

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05161

研究課題名（和文）転写ユニティー機構を構築する多因子間相互作用の構造的解明

研究課題名（英文）Structural elucidation of the multi-subunit interactions that establish the transcriptional unity mechanism

研究代表者

仙石 徹 (SENGOKU, Toru)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：60576312

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 21,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒストンH2Bのリジンユビキチン化は、転写伸長とDNA修復を制御し、がん抑制に寄与する。本研究では、H2Bユビキチン化酵素Bre1複合体（Bre1A/RNF20とBre1B/RNF40）がヌクレオソームに結合した構造を解明した。2つのRINGドメインがヌクレオソームの酸性パッチとDNAに結合し、E2酵素とユビキチンを標的リジンの近くに導いていた。本構造と先行研究から、ヌクレオソームDNAの柔軟性がH2Bユビキチン化を制御する可能性が示された。変異体解析により、Bre1AがE2とユビキチンをリクルートすることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒストンの翻訳後修飾がゲノム機能を制御する仕組みの一端を解明した。この成果は細胞の運命決定機構やDNA修復機構の深い理解につながる。また、Bre1Aはがん抑制因子として知られており、本研究はH2Bユビキチン化の異常が関与するがんの発症機構の理解やその診断法・治療法開発に有用な情報を与える。

研究成果の概要（英文）：Lysine ubiquitination of histone H2B regulates transcription elongation and DNA repair, contributing to cancer suppression. In this study, we solved the cryo-EM structure of the H2B ubiquitination enzyme Bre1 complex (comprising Bre1A/RNF20 and Bre1B/RNF40) bound to the nucleosome. The two RING domains bind to the acidic patch of the nucleosome and DNA, directing the E2 enzyme and ubiquitin near the target lysine. This structure, along with previous studies, suggests that the flexibility of nucleosomal DNA may regulate H2B ubiquitination. Mutant analysis showed that the Bre1A subunit recruits E2 and ubiquitin for H2B ubiquitination.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 エピジェネティクス 転写 修復 ユビキチン化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒストンは様々な翻訳後修飾を受け、それによりゲノム機能が制御されている。それらのヒストン修飾の間には互いに機能制御を行うものも存在し(修飾間のクロストーク)、またヒストン修飾と様々なクロマチンイベント(転写・複製・修復)も互いに機能制御を行っている。ヒストン H2B は C 末端側のリジン残基(ヒトでは K120)でモノユビキチンを受ける(H2BK120ub)。H2BK120ub は転写伸長と複製を制御し、また下流のヒストン修飾である H3K4 と H3K79 のメチル化酵素を活性化する。ヒトでは互いに相同な 2 種類のタンパク質である Bre1A (別名 RNF20) と Bre1B (別名 RNF40) がヘテロ 2 量体を形成して H2BK120ub 導入の E3 酵素として働く。がん細胞においてしばしば Bre1A や H2BK120ub の細胞内レベル低下が観察され、H2BK120ub はがん抑制機能を持つと考えられている。Bre1 複合体がどのようにして H2BK120ub 特異的にユビキチン化を行うか、そしてその活性がどのように制御されているかは詳しく分かっていなかった。

2. 研究の目的

以下が研究目的である。

Bre1 複合体がどのようにしてヌクレオソームと結合し、H2BK120ub 特異的にユビキチン化を行うかを解明する。

Bre1 複合体の機能がどのように制御されているかを理解する。

3. 研究の方法

(1) サンプルの調製

Bre1A と Bre1B を昆虫細胞で共発現させアフィニティークロマトグラフィーで精製することで Bre1 複合体を得た。E1 酵素、Rad6A (E2 酵素)、ユビキチン、4 種類のコアヒストンはそれぞれ大腸菌で発現させて精製した。ヌクレオソーム DNA は PCR で増幅した後にイオン交換クロマトグラフィーで精製した。高塩濃度下でコアヒストンと DNA を混合した後に透析により塩濃度を低下させることでヌクレオソームを再構成した。

(2) 構造予測

プログラム AlphaFold2 を用いて全長 Bre1 複合体の予測構造を計算した。

(3) クライオ電子顕微鏡による構造解析

Bre1 複合体とヌクレオソームを 4:1 のモル比混合したサンプルを用いて構造解析を行った。東京大学のクライオ電子顕微鏡 Titan Krios G3i を測定に使い、プログラム CryoSPARC で密度の再構成と 3D Flex 解析を行った。モデル構築と精密化にはプログラム Coot と Phenix を用いた。

