

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of nuclear FK506-binding protein (FKBP)
(核に局在する FK506 結合蛋白質の解析
—単離からクロマチンへの作用の解析—)
氏名 葛原 隆

免疫抑制剤 FK506 に結合する蛋白質である FKBP (FK506-binding protein) は、原核細胞生物から真核細胞生物まで殆どの生物種に存在しており、生体内の機能分子である蛋白質の主鎖の向きを大きく変換することのできる酵素活性 (peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase) 活性) を有している。また FKBP はファミリーを形成し、それぞれが核・細胞質・小胞体など細胞内の多様な場所に局在していることから、多様な蛋白質の構造変換に関与していると考えられる。

一方、染色体から遺伝情報がどのように読みとれるのかを解明することは、生体反応の基本的課題である。染色体 DNA は、ヒストンなどの蛋白質と共にクロマチン構造を形成することによって、DNA の情報が必要でない時に読まれるのを抑制しており、染色体 DNA の情報が発現するには、クロマチン構造を変換する必要がある。

FKBP が蛋白質の構造を大きく変換できる活性を有していることに着目し、核型 FKBP を新規に単離し、クロマチン構造変換に作用しているかを検証した。本研究は、核型の PPIase が蛋白質構造変換活性のみならずクロマチン構造変換活性を有するということを初めて示したものであり、高次クロマチン構造変換機構に新局面を切り開くものである。

I. 核型 FKBP の単離と「構造と局在性のルール」

転写基本因子 TFIID の相互作用因子としてヒト FKBP を単離し、さらに遺伝学的・生化学的な解析が可能である酵母の新規核型 FKBP も単離した。その過程で、多様な FKBP ファミリーの一次構造・三次構造と細胞内局在性の間に規則性があることを見出した。

1. PPIase ドメインと局在性

FKBP ファミリーは細胞内の多様な場所に存在することから、多様な場所で多様な基質を認識すると考えられる。そこで、これら FKBP ファミリーが持つ PPIase ドメインの系統樹を作成し分類したところ、細胞内局在による分類と一致することを見出した。さらに、それぞれのグループに特異的なアミノ酸が存在することを見出した。グループ特異的なアミノ酸は一次構造上分散していたが、それらを立体構造上にマップすると、まとまって存在していることが判明した。新規に単離した FKBP が核局在性を示すことがこのルールから予想されたので、蛍光抗体法により検討したところ、実際に核に局在していることが判明し、予測が実証された。

2. PPIase ドメイン以外のドメインと局在性

次に PPIase ドメイン以外のドメイン領域に注目したところ、PPIase ドメインで分類したグループに対応して、付加的なドメインの構造的特徴が分類されることがわかった。核局在型は N 末領域に長いドメインを有する。その領域には、進化的高保存ドメイン、高酸性ドメイン、高塩基性ドメインなどが見出された。高保存ドメインには対応した特定の相互作用因子の存在が考えられる。高酸性および高塩基性ドメインのそれぞれの相互作用相手として、塩基性物質であるヒストンや酸性物質である DNA などが考えられ、核型 FKBP は DNA やヒストンからなるヌクレオソームに相互作用して働くのではないかと考えた。

II. 核型 FKBP はヒストンシャペロン活性を有する

1. ヒストン依存スーパーコイル活性

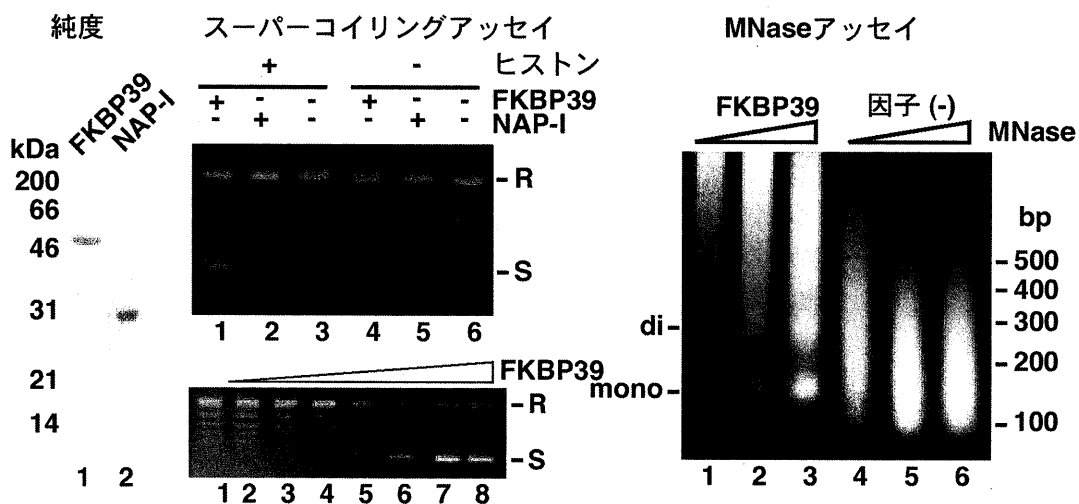
前述の理由から、核型 FKBP のヒストンと DNA への相互作用を想定し、ヒストンと DNA から形成されるヌクレオソーム構造の形成活性に核型 FKBP は関与するのではないかと考え、ヒ

