

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 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

研究成果の概要（和文）：ヘテロクロマチン形成因子のChp1とSwi6のクロモドメインの溶液中の構造をNMRで解析した。Chp1のクロモドメインのN末の天然変性領域はヒストンH3の9番目のリシンのメチル化体と複合体を形成してヘリックスを誘導し、その部位がセントロメアのncRNAと相互作用をすることを見出した。またヒストンH2A/H2Bヘテロ2量体を含むヒストン多量体について天然変性状態のヒストンテイル構造についてMSとMDで解析し、更にヒストンH2A/H2Bヘテロ2量体の単独の溶液構造とヒストンシャペロンNAP1のC末の天然変性状態の酸性ドメインとの相互作用構造をNMRで解析した。

研究成果の概要（英文）：Here, we have examined dynamical structures of intrinsically disordered proteins including heterochromatin-related proteins, Chp1 and Swi6 in addition to histone multimers by NMR and MS. The chromodomain (CD) of a heterochromatin-related protein, Chp1, possesses novel RNA-binding activity as well as histone H3K9me3-binding activity. NMR revealed that the presence of a small helix in the N-terminal outside region of Chp1 CD bound to histone H3K9me3. Addition of *cen* RNA led to chemical shift changes of amide protons for residues within this helix and a C-terminal helix in Chp1 CD. In addition we revealed the solution structure of H2A/H2B and its complex with the C-terminal disordered acidic domain of histone chaperone Nap1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	42,000,000	12,600,000	54,600,000
2009年度	24,000,000	7,200,000	31,200,000
2010年度	24,000,000	7,200,000	31,200,000
2011年度	24,000,000	7,200,000	31,200,000
2012年度	24,000,000	7,200,000	31,200,000
総計	138,000,000	41,400,000	179,400,000

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. 研究開始当初の背景

転写関連因子やクロマチン関連因子などの真核生物の核内タンパク質においては必ずしも結晶中の構造が水溶液中の構造を反映していない場合が多く、特に水溶液中では単独では全くランダムで相手と出会うこと

により一部が構造を形成する天然変性タンパク質が知られるようになってきた。

2. 研究の目的

クロマチン関連因子や転写関連因子の複合体形成における天然変性状態の役割と動

的構造を NMR 法を用いて解明する。

3. 研究の方法

本研究では、クロマチン関連因子としてヘテロクロマチン関連タンパク質やクロマチン構成因子であるヒストンの動的構造を解析する。また神経特異的転写抑制因子 NRSF の相互作用についても動的構造を基に創薬基盤技術を開発するとともに基本転写因子の TFIIE の相互作用構造なども解析する。特に相互作用における天然変性状態の役割及び特異的複合体における認識様式の普遍性を NMR の動的構造解析の立場から解明する。

4. 研究成果

ヘテロクロマチン形成因子の Chp1、Hp1 α 、Swi 6 のクロモドメインの溶液中の構造を解析した。分裂酵母のヘテロクロマチン関連因子 Chp1 はヒストン H3 の 9 番目のメチル化リシン (H3K9me) に結合すると共に ncRNA と相互作用してヘテロクロマチンを確立する。Chp1 のクロモドメインが H3K9me を認識するが、H3K9me 複合体中でクロモドメインの N 末にある天然変性領域で短いヘリックス形成が誘導され、その部位がセントロメアの ncRNA と相互作用をすることを始めて見出した (Mol. Cell:2012)。図 1 に示すようにこれまで報告されていた結晶構造ではクロモドメインの N 末部位は削除されていた。クロモドメインの N 末に存在する天然変性領域が ncRNA との相互作用上重要な役割を担っている事を明らかにした。

図 1. Chp1 クロモドメインの構造

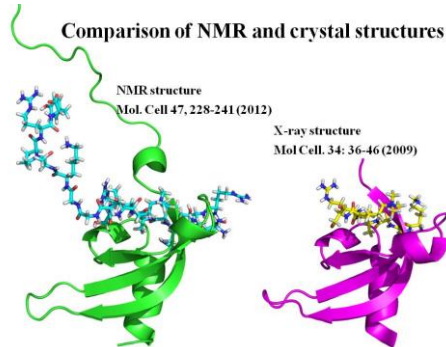
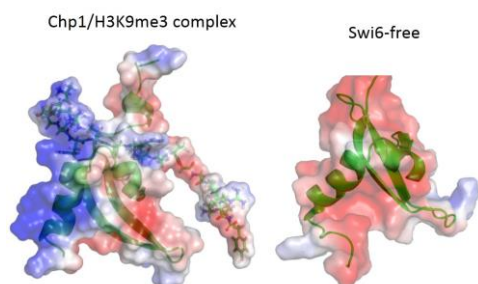


