

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18473

研究課題名(和文)ヘテロクロマチンの基盤構造の構造生物学的解析

研究課題名(英文)The structural study of heterochromatin by cryo-EM

研究代表者

町田 晋一(Machida, Shinichi)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：50732195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は染色体機能の発現に重要なヘテロクロマチンの基盤構造を明らかにすることである。凝縮したクロマチン領域であるヘテロクロマチンは、遺伝子発現の抑制や染色体の機能発現に機能する。ヘテロクロマチンの基盤構造は、H3K9me3を含むクロマチンにHP1が結合することで形成されるが、HP1とクロマチンの結合様式は明らかになっていない。そこで本研究では、試験管内でH3K9me3を含むクロマチンとHP1との複合体を試験管内で再構成し、クライオ電子顕微鏡解析により、その立体構造を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Heterochromatin functions as an important component for gene silencing and genome maintenance by the formation of condensed chromatin structures. The methylation of histone H3 at lysine 9 (H3K9me3) and its recognition by HP1 represent heterochromatin formation. However, it is unclear how HP1 folds chromatin containing H3K9me3 into condensed chromatin. In this study, we reconstituted H3K9me3 chromatin complexed with human HP1, and determined the structure of H3K9me3 chromatin complexed with HP1 by cryogenic electron microscopy.

研究分野：構造生物学

キーワード：エピジェネティクス クロマチン ヒストン ヘテロクロマチン HP1 ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

我々の体の設計図であるゲノム DNA は、クロマチンと呼ばれる構造体を形成することで細胞核内に折り畳まれて収納されている。クロマチンの機能単位は 4 種のヒストン (H2A 及び H2B、H3、H4) と DNA との複合体であるヌクレオソームであり、ヒストンは様々な化学修飾を受けることで、クロマチンの折り畳みの様式を変化させる。クロマチンの折り畳みは、遺伝情報の読み取りなどの DNA 機能の発現に影響をおよぼす。特に凝集度の高いクロマチン領域は、ヘテロクロマチンと呼ばれ、遺伝子発現が抑制されている。ヘテロクロマチンの代表的なヒストンの化学修飾として、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのトリメチル化 (H3K9me3) が知られている。H3K9me3 はヘテロクロマチンの主要な構成要因である HP1 の集積に機能し、ヘテロクロマチンの基盤となる構造体の形成に働く。しかし、H3K9me3 を含むクロマチンと HP1 の結合様式は不明であり、ヘテロクロマチンの基盤構造は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子発現制御に重要なヘテロクロマチンの基盤構造を構造生物学的手法により明らかにすることである。ヘテロクロマチンの基盤構造は H3K9me3 を含むクロマチンに HP1 が結合した構造体である。しかし、HP1 がクロマチンに結合することで形成される高次のクロマチン構造は不明である。そこで本研究では、HP1 が結合したクロマチンを試験管内で再構成し、構造生物学的手法により、その立体構造を明らかにする。本研究により、ヘテロクロマチンの構造基盤が明らかになることで、ヘテロクロマチンにおける高次クロマチン構造を介した遺伝子発現制御機構の理解に重要な知見を与える。

3. 研究の方法

ヘテロクロマチンの基盤構造である H3K9me3 を含むクロマチンと HP1 の複合体の立体構造を明らかにするために、試験管内で H3K9me3 を含むクロマチンと HP1 の複合体を再構成し、クライオ電子顕微鏡解析を行った。H3K9me3 を含むヒストン H3 は、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基をシステイン残基に置換した変異体をリコンビナントタンパク質として精製し、システイン残基にメチル基を含むアルキル化剤を付加することで化学的に調製した。さらに、H3K9me3 を含むヒストン H3 と H4、H2A、H2B 及び DNA を用いて、2 つのヌクレオソームが連結されたダイヌクレオソームを再構成した。一方、ヒトの HP1 には 3 種類の HP1 アイソフォーム (HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ) が存在することが報告されている。本研究では、HP1 アイソフォームをリコンビナントタンパク質として精製し、HP1 α -ダイヌクレオソ

ーム複合体、HP1 β -ダイヌクレオソーム複合体および HP1 γ -ダイヌクレオソーム複合体の再構成を行った。具体的には、ショ糖密度勾配遠心法とグルタルアルデヒドによるタンパク質間架橋を組み合わせた GraFix 法により、H3K9me3 を含むダイヌクレオソームと HP1 との複合体を精製した。さらに、再構成した HP1 α -ダイヌクレオソーム複合体、HP1 β -ダイヌクレオソーム複合体および HP1 γ -ダイヌクレオソーム複合体をクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法によって解析した。

4. 研究成果

H3K9me3 を含むダイヌクレオソームと HP1 との複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡法によって解析するために、H3K9me3 を含むダイヌクレオソームと HP1 α との複合体の調製を行った。ショ糖密度勾配遠心法とグルタルアルデヒドによるタンパク質間架橋を組み合わせた GraFix 法により、複合体を安定かつ高純度に調製することに成功した。GraFix 法では、H3K9me3 依存的に HP1 α -ダイヌクレオソーム複合体が形成された。調製した H3K9me3 を含むダイヌクレオソームと HP1 α との複合体をクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法によって解析し、その立体構造を決定した。決定した立体構造から、HP1 α 二量体が 2 つのヌクレオソームをブリッジする形でクロマチンに結合していることが明らかになった。さらに、HP1 α は DNA に結合する活性を有していることが知られていたが、HP1 α は 2 つのヌクレオソームを連結するリンカー DNA とは相互作用していないことが明らかになった。また、HP1 は多くのヘテロクロマチン関連因子の集積に機能することが知られているが、HP1 α -ダイヌクレオソーム複合体はそれら因子と HP1 との結合を可能とする構造体であることが明らかになった。さらに、クライオ電子顕微鏡を用いたトモグラフィ法による解析も行い、一分子レベルでも HP1 α が 2 つのヌクレオソームを連結する形でクロマチンに結合していることが明らかになった。

次に、HP1 β -ダイヌクレオソーム複合体および HP1 γ -ダイヌクレオソーム複合体を GraFix 法により調製した。さらに、それら複合体をクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法によって解析し、その立体構造を決定した。その結果、HP1 β および HP1 γ は 2 つのヌクレオソームをブリッジする形でクロマチンに結合することが明らかになった。これらの立体構造から、HP1 -ダイヌクレオソーム複合体の構造的特徴は、HP1 アイソフォーム間で共通の特徴であることがわかった。決定した HP1-ダイヌクレオソーム複合体の立体構造から、複合体中のリンカー DNA が溶媒に露出していることが明らかになった。このことから、リンカー DNA を足場として

ヌクレオソームの再編成に機能するクロマチンリモデリング因子が HP1-ダイヌクレオソーム複合体中で機能することが可能であることが予想された。特に、ACF 複合体はヘテロクロマチンにおける DNA 複製に機能するクロマチンリモデリング因子として報告されている。そこで、HP1-ダイヌクレオソーム複合体中における ACF 複合体依存的なヌクレオソームの再編成を解析した。その結果、ACF 複合体は HP1-ダイヌクレオソーム複合体中のヌクレオソームをリモデリングすることが明らかになった。この結果から、HP1-ダイヌクレオソーム複合体はヌクレオソームの再編成が可能である構造であることが明らかになった。

ヘテロクロマチンは最も特徴的なクロマチンの領域であり、古くから顕微鏡により観察されていたが、その実体は不明であった。本研究により、ヘテロクロマチンの構造基盤である HP1-クロマチン複合体の立体構造が明らかになった。今後、決定した立体構造をもとに、ヘテロクロマチンにおける高次クロマチン構造を介した遺伝子発現制御機構の理解が進むと予想される。さらに、ヘテロクロマチンの破綻が染色体異常や腫瘍化リスクと関連することが報告されている。よって、ヘテロクロマチンの構造基盤の解明は新たながんの治療法の開発に重要な知見となると期待される。

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 10 件)

Takizawa Y, Tanaka H, Machida S, Koyama M, Maehara K, Ohkawa Y, Wade PA, Wolf M, Kurumizaka H. Cryo-EM structure of the nucleosome containing the ALB1 enhancer DNA sequence. *Open Biology*, Royal Society Publishing, 査読有, Vol.8, 170255 (2018), doi: 10.1098/rsob.170255

Machida S, Takizawa Y, Ishimaru M, Sugita Y, Sekine S, Nakayama JI, Wolf M, Kurumizaka H. Structural Basis of Heterochromatin Formation by Human HP1. *Molecular Cell*, Cell Press, 査読有, Vol.69, pp385-397 (2018), doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.011.

