

審査の結果の要旨

氏名 葛原 隆

FK506は、臓器移植やアトピーなどの病気の治療に用いられる免疫抑制剤である。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、「生命の設計図」である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。

本論文では、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、クロマチン構造変換にも作用しているのではないかと考え、試験管内で検証しており、核型 FKBP 蛋白質の核型特異的ドメインがクロマチン構造変換活性の一つであるヒストンシャペロン活性を有し、しかも従来から知られるヒストンシャペロン因子とは作用機作が異なることを報告している。さらに、申請者は、核型 FKBP が生体内でリボソーム DNA 領域のクロマチンに結合し、この領域の遺伝子発現を抑制する活性 (サイレンシング活性) を有していることを発見した。また、ヒストンシャペロンドメインがこのサイレンシング活性に十分であった。これらの結果は、核型 FKBP がクロマチン構造の変換を通して、リボソーム DNA 領域のサイレンシング反応を制御していることを示しており、FKBP 分野、クロマチン分野では全く予期できなかった知見である。

第1章においては、核型 FKBP の単離と「構造と局在性のルール」について論じている。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ている。

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、予測を実証している。

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論じている。

第2章においては、「核型 FKBP のヒストンシャペロン活性」と、「核型 FKBP の rDNA サイレンシング反応への関与」を示している。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ル活性を検討したところ、ヒストン依存に活性が見出されている。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した。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ている。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。

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ている。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た。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を解明した。

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ンシング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。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。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、さらに 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を解明している。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と考えている。

この核型 FKBP が作用するリボソーム DNA 領域のクロマチン構造の変換制御と遺伝子の発現制御は細胞の老化に密接に関与することが明らかにされつつあることから、染色体 DNA の遺伝子発現制御という基本的な反応のメカニズム解明だけでなく、老化研究にも寄与できると考えられる。したがってこの核型 FKBP の研究により、これまで考えられてこなかった FKBP とクロマチン構造変換を介した遺伝子発現制御反応を結びつけることができ、FKBP が老化制御に対する新しい薬剤開発の標的になることも期待される。これらの成果は、遺伝子発現制御機構の要となるクロマチン構造変換制御機構に新たな機構を提唱するものである。さらに、クロマチン構造変換と PPIase の両分野を密接に繋げる結果を示し、クロマチン分野と蛋白質のフォールディング分野の発展にも大きく貢献すると考えられる。また、免疫抑制や老化などの医薬品化学にも貢献することが期待される。したがって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと判定した。