

自己評価報告書

平成23年5月16日現在

機関番号：22701
 研究種目：基盤研究(S)
 研究期間：2008～2012
 課題番号：20227009
 研究課題名(和文) 天然変性タンパク質の動的構造と機能制御機構の解明
 研究課題名(英文) Dynamics of intrinsically disordered proteins and their functional roles
 研究代表者
 西村 善文(NISHIMURA YOSHIFUMI)
 横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・教授
 研究者番号：70107390

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学 生物物理学

キーワード：NMR、転写因子、クロマチン、動的構造、天然変性状態

1. 研究計画の概要

本研究においては天然変性タンパク質の動的構造と機能制御機構の解明を行う。真核生物の特に核内タンパク質を標的に、単独では天然変性状態部位を持ち複合体形成に伴って全体としてフォールディングするテロメア関連因子、ヒストンタンパク質、ヒストンシャペロン、クロマチン関連因子、基本転写因子を対象に、NMRを用いて、単独の時の動的構造、中間体の動的構造、特異的複合体の動的構造を解析し、天然変性タンパク質の認識機構の普遍性を解明する。

2. 研究の進捗状況

(1) テロメアタンパク質TRF2の天然変性状態のN末塩基性ドメインとテロメアDNA末端との相互作用をNMRを用いて初めて明らかにした。テロメアDNAは末端ではTTAGGGの繰り返し配列からなる二重鎖DNAと3'末端突出1本鎖DNAからなる。TRF2塩基性ドメインをSS結合で2量体化しテロメア二重鎖DNAとテロメアDNA末端との相互作用をNMRで解析した。2量体塩基性ドメインは単独では天然変性状態でテロメア末端DNAに結合しても特定の2次構造は取っていなかったが、構造的には堅くなった。

(2) 組換えヒストンを発現精製しヒストン(H2AH2B)2量体と(H3/H4)₂4量体の安定性をnativeMSで初めて明らかにした。H2AH2Bの2量体やH3H4の4量体は高イオン強度で安定化し低イオン強度では各単量体に解離する事を見出し2量体や4量体の安定化に疎水結合が重要であることを示した。さらにH2AをPAD4でシトルリン化し、H2AのN末のフレキシブルなアームがシトルリン化されH2A/H2B複合体の構造の安定性が増すことが分かった。

(3) 同位体ラベルしたヒストンタンパク質

²H¹³C¹⁵N-H2A/²H-H2Bを用いてTROSY-NMRを測定し、始めてH2Aの主鎖の帰属を行いH2AH2Bヘテロ2量体中のH2A全長の2次構造を同定した。ヌクレオソームコア中のH2Aの構造と比較したところN末とC末のαヘリックスが2量体中では壊れていて、N末及びC末の各々30アミノ酸領域が天然変性状態であることが示された。

(4) ヒストンシャペロンNAP1、NAP2とFACTのSPT16の各酸性ドメインは単独では天然変性状態でH2AH2Bに結合する。ヒストンシャペロンとH2AH2Bヘテロ2量体との複合体中でH2Aの相互作用部位をNMRで同定した。

(5) ヘテロクロマチン形成因子HP1αのクロモドメインのフレキシブル領域でのリン酸化体の構造を初めてNMRで決定し、非リン酸化体との構造を比較した。

(6) RNAi介在ヘテロクロマチン関連因子Chp1クロモドメインとRNAとの相互作用構造を始めて解析した。

(7) ヒストンアセチル化酵素Esa1のヒトホモログのTip60のスプライシング・バリエーションの構造を初めてNMRで比較した。

(8) 基本転写因子TFIIEのαサブユニットのC末酸性ドメインとTFIIHのp62サブユニットが複合体構造に基づいて動的構造の解析を開始した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に伸展している。

(1) テロメア末端のDNAの3'突出1本鎖部分の保護についてはTRF2のN末塩基性ドメインと2量体形成ドメインの両方が重要である事が示されていた。今回SS結合で2量体化したTRF2塩基性ドメインと3'突出末端を含んだテロメアDNAとの相互作用をNMRで観測

しフリーでは天然変性状態で複合体では相互作用部位で構造が硬くなっている事を初めて見出した。

(2)大腸菌で組換えヒストンを発現精製しヒストンH2AH2B2量体と(H3/H4)₂4量体をMSで安定性を評価し(H2AH2B)₂量体のアルギニン残基のシトルリン化により安定性が増加する事を初めて明らかにした。

(3)組換えヒストンのNMR測定によりH2A/H2B2量体中のH2Aの2次構造を初めて同定し、H2AH2Bの3種類のヒストンシャペロンNAP1、NAP2、FACTのSPT16の各酸性ドメインとの相互作用を解析しH2Aの相互作用部位を同定する事が出来た。

(4)ヘテロクロマチン形成因子HP1 α のクロモドメインのリン酸化体の構造を初めてNMRで決定した。

(5)クロマチン関連因子としてRNAiに関連するChp1クロモドメインのフリーとH3K9me複合体でのRNA認識機構、Eaf3クロモドメインの機能解析、CHD7クロモドメインの機能解析、Tip60クロモドメインのスプライシング変異体間でのN末テイルの構造変化とその機能解析を行って動的構造多様性の比較を行っている。

(6)基本転写因子TFIIE α 酸性ドメインとTFIIHのp62のPHドメインとの複合体構造のR2分散の測定を行い酸性ドメインのN末の天然変性領域である酸性パッチで顕著なR2分散が観測された。

4. 今後の研究の推進方策

(1)TRF2塩基性ドメイン2量体とテロメアDNA末端複合体の構造をNMRで決定し、天然変性領域であるTRF2塩基性ドメインの動的挙動を明らかにする。

(2)ヒストンオクタマー(H2AH2B/H3/H4)₂や146塩基対のDNAとの複合体のヌクレオソームコアでの構造安定性をMSで評価する。

(3)安定同位体ラベルH2Bを組み込んだH2A/H2B2量体中のH2Bの構造解析を行い全体構造を求め、動的挙動を解析する。またヒストンシャペロンNAP1、NAP2、FACTのSPT16の各酸性ドメインについて各ラベル体でH2A/H2B2量体との複合体の構造解析と動的挙動をNMRで調べる。

(4)ヘテロクロマチン形成因子HP1 α のクロモドメインのリン酸化体のフリーの構造とH3K9me複合体構造及び非リン酸化体のフリーの構造とH3K9me複合体構造を動的挙動を含めてNMRで比較解析する。

(5)クロモドメインの構造的多様性と機能的な多様性をRNAiに関連するChp1クロモドメインの認識機構、Eaf3クロモドの機能解析、Tip60クロモドメインのスプライシング・バリエーション間での構造変化とその機能解析を行い、クロモドメインの動的構造多様性と機

能多様性の比較を行う。

(6)TFIIE α 酸性ドメインとTFIIHのp62のPHドメインとの複合体構造のR2分散の測定結果に基づいて遭遇複合体や中間体の構造を解析し動的挙動を明らかにする。

5. 代表的な研究成果

(1)雑誌論文(11件)

1. Horikoshi, N., Tachiwana, H., Saito, K., Osakabe, A., Sato, M., Yamada, M., Akashi, S., Nishimura, Y., Kagawa, W., and Kurumizaka, H., Structural and biochemical analyses of the human PAD4 variant encoded by a functional haplotype gene. *Acta Crystallogr. D* 67, 112-118 (2011).

2. Shimoyama, S., Nagadoi, A., Tachiwana, H., Yamada, M., Sato, M., Kurumizaka, H., Nishimura, Y., and Akashi, S. Deimination stabilizes histone H2A/H2B dimers as revealed by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 45, 900-908 (2010).

3. Shimojo, H., Sano, N., Moriwaki, Y., Okuda, M., Horikoshi, M., and Nishimura, Y., Novel Structural and Functional Mode of a Knot Essential for RNA Binding Activity of the Esal Presumed Chromodomain. *J. Mol. Biol.* 378, 987-1001 (2008).

4. Okuda, M., Tanaka, A., Satoh, M., Mizuta, S., Takazawa, M., Ohkuma, Y., and Nishimura, Y., Structural insight into the TFIIE/TFIIH interaction: TFIIE and p53 share the binding region on TFIIH. *EMBO J.* 27, 1161-1171 (2008).

5. Akashi, S., Nagakura, S., Yamamoto, S., Okuda, M., Ohkuma, Y., Nishimura, Y. Structural characterization of human general transcription factor TFIIF in solution. *Protein Sci.* 17, 389-400 (2008).

(2)学会発表(計27件)

Korean Magnetic Resonance Society Meeting
開会講演: NMR studies on gene regulation-related proteins: intrinsic disordered states and drug screening 西村善文

(3)その他

ホームページ

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/stbiol/index.html>

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/ynmr/>

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/segc/>