

平成30年6月19日現在

機関番号：82502

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25116003

研究課題名(和文)シミュレーション計算による動的クロマチンのダイナミクス解析

研究課題名(英文)Chromatin dynamics analysis using computer simulation

研究代表者

河野 秀俊(Kono, Hidetoshi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・関西光科学研究所 量子生命科学研究部・グループリーダー(定常)

研究者番号：40291918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 40,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヌクレオソームにおける翻訳後修飾やヒストンバリエーションの影響を全原子分子動力学シミュレーションで解析し、ヒストンH3のテール領域がアセチル化やメチル化されると、DNAが解離しやすくなることを見出した。また、新規のヌクレオソーム構造(ヒストン6量体のヌクレオソームとヒストン8量体のヌクレオソームが重なった構造)の構造を決定した。さらに、クロマチンの構造多様性は、H4テールの相互作用の仕方によって生み出されることを示した。

研究成果の概要(英文)：We studied impact of post-translational modifications of histones and histone variants on the structure and dynamics of mono-nucleosomes and poly-nucleosomes by integrating computer simulation and experimental data. We found that acetylation and methylation of H3 tails induce DNA dissociation from the histone core. We determined a novel nucleosome structure which is overlapping the typical 8-mer nucleosome and a 6-mer nucleosome which is missing one H2A-H2B heterodimer from the typical nucleosome. In addition, we found H4 tails play an important role in producing various packing forms of two nucleosomes, indicating that the way of the tail interactions yields a variety of chromatin conformations.

研究分野：生物物理、計算科学

キーワード：ヌクレオソーム 分子動力学計算 クロマチン ヒストン

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム DNA はヌクレオソームを基本構造とし、それが凝集したクロマチンとして直径数マイクロメートルの細胞核の中にコンパクトに収納されている。ヌクレオソームは、転写、複製、組換え時には、ゲノム中でその配置をダイナミックに変える。また、その際、構造のコアであるヒストンタンパク質が入れ替わることも知られている。このように、ヌクレオソームは安定かつコンパクトな DNA の収納を担っているにも関わらず、その構造をダイナミックに変えることで生命機能の発現制御を行っている。近年、マイクロアレイ、次世代シーケンサーによる ChIPseq (クロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーを組み合わせた解析) など実験技術の著しい進歩により、ゲノム上で 1bp という高分解能で網羅的にヌクレオソームの位置を同定することが可能となってきた。しかし、生命機能の発現過程において常にヌクレオソーム構造を保持しているわけではない。また、ヌクレオソームが凝集したクロマチンは、動的にその構造を変えて機能発現を行っているが、その仕組みは依然として謎のままである。一方、光ピンセットなど 1 分子実験技術の格段の進歩により、ヌクレオソームの力学特性(引っ張り、ねじれなど)を調べる実験も盛んに行われており、数十ピコニュートンの力でヌクレオソーム DNA はヒストン 8 量体からほどけることがわかってきた。

分子動力学法にもとづくシミュレーション計算は、アルゴリズムの開発、半導体技術の飛躍的な技術革新によって様々な研究に対して有用な手段として用いられるようになってきた。分子動力学計算は、原子間に働く力を計算し、ニュートン方程式に沿って原子の動きを時間軸に沿って追跡する方法である。100 残基程度の小さなタンパク質に限れば、海外では専用計算ボードを用いた数ミリ秒間の原子レベルの分子動力学計算が実現されている。しかし、ヌクレオソームのような大きな分子は取り扱うことができず、依然としてサブマイクロ秒間のシミュレーションしか報告されていない。我々は、世界に先駆けて導入した空間分割による高効率な並列計算法により、のべ時間にしてマイクロ秒間のヌクレオソームのシミュレーション計算を京コンピュータで実施している。近年は、計算コストを小さくして長時間(ミリ秒)の分子運動を追跡するために、アミノ酸や核酸をひとつの原子集団として取り扱った計算がヌクレオソームに適用され、クロマチン

凝集状態の解析が行われるようになった。しかし、粗視化してしまうと、ヒストンとヒストンバリエーションやその化学修飾との差異を見るのが非常に困難になる。そのため、全原子での分子動力学計算が必要である。

