

パイオニア転写因子による標的ヌクレオソーム認識機構の解析

研究代表者 小山 昌子
(理工学術院総合研究所 次席研究員)

1. 研究課題

パイオニア転写因子は、クロマチンの基本構造単位であるヌクレオソームの中に存在する DNA 塩基配列に結合して、他の転写因子群やクロマチンリモデリング因子を呼び込むとともに近傍のクロマチンの構造変換を誘起する。本研究では、細胞の初期化に重要なパイオニア転写因子である Oct4 に着目し、Oct4 が標的ヌクレオソームに結合するメカニズムを生化学的・構造生物学的解析により明らかにすることを目的とする。

2. 主な研究成果

Oct4 が標的ヌクレオソームに結合するメカニズムを生化学的・構造生物学的手法により解析するために、まずは Oct4 の標的となるヌクレオソームを作製した。そのために、先行研究の結果から Oct4 が結合してかつヌクレオソームが形成されることが分かっているゲノム領域の DNA 断片を、PCR 法によって大量に増幅し精製した。精製した DNA と、リコンビナントタンパク質として精製したヒトの 4 種類のコアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) を用いて、塩透析法によって標的ヌクレオソームを試験管内で再構成した。再構成したヌクレオソームを分取用電気泳動装置 (プレップセル) によって高純度に精製した。さらに、ヒトの Oct4 をリコンビナントタンパク質として大腸菌で発現させ、高純度に精製した。精製した Oct4 と標的ヌクレオソームを用いて、ゲルシフト法による結合解析を行った結果、Oct4 は標的ヌクレオソームに効率的に結合することを確認した。

Oct4 のヌクレオソーム上での結合位置を明らかにするために、さまざまな DNA 断片やヌクレオソームを競合相手として、Oct4 と標的ヌクレオソームとの結合解析を行った。その結果、Oct4 が結合する DNA 領域を絞り込むことができた。さらに、Oct4 とヒストンとの結合解析を行い、Oct4 がヒストンに結合するという結果を得た。これらの結果から、Oct4 は標的ヌクレオソーム中の標的塩基配列 DNA とヒストンとの両方に協調的に結合することで、標的ヌクレオソームに結合するという可能性が示唆された。さらに、標的ヌクレオソームの DNA 配列上でのポジショニングと、Oct4 の結合が標的ヌクレオソームのポジショニングに与える影響を解析するために、ケミカルマッピング法により試験管内でヌクレオソームポジショニングを解析する系を立ち上げた。この方法により、標的ヌクレオソームのポジショニングを明らかにし、さらにこのヌクレオソームポジショニングは Oct4 の結合によって変化しないことを明らかにした。以上の結果から、Oct4 はゲノム上に無数に存在する標的塩基配列の中から、標的ヌクレオソームの特定の部位を認識して、高い親和性で結合すると考えられる。

Oct4 の標的ヌクレオソームへの結合メカニズムを原子レベルで解明するために、Oct4-標的

ヌクレオソーム複合体の立体構造の解明を目指した。X線結晶構造解析を行うために、Oct4-標的ヌクレオソーム複合体の結晶化を行い、SPring-8 および Photon Factory において X線照射実験を行い、8 Å 分解能程度の回折データを得た。また、クライオ電子顕微鏡による解析を行うために、サンプルの調製条件の検討を行った。

3. 共同研究者

胡桃坂 仁志 (先進理工学部・教授)

4. 研究業績

4.1 学術論文

Y. Takizawa, H. Tanaka, S. Machida, M. Koyama, K. Maehara, Y. Ohkawa, P. A. Wade, M. Wolf, and H. Kurumizaka, Cryo-EM structure of the nucleosome containing the ALB1 enhancer DNA sequence, *Open Biol.*, **8**, 170255 (2018).

Koyama, M., Hirano, H., Shirai, N. and Matsuura, Y. Crystal structure of the Xpo1p nuclear export complex bound to the SxFG/PxFG repeats of the nucleoporin Nup42p, *Genes Cells*, **10**, 861-875 (2017).

Koyama, M., Sasaki, T., Sasaki, N. and Matsuura, Y. Crystal structure of human WBSR16, an RCC1-like protein in mitochondria, *Protein Sci.*, **26**; 1870-1877 (2017).

Koyama, M. and Matsuura, Y. Crystal structure of importin- α 3 bound to the nuclear localization signal of Ran-binding protein 3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **491**; 609-613 (2017).

4.2 総説・著書

M. Koyama and H. Kurumizaka, Structural diversity of the nucleosome, *J. Biochem.*, **163**, 85-95 (2018).

小山昌子, 胡桃坂仁志 パイオニア転写因子によるクロマチン構造変換 (特集: 核内イベントの時空間制御), *生体の科学*, **68**; 229-232 (2017).

4.3 招待講演

なし

4.4 受賞・表彰

なし

4.5 学会および社会的活動

Koyama, M., Nagakura, W., Kuroda, A. and Kurumizaka, H. Biochemical analyses using purified *S. pombe* histones, EMBO CONFERENCE, The Nucleosome: From Atoms to

Genomes., 2017年9月, ドイツ・ハイデルベルク.

小山昌子, 水上優夏, 胡桃坂仁志, パイオニア転写因子の結合が標的ヌクレオソームに与える影響の解析, 生殖エピゲノム・クロマチン動構造合同若手勉強会, 2017年6月, 和歌山県.

小山昌子, 水上優夏, 島林秀伎, 胡桃坂仁志, Oct4 がヌクレオソーム構造中の標的塩基配列に結合する機構の解析, 新学術領域研究クロマチン動構造第5回班会議, 2017年7月, 北海道.

5. 研究活動の課題と展望

Oct4-標的ヌクレオソーム複合体の立体構造を解明するために、高分解能まで回折する複合体の結晶を作製する。そのために、DNA 配列や Oct4 断片のコンストラクトや精製条件を検討する。また、並行してクライオ電子顕微鏡による構造解析も行う。これらの解析により、Oct4 が標的ヌクレオソームを特異的に認識して結合するメカニズムを明らかにする。