

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 : **Histone acetylation dependent energy landscapes in tri-nucleosome folding revealed by residue-resolved molecular simulations**

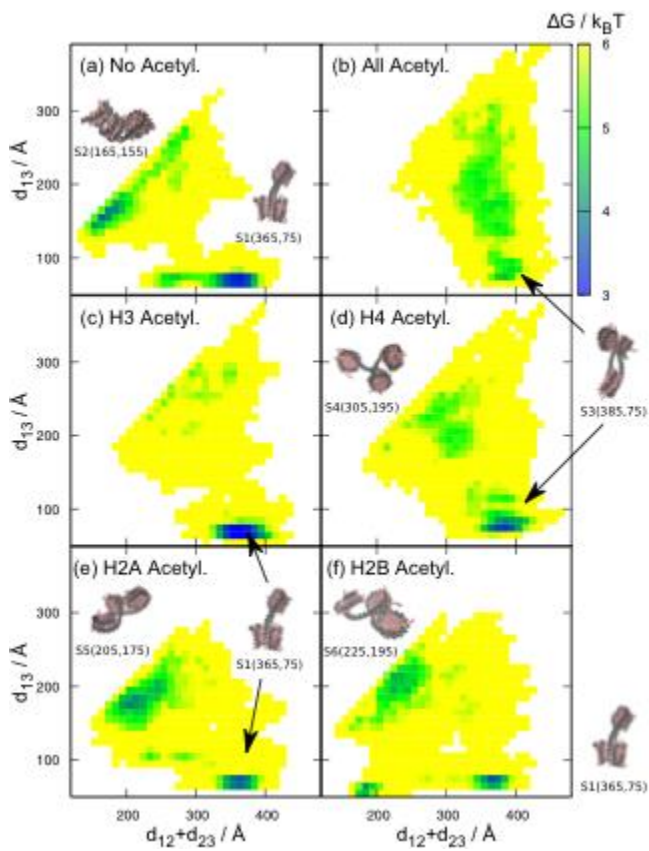
利用者氏名 : Le Chang, ○Shoji Takada

所属 :

「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

<p>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</p> <p>Histone tail acetylation is a key epigenetic marker that tends to open chromatin folding and activate transcription. Despite intensive studies, precise roles of individual lysine acetylation in chromatin folding have only been poorly understood. Here, we revealed structural dynamics of tri-nucleosomes with several histone tail acetylation states and analyzed histone tail interactions with DNA by performing molecular simulations at an unprecedentedly high resolution.</p> <p>2. 具体的な利用内容、計算方法</p> <p>In coarse grained (CG) molecular dynamics (MD) simulation of this work, histone globular domains were mostly restrained to their crystal structures by AICG2+ potential. Intrinsically disordered histone tails were modeled as flexible chains depending on local structural propensities. The DNA was modeled with 3SPN.1 model, which biases double stranded DNA to the B-type form and can bend by interacting with histones. As for the salt concentration, we used 100 mM which reproduces structures compatible with the small-angle X-ray scattering (SAXS) experimental profiles (Takagi et al, under review). Simulations</p>	<p>are performed by CafeMol.</p> <p>3. 結果</p> <p>We found versatile acetylation-dependent landscapes of tri-nucleosome folding. The H4 and H2A tail acetylation reduced the contact between the first and third nucleosomes mediated by the histone tails. The H3 tail acetylation reduced its interaction with neighboring linker DNAs resulting in increase in the distance between consecutive nucleosomes. Notably, two copies of the same histone in a single nucleosome have markedly asymmetric interactions with DNAs suggesting specific pattern of nucleosome docking albeit high inherent flexibility. Estimated transcription factor accessibility was significantly high for the H4 tail acetylated structure.</p> <p>4. まとめ</p> <p>We investigated histone tail acetylation dependence of the free energy landscape of tri-nucleosome folding using molecular simulations that has the residue-level resolution. We found that the tail acetylation in each histone alters the energy landscape in distinct manner. Of the four histones, the H4 acetylation showed the largest change; the open and loose states became dominant. The H3 acetylation increased the distance between neighboring nucleosomes. In the analysis of</p>
--	--

un-acetylated histone tail interactions with DNA, we found that two copies of each histone tail in each nucleosome show markedly different interactions, suggesting specific pattern of nucleosome docking. We also showed that the change in tri-nucleosome folding is correlated with altered accessible surface area of generic transcription factors: The H4 acetylated system showed the largest accessibility.



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転写因子 (HMGB1, Oct4) のダイナミクスの研究

利用者氏名 : 金田 亮、○高田彰二

所属 :

「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

核内環境においては様々な転写因子やシグナル伝達に関わる蛋白質が存在する。これらの転写因子は、外部の刺激に応答して遺伝子発現を柔軟に調整(変化)させる事ができる。しかしながら、その制御機構の詳細については未だに明らかになっていない。それは、核内における転写因子やシグナル伝達に関わる蛋白質のダイナミクスを実験的に明らかにする事が難しい為である。

そこで本研究において我々は、粗視化分子力学シミュレーションによりクロマチン構造内における転写因子のダイナミクスを調査する事を目的とする。昨年度の研究においてシグナル伝達に関わる ERK 蛋白質の挙動を調査した。本年度においては、パイオニア転写因子として知られる Oct4 蛋白質や HMGB1 蛋白質の核内混み合い環境におけるダイナミクスに焦点を当て、ERK との比較をする。

2. 具体的な利用内容、計算方法

核内混み合い環境における転写因子のダイナミクスを調査する為、まず、20 ヌクレオソームからなるクロマチン構造を粗視化シミュレーションにより構築した(Kenzaki et al., 2015)。(昨年度と同様、リンカーDNA の長さは 20-bp とした。) 細胞分裂のフェーズに依存して様々なヌクレオソーム濃度のクロマチンが実現されると考えられる為、本研究では主に 2 種類のクロマチンモデルを準備した : 高ヌクレオソーム濃度 (0.5mM) のクロマチン、低ヌクレオソーム濃度 (0.1mM) のクロマチンである。この 2 種類のクロマチン環境の中心部分に転写因子 (Oct4, HMGB1) の重心をそれぞれ配置し、それを拡散運動の調査

の為の初期構造とした。

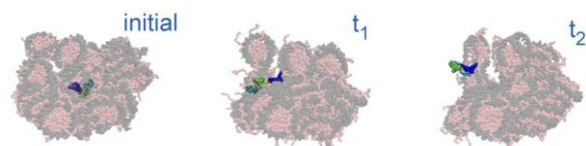
粗視化分子力学シミュレーションには、研究室で開発した CafeMol ソフトウェア (www.cafemol.org) を適用した。転写因子蛋白質やヌクレオソームを構成するヒストン蛋白質は各アミノ酸を 1 粒子(ビーズ)で表現し、DNA 分子は糖、リン酸、塩基を各々 1 ビーズで表現した。蛋白質分子内のビーズ間相互作用は AICG2+モデル (W. Li et al., 2011) を適用し、DNA 分子内の相互作用は 3SPN.1C (E. J. Sambriskii et al., 2009) を適用した。転写因子蛋白質とクロマチン間の相互作用については、静電相互作用 (Deby-Huckel 型、イオン強度: 0.21M) と排除体積の相互作用を導入した。系の時間発展については、under-damped Langevin ダイナミクスを適用し調査した。(その際、温度は室温 [300K] とし、各粗視化ビーズの質量と摩擦係数は 10.0 及び、0.02 とした。)

3. 結果

まず、初期構造からの転写因子の重心位置の変位の時系列を調査した。図は高ヌクレオソーム濃度のクロマチン環境下における HMGB1 蛋白質のスナップショットである。時間の経過と共に、HMGB1 はクロマチン内を確率的に動き、最終的にクロマチン環境から脱出している様子が確認できる。重心位置の変位スピードを ERK 蛋白質と定性的(定量的)に比較する為、平均 2 乗変位の時系列を計算し、その傾きからクロマチン環境下における有効拡散係数を評価した。その結果、転写因子 (HMGB1) の拡散係数は、非転写因子である ERK 蛋白質に比べて有意に高い事が判明した。

また、我々は転写因子 HMGB1 と Oct4 の DNA 探索ス

ピードについても調査した。その結果、特に高ヌクレオソーム濃度のクロマチン環境下において転写因子(HMGB1, Oct4)の DNA 探索スピードは非転写因子(ERK)に比して有意に早い事が分かった。DNA 探索に際し、転写因子はヌクレオソーム DNA よりもリンカーDNA を好んで探索する傾向も明らかになった。但し、HMGB1 はヌクレオソーム DNA の dyad 領域も優位に探索する事が分かった。この傾向は、転写因子 p53 と定性的に同じである。



図：転写因子(HMGB1)のクロマチン環境下における拡散運動(スナップショット)。Initial, t1, t2はそれぞれ初期構造、 $t_1=0.45 \times 10^7$ step, $t_2=0.78 \times 10^7$ stepにおけるスナップショットである。

4. まとめ

転写因子(HMGB1)のクロマチン環境下における拡散スピードは、非転写因子(ERK)に比べて有意に早い。HMGB1 と Oct4 の DNA 探索スピードについても非転写因子(ERK)に比べて有意に早いと分かった。DNA 探索に際し、転写因子が好んで探索する部位はリンカーDNA に集中しているが、HMGB1 は p53 と同様にヌクレオソーム DNA の dyad 領域も優位に探索し得る。

5. 今後の計画・展望

ERK や HMGB1 以外の転写因子のダイナミクスについても、網羅的に調査する事で転写因子(非転写因子)に共通にみられる拡散運動や DNA 探索機構の特徴について明らかにしたい。また、複数の転写因子が同時に DNA を探索する際にどのような競合が発生し得るか調査したい。特に転写因子に関してはアセチル化やメチル化等が核内混み合い環境下における拡散運動に及ぼす影響を明らかにしたい。

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 : **Dynamic coupling among Protein Binding to DNA, Sliding, and DNA Bending Revealed by Molecular Simulations**

利用者氏名 : Cheng Tan, ○Shoji Takada

所属 :

「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

<p>1. 背景、目的</p> <p>Protein-DNA interactions are ultimately sources of all kinds of genetic processes at molecular level. Protein binding to DNA can reshape DNA structure, whereas altered DNA structure could modulate protein dynamics bound on the DNA. Molecular mechanisms of such mutual dependences have not been well understood yet. Experiments have characterized the effect of protein binding on the apparent bend and twist flexibilities of DNA. Additionally, it was found that very subtle variances in the DNA backbone topography can result in distinguishable binding properties for different proteins belonging to the same family. However, due to the limitations of experimental time resolution, they focused on rather long-time behavior with specific DNA environment. In this study, we address more dynamic coupling among protein binding to DNA, protein sliding on DNA, and DNA bending for more general and thus ubiquitous situations employing molecular dynamics (MD) simulation approaches.</p> <p>2. 具体的な利用内容、計算方法</p> <p>To address the issue, as a model system, we use the histone-like protein from strain U93 (HU). HU is one of the most abundant DNA-binding proteins in <i>E. coli</i>, and is involved in many important cellular processes, such as transcription repression, DNA repair, and most basically, DNA compaction. In the present work, we employed</p>	<p>coarse-grained molecular models, where each amino acid in protein is represented by one particle located at its Cα position, while each nucleotide is simplified as three particles, representing phosphate, sugar, and base. For energy functions, we used the AICG2+ model for HUα2 homodimer, and the 3SPN.2C model for DNA.</p> <p>In this work, by performing extensive MD simulations of HU binding to DNA with different sequence or structural properties, we first confirmed that the sequence-dependent or topology-dependent deviations of DNA conformation affect the preferred binding site of HU. Then, we revealed that the binding of HU enhances bending angle of DNA, while the curvature changes of DNA in turn result in different diffusion modes of HU.</p> <p>3. 結果</p> <p>We first performed coarse-grained MD simulations for HU on five DNA sequences of 90 bp long. These DNAs have different C/G contents or topologies. For the case of DNA composing of purely C and G, HU did not show any preference to particular positions on DNA. Whereas for DNAs with A/T regions, we found weak preference of HU binding to A/T sequences. Besides, we found that in the simulations of HU binding to DNA with gap or nick, HU preferentially binds to nucleotides at the opposite side to the gap, and then forms interactions that stabilize the bound</p>
---	---

