

1. 연구개발과제의 개요

본 연구의 최종 목표는 크로마틴 조절을 통한 에피지네틱 유전자 발현을 제어하는 거대 단백질 복합체의 구조, 다이내믹스, 기능을 통합적 방법론으로 연구하여, 이들 복합체의 작용기작을 이해하고, 크로마틴 조절을 통한 에피지네틱 유전자 발현기작에 대한 핵심적 지식을 제공하는 것이다.

세부 목표 1. 크로마틴의 핵심 단위인 뉴클레오솜 형성 기작 규명-본 세부 목표에서는 뉴클레오솜이 형성되고 풀리는 뉴클레오솜 구조의 다이내믹스를 규명하고자 한다. NASP, FACT, ATAD2와 같은 뉴클레오솜 형성 복합체에 의한 뉴클레오솜을 형성 기작을 규명한다. 뉴클레오솜의 형성은 다양한 유전자 작용의 핵심 기작이며, 이 과정에 이상이 생길 경우 암과 같은 인간 질병을 유발한다. 본 연구 결과는 크로마틴의 핵심 단위인 뉴클레오솜의 형성과정에 대한 이해를 제공하고, 암과 같은 인간 질병을 치유할 수 있는 플랫폼을 제공한다.

세부 목표 2. 크로마틴 고차원 구조 형성을 통한 유전자 발현 조절 기작 규명-본 연구에서는 Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) 복합체에 의해 유도되는 크로마틴 고차원 구조의 형성기작을 규명한다. 본 연구결과는 DNA 고차원 구조형성 과정 및 이를 통한 글로벌 수준 유전자 발현조절에 대한 메커니즘을 제공하고, 이들 기작의 이상에서 오는 인간 질병 치료에 대한 이해를 제공한다.

세부 목표 3. 크로마틴의 변형 기작 규명- 히스톤 메틸화 효소인 Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) 와 ASH1L complex의 작용기작을 규명한다.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

세부 목표 1. 크로마틴의 핵심 단위인 뉴클레오솜 형성 기작 규명

가. 히스톤 H3-H4의 세포핵 내부로의 운송 및 조절에 관한 분자 기전의 연구

NASP는 정자에서 처음 발견되어 링커 히스톤 H1과 결합하는 것으로 알려졌다. 이후 히스톤 H3, H4와도 상호작용한다는 것이 밝혀졌다. H3, H4와 결합한 NASP는 아세틸기 전이 효소 hHAT1과 이것의 파트너인 RbAp48으로 구성된 복합체(이하 HAT complex)와 상호작용한다. hHAT1은 acetyl-CoA의 아세틸기를 histone H4의 N-말단 5번과 12번 lysine에 전달하여 acetylation mark를 만든다. 본 연구에서는 NASP, H3, H4, hHAT1, RbAp48로 구성된 복합체의 구조를 규명함으로써 histone chaperoning pathway 중 세포질에서 합성된 히스톤 H3, H4가 어떤 기작을 통해 다음 단계로 나아가는지 알아보기 위해 NASP 복합체에 대한 구조 생화학적 연구를 진행하였다.

- **NASP complex 정제:** E.coli bacteria system을 이용하여 NASP를, SF9 baculovirus system을 이용하여 HAT1-RbAp48 complex(이하 HAT complex)를 발현시킨다. 각각을 Ni-NTA affinity chromatography, ion

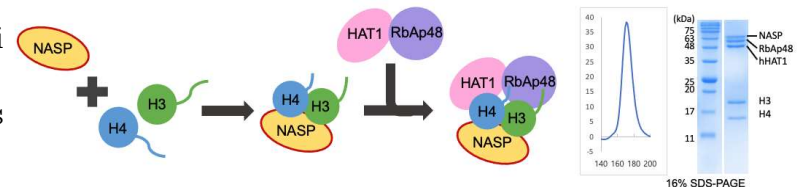


그림 1. NASP/Histone H3-H4/HAT1/RbAP48으로 이루어진 NASP 복합체의 발현 정제

exchange 그리고 size exclusion chromatography를 통해 분리 및 정제한다. 정제된 NASP에 histone H3와 H4를 먼저 결합시켜 NASP-H3-H4 complex를 만든다. 여기에 HAT

complex를 추가로 결합시키고 size exclusion chromatography를 통해 NASP complex를 얻었다 (그림1).

- NASP 복합체의 Cryo-EM 구조

규명: 얻어진 NASP complex는 Cryo-EM을 이용한 구조 연구를 위해 더욱 안정한 형태로 만들어야 하는데 이 과정에 GraFix 방식을 적용하였다. 이를 통해 최종적으로 cryo-EM을 위한 NASP complex 시료 준비를 하였다. 여러 차례의 cryo-EM screening을 통해 NASP complex가 안정하고 선명하게 보이는 조건을 찾아내 G.O grid를 이용하여 구조 연구를 위한 데이터 수집을 진행하였다. 데이터 수집을 위한 screening은 KARA Glacios를 이용하였고, 데이터 수집은 세 포막 단백질 연구소의 Krios K3 장비를 이용하여 10,257 micrographs를 얻었다. 모아진 데이터는 relion, cryoSPARC과 같은 프로그램을 이용하여 NASP complex의 3차원 구조를 얻기 위한 데이터 프로세싱 과정을 진행하였다 (그림2).

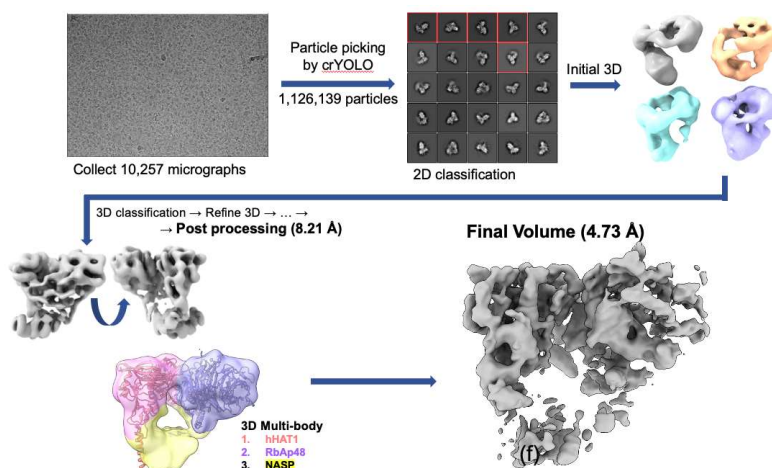


그림 2 NASP 복합체의 cryo-EM data processing

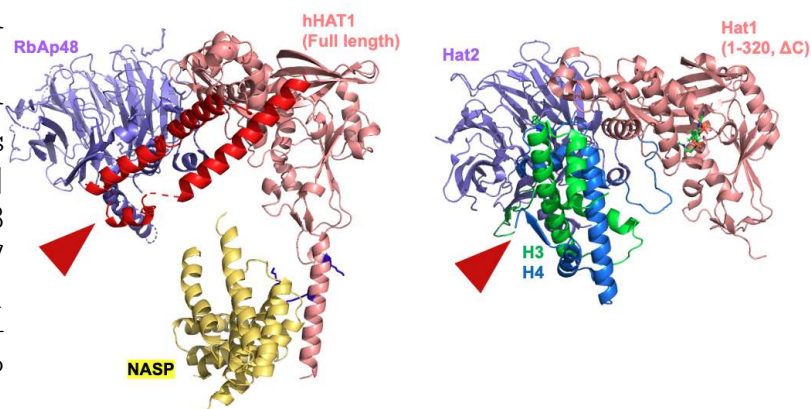


그림 3. NASP 복합체의 cryo-EM 구조

이를 통해 4.73 Å의 구조맵을 얻었고, 여기에 이전에 규명된 HAT complex의 yeast homolog 구조와 NASP 구조를 넣어 위치를 확인할 수 있다. (그림3) 이것을 규명된 구조와 비교하였을 때, HAT complex와 histone 사이의 결합에 차이를 발견할 수 있었다. 규명된 구조에서는 존재하지 않는 hHAT1의 C-말단 helix가 히스톤 결합 부위를 막고 있다는 것을 알아냈다. (그림3)

- NASP에 의한 HAT activity 활성화: HAT1의 histone H3에 대한 acetylation이 histone chaperone pathway에서 어떤 역할을 하는지 정확한 이유는 밝혀진 게 없으나, HAT activity를 제거한 null mutant mouse는 치사한다는 연구가 있다. 따라서 histone H3-H4가 전달되는 과정에서 HAT activity의 역할과 중요성을 규명하고자 HAT assay를 진행한다. NASP complex가 이루어진 후 HAT1이 histone에 근접하므로, 가장 먼저 HAT activity에 NASP의 역할을 규명하고자 assay를 진행하였고, NASP가 있을 때 HAT activity가 증가함을 확인했다. (그림4)

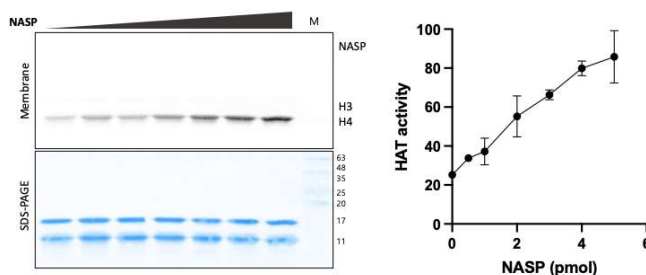


그림 4. NASP에 의한 HAT (Histone Acetyltransferase) activity 활성화

나. Codanin-1:Asf1a 단백질 복합체의 구조 규명을 통한 히스톤 H3-H4 단백질의 세포핵 내부로의 운송 저해 기작 이해

진핵생물의 유전체 복제 (Chromatin replication) 과정에서 다음 세대의 세포로의 정확한 유전정보 전달을 위해서 정교한 조절들이 존재한다. 다양한 조절 과정들 중 Codanin-1 단백질은 진핵생물 유전체의 필수 구성요소 중 하나인 히스톤 단백질 H3-H4의 세포핵 유입을 저해를 통해 유전체 복제를 저해한다는 모델이 제시되었다. Codanin-1은 Asf1, CDIN과 함께 복합체로 작용한다. 본 연구에서는 Codanin-1 복합체를 초저온전자현미경 (Cryo-EM)을 활용하여 3.3Å 분해능의 분자구조를 규명했다. 밝혀낸 구조를 기반으로 Codanin-1 단백질과 Asf1a 사이의 결합 방식을 밝혀냈고 Codanin-1 단백질과 히스톤 H3-H4 사이의 경쟁적 Asf1 결합에 의해서 Codanin-1 단백질이 히스톤 단백질의 세포핵 내부 운송 저해함을 밝히는데 성공하였다.

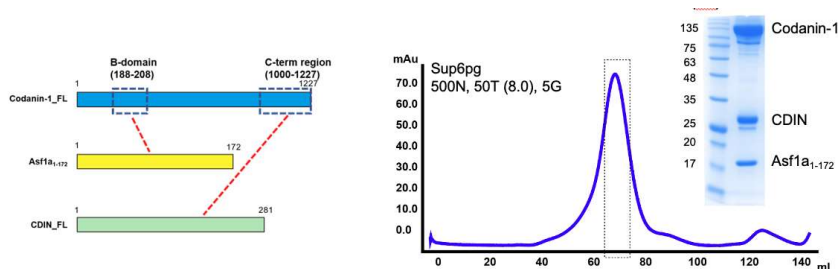


그림 5. Codanin-1 복합체의 발현 정제

- Codanin-1 복합체의 초저온 전자현미경 (Cryo-EM) 구조 규명: Codanin-1, Asf1a, CDIN으로 이루어진 Codanin-1 복합체를 insect cell expression을 이용하여 발현 및 정제를 하였다 (그림 5). 정제된 Codanin-1:Asf1a:CDIN 복합체의 단백질로 부터 Cryo-EM grid에 대해서 Titan Krios- Gatan K3 detector 장비를 이용해서 4,282장의 전자현미경 micrograph를 획득하고, 데이터 프로세싱 과정을 통해서 최종적으로 3.62Å 분해능의 Codanin-1복합체의 구조를 규명하였다 (그림 6).

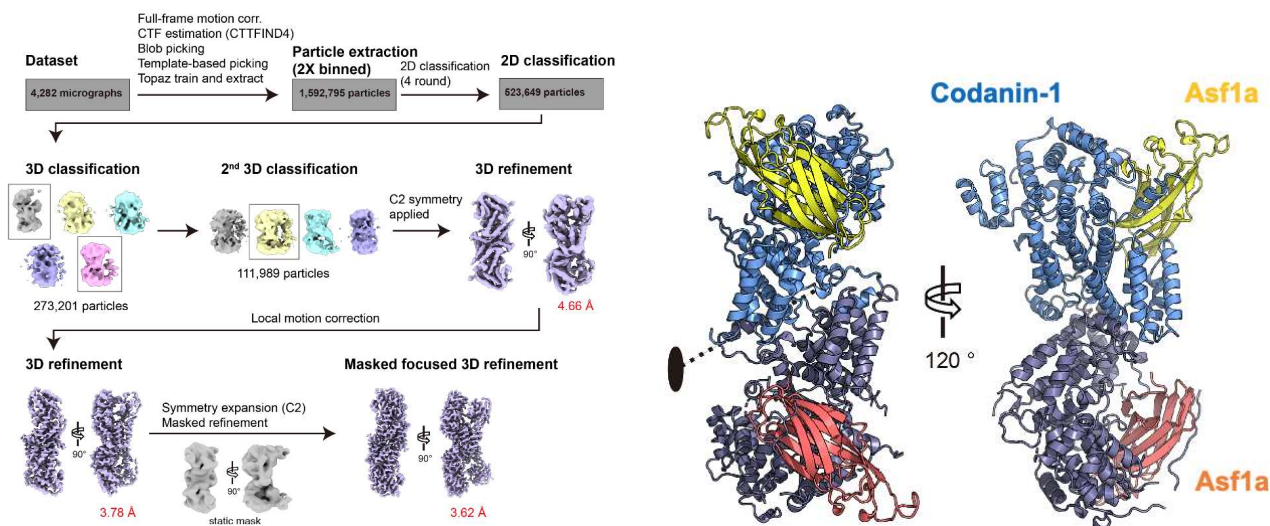


그림 6 Codanin-1 복합체의 Cryo-EM 구조 규명. (좌) Cryo-EM data processing, (우) Codanin-1복합체의 atomic model.

구조 규명 결과 Codanin-1은 histone H3 helix와 유사한 helix를 이용해서 Asf1a의 histone 결합 부위와 interaction을 하고 있고, 추가로 Codanin-1의 B-domain과도 결합하는 것으로 규명하였다. Histone H3 mimic helix (HMH)와 histone H3의 sequence와 결합 방식을 살펴보면 Codanin-1이 HMH를 이용하여 Asf1을 sequester하는 것으로 판명하였다 (그림 7).

- 구조 및 생화학 실험 기반 Codanin-1과 Asf1a사이의 결합 메커니즘 이해:

밝혀낸 Codanin-1:Asf1a 구조에서 Asf1a 결합에 있어서 두 개의 domains (HMH 및 B-domain)가 결합에 참여하고 있음을 확인함 (그림 8). 생화학적 실험을 통해서 이 두 개의 domains가 Codanin-1과 Asf1a 사이의 결합에 동시에 참여하고 있고 두 domain중 하나의 domain만으로도 단백질 사이의 결합이 가능함을 확인함 (그림 8). 더 나아가 Codanin-1:Asf1a 구조에서 발견한 중요한 특성은 Codanin-1의 HMH domain이 히스톤 H3-a3 helix와 유사한 서열 및 구조를 가지고 Asf1a와 결합하고 있는 것이다. 이를 통해 Asf1a의 결합에 있어서 히스톤 H3-H4 복합체와 Codanin-1 단백질이 경쟁관계에 있을 것을 예측할 수 있었고, 두 단백질 사이의 경쟁관계를 생화학적 실험을 통해 확인.

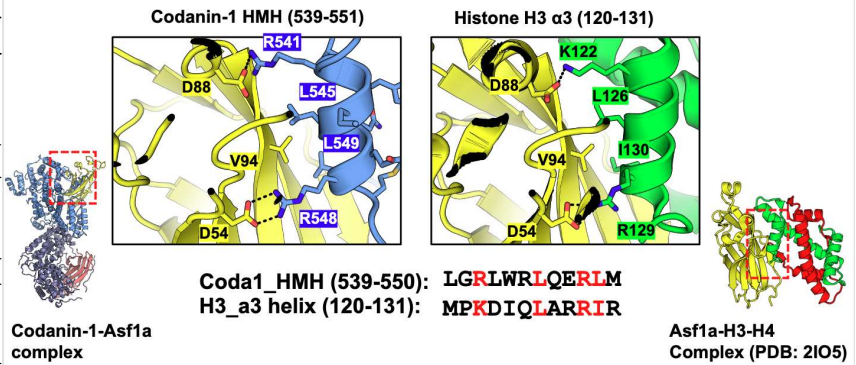


그림 7. Codanin-1의 Histone Mimic Helix를 이용한 Asf1의 결합

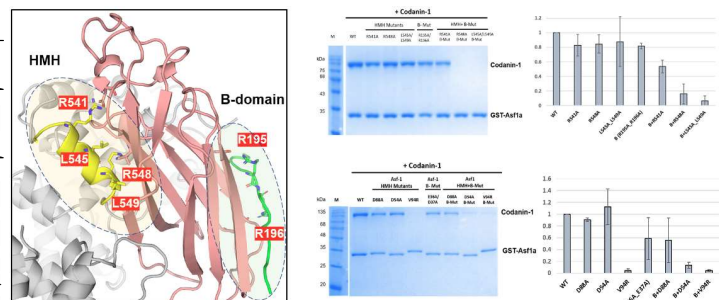


그림 8. Codanin-1의 HMH, B-domain을 이용한 Asf1a 결합기작

세부 목표 2. 크로마틴 고차원 구조 형성을 통한 유전자 발현 조절 기작 규명

가. Abo1 에 의해 FACT 가 partially unfolded nucleosome 으로부터 분리되는 과정의 기전에 대한 구조생화학적 연구

히스톤 단백질에 DNA 가 감겨 있는 형태인 뉴클레오솜은 세포의 유전자 발현을 조절하는 데에 중요한 기능을 수행한다. 그러나 RNA polymerase II 에 의해 전사가 진행될 때에는 뉴클레오솜이 구조적인 장애물로 작용하여 전사를 조기에 종료시킬 수 있고, 이는 비정상적인 유전자 발현을 초래한다. 이를 방지하기 위해 RNA polymerase II 는 전사 과정 중에 뉴클레오솜을 일부 해체한다. 이로 인해 불안정해진 뉴클레오솜에는 Spt16 과 Pob3 의 heterodimer 인 히스톤 샤페론 FACT 가 결합하여 뉴클레오솜이 완전히 해체되지 않도록 보호한다. 전사가 종료된 이후에는 FACT 가 뉴클레오솜으로부터 분리되어 뉴클레오솜이 다시 온전히 조립된 형태로 돌아가는 데, 이 과정에 ATPase activity 를 보이는 히스톤 샤페론인 Abo1 이 관여한다. 본 연구에서는 Abo1 에 의해 FACT 가 뉴클레오솜으로부터 분리되는 과정의 분자 기전을 자세히 설명하는 것을 목표로 하였다.

- Abo1과 FACT 복합체의 결합 관계 규명: Abo1 과 FACT 가 다른 물질을 매개체로 사용하지 않고 직접 상호작용하는 것인지를 확인하고자 Abo1 재조합 단백질과 FACT 재조합 단백질을 이용하여 binding assay 및 pull-down assay 를 수행하였다. 그 결과에 따른 해석을 요약하

면 다음의 세 가지와 같다. 첫째, Abo1 은 Spt16 과 상호작용하며 Pob3 와는 상호작용하지 않는다. 둘째, Abo1 의 Spt16 의 N-terminal domain 과 주로 상호작용한다. 셋째, Abo1 은 자신의 N-terminal domain 을 이용하여 Spt16 의 N-terminal domain 과 상호작용한다. 이에 Abo1 이 FACT 를 partially unfolded nucleosome 으로부터 분리시키는 데에는 Abo1 N-terminal domain 과 Spt16 의 N-terminal domain 사이의 상호작용이 필요한 것으로 추측할 수 있다 (그림 9).

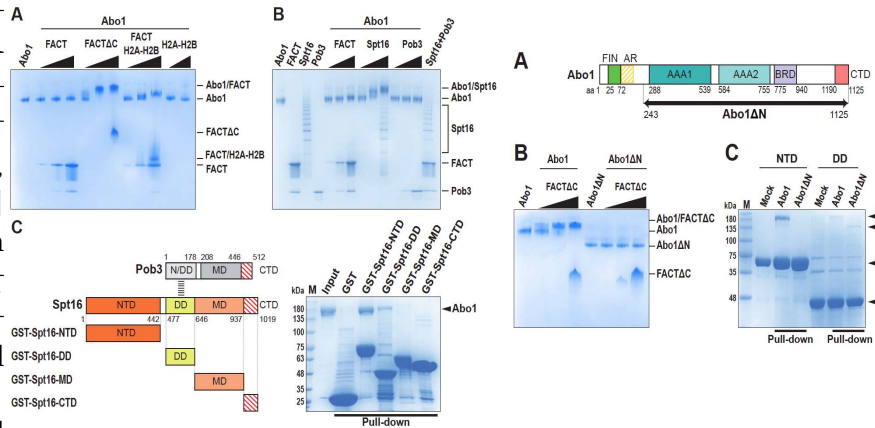


그림 9. Abo1과 FACT의 결합관계 규명

- **Abo1과 FACT 복합체의 cryo-EM 구조 분석:** Abo1과 FACT가 작용하는 기작을 규명하기 위하여, Abo1과 FACT의 복합체를 형성시키고 분리하여 cryo-EM 샘플을 제작하였다. cryo-EM 데이터를 수집하여 processing을 진행하였다. 2D classaverage를 진행하였을 때 FACT의 위치를 알 수 있었다 (그림 10).

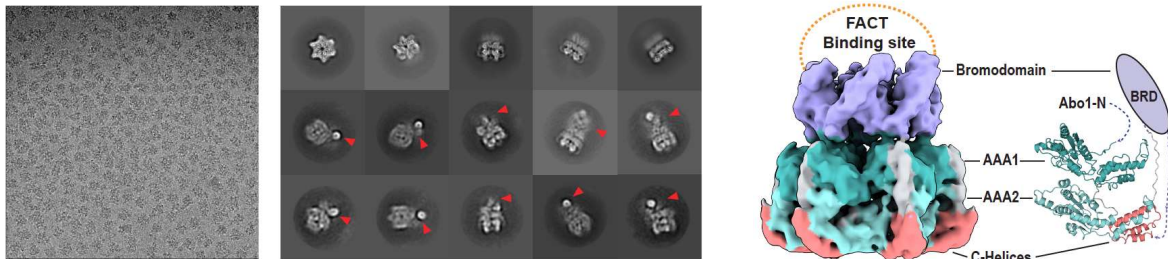


그림 10. Abo1-FACT 복합체의 구조 분석

- **Abo1과 FACT 복합체의 작용기작 규명:** Abo1 N-terminal domain 과 Spt16 의 N-terminal domain 사이의 상호작용이 실제로 Abo1 의 FACT 분리 기전에 필요한 것인지를 확인하기 위해 single molecule analysis를 수행하였다(그림 2A). Full length Abo1 은 ATP 가 존재하는 환경에서 FACT 를 partially unfolded nucleosome 으로부터 분리시켰지만(그림 2B)(Jang et al. Unpublished), N-terminal domain 이 제거된 Abo1 은 ATP 가 존재하는 환경에서도 FACT 를 분리시키지 못했다(그림 2C)(Jang et al. Unpublished). 이를 통해 pull-down assay 로 얻은 결론처럼 Abo1 이 FACT 를 partially unfolded nucleosome 으로부터 분리시키는 데에는 Abo1 N-terminal domain 이 관여하는 상호작용이 필요함을 알 수 있다. 본 연구실은 Abo1 이 Abo1 pore 와 histone H3 tail 사이의 상호작용 및 ATP 분해를 통하여 histone H3/H4 를 DNA 에 loading 한다는 사실을 밝혀낸 바 있다. Abo1 pore 와 histone H3 tail 사이의 상호작용이 partially unfolded nucleosome 으로부터의 FACT 분리에도 필요함을 확인하기 위해 Abo1 pore mutant 와 tailless histone H3/H4 를 이용하여 추가적인 single molecule analysis 를 진행하였다. 그 결과, Abo1 pore mutant 를 사용한 실험, tailless histone 을 사용한 실험 모두에서 FACT 분리가 일어나지 않았으므로 Abo1 pore 와 histone H3 tail 사이의 상호작용이 FACT 분리 기전에도 필요함을 알 수 있다 (그림 11).

나. Polycomb Repressive Complex1 : 뉴클레오솜 복합체 구조 연구를 통한 염색질 압축 및 Heterochromatin 형성 과정에 대한 이해

진핵생물의 유전물질인 디옥시리보핵산(DNA)은 뉴클레오솜(Nucleosome)을 기본 단위로 하여 염색질(chromatin)의 형태로 저장되어있다. 염색질은 크게 진정염색질(Euchromatin) 그리고 이질염색질(Heterochromatin)의 형태로 존재한다. 진정염색질의 경우 열린 구조로 존재하여 활발하게 전사가 이뤄질 수 있다. 반면에, 이질염색질은 응축된 구조로 존재하여 해당 영역의 유전자 발현이 억제된다. 이러한 염색질의 구조와 성질은 유전자 발현 조절에 아주 중요하게 작용하기에 이를 이해하는 것은 중요하다. 이질염색질의 경우 Heterochromatin Protein1 (HP1), Polycomb Repressive complex 1 (PRC1)과 같은 단백질과 뉴클레오솜의 상호작용에 의해 염색질의 응축이 이뤄지게 되고, 이러한 응축에 의해 특정 영역의 유전자 발현이 억제되게 된다. PRC1은 CBX, PHC, RING 그리고 PCGF 4가지 단백질 소단위체로 이루어진 복합체이다. 이들 중 CBX, PHC 소단위체가 염색질의 응축에 기여하는 것으로 알려져 있으나, 이들의 구조적 분자적 염색질 압축 기전에 대해서는 아직 알려지지 않았다. 본 연구에서는 PRC1 : 뉴클레오솜 복합체의 cryo - EM 구조 연구를 통하여 PRC1에 의한 염색질 압축 기전에 대해 이해하고자 하고, 나아가, PRC1 - 뉴클레오솜 액체 액체 상 분리 현상을 cryo - ET를 이용하여 이것들에 의해 형성되는 facultative heterochromatin 영역의 구조 및 물리적 성질에 대해 연구하고자 하였다.

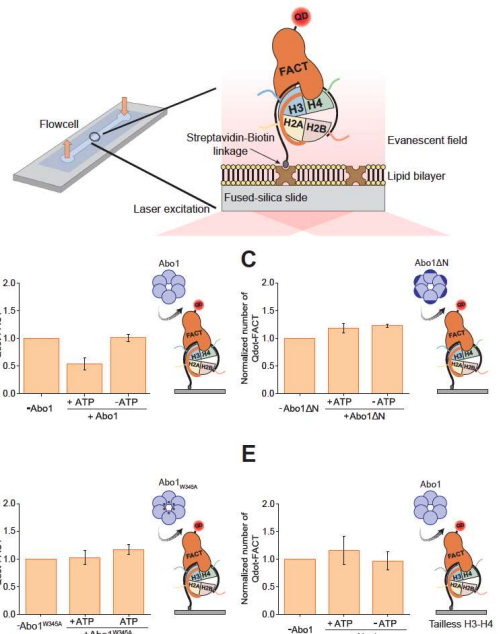


그림 11. Abo1에 의한 FACT 복합체의 dissociation 기작

- PRC1-Nucleosome복합체 정제: PRC1-Nucleosome 복합체의 구조 규명을 위한 PRC1 복합체, 뉴클레오솜을 정제함. (그림 12A, 12B). PRC1-Nucleosome 복합체를 형성하여 Grafix를 통하여 정제를 함. 그리고 이를 Negative em을 통하여 확인함 (그림 12C, 12D, 12E).

- PRC1-Nucleosome복합체 구조 규명: PRC1-Nucleosome 복합체를 초저온 전자현미경 (Cryo-EM) Glacios를 이용하여 1,179장의 이미지를 얻음. 이를 Relion을 이용하여 프로세싱하여 구조 분석을 진행 (그림 13).

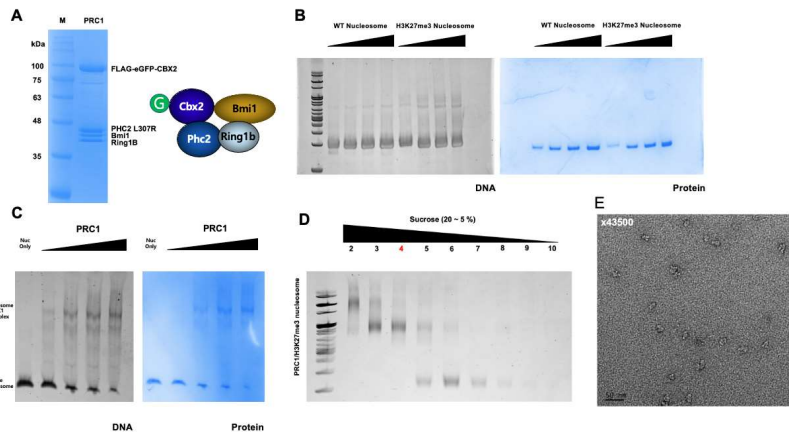


그림 12. PRC1-Nucleosome 복합체의 정제

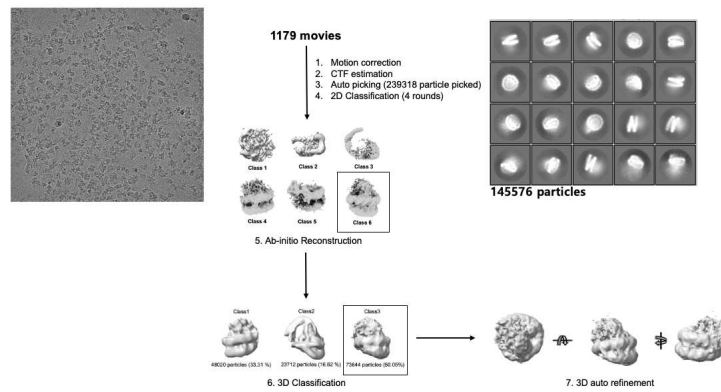


그림 13 PRC1-Nucleosome복합체 구조규명

- PRC1-di-Nucleosome복합체 구조규명: PRC1에 의한 nucleosome compaction기작을 규명하기 위해 di-nucleosome/PRC1 복합체의 초저온 전자현미경 구조 규명을 목표로, di-nucleosome/PRC1 복합체를 제조하고 이로부터 cryo-EM micrograph를 획득하여 초기 구조 분석을 진행하였다 (그림 14).
- PRC1에 의한 nucleosome의 phase separation 기작 규명: PRC1의 CBX 그리고 PHC 소단위체는 염색질의 압축과 액체-액체 상 분리(LLPS)에 관여하는 것으로 알려져 있음. 12량체 뉴클레오솜을 이용하여 PRC1에 의한 액체 액체 상분리 현상을 Confocal microscope 그리고 Negative stain EM을 이용하여 확인함. (그림 15)

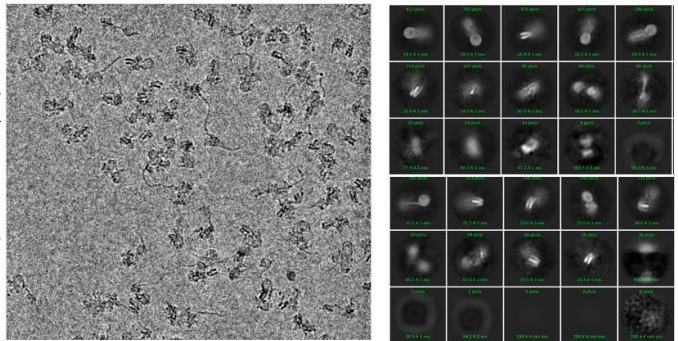


그림 14. Di-nucleosome/PRC1 복합체의 초저온 전자현미경 구조 분석

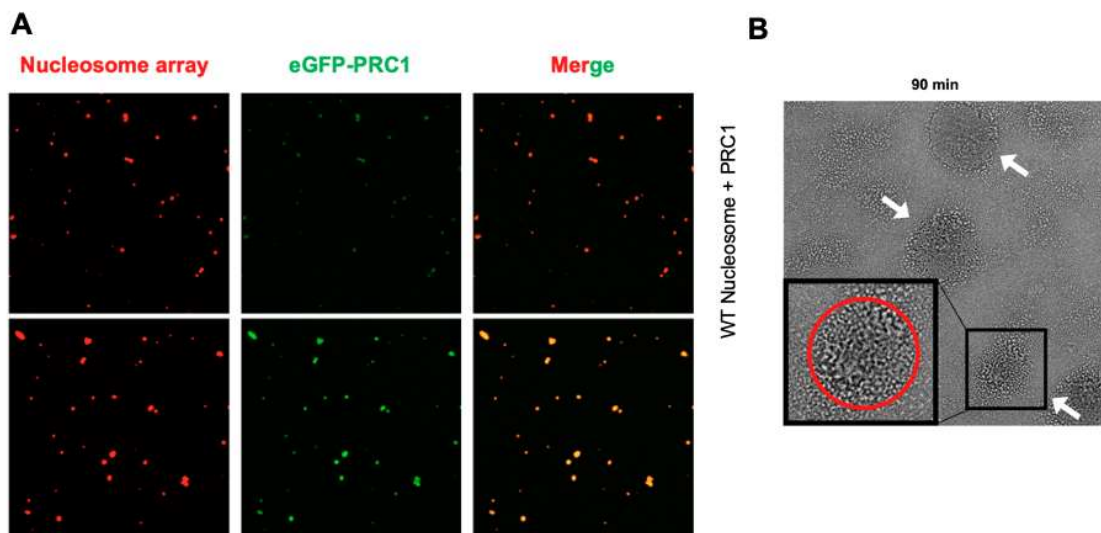


그림 15. PRC1에 의한 nucleosome의 phase separation

세부 목표 3. 크로마틴의 변형 기작 규명

가. 식물 Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) isoform의 기작 연구

*Arabidopsis thaliana*와 같은 특정 식물에 존재하는 Polycomb Repressive Complex 2 (이하 PRC2)는 타 organism과 달리 EzH2, Suz12 homologue subunit의 shuffling에 의해 target gene과 activity가 서로 다르게 나타난다. 이러한 subunit shuffling 현상은 식물의 발달, 종자 형성, 춘화작용 등 다양한 현상에 관여하는 식물 PRC2의 작동 및 활성 조절에 있어 중요한 현상으로써 많은 선행 연구가 진행되어 왔다.

본 연구에서는 *Arabidopsis thaliana* PRC2(이하 AtPRC2)의 subunit shuffling에 의해 형성되는 다양한 종류의 complex의 구조를 규명하고, 이에 적합한 생화학적 실험을 수행함으로써 subunit shuffling에 의해 나타나는 현상을 설명하기 위한 근거를 제시하고자 한다.

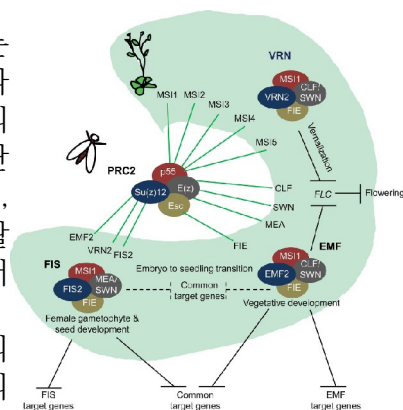


그림 16. 다양한 식물의 PRC2 isoform과 그 역할

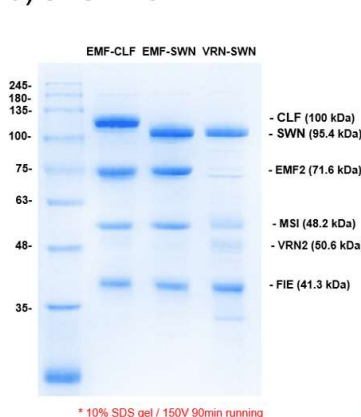
- **Plant PRC2의 발현 및 정제:** 선행 실험을 통해 AtPRC2의 6종류의 complex 중 EMF-SWN / EMF-CLF / VRN-SWN의 세 종류의 complex를 purification 하였다. 이렇게 분리한 complex는 그림1과 같이 SDS PAGE 및 Bis-Tris native PAGE를 통해 purity를 확인하였다 (그림 17).

- **Plant PRC2의 활성 분석:** 이렇게 purification한 AtPRC2의 subunit shuffling에 따라 nucleosome array에 대한 H3K27 methylation activity를 확인하기 위하여 그림2와 같이 nucleosome array의 농도를 증가시키

며 3H-SAM based methyltransferase activity assay를 진행하였다. 그 결과 그림3과 같이 CLF subunit을 가진 complex가 SWN based complex에 비해 높은 activity를 나타내는 것을 확인하였으며, Km은 두 subunit에 대해 큰 차이가 없으나 Vmax가 유의미하게 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 그림5와 같이 H3K27에 대한 di, tri-methylation의 특이성을 western blot을 바탕으로 확인한 결과 SWN subunit complex의 경우 H3K27의 di-methylation에 대해 major한 activity를 보이고, trimethylation에 대한 activity는 해당 실험을 통해 측정이 불가능했던 반면, CLF subunit complex의 경우 tri-methylation activity가 확인 되었다 (그림 18).

- **Plant PRC2의 구조 분석** 이러한 결과를 구조생물학적으로 접근하기 위하여 cryo-EM을 통해 EMF-SWN complex와 EMF-CLF complex의 구조를 규명하고자 시도하고 있다 (그림 18).

a) SDS PAGE



b) Bis-Tris native PAGE

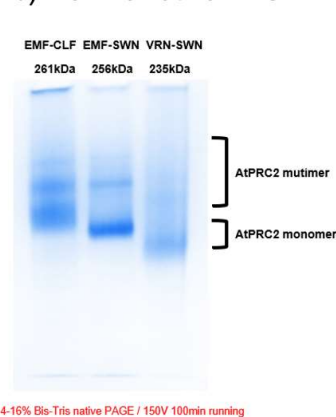


그림 17. 다양한 plant PRC2의 발현 및 정제

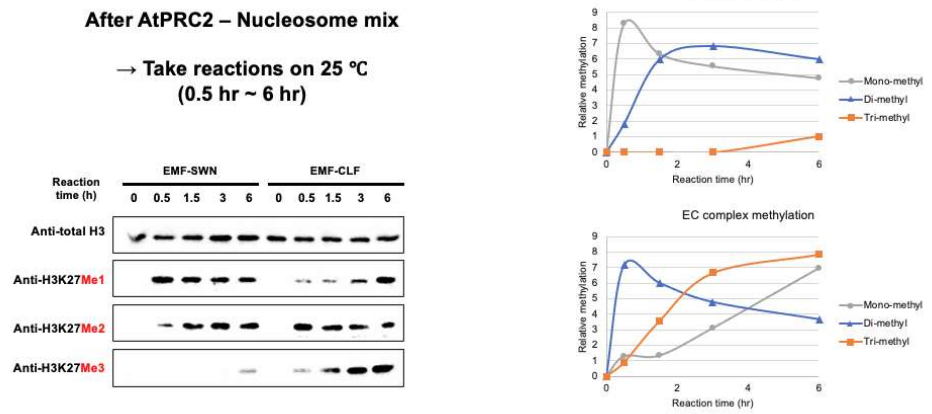


그림 18. 다양한 Plant PRC2의 활성 분석

Micrographs

(KARA 200kV FcIV)

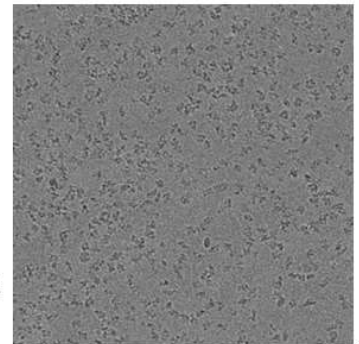
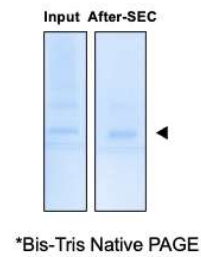


그림 19 Plant PRC2의 구조 분석

나. ASH1L histone H3 K36 메틸화 효소 복합체의 작용기작 규명

ASH1L은 유전자 발현을 조절하는 중요한 역할을 하는 히스톤 메틸화 효소 중 하나이다. 히스톤 메틸화는 크로마틴의 구조와 기능을 조절함으로써 유전자의 활성화나 비활성화에 핵심적인 역할을 한다. ASH1L은 특히 히스톤 H3의 리신 36 번째 아미노산(H3K36)에 메틸기를 추가하는 작용을 함으로써 유전자의 활성화에 관여한다. ASH1L은 Trithorax 그룹 단백질에 속하며, 유전자의 올바른 발현을 유지하는 데 필요한 epigenetic marker를 제공합니다. 이 효소는 다양한 발달 과정과 세포 기능에 중요하며, 그 결핍이나 과활성은 자폐 스펙트럼 장애, 투렛 증후군 및 지적 장애와 같은 다양한 질병의 발병과 연관되어 있다. ASH1L은 다양한 도메인을 포함하는 복잡한 구조를 가지고 있으며, 이러한 도메인들은 효소의 활성과 특정 유전자 지역에 대한 결합 능력에 중요하다. ASH1L의 활성은 자가 억제 메커니즘을 통해 조절되며, Mrg15와 같은 다른 단백질과의 상호 작용을 통해 이러한 자가 억제가 해제될 수 있습니다. Ash1은 Mrg15 및 Caf1과 함께 더 큰 복합체인 AMC 복합체의 일부로. 이 연구는 특히 이 복합체 내에서 Caf1의 역할을 규명하였다.

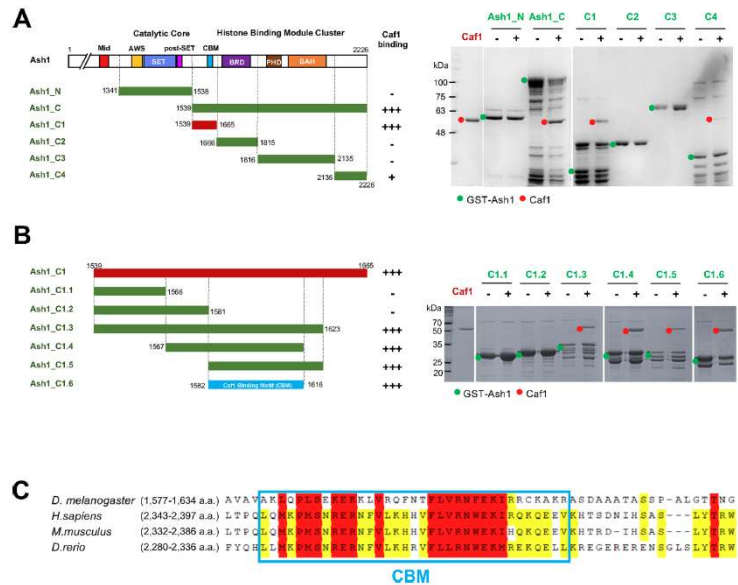


그림 21. Caf1 서브유닛과 Ash1 서브유닛의 결합 관계 규명

- AMC 복합체를 이루는 Caf1과 Ash1의 결합관계 규명: 본 연구에서는 AMC (Ash1, Mrg15, Caf1 복합체) 복합체 내에서 Caf1의 역할을 분석하기 위해 Caf1과 Ash1 사이의 결합하는 부위를 serial deletion mutant를 제조하여 분석하였다. 이를 통해 Caf1은 Ash1 내의 특정 영역인 'Caf1-Binding-Motif (CBM)'와 결합하며, 이 영역은 Ash1의 히스톤 결합 모듈 클러스터에 인접해 있음을 규명하였다.(그림 20).

- Caf1가 Ash1 활성이 미치는 작용기작 규명: Caf1이 Ash1과의 상호작용을 위해 히스톤 H4 결합 포켓을 사용한다는 것을 구조 분석을 통해 규명하였다 (그림 21). 또한 Caf1은 unmodified H3K4를 감지하고, 이는 AMC 복합체의 HMTase 활성에 영향을 미치는 것으로 나타났습니다 (그림 22). 이러한 발견은 히스톤 메틸화와 유전자 조절에 있어서 Caf1의 중요한 역할을 밝히며, 히스톤 수정을 통한 유전자 발현 조절 메커니즘을 규명하였다 (그림 22).

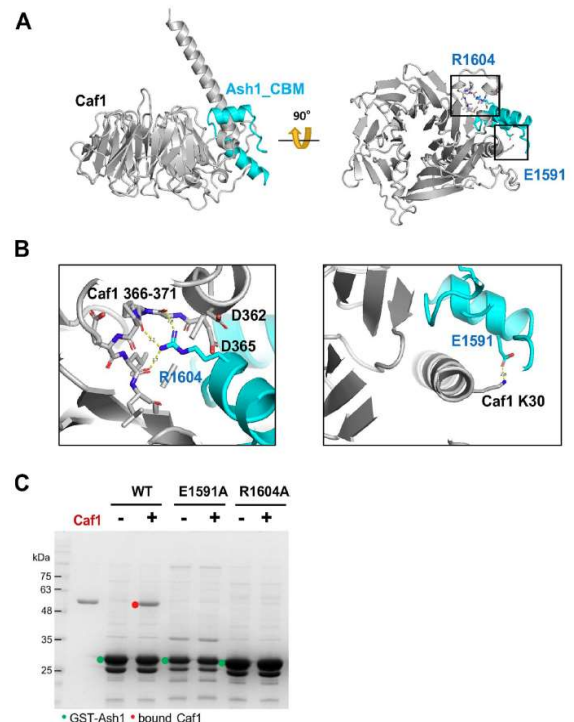


그림 22. Ash1_CBM과 Caf-1의 결합 구조 분석

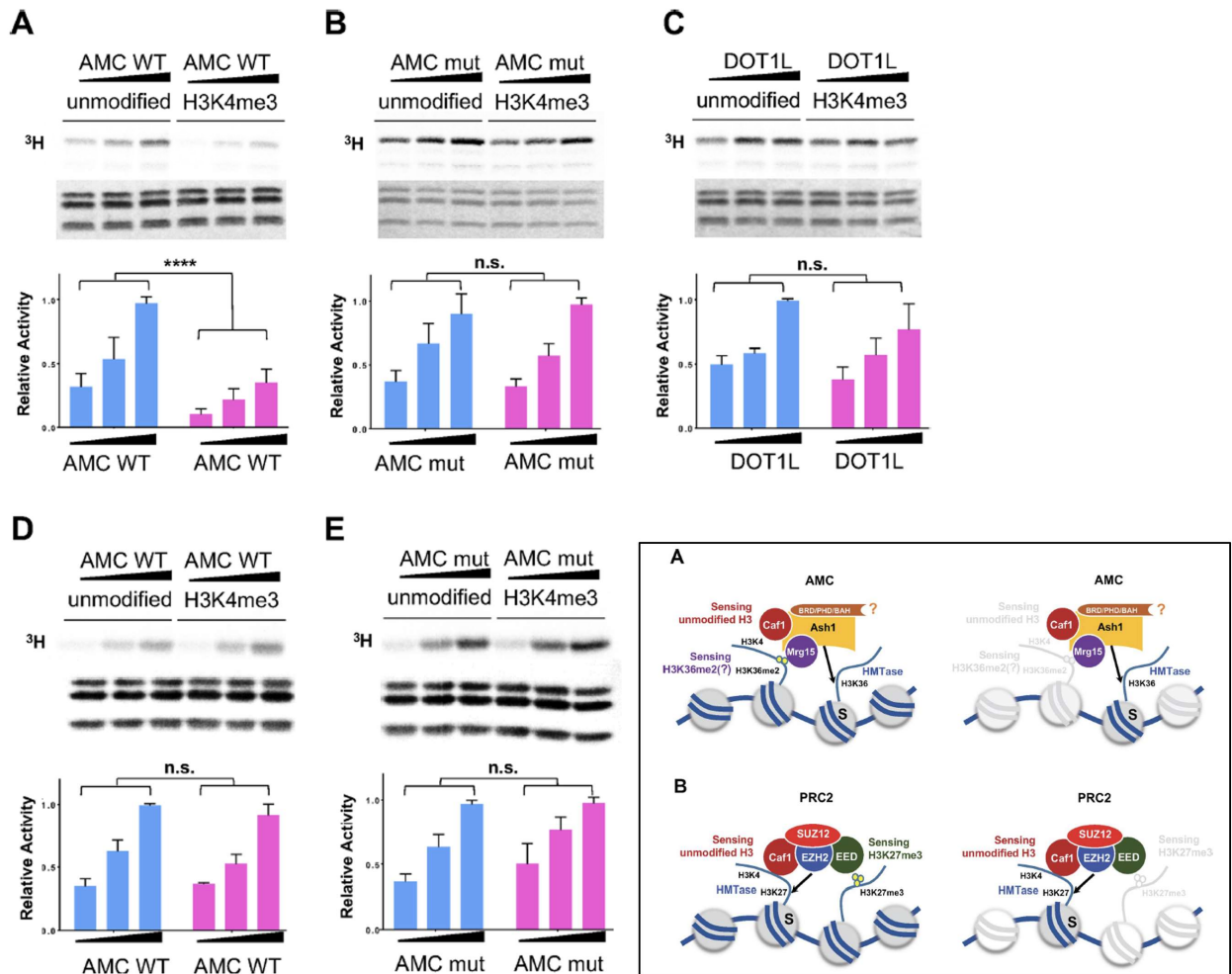


그림 23. Caf1가 Ash1 활성이 미치는 작용기작 규명

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 수준

1) 정성적 연구개발성과(연구개발결과)

- **세부 목표 1. 크로마틴의 핵심 단위인 뉴클레오솜 형성 기작 규명**-본 세부 목표에서는 뉴클레오솜이 형성되고 풀리는 뉴클레오솜 구조의 다이내믹을 규명이다. 본 연구에서는 NASP, FACT, Abo1/ATAD2의 다양한 히스톤 형성 단백질 복합체에 대한 구조 생화학적 연구를 수행하여 크로마틴의 핵심 단위인 뉴클레오솜의 형성과정에 대한 이해를 제공하고, 암과 같은 인간질환을 치유할 수 있는 플랫폼을 제공한다.
- **세부 목표 2. 크로마틴 고차원 구조 형성을 통한 유전자 발현 조절 기작 규명**-본 연구에서는 Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) 복합체에 의해 유도되는 크로마틴 고차원 구조의 형성기작을 규명하였다. 본 연구결과는 DNA 고차원 구조형성 과정 및 이를 통한 글로벌 수준 유전자 발현조절에 대한 메커니즘을 제공하고, 이들 기작의 이상에서 오는 인간 질병 치료에 대한 이해를 제공한다.
- **세부 목표 3. 크로마틴의 변형 기작 규명**- 본 연구에서는 히스톤 메틸화 효소인 Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) 와 ASH1L complex에 대한 구조 생화학적 연구를 수행하여, 히스톤 메틸화 효소의 작용기작과 그 조절 기작을 규명하였다.

2) 세부 정량적 연구개발성과: [붙임1] 참조

3) 목표 달성 수준

추진목표	달성내용	달성도 (%)
크로마틴의 핵심 단위인 뉴클레오솜 형성 기작 규명	- NASP, Codanin-1히스톤 샤페론 구조 규명 및 작용기작 규명	100
크로마틴 고차원 구조 형성을 통한 유전자 발현 조절 기작 규명	- Abo1, FACT, PRC1 크로마틴 고차원 복합체에 대한 작용기작 규명	100
크로마틴의 변형 기작 규명	- 히스톤 메틸화 효소 복합체인 PRC2, Ash1 의 작용기작 규명	100

4. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도(연구개발결과의 중요성)

본 연구 과제의 결과는 크로마틴 구조의 동적 조절 메커니즘을 규명함으로써 크로마틴의 조절 기작에 대한 이해를 제공하였다. 특히, 뉴클레오솜의 형성, 크로마틴 고차원 구조 형성 및 유전자 발현 조절 기작, 그리고 크로마틴 변형 기작에 대한 깊이 있는 연구를 수행하여, 다양한 복합체의 구조적 및 기능적 분석을 통해 크로마틴 관련 복잡한 생물학적 과정에 대한 새로운 통찰을 제공하였다. 본 연구의 성과는 SCI급 국제 학술지에 다수 게재되었으며, 과학기술적, 학술적 연구 성과를 내었다. 이러한 연구 결과는 향후 크로마틴 관련 질병의 치료 전략 개발과 유전자 조절 기술의 혁신에 기여할 가능성을 제시하며, 연구개발 성과의 활용 계획과 기대효과를 통해 사회적, 경제적 파급 효과를 기대할 수 있다. 또한, 본 연구에서 개발한 구조적 및 분자적 분석 방법론은 향후 크로마틴 관련 연구에 널리 활용될 수 있으며, 크로마틴 바이올로지 분야의 연구를 촉진시킬 것입니다. 이러한 연구 결과는 학술적으로 높은 가치를 가지며, 장기적으로는 신약 개발 및 유전자 치료 전략 개발에 기여할 잠재력을 가집니다.

5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

본 연구 과제의 성과를 바탕으로 지속적인 연구를 수행하여 향후 크로마틴 작용기작 이해와 이의 이상에서 오는 병의 기전 및 치료제 개발에 활용될 것으로 기대한다.

6. 자체점검표

작성 요령(작성 요령은 제출 시 삭제)

※ 각 항목에 따라 자체 점검한 등급을 체크(√)하고, 연구성과에 대한 종합의견을 간략하게 기술

구분	아주 우수	우수	보통	미흡	불량	비고
연구성과의 우수성/창의성	√					
연구성과의 파급 효과	√					
연구성과에 대한 활용 가능성	√					
연구수행의 성실도	√					
연구성과에 대한 종합의견 기술	본 연구는 크로마틴의ダイナ믹스에 작용하는 다양한 단백질 복합체에 대한 구조 생화학적 연구를 수행하였다.					

[붙임1] 세부 정량적 연구개발성과

사업명	중견후속연구(연평균연구비 2억원~4억원 이내)	연구책임자	송지준	주관기관	한국과학기술원
과제번호	2020R1A2B5B03001517	과제명	크로마틴 다이내믹스 기작 규명		

※산학강좌,기술이전 및 기술평가는 현재 입력 받지 않는 항목입니다.

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)																		
전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적		표준		신기술 지정	기술 제품 인증	
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서	국내	국제			
SCI	비SCI	SCI	비SCI	국내			국외	국내	국외	국내	국외							
2	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)							
학위배출		국내외 연수지원				산학강좌	연구기자재
박사	석사	장기		단기			
		국내	국외	국내	국외		
6	5	0	0	0	0	0	0

국제협력(단위 :명,건)					
과학자교류		국제협력기반			학술회의개최
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	학술회의개최(국내,국제 통합)
0	0	0	0	0	0

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)									
기술확산			연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)						
기술실시계약 (기술이전 등)	기술지도	기술무역	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료	기타목적활용	기술마케팅	시험제품	사업화계획
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

기타 성과(단위 : 건)								
언론보도 성과	생명자원/신품종 /화합물	원자력연구개발사업실적(원자력연구개발사업에한함)				법령 반영	정책 활용 내용	설계 기준
		기술보고서	설계문서	장비구축 및 개발	분석방법개발			
0	0	0	0	0	0	0	0	0

전문학술지 논문게재 성과정보											
과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2020R1A 2B5B030 01517	202006	Aldehyde-alcohol dehydrogenas	Kim, Gijeong; Yang, Jinsol; Jang, Juwon;	SCI	COMMUNIC ATIONS BIOLOGY	3(1)	국외	SCI등재	4.165	예	20

		e undergoes structural transition to form extended spiroosomes for substrate channeling	Choi, Jin-Seok; Roe, Andrew J.; Byron, Olwyn; Seok, Chaok; Song, Ji-Joon;								
2020R1A2B5B03001517	202009	The Polyglutamine Expansion at the N-Terminal of Huntingtin Protein Modulates the Dynamic Configuration and Phosphorylation of the C-Terminal HEAT Domain	Jung, Taeyang; Shin, Baehyun; Tamo, Giorgio; Kim, Hyeongju; Vijayvargia, Ravi; Leitner, Alexander; Marcaida, Maria J.; Astorga-Wells, Juan; Jung, Roy; Aebersold, Ruedi; Dal Peraro, Matteo; Hebert, Hans; Seong, Ihn Sik; Song, Ji-Joon;	SCI	STRUCTURE	(0)	국외	SCI등재	4.862	예	30

전문화술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2020R1A 2B5B030 01517	202011	Yeast Chd1p Unwraps the Exit Side DNA upon ATP Binding to Facilitate the Nucleosome Translocation Occurring upon ATP Hydrolysis	Kirk, Jaewon; Lee, Ju Yeon; Lee, Yejin; Kang, Chanshin; Shin, Soochul; Lee, Eunhye; Song, Ji-Joon; Hohng, Sungchul;	SCI	BIOCHEMISTRY	()	국외	SCI등재	2.865	아니오	20
2020R1A 2B5B030 01517	202012	Quantification of purified endogenous miRNAs with high sensitivity and specificity	Shin, Soochul; Jung, Yoonseok; Uhm, Heesoo; Song, Minseok; Son, Soomin; Goo, Jiyoung; Jeong, Cherlhyun; Song, Ji-Joon; Kim, V. Narry; Hohng, Sungchul;	직접입력	NATURE COMMUNICATIONS	()	국외	SCI등재	12.121	아니오	10
2020R1A 2B5B030 01517	202106	Antigen-Presenting, Self-Assembled Protein Nanobarrels as an Adjuvant-Free Vaccine Platform against Influenza Virus	Kang, Sukmo; Kim, Yujin; Shin, Yumi; Song, Ji-Joon; Jon, Sangyong;	SCI	ACS NANO	15(6)	국외	SCI등재	15.881	아니오	30

전문화술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2020R1A 2B5B030 01517	202109	A Novel N-terminal Region to Chromodomain in CHD7 is Required for the Efficient Remodeling Activity	Lee, Eunhye; Kang, Chanshin; Purhonen, Pasi; Hebert, Hans; Bouazoune, Karim; Hohng, Sungchul; Song, Ji-Joon;	SCI	JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY	433(0)	국외	SCI등재	5.469	예	40
2020R1A 2B5B030 01517	202304	Caf1 regulates the histone methyltransferase activity of Ash1 by sensing unmodified histone H3	Yoon, Eojin; Song, Ji-Joon;	SCI	EPIGENETICS & CHROMATIN	16(1)	국외	SCI등재	3.9	아니오	80
2020R1A 2B5B030 01517	202309	Structure of the human ATAD2 AAA+ histone chaperone reveals mechanism of regulation and inter-subunit communication	Cho, Carol; Ganster, Christian; Uchihashi, Takayuki; Kato, Koichi; Song, Ji-Joon;	SCI	COMMUNICATIONS BIOLOGY	6(1)	국외	SCI등재	5.9	예	40
2020R1A 2B5B030 01517	202312	Fast, sensitive, and specific multiplexed single-molecule detection of circulating tumor DNA	Shin, Soochul; Han, Sun; Kim, Juyoung; Shin, Yumi; Song, Ji-Joon; Hohng, Sungchul;	SCI	BIOSENSORS & BIOELECTRONICS	242(0)	국외	SCI등재	12.6	아니오	10

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2020R1A 2B5B030 01517	202312	Molecular basis for PHF7-mediated ubiquitination of histone H3	Hyun Sik Lee;Injin Bang;Jun ghyun You;Tae-Kyeong Jeong;Chang Rok Kim;Minsang Hwang;Jong-Seo Kim;Sung Hee Baek;Ji-Joon Song;Hee-Jung Choi	SCI	GENES & DEVELOPMENT	37(21)	국외	SCI등재	10.5	아니오	20
2020R1A 2B5B030 01517	202102	Single-Molecule Imaging Reveals the Mechanism Underlying Histone Loading of Schizosaccharomyces pombe AAA plus ATPase Abo1	Kang, Yujin; Cho, Carol; Lee, Kyung Suk; Song, Ji-Joon; Lee, Ja Yil;	SCI	MOLECULES AND CELLS	44(0)	국내	SCI등재	5.034	아니오	40

전문화술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2020R1A 2B5B030 01517	202308	Color-Tuning Mechanism of the Lit Form of Orange Carotenoid Protein	Han, Man-Hyuk ; Yang, Hee Wook; Yoon, Jungmin; Villafani, Yvette; Song, Ji-Young; Pan, Cheol Ho; Park, Keunwan; Cho, Youngmo on; Song, Ji-Joon; Kim, Seung Joong; Park, Youn-II; Park, Jiyong;	SCI	MOLECULES AND CELLS	46(8)	국내	SCI등재	3.8	아니오	10

학위배출인력 성과정보							
과제번호	학위취득연월	학위구분	학위취득자				진로
			성명	성별	대학	학과	
2020R1A2B5B03001517	202008	박사	장성민	남성	한국과학기술원	생명과학과	취업(박사후연구원 포함)
2020R1A2B5B03001517	202008	박사	이은혜	여성	한국과학기술원	생명과학과	취업(박사후연구원 포함)
2020R1A2B5B03001517	202103	석사	정태경	남성	한국과학기술원	생명과학과	박사과정진학
2020R1A2B5B03001517	202109	석사	이우린	여성	한국과학기술원	생명과학과	박사과정진학
2020R1A2B5B03001517	202202	박사	김형주	남성	한국과학기술원	생명과학과	취업(박사후연구원 포함)
2020R1A2B5B03001517	202202	석사	우상민	남성	한국과학기술원	생명과학과	박사과정진학
2020R1A2B5B03001517	202202	석사	김나윤	여성	한국과학기술원	생명과학과	박사과정진학
2020R1A2B5B03001517	202302	박사	윤어진	여성	한국과학기술원	생명과학과	취업(박사후연구원 포함)
2020R1A2B5B03001517	202302	석사	김재성	남성	한국과학기술원	생명과학과	박사과정진학
2020R1A2B5B03001517	202308	박사	장주원	여성	한국과학기술원	생명과학과	취업준비중
2020R1A2B5B03001517	202308	박사	김기정	남성	한국과학기술원	생명과학과	취업(박사후연구원 포함)

※ 필수제출 자료입니다. 임의로 서식을 삭제하지 마시고 반드시 작성하여 제출해 주시기 바랍니다.

[붙임2-1] 연구책임자(해당 시 참여연구자(공동) 포함) 대표적 연구실적

○ 논문 및 특허 실적(최대 5개 작성)(파란색 글자는 예시임)

번호	구분 (논문/특허)	논문명/특허명	소속기관명	역할	논문게재지/특 허등록국가	논문게재 일 /특허등록 일	특기사항
1	논문	Yeast Chd1p Unwraps the Exit Side DNA upon ATP Binding to Facilitate the Nucleosome Translocation Occurring upon ATP Hydrolysis	한국과학기술 술원	교신저자	BIOCHEMI STRY	2020.11	
2	논문	A Novel N-terminal Region to Chromodomain in CHD7 is Required for the Efficient Remodeling Activity	한국과학기술 술원	교신저자	JOURNAL OF MOLECUL AR BIOLOGY	2021.09	
3	논문	Caf1 regulates the histone methyltransferase activity of Ash1 by sensing unmodified histone H3	한국과학기술 술원	교신저자	EPIGENETI CS & CHROMATI N	2023.04	
4	논문	Structure of the human ATAD2 AAA+ histone chaperone reveals mechanism of regulation and inter-subunit communication	한국과학기술 술원	교신저자	COMMUNI CATIONS BIOLOGY	2023.09	
5	논문	Molecular basis for PHF7-mediated ubiquitination of histone H3	한국과학기술 술원	공동저자	GENES & DEVELOP MENT	2023.12	

[붙임2-2] 주관연구책임자(해당 시 참여연구자(공동) 포함) 대표적 논문·특허실적 요약문

연구실적 유형		논문(O) 특허()		
연구책임자 성명		연구책임자(송지준)		
논문/특허명		Yeast Chd1p Unwraps the Exit Side DNA upon ATP Binding to Facilitate the Nucleosome Translocation Occurring upon ATP Hydrolysis		
논문실적정보 V <input type="checkbox"/>	게재지(저널명)	Biochemistry		
	SCI 등재 여부	등재	인용횟수(SCI) Google Scholar	2 회
	SCOPUS 등재 여부		인용횟수(SCOPUS)	
	ISSN	0006-2960	게재년월	2020.11
	역할(제1, 교신, 참여)	교신저자	참여자수	8
특허실적정보 <input type="checkbox"/>	구분		등록(출원) 국가	
	등록(출원) 번호		등록(출원)일	
	등록(출원)자 성명		발명자 성명	
요 약 문				
<p>크로모도메인-헬리케이스-DNA-결합 단백질 1 (CHD1)은 염색체를 DNA를 따라 뉴클레오솜을 이동시켜 리모델링하지만, 그 메커니즘은 알려져 있지 않다. 단일 분자 형광 실험을 사용하여 이스트 CHD1 (Chd1p)이 뉴클레오솜을 리모델링하는 메커니즘을 규명하였다. ATP가 Chd1p에 바인딩되면 뉴클레오솜의 출구 쪽의 DNA가 일시적으로 풀림으로써 뉴클레오솜 이동이 용이해진다는 것을 발견했다. 이동 후 풀린 DNA는 가수분해된 뉴클레오타이드와 인산의 방출 후 다시 감싸지며, ATP 가수분해 주기의 각 단계가 뉴클레오솜 리모델링의 다른 단계에 관여 한다는 것을 밝혀내었다. 이러한 결과는 Chd1p가 다른 ATP 의존적인 염색체 리모델러들과는 다른 메커니즘을 통해 뉴클레오솜을 리모델링한다는 것을 보여준다.</p>				
연구 목표 및 연구내용과의 연관성		기대성과 및 파급 효과		
<p>- 연구목표 2의 크로마틴 고차원 구조 형성 복합체에 대한 구조 생화학적연구</p>		<p>- CHD1 는 크로마틴의 고차원 구조를 변형하는 리모델링 단백질로 다양한 질병의 원인으로 알려져 있어, CHD1 이상에서 오는 다양한 질병에 대한 원인에 대한 힌트를 제공</p>		

Yeast Chd1p Unwraps the Exit Side DNA upon ATP Binding to Facilitate the Nucleosome Translocation Occurring upon ATP Hydrolysis

Jaewon Kirk, Ju Yeon Lee, Yejin Lee, Chanshin Kang, Soochul Shin, Eunhye Lee, Ji-Joon Song,* and Sungchul Hohng*

Cite This: *Biochemistry* 2020, 59, 4481–4487

Read Online

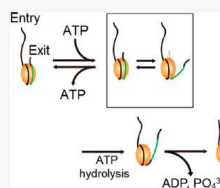
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 (CHD1) remodels chromatin by translocating nucleosomes along DNA, but its mechanism remains poorly understood. We use single-molecule fluorescence experiments to clarify the mechanism by which yeast CHD1 (Chd1p) remodels nucleosomes. We find that binding of ATP to Chd1p induces transient unwrapping of the DNA on the exit side of the nucleosome, facilitating nucleosome translocation. ATP hydrolysis is required to induce nucleosome translocation. The unwrapped DNA after translocation is then rewrapped after the release of the hydrolyzed nucleotide and phosphate, revealing that each step of the ATP hydrolysis cycle is responsible for a distinct step of nucleosome remodeling. These results show that Chd1p remodels nucleosomes via a mechanism that is unique among the other ATP-dependent chromatin remodelers.



AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Sungchul Hohng – Department of Physics and Astronomy, Institute of Applied Physics, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea; orcid.org/0000-0002-7131-2138; Email: shohng@snu.ac.kr

Ji-Joon Song – Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Daejeon 34141, Republic of Korea; orcid.org/0000-0001-7120-6311; Email: songj@kaist.ac.kr

Authors

Jaewon Kirk – Department of Physics and Astronomy, Institute of Applied Physics, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea

Ju Yeon Lee – Department of Physics and Astronomy, Institute of Applied Physics, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea

Yejin Lee – Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Daejeon 34141, Republic of Korea

Chanshin Kang – Department of Physics and Astronomy, Institute of Applied Physics, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea

Soochul Shin – Department of Physics and Astronomy, Institute of Applied Physics, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea

Eunhye Lee – Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Daejeon 34141, Republic of Korea

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.biochem.0c00747>

Author Contributions

J.K., J.Y.L., Y.L., and C.K. contributed equally to this work. J.K., J.Y.L., Y.L., C.K., S.S., and E.L. performed the experiments, and J.S. and S.H. led the project. All authors analyzed data and contributed to writing of the paper.

Funding

This work was supported by a grant (NRF-2019R1A2C2005209) to S.H. and by grants (NRF-2020R1A2B5B03001517 and NRF-2016K1A1A2912057) to J.S. from the National Research Foundation of Korea.

Notes

involves inhibitory modules antagonized by nucleosomal epitopes. *Nature* 492, 280–284.

(8) Flaus, A.; Martin, D. M.; Barton, G. J.; and Owen-Hughes, T. (2006) Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res.* 34, 2887–2905.

(9) Singleton, M. R.; Dillingham, M. S.; and Wigley, D. B. (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 23–50.

(10) Bouazoune, K.; Mitterweger, A.; Längst, G.; Imhof, A.; Akhtar, A.; Becker, P. B.; and Brehm, A. (2002) The dM2-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization. *EMBO journal* 21, 2430–2440.

(11) Nodelman, I. M.; Bleichert, F.; Patel, A.; Ren, R.; Horvath, K. C.; Berger, J. M.; and Bowman, G. D. (2017) Interdomain communication of the Chd1 chromatin remodeler across the DNA gyres of the nucleosome. *Mol. Cell* 65, 447–459.

(12) Flanagan, J. F.; Mi, L.-Z.; Chruszcz, M.; Cymborowski, M.; Clines, K. L.; Kim, Y.; Minor, W.; Rastinejad, F.; and Khorasanizadeh, S. (2005) Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* 438, 1181–1185.

(13) Sims, R. J.; Chen, C.-F.; Santos-Rosa, H.; Kouzarides, T.; Patel, S. S.; and Reinberg, D. (2005) Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J. Biol. Chem.* 280, 41789–41792.

(14) Pray-Grant, M. G.; Daniel, J. A.; Schieltz, D.; Yates, J. R., III; and Grant, P. A. (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 433, 434–438.

(15) Hassan, A. H.; Prochasson, P.; Neely, K. E.; Galasinski, S. C.; Chandy, M.; Carrozza, M. J.; and Workman, J. L. (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111, 369–379.

(16) Kasten, M.; Szerlong, H.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Werner, M.; and Cairns, B. R. (2004) Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *EMBO J.* 23, 1348–1359.

(17) Blosser, T. R.; Yang, J. G.; Stone, M. D.; Narlikar, G. J.; and Zhuang, X. (2009) Dynamics of nucleosome remodeling by individual ACF complexes. *Nature* 462, 1022–1027.

(18) Deindl, S.; Hwang, W. L.; Hota, S. K.; Blosser, T. R.; Prasad, P.; Bartholomew, B.; and Zhuang, X. (2013) ISWI remodelers slide nucleosomes with coordinated multi-base-pair entry steps and single-base-pair exit steps. *Cell* 152, 442–452.

(19) Harada, B. T.; Hwang, W. L.; Deindl, S.; Chatterjee, N.; Bartholomew, B.; and Zhuang, X. (2016) Stepwise nucleosome translocation by RSC remodeling complexes. *eLife*, e10051.

(20) Sundaramoorthy, R.; Hughes, A. L.; Singh, V.; Wiechens, N.; Ryan, D. P.; El-Mkami, H.; Petoukhov, M.; Svergun, D. I.; Treutlein, B.; Quack, S.; et al. (2017) Structural reorganization of the chromatin remodeling enzyme Chd1 upon engagement with nucleosomes. *eLife*, 22210.

연구실적 유형		논문(O) 특허()		
연구책임자 성명		연구책임자(송지준)		
논문/특허명		A Novel N-terminal Region to Chromodomain in CHD7 is Required for the Efficient Remodeling Activity		
논문실적정보 <input type="checkbox"/>	게재지(저널명)	Journal of Molecular Biology		
	SCI 등재 여부	등재	인용횟수(SCI) Google Scholar	2 회
	SCOPUS 등재 여부		인용횟수(SCOPUS)	
	ISSN	0022-2836	게재년월	202109
	역할(제1, 교신, 참여)	교신저자	참여자수	7 명
특허실적정보 <input type="checkbox"/>	구분		등록(출원) 국가	
	등록(출원) 번호		등록(출원)일	
	등록(출원)자 성명		발명자 성명	
요 약 문				
<p>크로모도메인-헬리케이스 DNA 결합 단백질 7 (CHD7)은 열린 염색질 구조를 유지하는 데 관여하는 ATP 의존적인 염색질 리모델러이다. CHD7 유전자의 돌연변이는 다양한 발달 장애, 특히 CHARGE 증후군을 일으킨다. 그러나 CHD7이 뉴클레오솜을 리모델링하는 분자 메커니즘에 대해 잘 알려져 있지 않다. CHD7 염색질 리모델러에 대한 생화학적 및 생물물리학적 분석을 수행하고, 크로모도메인(N-CRD) 앞의 N-단백질이 뉴클레오솜과 상호작용하며 높은 보존된 아르기닌 연속체를 포함하고 있음을 발견했다. 이 영역이 CHD7의 효율적인 ATPase 자극 및 뉴클레오솜 리모델링 활동에 필요하다는 것을 규명하였다. 더욱이, smFRET 분석은 N-CRD의 돌연변이가 리모델링 활동에 결함을 일으키는 것을 보여주었다. 종합적으로, 본 결과는 CHD7의 이전에 식별되지 않은 N-단백질 영역의 기능적 중요성을 밝혀내며, 염색질 리모델러의 다양한 도메인이 그들의 활동을 조절하는 데 관여함을 시사한다.</p>				
연구 목표 및 연구내용과의 연관성		기대성과 및 파급 효과		
<p>- 연구목표 2의 크로마틴 고차원 구조 형성 복합체에 대한 구조 생화학적연구</p>		<p>- CHD7 는 크로마틴의 고차원 구조를 변형하는 리모델링 단백질로 다양한 질병의 원인으로 알려져 있어, CHD7 이상에서 오는 다양한 질병에 대한 원인에 대한 힌트를 제공</p>		



A Novel N-terminal Region to Chromodomain in CHD7 is Required for the Efficient Remodeling Activity

Eunhye Lee^{1†}, Chanshin Kang^{2†}, Pasi Purhonen³, Hans Hebert³,
Karim Bouazoune⁴, Sungchul Hohng^{2*} and Ji-Joon Song^{1*}

1 - Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), KAIST Institute of BioCentury, Daejeon 34141, Korea

2 - Department of Physics and Astronomy, Institute of Applied Physics, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

3 - School of Engineering Sciences in Chemistry, Biotechnology and Health, Department of Biomedical Engineering and Health Systems, KTH Royal Institute of Technology, S-141 52 Huddinge, Sweden

4 - Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT), Biomedizinisches Forschungszentrum, Philipps-Universität Marburg, Marburg 35043, Germany

Correspondence to Sungchul Hohng and Ji-Joon Song: shohng@snu.ac.kr (S. Hohng), songj@kaist.ac.kr (J.-J. Song)

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167114>

Edited by Yamini Dalal

Abstract

Chromodomain-Helicase DNA binding protein 7 (CHD7) is an ATP dependent chromatin remodeler involved in maintaining open chromatin structure. Mutations of CHD7 gene causes multiple developmental disorders, notably CHARGE syndrome. However, there is not much known about the molecular mechanism by which CHD7 remodels nucleosomes. Here, we performed biochemical and biophysical analysis on CHD7 chromatin remodeler and uncover that N-terminal to the Chromodomain (N-CRD) interacts with nucleosome and contains a high conserved arginine stretch, which is reminiscent of arginine anchor. Importantly, this region is required for efficient ATPase stimulation and nucleosome remodeling activity of CHD7. Furthermore, smFRET analysis shows the mutations in the N-CRD causes the defects in remodeling activity. Collectively, our results uncover the functional importance of a previously unidentified N-terminal region in CHD7 and implicate that the multiple domains in chromatin remodelers are involved in regulating their activities.

© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

nected to the flow cell. Nucleosome substrates were immobilized on a PEGylated surface using biotin-streptavidin conjugation. smFRET experiments were performed in an imaging buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM NaCl) containing a gloxy oxygen scavenging system (a mixture of glucose oxidase (1 mg/ml, Sigma), catalase (0.04 mg/ml, Sigma), glucose (0.4% (w/v), Sigma), and Trolox (2 mM, Sigma)). Single-molecule fluorescence images were acquired at a frame rate of 10 Hz using a home-built prism-type total internal reflection fluorescence microscope equipped with an electron-multiplying charge coupled device camera (Ixon DV897; Andor Technology). Cy3 and Cy5 were alternately excited with 532 nm and 633 nm lasers using the ALEX (Alternative Laser Excitation) technique.⁴⁹ Experi-

Acknowledgements

We thank the members of the Song Lab for helpful discussions. We also thank the staff at the SciLifeLab and KARA for the Data collection. We thank Alexander Leitner at ETH Zurich for helpful discussion regarding XL-MS. The data processing was performed at Global Science experimental Data hub Center (GSDC) at Korea Institute of Science and Technology Information (KISTI). This work is partially supported by grants (NRF-2020R1A2B5B03001517, NRF-2016K1A1A2912057 to J.S. and NRF-2019R1A2C2005209 to S.H.) from the National Research Foundation of Korea, and a grant from the Swedish Research Council (VR- 2016-03810 to H.H. and P.H.).

연구실적 유형		논문(o) 특허()		
연구책임자 성명		연구책임자(송지준)		
논문/특허명		Caf1 regulates the histone methyltransferase activity of Ash1 by sensing unmodified histone H3		
논문실적정보 <input type="checkbox"/>	게재지(저널명)	Epigenetics & Chromatin		
	SCI 등재 여부	등재	인용횟수(SCI) Google Scholar	0 회
	SCOPUS 등재 여부		인용횟수(SCOPUS)	
	ISSN	1756-8935	게재년월	202304
	역할(제1, 교신, 참여)	교신저자	참여자수	2 명
특허실적정보 <input type="checkbox"/>	구분		등록(출원) 국가	
	등록(출원) 번호		등록(출원)일	
	등록(출원)자 성명		발명자 성명	
요 약 문				
<p>히스톤 수정은 유전자 발현을 조절하는 많은 핵심 메커니즘 중 하나입니다. Ash1은 히스톤 H3K36 메틸전이효소로서 유전자 활성화에 관여한다. Ash1은 Mrg15 및 Caf1/p55/Nurf55/RbAp48 (AMC 복합체)와 함께 큰 복합체를 형성한다. Ash1 하위단독으로는 자가억제로 인해 매우 낮은 활성을 나타내며, Mrg15의 결합이 자가억제를 해제한다. Caf1은 여러 염색체 변형 복합체에서 흔히 발견되는 스캐폴딩 단백질로, 두 개의 히스톤 결합 포켓을 가지고 있는데, 하나는 H3 와 결합하고, 다른 하나는 H4와 결합한다. Caf1은 H3 결합 포켓을 사용하여 비수정 히스톤 H3K4 잔여를 감지하는 능력을 가지고 있다. 그러나 AMC 복합체에서 Caf1의 역할은 알려지지 않았다. 본 연구는 AMC 복합체 하위단위 간 상호작용을 해체하여 Caf1이 히스톤 결합 모듈 군집 근처에서 Ash1과 상호작용하기 위해 히스톤 H4 결합 포켓을 사용한다는 것을 밝혀냈다. 또한, H3K4 메틸화가 비수정 히스톤 H3K4를 감지하여 활동을 인터뉴클레오솜적으로 조절함으로써 AMC HMTase 활성을 억제한다는 것을 보여주었다. 이는 H3K4 와 H3K36 메틸화 간의 상호작용을 시사하여, AMC 히스톤 H3K36 메틸전이 효소 복합체가 미묘하게 조절되는 메커니즘을 밝혀내었다.</p>				
연구 목표 및 연구내용과의 연관성		기대성과 및 파급 효과		
<p>- 연구목표 3의 크로마틴 변형 복합체에 대한 구조 생화학적연구</p>		<p>- Caf1은 Ash1 히스톤 메틸화 효소의 요소로서 히스톤 메틸화 효소의 활성을 조절하는 기작을 규명하였고, Ash1의 과 발현에서 오는 백혈병등의 질병에 대한 원인에 대한 힌트를 제공</p>		

RESEARCH

Open Access

Caf1 regulates the histone methyltransferase activity of Ash1 by sensing unmodified histone H3



Eojin Yoon¹ and Ji-Joon Song^{1*}

Abstract

Histone modifications are one of the many key mechanisms that regulate gene expression. Ash1 is a histone H3K36 methyltransferase and is involved in gene activation. Ash1 forms a large complex with Mrg15 and Caf1/p55/Nurf55/RbAp48 (AMC complex). The Ash1 subunit alone exhibits very low activity due to the autoinhibition, and the binding of Mrg15 releases the autoinhibition. Caf1 is a scaffolding protein commonly found in several chromatin modifying complexes and has two histone binding pockets: one for H3 and the other for H4. Caf1 has the ability to sense unmodified histone H3K4 residues using the H3 binding pocket. However, the role of Caf1 in the AMC complex has not been investigated. Here, we dissected the interaction among the AMC complex subunits, revealing that Caf1 uses the histone H4 binding pocket to interact with Ash1 near the histone binding module cluster. Furthermore, we showed that H3K4 methylation inhibits AMC HMTase activity via Caf1 sensing unmodified histone H3K4 to regulate the activity in an internucleosomal manner, suggesting that crosstalk between H3K4 and H3K36 methylation. Our work revealed a delicate mechanism by which the AMC histone H3K36 methyltransferase complex is regulated.

