

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18528

研究課題名(和文) アセチル化に伴うヌクレオソームの動的構造解析

研究課題名(英文) Analysis for structural change of nucleosome by acetylation

研究代表者

末松 和美(七種和美)(Suematsu, Kazumi)

広島大学・理学研究科・助教

研究者番号：60608769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アセチル化されたヌクレオソームの構造解析を行うために、2種類のDNAを用いてヌクレオソームを再構成し、それらのヒストンアセチル化前後の構造変化をネイティブ質量分析により解析した。また、そのアセチル化部位を種々のプロテオミクス解析を適用して同定した。さらに、ネイティブ質量分析で得られるヌクレオソームの構造をイオンモビリティ質量分析と計算化学を組み合わせて解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、アセチル化によるヌクレオソームの構造変化を質量分析による構造生物学的手法やプロテオーム解析手法を駆使して解析した。その中で、DNAの種類や長さの異なるヌクレオソームにおける解析の結果、生体内においてアセチル化の影響でヌクレオソーム構造が不安定化されることが示唆されたため、転写活性化の初期過程の分子機構の理解に貢献したと考えている。今後、構築した測定技術は他のエピジェネティクス因子やクロマチンリモデリング因子によるヌクレオソームの構造解析へと応用することによって、エピゲノム変化により起こるがんの分子機構解明にまで波及することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the regulation mechanism caused by the structural change of nucleosome by acetylation, two nucleosomes were reconstituted in vitro, acetylated with histone acetyltransferase, and characterized using native mass spectrometry. To identify the acetylated sites of acetylated nucleosome, we performed various proteomics analysis for acetylated nucleosomes. Furthermore, we investigated gas-phase structure of nucleosome using ion mobility mass spectrometry and molecular dynamics simulation.

研究分野：生物物理学

キーワード：質量分析 ヌクレオソーム 翻訳後修飾 アセチル化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を担う DNA はクロマチンと呼ばれる分子複合体によって核内に収納されている。遺伝情報が取り出される際、クロマチンから DNA がほどける必要があり、クロマチンの高次構造が変化する。このクロマチンの構造変化にはクロマチンの最小構造単位であるヌクレオソームのヒストン翻訳後修飾などのエピゲノム制御による構造変化が関係している。そのため、ヒストンバリエーションを含む様々なヌクレオソームの構造解析が X 線結晶解析[Tachiwana H. et al., Nature, 2011]などによって試みられてきた。しかしながら、ヌクレオソームの構造の安定性や局所的なゆらぎの変化がエピジェネティクスの分子制御機構に影響を与えられられるため、“静的な”構造だけでなく、“動的な”構造を明らかにする必要がある。

ヌクレオソームは 4 種類のコアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) 各 2 分子で構成されたヒストン 8 量体に DNA が結合した構造体である。各ヒストンの末端領域 (Tail 領域) は塩基性アミノ酸を多く含む特定の構造を持たない領域となっており、特に N-末端 Tail 領域に多くの翻訳後修飾が報告されている。その一つであるアセチル化は転写活性化に関与しており、初期過程において Tail 領域の正電荷が中和され、ヒストンと DNA の親和性が低下することによって DNA を露出すると考えられている。これまでの研究により、アセチル化に伴って NCP のパッキングが弱くなることは報告されている [Lee J.Y. et al., J. Biol. Chem., 2011] が、ヒストンと DNA の相互作用が弱くなる領域の特定など構造変化に関する詳細は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

今回対象とするヌクレオソームのアセチル化は主に Tail 領域に起こると考えられる。しかしながら、これまでの研究においてヌクレオソームのアセチル化することによって構造安定性が低下することが示唆された。このため、ヌクレオソームの不安定化が起こるとすれば、Tail 領域だけでなく DNA で巻かれたヌクレオソームのコア領域の構造およびゆらぎの変化が起こることが予想される。そこで、本研究では、再構成した未修飾のヌクレオソームをアセチル化し、経時的な重水素交換 (H/D 交換) による部位特異的な質量変化を質量分析で測定することによって、アセチル化に伴うヌクレオソームの構造変化やゆらぎの変化などの動的構造を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 質量分析を用いたアセチル化に伴うヌクレオソームの構造安定性の解析

##### 2 種類の DNA を用いたヌクレオソームのアセチル化

アセチル化に伴うヌクレオソームの構造変化を DNA の違いの観点から解析するために、2 種類の DNA を用いてヌクレオソームを再構成した。ここで使用した DNA はヒストン八量体と最も強い相互作用を持つ Widom 601 DNA、ヒトのセントロメアにある  $\alpha$ -satellite DNA の回文配列である。調製されたそれぞれのヌクレオソーム内のヒストンを p300 の活性化ドメインを用いてアセチル化した。

##### アセチル化されたヌクレオソームのネイティブ質量分析

試料の溶媒を測定溶媒である酢酸アンモニウム水溶液に透析により交換した。測定の際に、酢酸アンモニウム濃度を 50 mM、500 mM、1 M、2 M と変化させ、タンパク質試料濃度を 2  $\mu$ M とした。測定機器には、nanoESI イオン源を装着した質量分析装置 Synapt G2 HDMS を用いた。

##### アセチル化されたヌクレオソームの H/D 交換反応質量分析

氷上において試料に対して重水を加え、100 s、1000 s 反応させた。反応停止のため TFA を加えた後、マトリックスであるシナピン酸と混合し、プレートの上に乗せた。H/D 交換された試料は MALDI をイオン源として備えた質量分析装置 Axima CFR を用いて測定した。

#### (2) ヒストンアセチル化酵素によるヌクレオソームのアセチル化部位の解析

##### Tail 領域の 1 次構造解析手法の検討

タンパク質の 1 次構造解析手法のうち、ボトムアップ法とトップダウン法を用いて Tail 領域を解析した。この際、ヌクレオソームを構成する 4 種類のヒストンのうち、最も Tail 領域の特性を反映しているヒストン H2B を対象として解析した。ボトムアップ法では、H2B をトリプシンにより消化し、nanoLC を用いて分離後、質量分析装置 LTQ Orbitrap XL を用いて測定した。トップダウン法では、MALDI-ISD 法を採用し、H2B とマトリックスである 1,5-ジアミノナフタレン (1,5-DAN) をプレート上で混合し、質量分析装置 Autoflex を用いて測定した。

##### アセチル化されたヌクレオソームのアセチル化部位の解析

ヌクレオソームは 4 種類のヒストンと DNA で構成されているため、試料の高次構造を変性剤と TFA により壊して HPLC によって各ヒストンの成分に分離した。その後、得られた試料を濃縮し、で行ったトップダウン法による 1 次構造解析を行った。

#### (3) ネイティブ質量分析で得られるヌクレオソームの構造多様性の解析

##### 様々な長さの DNA を持つヌクレオソームのイオンモビリティ質量分析 (IM-MS) および衝突断面積の測定

上記の実験で用いたヌクレオソームは 147bp 程度の DNA の長さを持つ。これに対して、250bp、294bp、342bp の長さを持つヌクレオソームやダイヌクレオソームを用いて IM-MS 測定した。

この際、ネイティブ質量分析の場合と同様、試料の溶媒を測定溶媒である酢酸アンモニウム水溶液に透析により交換した。測定の際に、酢酸アンモニウム濃度を 50 mM、500 mM、とし、タンパク質試料濃度を 2 μM とした。測定機器には、nanoESI イオン源を装着した Travelling wave 型イオンモビリティ質量分析装置 Synapt G2 HDMS を用いた。得られたイオンモビリティを通過した時間からヌクレオソームの衝突断面積を算出した。

#### ヌクレオソームの構造計算

147bp の DNA からなるヌクレオソーム(カノニカルなヌクレオソーム)について分子動力学シミュレーション(MDシミュレーション)を行った。まず、ヌクレオソームの初期構造は PDB I.D.3MVD を元に実験に用いたタンパク質の配列と同じになるようにアミノ酸置換して作成した。溶液中の MD シミュレーションでは、50 mM、100 mM、150 mM、500 mM の NaCl 存在下で 10 ns 計算を行った。このうち、5.5 ns から 10ns までの 0.5 ns ごとの構造を初期構造として真空中で 2 種類の計算を行った。一つはエネルギー最小化のみを行う計算、もう一つは 5ns の真空中の MD シミュレーションである。それぞれの得られた構造から衝突断面積計算ソフトである Mobcal を用いて衝突断面積を計算した。

## 4. 研究成果

### (1)質量分析を用いたアセチル化に伴うヌクレオソームの構造安定性の解析

アセチル化に伴うヌクレオソームの構造変化を DNA の違いの観点から解析するために、2 種類の DNA を用いてヌクレオソーム(601DNA ヌクレオソーム、α-satellite DNA ヌクレオソーム)を再構成し、それぞれの NCP におけるヒストンアセチル化前後の構造変化をネイティブ質量分析により解析した。

NCP は DNA と蛋白質の複合体であるため、測定溶媒である酢酸アンモニウムの濃度を高くすることによって両者の相互作用は弱くなることが予想される。それぞれの NCP を酢酸アンモニウムの塩濃度を変化させて測定した結果、601DNA やアセチル化 601DNA ヌクレオソームではほとんど差が見られず構造安定性が高いことが示唆された。一方、α-satellite DNA ヌクレオソームの場合、アセチル化されたヌクレオソームのみ 1M 酢酸アンモニウムの条件で NCP から解離した DNA のピークが検出された。そのため、α-satellite DNA ヌクレオソームでは、アセチル化によって構造安定性が低くなることが示唆された。固くパッキングするようにデザインされた 601DNA ではアセチル化しても DNA の解離が見られず α-satellite DNA でのみ観測されたことは、アセチル化による構造安定性の変化と生体内におけるアセチル化の転写活性化機構との関連を示唆している可能性があると考えた。

また、アセチル化されたヌクレオソームの構造安定性の変化をヒストンレベルで解析するために、ヌクレオソームの H/D 交換質量分析を試みた。本研究では、MALDI 法を用いた H/D 交換質量分析を採用することで従来の ESI をイオン源とする方法よりも迅速な分析を目指した。その結果、H/D 交換されたヌクレオソーム内のヒストンを感度よく測定することが可能となった。今後は同一ロットの試料を用いて、経時的な測定やデータの再現性を検討する必要がある。

### (2)ヒストンアセチル化酵素によるヌクレオソームのアセチル化部位の解析

タンパク質の 1 次構造解析には、ボトムアップ法、ミドルダウン法、トップダウン法の 3 種類の手法がある。このうち、ミドルダウンの解析を行うことによって、Tail 領域にアセチル化されていることを予備実験において明らかにしたが、さらに詳細な解析を行う必要がある。そのため、残りの 2 種類の手法を検討した。ボトムアップ法は最もプロテオーム解析で用いられている手法であるが、H2B における解析では、消化酵素として用いたトリプシンによって Tail 領域が切断され、配列情報を得ることができなかった。一方、トップダウン法では、MALDI-ISD 法によって、N-末端から 8 番目程度から 33 残基に対応するシグナルを観測することができた (Figure 1)。このため、Tail 領域の解析にはトップダウン法が適していると考えられた。

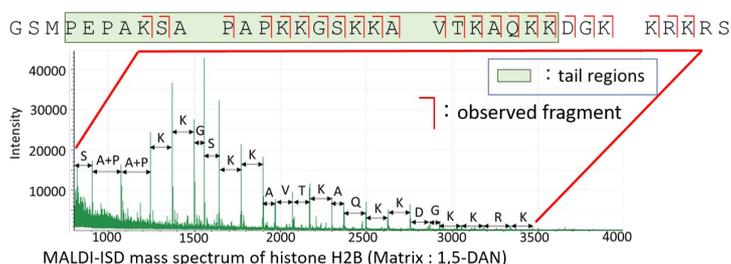


Figure 1. H2Bのトップダウン法による解析

ここで採用したトップダウン法による Tail 領域の解析をヌクレオソームに適応するには、4 種類のヒストンを分離する必要があるため、ヌクレオソームを個々の成分に分解した後、HPLC によって分離した。測定条件の最適化の際にアセチル化に伴う MALDI 測定における感度低下も示唆されたため、分解の際の溶液条件やタンパク質試料の濃度などを検討した。その結果、それぞれのヒストンのアセチル化の程度や量を同定することができた。

### (3) ネイティブ質量分析で得られるヌクレオソームの構造多様性の解析

ヌクレオソームの構造特性を明らかにするために、様々な長さの DNA を持つヌクレオソームを IM-MS によって測定した。また、IM-MS から得られた衝突断面積に対して妥当な構造を調べるため、MD シミュレーションを行った。

まず、カノニカルなヌクレオソームのネイティブ質量分析を行った。その結果、マスペクトルにおいて 3 つの電荷分布を示すことが明らかになった。また、IM-MS の結果から、これら 3 つの電荷分布を持つ conformer の衝突断面積はそれぞれ 8630、9510、10950 Å<sup>2</sup> であることがわかった (Figure 2)。また、長い DNA を持つヌクレオソームを測定した場合は、1 つの conformer のみ観測された。このため、長い DNA を持つヌクレオソームでは、ヌクレオソーム形成に関わらない余分な DNA と Tail 領域が相互作用することによって 1 つの conformer になると考えられた。よって、カノニカルなヌクレオソームで得られた 3 つの conformer はヒストン Tail 領域の多様性によって生じていると予想した。

次に、IM-MS で得られた衝突断面積に対応する構造を調べるために、MD シミュレーションを行った。カノニカルなヌクレオソームの真空中のシミュレーションとして、真空中における 5 ns の MD シミュレーションと脱溶

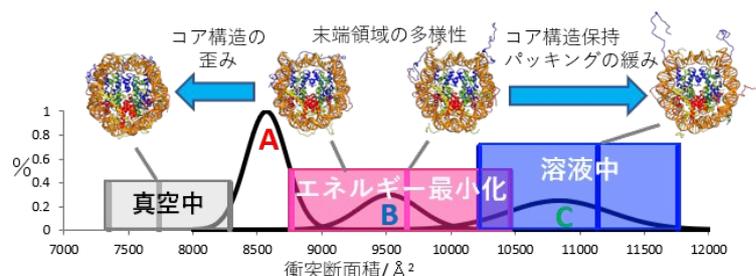


Figure 2. 実験と理論計算によるヌクレオソームの衝突断面積の分布と構造

媒過程を模倣した真空中のエネルギー最小化の 2 種類のシミュレーションを行った (Figure 2)。その結果、真空中の MD シミュレーションで得られた構造の衝突断面積は実験値よりも 1-2 割小さく、ヌクレオソームのコアの構造も潰れていることがわかった。一方、エネルギー最小化のシミュレーションでは、溶液中シミュレーションから抽出した初期構造から 8840 Å<sup>2</sup> から 10420 Å<sup>2</sup> の衝突断面積に対応する構造が生成された。これらの結果から考え合わせると、IM-MS によって得られたヌクレオソームの構造多様性は Tail 領域の構造多様性と DNA と中心にあるヒストン八量体とのパッキングの違いによって生じることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

K. Saikusa, A. Osakabe, D. Kato, S. Fuchigami, A. Nagadoi, Y. Nishimura, H. Kurumizaka, S. Akashi. "Structural diversity of nucleosomes characterized by native mass spectrometry" *Analytical Chemistry*, vol.90, no.13, pp.8217-8226 June 2018. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b01649, 査読有

D. Kato, A. Osakabe, Y. Arimura, Y. Mizukami, N. Horikoshi, K. Saikusa, S. Akashi, Y. Nishimura, S.Y. Park, J. Nogami, K. Maehara, Y. Ohkawa, A. Matsumoto, H. Kono, R. Inoue, M. Sugiyama, H. Kurumizaka. "Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome" *Science*, vol.356, pp.205-208 April 2017. DOI: 10.1126/science.aak9867, 査読有

[学会発表](計 9 件)

津中 康央、真柳 浩太、七種 和美、宮崎 直幸、明石 知子、岩崎 憲治、西村 善文、森川 耿右、ヌクレオソーム構造変換における FACT 酸性天然変性領域の新たな分子機能、第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、(2018 年 11 月)

日高はる菜、泉俊輔、明石知子、七種和美、質量分析によるヌクレオソームにおけるヒストンアセチル化の解析、第 56 回日本生物物理学会年会、岡山、(2018 年 9 月)

七種和美、越阪部晃永、加藤大貴、淵上壮太郎、長土居有隆、西村善文、胡桃坂仁志、明石知子、Motility of Histone Tails in Nucleosomes Characterized by NanoESI-MS and Structural Calculation、22 nd International Mass Spectrometry Conference、Florence、(2018 年 8 月)

七種和美、淵上壮太郎、明石知子、イオンモビリティ質量分析で得られたヌクレオソームの構造多様性、第 68 回質量分析総合討論会、吹田、(2018 年 5 月)

七種和美、淵上壮太郎、明石知子、巨大タンパク質-DNA 複合体 NCP のイオンモビリティ質量分析と構造計算、第 7 回イオン移動度研究会、東京、(2018 年 4 月)

七種和美、質量分析で観たヒストン Tail 領域の挙動、第 17 回日本蛋白質科学会年会、仙台、(2017 年 6 月)

七種和美、加藤大貴、長土居有隆、胡桃坂仁志、明石知子、不揮発性緩衝液で調製したタンパク質複合体の ネイティブ質量分析、第 67 回質量分析総合討論会、つくば、(2017 年 5 月)

七種和美、新屋大貴、加藤大貴、畔上菜々子、長土居有隆、泉俊輔、西村善文、胡桃坂仁

志、明石知子、アセチル化に伴うヌクレオソームの構造変化の解析、日本化学会 第 97 春季年会、横浜、(2017 年 3 月)  
七種和美、アセチル化に伴うヌクレオソームの構造変化の解析、第 16 回日本蛋白質科学会年会、博多、(2016 年 6 月)

〔その他〕

ホームページ等

[https://researchmap.jp/kazumi\\_saikusa](https://researchmap.jp/kazumi_saikusa)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：明石 知子

ローマ字氏名：( AKASHI Satoko )

研究協力者氏名：胡桃坂 仁志

ローマ字氏名：( KURUMIZAKA Hitoshi )

研究協力者氏名：淵上 壮太郎

ローマ字氏名：( FUCHIGAMI Sotaro )

研究協力者氏名：長土居 有隆

ローマ字氏名：( NAGADOI Aritaka )

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。