

研究報告書

「クロマチン構築に連携した転写dynamicsの構造解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 山田 和弘

1. 研究のねらい

真核生物の細胞核は、数 μm 幅の球状領域であるが、その微小空間に、直径僅か 2nm とはいえ合計長さが 2m に及ぶ染色体 DNA が収納されている。この高度に DNA を凝集・パッキングする機構を支える基本単位がヌクレオソームと呼ばれる円盤状の構造である。この構造では 4 種類の塩基性タンパク質・ヒストン(H2A, H2B, H3, H4)がそれぞれ2コピーずつ集まり、ヒストンオクターマーを構成し、これに二重鎖 DNA が反時計回りに約 1.75 周巻き付いてヌクレオソームとなる。このヌクレオソーム構造は、染色体 DNA 上におおよそ数十 b.p.毎に存在し、理論的には beads on the string(10nm 構造)と呼ばれる 1 次元的な周期構造を成すが、各ヌクレオソームは、実際には相互に作用し合い two-start-model(30nm 構造)と呼ばれる 3 次元的に幅のあるファイバー構造を形成する。この繊維状の高次構造が、染色体の凝集やパッキング機能の根幹を成す機構である。

染色体上のコード遺伝子はエピジェネティクス的に活性化されると、この高次ファイバー構造は unfold されることが観察されているが、その状態下でも 10nm 構造は染色体構造に残ると予想される。この 10nm 構造にある周期的なヌクレオソームは、転写伸長時の RNA ポリメラーゼ (Pol-II) にとって mRNA 伸長反応の物理的な障害となるが、種々の実験から Pol-II 自身には転写前方にあるヌクレオソームを解体・取り外し転写を継続する活性が極めて低いことが証明されている。従って、in vivo に於ける転写時には、Pol-II に種々の補助因子、例えばヒストンシャペロン因子・クロマチンリモデリング因子等が結合して超分子複合体を形成し、これがヌクレオソームを解体・撤去・再構築しつつ、同時進行で mRNA の転写伸長反応を促進することが想定されている。

しかしながら、この機構を支える超分子複合体に関しては、それに含まれる分子種の多数が大よそ同定されたとはいえ、あくまで proteomics データ解析の段階に留まっており、複合体に含まれる分子の stoichiometry を初めとして、その物理化学的安定性やヌクレオソームに対する生化学的機能など、構造生物学的アプローチを開始する前段階のレベルに於いても不明な点が多い。本研究ではこの現状を踏まえ、酵母に於ける超分子複合体の物理化学的解析・生化学的解析から研究をスタートをさせ、この研究結果を足掛かりに、Cryo 電顕・X 線結晶解析を用いた原子レベルでの構造解析に繋げ、これらの統合的データから超分子複合体の持つヌクレオソームプロセス反応と転写伸長反応の両者機能リンクの詳細を、構造生物学的に明らかとすることを目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

ヌクレオソーム構造を物理的に disassemble しつつ mRNA の伸長反応を促進する役割を持つ因子群の組合せは in vivo に於いて幾つか考えられる。しかしながら、そのうちの minimum

essential なものは、クロマチンリモデリング因子 CHD1(C)、ヒストンシャペロン因子 FACT(F)、これら両者を Pol-II と物理的・機能的にリンクしつつ modulate させる役割を果たす PAF1c(P) の、計 3 因子モジュールで構成される複合体に相当する点がこれまでの proteomics 解析から示唆されている。但し、研究の狙いの項で説明したように、これら 3 因子で構成される複合体への解析は、生化学解析の段階ですらその詳細は不明である。そこで、本研究を進めるにあたり、

