

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 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15014

研究課題名（和文）パイオニア転写因子FoxA1による標的ヌクレオソーム認識機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of target nucleosome recognition by the pioneer transcription factor FoxA1

研究代表者

田中 大貴（Tanaka, Hiroki）

東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員

研究者番号：90880104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、肝細胞への分化において重要なパイオニア転写因子であるFoxA1に着目し、FoxA1による標的ヌクレオソーム認識機構の解明を目的としている。申請者は、試験管内で再構成した標的ヌクレオソームとリコンビナントタンパク質として精製したFoxA1を用いて、FoxA1-ヌクレオソーム複合体を調製する系を確立した。続いてクライオ電子顕微鏡解析のための条件検討を行い、単粒子解析に適した条件を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パイオニア転写因子がどのようにヌクレオソームに作用するかを明らかにすることは、細胞の分化や初期化の分子メカニズムを理解する上で重要な意味がある。本研究で、クライオ電子顕微鏡構造解析に向けてFoxA1-ヌクレオソーム複合体の大量調製系を確立した。この系は、他のパイオニア転写因子とヌクレオソームの複合体を調製する上でも有効な手段となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, to understand the mechanism how the pioneer transcription factor FoxA1 binds to its target nucleosome, we reconstituted the target nucleosome in vitro, and performed biochemical and structural analyses. We tried to purify FoxA1-nucleosome complex and prepare samples for cryo-EM analysis.

研究分野：生化学、構造生物学

キーワード：クロマチン ヌクレオソーム 転写因子

1. 研究開始当初の背景

真核生物の遺伝情報を担うゲノム DNA は、4 種類のコアヒストン H2A、H2B、H3、H4 二分子ずつからなるヒストン八量体に、DNA が約 150 塩基対巻き付いたヌクレオソームを基本単位としたクロマチン構造を形成して核内に収納されている。クロマチンは、様々な因子が結合することでダイナミックに構造が変化する。この構造変化によって、転写、複製、組換え、修復を担うタンパク質複合体と DNA との相互作用が調節されて、様々な核内プロセスが制御されている。

転写因子は、ゲノム上の遺伝子発現制御領域に存在する標的塩基配列に結合して、標的遺伝子の転写を調節する。一般的に多くの転写因子はヌクレオソーム構造の中にある標的塩基配列には結合できないと言われている。しかし、パイオニア転写因子と総称される一部の特殊な転写因子群は、ヌクレオソーム構造の中にある標的塩基配列にも結合できる。パイオニア転写因子は標的塩基配列をもつヌクレオソームに安定的に結合し、直接的あるいは間接的に、局所的なクロマチンの構造変化を誘起することで、他の転写因子群が標的遺伝子の転写を調節できる状態を生み出すと考えられている。この特異な性質により、パイオニア転写因子は細胞分化の際に重要な役割を果たす。

FoxA1 は代表的なパイオニア転写因子であり、肝細胞への分化および肝臓の発生に必要なものである。また、FoxA1 はダイレトリプログラミング法による人工肝細胞(iHep 細胞)の作製にも必要な転写因子である。肝細胞への分化の際に FoxA1 は、標的ヌクレオソームに結合し、局所的なクロマチン構造変化をともなって他の転写因子群やクロマチンリモデリング因子の結合を誘起することで、標的遺伝子の転写を調節すると考えられている。しかしながら、FoxA1 がどのようなメカニズムで標的ヌクレオソームに結合し、クロマチンの高次構造の変化を誘起するのか、その機構は不明である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、肝細胞への分化において重要なパイオニア転写因子である FoxA1 が標的塩基配列を含む標的ヌクレオソームに安定的に結合する機構と、それにともなうクロマチン高次構造の変化に着目し、生化学的・構造生物学的アプローチによりこれらのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

以下の方法で研究を実施した。

(1) タンパク質の精製

ヒト由来のコアヒストンタンパク質(H2A、H2B、H3、H4)および FoxA1 を、大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質として精製した。精製したタンパク質は、SDS-PAGE によって解析し、その純度を確認した。

(2) 標的ヌクレオソームの試験管内再構成

FoxA1 の標的ヌクレオソームを試験管内再構成系によって調製した。FoxA1 の標的ヌクレオソームの試験管内再構成に用いる DNA には、マウスの *ALB1* 遺伝子のエンハンサー領域の DNA 配列を用いた。この DNA 領域は、肝細胞への分化の際に FoxA1 が結合しているおり、かつ、ヌクレオソームを形成していることが報告されている。この DNA 断片を用いて、塩透析法により試験管内でヌクレオソームを再構成し、精製した。精製した標的ヌクレオソームは非変性 PAGE および SDS-PAGE によって解析し、その純度を確認した。

(3) FoxA1-標的ヌクレオソーム複合体の調製

クライオ電子顕微鏡解析のために、FoxA1-ヌクレオソーム複合体を調製した。調製方法としては、複合体の安定性を高めるために、精製と化学的架橋を同時に行うことが可能な GraFix 法を用いて、架橋剤の濃度等を検討した。調製したサンプルは非変性 PAGE によって解析し、その純度を確認した。

(4) クライオ電子顕微鏡による FoxA1-標的ヌクレオソーム複合体の観察

FoxA1-ヌクレオソーム複合体の立体構造を決定するために、クライオ電子顕微鏡による観察を行った。データ測定に適切な氷の厚さ、粒子の密度・分布を満たす凍結試料の作製条件を検討した。

4．研究成果

研究方法に沿って研究を進めた。

(1) タンパク質の精製

まずリコンビナントタンパク質として FoxA1 を精製した。全長の FoxA1 は性質が悪く、精製が困難であった。そこで、天然変性領域である N 末端領域を欠失させたコンストラクトを用いたところ、十分な量と純度の FoxA1 を精製することに成功した。またコアヒストンについては先行研究に従った方法にて精製を行い、高純度かつ大量に調製することができた。

(2) 標的ヌクレオソームの試験管内再構成

次に標的ヌクレオソームとしてマウス *ALB1* エンハンサー領域の DNA 断片とリコンビナントタンパク質として精製したヒストンタンパク質を用いて標的ヌクレオソームを試験管内再構成した。精製した標的ヌクレオソームを非変性 PAGE および SDS-PAGE によって解析し、その純度を確認したところ、高純度かつ大量に標的ヌクレオソームを精製することに成功した。

(3) FoxA1-標的ヌクレオソーム複合体の調製

次に調製した FoxA1 と標的ヌクレオソームを用いて構造解析を目的とした FoxA1-ヌクレオソーム複合体の調製を検討した。複合体の安定化と遊離の FoxA1 を分離するために、GraFix 法による精製を試みた。結果、GraFix 法によって FoxA1-標的ヌクレオソーム複合体を調製する系を確立し、大量調製が可能となった。

(4) クライオ電子顕微鏡による FoxA1-標的ヌクレオソーム複合体の観察

調製した FoxA1-ヌクレオソーム複合体を用いて、クライオ電子顕微鏡解析のための凍結試料の作製条件を検討した。観察するために適切な氷の厚さ、粒子の密度・分布の凍結試料を得るために、試料作製の際のプロット時間やサンプルの濃度を検討した。複数の条件で作製した凍結試料をクライオ電子顕微鏡で観察した結果、良好な顕微鏡像が得られた。

本研究を通じて、FoxA1-ヌクレオソーム複合体の調製系の確立は、他のパイオニア転写因子とヌクレオソーム複合体の調製にも応用が効く可能性のある成果である。また、凍結試料作製の条件検討で得られたノウハウは、他の試料を作製する上でも重要な足がかりとなる。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 田中大貴、滝沢由政、奥田綾、守島健、佐藤信浩、井上倫太郎、杉山正明、胡桃坂仁志
2．発表標題 パイオニア転写因子GATA3 の結合したヌクレオソームの構造解析
3．学会等名 第56回京都大学複合原子力科学研究所学術講演会
4．発表年 2022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
---------	---------