

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06050

研究課題名(和文) 柔軟な構造領域を介した相互作用によるDNA結合タンパク質複合体の制御機構の研究

研究課題名(英文) Study on the regulatory mechanisms of DNA-binding protein complexes through interactions mediated by flexible regions

研究代表者

真柳 浩太 (Mayanagi, Kouta)

九州大学・薬学研究院・講師

研究者番号：50418571

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)：ヌクレオソームとFACTのMIDドメインの複合体の解析により、ヌクレオソームのヒストンH3のN末端テールが、ヒストンコアに巻き付いている2本のDNA2重鎖間に結合した状態を可視化した。リモデリング因子CHD8とヌクレオソームの複合体の単粒子解析結果、FACTの系より高い分解能(3.9 オングストロム)が得られたがヒストンテールは可視化されないため、この系ではテールはヌクレオソーム本体から離れ溶液中に展開していることが推察された。その他、結核菌の休眠現象に関わり、全長の半分が天然変性領域を占めるMDP1とDNA、リボソーム等から形成される複合体のクライオ電顕による解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、結晶構造解析等では可視化が困難だった、ヌクレオソームのヒストンテールを明確に可視化され、また結合因子等の様々な要因によりテールがコアに収納されたり、あるいは溶液中に展開されるなど非常にダイナミックに変化し、これが機能制御に利用されている可能性を示せた。また現在でも非常に重大な疾病である結核菌の、治療を困難にさせる要因の一つの休眠現象に深く関わるMDP1の天然変性領域とDNA、リボソーム等から形成される複合体の解析により、休眠の要因の一つと考えられる凝集体形成の機構の解析が進展した。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the nucleosome and the MID domain of the FACT complex visualized the N-terminal tail of histone H3 of the nucleosome binding between the two DNA double strands wrapped around the histone core. In single-particle analysis of the CHD8 remodeling factor and nucleosome complex, a higher resolution (0.39 nm) was obtained compared to the FACT system, but the histone tails were not visualized. This suggests that in this system, the tails extend into the solution away from the nucleosome core. Additionally, cryo-electron microscopy was used to analyze the complex formed by MDP1, which is involved in the dormancy phenomenon of Mycobacterium tuberculosis and has half of its full length occupied by intrinsically disordered regions, along with DNA and ribosomes.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 立体構造解析 超分子複合体 生物物理 天然変性領域

1. 研究開始当初の背景

近年、クライオ電顕は高性能の電子直接検出カメラ (DED カメラ) の開発によって分解能が向上し、結晶構造解析と互角になった。特に分子量 10 万程度以上の大きさを持ち、一定の構造を保つターゲットに関してはほぼルーチン通りの解析で原子分解能に到達できるようになってきている。その一方で多数の因子を含み、構造変化が生じやすい柔軟な複合体に関しては、未だ高分解能の解析が困難である。これはクライオ電子顕微鏡も、「平均化」のプロセスを通じて高分解能情報を抽出しており、異なる形状が混在すると、平均化のプロセスが厳密には破綻するからである。

我々が対象としてきた、核内現象を司るタンパク質の多くは、複数のドメインから構成され、ドメイン間、N 末端及び C 末端には天然変性領域 (以下、ID 領域と表記) のような柔軟なループで占められる。そのため複合体を構成する個々の因子自体が非常に柔軟性に富むものが多く、構造解析が難しい。

この他、結核菌の MDP1 因子は、結核の治療を著しく困難にしている同菌の休眠現象に関わり、その全長のうち C 末端側の半分が ID 領域であり、且つ DNA の他リボソーム等に結合することが知られていた。しかしながら複合体の形成様式、休眠現象誘導へのメカニズムは不明であり、この系もまたクライオ電顕の良いターゲットであった。

電子顕微鏡では、個々の複合体粒子の実像が得られるため、粒子像のクラス分けを詳細に行うことで、ある程度の多様性に対応することが可能である。我々はこれまで、この特性を駆使してヌクレオソームとリモデリング因子の系 (Mayanagi et al., *Sci. Rep.* 2019) や DNA 複製フォーク複合体 (Mayanagi et al., *BMC Biol.*, 2020) の解析を行ってきた。そしてこれらの系において ID 領域等の特に柔軟な領域を介した構成因子間の結合を新たに発見し、且つこれらの結合が機能制御に重要な役割を担っていることを明らかにした。単粒子解析では複数の立体構造のクラスを仮定し、膨大な数の粒子像を各クラスへ帰属させ、立体構造を算出する。そして反復計算により分解能が最も良く収束した 1~数個の立体構造を最終マップとして採用する。また、得られる複合体の構造は、領域によって分解能が大きく異なることも多い (local resolution)。

