

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16062

研究課題名(和文) GAS41によるアセチル化ヌクレオソーム認識機構の解明

研究課題名(英文) The recognition mechanism of acetylated nucleosomes by GAS41

研究代表者

菊地 正樹 (Kikuchi, Masaki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：20742430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、GAS41によるアセチル化ヒストンの基質認識機構を解明することを目的とし、GAS41とアセチル化ヌクレオソーム複合体の立体構造解析を目指した。昆虫細胞による全長GAS41の大量発現系を構築し、基質であるアセチル化ヒストンとの結合解析を行った。GAS41とアセチル化ヌクレオソーム複合体はクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析では低分解能であり構造決定には至らなかったが、ヌクレオソームを構成するアセチル化ヒストンとGAS41の複合体構造をX線結晶構造解析により決定した。GAS41はこれまでに報告されている結合ポケットとは別の相互作用領域が存在することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GAS41は膵臓がんをはじめとする様々ながん細胞の増殖・転移に密接に関わっているがん遺伝子である。GAS41がアセチル化修飾ヒストンを認識することにより、クロマチンリモデリング因子複合体や転写因子複合体などをクロマチンヘリクルートすることで転写を制御し、細胞増殖を促している。GAS41抗がん剤標的分子として期待されるが、基質特異性やその認識機構など未だ不明な点が多い。本研究で、これまでに報告されているアセチル化リジンの認識機構とは別の結合様式を明らかにした。GAS41とアセチル化リジンの新たな相互作用領域の立体構造情報は特異的阻害剤開発において有用な知見になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the substrate recognition mechanism of acetylated histone by GAS41, and to analyze the three-dimensional structure of GAS41-acetylated nucleosome complex.

The structure of GAS41 complexed with acetylated nucleosome was not determined by single particle analysis using cryo-electron microscopy because of its low resolution. The structure of GAS41 complexed with acetylated histone, which is a component of the nucleosome, was determined by X-ray crystallography, indicating that GAS41 has a different interaction region from the binding pocket that has been reported.

研究分野：構造生物学

キーワード：アセチル化ヒストン YEATSドメイン 立体構造解析 翻訳後修飾 GAS41

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物において、遺伝情報を持つゲノム DNA は核内タンパク質とともに高次に折りたたまれたクロマチン構造を形成している。その最小構造単位はヌクレオソームであり、ヌクレオソームを構成するタンパク質は 4 種のコアヒストン (H2A、H2B、H3、H4) である。ヒストンは様々な翻訳後修飾を受け、特にアセチル化リジン (Kac) は最初に確認された翻訳後修飾である。Kac 認識タンパク質の一つとして、YEATS ドメインを構成ドメインとして含む GAS41 が知られている。GAS41 の YEATS ドメインはヒストン H3 の 14 番目と 27 番目のアセチル化リジン (H3K14ac、H3K27ac) を認識することが報告されている (Genes.Dev. 32, 2018)。がん細胞において、転写因子やリモデリング因子と複合体化した GAS41 は H3K14ac、H3K27ac を認識することにより、これらの複合体をクロマチンにリクルートさせることで転写を制御する重要な役割を担っている。そのため、がん遺伝子でもある GAS41 は創薬標的タンパク質としても注目されている。

GAS41 の基質特異性について、他の既報文献では H3K14ac ペプチド (アミノ酸残基番号:8-15) への結合親和性は非常に弱いと報告されており議論がなされている (ACS Chem. Biol. 13, 2018)。GAS41 の基質特異性やその認識機構は未解明な部分が多い。また、GAS41 は細胞内で二量体を形成するため、どのようにしてアセチル化ヌクレオソーム (KacNCP: Kac Nucleosome Core Particle) を認識しているかは、未だ未解明である。

### 2. 研究の目的

GAS41 は、膵臓がんをはじめとする様々ながん細胞の増殖・転移に密接に関わっているがん遺伝子である。GAS41 は主に核内に存在し、構成ドメインの YEATS ドメインが基質であるアセチル化修飾ヒストンを認識することにより、転写因子複合体などをクロマチンにリクルートし転写を制御している。本研究では、GAS41・転写因子複合体・アセチル化ヌクレオソームの複合体構造を明らかにし、GAS41 によるアセチル化ヒストン認識機構・転写制御機構の構造基盤を解明する。

### 3. 研究の方法

下記 4 つの項目の研究を進めた。

#### 項目 (1) GAS41 によるアセチル化ヒストンへの結合親和性測定 (基質特異性解析)

約 380 種のヒストンペプチドを利用したペプチドアレイ解析を行い結合するヒストンペプチドを同定した。結合するヒストンペプチドとの結合親和性を等温滴定型熱量測定法により測定し、基質特異性を解析した。

