

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06100

研究課題名（和文）液液相分離したリン酸化HP1 のヌクレオソーム結合への機能解明

研究課題名（英文）Elucidation of phase separation mechanism of HP1a by phosphorylation

研究代表者

古川 亜矢子（Furukawa, Ayako）

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90453050

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヘテロクロマチン構造の形成にはHP1 の液液相分離（LLPS）が関与していることが示唆されている。HP1 は、ヘテロクロマチンの主要な構成要素であり、N末端テール、クロモドメイン（CD）、ヒンジ領域、クロモシャドウドメイン（CSD）からなり、CDはヌクレオソーム中のヒストンH3テールを認識し、HP1 はCSDを介して二量体を形成する。N末端テールのリン酸化がLLPSを起こす。本研究では、HP1 のCSD欠失変異体を用いて、LLPSに関与する分子内及び分子間相互作用部位の同定を行い、NMRとMDとSAXSによる相関構造解析により、LLPSを起こす分子機構を明らかにし、論文に投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、リン酸化HP1 のLLPSの分子機構を明らかにした。NMR法において動的構造を解析するSAXSとMDを組み合わせることでこの課題を解決した。また近年、細胞内におけるLLPSの形成と消失を起こすタンパク質同士の相互作用は注目されているが、原子レベルでの解析例はまだ少ない。本研究は、LLPSを原子レベルで解析する一例となるだろう。また、LLPSに関与すると同定した残基の変異体による細胞実験から、液滴の大きさを調節していることが示唆され、ヘテロクロマチンの形成機構の理解にもつながると考えている。

研究成果の概要（英文）：Heterochromatin is a highly condensed state of chromatin, and liquid-liquid phase separation (LLPS) is suggested to be involved in the formation of this higher-order chromatin structures. HP1, one of major components of heterochromatin, HP1 consists of N-terminal disordered tail (N-tail), chromodomain (CD), central flexible hinge region, and chromo shadow domain (CSD); CD recognizes the lysine9-methylated histone H3 tail in the nucleosome and HP1 forms a dimer via CSD. The phosphorylation of the N-tail forms LLPS of HP1. To elucidate the LLPS mechanism by the phosphorylation, integrative structural analyses of NMR, SEC-SAXS, and MD simulations were performed. We found important interactions in the LLPS formed by the phosphorylated HP1. The results are being submitted for publication.

研究分野：構造生物学

キーワード：ヘテロクロマチン 液-液相分離 相関構造解析

1. 研究開始当初の背景

ヘテロクロマチンは、クロマチンの基本単位であるヌクレオソーム同士が固まった凝集体であり、遺伝子の発現抑制や適切な染色体機能に重要な役割を果たしている。ヘテロクロマチンの形成には、ヘテロクロマチンタンパク質(HP1 α)が関与している。HP1 α は、間期ではヌクレオソーム中のヒストン H3 のメチル化された 9 番目のリジン(H3K9me3)に特異的に結合し、ヘテロクロマチン構造を形成する。ヒストン H3 の 10 番目のセリン(H3S10)が AuroraB キナーゼにリン酸化されると、HP1 α はヌクレオソームから解離し、染色体分配関連タンパク質と相互作用する。ヒトの HP1 α は、N 末テイル(NT)-クロモドメイン(CD)-ヒンジ(HR)-クロモシャドードメイン(CSD)-C 末テイル(CT)から成り、CSD を介して 2 量化する。ヌクレオソーム H3K9me3 との特異的結合は CD 領域で形成される。また、CD と CSD を連結する HR は塩基性に富む配列を持つため、ヌクレオソーム DNA に結合することがわかっている。

