

論文の内容の要旨

論文題目

概日リズム転写を調節する細胞死制御因子 DAXX

氏名 沢登 健治

[序]

Death domain-associated protein (DAXX) は、細胞死を誘導する細胞膜局在性の受容体 FAS と結合する蛋白質として同定された。DAXX は FAS のリガンドである FASL や紫外線の刺激に応答し、細胞死誘導に関与することが知られている。近年、DAXX は細胞質だけではなく核内に局在することが報告されているが、DAXX の核内での機能は不明な点が多い。私は DAXX が関与する未知の生理機能を明らかにするために、DAXX の新規結合蛋白質のスクリーニングを行い、概日リズム転写制御因子 BMAL1 を同定した。本研究で私は、DAXX の核内での役割について解析を行い、DAXX が分子時計の構成因子として働くことを見出した。

[方法と結果]

1. DAXX 新規結合蛋白質のスクリーニング

DAXX の核内での機能を明らかにするために、DAXX の結合蛋白質のスクリーニングを行った。FLAG タグをつけた DAXX の恒常的安定発現株を樹立し、その細胞抽出液から FLAG 抗体を用いて免疫沈降し DAXX 複合体を精製した。質量分析法により、DAXX の新規結合蛋白質として核内に局在する概日リズム転写制御因子 BMAL1 を同定した。

2. DAXX は CLOCK:BMAL1 二量体と複合体を形成する

BMAL1 は核内に局在する転写因子であり、概日リズムの制御に関わる約24時間の周期性を持つ分子時計を構成する。BMAL1 が DAXX と結合することを見出したことから、分子時計を構成する他の時計蛋白質 (CLOCK、CRY1) と DAXX が結合するかを免疫沈降法により検討した。その結果、DAXX は BMAL1 のみと特異的に結合することを明らかにした(図 1 A)。BMAL1 は CLOCK と二量体を形成し概日リズム転写制御に関わることから、DAXX が BMAL1 を介して CLOCK と複合体を形成する可能性を考え検討した。その結果、CLOCK 単独の発現だけでは DAXX との結合は観察されないのに対し、BMAL1 の共発現により CLOCK と DAXX の結合が観察された (図 1 B)。このことから、DAXX は BMAL1 を介して CLOCK:BMAL1 二量体と結合することが明らかになった。

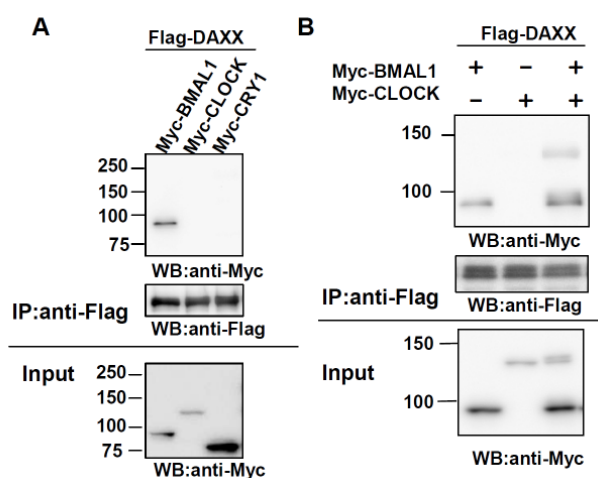


図 1 新規 DAXX 結合蛋白質 BMAL1

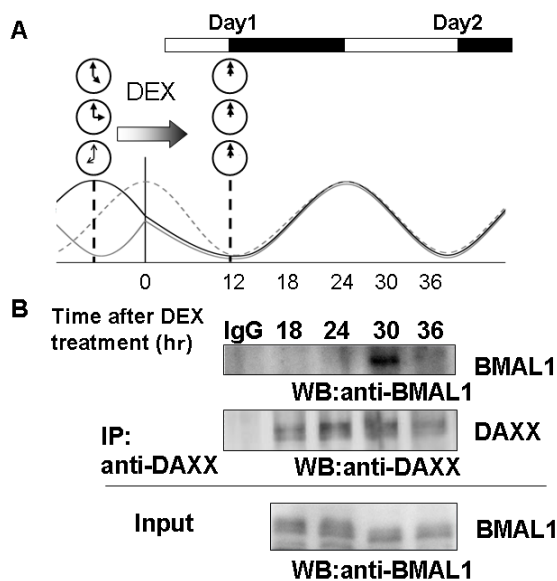


図 2 時間依存的な DAXX と BMAL1 の結合

3. DAXX は時間依存的に BMAL1 と結合する

内在の DAXX と BMAL1 の結合様式を、分子時計を同調させた細胞を用いて免疫沈降法により検討した。通常の培養条件下で、個々の細胞の分子時計の周期は同調していない。デキサメタゾン (DEX) 処理により、約 12 時間後に細胞間の周期が同調されることが知られている(図 2 A)。DEX 処理により分子時計の周期を同調させた細胞から経時的に抽出液を調製し、DAXX 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、興味深いことに、DEX 処理 30 時間後においてのみ DAXX と BMAL1 の結合が観察された(図 2 B)。このことから、DAXX と BMAL1 は時間依存的に結合することが示唆された。

4. CBP により BMAL1 はアセチル化される

DAXX が BMAL1 と時間依存的に結合する分子メカニズムを明らかにするために、時間依存的な DAXX と BMAL1 の結合を制御する蛋白質または翻訳後修飾の存在を考えた。これまでに DAXX と BMAL1 が結合する時間帯においてヒストンアセチル化酵素 (HAT) である CBP が、CLOCK : BMAL1 二量体に結合することが知られている。このことから、CBP が時間依存的な DAXX と BMAL1 の結合を制御する可能性を検討した。CBP の共発現による BMAL1 と DAXX の結合の亢進が免疫沈降法により観察された(図 3 A)。次に、CBP による BMAL1 と DAXX の結合の亢進が、CBP の HAT 活性によるものであるかを検討した。培養細胞に BMAL1 と CBP を共発現した後、アセチル化リジン抗体により BMAL1 のアセチル化を検討した(図 3 B)。その結果、CBP 依存的に BMAL1

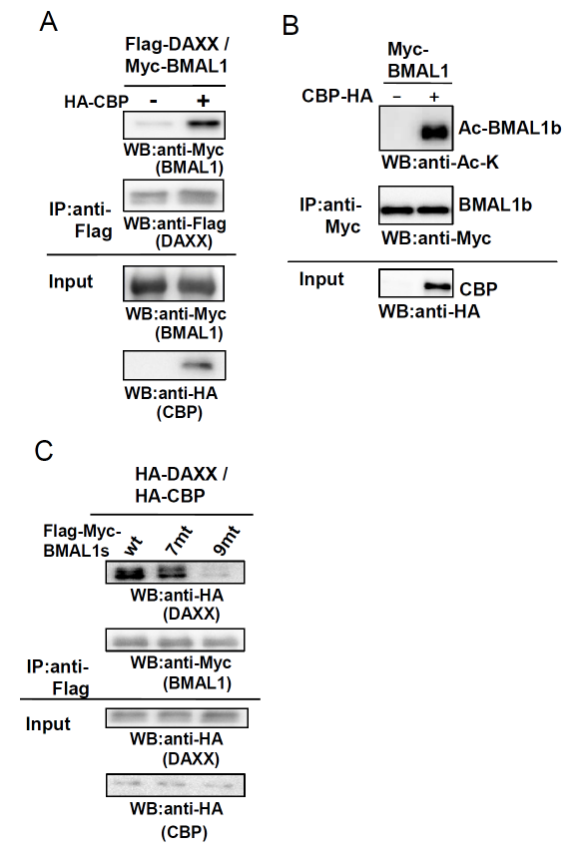


図 3 CBP による BMAL1 のアセチル化

のアセチル化が誘導されることを明らかにした。CBP により BMAL1 がアセチル化されるリジンを特定し、それらのリジンをアルギニンに置換した BMAL1 変異体 (7mt、9mt) を作製した。これらの BMAL1 変異体では CBP によるアセチル化は顕著に低下した。これらの BMAL1 変異体を用いて、DAXX と BMAL1 の結合に対する CBP による BMAL1 アセチル化の影響を免疫沈降法により検討した(図 3 C)。BMAL1 変異体では

DAXX との結合が野生型の BMAL1 に比べ顕著に低下した。これらの結果から、時間依存的に DAXX と BMAL1 が結合するためのシグナルとして、CBP による BMAL1 のアセチル化が機能している可能性が示唆された。