#### 項目 (2) GAS41・KacNCP 複合体の調製と架橋、構造解析測定条件の最適化

項目 (1) で同定したアセチル化ヒストンを大腸菌により発現・精製し KacNCP を調製した。GAS41 は昆虫細胞を用いて発現・精製し、GAS41・KacNCP 複合体を調製した。GAS41・KacNCP 複合体の結晶化スクリーニングと結晶化条件や測定条件の最適化を行った。クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) 単粒子構造解析については、グルタルアルデヒドとグリセロール密度勾配を利用した超遠心分離法 (Grafix 法) によって KacNCP 複合体を架橋し均一サンプルの調製を行った。透過型電子顕微鏡 (FEI F20) を用いて、架橋された複合体サンプルをネガティブ染色し、サンプルスクリーニングを行い測定サンプル条件の最適化を進めた。

#### 項目 (3) GAS41・KacNCP 複合体の X 線結晶構造解析・Cryo-EM 単粒子構造解析

最適化した KacNCP 複合体結晶は大型放射光施設 SPring-8 や Photon Factory にて X 線回折データ測定を行った。クライオ電子顕微鏡 (FEI Tecnai Arctica) ではスクリーニングから得られたサンプルを用いて電顕像を取得し GAS41・KacNCP 複合体の単粒子解析を行った。

#### 項目 (4) GAS41 変異体導入細胞を用いた標的遺伝子の mRNA 定量測定

構造解析から得られた相互作用情報を基に、ヒト細胞発現用に GAS41 変異体を作製した。ヒトがん細胞を用いて siRNA による GAS41 KD 細胞を作製し、GAS41 変異体遺伝子をトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞から RNA を抽出し RT-PCR 装置を用いて、標的遺伝子の mRNA を定量して GAS41 と転写制御の関連性について明らかにした。

#### 4 . 研究成果

GAS41 の基質特異性を明らかにするために、ヒストンペプチドを利用したペプチドアレイ解析から特異的に認識する基質を明らかにした。GAS41 は、ヒストン H3K14ac ( アミノ酸残基番号:1-19 ) は認識することができるが (  $K_D$  値=3.6 $\mu$ M )、N 末端領域を欠損した H3K14ac ペプチドに対しては 20 倍以上弱い結合親和性であった (  $K_D$  値=87 $\mu$ M )。ヒストン H3 の N 末端領域が GAS41 の Kac 結合親和性にどのように寄与しているかを明らかにするため、X 線結晶構造解析、および Cryo-EM 単粒子構造解析法を用いて GAS41・KacNCP 複合体構造の構造解析を試みた。しかし、GAS41・KacNCP 複合体は結晶構造解析と Cryo-EM 単粒子解析では分解能が低く構造決定には至らなかった。そこで GAS41・H3K14ac ペプチド複合体の結晶化を行い、結晶化に成功し、2Å の分解能で構造を決定した。ヒストン N 末端領域は、アセチル化リジン認識領域とは別の領域 ( S7-S8 間のポケット ) に入り込み、1 分子の GAS41 に対して 2 分子のヒストンペプチドが結合していることが明らかになった。このヒストン N 末端領域の結合は変異体解析からクリスタルパッキングでは無いことを確認している。さらに、GAS41・H3K27ac ペプチド複合体の結晶構造から、Kac ペプチドは相互作用領域で異なる 2 つの向きの結合様式を持つことが明らかになった。また、結晶構造から明らかになった相互作用残基が細胞内でアセチル化ヒストンの認識に関わっていることを示すため、GAS41 の KD 細胞に変異体 GAS41 を導入した細胞を作製し、qPCR により標的遺伝子の mRNA 量を定量した。qPCR の結果から、結晶構造中の相互作用残基が細胞内でのアセチル化ヒストンの認識・転写制御に関わることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菊地正樹、五島美絵、森田鋭、桂一茂、白水美香子、梅原崇史
2. 発表標題 部位特異的修飾ヌクレオソームライブラリを用いたアセチル化リジン認識タンパク質YEATSドメインの機能解析
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 菊地正樹、五島美絵、森田鋭、桂一茂、花田和晴、白水美香子、梅原崇史
2. 発表標題 アセチル化ヌクレオソームライブラリによる結合解析から明らかになったYEATSドメインタンパク質の機能と構造的特徴
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 菊地正樹、梅原崇史
2. 発表標題 Crystal structures of GAS41 YEATS domain in complex with acylated histone peptides
3. 学会等名 CBI学会2019年大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 菊地正樹、五島美絵、森田鋭、桂一茂、白水美香子、梅原崇史
2. 発表標題 アセチル化ヌクレオソームライブラリを用いたYEATSドメインの機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年～2020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
---------	---------