

オーバーラッピングダイヌクレオソームの構造解析 Structural analysis of the overlapping dinucleosome

有村泰宏¹、胡桃坂仁志^{1*}

¹東京大学、定量生命科学研究所、〒113-0032, 東京都文京区弥生 1-1-1

Yasuhiro ARIMURA¹ and Hitoshi KURUMIZAKA^{1*}

¹Institute for Quantitative Biosciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan.

本研究において、H2A、H2B が 3 分子ずつと、H3、H4 が 4 分子ずつからなるヒストンの 14 量体の周りに DNA が巻きついた、オーバーラッピングダイヌクレオソームと呼ばれる特殊なヌクレオソームの立体構造を、3.14Å の分解能で X 線結晶構造解析によって明らかにした。本研究によって、主要なヌクレオソーム（ヒストン 8 量体に DNA が巻きついたヌクレオソーム）とは異なる特殊なヌクレオソームの原子分解能での立体構造を初めて明らかにした。

1 はじめに

真核生物のゲノム DNA には様々なタンパク質や RNA が結合し、クロマチン構造を形成している。クロマチンの基本構成単位は、ヌクレオソームと呼ばれる DNA とヒストンタンパク質の複合体である。細胞内の大多数のヌクレオソームは、4 種のヒストン（H2A、H2B、H3、H4）各 2 分子ずつで構成されるヒストン 8 量体の周りに DNA が 1.7 回転巻きついたオクタソームと呼ばれる構造体である[1]。本研究においては、オーバーラッピングダイヌクレオソームと呼ばれる特殊なヌクレオソームの立体構造を、X 線結晶構造解析によって明らかにした。オーバーラッピングダイヌクレオソームは H2A、H2B が 3 分子ずつと、H3、H4 が 4 分子ずつからなるヒストンの 14 量体の周りに DNA が巻きついた構造体である。遺伝子発現調節などに伴って、プロモーターや遺伝子コード領域のヌクレオソームの形成位置が変化する際にヌクレオソーム同士が衝突することで、オーバーラッピングダイヌクレオソームが形成されることが、試験管で再構成したヌクレオソームを用いた生化学的解析によって示唆されていた[2], [3]。

本研究では、試験管内でオーバーラッピングダイヌクレオソームを再構成し、X 線結晶構造解析によって、3.14 Å の分解能でその立体構造を明らかにした（図 1）。この成果は *Science* 誌に掲載された（成果 1）。

2 実験

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するために、250 塩基対の DNA を調製した。さらに、ヒトの各種ヒストンタンパク質（H2A、H2B、H3、H4）をリコンビナントタンパク質として精製した。精製したヒストンを用いて、4 種のヒストン（H2A、H2B、H3、H4）各 2 分子ずつを含むヒストン 8 量体を再構成した。これらの DNA とヒストンとを高塩濃度下で混合し、徐々に塩濃度を低下させることで、試験管内でオーバーラッピングダイヌクレオソームを再構成した。再構成したオーバーラッピングダイヌクレオソームを、分

取用電気泳動装置を用いて、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製した。精製したオーバーラッピングダイヌクレオソームをハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化した。結晶化においては、結晶化ロボット DropSetter NT8 (Formulatrix) を用いて、70 μ L のレーザーバー溶液(100 mM potassium bromide, 100 mM potassium thiocyanate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1.5% PGA-LM30, 12% PEG 400)に対して、0.1 μ L のレーザーバー溶液の混合液を蒸気拡散によって、20°C において数日から数週間、平衡化した。結晶の観察には、自動結晶観察装置 RockImager182 (Formulatrix) を用いた。得られた結晶をクライオプロテktan溶液に浸潤し、液体窒素で凍結し、Uni-puck に装填して photon factory の BL-1A および BL-17A に持ち込み、クライオプロテktan溶液の最適化を行い、X 線回折データを取得した。

HKL2000 を用いて 3.14 Å の分解能でスケーリングを行った。位相決定は Molrep を用いて分子置換法によって行い、サーチモデルには、146 塩基対の DNA を含むヌクレオソーム構造 (PDB ID:3AFA)、および既知のヌクレオソーム構造をもとに作成したヘキサソームのモデル構造の 2 つを用いた。分子置換法によって得られた初期構造について、phenix、coot を用いて精密化を行なった。その結果、3.14 Å の分解能で、オーバーラッピングダイ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

今回決定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から、オーバーラッピングダイヌクレオソームは、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 回転巻きついた構造を形成していることが明らかになった。

