

2023年7月13日
横浜市立大学
金沢大学

ヒストンシャペロンとヒストンの複合体構造を 統合的な相関構造解析法により初めて解明

横浜市立大学大学院生命医科学研究科の大友秀明特任助教、山根努特任助教（現理化学研究所上級研究員）、小田隆研究員（現 J-PARC 研究員）、栗田順一特任助教、津中康央特任助教、池口満徳教授、西村善文特任教授は、金沢大学ナノ生命科学研究所の古寺哲幸教授との共同研究で、クロマチンの基本構造であるヌクレオソームの解離会合に関与するヒストンシャペロンとヒストンの動的な結合構造を統合的な相関構造解析法により初めて解明しました。今後、核内タンパク質の原子レベルでの機能解明による新たな治療薬の開発などへの応用が期待されます。

本研究は、『Journal of Molecular Biology』に掲載されました（2023年6月26日オンライン）。

研究成果のポイント

- 統合的な相関構造解析法として、核磁気共鳴（NMR^{*1}）、X線小角散乱（SAXS^{*2}）、多角度光散乱（MALS^{*3}）、原子間力顕微鏡（AFM^{*4}）、分子動力学（MD^{*5}）計算と生化学実験を用いた
- クロマチンの基本構造であるヌクレオソームの構築や解離に関与するヒストンシャペロン^{*6}NAP1とヒストン H2A-H2B の動的な複合体構造を解明
- NAP1はワイヤ付きヘッドホン構造の凹部でヒストン H2A-H2B と結合し、さらにもう一つの H2A-H2B は2本のワイヤで動的に結合
- 動的に動くワイヤがヌクレオソーム中の H2A-H2B の結合保持と介助に必要

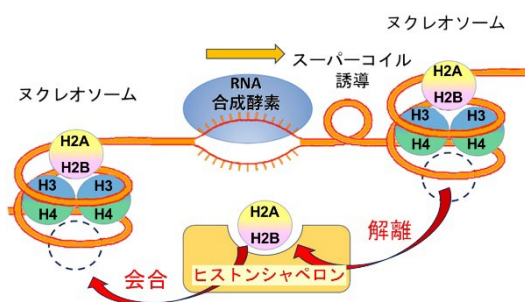


図：NMR、SAXS、MALS、AFM、MD 計算と生化学実験など複数の解析手法を組み合わせた統合的な相関構造解析法の概要図

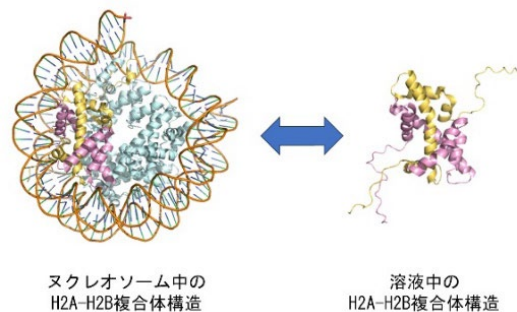
研究背景

真核生物の DNA は様々な因子によって折りたたまれ、クロマチン構造と呼ばれる形をとっています。クロマチンは、ヒストンタンパク質に DNA が巻き付いたヌクレオソームという構造体がリンカー DNA で繋がれた繰り返し構造を基本とし(図 1)、コアの構造は X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) によって決定されています。

ヌクレオソームには 4 種類のヒストン (H2A、H2B、H3、H4) が 2 個ずつ含まれており、H3-H4 の 4 量体構造を核として H2A-H2B の 2 量体構造が上下に重なり、約 145 塩基対の DNA が巻き付いています (図 1,2)。



