

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
(プログラム名) (英語) Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間: 平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 木寺 詔紀(2017/4/1~2020/3/31)、朴 三用(2020/4/1~2022/3/31)
(英語) Akinori Kidera、Sam-Yong Park

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 横浜市立大学・生命医科学研究科・教授
(英語) Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

II 補助事業の概要

補助事業の成果およびその意義等

本事業では NMR を用いた天然変性タンパク質の相互作用や構造解析法を開発し、NMR によるドッキング構造解析を行い、外部研究者による NMR 測定の支援体制を作る事を目的として支援や高度化を行った。

2017年度: 民間企業を含む9件の支援と外部測定可能なネットワークを950MHzと800MHzで構築した。一般向けセミナー(9/23)、溶液 NMR 講習会(1/18)と固体 NMR 講習会(1/16)、創薬スクリーニング(7/19)、AI 創薬と計算機科学(9/26)、計算化学から NMR(1/19)、ゲノム科学の最前線(3/22)の研究会を開催した。

2018年度: 13件の支援と2件の企業成果占有を行い、外部測定可能なネットワークを700MHzで構築した。創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム: BINDS 創薬支援 NMR(7/31)、一般公開セミナー(9/1)、溶液 NMR 講習会(1/10)、固体 NMR 講習会(1/24)、The 6th International Symposium on Drug Discover and Design by NMR(11/13-14)、平成最後の NMR(3/13)の研究会を開催した。BIOSAXS の解析支援も実施した。

2019年度: 12件の支援と2件の企業成果占有、公開セミナー(9/21)、日本化粧品技術者会 NMR 見学会での事業紹介(12/11)、令和最初の NMR(6/28)と液相分離(1/16)の研究会を開催し、BIOSAXS の解析支援も実施した。

2020年度: 18件の支援と1件の企業成果占有を行った。溶液 NMR 講習会(9/16)、横浜市大一般公開 ontheWeb2020(10/10-31)、製薬協創薬研究部会の NMR 施設見学会とセミナー(11/9)、超高磁場 NMR の現状と展望(10/22)、クライオ電子顕微鏡(3/13)の研究会を開催し、BIOSAXS の解析支援も実施した。

2021年度: 18件の支援を行った。研究者向けに固体 NMR 講習会(11/4)、溶液 NMR 講習会(11/16)、遠隔 NMR 測定実習会(2/22)を開催した。BINDS-NMR(横浜市大) 報告会(11/1)を2021年11月12日にオンラインで開催し、放射光解析の最前線(7/30)、DNP&中性子散乱(3/24)の研究会を開催した。

具体的な支援や高度化の内容は以下のとおりである。

1. PRISM化合物とSin3の相互作用解析 竹原大、三品正 (PRISM BioLabo)

結合タンパク質と同様な様式でSin3に結合する事をNMRで確認したPRISM化合物を、神経障害性疼痛モデルマウスや線維筋痛症のモデルマウスに投与すると改善効果を示した(Ueda et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017)ほか、自閉症モデルマウスでも改善効果を示した(特許申請)。

2. 転写因子を制御する蛋白質間相互作用阻害分子の探索とバリデーション 福西快文 (産総研・Molprof)

転写因子 REST が相互作用する Sin3 に結合する神経関連薬剤をインシリコスクリーニングで選択し、さらにNMRでSin3への結合をスクリーニングした結果セルトラリン、クロルプロマジン、クロルプロチキセンを同定した。それらはSin3が関与する髄芽腫細胞の増殖阻害効果を示したのでドラッグリポジショニング効果として報告した(Kurita et al. Sci. Rep. 2018)。更に既存治療薬からインシリコで208化合物を同定し、NMRでSin3Bの結合を観測した化合物について膠芽腫の細胞増殖抑制効果を検討した。また阪大肥後研で化合物の結合様式をMD計算で解析した(Hayami et al. Sci. Rep. 2021)。

3. 膜タンパク質と脂質との相互作用解析 大澤匡範 (慶応)

イソギンチャク毒 APETX1 の NMR 構造を決定し、APETX1 の疎水性表面が脂質分配だけではなく、イオンチャネル hERG の resting 状態の認識に関与する事を報告した(Matsumura et al. BMC Mol. Cell Biol. 2021)。

4. 核酸デリバリーシステムにおける核酸とポリアミノ酸との相互作用解析 長田健介 (東大)

siRNA - ポリリシンとの複合体のNMRを測定し、ポリリシンがRNAの主溝に結合していることが分かった。

5. ウイルス由来1本鎖DNAの構造解析 佐藤佳 (東京大学)

HIV-1のサブタイプのうちタイプC株にはGagタンパク質のPTAPモチーフに重複が見られる。PTAPをコードする配列とその相補鎖のDNA構造をNMRで調べ、ループ状の高次構造が存在することを明らかにした。

6. NMR解析の依頼 宮崎智之 (横浜市立大学)

フッ素を含むAMPA受容体結合PET薬剤の化合物の確認や生体内代謝物の構造決定をNMRで行った(Arisawa et al. Nuclear Medicine & Biol. 2022)。

7. クロマチン制御因子HiTAP1の構造解析 田上英明 (名古屋市立大学)

新規のヒストンH3結合タンパク質であるHiTAP1はそのC末領域がヒストンH3と特異的に相互作用する。NMRを用いてC末のドメイン構造を決定しその相互作用様式について議論した。

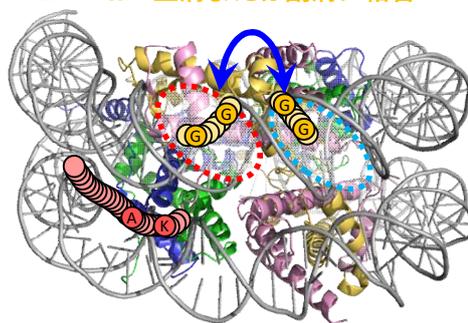
8. ヌクレオソーム構造におけるヒストンテールとDNAの相互作用解析 河野秀俊 (量子研)

H2A-H2Bをラベルした145bpと193bp DNAの2種類のヌクレオソームの動的構造をNMRで解析した。H2AのC末テールはリンカーDNAと相互作用していたが、H2AとH2BのN末テールはリンカーDNAの有無にかかわらず、2つの動的構造を取っていた。MD計算の結果、2つの動的

H2B N-tail: Entry/exit 方向



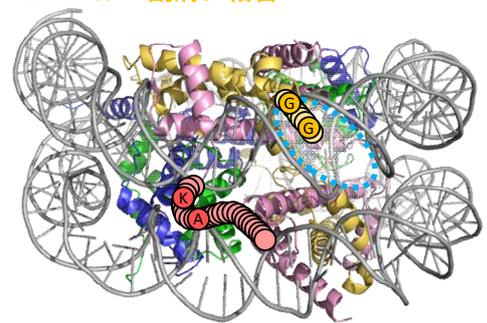
H2A N-tail: 主溝または副溝に結合



H2B N-tail: Entry/exit と反対方向



H2A N-tail: 副溝に結合

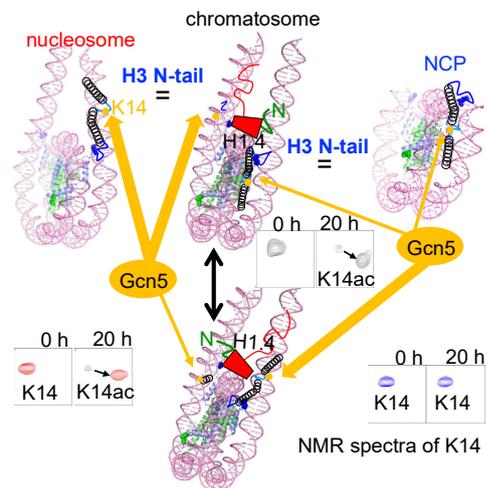


構造はH2AのN末テールのDNAの主溝結合構造と副溝結合構造、及びH2BのN末テールのDNA出入り口方向構造とその逆方向構造に対応した(上図)。しかも図に示すようにH2AとH2BのN末テールの2つの動的構造間に相関がある事を初めて報告した(Ohtomo et al. J. Mol. Biol. 2021)。

9. ヌクレオソームコア粒子(NCP)、ヌクレオソーム、クロマトソーム中のH3N末テールの動的構造解析

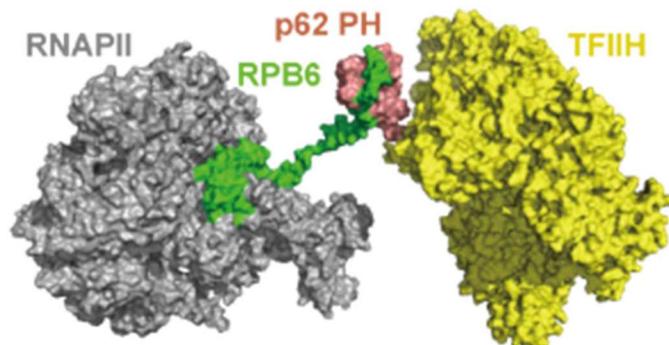
ヒストンH4のN末テールのK5、K8、K12、K16をアセチル化したヌクレオソームの動的構造解析を理研の梅原

研との共同で行った。H4 の N 末をアセチル化したヌクレオソームの結晶構造ではコアの構造は全く変化していなかったが、NMR で解析した結果、H4 テールが動的に DNA 結合型からフリー型になるとともに、H3 テールと DNA との相互作用が強くなることが明らかとなった。更に、ヒストン H4 にアセチル化が入ると、Gcn5 酵素による H3 の 14 番目のリシン残基のアセチル化の速度が早くなることも見出した。1 個のヌクレオソーム内でのヒストンテール末端間の翻訳後修飾を調節する新しい機構を明らかにした (Furukawa et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2020)。リンカーDNA が無いヌクレオソームコア粒子 (NCP)、リンカーDNA があるヌクレオソーム、さらにリンカーヒストンが結合したクロマトソームにおける H3 の N 末テールの動的構造を、同一条件下で比較した。その結果、NCP においては、H3 の N 末テールのダイナミクスと Gcn5 による K14 のアセチル化速度が、ヌクレオソーム中の H3 の N 末テールと比較すると大きく抑制されていた。一方、リンカーヒストン H1.4 が結合したヌクレオソームであるクロマトソームでは、H3 の N 末テールは NCP 的なコンフォメーションとヌクレオソーム的なコンフォメーションの 2 つをとっていることが明らかとなった。しかしながら、クロマトソームにおける H3K14 のアセチル化速度は、NCP よりもヌクレオソームにおけるアセチル化速度に近い結果が得られたことから、クロマトソームにおいても、H3 の N 末テールは高いフレキシビリティを保持していることが示唆された (上図) (A. Furukawa et al., iScience, 2022)。



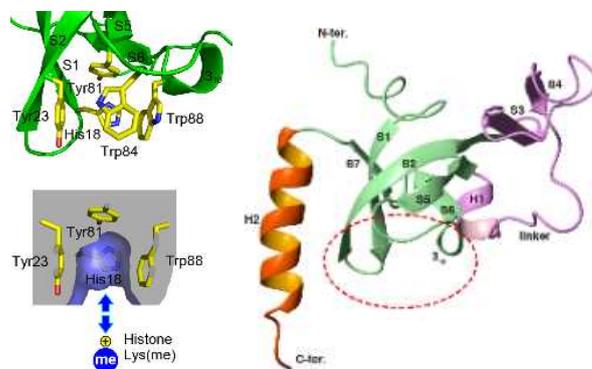
10. RNA ポリメラーゼと TFIIH の相互作用部位の NMR による構造解析 山口雄輝 (東工大)

基本転写/修復因子 TFIIH の p62 サブユニットの PH ドメインは様々な転写因子や修復因子と相互作用して TFIIH を機能部位へ先導する。3 つの RNA ポリメラーゼ (RNAPI、RNAPII、RNAPIII) に共通する RPB6 サブユニットの N 末テールの中に PH ドメイン結合部位の類似配列を見つけた。RPB6 は N 末テールで PH ドメインと特異的に結合することを確認し、RPB6 単独及び PH ドメインとの複合体の構造を NMR 法で決定した。この NMR 構造と RNAPII および TFIIH のクライオ電顕構造から、TFIIH と RNAPII とのドッキング構造を構築した (右上図) (Okuda et al. Nucleic Acids Res. 2022)。



11. クロモドメイン (CD) の結合多様性と pH 依存性

酵母の Eaf3 は転写開始点部位の H3K4me を認識しヒストンをアセチル化する Nua4 複合体と、転写伸長部位の H3K36me を認識しヒストンを脱アセチル化し疑似開始を抑制する Rpd3 複合体の共通サブユニットである。Eaf3 の CD は両方のメチル化ヒストンに弱く結合するが、今回 NMR を用いてその構造的な意義を解明した

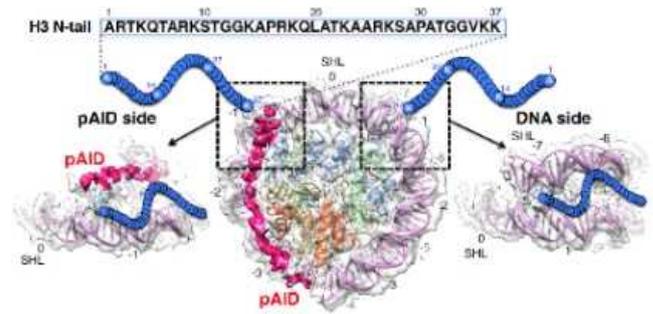


(Okuda&Nishimura, Biosci. Rep. 2020)。右図に Eaf3 のクロモドメインの構造を示す。メチル化ヒストン H3 を常磁性ラベルした結合実験から破線で囲んだ部位がメチル化ヒストン結合部位で、拡大図で示すようにメチル化リシン結合の芳香環ポケットを Tyr23, Tyr81, Trp88 が形成している。興味深いことに今までの芳香環ポケットには見つかっていないヒスチジン His18 が存在する。NMR で His18 の pKa を見積ると 6.70 でこれより酸性側では His はプロトン化し正電荷を帯びるので、正電荷を持つメチル化リシンの結合を阻害する。実際メチル化ヒスト

ンとの結合を解析した結果、酸性側で結合は無くなりアルカリ側で結合が強くなった。この実験から Eaf3 の CD は細胞内で転写開始部位と転写伸長部位の両方の pH センサーとして働き、転写活性を酸性側で抑制しアルカリ側で促進していることを示唆した。

12. FACT の SPT16 酸性領域 pAID と 112bp ヌクレオソームの複合体の NMR 解析

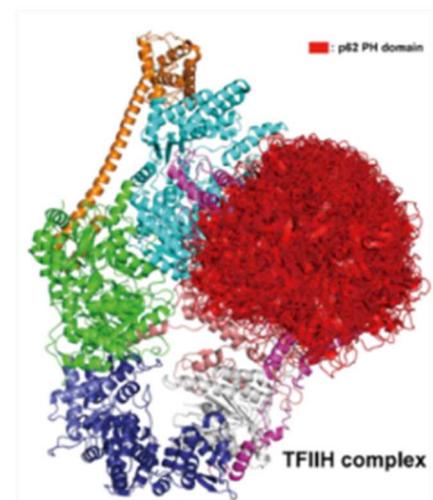
ヒストンシャペロン FACT のサブユニット Spt16 のリン酸化された酸性天然変性領域 (pAID) は、通常の 145bp より短い 112bp DNA で形成したヌクレオソームと安定な複合体を形成するが、クライオ電顕を用いて pAID と 112bp ヌクレオソームの複合体の立体構造を決定した (Mayanagi et al. Sci. Rep. 2019)。右図に模式的に示すように FACT-pAID/ヌクレオソーム複合体の電顕構造



では見えなかったヒストン H3 テールの動的挙動を解析するために、FACT-pAID/112bp ヌクレオソーム複合体の NMR 解析を行った (Tsunaka et al. iScience, 2020)。その結果、H3 テールは DNA 側と pAID 側の 2 種類のシグナルを示した。pAID 側の H3 テールは動的に DNA や pAID と相互作用しながら、より溶液中に露出しており、ヒストン修飾酵素などの影響を受けやすいのに対して、DNA 側やヌクレオソームの H3 テールはヌクレオソームの二本の DNA に囲まれた構造スペースにその相互作用により拘束されていて、ヒストン修飾酵素のアクセスを強く阻害することがわかった (上図)。この研究成果はクライオ電顕解析と相補的な NMR の利点を活用した高度化のマイルストーンとなった。

13. TFIIH の全体構造と標的タンパク質との複合体構造

ゲノム全体で DNA の損傷をヌクレオチド除去修復する時は XPC タンパク質が、転写の途中で修復する時には UVSSA タンパク質が損傷部位に結合し、どちらも酸性天然変性領域が基本転写因子 TFIIH の p62 サブユニットの PH ドメインと結合して TFIIH 複合体をリクルートする (Okuda et al. Nucleic Acids Res. 2017)。PH ドメインは TFIIH 複合体中でフレキシブルな為、結晶構造やクライオ電顕構造では見えない。PH ドメインと、後ろに続くクライオ電顕構造で見えている BSD1 ドメインを含んだ領域の静的および動的構造を NMR で解析した。得られた結果に基づいて初期構造を作成後、MD シミュレーションでリファインし、PH ドメインを含んだ TFIIH 複合体の動的構造をモデル化した (右図)。さらに、TFIIH と XPC や UVSSA とのドッキングモデルを構築し、NMR 化学シフト振動実験で各モデルの妥当性を確認した (Okuda et al. Nucleic Acids Res. 2021、掲載号の表紙に採用)。



References

1. [Furukawa A](#), Wakamori M, Arimura Y, [Ohtomo H](#), [Tsunaka Y](#), Kurumizaka H, Umehara T, [Nishimura Y](#). Characteristic H3 N-tail dynamics in the nucleosome core particle, nucleosome, and chromosome. *iScience* (2022) 25, 103937. doi: 10.1016/j.isci.2022.103937.
2. [Ohtomo H](#), [Kurita JI](#), Sakuraba S, Li Z, Arimura Y, Wakamori M, [Tsunaka Y](#), Umehara T, Kurumizaka H, Kono H, [Nishimura Y](#). 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.* (2021) 433, 167110. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167110.
3. [Okuda M](#), Suwa T, Suzuki H, Yamaguchi Y, [Nishimura Y](#). Three human RNA polymerases interact with TFIIH via a common RPB6 subunit. *Nucleic Acids Res.* (2022) 50, 1-16. doi: 10.1093/nar/gkab612.

4. Hayami T, Kamiya N, Kasahara K, Kawabata T, Kurita JI, Fukunishi Y, Nishimura Y, Nakamura H, Higo J. Difference of binding modes among three ligands to a receptor mSin3B corresponding to their inhibitory activities. *Sci Rep.* (2021) 11, 6178. doi:10.1038/s41598-021-85612-9.
5. Matsumura K, Shimomura T, Kubo Y, Oka T, Kobayashi N, Imai S, Yanase N, Akimoto M, Fukuda M, Yokogawa M, Ikeda K, Kurita JI, Nishimura Y, Shimada I, Osawa M. Mechanism of hERG inhibition by gating-modifier toxin, APETx1, deduced by functional characterization. *BMC Mol Cell Biol.* (2021) 22, 3. doi:10.1186/s12860-020-00337-3.
6. Okuda M, Ekimoto T, Kurita JI, Ikeguchi M, Nishimura Y. Structural and dynamical insights into the PH domain of p62 in human TFIIH. *Nucleic Acids Res.* (2021) 49, 2916-2930. doi: 10.1093/nar/gkaa1045.
7. Furukawa A, Walinda E, Arita K, Sugase K. Structural dynamics of double-stranded DNA with epigenome modification. *Nucleic Acids Res.* (2021) 49, 1152-1162. doi:10.1093/nar/gkaa1210.
8. 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.* (2020) 23, 101641. doi: 10.1016/j.isci.2020.101641.
9. Furukawa A, Wakamori M, Arimura Y, Ohtomo H, Tsunaka Y, Kurumizaka H, Umehara T, Nishimura Y. Acetylated histone H4 tail enhances histone H3 tail acetylation by altering their mutual dynamics in the nucleosome. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2020) 117, 19661-19663. doi:10.1073/pnas.2010506117.
10. Okuda M, Nishimura Y. The Eaf3 chromodomain acts as a pH sensor for gene expression by altering its binding affinity for histone methylated-lysine residues. *Biosci. Rep.* (2020) 40, pii:BSR20191958. doi:10.1042/BSR20191958.
11. Mayanagi K, Saikusa K, Miyazaki N, Akashi S, Iwasaki K, Nishimura Y, Morikawa K, Tsunaka Y. Structural visualization of key steps in nucleosome reorganization by human FACT. *Sci Rep.* (2019) 9, 10183. doi:10.1038/s41598-019-46617-7.
12. 奥田昌彦,西村善文 核内天然変性タンパク質の動的構造 細胞 (2019) 51, 600-603.
13. Kurita JI, Hirao Y, Nakano H, Fukunishi Y, Nishimura Y. Sertraline, chlorprothixene, and chlorpromazine characteristically interact with the REST-binding site of the corepressor mSin3, showing medulloblastoma cell growth inhibitory activities. *Sci. Rep.*(2018) 8, 13763. doi: 10.1038/s41598-018-31852-1.
14. Saikusa K, Osakabe A, Kato D, Fuchigami S, Nagadoi A, Nishimura Y, Kurumizaka H, Akashi S. Structural Diversity of Nucleosomes Characterized by Native Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* (2018) 90, 8217-8226. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b01649.
15. Saotome M, Saito K, Yasuda T, Ohtomo H, Sugiyama S, Nishimura Y, Kurumizaka H, Kagawa W. Structural Basis of Homology-Directed DNA Repair Mediated by RAD52. *iScience* (2018) 3, 50-62. DOI: 10.1016/j.isci.2018.04.005.
16. Okuda M, Nakazawa Y, Guo C, Ogi T, Nishimura Y. Common TFIIH recruitment mechanism in global genome and transcription-coupled repair subpathways. *Nucleic Acids Res.* (2017) 45,13043-13055. doi: 10.1093/nar/gkx970.
17. Shirai A, Kawaguchi T, Shimojo H, Muramatsu D, Ishida-Yonetani M, Nishimura Y, Kimura H, Nakayama JI, Shinkai Y. Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 on its heterochromatin assembly. *eLife* (2017) 6, 31641. doi:10.7554/eLife.31641.
18. Ueda H, Kurita JI, Neyama H, Hirao Y, Kouji H, Mishina T, Kasai M, Nakano H, Yoshimori A, Nishimura Y. A mimetic of the mSin3-binding helix of NRSF/REST ameliorates abnormal pain behavior in chronic pain models, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2017) 4705-4709. doi: org/10.1016/j.bmcl.2017.09.006.
19. Kato D, Osakabe A, Arimura Y, Mizukami Y, Horikoshi N, Saikusa K, Akashi S, Nishimura Y, Park SY, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Matsumoto A, Kono H, Inoue R, Sugiyama M, Kurumizaka H. Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. *Science.* (2017) 356, 205-208. doi:10.1126/science.aak98671.

ABSTRACT

We aimed to develop structural analyses of intrinsically disordered proteins and their complexes by NMR. To reveal their interaction modes, we have developed docking methods for small compounds on target proteins as drug candidates, and also for intrinsically disordered proteins on a supramolecular complex, whose overall architecture has been revealed by cryo-electron microscopy (cryo-EM) method.

For example, REST is related to medulloblastoma and neuropathic pain, and its N-terminal intrinsically disordered domain binds to the PAH1 domain of a corepressor Sin3, which recruits histone deacetylases. Compounds that inhibit the interaction of REST with the PAH1 domain ameliorated such neuropathies (Ueda et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017). In addition, we found that three neuropathic approved drugs: sertraline, chlorprothixene, and chlorpromazine bind to the PAH1 domain by NMR, and inhibit medulloblastoma cell growth (Kurita et al. *Sci. Rep.* 2018).

Histone acetylation is regulated by intracellular pH causing cell proliferation at high pH. Eaf3 CD interacts with epigenetic markers, H3K4me and H3K36me. Eaf3 CD contains a histidine residue in its binding pocket suggesting that Eaf3 CD functions as a pH sensor and a regulator of gene expression (Okuda & Nishimura, *Biosci. Rep.* 2020).

The nucleosome comprises two histone H2A/H2B dimers and one histone (H3/H4)₂ tetramer wrapped around by 145 bp of DNA together with linker DNA. As revealed by NMR and MD simulations in nucleosomes with and without linker DNA, the H2A N-tail can locate in the major or minor grooves of core DNA, while the H2B N-tail adopts two different conformations oriented toward the entry/exit side and opposite side (Ohtomo et al. *J. Mol. Biol.* 2021).

We showed that, in the nucleosome containing linker DNA, H4 N-tail acetylation enhances H3 N-tail acetylation by altering their mutual dynamics on linker DNA (Furukawa et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2020). In addition, we have examined the H3 N-tail dynamics and acetylation by using the linker DNA-less nucleosome (nucleosome core particle, NCP) and the linker histone H1-bound nucleosome (chromatosome). In the NCP, the H3 N-tail is bound between two core DNA gyres, thus H3 N-tail acetylation and dynamics are suppressed regardless of H4 N-tail acetylation. In the chromatosome, the asymmetric H3 N-tail adopts two conformations: one like in the NCP and one like in the nucleosome with linker DNA (Furukawa et al. *iScience*, 2022).

The FACT complex contains SPT16 subunit. Cryo-EM analysis revealed a partially unwrapped nucleosome by FACT, in which the phosphorylated intrinsically disordered (pAID) segment of SPT16 wrapped around the histone core together with 112-bp DNA (Mayanagi et al. *Sci. Rep.* 2019). NMR revealed that the histone H3 N-tails adopt two different conformations corresponding to the original nucleosome site (DNA side) and the site containing pAID (pAID side). The H3 N-tail acetylation by Gcn5 is faster on the pAID side than on the DNA side, suggesting that accessible conformations of H3 tails are created by the replacement of DNA with pAID of FACT (Tsunaka et al. *iScience* 2020).

TFIIH is an essential transcription and DNA repair factor composed of seven core subunits. The subunit p62 contains a PH domain, which is responsible for the TFIIH location at transcription and damage sites, and BSD1 domain. A cryo-EM structure of TFIIH visualized core, except for the PH domain. Based on the NMR structure of the p62 PH domain linked to the BSD1 domain, the PH domain was modeled in the cryo-EM structure to obtain the whole human TFIIH core structure, indicating that the PH domain moves around the surface of core (Okuda et al. *Nucleic Acids Res.* 2021).

In eukaryotes, three RNA polymerases are required for various RNA syntheses: RNAPI for rRNA, RNAPII for mRNA and most snRNAs, and RNAPIII for tRNA and other small RNAs. Three RNAPs contain a common subunit RPB5 possessing a short flexible N-tail. We revealed that the N-tail interacts with the PH domain of the p62 subunit of TFIIH and determined the NMR structure of RPB6 bound to the PH domain. Using available cryo-EM structures, we modelled the activated elongation complex of RNAPII bound to TFIIH. These and biochemical results show that the p62-RPB6 interaction plays multiple roles in transcription, TC-NER, and cell proliferation, suggesting that TFIIH is engaged in all RNAP systems (Okuda et al. *Nucleic Acids Res.* 2022).