

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
（プログラム名）（英語）Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間：平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）胡桃坂 仁志
（英語）Hitoshi Kurumizaka

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）東京大学・定量生命科学研究所・教授
（英語）The University of Tokyo, Institute for Quantitative Biosciences, Professor

II 補助事業の概要

真核生物のゲノムDNAは、ヒストンタンパク質をはじめとした様々な細胞核内タンパク質と結合し、高次に折り畳まれたクロマチンと呼ばれる構造体として細胞核内に収納されている。クロマチンの基本単位は、4種類のヒストンと約150塩基対のDNAから構成されるヌクレオソームである。ヒストンの翻訳後修飾やヒストンバリエーションと呼ばれるヒストンの亜種のヌクレオソームへの導入によって、集積するクロマチン結合タンパク質や高次のクロマチン構造が変化する。それによって、クロマチン上で起こる転写、複製、組換え、修復などの諸反応が多階層的に制御されている。このようなエピジェネティックなDNA機能発現制御が破綻すると、がんや代謝疾患をはじめとした様々な疾患を引き起こすことが知られており、それゆえに、エピゲノム制御因子を標的とするエピジェネティクス創薬研究が注目を集めている。

本事業では、研究開発代表者である胡桃坂が確立したヒストンタンパク質やヌクレオソームの高純度調製技術を基盤とし、エピジェネティクス研究を行う研究者に対し、多様なヒストン（ヒストンバリエーション、翻訳後修飾を導入したヒストン、ヒストン変異体、多様な生物種由来のヒストンなど）や、それらのヒストンを含むヌクレオソームやオリゴヌクレオソームなどの試料提供及び調製技術の指導を行ってきた。実際に、本事業期間を通じて計30件の支援を行い、また20名を超える国内外の研究者に対しヒストン精製やヌクレオソーム調製技術の指導を行い、エピジェネティクス研究の推進に貢献した。以下に主な支援の研究内容及び成果について述べる。

これまでの事業期間を通じて、研究開発代表者である胡桃坂が確立した 506 種類のヒストンライブラリーに基づいて、30 件の試料供給及び技術指導等を含む支援を行ってきた。多様なヒストンタンパク質やそれらを含むヒストン複合体、ヌクレオソーム、オリゴヌクレオソーム、クロマチン結合タンパク質-ヌクレオソーム複合体の供給及び構造・性状解析を含む支援を行うことができ、複数の顕著な成果に繋がった。また、研究開発分担者である朴、明石、Wolf は、高難度タンパク質複合体の構造解析、質量分析、クライオ電子顕微鏡解析における高度な技術を用いて支援を行った。以上の支援を通じて、エピジェネティクス研究の推進に貢献した。加えて、研究開発分担者である香月は、これまでに作製したヒト化マウスを汎用化して支援および高度化に使用するため、種々のヒト化マウスの繁殖を行い、薬物動態試験などのための動物数の確保・凍結胚の確保を実施し、医薬品開発の推進に貢献した。研究開発分担者の畑田は、創薬研究に用いるコンディショナル KO マウスの新規作製法の開発に取り組んだ。これらの理由から、マイルストーンに対して順調に支援を達成できたと考える。

本課題では高度化研究として、精製ヒストンライブラリーの拡充、クロマチン試験管内再構成システムの高度化、クロマチン性状・構造解析技術の高度化を推進してきた。精製ヒストンライブラリーの拡充については、H29 年度に約 60 種類、H30 年度に 10 種類、R1 年度に 12 種類、R2 年度に 10 種類、R3 年度に 23 種類の精製ヒストンを新たにライブラリーに追加することができ、順調にライブラリーの拡充を達成できている。クロマチン再構成システムの高度化および性状・構造解析技術の高度化については、まず、ヒストンライブラリーの拡張によって得られた多様なヒストンを含むヌクレオソームの調製技術の確立に成功し、それらのヌクレオソームの性状解析及びクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析に成功した (Sato et al, *Nucleic Acids Res* 2021; Hirai et al, *Nucleic Acids Res* 2021 等)。ヌクレオソームが 3 個連なったトリヌクレオソームの再構成に成功し、ヒストンバリエーションやヒストン修飾を含むヌクレオソームが近傍のクロマチン構造へ及ぼす影響を解析することが可能になった (Takizawa et al, *Structure*, 2020)。さらに、多種多様なクロマチン結合タンパク質とヌクレオソームとの複合体の調製に成功している。特に、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 については、ヌクレオソームが 2 個連なったジヌクレオソームとの複合体の調製に成功しており、マイルストーンを順調に達成できている。さらに、これらの一部については、精製した複合体の立体構造を Cryo-EM を用いた単粒子解析により決定しており、Cryo-EM による構造解析技術の高度化についても順調に成果を挙げている (Machida et al, *Mol Cell* 2018; Kujirai et al, *Science* 2018; Ehara et al, *Science* 2019; Kobayashi et al, *Commun Biol* 2019; Matsumoto et al, *Nature* 2019; Echigoya et al, *Sci Rep* 2020; Kujirai et al, *Science* 2020; Tanaka et al, *Nat Commun* 2020; Ho et al, *Life Sci Alliance* 2021 等)。また、X 線結晶構造解析と非破壊質量分析技術の高度化に関しても、新たなクロマチン試料を用いた解析に取り組み、順調に成果を挙げた (Arimura et al, *Nucleic Acids Res* 2018; Arimura et al, *Nat Commun* 2019; Dacher et al, *Nucleic Acids Res* 2019; Horikoshi et al, *Biochem Biophys Res Commun* 2019; Tanaka et al, *J Biochem* 2020; Saikusa et al, *Anal Chem* 2018; Sakamoto et al, *Anal Chem* 2021 等)。それらの成果は多数の学術論文として発表された。今後、がんや代謝疾患などに関与するさまざまなクロマチンタンパク質を結合したヌクレオソームの調製技術の確立、及びそれらの性状解析と構造解析に取り組む予定である。これらを実現させることにより、エピジェネティック創薬の実現に重要な構造的知見を蓄積し、タンパク質の立体構造情報に基づいた創薬化学研究に貢献していきたいと考えている。

本事業を遂行するに当たって、構造解析ユニット内連携及びユニット間連携を強化することにより、高度化研究を大幅に推進することに成功した。その一例について以下に示す。

本事業の構造解析ユニット (タンパク質生産領域) の代表を務める理化学研究所の白水美香子博士および関根俊一博士との連携により、世界で初めて RNAPII がヌクレオソーム上の DNA を転写している途中の中間体を試験管内での転写反応によって再現し、複数の中間体の立体構造の解明に成功した (Kujirai et al, *Science* 2018)。さらに、転写伸長因子である Spt4/5 と Elf1 を結合した RNAPII がヌクレオソームを転写している複合体についても、単粒子解析により立体構造を解明した (Ehara et al, *Science* 2019)。これらの成果は、本連携によって初

めてなし得たものであり、世界的に大きなインパクトを与えた。今後も引き続き本連携研究を強化して、クロマチン上での転写制御機構の解明に向けたクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析法の高度化を進める。

また、東京大学の吉川雅英博士が代表を務める本事業の構造解析ユニット（構造解析領域）との連携により、東京大学所有のクライオ電子顕微鏡（Talos Arctica）を利用して、核膜孔構成因子 ELYS、ゲノム DNA 配列を含むヌクレオソーム、およびパイオニア転写因子 GATA3 を結合させたヌクレオソームの単粒子解析を行い、その立体構造を解明した（Kobayashi et al, Commun Biol 2019; Echigoya et al, Sci Rep 2020; Tanaka et al, Nat Commun 2020）。本連携研究についても引き続き連携を強化し、転写調節や細胞周期制御などに寄与するクロマチン制御因子とヌクレオソームとの複合体のクライオ電子顕微鏡解析を行っていく。

その他にも、胡桃坂は小島グループ（東大・創薬機構、ケミカルシーズ・リード 探索ユニット）とのユニット間連携によって、蛍光ヌクレオソーム及び FRET 法を用いたヌクレオソーム結合因子に対する機能制御分子の探索研究を行い、エピジェネティクス創薬に向けた開発研究も推進した。

また、本事業を通じた人材育成についても大きな成果を挙げた。本事業に参画した若手研究者や学生に対しては、専門学術誌や学会における成果発表を支援し、多くの業績につながっている。また、本事業に参画していた4名の若手研究者が、本事業によって得られた実績と経験によって、ロックフェラー大学（米国）、スタンフォード大学（米国）、フランス国立科学研究センター（フランス）、IMBA（オーストリア）といった、海外トップレベルの大学および研究機関に異動しており、全員が学振海外特別研究員あるいは財団の海外留学助成に採択されている。さらに、本事業の期間内に、米国にて1名が Assistant Professor として、国内の大学にて4名が教授及び准教授としてプロモーションされた。さらに、4名が助教・研究員としてプロモーションされている。加えて、5名が国外で、3名が国内の研究機関にて博士研究員としてクロマチン研究に従事し、4名が製薬及び化学関連の企業にて研究開発に貢献している。加えて本事業では、外部の研究者に対してもクロマチンの再構成技術及び機能・構造解析の指導を行ってきた。量子科学技術研究開発機構、筑波大学（化）、早稲田大学（先進理工）、東京大学（薬）、東京大学（農）、東京大学（理）、理化学研究所、東京理科大学（薬）、神戸大学（理）、明星大学（総合理工）、富山大学（薬）、九州大学（医）、National Institutes of Health、University of Kansas 等に所属する20名以上の研究者及び大学院生に対して、クロマチン再構成及び構造・機能解析の指導を行ってきた。本事業における若手研究者の育成・支援により、産学の両面において我が国の研究力強化や国際競争力の向上に貢献した。

以上より、本補助事業を総括して、クロマチン試料の供給・支援、クロマチン試料調製技術及び構造解析技術の高度化、ユニット内・ユニット間連携、及び人材育成の全ての面で大きな成果を収め、我が国のエピジェネティクス研究の推進に大いに貢献したと考える。今後、これらの支援や高度化研究をさらに発展させることで、エピジェネティックな DNA 機能発現制御機構の解明や様々な疾病に対する診断薬、治療薬開発に向けたエピジェネティクス創薬研究を展開したいと考える。

In eukaryotes, genomic DNA, which interacts with various nuclear proteins, forms chromatin in nuclei. The basic repeating unit of chromatin is nucleosome, in which ~150 base-pairs of DNA is wrapped around a histone octamer consisting of histones H2A, H2B, H3, and H4. Aberrations in histone post-translational modifications and DNA methylation as well as mislocalization of canonical and variant histones are known as “epigenetic aberrations”, causing detrimental changes in the epigenetic chromatin landscape and impairing transcription, replication, and repair of DNA. These epigenetic aberrations are found in cancers, metabolic syndromes, neurological disorders, and viral infections. However, the mechanisms by which these epigenetic aberrations bring about diseases have not been elucidated because the structures and dynamics of higher-order chromatin with abnormal epigenetic states remain poorly understood. Over the last decade

spanning PDIS and BINDS, Kurumizaka has established an extensive histone library, containing 506 types of canonical and variant histones from different species with multiple post-translational modification mimics (acetylation, crotonylation, methylation, phosphorylation, and ubiquitination) and various mutations. Using these materials from the library, the Kurumizaka laboratory has determined more than 100 nucleosome structures by X-ray crystallography and cryogenic electron microscopy (cryo-EM). To accelerate research on epigenetics and chromatin, Kurumizaka has provided many researchers with its materials and technologies for chromatin sample preparation. In fact, Kurumizaka provided various histones and nucleosomes to support 30 applicants during the BINDS program. In addition, Kurumizaka has trained more than 20 researchers from various national and international institutes and universities.

Kurumizaka has also developed methods to reconstitute polynucleosomes by nucleosome-nucleosome ligation and nucleosomes in complex with chromatin-binding proteins, and successfully determined their structures by cryo-EM. To promote advanced research, Kurumizaka has cooperated closely with other Structural Analysis units within BINDS. In collaboration with Drs. Shirouzu and Sekine (RIKEN), Kurumizaka successfully reconstructed the structures of multiple intermediates of transcribing RNAPII on nucleosomes using cryo-EM (Kujirai et al, Science 2018). Kurumizaka also determined the nucleosome-bound RNAPII in complex with the transcription elongation factors Spt4/5 and Elf1 in collaboration with Drs. Shirouzu and Sekine (Ehara et al, Science 2019). In collaboration with Dr. Kikkawa (The University of Tokyo), Kurumizaka determined the structures of nucleosomes bound to the nuclear pore component ELYS, the nucleosome containing native LIN28B enhancer sequence, and the pioneer transcription factor GATA3 (Kobayashi et al, Commun Biol 2019; Echigoya et al, Sci Rep 2020; Tanaka et al, Nat Commun 2020).

Through the BINDS program, Kurumizaka has supported many young researchers and students who participated in this program. They had many opportunities to present their research in journals and at conferences. In addition, four young researchers who participated in this program have moved to top overseas universities and research institutions such as Rockefeller University (USA), Stanford University (USA), CNRS (France), and IMBA (Austria) thanks to their achievements and experiences gained through this program. During the period of BINDS, one researcher has been promoted to assistant professor in the United States, four researchers to full professor or associate professor at universities in Japan, and another four to assistant professor or have obtained positions at universities in Japan.

In summary, the program headed by Kurumizaka has achieved significant results in supporting researchers by supplying chromatin samples, advancement of chromatin sample preparation and structural analysis techniques, collaboration with other Structural Analysis units, and development of young researchers. We believe that it has greatly contributed to the promotion of epigenetics research in Japan.