

Atg8は、自身が明確な機能を持っており、タンパク質と脂質という違いはあれど、標的分子によってその機能が制御される。Atg8に関する研究は、ユビキチン様タンパク質の機能の多様性に、概念的にも新たなケースを提示したと言えよう。このユニークなユビキチン様タンパク質が統御する膜動態に注目し、さらに解析を進めることで、オートファゴソーム形成を支える特異な膜動態の解明に突破口が開けるものと期待している。

- 1) Mizushima, N. (2005) *Cell Death Differ.*, **12**, 1535–1541.
- 2) Nakatogawa, H., Ichimura, Y., & Ohsumi, Y. (2007) *Cell*, **130**, 165–178.
- 3) Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., & Ohsumi, Y. (1994) *J. Cell Biol.*, **124**, 903–913.
- 4) Baba, M., Osumi, M., & Ohsumi, Y. (1995) *Cell Struct. Funct.*, **20**, 465–471.
- 5) Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 657–668.
- 6) Ishihara, N., Hamasaki, M., Yokota, S., Suzuki, K., Kamada, Y., Kihara, A., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001) *Mol. Biol. Cell*, **12**, 3690–3702.
- 7) Hamasaki, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2003) *Cell Struct. Funct.*, **28**, 49–54.
- 8) Suzuki, K. & Ohsumi, Y. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 2156–2161.
- 9) Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2007) *Genes Cells*, **12**, 209–218.
- 10) Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (1998) *Nature*, **395**, 395–398.
- 11) Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000) *Nature*, **408**, 488–492.
- 12) Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000) *J. Cell Biol.*, **151**, 263–276.
- 13) Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000) *EMBO J.*, **19**, 5720–5728.
- 14) Ichimura, Y., Imamura, Y., Emoto, K., Umeda, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 40584–40592.
- 15) Chernomordik, L.V. & Kozlov, M.M. (2005) *Cell*, **123**, 375–382.

中戸川 仁

(自然科学研究機構 基礎生物学研究所
分子細胞生物学研究部門)

科学技術振興事業団 さきがけ「代謝と機能制御」領域

Mechanisms of membrane biogenesis in autophagy
Hitoshi Nakatogawa (Division of Molecular Cell Biology,
National Institute for Basic Biology, 38 Nishigonaka Myo-
daijicho, Okazaki, Aichi 444-8585, Japan)

ヒストンシャペロン CIA によるヌクレオソームの構造変換とヌクレオソームの半保存的複製モデル

1. はじめに

ヌクレオソームとは、約 200 塩基対の DNA とヒストンタンパク質からなる複合体で、真核生物の DNA の基本構造である。ヌクレオソームの中心部 (nucleosome core particle) は 4 種類のヒストン H2A, H2B, H3, H4 が 2 分子ずつ集まってできるヒストン八量体に 146 塩基対の DNA が約 1.7 回巻き付いた構造をとっており、これが約 50 塩基対のリンカー DNA を介して繰り返りつながっている。ヌクレオソームが密に凝集して転写がほとんど不活性化された状態、ヌクレオソームの凝集が緩み DNA が露出しやすくなって転写が活性化された状態は、それぞれ顕微鏡観察によって見出されたヘテロクロマチン、ユークロマチンにほぼ対応している。DNA がヒストンに巻き付いたままだと、その領域の DNA を介した転写、DNA 複製、DNA 修復などの核内反応は阻害される。これらの反応を進行させるには、ヌクレオソームを破壊し、DNA を露出させる機構が必須である。したがって、真核生物には、ヌクレオソーム構造の形成と破壊を調節することで核内反応を制御する仕組みがあると考えられる。

