

平成 29 年 4 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26251008

研究課題名(和文) DNAトランスアクションと共役したクロマチンリモデリング機構の構造基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism of chromatin remodeling coupled with DNA transaction

研究代表者

森川 耿右 (Morikawa, Kosuke)

京都大学・生命科学研究科・研究員

研究者番号：80012665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ヌクレオソームDNA中の切れ目(Nick)の存在がクロマチンリモデリング因子などのヒストンへのアクセスを促進し、クロマチンリモデリングに導くプロセスを立体構造の観点から原子レベルで解明する事にある。実験データから、クロマチンリモデリング因子FACTが二本鎖DNA切断(DSB)ヌクレオソームに強く結合し、安定な複合体を形成する事が判明した。更に、生化学的、構造生物学的解析から、FACTによるクロマチンリモデリングの作動には、DSBによってDNAの局所的な構造変化を誘発し、ヌクレオソームDNAからヒストンを局所的に露出させる必要があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We assumed that the interaction of chromatin remodeling factors with nucleosomes would involve local detachments of the nucleosomal DNA from histones during DNA transaction. Therefore, we studied the interaction of chromatin remodeling factors with nicked nucleosomes by biochemical and structural analyses. As a result, the introduction of a double-strand break (DSB) into the nucleosomal DNA allows a histone chaperone FACT to efficiently form a complex with nucleosomes. It is thus indicated that DNA cleavages on nucleosomes would cause local unwrapping of the nucleosomal DNA in the vicinity of the cleavage sites upon contacting FACT, leading to subsequent reactions for chromatin remodeling.

研究分野：構造生物学

キーワード：DNAトランスアクション クロマチンリモデリング 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

一般的に、真核生物における DNA トランスアクションは密接にクロマチンリモデリングと関係づけられる。研究開始当初、ようやく、転写、複製、修復の過程でこの事実を支持する多くの研究成果が報告された [ref1-4]。例えば、ゲノム中のリボヌクレオチドを除去する酵素である RNase H [ref1] を欠失させたマウス胎児のゲノム DNA では、著しく広範にリボヌクレオチド挿入が生じており、その結果、ゲノムが不安定する事実が報告された [ref2]。さらに、DNA 複製中の岡崎フラグメントの切れ目の位置がヌクレオソーム間の Linker DNA の領域ではなく、ヒストンが巻かれたヌクレオソーム DNA 領域中に有意に頻度高く存在する事が示された [ref3]。以上二つの報告を包括的に考えると、様々な DNA トランスアクションの結果、ゲノム DNA にはリボヌクレオチドが広範に挿入され、それらを RNase H などが除去する結果、クロマチン構造中に多数の切れ目 (Nick) が取り込まれた状態にあると想定される。また、我々の当時の未発表データから、クロマチンリモデリング因子 FACT (Facilitates chromatin transcription) が他の因子によってわずかに生じたヌクレオソーム DNA とヒストンの間隙に特異的に結合する事実が明らかになった。この我々の結果と、上記のデータを基礎に、我々は次のような着想を得るに至った。本格的なクロマチンリモデリングが作動する引き金の一つは、このゲノム中の切れ目 (Nick) の存在ではないかという着想である。即ち、DNA に生じた主鎖の切れ目はヌクレオソーム中に局所的且つ構造的“乱れ”を誘起する。この“乱れ”により、DNA とヒストンの接触が弱められ、DNA ループやヒストンの露出などが引き起こされる。この構造変化に伴って、様々なクロマチンリモデリング因子がヌクレオソーム中の露出したヒストンに容易にアクセスできると考えられる。FACT と DNA 修復部位の密な関係を明らかにした報告 [ref4] もこのアイデアを強く支持した。以上の着想を基に、本研究では DNA トランスアクション後の Nick の存在とクロマチン高次構造変換の関係に焦点をあて、その立体構造基盤の解明を提案した。

- <Reference> 1. Sparks, J.L., et al. (2012) Mol Cell. 47: 980-986.
 2. Reijns, M.A.M., et al. (2012) Cell. 149: 1008-1022.
 3. Smith, D.J., & I. Whitehouse. (2012) Nature. 483: 434-438.
 4. Dinant, C., et al. (2013) Mol Cell. 51: 469-479.

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヌクレオソーム DNA 中の切れ目 (Nick) の存在がクロマチンリモデリング因子などのヒストン蛋白質へのアクセスを促進し、最終的にクロマチンリモデリング

に導くプロセスを、立体構造の観点から原子レベルで解明する事にある。当時最新の研究結果から、紫外線によって誘発された細胞内の DNA 修復部位でクロマチンリモデリング因子 FACT によるヒストン交換反応の促進が報告された [ref4]。この報告は、転写と DNA 修復の共役をクロマチンレベルで言及したはじめての例で、本研究のターゲットとして FACT が適している事を強く示唆する。そこでまず、FACT と DNA の切れ目 (Nick) を任意の部位に導入したヌクレオソームを調製し、相互作用解析を行う。さらに、この他にも様々なリモデリング因子について同様の解析を行う。その中でより安定なリモデリング因子とヌクレオソームの複合体については、立体構造解析に取り組む。これらの実験から、遺伝子の傷 (Nick) がおよぼすクロマチンの立体構造への影響の全容を解明できると考えている。

3. 研究の方法

本研究の目標達成のために、様々な構造生物学的手法と生化学的解析を組み合わせた包括的な研究アプローチを駆使し、以下の研究を行った。まず、Nick が挿入されたヌクレオソーム (Nick ヌクレオソーム) を作製し、Nick ヌクレオソームと様々なクロマチンリモデリング因子との相互作用解析を行った。解析の結果、より安定な Nick ヌクレオソーム-リモデリング因子複合体が得られたら、その立体構造解析を行う。これにより、Nick 部位でクロマチンリモデリング因子がどのようにクロマチンを構造変換に導くのかを立体構造の観点から明確にする。これと並行して、Nick 部位を含んだ生体内クロマチンの取得を検討する。

4. 研究成果

初年度は、ヌクレオソームポジショニングが最も強い 601 配列を用いて、Nick (切れ目) をヌクレオソーム立体構造上の任意の位置に組み込んだ DNA を数十種類ほど調製し、モノヌクレオソームの再構成を試みた。再構成に成功したこれらの Nick ヌクレオソームに対して、熱安定性解析、MNase 処理、DNase I 処理などを行い、ヌクレオソーム構造が維持されていることを確認した。また、Nick ヌクレオソームの中でも特に安定性の高いものに関しては、結晶化を試みた。いくつか結晶化に成功したが、X 線結晶構造解析により、立体構造を明らかにするには分解能が低く、詳細な構造決定にはいたっていない。次に上記で作製した Nick ヌクレオソームを用いて、クロマチンリモデリング因子 CHD1 や FACT との結合性を解析した。特にヒストンシャペロン FACT との結合性に関して、興味深い結果をえた。二本鎖 DNA のうち、片方の DNA だけ

に切れ目を入れたシングル Nick ヌクレオソームに対して FACT は全く結合せず、複合体を形成しなかった。それに対して、制限酵素により二本鎖 DNA のうち、両方の DNA に切断の入ったヌクレオソームは FACT に強く結合し、安定な複合体を形成した。

また、当初の予定では、生体内から Nick 切断部位の残存したクロマチンを取得する予定であった。しかし、おそらくゲノムの不安定性が原因と思われるが、Nick 切断部位の残存した生体内クロマチンについては取得する事に成功しなかった。従って、実験計画の大幅な変更を余儀なくされた。

