トピックス

新しい染色体基盤構造ユニットであるオーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶構造

加藤大貴¹, 胡桃坂仁志^{1,2,3}

¹早稲田大学先進理工学研究科電気・情報生命専攻

²早稲田大学理工学術院

³早稲田大学構造生物・創薬研究所

1. はじめに

真核生物の遺伝情報の担い手であるゲノム DNA は、高次に折りたたまれたクロマチンを形成し、細胞核内にコンパクトに収納されている。クロマチンはヌクレオソームを基本単位として、それらが連なることで構成されている。ヌクレオソームは、塩基性のヒストンタンパク質 (H2A, H2B, H3, H4) 各 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体の周りに約 150 塩基対の DNA が左巻きに 1.65 回転巻きついた構造体である¹⁾。クロマチンは均一の構造体ではなく、ヌクレオソーム中のヒストンの翻訳後修飾の有無や、ヒストンバリエント (ヒストンの亜種) の存在、サブヌクレオソーム (通常のヌクレオソームと異なるヒストン含量のヌクレオソーム) の形成、クロマチン結合因子の影響などにより、その構造を変化させて DNA の機能発現を制御する。このうち、サブヌクレオソーム構造については、通常のヌクレオソームとの区別が細胞レベルでは困難であるため、その解析が立ち遅れていた。しかし、近年の次世代シーケンサーなどの技術進歩によって、徐々にサブヌクレオソームに関する解析が進展し、注目を集めつつある²⁾。また、クロマチンの動的な構造変換の 1 つとしてクロマチンリモデリングが知られている。クロマチンリモデリングは、クロマチンリモデリング因子と呼ばれるタンパク質群によって、DNA 上でのヌクレオソームの形成位置が変化する現象である^{3), 4)}。その際、ヌクレオソーム同士が衝突し、2 つのヌクレオソーム同士が重なり合った特殊な構造体が形成されることが示唆されていた⁵⁾。我々はこの分子を“オーバーラッピングダイヌクレオソーム”と呼んでいる。オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成は、

DNA 配列依存的に起こりうる可能性も示唆されており^{2), 5)-7)}、その生体内での多様な機能が示唆されている。しかし、オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造は、明らかになっていなかった。本稿では、我々が X 線結晶構造解析の手法を用いることで解明した、オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造について紹介する。

2. オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造解析

オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶化を行うため、試験管内でオーバーラッピングダイヌクレオソームの再構成を行った。ヌクレオソーム中のヒストンの DNA に対する相対位置を、601 配列の DNA を使用することで固定した。601 配列の DNA を組み合わせた 250 塩基対の DNA を用いることで、オーバーラッピングダイヌクレオソームを試験管内で再構成できることはすでに示されていた^{5), 8)}。そこで、601 配列の DNA を 2 つ組み合わせた 250 塩基対の DNA およびリコンビナントタンパク質として精製したヒトのヒストンを用いたヒストン 8 量体を調製した。DNA と塩基性のタンパク質であるヒストンを低塩濃度で混合すると、DNA とヒストンが非特異的に結合してしまい、ヌクレオソームを再構成することができない。そこで、高塩濃度条件下で DNA とヒストン 8 量体を混合し、徐々に塩濃度を低下させることで、オーバーラッピングダイヌクレオソームを試験管内で再構成した。再構成されたオーバーラッピングダイヌクレオソームを、分取用電気泳動装置 Prep Cell を用いて精製した。得られた試料について、native electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) による解析を行ったところ、再構成された複合体は、250 塩基対の DNA、

