

令和 4 年 5 月 27 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：2020～2021

課題番号：20K22519

研究課題名（和文）DNAホルミル修飾によるクロマチンの化学的構造制御を通じた生体反応制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of biochemical reactions on DNA through structural control of chromatin by DNA formylation

研究代表者

古畑 隆史（Furuhata, Takafumi）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：50882635

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、DNAホルミル修飾がクロマチンの構造制御に果たす役割の解明に向け、ポジショニングと熱的なスライディングの観点からホルミル修飾がヌクレオソームの化学特性に与える効果を検証した。ヌクレオソームコアパーティクル上、およびリンカー上にホルミル修飾を有する一群のヌクレオソームを作成し、評価を行ったところ、スライディング後のヌクレオソームのポジショニングがDNA上におけるホルミル修飾の位置の違いにより変化することが示唆された。以上の結果は、ホルミル修飾位置がヌクレオソームのポジショニングを規定する制御子として機能する可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAのホルミル化は、幹細胞で存在量が増加する、活性な遺伝子領域に多いなどの生理学的観察から、細胞の分化や異常化に関わる化学マーカーとして注目が集まっている。一方、ホルミル修飾が遺伝子発現を制御する化学的なメカニズムは未だ明らかではない。本研究課題では、位置特異的にDNAホルミル化を導入したヌクレオソームを化学的に構築することで、修飾の有無だけでなく、DNA上における修飾の位置とヌクレオソームの構造特性の関係性を系統的に検証することを可能とした。これは、ヌクレオソームとその集合体であるクロマチンの観点から、ホルミル修飾による遺伝子発現制御機構の理解に向けた足掛かりとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I investigated the effects of DNA formyl modifications on the chemical properties of the nucleosome in terms of its positioning and thermal sliding towards deeper understanding of the mechanism in which formyl modification regulates the chromatin structure and accessibility. To this aim, I reconstituted a group of nucleosomes modified with 5-formyl-2-deoxycytidine on the nucleosome core particle or on the linker DNA to evaluate the effect of formyl modification of nucleosomal positioning and sliding. The results indicate that the positioning of nucleosomes stabilized after thermal sliding is dependent on the site of the formyl modification on DNA. This observation suggests that the DNA formylation functions as a regulator that specifies nucleosome positioning on chromatin.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：DNA修飾 ホルミル化 ヌクレオソーム ポジショニング スライディング クロマチン

1. 研究開始当初の背景

クロマチンは、DNA がヒストンタンパク質を介して密に折りたたまれてできる核内の反応場である。その高次構造や凝集密度は、酵素群の DNA への集積と、それに伴う RNA 転写などの生体反応を制御する重要な要素といえる。近年、DNA のホルミル修飾が、クロマチンの構造単位であるヌクレオソームの構造制御子として注目を集めている。これまで、ホルミル修飾は、DNA への柔軟性の付与 (*Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10813)、およびリシン残基とのシッフ塩基の形成 (*Nat. Chem.* **2018**, *10*, 1258–1266) を介して、DNA とヒストンの相互作用を強め、ヌクレオソームの形成を促進し、クロマチンにおけるヌクレオソームの局所密度を高める効果がある可能性が示唆されている。一方、生理学的には、ホルミル修飾は遺伝子発現の活性化に寄与することが示唆されている。特に、幹細胞で多く見られることから、細胞の初期化や分化に重要な役割を果たすことが示唆されていた。しかし、一般的に、発現が活発な遺伝子領域ではヌクレオソーム頻度の減少が見られる (*Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4719)。この一見相反する高いヌクレオソーム頻度と酵素のアクセシビリティが、ホルミル修飾周辺で両立されるメカニズムは明らかではない。上記背景から、DNA ホルミル修飾と、核内反応場であるヌクレオソーム、およびクロマチン構造のより詳細な結びつきを明らかにすることが強く求められてきた。

2. 研究の目的

ホルミル修飾とクロマチン構造の関係性の解明には、その構造単位であるヌクレオソームに与える影響を明らかにすることが重要である。特に、ポジショニング (DNA 配列に対するヒストンの位置)・スライディング (ポジショニングの変位) のしやすさ・熱的な安定性は、クロマチンの高次構造やアクセシビリティと密接に結びつくヌクレオソームの化学特性として知られる。従って、ホルミル修飾の位置や数に応じた、ヌクレオソームのポジショニングと熱的なスライディング挙動を明らかにすることは、そのクロマチン構造制御機構の解明に繋がる足掛かりとなる。

以上から、本研究では、ホルミル修飾によるヌクレオソームの構造制御を上記化学特性の観点から明らかにし、ホルミル修飾が果たすクロマチン構造制御機構を分子レベルで理解することを目指した。