(図 1) RNA 合成酵素が DNA 二重らせんをほどこきヌクレオソーム中の H2A-H2B が解離する模式図



(図 2) ヌクレオソーム中と解離した単離の時の H2A-H2B の構造

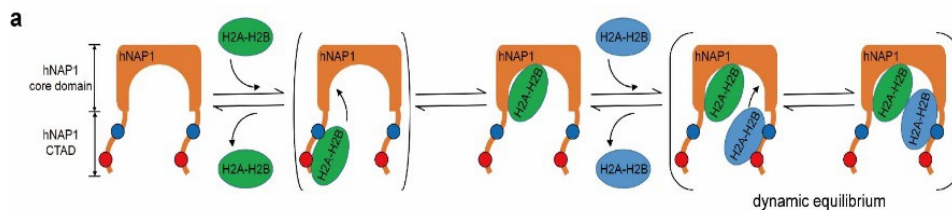
ヌクレオソーム中のヒストンの構造に関しては X 線や Cryo-EM で多数報告されていますが、解離した単独の H2A-H2B の構造は本研究グループにより NMR や MD 計算で初めて報告しました (参考 1)。ヒストンの H2A や H2B の N 末や H2A の C 末はふらふら揺らいでいて特定の構造を取っていませんが、H2A-H2B のコアの構造はヌクレオソーム中とほとんど同じでした。さらにヌクレオソーム中で H2A と H2B の N 末構造の揺らぎ方は単独の場合と異なっていて、お互いに 2 つのコンホメーションで揺らいでいる事も報告しています (参考 2)。RNA 合成や DNA 合成の時には DNA の二重らせんはほどかれて、ヌクレオソームからヒストン H2A-H2B が解離し、また合成が終了した後のヌクレオソームでは DNA は巻き戻され H2A-H2B はヌクレオソーム中に再構成されます。ヒストンの解離会合にはヒストンシャペロンと呼ばれるタンパク質が関与します。シャペロンとは元々は社交界にデビューする少女の付き添い役の意味ですが、タンパク質が機能する時にその介添え役として使用され、ヒストンの補助タンパク質としてヒストンシャペロンが機能します。ヒストンシャペロン NAP1 は当時の東京大学薬学部の石見らにより日本オリジナルのヌクレオソーム再構成に必要なタンパク質として 1984 年に同定され (参考 3)、主にヒストン H2A-H2B の核内輸送やヌクレオソームへの会合や解離に必要なタンパク質です。

ヌクレオソームの X 線結晶構造を初めて解析した Luger らにより酵母の NAP1 の X 線結晶構造解析が報告され NAP1 は 2 量体を形成しヘッドホン型構造をしていました (参考 4)。さらにヘッドホンから出たワイヤの様な紐様構造が NAP1 の C 末にあります (CTAD)、結晶中では見えていません。ヘッドホン構造の凹部には負の電荷を帯びた溝を形成し、正電荷に富んだヒストンと結合していると考えられてきました。アミノ酸の配列からヘッドホ

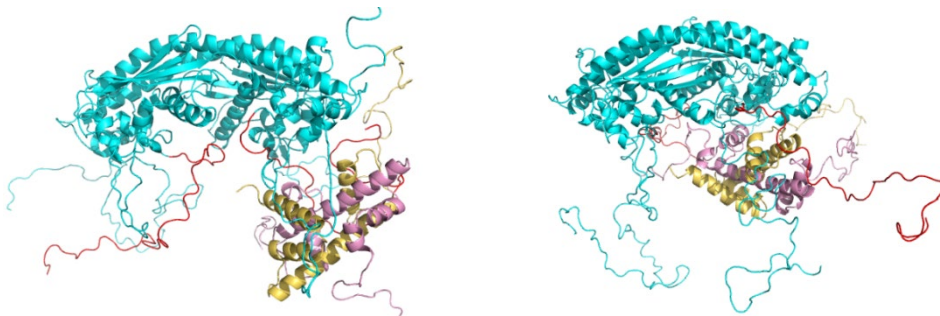
ン構造はヒトを含めてほとんど同じです。紐様構造の CTAD は多様性があり、やはり負電荷を帯びたアミノ酸が多くヒストンと結合することが示唆されてきました (図 3, 4)。



(図 3) 計算で得られたヒト NAP1 の 2 量体構造。ヘッドホン型構造の上から見た図で上下に紐様の CTAD が動的に揺らいでいる。



(図 4) ヒト NAP1 の 2 量体が突き出た CTAD が H2A-H2B と相互作用する模式図 (参考 5)。1 個目の H2A-H2B は CTAD に結合したのちに NAP1 の溝に動的に取り込まれ 2 個目の H2A-H2B は CTAD に結合する。



