

ヒストンシャペロンによるヌクレオソーム構造変換とエピジェネティクス

千田俊哉¹, 夏目 亮², 武藤真祐³, 栄徳勝光³, 赤井祐介²,
千田美紀², 佐野徳彦³, 佐藤 塁³, 堀越正美³

¹独産業技術総合研究所・生物情報解析研究センター

〒135-0064 東京都江東区青海 2-42

²独バイオ産業情報化コンソーシアム・生物情報解析研究センター

〒135-0064 東京都江東区青海 2-42

³東京大学・分子細胞生物学研究所

〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

要 旨 高等動物遺伝子の基本構造単位であるヌクレオソーム中に存在するヒストン (H3-H4)₂ 四量体は、30年以上にわたり安定な複合体であると考えられてきた。今回我々は、生化学的手法と X 線結晶構造解析的手法により、CIA と呼ばれる高度に保存されているヒストンシャペロンがヒストン (H3-H4)₂ 四量体を真っ二つに分割することを発見し、関係分野に大きな衝撃を与えた。本稿では、CIA によるヒストン (H3-H4)₂ 四量体分割活性から導かれる生物学的意義、ヌクレオソーム構造変換機構、ヌクレオソーム構造変換とヒストン化学修飾の関係、そしてエピジェネティック情報の伝達メカニズムに関して説明する。

1. イントロダクション：ヒストンの化学修飾とエピジェネティクス

遺伝子の本体である DNA は、いわゆる二重らせん構造を持つ鎖状の分子である。この鎖上には A, T, G, C で表される 4 種類の“塩基”が並んでおり、この配列が遺伝情報として親から子に伝えられる（細胞が増える細胞分裂の場合は、親細胞から娘細胞に伝わるといふ）。DNA 上の塩基配列は主として様々なタイプの RNA を合成するための情報である。合成された RNA のうちタンパク質のアミノ酸配列をコードするものが mRNA であり、mRNA に“転写”された遺伝情報がリボソーム上で“翻訳”されることでタンパク質が合成される。20 世紀末に始まったヒトゲノム計画により、ヒトの遺伝子全体（30 億塩基対）には、2-3 万個程度のタンパク質の配列情報が蓄えられていることが明らかになった。大切なことは、この 2-3 万ともいわれるタンパク質が全ての細胞で発現しているわけではないという点である。ヒトの細胞を考えてみれば明らかかなように、最初一つの受精卵であったものが心臓、胃、肝臓というように、細胞が分化することにより同一の遺伝子セットを持つにもかかわらず、役割と性質が異なる細胞になってしまうのである。この状況は、基本的には細胞内で発現するタンパク質が異なるために引き起こされる。したがって RNA へと遺伝情報を取り出す ON/OFF の制御機構は細胞の働きを理解する上で極めて重要で、遺伝子 DNA の発見以来、生物学研究の中心的課題であった。

生物は、大きく分けて核を持つ生物と核を持たない生物に分けられる。核を持たない生物は主に細菌で、DNA が“裸”に近い状態で細胞内に保管されている（通常、DNA にタンパク質などが結合していない状況を示すのに、“裸の DNA”という言葉が用いられる）。これらの生物の転写の ON/OFF に関するメカニズムは基本的に“裸”の DNA と DNA 結合型転写因子、および転写反応を行う酵素である RNA ポリメラーゼ等の相互作用制御で説明がなされてきた。一方、いわゆる高等生物は細胞内に核を持ちその中に DNA を保持している。もちろん酵母のように微生物の中にも核を持つ生物はいる。核を持つ細胞の DNA の存在様式は核を持たない細胞に比べて複雑で、“裸”の DNA の際に用いられた相互作用制御だけでは転写調節機構を十分に論じることができない。なぜならば、核を持つ細胞中では DNA が“裸”の状態では存在せず、ヒストンという塩基性タンパク質と複合体を作りヌクレオソームという基本構造単位へと折りたたまれているからである（Fig. 1）。ヌクレオソームの構造は、ヒストン H2A, H2B, H3, H4 という 4 種類のヒストンが 2 分子ずつ集合したヒストン八量体に DNA が約 1.7 回巻き付いたもので、1974 年に R. D. Kornberg により発見された¹⁾。その後 1997 年に T. J. Richmond らにより結晶構造が決定されている²⁾。核を持つ細胞の DNA は、このヌクレオソームが数珠繋ぎになった構造をとっており、さらにこの数珠繋ぎのヌクレオソームが高次構造をとることでクロマチン構造へ、さらには細胞分裂の際に観察されるような染色体構造

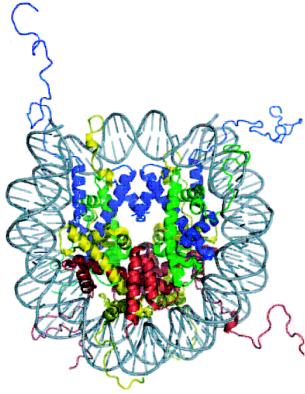


Fig. 1 Crystal structure of the nucleosome²⁾. Histones H2A, H2B, H3, and H4 are colored in yellow, red, blue and green, respectively. The unstructured regions located outside the wrapped DNA strand are histone tails, which are frequently chemically modified.

へと折り畳まれていくことが知られている。では、なぜこのような構造を取る必要があるのだろうか。

第一の理由は、核内に DNA を格納するためであると考えられている。ヒトの DNA は全長で 2 メートルにもなり、全ての DNA を直径 10 μm に満たない核に収納するためには、DNA 同士が絡まらないようにきれいに小さく折り畳み、核内に収納する必要がある。ヒストン八量体は DNA の糸巻きのようなもので、巨大な分子である DNA を核内に保管するためには必要不可欠だと考えられる。次に、これは生物学的に極めて重要であるが、ヌクレオソームを基本構造単位とするクロマチンなどの高次構造が DNA の関与する核内の反応制御に関係しているためである。ヌクレオソーム中では、DNA はヒストン八量体に巻き付いているため、ヌクレオソーム中の DNA に対して酵素が反応しようとしても立体障害が生じて反応を実行することが難しい。そこで反応の際にはヌクレオソーム構造を変換して DNA を「裸」に近い状態しておく必要が生じる。言い換えれば、ヌクレオソーム構造の形成や破壊を調節することで、転写等の核内反応を制御できるのである。実際に顕微鏡による観察から、クロマチンの構造には密なところと疎なところがあり、疎な部分の転写が活発で、密な部分は転写が不活発ということが分かっていた。では、このクロマチン構造の違いはなぜ生じるのだろうか？

生化学的な解析の結果、クロマチン構造の違いは DNA の塩基配列によって制御されるのではなく、ヌクレオソーム中のヒストンや DNA に対する化学修飾によって制御されているということが分かってきた。DNA の化学修飾として知られているのはメチル化である。雌細胞の持つ二本の X 染色体のうち一本を不活性化することにメチル化が関与していることが知られている。DNA の化学修飾の単純さに対し、ヒストンの化学修飾は極めて複雑である。リジン、アルギニン、セリン、トレオニンなどのアミノ酸残

基が、細胞の増殖・発生・分化さらには環境の変化に応じてアセチル化、メチル化、ユビキチン化など様々な化学修飾を受ける。さらに、これらの化学修飾を認識するタンパク質がヒストンに結合したり、ヒストンバリエーションという変種のヒストンが存在し化学修飾や認識タンパク質に影響を与えたりして、これらがヌクレオソームに取り込まれていく。これらの反応の総体が転写などの核内反応からクロマチン構造に至るまで広範な影響を与えるのである。このような分子機構の研究は、過去約十年間に欧米を中心に急速に進展し、莫大な量の研究がなされてきたが、核心的な点に関してはまだ完全には理解されていない。例えば、細胞内シグナル伝達の結果として、DNA 結合型転写因子の DNA への結合やヒストンのアセチル化が起こり特定部位のヌクレオソーム構造が変化して転写活性が変化を受けることは知られているが、その分子メカニズムの詳細は不明である。しかし、これ以上に重要なことは、これらの化学修飾が遺伝子の ON/OFF を制御するだけでなく、細胞分裂の際に親細胞から娘細胞へと伝わっていくという点である。これがいわゆるエピジェネティクスと呼ばれている現象である。エピジェネティクスとは遺伝子の塩基配列によらず細胞の持つ働きが細胞分裂を経て親細胞から娘細胞へと伝達されていくメカニズムのこと（もしくはこれを扱う学問領域のこと）で、21世紀の生物学における最大の課題とされている³⁾。

実は DNA のメチル化の伝達機構に関しては、基本的な点は既に決着がついている。J. D. Watson-F. H. Crick が提唱し⁴⁾、M. Meselson-F. W. Stahl が証明をしたように⁵⁾、DNA は半保存的に複製するため、二重鎖 DNA がメチル化されている場合は、娘 DNA 鎖上ではメチル化されている DNA 鎖は一本だけになってしまう。実は一本だけがメチル化されている DNA 鎖を認識して、メチル化されていない DNA 鎖をメチル化する酵素 (Dmmt1) がおり、この酵素によって DNA の半保存的複製によって失われたメチル化 DNA の情報が回復されることが知られている⁶⁾。問題はヒストンである。化学修飾が複雑である上に、複製の単位となるヌクレオソームは DNA と異なり数が膨大で、4種類のヒストン 2 個ずつからなるヒストン八量体という内部構造まで持っている。このため、エピジェネティック情報がどのようにして細胞分裂の際に娘細胞に伝わっていくのかという解析は可能性が膨大で極めて困難である。この難問題に決着をつけることは、遺伝学(ジェネティクス)とエピジェネティクスの最大の問題、すなわち生物を構成する細胞の維持および変換の仕組みの根本的課題を解決することに繋がるのである。

以上、核を持つ細胞の DNA がヒストンと複合体を形成してヌクレオソーム構造をとること、ヒストンや DNA の化学修飾がヌクレオソーム構造の変換を通じて転写などの核内反応に影響を与えること、これらの化学修飾はエピジェネティック情報と呼ばれ細胞の世代を超えて伝達しうる

ことを述べてきた。では、このエピジェネティック情報がどのようにヌクレオソーム構造変換と結びつくのであろうか？ また、細胞分裂に際してヌクレオソームの複製の過程で起こると考えられるエピジェネティック情報の伝達はどのように起こるのであろうか？ これら長年の謎を解く鍵は、ヒストンシャペロンというヌクレオソーム構造変換に係わる一群のタンパク質にある。シャペロンというのは、もともとは、社交界にデビューする若い女性の面倒をみる介添え役婦人の意味である。ヒストンに付き添っているということからこの名が付けられた。ちなみに、現在シャペロンというと、タンパク質分子の折りたたみを助ける分子の事を指すことが多いが、元々は現在でいうところのヒストンシャペロンに対して用いられたのが最初である。筆者らのグループでは、このヒストンシャペロンの構造と機能の研究を通じて、エピジェネティック情報とヌクレオソーム構造変換の関係およびエピジェネティック情報伝達メカニズムの解明を目指して長年研究を行ってきた。そこで、まずヒストンシャペロンの紹介から始めることとした。

