

平成 21年 6月 16日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 19 年度～平成 20 年度

課題番号：19770089

研究課題名（和文）クロマチン構造変換に関わる因子の作用機構解析

研究課題名（英文）Study for molecular mechanisms of chromatin remodeling factors

研究代表者

浜田 恵輔（HAMADA KEISUKE）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00344052

研究成果の概要：転写制御因子による転写活性化にはクロマチンの構造変換が必須である。その過程にはクロマチンリモデリング因子、ヒストンシャペロン、およびヒストン修飾酵素などのタンパク質が関与している。本研究は、クロマチン構造変換による遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的として、クロマチンリモデリング因子ACF、ヒストンシャペロンNap1、ヒストンアセチル化酵素の立体構造に基づく分子作用機構の解析を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,500,000	0	1,500,000
20 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：クロマチン構造変換、転写制御、クロマチンリモデリング因子、ヌクレオソーム会合因子、ヒストンアセチル化酵素、結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

転写制御因子による転写活性化にはクロマチンの構造変換が重要な役割を果たしていると思定されている。その過程にはクロマチンリモデリング因子、ヒストン修飾酵素およびヒストンシャペロンなどが関与すると

考えられている。すなわち、転写制御因子の作用とともに、ATP 依存性クロマチンリモデリング因子やヒストンアセチル化酵素などの関与によりヌクレオソーム構造の変化が誘起され、DNA との結合が弱められたヒストンがヒストンシャペロンと結合して取り

除かれ、基本転写因子やコファクターによって転写が活性化されるという流れである。一連のクロマチン構造変換における分子作用機構を調べることは遺伝子発現機構を理解する上で極めて重要であり、立体構造解析に基づく分子作用機構の詳細な理解が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、クロマチンリモデリング因子の代表的分子である ATP-utilizing chromatin and remodeling factor (ACF)、ヒストンシャペロンの一つである Nucleosome assembly protein-1 (Nap1)、およびヒストンアセチル化酵素 p300 に注目して、分子構造解析によりクロマチン構造変換における分子作用機構を解明することを目的とする。

個別的には、以下の目的で研究を行っている。

(1) ACF は ISWI と Acf1 の 2 つのサブユニットから構成される。ACF によるヌクレオソーム構造変換の分子作用機構を明らかにすることを旨として、ACF の全体構造を結晶構造解析により明らかにする。さらに、ACF とヌクレオソームとの相互作用の構造情報を得るために、ISWI ATPase ドメインと DNA との複合体の結晶構造解析を行う。

(2) Nap1 によるヒストン認識機構を明らかにするために、相互作用実験とともに、Nap1 とヒストン複合体の構造解析を行い、Nap1 がヒストンをヌクレオソームから脱着する分子機構を考察する。

(3) ヒストンアセチル化酵素 p300 は、ヒストンのアセチル化を触媒することによりヌクレオソームの構造変換を誘起して転写活

性を促進する。p300 によるアセチル化はヒストンのみならず多くの転写制御因子の機能調節に関与しており、p300 の histone acetyltransferase (HAT) ドメインの基質認識と活性制御機構の解析は転写制御機構の解明に極めて重要である。p300 の HAT ドメインの基質認識機構や活性制御機構を明らかにするために、HAT ドメイン - 基質複合体の構造解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ACF の大量発現は、昆虫細胞を用いて行った。ACF を精製した後、ATPase 活性測定により酵素活性を有することを確認した。また、クロマチンリモデリング活性を有することを確認した。ゲルシフトアッセイにより ACF とヌクレオソームとの結合を確認した。ACF の結晶化を試みた。また、ISWI ATPase ドメインの大量発現については大腸菌により行い、精製後に結合 DNA 配列との結合実験を行い、複合体を調製して結晶化を試みた。

ヌクレオソームは主に ACF、p300 の機能解析のために調製した。H2A-H2B 複合体、H3-H4 複合体を別々に調製し、変性条件下でヒストンが等モル比になるよう混合し、透析法により生理的条件下にヒストンオクタマーを調製し、別に調製した DNA 断片と一定比率のもと混合してヌクレオソームを調製した。最後に分取型ネイティブ電気泳動による精製を行い、純度の高いヌクレオソームを調製した。

(2) Nap1 とヒストン H2A-H2B、ヒストン H3-H4、およびヒストンオクタマーとの複合体を調製して、各複合体の結晶化を試みた。Nap1 単体の結晶は既に得られており、構造

解析の途上にある。現在、重原子をタンパク質内に特異的に結合させた結晶（重原子誘導体）を用いて多波長異常分散(MAD)や単波長異常分散(SAD)法による構造解析の検討を行っている。分解能の向上を目指して結晶化条件の検討も行っている。

(3) p300 の活性制御機構を調べるため、p300 全長、ヒストンアセチル化酵素(HAT)ドメイン、および HAT ドメインを含む各種フラグメントを調製し、基質（ヒストン）に対する酵素活性の違いを検討した。HAT ドメイン-基質ペプチド複合体の結晶化条件の検索を行っている。

4 . 研究成果

(1) ISWI ATPase ドメインは塩基配列非依存的に、38mer 以上の DNA と比較的強く結合することがわかった。ISWI の DNA 認識機構を明らかにするため、さらに、タンパク質および DNA の分子長の最適化を図って、ISWI ATPase ドメイン-DNA 複合体調製し、現在、分子構造解析のための結晶化条件の検索を継続している。

(2) Nap1 によるヒストンの認識機構を明らかにするため、Nap1 とヒストン H2A-H2B の間の親和性を表面プラズモン共鳴法により解析した。その結果、ヌクレオソーム会合因子と H2A-H2B の解離定数(K_D)は 14 nM であった。Nap1 の C 末端酸性領域を欠損させた変異体では、H2A-H2B との親和性は 1/3 に低下した。この結果からヌクレオソーム会合因子の酸性領域はヒストンとの結合に関わることが示唆された。また、Nap1 は分子内に存在する長いループ領域により多量体を形成するが、そのループ領域はヒストンとの結合に関与しないことが変異体を用いた測定から示唆

された。

Nap1 はヒストンオクタマーに対しても結合能をもち、クロマチン形成を起こすことを明らかにした。Nap1 とヒストンオクタマーとの複合体を調製して、結晶化条件の検索を行っている。

(3) 機能解析の結果、p300 全長と p300 HAT ドメインでは、基質であるヒストンオクタマーに対するアセチル化の特異性が異なることを明らかにした。また、ヌクレオソームに対しても同様に、特異性が異なることがわかった。現在、p300 分子内のどの領域が基質特異性の違いに影響しているのか探っている。

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 1 件)

Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Uruno K, Kumada S, Nishiyama K, Nishimura A, Okada I, Yoshimura Y, Hirai S, Kumada T, Hayasaka K, Fukuda A, Ogata K, Matsumoto N.

De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy

Nature Genetics, 40, 782-788, 2008,

査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

浜田 恵輔、タンパク質結晶化と構造解析、タンパク質精製ワークショップ、2008 年 12 月 18 日、国立遺伝学研究所

椎名 政昭, 浜田 恵輔, 佐藤 光, 緒方 一

博

転写制御因子・核酸複合体の静的・動的
分子構造と機能との相関、タンパク 3000
総合シンポジウム「タンパク 3000 の成
果と今後のタンパク研究展望」, 2007 年
2 月 27 日、東京

〔図書〕(計 1 件)

緒方 一博、浜田 恵輔、南山堂、転写制御と
エピジェネティクス 転写制御因子の分子
構造と作用機構、2008, 116-131

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浜田 恵輔 (HAMADA KEISUKE)

横浜市立大学・医学部・助教

00344052