

平成 21年 5月 25日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790083

研究課題名 (和文) 染色体制御因子群の複合体化とその構造・機能解析

研究課題名 (英文) Complex formation and structural/functional analysis of chromatin-associated factors

研究代表者

梅原 崇史 (UMEHARA TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・上級研究員

研究者番号：20415095

研究成果の概要：

染色体クロマチンの構造変換に関わる複合体の構造と機能を解明するため、タンパク質複合体の再構成に資する大腸菌内共発現ベクター系を構築した。また、ヒストン修飾酵素とヒストン、阻害剤を複合体化させ、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の結晶構造を解明した。さらにヒストンシャペロン Asf1 に対する 2 種類のシャペロン複合体を構造解明し、両結合因子が Asf1 に対して類似した結合様式をもつことを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：遺伝子発現、染色体、クロマチン、ヒストン、転写、構造解析

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする真核生物の生命情報は、ゲノム DNA の塩基配列から構成される遺伝情報と、それに付随する後成的なエピジェネティック情報に大別される。遺伝情報は、個体発生や分化の制御、がんや先天性疾患の原因となる最も基本的な生命情報であるが、エピジェネティック情報についても、遺伝的刷り込みによる疾病、メチル化 DNA 認識異常による疾病、ヒストン化学修飾異常による疾病等

の原因となり、染色体における各遺伝子の活性状態を決める局所情報であることから、その制御機構の解析は生命情報の発現機構を知る上で重要である。これらのエピジェネティック情報は、DNA の化学修飾から成る情報と、ヒストンの化学修飾から成る情報に大別されるが、このうちヒストンの化学修飾についてはその修飾の種類が多岐にわたり、遺伝子発現や DNA 複製・修復、染色体分配などの幅広い生命現象を調節することがわかってきている。本研究では、ヒストン修飾酵

素（ヒストン脱メチル化酵素等）やヒストンシャペロンを含む染色体制御因子群を安定な複合体として再構成し、その複合体の構造と機能を明らかにすることを目的としている。

研究開始当初の関連研究としては、最初のヒストン脱メチル化酵素 LSD1 が 2004 年に発見され、その後、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 に対する結合サブユニットの機能解析 (Wysocka et al. *Cell* 122, 654, 2005; Metzger et al. *Nature* 437, 436, 2005) およびその構造解析 (Stavropoulos et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 626, 2006)、さらに異なる反応タイプのヒストン脱メチル化酵素 JMJD2 の発見 (Whetstone et al. *Cell* 125, 467, 2006) およびその構造解析 (Chen et al. *Cell* 125, 691, 2006) が報告されていた。さらに国内からの関連研究は、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の SWIRM ドメインの構造・機能解析 (Tochio et al. *Structure* 14, 457, 2006) が発表された状況にあった。

2. 研究の目的

本研究では、染色体・クロマチン高次構造の維持変換に関わるヒストン修飾・脱修飾酵素や、ヒストンシャペロン、転写調節因子群やその分解に関わる複合体を再構成すること、さらにそれらのタンパク質複合体の立体構造と機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

染色体制御に関わるタンパク質複合体を再構成するために、大腸菌内で共発現する新規ベクターセットを開発する。さらに、共発現・共精製や複合体化効率の条件検討を通して、結晶構造解析に適した複合体を調製する。さらに、得られたタンパク質複合体について、結晶化と X 線結晶構造解析、または NMR 解析によりその立体構造情報を取得する。

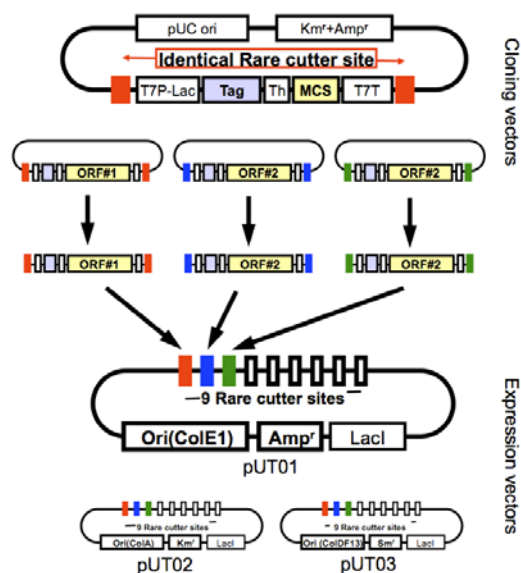
4. 研究成果

(1) タンパク質複合体再構成のための新規共発現ベクター系の開発

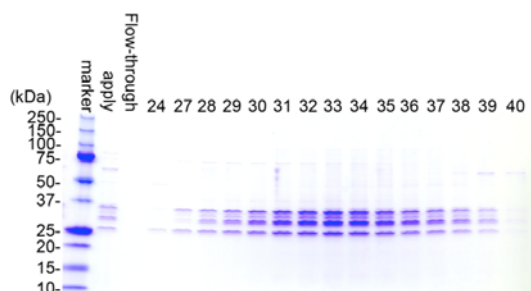
染色体制御に関わるタンパク質複合体を効率的に再構成するため、大腸菌内で複数のサブユニットを共発現させる系を構築・改良し、各サブユニットの発現条件と可溶化条件、およびそれらの複合体化条件を生化学的に検討した。

最初に、遺伝子組換えで非特異的な切

断を起こしにくい 8 塩基認識等の制限酵素 9 種類の特異的な切断認識配列を含むマルチクロニング部位を含むクロニングベクターを作成し、このベクターに挿入した遺伝子を大腸菌内で共発現させるために複製開始点の異なる 3 種類の発現ベクターを作成した（下図参照）。



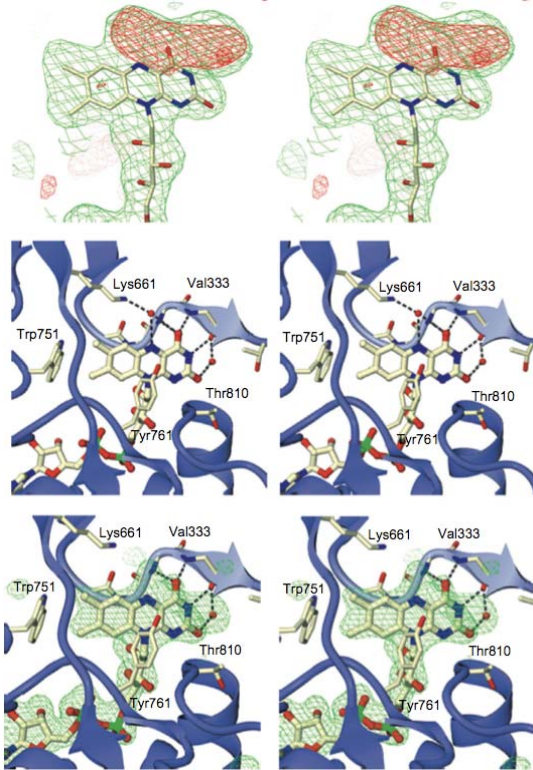
次に、これらのベクターシステムの発現条件を検討した。タンパク質複合体を再構成するための試行セットを検討した結果、転写因子のプロテアーゼ分解に関わる 7 成分複合体を再構成することに成功した。複合体構成成分の 1 サブユニットにヒスチジンタグ配列を付加し、Ni アフィニティー精製により溶出した結果、6-7 成分を stoichiometric に含む複合体の構成パターンが検出された（下図参照）。



(2) ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の構造・機能解析

染色体制御機構に関わる中心的な成分はヌクレオソームの主要コンポーネントであるコアヒストンである。ヒストンの翻

訳後修飾が認識・脱着される分子機構を明らかにするために、ヒストン脱メチル化酵素とヒストンテイルとの複合体化を行った。脱メチル化酵素 LSD1 とヒストン H3 テイルおよび LSD1 に対する非特異的阻害剤等の複合体化を検討した結果、ヒストン H3 テイルの添加により LSD1 の結晶成長が促進され、非特異的阻害剤トランシルシプロミンと複合体化した LSD1 の結晶構造を決定することができた（下図参照：文献 1）。



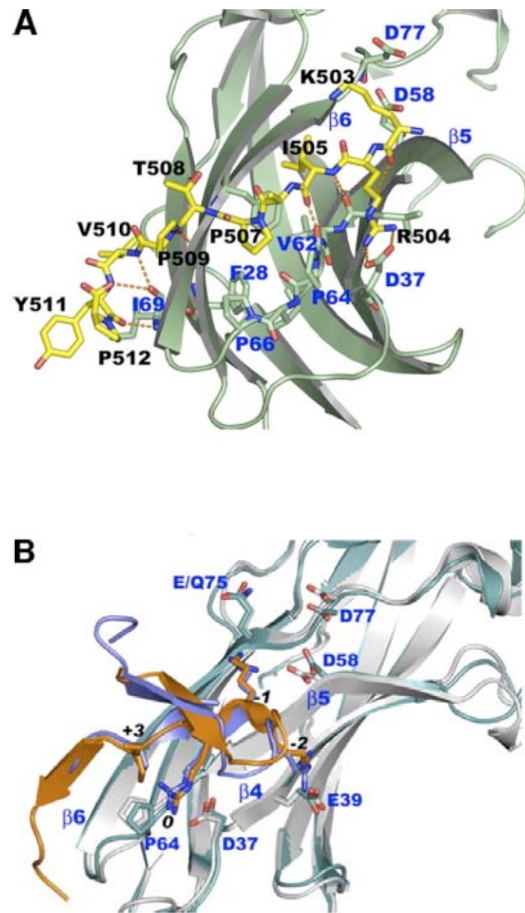
この構造解析において、非特異的阻害剤トランシルシプロミンが LSD1 中の補酵素フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) に共有結合する機構を明らかにした（上手参照）。

(3) ヒストンテイル結合因子複合体の構造・機能解析

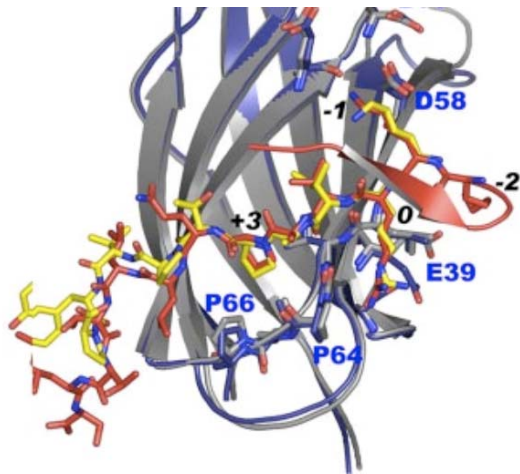
ヒストンテイルの修飾または配列特異的 DNA を認識するタンパク質の複合体化については、PHD ドメインや SWIRM ドメイン、プロモドメイン、および Zinc finger ドメイン等を含む因子群に対してヒストンテイルや DNA との結合解析とそれらの複合体化を試みた。このうち PHD ドメインについては、ヒストンのメチル化修飾に対する結合を表面プラズモン共鳴解析によって検出し、その相互作用部位を NMR 解析によって特定化した。

(4) ヒストンシャペロン Asf1 複合体の構造・機能解析

染色体・クロマチンの制御機構において、ヌクレオソーム DNA 高次構造の維持・変換は、ヒストンに対する特異的なシャペロン群によって担われていることが知られている。本研究においてヒストンシャペロン Asf1 に対する 2 種類の異なるシャペロン複合体を再構成し、それらの結晶構造を解明した。具体的には、Asf1 と、クロマチン集合因子 CAF-I の Cac2 サブユニットのペプチドから成る複合体（下図 A）と、Asf1 とヒストンシャペロン HIRA (Hip1) ペプチドから成る複合体（下図 B）の結晶構造を、それぞれ分解能 2.6 Å と 2.3 Å で解明した。



これら 2 種類の相互作用因子の Asf1 に対する結合様式をそれぞれ比較検討した結果、2 つのタンパク質の Asf1 に対する結合領域が互いに一致し、Asf1 に対して極めて類似した結合様式をもつことを見出した（次ページの図を参照）。



これらの結果から、ヒストンシャペロンの CAF-I が DNA 複製依存にコアヒストン H3.1/H4 を分子集合させる際、および、ヒストンシャペロンの HIRA が DNA 複製非依存にコアヒストン H3.3/H4 を分子集合させる際に、2つのタンパク質がそれぞれ相互排他的にヒストンシャペロン Asf1 と結合する分子機構が示唆された（文献2）。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

- ① Mimasu, S., Sengoku, T., Fukuzawa, S., Umehara, T., Yokoyama, S. "Crystal structure of histone demethylase LSD1 and tranylcypromine at 2.25 Å" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366: 15-22 (2008) 査読有
- ② Malay, A.D., Umehara, T., Matsubara-Malay, K., Padmanabhan, B., Yokoyama, S. "Crystal structures of fission yeast histone chaperone Asf1 complexed with the Hsp1 B-domain or the Cac2 C terminus" *J. Biol. Chem.* 283: 14022-14031 (2008) 査読有

〔学会発表〕（計4件）

- ① Nagashima, T., Izumi, K., Umehara, T., Hayashi, F., Shirouzu, M., Terada, T., Kigawa, T., Inoue, M., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Hirota, H., Yoshida, M., Tanaka, A., Suzuki, T., Nagai, R., Yokoyama, S. "Structural

study on the zinc-finger domains of Krüppel-like factors" 1st International Symposium on the Biology of the Krüppel-like Factors (東京) 2008年3月6日

- ② Umehara, T., Tochio, N., Mimasu, S., Yoneyama, M., Sengoku, T., Hayashizaki, Y., Ohara, O., Tanaka, A., Kigawa, T., Yokoyama, S. "Functional roles of the SWIRM domains in chromatin modification" 21st Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA (山梨) 2008年6月24日
- ③ 梅原崇史, 伊藤 環, 中村祥浩, 佐々木和樹, 佐藤万仁, 寺田貴帆, 白水美香子, Padmanabhan B., 伊藤昭博, 田仲昭子, 吉田稔, 横山茂之 「アセチル化ヒストンH4の認識を標的とするプロモドメイン阻害剤の開発」 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会（神戸）2008年12月11日
- ④ 若森昌聡, 梅原崇史, 田仲昭子, 横山茂之 「複合体再構成のための大腸菌共発現ベクターの開発」 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会（神戸）2008年12月12日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅原 崇史 (UMEHARA TAKASHI)
独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・上級研究員
研究者番号：20415095

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし