

課題名 (タイトル) :

## 粗視化分子モデルを用いた信号伝達経路上のリン酸化酵素複合体とクロマチンの動的モデリング: 核内混み合い環境における ERK の動態機構

利用者氏名: ○杉田 有治、金田 亮、高田 彰二

所属: 京都大学 理学研究科 生物物理学教室 理論生物物理学分科

「HPCI 戦略プログラム 分野 1 予測する生命科学・医療および創薬基盤」の戦略課題 1「細胞内分子ダイナミクスのシミュレーション」の業務参加者

## 1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

細胞が周囲の環境に適応するためには、外部からの刺激を核内まで伝達させて遺伝子発現を変化させる機構が必要となる。具体的に、シグナル伝達経路の代表的モデルの1つである哺乳類の MAPK カスケードでは、外からの刺激を契機に、Ras, Raf (MAPKK) が活性化し、さらに MEK1 (MAPKK)、ERK2 (MAPK) へと次々に上流のタンパク質が下流のタンパク質をリン酸化することで活性化する。この活性化(リン酸化)反応の連鎖によって最終的に信号が核内まで伝達される。MAPK カスケードは、細胞の増殖、分化、アポトーシスの決定のみならず、細胞のがん化とも強い関連を持っている事が知られているので、伝達における活性化機構の解明は医学的な見地からも強く望まれる。しかし、その活性化の分子機構の詳細は未だ不明である。また、ERK2 タンパクはリン酸化された後に核内に移行する事が知られている。核内に移行後、転写因子と相互作用すると考えられるが、クロマチン構造(ヌクレオソーム)が高濃度に存在している核内混み合い環境において、ERK2 タンパクがどのように振る舞うのか分かっていない。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究においては、特に核内に移行した ERK2 タンパク質の拡散運動に焦点を当てて調査をする。その為に、研究チームで開発した粗視化分子動力学シミュレーターCafeMol を適用する。

核内混み合い環境を実現する為に、20 ヌクレオソームからなるクロマチン構造を系に含めて計算を行う(ヌクレオソーム濃度が 0.1mM と比較的低濃度のケースと高濃度[0.5mM]のケースの2通りを調査

する)。各ヌクレオソームのヒストン部位及び ERK2 タンパク質に対しては AICG(Atomic interaction based coarse grained)モデルという従来の C $\alpha$  粗視化モデルよりも現実的なモデルを適用し、2 本鎖 DNA に対しては Pablo グループ等(2009)により開発された DNA モデルを適用する。ERK2 タンパクとクロマチン間の分子間相互作用については Debye-Huckel 型の静電相互作用と斥力相互作用を考慮する。我々はこのモデルに対して室温(300K)、イオン強度(0.2M)の条件で Underdamped の Langevin シミュレーションを遂行した。

## 3. 結果

低ヌクレオソーム環境下(0.1mM)と高ヌクレオソーム環境下(0.5mM)の2つの条件において各々独立に Langevin シミュレーション(各々100 サンプル)を行った。(図1は、ヌクレオソーム環境下[0.1mM, 0.5mM]における ERK2 タンパクのシミュレーションのスナップショットである。)Langevin シミュレーションで得られた100 サンプルの trajectory データを用いて ERK2 タンパク重心の MSD (Mean Square Displacement)の時間変化を見積もった。その結果、MSD は時間(シミュレーションの time-step)に対してほぼ線形に増加し、通常の拡散運動をしている事が確認された。更に、ヌクレオソームが全く存在しない環境下における ERK2 タンパクの拡散係数と、核内混み合い環境下(ヌクレオソーム濃度: 0.1mM, 0.5mM)における ERK の拡散係数の比を見積もった。その結果、低ヌクレオソーム濃度(0.1mM)における拡散係数の比は~0.9、高ヌクレオソーム濃度(0.5mM)における拡散係数の比は~0.6であった。

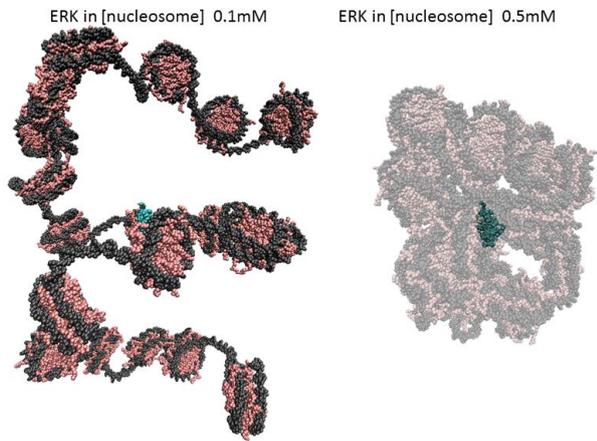


図 1：クロマチン環境下における ERK2 タンパク質 (スナップショット) 中央のシアンの部分 ERK2 タンパク、それ以外の部分はクロマチン (20 ヌクレオソーム) に対応。

