

論文内容の要旨

論文題目

蛋白質構造変換酵素 FKBP による遺伝子発現制御機構 (Mechanism of gene regulation by FK506-binding protein)

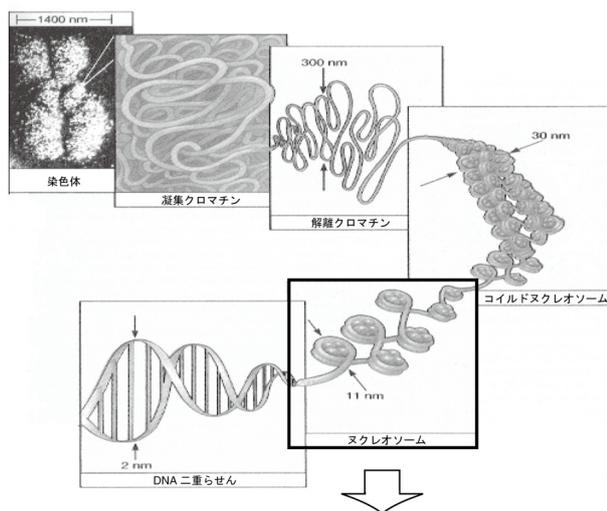
氏名

佐藤 罌

真核細胞において DNA は蛋白質と複合体を形成することで折りたたまれた状態(クロマチン構造)をとっている。クロマチン構造は染色体のように高度に寄り集まった状態から、DNA を露出させるほどに開いた状態まで動的に変化し、このことが遺伝子発現や DNA の複製・修復など DNA 上で起こる様々な現象の制御に関わっている。特に DNA が直接巻きつく蛋白質であるヒストンとその巻きついた構造(ヌクレオソーム)がその中心的な役割を果たしていることが、これまでの研究により明らかにされている。ヒストンは DNA の端から端まで結合し、その凝集状態がクロマチンの構造を変えるだけでなく、自身が DNA 上に起こる様々な反応の場を提供するという重要な働きを担っている。そのため、ヒストン上で起こる様々な反応がヌクレオソーム、クロマチンの構造変換を介した遺伝子発現制御の根幹を担い、その分子メカニズムの解明が生命現象の開始点となる物質の生産制御の仕組みを知るための鍵になると考えている(図 1 上)。

クロマチンが関与する遺伝子発現制御の機構を解明するために、1990 年代後半から、世界中で様々なクロマチン因子が単離・解析されてきた。ヒストンのテイル領域やコア領域における可逆的な化学修飾(アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化など)を行う一連の酵素群、ATP の加水分解エネルギーを利用してヌクレオソームの移動を行うヌクレオソームリモデリング酵素群、DNA 上に新しいヌクレオソームを構築するヒストンシャペロン群などである(図 1 下)。そして今もなお、これら酵素・因子群を用いて、ヌクレオソームレベルでの遺伝子発現制御から生命反応にいたる仕組みを解明することを目的として、多くの研究者が研究競争を繰り広げている。このような状況下で、独自性のある

新しい遺伝子発現制御機構を見出すには、これまでにない活性を持つドメイン・因子・酵素あるいは複合体の登場が必要不可欠であると考えます。そこで私は、これまでに注目されなかった「蛋白質構造変換」を行う因子がクロマチン上で遺伝子発現制御に関わる可能性を考え、研究対象として PPIase(ペプチジル・プロリル・シス・トランス異性化酵素)を選んだ。



PPIase は蛋白質中のプロリン残基の cis/trans 異性化反応を触媒する活性を持ち、この反応により基質蛋白質の主鎖の方向を変えることで、蛋白質の高次構造を変える能力をもつ。我々のグループでは、TFIID の CCG1 サブユニットの最保存領域に結合する因子

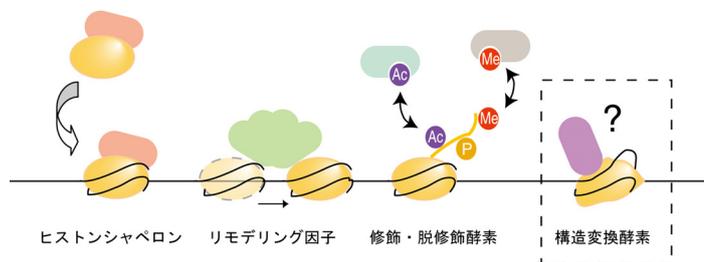


図 1. クロマチンの構造変換とヌクレオソーム上の反応

を Yeast two-hybrid システムを用いてスクリーニングし、PPIase ファミリーの 1 つである FK506 結合蛋白質(FKBP)を得た。この結果を受けて遺伝学的・生化学的な解析が容易である出芽酵母における核局在型 FKBP である Fpr4(FK506-binding proline rotamase 4)について解析を行った。Fpr4 の PPIase ドメイン以外のドメインに注目したところ、N 末端側に高酸性ドメイン、高塩基性ドメインなどが見出された。高酸性ドメインおよび高塩基性ドメインのそれぞれの相互作用の相手としては、塩基性物質であるヒストンや酸性物質である DNA などが考えられる。このことから、Fpr4 は DNA やヒストンからなるヌクレオソームに相互作用して働くのではないかと考えた(図 2)。この考えに基づいて、ヌクレオソームの形成を行う活性を検討したところ、予想通り Fpr4 がヌクレオソーム形成を行うヒストンシャペロンであるという結果を得た。これは、PPIase が直接クロマチン上で機能することを示す最初の知見となった(*Nature Struct. Mol. Biol.*, **11**, 275-83 (2004))。しかしながら、本論文で示されたヒストンシャペロン活性は PPIase ドメイン以外の部分の活性であり、PPIase 活性のクロマチン機能制御および遺伝子発現制御における役割は分からなかった。そこで私は、Fpr4 の PPIase ドメインが未知のクロマチン因子のプロ

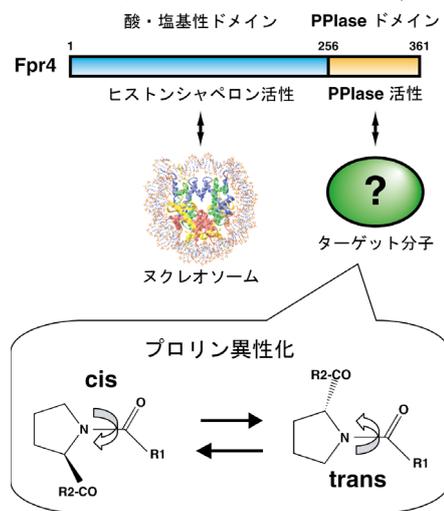


図 2. 酵母核型 FKBP のドメイン構造

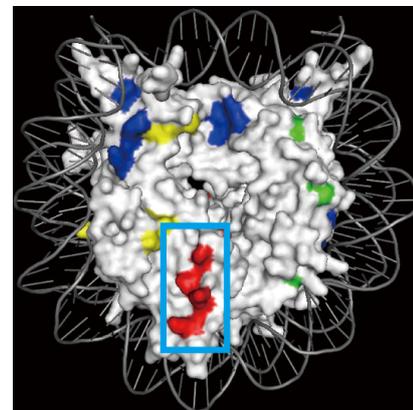
リン残基を異性化し、標的蛋白質の高次構造を変えることで遺伝子発現制御に関与することを予測し、そのプロリン残基の同定と、プロリン異性化反応の機能的意義を明らかにすることを目的として研究を行った。

1. Fpr4 はヒストン H2B のプロリン 106 を異性化する

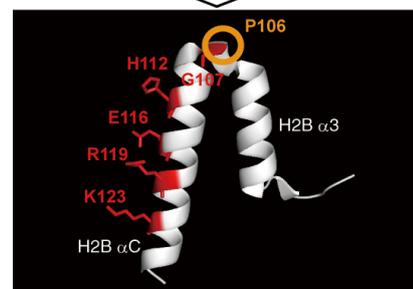
Fpr4 は全長蛋白質よりも、C末端側の PPIase ドメインを失ったヒストンシャペロンドメインのみの蛋白質の方が高いヒストンシャペロン活性を有する。このとき PPIase 活性の阻害剤であるラパマイシンを加えると、全長蛋白質のヒストンシャペロン活性が、ヒストンシャペロンドメインのみの蛋白質と同程度まで回復することを見出した。これは Fpr4 のもつヒストンシャペロン活性(ヌクレオソーム形成活性)に、自身の PPIase 活性が影響を及ぼすことを示している。

このことから、Fpr4 の PPIase 活性の標的はヌクレオソームであり、Fpr4 がヒストン蛋白質上のプロリン残基を異性化することを予想した。ヒストン上のプロリン残基の中から Fpr4 の基質となるプロリン残基を同定するにあたり、まずヒストン包括的的点変異株ライブラリー(ヒストンのアミノ酸一つ一つをアラニンに置換した出芽酵母 439 株からなるライブラリー)の中からラパマイシンに対して感受性を示す株をスクリーニングした。感受性を示した株の点変異残基をヌクレオソーム上にマップするといくつかのクラスターが形成されていた(図 3 上)。

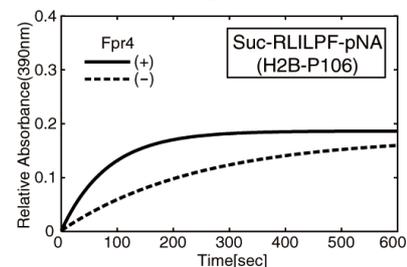
それらラパマイシン感受性残基クラスターの近傍に位置するプロリン残基それぞれに対して、プロリン周辺 5 アミノ酸からなるペプチドを作成し、Fpr4 が高い PPIase 酵素活性を発揮する基質ペプチドを探した。結果、ヒストン H2B のプロリン 106(H2B-P106)を含む基質ペプチドに対し、Fpr4 はほぼ最大限度の PPIase 活性を発揮した(図 3 下)。このことから、細胞内でも Fpr4 が H2B-P106 を異性化することで、ヒストンの構造変換反応を担っていることが強く示唆された。



Rapamycin sensitive residues



Rapamycin sensitive helix



Fpr4 PPIase activity (H2B-P106)

図 3. Fpr4 の基質プロリン(H2B-P106)の発見

2. H2B-P106 の C 末端側 α ヘリックスはヒストンバリエント Htz1 と遺伝学的に相互作用する

次に Fpr4 によるヒストン H2B-P106 の異性化がどのようにして遺伝子発現制御に関与しているかについて考えた。Fpr4 がヒストン H2A のバリエント Htz1 と相互作用するという過去の知見から、Htz1 が関係する反応系にヒストン構造変換が寄与することを予想した。

H2B-P106 のすぐC末端側にはヒストンH2Bだけが有する α ヘリックス(H2B α C)が存在する。ラパマイシン感受性残基が H2B α C の一側面に規則的に位置していることから、この α ヘリックスと Htz1 に機能的な関連性があると予測した(図3中央)。そこで、H2B α C 上の点変異と *htz1* 遺伝子破壊変異の二重変異による合成致死性を検定したところ、驚くべきことに合成致死性(または合成生育阻害性)を示す残基が、H2B α C 上のラパマイシン感受性残基と完全に一致することがわかった。これは、H2B α C、ラパマイシンの効果、ヒストンバリエント Htz1、の三者が遺伝学的に強く関係していることを意味する。

