

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

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：22131007

研究課題名（和文）クロマチンリモデリングの構造生物学

研究課題名（英文）Structural Biology of Chromatin remodeling

研究代表者

山縣 ゆり子（Yamagata, Yuriko）

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：40183678

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 98,900,000円

研究成果の概要（和文）：構造学的立場からゲノム修復・複製に関わる酵素の働きを調べる上で、これまでの裸のDNAではなくクロマチンレベルでのDNAやこれまでは経験的に扱っていた水素原子の位置を考慮すること、酵素の働く過程を原子レベルで追跡することは新しい視点で他に波及効果が大きい研究課題である。本研究では、ゲノム修復・複製に関わる酵素が働くためにクロマチン構造を変換するクロマチンリモデリング因子のサブユニットのX線結晶構造解析の結果に基づき、物理化学的、生化学的、分子生物学的手法を駆使し、全体像モデルを構築した。また、UV損傷を修復し、皮膚がんを抑えるDNAポリメラーゼの反応過程全体を初めて原子レベルで可視化した。

研究成果の概要（英文）：Structural biology has played an important role in understanding mechanism of DNA repair or replication enzymes. However, structural bases for enzyme mechanisms through chromatin remodeling are not known. Furthermore, visualization of the catalytic reaction process at the atomic level remains unclear.

In this study, we have determined the crystal structure of one subunit in an ATP-dependent chromatin remodeling factor and suggested the overall shape combined with a lot of physicochemical, biochemical and molecular biological methods. The pathway of nucleotidyl transfer reaction by human DNA polymerase ϵ , a key enzyme in translesion synthesis in human cells was newly visualized using time-resolved protein crystallography by freeze trapping. In sequence, the substrate and two Mg ions are aligned, the nucleophile 3'-OH is deprotonated, the sugar conformation changes and the new bond is formed. An unexpected third Mg ion arrives with the new bond and stabilizes the intermediate state.

研究分野：医歯薬学

キーワード：タンパク質 クロマチンリモデリング DNA合成酵素 構造生物学 時分割結晶学

1. 研究開始当初の背景

構造生物学は生命現象の各場面を原子レベルの化学の言葉で記述することに成功し、生命科学の発展に貢献してきた。1981年転写因子 Cro が初めて X 線結晶構造解析されて以降、ゲノム修復、複製、転写分野の構造生物学の進展も著しく、修復酵素はゲノムの傷を如何に認識するか、複製の忠実度の多様性や転写制御の仕組みなどが、立体構造に基づき原子レベルで解明されてきた。申請者も DNA グリコシラーゼ (*Cell*, 1996)、ゲノムメンテナンスに働く酸化ヌクレオチド分解酵素 (*JBC*, 2004&2010、*NAR*, 2005) について働く仕組みを原子レベルで解明してきた。

今日の構造生物学は、ゲノム修復、複製、転写のカップリングと普遍的なクロマチンリモデリング機構の分野におけるさらに新しい視点で、他に波及効果の大きい点として、

(1) 裸の DNA ではなくクロマチンレベルでの DNA を対象とする構造生物学、(2) ゲノム修復、複製に関わる酵素では、時間軸も加えた 4 次元構造 (反応過程の追跡) レベルの解明と (3) これまでの構造生物学ではほとんど考慮されて来なかった水素原子の位置 (超高分解能 X 線解析と中性子解析を合わせた精密構造解析) のレベルでの働く仕組みの解明、以上を研究対象とする時代に入っていると考えた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、ゲノム修復、複製、転写のカップリングと普遍的なクロマチンリモデリング機構の分野におけるさらに新しい視点で、他に波及効果の大きい点として、

(1) 裸の DNA ではなくクロマチンレベルでの DNA を考慮する構造生物学として、クロマチンリモデリングに関わるタンパク質複合体の X 線結晶構造解析、(2) ゲノム修復、複製に関わる酵素に関して時間軸も加えた 4 次元構造レベルの機能解明 (反応過程の追跡) と (3) これまでの構造生物学ではほとんど考慮されて来なかった水素原子の位置 (超高分解能 X 線結晶構造解析と中性子結晶構造解析を合わせた精密構造解析) のレベルでの働く仕組みの解明、以上を目的とした。

