

# CIA/ASF1-(H3-H4)-MCM2 複合体の X 線結晶構造解析

## X-ray crystallographic analysis of CIA/ASF1-(H3-H4)-MCM2 complex

赤井祐介<sup>1</sup>, 羅羽華<sup>1</sup>, 佐藤優花里<sup>1</sup>, 千田美紀<sup>1</sup>, 千田俊哉<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>高エネルギー加速器研究機構, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1Yusuke Akai<sup>1</sup>, Yu-Hua Lo<sup>1</sup>, Miki Senda<sup>1</sup>, and Toshiya Senda<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>High Energy Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

我々のグループでは、ヒストンと相互作用しヌクレオソームの破壊・再構築に関与するヒストンシャペロンに着目し、エピジェネティック情報伝達機構との関連を明らかにするための研究を進めている。本課題では、DNA 複製の際にヒストン運搬の鍵となると考えられる(H3-H4)-MCM2 複合体複合体の結晶構造を明らかにすることを旨とする。

### 1 はじめに

真核生物のゲノム DNA は、ヒストン複合体に巻き付いてヌクレオソーム構造を形成している。一方、ヌクレオソーム中のヒストンは細胞内外のシグナルに応じてアセチル化などの翻訳後修飾を受け、この翻訳後修飾がエピジェネティック情報としてヌクレオソームの構造変換を制御し、遺伝子の発現パターンに影響を与えている。遺伝子の発現パターンが細胞分裂を経て維持・変換される仕組みは多細胞生物にとって必須であり、そのためにはヒストンの翻訳後修飾などのエピジェネティック情報が細胞分裂の際に親細胞から娘細胞に受け継がれる必要があると考えられている。しかし、ヒストン上のエピジェネティック情報伝達の分子機構は、(1) ヒストンの運搬に関わる分子が多く分子機構の解析が困難であり、(2) 運搬されるヒストンの数が膨大かつ翻訳後修飾などの結果として多様性に富むために通常の生化学的方法では分子レベルの詳細な解析が難しく、全く解明されていない。このような困難を克服するためには、ヒストン運搬の鍵となる複合体の立体構造を明らかにし、立体構造から得られるタンパク質間相互作用の情報に基づいて生化学、遺伝学、生物学的な実験をデザインし、核内での複雑なヒストン運搬の分子機構を詳細に解析することが必要である。我々のグループでは、ヒストンと相互作用しヌクレオソームの破壊・再構築に関与するヒストンシャペロンに着目し、エピジェネティック情報伝達との関連をヒストンシャペロン、及びその相互作用因子との複合体の結晶構造に基づき研究してきた [1, 2, 3]。また、DNA の複製フォーク上で CIA/ASF1 は、CIA/ASF1-(H3-H4)-MCM2 複合体を形成して複製の進行・伸長反応の速度を制御するとともに、親ヌクレオソームの破壊とヒストンの運搬、及び娘ヌクレオソームの再構築をも協調的に制御していることを提案した [4]。実際に、CIA/ASF1-(H3-H4)-MCM2 複合体中に親ヌクレオソーム由来のヒストンが含まれるという実験結果

が示されており [5]、この複合体はヒストン運搬の反応中間体と考えられている。本課題では、DNA 複製の際にヒストン運搬の鍵となると考えられる(H3-H4)-MCM2 複合体複合体の結晶構造を明らかにすることを目的として研究を進める。

### 2 実験、結果および考察

#### 【結晶化】

精製したヒストン(H3-H4)<sub>2</sub> 複合体、MCM を混合し、結晶化スクリーニングを行った結果、約 2 週間で 100  $\mu\text{m}$  の大きさの薄い板状結晶を得ることができた。結晶を泳動した結果から、得られた結晶には MCM とヒストン H3-H4 が含まれていることが確認できている。

#### 【X 線回折強度データの収集】

PF の構造生物学ビームライン PF BL-1A, 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。クライオプロテクタントの検討を行った結果、30% グリセロールまたは 30% PEG600 を含む標準母液に 30 秒ソーキングした場合に 3.0  $\text{\AA}$  分解能程度の回折が生じた。XDS を用いてデータ処理を行った結果、3.25  $\text{\AA}$  分解能のデータを得ることができた (表 1)。

#### 【構造解析】

MOLREP を用いて分子置換法で構造決定を試みた。その結果、複合体の一部のモデル構築を行うことができたが、不明瞭な部分が多く、構造決定には至っていない。今後は、Se-Met 誘導体結晶を用いた SAD データの収集、結晶化条件の検討による結晶の大型化、クライオプロテクタントの最適化による分解能の向上等を行うことで全体構造の決定を目指したい。

表 1: Crystallographic summary

Data collection	
X-ray source	PF-AR
Beamline	NE3A
Osc. angle (°)	0.5
Exposure time (s)	1
Wavelength (Å)	1.0000
Temperature (K)	95
Space group	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å, °)	$a=63.7, b=80.6, c=107.5$
Resolution (Å)	64.47–3.25 (3.43–3.25)
Observations	65,197 (9,864)
Unique reflections	16,823 (2,530)
Completeness (%)	99.9 (100.0)
Redundancy	3.8(3.8)
Average $I/\sigma(I)$	9.3 (3.5)
Rmerge (%)	0.137 (0.458)
Mosaicity (°)	0.3
B-factor (Å <sup>2</sup> )	41.3

括弧内は最外殻分解能の値を示す

#### 4 まとめ

PF の構造生物学ビームライン PF-AR NE3A で (H3–H4)–MCM2 複合体結晶を用いて 3.25 Å 分解能のデータを収集することができた。分子置換法による構造決定を試みたものの、現段階で結晶構造を解明するには至っていない。

#### 参考文献

- [1] Muto *et al.* *PNAS* (2007)
- [2] Akai *et al.* *PNAS* (2010)
- [3] Natsume *et al.* *Nature* (2007)
- [4] Ishikawa *et al.* *Genes Cells* (2011)
- [5] Groth *et al.* *Science* (2007)

\* toshiya.senda@kek.jp