

自己評価報告書

平成23年 4月 1日現在

機関番号：32689

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20114005

研究課題名（和文） 細胞核の機能的複合体の構造と動作メカニズム

研究課題名（英文） Structural and functional studies of macromolecular complexes in the nucleus

研究代表者

胡桃坂 仁志（KURUMIZAKA HITOSHI）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：80300870

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：ヒストン、染色体、ヌクレオソーム、クロマチン、エピジェネティクス

1. 研究計画の概要

局所的・過渡的に誘起される染色体の核内配置や構造変動は、遺伝子の発現、DNA の複製、組換え、修復の制御に重要な役割を果たしている。このような染色体のダイナミクスを、遺伝情報収納・発現・継承のための「場」の実体として考え、それらの動作メカニズムを生化学的および構造生物学的手法により解析する。そして、本学術領域の目的である、遺伝情報「場」の実体解明のための、基盤情報を得ることを目指す。

（1）具体的には、まず、核内複合体の機能・構造解析をクロマチンレベルで行うために、クロマチンをリコンビナント蛋白質群によって再構成する系を確立する。それによって、細胞内ではヒストンの修飾などのために不均一な状態であるクロマチンを、解析が可能な均一な複合体として得ることを可能にする。そして再構成クロマチン自体の構造的・機能的性質を生化学的および構造生物学的手法により解析し、クロマチン高次構造と機能発現との相関を明らかにする。

（2）また、クロマチンの機能発現に重要な新規の核内複合体を同定するために、コアヒストンに結合する因子群の解析をプロテオミクス法によって行う。

（3）さらに、ダイナミックなクロマチン構造変換期、例えば細胞増殖や生殖細胞形成の際、に働く蛋白質群に着目し、これらの蛋白質に結合する因子群をプロテオミクス法により同定する。これらの解析から、局所的・過渡的に染色体の配置や構造変換に機能する核内複合体の同定を行う。並行して、これらの

核内複合体の再構成を行い、それらの機能・構造解析を行う。

2. 研究の進捗状況

（1）まず、クロマチンの最小構造ユニットであるヌクレオソームを、リコンビナントヒストンによって再構成するために、ヒトのヒストン H2A、H2B、H3、H4 の大量発現・精製系を確立した。その際、本研究にて購入した蛋白質精製システム、ゲル撮影装置などを使用した。そして、本系を用いて精製したヒストンによるヌクレオソーム再構成に成功した。再構成ヌクレオソームは、非変性ポリアクリルアミドゲルを用いたブレップセル装置によって高純度に精製することができた。次に、種々のヒストンバリエーションやヒストンの化学修飾をミミックした変異体を含んだヌクレオソームを再構成し、これらのヒストンを含んだヌクレオソームを大量かつ高純度で得ることに成功した。そして、得られたヌクレオソームの結晶化を蒸気拡散法によって行った。その際、本研究にて購入した、タンパク質結晶化用液体ハンドリングシステムおよび光散乱分光光度計などを使用した。そして、種々のヒストンバリエーションやヒストンの化学修飾をミミックした変異体を含むヌクレオソームの単結晶を得ることができた。これらのヌクレオソーム結晶を用いて、X 線回折データを得た。高分解能でのデータは、SPring8 放射光施設およびフォトンファクトリー (PF) 放射光施設を利用して収集した。そして、現在までに、ヒト精巣特異的に存在するヒストン H3 バリエーションである、H3T を含むヌクレオソームなど、20 種類以上のヌクレオソームの立体構造決定に成功した。また、生化学的解析により、H3T ヌクレ

オソームが、通常のヌクレオソームと比較して非常に壊れやすい性質であることを明らかにした。これらの解析によって、精巣での染色体基盤構造の形成および機能発現機構の解明に重要な知見を与えることができた。

(2) これらのヒストンの大量発現・精製系を利用して、ヒストンが共有結合したビーズを調製し、ヒト培養細胞抽出液からプロテオミクス法によりヒストン結合蛋白質群を探索した。その結果、sNASPをはじめとする幾つかのヒストンシャペロンが、ヒストン H3/H4 複合体に結合する因子として同定された。生化学的および構造生物学的解析によって、sNASP がヒストンを DNA 上にロードして、ヌクレオソーム構造を形成する活性を有する、真性のヒストンシャペロンであることを明らかにした。これらの生化学的解析には、本研究にて購入した分子間相互作用装置などを使用した。