ヌクレオソームの構造変換は、ATP 依存的クロマチンリモデリング複合体やヒストンシャペロンなどの作用によって引き起こされる。ATP 依存的クロマチンリモデリング複合体は、ATPase サブユニット、ヒストン認識サブユニットなどを含む複合体で、SWI/SNF, ISWI, RSC, CHD, SWR と呼ばれる様々な複合体が知られている。これらの複合体には、ATP 依存的にヒストンと DNA との相互作用を変化させ、ヌクレオソームから DNA を部分的に引きはがして核内因子の結合 DNA 領域を露出させる働きや、ヌクレオソーム間の間隔を変化させる働きがある。一方ヒストンシャペロンは ATP 非依存的にヌクレオソームの形成および破壊を促進する因子群である。この中にはヒストンの保管や輸送に関わるものも知られている。これまでに約 10 種類に及ぶヒストンシャペロンが同定されており、ヌクレオプラスミン, NAP1, FACT はヒストン H2A-H2B 複合体に、ヌクレオフォスミン, TAF-I, CAF-1, HIRA, CIA, FKBP, N1/N2 はヒストン H3-H4 複合体に

優先的に結合することが知られている。

ヌクレオソーム構造変換因子の研究は広く行われてきたが、ATP 依存的クロマチンリモデリング複合体やヒストンシャペロンのヒストンとの複合体の立体構造が未決定だったため、ヌクレオソーム構造変換反応の仕組みは不明であった。ようやく最近になって、ヒストンシャペロン CIA とヒストン H3-H4 の複合体の結晶構造が決定され^{1,2)}、ヌクレオソーム構造変換機構の議論が可能になった。本稿では CIA とヒストンの相互作用様式を基に、CIA によるヌクレオソーム構造変換機構を概説する。

2. CIA の単離とヒストンシャペロン活性の発見

CIA は、酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって転写基本因子 TFIID の最大サブユニット CCG1 (cell cycle gene 1) のプロモドメイン領域に対する相互作用因子 CCG1-interacting factor A として単離した、全長 204 アミノ酸残基のヒト由来の因子である^{3,4)}。CIA がヌクレオソーム形成促進能を持つヒストンシャペロンであり、ヒストン H3-H4 複合体と優先的に結合すること、ヒストン H3 の C 末端領域に結合することなどが明らかにされた³⁾。ヒト CIA は、Sternglanz らが遺伝学的な手法で抗サイレンシング機能を持つ因子 anti-silencing function 1 として同定した出芽酵母 ASF1⁵⁾ のホモログである⁴⁾。また、同時期に Kadonaga らが生化学的な手法で単離したヒストンシャペロン CAF-1 の活性促進因子 RCAF は、ショウジョウバエ CIA とヒストン H3, H4 の複合体であった⁶⁾。CIA は他のヒストンシャペロンに比べ、生物種を超えてアミノ酸配列が圧倒的に高く保存されている。

生化学的解析から、CIA は、転写の基本装置として働く TFIID^{3,4)}、DNA 合成反応非依存的に働くヒストンシャペロン HIRA⁷⁾、DNA 合成反応依存的に働くヒストンシャペロン CAF-1⁸⁾、DNA 複製の基本装置として働く RFC⁹⁾ などと相互作用することが明らかになっている。遺伝学的解析結果と総合して考えると、CIA は、プロモーター¹⁰⁾、ORF 内部¹¹⁾、テロメア領域^{5,7)}、修復された DNA^{5,6,12)}、複製フォーク^{5,6,8)} などに存在するヌクレオソームを (再) 形成^{3,4,6-12)} および破壊^{10,11)} するのではないかと考えられる。これらの研究から、CIA はヌクレオソーム構造変換反応において基盤的な役割を果たす普遍的な因子であると考えられ、CIA の構造、特にヒストン H3-H4 との相互作用様式の解明が、ヌクレオソーム構造変換機構解明に向けた急務であった。

CIA 単独の立体構造は、酵母 CIA の結晶構造解析^{7,13)} およびヒト CIA¹⁴⁾ の NMR 解析から明らかになった。CIA が

NF- κ B や p53 などの DNA 結合因子と類似したイムノグロブリンフォールドを持つことは驚きであった¹³⁾。一方、CIA 単独の構造だけではヒストン H3-H4 との相互作用様式は判らず、ヒストン H3-H4 と CIA の複合体の構造を決定する研究競争が日米欧で繰り広げられることになった。

