

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 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770108

研究課題名（和文） 固体 NMR を用いたヌクレオソーム中のヒストンの動的構造解析

研究課題名（英文） Dynamic structural analysis of histone in nucleosome using solid-state NMR

研究代表者

戸所 泰人（TODOKORO YASUTO）

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・特任助教

研究者番号：00533150

研究成果の概要（和文）：ヌクレオソームは染色体の最小単位で、ヒストン 4 種類 8 分子に DNA が巻きついて形成されている。その構造決定は既に行われているが、DNA の転写にかかわる非常に重要な領域であるヒストンテールの構造は示されなかった。本研究では固体 NMR を用いてヌクレオソーム中のヒストン分子の動的な構造解析をおこなった。ヒストンテールはランダムコイル構造をとって運動していることが分かった。それはクロマチン形成下でも、さまざまな機能発現を可能にしていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In eukaryotic cells the fundamental structural unit of chromatin is a nucleosome core, consisting of two copies of four histones and DNA, whose crystalline structures have been determined. However in the crystals the N-terminal histone tails, which are responsible for gene regulations by their chemical modifications could not be well identified. Here, we have examined the structures of N-terminal histone tails by solid-state NMR and suggested that the histone tails hold flexible random coil structures, which might play significant roles in gene regulations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：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：核磁気共鳴法、固体 NMR、構造生物学、ヌクレオソーム、ヒストン、クロマチン、天然変性

1. 研究開始当初の背景

ヒストンは、真核生物の染色体（クロマチン）を構成するタンパク質で、非常に長い分子である DNA を核内に収納する役割を担っている。ヒストンと DNA の相互作用は遺伝子

発現の最初の段階である転写に大きな影響を及ぼしている。

ヌクレオソームは染色体の最小単位であり、ヒストン八量体（ヒストンオクタマー）に 146 bp の DNA を左巻きに約 1.65 回巻き付いたものである。ヒストン八量体は H2A、

H2B、H3、H4 の 4 種類ヒストン分子がそれぞれ二分子ずつ集まり形成されている。

転写が活性化されるためにはクロマチン構造が緩み、プロモーター上の DNA はタンパク質からはがされる（裸になる）必要がある。それにはヒストンのメチル化、アセチル化、脱アセチル化、リン酸化、ユビキチン化などの化学修飾が発現制御に重要である。これらの化学修飾は他のタンパク質の認識のためのコードになっていると考えられている。この生体超分子の織りなすマシナリーをすべて原子レベルで解明しないと遺伝子の発現制御の機構はわからない。

固体 NMR は、近年、急速に発展し、立体構造やダイナミックスの解析に使われるようになってきている。それは固体 NMR に関連した技術の進歩だけではなく、X 線結晶解析や溶液 NMR といった今までタンパク質の構造決定法では対応できない膜タンパク質、繊維状タンパク質、巨大なタンパク質などがターゲットとなって来ているからである。

そこで、本研究では固体 NMR を用いてヌクレオソーム中のヒストンの動的構造解析をおこなう。

2. 研究の目的

本研究において、固体 NMR を用いたヌクレオソーム(分子量 200 kDa)中のヒストン(分子量 110 kDa)の動的な構造解析をおこなう。固体 NMR 法では、試料調製において結晶化、可溶化が必要なく、溶液 NMR 法のような分子量の限界 (20 kDa) は存在しない。そこで、これまで研究で用いられてきた X 線結晶構造解析では解析できない運動性の大きい領域や溶液 NMR では測定できない大きな分子量をもつクロマチン構造について、固体 NMR 法を適用し、ヒストンの運動性の高い領域 (ヒストンテール) の構造の解析をおこなう。その運動性の高い領域こそが、DNA の転写にかかわる非常に重要な領域で、その構造を解析し、機能発現機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

研究代表者の所属する研究室におけるヌクレオソームの大量調製技術の完成を目指した。人の H2A、H2B、H3.1、H4 からヒストンオクタマーに 146 bp DNA を再構成したものを目的のヌクレオソームとした。また、多次元スペクトルを得る NMR 装置でタンパク質の解析を行うためには ^{13}C 、 ^{15}N といった安定同位体を導入する必要がある。シグナルの混

雑さを減らすため、 ^{13}C 、 ^{15}N 標識は H2A のみとした。

精製したヌクレオソームは基本的に溶液に溶けている状態で存在している。そのため、どのように固体 NMR 用試料にするか検討をおこなった。具体的には凍結乾燥法と Mg^{2+} イオンによる凝集法の 2 つを検討した。