次年度は、クロマチンリモデリング因子 FACT に加えて、様々なヒストンシャペロンや ATP 依存的クロマチンリモデリング因子でも Nick ヌクレオソームに対して親和性があるのか否か、について調べた。しかし、明確に強い親和性を示すものはえられなかった。次に、二本鎖 DNA 切断 (DSB) 部位を任意の箇所に導入した数種類のヌクレオソームを用いて、FACT に対するヌクレオソーム立体構造上の DSB の位置の結合選択性を解析した。つまり、ヌクレオソーム上のどの位置に DSB が存在すると、FACT が結合しやすいかを精査する解析である。その結果、ヒストン H2B の N 末端塩基性領域の近傍に DSB を導入したヌクレオソームに最も効率よく FACT が結合できることがわかった。加えて、FACT はヒストン H2B の N 末端塩基性領域に結合することが生化学的解析から実証された。このヒストン H2B の N 末端塩基性領域はヌクレオソーム構造内で二本の二重鎖 DNA に挟まれて存在し、DNA 骨格と強く結合している。したがって、FACT が結合する際には、不安定性を内在した DSB によって DNA の局所的な構造変化を誘発し、この領域をヌクレオソーム DNA から露出させる必要があると示唆される。この結果を基に、FACT が誘起する新しいヌクレオソーム構造変換の分子機構を提案した。この研究成果は国際学術雑誌「Genes & Development」に掲載された。

最終年度は、昨年に引き続き、ヒストンシャペロン CIA1/Asf1 や ATP 依存的クロマチンリモデリング因子 Acf1 が Nick ヌクレオソームに対して親和性があるのか否か、について調べた。期待に反して、ゲルシフトアッセイなどの生化学的解析から強い親和性を示さず、均一で安定な複合体を形成するデータは得られなかった。結果として、安定で均一な複合体を形成する証拠は、昨年度取得に成功した FACT 機能ドメイン (Mid-AID) と二本鎖 DNA 切断 (DSB) ヌクレオソームの複合体のみであった。従って、その複合体の結晶構造解析を目指した。

様々な条件下で結晶化スクリーニングを試みた。幾つかの条件で結晶を得ることができたが、結晶の成分を SDS-PAGE で解析したところ、ヌクレオソームの単独結晶である事が判明した。それ故、以降の解析を断念した。次に複合体の電子顕微鏡観察を行った。最初に負染色を用いて確認したところ、粒子のそろった複合体が観察された。そこで、複合体構造の分解能をあげるために、試料を凍結し、クライオ電子顕微鏡で観察を行った。試料の凍結条件については塩濃度や氷の厚さなどのパラメータを変えて検討し、最適な観察条件を見つける事ができた。これらの観察結果を基に電子顕微鏡単粒子解析を行っているが、目下解析中である。今後、電子顕微鏡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となる。複合体の立体構造モデルが決定すれば、論文として発表する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Yasuo Tsunaka & Kosuke Morikawa. (2016 年) FACT creates a transiently accessible nucleosome structure through integrated reorganization mechanism. *Biochem Mol Biol J*. Volume 2, Number 3, 19. 査読あり、doi: 10.21767/2471-8084.100028
2. Yasuo Tsunaka, Yoshie Fujiwara, Takuji Oyama, Susumu Hirose, & Kosuke Morikawa. (2016 年) Integrated molecular mechanism directing nucleosome reorganization by human FACT. *Genes & Development*. Volume 30, Number 6, pp 673-686. 査読あり、doi: 10.1101/gad.274183.115

[学会発表](計 4 件)

1. 津中康央, 森川耿右, FACT を介したクロマチンリモデリングの分子機構、第 11 回エピジェネティクス研究会、2017 年 5 月 23 日、東京一ツ橋学術総合センター
2. 津中康央, 森川耿右, FACT を介したクロマチンリモデリング機構の構造基盤、ワークショップ「染色体研究の最前線」、2017 年 1 月 16 日、大阪大学生命科学研究科生命システム棟
3. 津中康央, 藤原芳江, 大山拓次, 広瀬進, 森川耿右, FACT を介したクロマチンリモデリングの分子機構、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日、

- パシフィコ横浜
4. 津中康央, 藤原芳江, 大山拓次, 広瀬進, 森川耿右, FACT を介したクロマチンリモデリングの分子機構、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 26 日、仙台国際センター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/index.php?page=article&storyid=184>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 耿右 (Morikawa, Kosuke)
京都大学・生命科学研究科・研究員
研究者番号：80012665

(2) 研究分担者

津中 康央 (Tsunaka, Yasuo)
京都大学・生命科学研究科・特定研究員
研究者番号：40551552

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし