

ヘテロクロマチンタンパク質による 液-液相分離機構を解明

横浜市立大学大学院生命医科学研究科の西村 善文名誉教授（特任教授）、古川 亜矢子客員研究員（現京都大学大学院農学研究科准教授）、理化学研究所放射光科学研究センターの清水 伸隆グループディレクター（研究当時：高エネルギー加速器研究機構教授）、東京大学大学院農学生命科学研究科の寺田 透教授、高エネルギー加速器研究機構の千田 俊哉教授、基礎生物学研究所の中山 潤一教授らのグループは、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 α による液-液相分離の分子機構を解明しました。液-液相分離とは自発的に液滴を形成する現象で細胞内のさまざまな顆粒形成に関与するとされ、核内では濃縮し遺伝子の発現が抑えられた状態のヘテロクロマチン形成にも関与すると考えられています。HP1 α の構造は N 末テイル・クロモドメイン・ヒンジ領域・クロモシャドードメインから成りますが、リン酸化 N 末テイルとクロモドメインの末端にある特異的な塩基性領域がお互いに結合した動的な 2 量体構造が中間体となり液-液相分離がおこっていることを解明しました（図 1）。さらにこの特異的な塩基性領域が変異した細胞ではヘテロクロマチンの大きさが変化し、HP1 α の液-液相分離とヘテロクロマチン形成が関連することを解明しました。

本研究成果は、Oxford University Press が発行する「Nucleic Acids Research」に掲載されました（日本時間 2025 年 3 月 24 日 9 時 1 分）。

研究成果のポイント

- ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 α の N 末リン酸化は液-液相分離を引き起こす。
- HP1 α の特定の塩基性領域とリン酸化 N 末との結合が液-液相分離の中間体である。
- HP1 α の液-液相分離変異体は細胞核内のヘテロクロマチン形成に影響する。

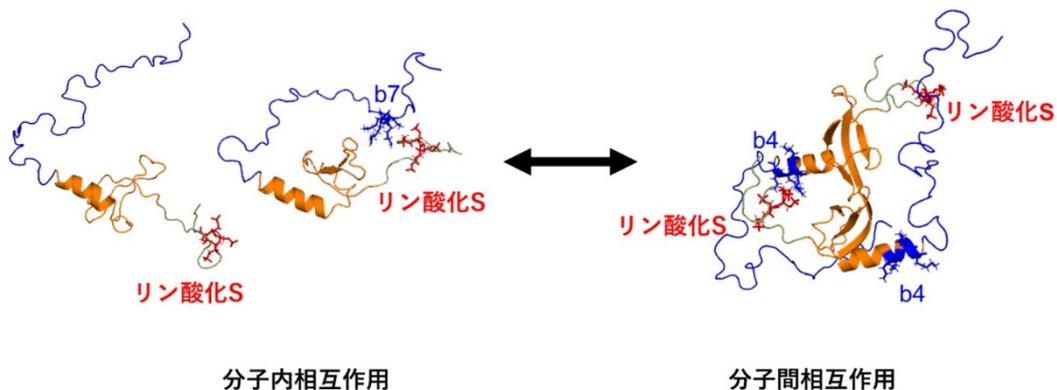


図 1 a 低濃度ではリン酸化 N テイル(pS)と 7 番目の塩基性領域(b7)との相互作用がある。b 少し濃度が濃くなると分子間相互作用によりリン酸化 N テイル(pS)とクロモドメイン中の 4 番目の塩基性領域(b4)が結合し 2 量体を形成する。c 濃度がさらに濃くなるとこの 2 量体構造がさらに会合して液-液相分離を引き起こす。

研究背景

細胞内にはさまざまな顆粒（膜が無い細胞小器官）が存在しますが、その顆粒形成に関与するのが液-液相分離です。液-液相分離とはタンパク質や DNA や RNA が高濃度で存在する時にできる液滴で、あたかも水の中の油のように存在し、通常の光学顕微鏡で観察することができます。液滴中でタンパク質等がどのような構造を形成しているかは、大きな研究課題であり、さまざまな細胞内小顆粒を対象に研究が進められてきました。核内の DNA はヒストンタンパク質に巻き付いてクロマチン構造を形成しています。クロマチン構造は、非常に密に凝集し遺伝子の発現が抑制されているヘテロクロマチンと、それほど凝集しておらず遺伝子発現が活発なユークロマチンが存在します。ヘテロクロマチンとユークロマチンの変換は細胞の特異性を決定付け、ヒトの約 250 種類の異なる細胞を生み出す源になります。この変換の制御が異常になると、細胞はがん化やさまざまな疾病の原因にもなります。そのため、クロマチン構造変換の正常な制御は私たちの健康な体の維持に非常に重要です。

研究内容

DNA はヒストンと呼ばれるタンパク質に巻き付いてヌクレオソームと呼ばれる構造になります。ヌクレオソームは束になってクロマチンと呼ばれる構造になります。クロマチンの中で特に凝縮度が高いものをヘテロクロマチンと呼びます。ヘテロクロマチンを形成するタンパク質に HP1 が存在します。HP1 は N テイル、クロモドメイン(CD)、ヒンジ領域、クロモシャードメイン(CSD)で構成されています(図 2)。ヘテロクロマチンでは、ヌクレオソーム中のヒストン H3 の 9 番目のリシン残基がメチル化され(H3K9me)、HP1 の CD が H3K9me と結合します。ヌクレオソーム中にはヒストン H3 が 2 個存在します。HP1 の CSD は 2 量体を形成し、2 量体の HP1 が隣同士のヌクレオソーム中の H3K9me を連結しヌクレオソームの凝集体(ヘテロクロマチン)を形成します。動物の HP1 は 3 種類(HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ)が存在しますが、その中でも HP1 α の N テイルは特異的にアミノ酸セリンが 4 個連続しリン酸化されています(pS)。研究グループは、核磁気共鳴(NMR)法^{*1}や X 線小角散乱(SAXS)法^{*2}、分子動力学計算(MD)法を用いた以前の研究で、非リン酸化体 N テイルはフラフラと揺らいで H3K9me と CD の結合を妨害するが、リン酸化 N テイル(pS)は、伸びた構造を取りヒストン H3K9me の結合を助けていることを報告しました[1]。また、CSD は他のクロマチン関連タンパク質が結合する足場になりますが、セントロメア特異的な INCENP のフラフラした領域が HP1 α の CSD に結合する様子も NMR を用いて解析し報告しました[2]。またリン酸化 HP1 α は高濃度で液-液相分離を起こし、ヘテロクロマチン形成に HP1 α の液-液相分離が関連することが示されました[3,4]。リン酸化 N テイル(pS)は非常に大きな負電荷をもっていますので、HP1 α 中の正電荷部位と強く相互作用することが考えられます。正電荷領域は HP1 α 内に分散して 8 個存在し順番に b1 から b8 と名前を付けました。b1 は N テイル中、b2、b3、b4 は CD 中、b5、b6、b7 はフラフラしたヒンジ領域中、b8 は CSD 中に存在し、液-液相分離中では、これらの正電荷領域が負電荷の pS と動的に結合する、非常に複雑な構造を取ることが示唆されます(図 2)。

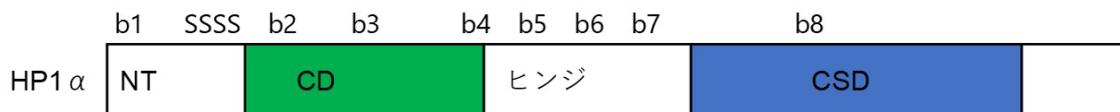


図2 HP1 α の構造の模式図

NT:N テイル、CD:クロモドメイン (ヒストン H3K9me に結合する)、CSD:クロモシャドードメイン (2量体形成ドメイン)。上段に HP1 α 中の塩基性領域の部位を b1 から b8 と名付けた (上段)。SSSS は N テイル中のリン酸化される 4 個の連続したセリン残基を示している。

HP1 α による液-液相分離の詳細な分子機構を解明するために、私たちは統合的な研究を実施しました。横浜市立大学の西村らの研究グループによる核磁気共鳴(NMR)法、高エネルギー加速器研究機構の千田・清水らの研究グループによるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)-多角度光散乱(MALS)法^{*3・4}と SEC-SAXS 法、東京大学の寺田らの研究グループによる粗視化分子動力学計算(CGMD)法^{*5}を組み合わせた多角的な構造解析法です。その結果、リン酸化 HP1 α は通常の濃度で CSD を介して 2 量体を形成し、2 量体中でリン酸化 N テイル(pNT)は、同じサブユニット内で b7 と、また 2 量体中のサブユニット間で b4、b6、b7 と相互作用することが分かりました。全体として非リン酸化体比べて、丸まった構造を取っていることが分かりました (図3)。

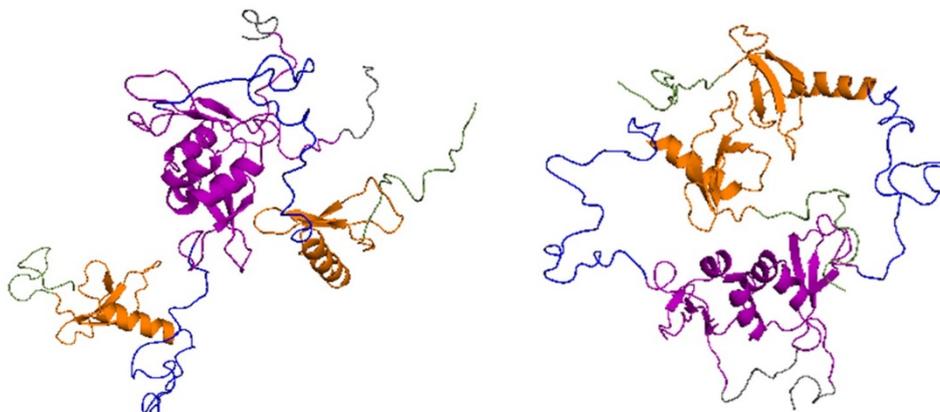


図3 (左) 非リン酸化 HP1 α 2 量体の構造の例。(右) リン酸化体 HP1 α の 2 量体構造の例

さらに、高濃度になると 2 量体間で相互作用をして多量体を形成し、その状態では、多様な構造体を形成し液-液相分離へと移行することが分かりました (図4)。HP1 α 各濃度における分子量を SEC-MALS で確認しタンパク質中の各アミノ酸の相互作用を NMR で解析し、SEC-SAXS と CGMD を組み合わせて全体構造解析をしました。2 量体間の相互作用は多量体形成と連動し、非常に多様で複雑な構造体を形成するため、液-液相分離に移行する中間状態の構造を明確には捉えることができません。特に SEC-SAXS では、低濃度の 2 量体構造は解析ができますが、高濃度の不均一な系は解析できません。今回の NMR 測定では分子量が大きくなるとシグナル強度が弱くなり、解析が困難で HP1 α の 2 量体が解析限界となります。

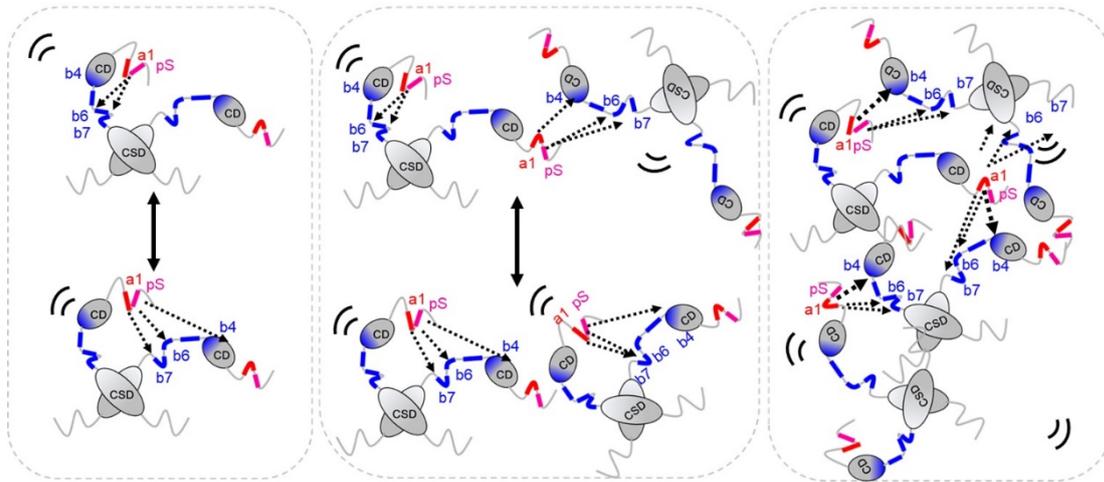


図4 (左) 低濃度のリン酸化 HP1 α 2 量体の構造モデル。(中) 中程度のリン酸化体 HP1 α 2 量体の構造モデル。お互いの2量体間で相互作用が起こり始めている。(右) 高濃度の HP1 α 2 量体の構造モデル。お互いの相互作用によりさらに多量体ができている

そこで、NMR 法や SEC-SAXS と CGMD 法で解析するために、HP1 α の液-液相分離の基本構造を求めることにしました。図2を見ると分かるように、pNT と相互作用する塩基性領域は、ほとんどが CD とヒンジ領域にあります。これらの間の複雑な相互作用が、液-液相分離の基本骨格だと考え、2量体形成ドメインの CSD を欠損した変異体(Δ CSD)で解析を行いました。リン酸化 Δ CSD(p Δ CSD)は、通常の溶液濃度では単量体ですが、400 μ M と高濃度にすると液-液相分離を示しました(図5)。非リン酸化体の Δ CSD の均一な溶液とは異なります。また顕微鏡で調べても、p Δ CSD が高濃度の時に微小な液滴が生じ、高濃度の状態で溶液部分と液滴部分が動的な平衡状態にあることが示唆されました。液-液相分離が観察された状態で p Δ CSD の NMR を測定すると、pNT 領域と b4 領域に大きな化学シフト変化が観察され、お互いに相互作用していることが示唆されました(図6)。またこの状態で SAXS を測定し CGMD で解析すると、p Δ CSD は2量体を形成していることが分かり、お互いの pNT と b4 が結合した2量体を基本構造として考えることができます。

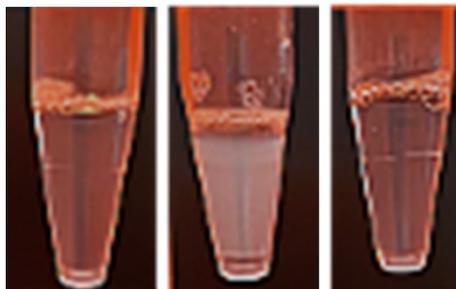


図5 550 μ M の Δ CSD (左)、460 μ M の p Δ CSD (中央)、550 μ M の p Δ CSD の b4 変異体 (右) の溶液の比較。p Δ CSD では明らかに液滴ができており、明瞭な NMR シグナルを観測できた。b4 の塩基性アミノ酸をアラニンに置換した変異体では液-液相分離が観測できなかった。

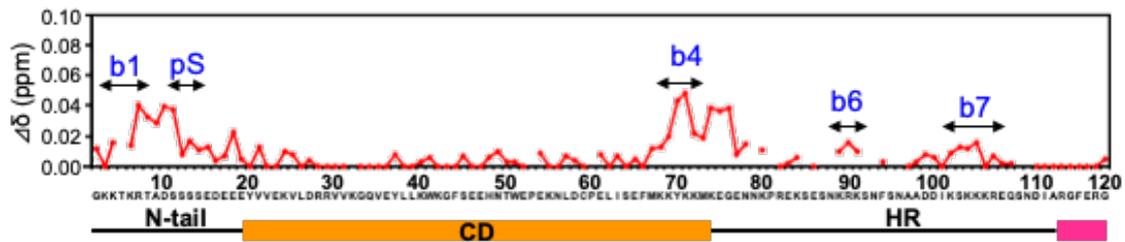


図6 120 μ Mと400 μ Mのp Δ CSDの化学シフト変化。pNTとb4に大きな化学シフト変化が観察された

p Δ CSDを用いることで、HP1 α の液-液相分離の基本構造単位はリン酸化NテイルとCDの末端に存在する塩基性のb4領域が、相互作用した動的な2量体構造であることが分かりました。この動的な2量体は液-液相分離した状態でもNMRの測定が可能で、NMRのシグナルは溶液中のp Δ CSDの構造を反映します。SEC-SAXSでは約50 μ M付近で単量体と2量体の間に動的な平衡があることが示唆されます。その動的な2量体はNMR測定条件の400 μ M付近で中間体として液-液相分離を生じていると考えることができ、非常に動的な挙動を示すことが分かりました。またb4領域をアラニンに置換すると、高濃度でも液-液相分離を示しませんでした(図5)。

NMRとSEC-SAXSとCGMDの結果から、HP1 α の液-液相分離の基本構造単位は、リン酸化NテイルとCDの末端にあるb4領域との動的な相互作用だと分かったので、細胞内での実際のヘテロクロマチン形成に、この相互作用は重要なのかを確認しました。全長の野生型のHP1 α とb4領域をアラニンに変異したHP1 α 変異体を、蛍光タンパク質を融合したタンパク質を細胞で発現させその挙動を調べたところ、ヘテロクロマチン領域と考えられる斑点の数と大きさが変化し変異体では大きな斑点が少なくなっていました。特にテイルのセリンとb4の両方の変異体で、斑点の大きさが小さくなり数が少なくなっていました。このことから、HP1 α のリン酸化NテイルとCDの塩基性領域のb4との相互作用がヘテロクロマチン形成に関与していることが示唆されました。

今後の展開

ヘテロクロマチンの形成は、細胞の分化やがん化において非常に重要です。セントロメアやテロメアにはヘテロクロマチン構造が存在します。ヘテロクロマチン構造の異常は、個々の遺伝子の発現パターンを大きく変化させ、これが発がん、あるいは悪性化へ寄与しています。本研究で解明したヘテロクロマチンタンパク質HP1 α のb4領域の液-液相分離への関与は、がんの治療等の一助になることが期待されます。また液-液相分離はさまざまな細胞内顆粒形成に関与していますが、タンパク質をはじめとする高分子の動的で多様な相互作用により生じるため、個々の原子レベルでの解析は困難です。本研究では、溶液中における複数の構造解析手法を統合し、さらに変異体を用いることで、液-液相分離移行過程における動的な中間構造を捉えることに成功しました。今後さまざまな細胞内顆粒形成の原子レベルでの機構解明も同様に解明されていくことが期待されます。

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」、JSPS 科研費 23K27119 基盤研究 B) の一環で行われました。

論文情報

タイトル：Dynamic structural unit of phase-separated heterochromatin protein 1 α as revealed by integrative structural analyses

著者：Ayako Furukawa, Kento Yonezawa, Tatsuki Negami, Yuriko Yoshimura, Aki Hayashi, Jun-ichi Nakayama, Naruhiko Adachi, Toshiya Senda, Kentaro Shimizu, Tohru Terada, Nobutaka Shimizu, Yoshifumi Nishimura

掲載雑誌：Nucleic Acids Research

DOI：10.1093/nar/gkaf154

用語説明

- *1 核磁気共鳴(NMR)法：核スピンをもった原子核(^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N)は、強い磁場中で磁場の強さに応じて特異的にラジオ波(600MHz、800MHz、950MHz)を吸収し、タンパク質中の原子核の動的な情報を与える解析技術。
- *2 X線小角散乱(SAXS)法：溶液中のタンパク質にX線を照射しその散乱から分子サイズと形状を見積もる分析手法。
- *3 サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)：溶液中のタンパク質の大きさに応じて分離する手法。
- *4 MALS（多角度光散乱）法：溶液中のタンパク質に光の照射しその散乱からタンパク質の分子量を見積もる手法。
- *5 粗視化分子動力学計算(CGMD)法：タンパク質溶液を構成する全ての原子を考慮する全原子分子動力学計算に代わり、水素以外の原子を4つ含むユニットを1つの粒子にまとめることで、各アミノ酸を1～5個の粒子で、4つの水分子を1個の粒子で表す粗視化モデルを用いて分子動力学計算を行う手法。

参考文献

1. Shimojo, H., Kawaguchi, A., Oda, T., Hashiguchi, N., Omori, S., Moritsugu, K., Kidera, A., Hiragami-Hamada, K., Nakayama, J., Sato, M. *et al.* (2016) Extended string-like binding of the phosphorylated HP1 α N-terminal tail to the lysine 9-methylated histone H3 tail. *Sci Rep*, **6**, 22527.
2. Kosuke Sako, Ayako Furukawa, Ryu-Suke Nozawa, Jun-ichi Kurita, Yoshifumi Nishimura, Toru Hirota, Bipartite binding interface recruiting HP1 to chromosomal passenger

complex at inner centromeres. *J. Cell Biol.* 2024 Vol. 223 No. 9 e202312021.

3. Larson, A.G., Elnatan, D., Keenen, M.M., Trnka, M.J., Johnston, J.B., Burlingame, A.L., Agard, D.A., Redding, S. and Narlikar, G.J. (2017) Liquid droplet formation by HP1alpha suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature*, **547**, 236-240.
4. Strom, A.R., Emelyanov, A.V., Mir, M., Fyodorov, D.V., Darzacq, X. and Karpen, G.H. (2017) Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature*, **547**, 241-245.