

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15711

研究課題名（和文）自然免疫DNAセンサーによるクロマチンの認識と構造制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of recognition and regulation of chromatin by innate immune DNA sensor cGAS

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脊椎動物では、ウイルスなどの外来DNAに対する防衛するため、自然免疫のDNAセンサーcGASを備えている。一方で細胞は、自身の設計図であるゲノムDNAを持つため、cGASは、自身のクロマチンを形成したDNAに対しては不活化しなければならない。本研究では、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームとcGAS複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡解析により決定した。本研究結果によって、ヌクレオソームによるcGAS不活化のメカニズムが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかになったcGASの制御機構は、自己と非自己のDNAの区別という、自然免疫分野における中心的な問いの一つの答えを与えるものであると考えられる。また、cGASは、がん、老化、自己免疫疾患などの広範な疾病に関与している。本研究結果は、これらの疾病の発症のメカニズムや、制御法についての重要な知見を与えること期待される。

研究成果の概要（英文）： Vertebrates have an innate immune DNA sensor cGAS to defend against foreign DNA such as viruses. On the other hand, cells have their own genomic DNA, and therefore cGAS must be inactivated against DNA that has formed chromatin. We have determined the three-dimensional structure of cGAS in complex with the nucleosome, the basic unit of chromatin, by cryo-EM analysis. Our results elucidate the mechanism of cGAS inactivation by nucleosomes.

研究分野：クロマチン

キーワード：クロマチン cGAS ヌクレオソーム 自然免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物はウイルスなどの微生物に対する防衛策として、外来 DNA を検知する免疫機構を備えている。その機構として、原核生物では制限修飾系や CRISPR 経路があるが、高等真核生物では自然免疫として、外来 DNA を検知し免疫及び炎症反応を誘起する cGAS-STING (stimulator of interferon genes) 経路が中心的役割を果たす。この経路では、まず cGAS が外来 DNA に結合して活性化し、GTP 及び ATP から cGAMP を合成する。そして、STING が cGAMP を認識してその後続く経路を活性化し、インターフェロンを含む免疫及び炎症反応の遺伝子産物が産生される。細胞内には自己のゲノム DNA も存在するため、cGAS は自己 DNA と外来 DNA を厳密に区別する必要がある。近年、自己免疫疾患や癌をはじめ様々な疾病に cGAS が関与していることが報告され、cGAS による自己、外来 DNA の認識機構の解明が今まさに期待されている (文献 1)。

ゲノム DNA は、細胞核内においてヒストンタンパク質に巻き付いたヌクレオソームを基本単位として、リンカー DNA により数珠状につながったクロマチンを形成している。cGAS による自己、外来 DNA の区別機構としてこれまでは「cGAS は細胞質因子であり、細胞質 DNA を外来 DNA として認識するため、核膜によるゲノム DNA と細胞質 DNA の区画化が重要である」と考えられてきた (文献 1)。しかし近年、cGAS が核内にも存在し、クロマチンに結合することが相次いで報告された (文献 2, 3)。重要な知見として、cGAS はクロマチン中のヌクレオソームに結合すると cGAMP 合成活性が抑制されることが報告された (図 1A; 文献 4)。本知見は、cGAS がヌクレオソームを利用することで自己と外来 DNA を区別することを示唆する。さらに、cGAS はクロマチンを凝集することで、DNA 損傷修復などのゲノム DNA 上の反応を抑制して重大な損傷を受けた細胞を細胞死に誘導することが報告された (図 1B; 文献 3)。本知見は、cGAS によるクロマチン構造制御が生体の恒常性を担保するために重要であることを示唆する。しかし、cGAS による自己 DNA としてのクロマチン認識機構と、クロマチン構造制御機構の詳細は明らかではない。

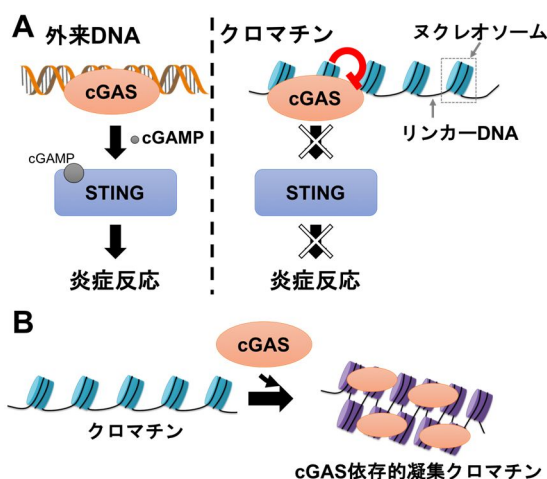


図1. A. cGAS-STING経路の概念図
B. cGASによるクロマチン凝集

2. 研究の目的

本研究では、cGAS がクロマチンに結合して不活化される機構の解明を目的とした。この解析を通して、cGAS が自己のクロマチンを形成したゲノム DNA に対して反応しないメカニズムの解明を目指した。そのために、cGAS-ヌクレオソーム複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡解析により原子分解能で決定し、得られた構造情報をもとに生化学的解析を行った。

3. 研究の方法

まず、cGAS-ヌクレオソーム複合体の再構成のために、cGAS およびヌクレオソームをリコンビナントタンパク質として精製した。これらの因子について、ゲルシフトアッセイによって結合試験を行った。さらに、これらの因子を用いて cGAS-ヌクレオソーム複合体を再構成した後、クライオ電子顕微鏡解析に最適な凍結試料の作製条件を検討し、単粒子構造解析により、立体構造解析を行った。構造をもとに、ヌクレオソームとの結合を阻害する変異体を設計し、結合試験および、cGAMP の合成についての生化学的解析を行った。

4. 研究成果

まず、cGAS のヌクレオソーム結合能を試験するために、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、cGAS がヌクレオソームに対して DNA よりも高い親和性で結合することが明らかになった。さらに、cGAS は、ヌクレオソームに結合して凝集した巨大構造体を形成することを見出した。そこで、cGAS-ヌクレオソーム凝集体についてクライオ電子顕微鏡を用いて観察した結果、ヌクレオソームがスタックしたような構造を形成しており、ヌクレオソーム間を cGAS が架橋した構造をとっていることが明らかになった。そこで、cGAS-ヌクレオソーム複合体について、最小単位のヌクレオソームが 2 分子連なった複合体を精製するために、スクロースと架橋剤を用いた密度勾配遠心分離法 (GraFix) を行った。このようにして得られた複合体について、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を行った結果、2 分子のヌクレオソームが 2 分子の cGAS に架

橋された、サンドイッチ様の複合体構造を決定することに成功した。この構造において、cGAS の本来の DNA 結合サイト A、B、C は(図 2: cGAS-DNA 複合体構造)、すべて活性化に必要な裸の直線型の DNA に結合できないようになっていた(図 2: cGAS-ヌクレオソーム複合体構造)。また、cGAS は 2 量体化して活性化するが、ヌクレオソーム結合型 cGAS では、2 量体形成に必要なもう一分子の cGAS がヌクレオソームと立体障害となり、結合できない配置になっていた(図 2: cGAS-ヌクレオソーム複合体構造)。詳細には、サイト A は、DNA が結合しておらず、さらに、ヌクレオソームとの立体配置によって外来の DNA が結合できない状態になっていた。サイト B は、本来 DNA 結合サイトであるが、ヌクレオソームとの複合体構造では、ヒストン H2A-H2B と結合していた。さらにサイト C は、もう一つのヌクレオソーム DNA と結合しており、直線型 DNA と結合できなくなっていた。これらの cGAS 活性化に必要な DNA 結合および、2 量体化が阻害されることで、不活性化されることが考えられた。

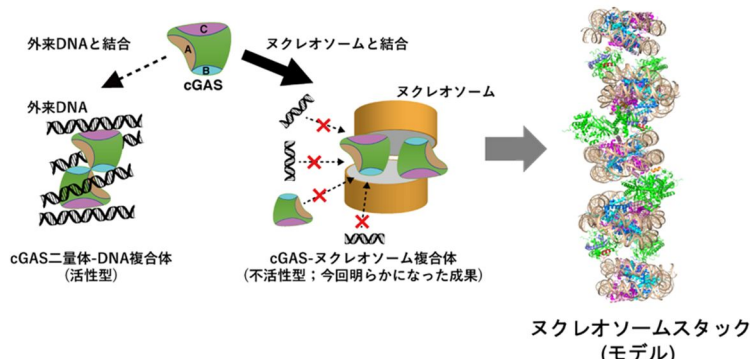


図 2 cGAS の制御機構

次に、cGAS のヌクレオソーム結合が、cGAS の不活性化に重要であることを確かめるために、立体構造をもとにヌクレオソーム結合能を欠いた cGAS 変異体を設計した。具体的には、cGAS のヌクレオソーム結合部位であるサイト B では、cGAS R255 がヌクレオソームのアシディックパッチと呼ばれる酸性部位にイオン性の相互作用により結合していたため、ヌクレオソーム結合能を欠いた変異体として、R255E 変異体を調製した。また、ヌクレオソームのアシディックパッチ変異体も調製した。これらの変異体は、ゲルシフトアッセイにより cGAS とヌクレオソームの結合能が確かに低下していることが確認された。そこで次に、cGAMP 合成活性を評価した結果、野生型 cGAS はヌクレオソーム存在では DNA に対して cGAMP 合成活性が抑制されていたが、cGAS R255E 変異体では cGAMP の合成が確認された。この結果はアシディックパッチ変異体でも同様であった。以上の結果から、cGAS のヌクレオソーム結合が、cGAS の不活性化に重要であることが明らかになった。また、今回の立体構造解析から、cGAS がヌクレオソームスタックを形成させる活性があることが明らかになった(図 2)。これは、cGAS によってクロマチン構造が凝集するメカニズムを示しているのかもしれない。本研究成果をまとめ、Science 誌に発表した(文献 5)。

cGAS は、自己免疫疾患、がん、老化などの広範な疾病に関与している。本研究成果は、クロマチン構造を形成したゲノム DNA に対して、cGAS の反応を回避するためのメカニズムを示している。今回明らかになった機構は、cGAS が関連する広範な疾患の原因解明や治療法確立のために重要な情報を提供すると期待される。

<引用文献>

1. Ablasser A, Chen ZJ. cGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation. *Science*. 2019;363(6431):eaat8657. doi:10.1126/science.aat8657
2. Volkman HE, Cambier S, Gray EE, Stetson DB. Tight nuclear tethering of cGAS is essential for preventing autoreactivity. *Elife*. 2019;8:e47491. doi:10.7554/eLife.47491
3. Jiang H, Xue X, Panda S, et al. Chromatin-bound cGAS is an inhibitor of DNA repair and hence accelerates genome destabilization and cell death. *EMBO J*. 2019;38(21):e102718. doi:10.15252/emj.2019102718
4. Zierhut C, Yamaguchi N, Paredes M, Luo JD, Carroll T, Funabiki H. The Cytoplasmic DNA Sensor cGAS Promotes Mitotic Cell Death. *Cell*. 2019;178(2):302-315.e23. doi:10.1016/j.cell.2019.05.035
5. Kujirai T, Zierhut C, Takizawa Y, et al. Structural basis for the inhibition of cGAS by nucleosomes. *Science*. 2020;370(6515):455-458. doi:10.1126/science.abd0237

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4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 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 該当する
1. 著者名 Kurumizaka Hitoshi, Kujirai Tomoya, Takizawa Yoshimasa	4. 巻 433
2. 論文標題 Contributions of Histone Variants in Nucleosome Structure and Function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 166678 ~ 166678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2020.10.012	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 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 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 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, KURUMIZAKA Hitoshi	4. 巻 61
2. 論文標題 Inactivation Mechanism of an Innate Immune DNA Sensor cGAS by Self-chromatinized DNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 324 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.324	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 鯨井 智也、胡桃坂 仁	4. 巻 75
2. 論文標題 クロマチンを形成したゲノムDNAが自然免疫DNAセンサーcGASの監視から逃れる仕組み	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 722-729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鯨井智也, Christian Zierhut, 滝沢由政, Ryan Kim, 根岸瑠美, 粉間信樹, 平井誠也, 船引宏則, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 cGAS-ヌクレオソーム複合体構造から明らかになったヌクレオソームによるcGAS不活性化のメカニズム
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 鯨井智也
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ヌクレオソームDNA転写のダイナミクス
3. 学会等名 令和2年度第2回量子線科学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoya Kujirai
2. 発表標題 Cryo-EM structure of cGAS-nucleosome reveals the mechanism of innate immune inhibition
3. 学会等名 44th Indian Biophysical Society Meeting Conceptual Advances in Biophysics and its Applications (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鯨井智也, Christian Zierhut, 滝沢由政, Ryan Kim, 根岸瑠美, 粉間信樹, 平井誠也, 船引宏則, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 ヌクレオソームによる自然免疫DNAセンサーcGASの不活性化機構
3. 学会等名 第38回 染色体ワークショップ 第19回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鯨井智也, 滝沢由政, 根岸瑠美, 粉間信樹, 平井誠也, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 cGAS-ヌクレオソーム複合体構造から明らかになった自然免疫の不活化機構
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鯨井智也, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 自然免疫DNAセンサーcGASとヌクレオソーム複合体のクライオEM構造解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第77回学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021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			
米国	The Rockefeller University			