

学位論文要旨

Phosphorylation-dependent regulation mechanism of the nucleosome reorganization by a histone chaperone, FACT

(ヒストンシャペロン FACT のリン酸化依存的な
ヌクレオソーム再構成制御機構の解明)

広島大学大学院 理学研究科 数理分子生命理学専攻
氏名 青木 大将

1. 序文

全長 2 m にも達するヒトゲノムは、直径~10 μm の細胞内に無理なく収納されている。これは、DNA およびタンパク質の複合体から成るクロマチン構造の形成によるもので、クロマチン構造を形成することで、DNA の高次元な折り畳みが実現される。クロマチンは、単位構造であるヌクレオソームが数珠上に連なることで構成されており、各ヌクレオソームはヒストンタンパク質に DNA が巻きついた構造をとっている。ヌクレオソームは溶液中で動的な構造変換を行うことで、様々な遺伝子活性における DNA の露出度を変化させ、その構造変換はヒストンシャペロンによって制御されている。これまでの研究により、多くのヒストンシャペロンが、安定な 3 次元構造を持たないタンパク質領域である、天然変性領域 (IDR) を保持することが知られており、IDR がヒストンシャペロンの機能制御において重要な役割を果たすことが報告されている。

FAcilitates Chromatin Transcription (FACT) も、複数の IDR を有するヒストンシャペロンのひとつで、DNA 転写・複製・修復など幅広い遺伝子活性に関与している。興味深いことに、ヌクレオソーム構造変換において、FACT はヌクレオソーム構造の安定化と不安定化の相反する機能を合わせ持つことが知られているが、その詳細なメカニズムについては明らかとなっていない。先行研究では、FACT の DNA 結合ドメインが持つ IDR における多数のリン酸化修飾部位に着目し、IDR へのリン酸化の数によって FACT の DNA 結合能が ON と OFF で切り替えられていることを見出した。このように、リン酸化修飾などの翻訳後修飾の段階的な入力、結合の ON と OFF や細胞周期の遷移など、スイッチのような応答に変換される現象を、「超高感度応答」と呼ぶ。

本研究では、DNA 結合制御における FACT の超高感度応答のメカニズムを解明することを目的とした。

2. 研究内容

本研究では、FACT の DNA 結合ドメインである AB-HMG フラグメントを用いた。AB-HMG は、酸性および塩基性残基が集まった AID と BID の隣接した 2 つの IDR と、BID の C 末端側に位置する DNA 結合ドメインの HMG から構成される。先行研究で、DNA 結合を担う BID-HMG がリン酸化修飾を受けた AID によって覆われることで DNA 結合が阻害される、といった DNA 結合阻害モデルが提唱され、DNA 結合制御における AID の阻害要素としての役割が明らかとなったが、FACT がリン酸化修飾に対して超高感度応答を示すメカニズムについては依然として疑問が残っていた。

そこで、本研究では、AID のリン酸化修飾に伴う AB-HMG の分子内相互作用の変化や、AID と BID からなる IDR の構造変化と超高感度応答との関連を調べるため、下記に示す 3 つの実験およびシミュレーションを行った。

第一に、リン酸化修飾による AB-HMG の分子内相互作用や構造動態の変化を調べるため、セグメント安定同位体標識をした AB-HMG サンプルを用いて各種 NMR 測定を行った。その結果、AID のリン酸化修飾によって AB-HMG の分子内相互作用に変化が観られ、リン酸化状態においては、AID と BID が硬く閉じた構造をとる一方で、HMG が溶液中に露出した状態をとることが示唆された。

第二に、AB-HMG のヌクレオソーム結合における超高感度応答のメカニズムを検証するため、リン酸化部位をグルタミン酸 (Glu) 残基に置換した、AB-HMG の擬似リン酸化変異体を用いてヌクレオソーム結合アッセイを行った。また、AID および BID の境目に存在する Gly-rich 領域の柔軟な構造特性に着目し、Gly-rich 領域のポリグリシン (poly-Gly) 配列をポリプロリン (poly-Pro) 配列に置換することで AB-HMG の超高感度応答が崩れたことから、Gly-rich 領域の機能的な重要性が明らかとなった。

最後に、広島大学・大学院・統合生命科学研究科の粟津 暁紀 准教授と藤井 雅史 助教が行った、粗視化分子動力学シミュレーションでは、Gly-rich 領域に柔軟なヒンジとしての構造特性を与えた粗視化モデル (hinge model) によって上記の超高感度応答が再現されたことから、AB-HMG が超高感度応答を実現する上で、Gly-rich 領域が柔軟なヒンジとして振る舞う必要があることが分かった。

以上から、AB-HMG を介した FACT の超高感度応答は、AID および BID から成る IDR の柔軟な分子運動によって実現していることが明らかとなった。

3. 結論

本研究により、酸性 IDR へのリン酸化修飾により FACT の機能が動的に制御されることが分かった。多くのヒストンシャペロンが、重要な機能部位として酸性 IDR を保持することから、本研究で明らかとなった FACT の超高感度応答のメカニズムは、ヒストンシャペロンの酸性 IDR におけるリン酸化修飾を介した新たな機能制御メカニズムとして加えられる。

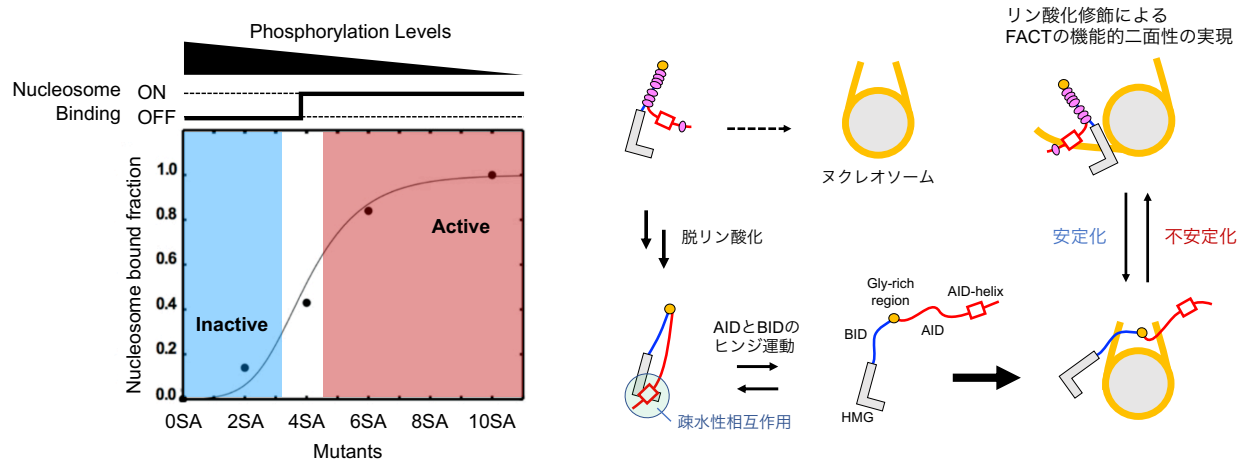


図 1：本研究で明らかにした AB-HMG の超高感度応答のメカニズム

4. 公表論文

Daisuke Aoki, Akinori Awazu, Masashi Fujii, Jun-ichi Uewaki, Manami Hashimoto, Naoya Tochio, Takashi Umehara and Shin-ichi Tate, **Ultrasensitive Change in Nucleosome Binding by Multiple Phosphorylations to the Intrinsically Disordered Region of the Histone Chaperone FACT** (2020) *Journal of Molecular Biology*, 432(16), 4637-4657