

研究報告書

「FACT を介したクロマチンリモデリング機構の構造基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 津中 康央

1. 研究のねらい

ヒトなどの多細胞生物においては、本質的には同じゲノムが個々の細胞に存在するにもかかわらず、発現する遺伝子の違いによって多様な細胞へ分化し、全体として統制のとれた一つの個体となる。このようなエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を解明することは分子細胞生物学における最も重要な研究課題となっている。真核生物では、遺伝子の発現制御はクロマチンの動的構造変化に依存して行われる。それゆえ、この過程で中心的役割を果たすリモデリング因子やヒストン化学修飾などがクロマチン構造をいかに巧妙に変化させて、遺伝子の働きを調節しているのか、その分子機構を理解する事が急務である。しかし、これまで多くの生化学的、分子遺伝学的研究結果が報告されているにもかかわらず、この分子機構は未だに不明な点が多い。その主な理由は、クロマチンの構造変化を引き起こす要因が非常に多岐にわたることに加えて、エピジェネティクス制御の際のクロマチン構造変化の道筋さえも解明されていない事実にある。

この問題を解決する方策として、構造生物学的手法が考えられる。立体構造解析は分子を直接的に‘観る’事を可能にする唯一の手段である。これまでもこのアプローチが生命現象の具体的な発見、理解に導き、また医学・生物学の基礎的分野、産業に関連したバイオテクノロジーの分野に大きなインパクトを与えてきた。しかし、クロマチンの構造変換とエピジェネティクス制御の関係を解明する研究では、顕著な構造生物学的成果が少ないことも事実である。そこで、本研究ではエピジェネティクス制御に起因したクロマチンリモデリングの分子機構を立体構造の観点から明らかにすることに狙いを定める。本研究では具体的な研究対象として、階層的クロマチン構造と関連し、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関与しているリモデリング因子 FACT を選択し、FACT とその関連因子がクロマチン構造にどのように結合し、影響を及ぼしているのかを立体構造の観点から解明する事を研究目的とする。本研究の目的が達成されれば、エピジェネティクス制御の分子機構解明に貢献する事ができる。

2. 研究成果

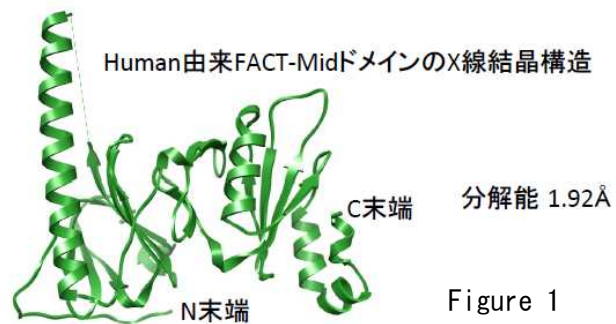
(1) 概要

まず、FACT 機能ドメインの探索を行ったところ、立体構造が未決定であった SPT16 サブユニットの Mid ドメインの結晶化に成功し、分解能 1.92 Å の立体構造解析に成功した。この FACT-Mid ドメインの立体構造は他の生物種間でも強く保存されていた。次にヒストンとの相互作用解析は、Human Mid ドメインが *Chaetomium thermophilum* 由来のものとは異なり、ヒストン H2A/H2B 二量体と強く結合しない事を示した。さらに、Human において H2A/H2B 二量体と強く相互作用する FACT の領域は、Mid ドメインではなく、酸性天然変性領域である事がわ

かった。また、ゲルろ過解析の結果は、FACT の酸性領域が H2B 塩基性領域と相互作用する事を示した。以上の結果をもとに、FACT 酸性領域がヌクレオソーム中の H2B 塩基性領域と相互作用する事でクロマチンリモデリング反応を誘起する事がわかった。このように、クロマチンリモデリング因子 FACT がクロマチン構造にどのように結合し、影響を及ぼしているのかを立体構造の観点から明確にした。

(2) 詳細

Human 由来 FACT を H2A/H2B 二量体、H3/H4 四量体、ヒストン八量体と複合体を形成させ、立体構造解析を行った。まず、X 線結晶構造解析については、結晶化及び複合体形成に最適な FACT 機能ドメインの探索を行ったところ、立体構造が未決定であった SPT16 サブユニットの

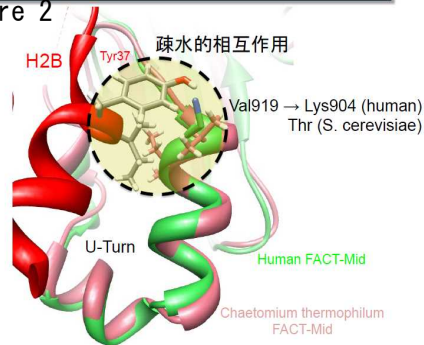


Midドメインの結晶化に成功した。SPRing8にてこの結晶の回折データを収集し、X線結晶構造解析を行ったところ、分解能 1.92 Å の立体構造解析に成功した (Figure 1)。その構造は、二つの PHドメイン構造から構成され、さらに、C 末端にこれまで例のなかった U-turn とよばれる短い α -ヘリックス 3 本からなる構造体が発見された (Figure 1)。この構造は内部の疎水的なコアで安定化している点が特徴的である。静電ポテンシャルマップを作製したところ、Mid ドメインの分子表面が表側と裏側で電荷状態が正負、全く逆になる事がわかった。これは、他の PH ドメイン構造をもつ蛋白質には見られない特徴である。さらに、形成させた FACT-ヒストン複合体のストイキオメリーや構成因子をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで詳細に解析した。その結果を踏まえた上で、ヒストン H2A/H2B 二量体との複合体の X 線結晶構造解析を試みたが、構造決定にはいたらなかった。

ところで、ほぼ同時期に *Saccharomyces cerevisiae* と *Chaetomium thermophilum* 由来の Mid ドメインの X 線結晶構造が報告された。これらの構造を我々のもの (human 由来) と比較したところ、ループ構造でいくつか相違が見られるものの、骨格となる構造はほとんど同じであった。Human で決定された U-turn 構造は、*S. cerevisiae* では認められなかったが、*C. thermophilum* ではほぼ同じ構造が存在した。静電ポテンシャルマップも同様に比較したところ、分子表面の電荷状態はほとんど同じであった。

上記の報告に加えて、*C. thermophilum* 由来 FACT-Mid ドメインと H2A/H2B 二量体の複合体の X 線結晶構造が報告された。この結晶構造において、さきほどの U-turn 構造が H2B の N 末端 α ヘリックスを認識していることが明らかとなった。その相互作用の中心は、疎水性残基であった。しかしながら、human 由来の U-turn 構造では、それらの相互作用を構成している疎水性残基の一つが塩基性残基 (K904) に置換されており、ヒストンとの疎水的相互作用が弱められている可能性がある (Figure 2)。そこでまず、この変異 (K904V) を human 由来 Mid ドメインに導入し、ヒストンとの相互作用解析を行った。ゲルろ過解析の結果、H2A/H2B 二量体に対して、この変異体は野生型と同様に安定な複合体を形成せず、ほとんど相互作用しない事

FACT-Midドメイン U-turn構造におけるH2Bとの疎水的相互作用
Figure 2



がわかった。また、この他にもMidドメインに様々な変異を導入し、ヒストンとの相互作用を調動べたが、有意に親和性が上昇する変異は見つからなかった。つまり、*C. thermophilum* 由来 FACT と human ではヒストン H2A/H2B 二量体との結合様式が異なる可能性が示唆された。

最近、yeast H2B の N 末端の塩基性領域は、yeast FACT がヌクレオソームに結合し、H2A/H2B を除去するために重要な役割を果た

す事が報告された。それに対して、*C. thermophilum* 由来 FACT-Midドメインと *Xenopus* 由来 H2A/H2B 二量体の立体構造解析で示された相互作用領域は、上記の塩基性領域とは異なり、より内部の α ヘリックスを形成している Ile39 などの疎水性残基であった。そこで、human FACT と human H2A/H2B 二量体の結合でも、同様の塩基性領域が必要であるか否かを調べた。ゲルろ過解析の結果、human ではこの塩基性領域が結合に必要な事がわかった。また、相互作用解析の結果は、Human において H2A/H2B 二量体と相互作用する領域は Midドメインではなく、その C 末端側にある酸性天然変性領域である事を示した。つまり、この FACT 酸性領域がヌクレオソーム中の H2B 塩基性領域と相互作用する事でクロマチンリモデリング反応を誘起する事が示唆された。

以上のすべての結果を基に、クロマチンリモデリング因子 FACT がクロマチン構造にどのように結合し、影響を及ぼしているのかを立体構造の観点から明確にした。

3. 今後の展開

エピジェネティクス制御に関連した階層的クロマチン構造はいまだに不明な点が多い。発生初期においては、おそらく多数のクロマチンリモデリング因子や転写因子が階層的なクロマチンの領域を正確に制御しながら生物個体として分化させ、その状態を維持するために機能している。本研究アプローチは、これらの因子の研究にも十分適応可能なものであり、将来モデルケースとなる可能性がある。例えば、未だ全容が明らかとなっていないポリコーム複合体による階層的クロマチン形成メカニズムの解明にも本研究アプローチを適応する事で、立体構造の観点から分子レベルで明確にしたい。さらに壮大なプロジェクトとして、核内受容体がクロマチン上の特異的な遺伝子配列に結合するところから、Coactivator-mediator 複合体をリクルート→初期的なクロマチンリモデリングを誘発→RNA pol II complex をリクルート→本格的なクロマチンリモデリングによる転写伸長に至るまでの転写活性化の全過程も同じ研究アプローチでいつの日か解明できるかもしれない。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

X線結晶構造解析及び、生化学的実験手法を用いて、クロマチンリモデリング因子 FACT によるヌクレオソーム構造変換機構の構造基盤の一端を明らかにすることができた。本研究結

果は、Human 由来 FACT が真菌などの他の生物種のものとは異なるヒストン認識機構をもつ事を明確にした。この事により、リモデリング因子 FACT が高等真核生物の生体内階層的クロマチン構造にどのように結合し、影響を及ぼしているのかについて、有用な知見を与える事ができた。今回の研究を今後発展させることでクロマチン構造が影響する遺伝子発現制御の分子機構解明に十分貢献する事ができると考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

エピジェネティックな遺伝子発現制御に関係しているリモデリング因子がクロマチン構造にどのように結合し、影響を及ぼしているのか、構造生物学的なアプローチにより解析を行なった。FACT の機能ドメイン SPT16 サブユニットの Mid ドメインの結晶化に成功し、分解能 1.92 Å の立体構造解析を行った。ヒトにおいて H2A/H2B 二量体と強く相互作用する FACT の領域は、C 末に存在する酸性天然変性領域であり、この領域が H2B の N 末テールにある塩基性領域と相互作用することを明らかにした。競争はし烈であるが、構造を基盤にした研究は重要であり、今後とも着実な研究姿勢を続け欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Manami Hashimoto*, Noriyuki Kodera*, Yasuo Tsunaka*, Masayuki Oda, Mitsuru Tanimoto, Toshio Ando, Kosuke Morikawa, and Shin-ichi Tate. Phosphorylation-Coupled Intramolecular Dynamics of Unstructured Regions in Chromatin Remodeler FACT. *Biophys J.* (2013) 104, 2222-2234. (*First equal contribution)
2. Yong-Woon Han, Yasuo Tsunaka, Hiroaki Yokota, Tomoko Matsumoto, Gengo Kashiwazaki, Hironobu Morinaga, Kaori Hashiya, Toshikazu Bando, Hiroshi Sugiyama, and Yoshie Harada. Construction and characterization of Cy3- or Cy5-conjugated hairpin pyrrole-imidazole polyamides binding to DNA in the nucleosome. *Biomater. Sci.* (2014) 2, 297-307.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

特になし