その結果、イオン凝集法によって作成した試料を固体 NMR により構造解析をおこなった。試料を凍らせ、試料の運動性をなくし、固体 NMR 法の手法で 2 次元 C-C 相関測定をおこなった。また、溶液 NMR で使われる手法とマジック角試料回転法を組み合わせることで、運動性の高い領域の 2 次元 H-C 相関測定をおこなった。

固体 NMR 法から得られた化学シフト値、構造を解析していかなければならないが、その簡略化モデルとして、H2A/H2B 二量体 (ダイマー) の解析を試みた。溶液 NMR の化学シフト値と分子動力学シミュレーションから、その二量体構造、ヒストンテールを評価した。

4. 研究成果

平成 22 年 9 月に 900MHz 固体 NMR 装置の磁場が消失し、震災の影響もあり復旧が平成 23 年 8 月になった。さらに平成 23 年 9 月にプローブが故障し、平成 22 年 9 月から平成 23 年 12 月まで固体 NMR 装置を使用することができなかった。固体 NMR 装置が使えたのは短い期間であったが、今後につながる重要な成果が得られた。

上記の固体 NMR 装置が使用できない期間中に研究代表者の所属する研究室におけるヌクレオソームの大量調製技術が完成し、固体 NMR 測定に十分な約 16 mg の H2A のみ ^{13}C 、 ^{15}N 標識したヌクレオソームを作成することに成功した。

固体 NMR 用試料を作成するために、凍結乾燥法と Mg^{2+} イオンによる凝集法の 2 つを検討した。凍結乾燥法では大量の凍結保護剤を用いることでヌクレオソームの分解が避けられた。一方、イオン凝集法ではヌクレオソームのみでできた沈殿をえることができた。この沈殿は凍結融解にも強く、クロマチン構造のモデルとして考えられ、生物学的にも重要である。そこでイオン凝集法を採用した。

まず、試料を凍らせ、試料の運動性をなくし、固体 NMR 法の手法で 2 次元 C-C 相関測定をおこなった。このスペクトルを溶液 NMR 法で帰属した H2A/H2B 二量体の化学シフト値をマッピングしてみると非常によく重なった (図 1)。化学シフト値はタンパク質の二次構造をよく反映しているため、H2A/H2B 二量体とヌクレオソームの H2A は非常に似た構造を

とっていることが分かった。

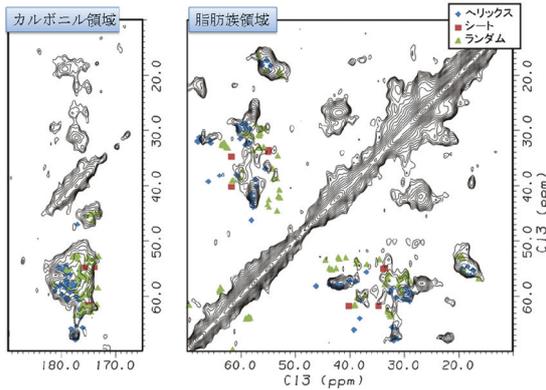


図1 2次元C-C相関スペクトル

溶液NMRで使われる手法とマジック角試料回転法を組み合わせることで、運動性の高い領域の2次元H-C相関測定をおこなった。このスペクトルを解析すると、ヒストンテールはランダムコイル構造をとっていることがわかった(図2、図3)。つまり、クロマチン構造形成下でもヒストンテールは運動していて、さまざまな機能発現を可能にしていると考えられた。

こうして世界で初めてヌクレオソーム中のヒストンの固体NMRによる解析が成功した。

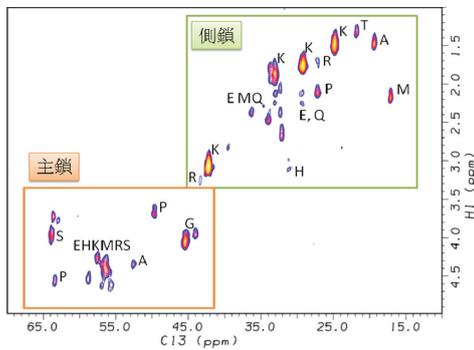


図2 2次元H-C相関スペクトル

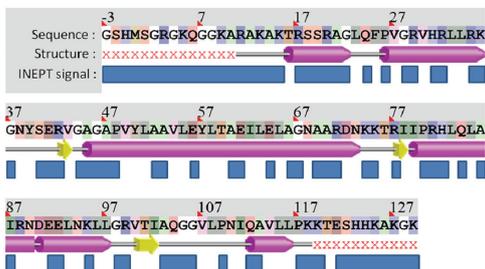


図3 シグナル帰属(アミノ酸単位)のマッピング

固体NMR法から得られた化学シフト値、構造を解析していくが、その簡略化モデルとして、H2A/H2B二量体(ダイマー)の解析を試

みた。溶液NMRの化学シフト値と分子動力学シミュレーションから、その二量体構造、ヒストンテールを評価した。

溶液NMRによって帰属されたH2A/H2B二量体の化学シフト値から二面角を予測し、それを用い、ヌクレオソームのX線結晶構造をテンプレートとしてH2A/H2B二量体モデルを作成した。その構造から計100 ns時間の分子動力学シミュレーションを行い、それらの構造から化学シフト値を予測した(図4)。構造の指標として $\Delta C\alpha - \Delta C\beta$ ($\Delta C\alpha$ 、 $\Delta C\beta$ はそれぞれのランダムコイルとの化学シフト値の差)を用いた。この指標では1.4ppm以上が α ヘリックス構造、-1.4ppm以下が β シートとなる。図のように、NMRによる化学シフト値をよく再現することができた。また、ランダムコイル構造であるヒストンテールにおいて、一部ヘリックスやシートに近い値を示すものがあった(H2A:22番目周辺、H2B:5番目周辺、ヒストンテールの平均-0.8ppm)。このような残基は潜在的に二次構造を取りうる領域なのかもしれない。機能としては重要であるが、構造として扱うことが難しいタンパク質の天然変性領域を扱う一つの手法を提案することができた。

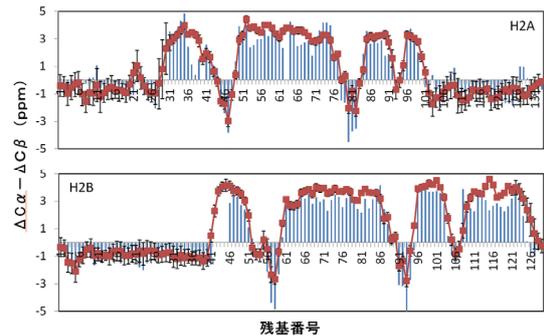


図4 実測(棒)と予測(折線)の化学シフト値の比較

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2件)

- ① Yumen I, Iwasaki I, Suzuki T, Y. Todokoro, Tanaka K, Okada O, Fujiwara T, Yoshida M, Akutsu H. Purification, characterization and reconstitution into membranes of the oligomeric c -subunit ring of thermophilic F_0F_1 -ATP synthase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* (査読有) **82**, 396-401(2012).

- ② Todokoro Y, Kobayashi M, Sato T, Kawakami T, Yumen I, Aimoto S, Fujiwara T, Akutsu H. Structure analysis of membrane-reconstituted subunit c -ring of *E. coli* H⁺-ATP synthase by solid-state NMR. *J Biomol NMR* (査読有) **48**, 1-11 (2010).

[学会発表] (計 5 件)

- ① 戸所泰人、田中健太郎、湯面郁子、岩崎郁、鈴木俊治、吉田賢右、藤原敏道、阿久津秀雄. 脂質二重膜へ再構成プロトン ATP 合成酵素 subunit c -ring の固体高分解能 NMR 法による構造解析. 第 10 回日本蛋白質科学会年会 2010.6 札幌コンベンションセンター (北海道)
- ② Kang S-J, Todokoro Y, Yumen I, Iwasaki I, Tanaka K, Suzuki T, Yoshida M, Fujiwara T, Akutsu H. Expression and purification of H⁺-ATP synthase subunit c -ring from Thermophilic Bacillus and its structure analysis by solid-state NMR. 23rd International Conferences on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS) 2010.8 Cairns Convention Centre (Australia)
- ③ 戸所 泰人、カン スジン、田中 健太郎、湯面 郁子、岩崎 郁、鈴木 俊治、吉田 賢右、藤原 敏道、阿久津 秀雄. 脂質二重膜再構成 H⁺-ATP 合成酵素 subunit c -ring の固体高分解能 NMR 法による構造解析. 第 11 回 日本蛋白質科学会年会 2011.6 ホテル阪急エキスポパーク (大阪)
- ④ Kang S-J, Bak S, Todokoro Y, Yumen I, Iwasaki I, Suzuki T, Fujiwara T, Yoshida M, Akutsu H. Solid-state NMR analysis of H⁺-ATP synthase subunit c -ring from Thermophilic Bacillus. 第 50 回 NMR 討論会 記念国際シンポジウム The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011 (ISNMR 2011) 2011.11 大さん橋ホール (神奈川)
- ⑤ 七種 和美、畔上 奈々子、戸所 泰人、長土居 有隆、立和名 博昭、胡桃坂 仁志、西村 善文、明石 知子. 質量分析で観測されるヒストンテイルの挙動. 新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」第二回公開シンポジウム 2012.1 千里ライフサイエンスセンター (大阪)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸所 泰人 (TODOKORO YASUTO)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・特任助教

研究者番号：00533150