

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻
平成 17 年度博士課程 入学
氏 名 野口 道也
指導教員名 塩田 邦郎

論文題目 PAL31 の細胞核内機能に関する研究

【緒 言】

すべての生命体の膨大なゲノム情報は DNA に組み込まれており、真核生物においては、細胞核の中に存在するヒストンと呼ばれる塩基性タンパク質と結合して格納されている。ヒストンは八量体を構成し、ヌクレオソームという機能単位を形成する。さらに、H1 やいくつかのタンパク質と複合体をつくり、クロマチン構造を形成することにより、DNA を高度に折りたたみ、細胞核に収納される。ヒストンは種を超えて高度に保存されており、ほぼすべての真核生物において同様なヌクレオソーム構造を形成している。本研究では、当研究室において、単離・同定した細胞増殖関連因子である Proliferation related acidic leucine-rich protein with molecular weight of 31 kDa (PAL31) の細胞核内における機能を解析した。今までの研究では、PAL31 は細胞核と細胞質の両方に局在することが報告されていたが、細胞核内における機能、ヒストンやクロマチン構造変換との関連については、明らかになっていなかった。今回の研究では、PAL31 の細胞内機能をヒストンとの相互作用を中心に解析し、クロマチン構造変換における新たな PAL31 の機能を明らかにした。現在のクロマチン研究において、最も解析されているクロマチン構造変換因子 Nucleosome assembly protein 1 (NAP-1) は、ヌクレオソーム形成を促進する活性を有することからヒストンシャペロンといわ

れている。ヒストンシャペロンは酵母からヒトまで広範にわたり存在し、クロマチン関連因子のうち最も基礎的な過程を担っており、生物において重要かつ不可欠であることが最近の研究から明らかになっている。そこで、PAL31 の細胞核内におけるクロマチン構造変換因子としての作用機序を明らかにすることを目的として、PAL31 がヒストンシャペロン活性を有しているか解析を行なった。

【第一章：PAL31 の細胞内動態解析】

本章では、PAL31 が有する特異的高酸性領域に着目し、ヒストンとの相互作用を解析した。PAL31 はすべてのヒストンに強く結合しており、さらに欠失変異体を用いた実験から、この酸性領域がヒストンと相互作用するドメインであることを明らかにした。また、データベース解析から、PAL31 には核局在シグナル (Nuclear localization signal, NLS) だけでなく核移行シグナル (Nuclear export signal, NES) も有することが明らかになった。そこで、PAL31 における NLS と NES の部位へ変異を加え、GFP 融合タンパクとして細胞に発現させ、局在を解析した。PAL31 は、細胞核だけでなく細胞質にも局在するが、NLS 変異体においては、細胞質だけに局在が観察された。このことから、PAL31 は細胞核と細胞質間をシャトリングする可能性が示唆された。

【第二章：PAL31 におけるヒストンシャペロン活性解析 I】

PAL31 が酸性領域を介してヒストンと相互作用することと細胞間をシャトリングする可能性から、PAL31 はクロマチン構造変換に関与し、ヌクレオソーム形成活性に関わるヒストンシャペロン活性を有することが推測された。ヒストンシャペロンとは、的確な高次構造のヌクレオソーム形成を促進させるための重要な活性である。そこで、DNA の負の超らせん形成を測定するスーパー・コイルリング法により、PAL31 がヒストンシャペロン活性を有していることが明らかになった。また、PAL31 の欠失変異体による解析から、PAL31 の酸性領域がヒストンシャペロン活性に必須であることが示唆された。さらに、ヌクレオソーム構造のリンカーDNA を特異的に切断するマイクロコッカス・ヌクレアーゼ法で解析した結果においても、PAL31 がヌクレオソーム形成を促進する活性を有することが明らかになった。