5. DAXX は CLOCK:BMAL1 二量体の転写能を亢進する

DAXX と CLOCK:BMAL1 二量体が結合することを明らかにしたので、CLOCK:BMAL1 二量体の転写能に対する DAXX の影響を検討した。特に CLOCK:BMAL1 二量体により転写制御されることが知られている *Per3* 遺伝子のプロモーターに対する DAXX の影響を、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した (図 4)。その結果、DAXX の増加に依存して CLOCK:BMAL1 二量体の転写能の亢進が観察された (レーン 2、3、4)。

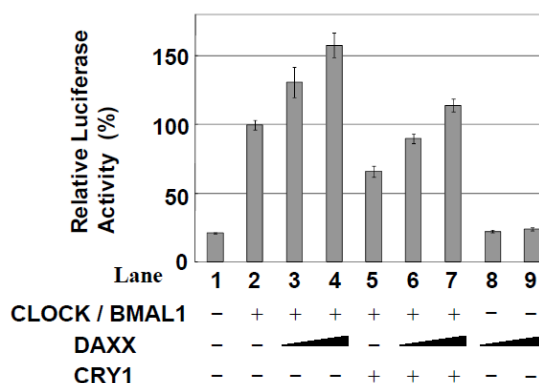


図 4 CLOCK:BMAL1 の転写能に対する

次に、CLOCK:BMAL1 二量体の転写抑制因子 CRY の共存下で、CLOCK:BMAL1 二量体の転写能に対する DAXX の影響を検討した。その結果、DAXX の共発現により CRY の CLOCK:BMAL1 二量体に対する転写抑制効果は緩和された (レーン 5、6、7)。以上より、DAXX は CRY と拮抗して働き CLOCK:BMAL1 二量体の転写能を正に制御することが示唆された。

6. DAXX は分子時計の周期を調節する

内在の DAXX の概日リズム制御における生理機能を明らかにするために、生きたままの培養細胞内の分子時計を経時的に測定できる系を構築した。まず *BMAL1* 遺伝子プロモーター下にルシフェラーゼ遺伝子を導入したコンストラクトをレトロウイルスを用いて導入した細胞株を樹立した。樹立した細胞株において siRNA を用いて内在の DAXX を発現抑制し、DEX 処理により細胞内の分子時計の周期を同調させた後、ルシフェラーゼの活性を経時的に計測した。その結果、DAXX を発現抑制した細胞においてコントロールに対し、発現振幅の減少及び周期の延長が観察された。これらの結果は DAXX が分子時計の周期性の制御に関わることを示唆する。

[考察]

本研究において、細胞死制御因子 DAXX の新規結合蛋白質として概日リズム転写制御因子 BMAL1 を同定した。興味深いことに、DAXX は BMAL1 と時間依存的に結合することを見出した。この時間依存的結合の分子メカニズムとして、ヒストンアセチル化酵素 CBP による BMAL1 アセチル化によって、BMAL1 と DAXX の結合能が亢進する可能性を示した (図 5)。DAXX:BMAL1:CLOCK 複合体の形成が CLOCK:BMAL1 二量体の転写能を亢進し、分子時計の周期性の調節に寄与する可能性が考えられる。

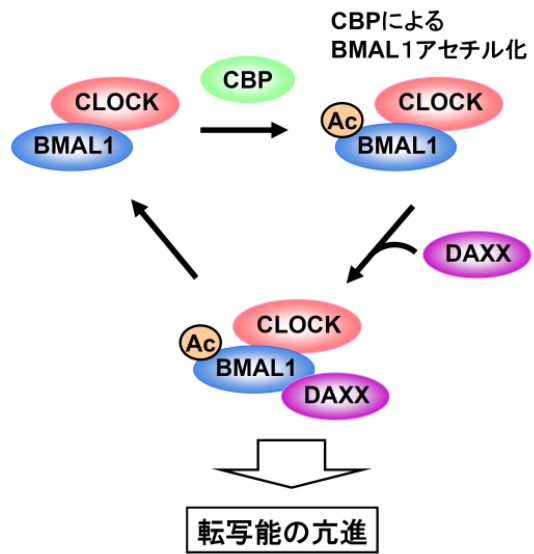


図 5 DAXX による分子時計制御の仮説