

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：82118

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06264

研究課題名(和文) 精製と結晶化が極めて困難な細胞機能継承因子CAF-I複合体の構造と機能の研究

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of chromatin assembly factor CAF-I

研究代表者

千田 俊哉 (Senda, Toshiya)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授

研究者番号：30272868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：CAF-I複合体の大量精製系の確立を達成し、クライオ電子顕微鏡での観察を行なった。その結果、CAF-I複合体がグリッド作製中に解離してしまうことが示唆された。続いて、架橋剤による安定化を試み、架橋+ゲル濾過の実験を行なったが、適切な条件を見出すことができなかった。ここで、CAF-IとヒストンH3/H4の解離定数がナノモラーオーダーであり、H3/H4の結合はCAF-Iを安定化することが期待されることから、両者を混ぜてゲル濾過カラムを通したところ、高純度のCAF-I-H3/H4複合体を得ることができた。現在、クライオ電顕による観察を進行中であるが、いまだ明瞭な粒子像は得られていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究計画が対象とするCAF-I複合体は、細胞が獲得した機能を維持する役割を果たす。ということは、CAF-I複合体の機能を阻害することができれば、細胞機能をリセットできる可能性がある。iPS細胞では、転写反応を制御することで細胞機能をリセットし、多能性幹細胞を創出しているが、CAF-I複合体の阻害は複製反応を制御することになる。本研究の目的が達成されれば、これまでとは全く異なる原理によって多能性幹細胞を創出できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：A large scale purification system of CAF-I complexes was established and the purified complexes were observed by cryo-EM. The results suggested that the CAF-I complexes disassembled during grid preparation. Subsequently, in order to stabilize the subunit interactions, cross-linking and gel filtration experiments were performed, but the appropriate conditions could not be found. Next, since the dissociation constants of CAF-I and histone H3/H4 are the nanomolar order, the H3/H4 is expected to stabilize CAF-I complex. Then, CAF-I-H3/H4 complexes were purified by gel filtration column. The cryo-EM experiments are in progress, but no clear particle image has been obtained yet.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 クロマチン 複製 複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々人類に代表される真核細胞生物の細胞機能は、ゲノム DNA に書き込まれた情報だけではなく、ヒストンタンパク質の翻訳後修飾パターンなどのエピジェネティック情報によって規定されている。ヒストンの翻訳後修飾パターンは、遺伝子発現制御を通して細胞機能を決定している。しかし細胞が分裂する際、ゲノム DNA は複製反応によって倍加するがヒストンは倍加しないため、新しく合成された新生ヒストンが取り込まれる。この結果、複製後のゲノム DNA では細胞分裂前のゲノム DNA 上にあった旧ヒストンと新生ヒストンが混在することになる。新旧ヒストンの翻訳後修飾パターンは異なるため、このままでは分裂直後の細胞のゲノム DNA 上ではヒストンの翻訳後修飾パターンが不揃いになってしまう。細胞機能維持には新旧ヒストンの翻訳後修飾パターンを揃える分子機構が必要だが、我々が注目する CAF-I 複合体は、この分子機構において中心的役割を果たす。この事実は、これまで iPS 細胞など転写反応経路で細胞機能をリセットする試みがなされてきたが、CAF-I 複合体の機能を阻害することにより複製反応経路で細胞機能をリセットできる可能性を示唆している。しかし CAF-I 複合体は 1989 年に単離されて以来、立体構造は未解明であり、新旧ヒストンの翻訳後修飾パターンを揃える分子機構の詳細も不明である。

2. 研究の目的

本応募研究課題では、複製反応経路の細胞機能のリセットを目指して、その中心因子である A. CAF-I 複合体の結晶構造を解析することを第一の目的とする。さらに可能であれば、B. CAF-I を含む超分子複合体の結晶構造解析を通して CAF-I の機能表面を明らかにして、細胞機能をリセットする CAF-I 変異体の作製を試みる。

3. 研究の方法

A. CAF-I 複合体(Cac1, 2, 3 という 3 種類のタンパク質から構成される三者複合体)について、これまでの実験から、大腸菌や昆虫細胞におけるリコンビナントタンパク質の発現は困難であることがわかっている。そこで出芽酵母の細胞内から内在性複合体の精製を試みた。これまでに 320 リットル培養菌体からの大量精製を繰り返して、応募者の施設の全自動微量結晶化ロボットを用いた結晶化スクリーニングを行い、既にいくつかの条件で結晶を見出している(下図中央)。これらの結晶の質を改善し、回折データの収集と結晶構造解析を行う。また、電子顕微鏡による負染色像観察でも良好な結果が得られており、既に試験的な単粒子構造も得られている。今度、共同研究によって電子顕微鏡による高分解能の単粒子解析も試みる。

B. CAF-I と相互作用因子(ヒストン H3/H4, CIA)との複合体について、相互作用因子(ヒストン H3/H4, CIA)については、既に大量精製法を確立している。また、GST プルダウン検定・ITC・BIA-CORE・熱シフト検定などを組み合わせて、相互作用が安定化する条件を探索しつつ、その結果を反映させて共結晶化を行う。

上記の研究が順調に進んで相互作用部位に関する情報が得られた場合は、点変異体と出芽酵母の点変異株を作製して試験管内と生体内での機能解析を行う。さらに、CAF-I のヒストン相互作用表面や CIA 相互作用表面について、出芽酵母 CAF-I の構造からヒト CAF-I の対応箇所を予測して結合する化合物を設計し、細胞の万能化や多能性幹細胞化を誘導できるかを検定する。

4. 研究成果

2017 年度は、目的として挙げた(A)の中で、特に CAF-I 複合体の精製に集中して研究を実施した。これまでに、培養スケールの拡大、精製に用いるレジンの検討、濃縮時の回収率向上の検討などを系統的に進めることで、CAF-I 複合体の大量精製法を確立してきた。本年度は、既に確立した方法で繰り返して精製を行い、結晶化スクリーニングを行った。現状では 320 リットル培養菌体から約 2mg/mL x 50 μ L・純度約 90%の精製標品が得られている。当研究室が開発した全自動微量結晶化ロボットを使用すれば、約 10 μ L で 96 条件の結晶化スクリーニングを行うことが可能で、既にいくつかの条件で CAF-I の結晶(約 1 μ m 程度)が得られている。同時に、クライオ電子顕微鏡単粒子解析に適した精製方法もほぼ確立しつつある。

2018 年度は、目的として挙げた(A)に対応して、CAF-I 複合体の大量精製系の確立を達成した。しかし、2018 年度前半、クライオ電子顕微鏡での観察を行なった結果、CAF-I 複合体がグリッド作製中に解離してしまうことが示唆され、なんらかの方法での安定化が必要なることがわかった。この結果を受けて、2018 年度後半は架橋剤による安定化を試み、架橋+ゲル濾過の実験を行なったが、適切な条件を見出すことができなかった。ここで、CAF-I 複合体の相互作用因子であるヒストン H3/H4 について、CAF-I と H3/H4 の解離定数はナノモラーオーダーであるため、H3/H4 の結合は CAF-I を安定化することが期待される。H3/H4 を共同研究先から分与してもらい、両者を混ぜてゲル濾過カラムを通したところ、高純度の CAF-I-H3/H4 複合体を得ることができた。

これまで、目的として挙げた(A)に対応して、CAF-I 複合体の大量精製の確立を達成し、クライオ電子顕微鏡での観察を行なった結果、CAF-I 複合体がグリッド作製中に解離してしまうことが示唆され、なんらかの方法での安定化が必要なのことがわかった。また、2018年度は架橋剤による安定化を試み、架橋+ゲル濾過の実験を行なったが、適切な条件を見出すことができなかった。これらの結果を受けて2019年度は、CAF-I 複合体の相互作用因子であるヒストン H3/H4 について、CAF-I と H3/H4 の解離定数がナノモラーオーダーであるため、H3/H4 の結合はCAF-I を安定化することが期待されることから、H3/H4 を共同研究先から分与してもらい、両者を混ぜてゲル濾過カラムを通したところ、高純度の CAF-I-H3/H4 複合体を得ることができた。現在、クライオ電顕による観察を進行中であるが、いまだ明瞭な粒子像は得られていない。

