

ヒト染色体複製開始因子Cdt1に結合する蛋白質GRWD1 のヌクレオソーム形成活性及び崩壊活性の解析

會澤， 誠大

<https://hdl.handle.net/2324/1654822>

出版情報：九州大学，2015，博士（臨床薬学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

ヒト染色体複製開始因子 **Cdt1** に結合する蛋白質 **GRWD1** の ヌクレオソーム形成活性及び崩壊活性の解析

(分野名) 医薬細胞生化学分野 (学籍番号) 3PS12029S (氏名) 會澤誠大

【序論】

真核生物の DNA は、クロマチンとして核内に収納されている。そのため、複製や転写といった反応にあわせてクロマチンの形態を変化させる必要がある。DNA 複製開始反応の最初のステップは、複製前複合体 (**pre-RC**) の形成である。これは、六量体 **ORC** と **Cdc6** 及び **Cdt1** による、**MCM** ヘリカーゼ複合体のローディング反応である (Masai et al., 2010; Hills and Diffley, 2014)。しかし **pre-RC** が形成される時に、どのようなメカニズムでクロマチン構造が制御されているのか詳しい事は分かっていない。それを解明する手がかりとして、**Cdt1** 結合因子として **SNF2H** や **WSTF**、**GRWD1** が同定された (Sugimoto et al., 2008)。**SNF2H** はクロマチンリモデリング因子の一つであり、**WSTF** と複合体を形成して転写制御に関与していることが知られている。**GRWD1** は酸性ドメインと **WD40** ドメインを持つタンパク質であり、少なくとも **GST-GRWD1-His** はヒストンシャペロン活性を示す事が分かっている (Sugimoto et al., 2015)。さらに **SNF2H**、**GRWD1** 共に複製起点にリクルートされ、**MCM2-7** 複合体のローディングを促進している事が示唆されている (Sugimoto et al., 2011; Sugimoto et al., 2015)。この他に、ヒストンアセチル化酵素 **HBO1** による **Cdt1** 依存的 **pre-RC** 形成促進が報告されている (Miotto and Struhl, 2008)。これらの事から、上記に挙げたクロマチン制御因子群が協調的に **Cdt1** 依存的にクロマチン上にリクルートされ、クロマチンの構造を変換させて **MCM2-7** 複合体のローディングを促進するのではないかと考えられる。

しかし、**GRWD1** の生化学的な解析はほとんど行われておらず、クロマチン構造変換の分子メカニズムは不明であった。そこで **GRWD1** のヌクレオソーム形成活性及び崩壊活性に関して解析を行った。さらに上述した仮説を証明する為に、**Cdt1** に依存した **GRWD1** 及び関連因子によるヌクレオソーム崩壊活性の試験管内アッセイ法の確立を行った。

【方法】

• **GRWD1** のヌクレオソーム構成活性試験

解析に用いた **GRWD1-His** を大腸菌から、**GRWD1-FLAG** を 293T 細胞から精製した。また、ヒストン **H2A-H2B** 二量体、**H3.1-H4** 四量体を大腸菌から精製した。DNA 断片は、**NPC** (ヌクレオソーム配置配列) を持つ *Lytechinus variegatus* 由来の 195 bp 5S リボソーム

ム RNA 遺伝子断片 (以下 195 bp 5S rDNA とする)を用いた。

GRWD1 とヒストンを 23 °C、10 分間反応させた後、195 bp 5S rDNA を加え、23 °C、1 時間、42 °C、1 時間反応させた。反応物は non-denaturing PAGE (7.5%)により解析した。DNA の検出を SYBR Gold 染色によって行った。

- **塩透析法によるモノヌクレオソームの再構成**

モノヌクレオソームを 195bp 5S rDNA と組換えヒストンを用いて、塩透析法により再構成した。

- **MNase と制限酵素を用いたヌクレオソームのポジショニングの解析**

モノヌクレオソームに MNase を反応させた後、MNase 耐性の約 150 bp の DNA を回収した。その後、得られた DNA を制限酵素 Dra I もしくは Mbo I で処理した。DNA サンプルは non-denaturing PAGE (7.5%)により解析した。

- **GRWD1 のヌクレオソーム崩壊活性試験**

GRWD1-His とモノヌクレオソームを 37°C、30 分間反応させた。反応物は non-denaturing PAGE (7.5%)により解析した。DNA の検出は SYBR Gold 染色によって、ヒストンの検出は抗ヒストン抗体を用いた Immunoblotting によって行った。

- **Cdt1 に依存した GRWD1 及び関連因子によるヌクレオソーム崩壊活性の試験管内アッセイ法を確立**

HBO1-His と SNF2H-WSTF-FLAG の精製、活性評価を行った。また LacO 配列を持つ DNA を用いて、塩透析法によりヌクレオソームを再構成した。さらに、Cdt1 と LacO 配列結合タンパク質 LacI の融合タンパク質 Cdt1-LacI-FLAG を 293T 細胞から精製した。

【結果】

- **GRWD1 は酸性ドメイン非依存的なヌクレオソーム形成活性を持つ**

GRWD1 のヌクレオソーム形成活性について詳細に調べた。その結果、大腸菌から精製した GRWD1-His がヌクレオソーム形成能を持っている事がわかった。また、ヒストンとの相互作用に重要な酸性ドメインを欠除した GRWD1-His Δ acid でも、この活性を保持していた。これらの事は、293T 細胞から精製した GRWD1-FLAG でも確認できた。

- **モノヌクレオソームの再構成とその解析**

GRWD1 がヌクレオソームの構造を変化させ得るのかどうか調べる為に、必要なモノヌクレオソームを塩透析法により再構成した。得られたモノヌクレオソームのポジショニングを調べた結果、再構成モノヌクレオソームの多くでは、ヒストンは NPC (ヌクレオソーム配置配列)に位置している一方、NPC から外れた位置にヒストンが存在するものも一定の割合で存在する事が分かった。

- **GRWD1 は酸性ドメイン依存的なヌクレオソーム崩壊活性を持つ**

GRWD1 のヌクレオソーム崩壊活性を調べたところ、GRWD1-His はヌクレオソームか

ら H2A-H2B 二量体を解離させる活性を持っている事が明らかになった。その結果、ヘキサソームの形成が促進されることも分かった。さらに NPC から外れた位置にヒストンが存在するモノヌクレオソームの割合が、GRWD1-His によって減少する事が分かった。興味深い事に、野生型 GRWD1 に比べ Δ acid 変異体ではこれらの活性が減弱していた。

• Cdt1 に依存した GRWD1 及び関連因子によるヌクレオソーム崩壊活性の試験管内アッセイ法の確立

GRWD1 の活性に対して、他のクロマチン制御因子群が影響を与えているか調べる為に、HBO1-His、SNF2H-WSTF-FLAG の精製及び活性評価を行った。また、これらクロマチン制御因子による Cdt1 依存的なヌクレオソームの崩壊をより簡便に調べる実験系の確立に向け、LacO 配列を持つ DNA を用いてヌクレオソームを形成し、さらに Cdt1 と LacO 配列結合タンパク質 LacI の融合タンパク質 Cdt1-LacI-FLAG を精製した。

【考察】

本研究により、GRWD1 は酸性ドメイン非依存的なヌクレオソーム形成活性を持っている事が明らかになった。一方 GRWD1 はヌクレオソームから H2A-H2B 二量体を解離させ、ヘキサソームの形成を促進する活性を持っている事も明らかとなった。さらにこの崩壊活性においては酸性ドメインが重要な役割を持っている事が明らかになった。似たような活性を持つヒストンシャペロンとして、NAP1 が報告されている (Park et al., 2005)。

以上の結果から、複製開始点において GRWD1 は酸性ドメインを介してヌクレオソームから H2A-H2B 二量体を解離させる事でクロマチン構造を緩め、pre-RC の形成を促進しているというモデルが考えられる。

一方、現時点ではヒト細胞系で pre-RC 形成の全再構成は難しい。そこで、LacO 配列を持つ DNA を用いてヌクレオソームを形成し、これに Cdt1 と LacO 配列結合タンパク質 LacI の融合タンパク質を加え、さらに上記因子を加えることで Cdt1 依存的なヌクレオソーム崩壊を調べることを考えた。この手法により、簡便に複製開始におけるクロマチン構造変換を調べる事が出来る。実際に、このような実験系は転写におけるクロマチン構造変換の解析に良く用いられている。よって今回構築した Cdt1-lacI 実験系は、GRWD1、HBO1、SNF2H-WSTF 複合体による Cdt1 依存的なヌクレオソームの構造変換を調べる方法として非常に有用であると考えている。

【引用文献】

Hills, S.A., and J.F. Diffley. 2014. *Curr.Biol.* 24:R435-44.

Masai, H., S. Matsumoto, Z. You, N. Yoshizawa-Sugata, and M. Oda. 2010. *Annu.Rev.Biochem.* 79:89-130.

Sugimoto, N., I. Kitabayashi, S. Osano, Y. Tatsumi, T. Yugawa, M. Narisawa-Saito, A. Matsukage, T. Kiyono, and M. Fujita. 2008. *Mol.Biol.Cell.* 19:1007-1021.

Sugimoto, N., K. Maehara, K. Yoshida, S. Yasukouchi, S. Osano, S. Watanabe, M. Aizawa, T. Yugawa, T. Kiyono, H. Kurumizaka, Y. Ohkawa, and M. Fujita. 2015. *Nucleic Acids Res.* 43:5898-5911.

Sugimoto, N., T. Yugawa, M. Iizuka, T. Kiyono, and M. Fujita. 2011. *J.Biol.Chem.* 286:39200-39210.

Miotto, B., and K. Struhl. 2008. *Genes Dev.* 22:2633-2638.

Park, Y.J., J.V. Chodaparambil, Y. Bao, S.J. McBryant, and K. Luger. 2005. *J.Biol.Chem.* 280:1817-1825.