(3) さらに、細胞分裂期の染色体ダイナミクスに重要な DNA 組換え蛋白質群の機能解析を行った。具体的には、新規染色体組換え因子として、PSF、GEMIN2、EVL などと同定し、それらと相同組換え蛋白質である RAD51 および DMC1 との物理的・機能的相互作用について生化学的に解析した。

3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

(理由) ヌクレオソームの結晶構造解析において、当初の予定(数種類)を遥かに超える 20 種類以上もの解析に成功した。これらの成果によって、染色体ダイナミクスを理解するための重要な構造基盤情報が得られた。さらに、染色体ダイナミクスに必要な新規因子群の同定・機能解析にも成功した。

4. 今後の研究の推進方策

遺伝情報場としてのクロマチン構造は、種々のヒストンバリエーションとヒストンの翻訳後修飾によってダイナミックに変動している。本研究では、ヒトのヒストン H3 バリエーションを含むヌクレオソーム構造の解析を中心に行ってきた。今後は、新たに発見されたヒストン H3 バリエーションである H3.X および H3.Y、H2A のバリエーションである H2A.Z1、H2A.Z2、および H2AX を含むヌクレオソームの立体構造解析および生化学的解析を、種々のヒストンバリエーションとの組み合わせにおいて行う。そして、それらのヒストンバリエーションの遺伝情報場形成における機能を解明する。また、ヒストンの翻訳後修飾を模倣した変異体ヒストンを用いてヌクレオソームの X 線結晶構造解析および生化学的解析を行い、ヒストンの翻訳後修飾のクロマチン構造への影響と

機能的意義を明らかにする。また、規則的なスペーシングを有するクロマチンの再構成を行い、得られた再構成クロマチンを用いて、その動的性質を生化学的および物理化学的手法によって解析する。また、セントロメア特異的なヒストン H3 バリエーション、CENP-A を含むヌクレオソームの結晶構造解析を行い、これまで不明であった、真核生物染色体のセントロメア領域の高次構造を解明する。さらに、CENP-A ヌクレオソームに直接結合するセントロメア特異的 DNA 結合タンパク質である CENP-B と CENP-A ヌクレオソームとの複合体の解析を行う。

5. 代表的な研究成果

(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 29 件)

1. Takaku, M., Takahashi, D., Machida, S., Ueno, H., Hosoya, N., Ikawa, S., Miyagawa, K., Shibata, T., and Kurumizaka, H. (2010) Single-stranded DNA catenation mediated by human EVL and a type I topoisomerase. *Nucleic Acids Res.*, 38, 7579-7586. 査読有り
2. Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2010) Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 10454-10459. 査読有り
3. Osakabe, A., Tachiwana, H., Matsunaga, T., Shiga, T., Nozawa, R., Obuse, C., and Kurumizaka, H. (2010) Nucleosome formation activity of human sNASP. *J. Biol. Chem.*, 285, 11913-11921. 査読有り
4. Morozumi, Y., Takizawa, Y., Takaku, M., and Kurumizaka, H. (2009) Human PSF binds to RAD51 and modulates its homologous-pairing and strand-exchange activities. *Nucleic Acids Res.*, 37, 4296-4307. 査読有り
5. Takaku, M., Machida, S., Hosoya, N., Nakayama, S., Takizawa, Y., Sakane, I., Shibata, T., Miyagawa, K., and Kurumizaka, H. (2009) Recombination activator function of the novel RAD51- and RAD51B-binding protein, Human EVL. *J. Biol. Chem.*, 284, 14326-14336. 査読有り

〔学会発表〕(計 122 件)

1. Kurumizaka, H. Atomic resolution structures of the human nucleosomes containing histone variants. International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities. 1/24-26, 2011, Awaji, Japan.

〔図書〕(計 2 件)

1. 齊藤 健吾、香川 亘、胡桃坂 仁志: 発がん防御に重要な相同組換えの分子機構、乳癌-基礎と臨床の架け橋-、最新医学社 76(13138)-88(13309) 2010 年