conformation. By comparing the results of HU binding to purely C/G, DNA with A/T-rich region, and gapped/nicked DNA, we showed that HU has weak preference to the AT-rich region, but strongly favors binding to the near-gap/nick regions. These results are all in good agreement with the experiments. Moreover, the experimental work classified HU as a structure-specific DNA binding protein rather than a sequence specific one. Consistently, we observed much of DNA bending upon strong binding of HU.

On the other side, to quantitatively evaluate the conformational changes of DNA upon HU binding, we monitored the local curvature of DNA during the simulations. We found that upon HU binding, the curvature of DNA without any nick or gap is slightly increased from that in the bare DNA, especially for the regions with higher HU contact probabilities. However, for HU-bound gapped DNA, we found that the binding of HU drastically enhanced the bending extent of DNA, especially at low ionic strength.

Our results also revealed that the bending of DNA affects the binding position of HU. Actually, the negative charge density at the concave of DNA bending is more prominent than the convex so that HU adopts interactions with nucleotides in the concave region.

We next address the coupling of HU binding and DNA bending in dynamics. We found that the highly curved DNA regions are largely overlapped with the binding position of HU, indicating that the protein binding and the DNA bending are dynamically coupled. Our results also indicate that the HU movements are not simple diffusion, but are divided into pauses and transitions that occur intermittently and that the pauses and transitions correspond to high and low DNA curvature, respectively.

For HU binding to the gapped DNA, we then looked into structures of HU-DNA complexes choosing two HU binding positions, one at the gap region, and the other that is far from the gap. At the two HU binding positions, we computed the DNA contact probability for each amino acid. We found that HU residues have higher probabilities to form contacts with DNA when HU binds to the gap region. Our results reveal that the residues of which the contact probabilities were distinct were spatially close each other, and are on the “flanking” surface of HU. Based on these results, we conclude that DNA tends to form contacts with these flanking residues of HU and consequently stabilizes largely curved DNA, provided that DNA is sufficiently bendable.

4. まとめ

In summary, we investigated the dynamic mechanism of sequence-nonspecific interactions between protein and DNA using HU as a model protein. The electrostatic interactions between positively charged protein residues and negatively charged DNA backbone groups dominate the binding, sliding behavior of HU as well as the bending of DNA. The HU-DNA binding interface is dynamically coupled to the curvature of DNA. Forming more contacts between HU and DNA facilitates the bending extent of DNA. We found that the HU motion on DNA has two distinct modes, sliding and pause. HU pauses when DNA is sharply bent. This type of complex interplay between protein binding, DNA bending, and protein sliding may be a general mechanism in protein-DNA interactions ranging from target searching processes of transcription factors to compaction of DNA by sequence-non-specific architectural DNA-binding proteins.

5. 今後の計画・展望

In the next stage, we will test large amount of other DNA-binding proteins to evaluate the

generality of our current conclusions,
especially the relation between
binding-induced-bending of DNA and possible
pauses of protein diffusion on DNA.

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：粗視化分子シミュレーションによる DNA 複製開始複合体の構造研究

利用者氏名：清水将裕、○高田彰二

所属：

「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

<p>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</p> <p>細胞にとって、適切なタイミングに DNA 複製を開始することは重要である。大腸菌では、DNA 複製に先立ち、ゲノム上の複製起点に DNA-タンパク質複合体（複製開始複合体）を形成する。この複合体は 11 分子の DnaA タンパク質を中心に構成されており、DNA を一本鎖の状態で保持することができる。ここで生じた一本鎖 DNA は、DNA ヘリカーゼが最初に結合する領域となり、そこから DNA 複製が進行してゆく。したがって、複製起点上の DNA 複製開始複合体はゲノム複製開始に重要な役割を果たす。</p> <p>バクテリアの DNA 複製開始複合体の構造研究は様々な手法によって進められているが、その全体像を高解像度で解明した例はまだない。本研究では、バクテリアの DnaA タンパク質、または DnaA タンパク質-DNA 複合体の既知の構造を利用した分子シミュレーションで、大腸菌 <i>E. coli</i> の複製開始複合体の構造を解明することを目的とした。</p> <p>2. 具体的な利用内容、計算方法</p> <p>大腸菌 <i>E. coli</i> の DNA 複製開始複合体はその機能によって右側と左側の二つの複合体に分かれる。私たちは今回、右側複合体のシミュレーションを行った。この複合体は一本鎖 DNA を直接結合しないが、DNA 複製開始に役割をもっている。ここでは DNA に 6 分子の DnaA タンパク質が結合しており、さらに DnaA タンパク質のドメイン III 同士がホモ多量化している。6 分子のうち 1 分子はほかから離れており、DnaA のドメイン III が 6 量体を形成するのかどうか、明らかにされていなかった。私たちは、DNA 上の DnaA タンパク質同士をすべて結合させたとき、安定な 6 量体構造</p>	<p>を形成するかどうか、シミュレーションした。それと併せて、他から離れた 1 分子を除く DnaA ドメイン III の 5 量体であれば形成できるかも、シミュレーションした。シミュレーションは、右側複合体に対応する領域の DNA と DnaA タンパク質のドメイン III-IV 6 分子を含めた。DnaA タンパク質ではこの 2 ドメインが複合体の概形を決める最小単位である。計算には粗視化シミュレーター CafeMol を使い、X 線結晶構造解析による既知構造とホモロジーモデルを利用した構造依拠モデルでシミュレーションを行った。タンパク質は各アミノ酸を一粒子で表現する AICG2+モデルを使い、DNA は糖・リン酸・塩基をそれぞれ一粒子とする 3 SPN.1 モデルを用いた。</p> <p>3. 結果</p> <p>DnaA ドメイン III 間に相互作用ポテンシャルを与えホモ 6 量体を形成させるシミュレーションを行ったが、多くのトラジェクトリでは、他と離れた位置にある DnaA 分子のドメイン III は、別の DnaA 分子との結合が不十分であった。また、DnaA 分子間の相互作用を達成する代わりに、DnaA タンパク質の折り畳みがほどける場合もあった。これらの結果より、複製開始複合体の右側で DnaA ドメイン III がホモ 6 量体を形成することは困難であることが示唆された。他方、DnaA ドメイン III のホモ 5 量体形成だけならば容易におこり、複合体構造は維持された。</p> <p>4. まとめ</p> <p>大腸菌 <i>E. coli</i> の DNA 複製開始複合体の右側領域の粗視化シミュレーションを行った。シミュレーションからは、DNA に結合した 6 分子の DnaA タンパク質のうち、5 分子がドメイン III によっ</p>
---	---

てホモ 5 量化しており、残りの 1 分子のドメイン III は単量体であるという構造モデルが支持された。

5. 今後の計画・展望

今後は、複製開始複合体の左側に注目し、この複合体が一本鎖 DNA を保持した構造に変化する分子メカニズムを、分子シミュレーションによって解明していく。

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 : HP1 のジヌクレオソームへの結合様式に関する分子シミュレーション研究

