



情報解禁日時：平成 28 年 3 月 3 日 19 時以降

平成 28 年 3 月 3 日
研究推進課

遺伝子発現を抑えるヘテロクロマチン構造の形成機構を解明 ～がんの発生や iPS 細胞産生の原理解明に向けて～

～Nature Publishing Group 『Scientific Reports』～
(平成 28 年 3 月 3 日英国時間 10 時にオンライン掲載)

横浜市立大学大学院生命医科学研究科 下條秀朗元特任助教、木寺詔紀教授、佐藤衛教授、西村善文学長補佐は、名古屋市立大学 中山潤一教授らとの共同研究で、遺伝子の発現が抑えられるヘテロクロマチン構造形成に関与するタンパク質の結合機構を解明しました。

タンパク質の紐様構造を横浜市大鶴見キャンパスに設置した世界最高級感度を誇る NMR 分光器、スーパーコンピュータ、実験室内小型 X 線小角散乱装置を用いて解析しました。今回の解析により、タンパク質から伸びた紐様構造のタンパク質同士が互いに結合して、そのタンパク質の結合を強くしていることを世界で初めて明らかにしました。特にクロマチン構造に関連するタンパク質においては、紐様構造のタンパク質同士の相互作用が重要であることが分かり、タンパク質は球状構造を取らない紐様構造でも機能することを解明しました。

今回の成果は、教科書等で確立されている、タンパク質が機能するときは球状構造を取り紐状構造では機能しないというパラダイムを大きく変化させる可能性があります。また、がん細胞や iPS 細胞等ではヘテロクロマチン構造が異なっている事が示されていますので、がんの発生の理解や iPS 細胞産生の理解につながります。

★研究成果のポイント

- ヘテロクロマチン形成に関与するタンパク質の化学修飾「リン酸化」の役割の解明
- 乳がんの生成と転移に関与するタンパク質 HP1 α の構造的理解
- 教科書でよく知られているタンパク質の球状構造ではなく、細長く伸びた紐構造の役割を解明。

【研究の概要と成果】

私達の DNA は、肝臓や心臓、神経など各々の細胞で特定の遺伝子を発現し特定の細胞機能を果たしています。ヒトでは約 250 種類といわれる細胞は基本的には同じ DNA を持っていますが、細胞ごとに DNA の折れ畳まり方が違い、発現する遺伝子が異なっています。細胞の核内で DNA は 4 種類のヒストンタンパク質に巻きついた玉のような構造(ヌクレオソームという。)を取り、それが数珠状に連なりクロマチン構造を形成しています。クロマチン構造としてユークロマチンとヘテロクロマチンの 2 種類が知られています。ユークロマチンでは数珠状構造が緩んでいて DNA はむき出しになりその部位の遺伝子が活発に発現しているのに対し、ヘテロクロマチンではヘテロクロマチンタンパク質 (HP1) によって数珠状構造が凝縮し DNA が外からは見えなくなり遺伝子の発現が抑えられます。ユークロマチンとヘテロクロマチンはヌクレオソームを構成する 4 種類のヒストンタンパク質のひとつであるヒストン H3 の化学修飾によって区別されます。例えばヒストン H3 の N 末のふらふらした紐(フレキシブルテイル)の 9 番目のリシンというアミノ酸がメチル化されていると、HP1 タンパク質が特異的に結合し凝集が起きます。HP1 タンパク質に存在する球状の領域(クロモドメインという。)に特徴的なポケットがあり、そのポケットの中にメチル化されたヒストン H3 の 9 番目のリシンが特異的に納まって、ふらふらしたヒストンの紐の一部を固定していました。しかし、2011 年に、クロモドメインからふらふらと突き出た 4 個のアミノ酸のセリンがリン酸化されると、HP1 タンパク質とメチル化されたヒストン H3 の結合が強くなる事を、当時理化学研究所の発生再生研に所属していた中山博士(現名古屋市立大学)が発見しました。なぜ HP1 タンパク質のふらふらした紐のような領域のリン酸化がメチル化されたヒストン H3 のふらふらした領域の結合を強くするのか不明でしたが、今回、横浜市大鶴見キャンパスに設置した世界最高級感度を誇る NMR 分

光器を西村学長補佐のグループの元特任助教の下條氏と修士を卒業した川口氏が使用して紐の部分と球状構造を解析し、スーパーコンピュータを木寺教授のグループの森次特任准教授、博士研究員の大森氏、修士を卒業した樋口氏が使用して紐と紐の相互作用を分子動力学計算で解析し、さらに実験室内小型 X 線小角散乱装置を佐藤教授のグループの小田特任助教が使用して紐の長さを解析した共同研究により、HP1 タンパク質のリン酸化された紐がメチル化されたヒストン H3 の紐とお互いがふらふらした伸びた紐同士で結合をしている様子を明らかにしました。これは、今までタンパク質の働きは球状の構造体が重要であるという生物学の教科書で確立していたパラダイムを大きく変革する成果です。

