

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

西野 智則

真核生物では DNA のメチル化やヒストンの翻訳後修飾が選択的な遺伝子発現の制御において非常に重要な役割を担っている。ヒストンのアセチル化はアセチル化酵素と脱アセチル化酵素 (HDAC) によって制御されており、HDAC によるヒストンの脱アセチル化は遺伝子発現の抑制において必要な過程であると考えられている。しかし、選択的な遺伝子発現が行われる中で、HDAC による転写抑制がどのように調節されているかは不明な点が多い。本論文は (1) HDAC4 による転写抑制因子 Bach2 の核内フォーカス形成メカニズム、(2) HDAC4 の細胞内局在制御機構、(3) ヒストンアセチル化による遺伝子発現変化の継承機構についての解析を行い、選択的な遺伝子発現の制御における HDAC の機能について述べたものである。

(1) HDAC4 による転写抑制因子 Bach2 の核内フォーカス形成メカニズム

共同研究者である星野らによって、Bach2 は共役抑制因子である SMRT を介して HDAC4 と複合体を形成し、核内で斑点状の核内構造体 (Bach2 フォーカス) を形成することが示された。この Bach2 フォーカスは HDAC4 非存在下ではより小さく、HDAC4 によってフォーカス形成が促進されることが見いだされていた。そこで、HDAC4 が核内構造体の形成に関与している可能性を検討するために、Bach2 フォーカスの形成における HDAC4 の機能解析を行った。共発現による局在観察の結果、Bach2 フォーカスは SMRT 存在下でのみ形成され、HDAC4 によるフォーカス形成の促進も SMRT が必要であることが示された。その一方で、核外輸送タンパク質 CRM1 の阻害剤である leptomycin B (LMB) を SMRT 存在下で処理したときにもフォーカス形成の促進は観察されたことから、HDAC4 は Bach2 の核局在を促進していると考えられた。そこで、LMB を用いて Bach2 の核蓄積を HDAC4 の存在下と非存在下で比較したが、HDAC4 は Bach2 の核移行を促進しておらず、HDAC4 は Bach2 を核内にリテンションすることでフォーカス形成を促進していると推察された。

(2) HDAC4 の細胞内局在制御機構の解明

HDAC4 を含む class IIa HDAC はアミノ末端に核移行シグナル (NLS)、カルボキシ末端には核外輸送シグナル (NES) を持ち、核-細胞質間をシャトルしているが、主な細胞内局在は 14-3-3 の結合を伴った核外輸送の活性化によって制御されていると考えられてきた。しかし、共同研究者である宮崎らにより phorbol-12 myristate-13 acetate (PMA) が核外輸送を伴わず HDAC4 の細胞質局在を引き起こすことが見出され、HDAC4 の細胞内局在にはまだ解明されていない新しい制御機構が存在することが示された。まず、PKC との

発現実験により、PMA による novel protein kinase C (nPKC) の活性化が HDAC4 の細胞質局在を引き起こすことを示し、さらに LMB を用いた核移行速度の評価により、PMA 存在下では著しい核移行速度の低下が起こることを観察し PMA による HDAC4 の局在制御機構が核移行の阻害であることを証明した。また、その分子機構について解析を行った結果、PMA により 14-3-3 との結合が増加することを示し、さらに 14-3-3 結合部位の変異体を用いることで、14-3-3 の結合が HDAC4 の核移行を阻害することを明らかにした。PMA による核移行阻害は、HDAC4 と同じ class IIa HDAC に分類される HDAC5 と HDAC7 においても観察されたことから 14-3-3 による核移行阻害が class IIa HDAC 間で起こる共通の分子機構であることが示された。

### (3) ヒストンアセチル化による遺伝子発現変化の継承機構の解析

遺伝子発現の調節に関するクロマチンの修飾は DNA のメチル化とヒストンの翻訳後修飾に大別されるが、ともに正常な遺伝子発現パターンを次世代に伝えるために DNA 複製により新しく形成されたクロマチンに継承される必要がある。可逆的な HDAC 阻害剤である trichostatin A (TSA) は全ヒストンのアセチル化レベルを上昇させ、一部の遺伝子について転写の活性化を誘導するが、TSA を除去すると速やかにアセチル化レベルは減衰し、基底状態へと戻る。このことは TSA による全体的なアセチル化レベルが維持されないことを示すが、変化を受けた一部の遺伝子座においてアセチル化が維持され、遺伝子発現が「記憶」される可能性を検討するために DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。HeLa 細胞に対して 24 時間 TSA 処理を行った後、TSA を除いて培養を続け、48 時間後と 96 時間後における遺伝子の発現量を DNA マイクロアレイ結果、TSA によって発現誘導される p21 mRNA レベルが TSA 除去後も 48 時間後も維持されていることが分かった。そこで p21 の mRNA レベルをノーザンブロットングにより調べた結果、TSA 除去後 72~96 時間まで mRNA レベルの増加が観察された。しかし、クロマチン免疫沈降実験では TSA 処理によって亢進したヒストンのアセチル化が TSA 除去 48 時間後には維持されていないことが示された。これらの結果からヒトの「細胞記憶」ではアセチル化だけでは形成されず、DNA メチル化や他のヒストン修飾が重要であることが示唆された。

本研究は HDAC が関わる遺伝子発現の制御として転写抑制因子 Bach2 のフォーカス形成における HDAC4 の役割、class IIa HDAC の局在制御機構、そしてヒストンアセチル化修飾の「細胞記憶」についてそれぞれ解析を行い、近年盛んに研究が進められているエピジェネティクス領域に新しい概念を与える研究として意義がある。よって審査委員一同は、本論文が、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。