3. CIA-ヒストン H3-H4 複合体の結晶構造解析および CIA によるヒストン (H3-H4)₂ 四量体分割の発見

このような状況下で我々のグループと Tyler らのグループは CIA-ヒストン H3-H4 複合体の結晶構造解析にそれぞれ成功し、CIA がヒストン H3-H4 二量体と共に三量体を形成することを示した^{1,2)} (図 1a-d)。CIA-ヒストン H3-H4 複合体中で観察される相互作用部位に点変異を与えると、転写、複製、修復いずれの反応においても影響があることから^{1,2)}、今回明らかになった相互作用部位は生体中で機能的に重要であると考えられる。これらの結果は、決定された CIA とヒストン H3-H4 二量体の複合体構造がヌクレオソーム構造の破壊および (再) 形成反応に共通する中間体構造であることを示唆している。

その上我々のグループは、CIA にヒストン (H3-H4)₂ 四量体を二つの二量体に分割して CIA-ヒストン H3-H4 の三量体を形成させる生化学的活性があることを発見した²⁾ (図 1e)。この発見が両グループの研究成果の決定的な違いであるとともに、生物学的に極めて重要な知見となった。ヌクレオソームに取り込まれる前のヒストン H3-H4 の状態が二量体であることは最近になって示されたものの¹⁵⁾、一度形成されたヒストン (H3-H4)₂ 四量体は安定であるといった考えは、ヌクレオソーム構造の発見以降 30 年にわたり信じ込まれてきた。したがって我々のグループの発見は、クロマチン研究の前提とされてきたこの定説を覆すことになった。このような根幹的な研究成果を日本から生み出したことは、望外の喜びである。

4. CIA によるヌクレオソーム形成および破壊に関する分子機構モデルの提案

CIA の結合によるヒストン (H3-H4)₂ 四量体の分割メカニズムは、今回の結晶構造とヌクレオソーム中のヒストン (H3-H4)₂ 四量体の構造の比較から説明可能であった (図 2a, b)。ヌクレオソーム中でヒストン (H3-H4)₂ 四量体の形成に必須なヒストン H3 のヘリックス $\alpha 2$ と $\alpha 3$ の領域は (図 2a)、CIA-ヒストン H3-H4 複合体中では CIA との相互作用に使われている (図 2b)。したがって、CIA が H3-H4 二量体と競合した結果ヒストン (H3-H4)₂ 四量体が分割

