

機関番号：82626
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20370043
 研究課題名(和文) FACT-ヒストン複合体の立体構造解析に基づいたヌクレオソーム構造変換機構の解明
 研究課題名(英文) Crystallographic analysis of the FACT-histone complex
 研究代表者
 千田 俊哉 (SENDA TOSHIYA)
 独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・主任研究員
 研究者番号：30272868

研究成果の概要(和文)：ヒストン H2A-H2B と相互作用しヌクレオソームの構造変換に関する FACT の構造-機能相関を明らかにするために、FACT の結晶構造解析を試みた。結晶構造解析の遂行に必須である大量かつ高純度の FACT の調製に成功した。ヒストンについても高純度かつ長期間保存可能な精製サンプルの大量調製法を確立した。精製した FACT とヒストンが相互作用することを確認し、動的光散乱法を用いて両者を安定に混合可能な条件を探索した。この結果に基づいて結晶化のスクリーニングを進めている。

研究成果の概要(英文)：FACT, which interacts with the histone H2A-H2B complex, is known to be involved in nucleosome assembly/disassembly. In order to reveal the molecular mechanism of nucleosome assembly/disassembly, crystal structure analysis of FACT was initiated. In the present study, we have established a method that can give about 7 mg of highly purified FACT from 1L culture of insect cell SF+. In addition, a purification method of histone proteins was improved. We confirmed that the purified FACT interacts with the histone proteins. To establish a proper condition for preparing the FACT-histone complex without forming aggregates, solution conditions of the FACT-histone complex were investigated by the dynamic light scattering method. On the basis these results, we are making an effort to obtain crystals of the FACT-histone complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究代表者の専門分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：結晶構造解析、結晶化、ヒストン、ヌクレオソーム、ヒストンシャペロン、精製

1. 研究開始当初の背景

真核細胞生物のゲノム DNA は、ヒストン 4 量体 (4 種類のヒストン蛋白質 H2A, H2B, H3, H4 がそれぞれ 2 分子ずつ含まれる) に DNA が

巻き付いたヌクレオソーム構造を形成しており、転写などの DNA に対する反応は抑制されている。このため、発生・分化の過程や環境の変化に応じて必要な時期に必要な遺伝

子を発現させるためには、ゲノム上の特定箇所ヌクレオソーム構造をいったんほどいて DNA と酵素群の反応を可能にし、反応後にヌクレオソームを再形成させる分子機構が必要となる。ヒストンと相互作用をしてヌクレオソーム構造の形成・破壊を促進する因子群は、ヒストンシャペロンと呼ばれている。ヒストンシャペロンが関与するヌクレオソーム構造変換は幾つもの分子が関わる複雑な過程であるため詳細は不明であるが、大まかには H2A-H2B の解離／集合の過程と H3-H4 の解離／集合の 2 つの過程に分けられる。

ヒストン H3-H4 の解離／集合の過程に関しては、我々の構造生物学的研究がブレークスルーとなり、この過程に関する構造的な基盤が与えられた (Natsume et al., Nature (2007))。この結果に基づき、我々はヌクレオソームの半保存的複製モデルや、アセチル化依存的なヌクレオソーム構造変換の分子機構を提唱してきた。

FACT は、ヒストン H2A-H2B の解離／集合の過程に関与するヒストンシャペロンとして同定され、多くの生物学的・生化学的解析が進められてきた。その結果、FACT は、ヒストン H2A-H2B との相互作用を介して転写や DNA 複製／ヌクレオソーム複製に関与することが示唆されている。FACT が H2A/H2B だけではなくヒストン H3/H4 とも相互作用することも明らかになり、CIA と FACT との協調的な作用も示唆されている。しかし FACT の立体構造解析は一部のドメインを除いて進んでおらず、H2A-H2B の解離／集合の過程の分子メカニズムは未だ不明である。

2. 研究の目的

ヒストン H2A/H2B の集合と解離とに関与するヒストンシャペロン FACT の機能解析を立体構造の基づいて進めるために、FACT を含む複合体 (FACT-H2A/H2B 複合体、

FACT-H2A/H2B-H3/H4 複合体) の結晶構造解析を行うことを本研究の目的とした。これらの FACT 複合体の構造が決定できれば、既知の CIA-H3-H4 複合体等の立体構造情報や、種々の生化学的、生物学的実験結果を組み合わせることで、ヌクレオソーム構造変換の分子機構の研究が大きく前進すると考えられる。

3. 研究の方法

結晶構造解析を成功させるためには、目的タンパク質を高純度かつ大量に用意することが必要で、この段階が以降の研究の正否を左右する。そこで本研究においては、高純度の FACT および複合体形成の相手であるヒストンを大量に準備する段階に最も力を注いだ。タンパク質の精製系が確立した後は、得られた試料が結晶化に適した状態にあるかどうかを、物理化学的方法を用いて確認しつつ、結晶化条件のスクリーニングを行った。具体的には、以下に示すように (1) FACT の大量発現・大量精製法の確立および FACT の結晶化、(2) ヒストン試料の大量発現・精製法の改良、(3) FACT-ヒストン複合体の結晶化、複合体試料調製条件の最適化に関して研究を進めた。

(1) FACT の大量発現・大量精製法の確立および FACT の結晶化

Spt16 (120kDa) と SSRP1 (180kDa) の 2 種類のサブユニットから構成されるヒストンシャペロン FACT の組換え蛋白質の生産には、昆虫細胞-バキュロウイルス発現系を用いた。N 末に His-タグを付与した Spt16 とタグを持たない SSRP1 の両サブユニットの全長が共発現するように構築したバキュロウイルスを使用した。ウイルスを純化した後に、感染力価が 1×10^8 pfu/mL 以上になるまで増幅させたものを発現に用いた。昆虫細胞株、培地、培養方法には、スケールアップが容易なものを採用した。また、FACT 発現量が 1L 培養の

細胞あたり 10mg 以上になるようにウィルスの添加量と感染時間とを最適化した。精製法の確立に際しては、結晶化に用いることを前提として、昆虫細胞 1L の培養から高純度な FACT を数 mg 以上得られること、5L 培養分の細胞からの精製にスケールアップが可能であること、精製の全工程を 3 日以内に行えることを目標とした。静的/動的光散乱などの物理化学的手法を用いて溶液中における試料の存在形態を分析しつつ、得られた試料を用いて結晶化条件をスクリーニングした。

(2) ヒストン試料の大量発現・精製法の改良

以前、独自に開発したヒストンの精製方法を用いれば、ヒストン H2A-H2B、ヒストン H3-H4、ヒストン八量体のいずれの試料も数十 mg のスケールで精製することは可能になっていた。しかし、その方法で得られた試料には、ヒストンに対して数% (w/w) の核酸が残存しており、これが原因となって試料を安定な状態で保存することができないという問題があった。また、ヒストンと FACT を混合した際に残存核酸と FACT が非特異的に相互作用して、FACT が沈殿してしまうという問題が発生することも予想された。そこで核酸を可能な限り除去することを目指し、ヒストンの精製方法を改良した。

(3) FACT-ヒストン複合体の結晶化、複合体試料調製条件の最適化

高純度な FACT とヒストンとが相互作用して複合体を形成するかどうかを確認し、その後結晶化条件のスクリーニングを行った。また、目視による観察では、FACT とヒストンとを混合した際に微小な沈殿や凝集体が存在するかどうかを検出することができない。これらの凝集体は、結晶化の阻害要因になるため、このような凝集体が生じないような条件を探索することが必要である。そこで、FACT

とヒストンを混合した際に沈殿や凝集体がほとんど発生せずに複合体が形成される条件を動的光散乱分析法で探索した。得られた結果を複合体再構成条件にフィードバックし、結晶化条件のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) FACT の発現条件を最適化し、1L 培養あたり 20mg 以上の組換え FACT 蛋白質を発現する細胞を調製することに成功した。さらにこの FACT 高発現昆虫細胞を、一度に 10L 培養することが常に可能となるような体制を整えた。FACT の精製では、初期精製に Ni-アフィニティカラムを用いた後、3 種類のカラムによる精製工程を加え、各カラム精製の条件を最適化した (表 1)。その結果、精製開始後 2 日以内に 1L 培養分の昆虫細胞から FACT 蛋白質を 7mg 以上得ることが可能な精製系の確立に成功した (表 1)。

表 1. FACT の精製過程

expression (4 L)	protein conc.	total protein
crude extract (450 mL)	18.3 mg/ml	6.2 g
Ni-sepharose HP (96 mL)	2.66 mg/ml	240 mg
SOURCE 30Q (80 mL)	0.93 mg/ml	74 mg
GHT (16 mL)	1.96 mg/ml	31 mg
Superdex200 (26 mL)	0.9 mg/ml	26 mg

SDS-PAGE (図 1)、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、静的光散乱法等を用いて純度や分子量等を分析したところ、得られた試料は高度に精製できていること、FACT はゲル濾過カラムの溶出体積から予想されるヘテロ四量体ではなく Spt16 と SSRP1 のヘテロ二量体であることが分かり、FACT は球状ではなく棒状に長く伸びた形態を溶液中でとっていることが示唆された (図 2)。この蛋白質を用いて、結晶化のスクリーニングを開始した。幾つかの条件で結晶が得られたが、放射光実

験施設において予備的な回折実験を行った結果、ほとんどが結晶化溶液に含まれる低分子の結晶であることが分かった。

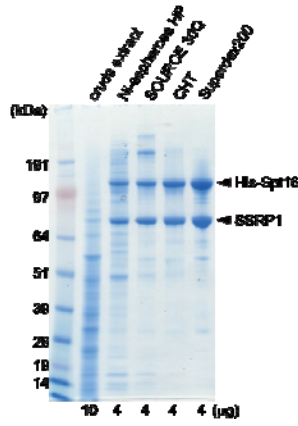


図1 精製 FACT の SDS-PAGE

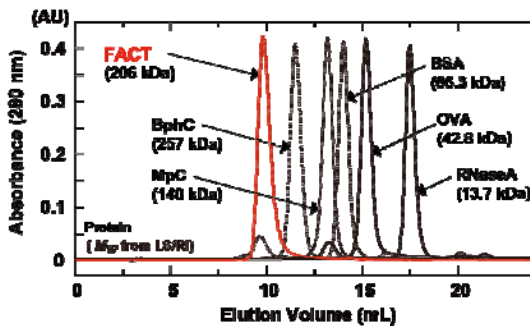


図2 ゲル濾過クロマトグラムと分子量分析結果

(2) 以前に独自に開発していたヒストンの精製法に改良を加え、サンプル中に残存する核酸を可能な限り除去できる精製法を確立した。その結果、ヒストン H2A-H2B、ヒストン H3-H4、ヒストン八量体のいずれの試料においても、一度の精製で数十〜数百 mg の高純度な試料が得られるようになった (図3)。また、精製サンプル内への残存量を低減させた結果、精製したヒストンの長期保管が可能になった。FACT のように安定性に問題があるタンパク質を複合体として結晶化する際には、物理化学的に均一な複数のタンパク質を同時に準備するという点が最も難しく、かつ実験の成否を左右する。今回の技術的な達成

により、ヒストンの長期保管が可能となったため、FACT とヒストンとの複合体の結晶化を、物理化学的に安定なサンプルを用いて行うことが容易に可能となった。

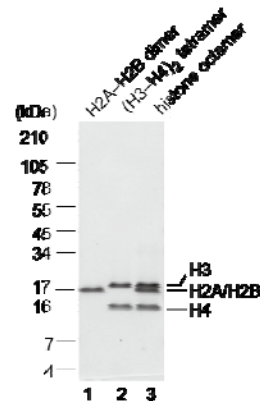


図3 精製ヒストンの SDS-PAGE

(3) 高純度な FACT とヒストンが相互作用して複合体を形成することをプルダウンアッセイにより確認した (図4)。

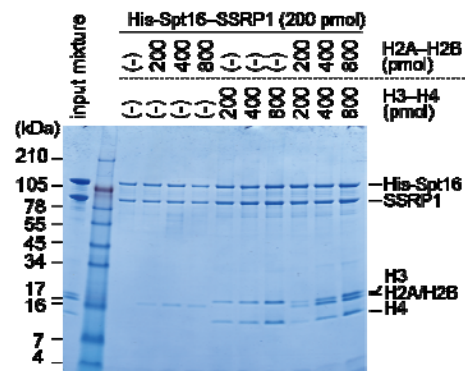
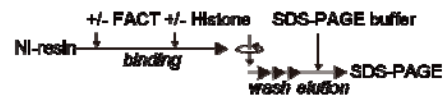


図4 FACT とヒストンの相互作用解析

そこで、FACT とヒストンとを混合して複合体溶液を調製し、結晶化条件のスクリーングを行った。その結果、いくつかの条件で結晶が得られたが、放射光を用いた X 線回折実験の結果、これらの結晶は全て緩衝液などに含まれる低分子性の結晶であることが明らか

になった。

結晶化の過程で別の問題も明らかになった。FACT とヒストンを混合すると場合によっては沈殿が生じることがあるなど、複合体サンプルの挙動が一定せず不安定であることがわかってきた。このような状況では、再現性のある実験結果は望めない。そこで、FACT とヒストンを混合した際に沈殿や凝集体がほとんど発生せずに安定に複合体が形成される条件を確立し、それを基に複合体試料を調製して結晶化条件のスクリーニングを行なうことにした。

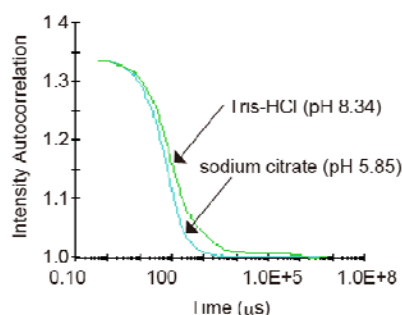


図5 FACT-ヒストン複合体の動的光散乱解析

種々の条件の緩衝液に対して蛋白質試料を加えて動的光散乱分析を行い、得られた粒子径分布によって、沈殿や凝集体の発生を評価した。pH 4.0 および 4.8 の酢酸緩衝液を用いた場合は、FACT のみの添加で直ちに白濁が生じた。他の pH 5.9-8.3 の緩衝溶液中では、多くても全タンパク質量の 1 割強(w/w)しか凝集体は生じなかった。pH 5.9-8.3 の緩衝溶液中に存在する FACT にヒストンを加えて分析した結果、ヒストン H2A-H2B、ヒストン H3-H4、ヒストン八量体のいずれを用いた場合でも、pH 5.9 のクエン酸緩衝液か pH 7.2 の HEPES 緩衝液を用いた条件が、FACT-ヒストン複合体の形成に適していると考えられた。得られた情報を参考にしながら複合体試料を調製し、結晶化条件のスクリーニングを

引き続き行なっている。

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 4 件)

- ① Akai, Y., Adachi, N., Hayashi, Y., Eitoku, M., Sano, N., Natsume, R., Kudo, N., Tanokura, M., Senda, T. & Horikoshi, M. (2010) Structure of the histone chaperone CIA/ASF1-double bromodomain complex linking histone modifications and site-specific histone eviction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8153-8158. 査読有り
- ② Hayashi, Y., Senda, T., Sano, N. and Horikoshi, M. (2009) Theoretical framework for the histone modification network: modifications in the unstructured histone tails form a scale-free network. *Genes Cells*, **14**, 789-806. 査読有り
- ③ Adachi, N., Senda, M., Natsume, R., Senda, T. and Horikoshi, M. (2008) Crystal structure of Methanococcus jannaschii TATA box-binding protein. *Genes Cells*, **13**, 1127-1140. 査読有り
- ④ Senda, M., Muto, S., Horikoshi, M. and Senda, T. (2008) Effect of leucine-to-methionine substitutions on the diffraction quality of histone chaperone SET/TAF-Ibeta/INHAT crystals. *Acta Crystallogr. F*, **64**, 960-965. 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

- ① Senda, T. “Structure-Based Model of the Biological Signaling from Histone Modifications to Structural Change of the Nucleosome” International symposium on the physicochemical field for genetic activities (Jan. 25th, 2011, Awaji, Japan)
- ② 千田俊哉 “ヒストンシャペロン複合体の結晶構造解析” BMB2010 (2010年12月10日、神戸)
- ③ 千田俊哉 “CIA/ASF1を中心としたヌクレオソーム構造変換機構” 構造エピゲノム研究会発足記念シンポジウム (2010年4月30日、横浜)

- ④ Senda, T. “Molecular mechanism of the site-specific histone eviction at active promoter regions” Taiwan-Japan Symposium on crystallography. (Dec. 8th, 2009, Osaka Japan)
- ⑤ Akai, Y. “Structure and function of the human histone chaperone CIA complexed with the bromodomain from TFIID” XXI congress and general assembly of the international union of crystallography. (Aug. 28th, 2008, Osaka, Japan)
- ⑥ Natsume, R. “Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histone H3 and H4” XXI congress and general assembly of the international union of crystallography. (Aug. 26th, 2008, Osaka, Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千田 俊哉 (SENDA TOSHIYA)

独立行政法人・産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター 主任
研究員

研究者番号：30272868

(2) 連携研究者

堀越 正美 (Horikoshi Masami)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
研究者番号：70242089

榎本 武美 (Enomoto Takemi)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：80107383