ストン依存スーパーコイリング活性を検討したところ、ヒストン依存に活性が見出された。この活性は核型 FKBP とヒストンが 1:1 の分子濃度で飽和する反応性を示したことから、ヒストンとの相互作用活性を中心とした化学当量論的な反応に由来すると考えられた。

2. ヌクレオソームアレイ活性(MNase アッセイ)

核型 FKBP によってヌクレオソームアレイが形成されるか否かを、MNase によるリンカーDNA 切断を通してヒストン・DNA 相互作用部位の DNA の長さを測ることにより検討した。その結果、1 個もしくは 2 個のヌクレオソーム様構造に対応する DNA が観察された。1,2 両活性により、核型 FKBP がヒストンシャペロン活性を有すると結論づけた。

FKBPのヌクレオソームアセンブリ活性



3. 新しいタイプのヒストンシャペロン活性

従来のヒストンシャペロンが主に酸性蛋白質であるのとは異なり、核型 FKBP は高塩基性領域と酵素領域を有することから、ヒストンシャペロン活性としての作用機構も従来のヒストンシャペロンとは異なることが予想された。そこで反応素段階を検討したところ、NAP1 を代表とする従来のヒストンシャペロンとは異なり、ヒストンとの前処理を必要としなかった。このことは、従来とは性質の異なる新しいタイプのヒストンシャペロンであることを示している。

4. ヒストンシャペロンドメインと PPIase ドメインの独立性

核型 FKBP のヒストンシャペロン活性がどのドメインにより担われているかを①核型特異的活性、②PPIase 活性阻害、③欠失変異体を用いて検定した。

①FKBP のヒストンシャペロン活性が核型特異的かどうかを検討した。細胞質型 FKBP と核型 FKBP を用いて、ヒストンシャペロン活性を検討したところ、細胞質型 FKBP にはヒストンシャペロン活性はなく、核型特異的に活性のあることがわかった。

②次に PPIase 活性がヒストンシャペロン活性に必要なかどうかを検討した。PPIase 活性の阻害剤である FK506 を用いて、ヒストンシャペロン活性が阻害されるかどうかを検討したところ、FK506 はヒストンシャペロン活性を阻害しないことが判明した。したがって、PPIase 活性はヒストンシャペロン活性に効果を及ぼさないと考えられる。

③上記 2 種類の実験から、N 末側領域の非 PPIase ドメインのみでヒストンシャペロン活性を発揮することが予想された。そこで核型 FKBP の欠失変異体を作成し、N 末側領域だけでヒストンシャペロン活性を示すかどうかを検討したところ、核型特異的な N 末側領域がヒストンシャペロン活性には必要十分であることが判明した。以上 3 種類の実験から、核型 FKBP はヒストンシャペロンドメインと PPIase ドメインの 2 つの独立したドメインからなる蛋白質であるこ

とがわかった。

III. 核型 FKBP の rDNA サイレncing 反応への関与

1. 核型 FKBP と rDNA サイレncing 反応

生体内での核型 FKBP のクロマチン関連反応における役割を検討した。まず、核型 FKBP の細胞内局在性を再検討したところ核小体に濃縮されていることがわかった。さらにクロマチン IP 法により、核型 FKBP は rDNA 領域に局在していることが見出された。出芽酵母細胞においては、rDNA 領域においては、ヘテロクロマチン様の構造体が形成され、遺伝子発現がサイレncing を受けていることがわかっている。これらの知見とヒストンシャペロンといった生化学的活性の知見から、核型 FKBP は rDNA サイレncing 反応に関与するのではないかと考えた。そこで、核型 FKBP の欠失変異体からなる酵母細胞株を作成し、rDNA サイレncing 反応活性を検討したところ、核型 FKBP の欠失により rDNA サイレncing 反応活性が解除されることがわかった。この結果は、核型 FKBP が rDNA サイレncing 反応に関与していることを意味している。

