

# 研究終了報告書

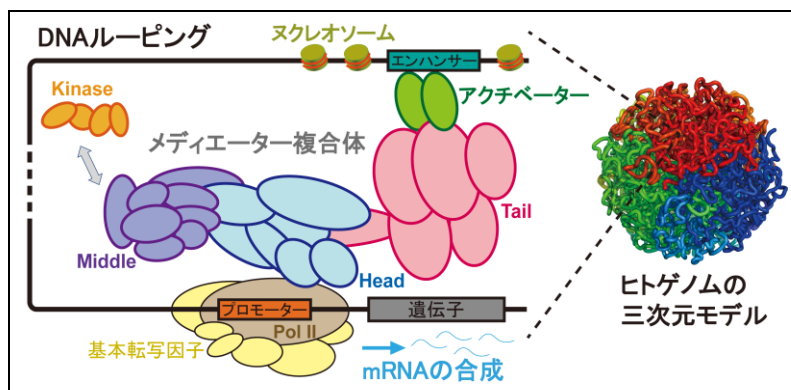
## 「遺伝子を活性化する DNA ルーピング機構の構造基盤の解明」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：野澤 佳世

### 1. 研究のねらい

ヒトは約2万種類のタンパク質から構成されるが、エンハンサーの数はその数十倍以上のものぼる。エンハンサーからの遺伝子活性化シグナルは、数キロから1 Mbpもの長鎖DNAを経てプロモーターへと伝わり、細胞の分化や発



生に応じたタンパク質の発現制御が可能となる(図1)。転写メディエーター(Med)は、真核生物特有の転写コファクターであり、エンハンサーDNAとプロモーターDNAを物理的に繋ぐDNAルーピング機構によって、ほぼすべてのタンパク質発現をコントロールしている。Medも含めたDNAループを理解し作り出すことは、高等真核生物を用いてGP-writeを実現させる上で、必須であると考えられる。Medを構成するモジュールのうちヘッドとミドルについては、プロモーター側で基本的な転写開始に関わることが明らかになってきたが、アクチベーター・タンパク質を介してエンハンサーDNAをリクルートするテール・モジュールやDNAループを解除するキナーゼ・モジュールに関する知見は非常に乏しい。加えて、最近では個別のMedサブユニットの変異が10種類以上の異なる組織のガンに関係していることが報告され、Medの疾患マーカーや薬剤の分子標的としての利用にも期待が高まっている。中でも、ガン原遺伝子の上流で多量のMedがクラスターを作り、遺伝子の異常な活性化を招くスーパーエンハンサー構造の解明は、DNAループ同士のクロストークを理解する上でも、非常に重要である。

本研究では、近年著しい革新を遂げているクライオ電子顕微鏡技術を中心に据え、Medによって制御されるDNAルーピング機構を解明したいと考えている。具体的には①DNAループのプロモーター側でどのようにしてMedとRNAポリメラーゼII(Pol II)が相互作用して、転写制御が行われているのかを明らかにし、②DNAループの解除機構を担うMedのキナーゼ・モジュールがDNAループの形成や転写を抑制する機構を解明する。③ではエンハンサーDNAと相互作用するアクチベーター・タンパク質群とそこに結合するMedのテール・モジュールを調製し、DNAループのエンハンサー側を構築し、最終的には、これらの材料を用いて、*in vitro*でDNAルーピング状態を再現し、任意の長鎖DNAの遺伝子制御機能を評価できるシステムを作りたいと考えている。

## 2. 研究成果

### (1)概要

これまで「さきがけ研究」では、基礎研究に適した分裂酵母を対象に遺伝子のオン・オフを規定する DNA の折り畳み構造の基本単位「DNA ループ」の構造に注目して研究を行ってきた。本提案の大きな成果は、クロマチン構造を模倣したヌクレオソーム・テンプレートと野澤が調製系を確立した Pol II を用いて、DNA ループの構成因子が転写に与える影響を評価できる系を構築したことである。本提案では、この *in vitro* 転写系を通じて、Med の機能最小単位であるコア・メディエーターを加えると Pol II のヌクレオソーム乗り越え効率を大きく促進することを見出した。また本提案では、ヌクレオソーム・テンプレートの作成過程で、ヒストン H3、H4 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)を形成することを見出し、その高分解能電子顕微鏡構造を解明した。国際共同研究で行った生体内部位特異的タンパク質間架橋実験からは、H3-H4 オクタソームが出芽酵母に存在していることが示され、新規のクロマチン基盤ユニットであることを証明した (論文投稿中)。また本提案では、上述した分裂酵母の解析以外にも、ヒト由来のキナーゼ・ジュールの調製系の構築や HeLa 細胞からの DNA ループの単離と構造観察の両方を実現するための構造解析スキームの作成など、応用研究に向けた取り組みも展開した。

### (2)詳細

#### 研究テーマ①「RNA ポリメラーゼ II の転写制御を行う転写メディエーターの構造・機能解析」

##### ・成果 A「分裂酵母 Pol II の調製系の構築」

共同研究にて、分裂酵母の内因性 Pol II の調製系を構築した。これまで研究室では酵母の培養系は存在しなかったが、研究遂行のため、酵母の培養システム、細胞破碎システムを導入した。最終的には 10 L の培養液から、170  $\mu\text{g}$  以上の高純度 Pol II タンパク質を精製することが可能となった。

##### ・成果 B「分裂酵母 Pol II と TFIIS、ヌクレオソーム・テンプレートを用いた *in vitro* 転写系の構築」

先行研究 (Kujirai *et al.*, Science 2018) を参考に、分裂酵母の系で初めてヌクレオソーム・テンプレートから転写される RNA 量を検出する系を確立した。転写のテンプレートは、ヒストン H2A、H2B、H3、H4、各 2 分子と 153 bp DNA に Pol II 結合の足場となるミスマッチ bubble DNA (45 bp)をライゲーションさせて作成し、転写産物の量は、反応液を尿素変性 PAGE にて展開し、プライマーに結合させた蛍光色 DY647 を検出することで定量した。転写実験の結果、本提案で調製した分裂酵母 Pol II と基本転写因子 TFIIS は、高い転写活性を有することも確認された。

##### ・成果 C「コア・メディエーター存在下における *in vitro* 転写活性の測定」

本提案の前段階として野澤は、Patrick Cramer 博士のもとで、Med の機能最小単位である、コア・メディエーターの調製系を確立していたため (Nozawa *et al.*, *Nature* 2017)、成果 B で構築した *in vitro* 転写系に添加し、その転写効率の変化を評価した。その結果、コア・メディエーター存在下では Pol II がヌクレオソームを乗り越える効率が~5 倍以上促進されることが明らかになった。これまで Med がプロモーター以外の遺伝子コード領域や転写終結領域で検出された例はいくつも報告されていたが (Guglielmi *et al.*, *Proc Natl Acad Sci.* 2007, Mukundan *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2011)、その明確な理由は分かっておらず、Med の主な役割は、転写が開始するまで Pol II をプロモーターに繋ぎ留めておくというのが通説だった。本成果をさらに検証して、Med が転写開始以降の「伸長」のフェイズで、クロマチン転写に関与していることが分かれば、大きな発見につながると考えられる。

#### ・成果 D「H3-H4 オクタソームの構造機能解析」

遺伝子の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はヒストン H2A、H2B の存在比率が少ないことが報告されており (Lai *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017)、これまでどの様な構造をとっているか不明だった。そこで本提案では、ヒストン H3、H4 のみから構成されるサブヌクレオソームがプロモーター付近に存在することを想定して、その構造機能解析を行った (図 2)。クライオ電子顕微鏡単粒子解析によって、ディスク構造の開き方の異なる 2 つのコンフォメーションそれぞれの電子顕微鏡構造を 3.6 Å、3.9 Å の分解能で解明することに成功し、H3-H4 オクタソームが通常

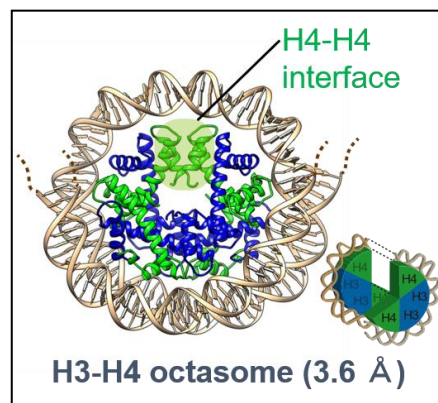


図 2 H3-H4 オクタソームのクライオ電子顕微鏡構造

通常に類似した概形を持つにもかかわらず、ヒストンのメチル化酵素やクロマチンリモデラーの足場として機能する、acidic patch を持たないユニークなヌクレオソームであることを解明した。また、ニューヨーク Stony Brook 大学の Ed Luk 博士との共同研究による生体内部位特異的タンパク質間架橋実験 (VivosX) により、H3-H4 オクタソームが出芽酵母の生体内に存在していることが証明された。VivosX 実験では、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側鎖 (H3\_R49) を選定して、そのシステイン変異を酵母に導入し、核抽出液中でこの相互作用を検出した。その結果、非還元状態で H3\_R49C ダイマーが検出され、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た。本成果については、プレプリントサーバーにて公表し、原著論文については、現在論文投稿中である。

#### 研究テーマ②「DNA ループの解除機構を担う Med のキナーゼ・モジュールの構造機能解析」

#### ・成果 A「キナーゼ・モジュールの発現系の構築」

共同研究により、応用研究を見据えてヒト由来キナーゼ・モジュールの発現系の構成を行った。キナーゼ・モジュールを構成する Med13、Med12、CycC、CDK8 のタンパク質遺伝子をポリシストロニックに 1 つベクターに導入した MultiBac ベクターを作成して、昆虫細胞 High5 での発現条件の検討を行ったところ、100 mL 培養液から、リン酸化活性のある高純度のキナーゼ・モジュールを 8 µg 得ることができた。今後培養系のスケールアップによって、構造解析や生化学解析に必要なタンパク質量を獲得できることが見込まれる。本研究を実施する前には、研究室で昆虫細胞での大量培養系や High5 株での発現系は立ち上がっていなかったため、そのシステムの構築も行った。また、分裂酵母由来のキナーゼ・モジュール 4 サブユニットについては、大腸菌での共発現ベクターを作成した。

### 研究テーマ③「アクチベーター・タンパク質群と Med テール・モジュールの構造機能解析」

#### ・成果 A「アクチベーター・タンパク質群の発現系の構築」

出芽酵母の Med タンパク質のインタラクトーム解析の先行論文(Uthe *et al.*, *Scientific Reports* 2017) を参考に、分裂酵母のアクチベーター・タンパク質を 10 つ選定し、cDNA ライブラリーからの遺伝子クローニングと大腸菌発現ベクターの構築を行った。Ni-NTA レジンをういたプルダウン精製の結果、7 つのタンパク質について大腸菌での発現が確認されたため、今後はこれらのタンパク質の精製系も構築したいと考えている。

#### ・成果 B「ホロ・メディエーターの大腸菌発現ベクターの構築」

テール・モジュールを構成する 3 サブユニットと C 末端側を含む Med14 全長を分裂酵母のコア・メディエーター大腸菌の共発現ベクターに組み込むことで、19 サブユニットのホロ・メディエーターの発現ベクターを作成することができたため、今後はその発現条件の検討を行う。

### 領域内共同研究「HeLa 細胞核から抽出した DNA ループ複合体の構造機能解析」

#### ・成果 A「ストレプトアビジン・グリットの作成」

CREST 研究代表者である白髭 克彦博士は、エンハンサーとプロモーター配列を含むビオチン化基質 DNA を HeLa 細胞の核抽出液と反応させることで、DNA ループを再構成する技術を確立されていたため、その電子顕微鏡構造をストレプトアビジン (SA) グリットで観察する共同研究を進めた。SA グリットには、ビオチン化基質 DNA を固定することが可能であるため、HeLa 細胞の核抽出液をそのグリットと反応させることで内因性の DNA ループをグリット上で直接精製し、カラム精製などを一切行わずにそのままクライオ電子顕微鏡で観察することができる。野澤はこれまでに、ビオチン化脂質を電子顕微鏡観察グリットに固定し、その上でストレプトアビジン

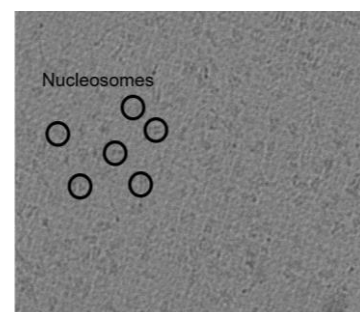


図 3 Streptavidin グリット上のヌクレオソーム

ンの 2 次元の結晶のシートを作り、DNA ループの基質となるビオチン化 DNA フラグメントやビオチン化ヌクレオソームをグリッド上に整列させることに成功した (図 3)。今後は SA グリッドを HeLa 細胞の核抽出液と反応させた上で DNA ループが再構成されるかどうかを、クライオ電子顕微鏡で観察する予定である。

### 3. 今後の展開

・本提案では、DNA ループのプロモーター側のクロマチン構造を模倣した転写テンプレートを作成し、DNA ループの構成因子が転写に与える影響を評価するシステムを構築した。今後は、DNA ループのエンハンサー側を構成する DNA や Med のテール・モジュール、アクチベーター、DNA ループの解除を担う Med のキナーゼ・モジュールの調製系を確立し、DNA ループの *in vitro* 再構成系を完成させ、任意の長鎖 DNA の遺伝子制御機能を評価できるシステムを作りたいと考えている。DNA ループの構成因子は、高等真核生物まで保存されているため、本提案で調製した DNA ループの材料とゲノム DNA のプール、転写量をハイスループットで定量できるシステムを組み合わせられれば、生体内の機能未知の DNA 配列の遺伝子活性化能力を測定できるようになると考えている。

・本提案で構造解析された H3-H4 オクタソームは、これまでクロマチン構造の単位としては全く想定されておらず、MNase-seq 法などの従来のゲノム解析技術では、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。今後、本提案の研究を継続することで、HeLa 細胞の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いる。

・本提案で作成を進めている SA グリッドで DNA ループを直接観察するシステムは、転写の研究のみならず DNA 修復や複製といったゲノム機能の解析にも応用が可能である。SA グリッドは、特定のターゲットを均一にグリッド上に固定することが可能であるため、クライオ電子顕微鏡での構造解析に迅速化の道を拓くと考えられる。この技術を創薬技術に応用すれば、薬剤スクリーニングと同時にその標的タンパク質との複合体の構造解析も行える新しいプラットフォーム技術としての利用が期待される。

### 4. 自己評価

DNA ループを *in vitro* 再構成するためには、40 種類以上の精製タンパク質が必要となるが、本提案では、そのほとんどを獲得することができた (DNA ループのプロモーター側に結合するコア・メディエーター: 16 サブユニット、分裂酵母由来内因性 Pol II、Pol II の伸長因子の TFIIIS、クロマチン構造の基本単位であるヌクレオソームを含む転写用の DNA テンプレート: 198 bp DNA+ヒストン 8 量体、エンハンサーと相互作用するアクチベーター・タンパク質の候補 7 種)。現在、発現系の構築が必要なのは、Med のうち、エンハンサー側に結合するテール・モジュール 3 サブユニットとキナーゼ・モジュール 4 サブユニットを残すのみである。また研究開始当時は、研究参画者はいなかったが、さきがけ期間中に研究補助者 1 名を雇用し、3 名の学生とともに研究を推進できる体制を整えることができ、本年 4 月からは東京工業大

学の独立准教授として研究室を主宰することになった。加えて研究期間を通じて、2つの外部共同研究、1つの国際共同研究、3つの共同研究を展開し、研究の幅も分裂酵母からヒトの系へと拡張することができた。DNA ループはゲノム折り畳み構造の基盤であるため、この構造を試験管内で組み合わせることができれば、腫瘍細胞特異的なスーパーエンハンサーを再現することも可能だと考えられ、今後の DNA ループ再構成系の発展性は極めて高いと考えられる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. M, Nishimura., Y, Arimura., **K, Nozawa.**, H, Kurumizaka.

Linker DNA and histone contributions in nucleosome binding by p53

*J Biochem.*, **168** (6), 669–675 (2020).

概要: 本成果は博士課程 3 年生の西村 正宏君が、申請者の指導のもと実施した。本研究では、ガン抑制因子である p53 が、クロマチン構造変換を誘起するパイオニア転写因子として働くメカニズムを示した。生化学実験を通じて①ヌクレオソーム中のリンカー DNA が p53 との複合体形成に必要であること、② p53 はヌクレオソームの entry/exit 領域に標的 DNA 配列がある時、特異的な複合体を形成すること③p53 の N 末端領域が、ヌクレオソーム中のヒストン H3-H4 複合体と直接相互作用することが明らかとなった。

### (2) 特許出願

・出願実績なし

### (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)

#### <学会発表(招待講演)>

1. **K, Nozawa.**, P, Cramer., H, Kurumizaka

Structural analysis of the Mediator complex in the eukaryotic transcription “日本プロテオーム学会 2021 大会”

徳島大学 (2021 年 7 月 19 日- 2021 年 7 月 21 日)

2. **K, Nozawa.**, TR, Schneider., P, Cramer.

Crystallographic and biochemical studies of the Mediator complex provide an insight into the phosphorylation mechanism of the RNA polymerase II CTD

“16th Conference of the Asian Crystallographic Association”

National University of Singapore (18 Dec. – 21 Dec., 2019)

#### <受賞>

1. M, Nishimura., Y, Arimura., **K, Nozawa.**, H, Kurumizaka.

日本生化学会 JB 論文賞 (2021)

<総説>

1. 野澤佳世

超分子複合体の立体構造解析を目指したストラタジー～転写メディエーターの X 線結晶構造解析を例として～

蛋白質科学会アーカイブ, 12, e093 (2019)

2. M, Nishimura., K. Nozawa., H, Kurumizaka.

Crystallographic analysis of the overlapping dinucleosome as a novel chromatin unit

Biophysics and Physicobiology, 12, 251–254 (2018)