最近報告が相次いでおり、lagging 鎖への H3-H4 のローディングには Mcm2-Ctf4-Pol α が (Petryk et al., 2018, Science; Gan et al., 2018, Mol. Cell)、leading 鎖への H3-H4 のローディングにはリーディング鎖 DNA ポリメラーゼ Pol ϵ のサブユニット Dpb3-Dpb4 が機能している (Yu et al., 2018, Science) などの報告がなされている。しかし、実際にこれら因子がヒストンシャペロン活性を有するか否かは不明である。また、転写制御などは、クロマチンの凝縮 弛緩という構造転換によってなされる点からも、新生鎖クロマチン構造の可視化解析は、エピジェネティクスの継承を理解する上で不可欠である。

上記のヒストンローディング因子の関与は、特定の翻訳後修飾を受けたヒストンサブユニットをターゲットとした ChIP などにより示されてきた。また、Asf1 や CAF1 の欠損によるゲノムの不安定性や S 期遅延が検出されており、これは新生鎖のヌクレオソーム形成に問題が生じ裸の DNA 部分が生成された結果と考えられている。しかし、ヒストンローディングに機能すると期待されるこれら因子が、どのように新生鎖にヌクレオソームを形成しているか (鋳型鎖ヒストンを Leading 鎖と Lagging 鎖に分配する様式への各因子の寄与、因子間の協調効果の有無、因子の欠損によりヌクレオソームが形成されない領域が生成され得るか、等々) については未だ不明である。

2. 研究の目的

新生鎖にヌクレオソームが形成されるメカニズムを明らかにする。とりわけ、直接可視化の手法を取ることで、ヒストンシャペロンと期待される各因子 (CAF1、Asf1、Mcm2 や Dpb3-Dpb4 など) の分子機能や、それらにより形成されるヌクレオソームの配位、もしくはクロマチン高次構造を明らかにする。そのために、各ヒストンシャペロン因子によるヌクレオソーム形成の様子を *in vitro* で再現し、その生化学的解析と AFM 可視化解析を行う。これにより、鋳型鎖コアヒストンが Leading 鎖/Lagging 鎖に分配される機構 (すなわち鋳型鎖クロマチン構造が新生鎖クロマチンに継承される機構) の理解を目指す。

3. 研究の方法

申請者は、すでに出芽酵母のコアヒストンを用いたクロマチン再構成実験系を研究に応用している (Hizume et al., 2013, Genes Cells)。これを利用し、Mcm2 や Dpb3-Dpb4 などの複製因子のヒストンシャペロン機能 (ヌクレオソーム形成能) を *in vitro* で測定する。この解析から、新生鎖特異的、もしくは Leading 鎖/Lagging 鎖特異的なヒストンシャペロン機能の有無や、因子間の協調作用の有無などを明らかにすることを目指す。

4. 研究成果

(本研究開始後に、COVID-19 が蔓延したため、出張実験を控える必要が生じた。そのため、当初予定していた原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた可視化解析は最小限に抑え、生化学的解析に重点を置いた研究へと方針変更を行った。)

リーディング鎖 DNA ポリメラーゼサブユニットや、複製ヘリカーゼのサブユニットのうち、ヒストン結合が報告される因子 (Dpb3-Dpb4 と Mcm2) について、その精製標品を用いたヒストンシャペロン活性測定を行った。DNA とコアヒストンオクタマーに、Nap1 を加えたポジティブコントロールにおいては、ヌクレオソームが形成されたが、Dpb3-Dpb4 や Mcm2N (Mcm2 の N 末端領域) を加えてもヌクレオソームは形成されなかった。また、Dpb3-Dpb4 や Mcm2N の介在による、ヒストン H3-H4 のみからなるテトラソームの形成についても検出できなかった。この結果から、必ず

しもこれら因子が、「ヒストンを DNA 上にリクルートしてヌクレオソーム（あるいはテトラソーム）を形成させる」といったヒストンシャペロン活性をもつのではなく、別のはたらきを通じて鋳型鎖ヒストンによる新生鎖ヌクレオソーム形成に機能するのではないかと考え、以下の実験を更に進めた。

