様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月　 １ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｈ０６０４４・１９Ｋ２１１７７

研究課題名（和文）クロマチン構成因子DEKによるクロマチン構造制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of chromatin structure by DEK

研究代表者
鯨井　智也（Kujirai, Tomoya）

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：７０８２３５６６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,300,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝情報の担体であるゲノムDNAは、クロマチン構造をとって細胞核内に収納されている。クロマチン構成因子であり、がん遺伝子であるDEKは、クロマチン構造に作用することで、転写、スプライシング、DNA修復などの多様な核内プロセスに関与し、クロマチンの恒常性を担保すると考えられている。そこで本研究では、DEKが形成するクロマチン構造を解明することを目的とし、DEK-クロマチン複合体を試験管内において再構成し、構造生物学的、生化学的解析を行った。研究の結果、DEK-クロマチン複合体の立体構造を決定し、DEKによる特徴的なクロマチン構造制御機構が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
クロマチンは、多様な構造変化を介して転写や、複製、DNA修復などの広範な核内プロセスを制御することで、発生、老化、癌化などの複雑な生命現象を実現する。しかしながら、クロマチンがどのように構造変換されるのかについては未だ不明な点が多い。本研究では、クロマチンに結合するがん遺伝子DEKによるクロマチン制御機構の一端を解明した。本知見は、核内におけるクロマチン制御機構の知識を深化するものであり、多様な核内プロセスが調節されるメカニズムを考える一助となる。また、癌におけるDEKの作用機序と、癌に対する創薬への知見を提供する。

研究成果の概要（英文）：In eukaryotic cells, the genomic DNA forms chromatin structure. A chromatin associated oncogene, DEK, reportedly changes chromatin structure and affects various nuclear processes, such as transcription, splicing, and DNA repair, maintaining chromatin integrity. In this study, structural and biochemical analyses of DEK-chromatin complex were performed. These results demonstrated the unique regulation of chromatin by DEK.

研究分野：クロマチン構造

キーワード：クロマチン　DEK　癌

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

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、遺伝情報の担体であるゲノム DNA は、ヌクレオソームを基本単位とするクロマチンを形成し、高度に折りたたまれ細胞核内に収納される。ヌクレオソームは、四種類のヒストン(H2A、H2B、H3、H4)が二分子ずつからなるヒストン八量体に DNA が 1.65 回転巻きついた円盤状の構造体である。クロマチンは、多様な因子が結合することでダイナミックに構造変化する。この構造変化によって転写、DNA の修復、複製などを担うタンパク質複合体と、DNA の相互作用が調節され、核内プロセスが制御される。これまでに、リンカーヒストン H1 や、ポリコーム複合体など、いくつかの因子がクロマチン構造を制御することが明らかになってきている。しかし、他のクロマチン結合因子については解析は進んでいないのが現状であり、細胞内のクロマチン構造制御機構にはさらなる多様性が存在する可能性が考えられる。

本研究では、核内にユビキタスに存在する癌遺伝子 DEK に焦点を当て、研究を行った。DEK はクロマチンの高次構造形成において重要な役割を果たし、特にヘテロクロマチン構造形成に必須であること、クロマチンの恒常性を保つために寄与することが報告されている。さらに、DEK が転写、スプライシング、DNA 修復などの多様な核内プロセスに関与することが報告されており、DEK のインタラクトーム解析からも、多様な経路の因子と相互作用することが裏付けられている。そのため、DEK はクロマチンにおける基本的な構造規定因子の一つであると考えられる。

臨床研究から DEK は、卵巣癌や、肝臓癌、尿路癌、乳癌などの患者において過剰発現していることが知られており、がんと深い関わりがあると考えられている。重要な知見として、卵巣癌細胞において、siRNA による DEK ノックダウンによって増殖が遅延し、アポトーシスが誘導されることから、DEK が創薬ターゲットとなる可能性が期待されている。

しかしながら、DEK がどのようにクロマチン構造を制御するのか、そして、転写や DNA 修復をはじめとする核内プロセスにどのように作用することで、クロマチンの恒常性を担保するのか、その機構は不明である。