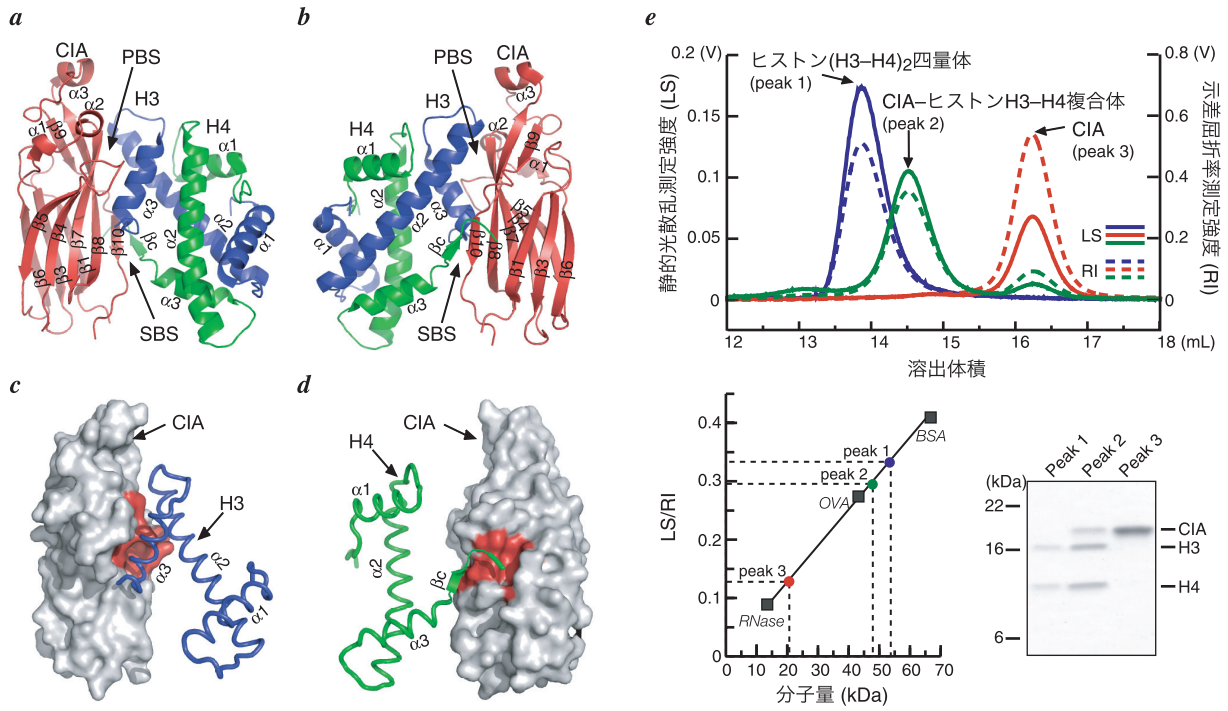


図1

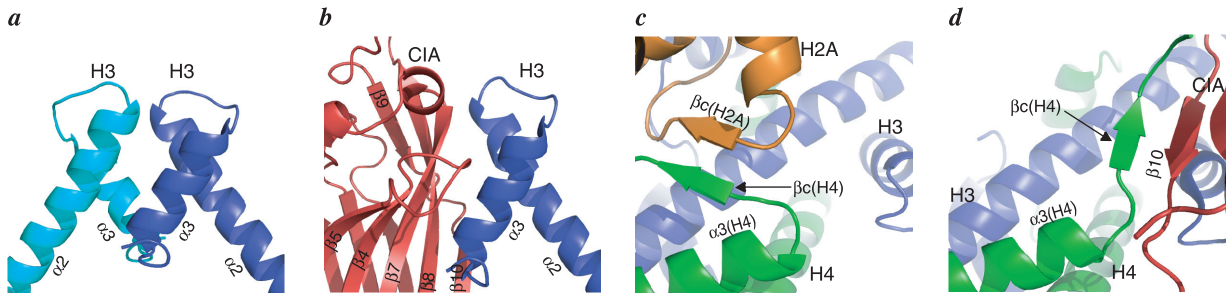


図2

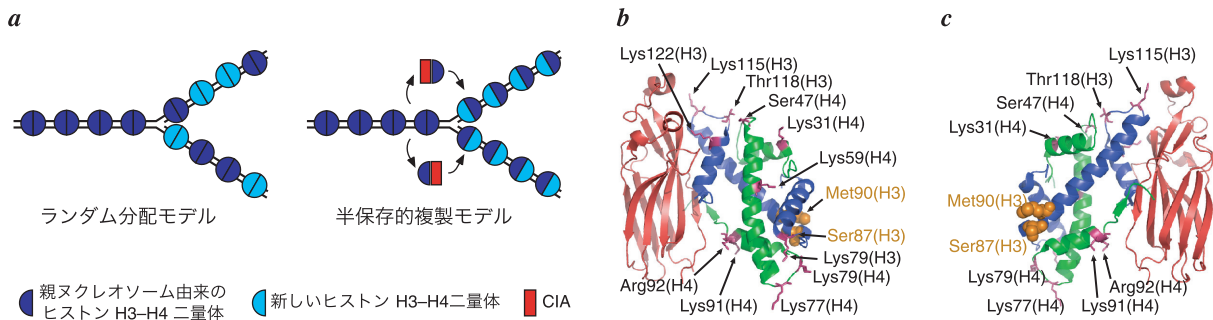


図3

図1 CIAはヒストン(H3-H4)₂四量体を分割してCIA-ヒストン H3-H4 三量体を形成する

a および *b*, CIA-ヒストン H3-H4 複合体のリボンモデル. CIAはヒストン H3, H4 と, それぞれ primary binding site (PBS) と secondary binding site (SBS) の2箇所の領域で相互作用している. *b* は *a* を 180° 回転させたモデル. *c* および *d*, CIA の分子表面モデルとヒストンのリボンモデル. *c* では PBS を, *d* では SBS を赤で表示してある. *c*, *d* はそれぞれ *a*, *b* とほぼ同じ向きから見た構造. *e*, ゲル透過カラム, 静的光散乱測定器, 示差屈折率計を組み合わせた分子量分析. 実線で示した静的光散乱の測定強度 (LS) と破線で示した示差屈折率の測定強度 (RI) の比 (LS/RI) から試料の分子量を見積もることができる. ヒストン(H3-H4)₂ 四量体 (青, peak 1) と CIA の単量体 (赤, peak 3) を混合するとヒストン(H3-H4)₂ 四量体は分割され, CIA-ヒストン H3-H4 三量体 (緑, peak 2) が生成する.

図2 CIA-ヒストン H3-H4 複合体とヌクレオソームの構造比較

a, ヌクレオソーム中の二つのヒストン H3 同士の相互作用部位. *b*, CIA-ヒストン H3-H4 複合体中の CIA とヒストン H3 の相互作用部位 (PBS). *c*, ヌクレオソーム中のヒストン H2A とヒストン H4 の相互作用部位. *d*, CIA-ヒストン H3-H4 複合体中の CIA とヒストン H4 の相互作用部位 (SBS).

図3 ヌクレオソームの複製様式

a, (左)ヌクレオソームのランダムな複製モデル. 親ヌクレオソーム由来のヒストン(H3-H4)₂ 四量体を取り込まれた娘ヌクレオソーム同士の隙間には, 新しいヒストン H3-H4 二量体同士が四量体となって DNA 上に取り込まれ娘ヌクレオソームが形成される. (右)ヌクレオソームの半保存的複製モデル. 