しかし、重要な相互作用が可視化される構造が、最も良いクラスになるとは限らない。また着目しているのが往々にして分解能で劣る領域に相当することがある。結果、全体の分解能 (global resolution) 向上を指向した通常のルーチンでは却って着目している ID 領域にとってマイナスの処理が施されうる。従って、このような系に関しては、通常よりも多くの粒子像を元に、分解能重視時よりも広範囲に渡る収束パラメータの検討が必用となる。

研究開始当初、国内に原子分解能レベルのデータが収集可能な、DED カメラ搭載のクライオ電顕を設置しているのは大阪大学、理化学研究所、東京大学等の数拠点に限られ、マシンタイムが極めて貴重であり、負染色試料や通常のクライオ電顕を用いた事前の試料最適化の作業は極めて重要であった。その一方で、どこまで分解能が向上するかは、結局のところ実際にこれら拠点の最先端の装置を用いて収集したデータを解析してみないと分からない面もあり、DED カメラを保持していない我々のグループにとっては極めて深刻な状況であった。

2. 研究の目的

DNA-タンパク質複合体等、柔軟で構造的に多様な超分子複合体のクライオ電顕単粒子解析を行う。とりわけ構成タンパク質が ID 領域を持ち、且つこの領域を因子間の結合等の相互作用に用いる場合、複合体全体が非常に柔軟性及び、多様性を持ち、既存のルーチンが必ずしも上手く機能しないことを、これまでの解析から経験した。要因の一つに現在の単粒子解析が高分解能の構造を取得することを最優先していることが挙げられる。即ち、単粒子解析において試料が幾つかの構造をとることが予想される場合、幾つかの構造グループを仮定し、個々の画像を各グループに割り当てることで、ターゲットの多様性にある程度対応できるようにしている。しかしながら標準的なルーチンでは複数のグループ分け、先鋭化処理などが、結果的には分解能の高いグループ及び領域の抽出、柔軟であるが故の低分解能領域は排除される傾向があり、本研究課題のターゲットのしかも肝心の ID 領域の可視化に対してはマイナスに働くことが多かった。本研究では従来の方を見直すことで、分解能重視時よりも広範囲に渡る収束パラメータの検討を行う。これまで可視化が困難あるいは過度の先鋭化処理で認識困難に陥っていた領域の可視化をすることで、従来の方では見過ごされていた新規の相互作用の探索をおこなう。得られた相互作用情報を元に機能制御の機構を考察する。また個々の解析で蓄積した対応策より、このような IDR 領域の可視化の一般的な方法論の確立を試みる。更に多様性を持ち、不定形な対象に対しては、クライオ電子線トモグラフィを使用して可視化を試みる。

3. 研究の方法

ヌクレオソームとリモデリング因子の複合体等、重要な核内現象に関わる DNA-タンパク質複合体の構成因子をそれぞれ発現精製する。用いる DNA に関しては反応を解析する上で適切なオリゴ DNA を 2 次構造の形成を極力避けられるよう構造予測ソフトで考慮しながら設計し、上記

の複製因子と混合することで複合体を再構成した。再構成した複合体をゲルろ過を用いて精製し、同時に溶出溶液等、複合体が安定になる条件を検討した。精製した複合体を負染色または急速凍結を行い、電子顕微鏡観察試料を作製した。まず負染色試料による最適化を行い、次に所属研究所のクライオ電子顕微鏡を用いて精製及び凍結条件の検討等を行った。その結果をもとに、ある程度高分解能が期待できるもののみ、他機関の DED カメラを装備したクライオ電子顕微鏡にて観察、動画によるデータ収集を行い、解析の効率の向上を目指した。電子顕微鏡で取得した画像データをもとに、計算機による画像解析、立体構造解析を行い、ターゲットの平均画像や立体構造を算出した。得られた密度マップに結晶構造を当てはめ、また結晶構造が未知の領域についてはモデリングによって複合体全体の原子モデルを構築した。機能制御や分子間コンタクトに重要なアミノ酸を立体構造情報をもとに特定し、変異体解析等により構造情報の妥当性を検討した。得られた構造をもとに複合体の制御機構を考察した。解析にはこのような柔軟な構造の解析に適した単粒子解析法を用い、Relion 等複数の構造が混在する系に対し威力を発揮するツールを用いて解析した。その際、これまでの標準的なルーチンでは高分解能化が優先されるあまり、本研究課題のターゲットである、多様性、柔軟性を有する領域が、クラス分けやマップの先鋭化の過程で排除あるいは断片化されて認識困難になる傾向がある危険性を意識しながら、収束パラメーターをより慎重に吟味した。

初年度の途中から所属研究所のクライオ電顕に DED カメラが設置されたことに伴い、所属機関内で原子レベルの解析を可能にするため、自動撮影機構のセットアップを行った。アポフェリチン及びベータガラクトシダーゼ等の標準試料にて原子分解能に到達できるデータ収集が可能であることを確認したのち、上記サンプルの構造計算用データ収集を所属研究所で行った。2 年度には冷陰極電解放射形電子銃を装備したクライオ電顕が 2 台が所属機関の同一キャンパス内に設置された。この 2 台の装置に関しても自動撮影機構のセットアップを行い、解析効率の大幅な向上を目指した。更に、不定形な系に対応するためのクライオトモグラフィのために必用なシステムの構築をこの 2 台のクライオ電顕及び解析用ワークステーションについて行った。

4. 研究成果

ヌクレオソームとリモデリング因子 FACT の AID セグメントの複合体の解析から着手した。この複合体では酸性残基に富む FACT の AID セグメントが DNA と入れ替わる形でヌクレオソームに潜り込み、ヒストンコアに結合しているが (Mayanagi et al., *Sci. Rep.* 2019)、その他の新規構造として今回、H3 の N 末端テールが 2 本の DNA2 重鎖間の窪みに沿って結合している様子を新たに可視化できた。このヒストンテールは通常のルーチンでは複合体全体の分解能の向上の過程で断片化され認識困難となっていたが、マップの先鋭化のパラメータを抑制的に設定することにより、連続的な密度として可視化することができた。

この結果と比較するため、次にリモデリング因子 CHD8 とヌクレオソームの複合体の構造解析を行った。FACT の MID ドメインとヌクレオソームの系の場合、MID ドメインは揺らぎのため可視化されず、AID セグメントのみが DNA と入れ替わる形で紐状の密度として可視化されたが、CHD8 の系では分解能は限られるものの、CHD8 に相当する領域がヌクレオソームに付着する形で可視化できた。またヌクレオソーム自体の分解能は FACT の系よりも高い 3.9 Å に達した。しかしながら、FACT の場合と同様、過度な密度の精鋭化を抑制することでヒストンテールが可視化されるか試みたが、現時点では可視化には至っていない。このことから CHD8 と形成される複合体の場合はヒストンテールが DNA 間の窪みから外れ、周囲の溶液中に伸展しており、ヌクレオソームの状態の切り替えが起きていることが推察される。

また、結核菌の休眠現象と関連し、全長の半分が天然変性領域を占める MDP1 と、DNA 及び 50S リボソーム等の相互作用の解析を行った。電子顕微鏡観察により、この因子は DNA や 50S リボソームと結合、凝集体を形成する機能を有することを確認した。この因子のホモログに関する知見から、本因子がダイマーを形成する可能性があったが、電顕観察の結果、凝集体形成の条件下ではモノマーとして溶液中に存在し、ダイマー形成が凝集体の形成に必須ではないことを明らかにした。これらの結果は Nishiyama et al., *NAR* (2024) に掲載された。また、DNA との相互作用により凝集体の形成をクライオ電顕で確認し、このような不定形な対象の立体構造解析を可能とするクライオトモグラフィのセットアップを行った。さらにセグメンテーションにより凝集体中での DNA 2 重鎖の可視化を行い、DNA が MDP1 によって束ねられる様子を可視化した。