２．研究の目的

そこで本研究では、DEK によるクロマチン構造制御機構の解析を生化学的、構造生物学的解析によって明らかにする研究を計画した。さらに、構造制御機構の知見を基に、DEK が転写や DNA 修復に与える影響を明らかにすることを目指した。これらの解析を通じて、細胞核内におけるクロマチン構造制御機構の多様性に関する知見を深める。

３．研究の方法

本研究では、クロマチンと DEK の複合体を調製し、生化学的解析、及び、クライオ電子顕微鏡を用いた構造生物学的解析によりその立体構造を決定することで、DEK によるクロマチン構造制御機構を解明する研究計画を立案した。

(1) DEK-クロマチン複合体の立体構造解析

まず、DEK を構造生物学的解析に足る十分な量を調製するため、リコンビナントタンパク質として大量に調製する系を検討した。次に、DEK とクロマチン複合体の立体構造を解明するため、DEK-クロマチン複合体をスクロースと架橋剤の密度勾配遠心分離による精製法 GraFix を用いることで、安定化して精製できる系を検討した。その後、クライオ電子顕微鏡解析に適した凍結試料を作製するために、試料の濃度、架橋剤の濃度や、複合体の凍結条件(Blot time や Blot force など)を詳細に検討した。この試料について、クライオ電子顕微鏡を用いて、数千枚の顕微鏡写真を収集し、単粒子解析を行った。

(2) DEK のクロマチン結合ドメインの同定と立体構造解析

DEK がクロマチンに結合する機構を詳細に解析するため、DEK に含まれる各ドメインをリコンビナントタンパク質として精製し、ゲルシフトアッセイによってクロマチン結合ドメインを探索した。

(3) DEK-クロマチン複合体における DNA へのアクセシビリティ解析

DEK がクロマチン構造や、他の因子の DNA への結合に与える影響を明らかにするため、DEK-クロマチン複合体について、DNA 消化酵素マイクロコッカルヌクレアーゼを用いて、DNA に対するアクセシビリティを解析した。

４．研究成果

まず、DEK をリコンビナントタンパク質として精製する系を確立した。具体的には、大腸菌において DEK をヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質として発現させ、Ni アフィニティカラムクロマトグラフィにより精製した。その後、MonoS イオン交換カラムを用いることで、DEK を高純度に精製した。次に、この DEK をクロマチンと結合させ、GraFix 法により DEK-クロマチン複合体の精製系を確立した。この試料について、良質な凍結試料を作製することに成功し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を行った。その結果、DEK-クロマチン複合体の立体構造を

決定することに成功した。この複合体において、DEK がクロマチン中の DNA に結合することが明らかになり、DEK の特徴的な結合機構が明らかになった。しかし、複合体構造において、DEK の分解能は低く、アミノ酸レベルでの相互作用を議論するために十分ではなかった。そこで次に、DEK のクロマチン結合ドメインの探索を行った。変異体解析の結果、DEK のクロマチン結合ドメインの同定に成功し、DEK とクロマチンの相互作用に関して詳細な情報が得られた。また、DEK が結合したクロマチンについて、DNA 消化酵素であるマイクロコッカルヌクレアーゼに対する感受性試験を行った結果、DEK の結合によって DNA へのアクセシビリティが低下することが明らかになった。

以上の構造生物学的、生化学的解析結果から、DEK が結合することで、クローズドなクロマチンが形成される可能性が考えられた。本機構は、ヘテロクロマチン構造の維持に重要であるのかもしれない。

クロマチン上での DEK の機能を詳細に明らかにするためには、クロマチン上での転写や、DNA 修復などの反応の詳細な構造情報が重要である。そこで、転写中のクロマチンの立体構造を解明するために、まず、試験管内での RNA ポリメラーゼ II によるヌクレオソーム DNA の転写系を確立した。具体的には、転写の鋳型として、ヌクレオソームの片側のリンカーDNA に、RNA ポリメラーゼ II の結合サイトとして、転写の際に生じるバブル DNA 構造を模倣したミスマッチ DNA を含むヌクレオソームを再構成した。この鋳型ヌクレオソームと、精製した RNA ポリメラーゼ II を用いて転写反応を起こすことで、試験管内でヌクレオソームを鋳型とする転写系を再現した。本系を用いて、転写中の RNA ポリメラーゼ II-ヌクレオソーム複合体を再構成し、その立体構造群をクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって決定した。これらの構造群より、ヌクレオソーム DNA の転写の際には、RNA ポリメラーゼ II がヌクレオソームから DNA を剥がしながら転写する機構が明らかになった(Kujirai, Ehara, et al., Science, 2018)。また、本解析系を用いて、転写伸長因子 Spt4/5 および Elf1 が、協調的に働くことで効率良くヌクレオソーム DNA の転写を可能にすることを見出した。さらに、RNA ポリメラーゼ-Spt4/5-Elf1-ヌクレオソーム複合体の立体構造を決定することで、効率良く転写されるメカニズムを明らかにした(Ehara, Kujirai, et al., Science, 2019)。ヌクレオソーム DNA の転写機構を明らかにした本研究は、DEK により形成されるクロマチン構造が、転写に与える影響を明らかにするための基盤情報となる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計9件（うち査読付論文　9件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　4件）

１．著者名 Kujirai Tomoya、Ehara Haruhiko、Fujino Yuka、Shirouzu Mikako、Sekine Shun-ichi、Kurumizaka Hitoshi	４．巻 362
２．論文標題 Structural basis of the nucleosome transition during RNA polymerase II passage	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Science	６．最初と最後の頁 595～598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aau9904	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 Ehara Haruhiko、Kujirai Tomoya、Fujino Yuka、Shirouzu Mikako、Kurumizaka Hitoshi、Sekine Shun-ichi	４．巻 363
２．論文標題 Structural insight into nucleosome transcription by RNA polymerase II with elongation factors	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Science	６．最初と最後の頁 744～747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aav8912	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 Kujirai Tomoya、Arimura Yasuhiro、Fujita Risa、Horikoshi Naoki、Machida Shinichi、Kurumizaka Hitoshi	４．巻 1832
２．論文標題 Methods for Preparing Nucleosomes Containing Histone Variants	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Methods in Molecular Biology	６．最初と最後の頁 3～20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-8663-7_1	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 Hirano Rina、Kujirai Tomoya、Negishi Lumi、Kurumizaka Hitoshi	４．巻 18
２．論文標題 Biochemical characterization of the placeholder nucleosome for DNA hypomethylation maintenance	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	６．最初と最後の頁 100634～100634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2019.100634	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、Sato Shoko、Koyama Masako、Kujirai Tomoya、Kurumizaka Hitoshi	4．巻 167
2．論文標題 Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A.J	5．発行年 2019年
3．雑誌名 The Journal of Biochemistry	6．最初と最後の頁 419～427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz109	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 Kujirai Tomoya、Kurumizaka Hitoshi	4．巻 61
2．論文標題 Transcription through the nucleosome	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Current Opinion in Structural Biology	6．最初と最後の頁 42～49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.sbi.2019.10.007	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 Saotome Mika、Horikoshi Naoki、Urano Kazuki、Kujirai Tomoya、Yuzurihara Hidetaka、Kurumizaka Hitoshi、Kagawa Wataru	4．巻 75
2．論文標題 Structure determination of the nucleosome core particle by selenium SAD phasing	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6．最初と最後の頁 930～936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S2059798319012713	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 Horikoshi Naoki、Kujirai Tomoya、Sato Koichi、Kimura Hiroshi、Kurumizaka Hitoshi	4．巻 515
2．論文標題 Structure-based design of an H2A.Z.1 mutant stabilizing a nucleosome in?vitro and in?vivo	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6．最初と最後の頁 719～724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.012	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 Sato Shoko、Arimura Yasuhiro、Kujirai Tomoya、Harada Akihito、Maehara Kazumitsu、Nogami Jumpei、Ohkawa Yasuyuki、Kurumizaka Hitoshi	４．巻 9
２．論文標題 Biochemical analysis of nucleosome targeting by Tn5 transposase	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Open Biology	６．最初と最後の頁 190116～190116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsob.190116	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10件（うち招待講演　4件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 Kujirai T, Ehara H, Fujino Y, Nishimura M, Shirouzu M, Sekine S, Kurumizaka H.
２．発表標題 Influence of nucleosome structure in transcription.
３．学会等名 FASEB Science Research Conference, MACHINES ON GENES.（国際学会）
４．発表年 2018年

１．発表者名 鯨井智也、江原晴彦、藤野優佳、白水美香子、関根俊一、胡桃坂仁志
２．発表標題 RNAポリメラーゼIIによるヌクレオソームDNA転写機構の構造生物学的解析
３．学会等名 第36回染色体ワークショップ・第17回核ダイナミクス研究会
４．発表年 2019年

１．発表者名 鯨井智也、江原晴彦、藤野優佳、西村正宏、有村泰宏、白水美香子、関根俊一、胡桃坂仁志
２．発表標題 ヌクレオソームによるRNAポリメラーゼIIの転写制御機構
３．学会等名 第41回日本分子生物学会年会
４．発表年 2018年

１．発表者名
3.鯨井智也、江原晴彦、藤野優佳、西村正宏、有村泰宏、白水美香子、関根俊一、胡桃坂仁志

２．発表標題
クロマチンにおける転写機構に関する解析

３．学会等名
第91回日本生化学会大会

４．発表年
2018年

１．発表者名
Kujirai T, Ehara H, Fujino Y, Shirouzu M, Sekine S, Kurumizaka H.

２．発表標題
Structural insight into the nucleosomal DNA transcription by RNA polymerase II

３．学会等名
Cold Spring Harbor Laboratory meeting, Mechanisms of Eukaryotic Transcription（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
Tomoya Kujirai, Haruhiko Ehara, Yuka Fujino, Mikako Shirouzu, Shun-ichi Sekine, Hitoshi Kurumizaka

２．発表標題
Structural transition of nucleosome during RNA polymerase II transcription revealed by cryo-EM

３．学会等名
第57回生物物理学会年会（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
鯨井智也、江原晴彦、藤野優佳、白水美香子、関根俊一、胡桃坂仁志

２．発表標題
試験管内転写系によるクロマチン構造変換機構の生化学的、構造生物学的解析

３．学会等名
第92回生化学会大会

４．発表年
2019年

１．発表者名
鯨井智也

２．発表標題
クロマチン構造における転写反応の構造基盤の解明

３．学会等名
第92回生化学会大会（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
鯨井智也、江原晴彦、藤野優佳、白水美香子、関根俊一、胡桃坂仁志

２．発表標題
クロマチンによる転写制御の構造生物学的解析

３．学会等名
第１９回日本蛋白質科学会年会 第７１回日本細胞生物学会大会 合同年次大会（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
鯨井智也、江原晴彦、藤野優佳、白水美香子、関根俊一、胡桃坂仁志

２．発表標題
Structural study of transcription on chromatin

３．学会等名
第13回日本エピジェネティクス研究会年会（招待講演）

４．発表年
2019年

〔図書〕　計3件

１．著者名 胡桃坂仁志、　鯨井智也	４．発行年 2018年
２．出版社 医歯薬出版	５．総ページ数 7
３．書名 週刊医学のあゆみ　タンパク質代謝医学「クロマチンによるエピジェネティックな転写制御」	

１．著者名 胡桃坂仁志，有村泰宏、鯨井智也、小山昌子、立和名博昭、野澤佳世、田口裕之、佐藤祥子、小林 航、堀越直樹、飯倉ゆかり、町田晋一、加藤大貴、藤田理紗	４．発行年 2018年
２．出版社 羊土社	５．総ページ数 18
３．書名 実験医学別冊 「あなたのタンパク質精製、大丈夫ですか？」	

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〕

クロマチンにおける転写の構造基盤
http://first.lifesciencedb.jp/archives/18784

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