2. ヒストンシャペロン

ヒストンシャペロンは、ヌクレオソーム構造を形成または破壊する活性を示すタンパク質で、これまでに十数種類のもものが知られている。ちなみにこのうち約半分が日本で発見されたもので、生物学研究の中でも日本国内から世界最先端の研究領域を形成し得た数少ない因子群の例である。DNA とヒストンを適切な条件下で混合すれば、ヌクレオソームの形成がある程度起こるが、この反応はヒストンシャペロンによって促進される。これまでに行われてきた生化学的、遺伝学的な解析から、ヒストンシャペロンはヌクレオソーム構造の形成と破壊という反応を通じて転写、複製、DNA 修復などに関与していることが示されてきた⁷⁾。これは、酵素が DNA を基質として反応をする際には、通常は DNA が“裸”の状態（もしくはそれに準ずる状態）でなければならないからで、ヌクレオソームの構造変換が反応制御の鍵を握っている為である。しかし、つい最近までヒストンシャペロンの重要性は一般には認識されておらず、ヌクレオソームの形成と破壊の分子メカニズムは長らく不明であった。筆者らはヒストンシャペロンこそが、ヌクレオソーム構造変換反応の中心的プレーヤーであるという考えのもと、以前からヒストンシャペロンに注目し、様々な相互作用因子の単離と機能解析を通じてヒストンシャペロンの機能的な重要性を示してきた。そしてヒストンシャペロンの作用機構を明らかにするとともに、エピジェネティクス機構に迫ることを目指して、様々なヒストンシャペロンの構造解析に取り組んだ。

TAF- $I\beta$ (Template Activating Factor- $I\beta$) はホモ二量体のヒストンシャペロンで、サブユニットの分子量は約33

kDa である。最初は白血病の原因遺伝子として同定されたが、その後ヒストン H3-H4 複合体に高い特異性を示すヒストンシャペロンであることが発見された⁸⁾。現在ではヒストンアセチル化酵素の阻害活性、動脈硬化促進活性を示す DNA 結合型転写因子 KLF5 の活性阻害^{9,10)}、アポトーシスへの関与など多くの活性を示すことが明らかになっている。

CIA (CCG1-Interacting factor A) は既知のヒストンシャペロン中では進化的に最も高度に保存されており、ヒストン H3 と H4 とに高い特異性を示す。酵母でサイレンシング (DNA の一部領域の転写活性が深く OFF になる現象で、エピジェネティクスの分野での重要研究対象である) の阻害因子 ASF1 (Anti-silencing function 1) として遺伝学的に単離されていたが、筆者らによって転写基本因子 TFIID の最大サブユニットである CCG1 と相互作用する因子 CIA として独立に単離された^{11,12)}。CIA の生化学的活性を明らかにするために相互作用因子を単離したところ、ヒストン H3 を含む様々なクロマチン関連因子が CIA 相互作用タンパク質として得られた。この事実から CIA の生化学的活性が予測され、ヒストンシャペロンであることが示された¹¹⁾。その後、様々な研究者の解析により、CIA が転写、複製、DNA 修復などに関与していることが示されている。転写との関係では、転写開始反応および転写伸長反応において CIA がヌクレオソーム構造変換に関与するのではないかという考えに至っている¹²⁾。複製や DNA 修復の際には別のヒストンシャペロンである CAF-1 や HIRA と協同して、ヌクレオソーム形成に関与することも示されてきた^{13,14)}。このように CIA は多様なタンパク質因子と相互作用することで様々な活性を発揮することが明らかになってきているが、それがどのような統一メカニズムによるのかは謎のままであった。いずれにしても CIA はヒストンや他のタンパク質因子と複合体を形成して機能を発揮すると考えられるので、作用標的の中心にあるヒストンとの複合体形成機構の解明が CIA の作用機構解明の鍵であった。

今回筆者らのグループでは、TAF- $I\beta$ および CIA-ヒストン複合体の結晶構造解析に成功した。その結果、ヌクレオソーム構造変換反応の分子メカニズムに初めて迫るとともに、エピジェネティック情報とヌクレオソーム構造変換反応との関係に関しても分子レベルの議論が可能となりつつある。また、ヒストン八量体中のヒストン (H3-H4)₂ 四量体の安定性に関して従来の常識を覆し、これを元にエピジェネティック情報の伝達メカニズムに関するモデルを提出することができた。以下の節では、これらについて概説すると共に、構造解析の際に生じた問題点を如何に解決してきたかについても簡単に触れたい。

3. TAF- $I\beta$ の結晶構造解析

TAF- $I\beta$ は高濃度の硫酸を沈殿剤として用いて結晶化された¹⁵⁾。しかし得られた結晶は質が悪く構造解析に2年ほど費やした。最初に得られた結晶は6 Å分解能程度の回折点しか与えず、構造解析など到底望めない結晶であった。それでも回折データ収集の際の結晶の凍結条件を改善することで4.5 Å分解能程度の回折像を得ることができた。その後、種々の変異体を作成し結晶化スクリーニングをすることで、ある変異体が2.5 Åを超える分解能の回折点を与えることを見いだした。しかし回折像の異方性が高く、多波長異常分散 (MAD) 法の解析に十分な質のMADデータの収集には多大の苦勞を要した。試行錯誤の末、クライオプロテクタント (水が凍結する際に結晶性の氷になるのを防ぐ試薬) へのソーキング時間などを最適化することでほとんど異方性のない回折データを収集することに成功した。しかし結晶の質を改善した後でも、構造解析に必要な分解能まで回折点を与える結晶の割合が低いため、実験室系のX線回折計を使用して得られた結晶の分解能をチェックした上で、放射光施設に結晶を持ち込んで測定するということを繰り返した。しかしながら、結晶の質をあらかじめチェックしてから放射光施設へ結晶を持って行くという作業は、結果的には回折データ測定にあまり良い影響は与えなかったようだ。最も質の良い回折データが収集できたのは、このようなチェックをしなかった結晶である。タンパク質結晶に一度X線を照射してしまうと時間に応じて結晶の劣化が進むようで、結晶の質や空間群の問題で回折データ測定の精度があまり良くない場合には、事前の回折像チェックという操作が致命的な場合があるのかもしれない。現在では、結晶自動マウントロボットが利用可能になっているので、このような解析を行う際にはロボットが極めて重要な役割を果たすことになるであろう。X線回折像をチェックした結晶は1,000個に迫るほどであったが、最終的にはPF-ARのNW12AでMAD法解析に利用可能なデータを収集することに成功し、結晶構造の決定に成功した¹⁶⁾。結晶構造解析に至る詳しい手順や結晶の質が悪い場合の構造解析法に関しては論文発表する予定であるので、その論文を参照していただけたらと思う。

