

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770086

研究課題名（和文） 立体構造に基づくヒストンメチル化因子間のあらたな調節機構の解明

研究課題名（英文） Structural study of new regulatory mechanisms of histone methylation

研究代表者

大木 出（OHKI IZURU）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80418574

研究成果の概要（和文）：高等生物においてヒストンは様々な修飾を受け、その組み合わせは精巧な転写制御を生み出し多様な高次生命現象に関与している。本研究ではヒストン修飾因子のうち転写活性化能を持つメチル化因子MLLと抑制能を持つHPC2の相互作用に注目し、因子間の調節メカニズムの解明を目指した。二つの因子の構造学的な解析から、お互いが相反する機能を持つドメインを介して直接相互作用することが判明し、これにより機能のバランスを取って転写を行っている事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In vertebrate, histones are modified in various combinations to produce the elaborate transcriptional control. In this study, we focus on the interaction of the trithorax MLL and polycomb Pc proteins to clarify the new regulatory mechanism by histone methylation. From structural analysis, two proteins were found to interact directly through a domain that has the opposite function of each other. This interaction was considered to adjust the balance of transcriptional activation and repression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：構造生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：クロマチン構造、ヒストン修飾、タンパク質、立体構造解析

1. 研究開始当初の背景

真核生物においてはゲノムDNAのほとんどはヒストン蛋白質に巻き取られ、クロマチンとして格納されている。ヒストンのアミノ酸残基はアセチル化、リン酸、メチル化等の化

学修飾を受けることが知られており、それによりクロマチン構造に変化が生じ、転写の活性化、不活性化やサイレンシング等の現象を引き起こす。ヒストン上で修飾を受けるアミノ酸残基の位置、修飾の種類、また様々な修飾の組み合わせは、精巧な転写制御を生み出

し、多様な高次生命現象に関与している。これまで、ヒストンのメチル化は、リン酸化、アセチル化と比べて比較的静的で変化の少ないものとして考えられてきた。しかし、2004年にLSD1、また2006年になってJHDM1といった脱メチル化反応を行う酵素群が同定された事で、他の修飾と同様に可逆的な修飾であり、ダイナミックな制御を受けうることが示されていた。

2. 研究の目的

本研究は、多様な転写制御に関わるヒストンのメチル化に注目し、ヒストンメチル化の制御因子群を生化学的、構造学的な手法によって調べることで、メチル化修飾による転写制御の調節機構についての新たな知見を得ることを目的としている。特にメチル化因子が他のヒストン修飾因子により制御を受ける現象に注目することで、ヒストンメチル化の新たな調節メカニズムの提案を目指すものである。本研究では、ヒトにおいてヒストンメチル化制御で中心的な役割を果たしており、白血病の原因タンパク質でもあるヒストンH3K4メチル化酵素MLLを中心に研究を行った。

3. 研究の方法

MLLを中心としたヒストンメチル化の制御因子群を生化学、構造生物学的な手法によって調べることににより研究を遂行した。立体構造解析にはX線結晶構造解析法を、複合体のX線構造解析に必要な相互作用部位の同定、結合強度の見積もりにはNMR法を用いた。X線回折装置は本大学の所有するBruker社Proteum Rを、NMR装置も本大学の所有するBruker社600MHz、700MHz高磁場NMR装置を使用した。NMR装置にはクライオプローブと呼ばれる高感度の検出装置が付属しているため、微量の蛋白質でも感度良く測定することが可能であり、初期段階の相互作用の見積もりを効率よく行うことが出来た。

4. 研究成果

2008年度は、まずヒストンメチル化酵素MLLの転写制御機構の解明を行った。MLLタンパク質は分子内に含まれるシステインに富んだCXXCドメインによりCpGに富んだプロモーター領域に結合するが、どのようにCpGという短い配列を見分けているのかは不明であった。そこでMLLのCXXCドメインとターゲットであるCpG-DNAとの複合体の構造解析を行い、2種類の配列の異なるCpG-DNAとの複合体の構造決定に成功した(図1)。

得られたCXXCドメインの2種類の基質との

相互作用様式を比較することで、ドメインが非特異的な塩基認識機構をうまく用いてCpGという短い配列を見分けている事が判明した。また、生体内ではCpG配列中のシトシン塩基はメチル化を受けている事が多いが、CXXCドメインはメチル化が起きている場合は立体障害が起こってDNAに結合出来ない事が明らかになった。さらにCXXCドメインは、申請者が過去に研究を行って来たメチル化されたCpG配列特異的な結合ドメインであるMBD(Ohki et. al, Cell 105, 487-97, 2001)と比較して、DNAを深く包み込むような形で結合しており(図1)、ヌクレオソーム存在下では立体障害によりCpG-DNAと結合出来ない事が予想された。

これらのCXXCドメインの特異的な性質よりMLL蛋白質がターゲットであるDNAがメチル化されておらず、ヌクレオソームも存在していないプロモーター領域のみに局在出来ているメカニズムを説明する事ができた。

これらの成果はMBDの研究で得られていた結果と合わせてBiochemistry誌に発表した(雑誌論文3)。

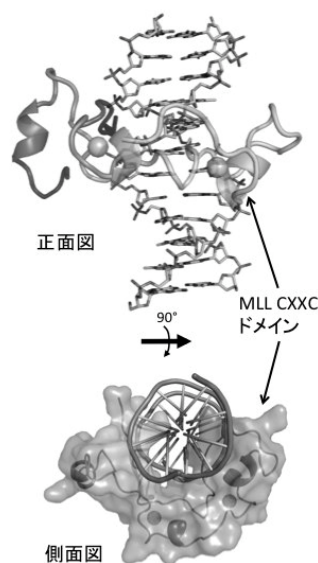


図1. MLL CXXCドメイン-DNA複合体の立体構造

2009年度は、MLL蛋白質の新たな制御因子として同定されてきたポリコム蛋白質HPC2との構造学的解析、相互作用解析を行った。HPC2タンパク質はH3K27メチル化ヒストン結合タンパク質であり、クロマチンを凝集させて転写抑制を行うことが知られている。発生の過程においては、HPC2は転写活性化を行うMLLと共に働き、相反する機能のバランスを取りつつ分化に関わる遺伝子群の転写調節を行っていることが知られている。

NMR法を用いた実験からMLLとHPC2の相互

作用する領域を決定し、MLLのCXXCドメインがHPC2のクロモドメインと直接相互作用する事を決定した。MLLのCXXCドメインはMLLをメチル化する予定のゲノム領域にリクルートする役目を持っている。このCXXCドメインがアミノ酸変異したMLLは、本来メチル化するべきゲノム領域に対するメチル化能が失われることが知られている。HPC2のクロモドメインはこのCXXCドメインに結合することから、HPC2はMLLに結合することでMLLのメチル化能を調整している可能性が考えられた。そこで、この分子間相互作用メカニズムを明らかにするため、HPC2クロモドメインの解析を行った。

興味深い事に、相互作用解析の過程において、クロモドメインがCXXCドメインだけでなくDNAとも結合し、DNAの凝集を強く引き起こすことを独自に発見した。この機能はHPC2のクロマチン凝集機構と関わっていることが予想された。

この機構を解明するためHPC2クロモドメイン単独の結晶構造解析を進め、立体構造を決定した(図2)。得られたHPC2のクロモドメインの立体構造は二量体を形成しており、DNA結合部位と考えられる高度に保存された塩基性領域は二量体表面の両端に離れて存在していた。このダイマー両端に存在するアミノ酸残基に変異を入れるとDNAの凝集が抑えられた。この領域はNMRで決定したMLLとの結合部位と重なっていた(図2)。

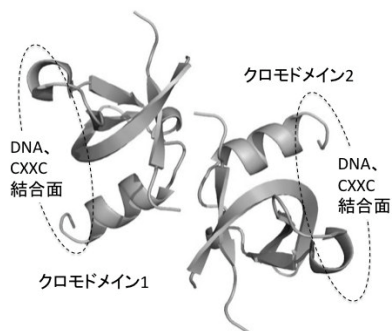


図2. HPC2クロモドメイン二量体の立体構造

他のクロモドメインファミリーではこのようなダイマー構造は報告されておらず、HPC2のクロモドメインは、この独自の構造によりDNAあるいはヌクレオソームをクロスリンクしてクロマチン凝集を引き起こすという新たな機能をもっている可能性が示唆された。MLLのCXXCはこのDNAを介したHPC2のクロマチン凝集能を変化させる事でMLLとHPC2の相反する転写能のバランスを取りつつ、ヒストンのメチル化状態を変化させ分化関連遺伝子群の転写調節を行っていることが考

えられた。

今後、この調整メカニズムの解明のために、MLL-CXXC、HPC2クロモドメイン、DNA及びクロモドメインが結合するH3K27メチル化ヒストンの4者間の詳細な相互作用解析、立体構造解析を行い、MLLとHPC2という機能の異なるメチル化修飾因子間の機能のクロストークを明らかにしていきたい。

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3件)

- 1) Ohki I, Amida H, Yamada R, Sugihara M, Ishigaki T, Tate SI. Surface plasmon resonance study on functional significance of clustered organization of lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1). *Biochim Biophys Acta*. 1814, 345-54 (2011). 査読有
- 2) Nakamura S, Kuroki K, Ohki I, Sasaki K, Maruyama T, Ito M, Kameda Y, Ikura M, Yamamoto K, Matsumoto N, Maenaka K. Molecular basis for E-cadherin recognition by killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *J. Biol. Chem.* 284, 27327-35 (2009). 査読有
- 3) Inomata K, Ohki I, Tochio H, Fujiwara K, Hiroaki H, Shirakawa M. Kinetic and Thermodynamic evidence for flipping of a methyl-CpG binding domain on methylated DNA. *Biochemistry* 47, 3266-71 (2008). 査読有

[学会発表] (計19件)

- 1) 西原宏直、大木出、大谷淳二、水上進、菊地和也、朽尾豪人、白川昌宏、有吉真理子、「NMRを用いた再構成ヌクレオソーム上におけるヒストン修飾認識機構解析」、第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会・合同年会、神戸、2010年12月10日
- 2) 山田梨紗都、編田宏一、大木出、楯真一、「酸化LDL受容体蛋白質LOX-1の酸化LDL認識機構の解明」、第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会・合同年会、神戸、2010年12月7日
- 3) 服部良一、大木出、古板恭子、池上貴久、深田はるみ、白川昌宏、藤原敏道、児嶋長次郎、「NMRを用いた蛋白質リジンを介する静電的相互作用の解析」、平成22年度日本分光学会年会、京都、2010年11月20日
- 4) 服部良一、大木出、古板恭子、池上貴久、深田はるみ、白川昌宏、藤原敏道、児嶋長次郎、「¹³Cメチル基をプローブとして用いるリジン側鎖を介した塩橋の解析法の開発」、第

- 49 回NMR討論会、東京、2010年11月15日
- 5) 辻寛之、田岡健一郎、大木出、山口緑、大垣友香、Y. Purwestri、児嶋長次郎、島本功、「イネのフロリゲンHd3aと相互作用する転写因子OsFD1の機能解析」、日本育種学会第118回講演会、秋田、2010年9月25日
- 6) Ohki I, Kojima C, "A labeling technology for investigating supramolecular complexes by ¹³C methylation of lysine sidechain", XXIVth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Cairns, Australia, 26 of August 2010
- 7) 田岡健一郎、大木出、島田千尋、柳瀬朋子、辻寛之、児嶋長次郎、島本功、「イネフロリゲンHd3aタンパク質の機能ドメイン解析」、イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ2010、つくば、2010年7月3日
- 8) 辻寛之、田岡健一郎、大木出、山口緑、大垣友香、児嶋長次郎、島本功、「イネフロリゲンHd3aタンパク質と相互作用する転写因子OsFD1の機能解析」、イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ2010、つくば、2010年7月3日
- 9) 大木出、古板恭子、田岡健一郎、林こころ、深田はるみ、辻寛之、中川敦史、島本功、児嶋長次郎、「イネフロリゲンタンパク質Hd3aの花成制御機構の構造的基盤」、第10回蛋白質科学会年会、札幌、2010年6月18日
- 10) 服部良一、大木出、古板恭子、児嶋長次郎、「リジン側鎖選択的メチルラベルを用いたNMR法の開発と膜タンパク質への応用」、分子研研究会「拡がるロドプシンの仲間から“何がわかるか” “何をもちらすか”」、岡崎、2010年3月23日
- 11) 大木出、林こころ、古板恭子、深田はるみ、田岡健一郎、辻寛之、島本功、児嶋長次郎、「イネフロリゲンHd3aタンパク質の分子機能の構造的基盤」、シンポジウム「花成・光周期・リズム・時計」4pX04、口頭発表、第51回日本植物生理学会年会、熊本、2010年3月21日
- 12) 大木出、服部良一、児嶋長次郎、「リジンの¹³Cメチル化標識による高分子量蛋白質のNMR解析技術」、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月11日
- 13) 西原宏直、大木出、大谷淳二、水上進、菊地和也、朽尾豪人、白川昌宏、有吉真理子、「核磁気共鳴法と再構成ヌクレオソームを用いたヒストン修飾認識機構の解明」、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月10日
- 14) 服部良一、大木出、古板恭子、児嶋長次郎、「リジン¹³Cメチル化法を用いたユビキチン側鎖のNMR解析」、第48回NMR討論会、福岡、2009年11月10日
- 15) 大木出、「新しいメチルプローブによる

- 高分子量蛋白質の相互作用解析」、蛋白研セミナー「溶液NMRの方法論の新展開と生体分子解析への応用」、大阪大学、2009年3月6日
- 16) 福井陽子、大木出、児嶋長次郎、「ヒトのポリコームの構造、相互作用解析によるクロマチン凝縮メカニズムの解明」、BMB2008（第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会）、神戸、2008年12月11日
- 17) 福井陽子、大木出、児嶋長次郎、「クロマチン凝集メカニズムの解明を目指したヒトPolycombクロモドメインのNMR構造解析」、第47回NMR討論会、つくば、2008年11月12日
- 18) 大木出、真板宣夫、前仲勝実、神田大輔、「DNAのメチル化シグナルを見分ける分子メカニズム—メチル化及び非メチル化CpG結合ドメインの立体構造解析より—」、日本蛋白質科学会年会、東京、2008年6月11日
- 19) 大木出、「メチル化及び非メチル化CpG結合ドメインの立体構造解析から見たDNAメチル化シグナルを見分けるメカニズム」、第2回日本エピジェネティクス研究会年会、三島、2008年5月10日

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：フロリゲン活性化複合体およびその結晶

発明者：大木出、田岡健一郎、辻寛之、児嶋長次郎、島本功

権利者：奈良先端科学技術大学院大学

種類：特願

番号：2010-61562

出願年月日：2010年3月17日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページアドレス

http://bsw3.naist.jp/kojima/member/Izuru_00KI.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大木 出 (OHKI IZURU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80418574

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：