(図 5) NAP1 の CTAD に H2A-H2B が結合した構造。(左)NMR で求めた CTAD 単独と H2A-H2B の複合体構造を NAP1 の全体構造に当てはめた構造の 1 例。(右) NAP1 の溝に H2A-H2B が結合した構造の 1 例。SAXS の実験からは NAP1 に H2A-H2B が 1 個結合したときには左の構造が約 8%で右の構造が約 92%の割合で動的に存在することが分かった。

本研究グループは既にヒト NAP1 の CTAD がヒストン H2A-H2B と非常に強く結合し、CTAD が無いとヌクレオソームの再構成が出来なくなることを報告しています (参考 5)。またヒト NAP1 に H2A-H2B が結合すると CTAD 領域と NAP1 の凹部の領域の間で動的に結合している事も報告しています。これまでに NAP1 と H2A-H2B の複合体構造が X 線結

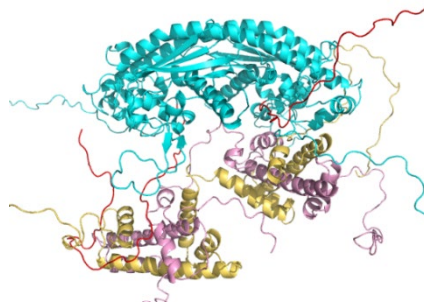
晶構造解析で報告されてきましたが、多様な静的な結合様式が報告され実際の溶液中での動的な結合様式は全く不明でした。

研究内容

本研究では溶液中の多様な動的な結合様式を解明するために、核磁気共鳴 (NMR)、X 線小角散乱 (SAXS)、多角度光散乱 (MALS)、原子間力顕微鏡 (AFM)、分子動力学 (MD) 計算と生化学実験を用いました。

NMR は分子量が大きいタンパク質の構造を解析する事は困難なので、先ず単離した CTAD と H2A-H2B の複合体構造を NMR で求めました。溶液中の H2A-H2B の 2 量体の全体構造は既に本研究グループで解析していました (参考 1)。CTAD 中の 2 つの部位が H2A-H2B の塩基性領域と疎水性領域に結合していることが分かり NMR 構造を求める事が出来ました。さらに NAP1 全体を NMR で測定すると CTAD 領域はふらふらして、単離した CTAD と同じようにシグナルを観察でき H2A-H2B を加えると単離した CTAD と同じように CTAD 部位のシグナルが変化しました。NAP1 に 1 個の H2A-H2B が結合した時の MALS と SAXS の実験から、NAP1 の CTAD に結合した構造と NAP1 の溝に結合した構造の動的な分布があり約 8% が CTAD 結合型で約 92% が溝結合型でした (図 5)。

次に H2A-H2B が 2 個結合した状態の MALS/SAXS の実験から 1 個の H2A-H2B は CTAD 結合型でもう 1 個は溝結合型でした (図 6)。



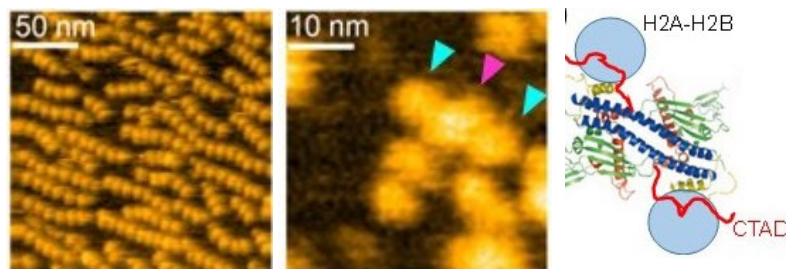
(図 6) NAP1 に 2 個の H2A-H2B が結合した構造の 1 例。1 個の H2A-H2B は CTAD 結合型でもう 1 個は溝結合型であった。

これらの構造は当研究室で以前提案したモデルを支持する構造でした。

NAP1 と H2A-H2B の複合体の構造解析が今まで非常に困難だった理由の一つは NAP1 の CTAD がふらふら揺らいでいて CTAD の構造的な役割が不明であったことと、同じ溝結合型でも動的に揺らいでいて結晶構造解析で静的な描像を得にくいことでした。また NAP1 は 2 量体が安定な基本構造ですが、さらに NAP1 は以下の AFM 像で示すように多量体構造をとります。よって溶液中で NAP1 の構造を解析する時には常に様々な多量体構造が生じ、均一な系での構造解析が困難になります。H2A-H2B を加えると AFM 像で示すように NAP1 は 2 量体に解離し、2 個の H2A-H2B との CTAD 結合型の像が得られました。溝結合型が全く見えない理由は AFM で NAP1 を観察する時に NAP1 の溝の部位が顕微鏡に用いる基板表面に結合して覆われているためであると考えられます。また NAP1 が多量体を形成する理由は、NAP1 が細胞質で存在する時に多量体のプール (貯蔵庫) を形成し、細胞質

で新生された H2A-H2B に NAP1 を迅速に供給するためだと考えられます。H2A-H2B と結合する時は、NAP1 は 2 量体になり、核に移行しヌクレオソームの構築に関与します。単独の NAP1 が多量体を形成しやすいことは、均一な系での構造解析では大きな妨害になります。ヌクレオソームへの H2A-H2B の結合や解離の機能には NAP1 の 2 量体で十分です。よって多量体形成をしない NAP1 変異体を作成し AFM で安定な 2 量体を確認しました (図 7)。

本研究では均一な系での溶液構造解析を行うために、H2A-H2B 結合の機能は保持した NAP1 変異体を用いています。さらにゲルろ過 (size exclusion chromatography : SEC) を用いてタンパク質の会合体が均一な条件で SAXS や MALS の実験を行っています。



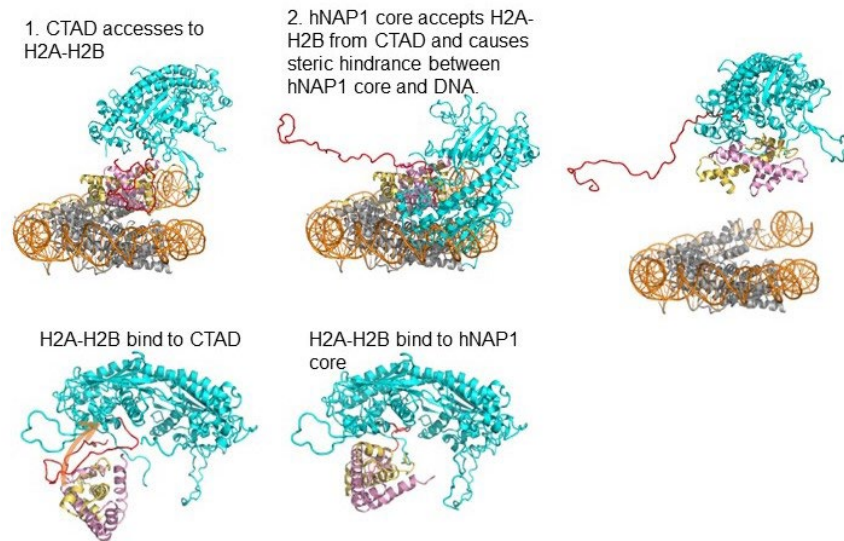
(図 7) NAP1 の原子間力顕微鏡(AFM)像。(左) NAP1 だけの AFM 像では棒状の多量体が形成されていた。(中)NAP1 に H2A-H2B が結合すると棒状構造が壊れ、NAP1 の 2 量体に H2A-H2B が結合した AFM 像が得られる。(右) AFM 像のモデル。

本研究の結果を基に NAP1 がヌクレオソームから H2A-H2B を解離する機構は模式的に図 8 のように考える事ができます。NAP1 の CTAD がヌクレオソーム中の H2A-H2B と結合する場合は、ヌクレオソーム中の末端の約 30 塩基対程度の DNA が、例えば RNA 合成酵素による超らせんストレスに等によりはがされ、NAP1 の CTAD が DNA の代わりにヌクレオソーム中の H2A-H2B と結合します。その後、H2A-H2B が NAP1 の溝に結合するとともに H2A-H2B はヌクレオソームからはがされます (図 8)。再結合の時には例えば RNA 合成酵素の通過後にできたヌクレオソームに巻き付くための DNA の超らせんのストレスが逆に NAP1 の CTAD から H2A-H2B を引きはがします。NAP1 中で H2A-H2B が溝結合型と CTAD 結合型の間で動的に揺らいている事がヌクレオソームからの H2A-H2B の解離や再結合をスムーズに起こすために必要だと考えられます。

今後の展開

現在巨大タンパク質の機能を原子レベルで解析し、タンパク質の機能解明さらにはタンパク質機能不全から生じる疾病の治療候補化合物のデザイン等の研究が精力的に行われています。特にタンパク質を結晶化した X 線結晶構造解析やタンパク質を氷中で固定化した Cryo-EM による解析が精力的に行われ、多数の構造が報告されています。これらの構造解析により巨大タンパク質中のコアの構造が精密に解析され巨大タンパク質の構造変化が細かなブロックの積み重なりの変化として解析できるようになりました。しかしタンパク質

の機能にはふらふらと揺らいでいる紐様の構造（天然変性状態）が重要な役割を持つ場合があります。特に核内で機能するタンパク質では天然変性状態が約 50%もある場合があり、ここで取り上げたクロマチンの構成タンパク質であるヒストンやヒストンシャペロンでは揺らいでいる領域が非常に重要な機能を持っています。それらの構造を解析するために本研究で示したような NMR、SAXS、MALS、AFM、MD 計算など統合的な相関構造解析が必要です。今後核内タンパク質の原子レベルでの機能解明のために本研究で提案した相関構造解析がますます重要になると考えられます。



（図 8）NAP1 がヌクレオソームから H2AH2B を乖離させるときの模式図。まず NAP1 の CTAD がヌクレオソーム中の H2AH2B にアクセスする。CTAD は H2B の N 末テイルと H2A の C 末テイルと相互作用し、H2AH2B のヌクレオソーム中での安定化を弱めて CTAD の結合を強め次に H2AH2B がヌクレオソームから解離すると同時に NAP1 の溝の H2AH2B を納める。

研究費

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）「創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業」、文部科学省「先端研究基盤共用促進事業（共用プラットフォーム形成支援プログラム）NMR 共用プラットフォーム」、日本学術振興会科学研究費（基盤研究 B）の一環で行われました。

論文情報

Dynamic solution structures of whole human NAP1 dimer bound to one and two histone H2A-H2B heterodimers obtained by integrative methods.

Hideaki Ohtomo, Tsutomu Yamane, Takashi Oda, Noriyuki Kodera, Jun-ichi Kurita, Yasuo Tsunaka, Romain Amyot, Mitsunori Ikeguchi, and Yoshifumi Nishimura

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168189>

用語説明

*1 NMR :

強い磁場中で特定の原子核スピンの向きが揃えられた化合物やタンパク質などに対し、ラジオ波を照射して核磁気共鳴させた後、核スピンの元の安定な状態に戻る際に出す信号を観測して、原子の配置などを解析する装置。分子量が 30KDa を超えるような大きなタンパク質では、水溶液中のタンパク質の動きが遅くなり NMR の観測は困難になるが、巨大タンパク質中でもふらふらと揺らいでいる N 末や C 末の部位は小分子の動きと同じく速いので原子レベルでの同定が可能である。

*2 X 線小角散乱 (SAXS) :

タンパク質水溶液などの試料に X 線を照射し、得られる散乱 X 線の角度分布から試料分子の形状を解析する方法。NMR のような分子量の制限がなく、X 線結晶構造解析のように目的タンパク質を結晶化する必要がない反面、分解能が低い欠点があるため、NMR や MD など原子分解能での情報と合わせることで有効な解析が可能。

*3 多角度光散乱 (MALS) :

タンパク質水溶液などの試料に光を照射し、得られる散乱光の角度分布から試料分子の分子量を決定する方法。

*4 原子間力顕微鏡 (AFM) :

原子間力顕微鏡は、レコードプレーヤーの針がレコード盤の表面の形状をなぞるように、探針（プローブ）と試料間の相互作用を 2 次元に走査し、試料の起伏の画像を取得する顕微鏡。生体分子が機能する水溶液中であっても、分子の形状をナノメートルの空間分解能で観察することができる特徴を持つ。

*5 分子動力学 (MD) 計算 :

計算機シミュレーションの手法の一つ。計算機上に水分子やイオンなども含めた系を構築してタンパク質分子の生体内部における様子を模倣し、その全原子間に働く相互作用を考慮してニュートンの運動方程式を数値的に解くことをくりかえすことにより、生物の体温程度でのナノ秒～ミリ秒の時間スケールの生体内での蛋白質などの分子の挙動をシミュレーションする。本研究で用いた hNAP1 と H2A-H2B の複合体の MD シミュレーションでは、約 100 万原子程度の大きさの系について、100 ナノ秒 (0.1 ミリ秒) の計算を行っている。

*6 ヒストンシャペロン :

ヒストン分子に結合しヌクレオソームへヒストンを運搬し再構成する時の介助タンパク質。DNA 合成や RNA 合成の時には DNA 二重らせんはほどかれてヌクレオソームからヒストン

が解離し、さらに合成終了時にはヒストンは再結合しヌクレオソームが再構成される時に、ヒストンシャペロンは介助役を果たす。ヒストンシャペロンとしてはここで取り上げた NAP1 以外にも FACT があり、FACT のサブユニット Spt16 タンパク質の C 末天然変性領域とヌクレオソーム中でのヒストン H3 の N 末の天然変性領域との相関構造や H2A-H2B の相関構造に関してはやはり当研究室で NMR 法等を用いて既に報告した (6 - 9)。

参考文献

1. Y. Moriwaki, T. Yamane, H. Ohtomo, M. Ikeguchi, J. Kurita, M. Sato, A. Nagadoi, H. Shimojo, Y. Nishimura, Solution structure of the isolated histone H2A-H2B heterodimer., *Sci. Rep.* 6 (2016) 24999. <https://doi.org/10.1038/srep24999>
2. H. Ohtomo, J. Kurita, S. Sakuraba, Z. Li, Y. Arimura, M. Wakamori, Y. Tsunaka, T. Umehara, H. Kurumizaka, H. Kono, Y. Nishimura, The N-terminal Tails of Histones H2A and H2B Adopt Two Distinct Conformations in the Nucleosome with Contact and Reduced Contact to DNA, *J. Mol. Biol.* 433 (2021) 167110. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167110>
3. Y. Ishimi, J. Hirosumi, W. Sato, K. Sugasawa, S. Yokota, F. Hanaoka, M. Yamada, Purification and initial characterization of a protein which facilitates assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells., *Eur. J. Biochem.* 142 (1984) 431-9. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08305.x>
4. Y.J. Park, K. Luger, The structure of nucleosome assembly protein 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 1248-1253. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508002103>
5. H. Ohtomo, S. Akashi, Y. Moriwaki, M. Okuwaki, A. Osakabe, K. Nagata, H. Kurumizaka, Y. Nishimura, C-terminal acidic domain of histone chaperone human NAP1 is an efficient binding assistant for histone H2A-H2B, but not H3-H4, *Genes to Cells.* 21 (2016) 252-263. <https://doi.org/10.1111/gtc.12339>
6. Tsunaka Y, Ohtomo H, Morikawa K, Nishimura Y. Partial Replacement of Nucleosomal DNA with Human FACT Induces Dynamic Exposure and Acetylation of Histone H3 N-Terminal Tails. *iScience.* 23, 101641 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101641>
7. Tsunaka Y, Ohtomo H, Nishimura Y. FACT modulates the conformations of histone H2A and H2B N-terminal tails within nucleosomes. *Commun Biol.* 5, 814. (2022). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03785-z>.
8. Tsunaka Y, Furukawa A, Nishimura Y. Histone tail network and modulation in a nucleosome. *Curr Opin Struct Biol.* 75, 102436. (2022). <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102436>.
9. Okuda M, Tsunaka Y, Nishimura Y. Dynamic structures of intrinsically disordered proteins related to the general transcription factor TFIIH, nucleosomes, and histone chaperones. *Biophysical Reviews* 14, (2022). <https://doi.org/10.1007/s12551-022-01014-9>

< 研究成果に関する窓口 >

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科 特任教授 西村 善文

Tel : 045-508-7211/7212 nisimura@yokohama-cu.ac.jp

< 取材対応に関する窓口 >

横浜市立大学 広報課長 上村 一太郎

Tel : 045-787-2414 koho@yokohama-cu.ac.jp

SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS 横浜市立大学は、様々な取り組みを通じてSDGsの達成を目指します。