利用者氏名 : 渡辺 周平、○高田彰二

所属 :

「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

<p>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</p> <p>HP1 (ヘテロクロマチンタンパク質 1) はクロマチン構造の動的制御に関わるタンパク質のうちのひとつである。HP1 は H3K9 のトリメチル化を認識してヒストン H3 テールに結合し、ヘテロクロマチン化を誘導することが知られている。HP1 のヌクレオソームへの結合・親和性についてはよく調べられているが、その複合体構造やダイナミクスについては、HP1 が多くの天然変性領域を持っていることもあり、ほとんど明らかになっていない。本研究の目的は、HP1 のヌクレオソームへの結合様式について、分子シミュレーションによってその複合体構造や動態を特定することである。</p>	<p>HP1 ダイマーは隣り合う 2 つのヌクレオソームの H3 テールに結合し、橋渡しをした状態を安定化させていることが分かった。さらに、HP1 ファミリーのホモログである HP1α と HP1γ を比較すると、この隣り合うヌクレオソームの H3 テールに HP1 が橋渡しをした状態の形成度合に大きな違いがあり、ホモログ間でのヌクレオソームへの結合割合の違いに影響していることを明らかにした。</p>
<p>2. 具体的な利用内容、計算方法</p> <p>ヌクレオソームと HP1 からなる系、およびヌクレオソームのみからなる系について、粗視化分子力学プログラム CafeMol を用いて粗視化分子力学シミュレーションを行った。ヌクレオソームの種類 (モノヌクレオソームまたはジヌクレオソーム) や HP1 の種類 (HP1 ファミリーのホモログである HP1α または HP1γ)、初期構造、および分子力場などを変えて、様々な条件でシミュレーションを行った。CafeMol による粗視化分子力学シミュレーションは、1 アミノ酸を 1 粒子、1 塩基を 3 粒子とするものであり、ヌクレオソームのような分子量の大きい系のシミュレーションを行うのに適したものである。</p>	<p>4. まとめ</p> <p>ヌクレオソームと HP1 からなる系について、粗視化分子力学プログラム CafeMol を用いて粗視化分子力学シミュレーションを行った。その結果、HP1 の天然変性領域と DNA の相互作用に起因して、HP1 はヌクレオソームの分子量に応じて異なった結合の仕方を示すとともに、ホモログ間でも結合割合に違いが出ることを明らかにした。この結果は、HP1 がクロマチンを認識する際の基本的な機構となりうるだけでなく、より一般に天然変性タンパク質とヌクレオソームの相互作用にも応用しうる、重要な結果である。</p>
<p>3. 結果</p> <p>ジヌクレオソームの場合、HP1 の天然変性領域がリンカー DNA とよく相互作用をすることによって、</p>	<p>5. 今後の計画・展望</p> <p>まず、共同研究者の検証実験によって、今回の結果の正当性を確かめる予定である。また、今回はモノヌクレオソーム、ジヌクレオソームを扱ったが、テトラヌクレオソームのようなより高分子量の系のシミュレーションも可能であれば行うつもりである。HP1 に関する実験はヌクレオソームアレイのような分子量の非常に大きい系に関するものが多く、それらの実験結果とシミュレーションの結果を、より比較しやすくなるものと考え</p>

られる。

平成 27 年度 利用研究成果リスト

【国際会議、学会などでの口頭発表】

°Le Chang and Shoji Takada : The 53 Annual Meeting of Biophysical Society of Japan: Structural dynamics of tri-nucleosome by coarse-grained simulations: effects of histone acetylation. 2015 (Oral presentation)

°Ryo Kanada, Tsuyoshi Terakawa, Hiroo Kenzaki, and Shoji Takada: "The diffusion dynamics of transcription factors and ERK in chromatin environment studied by coarse-grained simulations", 第 53 回日本生物物理学会年会. (2015.09.13-2015.09.15), 金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館, 2015 年 9 月 13 日