4. TAF- $I\beta$ の機能発現様式：DNA とヒストンとの相互作用

TAF- $I\beta$ のC末端領域は、酸性アミノ酸に富んだテイル (tail) 領域である。この領域がヒストンシャペロン活性に必要なという指摘もあったが、このテイル領域を欠いたTAF- $I\beta$ でもヒストンシャペロン活性を示すことがわかったため¹⁶⁾、結晶構造解析はテイル領域を除いた変異体を用いて行った。TAF- $I\beta$ は、Fig. 2に示す通り二量体

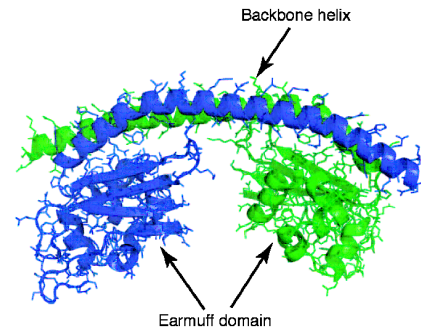


Fig. 2 Crystal structure of TAF- $I\beta$ ¹⁶⁾. TAF- $I\beta$ is a dimeric molecule. Each subunit is composed of the N-terminal helix (not shown in this figure), the backbone helix, and the earmuff domain.

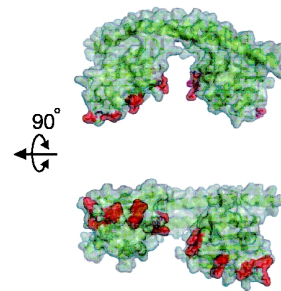


Fig. 3 Active site of TAF- $I\beta$ ¹⁶⁾. The residues that are involved in histone binding, DNA binding, and histone chaperone activities are shown in red.

を形成しており、ヘッドフォンのような構造をしている¹⁶⁾。二量体中には2回回転軸があることから、分子中に2回回転軸を持つヒストン (H3-H4)₂ 四量体に結合すると考えるのが妥当であるが、実際にどのような複合体を形成するのかは不明である。次にTAF- $I\beta$ 分子の活性部位を明らかにするために、点変異体を用いた実験を行った。分子表面のほぼ全てを覆うように3アミノ酸ずつを変異させた点変異体を18種類作成し、これらの変異体のヒストンシャペロン活性と、ヒストンおよびDNAとの結合活性を解析した。その結果、Fig. 3の赤色で示した耳当てドメイン (earmuff domain) の底の部分がDNAおよびヒストンとの結合のみならず、ヒストンシャペロン活性にも重要であることが判明した。このことから、ヒストンシャペロンがヌクレオソームを形成する際には、DNAとヒストンとがヒストンシャペロンの働きによって分子集合することで、ヌクレオソームの形成が起こっていると考えられる。但し、具体的にどのような中間体を取っているのかTAF- $I\beta$ の例からは明らかにすることはできなかった。ヌクレオソームの構造変換機構のメカニズムに迫るためには、ヒストンシャペロンとヒストンとの複合体の構造解析が不可欠である。そこで次節以降では、ヒストンシャペロンCIAとヒストンの複合体の結晶構造解析の結果を紹介し、ヌクレオソーム構造変換のメカニズムに迫ってみたい

と思う。

5. CIA-ヒストン複合体の構造解析

CIA-ヒストン複合体の構造解析において、最も困難であった点はヒストンの調製である。遺伝子組換え型ヒストンの発現系は、T. J. Richmond らのグループにより確立されていたが¹⁷⁾、彼らの方法では CIA-ヒストン複合体の結晶化実験に十分な量 (10–100 mg) のヒストン複合体 (この場合はヒストン (H3-H4)₂ 四量体) を調製することができないでいた。ヒストン複合体は、複合体形成に用いるヒストンを変性状態のまま混ぜ合わせて、リフォールディングさせつつ再構成するのであるが、再構成ヒストン複合体の収率が悪いと、いかに各ヒストンを大量に得るかが実験の成功の鍵であった。そこで筆者らのグループでは、独自のヒストン精製方法を開発し、各ヒストンを 1 g のオーダーで調製できる系を確立した (論文準備中)。この結果、結晶化に使うのに十分な量 (100 mg 程度) のヒストン (H3-H4)₂ 四量体を作成することが可能になったので、CIA-H3-H4 複合体の結晶化に取りかかった。結晶化には TAF-*I* β の場合と異なりそれ程大きな苦労は無かったが、得られた結晶はごく小粒であり (0.075 × 0.075 × 0.03 mm³)、放射光無しでは解析は困難であった。データ測定は PF-AR の NW-12A で行い、2.7 Å 分解能のデータを収集し分子置換法により結晶構造を決定した¹⁸⁾。

6. CIA によるヒストン (H3-H4)₂ 四量体の分割

CIA のヒストンシャペロン活性に C 末端のテイル領域は不必要であることが分かっていたため、結晶化は C 末テイル領域を削った CIA とヒストン (H3-H4)₂ 四量体を用いて行った。CIA に対して各ヒストンが等モルになるように混合して結晶化を行ったところ、得られた結晶構造中にはヒストン (H3-H4)₂ 四量体は見られず、CIA はヒストン H3-H4 二量体と複合体を形成して三量体構造をとっていた¹⁸⁾ (Fig. 4)。これは、結晶化中にヒストン (H3-H4)₂ 四量体が 2 つのヒストン H3-H4 二量体に分割され、各々が CIA と結合したことを意味している。CIA は溶液中では単量体として存在することから、ヒストン H3-H4 二量体に 1 分子の CIA が結合するという結合様式は、分子の対称性から考えても納得のいくものである。しかし、単に化学平衡によって大量に生じたヒストン H3-H4 二量体に CIA が結合したという可能性もある。そこで、静的光散乱を用いて、CIA にヒストン (H3-H4)₂ 四量体の分割活性が有るのかどうかを確かめた。

静的光散乱を用いた分子量の測定は近年注目を集めている方法で、比較的簡便に測定を行うことが可能な上、ゲル濾過による分子量測定に比べ極めて精度が高いため、複合

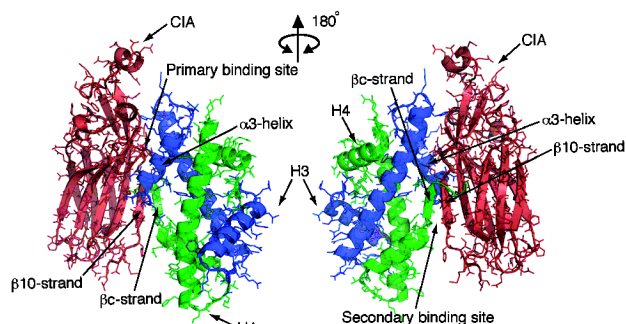


Fig. 4 Crystal structure of the CIA-histone-H3-H4 complex¹⁸⁾. CIA, histone H3, and histone H4 are shown in red, blue, and green, respectively.

体の分子量測定に用いるのには最適な方法である。この方法を用いて、ヒストン (H3-H4)₂ 四量体、CIA、および両者の混合物の分子量を測定したところ、両者を混合した場合にはヒストン (H3-H4)₂ 四量体は検出されず CIA がヒストン H3-H4 二量体と複合体を形成していることが見いだされた。本実験条件下ではヒストン (H3-H4)₂ 四量体は溶液中で安定に存在するので、CIA がヒストン (H3-H4)₂ 四量体を分割したことは明らかである。これはヒストン (H3-H4)₂ 四量体が、生体内の因子によって分割されるということを示した初めての例で、溶液中ではヒストン (H3-H4)₂ 四量体が安定であるという30年来の定説を覆すことになった。ちなみに、筆者らとほぼ同時期に J. K. Tyler らのグループが酵母由来の CIA (ASF1) とヒストン H3-H4 二量体の複合体の結晶構造を報告しているが¹⁹⁾、彼らは、CIA がヒストン (H3-H4)₂ 四量体を分割するという生化学的知見を得るに至っておらず、30年来の“ドグマ”が如何に大きなものであったのかを物語っている。両者の間にこのような大きな差を生み出している原因として、彼らが CIA-H3-H4 の複合体を得るために3種類のタンパク質の共発現系を利用している点が挙げられる。つまり、彼らの実験系では CIA は最初からヒストン H3-H4 との複合体として精製されてくるため、CIA がヒストン (H3-H4)₂ 四量体を分割しているかどうかは全く分からないのである。この点が筆者らとの大きな違いであり、DNA 合成に伴うヌクレオソームの複製機構に関しても (この点は最も重大な点であるのだが) 異なった解釈をすることに繋がっていく。

7. ヒストン (H3-H4)₂ 四量体の Yawara split モデル：柔よく剛を制す

では CIA のヒストン (H3-H4)₂ 四量体の分割は、どのようなメカニズムで起こるのであろうか? CIA-H3-H4 複合体の結晶構造から、CIA とヒストン H3-H4 二量体とは、2カ所で相互作用をしている事が明らかになった

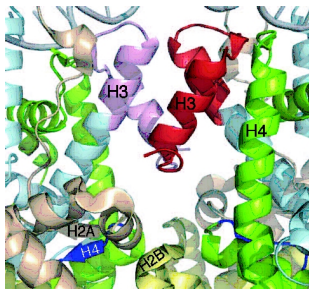


Fig. 5 The position of the CIA-binding sites of histones H3 and H4 in the nucleosome. Histone H3, and histone H4 are shown in cyan, and green, respectively. The CIA-binding sites of histones H3 are shown in red and pink. The CIA-binding sites of histones H4 are shown in blue. In the nucleosome, the residues in the CIA-binding sites of histones H3 and H4 are involved in the interactions that are important to the formation of the histone octamer.

