

## 論文内容の要旨

### 論文題目

ヒストンシャペロン CIA 分子表面の網羅的機能解析  
–クロマチン構造変換反応機構の理解に向けて–  
Global analysis of surface by point-mutation for histone chaperone CIA  
–Towards understanding of the mechanism of chromatin structural change–

### 氏名

栄徳 勝光

細胞運命は転写、DNA 複製、DNA 修復などの核内反応による遺伝情報の選択、増幅、維持によって決定される。真核生物において DNA は、ヒストンと共にヌクレオソームを形成し、それらが連なったクロマチン構造として存在する。ヌクレオソームは核内反応の進行に阻害的に働くことから、核内反応の進行にはクロマチン構造を変換することが必要となる。このクロマチン構造変換反応は DNA 結合因子群とヒストン結合因子群の協調的作用により制御されていることが明らかにされてきたが、様々な核内反応においてクロマチン構造変換反応がどのように行われるのか、その分子機構は未解明のままであった。

我々のグループではクロマチン構造変換反応の分子機構解明を目指し、クロマチン制御反応に関連する転写制御の正の中心因子 TFIID に着目して様々な相互作用因子を単離し、その生化学的機能を明らかにしてきた。その中で TFIID 最大サブユニット CCG1 のプロモドメイン(BrD)に相互作用する因子として 204 アミノ酸からなる進化的高保存機能未知因子 CIA(CCG1-interacting factor A)を単離し、更にその相互作用因子としてヒストン H3 を単離することを通して、ヌクレオソームの形成、破壊を担うヒストンシャペロン活性を有することを明らかにした。また、CIA が転写、DNA 複製、DNA 修復などの核内反応に関与することが示され、これらの反応系において高保存因子ヒストンやヒストンシャペロン CAF-1, HIRA など多種多様なクロマチン関連因子と相互作用することが明らかにされてきた。これらの知見から CIA は様々な核内反応系において多種多様な因子と相互作用し、協調的にヌクレオソームの形成、破壊反応を担っていると予想された。

このように様々な核内反応の進行に伴うクロマチン構造変換反応において、ヒストンシャペロンの中でも突出した進化的保存性を有し、ほぼ全ての核内反応系で働く CIA は、反応系の中心因子として働いていることが予想されてきた。そこで様々な反応におけるクロマチン構造変換反応機構の共通性と多様性の解明を目指し、多機能性を担う CIA の分子表面の機能活性及び機能モチーフをまず同定することを研究戦略の第一歩とした。CIA の高度

に保存された分子表面には一アミノ酸レベルで機能しうるモチーフが多数存在すると考えて、CIA の立体構造上分子表面に位置するアミノ酸に点変異を導入して、遺伝学的・生化学的解析に適した出芽酵母 *Cia1p/Asf1p* の点変異株を作製し、転写、DNA 複製、DNA 修復に関与する表現型を網羅的に解析することから着手し、以下のように DNA 複製及び転写反応に伴うヌクレオソーム構造変換反応における CIA の役割及びヌクレオソーム構造変換反応機構モデル、そしてヒストン化学修飾からヌクレオソーム構造変換反応に至る分子機構モデルを提出することに成功した。

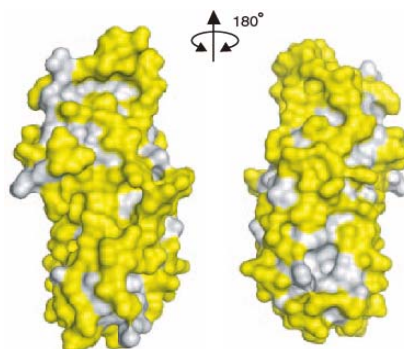


図 1. *Cia1p* への変異導入部位（黄色）

### 1. CIA 点変異体による網羅的表現型解析及び生化学的活性解析

*Cia1p* の高度に保存された N 末ヒストンシャペロンドメインの立体構造上、分子表面に位置するアミノ酸 90 個に着目して、立体構造への影響が少ないと予想されるアラニンに置換した点変異株シリーズを作製した（図 1）。*Cia1p* の生物学的機能としては、これまでに *cia1* 破壊株が *Spt* 表現型、HU、MMS 感受性などの表現型を示すことが解析され、転写、DNA 複製、DNA 修復などの様々な核内反応系に関与すると考えられてきた。

作製した 90 種類の *cia1* 点変異株の表現型をこれらの検定系で網羅的に解析したところ、5 種類の点変異株が *Spt* 表現型を示すことがわかった。更に、驚くべきことに HU、MMS 感受性に関しては破壊株と異なり、これらの薬剤に耐性を獲得した点変異株が同定された（図 2）。しかも、表現型を示した点変異株の変異導入部位を分子表面上にマップした結果、たった一つの領域に集中することが分かった。我々のグループによる CIA-H3-H4 複合体構造の解明及び生化学的解析により、この領域がヒストン H3 との相互作用領域であることが明らかとなった（図 3）。そこでこれらの点変異が生化学的活性にどのように影響するのかを確かめたところ、野生型 *Cia1p* に比べて点変異型 *Cia1p* のヒストンシャペロン活性がより高いことが示された（図 4）。このことは、*Cia1p* のヒストン結合能が低いほどヒストンシャペロン活性が高くなることを示している。これらの結果は、転写と DNA 複製、DNA 修復反応においてヌクレオソームの形成、破壊反応における CIA の役割が異なることを示唆している。

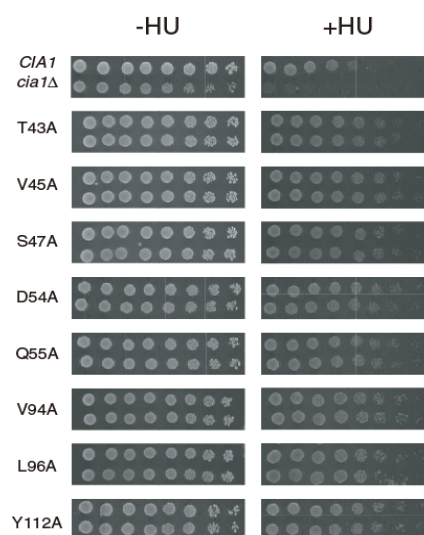


図 2. *cia1* 点変異株の HU 耐性

## 2. CIA によるヌクレオソーム構造変換反応モデルとヌクレオソーム半保存的複製モデル

*cia1* 点変異株による遺伝学的解析結果は Cia1p の主要な役割がヒストン H3 との相互作用活性であることを示唆していた。一方、CIA-H3-H4 の複合体構造解析結果及び生化学的解析結果から、ヒストン H3-H4 二量体の CIA との相互作用部位に位置するアミノ酸を明らかにした。我々のグループではこれまでに4種のヒストンの約320個の分子表面に点変異を導入して網羅的機能解析を行い、機能モチーフを明らかにしてきた。そこでこれらの点変異体のうち、Cia1p との相互作用に用いられる領域に対する点変異体を用いて Cia1p 相互作用解析並びに表現型解析を行ったところ、ヒストン H3 と H4 が協調的に作用することが分かった (図5)。

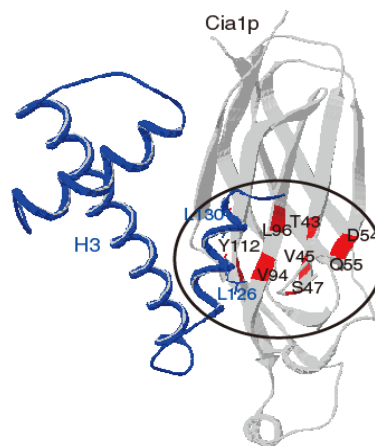


図 3. Cia1p 機能モチーフ領域

CIA-H3-H4 複合体は細胞質から核まで存在し、核内ではこの複合体に CIA と協調的に働くヒストンシャペロン HIRA, CAF-1 などが加わることが知られている。そこで、CIA-H3-H4 複合体構造と CIA-HIRA 複合体並びにヌクレオソームとの構造比較を行ったところ、CIA-HIRA 相互作用と CIA-H3-H4 相互作用は同時に起こりうるものの、CIA-H3-H4 相互作用とヒストン H3-H4 二量体同士の相互作用は相互排他的であることが分かった。このことから、CIA-H3-H4 複合体構造はヌクレオソームの形成、破壊反応における中間体構造であることが示唆された。これらのことから、ヌクレオソーム形成反応は CIA-H3-H4 複合体から HIRA, CAF-1 が CIA を解離させることによって進行することが予想された。

一方、ヌクレオソームの破壊反応に関しては、CIA がヒストン(H3-H4)<sub>2</sub> 四量体を分割することで反応が進むと考えられた。このことを確かめるために、ヒストン(H3-H4)<sub>2</sub> 四量体に CIA を混合して生成成分を解析したところ、CIA によってヒストン(H3-H4)<sub>2</sub> 四量体がヒストン H3-H4 二量体に分割されることが明らかになり、30 数年間信じられてきたヒストン(H3-H4)<sub>2</sub> 四量体は安定であるといったクロマチン構造研究の前提を覆すことになった。

これらの結果は、DNA 複製反応において CIA が親ヌクレオソーム中のヒストン(H3-H4)<sub>2</sub>

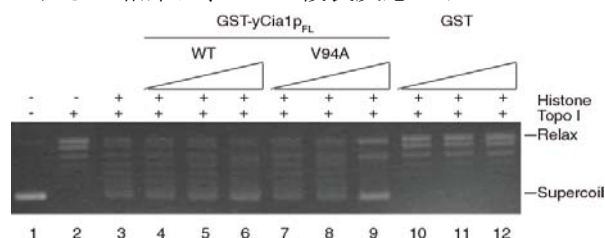


図 4. 点変異型 Cia1p のヒストンシャペロン活性

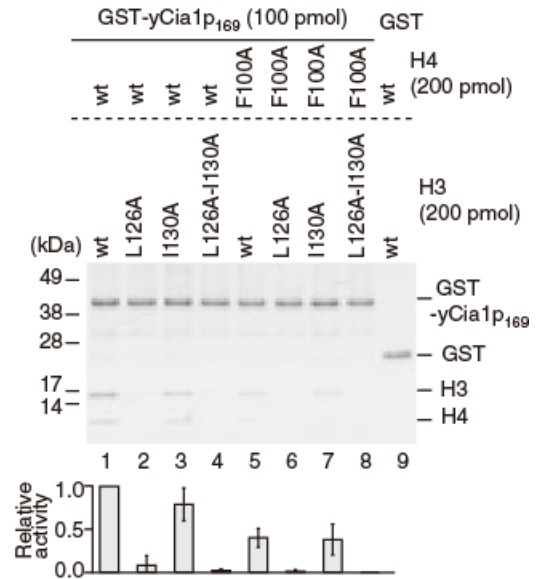
四量体を分割し、娘ヌクレオソームに均等に分配することにより、ヌクレオソームが半保存的に複製され得ることを示唆している。

### 3. ヒストン化学修飾からヌクレオソーム構造変換への反応伝達機構モデル

Spt 表現型を顕著に示した *cia1* D54A, Y112A のうち、後者はヒストン結合能の変化が少なかったことから、Cia1p Y112 が転写反応においてヒストン以外の因子との相互作用にも用いられている可能性が予想された。我々のグループが CIA-BrD(CCG1)複合体構造を解明した結果、その因子が BrD(CCG1)であることが明らかとなった。

構造解析の結果、一分子の BrD(CCG1)に二分子の CIA が結合することが示されたので、相互作用表面についての点変異型 BrD(CCG1)を用いて CIA 相互作用解析を行ったところ、二分子の CIA が協調的に BrD(CCG1)と結合することが分かった。また、BrD(CCG1)の酵母ホモログ *BDF1*, *BDF2* の点変異株を用いて Spt 表現型解析を行った結果、Cia1p との相互作用表面が転写反応において重要な役割を担うことが示された (図 6)。

図 5. 点変異型ヒストンの Cia1p 結合能



更に、CIA-BrD(CCG1)複合体と BrD(Gcn5p)-アセチル化ヒストン H4 N 末テイル複合体並びに CIA-H3-H4 複合体構造との構造比較を行ったところ、CIA-BrD(CCG1)相互作用と BrD-アセチル化ヒストン H4 N 末テイル相互作用は同時に起こりうるものの、CIA-BrD(CCG1)相互作用と CIA-H3-H4 相互作用は相互排他的であることが分かった。そこで BrD(CCG1)とヒストン(H3-H4)<sub>2</sub> 四量体が競合的に CIA と結合するかを確かめたところ、ヒストン(H3-H4)<sub>2</sub>

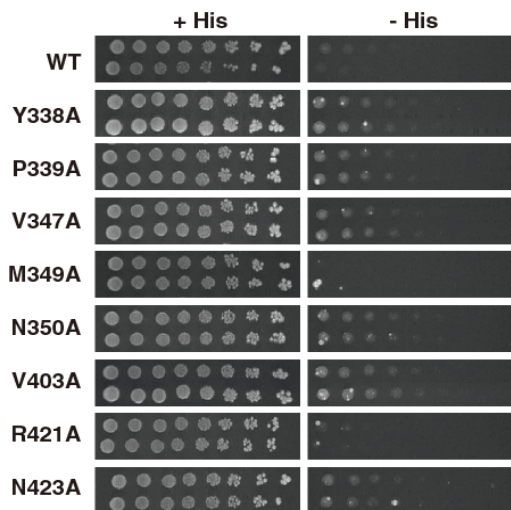


図 6. *bdf1* 点変異株の Spt 表現型

四量体により CIA-BrD(CCG1)複合体は解離するが、BrD(CCG1)により CIA-H3-H4 複合体は解離しないことが分かった。

クロマチンからの転写反応においては、細胞内外のシグナルによってプロモーターに分布するヒストンがアセチル化されて、遺伝子発現が活性化されることが知られている。これらのことは、転写反応において CIA が BrD(CCG1)と共にアセチル化ヒストンを認識し、ヒストン(H3-H4)<sub>2</sub> 四量体を分割することにより遺伝子発現が活性化することを示唆している。