3. 研究の方法

(1) クロマチンレベルの構造生物学の対象として ATP 依存性クロマチンリモデリング複合体 hCHRAC を選び、その構成因子である ACF1、CHRAC15/17、SNF2H の様々な領域の発現系の構築、精製方法を検討した。どの領域を選ぶかについては、生化学的や物理化学的手法による相互作用解析の結果に基づいて決定した。精製した試料について結晶化スクリーニングを行い、結晶が得られたものについては X 線結晶構造解析を行った。X 線結晶構造解析の結果を参考に、hCHRAC

のサブユニット間の相互作用領域を GST Pull-down Assay、トリプシン限定分解法、SPR 解析等により決め、それらは変異実験や X 線小角散乱実験によっても妥当性が示唆されたので、全体のモデルを構築した。

(2) 時間軸も加えた 4 次元構造レベルの機能解明 (反応過程の追跡) については DNA ポリメラーゼ η を対象とした。DNA ポリメラーゼは、鋳型 DNA と相補的な dNTP を取り込み、dNTP の α リンとプライマー鎖末端の 3'-OH との間に共有結合を形成することで、プライマー鎖を伸長させる。多くの研究からこの反応は、2つの Mg^{2+} を介した機構によって起こるとされている。ヒト DNA ポリメラーゼ η (Pol η) は、紫外線により生じるチミン二量体を乗り越えて複製することのできる DNA ポリメラーゼである。DNA ポリメラーゼの中でも、反応速度が比較的遅く、反応中の構造変化が小さいという Pol η の特徴を利用して、低温トラップ法による時分割 X 線結晶構造解析を行い、Pol η のヌクレオチド転移反応をリアルタイムかつ原子レベルで観察した。まず、真の基質 dATP と反応を阻害する Ca^{2+} を用いることで反応開始構造である Pol η -DNA- dATP- Ca^{2+} 構造 (酵素-基質複合体) を決定した。この結晶を pH を上げた Mg^{2+} 溶液に移して、結晶内反応を引き起こし、40 秒から 300 秒まで約 40 秒間隔で結晶凍結、反応を停止した。それら反応中間体構造は、1.50-1.95 Å 分解能で精密化した。

(3) 水素位置の決定については、新規抗がん剤の標的として注目されている大腸菌 MutT のヒトホモログを対象とした。このホモログの大型結晶の調製に相応しい変異型を作成し (雑誌論文⑨)、結晶の大型化を試み、中性子結晶構造解析が可能な大型結晶を得ることが出来た。現在、超高分解能 X 線結晶構造解析と中性子結晶構造解析を行っている。

4. 研究成果

時間軸も加えた 4 次元構造レベルの機能解明 (反応過程の追跡) について、1.50-1.95 Å 分解能で精密化した反応中間体の X 線結晶構造から、これまでの DNA ポリメラーゼと基質アナログもしくは、反応しない変異型ポリメラーゼと基質の複合体の多くの結晶構造からは、全く予想されなかった DNA ポリメラーゼの新規の反応機構が解明できた (*Nature*, 2012 他、雑誌論文④、⑥、⑦、⑨)。

すなわち、それまでの DNA ポリメラーゼの反応は、2か所に位置する Mg^{2+} を介して触媒されるという 2 金属イオン機構が信じられてきたが、今回、低温トラップ法による時分割 X 線結晶構造解析法で反応過程を追跡することにより、2 個の Mg^{2+} が活性部位に結合する

ことでプライマー鎖末端の3'-OHが反応開始位置にきた後、糖の構造を変えながら、3'-OHとdATPの α リンの間に共有結合が形成されることが分かった。さらに、3'-OHの脱プロトン化に関わる一過性の水分子の存在や第3の Mg^{2+} が反応に関与することを初めて示すことができた(図1)。

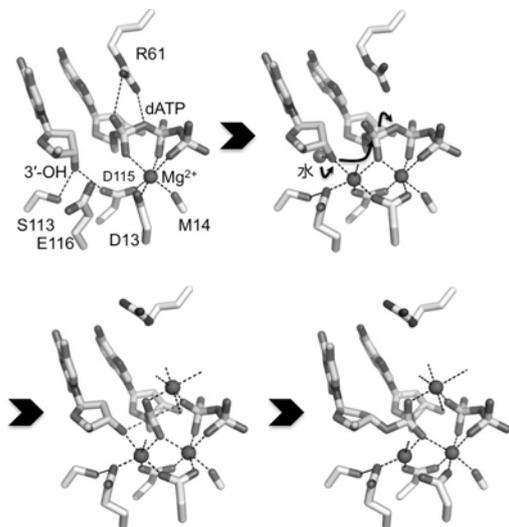


図1、低温トラップ法による時分割 X 線結晶構造解析により、明らかになった反応機構

タンパク質結晶学による酵素の構造解析は、酵素反応の研究に大きな貢献をしてきたが、多くは酵素と反応が起こらない基質アナログなどを用いて「反応状態を模倣した」構造から反応機構を推定していたに過ぎない。また、酵素反応機構の研究への時分割タンパク質結晶学の貢献は 1980 年代から期待されていたが、これまでに低温トラップ法で数十秒から数百秒に亘る反応過程全体を精度よく追跡した報告例がなかった。そのような現状で、2012 年、筆者らが初めて低温トラップ時分割 X 線結晶構造解析による DNA ポリメラーゼ η (ゲノム普遍的制御領域代表、花岡文雄らが発見し、X 線結晶構造解析した損傷乗り越え DNA ポリメラーゼで、UV 損傷を修復し、皮膚がんを抑える働きをしている) の時間軸をふくめた 4 次元構造の決定(酵素反応過程全体の可視化)は、酵素研究に大きなインパクトを与え、わずか 1 年後に DNA ポリメラーゼ β の低温トラップ時分割 X 線結晶構造解析が Cell 誌に発表され、引き続き 1 年半後に Nature 誌にも基質が異なるものが発表され、判明した DNA ポリメラーゼ反応機構は、筆者らが初めて明らかにした機構と基本的に同じであることが分かった。低温トラップ法による時分割 X 線結晶構造解析手法は容易であるため、DNA ポリメラーゼのみならず、多くの酵素の反応機構研究の本流に

なることが予想され、酵素反応機構研究へ多大な波及効果を与えることは疑いない。今後、他の DNA ポリメラーゼや様々な酵素の時分割 X 線結晶構造解析により、推定ではなく真の反応機構の解明が可能になり、これは酵素の学ぶモノづくりや計算科学の検証と発展に大きな貢献を果たすと期待できる。

なお、hCHRAC の全体モデルについて、現在、論文を準備している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Yamaguchi, Y., Matsueda, S., Matsunaga, K., Takashio, N., Toma-Fukai, S., Yamagata, Y., Shibata, N., Wachino, J., Shibayama, K., Arakawa, Y., and Kurosaki, H. (2015) Crystal structure of IMP-2 metallo- β -lactamase from *Acinetobacter* spp. Comparison of active-site loop structures between IMP-1 and IMP-2. *Biol. Pharm. Bull.*, 38, 96-101. 査読有 DOI: 10.1248/bpb.b14-00594
- ② Miyata, K., Takagi, M., Sato, S., Morioka, H., Shiba, K., Minamisawa, T., Takami, M., and *Fujita, N. (2014) Suppression of Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and pulmonary metastasis by a single-chain antibody variable region fragment. *Cancer Med.* 3, 1595-1604. 査読有 DOI: 10.1002/cam4.320
- ③ 山縣ゆり子 (2014) 構造生物学の歴史と進展. *ファルマシア* 50, 393-397. 査読有 <http://farumashia.pharm.or.jp/mokuji/2014/50-05.html>
- ④ 中村照也, 山縣ゆり子, Yang, W. (2013) DNA ポリメラーゼ η によるリン酸ジエステル結合の形成過程の観察. *生物物理*, 53, 254-257. DOI: 10.2142/biophys.53.254 査読有
- ⑤ Minomo, A., Ishima, Y., Chuang, V.T., Suwa, Y., Kragh-Hansen, U., Narisoko, T., Morioka, H., Maruyama, T., and *Otagiri, M. (2013) Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects* 1840, 2917-2923. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.01.006 査読有
- ⑥ Nakamura, T., Zhao Y., Yamagata, Y., Hua, Y.J., and Yang, W. (2013) Mechanism of the nucleotidyl-transfer reaction in DNA polymerase revealed by time-resolved protein crystallography. *Biophysics* 9, 31-36. 査読有 DOI: 10.2142/biophysics.9.31
- ⑦ 中村照也, 山縣ゆり子, Yang, W. (2013) 時分割タンパク質結晶学による DNA ポリメラーゼ η のヌクレオチド転移反応の可視化. *日本結晶学会誌*, 55, 42-46. 査読有 DOI: 10.5940/jcrsj.55.42
- ⑧ Koga, Y., Inazato, M., Nakamura, T.,

- Hashikawa, C., Chirifu, M., Michi, A., Yamashita, T., Toma, S., Kuniyasu, A., Ikemizu, S., Nakabeppu, Y., and Yamagata, Y. (2013) Crystallization and preliminary X-ray analysis of human MTH1 with a homogeneous N-terminus. **Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.** 69, 45-48. 査読有 DOI: 10.1107/S1744309112048002
- ⑨ Nakamura, T., Zhao, Y., Yamagata, Y., Hua, Y.-J., and Yang, W. (2012) Watching DNA polymerase η make a phosphodiester bond. **Nature** 487, 196-202. 査読有 DOI: 10.1038/nature11181
- ⑩ Takagi, Y., Setoyama, D., Ito, R., Kamiya, H., Yamagata, Y., and Sekiguchi, M. (2012) Human MTH3 (NUDT18) hydrolyzes the oxidized forms of guanosine and deoxyguanosine diphosphates: A comparison with MTH1 and MTH2. **J. Biol. Chem.** 287, 21541-24549. DOI: 10.1074/jbc.M112.363010 査読有
- ⑪ Shirouzono, T., Chirifu, M., Nakamura, C., Yamagata, Y., and Ikemizu, S. (2012) Preparation, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the glycosylated form of human interleukin-23. **Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.** 68, 432-435. 査読有
- ⑫ 有森貴夫、山縣ゆり子 (2011) 突然変異抑制酵素 NUDT5 の幅広い基質特異性発現機構、**福岡医学雑誌**、102, 303-312. <http://catalog.lib.kyushu-u.ac.jp/handle/2324/20446/p303.pdf> 査読有
- ⑬ Arimori, T., Tamaoki, H., Nakamura, T., Kamiya, H., Ikemizu, S., Takagi, Y., Ishibashi, T., Harashima, H., Sekiguchi, M., and Yamagata, Y. (2011) Diverse substrate recognition and hydrolysis mechanisms of human NUDT5. **Nucleic Acids Res.** 39, 8972-8983. 査読有 DOI: 10.1093/nar/gkr575
- ⑭ Minomo, A., Ishima, Y., Kragh-Hansen, U., Chuang, V.T., Uchida, M., Taguchi, K., Watanabe, H., Maruyama, T., Morioka, H., and Otagiri, M. (2011) Biological characteristics of two lysines on human serum albumin in the high-affinity binding of 4Z,15Z-bilirubin-IX α revealed by phage display. **FEBS J.** 278, 4100-4111. 査読有 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08316.x
- ⑮ Ito, R., Sekiguchi, M., Setoyama, D., Nakatsu, Y., Yamagata, Y., and Hayakawa, H. (2011). Cleavage of oxidized guanine nucleotide and ADP sugar by human NUDT5 protein. **J. Biochem.** 149, 731-738. 査読有 DOI: 10.1093/jb/mvr028
- ⑯ Nishi, K., Ono, T., Nakamura, T., Fukunaga, N., Izumi, M., Watanabe, H., Suenaga, A., Maruyama, T., Yamagata, Y., Curry, S., and Otagiri, M. (2011). Structural insights into differences in drug-binding selectivity between two forms of human α 1-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1*S forms. **J. Biol. Chem.** 286, 14427-14434. 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M110.208926
- ⑰ Mukai, Y., Nakamura, T., Yoshikawa, M., Yoshioka, Y., Tsunoda, S., Nakagawa, S., Yamagata, Y., and Tsutsumi, Y. (2010). Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. **Sci. Signal.** 3, ra83. 査読有 DOI: 10.1126/scisignal.2000954
- ⑱ Li, Q., Ujiie, H., *Shibaki, A., Wang, G., Moriuchi, R., Qiao, H.J., Morioka, H., Shinkuma, S., Natsuga, K., Long, H.A., Nishie, W., and *Shimizu, H. (2010). Human IgG1 monoclonal antibody against human collagen 17 noncollagenous 16A domain induces blisters via complement activation in experimental bullous pemphigoid model. **J. Immunol.** 185, 7746-7755. 査読有 DOI: 10.4049/jimmunol.1000667
- ⑲ Miyata, M., Sato, T., Kugimiya, M., Sho, M., Nakamura, T., Ikemizu, S., Chirifu, M., Mizuguchi, M., Nabeshima, Y., Suwa, Y., Morioka, H., Arimori, T., Suico, M. A., Shuto, T., Sako, Y., Momohara, M., Koga, T., Morino-Koga, S., Yamagata, Y., and Kai, H. (2010). The crystal structure of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate-transthyretin complex reveals a novel binding site distinct from the thyroxine binding site. **Biochemistry** 49, 6104-6114. 査読有 DOI: 10.1021/bi1004409

[学会発表] (計 15 件)

- ① 阿川大貴、辻美保子、諏訪喜昭、小橋川敬博、小城美春、池鯉鮒麻美、中村照也、菅野新一郎、安井明、山縣ゆり子、森岡弘志、クロマチンリモデリング関連因子 hCHRAC15/17 複合体と hACF1 との相互作用解析、第 31 回日本薬学会九州支部大会、2014.12.6-7、第一薬科大学 (福岡)
- ② 谷口岳史、辻美保子、森田和美、阿大貴、諏訪喜昭、小橋川敬博、池鯉鮒麻美、中村照也、逢坂文那、齊藤貴士、前仲勝実、菅野新一郎、安井明、山縣ゆり子、森岡弘志、クロマチンリモデリング複合体形成の構造生物学的研究、第 37 回日本分子生物学会年会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜 (横浜)
- ③ 山縣ゆり子、X 線結晶構造解析による酵素反応機構の解明 (招待講演) 第 42 回構造活性相関シンポジウム、2014.11.13-14、くまもと森都心プラザ (熊本)
- ④ T. Nakamura, M. Inazato, K. Hirata, K. Yoshikawa, M. Chirifu, S. Ikemizu, Y. Yamagata, Kinetic Crystallography on MutT and its homolog, XXIII Congress of the International Union of Crystallography, 2014.8.5-12, Montreal (Canada)
- ⑤ 山縣ゆり子、ヒト酸化プリンヌクレオチ

ド分解酵素の基質認識機構の解明（招待講演）、蛋白質研究所セミナー「量子ビームの連携利用に向けた新しいタンパク質結晶学」、2013.12.17-18、大阪大学（吹田）

- ⑥ 辻美保子, 谷口岳史, 諏訪喜昭, 小橋川敬博, 池鯉鮒麻美, 中村照也, 菅野新一郎, 安井明, 山縣ゆり子, 森岡弘志, クロマチンリモデリング関連因子hACF1とhSNF2Hの相互作用解析、第36回日本分子生物学会年会、2013.12.3-12.6、神戸ポートアイランド（神戸）
- ⑦ 山縣ゆり子, 中性子と放射光が連携するタンパク質結晶学への期待（招待講演）、第13回日本蛋白質科学会年会、2013.6.12-14、とりぎんホール（鳥取）
- ⑧ 森岡弘志, 辻美保子, 諏訪喜昭, 中村照也, 池鯉鮒麻美, 古城美春, 阿川大貴, 上赤伸吾, 谷口岳史, 菅野新一郎, 安井明, 山縣ゆり子, クロマチンリモデリング複合体 HuCHRAC における生体分子間相互作用の解析（招待講演）、平成24年度文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム、2013.1.31、学術総合センター（東京）
- ⑨ 山縣ゆり子, DNA 修復関連酵素の構造生物学的研究における中性子回折計への期待（招待講演）、シンポジウム「構造生物学研究における中性子と放射光の連携」、2013.1.22、東京国際ファーマム（東京）
- ⑩ 山縣ゆり子, DNA 修復酵素の反応過程を原子レベルで追跡する（招待講演）、平成24年度熊本大学関西オフィスセミナー、2013.1.12、大阪駅前第3ビル（大阪）
- ⑪ Nakamura, T., and Yamagata, Y., Visualization of oxidized nucleotide processing by *E. coli* MutT (Invited). Nucleic Acids Conference 2012, 2012.11.14-18, Riviera Maya (Mexico)
- ⑫ 山縣ゆり子, DNA 修復関連酵素の反応過程解明における中性子構造解析の展望（招待講演）、平成24年度第1回生物構造学研究会、2012.10.2、研究社英語センター（東京）
- ⑬ Yamagata, Y., and Nakamura, T., Structural studies on the substrate specificity and hydrolysis mechanism of oxidized nucleotide processing (Invited). 4th US-JAPAN DNA REPAIR MEETING, 2012.4.11-14, Virginia (USA)
- ⑭ 山縣ゆり子, 突然変異原となる酸化ヌクレオチド分解酵素における新たな水の役割（招待講演）、2011年度第1回バイオ単分子・水和ナノ構造合同研究会、2011.9.22-23、ホテル箱根パウエル（箱根）
- ⑮ 森岡弘志, ヒト FEN1 のヌクレアーゼ活性促進機構の解析、九州大学農学部特別講

演会、2010.10.8、九州大学（福岡）

〔図書〕（計3件）

- ① Kobashigawa, Y., Fukuda, N., Nakahara, Y., and Morioka, H. (2015) Surface plasmon resonance. **Advanced Methods in Structural Biology** (Senda, T., and Maenaka, K. eds) Springer Japan, *in press*
- ② Nakamura, T., Mukai, Y., Tsutsumi, Y., and Yamagata, Y. (2015) Chapter 9: Structural basis for signal initiation by TNF and TNFR. **Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling** (Inoue, J., and Takekawa, M. eds) Springer Japan, *in press*
- ③ 山縣ゆり子 (2014) ゲノム安定性維持に働くタンパク質～DNA修復・複製酵素. **日本の結晶学 II～輝かしき発展～** 日本結晶学会編, 313-314.

〔その他〕

アウトリーチ活動

- ① 平成23年度熊本大学女子中高校生の理系進路選択支援事業、平成23年10月23日（熊本大学医学部）山縣ゆり子「立体構造の美しいタンパク質に魅せられて」
- ② 平成24年度佐賀県立唐津東高等学校大学出前講座、平成24年9月21日（佐賀県立唐津東高等学校）山縣ゆり子「遺伝子の傷を治す仕組み」
- ③ 平成25年度ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI（研究成果の社会還元・普及事業）、平成25年11月23日（熊本大学薬学部）、山縣ゆり子「タンパク質の結晶を作り、その3次元構造をコンピューターグラフィックスで調べよう！」
- ④ 平成25年度宮崎県立宮崎南高等学校テーマ別ミニ講演会、平成25年12月25日（宮崎県立宮崎南高等学校）、森岡弘志「分子標的治療薬」
- ⑤ 平成26年度熊本県立玉名高等学校大学出前講座、平成26年10月23日（熊本県立玉名高等学校）、森岡弘志「分子標的治療薬としての抗体」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山縣 ゆり子 (Yamagata Yuriko)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：40183678

(2) 研究分担者

森岡 弘志 (Morioka Hiroshi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20230097