親ヌクレオソームのヒストン(H3-H4)₂ 四量体が分割され二つの CIA-ヒストン H3-H4 三量体になる. この中間状態を介して親ヌクレオソーム由来の二つの H3-H4 二量体は新しいヒストン H3-H4 二量体とそれぞれ対になって二つのヒストン(H3-H4)₂ 四量体を形成し, 2本の娘 DNA 鎖上に分配される. ヌクレオソームに2分子ずつ含まれるヒストン H2A, H2B は, 二つの H2A-H2B 二量体に分割できるため, ヌクレオソーム全体を半保存的に複製することが可能である. *b* および *c*, 化学修飾を受けるヒストン H3, H4 のアミノ酸残基およびヒストン H3 とそのヒストン H3.3 バリエーションの間で保存されていないアミノ酸残基を, それぞれ桃色と橙色のスティックモデルで表示. これらの残基は CIA-ヒストン H3-H4 複合体の分子表面に露出しているため, CIA によるヒストン(H3-H4)₂ 四量体の分割はヒストンの化学修飾やヒストン H3 と H3.3 の間のアミノ酸残基の違いに影響を受けないと考えられる. *b*, *c* はそれぞれ図1の *a*, *b* に対応する.

されたと考えられた.

一方, CIA とヒストン H4 の相互作用も, ヒストン (H3-H4)₂ 四量体の分割に関与しているのではと我々は考えた. ヒストン H4 の C 末端領域のストランド β_c (β_c(H4)) はヌクレオソーム中ではヒストン H2A の C 末端側の β ストランドと平行 β シートを形成している (図 2*c*). しかし, CIA-ヒストン H3-H4 複合体中ではストランド β_c(H4) は CIA のストランド β₁₀ と逆平行 β シートを形成していた (図 2*d*). ヌクレオソームに含まれるヒストン八量体は中心部のヒストン(H3-H4)₂ 四量体を挟み込むように二つのヒストン H2A-H2B 二量体が会合して形成されているため, ヌクレオソームが破壊される時, 最初に二つのヒストン H2A-H2B 二量体が, FACT などの因子の作用によってヒストン(H3-H4)₂ 四量体から解離するのではと考えられる. その結果ストランド β_c(H4) が露出するため, そこに CIA が相互作用するのではと考えた. この相互作用を足がかりに, ヒストン H3-H4 二量体上で CIA ともう一つのヒストン H3-H4 二量体が競合することでヒストン(H3-H4)₂ 四量体を分割し, ヌクレオソームの破壊が完了すると予想される. この仕組みは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」を連想させたため, この CIA の作用機構モデルを「Yawara split」モデルと名付けた²⁾.