Kawaguchi T, Machida S, Kurumizaka H, Tagami H, Nakayama JI. Phosphorylation of CBX2 controls its nucleosome-binding specificity. *The journal of Biochemistry*, Oxford University Press, 査読有, Vol.162, pp343-355 (2017), doi: 10.1093/jb/mvx040.

Hatanaka Y, Tsusaka T, Shimizu N, Morita K, Suzuki T, Machida S, Satoh M, Honda A, Hirose M, Kamimura S, Ogonuki N, Nakamura T, Inoue K, Hosoi Y, Dohmae N, Nakano T, Kurumizaka H, Matsumoto K, Shinkai Y, Ogura A. Histone H3 Methylated at Arginine 17 Is Essential for Reprogramming the Paternal Genome in Zygotes. *Cell Reports*, Cell Press, 査読有, Vol.20, pp2756-2765. (2017), doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.088.

Kobayashi W, Hosoya N, Machida S, Miyagawa K, Kurumizaka H. SYCP3 regulates strand invasion activities of RAD51 and DMC1. *Genes to Cells*, Wiley-Blackwell, 査読有, Vol.22, pp799-809 (2017), doi: 10.1111/gtc.12513.

Kakumu E, Nakanishi S, Shiratori H, Kato, A, Kobayashi W, Machida S, Yasuda T, Adachi N, Saito N, Ikura, T, Kurumizaka H, Kimura H, Yokoi M, Sakai W, Sugasawa K. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: Regulation by acetylated states of histone H3. *Genes to Cells*, Wiley-Blackwell, 査読有, Vol.22, pp310-327 (2017), doi: 10.1111/gtc.12479.

Kujirai T, Machida S, Osakabe A, Kurumizaka H. Influence of polynucleosome preparation methods on sedimentation velocity analysis of chromatin. *The journal of Biochemistry*, Oxford University Press, 査読有, Vol.161, pp381-388 (2017), doi: 10.1093/jb/mvw081.

Ueda J, Harada A, Urahama T, Machida S, Maehara K, Hada M, Makino Y, Nogami J, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tanaka H, Tachiwana H, Yao T, Yamada M, Iwamoto T, Isotani A, Ikawa M, Tachibana T, Okada Y, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Yamagata K. Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Reports*. Cell Press, 査読有, Vol.18, pp593-600 (2017), doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.065.

Machida S, Sekine S, Nishiyama Y, Horikoshi N, Kurumizaka H. Structural and biochemical analyses of monoubiquitinated human histones H2B and H4. *Open Biology*, Royal Society Publishing, 査読有, Vol.6, 160090 (2016), doi: 10.1098/rsob.160090.

Kobayashi W, Takaku M, **Machida S**, Tachiwana H, Maehara K, Ohkawa Y, and Kurumizaka H. Chromatin architecture may dictate the target site for DMC1, but not for RAD51, during homologous pairing. Scientific Reports, Nature Publishing Group, 査読有, Vol. 6, Article number: 24228 (2016), doi:10.1038/srep24228

〔学会発表〕(計 4件)

町田 晋一、滝沢 由政、石丸 雅一、関根 慧、中山 潤一、Mattias Wolf、胡桃坂 仁志
ヘテロクロマチンの立体構造解析、第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都千代田区、2017 年 5 月

町田 晋一、滝沢 由政、石丸 雅一、関根 慧、中山 潤一、Mattias Wolf、胡桃坂 仁志
H3K9me3 を含むクロマチンと HP1 により形成されるヘテロクロマチンの解析、第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会、千葉県木更津市、2017 年 1 月

町田 晋一、井倉正枝、孫継英、小林航、堀越保則、福戸敦彦、田代聡、井倉毅、胡桃坂 仁志
リンカーヒストン H1 を含むクロマチンでの相同組換え反応、第 39 回日本分子生物学会年会、神奈川県横浜市、2016 年 11 月

Shinichi Machida, Motoki Takaku, Masae Ikura, Jiyang Sun, Wataru Kobayashi, Aiko Kinomura, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Yasunori Horikoshi, Atsuhiko Fukuto, Tsuyoshi Ikura, Satoshi Tashiro, Hitoshi Kurumizaka
The homologous pairing reaction in higher-ordered chromatin containing linker histone H1. Cold Spring Harbor Asia conference (DNA Metabolism, Genomic Stability and Human Disease)、China Suzhou、2016 年 6 月

〔図書〕(計 0件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)
該当なし

取得状況(計 0件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

町田 晋一 (Machida Shinichi)
早稲田大学・理工学術院・助教
研究者番号：50732195

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし