

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06692

研究課題名(和文) HP1BP3が形成するクロマチン高次基盤構造の立体構造解明

研究課題名(英文) Structural study of the higher order chromatin structure formed by HP1BP3

研究代表者

小山 昌子 (Koyama, Masako)

早稲田大学・理工学術院・次席研究員(研究院助教)

研究者番号：40755097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトの新規リンカーヒストンタンパク質HP1BP3が形成するクロマチン高次基盤構造の解明を目指した。しかし、HP1BP3タンパク質を構造解析に必要な純度で大量に精製することが困難であった。そこで、分裂酵母におけるHP1BP3の機能性ホモログを選定し、リコンビナントタンパク質として高純度かつ大量に精製した。さらに、分裂酵母の四種類のヒストンを高純度に精製し、分裂酵母ヌクレオソームを試験管内で再構成する系を確立した。これは分裂酵母ヌクレオソームを試験管内再構成した初めての報告例である。さらに、精製したHP1BP3ホモログタンパク質がヌクレオソームに結合することを確認した。

研究成果の概要(英文)：We have aimed to determine the structure of the fundamental unit of higher order chromatin formed by human HP1BP3, the recently identified linker histone in human. However, it was difficult to purify the HP1BP3 protein at high yield necessary for the structural studies. Therefore, we selected the functional homolog of HP1BP3 in *S. pombe*. The protein was expressed as a soluble recombinant protein in *E. coli*, and purified in high quality. Furthermore, we established the method to reconstitute *S. pombe* nucleosomes in vitro. We purified the four canonical core histones in *S. pombe* (H2A, H2B, H3, and H4, which share 79%, 68%, 92%, and 91% amino acid sequence homology with their human counterparts). Using *S. pombe* histones and a 146-base-pair DNA, we successfully reconstituted nucleosomes in vitro. We confirmed that the HP1BP3 homolog in *S. pombe* bind the nucleosome.

研究分野：クロマチンの構造生物学

キーワード：クロマチン ヌクレオソーム 分裂酵母 リンカーヒストン

#### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞において、ゲノム DNA はクロマチン構造を形成し、コンパクトに折り畳まれて核内に収納されている。クロマチン構造の基本単位は、ヌクレオソームと呼ばれる構造体である。ヌクレオソームは、四種類のヒストンタンパク質 (H2A, H2B, H3 および H4) 二分子ずつからなるヒストン八量体の周囲に約 150 塩基長のゲノム DNA が約 1.7 回巻きついた円盤状の構造体である。ゲノム DNA 上にはヌクレオソームが数珠上に連なって形成されており、直径 10 nm のヌクレオソーム線維となっている。ヌクレオソーム線維には、さらにリンカーヒストンをはじめとするさまざまなクロマチン高次構造形成因子が結合することにより、高次のクロマチン構造が形成されている。ヌクレオソームとクロマチン高次構造形成因子からなるクロマチン高次基盤構造は、ゲノム DNA を安定に核内に収納する機能をもつだけでなく、転写因子やクロマチンリモデリング因子、ヒストン修飾酵素や DNA 修飾酵素などさまざまなクロマチン結合因子の作用によってダイナミックに構造変化し、ゲノム DNA の機能発現を制御する上で重要である。

ヒトの HP1BP3 (HP1-binding protein 3) は、近年、HP1 に結合する因子として同定された、H1 遺伝子ファミリーに属する新規のリンカーヒストンタンパク質である。先行研究から、HP1BP3 はクロマチン高次構造の構築に寄与することが明らかになっている。しかし、HP1BP3 がクロマチンに結合するメカニズム、および HP1BP3 の結合したクロマチンの高次基盤構造については明らかになっていない。

#### 2. 研究の目的

本研究では、リンカーヒストンタンパク質 HP1BP3 に着目し、HP1BP3 が形成するクロマチンの高次基盤構造を原子レベルで解明することを目的とした。そのために、HP1BP3-ヌクレオソーム複合体を試験管内で再構成し、立体構造解析と機能解析を行う。HP1BP3-ヌクレオソーム複合体の試験管内再構成と構造解析に成功すれば、エピジェネティックなゲノム DNA の機能発現制御機構の解明に欠かせない「高次の機能的なクロマチン構造」の一端が明らかになる。

#### 3. 研究の方法

リンカーヒストン HP1BP3 が形成するクロマチンの高次基盤構造を解明するために、まず HP1BP3 をリコンビナントタンパク質として大腸菌から高純度かつ大量に精製する。さらに、四種類のヒストン (H2A, H2B, H3 および H4) をリコンビナントタンパク質として変性条件下で精製し、塩透析法によりヒストン八量体の再構成を行う。大量調製した DNA とヒストン八量体を高塩濃度下で混合して、塩透析法によりヌクレオソームを試

験管内で再構成し、分取用電気泳動 (プレップセル) によって高純度に精製する。精製した HP1BP3 タンパク質をヌクレオソームに対して試験管内で滴定し、非変性ゲルを用いたゲルシフト法により結合を解析する。さまざまな溶液条件やヌクレオソームの種類について検討を行い、安定な複合体を形成する条件を見いだす。精製した複合体サンプルを用いて X 線結晶構造解析、電子顕微鏡を用いたネガティブ染色法による構造解析、クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析などを行うとともに、DNA フットプリント法による結合解析や分析超遠心機を用いた沈降速度解析などの生化学的解析を行う。

#### 4. 研究成果

まず、HP1BP3 をリコンビナントタンパク質として高純度かつ大量に精製する系の確立を試みた。発現系としては大腸菌 (*E. coli*) を用いた。HP1BP3 を 6×His-タグを融合したタンパク質として大腸菌内で大量発現させ、ニックルアガロースレジンを用いてアフィニティー精製を行った。その結果、HP1BP3 タンパク質はわずかに発現し精製できたものの、発現量が非常に低く、構造解析に必要な量を高純度に精製することは困難であった。培養条件 (IPTG の添加量、培養温度、培地の種類、および培養時間) について検討を行い、宿主の大腸菌についてもさまざまな種類を試したものの、大きな改善は得られなかった。目的タンパク質の可溶性を上げることで知られる多数のコンストラクトを作製することで、HP1BP3 の生産を試みたが、著しい改善はみられなかった。今後は、昆虫細胞や培養細胞を用いたりコンビナントタンパク質発現系についても試みる必要がある。

ヒトの HP1BP3 をリコンビナントタンパク質として高純度かつ大量に精製することが困難であったため、HP1BP3 に相当すると考えられる他の生物種のクロマチン高次構造形成因子をターゲットに研究を行った。その際に、まず分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) に着目した。HP1BP3 のヘテロクロマチンタンパク質への結合能や、リンカーヒストンとしての性質を考慮して、分裂酵母における機能性ホモログを選定した。そして、HP1BP3 の分裂酵母における機能性ホモログ候補を、リコンビナントタンパク質として大量に精製することを試みた。その結果、目的タンパク質を GST-タグ融合タンパク質として大腸菌内で可溶性画分に大量発現させ、グルタチオンセファロースレジンを用いたアフィニティー精製とゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる精製を行って、純度の高いサンプルを大量に精製することができた。GST-タグは、精製の過程でプロテアーゼによって切断除去した。

分裂酵母における機能性ホモログ候補とヌクレオソームとの複合体の解析を行うた

めに、次に、分裂酵母のヌクレオソームの作製を試みた。分裂酵母は、ゲノム構成が単純な単細胞生物でありながらヒトをはじめとする高等真核生物と非常によく似たクロマチン構造をもち、その制御機構もよく保存されている。そのため、クロマチン研究におけるモデル生物として適しており、これまでに分裂酵母を用いた遺伝学的・細胞生物学的解析により多くの知見が得られている。しかしながら、分裂酵母に関して、クロマチンの基本構造単位であるヌクレオソームの試験管内再構成に成功した例はこれまでになく、*in vitro* におけるクロマチンの解析は立ち遅れていた。そこで、本研究では分裂酵母のヌクレオソームの試験管内再構成系の確立を行った。分裂酵母の H2A, H2B, H3 および H4 のアミノ酸配列の保存性は、ヒトの H2A, H2B, H3, H4 と比較して、それぞれ 79%, 68%, 92%, 91% である。まず、分裂酵母の四種類の主要型コアヒストンを、His-タグを融合したりコンピナントタンパク質として大腸菌内で大量発現させ、封入体を変性剤で可溶化した画分からニッケルアガロースレジンをを用いたアフィニティー精製と MonoS カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行って高純度かつ大量に精製した。His-タグは、精製の過程でプロテアーゼによって切断除去した。精製した分裂酵母の H2A と H2B、あるいは H3 と H4 を変性条件下で混合して、塩透析法により H2A-H2B 複合体と H3-H4 複合体を試験管内で再構成し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。精製した H2A-H2B 複合体と H3-H4 複合体、および 146 塩基対の DNA を高塩濃度下で混合し、塩透析法により分裂酵母ヌクレオソームを試験管内で再構成することに成功した。再構成したヌクレオソームを分取用電気泳動法（プレップセル）により精製した。得られたヌクレオソームサンプルを SDS-PAGE により展開した結果、得られたサンプルは H2A, H2B, H3, H4 をすべて等モル比で含んでおり、分裂酵母のヒストンを用いてヌクレオソームを試験管内再構成できることが分かった。これは、分裂酵母ヌクレオソームを試験管内で再構成できた初めての例である (Koyama et al., 2017, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* )。

