

## 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

<http://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）

氏名	會澤 誠大
論文名	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
論文調査委員	主査 九州大学 薬学府 教授 藤田 雅俊 副査 九州大学 薬学府 教授 片山 勉 副査 九州大学 薬学府 教授 植田 正 副査 九州大学 システム生命科学府 教授 釣本 敏樹

### 論文審査の結果の要旨

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 および 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。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。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。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。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。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。そこで本研究では、この仮説を証明する為に主に試験管内再構成系を用いて解析を進めた。

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。そこでまず、GRWD1 のヌクレオソーム形成活性及び崩壊活性について解析を行った。最初に GRWD1 のヌクレオソーム形成能について詳細に調べた。そのために、GST を持たない GRWD1-His を大腸菌から精製した。モノヌクレオソーム構成活性試験の結果、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  $\Delta$ 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。

次に GRWD1 がヌクレオソームの構造を変化させ得るのかどうかを調べた。そのために必要な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。得られたモノヌクレオソームと GRWD1-His を反応させた後、non-denaturing PAGE を行い、SYBR Gold 染色による DNA の検出と抗ヒストン抗体を用いた Immunoblotting によるヒストンの検出により評価した。アッセイに用いた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。実験の結果、これら 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。さらに、GRWD1-His によって H2A-H2B 二量体がヌクレオソームから解離し、ヘキサソームが形成される事も分かった。興味深い事に、野生型 GRWD1 に比べ  $\Delta$ acid 変異体ではこれらの活性が減弱していた。以上のデータより、GRWD1 は酸性ドメインを介してヌクレオソームからヒストンを追い出す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。

上記の結果を鑑み、Cdt1 に依存した GRWD1 およ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に向けた検討を開始した。上述したように、GRWD1 は SNF2H-WSTF 複合体および HBO1 と協調して、Cdt1 依存的にヌクレオソーム崩壊を促進しているという仮説が考えられる。そこでこれらが、GRWD1 のヌクレオソーム崩壊活性に与える影響について調べることを試みた。そのためまず、HBO1 および SNF2H-WSTF 複合体を精製し活性を評価した。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。よって、ヌクレオソームを持った DNA を基質として pre-RC 全再構成を行い、そこに GRWD1、HBO1、SNF2H-WSTF (WICH) を加えて MCM ローディングの促進を検討するのは現実的ではないと考えている。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。このために、新たに LacO 配列を含むモノヌクレオソームの再構成と、Cdt1-LacI 融合タンパク質の精製を行った。今回構築の基礎検討を行なった Cdt1-LacI 解析システムは、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ことが期待される。

以上の結果は非常に意義深いものと考えられ、よって本学位請求論文は博士(臨床薬学)の学位に値すると認めた。