*Correspondence:

Ji-Joon Song
songj@kaist.ac.kr

¹ Department of Biological Sciences, KI for BioCentury, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Daejeon 34141, Korea

in humans are histone methyltransferases (HMTases) and belong to the Trithorax Group of proteins. The histone target site of Ash1 has been controversial. However, it has been clearly demonstrated that Ash1 is a bona-fide histone H3K36 methyltransferase [2]. The human

Tris-HCl (9.0), 50 mM MgCl₂, 40 mM D11) and added to the reaction mixture. The reaction was performed at 25 °C for 40 min, stopped by heating to 65 °C for 5 min, and then SDS buffer was added and boiled in 95 °C for

Funding

A grant (NRF-2020R1A2B5B03001517) from National Research Foundation of Korea.

연구실적 유형		논문(o) 특허()		
연구책임자 성명		연구책임자(송지준)		
논문/특허명		Structure of the human ATAD2 AAA+ histone chaperone reveals mechanism of regulation and inter-subunit communication		
논문실적정보 <input type="checkbox"/>	게재지(저널명)	Communications Biology		
	SCI 등재 여부	등재	인용횟수(SCI) Google Scholar	0 회
	SCOPUS 등재 여부		인용횟수(SCOPUS)	
	ISSN	2399-3642	게재년월	202309
	역할(제1, 교신, 참여)	교신저자	참여자수	5 명
특허실적정보 <input type="checkbox"/>	구분		등록(출원) 국가	
	등록(출원) 번호		등록(출원)일	
	등록(출원)자 성명		발명자 성명	
요 약 문				
<p>ATAD2는 비전형적인 ATP 의존적인 히스톤 챗론 및 주요 암 타깃이다. ATAD2 브로모도메인을 타겟팅하는 약물을 개발하기 위한 노력이 널리 전개되었음에도 불구하고, ATAD2의 전체 구조적 조직과 조절에 대해 거의 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 인간 ATAD2의 ATP 상태의 3.1 Å 크리오 전자현미경 구조를 규명하였다. 이 구조는 중앙 포어에 펩타이드 기질을 결합하는 얇은 육각형 나선을 보여준다. 나선 구조는 시작점 서브유닛 사이에 매워지는 N-단백질 링커 도메인 (LD)에 의해 잠금이 되어 있으며, 이로써 AAA+ 링의 ATP-의존 대칭 깨짐이 제한된다. 반면, ATAD2-히스톤 H3/H4 복합체의 구조는 LD가 시작점에서 분리된 것을 보여주며, 이는 H3/H4 결합이 LD를 알로스테릭하게 해제하여 AAA+ 나선을 잠금 해제한다는 것을 시사한다. 이러한 발견들은 서로간의 서브유닛 간 신호 전달 메커니즘의 발견과 결합하여, ATAD2에 대한 독특한 규제 메커니즘을 밝혀내었으며, 새로운 ATAD2 억제제를 개발하기 위한 기초를 마련하였다.</p>				
연구 목표 및 연구내용과의 연관성		기대성과 및 파급 효과		
<p>- 연구목표 1의 크로마틴 형성 단백질 복합체에 대한 구조 생화학적연구</p>		<p>- ATAD2는 크로마틴을 형성 및 해체에 관여하는 단백질로 유방암등 다양한 암을 유발하는 것으로 알려져, ATAD2 이상 오는 다양한 질병에 대한 원인에 대한 힌트를 제공</p>		

communications biology

ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s42003-023-05373-1>

OPEN

Structure of the human ATAD2 AAA+ histone chaperone reveals mechanism of regulation and inter-subunit communication

Carol Cho¹ , Christian Ganer², Takayuki Uchihashi^{2,3} , Koichi Kato^{2,4,5} & Ji-Joon Song¹

ATAD2 is a non-canonical ATP-dependent histone chaperone and a major cancer target. Despite widespread efforts to design drugs targeting the ATAD2 bromodomain, little is known about the overall structural organization and regulation of ATAD2. Here, we present the 3.1 Å cryo-EM structure of human ATAD2 in the ATP state, showing a shallow hexameric spiral that binds a peptide substrate at the central pore. The spiral conformation is locked by an N-terminal linker domain (LD) that wedges between the seam subunits, thus limiting ATP-dependent symmetry breaking of the AAA+ ring. In contrast, structures of the ATAD2-histone H3/H4 complex show the LD undocked from the seam, suggesting that H3/H4 binding unlocks the AAA+ spiral by allosterically releasing the LD. These findings, together with the discovery of an inter-subunit signaling mechanism, reveal a unique regulatory mechanism for ATAD2 and lay the foundation for developing new ATAD2 inhibitors.

Acknowledgements

We would like to thank Sarah Sterling and Richard Walsh at the Harvard Center for Cryo-Electron Microscopy (HC2EM), and Sujeong Kim at POSTECH Institute of Membrane Proteins (IMP) for supporting data collection. We also thank Yumi Shin and Eunhee Seong for technical assistance, and Dr. Bob Kingston for supporting this project. This work was supported by grants from the National Research Foundation of Korea (NRF). Specifically, a Sejong Science Fellowship (2022R1C1C2003419) and the Basic Science Research Program through the Korea Ministry of Education (2019R1A6A1A10073887) to C.C. and grants (2020R1A2B5B03001517, 2020M3E5E2037170, RS-2023-00266300) and the framework of international cooperation program (2021K2A9A2A08000088) to J.S. This research was also supported by Joint Research of the Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS program No. 18-101 to T.U., 22EXC601 to T.U. and K.K., 20-318, 21-313, and 22EXC305 to J.S.), and the JSPS Bilateral Program (Grant number JPJSBP120218819) to K.K.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

연구실적 유형		논문(o) 특허()		
연구책임자 성명		참여연구자(공동)(송지준)		
논문/특허명		Molecular basis for PHF7-mediated ubiquitination of histone H3		
논문실적정보 <input type="checkbox"/>	게재지(저널명)	Genes & Development		
	SCI 등재 여부	등재	인용횟수(SCI) Google Scholar	1 회
	SCOPUS 등재 여부		인용횟수(SCOPUS)	
	ISSN	0890-9369	게재년월	202312
	역할(제1, 교신, 참여)	참여	참여자수	10
특허실적정보 <input type="checkbox"/>	구분		등록(출원) 국가	
	등록(출원) 번호		등록(출원)일	
	등록(출원)자 성명		발명자 성명	
요 약 문				
<p>RING 형태의 E3 리가제는 20년 이상 알려져 왔지만, 그 다양한 작용 모드는 여전히 활발히 연구되고 있다. 식물 홈레오도메인 (PHD) 손가락 단백질 7 (PHF7)은 히스톤 유비퀴틴화를 담당하는 RING 형태의 E3 유비퀴틴 리가제이다. PHF7은 세 개의 아연 손가락 도메인으로 이루어져 있다. 확장된 PHD (ePHD), RING 도메인 및 PHD입니다. RING 도메인의 기능은 알려졌지만, 나머지 두 도메인이 E3 리가제 활동에 어떤 역할을 하는지는 여전히 알려지지 않았다. 본 연구에서는 E2 유비퀴틴 결합 효소 (E2)와 복합체를 이루는 PHF7의 결정 구조를 규명하였다. 본 구조는 E2가 RING 도메인과 C-단백질 PHD 사이에서 효과적으로 포획되어, 직접적인 접촉을 통해 E2를 모집할 수 있음을 보여준다. 또한, in vitro 결합 및 기능 실험을 통해, 우리는 N-단백질 ePHD가 DNA 결합을 통해 뉴클레오솜을 인식하고, C-단백질 PHD가 히스톤 H3 인식에 관여함을 보였다. 우리의 결과는 PHF7의 E3 리가제 활동에 대한 분자적 기초를 제시하고, 각 도메인이 PHF7 유비퀴틴화 활동에 특정하면서도 협력적인 기여를 하는 것을 밝혀내었다.</p>				
연구 목표 및 연구내용과의 연관성		기대성과 및 파급 효과		
<ul style="list-style-type: none"> - 연구목표 3의 크로마틴 변형 단백질 복합체에 대한 구조 생화학적연구 		<ul style="list-style-type: none"> - PHF는 크로마틴을 유비퀴틴화를 담당하는 중요한 단백질로 본 연구는 PHF 작용기작에 대한 이해를 제공하여 유전자 발현의 작용기작에 대한 insight를 제공 - PHF7 이상에서 오는 다양한 질병에 대한 원인에 대한 힌트를 제공 		

Molecular basis for PHF7-mediated ubiquitination of histone H3

Hyun Sik Lee,^{1,6} Injin Bang,^{2,6} Junghyun You,^{1,5} Tae-Kyeong Jeong,³ Chang Rok Kim,^{4,5} Minsang Hwang,¹ Jong-Seo Kim,¹ Sung Hee Baek,⁴ Ji-Joon Song,³ and Hee-Jung Choi¹

¹Department of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea; ²Laura and Isaac Perlmutter Cancer Center, New York University Langone Health, New York, New York 10016, USA; ³Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 34141, Republic of Korea; ⁴Creative Research Initiatives Center for Epigenetic Code and Diseases, School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 08826, South Korea

The RING-type E3 ligase has been known for over two decades, yet its diverse modes of action are still the subject of active research. Plant homeodomain (PHD) finger protein 7 (PHF7) is a RING-type E3 ubiquitin ligase responsible for histone ubiquitination. PHF7 comprises three zinc finger domains: an extended PHD (ePHD), a RING domain, and a PHD. While the function of the RING domain is largely understood, the roles of the other two domains in E3 ligase activity remain elusive. Here, we present the crystal structure of PHF7 in complex with the E2 ubiquitin-conjugating enzyme (E2). Our structure shows that E2 is effectively captured between the RING domain and the C-terminal PHD, facilitating E2 recruitment through direct contact. In addition, through in vitro binding and functional assays, we demonstrate that the N-terminal ePHD recognizes the nucleosome via DNA binding, whereas the C-terminal PHD is involved in histone H3 recognition. Our results provide a molecular basis for the E3 ligase activity of PHF7 and uncover the specific yet collaborative contributions of each domain to the PHF7 ubiquitination activity.

sec spacing. The samples were stirred at 500 rpm at 25°C throughout the assay. MicroCal PEAQ-ITC analysis software (Malvern Panalytical Ltd.) was used to construct a binding curve and determine the binding affinity.

Microscale thermophoresis (MST)

Center for Epigenetic Code and Diseases; 2017R1A3B1023387 to S.H.B.), and the Ministry of Science and ICT (Information and Communication Technologies; NRF-2022M3A9I2017587 and NRF-2019M3E5D6063903 to H.-J.C., and NRF-2020R1A2B5B03001517 to J.-J.S.).

Author contributions: H.S.L., I.B., and H.-J.C. conceived the study. H.S.L. and I.B. determined the crystal structures and per-