

論文審査の結果の要旨

氏名：松原和子

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：DNA 介在反応に關与する DNA 結合因子の構造および機能との關係

審査委員：(主査) 教授 榛葉繁紀

(副査) 教授 木澤靖夫 教授 草間國子

教授 鈴木孝

遺伝情報を集積した DNA が關与する反応は、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について、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. 包括的な点変異体を用いたコアヒストン分子表面の機能解析

真核生物においてコアヒストン（8量体）が DNA を巻いた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關与するアミノ酸残基はほぼ未解明であった。そこで申請者は 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 個のアミノ酸残基をアラニンに置換し、それらの解析から転写、複製、修復に關与するアミノ酸残基の特定を試みた。その結果、以下に示す新知見が得られた。

1. 機能残基の多くはヌクレオソームの出入り口や隣のヌクレオソーム同士の相互作用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. ヒストン H3-DNA 相互作用領域近辺の残基は転写反応への關与を示し、ヒストン H3-H3 相互作用に關わる残基は複製・修復への關与を示した。すなわち、転写と複製・修復の間ではこの領域における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 種の機能解析実験において作用部位が異なっていた。この領域は隣のヌクレオソーム同士の相互作用に關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・修復の際に異なる残基が關与することが示された領域に対して、ヒストンシャペロン Asf1 が結合することが知られている。そこで次章では 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. 分裂酵母ヒストンシャペロン Asf1 及び Hip1B ドメイン/Cac2 C 末端の複合体立体構造解析

ヒストンシャペロンはコアヒストンに結合し、ヌクレオソームの集合または脱集合を促進するタンパク質である。多くのヒストンシャペロンが知られており、中でも Asf1 は、CAF-1 や HIR といった様々なクロマチン相互作用因子と結合し、ヌクレオソームの集合や脱集合を促進する。その結果として、Asf1 は遺伝子発現、サイレンシング、DNA 修復、複製、組換えといった様々な DNA 介在反応に關与する。

本研究において、CAF-1 と HIR が類似したドメインを有することに着目して、分裂酵母 Asf1 (SpAsf1N;1-161) とヒト HIRA の分裂酵母ホモログである Hip1 の B ドメインおよび分裂酵母の Cac2 の B ドメイン様 C 末端領域 (Cac2C) との複合体における結晶構造解析を行った。その結果、予想通り Hip1 と Cac2 は同様の結合様式で Asf1 と相互作用することが明らかとなった。また、立体構造から予想されたアミノ酸残基の結合への關与は表面プラスモン共鳴法による解析により証明された。

今回の解析により明らかになった Asf1-Cac2 複合体ならびに Asf1-Hip1 複合体について、既に明らかになっている Asf1-H3-H4 複合体の構造と重ね合わせることで、Cac2 および Hip1 はヒストンとの相互作用

用部位とは離れた場所で Asf1 と結合していることが明らかとなった。一方、Asf1-Cac2 複合体ならびに Asf1-Hip1 複合体の間には興味深い違いが認められた。すなわち、Asf1 は、Hip1 と結合した際には、ヒストン H3 との相互作用領域の近傍において構造変化が見られた。しかしながらこの構造変化は、Cac2 との結合によっては観察されなかった。また、第一章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与える部位であることが示されている。Asf1 は Cac2 とは複製依存的に相互作用し、Hip1 とは複製非依存的に相互作用する。したがって、本研究において得られた結果は、Asf1 とヒストン H3-H4 複合体との結合様式が、Hip1 が相互作用した際と Cac2 が相互作用した場合とでは異なっており、これが複製反応への依存性の違いを生み出していることが示唆された。

III. バクテリオファージラムダ Red・タンパク質とヒト Rad52 組換え酵素間におけるオリゴマー形成および 1 本鎖 DNA 結合に必要な保存残基の同定

バクテリオファージラムダ・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は明確になっていない。そこで、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した。

まず、 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。しかしながら、1 本鎖 DNA 結合残基に関して検討したところ、Rad52 と β タンパク質において高度に保存されていることを発見した。そこで 12 個の点変異タンパク質を作製し、それらを用いてゲルシフトアッセイおよび透過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、 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。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。

β タンパク質は 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。その結果、野生型 Red β は 11 量体が 2 つ結合した 22 量体からなることが示唆された。また保存領域の点変異により分子量は大きく変化し、これらの領域がオリゴマー形成に重要な役割を果たしていることが示された。

本研究より、1 本鎖 DNA アニールタンパク質の Red β および Rad52 の間で保存されたアミノ酸が機能に重要な役割を果たしていることを実験的に証明された。また、1 本鎖 DNA 結合に必要な残基は、オリゴマー構造変化に重要な役割を果たす残基も含まれることも明らかにし、相同組換え機構を解明する上で進展をもたらした。

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。それらに対して、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。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。よって博士(薬学)の授与に値するものと認定する。

以 上

平成 25 年 10 月 17 日