

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14677

研究課題名（和文）パイオニア転写因子Oct4による標的ヌクレオソーム構造特異的認識メカニズム

研究課題名（英文）Mechanism how the pioneer transcription factor Oct4 binds its target nucleosome

研究代表者

小山 昌子（Koyama, Masako）

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：40755097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Oct4が標的ヌクレオソームに結合する機構を解明するため、Oct4と標的ヌクレオソームを用いた生化学的解析を行った。変異体解析とヌクレオソームポジショニング解析から、Oct4はヌクレオソームのentry/exit部位に存在する標的配列に優先的に結合することが明らかになった。また、クロスリンク質量分析から、Oct4はヌクレオソーム中のヒストンH3のN末端と相互作用することが示唆され、Oct4がヌクレオソームのentry/exit部位に結合することを支持する結果を得た。さらに、リンカーヒストンH1がOct4と競合して、Oct4をヌクレオソームから解離させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パイオニア転写因子Oct4は、細胞の初期化（iPS細胞の作製）において中心的な役割を担うことが知られている。細胞初期化については、近年、細胞生物学的解析やゲノム解析などが精力的に行われ、関与する因子の同定が進んでいるものの、それらの作用機序については未解明な点が多く残されている。本研究では、細胞初期化における最も初期のイベントである「Oct4による標的ヌクレオソーム認識機構」に着目し、その一端を解明することができた。本研究成果は、発生生物学やエピジェネティクスなどの基礎研究分野に対してインパクトを与えるだけでなく、将来的にはiPS細胞を利用した再生医療の発展にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, to understand the mechanism how the pioneer transcription factor Oct4 binds to its target nucleosome, we reconstituted the target nucleosome containing native Oct4 target DNA sequence in vitro, and performed biochemical analyses. A mutational analysis and nucleosome positioning assay revealed that Oct4 preferentially binds its target motif located near the entry/exit site of the nucleosome. Consistently, the crosslinking mass spectrometry of the Oct4-nucleosome complex showed that Oct4 binds the nucleosome near the histone H3 N-terminal region, which is close to the entry/exit site of the nucleosome. Moreover, we also found that the linker histone H1 competes with Oct4 for the nucleosome binding, and dissociates Oct4 from the nucleosome.

研究分野：生化学、構造生物学

キーワード：Oct4 パイオニア転写因子 ヌクレオソーム クロマチン ヒストン リンカーヒストン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞において、生命情報を担うゲノム DNA はヒストンタンパク質に結合してクロマチンを形成し、核内に収納されている。クロマチンの基本構造単位は、4 種類のコアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) 二分子ずつからなるヒストン八量体に約 150 塩基対の DNA が巻き付いた、ヌクレオソームと呼ばれる構造体である [1]。細胞核内において、ヌクレオソームはリンカー DNA を介して数珠状に連なっており、リンカーヒストンがヌクレオソームとリンカー DNA に結合することで、クロマチンはさらに高密度に折りたたまれている。転写因子は、ゲノム上の遺伝子発現調節領域に存在する標的塩基配列に結合して標的遺伝子の転写を調節するが、多くの転写因子はヌクレオソーム構造中に存在する DNA には結合できない。しかし、「パイオニア転写因子」と総称される一部の特殊な転写因子群は、ヌクレオソーム構造の中にある標的塩基配列に結合できる [2]。

Oct4 は、代表的なパイオニア転写因子として知られており、受精卵などの未分化細胞において高発現している。終末分化した細胞のゲノムでは、未分化性の維持に重要な遺伝子群の発現調節領域がヌクレオソーム構造を形成して転写因子の結合を阻害しており、それら遺伝子群の発現が抑制されている。人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、終末分化した細胞に、Oct4 をはじめとする 4 種類の転写因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) を強制発現させることにより、細胞に未分化性を獲得させることで作製される [3]。なかでも、Oct4 は細胞初期化の最も初期の段階において機能すると考えられている。しかしながら、Oct4 が標的ヌクレオソームに結合するメカニズムの詳細については未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、パイオニア転写因子 Oct4 がヌクレオソーム構造中の標的塩基配列に結合するメカニズムを、生化学的・構造生物学的アプローチにより解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト由来の Oct4 を、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質として発現させ、高純度に精製した。Oct4 の標的ヌクレオソームの作製には、Oct4 の標的遺伝子として知られる *LIN28B* 遺伝子のエンハンサー領域のなかで、細胞初期化誘導因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) が集積することで知られる 162 塩基対の領域のゲノム DNA 配列を用いた [4]。この DNA 断片と 4 種類のコアヒストンを用いて、Oct4 の標的ヌクレオソームを塩透析法により試験管内再構成し、高純度に精製した。精製した Oct4 と標的ヌクレオソームを用いて、以下の生化学的・構造生物学的解析を行った。

- (1) クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、標的ヌクレオソームの立体構造を決定した。
- (2) 標的ヌクレオソームの Oct4 標的配列に変異を入れた変異体ヌクレオソームを作製し、変異体ヌクレオソームに対する Oct4 の結合能をゲルシフト法により解析した。
- (3) 標的ヌクレオソームのポジショニングを、ケミカルマッピング法によって決定した。
- (4) Oct4-ヌクレオソーム複合体における Oct4 の結合部位を同定するため、Oct4-標的ヌクレオソーム複合体のクロスリンク質量分析を行った。
- (5) リンカーヒストン H1 をリコンビナントタンパク質として発現精製し、ゲルシフト法により Oct4 と H1 の標的ヌクレオソームに対する競合実験を行った。

4. 研究成果

(1) 精製した標的ヌクレオソームの立体構造を、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析により決定し、ヒストン八量体の周囲に DNA が巻き付いたヌクレオソーム構造をとっていることを確認した。

(2) 標的ヌクレオソームの作製に使用した DNA 断片の中には、Oct4 の標的配列として推測される配列が 3 個存在する。Oct4 がこれらのうちのどの標的配列に結合するのかを調べるために、3 個の標的配列のそれぞれに変異を入れた 3 種類の変異体 DNA を作製し、それぞれの DNA を用いて変異体ヌクレオソームを再構成した。これらの変異体ヌクレオソームに対する Oct4 の結合能を、ゲルシフト解析により調べた。その結果、Oct4 はヌクレオソーム中に存在する特定の 1 個の標的配列に優先的に結合することが明らかになった。

(3) 標的ヌクレオソームのポジショニング解析を行い、(2)の結果と合わせることで、Oct4 はヌクレオソームの entry/exit 部位に存在する標的配列にとくに効率的に結合することが示唆された。

(4) ヌクレオソーム中における Oct4 の結合位置をさらに解析するために、Oct4-標的ヌクレオソーム複合体のクロスリンク質量分析を行った。その結果、Oct4 はヌクレオソーム中のヒストン H3 の N 末端領域と相互作用することが示唆された。ヌクレオソーム構造中においてヒストン H3 の N 末端は entry/exit 部位の近傍に位置することから、クロスリンク質量分析で得られた結果は、Oct4 がヌクレオソームの entry/exit 部位に結合することを支持するものであった。

(5) リンカーヒストンは、ヌクレオソームの entry/exit 部位に結合してクロマチンの高次構造を形成する。そのため、Oct4 とリンカーヒストンがヌクレオソーム結合において競合するのではないかと考えた。これを検証するために、リコンビナントタンパク質として発現精製したリンカーヒストン H1 を用いて、ゲルシフト解析により、Oct4 と H1 の競合実験を行った。その結果、確かに Oct4 と H1 はヌクレオソーム結合において競合し、H1 が Oct4 をヌクレオソームから解離させることを明らかにした。

参考文献

- [1] Koyama, M. & Kurumizaka, H., J. Biochem. **163**; 85-95 (2018).
- [2] Iwafuchi-Doi & Zaret, Genes Dev. **28**; 2679-2692 (2014).
- [3] Takahashi *et al.*, Cell **131**; 861-872 (2007).
- [4] Soufi *et al.*, Cell **161**; 555-568 (2015).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka H., Sato S., Koyama M., Kujirai T., Kurumizaka H.	4. 巻 167
2. 論文標題 Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A.J.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 419-427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz109 Abstract	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島林秀伎
2. 発表標題 パイオニア転写因子Oct4が標的ヌクレオソームに結合する機構の解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山昌子
2. 発表標題 パイオニア転写因子による標的ヌクレオソームの認識と作用
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 小山昌子、胡桃坂仁志（日本科学者会議 編集）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 本の泉社	5. 総ページ数 64
3. 書名 日本の科学者（担当：遺伝子のはたらきを制御するヒストン）	

1. 著者名 胡桃坂仁志、小山昌子（平野達也・胡桃坂仁志 編集）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 214
3. 書名 実験医学増刊「教科書を書き換える！染色体の新常識」（担当：ヒストンとヌクレオソームによるゲノム機能制御）	

1. 著者名 小山昌子（胡桃坂仁志・有村泰宏 編集）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 186
3. 書名 あなたのタンパク質精製、大丈夫ですか？～貴重なサンプルをロスしないための達人の技（実験医学別冊）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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