まず、Dpb3-Dpb4 について、更にヌクレオソーム構造に対して示す機能を探索した。上記の通り、ヌクレオソームを形成させる活性は見出されなかったが、ヌクレオソームを解離する活性を有するかどうか調べるため、再構成したヌクレオソームに Dpb3-Dpb4 を添加し、ヌクレオソームの安定性を調査したが、影響は見られなかった。また、Dpb3-Dpb4 は、その構造においてヒストン H2A-H2B との類似性を指摘する先行研究もあったため、ヒストン H3-H4 と Dpb3-Dpb4 とを混合することによりヌクレオソーム様の構造を形成するかどうか試したが、MNase の部分消化実験などからはヌクレオソーム様構造は検出できなかった。

次に、Mcm2N に着目して、ヒストンとの相互作用様式を探索した。GST 融合 Mcm2N を用いたプルダウン実験から、Mcm2N が、ヒストン H2A-H2B に対するよりも、ヒストン H3-H4 に対して強い結合能を示した。これは、既に報告されているヒトの Mcm2N の性質と共通するものであるため、ヒトの Mcm2N においてヒストン H3 や H4 との結合に重要であると考えられたアミノ酸の変異タンパク質（Mcm2 の 91 番目のチロシンをアラニンに置換した Y91A 変異体、および、81 番目のアスパラギン酸と 82 番目のチロシンをそれぞれアラニンに置換した D80AY81A 変異体）を用いて実験したところ、それぞれ、ヒストンへの結合が減弱することを見出した。更に、81,82,91 番目のアミノ酸すべてをアラニン置換した 3xA 変異体の Mcm2N を精製したところ、ヒストンへの結合が顕著に低下することを見出した。

また、ヒストン（特に H3-H4）との結合がみられた Mcm2N であるが、ヌクレオソームに対しては相互作用を示さない結果も得られた。このことから、Mcm2N は、ヌクレオソーム内のヒストン H3-H4 にはアクセスできない、すなわち、複製フォークの前方の鋳型鎖上のヌクレオソームの解離には機能しえないことを示唆している。また、おそらく複製フォークの前進により解離した鋳型鎖ヌクレオソームから遊離したヒストンを捕捉し留め置く活性があることを示唆している。

最後に、Mcm2N が捕捉した H3-H4 を“離す”作用について解析を行った。補足した H3-H4 は、本来、新生鎖に受け渡され、ヌクレオソーム形成に活用されなければならない。そこで、試験管内で Mcm2N が H3-H4 を“離す”条件を探索した。生理的塩濃度下では、H3-H4 は、3 時間程度は安定に Mcm2N との相互作用を維持する様子が検出された。次に、Mcm2N-H3-H4 複合体に対して、DNA を加える実験を行ったが、Mcm2N-H3-H4 相互作用は維持され、H3-H4 が Mcm2N から DNA へ引き渡される様子は見られなかった。以上の結果から、Mcm2N は、いったん H3-H4 を捕捉すると、何らかの因子がない限りその結合を解消しない十分に安定な相互作用を確立することを明らかにした。今後の課題としては、Mcm2N が捕捉したヒストンを新生鎖 DNA 上に“落とす”ことを促進する因子を見出し、それによりヒストン再利用の生化学的再構成を構築することである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hizume Kohji, Araki Hiroyuki	4. 巻 593
2. 論文標題 Replication fork pausing at protein barriers on chromosomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1449 ~ 1458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13481	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 荒木 弘之、遠藤 静子、村松 佐知子、日詰 光治
2. 発表標題 酵母DNAポリメラーゼ のDNA合成酵素以外の染色体複製における機能
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohji Hizume, Shizuko Endo, Sachiko Muramatsu and Hiroyuki Araki
2. 発表標題 Requirements for replication fork pausing at the barriers
3. 学会等名 The 2019 meeting on Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohji Hizume, Shizuko Endo, Sachiko Muramatsu and Hiroyuki Araki
2. 発表標題 Formation and progression of replication forks in budding yeast; replication fork pausing at the barriers
3. 学会等名 The 44th FEBS Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------