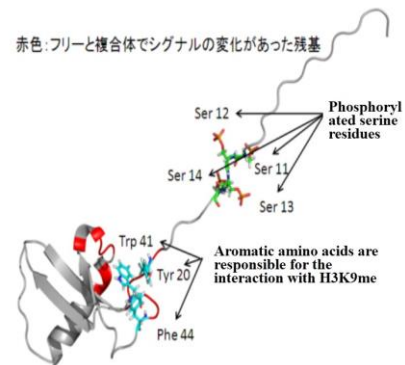
図 2. クロモドメインのポテンシャル比較



更に酵母でヘテロクロマチンの維持に関与する Swi6 のクロモドメインのフリーの構造を解析し、Swi6 のクロモドメインは ncRNA と相互作用しないことを図 2 に示すように静電ポテンシャルの比較から確認した。

また哺乳類の Swi6 のホモログである HP1 のクロモドメインの N 末にある天然変性領域がリン酸化されると、H3K9me との結合が強くなる。リン酸化体と非リン酸化体ではクロモドメイン部分の立体構造は同じであったが、リン酸化により N 末の天然変性領域の動的挙動が変化した。

図 3. HP1 クロモドメインの構造



大腸菌発現系を用いて H2A/H2B ヘテロ 2 量体および H3/H4 ヘテロ 4 量体、H2A/H2B/H3/H4 の各 2 量体のヒストンオクタマー、オクタマーと 146 塩基対の DNA との複合体のヌクレオソームについて、試料調製を行い各々 MS で試料の同定を行った。

図 4 に示すようにヒストン H2A/H2B ヘテロ 2 量体と H3/H4 のヘテロ 4 量体の構造を MD 計算で求めた。各ヒストンの N 末や C 末の天然変性領域はフレキシブルであったがヒストンフォールドの構造はヌクレオソーム中と同様に保持されていた。次に H2A/H2B と H3/H4 の構造をイオンモビリティ MS で解析した。解析の結果図 5 に示すように MS の実験条件化である真空中では 2 種類のコンフォマーが存在した。

図 4. H2A/H2B と H3/H4 の MD 計算構造

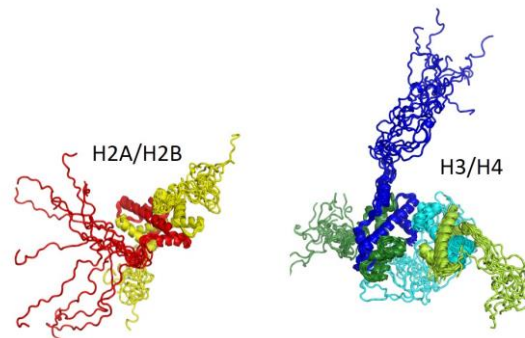
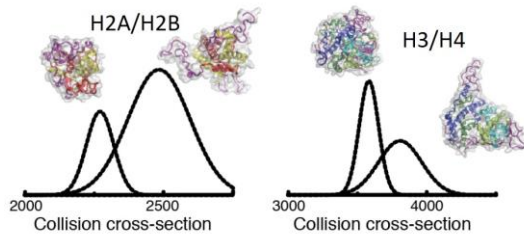
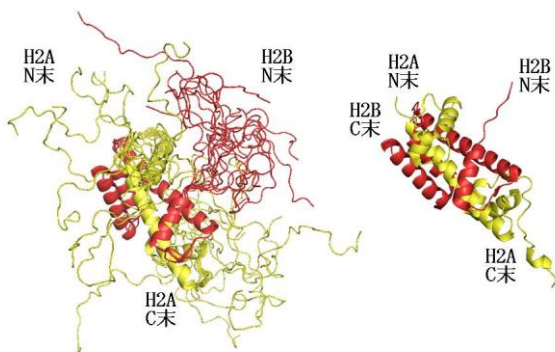


図5. ヒストンのイオンモビリティMS



さらに¹⁵N, ¹³C, 2Hでラベルしたヒストンを調製し溶液中のH2A/H2BのNMR測定を行った。H2A/H2Bは溶液中ではヒストンフォールドの構造はH2AとH2Bの各々で保存されていたが、ヌクレオソーム中と異なりH2AのN末のヘリックスとC末のヘリックスの構造は壊れていた。

図6. H2A/H2BのNMR構造



図の左が現時点での遊離したH2A-H2Bの水溶液中の構造であり、図の右がヌクレオソーム結晶中のH2A-H2Bの構造である。薄い方がH2Aで濃い方がH2Bである。H2AのN末とC末及びH2BのN末は揺らいでいて結晶中では見えない。

さらにH2A/H2BとヒストンシャペロンNAP1との相互作用をNMRで解析した。NAP1のC末の酸性ドメイン単独でヒストンH2A/H2Bと相互作用した。酸性ドメインは天然変性状態のひも状で、アスパラギン酸に富む領域とプロリン/チロシン領域が別々にヒストンH2A/H2Bの表面の2箇所相互作用をしていた。アスパラギン酸に富む領域はH2AのN末領域に結合しヌクレオソーム中と同様にヘリックス形成を誘導した。またNAP2の酸性ドメインとH2A/H2Bとの相互作用もNMRで解析した。NAP1の酸性ドメインに比べて結合は弱く、その原因はNAP1で2箇所あった相互作用部位の内の1箇所だけで相互作用部したためである事が分かった。ラベルしたヒストンを用いてヌクレオソームコアの900MHz 固体NMRの測定を行なった。

基本転写因子TFIIEの α サブユニットのC末酸性ドメイン(AC-D)のフリーの構造と、

TFIIHのp62サブユニットのPHドメイン(PH-D)との複合体構造をNMRで決定した。AC-Dのフリーの構造は、酸性領域に富んだN末が天然変性状態であった。複合体中でフリーのときと同じ構造であったが、フリーのときに天然変性状態であったN末酸性領域は、PH-Dの塩基性アミノ酸に富んだ領域と相互作用をして伸びた構造をとり、さらに一部が β 鎖を形成しPH-Dと分子間で β シートを形成した。静電的相互作用に加えAC-DのフェニルアラニンとバリンがPH-Dの疎水性ポケットに特異的に結合していた。AC-DとPH-D相互作用面の一部は、がん抑制遺伝子産物p53の転写活性化ドメインとPH-Dとの相互作用部位と重なっていた。

さらに、基本転写因子TFIIE $\alpha\beta$ の全長構造をNMRで解析した。主鎖シグナルの比較から、TFIIE α のコアドメイン、TFIIE α のAC-D、およびTFIIE β のコアドメインはTFIIE $\alpha\beta$ 全長中でも、単離して解析したドメインと同一の構造を保持していることを示した。転写開始前複合体形成時にTFIIEが長く伸びたフレキシブルな領域でTFIIHを広範囲に渡って探索し、末端のAC-Dでp62PH-Dを特異的に認識するリクルート機構が提唱される。エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)を用いてヒトTFIIFがヒトTFIIEの場合と同様にそれまで言われていた $\alpha 2\beta 2$ ヘテロ四量体ではなく $\alpha\beta$ ヘテロ二量体であることを示した。

神経特異的抑制因子NRSFのN末ドメインとコリプレッサーSin3のNMR複合体構造に基づいて、NRSFとの相互作用を阻害する化合物の同定をNMRにより行った。NRSFが標的である神経疼痛モデルマウスで共同実験を行ったところ、2つの化合物が神経疼痛に効果があり、その治療候補化合物としてPCT出願を行った。更に繊維筋痛症モデルマウスでNRSF結合阻害化合物の効果を見たところ繊維筋痛症にも治癒効果が確認され特許出願を行った。

Sin3とNRSFのN末の転写抑制ドメインの複合体構造を共同研究でMD計算によるシミュレーションを行った。NRSFの転写抑制ドメインは単独ではNMR的には天然変性タンパク質であるが、MD的には、ランダムな構造、伸

びた構造、ヘリカルな構造、ターン構造と様々な構造間の動的平衡であった。また、各々の構造が標的である Sin3 に結合し遭遇複合体を形成し、結合したあとで誘導適合により構造が変化し最終的には NMR 構造に落ち着くことが分かった。

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)

[英文論文] (計 25 件)

1. Saikusa K, Fuchigami S, Takahashi K, Asano Y, Nagadoi A, Tachiwana H, Kurumizaka H, Ikeguchi M, Nishimura Y, Akashi S, “Gas-phase structure of the histone multimers characterized by ion mobility mass spectrometry and molecular dynamics simulation”, *Anal Chem.*, **85**, 4165-4171(2013). 査読有 . doi:10.1021/ac400395j.
2. Saikusa K, Kuwabara N, Kokabu Y, Inoue Y, Sato M, Iwasaki H, Shimizu T, Ikeguchi M, Akashi S, “Characterisation of an intrinsically disordered protein complex of Swi5-Sfr1 by ion mobility mass spectrometry and small-angle X-ray scattering”, *Analyst.*, **138**, 1441-14499(2013). 査読有 . doi: 10.1039/c2an35878f.
3. Yoshida H, Kawai F, Obayashi E, Akashi S, Roper DI, Tame JR, Park SY., “Crystal structures of penicillin-binding protein 3 (PBP3) from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the apo and cefotaxime-bound forms”, *J Mol Biol.*, **423**,351-364(2012). 査読有 . doi:10.1016/j.jmb.2012.07.012
4. Ishida M, Shimojo H, Hayashi A, Kawaguchi R, Ohtani Y, Uegaki K, Nishimura Y, Nakayama J., “Intrinsic Nucleic Acid-Binding activity of Chp1 Chromodomain Is Required for Heterochromatic Gene Silencing”, *Mol Cell.*, **47**, 228-241(2012) 査読有 . doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.017.
5. Okuwaki M, Sumi A, Hisaoka M, Saotome-Nakamura A, Akashi S, Nishimura Y, Nagata K., “Functions of homo- and hetero-oligomers of human Nucleoplamin/Nucleophosmin family proteins NPM1, NPM2, and NPM3 during sperm chromatin remodeling”, *Nucleic Acids Res.*,**40**, 4861-4878(2012) 査読有 . doi:10.1093/nar/gks162.
6. Horikoshi N, Tachiwana H, Saito K, Osakabe A, Sato M, Yamada M, Akashi S, Nishimura Y, Kagawa W, Kurumizaka H., “Structural and biochemical analyses of the human PAD4 variant encoded by a functional haplotype gene”, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, **67**,112-118(2011) 査読有 .doi: 10.1107/S0907444910051711.
7. Higo J, Nishimura Y, Nakamura H., “Free-energy Landscape for Coupled Folding and Binding of an Intrinsically Disordered Protein in Explicit Solvent from Detailed All-atom Computations”, *J Am Chem Soc.*, **133**, 10448-10458(2011) 査読有 . doi: 10.1021/ja110338e.
8. Downard KM, Maleknia SD, Akashi S., “Impact of limited oxidation on protein ion mobility and structure of importance to footprinting by radical probe mass spectrometry”, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **26**, 226-230 (2012). 査読有 . doi: 10.1002/rcm.5320.
9. Kokabu Y, Murayama Y, Kuwabara N, Oroguchi T, Hashimoto H, Tsutsui Y, Nozaki N, Akashi S, Unzai S, Shimizu T, Iwasaki H, Sato M, Ikeguchi M., “Fission yeast Swi5-Sfr1 protein complex, an activator of Rad51 recombinase, forms an extremely elongated dogleg-shaped structure”, *J Biol Chem.*, **286**, 43569-43576(2011). 査読有 . doi: 10.1074/jbc.M111.303339.
10. Downard KM, Kokabu Y, Ikeguchi M, Akashi S., “Homology-modelled structure of the β B2B3-crystallin heterodimer studied by ion mobility and radical probe MS”, *FEBS J.*, **278**, 4044-4054(2011). 査読有 . doi: 10.1111/j.1742-4658.
11. Shimoyama S, Nagadoi A, Tachiwana H, Yamada M, Sato M, Kurumizaka H, Nishimura Y, Akashi S., “Deimination stabilizes histone H2A/H2B dimers as revealed by electrospray ionization mass spectrometry,” *J Mass Spectrom.*, **45**,900-908(2010) 査読有 . doi: 10.1002/jms.1778.
12. Yamane T, Okamura H, Nishimura Y, Kidera A, Ikeguchi M., “Side-chain conformational changes of transcription factor PhoB upon DNA binding: a population-shift mechanism”, *J Am Chem Soc.*,**132**, 12653-12659(2010) 査読有 .doi:

- 10.1021/ja103218x.
13. Oda T, Hashimoto H, Kuwabara N, Akashi S, Hayashi K, Kojima C, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K, Sato M, Shimizu T., "The structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications", *J Biol Chem.*, **285**, 1435-1445(2010) 査読有. doi: 10.1074/jbc.M109.058909
 14. Domann PJ, Akashi S, Barbas C, Huang L, Lau W, Legido-Quigley C, McClean S, Neusüss C, Perrett D, Quaglia M, Rapp E, Smallshaw L, Smith NW, Smyth WF, Taylor CF., "Guidelines for reporting the use of capillary electrophoresis in proteomics", *Nat Biotechnol.*, **28**, 654-655(2010). 査読有. doi: 10.1038/nbt0710-654b.
 15. Hara K, Hashimoto H, Murakumo Y, Kobayashi S, Kogame T, Unzai S, Akashi S, Takeda S, Shimizu T, Sato M. "Crystal structure of human REV7 in complex with a human REV3 fragment and structural implication of the interaction between DNA polymerase zeta and REV1", *J Biol Chem.*, **285**, 12299-12307(2010). 査読有. doi: 10.1074/jbc.
 16. Hara K, Shimizu T, Unzai S, Akashi S, Sato M, Hashimoto H., "Purification, crystallization and initial X-ray diffraction study of human REV7 in complex with a REV3 fragment", *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.*, **65**, 1302-1305(2009) 査読有. doi: 10.1107/S1744309109046181.
 17. Miranda FF, Iwasaki K, Akashi S, Sumitomo K, Kobayashi M, Yamashita I, Tame JR, Heddle JG., "A Self-Assembled Protein Nanotube with High Aspect Ratio", *Small*. **5**, 2077-2084(2009) 査読有. doi: 10.1002/smll.200900667.
 18. Watanabe M, Heddle JG, Kikuchi K, Unzai S, Akashi S, Park SY, Tame JR., "The nature of the TRAP-Anti-TRAP complex." *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**, 2176-2181(2009) 査読有. doi: 10.1073/pnas.0801032106.
 19. Akashi S, Watanabe M, Heddle JG, Unzai S, Park SY, Tame JR., "RNA and protein complexes of TRAP characterized by mass spectrometry", *Anal Chem.*, **81.**, 2218-2226(2009) 査読有. doi: 10.1021/ac802354j.
 20. Hiraki T, Shibayama N, Akashi S, Park SY., "Crystal Structures of the Clock Protein EA4 from the Silkworm *Bombyx mori*", *J Mol Biol.*, **377**, 630-635(2008)査読有. doi: 10.1016/j.jmb.2008.01.020.
 21. Yamane T, Okamura H, Ikeguchi M, Nishimura Y, Kidera A., "Water-mediated interaction between DNA and PhoB DNA-binding/transactivation domain: NMR-restrained molecular dynamics in explicit water environment", *Proteins.*, **71**, 1970-1983(2008) 査読有. doi: 10.1002/prot.21874.
 22. Okuda M, Tanaka A, Satoh M, Mizuta S, Takazawa M, Ohkuma Y, Nishimura Y., "Structural insight into the FIIIE-TFIIH interaction: TFIIIE and p53 share the binding region on TFIIH", *EMBO J.*, **27**,1161-1171(2008) 査読有. doi: 10.1038/emboj.
 23. Akashi S, Nagakura S, Yamamoto S, Okuda M, Ohkuma Y, Nishimura Y., "Structural characterization of human general transcription factor TFIIIF in solution", *Protein Sci.*, **17**, 389-400(2008)査読有. doi: 10.1110/ps.073258108.
 24. Sperry JB, Shi X, Rempel DL, Nishimura Y, Akashi S, Gross ML., "A Mass Spectrometric Approach to the Study of DNA-Bonding Proteins: Interaction of Human TRF2 with Telomeric DNA", *Biochemistry.*, **47**, 1797-1807(2008) 査読有. doi: 10.1021/bi702037p.
 25. Shimojo H, Sano N, Moriwaki Y, Okuda M, Horikoshi M, Nishimura Y., "Novel Structural and Functional Mode of a Knot Essential for RNA Binding Activity of the Esa1 Presumed Chromodomain", *J Mol Biol.*, **378**, 987-1001(2008) 査読有. doi: 10.1016/j.jmb.
- [邦文] (計5件)
1. 西村善文, 「バンド生物学とインパクトファクター」、*生化学*, **83**, 809(2011) 査読無。
 2. 明石知子, 「巨大タンパク質の質量分析」、*ぶんせき*, 422-427(2009) 査読無。
 3. 明石知子, 史向国, 高見澤淳, 西村善文, 平岡賢三, 「レーザーสプレー質量分析が可能にした生体高分子複合体の結合親和性の定量的な解析」、*J. Mass*

Spectrom. Soc. Jpn. **22**, 155-161(2008)
査読無.

4. 西村善文、「転写・翻訳 真核生物の転写系を中心に」、*蛋白質・核酸・酵素*、**Vol.53 No.5**、620-623(2008) 査読無.
5. 西村善文、奥田昌彦、「基本転写因子 TFIIE の構造と TFIIF との相互作用」、*生化学*、**第 80 巻第 6 号**、501-510(2008) 査読無.

[学会発表] (計 103 件)

(内：国外招待講演計 6 件)

1. Nishimura Y., Structural analysis of Chp1 chromodomain required for heterochromatin assembly, Symposium on the Structure and Folding of Disease Related Proteins, 韓国・Structural Research Center for Innovative Drug Development(2012.7.6).
2. Nishimura Y., Shimojo H, Kawaguchi A, Okuda M, Moriwaki Y, Iizumi K, Nagadoi A., Structural biology on Chromatin - related proteins, The 4th Asia-Pacific NMR Symposium (The 4th APNMR Symposium) アジア-太平洋 NMR シンポジウム、中国・Beijing Central Garden Hotel(2011.10.16-19).
3. Nishimura Y., Structural biology on chromatin - related proteins, Symposium on the Structure and Folding of Disease Related Proteins, Structural Research Center for Innovative Drug Development, 韓国・ソウル国立大学(2011.7.7-10).
4. 西村善文、Eukaryotic nuclear IUPs (真核生物の核内天然変性タンパク質)、2010 KRIBB Conference on Structural Bioinformatics(2nd Asia-Pacific symposium on Intrinsically Unfolded Proteins), 韓国・大田 (KRIBB) (2011.1.12-15).
5. 西村善文、NMR studies on gene regulation-related proteins: intrinsic disordered states and drug screening. Korean Magnetic Resonance Society Meeting(KMRS : 韓国磁気共鳴学会)、韓国・釜山 (2010.6.21-23).
6. Okuda M, Nagadoi A., Komatsu M, Nishimura Y., Intrinsically Disordered Transcription-related Proteins, 第 3 回アジア-太平洋 NMR シンポジウム (APNMR)、韓国・Ramada Plaza Jeju Hotel(2009.10.25-28).

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称:神経選択的転写抑制因子 NRSF に特異的に結合する mSin3B に結合する化合物の利用

発明者: 西村善文、長土居有隆、平尾優佳、五嶋良郎、山下直也、植田弘師、宮田直樹、鈴木孝禎、平石龍大

権利者: 公立大学法人横浜市立大学、公立大学法人名古屋市立大学、国立大学法人長崎大学

種類: 2010-27066

番号: PCT/JP2011/52710

出願年月日: 2011/2/9

国内外の別: 国外

名称: 線維筋痛症の予防または治療薬

発明者: 西村善文、植田弘師

権利者: 公立大学法人横浜市立大学、公国立大学法人長崎大学、PRISM BioLab株式会社

種類: 2012-267599

番号: A11178

出願年月日: 2012/12/6

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

よこはま NMR 構造生物学研究会

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

構造エピゲノム研究会

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

明石 知子 (AKASHI SATOKO)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号: 10280728

長土居有隆 (NAGADOI ARITAKA)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・助教

研究者番号: 50336591

(3) 連携研究者

なし