

ヒストンシャペロン HIRA C Domain の X 線結晶構造解析 X-Ray Crystallographic Analysis of Histone Chaperone HIRA C Domain

佐藤優花里¹, 千田俊哉^{1*}

¹高エネルギー加速器研究機構, 〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Yukari Sato¹ and Toshiya Senda¹

¹High Energy Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

1 はじめに

真核生物の染色体はヒストン八量体に DNA が巻き付いたヌクレオソームの繰り返し構造から成る。真核生物の遺伝情報の継承や発現には「解離」と「再構築」というヌクレオソームの構造変換を伴う。ヌクレオソーム構造変換は、ヒストン、基本転写因子、ヒストンシャペロン、ヒストンアセチル化酵素・脱アセチル化酵素などのタンパク質群の逐次的な相互作用により実現し、これらの分子の機能異常は癌や発生異常に直結する。

ヌクレオソームへのヒストンの取り込みに関与するヒストンシャペロン HIRA は、ヒトが有するヒストン H3 バリエーションのうち、転写時、特に生殖系列や受精卵、胚で豊富に存在する H3.3 と複合体を形成することが示唆されている [1-4]。タンパク質全長 1017 a.a. からなるヒト HIRA は (1) β -プロペラ構造と相同性を示す A domain、(2) CIA/Asf1 と相互作用する B domain、(3) 二つの WD モチーフを有する C domain から構成される。申請者らのグループは X 線結晶構造解析と出芽酵母を用いた分子生物学実験により、ヒストンシャペロン CIA/Asf1 がヒストン(H3-H4)₂ 四量体を二量体に分割するモデルを提唱した [5]。HIRA は CIA/Asf1 に結合することが明らかになってきたため [6]、HIRA は CIA/Asf1-H3.3-H4 と相互作用し、クロマチンへのヒストン H3.3-H4 の取り込みに関与するというモデルを立てている。しかしながら、ヒト HIRA 全長は立体構造をとらない天然変性領域を 40%以上含むと予想され、高純度での精製や結晶化は困難で、その生化学的性質の情報不足のため、ヌクレオソーム再構築機構は分子生物学における大きな未解決問題の一つとして残されていた。申請者らは約 400 アミノ酸残基から構成されるヒト HIRA C domain の発現系と結晶化方法を確立した。そこで本研究は、ヌクレオソームの「再構築」に関与するとされ、立体構造が未知のヒストンシャペロン HIRA C domain の立体構造を解明し、ヌクレオソーム再構築の反応機構解明のための基盤情報とすることを目的とした。

2 実験

[タンパク質の精製]

ヒト HIRA C domain は純度 95%以上で精製できたものの、濃縮すると沈殿した。そこで differential

scanning fluorimetry (DSF) を実施して、C domain を高濃縮できるバッファー条件を確立した。

[結晶化]

HIRA C domain の Native タンパク質と Se-Met 置換体タンパク質を結晶化した。

[X 線回折データの収集]

構造生物学ビームライン PF BL-1A, BL-5A, BL-17A, PF-AR NE3A を用いて X 線回折強度データの収集を行った。Se-Met 置換体結晶は Se-SAD 法で測定した。Native 結晶は各ビームラインのデフォルト波長 (0.98-1.10 Å) と Native-SAD 法で測定した。

3 結果

XDS を用いてデータ処理を行った結果、最大で 2.45 Å 分解能のデータが得られた (表 1)。HIRA C domain の立体構造は Se-Met 置換体結晶を用いた SAD 法で 2.70 Å の分解能にて決定した。C domain Native の初期位相は Se-Met 置換体の結晶構造をモデルに用いた分子置換法により決定した。MR Native-SAD 法により Native タンパク質の立体構造精密化を行った。

表 1: Crystallographic summary

Data collection	
X-ray source	PF
Beamline	BL-17A
Osc. angle (°)	0.50
Exposure time (s)	0.50
Wavelength (Å)	0.98
Temperature (K)	95
Space group	C2
Unit-cell parameters (Å, °)	$a=149.99$, $b=86.80$, $c=99.15$, $\alpha=\gamma=90.00$, $\beta=102.49$
Resolution (Å)	20.00-2.45 (2.54-2.45)
Completeness (%)	99.46 (99.84)
Redundancy	13.34 (3.50)
$I/\sigma I$	19.40 (2.86)
R_{merge} (%)	0.04 (0.50)
Wilson B -factors (Å) ²	58.75

括弧内は最外殻分解能の値を示す

4 まとめ

構造生物学ビームライン PF BL-17A でヒト HIRA C domain の Native タンパク質結晶を用いて 2.45 Å 分解能のデータを収集することができた。Se-Met 置換体結晶を用いた SAD 法により既に HIRA C domain の結晶構造を決定できており、現在、構造精密化を進めている段階である。

謝辞

実験をサポートして下さったビームラインスタッフと PF の皆様に感謝致します。

参考文献

- [1] Tagami *et al.*, *Cell*, **116**, 51-61 (2004).
- [2] Chow *et al.*, *EMBO Rep.*, **6**, 354-360 (2005).
- [3] Mito *et al.*, *Nat. Genet.*, **37**, 1090-1097 (2005).
- [4] Ooi *et al.*, *PloS. Genet.*, **2**, 883-895 (2006).
- [5] Natsume *et al.*, *Nature*, **446**, 338-341 (2007).
- [6] Tang *et al.*, *Nat. Struc. Biol.*, **13**, 921-929 (2006).

成果

1. 学会発表
佐藤優花里、千田俊哉
第 89 回 日本生化学会大会
ヒストンシヤペロン HIRA C domain の立体構造解析

* toshiya.senda@kek.jp