3. 研究の方法

上記目的の達成のため、本研究では、ホルミル修飾の位置、数に代表される局所的なヌクレオソームの構造条件と、ポジショニングやスライディング挙動などの全体的な化学特性の相関について系統的な理解を目指した。これまで、化学修飾を含む DNA を用いたヌクレオソームの特性評価には、修飾塩基を PCR やメチル化酵素を用いて導入する方法が主に用いられてきた。しかし、これらの方法では導入する DNA 修飾の位置の制御が難しく、DNA 修飾の位置や数の効果を系統的に評価することができない。

そこで、特定の DNA 修飾を有する DNA 断片を核酸化学合成法により作成し、適切な組み合わせの修飾断片と未修飾断片を DNA リガーゼにより連結することで、DNA 修飾の位置を厳密に制御した一連の 2 本鎖 DNA の作成を目指した。DNA は、ヌクレオソーム形成配列として知られる 147 塩基対からなる 601 配列と 45 塩基からなるリンカー配列で構成される。これにより、効率的なヌクレオソームの形成とスライディングによるリンカー配列側への変位効率の検証が可能になることが期待される。また、上記 DNA 群を用いてヌクレオソームを塩勾配透析法により作成し、その熱的な安定性、ポジショニング、スライディング挙動について検討した。

4. 研究成果

(1) 位置特異的なホルミル修飾を有する DNA 群とヌクレオソーム群の構築

DNA におけるホルミル修飾の有無、および位置がヌクレオソームの化学特性に与える影響を検証するため、ヌクレオソームコアパーティクル (NCP) 上、またはリンカー領域にホルミル修飾を有する DNA の作成を行った。具体的には、ホルミル修飾として 5-formyl-2'-deoxycytidine (5fdC) を導入した DNA 断片を固相合成法により作成し、修飾断片を含む全部で 9 断片からなる 1 本鎖

DNA を酵素的に連結することで、601 配列と 45 塩基対のリンカー領域からなる全長 192 塩基対の DNA 群を構築した。また、これら DNA をヒストン 8 量体と混合し、塩勾配透析法を適応することで、ヌクレオソームコアパーティクル上またはリンカー領域にホルミル修飾を有するヌクレオソーム (5fdC-NCP-Nuc, 5fdC-linker-Nuc) と未修飾のヌクレオソーム (UnM-Nuc) の再構成に成功した。いずれのヌクレオソームも初期構造として同一のポジショニングをとるものであることが確かめられ、以降の評価に用いた。

(2) ホルミル修飾の位置の違いによるヌクレオソームスライディング挙動の変化

(1) で構築したヌクレオソーム群について熱安定性、およびスライディング挙動の観点から化学物性の評価を行った。熱安定性の評価のため、5fdC-NCP-Nuc と UnM-Nuc を加熱し、その分解量を検証したところ、5fdC-NCP-Nuc は UnM-Nuc に比べ分解が抑えられており、NCP 上の 5fdC によりヌクレオソームが安定化されている可能性が示唆された。これは、5fdC が、ヒストンオクタマーと DNA の結合を促進するとして先行研究の結果とも一致する (*Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10813)。

続いて、ホルミル修飾がヌクレオソームのスライディング挙動に与える影響を評価した。分解温度を下回る温度にてヌクレオソームを加熱したのち、非変性ポリアクリルアミド電気泳動により分析すると、ポジショニングの異なる 2 つのヌクレオソームに相当するバンドが確認された。この 2 つのバンドの強度比からスライディング効率を評価したところ、5fdC-NCP-Nuc では Unm-Nuc に比べてスライディングが促進されていることが示唆された。また、5fdC-NCP-Nuc では、スライディング後に酵素アクセシビリティの大きな低下が見られた。以上の結果から、ホルミル修飾はヌクレオソームの全体的な安定性を向上させる一方、DNA 上における局所的な変位を促進する化学因子である可能性が示された。

さらに、ホルミル修飾の位置の効果を検証に向け、5fdC-NCP-Nuc と 5fdC-linker-Nuc のスライディングとスライディング後のポジショニングに関する比較を行った。すると、5fdClinker-Nuc では、5fdC-NCP-Nuc とはスライディング後のヌクレオソームのポジショニングが異なることが示された。このことは、ホルミル修飾がヌクレオソームの特定のポジショニングを安定化する構造制御子として機能する可能性を示唆するものである。

ホルミル修飾によるポジショニング制御機構についてより詳細に検証を進めるため、これまでに、ヌクレオソームの末端付近だけでなく、中央付近や中間地点にホルミル修飾を有する DNA 群を構築した。また、ヌクレオソームが連なったクロマチンモデルの構築に向け、複数の 601 配列からなる DNA の作成と位置得意的な DNA 修飾の導入手法を確立している。本研究課題で構築した DNA 群を用いて、スライディング後のホルミル修飾の位置を ligation-mediated PCR 法などを用いた配列解析手法により明らかにし、クロマチンの凝集挙動との関連を検討することで、ホルミル修飾によるクロマチン構造制御メカニズムを分子レベルで明らかにできると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------