

ヒストンシャペロン yNap1 が核外輸送される機構への計算科学的アプローチ

芦田 星 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 原田 隆平 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

Nucleosome Assembly Protein 1 (Nap1) はヒストンサブユニットとの相互作用を介し、ヌクレオソーム構築・分解に関する真核生物で保存されたタンパク質の一つである。Nap1 は安定した二量体として存在し、核-細胞質間を行き来する。タンパク質が核内から細胞質へ搬出される際、エクスポーチンが Nuclear Export Sequence (NES) を認識・結合することで、核膜孔を介した核外搬出が進行する。Nap1 にも NES が存在し、核外搬出に必要であることが報告されている¹。しかし、出芽酵母の Nap1 (yNap1) の結晶構造を見ると、二量体間で NES を覆う Accessory Domain (AD) が存在しており、NES に対するアクセスが困難と予想される。AD やその周辺にはリン酸化可能なセリンが存在するが、リン酸化が立体構造に及ぼす影響は不明である。

タンパク質の主要な翻訳後修飾であるリン酸化は、多くの先行研究により調べられている。近年では、網羅的探索により数多くのリン酸化部位が特定されている。しかし、生体内のリン酸化による影響を実験的に評価するには、アミノ酸置換によりリン酸化状態・非リン酸化状態を模倣すること以外に方法がなく、影響を評価することが難しい。本研究では、計算科学的なアプローチとして分子動力学シミュレーション (MD) を実行し、リン酸化の影響を調べた。具体的には、非リン酸化型・リン酸化型の yNap1 構造をモデリングして MD を実行し、リン酸化による構造やダイナミクスの違いを解析した。ここで、リン酸化した部位は yNap1 の 140、159、177 番目のセリン (Ser 140、159、177) であり、AD の周辺に位置している。

【計算方法】

MD は原子を質点として扱い、計算機でニュートンの運動方程式を解くことでタンパク質構造の時間発展を追跡する計算手法である。MD の初期構造として、Protein Data Bank (PDB) に登録されている結晶構造 (PDB id: 2Z2R) を用いた。結晶構造の欠損部位は、タンパク質構造モデリングサーバである Phyre2 により補完し、末端部位は計算から除外した。リン酸化は、可視化ソフト (PyMOL) を用いて導入した。非リン酸化・リン酸化 yNap1 をモデリングした後、300 K、1 atm の条件下で MD を 100 ns 実行した。統計性を保つため、それぞれの状態に関して初期速度を振り直し、独立に 5 本の MD を 100 ns 実行した。

【結果】

リン酸化が NES の溶媒露出面積 (SASA) に与える影響を調べた。100 ns × 5 の MD トラジェクトリをもとに yNap1 二量体内 NES の SASA の時系列変化を調べたところ、リン酸化により AD に覆われた NES が非リン酸化型と比較して溶媒に露出していることが分かった (図 1)。

【考察】

NES に対する AD の位置関係は、エクスポーチンによる認識を妨げている可能性がある (図 2)。先行研究では、本研究でリン酸化した Ser 159、177 を含むセリンのアラニンあるいはアス

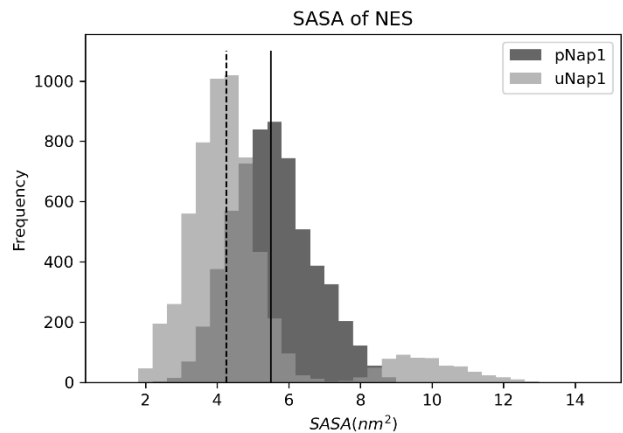


図 1 リン酸化型 (pNap1)、非リン酸化型 (uNap1) の NES (L88-L102) について計算した SASA. 実線と破線は pNap1 と uNap1 の中央値に対応

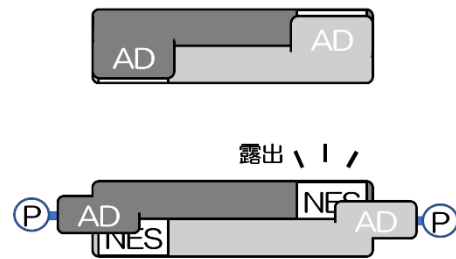


図 2 リン酸化による NES アクセス性向上のイメージ

パラギン酸への置換が行われ、どちらも S 期の伸長を示した²。この先行研究の結果は、リン酸化型と非リン酸化型の平衡、あるいは時空間的リン酸化制御が正常な細胞周期の進行に重要であることを示唆している。先行研究に基づき、リン酸化による NES のアクセス性に着目した。解析結果として、リン酸化型 yNap1 の NES における SASA の増加 (図 1) が確認され、リン酸化が NES のアクセス性を向上させていることが示唆された (図 2)。実際に生体内でどのような制御が行われているかは不明であるが、*in vitro* で Ser 159、177 をリン酸化する Casein Kinase 2² の細胞周期に応じた活性変化や、S 期における細胞質でのヒストンの合成、核内での DNA 複製後のヌクレオソーム構築といったイベントの時空間的特異性から、リン酸化による細胞周期依存的な制御が期待される。リン酸化がどのように SASA を増加させたかについては、現在解析中である。

【参考文献】

1. Miyaji-Yamaguchi, M. *et al.* Involvement of Nucleocytoplasmic Shuttling of Yeast Nap1 in Mitotic Progression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6672–6684 (2003).
2. Calvert, M. E. K. *et al.* Phosphorylation by Casein Kinase 2 Regulates Nap1 Localization and Function. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1313–1325 (2008).