(4) 生化学的解析

E1 酵素、Rad6A、ユビキチン、Bre1 複合体、ヌクレオソームを ATP 存在下でインキュベートし、ユビキチン化 H2B に対する特異的抗体を用いたウェスタンブロットングにより反応産物を検出した。Bre1 変異体を用いるアッセイには、Bre1A と Bre1B の RING ドメインのみをコードし Rad6A と融合したキメラ発現系を用いた。

4. 研究成果

(1) 全体構造

Bre1 複合体がヌクレオソームに結合した構造を全体分解能約 2.8 Å で決定した(図 1)。Bre1A と Bre1B は共に約 1000 アミノ酸残基からなるが、密度マップにおいてはその C 末端側に存在する RING ドメインのみが観察され、それらの部分分解能は 3 - 6 Å 程度にとどまった。3D Flex 解析により部分分解能が向上し、約 4 Å 程度の密度マップを得ることができた。

二つの RING ドメインのうち一つはヌクレオソームの酸性パッチに結合し、保存されたアルギニン残基を介して酸性パッチ上の酸性残基とイオン性相互作用を形成していた。このような相互作用はこれまで解析されたヌクレオソーム結合因子においてしばしば観察されている。もう一つの RING ドメインはヌクレオソーム DNA の SHL6.0-6.5 領域のリ

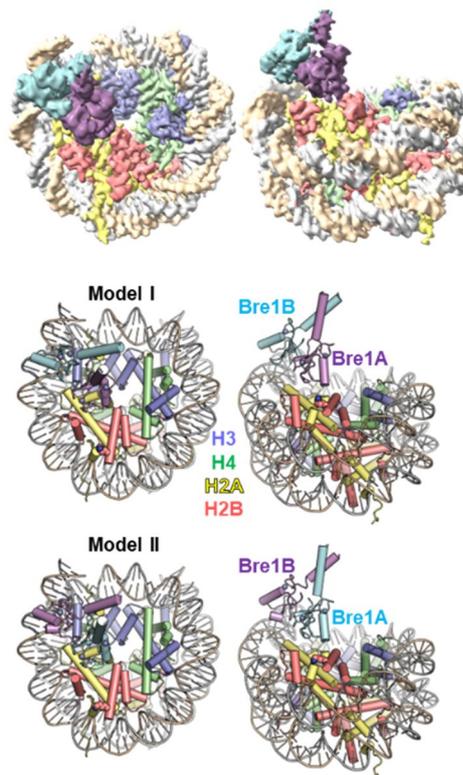


図 1 上: 複合体の密度マップ。
中・下: 原子モデルのリボン図。

酸基とやはりイオン性相互作用を形成していた。

Bre1A と Bre1B は RING ドメインにおいてアミノ酸配列が非常によく似ており、密度マップからどちらのサブユニットがどちらの密度に対応するかを断定することができなかった。そのため、ヘテロ二量体の配向が異なる 2 種類の原子モデル (Model I, Model II) を構築した。後述する変異体解析から、Bre1A が酸性パッチに結合した状態で E2 酵素とユビキチンをリクルートして H2BK120 ユビキチン化反応が進行すると考えられる。

(2) DNA 柔軟性による制御

先行研究から、ヌクレオソーム DNA の柔軟性を上げるヒストン修飾やヒストン変異は Bre1 複合体のユビキチン化活性を上昇させることが明らかになっていた。Bre1 複合体がヌクレオソーム DNA と直接結合している本構造はこの結果を説明し得る。今後は、このような制御機構が細胞内で働いているかどうかを解析する必要があるだろう。

(3) 変異体のユビキチン化活性解析

Bre1 サブユニット上のアミノ酸残基の重要性を調べるため、点変異体を作成してヌクレオソームのユビキチン化活性を解析した。酸性パッチやヌクレオソーム DNA とイオン性相互作用を形成する塩基性残基をアラニンに置換した変異体はどれもユビキチン化活性が低下し、これらの残基を介したヌクレオソーム相互作用が活性に必要であることが明らかになった。興味深いことに、Bre1A 上の塩基性残基の置換は活性をほとんど消失させるのに対し、Bre1B 上の置換が活性に与える影響は小さく、両ホモログが非対称の役割を担うことが示唆された。

