

論文の内容の要旨

氏名：松原 和子

博士の専攻分野の名称：薬学博士

論文題名：DNA 介在反応に関与する DNA 結合因子の構造および機能との関係

遺伝情報を集積した DNA が関与する反応は、転写、複製、修復ならびに組換えといった生命の維持および細胞増殖において必須である。本研究では、これらの DNA 介在反応における制御タンパク質の機能を、その構造の観点から明らかにすることを目的として以下の検討を行った。

I. ヒストンの機能表面残基の包括的解析

真核生物において DNA はヒストンによって巻かれヌクレオソームを形成している。したがって DNA を介した転写、複製、修復などの反応の際にはヌクレオソーム構造変化を伴う必要がある。ヒストンは出芽酵母からヒトまで90%以上のアミノ酸配列が保存されており、このことは個々のアミノ酸が重要な役割を担っていることを示唆している。しかし、従来の研究は、主にヒストンの N 末端における化学修飾残基に関するものであり、コア領域における解析はなされていない。また、転写以外の複製や修復に関与するアミノ酸残基はほぼ未解明であった。そこで我々は4種類のヒストン H2A、H2B、H3、H4 について、ヌクレオソームの分子表面に位置する 320 のアミノ酸残基に対してアラニン置換を行い、それらの解析から転写、複製、修復に関与するアミノ酸残基の特定を試みた。

転写、複製、修復のそれぞれに関わるヒストン機能残基を解析するためにそれぞれの反応系を調節する薬剤で、作製した点変異酵母を処理し、その表現型解析を行った。転写開始に対しては Suppressor of Ty (Spt)、転写伸長に対しては 6-azauracil (6AU)、複製に対しては hydroxyurea (HU)、そして修復に対しては methyl-methanesulfonate (MMS) を用いた。複数のシステム解析を行った結果、以下を例とする様々な新知見が得られた。

1. 機能残基の多くはヌクレオソームの出入り口 (図1-A 緑の囲み) や隣のヌクレオソーム同士の相互作用 (図1-A オレンジの囲み) 部位に局在することを明らかにした。これらの場所は異なる反応

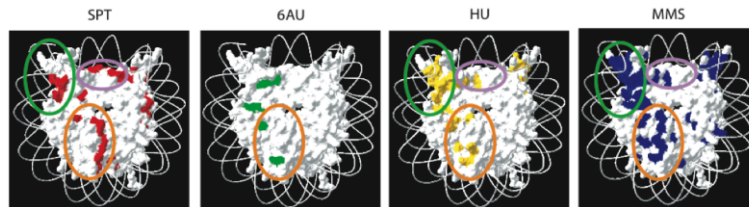


図1-A. Spt, 6AU, HU, MMSそれぞれに影響を及ぼした残基をヌクレオソーム上にマップ。緑:ヌクレオソーム出入り口、オレンジ:隣のヌクレオソーム間相互作用、紫:H3-DNA、H3-H3相互作用

系において共通にヒストンを攻撃するための重要な場所であると考えられる。

2. 反応特異的に作用する部位として、ヒストンH3-DNA相互作用領域近辺の残基はSpt表現型を示し、ヒストンH3-H3相互作用に関わる残基はHUならびにMMS感受性を示した (図1-B 左)。すなわち転写と複製・修復の間ではこの領域の反応機構が異なることが示唆された。また、H2B- α C領域では4種の反応系において作用部位が異なっていた (図1-B 右)。この領域は隣のヌクレオソーム同士の

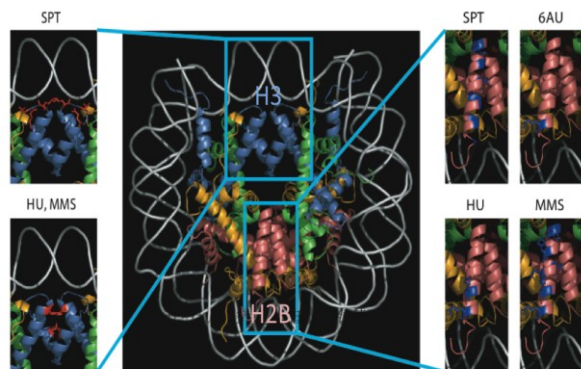


図1-B. 反応特異性が見られた残基のマップ。(中央)ヌクレオソームリボン図の全体像。(左)ヒストンH3における機能残基:赤。(右)ヒストンH2Bにおける機能残基:青。

相互作用に関わる残基を含むことから、ヌクレオソーム同士の相互作用変換様式が反応によって異なることが考えられる。

今回の実験により転写および複製・修復の際において異なる残基が関与することが示された領域(図1-B左)に対しては、ヒストンシャペロンCIA/Asf1が結合することが知られている。そこで次章ではCIA/Asf1とその相互作用因子による反応特異的なクロマチン制御について検討した。

II. CIA/Asf1 とその相互作用因子によるクロマチン反応特異的制御の解明

ヒストンシャペロン CIA/Asf1 はヒストン同様、複数の DNA を介した反応に関与している。CIA/Asf1 はヒストンに結合しクロマチンの集合または脱集合を促進する。そして複製依存的にヒストンシャペロンである CAF-1 と、複製非依存的にヒストンシャペロンである HIRA と協調的に働き特異的な制御がなされる。CIA/Asf1 はヒト HIRA の B ドメイン領域を介して相互作用する。B ドメインは種を超えて保存されており分裂酵母ホモログ Hip1 もこのドメインを有している。また CIA/Asf1 は CAF-1 複合体サブユニットの Cac2 とも結合することが知られているため、HIRA と Cac2 の両者における共通のドメインを検索したところ、Cac2 においても B ドメイン様の配列の存在が示された。この部位のペプチドを用いて分裂酵母の CIA/Asf1 との複合体構造解析をしたところ、予想通り Hip1 および Cac2 ペプチドは同様の結合様式であった(図2)。また立体構造から予想されたタンパク質同士の結合残基は点変異タンパク質を用い表面プラスモン共鳴法による結合解析により実証された。

Cac2 および Hip1 が複製依存、または複製非依存的にヒストンに対してどのように影響を及ぼしているのかは興味深い点であり、既に明らかになっている CIA/Asf-H3-H4 複合体の構造および今回の解析により明らかになった CIA/Asf1-Cac2 複合体、そして CIA/Asf1-Hip1 複合体を重ね合わせると、Cac2 および Hip1 はヒストン相互作用部位とは離れた場所で CIA/Asf1 と相互作用をしていることがわかる(図2)。しかし、注目すべき点として、Hip1 と結合した際において CIA/Asf1 の構造変化に影響を及ぼした領域はヒストン H3 相互作用に関わる領域の近傍である。一方、Cac2 が結合した際には CIA/Asf1 の H3 相互作用部位において、構造変化が見られなかった。また、先に行ったヒストン点変異体解析においてこの領域は転写および複製/修復の間で異なる残基が影響を及ぼしている(図1B左)。これらの結果は、Hip1 が相互作用した際と Cac2 が相互作用した場合とではヒストン H3-H4 複合体と CIA/Asf1 の結合様式が変わり、反応特異性を生み出していることを示唆している。

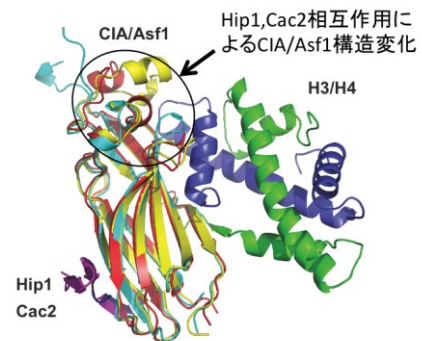


図2. 様々なCIA/Asf1複合体構造解析の比較。CIA/Asf1:シアン-Hip1:マゼンタ、CIA/Asf1-Cac2: 深青、Asf1:赤-H3:青-H4:緑。

III. バクテリオファージ由来 Red β タンパク質の機能解析

バクテリオファージラムダにおいて、Red β タンパク質は1本鎖DNAに結合する性質があり、相補的なDNA配列を対合し相同DNA組換えを促進する。真核生物においては類似した機能を持つタンパク質としてRad52が知られている。両者の1次構造の相同性は低く、同じファミリーに属するのかどうか明確にならなかった。そこで我々は、生物種を超えた機能および構造の共通性と多様性について追求することにした。

まず Red β タンパク質ファミリーと Rad52 ファミリーの1次構造類似性を解析したところ 15%程度の相同性であった。Rad52において1本鎖DNA結合残基の多くがRed β タンパク質においても保存されていることを発見した(図3-A)。実際に12個の点変異タンパク質を用いてゲルシフトアッセイおよび走査型電子顕微鏡観察を行った結果、多くの残基が1本鎖DNA結合に影響を及ぼし、Red β タンパク質とRad52の1次構造相同性が機能的にも保存されていることを明らかにした(図3-B)。また、疎水性領域と塩基性領域の2つの領域において、点変異により1本鎖DNA結合に著しく影響を及ぼすことがわかった(図3-A)。

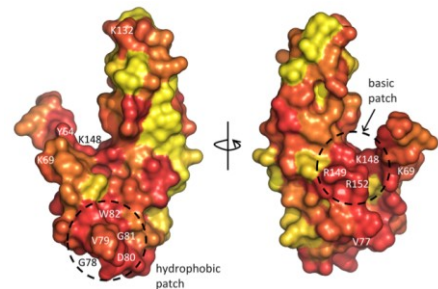


図3-A. Rad52N末領域の単量体構造。黄色から赤に近づくにつれて種間の保存性が高い。

Red β タンパク質においては 11-12 量体を形成することから、点変異によるオリゴマー形成への影響について Native-PAGE およびゲルろ過による解析を行った。Rad52 の X 線構造解析の結果より疎水性領域は分子内部に位置することが予想されたため、オリゴマー形成に影響し、塩基性領域は分子表面に位置する事からオリゴマー形成に影響しないと予想していた。しかし、結果は正反対となった。今回、全長の Red β タンパク質を用いて解析を行ったが、Red β タンパク質と Rad52 における配列相同性は N 末の DNA 結合ドメインにおいてのみ見られ、全長の立体構造は明らかになっていない。このことから塩基性領域は表面にでると予想していたが全長においては分子内部に属する可能性も考えられた。

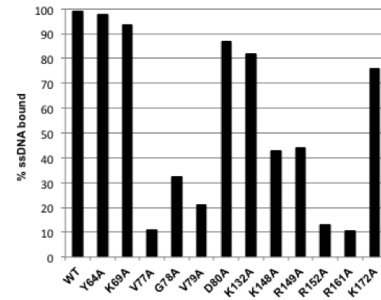


図3-B. 様々な点変異 β タンパク質を用いたゲルシフトアッセイによる1本鎖DNA結合解析結果。

総括

DNA 結合因子による遺伝子発現制御は、従来、1次および2次構造の観点から解析されてきた。しかしながら DNA 介在反応の多くは、複数のタンパク質の相互作用により成立するため、そのような解析では理解に限界が見られた。本研究では、DNA 介在反応を高次元も含め解析することで、従来の解析では読み取ることができなかった多くの知見を得た。したがって本研究で得られた知見ならびに手法は、未だ不明な点が多い DNA 介在反応の詳細を分子レベルで明らかにするための一助となるものである。