Crystal Structure of Overlapping Dinucleosome, the New Basic Unit of Chromatin

Daiki KATO¹ and Hitoshi KURUMIZAKA^{1,2,3}

¹Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University

²Research Institute for Science and Engineering, Waseda University

³Institute for Medical-oriented Structural Biology, Waseda University

図 1

A. オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶構造。H2A-H2B 複合体を 1 分子含むヘキサソームユニットと H2A-H2B 複合体を 2 分子含むオクタソームユニットが重なり合った特殊な構造を形成している。シアンはヘキサソームユニット中の H2A-H2B 複合体、マゼンタはオクタソームユニット中の H2A-H2B 複合体をそれぞれ示している。H3-H4 複合体はグレーで示している。B. ヌクレオソーム同士が衝突する面から H2A-H2B 複合体が解離することで、オーバーラッピングダイヌクレオソームが形成される。(PDB: 5GSE)

各 4 分子の H3 と H4、各 3 分子の H2A と H2B からなる複合体であることがわかった。このことは、先行研究で予測されたオーバーラッピングダイヌクレオソームの構成とよく一致した⁵⁾。次に、精製したオーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶化を行った。得られた結晶に対し、大型放射光施設である SPring-8, Photon Factory を用いた高輝度 X 線による X 線回折実験を行った。その結果、良質の X 線回折データを取得することに成功した。既知のヌクレオソームの立体構造と、それをもとに作製したヘキサソームのモデル構造を用いた分子置換法によって位相決定を行い、オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造を 3.14 Å の分解能で決定した (図 1A)⁹⁾。

3. オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造

今回明らかにしたオーバーラッピングダイヌクレオソームの構造では、オクタソーム (ヒストン 8 量体に DNA が巻きついた構造体) とヘキサソーム (ヒストン 6 量体に DNA が巻きついた構造体) の 2 つのユニットが緊密に連結することで、ヒストン 14 量体の周りに DNA が約 3 回転巻きついた特殊なポリヌクレオソーム構造を形成していることが明らかになった。また、ヘキサソーム部分の構造中では、オクタソームと近接している面の H2A、H2B が各 1 分子ずつ欠落していた (図 1B)。この H2A、H2B の欠落により、ヘキサソーム構造内における H3 の α N ヘリックスが通常のオクタソーム中の α N ヘリックスと比較して、顕著に短くなっていることがわかった。 α N ヘリックスは、ヌクレオソーム中の出入り口付近で、DNA と相

図 2

A. ゲノム解析の概略図。B. ゲノム解析の結果より、オーバーラッピングダイヌクレオソームが、転写開始点直下の領域に形成されることが示唆された。

互作用することが知られる重要な領域である。さらに、H2A、H2B の欠落は、オクタソームとヘキサソームの緊密な融合を可能にしていた。特に、ヘキサソーム中の H3 の 56 番目のリジンおよび 80 番目のスレオニンがオクタソーム中の DNA と、オクタソーム中の H2A の 68 番目のアスパラギンと 71 番目のアルギニン、および H2B の 108 番目のリジン、112 番目のセリン、116 番目のリジンが、ヘキサソーム中の DNA と近接しており、これらのアミノ酸と DNA との相互作用の可能性が示唆された。そこで、これらのアミノ酸をアラニンもしくは酸性アミノ酸に置換した変異体を用いた解析を行った結果、変異体を用いた場合においてもオーバーラッピングダイヌクレオソームが再構成可能であることがわかった。しかし、X 線小角散乱を用いた解析から、これらの変異体を含むオーバーラッピングダイヌクレオソームは、野生型と比較して、回転半径が若干大きくなった溶液構造を形成していることが示された。また、この性質には、特に H3 の 56 番目のリジンと 80 番目のスレオニンが重要であることがわかった。

4. 生体内におけるオーバーラッピングダイヌクレオソームの形成

生体内におけるオーバーラッピングダイヌクレオソームの形成領域を調べるため、球菌ヌクレアーゼ (Micrococcal nuclease: MNase) を用いた解析を行った。MNase は、ヒストンと直接結合していないリンカー DNA 領域を優先的に切断する DNA 分解酵素である。オーバーラッピングダイヌクレオソームに対して、MNase による DNA 切断実験を行った。その結果、通常のヌクレオソームと比較して、オーバーラッピングダイヌクレオソームでは、オクタソームとヘキサソームとの間にリンカー DNA 領域を持たないため、MNase

によって極端に切断されにくい性質を有することが明らかになった。そこで、HeLa 細胞から核を抽出してゲノム DNA を MNase で消化し、得られた 250 塩基対程度のゲノム DNA 断片について、次世代シーケンサーを用いた解析を行った。そして、オーバーラッピングダイヌクレオソームと予想される 250 塩基対の DNA 断片が、ヒトゲノム上では転写開始点の直下流にマッピングされることが明らかになった (図 2A)。このことは、転写開始点の直下の領域にオーバーラッピングダイヌクレオソームが形成されることを示唆した (図 2B)。

5. | 終わりに

ヌクレオソームの原子分解能での立体構造は、1997 年に初めて明らかにされた。それ以降、これまでに 100 種類以上のヌクレオソームの立体構造が明らかにされている。特に近年は、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析の技術進歩によって、様々なクロマチン結合タンパク質とヌクレオソームとの複合体や、高次クロマチンの構造解析がなされており、クロマチンの構造生物学が急速に進展している。一方で、通常とは異なるヒストン含量のヌクレオソームの原子分解での立体構造は未だ明らかにされていなかった。本稿で紹介したオーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造は、原子分解能で通常型とは異なる特殊なヌクレオソームの立体構造を明らかにした初めての例である。また、最近、古細菌の特殊なクロマチンの結晶構造が Luger らのグループから発表され、これまで知られているオクタソーム構造とは異なる特殊な構造が示された¹⁰⁾。これらの研究成果は、クロマチンの構造の多様性を示す重要な知見である。今後、さらに多様なクロマチンの基盤構造が明らかになることで、生体内におけるクロマチンの機能発現機構が明らかになっていくことが期待される。

文 献

- 1) Luger, K. *et al.* (1997) *Nature* **389**, 251-260. DOI: 10.1038/38444.
- 2) Lai, W. K. M., Pugh, F. (2017) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 548-562. DOI: 10.1038/nrm.2017.47.
- 3) Mueller-Planitz, F. *et al.* (2013) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1026-1032. DOI: 10.1038/nsmb.2648.
- 4) Clapier, C. R., Cairns, B. R. (2009) *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 273-304. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223.
- 5) Engholm, M. *et al.* (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 151-158. DOI: 10.1038/nsmb.1551.
- 6) Brogaard, K. R. *et al.* (2012) *Nature* **486**, 496-501. DOI: 10.1038/nature11142.
- 7) Struhl, K., Segal, E. (2013) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 267-273. DOI: 10.1038/nsmb.2506.
- 8) Lowary, P. T., Widom, J. (1998) *J. Mol. Biol.* **276**, 19-42. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1494.
- 9) Kato, D. *et al.* (2017) *Science* **356**, 205-208. DOI: 10.1126/science.aak9867.
- 10) Mattioli, F. *et al.* (2017) *Science* **357**, 609-612. DOI: 10.1126/science.aaj1849.

加藤大貴

加藤大貴 (かとう だいき)

早稲田大学先進理工学研究科電気・情報生命専攻
博士後期課程在学中

研究内容: クロマチンの立体構造解析

連絡先: 〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2 早稲田大学先端生命医科学センター 01C603

E-mail: d-katou@ruri.waseda.jp

URL: <http://www.eb.waseda.ac.jp/kurumizaka/>

胡桃坂仁志

胡桃坂仁志 (くるみざか ひとし)

早稲田大学理工学術院教授

1989 年東京薬科大学卒業, 95 年埼玉大学大学院理工学研究科博士後期課程修了, 博士 (学術). NIH 博士研究員, 理化学研究所研究員を経て, 2003 年早稲田大学理工学部助教授. 08 年より現職.

研究内容: クロマチン構造とダイナミクス

連絡先: 同上

E-mail: kurumizaka@waseda.jp

URL: 同上