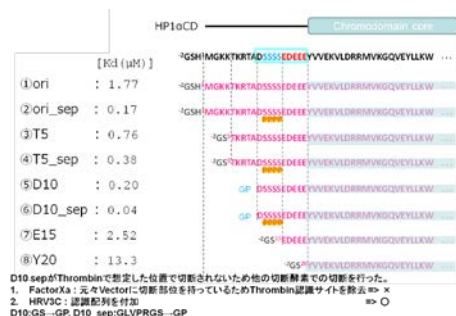
【研究内容の詳細】

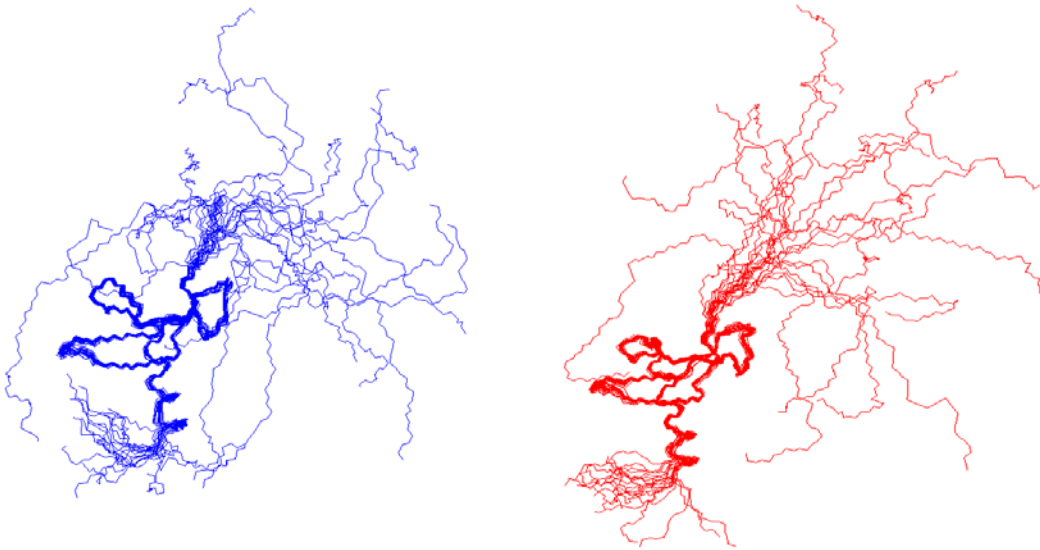
DNA は細胞の核の中で折り畳まれたクロマチン構造を取っています。クロマチン構造には 2 種類が存在し、DNA が剥き出しにあって遺伝子が活発に発現しているユークロマチンと、DNA がきつく折り畳まれたヘテロクロマチンです。ヒトには心臓や肝臓や神経など様々な機能を持った細胞があり、細胞毎に特定の遺伝子が発現しクロマチン構造が異なっています。クロマチンは 4 種類のヒストンタンパク質 (H2A、H2B、H3、H4) が 2 個ずつ集まった球状のヒストン 8 量体 (オクタマー) の周囲に 146 塩基対からなる DNA が巻きついたヌクレオソームが基本構造になり、数珠状につながっています。ユークロマチンではヌクレオソームの数珠状の構造が緩んでいて、数珠と数珠を剥き出しの DNA が結んでいる構造ですが、ヘテロクロマチンではヌクレオソーム同士が固まった集合体を形成しています。ユークロマチンとヘテロクロマチンの違いはヒストンの化学修飾の違いで説明できます。例えばユークロマチンのヒストン H3 の N 末の 4 番目のアミノ酸のリシンがメチル化されているのに対し、ヘテロクロマチンではヒストン H3 の N 末の 9 番目のアミノ酸のリシンがメチル化 (H3K9me) されています。9 番目のリシンがメチル化されたヒストン H3 はヘテロクロマチンタンパク質 (HP1) によって認識され HP1 タンパク質がヌクレオソームを会合させます。