2. H2B-P106 は rDNA 領域上のヒストンバリエント Htz1 と H2A の交換反応に関与する

Htz1 が組み込まれたヌクレオソームはゲノム上に 10 個に 1 個の割合で存在する。そして、その多くは遺伝子のプロモーター領域に存在し、転写制御に関わることが示唆されている。このことと、Fpr4 の PPIase 活性が rDNA サイレンシング反応に関わるという当研究室の過去の知見から、Fpr4 による H2B-P106 の異性化反応とヒストンバリエント Htz1 の両方が関与する分子機構として、rDNA 領域上の Htz1 局在制御が考えられた。

そこで、Chromatin IP により rDNA 領域上の Htz1 と H2A の局在を観察した。H2B-P106A 変異株では、野生株と比べて顕著な Htz1 の局在低下が見られ(図4上)、また逆に H2A の局在上昇が見られた(図4下)。この結果を踏まえ、Fpr4 による H2B-P106 の異性化がヌクレオソーム中の Htz1 と H2A の交換反応を促進するというモデルを立てた(図5)。

本研究により、ヒストンのコア領域のプロリン残基が PPIase によって異性化されること、そしてその異性化反応が今まで不明であったヒストンバリエント Htz1 交換反応の素過程の一端を担うことを初めて見出した。そして、これらの発見は PPIase によるヒストンの蛋白質構造変換活性を介した遺伝子発現制御研究の端緒となる成果となった。

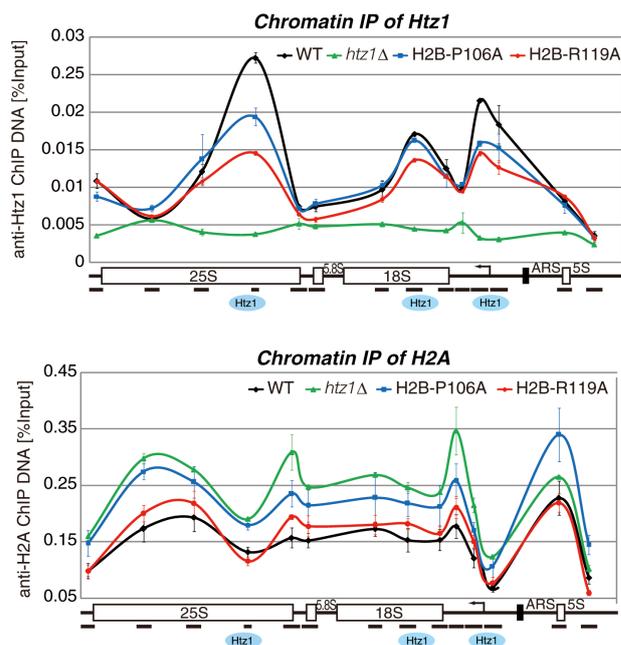


図4. rDNA 領域上の Htz1、H2A 局在が H2B-P106 により制御される

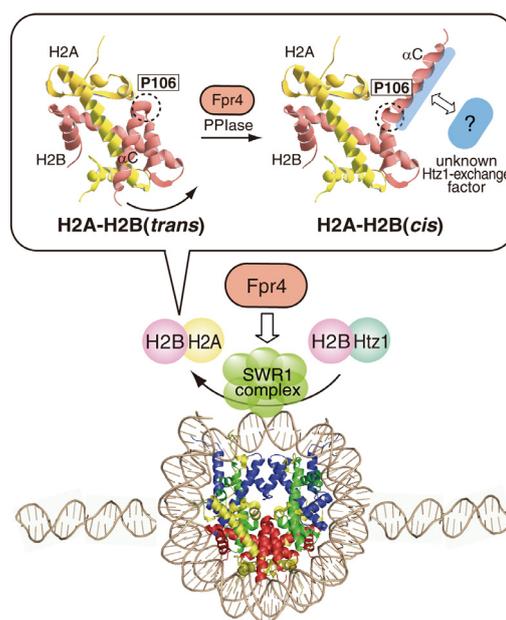


図5. Fpr4 によるヒストンバリエント交換モデル