それに対して、(核内混み合い環境で機能する) 転写因子 p53 の拡散係数の比は、予備的な結果 [寺川等, 2013] ではあるが、ヌクレオソーム濃度 0.1mM で  $\sim 0.75$ 、0.5mM で  $\sim 0.2$  程度である事が見積もられている。これらの結果から、特に高濃度クロマチン環境下 (0.5mM) における転写因子 p53 の拡散係数の減少率が ERK タンパクの拡散係数の減少率に比べて顕著である事が分かった。ERK2 タンパクの拡散係数が (p53 と比較して) 高濃度クロマチン環境でもそれ程低下しないのは、ERK2 タンパクの慣性半径が p53 に比して小さい事 ( $R_g \sim 20 \text{ \AA}$ )、更に正電荷の分布が比較的低い事が起因していると考えられる。

#### 4. まとめ

MAPK カスケードの一部を担う ERK2 タンパクの核内混み合い環境下における拡散運動 (ダイナミクス) を CafeMol を用いた粗視化シミュレーションにより調査した。その結果、ERK2 タンパク (の拡散係数) は、p53 等の転写因子と比べて、高濃度ヌクレオソーム環境下における拡散係数の減少率が比較的、低く抑えられている事が分かった。

#### 5. 今後の計画・展望

今後は、ERK の並進運動だけでなく、高濃度クロマチン環境下における ERK2 タンパクと DNA (ヌクレ

オソーム) の結合乖離ダイナミクスの詳細を調査する。

特にそのダイナミクスを p53 や HMGB1 の様な転写因子と比較調査する為に、より長時間のシミュレーションを遂行する。(アセチル化の有り無しを含めて様々な条件下で調査する。)

課題名 (タイトル) :

粗視化分子モデルを用いた信号伝達経路上のリン酸化酵素複合体とクロマチンの動的モデリング :

リンカーヒストン H1 の結合に伴うヌクレオソーム構造のコンパクト化のダイナミクス

利用者氏名 : ○杉田 有治、白井 伸宙

所属 : 京都大学 理学研究科 生物物理学教室 理論生物物理学分科「HPCI 戦略プログラム 分野 1 予測する生命科学・医療および創薬基盤」の戦略課題 1「細胞内分子ダイナミクスのシミュレーション」の業務参加者

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

真核細胞は 2 メートルにも及ぶ DNA をマイクロメートルスケールのその核内に凝縮させクロマチンを形成している。クロマチンはヒストンコアと呼ばれるタンパク質の複合体に DNA が巻き付いたヌクレオソームを基本単位として持ち、このヌクレオソームが重なりあってさらに高次の構造を形成している。このクロマチン構造形成には様々なタンパク質が絡んでいることが知られているが、その中でも特にクロマチン構造のコンパクト化に寄与している因子としてリンカーヒストン H1 が知られている。

リンカーヒストン H1 は一つの球状ドメインと長い C 末端の変性領域を持っている。この変性領域はプラスの電荷の残基に富み、全体としてマイナスの電荷を帯びたヌクレオソームに結合してヒストンと DNA の間の結合を強固にし、ヌクレオソーム間の相互作用を変化させることでより高次のヌクレオソーム構造の形成に寄与すると考えられている。電子顕微鏡によりリンカーヒストン H1 を含むヌクレオソーム多量体の像は得られているが、電子顕微鏡像のどこに C 末端の変性部位があるかは特定されていない [F. Song, et al. *Science* **344**, 376-380 (2014)]。NMR 等を用いた他の実験についても、変性部位を含めたリンカーヒストン H1 とヌクレオソームの全体構造は得られていない。

そこで本研究では、変性部位に富んだリンカーヒストン H1 がヌクレオソームと結合しどのような構造を形成するのかについて粗視化モデルを用いた分子動力学シミュレーションにより解析を行った。また、実験では捕らえにくいリンカーヒス

ン H1 の結合に伴うヌクレオソームの高次構造形成ダイナミクスを同シミュレーションにより観察した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

リンカーヒストン H1 とヌクレオソーム単量体、リンカーヒストン H1 とヌクレオソーム三量体を含む箱に閉じ込められた系について、塩濃度パラメーターとヌクレオソーム内の DNA の長さを様々に変えたシミュレーションを行った。

