

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：82118

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22121005

研究課題名(和文)クロマチンリモデリング制御複合体の構造と機能の解析

研究課題名(英文)Structural and functional analyses of chromatin assembly factors

研究代表者

千田 俊哉(Senda, Toshiya)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授

研究者番号：30272868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 149,500,000円

研究成果の概要(和文)：クロマチンの基本構成要素であるヌクレオソームの破壊と再形成は、複製・転写・修復・組換えなどの多くの核内反応を制御するだけでなく、ヒストンの翻訳後修飾等のエピジェネティック情報の伝達にも深く関わる生命現象である。本研究では高分子量型ヒストンシャペロンであるCAF-1とHIRAに注目し、研究を推進した。CAF-1については、昆虫細胞における大量発現系の構築と出芽酵母からの複合体の大量精製系の構築を行い、電子顕微鏡による負染色像観察に成功した。HIRAについては、C末端側ドメインの結晶を得ることに成功した。加えて、細胞内シグナルを攪乱するピロリ菌由来タンパク質CagAの結晶構造の決定にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Nucleosomes are the fundamental repeating units of chromatin. Nucleosomes must be disassembled and reassembled during nuclear reactions, such as replication, transcription, repair, and recombination. During the reassembly of nucleosomes, histones need to be deposited on genomic DNA in the correct procedure. If not, epigenetic information, which is encoded on the N-tail of histones, is eliminated in the course of nuclear reaction coupled nucleosome reassembly. Here, we focused on the histone deposition factors, CAF-1 and HIRA. We established a protocol for the large-scale purification of CAF-1 (a replication-dependent histone deposition factor), which enabled us to obtain images from EM analyses. Regarding HIRA, which is a replication-independent histone deposition factor, we have obtained crystals of the HIRA-C domain. We will now try crystal optimization. In addition, we have determined the crystal structure of CagA, which has been implicated in Helicobacter pylori pathogenicity.

研究分野：結晶学・構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 クロマチン ヌクレオソーム 転写 複製 CAF-1 HIRA

1. 研究開始当初の背景

クロマチンの基本構成要素であるヌクレオソームの破壊と再形成は、複製・転写・修復・組換えなどの多くの核内反応を制御するだけでなく、ヒストンの翻訳後修飾等のエピジェネティック情報の伝達にも深く関わる生命現象である。これまでに我々は、ヒストンシャペロン CIA とその相互作用因子との複合体の結晶構造に基づき、ヌクレオソーム破壊の分子機構を解明してきた。本研究では、高分子量型ヒストンシャペロンである CAF-1 と HIRA を取り上げ、ヌクレオソーム再形成の分子機構解明を目指した構造細胞生物学を推進する。具体的には、ヌクレオソーム再形成に関与する CIA-CAF-1 複合体や CIA-HIRA 複合体と、ヒストン H3-H4 とが形成する核内シグナリング複合体の結晶構造を決定し、立体構造情報に基づいた生化学的解析により、ヌクレオソーム再形成の分子機構を解明する。また、ヌクレオソームの破壊と再形成の分子機構と立体構造情報に基づき生物学的・遺伝学的解析を行うことで、基礎生物学上の大問題であるエピジェネティック情報の伝達機構の解明も目指す。

2. 研究の目的

次の2点の構造細胞生物学的研究を行うこととする。

- (1) ヒストンシャペロン CAF-1, HIRA と、これらの相互作用因子である CIA, ヒストン H3-H4 等との複合体(核内シグナリング複合体)の立体構造を決定する
- (2) 得られた立体構造情報に基づいて生化学的・遺伝学的解析を行い、核内シグナリング複合体による転写・複製時におけるエピジェネティック情報の伝達及び変換機構を解明する

なお、これらの核内シグナリング複合体の結晶構造解析は一般的には困難が予想されるが、領域内での共同研究や方法論連絡会等のメリットを活かすことで、十分に達成可能であると考えている。

3. 研究の方法

平成22年度:CAF-1の大量発現系および大量精製系の構築を行う。CAF-1が充分量発現しないという問題が生じる可能性があるが、既存の大量培養設備を駆使して問題解決にあたる予定である。本研究に必要な他の主要タンパク質の大量発現・大量精製系は、確立済みである。

平成23年度以降:CAF-1及びHIRAについて、CIAおよびヒストンH3-H4複合体との共結晶化を行う。また、これらの分子複合体の化学量論的解析を行ない、結晶化条件の検討の助けとする(平成23-24年度)。結晶が得られ次第、放射光を利用した結晶構造解析を行なう。結晶の質が悪い場合は、変異体の利用や結晶の凍結条件等を検討して、結晶の質の改善を図る。結晶が得られない場合は、CAF-1、

HIRAの機能ドメインを切り出し、CIAやヒストンとの分子複合体の結晶構造解析を行う。この場合、全体構造は領域内での共同研究による電子顕微鏡を用いた単粒子解析で決定する。構造解析・機能解析に用いるCAF-1やHIRAに対する多数の相互作用因子は、in vitro 翻訳系の自動化装置で効率的に作成する予定である。

立体構造情報が得られた後は、変異体を用いた生化学的解析(平成25年度)、出芽酵母を用いた遺伝学的解析を行う(平成25-26年度)。得られた解析結果を総合的に評価して、CIA, CAF-1, HIRAがヌクレオソームの破壊・再形成を行う分子機構と、エピジェネティック情報の伝達機構との関係を明らかにしていく(平成26年度)。

4. 研究成果

(1) 核内シグナリング複合体CAF-1の大量精製系の確立と試験的な単粒子解析

CAF-1複合体は出芽酵母からヒトまで、進化上高度に保存されたヒストンシャペロン複合体で、分子量150, 60, 48kDaの3種類のサブユニットから構成される。一般的に分子量が大きいサブユニットで形成される複合体は、大腸菌での発現・再構成が困難であることが多いため、我々は、昆虫細胞共発現系の構築及び内在性複合体の精製を同時進行した。

第一に、昆虫細胞共発現系の構築については、Multi-Bacシステムを利用してヒトCAF-1複合体の3種類のサブユニット(p150, p60, p48)を共発現させ、複合体の精製を試みた。しかし、精製の過程でp60が非常に解離しやすいことが判明した。電子顕微鏡による負染色像観察においても、不揃いなサイズの粒子像が観察された。現在、複合体の安定化条件を検討中である。

第二に、出芽酵母を出発材料として実験を行った。各サブユニットにタグを入れて、細胞内から内在性複合体を精製したところ、60kDaのサブユニット(Cac2p)にタグを付加した場合に、最も高純度のCAF-1複合体を精製できることが判明した。次に、大型インキュベーター・培養バック・大型遠心機の利用により、1日最大80Lの培養を毎日繰り返して行える体制を整えた後、大量規模での精製を行った。最終的に、40Lの培養菌体から高純度の精製標品が得られた。最終精製標品を用いて、電子顕微鏡による負染色像観察を行った結果、良好な像を得ることに成功した(理研・藤井高志博士との協力研究)。得られた画像を解析した結果、試験的にはあるが出芽酵母CAF-1複合体の単粒子像を得ることに成功した。

(2) 核内シグナリング因子HIRAの大量精製系の確立と結晶化

研究期間前半は、全長のタンパク質について大腸菌発現系・昆虫細胞発現系における発

現と精製を試みた。しかし、全長タンパク質は大腸菌の内在性の DNA と非特異的に結合し、可溶性の凝集体を形成する傾向が強く、結晶化に必要なタンパク質を精製することはできなかった。研究期間後半は、ドメインごとの発現・精製や、相互作用因子との共精製を試みた。その中で、HIRA の C 末端側ドメインについて結晶が得られ、現在は、独自に開発したシークエンシャルシーディング法により、結晶の質の改善を試みている。

(3) 様々な核内シグナリング複合体の大量精製系の確立

CAF-I 複合体や HIRA の研究に加えて、核内シグナリング制御やクロマチン鑄型からの遺伝子発現制御を通して、エピジェネティック情報の維持・変換に対して重要な役割を果たす複数の複合体についても、立体構造解析に向けた大量精製を行った。いずれの複合体も、各サブユニットの分子量が大きく、サブユニット数も多いため、大腸菌や昆虫細胞での共発現は困難であることが予想されるが、我々が確立した内在性複合体の大量精製パイプラインでは、良好に精製できている。出芽酵母 CAF-I 複合体と同様に、スケールアップと電子顕微鏡観察を行い、単粒子解析・結晶化へと進展する計画である。これらの研究に加えて、細胞内シグナリングを擾乱することによって胃癌を促進するピロリ菌のタンパク質 (CagA) の結晶構造を解析し、立体構造に基づく感染機構モデル (ラリアットループモデル) を提唱した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Prokop, Z., Sato, Y., Brezovsky, J., Mozga, T., Chaloupkova, R., Koudelakova, T., Jerabek, P., Stepankova, V., Natsume, R., van Leeuwen, J.G., Janssen, D.B., Florian, J., Nagata, Y., Senda, T. and Damborsky, J., Enantioselectivity of haloalkane dehalogenases and its modulation by surface loop engineering., *Angew. Chem. Int.*, 査読有, 49 巻, 2010, 6111-6115

Ishikawa, K., Ohsumi, T., Tada, S., Natsume, R., Kundu, L.R., Nozaki, N., Senda, T., Enomoto, T., Horikoshi, M. and Seki, M., Roles of histone chaperone CIA/Asf1 in nascent DNA elongation during nucleosome replication., *Genes Cells*, 査読有, 16 巻, 2011, 1050-1062

Hayashi, T., Senda, M., Morohashi, H., Higashi, H., Horio, M., Kashiba, Y., Nagase, L., Sasaya, D., Shimizu, T., Venugopalan, N., Kumeta, H., Noda, N.N., Inagaki, F., Senda, T., and Hatakeyama, M., Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling

potentiation mechanism of Helicobacter pylori oncogenic effector CagA., *Cell Host Microbe.*, 査読有, 12 巻, 2012, 20-33

Aizawa, S., Senda, M., Harada, A., Maruyama, N., Ishida, T., Aigaki, T., Ishigami, A., and Senda, T., Structural basis of the γ -lactone-ring formation in ascorbic acid biosynthesis by the senescence marker protein-30/gluconolactonase., *PLoS One*, 査読有, 8 巻, 2013, e53706

Sugimoto, K., Senda, M., Kasai, D., Fukuda, M., Masai, E. and Senda, T., Molecular mechanism of strict substrate specificity of an extradiol dioxygenase, DesB, derived from *Sphingobium* sp. SYK-6., *PLoS One*, 査読有, 9 巻, 2014, e92249

Kuwabara, N., Minami, R., Yokota, N., Matsumoto, H., Senda, T., Kawahara, H. and Kato, R., Structure of a BAG6 (Bcl-2-associated Athanogene 6)-Ubl4a (Ubiquitin-like Protein 4a) complex reveals a novel binding interface that functions in tail-anchored protein biogenesis., *J. Biol. Chem.*, 査読有, 290 巻, 2015, 9387-9398

〔学会発表〕(計 13 件)

安達成彦、千田俊哉、他、Purification and crystallization of TAF subunits of general transcription initiation factor TFIID., コールドスプリングハーバー 研究所国際学会 (アメリカ合衆国) 2012 年 9 月

羅羽華、千田俊哉、Mechanistic insights revealed by the crystal structures of the nucleotide-bound PIP5P4K II., アメリカ結晶学会 (アメリカ合衆国) 2013 年 7 月

Adachi, N., Aizawa, K., Yamaguchi, Y., and Senda, T., Large-scale purification of general transcription factor TFIIF. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Epigenetics & Chromatin, New York, USA, September 9-13 (2014)

Senda, T., Structure and Function of an Oncoprotein CagA from *Helicobacter pylori*. 8th Asia-Oceania Forum for Synchrotron Radiation Research, Hsinchu, Taiwan, September 16 (2014) (招待講演)

Senda, T., Tertiary structure and functional analysis of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. The 3rd international symposium on drug discovery and design by NMR, Nagoya, October 11-12 (2012). (招待講演)

佐藤優花里、千田俊哉、Expression and purification of histone chaperone HIRA., Nagoya Symposium, Frontiers in Structural Physiology (名古屋・名古屋大学), 2013 年 1 月 22-24 日

千田俊哉、PF の現状とピロリ菌発がんタ

ンパク質 CagA の結晶構造解析、第 13 回日本蛋白質科学会年会(鳥取・とりぎん文化会館), 2013 年 6 月 14 日(招待講演)

羅羽華、竹内恒、千田美紀、嶋田一夫、Lewis Cantley、佐々木敦朗、**千田俊哉**、Human Type II PIPK -ヌクレオチド複合体の X 線結晶構造解析、第 13 回日本蛋白質科学会年会(鳥取・とりぎん文化会館), 2013 年 6 月 13 日

原田彩佳、佐藤優花里、上村直史、政井英司、**千田俊哉**、Sphingobium sp. SYK-6 由来バニリン酸脱メチル酵素 LigM の立体構造解析に向けた精製、第 86 回日本生化学会大会(横浜・パシフィコ横浜), 2013 年 9 月 13 日

千田俊哉、エピジェネティックおよび疾病関連タンパク質の構造生物学研究、平成 26 年度日本結晶学会年会(東京・東京大学農学部弥生キャンパス), 2014 年 11 月 1 日(招待講演)

千田俊哉、ピロリ菌由来のがんタンパク質 CagA の構造-機能相関研究、第 87 回日本生化学会大会(京都・国立京都国際会館), 2014 年 10 月 16 日(招待講演)

佐藤優花里、**千田俊哉**、ヒストンシャペロン HIRA C domain の精製系の確立、第 87 回日本生化学会大会(京都・国立京都国際会館), 2014 年 10 月 16 日

千田俊哉、創薬等支援技術基盤プラットフォームにおける構造研究、第 135 回日本薬学会(神戸・神戸学院大学/兵庫医療大学), 2015 年 3 月 26 日(招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

安達成彦、**千田俊哉**、他、Springer、Encyclopedia of Systems Biology "Histone posttranslational modification to nucleosome structural change."、2013、896-899

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://pfweis.kek.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千田 俊哉 (SENDA, Toshiya)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授

研究者番号：3 0 2 7 2 8 6 8

(2) 研究分担者

該当するメンバーはなし

(3) 連携研究者

堀越 正美 (HORIKOSHI Masami)
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
研究者番号：7 0 2 4 2 0 8 9

関 政幸 (SEKI Masayuki)
東北薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：7 0 2 0 2 1 4 0