

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370052

研究課題名（和文）ヒストンの化学修飾を介したヌクレオソーム構造変換反応の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of nucleosomal structural change mediated by histone modifications

研究代表者

堀越 正美 (Horikoshi Masami)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：70242089

研究成果の概要（和文）： 転写反応では、ヒストンのアセチル化やメチル化等様々なシグナル情報に応答してプロモーター領域周辺のヌクレオソーム構造が解離する。ヒストンのアセチル化を認識するブロモドメインと、ヌクレオソームの解離に際して働く因子との相互作用が報告されているが、ヒストン化学修飾とヌクレオソームの解離を連動させる構造的基盤は何ひとつ明らかにされていなかった。報告者は転写開始因子 TFIID の CCG1 サブユニット中の繰り返しブロモドメインとヒストンシャペロン CIA との複合体の X 線結晶構造を 3.3Å レベルの解像能で決定した。構造的、生化学的、生物学的解析により、繰り返しブロモドメインと CIA との相互作用は転写活性化プロモーター領域における共局在性、ヒストン解離、そして polIII 導入にとって必要であった。更に今回の結晶構造解析では、ヒストンアセチル化と CIA を介したヒストンの解離とを連動させている特徴を見出した。転写活性化プロモーター領域における部位特異的なヒストンの解離において、CIA と繰り返しブロモドメインとの分子複合体が重要な鍵を握っていることを示している。報告者は、ヒストン化学修飾からヌクレオソーム構造変換に至るシグナル伝達の最初の構造基盤モデル (hi-MOST モデル) を報告することに至った。(本概要には、真核細胞遺伝子発現制御の最大の課題を解明した点のみをここに記し、他の成果は 4. に示した。)

研究成果の概要（英文）： Nucleosomes around the promoter region are disassembled for transcription in response to various signals, such as acetylation and methylation of histones. Although the interactions between histone-acetylation-recognizing bromodomains and factors involved in nucleosome disassembly have been reported, no structural basis connecting histone modifications and nucleosome disassembly has been obtained. We determined at 3.3 Å resolution the crystal structure of histone chaperone cell cycle gene 1 (CCG1) interacting factor A/antisilencing function 1 (CIA/ASF1) in complex with the double bromodomain in the CCG1/TAF1/TAF(II)250 subunit of transcription factor IID. Structural, biochemical, and biological studies suggested that interaction between double bromodomain and CIA/ASF1 is required for their colocalization, histone eviction, and pol II entry at active promoter regions. Furthermore, the present crystal structure has characteristics that can connect histone acetylation and CIA/ASF1-mediated histone eviction. These findings suggest that the molecular complex between CIA/ASF1 and the double bromodomain plays a key role in site-specific histone eviction at active promoter regions. The model we propose in this study is the initial structure-based model of the biological signaling from histone modifications to structural change of the nucleosome (hi-MOST model).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000円	1,860,000円	8,060,000円
2010年度	4,900,000円	1,470,000円	6,370,000円
2011年度	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円
総計	14,600,000円	4,380,000円	18,980,000円

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：遺伝子の情報発現と複製

1. 研究開始当初の背景

細胞内外で生じた生体シグナルは、核内に伝達され、生物体の設計図である DNA に到達する。しかし、真核細胞生物の DNA は、ヒストン八量体に巻きついてヌクレオソーム構造を形成し、その活性は負に制御されている。従って、転写、DNA 複製、DNA 修復といった DNA を基盤とする様々な反応に先立って、ヌクレオソームを移動させる、破壊するといったヌクレオソーム構造変換反応が必要とされる。この反応は、ATP 依存性クロマチンリモデリング因子、及びヒストンシャペロンという二種類の因子群により制御されることが示唆されている。しかしながら、これらの因子がヌクレオソームに作用する分子機構は明らかにされておらず、ヌクレオソーム構造変換反応がどのように成されるのか、といった主要課題は未解決のままであった。

そのような状況の中で、報告者が単離しその生化学的機能を明らかにした、進化的に高度に保存されたヒストンシャペロン CIA (CCG1-interacting factor A) が、ヒストン(H3-H4)₂ 四量体に働きかけ、2分子の H3-H4 二量体に分割する活性を有することを機能生物学的、構造生物学的観点から世界に先駆けて示すことに成功した (*Nature*, 2007; 図1)。

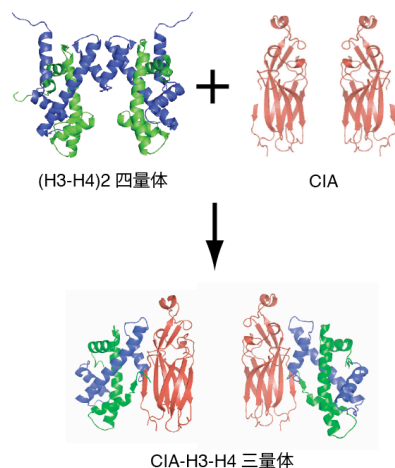


図1. CIA による (H3-H4)₂ 四量体の分割

これは、ヒストンシャペロンの作用機構を具体的に示した世界で初めての知見である。更に報告者は、生体シグナルの一つの終着点であるヒストン化学修飾により、ヌクレオソーム構造変換反応が部位特異的にどのように引き起こされるのか、という課題にも迫ることになった。CIA が TFIIID のサブユニットの一つである CCG1 (Cell Cycle Gene 1) 中のアセチル化ヒストン認識ドメインである繰り返しプロモドメイン (以下、CCG1DBD (double bromodomains) と表記) と相互作用することは既に見出しており (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002)、この相互作用の構造基盤を解析することにより、ヒストンアセチル化と CIA によるヌクレオソーム構造変換反応の関連性を解明することを試みた。

この解析が成功すれば細胞内外のシグナル情報がどのように転写活性化を引き起こすかといった真核細胞遺伝子発現制御における最大の課題を解き明かすことになる。

2. 研究の目的

本研究は、ヒストンの化学修飾を介してヌクレオソーム構造変換反応を引き起こされるメカニズムを明らかにすることを目的としている。ヌクレオソーム構造変換反応は、ヒストン八量体と DNA の解離、ヒストン(H3-H4)₂ 四量体と 2分子の H2A-H2B 二量体への解離、(H3-H4)₂ 四量体から 2分子の H3-H4 二量体への解離といった様々な素過程から構成されていると考えられる。その各素過程がヒストン化学修飾の入力や出力とどう結びついているのか、その分子的機構を機能生物学的、構造生物学的手法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CIA とプロモドメインの相互作用を介してのヌクレオソーム構造変換機構の解析

CIA-プロモドメインの相互作用の制御は、CIA の部位特異的なヌクレオソーム上へのリクルートを制御するという意義を持ち、生体の遺

伝子発現制御において重要な役割を果たすと考えられる。そこで、CIA-プロモドメインの相互作用複合体の結晶構造解析を行い、得られた複合体間の相互作用領域を生化学的、遺伝学的(生物学的)に解析した。

(2) ヒストン N 末側テイル領域の化学修飾に対するコア領域の役割の解析

ヒストン化学修飾が起こるテイル領域に対するコア領域の働きかけを調べるために、ヒストンコア領域の点変異体ライブラリーを用いてテイル領域への化学修飾の有無を調べた。

(3) ヒストンの転写反応以外の核内反応での解析

ヒストンの複製時での役割を調べるために、ヒストンシャペロン CIA、FACT を用いて解析した。また、染色体分配機構での解析を調べるため、コア領域内の機能ドメインを決定するために、ヒストンコア領域の点変異体ライブラリーを用いて解析した。

4. 研究成果

本研究は、ヒストンの化学修飾を介してヌクレオソーム構造変換反応が引き起こされるメカニズムを明らかにすることを目的とした。研究代表者が単離しその生化学的機能を明らかにした、進化的に高度に保存されたヒストンシャペロン CIA が、ヒストン(H3-H4)₂ 四量体に働きかけ、2分子の H3-H4 二量体に分割する活性を有することを機能生物学的、構造生物学的観点から世界に先駆けて示すことに成功した (*Nature*, 2007)。生体シグナルの一つの終着点であるヒストン化学修飾により、ヌクレオソーム構造変換反応が部位特異的にどのように引き起こされるのか、という課題にも迫った。CIA が TFIID のサブユニットの一つである CCG1 (Cell Cycle Gene 1) 中のアセチル化ヒストン認識ドメインである繰り返しプロモドメイン CCG1DBD と相互作用することは既に見出しており (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002)、この相互作用の構造基盤を解析することにより、ヒストンアセチル化と CIA によるヌクレオソーム構造変換反応の連関性を解明することを試みた。その結果、世界に先駆けて CIA-CCG1DBD の複合体結晶構造解析に成功し、その生化学的、遺伝学的解析を通して、CIA が CCG1DBD を介してアセチル化ヒストンを含むヌクレオソームに特異的にリクルートされ、その後、CIA がヒストンに受け渡されることによりヌクレオソームの破壊が進行するという分子機構モデルを提唱した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 図 2)。