【第三章：PAL31のヒストンシャペロン活性解析 II】

生細胞において、クロマチン構造変換に関わるタンパク質の動態やヒストン交換を可視化することにより、そのタンパク質の細胞内局在や細胞周期に依存した機能の解析が可能になる。この生細胞を使用した可視化解析により、PAL31 およびヒストンの細胞内動態の経時的变化を解析した。細胞周期依存的に変化する PAL31 の局在やヒストンシャペロンタンパクとしてのヒストン交換の動態をリアルタイムで観察した。それぞれのタンパクを異なる蛍光色で発光させ、それらの挙動を同時に観察することにより、分子間相互作用を可視化して PAL31 の機能の解析を行なった。本章では、それぞれのヒストンを GFP 融合タンパクとして発現するようなベクターを構築し、HeLa 細胞に強制発現させて解析した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光消光回復法 (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) により、蛍光退色後のそれぞれの GFP 融合ヒストンの蛍光回復を計測し、生細胞内における PAL31 のヒストン交換能を検証した。PAL31 の野生型が発現している細胞においては、より早い回復が確認でき、PAL31 がヒストン交換を活発に行なっていることが示唆された。

【第四章：PAL31のヒストンアセチル化阻害活性解析】

クロマチンにおけるヒストンの修飾反応は、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、スモ化等が知られており、これらによってクロマチン構造変換や遺伝子発現が調節され“ヒストンコード”と呼ばれている。PAL31 のホモログの1つである Phosphoprotein with a molecular mass of 32 kDa (pp32) は、ヒストンアセチル化酵素 (Histone acetyltransferase, HAT) によるヒストンのアセチル化を阻害 (Inhibition of HAT, INHAT) することが報告されている。本章では、PAL31 の新たな細胞核内の機能としてクロマチン修飾因子としての INHAT 活性を解析した。PAL31 の存在下ではヒストンのアセチル化が検出されず、PAL31 の非存在下ではヒストンのアセチル化が強く確認された。また、欠失変異体による実験において、PAL31 の INHAT 活性も酸性領域に存在することが明らかになった。PAL31 はヒストンと結合して、ヒストンのアセチル化される特異的部位を覆うことで、HAT によるアセチル化を阻害することが考えられる。

【第五章：転写因子 Jun Dimerization Protein 2 (JDP2)の機能解析】

PAL31 と機能的に類似する転写因子 Jun Dimerization Protein 2 (JDP2) は、PAL31 と同様な発現分布、細胞局在を示し、さらには、ヒストンシャペロン活性、

INHAT 活性を有している。この JDP2 は、Basic leucine zipper の機能ドメイン構造を持ち、Activating protein-1 (AP-1) ファミリーに属する転写因子である。本章では、PAL31 と機能的に類似する JDP2 の機能解析をアラニンスキャニング法により解析した。JDP2 のすべての変異体を用いた網羅的なアラニンスキャニング解析により、JDP2 におけるどのアミノ酸が、それぞれの活性に必須であり重要であるかを明らかにした。この JDP2 の機能解析から PAL31 の構造や機能を比較解析することで、PAL31 における生理活性を検討した。

【総合討論】

本研究により、PAL31 の細胞核内における主な機能が明らかになった。第一章では PAL31 の高酸性領域に着目し、真核生物にとって重要な役割を担っているヒストンとの相互作用を解析した。PAL31 は、すべてのヒストンと結合し、高酸性領域がヒストンの相互作用に必須であることを明らかにした。また細胞核と細胞質をシャトリングする可能性が示唆された。このことから、PAL31 は細胞核内における機能として、クロマチン構造変換に関わる因子であると仮説をたてた。第二章では、PAL31 がクロマチン構造変換因子としての活性を有しているか解析を行った。最も研究がおこなわれているクロマチン構造変換因子の NAP-1 と同様に、PAL31 にはヌクレオソーム形成を促進するヒストンシャペロン活性を有することが明らかになった。第三章では、このヒストンシャペロン活性を可視化することによって、よりダイナミックにリアルタイムでヒストンの交換や PAL31 の動態が明らかになった。第四章では、PAL31 のさらなる核内機能を解析した結果、ヒストンと結合することでヒストンアセチル化を阻害する活性である INHAT 活性を有することが明らかになった。第五章では、PAL31 と類似する機能を有した転写因子 JDP2 を網羅的にアラニンスキャニング法で解析した。この JDP2 は DNA に結合するだけでなく、PAL31 と同様にヒストンとも結合し、さらには、ヒストンシャペロン活性、INHAT 活性も有している。この JDP2 の機能解析から PAL31 の生理活性を検討した。これらの結果から、PAL31 は、細胞質で合成された新規のヒストンに結合しながら特異的部位を覆うことで、HAT からのアセチル化を阻害し、細胞核内においてヌクレオソーム形成に関与しているヒストンシャペロンであることが考えられる。