5. ヌクレオソームの半保存的複製モデルの提案

ヌクレオソーム中のヒストンの化学修飾パターンは細胞の状態を反映しており, クロマチン上で時間的・空間的パターンを形成し, 遺伝子制御パターンに影響する. 従って細胞が増殖する際に親細胞と同じ遺伝子制御パターンを持つ娘細胞を作るには, クロマチン上のヒストンの化学修飾パターンが細胞の世代を超えて伝えられる必要があると考えられている. では, どのような仕組みがあれば親細胞と同じヒストンの化学修飾パターンを持つ娘細胞を二つ作れるのだろうか. ここで問題となるのは, 親 DNA 鎖上のヌクレオソーム (親ヌクレオソーム) に含まれるヒストンを 2本の娘 DNA 鎖上に形成されるヌクレオソーム (娘ヌクレオソーム) へと分配する仕組みである. これまでは, 一度形成されたヒストン(H3-H4)₂ 四量体は安定だと考えられていたため, 親ヌクレオソーム由来のヒストン(H3-H4)₂ 四量体は 2本の娘 DNA 鎖上のどちらかヘランダムに分配されるという考え方が主流であった (図 3*a* 左). しかし, 親細胞のヒストンの化学修飾パターンをもれなく娘細胞に伝えるのであれば, このモデルでは情報が娘細胞に正確に伝わりにくく不都合である. 一方, ヒストン(H3-H4)₂ 四量体が CIA によって分割されるという今回の発見からは, 娘ヌクレオソームへのヒストン(H3-H4)₂ 四量体の分配をうまく説明する別のモデルを導くことが可能である²⁾. そ

れは、親ヌクレオソーム由来のヒストン(H3-H4)₂四量体を二つに分割し、新しいH3-H4二量体とともにそれぞれ四量体を形成させ、2本の娘DNA鎖上へ均等に分配するというモデルである(図3a右)。しかも今回の結晶構造からCIAによるヒストン(H3-H4)₂四量体の分割がヒストンの化学修飾状態に影響を受けにくいことが示唆されるため(図3b, c), どのような化学修飾パターンを持つヒストン(H3-H4)₂四量体でも二つに分割して2本の娘DNA鎖上に分配できると考えられる。DNA複製の際にヌクレオソームも半保存的に複製されれば、ヒストンの化学修飾パターンを正確に伝えながら娘細胞を作ることが可能である。このモデルはヌクレオソームの発見後すぐに考えられたもので、DNAの半保存的複製にならってヌクレオソームの半保存的複製モデルと呼ばれる。しかし、ヒストン(H3-H4)₂四量体が分割される結果が得られていなかったため、このモデルは長らく無視されてきた。CIAによってヒストン(H3-H4)₂四量体が分割されるという発見は²⁾、ヌクレオソームの半保存的複製モデルが成立可能であることを示した初めての直接的な実験証拠である。

6. 今後の展開

CIA-ヒストンH3-H4複合体の結晶構造から、ヌクレオソーム構造変換の分子機構を説明できるようになった。しかし、CIAはヒストンH3-H4二量体と安定な複合体を形成するため、この複合体からCIAを解離させてヒストン(H3-H4)₂四量体を形成させるにあたっては、予想の域を出ないものの、DNAや他の因子の働きが必要だと考えられる。ヌクレオソーム構造変換の分子機構の全容を明らかにするためには、ヒストンと他のヒストンシャペロンとの相互作用様式、そして他のクロマチン関連因子との更なる高次複合体構造も明らかにすることが必要であろう。