次の課題として、以下の疑問の解明に着手した。ヒストンの化学修飾とヌクレオソーム構造変換反応の関係は、ヒストン化学修飾が起こるテイル領域と、ヌクレオソーム構造変換反応が起こるコア領域の機能関係に依存していると考えられる。そこでヒストンのテイル領域の化学修飾に効果をもたらすコア領域内の特定領域を決定することを試みた。まず、様々な核内反応

の伸長反応に重要なヒストン H3-K36 への化学修飾に効果をもたらすコア領域を決定することに成功した (*Genes Cells*, 2012)。この領域はすでに決められているヒストン H3-K4 の化学修飾に効果をもたらす領域とは異なることが示され、テイル領域への化学修飾とそれに対して効果をもたらすコア領域との関係に、特異性が存在することを初めて示すことになった。更に、CIA 以外のヒストンシャペロン FACT についても機能解析を行い、複製時の伸長過程における反応速度を制御するといった新しい知見を得た (*J.Biol.Chem.*, 2011)。また、ヌクレオソーム構造変換レベルだけでなく、染色体レベルでの構造変換機構を解析する第一歩として染色体分配機構の解析を行い、コア領域内の新しい機能ドメインを同定した (*EMBO J.*, 2011)。

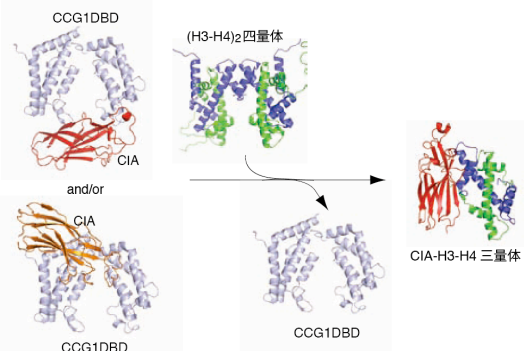


図2. CCG1DBD から (H3-H4)₂ 四量体への CIA 受け渡しモデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件) 全て査読有

1. Y.Hayashi, T.Senda, N.Sano & M.Horikoshi
Theoretical framework for the histone modification network: modifications in the unstructured histone tails form a robust scale-free network.
Genes Cells, 14, 789-806 (2009)
10.1111/j.1365-2443.2009.01314.x
2. M.Sakamoto, S.Noguchi, S.Kawashima, Y.Okada, T.Enomoto, M.Seki & M.Horikoshi
Global analysis of mutual interaction surfaces of nucleosomes with comprehensive point mutants.
Genes Cells, 14, 1271-1330 (2009)
10.1111/j.1365-2443.2009.01350.x
3. Y.Akai, N.Adachi, Y.Hayashi, M.Eitoku, N.Sano, R.Natsume, N.Kudo, M.Tanokura, T.Senda & M.Horikoshi
Structure of the histone chaperone CIA/ASF1-double bromodomain complex connecting histone modifications and site-specific histone eviction.

- Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 107, 8153-8158 (2010)
10.1073/pnas.0912509107
4. L.Sato, S.Noguchi, Y.Hayashi, M.Sakamoto & M.Horikoshi
Global analysis of functional relationships between histone point mutations and the effects of histone deacetylase inhibitors.
Genes Cells, 15, 553-594 (2010)
10.1111/j.1365-2443.2010.01408.x
 5. H.Endo, S.Kawashima, L.Sato, M.S.Lai, T.Enomoto, M.Seki & M.Horikoshi
Chromatin dynamics mediated by histone modifiers and histone chaperones in postreplicative recombination.
Genes Cells, 15, 945-958 (2010)
10.1111/j.1365-2443.2010.01435.x
 6. A.Kawano, Y.Hayashi, S.Noguchi, H.Handa, M.Horikoshi & Y.Yamaguchi
Global analysis for functional residues of histone variant Htz1 using the comprehensive point mutant library.
Genes Cells, 16, 590-607 (2011)
10.1111/j.1365-2443.2011.01512.x
 7. L.R.Kundu, M.Seki, H.Murofushi, A.Furukohri, S.Waga, A.J.Score, J.J.Blow, M.Horikoshi, T.Enomoto & S.Tada
Biphasic chromatin binding of histone chaperone FACT during eukaryotic chromatin DNA replication.
Biochim.Biophys.Acta, 1813, 1129-36 (2011)
10.1016/j.bbamcr.2011.01.002
 8. S.Kawashima, Y.Nakabayashi, K.Matsubara, N.Sano, T.Enomoto, K.Tanaka, M.Seki & M.Horikoshi
Global analysis of core histones reveals nucleosomal surfaces required for chromosome bi-orientation.
EMBO J., 30, 3353-3367 (2011)
10.1038/emboj.2011.241
 9. T.Abe, K.Sugimura, Y.Hosono, Y.Takami, M.Akita, A.Yoshimura, S.Tada, T.Nakayama, H.Murofushi, K.Okumura, S.Takeda, M.Horikoshi, M.Seki & T.Enomoto
The histone chaperone FACT maintains replication fork rates.
J.Biol.Chem., 286, 30504-30512 (2011)
10.1074/jbc.M111.264721
 10. K.Ishikawa, T.Ohsumi, S.Tada, R.Natsume, L.R.Kundu, N.Nozaiki, T.Senda, T.Enomoto, M.Horikoshi & M.Seki
The roles of histone chaperone CIA/Asf1 in nascent DNA elongation during nucleosome replication.
Genes Cells, 16, 1050-1062 (2011)
10.1111/j.1365-2443.2011.01549.x
 11. H.Endo, Y.Nakabayashi, S.Kawashima, T.Enomoto, M.Seki & M.Horikoshi
Nucleosome surface containing nucleosomal DNA entry/exit site regulates H3-K36me3 via association with RNA polymerase II and Set2.
Genes Cells, 17, 65-81 (2012)
10.1111/j.1365-2443.2011.01573.x
- [学会発表] (計9件)
1. 堀越 正美
「ヒストンコード仮説の問題点と克服」
第9回日本蛋白質科学会年会
2009.5.20、全日空ホールニュースカイ (熊本市)
 2. 堀越 正美
「ヒストン点変異体を用いた網羅的機能解析によるヌクレオソーム構造変換反応機構の構築」
第82回日本生化学会大会
2009.10.23、神戸ポートアイランド (神戸市)
 3. 堀越 正美
「ヒストンコード仮説の問題点と克服」
第32回日本分子生物学会年会
2009.12.12、パシフィコ横浜 (横浜市)
 4. M.Horikoshi
「Regulatory mechanisms of chromatin structure and function」
2010 Global Biomarker Conference
2010.09.10、Vancouver, Canada
 5. 堀越 正美
「遺伝子制御の ON/OFF : 要素からネットワーク構造へ」
BMB2010 (第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会)
2010.12.10、神戸ポートアイランド (神戸市)
 6. Y.Hayashi et al.
「Network-Based Histone “Modification Web” Theory and “DESS” Strategy for Elucidating the Physiological Significance of Histone Modifications」
Keystone Symposia-Histone Code: Fact or Fiction?
2011.01.12, Utah, USA
 7. 堀越 正美
「生化学を基軸に独創性、そして独走性を目指した30年に及ぶ遺伝子制御研究」
第84回日本生化学会大会
2011.09.23、京都市
 8. M.Horikoshi
Studies on chromatin regulation by utilizing histone-GLibrary
Keystone Symposia-Chromatin Dynamics

2012.01.17-01.22
Keystone (Colorado), USA

9. M.Horikoshi
Theoretical framework for the histone
modification networks
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting-
Systems Biology: Global Regulation of Gene
Expression 2012
2012.03.20-03.24
Cold Spring Harbor (New York), USA

[図書] (計 1 件)

1. 堀越 正美
スーパーサイエンスハイスクール講義
-LET IT BE OR NOT
254 頁、培風館、2009 年

[その他]

ホームページ等
<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/homasami/etc.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
堀越 正美 (Horikoshi Masami)
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
研究者番号：70242089

(2) 研究分担者

-

(3) 連携研究者

-