これらの解析と併行して、初年度は所属研究所に既設のクライオ電顕に設置された DED カメラを活用した画像データ自動収集システムの構築を進め、原子分解能の解析が可能な解析環境の整備を完了した。次年度は新たに導入された冷陰極電解放射形電子銃を装備したクライオ電顕が 2 台に自動収集システムを導入及び改善を行い、2 Å を切る分解能の解析が可能となった。本装置は液体窒素、試料交換等も自動で行えることから、作業効率の大幅な向上も見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiraishi Taichi, Katayama Yuta, Nishiyama Masaaki, Shoji Hiroataka, Miyakawa Tsuyoshi, Mizoo Taisuke, Matsumoto Akinobu, Hijikata Atsushi, Shirai Tsuyoshi, Mayanagi Kouta, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 -
2. 論文標題 The complex etiology of autism spectrum disorder due to missense mutations of CHD8	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41380-024-02491-y	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 Fukuoka Kohei, Yoshida Yuya, Sotono Kurumi, Nishikawa Naoki, Hamamura Kengo, Oyama Kosuke, Tsuruta Akito, Mayanagi Kota, Koyanagi Satoru, Matsunaga Naoya, Ohdo Shigehiro	4. 巻 675
2. 論文標題 Oral administration of vancomycin alleviates heart failure triggered by chronic kidney disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 92 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.07.015	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 Yoshida Yuya, Fukuda Taiki, Fukuoka Kohei, Nagayama Toshitaka, Tanihara Tomohito, Nishikawa Naoki, Otsuki Kaita, Terada Yuma, Hamamura Kengo, Oyama Kosuke, Tsuruta Akito, Mayanagi Kota, Koyanagi Satoru, Matsunaga Naoya, Ohdo Shigehiro	4. 巻 388
2. 論文標題 Time-Dependent Differences in Vancomycin Sensitivity of Macrophages Underlie Vancomycin-Induced Acute Kidney Injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 218 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.123.001864	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 Nishiyama Akihito, Shimizu Masahiro, Narita Tomoyuki, Kodera Noriyuki, Ozeki Yuriko, Yokoyama Akira, Mayanagi Kouta, Yamaguchi Takehiro, Hakamata Mariko, Shaban Amina?Kaboso, Tateishi Yoshitaka, Ito Kosuke, Matsumoto Sohkiichi	4. 巻 52
2. 論文標題 Dynamic action of an intrinsically disordered protein in DNA compaction that induces mycobacterial dormancy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 816 ~ 830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad1149	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 Oki Keisuke, Yamagami Takeshi, Nagata Mariko, Mayanagi Kouta, Shirai Tsuyoshi, Adachi Naruhiko, Numata Tomoyuki, Ishino Sonoko, Ishino Yoshizumi	4. 巻 49
2. 論文標題 DNA polymerase D temporarily connects primase to the CMG-like helicase before interacting with proliferating cell nuclear antigen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 4599 ~ 4612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab243	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 真柳 浩太	4. 巻 56
2. 論文標題 負染色法による超分子複合体の単粒子解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 81-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11410/kenbikyo.56.2_81	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 真柳浩太
2. 発表標題 BINDS九州大学拠点における クライオEM構造解析支援及び高度化
3. 学会等名 徳島大学・九州大学BINDS合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 真柳浩太
2. 発表標題 九州大学病院キャンパスにおける クライオ電子顕微鏡施設の現状
3. 学会等名 日本生物物理学会九州支部主催・九州大学生体防御医学研究所共催セミナー「構造生物学の新展開: in vitroからin cell, in vivoへ」 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 真柳浩太
2. 発表標題 九州大学 グリーンファルマ構造解析センター
3. 学会等名 2023年 CRYOARMオーナーズミーティング(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kouta Mayanagi, Kazumi Saikusa, Naoyuki Miyazaki, Satoko Akashi, Kenji Iwasaki, Yoshifumi Nishimura, Kosuke Morikawa, and Yasuo Tsunaka
2. 発表標題 Key steps in nucleosome reorganization by human FACT as revealed by cryo-EM single particle analysis
3. 学会等名 Gordon Research Conference 3D Electron Microscopy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真柳浩太
2. 発表標題 電子顕微鏡で「見た」アーキアのDNA 複製装置の仕組み
3. 学会等名 第34 回日本Archaea 研究会講演会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真柳浩太
2. 発表標題 グリーンファルマ構造解析センター
3. 学会等名 九州大学大学院薬学研究院附属グリーンファルマ構造解析センター記念講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真柳浩太
2. 発表標題 グリーンファルマ構造解析センター
3. 学会等名 第1回クライオ電子顕微鏡 施設技術交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真柳浩太
2. 発表標題 九州大学グリーンファルマ構造解析センター
3. 学会等名 CRYOARMオーナーズミーティング
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真柳浩太
2. 発表標題 九州・西日本エリアにおける創薬支援を目指したクライオ電顕ネットワーク
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真柳浩太
2. 発表標題 最先端電子顕微鏡カメラで「見る」生体高分子複合体の立体構造
3. 学会等名 バイオインタラクション研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 真柳浩太 他（監修 難波 啓一、加藤 貴之、牧野 文信）	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 クライオ電子顕微鏡ハンドブック	

〔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
---------	---------