

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06609

研究課題名(和文) ヒストンメチル基転移酵素SUV39H1を含むヘテロクロマチン様複合体の構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of the SUV39H1-chromatin complex

研究代表者

佐藤 祥子 (Sato, Shoko)

東京大学・定量生命科学研究所・特任助教

研究者番号：90624966

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)：真核生物のゲノムDNAは、ヌクレオソームを基本単位としてクロマチンを形成し、構造的・機能的に異なる区画を形成して遺伝子発現やゲノムの安定性を制御している。本研究では、構成的ヘテロクロマチンのエピジェネティックマークの書き込み因子であるSUV39H1と、読み取り因子であるヘテロクロマチンタンパク質HP1、およびヌクレオソームとで形成される複合体の立体構造を解析することにより、ヘテロクロマチン形成の機構を明らかにすることを目的とした。本研究では、HP1-クロマチン複合体の電子線トモグラフィー像を得ることに成功した。また、クライオ電子顕微鏡解析の高度化の過程で、新規ヌクレオソーム構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

構成的ヘテロクロマチンは、その領域からの転写やDNA組換えを抑制することによりゲノムの安定性に寄与すると考えられている領域であり、その破綻は癌などの疾患に繋がる。本研究で行ったHP1-クロマチン複合体の構造解析は、ヘテロクロマチン領域の形成と維持の機構解明のための基盤情報となるものである。また、クライオ電子顕微鏡解析技術の高度化の過程で得られた新規構造のうち、ヒト病原性寄生虫であるジアルジアのヌクレオソーム構造は、創薬の基盤情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotes, the genomic DNA forms chromatin, which regulates the genomic function, such as gene expression and recombination. Nucleosome is a fundamental unit of the chromatin, in which DNA wrapped around the histone octamer containing two molecules each of four histone proteins, H2A, H2B, H3 and H4. Constitutive heterochromatin is marked with the post-translational histone modification, histone H3 Lysine 9 di- or tri- methylation (H3K9me2/3). The H3K9me2/3 in constitutive heterochromatin is written by the histone-methyltransferase family, SUV39H1 or SUV39H2, and bound with heterochromatin protein 1 (HP1) forming the fundamental structure of heterochromatin. In this study, we tried to determine the structure of the complex containing these heterochromatin factors, using cryo-electron microscopy technology. Here, we obtained a tomogram of the reconstituted HP1-chromatin complex using cryo-electron tomography.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヘテロクロマチン ニュクレオソーム クライオ電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム DNA は、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 を各 2 分子ずつ含むヒストン八量体に、DNA が約 150 bp 巻きついたヌクレオソームを基本単位とし、ヌクレオソームがリンカー DNA を介して連なった構造体であるクロマチンを形成し、核内に収納されている。クロマチンは、さらに高次に折りたたまれて構造的・機能的に異なる区画に分かれ、遺伝子発現や DNA 組換えを制御していると考えられているが、実際にどのような構造を形成しているのか、その詳細が明らかになっている領域は限られている。クロマチン構造を変化させる要因として、ヒストン亜種への交換、ヒストンの翻訳後修飾などが挙げられる。ヒストン亜種は、複製依存的に取り込まれるヒストンとのアミノ酸配列の違いから、ヌクレオソームの性状を変化させる場合がある。また、ヒストンのアセチル化、メチル化などの翻訳後修飾は、ヒストンアセチル基転移酵素、ヒストンメチル基転移酵素などの「書き込み因子」によって行われ、それらを特異的に認識する「読み取り因子」に認識されることにより、高次クロマチン構造の基盤構造の形成や、構造変換が行われる。従って、ゲノム上のどこに、どの翻訳後修飾が書き込まれるかは、重要な問題である。しかしながら、ゲノム上において、エピジェネティックな情報の書き込みを決定し維持するメカニズムについては、不明な点が多く残されている。

