

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 野口 道也

真核生物では、DNA はコアヒストン八量体に巻きつき、ヌクレオソーム構造をとる。ヌクレオソームはさらにリンカーヒストンやその他の核タンパク質と複合体をつくり、高次のクロマチン構造となって核内に収納される。ヌクレオソームは細胞周期毎に新たに作り直されることになり、また、エピジェネティクス制御による遺伝子発現時や DNA 修復時には、局所のヌクレオソームが再構成される。その際、ヌクレオソーム構造に不具合が生じると、増殖や遺伝子発現ばかりでなく、ゲノムの不安定化等に起因するがん化などの細胞異常を呈することになる。ヌクレオソーム形成に関わる分子として、ヒストンシャペロンが知られている。ヌクレオソーム構造はヒストン修飾に影響を受けることも知られている。

細胞増殖関連因子 PAL31 は、ラット胎仔脳の遺伝子発現研究から発見された分子である。これまでの研究から、PAL31 は、1)細胞増殖の盛んな組織で発現している、2)DNA 合成期 (S 期) への進入に必要である、3)細胞核と細胞質の両方に局在する、および、4)抗アポトーシス作用を有する、などが明らかになっている。4 は細胞質での機能であるが、核内における PAL31 の機能は不明であった。本論文は、PAL31 がヒストンシャペロン活性とヒストンアセチル化抑制活性を有していることを発見し、核内への移行機構と共に証明したもので、以下の 3 章よりなる。

第 1 章は、PAL31 の細胞内動態に関するものである。一次構造のモチーフ解析から、PAL31 は 1 つの核局在シグナル (NLS) だけでなく、2 つの核外移行 (輸出) シグナル (NES) (アミノ酸 63-71 番、および 112-120 番) も有することが推測された。そこで、NLS と NES の変異 PAL31-GFP 融合タンパクの細胞内局在を調べた。その結果、PAL31 は通常は核と細胞質に存在するが、NLS 変異体は細胞質だけに局在することが明らかになった。それぞれの NES 変異体を用いた実験から、C 端側の NES が核外移行シグナルとして実際に機能していることが示された。さらに、GST-PAL31 組み換えタンパクを用いたプルダウンアッセイより、PAL31 の酸性領域がコアヒストンと強く結合するドメインであることを発見した。このとき、PAL31 と DNA の結合は検出されなかった。PAL31 は、細胞質と核の間をシャトリングし、酸性領域を介してヒストンと相互作用することが明らかになったのである。

第 2 章は、PAL31 のヒストンシャペロン活性に関するものである。DNA とコアヒストンを混合するだけではヌクレオソームは形成されない。DNA がコアヒストンに巻きつきヌクレオソーム構造をとるためには、ヒストンシャペロン活性を有する因子を要するのである。まず、組み換え PAL31 と既知のヒストンシャペロンである NAP-1 を用いて、DNA の負の超らせん形成を測定するスーパーコイル法にて解析した。その結果、PAL31 はヒストンシャペロン活性を有し、その活性は NAP-1 に匹敵することが明らかになった。PAL31 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も示された。

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ル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。

PAL31 のヒストンシャペロン活性は、HeLa 細胞を用いた共焦点レーザー顕微鏡による蛍光消光回復法でも確認された。ヒストンシャペロン活性が *in vivo* で解析されたのは世界初である。

ヒストンの修飾は、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いる。第3章はヒストンアセチル化阻害活性に関するものである。PAL31 は、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) によるアセチル化を阻害する活性 (INHAT 活性) が見出された。酸性領域欠失変異体を用いた実験より、PAL31 の INHAT 活性も、ヒストン結合活性やシャペロン活性を有する酸性領域に存在することが明らかになった。これらの発見を基に、「PAL31 は細胞質で新規に合成されたコアヒストン分子に直接結合して HAT からのアセチル化を阻害し、細胞核内ではヒストンシャペロンとしてヌクレオソーム形成に関与する」とするモデルが提唱された。

以上、本論文では、細胞の核内における PAL31 の機能について、NES や NLS を用いて細胞質と核を行き来し、INHAT 活性とヒストンシャペロン活性を有する、などの発見がなされた。これらの発見は、ヌクレオソーム構造制御機構の解明に寄与する重要な知見である。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。