

遺伝情報の維持と継承の分子機構：

染色体基本構造と DNA 組換え機構の解明を目指して

研究代表者 胡桃坂 仁志
(先進理工学部 電気・情報生命学科 教授)

1. 研究課題 遺伝情報の維持と継承の分子機構：染色体基本構造と DNA 組換え機構の解明を目指して

生物の遺伝情報は DNA として維持され継承されており、真核生物において、DNA はヒストンタンパク質からなるヌクレオソームを基本構造としている。ヌクレオソーム構造が折り畳まれて形成されるクロマチン構造は、長大な DNA を細胞核内に収納するだけでなく、動的に変化することによりゲノムの機能を制御している。そのため、クロマチン構造の変化は、遺伝情報が正常に維持され継承されるメカニズムの根幹を成す。

本研究課題では、染色体の基本構造であるヌクレオソームを試験管内で再構成し、原子分解能での構造解析と生化学的解析により、遺伝情報を正確に維持し継承するための分子機構を明らかにすることを旨とする。

2. 主な研究成果

(1) 染色体基本構造を試験管内において再構成し、立体構造を解析した

真核生物の DNA は、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 からなるヒストン 8 量体に約 1.7 回巻き付いたヌクレオソームを基本単位としている。ヌクレオソームは、それを構成するヒストン亜種の種類や翻訳後修飾により、立体構造や安定性の違い、および特異的な因子の呼び込みによりゲノムの機能を調節している。研究代表者は、ヌクレオソームを試験管内で再構成し、詳細な立体構造を解析することにより、クロマチンによるゲノム機能の制御メカニズムを解析してきた。本研究課題では、遺伝子の発現を制御する多様な染色体基本構造を試験管内で再構成し、立体構造を解析した。

遺伝子発現制御領域に形成されるヌクレオソーム-ヌクレオソーム融合体を再構成し、X 線結晶構造解析によって立体構造を解析した。この構造は、通常形成されるヒストン 8 量体からなるヌクレオソームと、ヒストン 8 量体から H2A-H2B が抜けた 6 量体からなるヌクレオソームが融合した、ヒストン 14 量体に DNA が 3 回巻き付いた新規のヌクレオソーム構造であることを明らかにした (図 1, Kato et al., Science, 2017)。生体内における遺伝子の転写活性化には、ATP 加水分解のエネルギーを使いヌクレオソームの位置やクロマチン構造を変化させるクロマチンリモデリング反応が必要である。本研究で示した新規ヌクレオソーム構造はクロマチンリモデリング中間体であると考えられており、遺伝子発現とクロマチン構造の制御に関する研究に新たな展開が期待される。また、肝発生において鍵となる転写因子 FoxA1 の

結合配列を含む内在性遺伝子の発現制御領域を用いてヌクレオソームを再構成し、クライオ電子顕微鏡により解析を行なった。これにより、生体内に存在する遺伝子制御領域に形成されるクロマチン構造を明らかにした (Takizawa et al., *Open Biol.*, 2018)。ヒトにおいて新たに同定したヒストン H3 の亜種である H3.6 を含むヌクレオソームを再構成し、生化学的手法によりダイナミクスを解析した。その結果、H3.6 を含むヌクレオソームは、通常形成されるヌクレオソームと比較して不安定であることを明らかにした。ヒストン H3.6 を含むヌクレオソームの X 線結晶構造を解析することにより、ヒストン亜種が転写活性化に関わる機構を提唱した (Taguchi et al., *Biochemistry*, 2017)。

ヘテロクロマチンは、遺伝子の発現や組換えを抑制し染色体の安定性を維持する重要な構造体である。従来、ヌクレオソームが凝集した構造であると考えられてきたが、その詳細はほとんど不明であった。本研究課題では、ヘテロクロマチンの基盤構造を形成する HP1 タンパク質-クロマチン複合体を試験管内で再構成し、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析により立体構造を解析した。本研究の成果から、HP1 とヌクレオソームにより形成されるヘテロクロマチンの基盤構造が、これまで考えられてきた密な構造とは異なり、様々なクロマチン構造調節因子の相互作用が可能な構造であることが明らかになった (図 2, Machida et al., *Mol. Cell*, 2018)。本成果により、ヘテロクロマチンの形成機構や機能が明らかになることが期待される。