- ① PAF1c-FACT-CHD1(PFC)複合体が、実際に溶液中で安定な複合体を形成出来るのか
- ② PFC 複合体は、inter-及び intra-module 間でどのような stoichiometry を持つのか
- ③ PFC 複合体は、ヌクレオソームに対し実際にどのような生化学的プロセス機能を持つのか
- ④ ①が可能として、PFC 及び PFC-nucleosome 複合体の電顕観察像は実際にどのような形状なのか及び、これらに対する direct electro detector+CryoEM の組合せでの原子分解能構造解析の見込みはどの程度なのか
- ⑤ PFC 及び PFC-nucleosome 複合体に対する結晶化の試みと X 線結晶構造解析の見込みはどの程度なのか
- ⑥ PFC 複合体の機能が③で確認されたとして、この複合体は実際に Pol-II と更なる超分子複合体を形成出来るのか

及び、この複合体に対する CryoEM 解析成功の見込みはどの程度か」、

の各項を中間達成目標として定め、これらを順に進めることにより、最終目標である⑥項の達成を可能ならしめる戦略を立てた。なお、各項目に対する研究の進捗・達成状況は次項説明に譲るが、現在、①及び②項の解析は終了し、③項に於いては、PFC 複合体がヌクレオソームをプロセスする活性を、生化学的解析法によって検出済みである。④項は、GraFix 法によるサンプル精製と負染色法(NS)-単粒子解析法により NS グリッド上で良好な粒子像が得られており、その EM-3D 再構成も一部計算されている。しかしながらこの手法では、得られるデータの分解能とそこから導き出される生物学的意義に限界が存在する為、今後は原子分解能データ取得が見込める direct-electron-detector + Cryo 電顕解析を推し進める計画で、PFC 複合体に関しては、対象粒子のクライオグリッド上の分散が良好な像が得られている。⑤⑥に関しては、今後研究を始める予定である。

(2) 詳細

① PAF1c-FACT-CHD1(PFC)複合体が、実際に溶液中で安定な複合体を形成出来るのか

P はそれぞれ異なる 5 つの component, F は 2 つの hetero-component, C は単独 component からなるモジュール因子であるが、MultiBac タンパク質共発現システムを用いた昆虫細胞系で、各因子のタンパク発現とその可溶化を実現した。C 及び F に関しては既にその stoichiometry は既知であるが、P に関してはこれに相当するデータ報告がない。そこで、ゲルろ過と多角度光散乱法を組み合わせた計測法(SEC-MALS)により、その stoichiometry を解析したが、それぞれの component は monomeric で構成されている結果が得られた。また、PFC 複合体の in vitro 再構成方法を確立させると共に、ゲルろ過中で安定な複合体を維持することを確認した。

② PFC 複合体は、inter-module 間でどの様な stoichiometry を持つのか

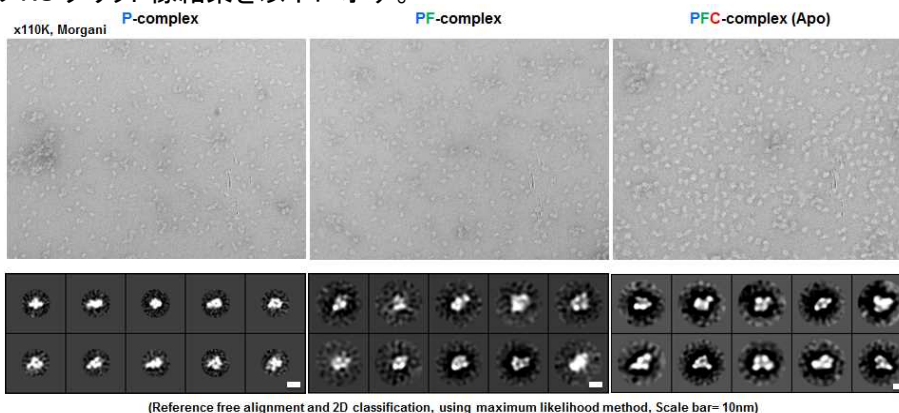
PFC 複合体のみならず、PF, PC, FC の各複合体に関しても SEC-MALS 及び沈降速度法 (Sedimentation Velocity [SV])・沈降平衡法(Sedimentation Equilibrium [SE])を適応した超遠心分析(AUC)により、モジュール間 stoichiometry の問題を解決した。結論的には、PF, PC, FC の各複合体は、それぞれ 1:1、PFC 複合体は 1:1:1 の inter-module stoichiometry であることが判明した。なお、Sedphat プログラムを用いた SE-AUC 解析により、P-F, P-C, F-C 間の解離定数(Kd)も算定可能となり、それぞれ 3.7nM, 11nM, 738nM の数値が得られた。

③ PFC 複合体は、ヌクレオソームに対し実際にどの様な生化学的プロセス機能を持つのか

酵母のヒストン H2A, H2B, H3, H4 を用いたヌクレオソームを作製し、これを基質とした反応系に PFC 複合体と ATP を加え、time-course で反応をトレースしつつ native-PAGE を用いてその product がどの様に現れるかエチジウムブロマイド(EtBr)で染色観察した。現段階では、まだ preliminary な結果が得られただけであるが、PFC による反応は ATP 水解依存的であることが観察され、反応前基質であるヌクレオソームはヒストンと DNA に解離されることが確認出来た。

④①が可能として、PFC 及び PFC-nucleosome 複合体の電顕観察像は実際にどの様な形状なのか及び、これらに対する direct electro detector+CryoEM の組合せでの原子分解能構造解析の見込みはどの程度なのか

②の inter-module 間の解離定数の結果から、PFC 複合体以外にも PF 複合体は溶液中で安定して存在することが示唆された。従って、単粒子電顕解析のサンプル調製に於けるターゲット複合体は、その分子の安定性・分子量から判断して P, PF, PFC の計 3 者を電顕解析の対象とした。当初は、酢酸ウラニウムを染色剤として用いた負染色(NS)法を適応したが、その際の染色剤塩濃度の為、対象粒子に解離の傾向が見られた。その為、通常方法による NS グリッド作製を諦め、代わりとしてグリセロールとグルタルアルデヒドの濃度勾配を利用した GraFix 法を適応して対象粒子に共有結合を導入し複合体を安定化させると共に、グリセロール濃度勾配により対象粒子を分子量で分画精製した。なお、GraFix 法で調製したサンプルを用いての NS グリッド像結果を以下に示す。



他方、Cryo 電顕解析の進捗状況であるが、PFC 複合体に関しては、粒子分散の良好なクライオグリッド調製条件がほぼ固まり、2016 年早々に複数のクライオグリッド作製及び Titan Krios によるデータ収集を開始する予定である。なお、PFC-nucleosome 複合体についても、材

料調製が完了次第、クライオグリッド調製条件の最適化に入り、これが済めば同様に Titan Krios によるデータ収集を開始する計画である。

⑤PFC 及び PFC-nucleosome 複合体に対する結晶化の試みと X 線結晶構造解析の見込みはどの程度なのか

これまで 500 種類以上の結晶化条件を利用して、P, FC, PFC それぞれの結晶化を試みたが、一つの結晶化成功の条件も得られていない。これらの理由として、5 つの component で構成される P 因子上に Intrinsic Disorder(ID)領域[自分自身単体では 2 次構造や fix ループ構造など、特定の構造体を取らない]が残っており、これが結晶化の障害になっていると考えている。この ID 領域は真核生物の核内因子に頻繁に見られ、構造解析を行う際に取り扱いの厄介な領域の一つである。しかし一方で複合体を形成する際の重要な認識ループに関わる場合があり、この領域を遺伝子コンストラクトの際に安易に除くと、却って複合体を形成しなくなる恐れがあり、慎重な取り扱いが求められる。このような背景の元、タンパク分解酵素を用いた従来の限定分解解析法に代わり、重水素交換と質量分析装置を組み合わせた手法で ID 領域を検出するのが妥当と予測しており、これらの結果を現在使用している遺伝子コンストラクトの再構成にフィードバックする計画である。PFC 及び PFC-nucleosome 複合体の結晶化成功の確率は、このフィードバック以降の結果にかかっていると予測している。

⑥PFC 複合体の機能が③で確認されたとして、この複合体は実際に Pol-II と更なる超分子複合体を形成出来るのか及び、この複合体に対する CryoEM 解析成功の見込みはどの程度か

Preliminary な生化学解析結果ながら、PFC 複合体が nucleosome をプロセスする機能が確認された。従って、今後はつくば高エネ研の千田教授・安達助教との共同研究を通じて Pol-II を入手し、PFC-Pol II 間の結合能のチェックと安定性確認をゲルろ過解析で行い、これらの結果が良好ならば、クライオ電顕解析を開始する予定。本項目の解析対象としては、Pol-II-PFC 及び Pol-II-PFC-nucleosome の計 2 種類を考えている。

3. 今後の展開

本研究の直接の成果となる最初の論文は、PFC の物理化学的性状解析(解析終了)とその生化学的解析(解析中)及び PFC, PFC-nucleosome のクライオ電顕解析(解析中)の各結果を統合して発表する予定である。この論文完成後は、①PFC 及び PFC とヒストン複合体の結晶化とその X 線構造解析、②Pol-II と PFC の 2 者複合体及び Pol-II-PFC-nucleosome の 3 者複合体のクライオ電顕解析を次なる研究項目に掲げている。これら 2 つの項は、達成毎に論文として発表の計画である。なお、今後発表予定の論文に上記①②項の内容が加われば、本さがけ研究課題である「クロマチン構築に連携した転写 dynamics の構造説明」を、ほぼ達成出来得る成果になると考えている。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

2.(2)項で述べたように、本研究を遂行するにあたり6つの達成目標を掲げた。これらのうち、今の段階で完全に達成出来た目標は①②のみであり、③も preliminary なデータながら対象分子の活性が確認されているとはいえ、論文掲載に必要なデータ収集には、あと数ヶ月かかる見込みである。他方、④～⑥の構造生物学的研究に関しては、ほぼ達成されたと言える項目は、GraFix による NS 単粒子解析だけであり、大部分の項目が研究途中である。従って、全体的な研究達成の概況としては、50%程度と自己評価している。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

現在、ドイツ・ハイデルベルグの MPIImf 研究所に於いて、一人の研究補助員を雇い、電顕解析及び試料調製の観点から、2 箇所の研究室と共同研究を進めている。本研究を遂行する上で、人員的には今の体制で充分であるが、今後も電顕解析を継続し最初の論文を発表するまでに、最低 1 年程度は掛かると予想している。その為、さきがけサポート期間終了後の研究費を獲得する為、ドイツ国内でグラントを申請中である。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本研究を遂行するにあたり 6 つの達成目標を掲げたが、これらを全て達成できれば、本研究課題である「クロマチン構築に連携した転写 dynamics の構造解明」の具体的命題に全て答えることが可能となる。これらの命題証明は、構造生物学的に殆ど未開拓ともいえる“クロマチン構造中の転写メカニズムの詳細”に初めて言及するものとなり、この基礎生物学分野の学問的発展に大きく寄与する点は間違いない。

(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)

RNA polymerase がクロモソームを乗り越える超分子複合体のクライオ電顕解析を行うべく、厳密な生化学解析(ゲルシフト、光散乱、超遠心分析)を行い、stoichiometric な複合体の形成を確認でき、ネガティブステイニングによる低分解能構造がわかった点は評価できる。

調製の困難な複合体なので、進捗が早くないことはやむを得ないが、試料調製や stoichiometry も慎重に確認しているのので、電顕での構造解析をもっと強力におし進め、マシンタイムが確保しやすいのであれば負染色も積極的に行うべきである。今後の複合体の解析に期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

なし

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(2) 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)

なし