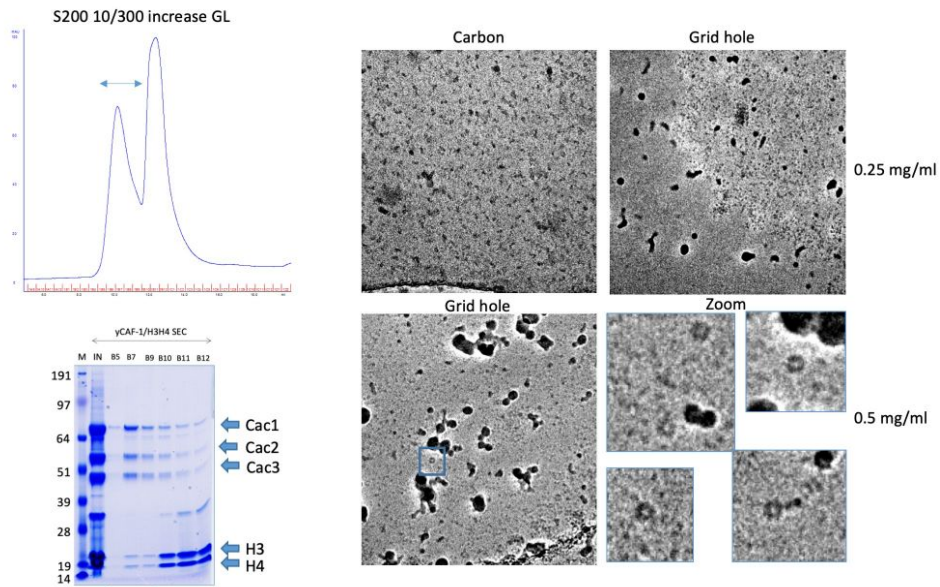


Fig. CAF-I 複合体のゲルろかカラムによる精製とクライオ電顕観察

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ray-Gallet D, Ricketts MD, Sato Y, Gupta K, Boyarchuk E, Senda T, Marmorstein R, Almouzni G.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Functional activity of the H3.3 histone chaperone complex HIRA requires trimerization of the HIRA subunit.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 3103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05581-y	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 Nakashima Y, Mitsuhashi T, Matsuda Y, Senda M, Sato H, Yamazaki M, Uchiyama M, Senda T, Abe I.	4. 巻 140(30)
2. 論文標題 Structural and Computational Bases for Dramatic Skeletal Rearrangement in Anditomin Biosynthesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Am Chem Soc.	6. 最初と最後の頁 9743-9750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.8b06084	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 Katsuyama Y, Sato Y, Sugai Y, Higashiyama Y, Senda M, Senda T, Ohnishi Y.	4. 巻 285(8)
2. 論文標題 Crystal structure of the nitrosuccinate lyase CreD in complex with fumarate provides insights into the catalytic mechanism for nitrous acid elimination.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 1540-1555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14429	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 Koentjoro MP, Adachi N, Senda M, Ogawa N, Senda T.	4. 巻 285(5)
2. 論文標題 Crystal structure of the DNA-binding domain of the LysR-type transcriptional regulator CbnR in complex with a DNA fragment of the recognition-binding site in the promoter region.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 977-989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14380	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 Nakashima Y, Mori T, Nakamura H, Awakawa T, Hoshino S, Senda M, Senda T, Abe I.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Structure function and engineering of multifunctional non-heme iron dependent oxygenases in fungal meroterpenoid biosynthesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-02371-w	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 Kawakami E, Adachi N, Senda T, Horikoshi M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Leading role of TBP in the Establishment of Complexity in Eukaryotic Transcription Initiation Systems.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 3941-3956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.12.034	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 Yuta Sato, Takashi Yabuki, Naruhiko Adachi, Toshio Moriya, Takatoshi Arakawa, Masato Kawasaki, Chihaya Yamada, Toshiya Senda, Shinya Fushinobu, Takayoshi Wakagi	4. 巻 -
2. 論文標題 Crystallographic and cryogenic electron microscopic structures and enzymatic characterization of sulfur oxygenase reductase from Sulfurisphaera tokodaii	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) https://doi.org/10.1101/2020.05.03.074773	査読の有無 無
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 Koiwai K, Inaba K, Morohashi K, Enya S, Arai R, Kojima H, Okabe T, Fujikawa Y, Inoue H, Yoshino R, Hirokawa T, Kato K, Fukuzawa K, Shimada-Niwa Y, Nakamura A, Yumoto F, Senda T, Niwa R.	4. 巻 -
2. 論文標題 An integrated approach to unravel a crucial structural property required for the function of the insect steroidogenic Halloween protein Noppera-bo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	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) 10.1074/jbc.RA119.011463	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 Hayashi T, Yasuda S, Suzuki K, Akiyama T, Kanehara K, Kojima K, Tanabe M, Kato R, Senda T, Sudo Y, Murata T, Kinoshita M.	4. 巻 124
2. 論文標題 How Does a Microbial Rhodopsin RxR Realize Its Exceptionally High Thermostability with the Proton-Pumping Function Being Retained?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Phys Chem B	6. 最初と最後の頁 990-1000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b10700	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 Kuwabara N, Imae R, Many H, Tanaka T, Mizuno M, Tsumoto H, Kanagawa M, Kobayashi K, Toda T, Senda T, Endo T, Kato R.	4. 巻 11
