

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06599

研究課題名(和文)新規クロマチンユニットの構造機能解析

研究課題名(英文)Structural and functional analysis of the novel chromatin unit

研究代表者

野澤 佳世 (Nozawa, Kayo)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：10808554

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はディスク状のヌクレオソーム(NCP)構造に巻き取られて核内に収納されており、H2A、H2B、H3、H4の4種類のヒストン2分子ずつからなるヒストン8量体からなる均一な構造体だと考えられてきた。一方、申請者はヒトのリコンビナント・タンパク質を用いたクライオ電子顕微鏡単粒子解析を通じて、ヒストンH3、H4の2種類のみでもNCP様構造体(H3-H4オクタソーム)が形成されることを発見した。また申請者は、出芽酵母を用いた細胞内タンパク質間架橋実験によって、H3-H4オクタソーム特異的な相互作用を検出し、H3-H4オクタソームが生体内に存在することを初めて実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NCPを構成するヒストンには多数のバリエーションが存在し、その中には、がん細胞で高頻度に存在するものも報告され、ヒストン修飾がもたらすクロマチンの大規模な構造変換の破綻は、がんや生活習慣病、精神疾患などの疾患の原因となる。H3-H4オクタソームでは、DNA上のヒストンの配向が通常のNCPと全く異なるため、そのヒストン修飾のパターンも特徴的であることが想定される。本研究は、ヒストンの変異でも修飾でもなく、ヒストンの比率がゲノム機能を調節することを新たに提唱し、上述したエピジェネティクス制御の異常に関わる疾患の理解においても、新しい概念を加えられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Genetic information is stored in chromatin with nucleosomes as the basic unit. A typical nucleosome comprises a DNA segment wrapped around a histone octamer core, consisting of two copies of histone H2A-H2B and histone H3-H4 dimers. In the present study, we determined the structures of a novel nucleosome, the H3-H4 octasome, composed of four H3-H4 dimers without H2A-H2B. In vivo crosslinking experiments supported the existence of the H3-H4 octasome in yeast cells. The discovery of the unique structural characteristics of the H3-H4 octasome will have major impacts on topics ranging from chromatin structure and dynamics to epigenome regulation in eukaryotes.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡解析 クロマチン サブヌクレオソーム 転写 ゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA の情報はヌクレオソームを基本単位とするクロマチン構造の中に保存されており、通常ヌクレオソームは H2A、H2B、H3-H4、2 分子ずつからなるヒストン 8 量体に DNA が左巻きに 1.65 回巻き付いた構造をとっている。一方、生体内にはサブヌクレオソームと呼ばれるヒストンの含有量や DNA の巻き付き方の異なる構造体が存在しており、クロマチンの高次構造とダイナミクスに多様性を与えている。特に H3-H4 ヒストン・タンパク質から構成されるサブヌクレオソームは、ヌクレオソーム形成に必要な中間体であることが知られており、その構造の解明が待たれていた。これまで H3-H4 サブヌクレオソームは、ヒストン 4 量体に DNA が巻き付いたテトラソームを構成すると考えられていたが、我々はヒトのリコンビナント・ヒストン・タンパク質を用いて、この複合体を *in vitro* で再構成し、6.8 ㎵ の分解能でクライオ電子顕微鏡像を得ることで、H3-H4 サブヌクレオソームが H2A、H2B 非存在下でも通常のヌクレオソームのようにヒストン 8 量体からなる安定な構造体 (H3-H4 オクタソーム) を形成することを明らかにした。

2. 研究の目的

従来ヌクレオソームのゲノム解析は、核をエキソヌクレアーゼである MNase で処理した産物に対して行われており、この方法では通常のヌクレオソームと H3-H4 オクタソームを見分けることができない。本研究で行う構造生物学的、生化学的解析を通じて、これまでヌクレオソームと思われていた核抽出フラクションの中から、H3-H4 オクタソームを単離することができれば、新規のクロマチン基盤ユニットの発見と、その構造がゲノム機能に与える影響を初めて解析することができると考えて研究を進めた。

3. 研究の方法

本研究では、H3-H4 オクタソームが新規のクロマチン構造基盤ユニットであることを証明するために、クライオ電子顕微鏡解析によって、H3-H4 オクタソームのさらなる高分解能構造を獲得し、*in vitro* の転写システムを用いて H3-H4 オクタソームが RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の転写に与える影響を評価するとともに、H3-H4 オクタソームのゲノム局在位置を同定し、H3-H4 オクタソームと結合するクロマチン関連因子を探索する、という 3 つの課題で 3 年間の研究を進めた。

4. 研究成果

新規のクロマチンユニットである H3-H4 オクタソームについては、初年度にクライオ電子顕微鏡単粒子解析を通じて、ディスク構造の開き方の異なる 3 つのコンフォメーションそれぞれの構造を 3.6 ㎵、4.3 ㎵、3.9 ㎵ の分解能で解明することができた (図)。このことから H3-H4 オクタソームがゲノム上に存在すれば、クロマチンに柔軟性を与えることが示唆された。また H3-H4 オクタソームは、ヌクレオソームと似た概形を持ちながらも、クロマチンの構造変換を引き起こす、ヒストンのメチル化酵素やクロマチンリモデリング因子といった因子が結合するための足場となる特徴的な酸性表面 (アシディックパッチ) を持たないユニークなヌクレオソームであることも明らかになった。また、遺伝子発現がオンになったプロモーター付近のヌクレオソームでは、H2A、H2B の存在比率が少ないことが報告されてることを踏まえて、H3-H4 オクタソームをテンプレートとした試験管内転写実験も行った。転写テンプレートを調製するために、H3-H4 オクタソームに Pol II 結合の足場となるミスマッチ bubble DNA をライゲーションさせた試料を非変性ポリアクリルアミドゲルを用いて精製した。H3-H4 オクタソームから経時的に転写された産物は、尿素変性ポリアクリルアミドゲルで展開し、プライマーに結合させた蛍光色素 Cy5 を検出することで RNA 量を測定した。その結果、H3-H4 オクタソームのテンプレートでは通常型のヌクレオソームで見られるような SHL-1 の位置での Pol II の停止が見られず、転写効率が高いことが示された。

次年度では、国際共同研究によって、H3-H4 オクタソーム特異的な相互作用を出芽酵母内で検出することに成功し、H3-H4 オクタソームが生体内に存在することを初めて示した。本研究で行った生体内部位特異的タンパク質間相互作用架橋実験 (VivosX) では、通常型のヌクレオソームでは遠位に配置し、H3-H4 オクタソーム中でのみ近接したアミノ酸として、ディスク面で向かい合う、H3 の N 上に存在する R49 を選定し、システイン変異を導入した。我々は、この R49C 変異をゲノムシャッフリング法で出芽酵母に導入し、disulfide exchanger である 4-DPS で処理した細胞を Zirconia beads でホモジェナイズして調製した核抽出液に対して、H3 抗体を用いた western blotting を行った。その結果、非還元状態で H3-H4 オクタソームに由来する H3 R49C ダイマーが検出された。この結果は、試験管内再構成系でも検証され、H3-H4 オクタソーム特異的に H3 R49C ダイマーが形成されることが確認され、H3-H4 オクタソームが生体内に存在することが裏付けられ、この成果をプレプリント・サーバー-bioRxiv に発表した。

最終年度はリバイス実験を遂行し、上述の成果を筆頭著者として学術雑誌 *Proc Natl Acad Sci U S A.* に報告することができた。リバイス実験では、H4 R92C 変異酵母を用いた細胞内部位特異的タンパク質間架橋実験 (VivosX) によって、H3-H4 オクタソーム特異的な構造 (H4-H4' 相互作用) が生体内に存在していることを実証した。また、こうした H3-H4 オクタソーム特異的な架橋産物が生体内でヌクレオソームが連なった結果生じるアーティファクトではないことを証明するために、我々は同様の変異を含むポリ・ヌクレオソームを試験管内再構成にて作成し、ポリ・ヌクレオソーム状態では架橋産物が形成されないことも示した。加えて、H3-H4 オクタソーム結合因子の探索についても進展があった。我々は、ビオチン化した DNA を用いて H3-H4 オクタソームを再構成し、ストレプトアビジン担体と結合させることで H3-H4 オクタソーム・カラムを作成し、HeLa 細胞の核抽出液と反応させ、その結合因子のプルダウン精製を行った。カラムに結合した因子を LC-MS/MS 質量分析法により網羅的に解析した結果、リンカー・ヒストン H1 が優位に検出されることが分かった。H1 は、ゲノム上のヌクレオソームの固定やクロマチン高次構造の維持に必須の因子であることから、H3-H4 オクタソームがゲノム構造の基本単位として働きうるデータだと考えられる。今後は、H1-H3-H4 オクタソーム複合体の構造・機能解析を行うことで、そのゲノム機能を解明して行きたいと考えている。

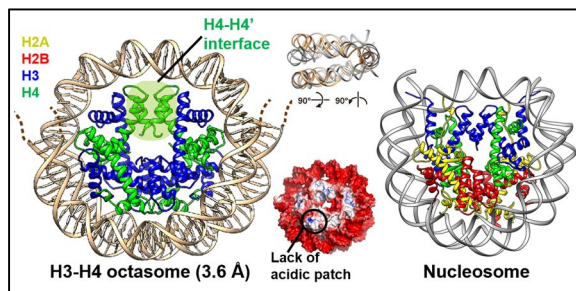


図 H3-H4 オクタソームのクライオ電子顕微鏡構造

本研究成果は、ヒストンの変異や修飾だけでなく、ヒストンの含有率もヌクレオソームにアイデンティティを与えることを提唱し、今後、エピジェネティクス制御の異常がもたらす、がん化や生活習慣病、精神疾患の理解においても、H3-H4 オクタソームが新しい概念を加えると考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 K, Nozawa., Y, Takizawa., L, Pierrakeas., K, Saikusa., S Akashi., E, Luk., H, Kurumizaka.	4. 巻 -
2. 論文標題 Cryo-electron microscopy structure of the H3-H4 octasome without histones H2A and H2B	5. 発行年 2021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） 10.1101/2021.10.27.466091	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野澤佳世
2. 発表標題 Structural analysis of the Mediator complex in the eukaryotic transcription
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野澤佳世
2. 発表標題 遺伝子発現制御に関わるゲノム三次構造の構造機能解析
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 野澤佳世
2. 発表標題 ゲノム三次構造が遺伝子発現に与える影響
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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			
米国	Stony Brook University			