

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650010

研究課題名(和文) 高次染色体構造を基質とした生化学及び微細構造解析法の開発

研究課題名(英文) Development of biochemical and fine structural analyses methods for higher order chromosome structure

研究代表者

荒木 弘之 (ARAKI, Hiroyuki)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授

研究者番号：20151160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内から特定の領域のクロマチンファイバーを精製し、可視化解析および生化学的解析に供する手法の確立を目的とする。研究期間内に、制限酵素により断片化した染色体クロマチンファイバー、酵母細胞内に導入した環状DNAに形成されたクロマチンファイバーなどの精製を行い、そこに結合している複製開始制御因子などの構造を原子間力顕微鏡(AFM)による可視化解析により検出した。また、その構造を比較検討する対象として、試験管内でpre-RCなどのDNA複製開始制御因子や複製ヘリカーゼとDNAとの複合体を形成し、その可視化解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish the method of the purification of the chromatin fiber containing specific DNA region and use the chromatin fiber for structural and biochemical analyses. We carried out the fragmentation of chromosomal DNA by the treatment of the purified yeast nuclei with restriction enzymes and the isolation of the specific chromatin fiber by immunoprecipitation. We have also carried out the purification of the plasmid DNA together with the bound proteins from yeast cells. The structure of the chromatin fiber has been visualized and analyzed by atomic force microscopy (AFM). The reconstituted complex consisting of the chromatin fiber and DNA-replication factors has also been visualized by AFM to evaluate the size and shape of the particles observed in the chromatin fiber purified from yeast cells.

研究分野：染色体動態

キーワード：クロマチン DNA複製 AFM

1. 研究開始当初の背景

細胞内のクロマチンの状態は、蛍光顕微鏡下での DNA の蛍光輝度の違いから、まず転写活性が高く弛緩したユークロマチン領域と、転写活性が抑制され凝縮したヘテロクロマチン領域の存在が提唱され、後にヒストンのアセチル化やメチル化、HP1 などといったヘテロクロマチン特異的局在タンパク質などが同定され、これら因子の蛍光顕微鏡下での局在から解析が進められた。そのうち、ChIP-chip や ChIP-seq などによりヒストンコードや各種タンパク質のゲノムワイドな局在も同定されるに至り、構成因子のパターンが多様なクロマチンが細胞内で形成されていることが明らかとなってきた。

一方で、転写や複製の関連因子といった機能タンパク質の研究も進み、変異遺伝子を用いた遺伝学的な解析とともに、その遺伝子がコードするタンパク質の生化学的解析が大きな役割を果たしてきた。特定の配列を有する DNA との結合親和性の測定や、タンパク質間の結合、あるいは、再構成ヌクレオソームを用いた“クロマチン”との結合実験などである。また、結晶解析や電子顕微鏡により、DNA-タンパク質間、タンパク質-タンパク質間結合の構造的解析も行われてきた。

以上のように、クロマチンの状態の多様性と、機能タンパク質の解析が進んだ結果、「転写や複製の機能タンパク質が細胞内ではたらく際には、クロマチンのアクセシビリティが影響を持つ」というモデルが多く提唱されている。しかし、“特定の状態の高次染色体構造”と“特定の機能タンパク質”の結合親和性を定量的に測定する生化学的実験法は存在せず、したがって、細胞内での局在を蛍光顕微鏡や ChIP で検出する定性的なデータに依存するほかない。近年、ヘテロクロマチンといえども、“ゆらぎ”の性質を持つ動的な状態であることが提唱されており、高次染色体構造と特定のタンパク質との結合（あるいは解離）の反応は生化学的に測定されてこそ、科学的に説明する（たとえば数理モデルなどにデータを提供する）定量性を確保できると考える。しかし、高次染色体構造はその複雑さから人工的に再構築することが不可能であり、そのため、生化学的解析に供することは不可能だった。

本研究では、細胞内から特定のクロマチン領域を高次染色体構造を保持したまま単離し、試験管内解析に供するシステムを開発することを目的とする。これにより、着目するタンパク質因子の高次染色体構造に対する結合親和性や、その結合が染色体構造に及ぼす影響について定量的・直接的に調査する。

2. 研究の目的

クロマチンは、多くの因子が複雑なバラ

スを保ちつつ細胞内で集合し形成されるため、試験管内で再現することは困難である。高次クロマチンファイバーの *in vitro* 生化学および構造解析のために以下の手法を確立する (図 1 参照)。

- 細胞内からの標的ゲノム領域のクロマチン切り出し法の確立
- 切り出したクロマチンの精製法の確立

更に、回収したクロマチンを解析する方法論も確立する

- 回収クロマチンへの因子の結合あるいは解離を追跡する手法の確立
- 回収クロマチンの微細構造の解析

上記の方法論の確立には、申請者が長期にわたって携わっている複製開始制御とクロマチン構造の相関に着目した研究にまず利用し、さらに染色体の多様な現象への広い応用を目指す。

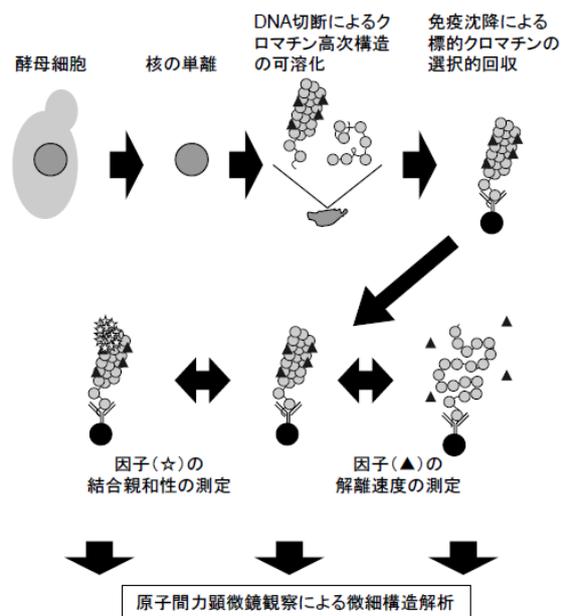


図 1. 本研究により開発を目指す染色体高次構造生化学解析法概念図

3. 研究の方法

26年度に、染色体高次構造の細胞内からの切り出し（不溶性画分である核成分から、標的クロマチン領域のみを制限酵素などによる DNA 切断により遊離させる）の手法、および切り出したクロマチンの選択的回収法（免疫沈降）を確立した。26年度の後半には、確立した切り出し・回収法を用いて種々の染色体領域をルーチンに単離し、本手法の汎用性を評価した。27年度には、本手法を応用した高次クロマチン構造の解析を行った。特に、研究代表者が長年研究対象として

いる DNA 複製開始の制御に着目し、複製開始領域 replication origin を含む染色体領域のクロマチン高次構造を単離し、そこにおける複製開始因子のクロマチン上での配位などの解析に供した。さらに、rDNA 領域などのリピート配列など、特殊な構造を有することが期待される染色体領域の構造解析を試みた。

4. 研究成果

(1) 制限酵素による断片化した染色体クロマチン回収の試み

クロマチン高次構造を維持したまま、染色体領域を可溶化する手法の確立を目指し、酵母細胞を溶菌させた後、細胞核を精製し、制限酵素処理による染色体の断片化を行った。しかし、切断された染色体領域は依然不溶性画分に留まり、可溶化は困難であった。そこで、種々の条件検討を行った結果、制限酵素後に遠心して得られた不溶性画分を、500 mM NaCl と 1 mM EDTA を含む溶液で再懸濁することで、切断されたクロマチン断片を一部可溶化することに成功した。

可溶化したクロマチン画分から、特定のクロマチン領域を単離・精製するため、rDNA 領域に Lac O リピートを含み、かつ LacI-FLAG タンパク質を発現する細胞株を用いて、クロマチン可溶化処理を行った。可溶化したクロマチン画分から、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、回収されたクロマチンファイバーを AFM により可視化した (図 2)。ヌクレオソームファイバーと、より凝縮したクロマチン構造が混在した構造が検出された。今後、検出された構造が、rDNA 領域のクロマチンに局在していることが知られているタンパク

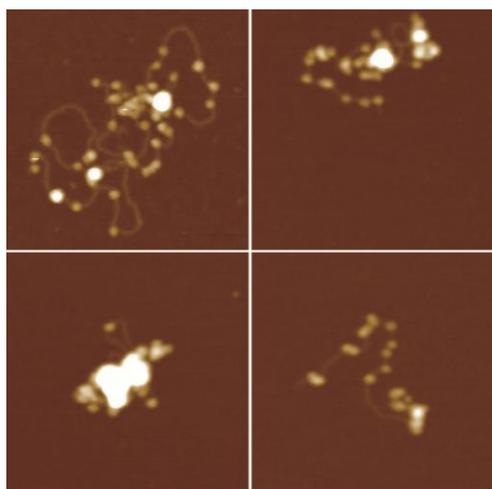


図 2. 酵母細胞内から精製した、制限酵素処理により断片化したクロマチンファイバーの AFM 観察像。スケールバーは 100 nm。

質の変異株を用いても検出されるかどうかなどを検討することで、rDNA 領域特異的なクロマチン構造の構築原理などが解明される

ものと期待される。

(2) ミニ染色体 (プラスミド) を利用した細胞内からのクロマチンファイバー回収

制限酵素処理により染色体を断片化し回収する図 2 のような手法では、検出されるクロマチン構造の長さや凝縮度が多様であり、解析に際し着目すべき点を絞り込むことが困難であった。そこで、異なる手法でのクロマチン回収法も検討した。酵母細胞内に、Lac O 配列を含むプラスミドを導入し、かつ、同細胞内で LacI-FLAG タンパク質を発現させるシステム (Unnikrishnan, A. et al., 2012, *Methods Mol. Biol.*, **833**, 115-123.) を用いて、ミニ染色体 (プラスミドとそれに結合しているタンパク質の複合体) を回収した。このプラスミドは複製開始領域の配列を含むため、G1 期には複製開始因子が集合することが期待される。実際に、G1 期から精製したミニ染色体上には、ヌクレオソームよりも大きな凝集体が検出された (図 3A, 矢印)。この凝集体のサイズを測定したところ、精製タンパク質を材料に形成させた複製開始因子複合体 (pre-RC) と類似した形状であることが分かった。S 期から精製したミニ染色体は、図 3B のように、さらに巨大な凝集体が形成されており、もはやヌクレオソームを個別に検出することは困難であった。すなわち、細胞周期に応じたミニ染色体の高次構造変化を検出することに成功した。

(3) 真核生物複製ヘリカーゼ CMG 複合体を用いた、クロマチン上での DNA 開裂反応の解析

ミニ染色体の観察において、S 期に同調させた酵母細胞から精製した標品の観察像では、巨大なタンパク質複合体が DNA 上に観察されたものの、その複合体に含まれるタンパク質の同定には至っていない。そこで、比較対象として、再構成クロマチン上に、S 期に形成される複製ヘリカーゼである CMG 複合体を結合させた標品の AFM 観察を行った。

酵母細胞から精製した CMG 複合体を用いて、ヘリカーゼ活性測定を行った結果、裸の DNA を基質として用いた場合も、ヌクレオソームを形成させた DNA を基質として用いた場合も、ほぼ同等の効率で DNA の開裂が検出された。すなわち、ヌクレオソーム構造は CMG のヘリカーゼ活性を阻害しないことが分かった。現在までに、DNA 端に結合している、反応前段階の CMG-DNA 複合体の AFM による観察を行った (図 4)。さらに、反応過程の、とりわけ、ヌクレオソームの除去を伴いながら DNA を開裂していく過程の可視化解析を目指している。

(4) ビオチンライゲースを用いた標的クロマチンの標識法の探索

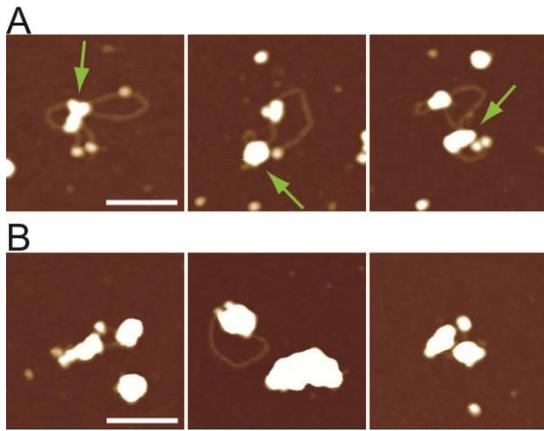


図3. 酵母細胞内から精製したミニ染色体のAFM観察像。G1期（パネルA）もしくはS期（パネルB）に同調させた細胞から精製したミニ染色体を観察した。Aの矢印は、複製開始因子複合体 pre-RC と考えられる凝集体を示す。スケールバーは100 nm。

前述の(1)で示したように、断片化した染色体の免疫沈降による回収をこれまでに試みたが、その収率は必ずしも高くはなかった。そこで、より効率的な回収を目指し、局所的に染色体上にビオチン化修飾を導入することを試みた。

具体的には、複製開始因子である Sld3 などのタンパク質にビオチン化ライゲースを融合させ、出芽酵母内で発現させる実験を行った。これにより、Sld3 と空間的に近くに配置されているタンパク質がビオチン化されることが期待される。これまでに、融合タンパク質の細胞内での発現は確認されており、ストレプトアビジンビーズによる精製も試験的に開始している。今後、標的としている複製開始領域クロマチンが選択的に精製できるか等を精査し、また、Sld3 以外のタンパク質をビオチン化ライゲースと融合させる実験も行う予定である。本手法が確立されれば、様々な染色体領域を精製する手法として応用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 4 件）

- (1) 日詰光治、矢倉勝、遠藤静子、荒木弘之 真核生物複製ヘリカーゼ CMG 複合体のクロマチン基質に対する活性
第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月 1 日 神戸ポートアイランド（神戸）
- (2) 日詰光治、遠藤静子、荒木弘之 複製ヘリカーゼ CMG 複合体によるクロマチン鎖開裂反応
第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワーク

ショップ 2015 年 10 月 21 日 焼津グラ
ンドホテル（焼津市）

- (3) Hizume K., Endo S., and Araki H.,
Nucleosome on helicase activity of CMG
complex
Eukaryotic DNA replication and genome
maintenance（国際学会）、2015 年 9 月
2 日 Cold Spring Harbor, NY, USA
- (4) 日詰光治、荒木弘之 MCM-DNA 複合体の
原子間力顕微鏡による可視解析
第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年
11 月 25 日 パシフィコ横浜（横浜市）

〔その他〕

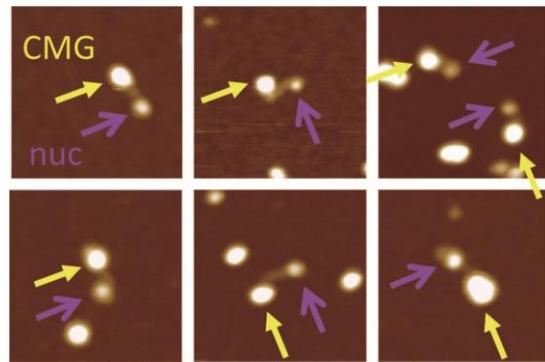


図4. ヌクレオソームを形成させた DNA の一端に結合させた CMG 複合体の AFM 像。一端に ssDNA を有する DNA にヌクレオソームを再構成し、さらに ATP 非存在下で CMG と混合することにより、CMG を ssDNA 部分に結合させた。スケールバーは 100 nm。

ホームページ等

<https://www.nig.ac.jp/nig/ja/research/organization-top/laboratories/araki>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 弘之 (ARAKI Hiroyuki)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授
研究者番号：20151160

(2) 研究分担者

日詰 光治 (HIZUME Kohji)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教
研究者番号：10378846