計算には高田研究室で開発されている粗視化分子動力学プログラム CafeMol を用いた。リンカーヒストン H1 の変性部位を表現するため、変性部位の統計情報を用いて作られたフレキシブル・ローカル・ポテンシャル [T. Terakawa and S. Takada, *Biophys. J.* **101**, 1450-1458 (2011)] を用いた。

3. 結果

構築した粗視化モデルが現実の分子をどの程度正しく表現できているかを検証するため、リンカーヒストン H1 の C 末端変性部位の両端に蛍光分子をつけて行われた FRET の実験とシミュレーションとの比較を行った。

比較したのはリンカーヒストン H1 単独での FRET 実験とシミュレーション、リンカーヒストン H1 とヌクレオソーム単量体の FRET 実験とシミュレーションである。比較の結果、シミュレーションでのリンカーヒストン H1 の C 末端変性部位の広がりはいオン濃度に依存して単調に変化し、ある特定のイオン濃度領域で実験との良い一致を示した。リンカーヒストン H1 とヌクレオソーム単量体の系でも同様に良い一致を示した。図 1 にリンカーヒス

トン H1 とヌクレオソーム単量体の系での蛍光分子間距離のヒストグラムの図を示す。従って、

FRET 実験で得られたリンカーヒストン H1 の C 末端部位の広がり方をシミュレーションで再現することができ、リンカーヒストン H1 のモデリングやヌクレオソーム単量体との相互作用が見ている粗視化のスケールで妥当なものだと確認することができた。

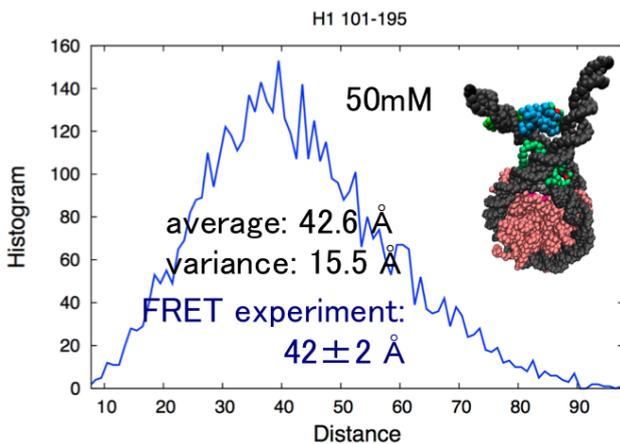


図 1: リンカーヒストン H1 とヌクレオソーム単量体の系での H1C 末端変性部位の両端の距離分布(ヒストグラム)。FRET 実験で得られた値とよい一致を示している。

次に、リンカーヒストン H1 とヌクレオソーム単量体を含む系でのシミュレーション結果をヌクレオソーム単量体のみを含む系のシミュレーションと比較した。その結果、リンカーヒストン H1 はヒストンから飛び出している DNA を縛るように絡まり、ヌクレオソーム単量体をよりコンパクトにすることがわかった。これは電子顕微鏡像や NMR 等の実験で予見されていた結果と整合し、かつリンカーヒストン H1 の変性部位も含めたヌクレオソーム構造のアンサンブルを得ることができた。

さらにリンカーヒストン H1 とヌクレオソーム三量体を含む系でのシミュレーションではヌクレオソームとヌクレオソームの間を橋渡ししている DNA に結合しヌクレオソーム三量体全体の構造をコンパクトにする構造が得られた。この状態へ至るダイナミクスも非常に興味深いものが得られた。

#### 4. まとめ

ヌクレオソームを基本単位として構成されているクロマチン構造の形成について、クロマチンのコンパクト化に関わっているリンカーヒストン H1 とヌクレオソームの相互作用に注目して研究を行った結果、実験結果と整合したコンパクト化構造やコンパクト化のダイナミクスを予言することができた。

#### 5. 今後の計画・展望

ヌクレオソーム三量体のより長い計算を行うことで他にどのような構造が形成可能か、またそれぞれの構造がどのような頻度で現れるかなどの解析を行いたい。

また、リンカーヒストン H1 と競合して働く因子、HMGB1 というタンパク質を加えたシミュレーションを計画している。

#### 6. 利用がなかった場合の理由

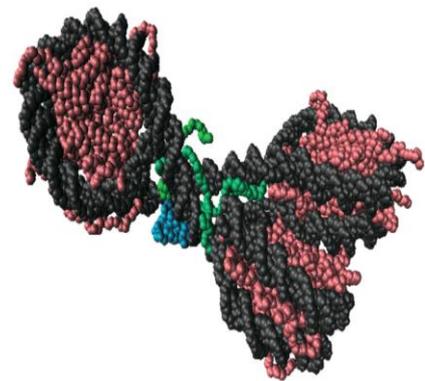


図 2: リンカーヒストン H1 がヌクレオソーム三量体にからまりコンパクト化を引き起こしている。

課題名 (タイトル) :

粗視化分子モデルを用いた信号伝達経路上のリン酸化酵素複合体とクロマチンの動的モデリング :

## Structural Dynamics of Tri-Nucleosome by Coarse-Grained Simulations: Effects of Histone Tail Acetylation

利用者氏名 : ○杉田 有治、Le Chang

所属 : 京都大学 理学研究科 生物物理学教室 理論生物物理学分科(Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

「HPCI 戦略プログラム 分野 1 予測する生命科学・医療および創薬基盤」の戦略課題 1「細胞内分子ダイナミクスのシミュレーション」の業務参加者

本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

The structure of chromosome, which is a huge complex of histone proteins and DNA, controls gene expression and influence various reactions in cell. Histone acetylation, which neutralizes the charge of specific lysine side-chain, has been widely proved to activate gene expression. However, the reason behind such activation is still not very clear. In this work, we studied the effects of histone tail acetylation on nucleosome, which is the fundamental unit of chromosome, interactions and structures of nucleosome array.

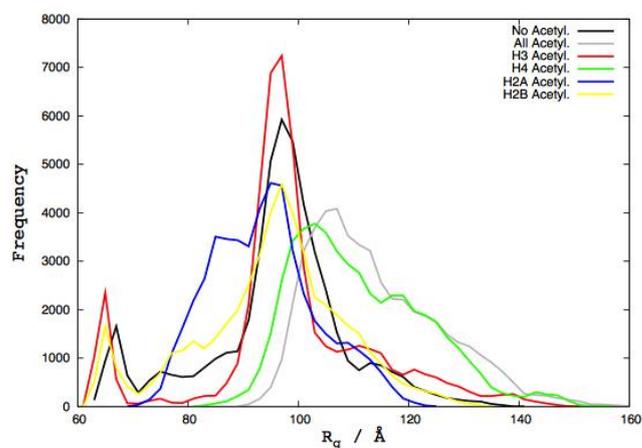
具体的な利用内容、計算方法

In detail, we studied a system consist of 3 nucleosome using coarse-grained simulations with CafeMol, which is a software developed by our group for coarse-grained simulations of bio-molecular system. To compare the effect of histone tail acetylation, we have 6 different setups for no acetylation, H3 tail acetylation, H4 tail acetylation, H2A tail acetylation, H2B tail acetylation and all tails acetylation. The acetylation sites were selected based on the most popular ones in experiments. For each setup, 10 independent simulations were performed to reduce statistical error.

結果

To measure the structural compactness, we use the

radius of gyration  $R_g$  as an indicator. As shown in the figure below, if H4 tail were acetylated, the structure of system will be loosened. Acetylation of other histone tails will not result in such effect. This indicates the charges in H4 tail play important role in the structural compactness of 3 nucleosome system and might explain the reason why H4 tail acetylation will activate lots of gene expression in experiments. Further analysis indicates that the effect of H4 tail acetylation comes from the weakening of neighbor nucleosome interaction. Such weakening is caused by breaking some of the H4 tail mediate electrostatic interaction between neighbor nucleosomes.



まとめ

In this work, we studied the effects of histone tail acetylation on structures of 3 nucleosome by coarse-grained simulations. The results indicate that histone H4 tail acetylation will weaken the

electrostatic interaction between neighbor nucleosome and thus loosen the structure of whole system.

今後の計画・展望

In future, we will study same system with more accurate DNA model (SPN2) and force field (GBSA).

## 平成 26 年度 RICC 利用研究成果リスト

### 【その他】

2014.9, 52 BSJ Annual Meeting, Coarse-grained Generalized Born and surface area models and its application to protein docking, Le Chang, Wenfei Li, Naoto Hori, Shoji Takada

2015.1, FY2014 Strategic Programs for Innovative Research Field 1 workshop, Structural Dynamics of Tri-Nucleosome by Coarse-Grained Simulations: Effects of Histone Tail Acetylation, Le Chang, Yusuke Takagi, Shoji Takada

金田亮、高田彰二、“Interaction of MEK1 with ERK2 in mammalian MAPK pathway studied by coarse-grained molecular simulations”, 第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月、札幌コンベンションセンター、ポスター発表