



情報解禁日時：英国時間 平成 28 年 5 月 16 日 10 時
日本時間 平成 28 年 5 月 16 日 18 時

平成 28 年 5 月 16 日
研究企画・産学連携推進課

横浜市立大学記者発表資料

ヒストンタンパク質複合体の溶液構造を世界で初めて解明 ～遺伝子発現のメカニズム解明を目指して～

～Nature Publishing Group 『*Scientific Reports*』～
(平成 28 年 5 月 16 日英国時間 10 時にオンライン掲載)

がんや iPS 細胞作成に関わる、遺伝子の発現や制御に非常に重要なクロマチン構造の形成に関与するヒストンタンパク質 H2A と H2B の複合体の水溶液中での構造を、世界で初めて解明しました。

1. 研究成果

☆研究成果のポイント

- ヒストンタンパク質 H2A と H2B の複合体全長の溶液構造を世界で初めて解明
- 化学シフトのみによる構造決定法で複合体タンパク質の構造を初めて解明
- ほどけた構造のタンパク質の領域に特徴的な硬い紐状の領域があることを発見

※研究者：横浜市立大学大学院生命医科学研究科の山根特任助教、大友特任助教、栗田特任助教、池口教授、西村学長補佐らのグループ

この構造解析は、横浜市大鶴見キャンパスに設置した世界最高レベルの感度を誇る NMR 分光器及びスーパーコンピュータを用いて行いました。その結果、H2A-H2B 複合体の核になる領域の構造は、この複合体がクロマチンの単位であるヌクレオソームを形成しているときの構造と同様でしたが、それぞれのタンパク質の末端の構造はほどけた紐状態であることが分かりました。また、これらのほどけた紐の構造は、単純なランダムコイルではなく特徴的な固い紐の領域もあることが明らかになりました。

今回の構造決定法は、通常行われているタンパク質の結晶を作成し X 線を照射する方法や NMR でタンパク質中の水素原子間の距離を測る手法とは異なり、NMR の測定により得られる化学シフトという値のみから構造を決定する手法 (CS-Rosetta 法) を用いています。本方法を用いたタンパク質複合体の構造決定は世界初です。

2. 今後の展開

クロマチン構造の変化は遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしている事がわかってきています。このことから、がんや iPS 細胞作成への関連が容易に想像できます。また、今まで教科書的にはタンパク質の機能にはその球状構造の変化が重要だとされており、その静的な構造変化を結晶化して構造解析を行う事が現在のパラダイムであるが、今回の研究等により、タンパク質の紐の結晶化できない動的な構造もまたその機能の上で重要な事が分かってきたのは大きな発見です。またヌクレオソームの H2A-H2B が水溶液中に遊離したり再び吸着されたりを起こすのを助けるヒストンシャペロンの NAP1 というタンパク質を私達は解析していますが (5)、今回の H2A-H2B の構造に基づいてどの様にして NAP1 が助けているかも分かるようになります。

今回開発した手法は結晶化しない紐様タンパク質やタンパク質複合体の構造を決定できます。また、従来の NMR 解析で用いられる水素間距離が分からなくてもよいので、分子量の大きなタンパク質の解析も可能であり、応用範囲は広いと考えられます。

3. 研究の概要と成果

私達の DNA は細胞の核内で 4 種類のアミノ酸タンパク質 (H2A、H2B、H3、H4) からなる複合体に巻きつき、ヌクレオソームと呼ばれる構造を形成しています。この複合体は H2A タンパク質と H2B タンパク質の複合体(H2A-H2B)ふたつと、H3 タンパク質と H4 タンパク質ふたつずつからなる分子(H3-H4)₂ ひとつから形成されていて、まず(H3-H4)₂ が DNA 鎖に結合し、その後その周辺の DNA 鎖に(H2A-H2B)がふたつ結合し、これらが会合してヌクレオソームとなります。このヌクレオソームを基本構造に、遺伝子の発現や制御に関与している「クロマチン構造」ができています。

遺伝子が発現するときは、ヌクレオソームの H2A-H2B が水溶液中に遊離したり再び吸着されたりを繰り返します。この水溶液中とヌクレオソーム中での H2A-H2B の構造を比較することで、クロマチン構造の制御やヌクレオソームの運動を解明するために重要な情報が得られると考えました。H2A-H2B 等のアミノ酸タンパク質は球状の領域の他に長く一定の形をとらない紐が末端にあり、そのままでは結晶化が出来ないため、これまでその水溶液中の構造が未解明でした。しかし今回、通常 1 つのアミノ酸タンパク質にしか使えない解析用ソフトを応用してタンパク質複合体にも用いられるようにし、化学シフトのみによる構造決定方法を用いることにより、この H2A-H2B 単独の構造を初めて決定できました。

4. 研究内容の詳細

これまでにヌクレオソームの結晶中に存在する H2A-H2B の 2 つの構造が明らかにされていますが、結晶中では末端の紐の領域は見え、水溶液中の構造も全く未決定のままです。また、H2A-H2B と H2A-H2B に結合するヒストンシャペロンの構造はいくつか報告されていますが、これらの構造は、H2A や H2B の末端領域 (ヒストンテール領域) をわざと削って解析しやすいように細工した構造です。ヒストンテール領域は、アセチル化やリン酸化やメチル化などによるクロマチンの動的な機能に重要な役割を担っています。これらのヒストンの化学修飾の状態の違いがエピゲノムと呼ばれているゲノムを超えた遺伝情報伝達に重要である事が分かっているため、ヒストンテール領域を細工した構造解析は遺伝子発現メカニズム解明のためには望ましくありません。

H2A-H2B 複合体について、NMR 解析により得られたタンパク質の骨格部分の化学シフト値に基づき、H2A-H2B 複合体を形成する各アミノ酸がどのように折りたたまれやすいかの傾向を知ることができます。その結果、H2A-H2B 複合体のコア部分の構造は、ヌクレオソーム中にあるときの構造と同じであり、一方、H2A の N 末端および C 末端、H2B の N 末端は構造を形成しない領域で、とくに H2A の N 末端と C 末端はヌクレオソーム中でみられた α ヘリックスという構造がほどけたものであることが示されました (図 2)。

NMR 解析により得られた化学シフトの情報に基づき、CS-Rosetta 法 (文献 4) を用いてタンパク質複合体 H2A-H2B の全長の構造を決定しました (図 1)。CS-Rosetta 法は、通常用いられる NMR により得られた水素間距離などの構造情報に基づく構造決定方法と異なり、NMR により得られた化学シフト値の情報に基づき、その値を満たす構造を探索する手法です。得られた H2A-H2B 複合体の構造はタンパク質全長にわたり NMR により得られた化学シフトを矛盾なく再現するものでした (図 3)。これまで CS-Rosetta 法を用いて蛋白質複合体の構造を決定した例はなく、この研究が初めての成功例となります。

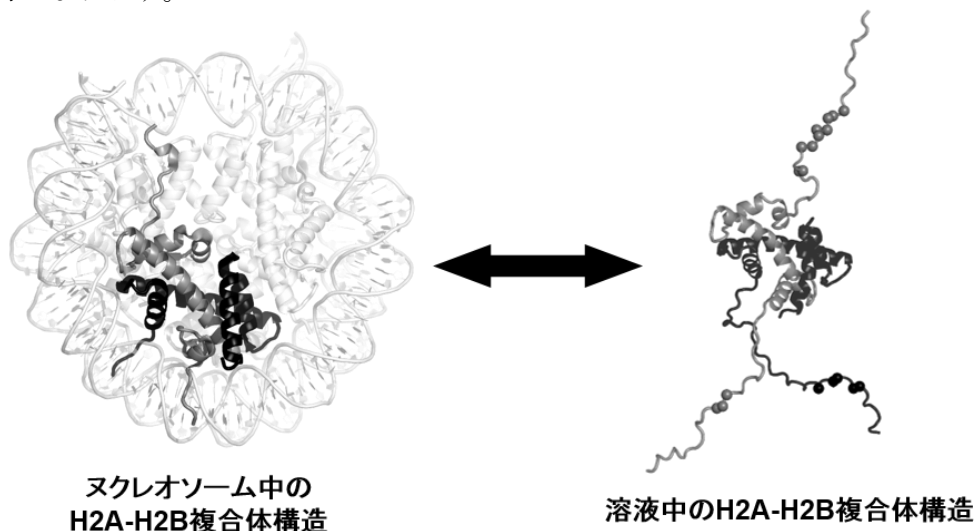


図 1: H2A-H2B の構造。左: H2A-H2B のヌクレオソーム中の構造。灰色が H2A で黒が H2B である。両方ともコアの部分に 4 本のらせん構造 (ヘリックス) からなる。H2A の上に伸びた部分が DNA と接触して短いヘリックスが形成されている。下の方にも DNA と接して短いヘリックスが形成されている。H2B の左下のひもは DNA に接している。本来は紐の部分をもっと長いのだが結晶中では見えていない。右: 今回決定した溶液中の H2A-H2B の構造である。実際の解析結果は紐の部分やコアの部分がダイナミックに動いているが、ここでは見易くするためにその中の一つの構造だけをとりだした。H2A の上の紐や下のヘリックス構造は壊れているが、球で示したところは他に比べて紐が固いと考えられる領域である。

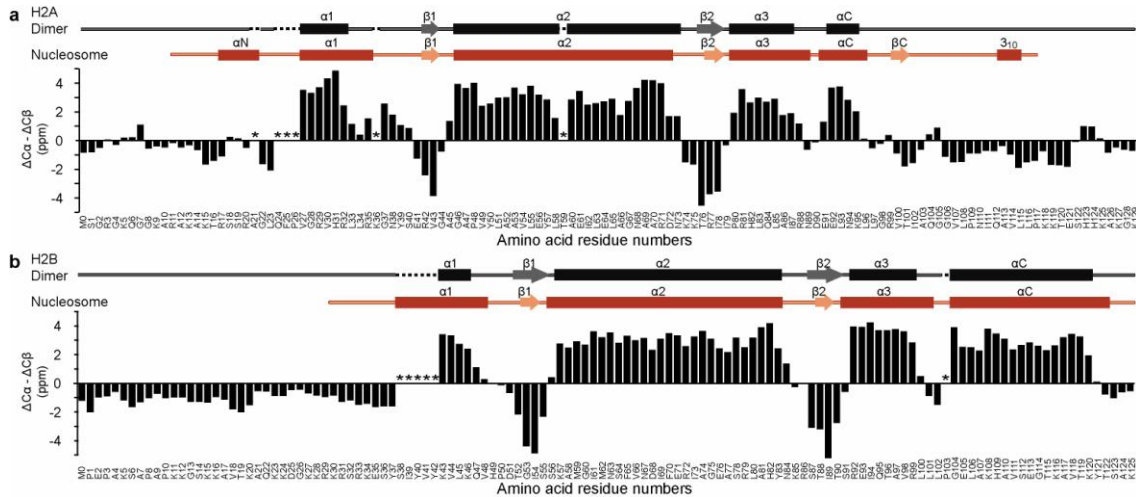


図 2: H2A(a)と H2B(b)の NMR の化学シフト。注: ここでの化学シフトは H2A と H2B タンパク質の主鎖を構成する約 130 個のアミノ酸を並べて、各アミノ酸の炭素原子の α 位と β 位の化学シフトの差を示している。この差はタンパク質が α ヘリックス (らせん構造) の時は正に、 β 鎖の時は負になることが経験的に知られている。H2A も H2B も 4 本の α ヘリックス ($\alpha 1$ - αc) と 2 本のベータ鎖 ($\beta 1$ と $\beta 2$) からなることが分かったが、それらの折れ畳み方は CS-Rosetta で今回初めて決定された。ヌクレオソーム中の構造も示されているが H2A の左側の末端 (N 末) と右側の末端 (C 末) は見えていない。ヌクレオソーム中の左側の αN と右側の βC とヘリックス (3_{10}) が H2A-H2B 複合対中では壊れている。

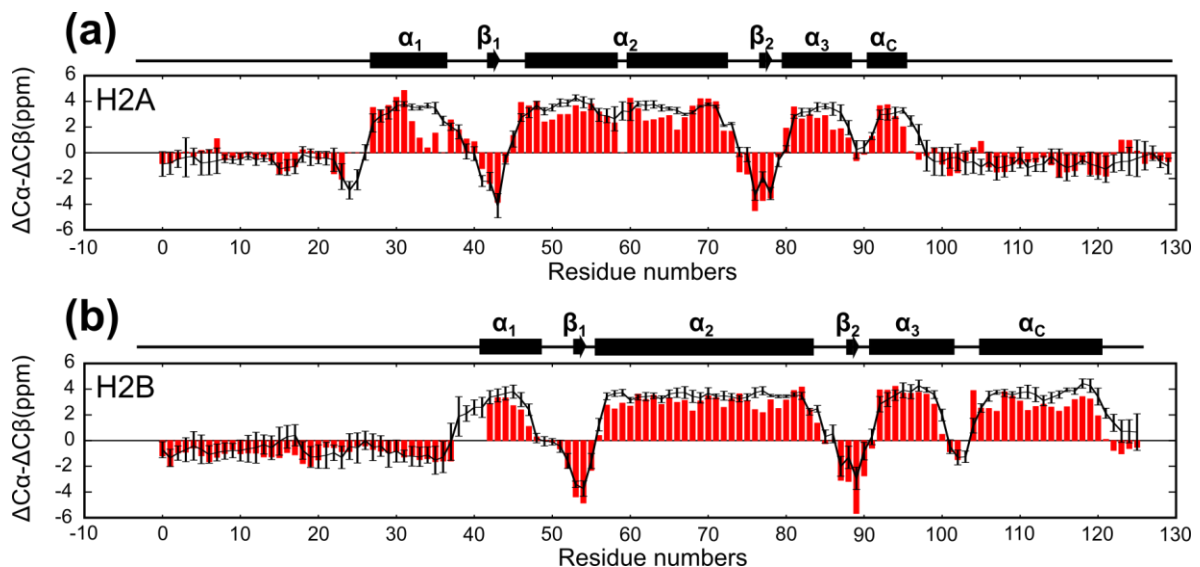


図 3: H2A(a)と H2B(b)の化学シフト。黒線は CS-Rosetta により決定された構造から計算した化学シフト。棒グラフは NMR の実験による化学シフト。注: ここでの化学シフトは H2A と H2B タンパク質の主鎖を構成する約 130 個のアミノ酸を並べて、各アミノ酸の炭素原子の α 位と β 位の化学シフトの差を示している。この差はタンパク質が α ヘリックス (らせん構造) の時は正に、 β 鎖の時は負になることが経験的に知られている。H2A も H2B も 4 本の α ヘリックス ($\alpha 1$ - αc) と 2 本のベータ鎖 ($\beta 1$, $\beta 2$) からなることが図 2 の NMR 実験結果から分かったが、それらの折れ畳み方は図 1 に示すように CS-Rosetta で今回初めて決定され、その計算で求めた立体構造の化学シフトが実験とよく対応している。

また、別の実験での NMR による解析から、(H2A-H2B)複合体の末端領域は、単なるランダムなコイル構造の領域ではなく、部分的に硬い紐状の領域が存在するような特徴的な構造であることが示されました (図 4)。このことは、今回得られた溶液構造中에서도示唆されており、この特徴的な構造をとる末端領域が、(H2A-H2B)複合体のヌクレオソーム中での動的な機能を理解する上で重要な役割を果たしていると考えられます。

