

審査の結果の要旨

氏名 安達 成彦

生物学の中心課題は、構造と機能の特異的相関関係を明らかにすることにある。これらに対応して、構造生物学と機能生物学が急速に発展してきた。近年、立体構造情報は飛躍的に増加しており、1983年には200件、1993年には2000件であった蛋白質立体構造データベース(Protein Data Bank)への登録件数は、2003年3月現在では20000件に達している。しかし現状では、構造生物学で立体構造が解析された後に、その情報を利用して機能生物学の研究が新しい考えの元に進められることは少ない。申請者は、遺伝情報を機能生物学に利用する逆遺伝学と同様に、構造情報を機能生物学に利用する手法を「逆構造生物学」と名付け、本論文では、逆構造生物学的手法を用いて、立体構造情報を遺伝子発現制御の要である転写研究分野及びクロマチン研究分野に適用した3種の例を報告している。

第一章では、真核細胞生物クロマチンの主成分ヒストンの化学修飾と脱修飾を介して、クロマチン転写制御において中心的役割を果たすヒストンアセチル化酵素(HAT)とヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の活性中心部位付近に、共通の構造・機能モチーフを発見した研究結果を報告している。

真核細胞生物のゲノムDNAは進化上高度に保存された塩基性蛋白質であるヒストンと結合することで、ヌクレオソームと呼ばれる構造を形成している。ヌクレオソームは転写反応に阻害的に機能するため、ヌクレオソームの形成と破壊機構の理解はクロマチン転写機構を理解する上で必要不可欠である。これらの考えに沿って、ヒストンのN末端側領域のリジン残基のアセチル化やメチル化などの修飾が、ヌクレオソームの機能変換に重要であることが示されてきた。ヒストンN末端側領域の特定のリジン残基のアセチル化修飾はHATとHDACにより制御され、進化上高度に保存されたEsa1(HAT)とRpd3(HDAC)は、ヒストンH4のN末端から12番目のリジン残基をアセチル化・脱アセチル化し、転写調節・遺伝子サイレンシング・X染色体における遺伝子量補償・DNA修復・アポトーシスにおいて対として機能することが知られている。申請者は、このような機能上の強い相同性から、逆反応ながらもEsa1とRpd3には共通のリジン残基を認識する相同な構造があると予測した。

これらの予測に沿って、Esa1とRpd3の間に21アミノ酸に渡る1次構造上の相同領域(ERモチーフ)を見出し、機能解析を行った。ERモチーフは、立体構造上活性中心のごく近傍に存在することから、両酵素活性に重要であることが示唆された。次に、CDスペクトル解析によりEsa1とRpd3のERモチーフの2次構造が相同であることを明らかにした。最後に、ERモチーフ領域の各アミノ酸の点変異体の活性検定を行った結果、Esa1とRpd3において、機能上対応する結果を得た。以上の逆構造生物学的解析から、Esa1とRpd3において、ERモチーフが共通の構造と機能を持つことを示した。これらの知見から、対となって働く酵素は共通モチーフを持ち得る可能性があり、さらに、正逆の反応を担う酵素の活性中心部位付近に共通モチーフ構造を探すことによって、生体内で対となって働く酵素を予測できうという可能性を切り開いたと考えられる。

第二章では、細胞の運命決定を担う細胞周期G1/S期進行制御および細胞の癌化において中

心的役割を果たすガンキリンについて、出芽酵母ホモログ Nas6p の立体構造を解析し、新たに得られた立体構造情報から G1/S 期進行制御モデルを予測した研究結果を報告している。

細胞周期 G1/S 期の進行制御および細胞の癌化は、CDK4/6 による Rb のリン酸化によって制御される。Rb のリン酸化は、Rb-転写因子 E2F 複合体の解離を引き起こし、E2F は G1/S 期進行促進因子群の遺伝子発現を促進する。CDK4/6 による Rb リン酸化は二種類のアンキリン構造蛋白質（ガンキリンと INK (Inhibitor of CDK)）によって正と負に制御されている。これまでに、負の制御機構は INK4d-CDK6 複合体の立体構造解析から詳細に解析されていたが、正の制御機構はガンキリンの立体構造が未知であるために不明であった。さらに、Rb には複数のリン酸化部位が存在するものの、選択的にリン酸化される仕組みについては全く不明であった。申請者は、ガンキリンの立体構造を解析し INK4d-CDK6 複合体と比較することで、正の制御機構および Rb の特異的部位のリン酸化機構を明らかにできると考えた。

ガンキリンとその出芽酵母ホモログである Nas6p について X 線立体構造解析を進めた結果、Nas6p の結晶化・X 線解析が先行した。立体構造解析の結果、Nas6p が 7 つのアンキリン構造・N 末側と C 末側に 2 つの酸性領域・湾曲構造という特徴を持つことを明らかにした。まず、アンキリン構造のうち N 末側の 5 つは、CDK4/6 と相互作用すること、この領域が INK4d-CDK6 複合体の立体構造における INK4d とよく重なることから、ガンキリン-CDK6 複合体の立体構造を予想した。ここから、ガンキリンが INK4d から CDK6 を奪うという G1/S 期進行の正の制御機構を考察した。次に、ガンキリン-CDK6 複合体の予測立体構造において、C 末側の 2 つのアンキリン構造が湾曲構造のために CDK6 の活性中心部位に向かって伸びていること、ガンキリンの C 末側領域は CDK6 の基質である Rb と LXCXE モチーフを介して相互作用すること、Rb-LXCXE ペプチドの共結晶構造が解析されていることから、ガンキリン-Rb 複合体の立体構造を予測した。これら全ての知見を考え合わせると、ガンキリン-CDK6-Rb 複合体が予測できた。以上の逆構造生物学的解析により、ガンキリンが Rb の特定のリン酸化部位を CDK4/6 に向けて、Rb の特定部位が選択的にリン酸化される機構を示唆した。さらに、ガンキリンはプロテアソームの制御因子であり、ガンキリン-CDK6-Rb 複合体はシグナル伝達・転写調節・蛋白分解の中心因子の複合体であることから、今回の解析により細胞の運命決定において重要な役割を担う複合体の立体構造を予測できたと考えられる。

第三章では、真核細胞生物の転写基本因子と転写開始機構の進化上の起源を解析した研究結果を報告している。

真核細胞生物と原核細胞生物の転写開始反応には、転写酵素と転写開始因子により構成される転写装置が必要である。これまでの 1 次構造・立体構造解析から、真核細胞生物と原核細胞生物において、転写酵素は機能・構造ともに高い相同性をもつことが知られている。一方、転写開始因子は、真核細胞生物では転写基本因子群として複数の因子 (TFIIA, IIB, IID, IIE, IIF, IIH) が存在するのに対して、原核細胞生物では σ のみと、因子の構成が大きく異なるものの、 σ の性質が転写基本因子に分担されて引き継がれたと考えられていた。

これらの考えに沿って、転写基本因子 (TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIIF) と σ の間に、1 次構造上の相同性が見出されてきた。しかし、転写基本因子と σ の DNA 結合ドメインの立体構造が明らかになると、1 次構造より提案した相同領域は、立体構造上相同でないことがわかった。ここで申請者は、真核細胞生物と原核細胞生物の RNA ポリメラーゼやアクチンを比較した場合、1 次構造よりも 3 次構造がより保存されていることに注目し、転写基本因子に進化上対応する原核細胞生物の因子は、1 次構造が保存されていなくとも立体構造が保存されていると予想した。

申請者は、転写基本因子と相同なフォールド構造を持つ因子を検索し、TBP は σ ではなく原核細胞生物転写酵素 α と相同なフォールド構造を持つことを明らかにした。全長のアミノ酸配列の相同性は低いものの、分子内部のアミノ酸の化学的性質はよく保存されていた。一方で、分子表面に露出したアミノ酸の相同性は低く、実際、TBP はその DNA 結合能を反映して全体が塩基性であるのに対して α は酸性であった。また、その他の転写基本因子 (TFIIB, TFIIH, TFIIE,

TFIIIF) については σ と相同なフォールド構造を持つことがわかった。以上の逆構造生物学的解析により、転写基本因子と $\alpha \cdot \sigma$ の進化上の起源が同一であるらしいことを予測した。申請者は、真核細胞生物の転写機構において、正の制御因子 TBP と負の制御因子ヒストンがともに真核細胞生物特有であること、TBP とヒストンがともに DNA に結合して他を排除することから、TBP がヒストンと競合することによって RNA ポリメラーゼの結合部位を確保するという分子機構の進化モデルを提唱している。今回の解析は、発見しにくい立体構造の類似性から進化上の対応をつけることに加えて、今迄になかった分子機構を予測できるという点で重要であると考えられる。

これらの成果は、遺伝子発現制御機構の要となる転写調節機構・クロマチン構造変換制御機構の一端を明らかにする意欲的なものである。さらに、本来は車軸の両輪のごとく切り離せないものでありながらも現状では十分に生かされておらず、構造生物学と機能生物学との関連性に注目し、両分野を密接に繋げるための解析手法（逆構造生物学的手法）を提唱し、コンポーネント・リアクション・システムの各階層から実証していることから、両分野をつなぐ新しいアプローチとして、構造生物学と機能生物学の発展にも大きく貢献すると考えられる。また、今回解析対象としたヒストン脱アセチル化酵素、gankyrin (Nas6p)は、細胞の癌化において主要な役割を果たす因子であり、その分子機構の解明は癌の治療薬開発に大きく貢献すると考えられる。また、転写基本因子の進化上の起源に関する考察は、生物学の基本的な仕組みを基にした医薬品化学にも貢献すると考えられる。したがって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと判定した。