2. ヒストンシャペロンドメインと rDNA サイレncing 反応

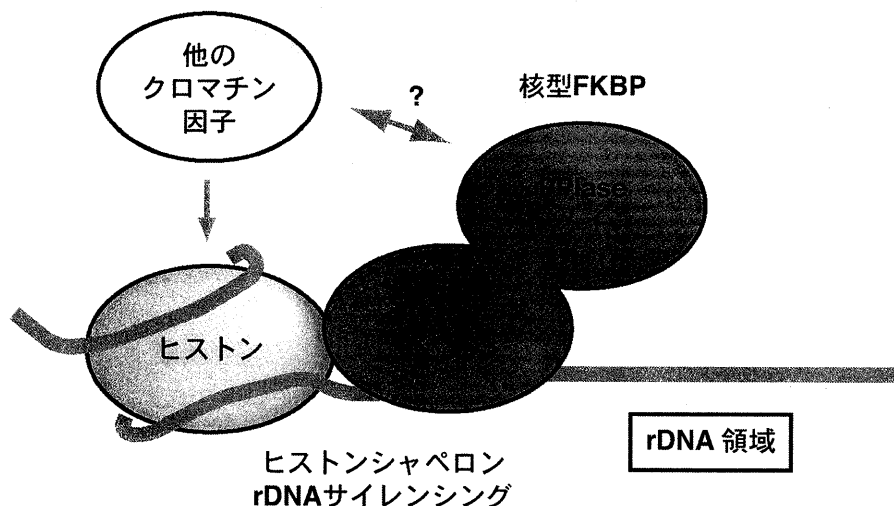
次に核型 FKBP のどの領域が rDNA サイレncing 反応に関与するかを解析した。核型 FKBP の欠失変異体酵母細胞において、全長あるいはヒストンシャペロンドメインの発現により、rDNA サイレncing 反応活性は回復を示したものの、PPIase ドメインでは活性の回復は見られなかった。したがって rDNA サイレncing 反応にはヒストンシャペロンドメインだけで十分であることが判明した。このことは、核型 FKBP がヒストンシャペロン活性を通して rDNA サイレncing 反応に関わっていることを示唆している。

3. PPIase ドメインによる rDNA サイレncing 反応制御

核型 FKBP の PPIase ドメインは rDNA サイレncing 反応に必須ではないと判明したが、PPIase 活性は rDNA サイレncing 反応にどのように関わっているのか？ PPIase 活性中心部位に PPIase 活性の低下する点変異を導入して、PPIase 活性の rDNA サイレncing 反応への役割を検討したところ、PPIase 活性の低下する点変異により、rDNA サイレncing 反応活性が増強されることが判明した。この知見から、PPIase 活性は rDNA サイレncing 反応に必須ではないものの、その制御には働いていると予想できる。次に、核型 FKBP の点変異体がヒストンシャペロン活性の制御に関わるか否かを検討したところ、この点変異はヒストンシャペロン活性には大きく影響を与えないことが判明した。したがって PPIase 活性はヒストンシャペロン活性に効果をも

たらすものではなく、他のタイプのクロマチン関連因子などとの相互作用を通して rDNA サイレncing 反応の制御に関与することが考えられた。

核型FKBPはヒストンシャペロン活性を有し、サイレncingに必要である



IV. 今後、解析すべき課題

1. 核型 FKBP の DNA 構造変換に対する作用

従来のヒストンシャペロンは、前処理としてヒストンと結合させておくことによりヒストンシャペロン活性を発揮する。一方、核型 FKBP のヒストンシャペロン活性を生み出すには、ヒストンとの前処理を必要としなかったため、核型 FKBP にはヒストン以外の標的があるのではないかと考えた。ヌクレオソームがヒストンと DNA により構成されていることから、核型 FKBP が DNA に対して作用すると考え、検討したところ、それに即した結果が得られている。今後核型 FKBP の DNA への作用活性機構を解析していく予定である。

2. PPIase ドメインの意義

核型 FKBP の PPIase ドメインに点変異を導入し、その反応活性を解析したところ、変異核型 FKBP は rDNA サイレンシング反応活性を増強するものの、ヒストンシャペロン活性には効果を持たなかった。この結果から、PPIase ドメインが rDNA サイレンシングに関与する蛋白質を標的として働いていることが考えられる。PPIase は、クロマチン構造変換因子と遺伝学的相互作用のあることが知られていることから、PPIase ドメインのクロマチン構造変換因子に対する制御活性によりサイレンシング反応の制御を行っていることも考えられる。

FKBP と転写基本因子との相互作用を見出しており、転写基本因子 TFIID が転写活性化時に構造変換する可能性が既に示されていることから、PPIase を介した転写基本因子群の構造変換は転写活性化機構の新しい局面を切り拓くのに寄与するかもしれない。また、転写調節因子の中には、高プロリン領域を転写活性化ドメインとして有するものが知られており、この高プロリン領域の構造変換を介して転写制御を行う可能性がある。

PPIase ドメインとヒストンシャペロンドメイン双方とも構造変換活性を有することを考え合わせると、両ドメインを通して核型 FKBP は効率よくクロマチン機能変換を行っていることが示唆される。

3. rDNA サイレンシング反応での役割 (老化への関与の可能性)

rDNA サイレンシングには、ヒストン脱アセチル化酵素などのクロマチン因子の関与することが知られていることから、核型 FKBP とそれらの因子群との協調的または阻害的な作用を遺伝学的・生化学的に解析する。

さらに、rDNA サイレンシング反応は細胞老化と密接に関係のあることが知られていることから、核型 FKBP の働きは細胞老化に関与する可能性がある。細胞老化と関連することが既に知られているヘテロクロマチン因子との機能的相互作用を検討し、老化関連因子間の相互作用

ネットワークを検討していく。また、細胞老化に伴って rDNA が円形 DNA として染色体外に放出されることが知られており、これが核型 FKBP の DNA への作用活性と関連しているのかを検討する。