CIAによってヒストン(H3-H4)₂四量体が分割されるという発見から、ヒストン化学修飾パターンを正確に伝えることのできるヌクレオソームの半保存的複製モデルが導かれた。一方、娘細胞に伝えるヒストンの化学修飾パターンに偏りを生じさせる仕組みも、細胞が分化する際には必要だと考えられる。特定の領域でのヌクレオソームの複製においてCIAの活性が抑制されるのであれば、そのような仕組みが可能であることも指摘しておく。

1) English, C.M., Adkins, M.W., Carson, J.J., Churchill, M.E., & Tyler, J.K. (2006) *Cell*, 127, 495-508.

- 2) Natsume, R., Eitoku, M., Akai, Y., Sano, N., Horikoshi, M., & Senda, T. (2007) *Nature*, 446, 338-341.
- 3) Munakata, T., Adachi, N., Yokoyama, N., Kuzuhara, T., & Horikoshi, M. (2000) *Genes Cells*, 5, 221-233.
- 4) Chimura, T., Kuzuhara, T., & Horikoshi, M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 9334-9339.
- 5) Le, S., Davis, C., Konopka, J.B., & Sternglanz, R. (1997) *Yeast*, 13, 1029-1042.
- 6) Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., & Kadonaga, J.T. (1999) *Nature*, 402, 555-560.
- 7) Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Lam, W.M., Skordalakes, E., Zhang, R., Franco, A.A., Brill, S.J., Adams, P.D., Berger, J.M., & Kaufman, P.D. (2003) *Curr. Biol.*, 13, 2148-2158.
- 8) Tyler, J.K., Collins, K.A., Prasad-Sinha, J., Amiot, E., Bulger, M., Harte, P.J., Kobayashi, R., & Kadonaga, J.T. (2001) *Mol. Cell Biol.*, 21, 6574-6584.
- 9) Franco, A.A., Lam, W.M., Burgers, P.M., & Kaufman, P.D. (2005) *Genes Dev.*, 19, 1365-1375.
- 10) Adkins, M.W., Howar, S.R., & Tyler, J.K. (2004) *Mol. Cell*, 14, 657-666.
- 11) Schwabish, M.A. & Struhl, K. (2006) *Mol. Cell*, 22, 415-422.
- 12) Mello, J.A., Silljé, H.H., Roche, D.M., Kirschner, D.B., Nigg, E.A., & Almouzni, G. (2002) *EMBO Rep.*, 3, 329-334.
- 13) Padmanabhan, B., Kataoka, K., Umehara, T., Adachi, N., Yokoyama, S., & Horikoshi, M. (2005) *J. Biochem. (Tokyo)*, 138, 821-829.
- 14) Mousson, F., Lautrette, A., Thuret, J.Y., Agez, M., Courbeyrette, R., Amigues, B., Becker, E., Neumann, J.M., Guerois, R., Mann, C., & Ochsenbein, F. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 5975-5980.
- 15) Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., & Nakatani, Y. (2004) *Cell*, 116, 51-61.

夏目 亮¹, 栄徳 勝光², 堀越 正美², 千田 俊哉³

(¹社)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,

² 東京大学・分子細胞生物学研究所,

³(独)産業技術総合研究所・生物情報解析研究センター)

Mechanism of nucleosome assembly/disassembly mediated by histone chaperone CIA; Implications for nucleosome semi-conservative replication

Ryo Natsume¹, Masamitsu Eitoku², Masami Horikoshi² and Toshiya Senda³ (¹Japan Biological Information Research Center (JBIRC), Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), AIST Bio-IT Research Building, 2-42 Aomi, Koto-Ku, Tokyo 135-0064, Japan, ²Institute of Molecular and Cellular Biosciences (IMCB), The University of Tokyo, ³Biological Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), AIST Bio-IT Research Building, 2-42 Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-0064, Japan)