ヘテロクロマチンは、ヒストンの翻訳後修飾によりクロマチン状態が規定される領域の 1 つである。ヘテロクロマチンのうち、構成的ヘテロクロマチン領域は、繰り返し配列やトランスポゾン由来の配列を多く含み、これらの配列からの転写や DNA 組換えを抑制してゲノムの安定性に寄与していると考えられている領域である。構成的ヘテロクロマチンは、DNA が高密度に存在することから、高次に折りたたまれた領域であると考えられており、ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基のジメチル化およびトリメチル化 (H3K9me2/3) をエピジェネティックマークとする。H3K9me2/3 は、ヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) により認識され、HP1 が結合したヌクレオソームが、ヘテロクロマチンの基盤構造を形成すると考えられ、その立体構造が報告されている。構成的ヘテロクロマチン領域では、ヒストンメチル基転移酵素である SUV39H ファミリーの 2 つのサブタイプである、SUV39H1 または SUV39H2 (SUV39H1/2) により、H3K9me2/me3 化が行われる。SUV39H1 は、H3K9me2/3 を認識するクロモドメインを有しており、自ら H3K9me2/3 に結合し、H3K9me2/3 をもつ領域の周辺にメチル化を広げていくモデルが提唱されているが、詳細な機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、構成的ヘテロクロマチン形成と維持のメカニズムを明らかにすることを目的としている。そのため、SUV39H1/2 とクロマチンとの相互作用様式、SUV39H1/2 とヘテロクロマチンマークである HP1 との相互作用様式を可視化することにより、構成的ヘテロクロマチン領域特異的に H3K9me2/3 マークが導入される機構を明らかにしようとして試みた。また、SUV39H1/2 および HP1 により形成される高次クロマチン構造を明らかにしようとして試みた。

3. 研究の方法

(1) 試験管内でヘテロクロマチン様複合体を再構成し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により立体構造を解析する。SUV39H1 と SUV39H2 は、共通して、構造をもたない N 末端領域、H3K9me2/3 を認識すると考えられるクロモドメイン、酵素活性を有する SET ドメインからなり、細胞内において重複した機能を有することが報告されている。また、SUV39H1 は、HP1 と相互作用することが報告されている。そこで、HP1 および他のヘテロクロマチン関連因子との相互作用解析を視野に入れ、SUV39H1/2 の全長を用い、クロマチンとの複合体解析を行うことを計画した。また、より構造解析に適した、SUV39H1/2 とクロマチンとの安定な複合体が形成されることを期待し、SUV39H1/2 の欠失変異体および点変異体を用いてクロマチンとの複合体解析を行うことを計画した。

(2) SUV39H1/2 を含むヘテロクロマチン様複合体の構造多様性が大きい場合、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析だけでは、立体構造の取得が困難である可能性が考えられる。このような場合、個々の粒子の形状を観察できる手法である電子線トモグラフィーを用いることにより、立体構造解析を行うことを計画した。また、HP1-クロマチン複合体の構造は、ヘテロクロマチンの基盤構造であるため、ヘテロクロマチン領域の形成と維持の機構解明のための基盤情報となるものである。そのため、SUV39H1/2 を含むヘテロクロマチン様複合体の立体構造解析に先行して、高純度のタンパク質精製に成功している HP1 を用い、HP1 とクロマチンの立体構造を電子線トモグラフィーにより解析した。

(3) ヘテロクロマチンは、複製依存的にクロマチンに取り込まれる通常型 H2A の他、H2A の亜種である H2A.Z が局在していることが知られている。本研究では、H2A.Z を含むヌクレオソームを試験管内で再構成し、性状解析を行った。

(4) クロマチンの構造解析技術の高度化のため、ヌクレオソームを試験管内で再構成し、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 試験管内でヘテロクロマチン様複合体を再構成し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により立体構造を解析する。そのために、まず、SUV39H1/2 の全長タンパク質の発現・精製系を検討した。また、SUV39H1/2 の欠失変異体および点変異体を発現・精製系を構築した。精製したタンパク質を用い、試験管内で再構成したヌクレオソームへの結合試験を行った。これらの実験から、SUV39H1/2 とクロマチン複合体の構造解析に必要な基盤的知見を得ることができた。

(2) 精製した HP1 および試験管内再構成クロマチンを用いて、HP1-クロマチン複合体の形成・精製方法の検討を行った。得られた HP1-クロマチン複合体を用いて、クライオ電子顕微鏡観察用凍結試料(グリッド)の作成方法を検討した。作成したグリッドを用い、クライオ電子顕微鏡にて電子線トモグラフィーにより観察し、トモグラムを得ることに成功した。

(3) ヘテロクロマチンに含まれる H2A 亜種である H2A.Z を含むヌクレオソーム (H2A.Z ヌクレオソーム) を試験管内で再構成し、性状解析を行った。その結果、H2A.Z ヌクレオソームは、通常型 H2A に比べ、DNA 上でのヌクレオソームの形成位置が変化しやすいことを見出した。さらに、H2A.Z 変異体を用いた解析により、H2A.Z ヌクレオソームの形成位置が変化しやすいという性質は、H2A.Z の N 末端側の領域のアミノ酸配列により付与される性質であることを明らかにした。また、H2A.Z ヌクレオソームは、通常型のヌクレオソームに比べ、不安定であることを見出した。この性質は、H2A.Z の C 末端側の領域のアミノ酸配列により付与される性質であることを明らかにした。これらの結果は、論文にまとめ、*Genes to Cells*, 2020, 25 (8): 538-546 に発表した。本研究成果は、細胞内における H2A.Z の機能解析のための基盤情報を提供するものである。

(4) ヒト寄生虫であるジアルジアは、ジアルジア症を引き起こす病原性寄生虫であり、現在、感染者が最も多い寄生虫の 1 つである。本研究では、ジアルジア由来のヒストンタンパク質を大腸菌において発現・精製し、試験管内でヌクレオソームを再構成した。クライオ電子顕微鏡による単粒子解析により、立体構造を取得した。立体構造および生化学的解析から、ジアルジアのヒストンタンパク質からなるヌクレオソームは、ヒトヌクレオソームに比べ、DNA の巻きつきが短く、「開いた」構造を形成することを明らかにした。この性質は、ヌクレオソームが連なったポリヌクレオソームにおいても観察され、ジアルジアのクロマチンは弛緩した構造を形成しやすいことを示唆している。また、ジアルジアヌクレオソームにおいて、H2A-H2B により形成される酸性領域の特徴的な構造を明らかにした。これらの結果は、論文にまとめ、*Nucleic Acids Research*, 2021, 49 (15): 8934-8916 に発表し、プレスリリースを行なった。本成果は、原生生物のヌクレオソームの立体構造を明らかにした最初の報告であり、寄生虫のクロマチンを標的とした創薬研究に基盤情報を提供する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Shoko, Tanaka Naoki, Arimura Yasuhiro, Kujirai Tomoya, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 The N terminal and C terminal halves of histone H2A.Z independently function in nucleosome positioning and stability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 538 ~ 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12791	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 Tanaka Hiroki, Sato Shoko, Koyama Masako, Kujirai Tomoya, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 167
2. 論文標題 Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A.J	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	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	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 Sato Shoko, Takizawa Yoshimasa, Hoshikawa Fumika, Dacher Mariko, Tanaka Hiroki, Tachiwana Hiroaki, Kujirai Tomoya, Iikura Yukari, Ho Cheng-Han, Adachi Naruhiko, Patwal Indu, Flaus Andrew, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Cryo-EM structure of the nucleosome core particle containing Giardia lamblia histones	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8934 ~ 8946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab644	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤祥子, 滝沢由政, 田中大貴, ダッシェ マリコ, Indu Patwal, Andrew Flaus, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 ランブル鞭毛虫ヌクレオソームの構造と生化学的性質
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 佐藤祥子, 有村泰宏, 原田哲仁, 前原一満, 大川恭行, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 再構成クロマチンを基質としたトランスポゾン転移酵素Tn5の生化学的解析
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤祥子, 滝沢由政, 星川史佳, ダッシェ マリコ, 田中大貴, 立和名博昭, 鯨井智也, 飯倉ゆかり, 何承翰, 安達成彦, Indu Patwal, Andrew Flaus, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 病原性寄生虫Giardia lambliaヌクレオソームの構造と生化学的性質
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤祥子, 滝沢由政, 星川史佳, ダッシェ マリコ, 田中大貴, 立和名博昭, 鯨井智也, 飯倉ゆかり, 何承翰, 安達成彦, Indu Patwal, Andrew Flaus, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いたジアルジアヌクレオソームの構造解析と生化学的解析
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 hoko Sato, Yoshimasa Takizawa, Fumika Hoshikawa, Mariko Dacher, Hiroki Tanaka, Hiroaki Tachiwana ² , Tomoya Kujirai ¹ , Yukari Iikura, Cheng-Han Ho, Naruhiko Adachi, Indu Patwal, Andrew Flaus, Hitoshi Kurumizaka
2. 発表標題 Cryo-EM structure of the nucleosome containing human parasitic Giardia lamblia histones
3. 学会等名 The 30th Hot Spring Harbor International Symposium Chromatin Potential in Development & Differentiation (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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		
英国	National University of Ireland Galway		