(Fig. 4)。第一の結合部位では、CIAの“正面”の凹面部分とヒストンH3の3番目の α ヘリックス($\alpha 3$ -ヘリックス)が相互作用をしている。この部分が最も両者が密に結合している部分である。第二の結合部位では、CIAの側面部分とヒストンH4が相互作用をしている。この部分は、第一の結合部位に比べて接触面積が狭く、結合エネルギーに対する効果は2次的であると考えられる。点変異体を用いた解析から、結晶中でCIAとヒストンH3-H4二量体との相互作用に重要であると考えられたアミノ酸残基は、溶液中においても両者の相互作用に重要であることが示された。また、酵母を用いた遺伝学的解析から、CIAの第一の結合部位を利用した相互作用が生物学的にも重要であることも示された¹⁸⁾。

両者の相互作用において興味深いのは、ヒストンH3およびH4が、CIAと相互作用している部分は、ヌクレオソーム中で他のヒストンと相互作用している部分であるという点である(Fig. 5)。ヒストンH3のCIA結合部位である $\alpha 3$ -ヘリックスは、ヌクレオソーム中のヒストン(H3-H4)₂四量体において、もう片方のヒストンH3との相互作用部位となっている。ヒストンH4は、C末端部分の β ストランド(βc -ストランド)を通じてCIAと相互作用をするが、ヒストンH4のこの部分はヌクレオソーム中ではヒストンH2Aの β ストランドと平行 β シートを形成している。つまりこの部位はヒストン(H3-H4)₂四量体とヒストンH2A-H2B二量体を結びつける重要な相互作用部位となっている。このような結合部位の重複がCIAのヒストン(H3-H4)₂四量体分割活性と関係していると考えられる。

では、CIAはどのような過程を経てヒストン(H3-H4)₂四量体を分割するのであろうか？ヌクレオソームが破壊される際には、まずヒストン(H3-H4)₂四量体からヒストンH2A-H2B二量体が他のヒストンシャペロンの作用によって解離すると考えられている。このためヒス

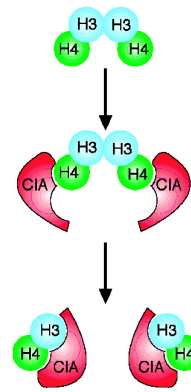


Fig. 6 Yawara split model¹⁸⁾. Yawara split proceeds in two steps. CIA initially binds to the βc -strand of histone H4, and then the H3-H3 interaction is disrupted.

トンH2A-H2Bが解離した後は、ヒストンH4の βc -ストランドは相互作用の相手を失い溶液中に露出していると考えられる。そこでCIAが、この時点で相互作用可能なヒストンH4の βc -ストランドと最初に相互作用すると考えるのが妥当であろう。そしてヒストンH4の βc -ストランドとCIAの $\beta 10$ -ストランドの相互作用によって両者が十分に接近した後に(Fig. 4)、CIAがヒストンH3の $\alpha 3$ -ヘリックスと相互作用することでヒストン(H3-H4)₂四量体を分割するというモデルが考えられる(Fig. 6)。このモデルは、まず弱い相互作用で複合体の前段階を形成しておき、その後大きな構造変換(ヒストン(H3-H4)₂四量体の分割)を誘起するというもので、大きな相手を小さな力でうまく投げ倒す柔道の心得「柔よく剛を制す」を連想させるため、この分割の仕方を「Yawara split」モデルと名付けた¹⁸⁾。

さて、このようにして生じると考えられるCIA-H3-H4三量体の生物学的意味は何であろうか？CIAは核内でヌクレオソーム構造変換に関与していると考えられるため、ヒストン(H3-H4)₂四量体の分割の結果生じるCIA-H3-H4三量体は、核内でのヌクレオソーム構造変換反応における反応中間体の一つではないかと考えている。

8. シグナル伝達とヌクレオソーム構造変換モデルの確立

では、CIAがヒストン(H3-H4)₂四量体を分割することは、どのような生物学的な意味があるのであろうか？増殖因子などの情報伝達物質が細胞膜上の受容体により認識されると、このシグナルは細胞内の情報伝達経路を用いて核内に到達し、DNA結合型転写因子による転写領域の決定が起こると考えられている。さらに、DNA結合型転写因子はコアクチベーターといわれる複合体群と相互作用し、その結果ヒストン化学修飾酵素等によるヒストンの化学修飾、その化学修飾情報に基づいたヌクレオソ

ムの構造変換が起こり、転写をはじめとする核内反応が起きると考えられるようになってきた。このヒストンの化学修飾と転写活性化の関連は、現象としては40年以上も前から知られていたにもかかわらず²⁰⁾、細胞内シグナル伝達とスクレオソーム構造変換の関係の分子基盤は、残された謎となっていた。しかし、() CIA は転写基本因子 TFIID の最大サブユニットである CCG1 中のプロモドメインと相互作用すること^{11,12)}、()プロモドメインがアセチル化ヒストンを認識するドメインであること²¹⁾、()プロモドメインが抗サイレンシングに関与することと、今回の筆者らのグループの結果を合わせて考えると、アセチル化ヒストンと相互作用するプロモドメインが CIA をリクルートし、その結果 CIA がヒストン (H3-H4)₂ 四量体の分割を含むスクレオソームの構造変換反応を行うことを示唆しており、細胞内シグナル伝達の一つの到達点としてのスクレオソーム構造変換というモデルが初めて確立されたといえよう。

9. スクレオソームの半保存的複製モデルによるエピジェネティック情報の伝達機構

イントロダクションで述べた通りヒストンの化学修飾はエピジェネティック情報として機能し、この伝達のメカニズムが重大な問題として残されている。実は今回の CIA-H3-H4 複合体の結晶構造解析と CIA によるヒストン (H3-H4)₂ 四量体の分割活性の発見からエピジェネティック情報の伝達メカニズムの解明に大きな前進がもたらされた。話を簡単にするために、ヒストン八量体からなるスクレオソームではなく、ヒストン (H3-H4)₂ 四量体に絞って考えてみよう。スクレオソームの発見以来、ヒストン (H3-H4)₂ 四量体の娘 DNA 鎖への分配には主に3つのモデルが考えられてきた。ヒストン (H3-H4)₂ 四量体を2つの娘 DNA 鎖にランダムに分配する方法、ヒストン (H3-H4)₂ 四量体を片方の娘 DNA 鎖だけに分配する方法、最後にヒストン (H3-H4)₂ 四量体を2つに分割して2つの娘 DNA 鎖に等価に分配する方法である (Fig. 7)。ヒストンの化学修飾情報を確実に娘 DNA 鎖に伝達するためには、3番目の方法が最も合理的で良いのであるが、30年以上にわたってヒストン (H3-H4)₂ 四量体は安定であると考えられてきたため、この分配方式(スクレオソームの半保存的複製という)はモデルの美しさや理論的妥当性にもかかわらず実験的根拠がないとされてきた。しかし、今回筆者らが CIA によるヒストン (H3-H4)₂ 四量体の分割活性を示したために、これまでネックとされてきたヒストン (H3-H4)₂ 四量体の安定性というモデル中の障害が取り除かれ、全く状況が変わったのである。つまり、親スクレオソーム中のヒストン (H3-H4)₂ 四量体が CIA によって2つに分割され各々が娘 DNA 鎖上にそれぞれが分配されるのであれば、スクレオソームの半保存的複製が可能

