

2023 年度
創発的研究支援事業 年次報告書

研究成果の概要

研究担当者	野澤 佳世
研究機関名	東京工業大学
所属部署名	生命理工学院
役職名	准教授
研究課題名	遺伝子発現を制御するゲノム折り畳み構造のクライオ電子顕微鏡解析
研究実施期間	2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日
研究課題 A では、細胞抽出液から DNA ループ複合体の精製と直接観察が可能なアフィニティグリッド (SA グリッド) の作成法の検討を行った。これまでの研究で、電子顕微鏡観察グリッドにビオチン化脂質を疎水性相互作用で固定し、その上で SA の結晶化を行い、ビオチン化標的分子を結合できる二次元結晶のシートを作ることに成功している。また核酸プローブとして、エンハンサーとプロモーター配列を含むビオチン化 DNA やヌクレオソームをグリッド上に整列させることにも成功した。加えて、SA グリッド上にディスプレイするプローブとして抗体を使用できるかを検討するために、コントロール抗体を用いてマレイミド-PEG2-ビオチン化を行い、そのビオチン化効率を Alexa488 蛍光色素を結合させた SA を用いてウエスタンブロッティング法で確認した。また、SA グリッドと反応させる HeLa の核抽出液の調製法を確立した。ビオチン化したヌクレオソームを SA ビーズに結合させて作成したヌクレオソーム・カラムを SA グリッドに見立てて核抽出液を添加して、トラップされた因子を LC/MS 質量分析で解析した。その結果、得られた核抽出液にクロマチン結合因子が十分に含まれていることを評価できた。 研究課題 B では、試験管内再構成した DNA ループの構造機能解析の一環として、ヌクレオソームと結合するコヒーシン複合体を予備的にクライオ電子顕微鏡で観察することができたが、分解能が不十分であった。そのため、本年度では、電子顕微鏡像自体の解像度を上げるために、ATP 非加水分解アナログを用いて動きを止めたコヒーシンとヌクレオソームの複合体についても大量調製を行い、その試料について cryoEM データセットを取得した。 研究課題 C では、蛍光標識したヌクレオソームを人工細胞に包埋することに成功した。しかし、この人工細胞についてクライオ電子顕微鏡による高分解能観察を行ったところ、大きなリポソームのほとんどが、試料凍結のステップで壊れてしまうことが分かり、包埋されたタンパク質粒子を観察することができなかった。この問題を解決するために、本年度は、クライオ電子顕微鏡観察に特化した人工細胞の作成条件の検討を行った。その結果、脂質の組成を変更し、Mini-Extruder を使用してリポソームのサイズを最適化することで、クライオ電子顕微鏡によって人工細胞内の粒子を観察できる方法を構築することができた。	