

審査の結果の要旨

氏名 沢登 健治

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、細胞死誘導に関わ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。「概日リズム転写を調節する細胞死制御因子 DAXX」と題した本論文においては、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、DAXX が分子時計の構成因子として機能することを見出している。

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 時間の周期性をもつ分子時計を構成する。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。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。

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。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、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。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

ヒストンアセチル化酵素 (HAT) である CBP が、DAXX と BMAL1 の時間依存的な結合を制御する可能性を免疫沈降法により検討した結果、CBP の共発現による BMAL1 と DAXX の

結合の亢進が観察された。次に、CBP による BMAL1 と DAXX の結合の亢進が、CBP の HAT 活性による可能性を考え検討した結果、CBP 依存的に BMAL1 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。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

CLOCK-BMAL1 二量体の転写能に対する DAXX の影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した結果、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。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。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、*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、コントロールに比して、発現振幅の減少及び周期の延長が観察された。これらの結果から DAXX が分子時計の周期の調節に関わる可能性が示された。

本論文では、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、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、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。DAXX-BMAL1-CLOCK 複合体の形成が CLOCK-BMAL1 二量体の転写能を亢進し、分子時計の周期の調節に寄与するというモデルが提示された。以上を要するに、本論文は、細胞死制御因子 DAXX の機能解析により、概日リズム転写の調節という DAXX の新規の機能を明らかにしたことに加え、概日リズム転写制御機構の解明における有用な知見を提供しており、博士(薬学)の学位として十分な価値があるものと認められる。