## 2. 研究の目的

真核生物のゲノム DNA は核内にクロマチン構造としてコンパクトに収納されている。しかし、転写、複製、組換えでは、基本構造であるヌクレオソームから DNA が解けたり、ヌクレオソーム自体が一旦破壊され再構築されたりとその構造をダイナミックに変える。生物は、この過程を通して、制御因子など DNA 結合タンパク質のアクセスを制御し、DNA の持つ情報を発現している。本研究では、分子動力学シミュレーションを用い、原子レベルやアミノ酸や塩基をひとかたまりと見た粗視化レベルで、ヌクレオソームやポリヌクレオソームの構造安定性や構造揺らぎなどがクロマチンに及ぼす影響を調べる。これにより、動的なクロマチンと機能発現メカニズムの関係を明らかにする。さらに、計画班の他の実験研究者と共同し、核内でのクロマチン動態とヒストンバリエーションや化学修飾の関係を構造安定性や揺らぎなど計算科学的なアプローチにより定量的に明らかにする。

## 3. 研究の方法

独自に開発した超分子用分子動力学計算ソフト SCUBA と原子力機構の大型計算機及び京コンピュータをおもに利用して、原子レベルでのモノヌクレオソームシミュレーションとアミノ酸や核酸レベルで粗視化したレベルでのポリヌクレオソームのモデリングを実行する。SCUBA は、京コンピュータ利用戦略課題プログラムにも選ばれたソフトウェアであり、世界に先駆けて導入した空間分割による並列計算法により非常に高い並列化率を持ち、特に大規模系のシミュレーション計算に威力を発揮する。本研究では、(1) 領域代表の胡桃坂らがこれまでに決定した、もしくは、今後決定するさまざまなヒストンバリエーションや化学修飾体から構成されるヌクレオソーム及びデザインするポリヌクレオソームの立体構造にもとづいて分子動力学計算を行い、詳細なダイナミクス解析を行う。(2) 高次クロマチンのシミュレーション計算に向け、胡桃坂らが取得するヌクレオソーム 2 量体及び 3 量体の X 線小角散乱データや電子顕微鏡像を利用したモデリングを行う。(3) シミュレーション計算で特徴的な物

性を示すヌクレオソーム変異体を設計し、その物性を調べる。以上の研究を通して、クロマチンの動的な構造を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) モノヌクレオソームのダイナミクス解析

種々のヒストンバリエーション間の構造揺らぎや構造変化の差異を調べるために、カノニカルヌクレオソームに加えて、領域代表者の胡桃坂らによって決定された組成の異なるヌクレオソーム（内在性のヒストンバリエーション、ヒストンH3.3, H2AZを含む）構造にもとづき、100ナノ秒から300ナノ秒の分子動力学計算をおこなった。計算は、本予算で導入したPCクラスター及び京コンピュータを使って実行した。

バリエーションとの違いを調べるため、まず、カノニカルヌクレオソームについて解析を行った。カノニカルヌクレオソームは、4種類のヒストンH3, H4, H2A, H2Bがそれぞれ2つずつ入った8量体に約150塩基対のDNAが巻き付いた構造体である。結晶構造で構造が決定できるのは、コア領域のみで、ヒストンのN末端及びC末端領域（テールと呼ばれる）は特定の安定な構造をとらない天然変性領域である。そのため結晶構造解析では構造決定ができない。しかし、その領域は多くの翻訳後修飾を受けることから、その領域の振る舞いが重要視されている。我々の計算からは、H2AテールがヌクレオソームのリンカーDNAの開閉に重要な役割を果たしていることが分かった。テールを切断すると、リンカーDNAは開くことが観察されたことなどから、H2AのC末テールがリンカーDNAが閉じた状態を安定化していることが示唆された。

新学術領域内で見つかった変異ヌクレオソームやヒストンバリエーションの全原子分子動力学シミュレーションを行った。そのなかで、ヒストンバリエーション（H2A.Z）を持つヌクレオソームでは、ひとつのアミノ酸変異によってヌクレオソームに巻き付いたDNAが解離しやすくなることを見出した。

H3テールは、翻訳後修飾を受ける部位を複数持っており、分子生物学的実験に翻訳後修飾の影響が最もよく調べられている。しかし、その構造が翻訳後修飾によってどのように変わるのかはよく分かっていなかった。そこで、独自に開発した拡張アンサンブル法を取り込んだ全原子分子動力学計算を行い、H3テールの構造アンサンブルの解析を行った。結果、修飾なしと比べて、アセチル化は場所に関わらずヘリックス形成を誘導したが、メ

チル化ではそのような誘導は見られなかった。また、アセチル化、メチル化ともにテールの空間存在領域が小さくなることが分かった。つまり、テールはコンパクトな構造を持ち、ある領域に留まることが多くなる傾向が見られた。さらに、メチル化では、テール全体の溶媒露出面積が大きくなることが分かった。このことは、メチル化をターゲットにして結合するタンパク質との結合を促進する効果があると考えられる。また、H3テールのアセチル化及びメチル化は、リンカーDNAを開く傾向にあること、複数のアセチル化はその効果を促進することが分かった。但し、例外的にそのような効果が見られない部位もあることが分かった。

##### (2) 高次クロマチンダイナミクスシミュレーションに向けた原子構造モデルの構築

真核生物のゲノムは、ヌクレオソームが連結したクロマチン構造をもつ。ヌクレオソーム同士のパッキングや連結したポリヌクレオソームの構造を理解することは、クロマチンの構造やダイナミクスを理解する上で不可欠である。

そこで、分子動力学計算により、2つのヌクレオソームのパッキング状態での構造と解離エネルギーを明らかにした。パッキング状態は、片方のヌクレオソームのH4テールが、もう片方のヌクレオソームとの相互作用の仕方に依存していること、また異なるパッキング状態のエネルギーはほぼ等しい、ことがわかった。つまり、H4テールの相互作用の仕方によって多様なパッキング状態が存在しうることを示した。また、H4テールを取ると自発的に解離が進んだ。このことは、H4テールがパッキング状態を安定化するために不可欠であることを示す。

次に、ヌクレオソーム3量体（トリヌクレオソーム）の構造解析を行った。電子顕微鏡解析とコンピュータによる分子モデリングにより、トリヌクレオソームがどのような構造を取り得るのか、また、ヒストンバリエーションを含むトリヌクレオソームは構造が変わるのかを調べた。分子モデリングでは、結晶構造解析によって決定された高分解能モノヌクレオソーム構造にリンカーDNAをつなぎ、3量体のオリゴヌクレオソームの原子モデルを構築した。モノヌクレオソームの分子動力学計算結果と弾性ネットワークモデル解析結果にもとづき、合理的に、つまり、構造エネルギー的観点からみて無理のない方向にDNAを変形させた。このようにして、

取りうる多数の構造をあらかじめ用意し、この中から胡桃坂らが取得した3量体の電子顕微鏡像データに最もよく適合する構造を探し出すという手法で、トリヌクレオソームの原子モデルを構築した。カノニカルヌクレオソームのみで構成されるトリヌクレオソームと、CENPA (H3 ヒストンのバリエーション) を真ん中に配置したものの2種類に対して解析を行った。CENPA を真ん中にもつトリヌクレオソームでは、ヌクレオソームに巻き付いた DNA の両端がカノニカルに比べてより開いた構造が多いのに対し、カノニカルでは互いによく似た構造を持ち、構造の多様性が小さかった。これらの結果は、高次クロマチンの構造がモノヌクレオソームの性質の違いを反映させたものになっているということを示唆している。

また、他の計画研究者らとともに新規ヌクレオソーム、オーバーラッピングジヌクレオソーム (OLDN) の構造決定に成功した。ヌクレオソームはカノニカルヒストン8量体と約150bpのDNAから形成されるが、OLDNではヌクレオソーム同士の会合面からH2A-H2Bが欠落し、約250塩基対のDNAが巻き付いていた。この構造体は、レモデラーやRNAポリメラーゼによってヌクレオソームの破壊ないし位置の変化時に形成される中間体だと推定される。

### (3) シミュレーション計算で特徴的な物性を示すヌクレオソーム解析

出芽酵母ゲノムの転写開始直後に存在するヌクレオソームのDNA配列には、AA/TT配列が片側(先に転写される側)に多く存在する。我々は、シミュレーション計算により、DNA配列がAA/TTの場合、その領域は硬いということを見出した。これらを合わせて考えると、AA/TTを多く含むDNA配列はヌクレオソームを形成しにくい、つまり、AA/TTの偏りによって転写を一方向に進めるように遺伝子がコードされている、という仮説を立てるに至った。そこで、他の計画研究班と検証実験を行った。検証実験では、ヌクレオソームを形成するDNAの片側にAA/TTを多く含むヌクレオソームと均等に含むヌクレオソームを再構成し、DNA分解酵素への感受性を調べた。結果、仮説通り、AA/TTを多く含む側の方が優位に高い感受性を示すことが分かった。さらに、そのようなヌクレオソームを持つ傾向は、発現が活発な遺伝子ほど強いことが分かった。以上から、出芽酵母の場合、ゲノム配列自体に遺伝子の発現の方向

がコードされているという我々の仮説が支持された。

### 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 15 件)

- ① Luo D, Kato D, Nogami J, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Kono H (2018) MNase, as a probe to study the AA/TT-dependent site exposure in the +1 nucleosomes of yeast. *Nucleic Acids Res.*, 査読有, in press, DOI: 10.1093/nar/gky502
- ② Kono H, Sakuraba S, & Ishida H (2018) Free energy profiles for unwrapping the outer superhelical turn of nucleosomal DNA. *PLoS Comput Biol*, 査読有, 14(3):e1006024. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006024
- ③ Ishida H & Kono H (2017) H4 tails potentially produce the diversity in the orientation of two nucleosomes. *Biophysical J.*, 査読有, 113:978-990. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.07.015
- ④ Tencer, A. H., Cox, K. L., Di, L., Bridgers, J. B., Lyu, J., Wang, X., Sims, J. K., Tyler, Allen, H. F., Zhang, Y., Gatchalian, J., Li, W., Ikebe, J., Wade, P. A., Hayes, J. J., Strahl, B. D., Kono, H., Poirier, M. G., Musselman, C. A. & Kutateladze, T. G. (2017). *Cell Reports*, 査読有, **21**, 455-466. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.09.054
- ⑤ Gatchalian, J., Wang, X., Ikebe, J., Luo, D., Gibson, M., Zhang, Y., Cox, K., Musselman, C. A., Poirier, M. G., Kono, H., Haynes, J. J. & Kutateladze, T. G. (2017). *Nat. Comm.*, 査読有, **8**, 1489. DOI: 10.1038/s41467-017-01598-x
- ⑥ Andrabi, M., Hutchins, A. P., Miranda-Saavedra, D., Kono, H., Nussinov, R., Mizuguchi, K. & Ahmad, S. (2017). *Scientific Reports*, 査読有, **7**, 4071. DOI: 10.1038/s41598-017-03199-6
- ⑦ Kato, D., Osakabe, A., Mizukami, Y., Adachi, F., Arimura, Y., Saikusa, K., Akashi, S., Nishimura, Y., Park, S.-Y., Matsumoto, A., Kono, H., Inoue, R., Sugiyama, M. & Kurumizaka, H. (2017). *Science*, 査読有, **56**, 205-208. DOI: 10.1126/science.aak9867

⑧ 池部仁善, 櫻庭俊, 河野秀俊 (2017) スクレオソーム中におけるヒストンテールの特性とアセチル化の影響 (H3 Histone Tail Structure within the Nucleosome and the Impact of the Acetylation). *日本生物物理学会誌*, 査読有, 57(2):095-097.

⑨ Sakuraba S & Kono H (2016) Spotting the difference in molecular dynamics simulations of biomolecules. *J. Chem. Phys.*, 査読有, 145:074116. DOI: 10.1063/1.4961227

⑩ Li Z & Kono H (2016) Distinct Roles of Histone H3 and H2A Tails in Nucleosome Stability. *Scientific Reports*, 査読有, 6:31437. DOI: 10.1038/srep31437

⑪ Ikebe J, Sakuraba S, & Kono H (2016) H3 Histone Tail Conformation within the Nucleosome and the Impact of K14 Acetylation Studied Using Enhanced Sampling Simulation. *PLoS Comput Biol*, 査読有, 12(3):e1004788. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004788

⑫ Kono, H., Shirayama, K., Arimura, Y., Tachiwana, H. & Kurumizaka, H. (2015) Two Arginine Residues Suppress the Flexibility of Nucleosomal DNA in the Canonical Nucleosome Core. *PLoS ONE*, 査読有, 10, e0120635 DOI: 10.1371/journal.pone.0120635

⑬ Ikebe, J., Sakuraba, S. & Kono, H. (2014). Adaptive lambda square dynamics simulation: an efficient conformational sampling method for biomolecules. *J. Comp. Chem.*, 査読有, 35, 39-50. DOI: 10.1002/jcc.23462

[学会発表] (計 31 件)

① Kono H (2018) Mono- and Di- nucleosome Dynamics Studied by Molecular Modeling and Simulation. *The 8th Taiwan-Japan Joint Meeting on Neutron and X-ray Scattering* (招待講演) (Taiwan).

② 河野秀俊 (2017) ヒストン翻訳後修飾はスクレオソームの安定性を変える. 第40回日本分子生物学会年会ワークショップ (招待講演), 神戸.

③ 河野秀俊 (2017) ヒストン H3 翻訳後修飾のスクレオソーム動態に与える影響. 第17

回日本蛋白質科学会年会 (招待講演), 仙台.

④ Kono H (2017) Role of tails in intra-nucleosome and inter-nucleosomes. *1st Munche-Japan mini-Symposium, Chromatin Structure and Function* (Helmholtz Zentrum, Munchen, Germany).

⑤ Kono H (2017) Impact of Post-Translational Modifications on Histone H3 tail on Nucleosome Structure and Dynamics. *EMBO Conference: The Nucleosome: From Atoms to Genomes* (Heiderburg, Germany).

⑥ Ishida H & Kono H (2017) Free energy analysis of the Nucleosome-Nucleosome interaction analyzed by Biomolecular Simulations. *1st QST International Symposium "Quantum Life Science"* (Chiba, Japan).

⑦ Luo D, Kato D, Nogami J, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Kono H (2017) MNase, as a probe to study the sequence-dependent site exposure in the +1 nucleosomes of yeast. *1st QST International Symposium "Quantum Life Science"*, (Chiba, Japan)

⑧ Li Z, Ikebe J, Sakuraba S, & Kono H (2017) Distinct Roles of H3 and H2A tails in linker DNA dynamics. *Biophysical Society 61th Annual Meeting* (New Orleans, Louisiana, USA).

⑨ Ishida H & Kono H (2017) The free-energy landscape of the di-nucleosome: a critical role of the h4 tails for the nucleosome-nucleosome conformation. *Biophysical Society 61th Annual Meeting* (New Orleans, Louisiana, USA).

⑩ 鈴木翠, 立名和博昭, 滝沢由政, 松本淳, 河野秀俊, Wolf, M., 胡桃坂仁志 (2016). セントロメア特異的なクロマチン構造の解析, 第39回日本分子生物学会年会, 横浜.

⑪ 加藤大貴, 越阪部晃永, 足立風水也, 水上優夏, 有村泰宏, 七種和美, 明石知子, 西村善文, 朴三用, 松本淳, 河野秀俊, 井上倫太郎, 杉山正明, 胡桃坂仁志 (2016). 特殊なスクレオソームの立体構造解析, 第39回日本分子生物学会年会, 横浜.

⑫ Kono, H. (2016). Role of H3 and H2A Tails

on Nucleosome Stability, Colorado Chromatin Meeting 2016 (招待講演), (Colorado, USA).

⑬ 河野秀俊 (2016). 転写因子のアクティビティは結合サイト及びその周辺領域のDNA特性の関係できまる, 第16回日本蛋白質科学会年会 (招待講演),福岡.

⑭ Li, Z. & Kono, H. (2016). Distinct Roles of Histone H3 and H2A Tails in Nucleosome Stability, Chromatin Structure & Function, Gordon Conference (Les Diablerets, Switzerland)

⑮ Kono, H., Ikebe J, Sakuraba S, & Ishida H (2016) Impact of histone variant and post-translational modification on nucleosome. *Biophysical Society 60th Annual Meeting* (Los Angeles,USA).

⑯ Ikebe J, Li Z, Sakuraba S, Ishida H, & Kono, H. (2015) Role of histone variant and histone tails within the nucleosome and the impact of H3 tail acetylation studied using enhanced sampling simulation. *4th International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics* (Hiroshima, Japan).

⑰ Kono, H., Ikebe J, Sakuraba S, & Ishida H (2015) Dynamics of nucleosomes and impact of acetylation. *International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function* (Awaji, Japan)

⑱ Kono, H., Sakuraba, S. & Ishida, H., (2015) Free Energy Profile for Nucleosomal DNA Unwrapping, *Biophysical Society 59th Annual Meeting*, (Baltimore, USA).

⑲ Ikebe, J., Sakuraba, S. & Kono, H. (2015) Conformational sampling of unmodified and acetylated H3 histone tails on a nucleosome by all-atom model molecular dynamics simulations, *Biophysical Society 59th Annual Meeting*, (Baltimore, USA).

⑳ Kono, H. Differences (2015) Dynamics among Nucleosomes with Distinct Histone Compositions RIKEN Epigenetics in Kobe (招待講演), 理研再生科学総合研究センター, 神戸.

[その他]

① 河野秀俊 (2018) スーパーコンピュータでみる分子の形と動き. 新学術領域クロマチン動構造、一般公開シンポジウム, 東京.

② Kono, H. (2015) Impact on nucleosome dynamics via histone variants and post-translational modifications. *スパコン「京」がひらく科学と社会; Supercomputational Life Science 2015 (SCLS 2015); HPCI戦略プログラム分野1 成果報告会*, 東京.

③ 河野秀俊 (2013) スーパーコンピュータで探る分子の動き. 一般公開シンポジウム「DNAをあやつる生物のしくみ」, 千里.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 秀俊 (KONO, Hidetoshi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・関西光科学研究所 量子生命科学研究所・グループリーダー (定常)

研究者番号: 40291918

### (2) 研究協力者

リ ツェンハイ (LI, Zhenhai)