

# がんに関わるヒストン H2B E76K 変異体を含むヌクレオソームの構造解析

## Structural analysis of the nucleosome containing cancer-associated histone mutant H2B E76K

田中大貴<sup>1,2</sup>, 胡桃坂仁志<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> 東京大学 定量生命科学研究科, 〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

<sup>2</sup> 早稲田大学 先進理工学研究所, 〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2

Hiroki TANAKA<sup>1,2</sup> and Hitoshi KURUMIZAKA<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Quantitative Biosciences, The University of Tokyo,  
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0032, Japan

<sup>2</sup> Waseda University, 2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8480, Japan

### 1 はじめに

真核生物の遺伝情報を担うゲノム DNA は、核内の様々なタンパク質や RNA と結合し、クロマチンと呼ばれる高次構造体を形成して核内に収納されている。転写、複製、修復、組換えなどの DNA の機能発現は、クロマチンの構造変換を介して制御されている。クロマチンの基本構造単位はヌクレオソームと呼ばれる、4 種類のヒストンタンパク質 (H2A、H2B、H3、H4) それぞれ 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体に DNA が巻き付いた構造体である。ヌクレオソーム中のヒストン翻訳後修飾や、主要型ヒストンがヒストンバリエーションに置き換わることにより、多様なヌクレオソーム構造の形成が可能になり、それらの構造や物理的性質の違いによってゲノム DNA の機能発現制御の多様性が担保されている。

近年、ヒストン遺伝子の変異が、がん細胞に高頻度で見られることが相次いで報告されている [1-2]。しかし、これらのヒストンの変異がどのように細胞のがん化に関わっているのか、そのメカニズムは未だ未解明の問題である。そこで今回、我々はがん細胞において高頻度で見られる H2B E76K 変異に着目し、H2B E76K を含んだヌクレオソームを試験管内で再構成し、X 線結晶構造解析を行った。本成果は *Nucleic Acids Research* 誌に掲載された [成果 1]。

### 2 実験

H2B E76K を含むヌクレオソームを試験管内で再構成するために、各種ヒストン (H2A、H2B wild-type、H2B E76K、H3.1、H4) をリコンビナントタンパク質として精製した。精製した各ヒストンを用いて、ヒストン複合体を再構成し、146 塩基対の DNA と混合して、塩透析法により H2B wild-type を含むヌクレオソーム (以降、H2B wild-type ヌクレオソーム) 及び H2B E76K を含むヌクレオソーム (以降、H2B E76K ヌクレオソーム) を再構成した。精製した H2B wild-type ヌクレオソーム及び H2B E76K ヌ

クレオソームを用いて結晶化を行い、単結晶を得た。得られた単結晶をクライオプロテクト溶液に浸潤し、液体窒素で凍結し、Uni-puck に装填して photon factory の BL-1A にてクライオプロテクト溶液の最適化を行い、X 線回折データを収集した。HKL2000 を用いてスケーリングを行った。位相決定は Phaser を用いて分子置換法によって行い、サーチモデルには既知のヌクレオソームの X 線結晶構造 (PDB ID:2CV5) を用いた。分子置換法によって得られた初期構造を Phenix、Coot を用いて精密化を行った。その結果、それぞれ 2.09Å 分解能、1.99Å 分解能で H2B wild-type ヌクレオソーム及び H2B E76K ヌクレオソームの立体構造を決定した。

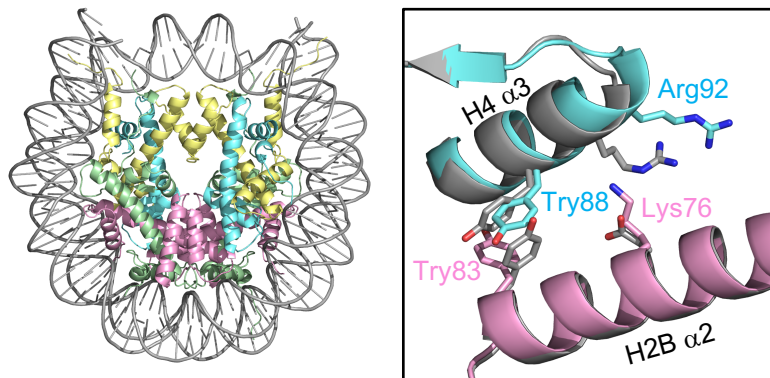
### 3 結果および考察

今回決定した H2B wild-type ヌクレオソームと H2B E76K ヌクレオソームの構造比較を行った。その結果、H2B E76K ヌクレオソーム中では、H2B の Lys76 と隣接する H4 の Arg92 との間で静電的に反発し合うことで、H4 の Arg92 周辺の  $\alpha 3$  ヘリックスの位置が、H2B wild-type ヌクレオソームと比較して大きく異なっていることが明らかになった。更にこの構造変化に伴い、H2B の Tyr83 と H4 の Tyr88 との間の水素結合および芳香環同士のスタッキング相互作用が失われていた (図 1)。したがって、H2B E76K ヌクレオソームは、ヌクレオソーム中での H2B-H4 間の相互作用が部分的に失われることで、ヌクレオソームの安定性が低下していることが示唆された。そこで、H2B wild-type ヌクレオソームと H2B E76K ヌクレオソームとで、熱耐性試験を用いた構造安定性の比較解析を行ったところ、H2B E76K ヌクレオソームは H2B wild-type ヌクレオソームと比べて著しく不安定であることが明らかになった。また細胞内における H2B E76K の動態を FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) 法によって解析した結果、H2B E76K は H2B wild-type と比べて、H2A-H2B の交換速

度が速いことが分かった。このことより、生細胞においても H2B E76Kヌクレオソームは構造不安定であることが示された。

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

以上のことから H2B E76K のヒストン変異は、ヌクレオソームの不安定化を引き起こすことで、細胞のがん化を誘導すると考えられた。



H2B E76Kヌクレオソームの  
全体構造

wild-type との構造比較

図 1 : H2B E76Kヌクレオソームの立体構造

#### 4 まとめ

近年、ヒストン遺伝子の変異ががん細胞において高頻度で見られることが報告されている。しかしこのような変異がどのようにして細胞のがん化に関与するのかは明らかになっていない。そこで本研究では、がん細胞において高頻度で見られる H2B E76K 変異に着目し、H2B E76Kヌクレオソームを試験管内で再構成し、X線結晶構造解析によって立体構造の決定を行った。その結果、H2B E76Kヌクレオソーム中では、H2BとH4との間の相互作用が部分的に失われていることが明らかになった。生化学的解析および細胞生物学的解析によって、実際に H2B E76Kヌクレオソームは不安定であることが示され、H2B E76Kヌクレオソームにおける構造変化の結果と良い一致を示した。

本研究によって、ヒストン遺伝子の変異による発がんメカニズムの解明のための重要な知見を得ることができた。

#### 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] C. Kandoth *et al.*, *Nature* **502**, 333-339 (2013)
- [2] I. Martincorena and P. Campbell, *Science* **349**, 1483-1489 (2015)

#### 成果

1. Y. Arimura *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **46**, 10007-10018 (2018)