

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06064

研究課題名(和文) ヒストンシャペロンFACTによるヌクレオソーム再構築機構の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for nucleosome reconstitution mechanism by FACT

研究代表者

津中 康央(津中康央)(Tsunaka, Yasuo)

大阪大学・大学院工学研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：40551552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：FACTのリン酸化天然変性領域(pAID)とDNAがはがれたヌクレオソームの複合体の立体構造を電子顕微鏡単粒子解析により決定した。この構造でFACTのpAIDがヌクレオソームのDNAがはがれたヒストン表面に結合しており、FACTがヌクレオソームからのヒストン除去を防ぎ、エピジェネティックな細胞記憶を維持していることが示唆された。さらに、このFACTのpAIDとヌクレオソームの複合体のNMR解析から電子顕微鏡構造では見えなかったヒストンテイルの動的構造が明らかとなった。その結果、FACTはヌクレオソーム構造を維持しながら、ヒストンH3テイルをDNAの束縛から解放することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電子顕微鏡構造の研究成果は、転写や複製などによるクロマチン構造変化で一時的にヌクレオソームDNAがヒストンからはがれても、FACTがその機能を補う事で、ヌクレオソーム構造を維持し、ヒストンのエピジェネティックな記憶を保持していることを示唆した。NMR解析の研究成果は、FACTはヌクレオソームと結合することでヒストンH3テイルをDNAから解放することが明らかとなった。これらの研究成果は、クロマチン構造変化を理解する上でこれまで想像もつかなかった新たな観点を与え、クロマチン構造変化やエピジェネティクス制御を研究する研究者に大きなインパクトを与えた。

研究成果の概要(英文)：I determined cryo-EM structures of 112-bp nucleosome complexed with the FACT-pAID (phosphorylated acidic intrinsically disordered) region. The structure discovered extensive contacts between the pAID region and histones H2A, H2B, and H3, suggesting that FACT is competent to direct functional replacement of a nucleosomal DNA end by pAID. Using NMR, I also clarified that the histone H3 N-terminal tails, unobserved in the cryo-EM structure, adopt two different conformations: one corresponds to the original nucleosome site buried in two DNA gyres, whereas the other, comprising pAID and DNA, is more exposed to the solvent. These findings highlight that accessible conformations of H3 tails are created by the replacement of nucleosomal DNA with pAID of FACT.

研究分野：構造生物学

キーワード：FACT クロマチンリモデリング 構造生物学 ヌクレオソーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高等真核生物は、様々な因子が遺伝子発現のプロファイルを厳密に制御する事で、一つの受精卵から各器官や組織などの多様な細胞に分化していく。この細胞記憶とも言える生命現象の本質は、ヒストンや DNA の化学修飾を基本媒体として、それに特異的に結合する因子によって安定に形成、維持される階層的クロマチン構造の反映であるといえるだろう。事実、遺伝子の転写、複製、修復、組換えなどの制御機構は、クロマチンの動的構造変化に依存している。さらに、クロマチン構造の動的変化は、細胞の癌化、老化、染色体異常にも関わり、iPS、ES 細胞作成など再生医療や抗癌剤などの創薬研究においても重要な意味をもつ。従って、この過程で中心的役割を果たす ATP 依存的クロマチンリモデリング因子やヒストンシャペロンなどが階層的クロマチン構造をいかに巧妙に変化させて、遺伝子の働きを調節しているのか、その分子機構を理解する事が急務である。しかし、クロマチンを対象とした研究開始当初で報告された研究のほとんどが“何が(What)”クロマチン構造変換を制御しているのかを探索することを目標としており、これらの制御因子が“どのようにして(How)”クロマチン構造を変換しているのかという分子構造基盤の研究が置き去りにされていた。その結果、細胞の癌化や染色体異常などを引き起こすヒストン修飾などのエピジェネティックマーカーやクロマチン構造の制御因子は多数発見されたが、それらの因子によって引き起こされるクロマチン構造変化は、その道筋さえも分子レベルではほとんど解明されていなかった。

### 2. 研究の目的

真核生物では、遺伝子の転写、複製、修復、組換えなどの制御機構はクロマチンの動的構造変化に依存して行われる。事実、クロマチン構造の動的変化は、細胞の染色体異常、分化、癌化、老化に関わり、iPS、ES 細胞作成など再生医療や抗癌剤などの開発においても重要な意味をもつ。それゆえ、この過程で中心的役割を果たす因子がクロマチン構造をいかに巧妙に変化させているのか、その分子機構を解明する事が緊急の課題である。そこで、本研究ではヒストンシャペロン FACT によるヌクレオソーム再構築の分子機構の全容を時系列に沿って整理し、立体構造の観点から明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

FACT のヌクレオソーム再構築活性をしらべるために、Supercoiling assay を用いた。Supercoiling assay とは閉環状プラスミドとヒストンを用いて、DNA 上にヌクレオソームが 1 つ作られたとき、ネガティブなスーパーコイルが 1 つ入ることを利用した検定法である。まず、この Supercoiling assay を用いて、FACT の機能ドメインを欠失した各種変異体のヌクレオソーム再構築活性の測定を行う。これにより、ヌクレオソーム再構築に必要な FACT 機能ドメインを同定する。さらに同定された FACT 機能ドメインとヒストン H2A-H2B 二量体、H3-H4 四量体、ヌクレオソームとの相互作用をゲルシフトアッセイにより解析する。また、完全なヌクレオソームだけでなく、反応中間体であるテトラソーム (H3-H4 四量体と DNA の複合体)、ヘキサソーム (H3-H4 四量体と H2A-H2B 二量体からなるヒストン六量体と DNA の複合体)、DNA が一部はがれたヌクレオソーム、DSB が導入されたヌクレオソームなども調製可能であり、これらと FACT の相互作用もゲルシフトアッセイで解析する。これらの解析により、安定で、均一な複合体を形成したものについては、X 線結晶構造解析、電子顕微鏡観察を行う。電子顕微鏡については単粒子解析を行って得られた電子密度マップに、各ドメインの X 線構造原子モデルを当てはめることで、複合体の詳細な立体構造モデルを構築することが可能である。さらに、核磁気共鳴 (NMR) を用いることで、電子顕微鏡構造で可視化できないヒストンテイルの動的挙動を解析する。

### 4. 研究成果

FACT のヌクレオソーム再構築活性をしらべるために、Supercoiling assay を用いた。まず、この Supercoiling assay を用いて、FACT の機能ドメインを欠失した各種変異体のヌクレオソーム再構築活性の測定を行った。これにより、ヌクレオソーム再構築に必要な FACT 機能ドメインをおおよそ推定することができた。

同定された FACT 機能ドメインとヒストン H2A-H2B 二量体、H3-H4 四量体、ヌクレオソームとの相互作用をゲルシフトアッセイで解析した。さらに、完全なヌクレオソームだけでなく、反応中間体である DNA が一部はがれたヌクレオソームを調整し、これらと FACT の相互作用も同様に解析した。安定で、均一な複合体を形成したものについては、X 線結晶構造解析、電子顕微鏡観察を行った。その結果、FACT のリン酸化された酸性の天然変性領域 (pAID) と DNA が一部はがれたヌクレオソームの複合体の立体構造を電子顕微鏡単粒子解析により高分解能で決定した (図 1)。この構造で FACT の pAID がヌクレオソームの DNA が部分的にはがれたヒストン表面に結合しており、FACT がヌクレオソームからのヒストン除去を防ぎ、エピジェネティックな細胞記憶を維持していることが示唆された。これらの研究成果は科学雑誌に掲載された。

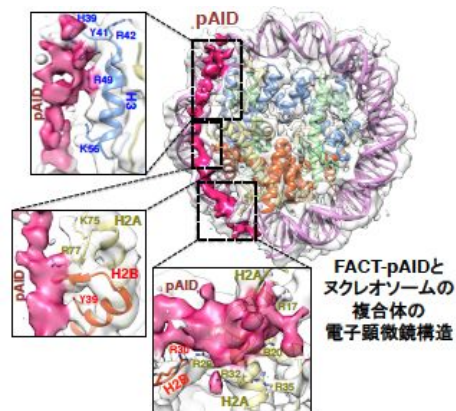


図 1.pAID とヒストンの結合部位

当初の研究計画にはなかったが、電子顕微鏡解析で立体構造を決定した FACT の pAID とヌクレオソームの複合体の NMR 解析を行った。その結果、複合体の電子顕微鏡構造では見えなかったヒストンテイルの動的構造が明らかとなった。具体的には、pAID が結合している側のヒストン H3 テイルは動的に揺動しながら、より溶液中に露出しており、ヒストン修飾酵素などの影響を受けやすいのに対して、ヌクレオソームの H3 テイルはヌクレオソームの二本の DNA に囲まれた構造スペースにその相互作用により拘束されていて、ヒストン修飾酵素のアクセスを強く阻害することがわかった (図 2)。つまり、FACT は DNA の代わりにヒストンのコア構造と結合することでヌクレオソーム構造を維持しながら、ヒストン H3 テイルを DNA の束縛から解放することが明らかとなった。この結果は、クロマチン構造変化を理解する上でこれまで想像もつかなかった 新たな視点を与え、エピジェネティクス制御を研究する研究者に大きなインパクトを与えた。この結果を取りまとめ、研究成果として学会にて発表を行った。さらに、本研究成果は科学雑誌に掲載された。

さらに NMR 解析と生化学的解析を用いて、FACT によるヌクレオソーム再構成に重要な機能を果たすヒストン H2A, H2B の領域を新たに特定した。この新たな知見についても学术论文として発表し、学術雑誌に掲載された。

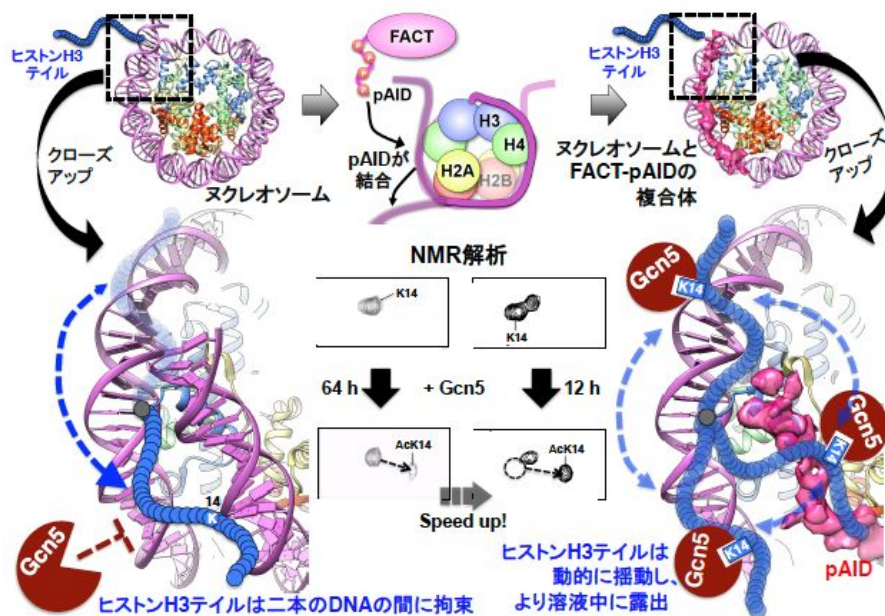


図 2. NMR 解析で明らかとなった FACT によるヒストン H3 テイルの動的挙動変化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsunaka Yasuo, Ohtomo Hideaki, Morikawa Kosuke, Nishimura Yoshifumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Partial Replacement of Nucleosomal DNA with Human FACT Induces Dynamic Exposure and Acetylation of Histone H3 N-Terminal Tails	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101641 ~ 101641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101641	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 Kouta Mayanagi, Kazumi Saikusa, Naoyuki Miyazaki, Satoko Akashi, Kenji Iwasaki, Yoshifumi Nishimura, Kosuke Morikawa, Yasuo Tsunaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural visualization of key steps in nucleosome reorganization by human FACT	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46617-7	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 Tsunaka Yasuo, Ohtomo Hideaki, Nishimura Yoshifumi	4. 巻 5
2. 論文標題 FACT modulates the conformations of histone H2A and H2B N-terminal tails within nucleosomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03785-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 -
1. 著者名 Okuda Masahiko, Tsunaka Yasuo, Nishimura Yoshifumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Dynamic structures of intrinsically disordered proteins related to the general transcription factor TFIIH, nucleosomes, and histone chaperones	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 1449 ~ 1472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-022-01014-9	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 Tsunaka Yasuo, Furukawa Ayako, Nishimura Yoshifumi	4. 巻 75
2. 論文標題 Histone tail network and modulation in a nucleosome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 102436 ~ 102436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sbi.2022.102436	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 津中 康央, 大友 秀明, 森川 耿右, 西村 善文
2. 発表標題 クライオ電顕構造とNMR解析を組み合わせてFACTを介したヒストンテイルの動的構造変化にせまる
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津中 康央, 大友 秀明, 森川 耿右, 西村 善文
2. 発表標題 FACTを介したヒストンH2A、H2Bテイルの動的構造変化の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津中 康央
2. 発表標題 FACT蛋白質はヌクレオソームの動的構造変化を誘導し、そのアクセスビリティを制御する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津中 康央, 大友 秀明, 森川 耿右, 西村 善文
2. 発表標題 相関構造生物学によるFACTを介したヒストンH3テイルの動的構造変化の解明
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津中康央, 大友秀明, 森川耿右, 西村善文
2. 発表標題 FACT-ヌクレオソーム複合体の電顕構造では可視化できないヒストンテイルの動的挙動をNMRで明らかにする
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津中康央, 大友秀明, 森川耿右, 西村善文
2. 発表標題 FACTによるクロマチンリモデリングで鍵となるヒストンH3テイルの動的挙動
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津中 康央, 真柳 浩太, 七種 和美, 宮崎 直幸, 明石 知子, 岩崎 憲治, 西村 善文, 森川 耿右
2. 発表標題 FACTを介したクロマチンリモデリング機構のスナップショットを立体構造で可視化する
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津中 康央, 真柳 浩太, 七種 和美, 宮崎 直幸, 明石 知子, 岩崎 憲治, 西村 善文, 森川 耿右
2. 発表標題 電子顕微鏡構造からFACTを介したクロマチンリモデリングの分子機構にせまる
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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津中 康央, 真柳 浩太, 七種 和美, 宮崎 直幸, 明石 知子, 岩崎 憲治, 西村 善文, 森川 耿右
2. 発表標題 FACTによって引き起こされるヘキサゾーム構造の電子顕微鏡解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津中 康央, 真柳 浩太, 七種 和美, 宮崎 直幸, 明石 知子, 岩崎 憲治, 西村 善文, 森川 耿右
2. 発表標題 ヌクレオソーム構造変換におけるFACT酸性天然変性領域の新たな分子機能
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ヒストンテイルの動的構造変化を解明  
<https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2020/201022nishimurayoshihumi.html>

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