

論文の内容の要旨

論文題目 真核生物転写制御におけるヒストンシャペロンの機能解析

氏名 千村 崇彦

真核生物の染色体 DNA は塩基性ヒストンタンパク質と DNA の複合体であるヌクレオソーム構造を基本単位としたクロマチン構造を形成している。ヌクレオソームはヒストン H2A/ H2B のヘテロダイマーが二分子と、H3/ H4 ヘテロテトラマー分子からなるヒストンオクタマーに対して約 146bp の DNA が約 1.75 回巻いた構造である。ヌクレオソーム構造は転写反応に対して阻害的に作用することから、真核生物において転写反応の制御機構を理解するためには、転写開始反応に伴うヌクレオソーム構造変換反応機構、即ち DNA- ヒストン相互作用及びヒストン- ヒストン相互作用の制御機構を理解する必要がある。TATA 配列結合因子 TFIID は転写開始反応を担う転写基本因子の中でも最初に TATA 配列を含むプロモーターに結合し転写開始複合体のコアとなることから、TFIID のプロモーター領域への結合が真核生物における転写反応において中心的な反応ステップである。したがって、転写開始反応に伴うヌクレオソーム構造変換を担う因子は TFIID と相互作用するはずである、という予想に基づき、TFIID を形成するサブユニットと相互作用する因子をスクリーニングし。その中で、最大サブユニット CCG1 のプロモドメイン領域と相互作用する複数の因子の中でも、ヒトから酵母まで高度に保存された因子 CIA の機能解析を行った (図 1)。

ヒト CIA はヒストン H3/ H4 と直接結合し、ヌクレオソーム構造の形成を促進するヒストンシャペロン活性を有していたことから、報告者は CIA がヌクレオソームを鋳型とした真核生物転写反応において中心的な役割を果たすと考え、生化学的解析に加え遺伝学的解析が容易な出芽酵母を用いて解析を進めた。これまで知られているヒストンシャペロンは酸性アミノ酸 (アスパラギン酸、グルタミン酸) に富んだ領域を有しており、酸性アミノ酸領域がヒストンとの結合もしくはヒストンシャペロン活性に必須な役割を果たすことが示唆されてきた。出芽酵母

CIA(Cia1p)には酸性アミノ酸領域が存在するが、興味深いことにヒト CIA には酸性アミノ酸領域が見出されなかったことから、CIA が酸性アミノ酸領域を必要としない新規なタイプのヒストンシャペロンである可能性が示唆された。そこで、本解析ではまず Cia1p の分子としての性質に着目し、ヒストンシャペロンとしての機能ドメインの探索を通して、酸性アミノ酸領域のヒストンシャペロン活性への必要性の検討を行った。次いで、Cia1p の転写制御反応における TFIID との機能的相互作用の検討を行った。さらに、より大きな枠組みの中での Cia1p の機能解析を行うため、Cia1p による転写制御反応の細胞周期制御反応における役割の解明を試みた。

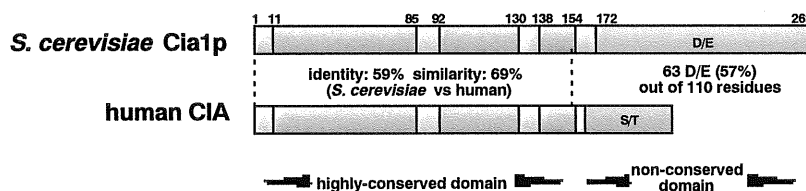


図1 CIAは酵母からヒトまで進化上高度に保存された因子である

1. Cia1p のヒストンシャペロンとしての性質に着目した解析

Cia1p の分子内の性質に着目し、CIA の活性の種間保存性の検討及び活性ドメインの特定を試みた。その結果 Cia1p はヒト CIA と同様、ヒストンシャペロン活性を有することを見出し、Cia1p が1次構造上保存性が高いだけでなく、その活性も種を超えて保存されていることを示した。さらに、Cia1p のヒストン結合特異性、ヒストンシャペロン活性そして in vivo でのヌクレオソーム構造変換活性を担うドメインをデリション変異蛋白質を用いて特定し、これらの活性が、種間で高度に保存されたドメインにより担われていることを見出した (表1)。

structures of WT and deletion mutants	histone binding	nucleosome assembly	telomeric derepression
WT	H3/H4	++	+++
ΔC1	H3/H4	++	+++
ΔC2	H3/H4	+	++
ΔC3	-	-	-
ΔC4	-	-	-
ΔN1	H2A/H2B H3/H4	-	+/-
ΔN2	H2A/H2B H3/H4	+	++
ΔN3	H2A/H2B H3/H4	+	+
vector/mock	-	-	-

表1 CIAによるヒストンシャペロン活性は種間保存領域に担われている

しかも、この領域には酸性アミノ酸に富んだ領域を含まなかった。これまでの報告で他のヒストンシャペロンに関しては酸性領域がヒストンシャペロン活性に必須と考えられてきたことを

考えると、Cia1p が新規な性質を持つヒストンシャペロンであると考えられる。一方、酸性アミノ酸領域単独でもヒストンシャペロン活性を示すが、ヒストンとの結合特異性が異なっており、ヒストン H2A/H2B とも結合できることを見出した。酸性アミノ酸領域はヒストンシャペロン活性自体には必要ないが、その効率を決めるドメインであることが予想された。

2. Cia1p の転写制御反応への関与に着目した解析

CIA が TFIID と相互作用する因子として単離された経緯から、この相互作用の転写制御反応における進化的な重要性を明らかにするため、CIA と TFIID 内のプロモドメインとの相互作用の種間保存性を検討すると共に、*in vivo* における転写制御反応において CIA と TFIID との機能的関連性の解析を行った。その結果、CCG1 プロモドメインに対応する出芽酵母の対応因子である Bdf1p 及び Bdf2p プロモドメイン領域と直接相互作用し、しかも細胞内でも相互作用することを見出した。

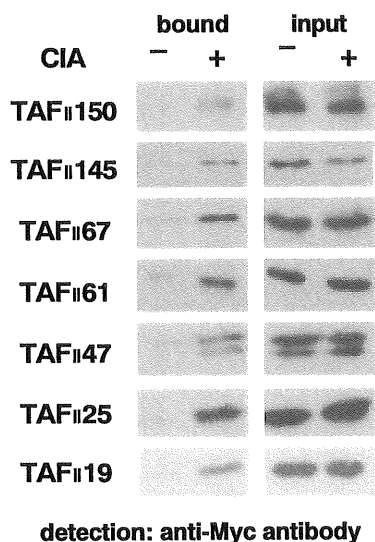


図2 CIAとTFIIDは細胞内で相互作用する

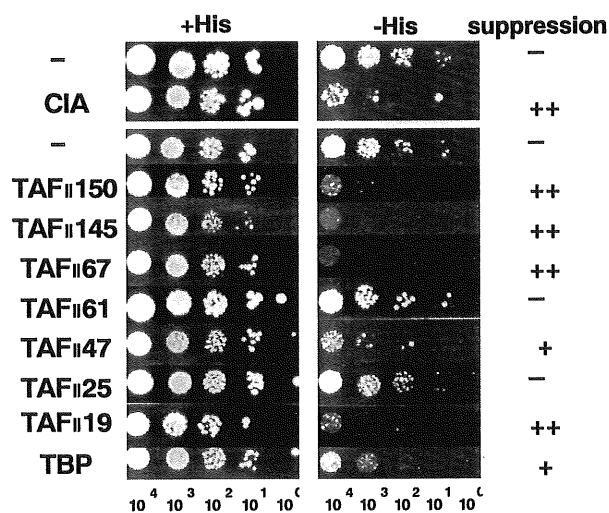


図3 CIAとTFIIDは遺伝学的に相互作用する

また、CIA1 遺伝子破壊株と BDF1 遺伝子破壊株がともに Spt 表現型を示し、両遺伝子の 2 重変異が合成致死となったことから CIA1 と BDF1 との転写制御反応における協調的作用が示唆された。さらに免疫沈降法を用いた解析によって、Cia1p が TFIID のサブユニットと相互作用することを見出し (図2)、しかも CIA1 遺伝子破壊による Spt 表現型が TFIID サブユニットの過剰発現によって抑圧されるという遺伝学的相互作用が見出された (図3)。これは、転写制御反応において CIA が TFIID サブユニットと機能的関連性があることを示唆している。また、本解析はヒストンシャペロンが転写基本因子と機能的に相互作用することを見出した最初の知見となった。

3. Cia1pによる転写制御が関与する生命現象に着目した解析

CIAによる転写制御反応が、細胞の生命維持においてどのような局面で必要となるのかを検討することを目的とした。そのために、CIA1遺伝子破壊株の表現型の検討により反応系を絞り込むという戦略をとった。CIA1遺伝子破壊株は致死ではないが増殖能が野生株に比べ低かった。このことから Cia1p は細胞増殖、つまり細胞周期の進行に重要な役割を果たすことが示唆された(図4)。そこで、Cia1pの欠損が、細胞周期のどの時期に欠陥を引き起こすのかを検討する目的で FACSscan 解析を行ったところ、G2期の細胞が野生株に比べ多くなっていた。したがって Cia1pが必要となる細胞周期の時期はG2期かそれ以前と予想された。

細胞周期のG2期での進行異常は Cia1pが必要とされる細胞時期と一致するのかを検証する目的で CIA1遺伝子の発現の起きる細胞周期の時期の特定を試みたところ、出芽酵母のみならず、分裂酵母に関してもG1/S期での発現上昇が見られた。CIA1の発現がG1/S期に起こり、CIA1欠失による異常がG2期でみられたことから、Cia1pはその間の時期であるS期の進行に必要であることが予想された。そこで、ヒドロキシウレア(HU)処理によってDNA複製の進行を阻害すると、CIA1遺伝子破壊株は増殖できなくなることがわかった(図4)。さらにHU処理により通常発現誘導されるはずのRNR3遺伝子の発現誘導にCIA1遺伝子破壊株では欠陥があることが判った(図5)。これらのことから、Cia1pは細胞周期の中でもS期の進行に関与するヒストンシャペロンであることが示唆された。

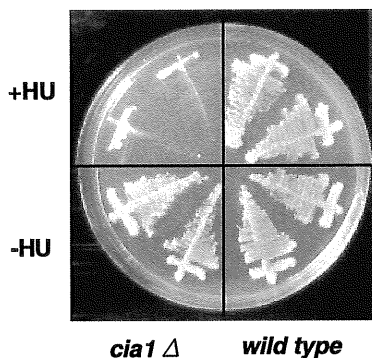


図4 *cia1 Δ*株はHU感受性を示す

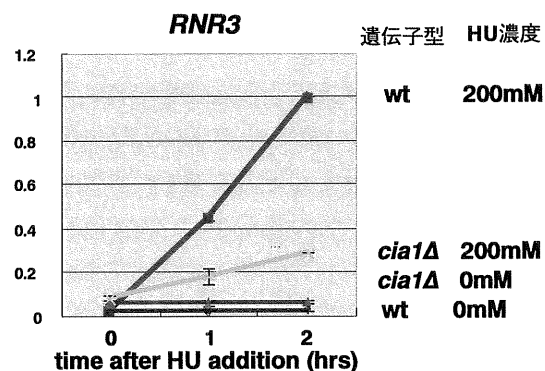


図5 *cia1 Δ*株は転写誘導に欠陥がある

まとめと今後の展望

以上の解析で、酸性アミノ酸に富んだ領域を必要としない新規ヒストンシャペロン Cia1pは、転写基本因子 TFIID と転写制御反応において機能的な相互作用を示し、Cia1pによる転写制御はS期の進行に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。酸性アミノ酸領域は Cia1pのヒストンシャペロン活性に必要なことから、今後酸性アミノ酸領域が Cia1pによるヒストンシャペロン活性に対してどのような役割を持っているのかを明らかにしていく必要がある。さらに、本解析により Cia1pとTFIIDとの機能的相互作用に加え、Cia1pの転写活性化への関与が示唆されたことから、Cia1pによるヌクレオソーム構造変換がTFIIDとヌクレオソームDNAとの相互作用に及ぼす影響を生化学的に明らかにすることが課題である。