精製した分裂酵母のヌクレオソームを用いて、マイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) による末端 DNA の消化実験を行い、分裂酵母ヌクレオソームを構成する DNA の末端の柔軟性を解析した。MNase は二本鎖 DNA を切断する酵素であるが、ヒストンに結合して安定にヌクレオソームを形成している DNA を切断する活性が著しく低い。したがって、ヌクレオソームを MNase で処理した後の DNA 断片の長さを非変性ゲル電気泳動で解析することにより、ヌクレオソームを形成する DNA の末端の柔軟性を評価することができる。ヒトのヌクレオソームをコ

ントロールとして分裂酵母ヌクレオソームの MNase 感受性試験を行った結果、分裂酵母ヌクレオソームはヒトのヌクレオソームと比較して末端の DNA が MNase による消化を受けやすく、末端 DNA がフレキシブルな性質を持つことが明らかになった。

さらに、分裂酵母ヌクレオソームの熱安定性試験を行った。熱安定性試験では、温度上昇に伴うヌクレオソームからのヒストン (H2A-H2B 複合体および H3-H4 複合体) の脱離をリアルタイムで検出することができる。ヒストンの脱離の検出には、SYPRO Orange (タンパク質の疎水性表面に非特異的に結合して蛍光を発する蛍光試薬) を用いた。その結果、分裂酵母ヌクレオソームでは、ヒトのヌクレオソームと比較してより低い温度で H2A-H2B 複合体がヌクレオソームから脱離することが分かった。このことから、分裂酵母の H2A-H2B 複合体は、ヌクレオソームから解離しやすい性質をもつことが明らかになった。本研究で見いだされた分裂酵母ヌクレオソームの性質は、分裂酵母の核内において、クロマチンの構造と機能が動的に制御される上で重要な性質であると考えられる。

最後に、精製した HP1BP3 の分裂酵母ホモログタンパク質とヌクレオソームを用いてゲルシフト法による結合解析を行った結果、HP1BP3 ホモログタンパク質はヌクレオソームに効率良く結合することが分かった。今後は、この複合体を精製して X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡による立体構造解析を行う予定である。

## 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)

Koyama, M., Nagakura, W., Tanaka, H., Kujirai, T., Chikashige, Y., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., and Kurumizaka, H., *In vitro* reconstitution and biochemical analyses of the Schizosaccharomyces pombe nucleosome., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 482, 2017, 896-901. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.130.

Koyama, M., Sasaki, T., Sasaki, N., and Matsuura, Y., Crystal structure of human WBSR16, an RCC1-like protein in mitochondria, *Protein Science*, 査読有, in press.

小山昌子、胡桃坂仁志、パイオニア転写因子によるクロマチン構造変換、生体の化学、査読無、第 68 巻、229-232, 2017.

[学会発表](計 5 件)

Koyama, M., *Biochemical and*

biophysical analyses of the S. pombe nucleosome, Japan-Swiss Symposium "Chromatin Structure and Dynamics", バーゼル (スイス), 口頭発表, 2017年1月20日.

小山昌子、水上優夏、胡桃坂仁志、Oct4が標的ヌクレオソームを特異的に認識する機構の解明、第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会、かずさアカデミアホール(千葉県木更津市)、ポスター発表、2017年1月11日~13日.

小山昌子、胡桃坂仁志、細胞初期化に重要なパイオニア転写因子による標的ヌクレオソーム認識機構の解明、第39回分子生物学学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、ポスター発表、2016年11月30日~12月2日.

Koyama, M., Shirai, N., and Matsuura, Y., Structural basis for the Xpo1p-mediated nuclear export., 第42回内藤コンファレンス「In the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences」, シャトラーゼガトーキングダム サッポロ(北海道札幌市), ポスター発表, 2016年10月4日~7日.

小山昌子、胡桃坂仁志、パイオニア転写因子 Oct4 による標的ヌクレオソーム認識機構の解明、新学術領域研究「動的クロマチン構造と機能」班会議ワークショップ、ルスツリゾート(北海道虻田郡)、ポスター発表、2016年7月7日~9日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.eb.waseda.ac.jp/kurumizaka/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小山 昌子 (KOYAMA, Masako)  
早稲田大学・理工学術院総合研究所・次席  
研究員(研究院助教)  
研究者番号：40755097

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )