

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 18 年度博士課程 入学

氏 名 赤井 祐介
指導教員名 田之倉 優

論文題目 ヒストンシャペロン CIA/ASF1-CCG1 ブロモドメイン複合体の構造と機能

真核生物のゲノムDNAは、ヒストンにDNAが巻き付いたヌクレオソームを形成することで、わずか数ミクロンの核内に収納されている。ヌクレオソームはDNA上で起こる転写・複製・修復・組み替えなどの反応に抑制的に作用するため、DNAを収納しつつ反応を進行させるにはヌクレオソームの形成と破壊が必須である。これまでに、細胞内外のシグナルに依存してヒストンの化学修飾が施され、特定領域のヌクレオソームの構造変換が起こることが明らかにされている。しかしながら、ヒストンの化学修飾からヌクレオソーム構造変換に至る反応素過程については未だ解明されていない。

ヒストンのアセチル化修飾は、特定の領域のヌクレオソームを特定の時期に破壊する目印となることが明らかにされている。ヒストンシャペロンCIA/ASF1は、この目印となるアセチル化を特異的に認識するTFIIDの最大サブユニットCCG1の高保存領域であるダブルブロモドメイン(以下、DBD(CCG1)と略す)と機能的に相互作用することで、転写活性化領域にリクルートされると考えられている。ヌクレオソーム構造変換因子とアセチル化ヒストン認識ドメインとの複合体(CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体)を解析することは、生体内の

シグナルがヌクレオソーム構造変換を制御する分子機構を理解する上で、有用な知見を与えると考えられる。本研究では、この分子機構モデルを構造学的に明らかにするため、X線結晶構造解析の手法を用いてCIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体の立体構造を決定した。

1. CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体のX線結晶構造解析

CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体溶液はモル比 1:1 で混合することにより調製し、15~20 mg ml⁻¹まで濃縮して結晶化に用いた。結晶化を行った結果、0.4 x 0.25 x 0.2 mm³の複合体結晶を得ることに成功した。シンクロトン放射光施設にて回折データ収集を行った結果、最大分解能 3.0 Å の回折データを収集することに成功した。結晶の晶系は hexagonal に属し、格子定数は $a = b = 101.8$ Å、 $c = 272.2$ Å、空間群は $P6_122$ の結晶であることが示された。

これまでに構造決定されている酵母由来の Cia1p/Asf1p とヒト由来の DBD(CCG1)を初期モデルとして、分子置換法により位相の決定を行った。分子置換法で得られた座標を用いて、3.3 Å 分解能で REFMAC5、CNS による精密化を行った。精密化の過程で、2 つ目の CIA/ASF1 分子の電子密度が見つかったため、さらに CIA/ASF1 をモデルに追加した。分解能が 3.0 Å より低いことから個々の原子の温度因子は精密化を行わず、TLS パラメーターのみ精密化を行った。 $R_{\text{work}} = 0.237$ 、 $R_{\text{free}} = 0.293$ となったところで精密化を終了した。

2. CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の全体構造

結晶構造解析の結果、1 分子の DBD(CCG1)に対して 2 分子の CIA/ASF1(155)が結合することが明らかになった (図 1A)。CIA/ASF1(155)は DBD(CCG1)のドメイン I と II の領域と相互作用している。CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の接触面積は 818 Å² (結合サイト 1)、719 Å² (結合サイト 2)であり、両者の相互作用は非常に弱いことが示唆される。

CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の特徴的な点は、ヒストン H3-H4 やアセチル化ヒストン結合サイトと結合部位が重複していることである。結合サイト 1 では、DBD(CCG1)の Phe1536 が CIA/ASF1 分子の側面に位置する疎水ポケットを塞ぐ形で相互作用している (図 1B)。この疎水ポケットは CIA/ASF1 とヒストン H4 Phe100 の相互作用に利用される領域でもある (図 1B)。また、DBD(CCG1)の結合サイト 1 にはアセチル化ヒストン H4 との相互作用に関わる疎水ポケットが存在し、CIA/ASF1(155)は DBD(CCG1)の 2 つの疎水ポケットに近接した領域で相互作用している (図 1A)。CIA/ASF1 は進化上高度に保存されたタンパク質でその相互作用因子も多いことから、共通表面を多数の相互作用に利用していることが示唆される。

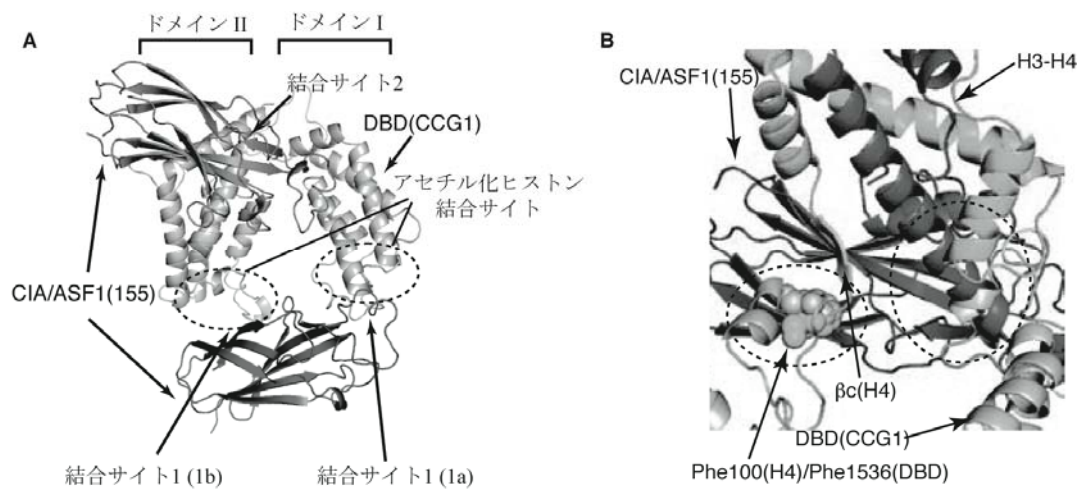


図 1 A) CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)の全体構造。DBD(CCG1)のアセチル化ヒストン結合サイトと CIA/ASF1(155)の結合サイトが近接している。B) CIA/ASF1-ヒストン H3-H4 複合体と CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の CIA/ASF 分子での重ね合わせ。点線で示している領域で立体障害となるため、CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)、ヒストン H3-H4 による 3 者複合体は形成できないことが推察される。

3. CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の定量的相互作用解析

CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用を溶液中で評価するため、点変異体を用いた GST プルダウンアッセイ、分析超遠心、等温滴定カロリメトリー(ITC)を行った。DBD(CCG1)変異体を用いた GST プルダウンアッセイの結果、結合サイト 1 および 2 における両者の相互作用が減少したことから、溶液中でも 2 つの異なる分子表面を用いて複合体を形成していると考えられる。次に、ITC を行った結果、2 つの独立した結合サイトをもつ ”Two set of sites ” モデルによるフィッティングで最良の結果が得られ、8.6 μM と 173 μM の解離定数を有することが示された。さらに、CIA/ASF1(155)の高親和性結合サイトを決定するため、DBD(CCG1)点変異体を用いた沈降速度法を行った。その結果、Phe1536Ala (結合サイト 1)点変異体では複合体が形成されないことから、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の高親和性結合サイトは結合サイト 1 であることが示された。以上の結果から、結合サイト 1 の K_d は 8.6 μM 、結合サイト 2 の K_d は 173 μM であると考えられる。

4. CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)、ヒストン(H3-H4)₂による競合的相互作用

DBD(CCG1)との相互作用を介してプロモーター上にリクルートされた CIA/ASF1 は次にヒストン(H3-H4)₂ と相互作用し、ヌクレオソーム構造を破壊すると考えられる。CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体と CIA/ASF1-ヒストン H3-H4 複合体の CIA/ASF1 分子で構造重ね合わせを行うと、立体障害のため DBD(CCG1)とヒストン H3-H4 が CIA/ASF1 に対

して競合的に相互作用することが予想される (図 1B)。そこで、3 者の相互作用の関連性を明らかにするため、CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)、ヒストン(H3-H4)₂を用いた競合的相互作用実験を行った。競合実験の結果、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体にヒストン(H3-H4)₂添加することでDBD(CCG1)がCIA/ASF1(155)から解離し、CIA/ASF1(155)はヒストン H3-H4 と複合体を形成することが示された (図 2A)。しかしその一方で、その逆過程は進行しないことが示された (図 2B)。以上のように、DBD(CCG1)とヒストン H3-H4 は CIA/ASF1(155) に対して競合的に相互作用し、CIA/ASF1(155)の DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 への変化は不可逆的に進行することが明らかになった (図 2C)。これらの結果は、DBD(CCG1)との相互作用を介してプロモーター上にリクルートされた CIA/ASF1 が DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 へと受け渡され、ヌクレオソームを破壊するという分子機構モデルを支持している。

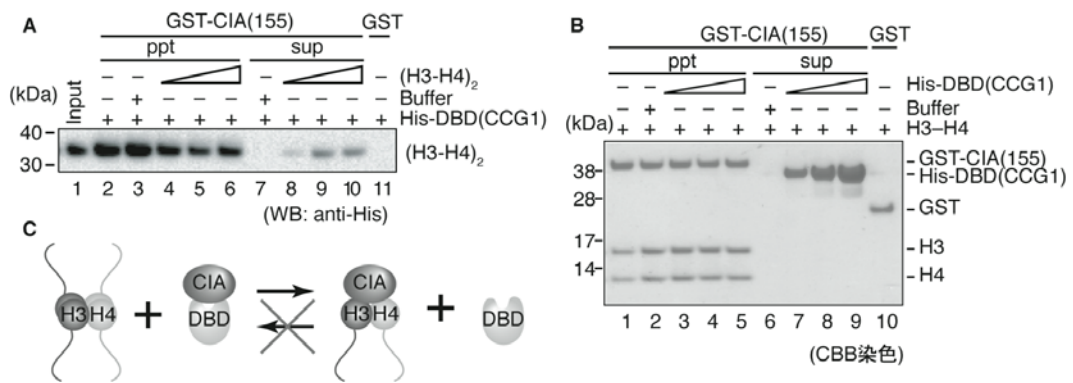


図 2 CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用に与えるヒストン(H3-H4)₂の影響。

- A) CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)にヒストン H3-H4 を添加する競合実験。
- B) CIA/ASF1(155)-ヒストン H3-H4 に DBD(CCG1)を添加する競合実験。
- C) 競合実験の概略図。この過程は不可逆的に進行することがわかった。

まとめ

本研究では、ヌクレオソーム構造変換因子-アセチル化ヒストン認識ドメイン複合体で最初の例となる CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の結晶構造を明らかにした。さらに、共同研究を進めている東大・分生研の堀越研究室によるクロマチン免疫沈降を用いた局在解析の結果、CIA/ASF1 が DBD(CCG1)との相互作用を介して *ACT1* プロモーター上に局在することを明らかにした。以上の結果から、細胞内でも「CIA/ASF1 が DBD(CCG1)との相互作用を介してプロモーター上にリクルートされた後、CIA/ASF1 が DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 へと受け渡される」という分子機構モデルが示唆される。