また、オーバーラッピングダイヌクレオソームは、H2A、H2B を 3 分子ずつと、H3、H4 を 4 分子ずつ含む複合体であり、ヌクレオソーム二つ分のヒストン含有量 (H2A、H2B、H3、H4 が 4 分子ずつ) に比べて、H2A と H2B が 1 分子ずつ少ない。そのためオーバーラッピングダイヌクレオソームが形成される際には、2 つのヌクレオソームのうち、片方のヌクレオソームから、H2A と H2B が 1 分子ずつ解離すると考えられた。今回決定した立体構造から、オーバーラッピングダイヌクレオソーム中のヘキサソームユニットは、オクタソームユニットと接する面の H2A と H2B を欠失していた。オーバーラッピングダイヌクレオソームが形成される際には、2 つのヌクレオソームの向き合う面から、H2A および H2B が解離すると考えられた。

さらに、ヘキサソームユニットとオクタソームユニットの間に形成される相互作用に着目すると、ヘキサソームユニット中の H3 の Lys56 および Thr80 がオクタソームユニット中の DNA と、オクタソームユニット中の H2A の Asn68 と Arg71 および H2B の Lys108、Ser112、Lys116 がヘキサソームユニット中の DNA と近接しており、相互作用することが考えられた。これらのアミノ酸を酸性アミノ酸に置換することで、DNA との相互作用を失わせるような変異体を設計して、X 線小角散乱によって解析したところ、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成効率には影響がなかったものの、通常オーバーラッピングダイヌクレオソームよりも回転半径が大きくなるのが、X 線小角散乱解析によって明らかになった。そのため、これらのアミノ酸は、オーバーラッピングダイヌクレオソームの形成には必須ではないものの、その構造を安定に保つために必要であることが考えられた。

4 まとめ

ヌクレオソームはゲノム DNA 上に数珠状に形成されており、クロマチンリモデリング因子によって、プロモーターや遺伝子コード領域のヌクレオソームの形成位置が変化させられる際に、ヌクレオソーム同士が衝突し、オーバーラッピングダイヌクレオソームと呼ばれる特殊なヌクレオソーム構造が形成される場合があることが示唆されていた。

本研究では、試験管内でオーバーラッピングダイヌクレオソームを再構成し、X 線結晶構造解析によって、3.14 Å の分解能でその立体構造を明らかにした。この構造中では、ヒストン 6 量体に DNA が巻きついたヘキサソームと、ヒストンの 8 量体に DNA が巻きついたオクタソームが重なり合い、ヒストン 14 量体に DNA が左巻きに 3 回転巻きついた特殊な立体構造を形成していた。

本研究によって、通常ヌクレオソーム (ヒストン 8 量体に DNA が巻きついたヌクレオソーム) とは異なる特殊なヌクレオソームの原子分解能での立体構造が世界で初めて明らかになった。

ゲノム解析の結果、このオーバーラッピングダイヌクレオソームが転写開始点の近傍に形成されていることが示唆された。今後、オーバーラッピングダイヌクレオソームの機能について明らかにしていきたい。

謝辞

X 線回折データの収集にあたり、ご協力いただいた PF のスタッフの方々に深くお礼申し上げます。

参考文献

- [1] K. Luger *et al.*, *Nature* **389**, 251-260 (1997).
- [2] M. Engholm *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 151-158 (2009).
- [3] N. P. Ulyanova and G. R. Schnitzler, *Mol. Cell. Biol.* **25**, 11156-11170 (2005).

成果

- [1] D. Kato *et al.*, *Science* **356**, 205-208 (2017).

* kurumizaka@iam.u-tokyo.ac.jp

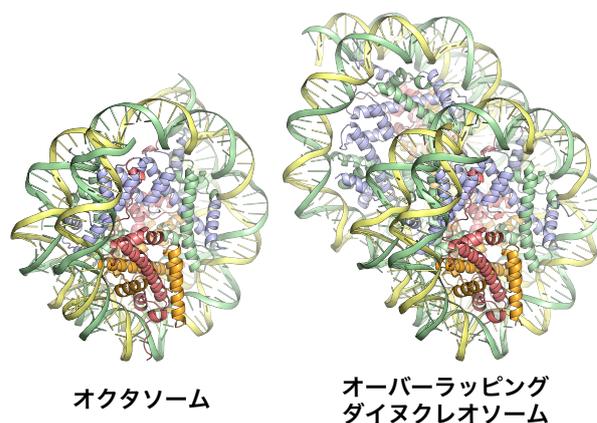


図1 オクタソームと、オーバーラッピングダイヌクレオソームの立体構造