様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ６ 月 ２０ 日現在

機関番号：２２７０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０８７１７

研究課題名（和文）血液がんに関わるMMSETとヌクレオソーム複合体のクライオ電顕による構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of the MMSET-nucleosome complex involved in blood cancers by cryo-electron microscopy

研究代表者
佐藤　光（SATO, Ko）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：９０３００９６２

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）：ヒストンメチル化酵素MMSETはヒストンH3の36番目のリジンをジメチル化することで遺伝子の転写を活性化している。20%の多発性骨髄腫ではMMSETのタンパク質の量の増加が見られ、また一部のがんでは活性が異常亢進したアミノ酸変異体が見つかっている。本研究ではMMSETのクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によってMMSETと基質ヌクレオソームとの複合体の立体構造を解析し、そのメチル化活性を制御する機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
MMSETは本来基質が結合するクレフトに自己阻害ループがフタをするように結合することで基質との結合がある程度制限されている。一方、E1099KやT1150Aのようながん化型のアミノ酸変異体は、自己阻害ループのフタをする力が弱いため、高いメチル化活性を示すことが立体構造レベルで明らかとなった。この成果は、がん化型MMSETによる調節機構の破綻を回避し、適切な活性制限効果を取り戻すような分子標的薬を設計するための立体構造基盤を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：The histone methyltransferase MMSET activates gene transcription by dimethylated lysine 36 of histone H3. 20% of multiple myeloma patients show increased amounts of MMSET protein, and some cancers have mutations in MMSET that abnormally increase their activity. In this study, we analyzed the three-dimension structure of MMSET in complex with nucleosome by single-particle analysis of MMSET using cryo-EM. We clarified the mechanism that regulates its methylation activity.

研究分野：構造生物学

キーワード：エピジェネティクス　ヒストンメチル化　ヌクレオソーム　クライオ電子顕微鏡

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

真核生物のゲノムは、ヒストンコア(ヒストン H2A、H2B、H3、H4 を各 2 分子ずつ含むヒストン八量体)に約 146bp の DNA が強固に巻き付いたヌクレオソームを基本単位として持つ。さらにこのヌクレオソームはリンカーDNA を介して連なりコンパクトなクロマチンを形成して核内へ収納されている。このようなゲノムが高次に折りたたまれた状態では、転写因子が目的の DNA 配列を認識することが難しく、遺伝子の転写制御に支障をきたすと考えられる。これまでの研究から、ヒストンの翻訳後修飾やクロマチンの構造変化が転写制御に重要な役割を果たすことが知られている(エピジェネティック制御)。例えばヒストンのメチル化、アセチル化など様々な翻訳後修飾は、ヒストンメチル化酵素、ヒストンアセチル化酵素といった修飾を書き込む”writer 因子”によって行われている。さらに書き込まれた修飾は、それらを特異的に読み取る”reader 因子”によって認識され高次に折りたたまれたゲノム構造に変化がもたらされ、最終的に転写因子が DNA にアクセス可能となる。

このような背景からヒストン修飾の破綻は様々な疾患を誘発することが多く、本研究の対象であるヒストン修飾因子 MMSET の異常も、様々ながんを含む疾患の原因となることが報告されているが、分子・原子レベルでの発症メカニズムには不明な点が多い。そのため治療薬開発の基盤となる立体構造に基づいた酵素活性制御メカニズムの解明が待たれている。

２．研究の目的

これまでの研究によりエピジェネティックな制御の破綻が疾患を引き起こす例は数多く報告されている。本研究で取り扱う“ writer 因子”である MMSET は転写が活性な領域や遺伝子間領域のヒストン H3 の 36 番目のリジンをジメチル化(H3K36me2)することで遺伝子の転写活性化に関与している。この MMSET 遺伝子がハプロ不全を起こすとウォルフ・ヒルシュホーン症候群の原因となることが知られている。また多発性骨髄腫の 20%においては、染色体転座 t(4;14)が起こることによって MMSET が過剰に発現することが発症の原因になっている。さらに、他のがんでは触媒ドメイン中の 1099 番目のグルタミン酸がリジンに変異(E1099K)することで、触媒活性が上昇していることが分かっている。以上のことから本研究では、がんの原因となる活性上昇型変異(E1099K)を持つヒストンジメチル化酵素 MMSET と基質であるヌクレオソームとの複合体の立体構造解析を行い、酵素活性制御機構を明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

MMSET の触媒ドメインとヌクレオソームとの複合体を試験管内で再構成し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により立体構造を解析した。酵素活性を示す MMSET の触媒ドメイン(973-1226)は先行研究を参考にして決定した。基質ヌクレオソームを構成する DNA 長はメチル化活性測定を行い必要十分な長さ(185bp)を決定した。MMSET とヌクレオソームを安定な複合体として調製することが良質な立体構造解析を可能とすることから、いくつかの工夫を取り入れた。(1) MMSET は、ヒストン H4 の N 末端とリンカー配列を介した融合タンパク質として調製した。(2)MMSET は酵素活性が亢進している E1099K 変異体を用いた。(3)ヒストン H3 は、先行研究からメチル化酵素との相互作用が強くなることが期待されるヒストン H3 の 36 番目のリジンをメチオニンに変異させた(H3K36M) ものを用いた。 さらに生化学的な解析として、がんの原因となる MMSET の E1099K や T1150A 変異体、得られた立体構造から予想された活性制御を担うアミノ酸等の変異体に関して、ヌクレオソームを基質とした酵素活性測定や結合能の測定を行った。

４．研究成果

本研究では、様々な工夫を行い安定化した MMSET 触媒ドメイン-ヌクレオソーム複合体を試験管内で再構成し、クライオ電子顕微鏡(Titan Krios)による単粒子解析を行った。その結果、約 2.8Åの分解能で立体構造（図１）を得ることができた。得られた複合体構造では典型的なヌクレオソームに比べ、SHL +5.5 付近から末端にかけて DNA がヒストンコアからはがれた構造をとっていた。そして DNA がはがれることで露出したヒストン H3、H2A 部分に MMSET が相互作用し

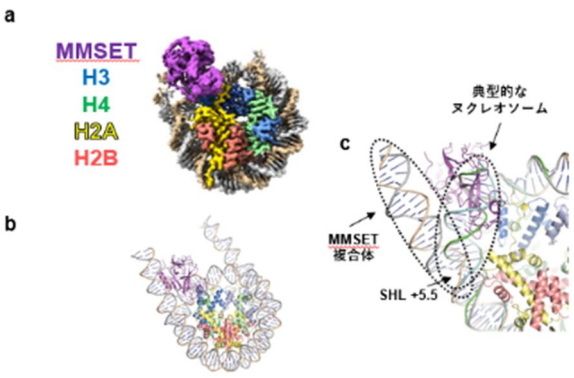

図1 MMSET-ヌクレオソーム複合体の全体構造

ていることが明らかとなった。さらに MMSET はヌクレオソーム DNA の SHL-1 部位、および SHL +5.5 より末端に位置するリンカーDNA 部位の２か所で相互作用をしていた。

基質であるヒストン H3K36M 付近のアミノ酸は MMSET 表面の基質結合クレフトに寄り添うように結合することで、メチル基供与体の近くに位置していた。既に報告されている MMSET 単体の X 線結晶構造解析結果によると、基質結合クレフトは MMSET 触媒ドメイン内(1180-1188:自己阻害ループ)で相互作用しているため、基質結合が阻害されていると推測されていた。これらの構造を詳細に比較した結果(図２)、このヒストン H3 がない単体の状態では、自己阻害ループの D1182 が K1152 や T1150 と結合することで、自己阻害ループが基質結合クレフトに安定して相互作用可能となることが示唆された。一方、ヌクレオソーム複合体では K1152 は結合パートナーが DNA に変わり、D1182 との相互作用はなくなっていた。そのため自己阻害ループは基質結合クレフトから離れ、代わりに H3K36 付近のアミノ酸が結合することが可能となったと考えられた。がん化変異体 T1150A は野生型に比べて酵素活性が異常亢進しているが、その原因として T1150A 変異によって D1182 との相互作用が消失することで自己阻害ループが不安定化し阻害効果が減弱した可能性が考えられた。また E1099K 変異体も酵素活性が異常亢進している。単体構造において、この E1099 は K1124 と相互作用することで自己阻害ループの L1184 を安定化している。E1099K 変異が生じると K1124 との相互作用が破壊され、自己阻害ループを安定化していた相互作用ネットワークの破綻及び再構成が起こるため、自己阻害作用が弱まると推察された。

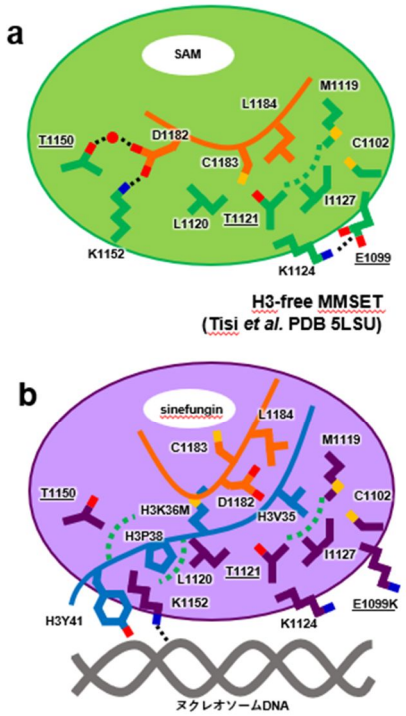

図2 自己阻害ループ(オレンジ色)の構造変化の模式図
a MMSET単体（H3無し）
b MMSET-ヌクレオソーム複合体　H3は青色で示した

次に得られた立体構造情報から考えられる酵素活性異常亢進メカニズムを検証するために野生型、E1099K, T1150A, E1099K-T1150A の 4 種類の単体構造についてそれぞれ分子動力学(MD)シミュレーションによる解析を行った。このシミュレーションでは自己阻害ループがどの程度の比率で基質結合クレフトから離れているか（開状態）を解析した。すると、野生型ではわずか 0.86%が開状態であったのに対し、E1099K、T1150A、E1099K-T1150A 変異体は、高頻度で開状態であることが分かった（それぞれ 9.7%、6.3%、18.8%)。この結果から、活性異常亢進を示す変異体は、その変異によって自己阻害ループの基質結合部位への結合が不安定化されていることが示唆された。

生化学的な解析を様々な変異体について行った。まず、がん化変異体である E1099K や、T1150A 変異体の酵素活性を測定したところ、既報の通り野生型に比べ異常亢進していることを確認した。E1099 をアルギニン、グルタミン、アラニンで置換した変異体も野生型より高い活性を示したことから、1099 番目がグルタミン酸であることが正常な活性調節を示すために必要であることが示唆された。次に速度論的解析を行ったところ E1099K、T1150A の両変異体は野生型と比較して基質ヌクレオソームに対する親和性に大きな差はなく、主にターンオーバー数が上昇していることが酵素活性亢進につながっていることがわかった。また複合体構造から予測されるリンカーDNA と相互作用する主なアミノ酸 K992,K995,K998 をすべてアラニンに変えた変異体では、酵素活性はほとんど無くなっていた。これはリンカーDNA を持たない 146bp DNA を持つ最小単位のヌクレオソームを基質にした場合に酵素活性が弱いという結果とも一致し、リンカーDNA との相互作用が活性に重要であることが示された。

以上のように本研究ではヒストンメチル化酵素 MMSET の立体構造解明、MD 解析、および生化学的解析を行った。その結果、基質の存在しない状態の野生型 MMSET の基質結合クレフトは自己阻害ループによってしっかりフタをされているため、基質が結合する機会が少なくなっていることがわかった。一方、がん化型変異体では、変異によって自己阻害ループのフタをする力が緩められた結果、基質と結合できる状態が増え、酵素活性が異常亢進していることが明らかとなった。これらの結果は酵素活性異常亢進を低減する薬剤開発を行う分子構造基盤を提供するものである。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Sato Ko、Kumar Amarjeet、Hamada Keisuke、Okada Chikako、Oguni Asako、Machiyama Ayumi、Sakuraba Shun、Nishizawa Tomohiro、Nureki Osamu、Kono Hidetoshi、Ogata Kazuhiro、Sengoku Toru	４．巻 -
２．論文標題 Structural basis of the regulation of normal and oncogenic methylation of nucleosomal histone H3 Lys36 by NSD2	５．発行年 2020年
３．雑誌名 bioRxiv	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.12.05.413278	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Sato Ko、Kumar Amarjeet、Hamada Keisuke、Okada Chikako、Oguni Asako、Machiyama Ayumi、Sakuraba Shun、Nishizawa Tomohiro、Nureki Osamu、Kono Hidetoshi、Ogata Kazuhiro、Sengoku Toru	４．巻 12
２．論文標題 Structural basis of the regulation of the normal and oncogenic methylation of nucleosomal histone H3 Lys36 by NSD2	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Nature Communications	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26913-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ヒストンメチル化酵素NSD2は発がん性変異により安全装置が外れ、制御不能になる
https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2021/202111sengoku_nc.html

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関