

ユビキチン化ヒストンを含むヌクレオソームの構造解析

Structural analysis of the nucleosome containing ubiquitinated histones

町田晋一¹, 関根慧¹, 西山友貴¹, 堀越直樹², 胡桃坂仁志^{1,2,3,*}

¹ 早稲田大学 先進理工学研究科, ² 早稲田大学 理工学術院総合研究所,
³ 早稲田大学 構造生物・創薬研究所, 〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2

Shinichi Machida¹, Satoshi Sekine¹, Yuuki Nishiyama¹, Naoki Horikoshi², Hitoshi Kurumizaka^{1,2,3,*}

¹Structural biology laboratory, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, ²Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, ³Institute for Medical-oriented Structural Biology, Waseda University, 2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8480, Japan

1 はじめに

真核生物のゲノム DNA は核内タンパク質と結合し、高次に折りたたまれたクロマチン構造として細胞核内に収納されている。クロマチンの最小機能単位であるヌクレオソームは、4 種類のヒストンタンパク質 H2A、H2B、H3、H4 が 2 分子ずつから構成されるヒストン 8 量体に約 150 塩基対の DNA が巻きついた円盤状の構造体である。転写をはじめとする DNA の機能発現は、クロマチン構造のダイナミクスによって厳密に制御されていることが近年明らかになってきた。このクロマチンのダイナミクスを制御する要因として、ヒストンの翻訳後修飾、ヒストンバリエント、DNA のメチル化などが挙げられるが、これらの要因によるクロマチンダイナミクスの制御機構については未だ不明な点が多く残されている。本研究では、ヒストンの翻訳後修飾のひとつであるユビキチン化に着目して、ユビキチン化ヒストンを含むヌクレオソームの X 線結晶構造解析を行った。

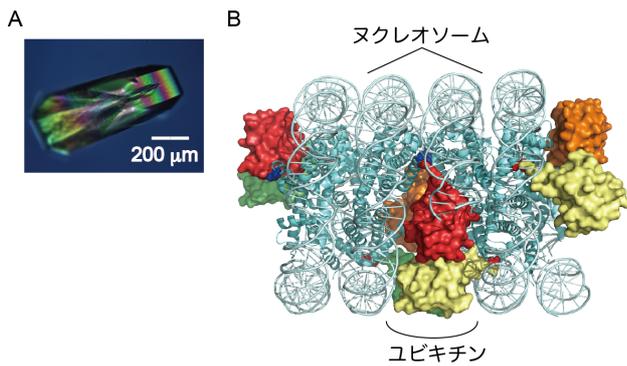
2 実験

本研究では、転写が活発な遺伝子領域に局在するヒストン H2B の 120 番目のリジン残基 (以降、H2B K120) および H4 の 31 番目のリジン残基 (以降、H4 K31) のユビキチン化に着目し、これらの残基を部位特異的にユビキチン化したヒストン H2Bub120 および H4ub31 を合成した[1-4]。さらに、これらを含むヌクレオソームを試験管内で再構成した。これらのユビキチン化ヒストンを含むヌクレオソームを用いて結晶化を行った。得られた単結晶を用いて、BL-1A および BL-17A にて X 線回折データを収集し、ユビキチン化ヒストンを含むヌクレオソームの立体構造を決定した。

3 結果および考察

H2Bub120 および H4ub31 がヌクレオソーム構造に及ぼす影響を解析するために、H2Bub120 および H4ub31 を含むヌクレオソームを試験管内で再構成した。まず、H2B の 120 番目および H4 の 31 番目のアミノ酸にユビキチン分子を付加するために、H2B K120C および H4 K31C 変異体を精製し、ジスルフィド結合を介してユビキチン分子を付加した[5]。調製した H2Bub120、H4ub31、および H2A、H3 を用いて、DNA 存在下でヌクレオソームを塩透析法によって再構成した。

次に、H2Bub120 および H4ub31 を含むヌクレオソームの立体構造を明らかにするために、H2Bub120 および H4ub31 を含むヌクレオソームの結晶化を行った。その結果、十分なサイズかつ良質な単結晶を得ることに成功した (図 1A)。得られた単結晶を用いて、X 線回折データを収集した。収集した X 線回折データを HKL2000 によって処理した結果、3.33 Å で空間群は P3₂ であることが分かった。また、既知の非修飾ヒストンを含むヌクレオソーム構造 (PDB ID: 3AV1) を用いて分子置換によって位相決定を行った。得られた初期構造をもとに、PHENIX および COOT を用いて構造の精密化を行い、ユビキチン化ヒストンを含むヌクレオソームの立体構造を決定した。構造解析の結果、隣り合ったヌクレオソームの間には、ユビキチン分子が収まる空間が存在するものの、ユビキチンの電子密度は観察されなかった (図 1B)。このことは、ヌクレオソームに結合したユビキチンは、著しく運動性が高いことを示唆している。



of monoubiquitinated human histones H2B and H4,
Open Biol., 6: 160090, 2016

* kurumizaka@waseda.jp

図1：ユビキチン化ヌクレオソームの立体構造

4 まとめ

モノユビキチン化はヒストンの主要な翻訳後修飾のひとつである。細胞内においては1~5%程度のH2Bがユビキチン化されていることが報告されていることから、ヒストンのユビキチン化修飾は重要な機能を有することが示唆されている。本研究では、転写活性化領域に局在するヒストンH2B K120 およびH4 K31のユビキチン化に着目した。そして、これらのユビキチン修飾がヌクレオソーム構造に及ぼす影響を明らかにするために、H2Bub120 およびH4ub31を含むヌクレオソームを用いてX線結晶構造解析を行った。

その結果、ヌクレオソームに結合したユビキチン分子は、運動性が著しく高いことが明らかとなった。このことから、H2Bの120番目およびH4の31番目に付加された高い運動性を有するユビキチン分子が、転写などのゲノムDNA機能において抑制的に働くクロマチンの凝縮に対して阻害的に働くことが考えられた。生化学的解析によって、このアイデアを支持する結果を得ている。これらの結果を統合して、クロマチンにおけるユビキチン修飾の、DNA機能発現制御への寄与を解明するために、重要な知見を得ることができた。

謝辞

本実験を遂行するにあたり、PF BL-1A およびBL-17Aのビームラインスタッフの方々にはデータ収集および解析において大変お世話になりました。

参考文献

- [1] Minsky N., et al., *Nat. Cell Biol.*, **10**, 483-488 (2008).
- [2] Shema E., et al., *Genes Dev.*, **22**, 2664-2676 (2008).
- [3] Jung I., et al., *Genome Res.*, **22**, 1026-1035 (2012).
- [4] Kim K., et al., *Cell Rep.*, **5**, 1690-1703 (2013).
- [5] Chatterjee C., et al., *Nat. Cell Biol.*, **6**, 267-269 (2010).

成果

1. Machida S, Sekine S, Nishiyama Y, Horikoshi N, Kurumizaka H. Structural and biochemical analyses