Bre1A と Bre1B の RING ドメインにおけるアミノ酸残基は保存性が高いが、E2 酵素を結合すると予想される部分において Bre1A は 2 つのスレオニン残基を持ち (T948 と T952)、一方で Bre1B では応ずる残基が異なっていた (G974 と A978)。これらの残基の重要性を調べるため、Bre1A の T948 と T952 をそれぞれグリシンとアラニンに置換した (T948A-T952A) と、ユビキチン化活性はほとんど消失した。一方で、G974 と A978 の両者をスレオニンに置換した Bre1B を作成し T948A-T952 を持つ Bre1A とのヘテロ二量体を作成したところ、これはユビキチン化活性を回復した。これらの結果は、Bre1A の RING ドメインが T948 と T952 を含む領域で E2 酵素とユビキチンを結合することを示唆する。

(4) E2-ユビキチン複合体の仮想モデル

これまでの RING ドメインと E2 酵素、ユビキチンとの複合体構造をもとに、ヌクレオソーム-Bre1-E2-ユビキチン複合体の仮想モデル構造を構築した。この構造において、ユビキチンの C 末端でリジン残基とイソペプチド結合を形成する G76 はまさに H2BK120 の近傍に位置していた。すなわち、本構造は Bre1 が H2BK120 特異的ユビキチン化反応を行うためにヌクレオソームを認識した状態をとらえたものである。

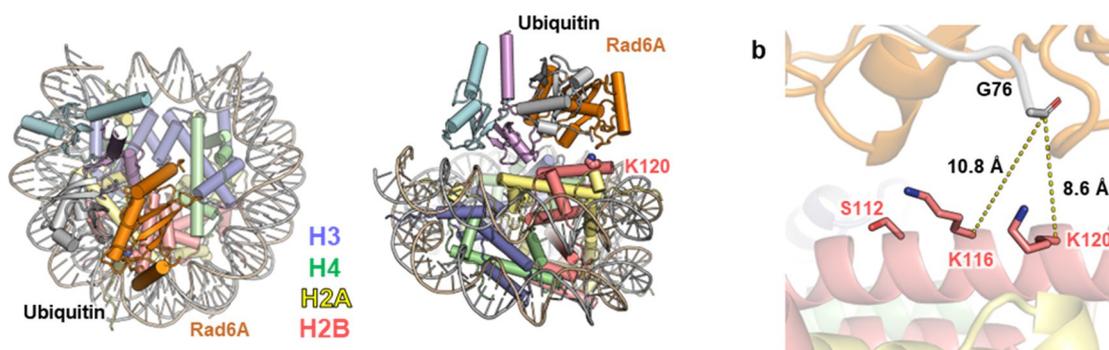


図 2 左: E2-ユビキチン複合体の仮想モデル。右: H2BK120 周辺の拡大図。

(5) 今後の展望

本研究により、Bre1 による H2BK120 特異的なユビキチン化に関する構造的知見を得ることができた。また、H2BK120 ユビキチン化が DNA の柔軟性によって制御される可能性が示唆された。細胞内では RNA polymerase II の転写と伴って H2BK120 ユビキチン化が導入されることが知られており、またこの転写はヌクレオソーム構造の一時的な変換を伴う。転写と H2BK120 の共役機構に関する詳細な研究は今後の課題である。

また、本研究では Bre1A と Bre1B が非対称な役割を持ち、Bre1A が E2 酵素を結合する触媒サブユニットであることが明らかになった。二つの Bre1 ホモログの機能の違いと細胞の正常な機能やがんなどの病的環境との相関は今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Onishi Shuhei, Uchiyama Kotone, Sato Ko, Okada Chikako, Kobayashi Shunsuke, Hamada Keisuke, Nishizawa Tomohiro, Nureki Osamu, Ogata Kazuhiro, Sengoku Toru | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Structure of the human Bre1 complex bound to the nucleosome | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 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/s41467-024-46910-8 | 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 Alexander A Vinogradov, Yue Zhang, Keisuke Hamada, Shunsuke Kobayashi, Kazuhiro Ogata, Toru Sengoku, Yuki Goto, Hiroaki Suga | 4. 巻 146 |
| 2. 論文標題 A Compact Reprogrammed Genetic Code for De Novo Discovery of Proteolytically Stable Thiopeptides. | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society | 6. 最初と最後の頁 8058-8070 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.3c12037 | 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 Yuchen Zhang, Keisuke Hamada, Masayuki Satake, Toru Sengoku, Yuki Goto, Hiroaki Suga | 4. 巻 145 |
| 2. 論文標題 Switching Prenyl Donor Specificities of Cyanobactin Prenyltransferases | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society | 6. 最初と最後の頁 23893-23898 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.3c07373 | 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 Ohori S, Miyauchi A, Osaka H, Lourenco CM, Arakaki N, Sengoku T, Ogata K, Honjo RS, Kim CA, Mitsuhashi S, Frith MC, Seyama R, Tsuchida N, Uchiyama Y, Koshimizu E, Hamanaka K, Misawa K, Miyatake S, Mizuguchi T, Saito K, Fujita A, Matsumoto N. | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Biallelic structural variations within <i>FGF12</i> detected by long-read sequencing in epilepsy | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Life Science Alliance | 6. 最初と最後の頁 e202302025 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202302025 | 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 該当する |

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Vinogradov Alexander A., Zhang Yue, Hamada Keisuke, Chang Jun Shi, Okada Chikako, Nishimura Hirota, Terasaka Naohiro, Goto Yuki, Ogata Kazuhiro, Sengoku Toru, Onaka Hiroyasu, Suga Hiroaki | 4. 巻 144 |
| 2. 論文標題 De Novo Discovery of Thiopeptide Pseudo-natural Products Acting as Potent and Selective TNIK Kinase Inhibitors | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society | 6. 最初と最後の頁 20332 ~ 20341 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c07937 | 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 Zhang Yuchen, Hamada Keisuke, Nguyen Dinh Thanh, Inoue Sumika, Satake Masayuki, Kobayashi Shunsuke, Okada Chikako, Ogata Kazuhiro, Okada Masahiro, Sengoku Toru, Goto Yuki, Suga Hiroaki | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 LimF is a versatile prenyltransferase for histidine-C-geranylation on diverse non-natural substrates | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Catalysis | 6. 最初と最後の頁 682 ~ 693 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41929-022-00822-2 | 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 Sengoku, Toru; Shiina, Masaaki; Suzuki, Kae; Hamada, Keisuke; Sato, Ko; Uchiyama, Akiko; Kobayashi, Shunsuke; Oguni, Asako; Itaya, Hayato; Kasahara, Kota; Moriwaki, Hiroto; Watanabe, Chiduru; Honma, Teruki; Okada, Chikako; Baba, Shihō; Ohta, Tsutomu; Motohashi, Hozumi; Yamamoto, Masayuki; Ogata, Kazuhiro | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Structural basis of transcription regulation by CNC family transcription factor, Nrf2 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Research | 6. 最初と最後の頁 12543-12557 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac1102 | 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 - |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 仙石徹 |
| 2. 発表標題 転写制御と環状ペプチドの構造生物学 |
| 3. 学会等名 第 51 回構造活性相関シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大西 修平, 内山 琴音, 佐藤 光, 岡田 千佳子, 小林 俊介, 濱田 恵輔, 西澤 知宏, 濡木 理, 緒方 一博, 仙石 徹 |
| 2. 発表標題 ヒトBre1複合体によるヌクレオソーム上H2BK120ユビキチン化の構造基盤 |
| 3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 野口慶介, 鬼澤理紗, 仙石 徹, 緒方一博, 鈴木秀文, 高橋秀尚 |
| 2. 発表標題 LECコンポーネントZC3H8による転写制御メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 野口慶介, 鬼澤理紗, 阿部竜太, 仙石 徹, 緒方一博, 池 陽子, 井野洋子, 木村弥生, 鈴木秀文, 高橋秀尚 |
| 2. 発表標題 LEC構成因子ZC3H8によるsnRNA遺伝の発現制御機構の解明 |
| 3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 寺内佑希, 鈴木秀文, 小川真太郎, 仙石 徹, 緒方一博, 高橋秀尚 |
| 2. 発表標題 LECコンポーネントICE2の機能解明 |
| 3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 仙石 徹 |
| 2. 発表標題 NSD2によるヌクレオソーム上H3 Lys36メチル化の構造基盤 |
| 3. 学会等名 日本エビジェネティクス研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 仙石 徹 |
| 2. 発表標題 NSD2/MMSETによるヌクレオソーム上H3K36メチル化とその制御の構造基盤 |
| 3. 学会等名 日本生化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大西 修平、内山 琴音、佐藤 光、岡田 千佳子、小林 俊介、西澤 知宏、濡木 理、緒方 一博、仙石 徹 |
| 2. 発表標題 ヌクレオソーム上H2Bモノユビキチン化の構造基盤 |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>転写因子Nrf2は他のbZIP型転写因子よりDNAに強く結合し、酸化ストレス応答やがん化に関わる https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2022/20221206sengoku.html</p> <p>がん抑制に重要な役割を果たす転写伸長マークが導入されるメカニズムを解明&#8212;がん発症メカニズム理解への手がかりに&#8212; https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2024/20240430sengoku.html</p> |
|--|

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 |
|---------|---------|