本研究課題で明らかにした染色体の基本構造は、クロマチンによる遺伝子発現制御に関する研究に重要な基盤情報を提供している。

(2) 染色体相同組換えの機構を明らかにするため、DNA 組換えにおいて中心的な役割を果たすタンパク質の生化学的性質や立体構造を解析した

減数分裂は、ヒトなどの高等動物から酵母などの単細胞生物に至るまで、有性生殖を行なう生物においてゲノムを子孫に継承するための重要なプロセスである。高等動物では体細胞から卵子や精子などの配偶子を作る、通常の体細胞分裂とは異なる様式の細胞分裂である。減数分裂期には、父母に由来する相同染色体が互いを認識して対合し、相同染色体間の組換えが起こる。この際、クロマチンを含む巨大な構造物であるシナプトネマ複合体が形成され、相同染色体の対合と乗換えにより DNA の交差構造が生じる。この構造はキアズマと呼ばれ、正常な染色体分配を保証し、形成不全は染色体異数性に起因した疾患の原因となる。研究代表者は、クロマチン上で起こる DNA 組換えのメカニズムを明らかにすることを目的とし、相同染色体組換えを促進するタンパク質群の機能を解析してきた。本研究課題では、様々な細胞において相同染色体の対合反応を促進する RAD51、同活性を有し減数分裂期特異的に機能する DMC1 に注目した。組換えに関与するタンパク質をリコンビナントタンパク質として精製し、試験管内で相同組換え反応系を解析した。その結果、シナプトネマ複合体に含まれキアズマ形成を促進するタンパク質である SYCP3 が RAD51 に結合することにより、RAD51 に依存した相同鎖検索を抑制することを明らかにした (Kobayashi et al., *Genes Cells*, 2017)。本成果から、減数分裂期組換えでは、RAD51 による対合活性が抑制されることにより DMC1 依存的対合反応が促進されるモデルを示し、クロマチン上で起こる減数分裂期組換えの機構に新たな知見を加えた。

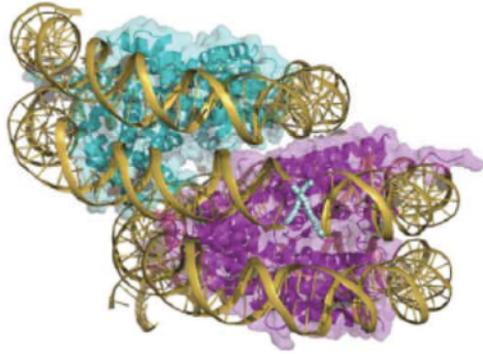


図1 転写制御領域に形成されるヌクレオソーム-ヌクレオソーム融合体のX線結晶構造 (Kato et al., Science, 2017)

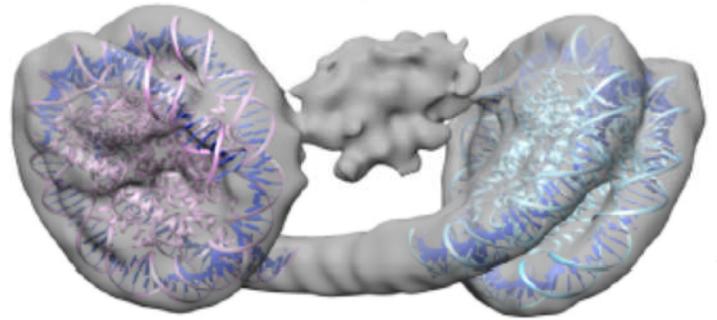


図2 HP1を含むヘテロクロマチンの基盤構造。クライオ電子顕微鏡による単粒子解析から再構築した立体構造 (Machida et al., Mol. Cell, 2018)

3. 共同研究者

堀越 直樹 (理工学術院総合研究所 次席研究員)
 小山 昌子 (理工学術院総合研究所 次席研究員)

4. 研究業績

4.1 学術論文

Y. Okamoto, M.W. Iwasaki, K. Kugou, K.K. Takahashi, A. Oda, K. Sato, W. Kobayashi, H. Kawai, R. Sakasai, A. Takaori-Kondo, T. Yamamoto, M.T. Kanemaki, M. Taoka, T. Isobe, H. Kurumizaka, H. Innan, K. Ohta, M. Ishiai, M. Takata, Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes, *Nucleic Acids Res.*, in press (2018).

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

S. Machida, Y. Takizawa, M. Ishimaru, Y. Sugita, S. Sekine, J. Nakayama, M. Wolf, H. Kurumizaka, Structural Basis of Heterochromatin Formation by Human HP1, *Mol. Cell*, **69**, 385-397 (2018)

T. Fuse, K. Katsumata, K. Morohoshi, Y. Mukai, Y. Ichikawa, H. Kurumizaka, A. Yanagida, T. Urano, H. Kato, M. Shimizu, Parallel mapping with site-directed hydroxyl radicals and micrococcal nuclease reveals structural features of positioned nucleosomes in vivo, *PLoS One*, **12**, e0186974 (2017)

W. Kobayashi, N. Hosoya, S. Machida, K. Miyagawa, H. Kurumizaka, SYCP3 regulates strand invasion activities of RAD51 and DMC1. *Genes Cells*, **22**, 181-189 (2017).

S. Inano, K. Sato, Y. Katsuki, W. Kobayashi, H. Tanaka, K. Nakajima, S. Nakada, H. Miyoshi, K. Knies, A. Takaori-Kondo, D. Schindler, M. Ishiai, H. Kurumizaka, M. Takata, RFW3-mediated ubiquitination promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination, *Mol. Cell*, **66**, 622-634 (2017).

H. Taguchi, Y. Xie, N. Horikoshi, K. Maehara, A. Harada, J. Nogami, K. Sato, Y. Arimura, A. Osakabe, T. Kujirai, T. Iwasaki, Y. Semba Y, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Crystal structure and characterization of novel human histone H3 variants, H3.6, H3.7, and H3.8, *Biochemistry*, **56**, 2184-2196 (2017).

D. Kato, A. Osakabe, Y. Arimura, Y. Mizukami, N. Horikoshi, K. Saikusa, S. Akashi, Y. Nishimura, S.Y. Park, J. Nogami, K. Maehara, Y. Ohkawa, A. Matsumoto, H. Kono, R. Inoue, M. Sugiyama, H. Kurumizaka, Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. *Science*, **356**, 205-208 (2017).

S. Barral, Y. Morozumi, H. Tanaka, E. Montellier, J. Govin, M. de Dieuleveult, G. Charbonnier, Y. Couté, D. Puthier, T. Buchou, F. Boussouar, T. Urahama, F. Fenaille, S. Curtet, P. Héry, N. Fernandez-Nunez, H. Shiota, M. Gérard, S. Rousseaux, H. Kurumizaka, S. Khochbin, Histone variant H2A.L.2 guides transition protein-dependent protamine assembly in male germ cells, *Mol. Cell*, **66**, 89-101 (2017).

4.1 総説・著書

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

M. Ishiai, K. Sato, J. Tomida, H. Kitao, H. Kurumizaka, M. Takata. Activation of the FA pathway mediated by phosphorylation and ubiquitination. *Mutat Res.*, **803-805**, 89-95 (2018)

4.2 招待講演

国際学会

“Chromatin contribution in DNA repair”, The 6th US-Japan DNA Repair Meeting, Clark-Kerr Campus, Berkeley, California, May 2017

“Structural versatility and dynamics of chromatin units” (タイトル変更: Structural studies of the nucleosome-nucleosome interaction), EMBO CONFERENCE “The Nucleosome: From Atoms to Genomes”, EMBL Heidelberg, Germany, August 2017

“Structural studies of reconstituted chromatin units” HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, Helmholtz Zentrum München, Großhadern, September 2017

“Structural Biology of Epigenetic Chromatin Regulation”, 15th Chinese Biophysics Congress, Shanghai, November 2017

“Nucleosome Remodeling and Structure”, INDO-JAPAN Conference (2018): Epigenetics, Human Microbiomes and Disease, Human Microbiomes and Disease, Bose Institute, Kolkata, February 2018

国内学会

“エピジェネティクスの制御基盤としてのクロマチン構造多様性”, DSSB シンポジウム, 横浜理研, 2017年6月

“ヌクレオソームの構造と動的多様性によるゲノムDNA機構制御”, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 2017年6月

“ゲノム DNA 機能制御のクロマチン構造基盤”, 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 大阪大学,

2017年8月

“ヌクレオソームのリモデリング機構”，第76回日本癌学会学術総会，パシフィコ横浜，2017年9月

“クロマチン構造とゲノム機能制御機構”，平成29年度遺伝研研究会，国立遺伝学研究所，2017年10月

“クロマチンの高次構造とダイナミクスの相関構造解析”，第31回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム，つくば国際会議場，2018年1月

“クロマチンコーディングの構造基盤”，染色体研究の最前線2018，東京工業大学すずかけ台キャンパス，2018年3月

4.3 学会および社会的活動

主催：文部科学省科学研究費補助金新学術領域「動的クロマチン構造と機能」一般公開シンポジウム、2018年1月、東京

共催：文部科学省研究費補助金新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」「ステムセルエイジングから解明する疾患原理」「動的クロマチン構造と機能」3領域合同若手勉強会2017、2017年6月、和歌山

講演：『エピジェネティクス：生命の源である遺伝子の新しい制御メカニズム』、早稲田大学商議会、2017年7月、東京

講演：『エピジェネティクス研究と創薬のための再構成クロマチンの産生と性状解析』、平成29年度創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム公開シンポジウム、2017年8月30日、東京

講演：『自動化によって得られたものは？』、量子ビームサイエンスフェスタ、2018年3月、茨城

5. 研究活動の課題と展望

ヌクレオソーム間の立体配置や、ヌクレオソーム結合因子とヌクレオソームとの相互作用は、クロマチン構造を変化させゲノムの機能を制御する。今後は、より高次クロマチンや複合体を試験管内で再構成し、構造と機能を解析する必要がある。