2. 論文標題 Crystal structures of fukutin-related protein (FKRP), a ribitol-phosphate transferase related to muscular dystrophy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-14220-z	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18件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 千田俊哉
2. 発表標題 Structural Biology Research Center.
3. 学会等名 千葉大-KEK第1回合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千田俊哉
2. 発表標題 Study of GTP sensor -importance of interdisciplinay collaboration.
3. 学会等名 International Symposium of Quantum Beam Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千田俊哉
2. 発表標題 創薬等先端技術支援基盤プラットフォームにおけるクライオ 電子顕微鏡のネットワーク化と利用について
3. 学会等名 Study of GTP sensor importance of interdisciplinay collaboration (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤優花里、千田俊哉
2. 発表標題 ヒストンシャペロンHIRA の構造機能相関
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naruhiko Adachi, Eiryo Kawakami, Toshiya Senda, Masami Horikoshi
2. 発表標題 Leading role of TBP in the establishment of complexity in eukaryotic transcription initiation systems.
3. 学会等名 The 18th Annual meeting of PSSJ (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiya Senda
2. 発表標題 Structure-based integrated approach for analysis of the GTP metabolism.
3. 学会等名 American Crystallographic Association (ACA) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naruhiko Adachi, Eiryo Kawakami, Toshiya Senda, Masami Horikoshi
2. 発表標題 Leading role of TBP in the establishment of complexity in eukaryotic transcription initiation systems
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Epigenetics & Chromatin (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安達成彦, 川崎政人, 小祝孝太郎, 湯本史明, 守屋俊夫, 篠田晃, 山田悠介, 千田俊哉
2. 発表標題 KEKクライオ電顕の立ち上げと単粒子解析
3. 学会等名 生理研研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安達成彦, 千田俊哉
2. 発表標題 マルチサブユニット複合体の研究とKEKクライオ電子顕微鏡の現状
3. 学会等名 蛋白研セミナー (第1回構造生命科学研究会) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naruhiko Adachi, Kyohei Aizawa, Yuka Kratzer, Shinya Saijo, Nobutaka Shimizu, Toshiya Senda
2. 発表標題 Improved method for soluble expression and rapid purification of yeast TFIIA
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Lab meeting, MECHANISMS OF EUKARYOTIC TRANSCRIPTION (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡: 気になっていること・困っていること@KEK
3. 学会等名 日本顕微鏡学会・第75回学術講演会(口頭発表) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 Structure analysis of transcription related complexes and installation of cryo-EM in KEK
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会(口頭発表) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡で生体分子の形を明らかにする
3. 学会等名 KEK公開講座「生物学におけるクライオ電子顕微鏡」(口頭発表) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naruhiko Adachi, Masato Kawasaki, Toshio Moriya, Fumiaki Yumoto, Kotaro Koiwai, Akira Shinoda, Yusuke Yamada, Toshiya Senda
2. 発表標題 Structure analysis of transcription related complexes and installation of cryo-EM in KEK
3. 学会等名 The 2019 American Crystallographic Association Annual Meeting(ポスター発表) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 単粒子解析の原理と実際:KEKにおける共同利用型クライオ電子顕微鏡の立ち上げを例として
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会(口頭発表)(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naruhiko Adachi, Masato Kawasaki, Toshio Moriya, Fumiaki Yumoto, Kotaro Koiwai, Akira Shinoda, Yusuke Yamada, Toshiya Senda
2. 発表標題 Structure analysis of transcription related complexes and installation of cryo-EM in KEK
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory meeting, Mechanisms of eukaryotic transcription(ポスター発表)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千田俊哉・安達成彦・川崎政人・守屋俊夫・山田悠介・篠田晃・小祝孝太郎
2. 発表標題 KEKクライオ電顕の現状
3. 学会等名 生理研研究会「クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の高分解能単粒子構造解析」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千田俊哉・安達成彦・川崎政人・守屋俊夫・山田悠介・篠田晃・小祝孝太郎
2. 発表標題 KEKにおけるクライオ電顕施設の紹介
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会(口頭発表)(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 安達成彦、千田俊哉	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学増刊・イメージング時代の構造生命科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・構造生物学研究センター
<https://www2.kek.jp/imss/sbrc/>

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
---------------------------	-----------------------	----