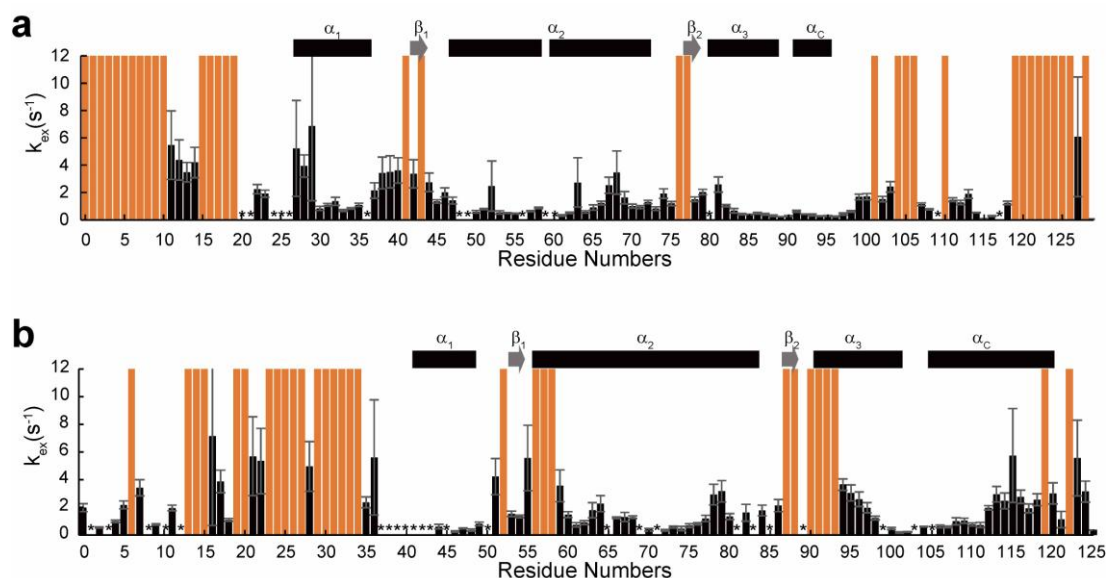


図 4 : H2A(a)と H2B(b)のタンパク質を構成する各アミノ酸のアミドの水素原子の水との交換の速さ。棒グラフは NMR の実験により求めた溶媒との水とアミドの水素との交換の速さを示している。タンパク質が折れたたまってヘリックスやベータ鎖を構成すると溶媒との水との接触が減って交換が遅くなる。しかし、N 末や C 末で明らかに構造を取っていない紐状の部位でも交換が遅くなっている領域がある。これらの領域は完全なランダムな構造では無い領域である。

参考文献

- (1) Luger, K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 127-135 (2003).
- (2) Akey, C. W. & Luger, K. Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 6-14 (2003).
- (3) De Koning, L., Corpet, A., Haber, J. E. & Almouzni, G. Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 997-1007 (2007).
- (4) Shen, Y., Lange, O. *et al.* Consistent blind protein structure generation from NMR chemical shift data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4685-4690 (2008).
- (5) Ohtomo, H. *et al.* The C-terminal acidic domain of histone chaperone human NAP1 is an efficient binding-assistant for histone H2A-H2B but not H3-H4. *Genes Cells* **21**, 252-263 (2016).

用語説明

NMR (核磁気共鳴) : 強い磁場中にタンパク質を置くとタンパク質を構成する原子核の核スピンの変化し、それを解析することによってタンパク質の構造を解析する手法である。同様の原理で MRI は強い磁場中におかれた生体中の水分子の水素原子核の核スピンをモニターしている。タンパク質の構造の詳細を知るためには水素原子核だけの情報では不十分で、さらに質量 13 の炭素原子 (通常は質量 12) や質量 15 の窒素原子 (通常は質量 14) 等の安定同位体を使用する必要があり、その目的のために特別なタンパク質を調製する。横浜市立大学には世界最高レベルの NMR 装置が文科省のプラットフォーム形成事業により整備されている。

※ 本研究の成果は、文部科学省「先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業」と文部科学省及び国立研究開発法人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（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）の支援により得られました。

*論文著者、ならびにタイトルなど

Yoshihito Moriwaki, Tsutomu Yamane, Hideaki Ohtomo, Mitsunori Ikeguchi, Jun-ichi

Kurita, Masahiko Sato, Aritaka Nagadoi, Hideaki Shimojo, and Yoshifumi Nishimura*

Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, 1-7-29 Suehiro-cho,
Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

Solution structure of the isolated histone H2A-H2B heterodimer

*論文掲載 URL:DOI:10.1038/srep24999

YCU
横浜市立大学

お問い合わせ先
(本研究の内容に関するお問合せ)
大学院生命医科学研究科 西村 善文 Tel:045-508-7211/7212 E-mail: nisimura@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
(取材対応窓口、資料請求など)
研究企画・産学連携推進課長 渡邊 誠 Tel 045-787-2510 E-mail: sangaku@yokohama-cu.ac.jp