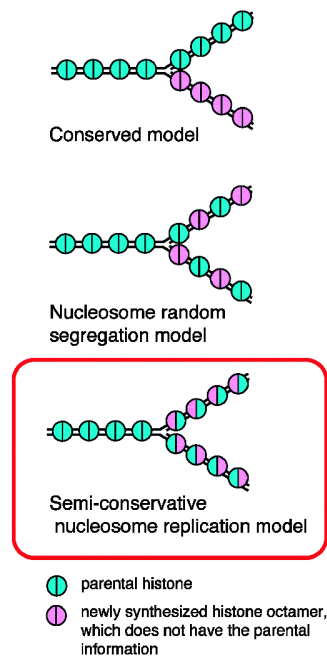


Fig. 7 Three major nucleosome replication models. We propose the semi-conservative nucleosome replication model on the basis of our recent biochemical and structural studies¹⁸⁾.

となる。また、細胞質中にあるヒストン H3-H4 は、二量体として存在していることが最近明らかになってきたため²²⁾、複製の際にスクレオソームの形成を助ける CAF-1 という分子上で2分子のヒストン H3-H4 二量体が CIA の助けを借りてヒストン (H3-H4)₂ 四量体を形成すると考えれば合理的である。さらに、これまで親スクレオソーム中のヒストン (H3-H4)₂ 四量体を2本の娘 DNA 鎖上へランダムに分配するというモデルを支持するとされてきた過去の実験結果を再検討してみたところ、スクレオソーム半保存的複製との矛盾点を見いだすことは出来なかった。ほとんどが、ヒストン (H3-H4)₂ 四量体が安定で分割されないという前提に基づいた実験結果の解釈に依存していたのであった。

もちろん別の考え方も可能である。J. K. Tyler らは、ヒストン H3-H4 二量体が CIA と複合体を形成するということを認めた上で親スクレオソーム上のヒストン (H3-H4)₂ 四量体がランダムに娘 DNA 鎖上に分配され、新規合成スクレオソームのみが(新規に合成されたヒストンからなるスクレオソームという意味)、CIA-H3-H4 の中間体構造を経てヒストン (H3-H4)₂ 四量体を形成しスクレオソームに取り込まれていくというモデルを提案している²³⁾。しかしながら、このモデルはヒストンの化学修飾情報の(細胞の)世代を超えた保持という観点からは不都合で、どのようにして等価な娘細胞を作り出せるのかという問いに答えることが出来ない。要するに、親スクレオソームのランダムな分配ということを一端認めると、親細胞と娘細胞の間でエピジェネティック情報を正確に伝達す

ることが困難になってしまうのである。ヌクレオソームの半保存的複製のみがエピジェネティック情報を2本の娘DNA鎖へと正確に伝達しうる唯一のモデルであるということは、強調してもしすぎることはないであろう。これに加え、ヒストン八量体は4種類のヒストンH2A, H2B, H3, H4が2セットずつ集まって形成されており、ヌクレオソーム自体が半保存的複製に都合が良いように出来ている点も見逃すことが出来ないのではないだろうか。

10. 終わりに

今回のCIAに関する結晶学的、生化学的研究から、CIAのヒストン(H3-H4)₂四量体の分割活性の発見、この活性に基づく細胞内シグナル伝達とヌクレオソーム構造変換の関係、特にプロモドメインとヌクレオソーム構造変換因子間の機能的関係の確立、CIAの関与するヌクレオソーム構造変換反応における中間体構造(CIA-H3-H4複合体)の決定、そしてヌクレオソームの半保存的複製モデルの提唱と、極めて多岐にわたる重要な結論が導き出された。特に、ヌクレオソームの半保存的複製が可能であることを初めて分子レベルの実験により示した点は極めて意義深いと考えている。もちろん、エピジェネティック情報は常に伝達しておけば良いわけではなく、細胞の分化などの際にはエピジェネティック情報を消去するというプロセスも必要である可能性は否定できない。この場合は、CIAの活性を制御することで、このようなプロセスが可能になると考えることが出来る。少なくとも、今回の結果は、細胞の増殖の基本的な機構に関して、DNAの半保存的複製に加えてDNAと相互作用するヒストンも半保存的に複製しうることを支持するという点で極めて重要なモデルで、このモデルを元にしてエピジェネティック情報伝達に新しい見方が導入されたといえる。今後このモデルに基づいて多くの新しい概念が提出され、エピジェネティクス分野に大きな転換点が訪れるのではないかと考えている。

参考文献

- 1) R. D. Kornberg: *Science* **184**, 868 (1974).
- 2) K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond: *Nature* **389**, 251 (1997).
- 3) C. D. Allis, T. Jenuwein, D. Reinberg and M.-L. Caparros: *Epigenetics* (Cold Spring Laboratory Harbor Press, New York, 2007).
- 4) J. D. Watson and F. H. Crick: *Nature* **171**, 737 (1953).
- 5) M. Meselson and F. W. Stahl: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 671 (1958).
- 6) A. Bird: *Genes Dev.* **16**, 6 (2002).
- 7) A. Loyola and G. Almouzni: *Biochem. Biophys. Acta* **1677**, 3 (2004).
- 8) H. Kawase, M. Okuwaki, M. Miyaji, R. Ohba, H. Handa, Y. Ishimi, T. Fujii-Nakata, A. Kikuchi and K. Nagata: *Genes Cells* **1**, 1045 (1996).
- 9) T. Suzuki, S. Muto, S. Miyamoto, K. Aizawa, M. Horikoshi and R. Nagai: *J. Biol. Chem.* **273**, 28758 (2003).
- 10) S. Miyamoto, T. Suzuki, S. Muto, K. Aizawa, A. Kimura, T. Nagino, Y. Imai, N. Adachi, M. Horikoshi and R. Nagai: *Mol. Cell Biol.* **23**, 8528 (2003).
- 11) T. Munakata, N. Adachi, N. Yokoyama, T. Kuzuhara and M. Horikoshi: *Genes Cells* **5**, 221 (2000).
- 12) T. Chimura, T. Kuzuhara and M. Horikoshi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9334 (2002).
- 13) J. K. Tyler, C. R. Adams, S.-R. Chen, R. Kobayashi, R. T. Kamakaka and J. T. Kadonaga: *Nature* **402**, 555 (1999).
- 14) E. M. Green, A. J., Antczak, A. O. Bailey, A. A. Franco, K. J. Wu, J. R. Yates and P. D. Kaufman: *Curr. Biol.* **15**, 2044 (2005).
- 15) S. Muto, M. Senda, N. Adachi, T. Suzuki, R. Nagai, T. Senda and M. Horikoshi: *Acta Crystallogr.* **D60**, 712 (2004).
- 16) S. Muto, M. Senda, Y. Akai, L. Sato, T. Suzuki, R. Nagai, T. Senda and M. Horikoshi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 4285 (2007).
- 17) K. Luger, T. J. Rechsteiner and T. J. Richmond: *Methods Enzymol.* **304**, 3 (1999).
- 18) R. Natsume, M. Eitoku, Y. Akai, N. Sano, M. Horikoshi and T. Senda: *Nature* **446**, 338 (2007).
- 19) C. M. English, M. W. Adkins, J. J. Carson, M. E. Churchill and J. K. Tyler: *Cell* **127**, 495 (2006).
- 20) V. G. Allfrey, R. Faulkner and A. E. Mirsky: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 786 (1964).
- 21) R. H. Jacobson, A. G. Ladurner, D. S. King and R. Tjian: *Science* **288**, 1422 (2000).
- 22) H. Tagami, D. Ray-Gallet, G. Almouzni and Y. Nakatani: *Cell* **116**, 51 (2004).
- 23) C. M. English, N. K. Maluf, B. Tripet, M. E. Churchill and J. K. Tyler: *Biochemistry* **44**, 13673 (2005).

● 著者紹介 ●

千田俊哉

独産業技術総合研究所・生物情報解析研究センター 主任研究員

E-mail: tsenda@jbirc.aist.go.jp

専門：蛋白質結晶学，生化学，構造生物学

夏目 亮

㈱日本バイオ産業情報化コンソーシアム・生物情報解析研究センター 特別研究員

E-mail: rnatsume@jbirc.aist.go.jp

専門：蛋白質化学

武藤真祐

東京大学分子細胞生物学研究所 博士研究員

E-mail: mutoshin@ya2.so-net.ne.jp

専門：生化学，分子生物学，構造生物学

荣徳勝光

東京大学大学院理学系研究科

博士課程 3年

E-mail: ss57164@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

赤井祐介

東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程 2年

E-mail: yakai@jbirc.aist.go.jp

千田美紀

㈱日本バイオ産業情報化コンソーシアム・生物情報解析研究センター 研究員

E-mail: msenda@jbirc.aist.go.jp

専門：蛋白質結晶化，構造生物学

佐野徳彦

東京大学大学院理学系研究科

修士課程 2年

E-mail: ss66319@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

佐藤 壘

東京大学大学院理学系研究科

博士課程 1年

E-mail: ss077142@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

堀越正美

東京大学分子細胞生物学研究所 准教授

E-mail: horikosh@iam.u-tokyo.ac.jp

専門：生化学，分子生物学，遺伝学，構造生物学

Molecular mechanism of the nucleosome assembly/disassembly by the histone chaperone

Toshiya SENDA¹, Ryo NATSUME², Shinsuke MUTO³,
Masamitsu EITOKU³, Yusuke AKAI², Miki SENDA²,
Norihiro SANO³, Lui SATO³, Masami HORIKOSHI³

¹Biological Information Research Centre (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-42 Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-0064, Japan

²Japan Biological Information Research Centre (JBIRC), Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), 2-42 Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-0064, Japan

³Laboratory of Developmental Biology, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

Abstract CIA is the most conserved histone chaperone in the eukaryotes. The biochemical and X-ray crystallographic studies have revealed that CIA disrupts the histone (H3-H4)₂ tetramer into two histone H3-H4 dimers through forming the CIA-H3-H4 complex. Since many researchers have believed that the histone (H3-H4)₂ tetramer is a stable complex in solution, the histone (H3-H4)₂ tetramer disrupting activity of CIA gave an impact on the chromatin research. This activity of CIA gives new insights into the mechanism of the nucleosome assembly/disassembly, the relationship between nucleosome assembly/disassembly and epigenetic modifications of histones, and the mechanism of the epigenetic information inheritance through the semi-conservative nucleosome replication mode.