HP1 タンパク質がヒストン H3K9me に結合する領域をクロモドメインと呼びます。HP1 のクロモドメインとヒストン H3K9me の結合様式は 2002 年に米国のグループが明らかにしました (参考文献 1)。クロモドメインは球状の構造を取り、ヒストン H3 の 5 番目から 8 番目のアミノ酸がクロモドメインの溝にはまり込み 9 番目のメチル化リシンがポケットに納まっていた。HP1 の 20 番から 80 番のアミノ酸がクロモドメインの球状構造を形成しています。ところが現在名古屋市大の中山教授のグループが 2004 年にクロモドメインの球状構造の N 末の 11 番目から 14 番目にあるセリン残基がリン酸化されるとヒストン H3K9me との結合が非常に強くなる事を見出しました。N 末領域は球状クロモドメインから紐のように突き出ている、その紐のリン酸化によりヒストン H3K9me の紐との結合が考えられます。タンパク質構造の教科書によると、アミノ酸の紐からなるタンパク質は機能するときは折れたたまった球状構造で、通常天然型と呼び、温度を上げたりするとタンパク質は変性し機能がなくなることが知られています。しかし最近単独で存在するときには変性した紐状構造である天然変性タンパク質の例が知られてきました。これら天然変性タンパク質も機能するために相手の球状タンパク質と結合すると相手に合わせて紐からヘリックス等に変化する事 (結合にカップルした構造形成) が知られています。私達は最近、天然変性タンパク質であるがん抑制タンパク質 p53 のリン酸化された転写活性化ドメインやヌクレオチド除去修復因子 XPC の酸性ドメインが基本転写因子の TFIIF の p62 タンパク質と結合すると紐状構造で p62 の表面に固定化される例を最近報告しました (参考文献 3 と 4)。

HP1 クロモドメイン単独 (Y20) では解離定数が $13.3 \mu\text{M}$ ですが、N 末を伸ばしてリン酸化すると D10_sep 解離定数が $0.04 \mu\text{M}$ と 330 倍ヒストン H3K9me との結合が強くなった。N 末まで伸ばすと結合が少し弱くなるが、リン酸化すると非リン酸化に比べて約 10 倍結合が強くなった。この現象は今までのクロモドメイン単独の球状構造では説明が出来なく、クロモドメインから伸びた紐がヒストンの紐と相互作用していることを意味している (右図)。

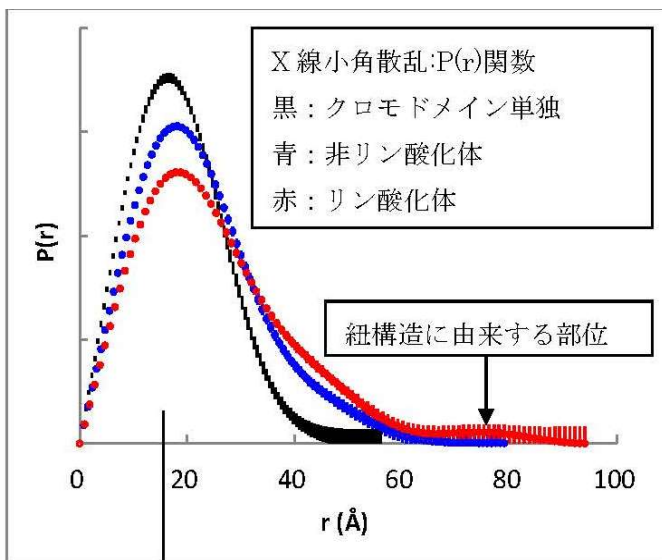
NMR でリン酸化された構造 (赤) とリン酸化されていない構造 (青) を決定したが、クロモドメインの領域の構造には全く差がないが、紐のダイナミクスに差があった。リン酸化された方の紐がリン酸化されていない紐に比べてより伸びた構造であった (図 1)。





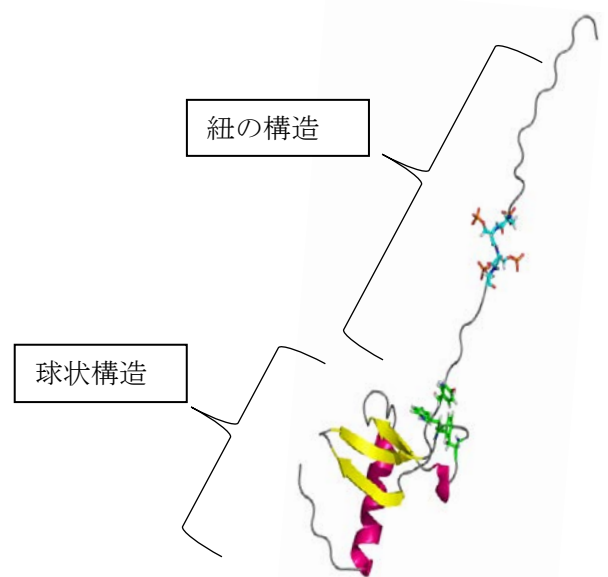
(図 1) 非リン酸化体の NMR 構造 (青) リン酸化体の NMR 構造 (赤)

実際に紐が伸びた構造かどうかを X 線小角散乱で確認した。X 線小角散乱の実験から、クロモドメイン単独では球状構造 (黒) だが、リン酸化されていない紐がついていると (青) 伸びた紐構造に由来するシグナルが見えた。リン酸化体 (赤) では更に紐が伸びた構造であった。溶液中の X 線小角散乱の実験からも紐の挙動が解明された (図 2)。

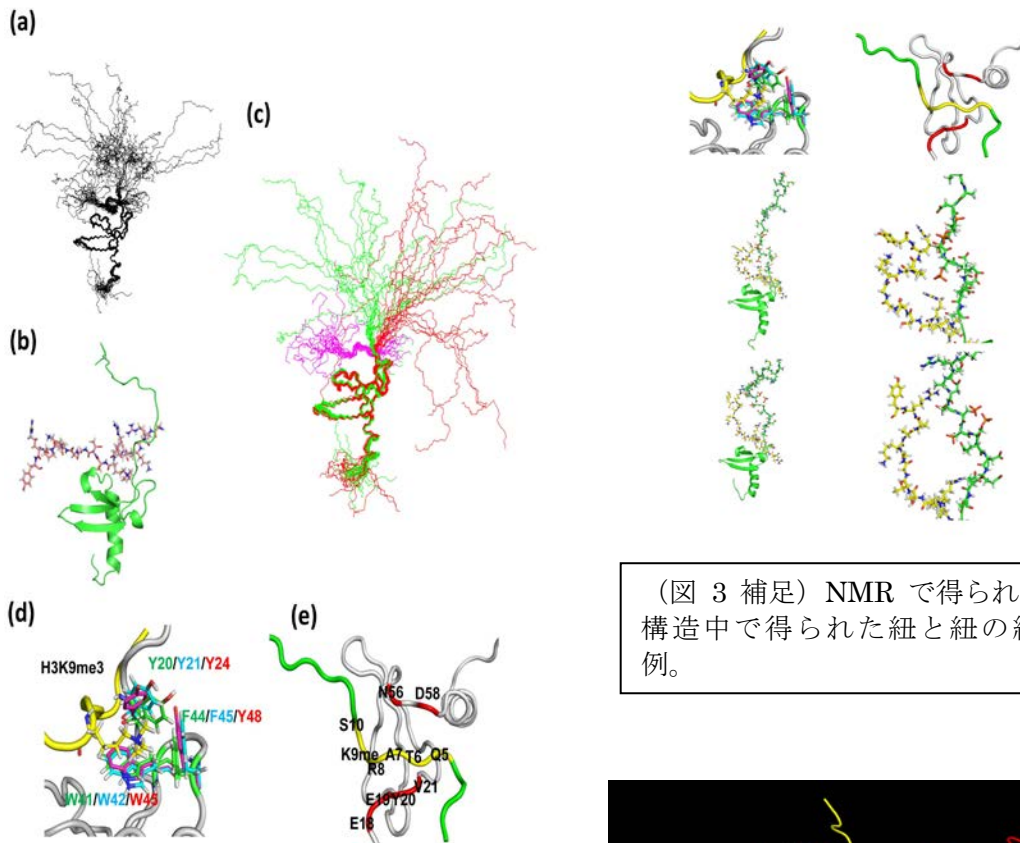


(図 2)

球状構造に由来するピーク

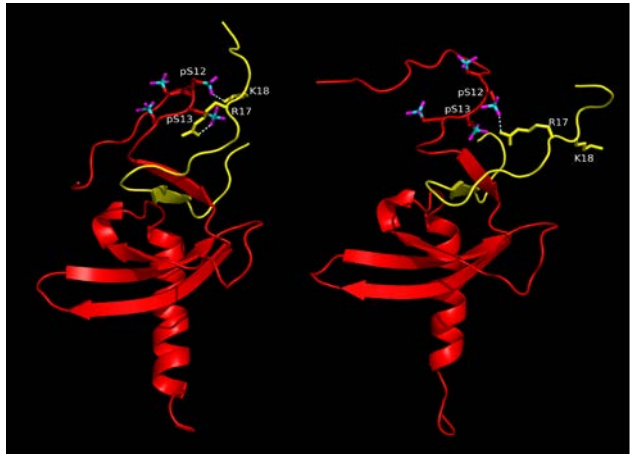


伸びた紐が実際にヒストン H3K9me の紐とどのように相互作用しているかを NMR で解析した結果、下図 (図 3) の (a) に示すように HP1 のリン酸化された紐の領域とヒストン H3K9me の紐の領域がふらふらとお互いに揺らいでいたが、その中には下図 (図 4) に示すようにお互いが結合している構造もあった。紐と紐の結合は非常に動的で静的な安定構造ではなかったため、レプリカ交換分子動力学計算 (REMD) でその挙動を調べた。REMD でも下図 (図 4) の右に示すように赤で示した HP1 のリン酸化された紐と黄色で示したヒストン H3 の紐が静電的に結合していた。このように紐と紐の相互作用を NMR と分子動力学計算より、初めてその実態を解明する事が可能となった。



(図 3 補足) NMR で得られた複合体構造中で得られた紐と紐の結合の一例。

(図 3) NMR で解析したリン酸化 HP1 とヒストン H3K9me の複合体構造の重ね書き(a)とその一つ(b)。フリー(赤)と複合体構造の比較(c)。メチル基に結合するポケット(d)。H3K9me の 5 番目から 8 番目の結合様式。



(図 4) REMD 計算の結果得られた複合体構造。HP1 が赤で H3K9me が黄色で表示されている。紐と紐の結合の一例。

【今後の展開】

ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 は乳がんに関連する事が知られている。紐と紐の結合の実態に基づいて乳がん治療候補化合物のデザインが将来可能になる。なお、iPS 細胞ではヘテロクロマチン構造を変化させる事が重要なので、ヘテロクロマチン構造形成を制御する事が可能となれば iPS 細胞の制御も可能になることが期待される。さらに、今までは教科書的にはタンパク質の働きは球状構造の変化が重要だとされてきて、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、タンパク質の紐と紐の動的な結合が働きに重要である事が分かってきたので、今後教科書的な考え方のパラダイムシフトを起こす必要がある。

参考文献

- (1) Jacobs, S.A. & Khorasanizadeh, S. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **295**, 2080-2083 (2002).
- (2) Hiragami-Hamada, K. et al. N-terminal phosphorylation of HP1 α promotes its chromatin binding. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1186-1200 (2011).
- (3) Okuda, M. & Nishimura, Y. Extended string binding mode of the phosphorylated transactivation domain of tumor suppressor p53. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 14143- 14152 (2014).
- (4) Okuda, M., Kinoshita, M., Kakumu, E., Sugasawa, K. & Nishimura, Y. Structural Insight into the Mechanism of TFIIH Recognition by the Acidic String of the Nucleotide Excision Repair Factor XPC. *Structure* **23**, 1827-1837 (2015).

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的に最高レベルの 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。

X 線小角散乱 (SAXS) : 溶液中に存在するタンパク質に X 線を照射しその散乱を解析し溶液中に存在するタンパク質の構造を解析する。通常は播磨や筑波にある放射光施設を利用し、試料の損傷に注意しながら強い X 線を照射するが、横浜市大には研究室レベルの弱い X 線を照射して解析できる装置が設置されている。

レプリカ交換分子動力学計算 (REMD) : 計算機中でタンパク質のダイナミクスをシミュレーションする方法が、分子動力学計算 (MD) である。しかし MD は、高々 μ 秒 (10^{-6} 秒) 程度の時間しか追えない。紐の動きは μ 秒よりもはるかに遅い運動であり、そのような遅い時間スケールの運動を捉えるために、異なる温度でのシミュレーションを多数同時に行う (ここでは 48 のシミュレーションを同時実行) REMD という大きな計算資源を使う方法を用いた。

※ 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

Hideaki Shimojo¹, Ayumi Kawaguchi¹, Takashi Oda¹, Nobuto Hashiguchi¹, Satoshi Omori¹, Kei Moritsugu¹, Akinori Kidera¹, Kyoko Hiragami-Hamada², Jun-ichi Nakayama³, Mamoru Sato¹ and Yoshifumi Nishimura^{1*}

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

² Division of Genome Technologies, RIKEN Center for Life Science Technologies, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

³ Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan

Extended string-like binding of the phosphorylated HP1 α N-terminal tail to the lysine 9-methylated histone H3 tail

*論文掲載 URL: www.nature.com/articles/srep22527

お問い合わせ先
(本資料の内容に関するお問合せ) 公立大学法人横浜市立大学大学院生命医科学研究科 学長補佐 西村 善文 横浜市鶴見区末広町1-7-29 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) 公立大学法人横浜市立大学 研究推進課長 竹内 紀充 Tel 045-787-2019 E-mail: sangaku@yokohama-cu.ac.jp