さらに、NT に存在する連続した 4 個のセリン残基は、ガゼインキナーゼ 2 によってリン酸化されるという特徴がある。HP1 α はこのリン酸化によって、H3K9me3 への結合が強くなることや、周囲とは異なる液相を形成し液-液相分離が起こることが報告されている(Nature 2017)。一方で、NT がリン酸化されない HP1 変異体は、多くのがん細胞で観察される高頻度の染色体の分配異常(染色体不安定性)を引き起こすため、HP1 α において NT のリン酸化は必要不可欠な機能である。HP1 α によるヘテロクロマチン形成機序、リン酸化や液-液相分離の役割を理解するためには、HP1 α の詳細構造の解析が重要となる。HP1 α の CD や CSD の構造、CD と H3K9me3 ペプチドとの複合体構造は、X 線結晶構造解析や NMR 法によって決定されている。しかしながら、HP1 α とダイヌレオソームとの複合体の電顕構造の報告では、CD や HR 領域は見えておらず(Moll. Cell 2018)、ヌクレオソームの X 線結晶構造や電顕構造でも、HP1 α の結合するヒストン H3 の N 末テイルやリンカー-DNA は観測されていないなど、リン酸化 HP1 α 全長の構造やヌクレオソーム上での特異的結合を形成する H3K9me3 以外の相互作用(結合様式)はわかっていない。この理由は、HP1 α 全体が非常に動的で、NT、CD、HR、CSD、CT がお互いに弱く相互作用していること、ヒストン H3 の N 末テイルもまた天然変性領域で非常に動的な構造であるためである。

また、細胞内においてリン酸化 HP1 α が形成する液滴中には、ヒストン H3K9 に me3 修飾が入ったヌクレオソーム、DNA、AuroraB が内包されることが報告されており、ヘテロクロマチン形成にも寄与することが考えられている。しかしながら、リン酸化 HP1 α の液-液相分離がどのような分子機構で形成されるのか、クロマチン構造にどのように関わっているのかなど未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、HP1 α のリン酸化およびリン酸化にともなう液-液相分離がヘテロクロマチン形成に果たす役割を明らかにするため、リン酸化 HP1 α の液-液相分離の機構およびリン酸化 HP1 α のヌクレオソームへの結合様式を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

動的構造解析を得意とする溶液核磁気共鳴(NMR)法、X 線溶液散乱(Bio-SAXS)法、MD シミュレーションとの構造相関解析によって、リン酸化体 HP1 の液-液相分離が起こるための核となる相互作用を解明する。具体的には、非リン酸化体 HP1 と液-液相分離を生じるリン酸化体 HP1 を *in vitro* で大量調製し、この両者の分子内や分子間の相互作用の相違を、溶液 NMR 法では化学シフト変化やシグナル強度変化から明らかにする。また、Bio-SAXS 法と MD 法を用いて両者の形状の違いや相互作用の違いを明らかにする。

4. 研究成果

HP1 α の配列上には、酸性残基や塩基性残基に富む領域が散在していることから、NT のリン酸化の有無による低塩強度と高塩強度における各残基の化学シフトの違いを解析した。その結果、塩強度による化学シフト変化が観測され、その化学シフトの変化はリン酸化体と非リン酸化体で異なることも明らかとなった。このことから、HP1 α は分子内の N 末テイル(NT)、クロモドメイン(CD)、ヒンジ(HR)、クロモシャドードメイン(CSD)、C 末テイル(CT)テイルが互いに弱く静電的相互作用しており、さらに NT のリン酸化は多様に存在する分子内の弱い静電相互作用を変化させていることが示唆された。また、Bio-SAXS 法から、リン酸化 HP1 α の方が非リン酸化 HP1 α よりも少しコンパクトな構造を取ること、MD からはリン酸化 HP1 α の方が多数存在する分子内相互作用が強まる傾向にあることも明らかとなった。また、MD から得られた相互作用に關与す

る領域は、NMRの実験結果とよく一致した。続いて、濃度上昇に伴いリン酸化 HP1 α の液-液相分離が確認された。非リン酸化体とリン酸化体共に、CSD と CD 及び HR 領域が多様に相互作用しているが、NT がリン酸化されると NT とヒンジ領域の相互作用が強くなり、液-液相分離が起こることが予想された。そこで、全長の HP1 α の解析は、HP1 α が二量体を形成するという理由から NMR の詳細な解析が困難であるため、CSD を欠損させた HP1 α Δ CSD 変異体を作製した。

興味深いことに、リン酸化 HP1 α Δ CSD も全長同様液-液相分離を起こし、液-液相分離が生じる濃度は全長よりも低くなった。このことから、CSD の欠損により CSD と HR 領域との相互作用がなくなったことにより、NT と HR 領域との相互作用が強くなり液-液相分離が起こりやすくなったことが示唆された。この CSD 欠失変異体を用いて、非リン酸化 HP1 α Δ CSD とリン酸化 HP1 α Δ CSD での塩強度や濃度の違いによる化学シフト変化および強度変化を解析した。低濃度における非リン酸化 HP1 α Δ CSD とリン酸化 HP1 α Δ CSD で、大きく化学シフトが異なる残基が同定され、これらは分子内での両者の違いに起因する差であると言える。さらに、リン酸化体での濃度変化に伴う化学シフト変化も観測され、これは分子間相互作用に参与する残基の違いに起因すると考えられる。また、希薄溶液条件下で解析した Bio-SAXS の結果から、全長と同様にリン酸化 HP1 α Δ CSD の方が非リン酸化 HP1 α Δ CSD よりも、コンパクトな構造を取ることが分かった。MD の結果からも、多数存在する分子内相互作用が、NMR の実験結果とよく一致することも明らかとなった。以上から、HP1 α 欠失変異体を用いて液-液相分離に移行する過程に重要な相互作用残基を同定することができた。

次に、この同定した箇所に変異を入れた HP1 α を細胞内で発現させる実験を行った。用いた変異体は、リン酸化部位のみ変異体と相分離関連部位のみ変異体とその両方の変異体である。野生型の HP1 α の foci は明瞭に観察されたが、リン酸化部位変異体は過去の報告にあるように foci が明瞭に観察されなかった。一方、相分離関連部位変異体は、foci は明瞭に観察された。さらに、二重変異体は明らかに観察される foci の数が減少し、また観察される foci も明瞭ではなかった。HP1 α の foci の大きさは、野生型に比べてリン酸化部位変異体では減少し、相分離関連部位変異体では foci の面積がわずかに減少したが、ばらつきも大きかった。二重変異体では foci の大きさがはっきりと減少した。リン酸化部位変異体では foci 数の変化がなく、foci の面積が減少することから、NT のリン酸化は HP1 α の foci 形成の開始ではなく、維持または foci の融合に関わることが考えられる。また相分離関連部位変異体は foci の形成は野生型と顕著な差は見られないが、foci の大きさのばらつきが大きいことから、HP1 α の foci の融合の制御に欠損がある可能性が示唆された。

構造相関解析によって、液-液相分離に移行する過程に重要な相互作用残基を同定することに成功し、その領域は細胞内においても foci の大きさの制御に参与していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古川亜矢子, 米澤 健人, 根上 樹, 吉村 ゆり子, 林 亜紀, 中山 潤一, 安達 成彦, 千田 俊哉, 清水 謙多郎, 寺田 透, 清水 伸隆, 西村 善文
2. 発表標題 ヘテロクロマチン関連タンパク質HP1aのリン酸化による液-液相分離機構の解明
3. 学会等名 日本分光学会NMR分光部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川亜矢子, 米澤 健人, 根上 樹, 吉村 ゆり子, 林 亜紀, 中山 潤一, 安達 成彦, 千田 俊哉, 清水 謙多郎, 寺田 透, 清水 伸隆, 西村 善文
2. 発表標題 リン酸化によるHP1 の液-液相分離機構の解明
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川亜矢子
2. 発表標題 ヘテロクロマチンタンパク質HP1のNMR構造解析
3. 学会等名 BINDS-NMR報告会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------