

論文の内容の要旨

論文題目 ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A の機能解析

氏名 合田 哲

【目的】

ヌクレオソームを構成するヒストンの側鎖へのメチル基の修飾は、近傍遺伝子の転写を制御することで、癌をはじめとする様々な疾患に関与することが報告されている。また、その修飾は可逆的であり、これまでに哺乳動物細胞でおよそ 85 種類のヒストンメチル化酵素およびヒストン脱メチル化酵素が同定されている。その中で私が着目した JMJD1A (Jumonji domain containing 1A) は、ヒストン H3 の N 末端から 9 番目のリジン (H3K9) に修飾されたメチル基 (me₂/me) を特異的に脱メチル化する酵素である。H3K9 のメチル化は転写を抑制する修飾であり、JMJD1A による脱メチル化反応に基づいて種々の遺伝子の転写が促進されることが報告されている。これまでに、大腸癌細胞株、膀胱癌細胞株、および前立腺癌細胞株を用いて、RNAi により JMJD1A を発現抑制することで、細胞増殖抑制効果が認められていることから、JMJD1A は抗癌剤の標的分子の一つとして注目されている。しかしながら、JMJD1A の阻害剤創製に際して、詳細な酵素学的知見が報告されていない。そこで私は、JMJD1A の分子構造と機能の関連性を理解することを目的として、分子生物学的手法を用いた機能解析を行った。

【結果および考察】

・ JMJD1A のホモ二量体形成評価、および二量体界面の探索

N 末端に Strep-FLAG (SF) タグを付加した JMJD1A 発現ベクターを構築し、これを 293T 細胞へ遺伝子導入し、Strep タグを介したアフィニティ精製を行った。精製物を Blue-Native PAGE および抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロットングにより解析したところ、JMJD1A がホモ二量体を形成することが示唆された。次に、二量体形成を制御している領域を調べる目的で種々のドメイン欠損タンパク質を構築し、完全長の JMJD1A との相互作用を免疫沈降法により解析した。その結果、JMJD1A は酵素活性に必須の領域である Zf および JmjC ドメインを含む、N 末端から 623~1321 番目のアミノ酸配列を介して二量体形成していることが示唆された。

・ 二量体形成と細胞内局在制御の関連性に関する評価

N 末端に SF タグを付加した種々のドメイン欠損タンパク質を HeLa 細胞に一過的に発現

させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫染色実験により細胞内局在を検証した。その結果、1~306 番目のアミノ酸配列により JMJD1A の核局在が制御されていることが明らかとなり、核局在と二量体形成が異なる領域で制御されていることが示唆された。そこで次に、二量体形成と細胞内局在の関連性について解析した。N 末端に SF タグを付加した 1-306 欠損変異体 (Δ 1-306) と、完全長の JMJD1A を共発現させ、核画分について抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングによる解析を行った。その結果、 Δ 1-306 を単独で発現させた場合とは異なり、核画分から Δ 1-306 が検出された。以上の結果から、JMJD1A は核外で二量体を形成した後に核移行することが示唆された。

・二量体形成と脱メチル化活性制御の関連性に関する評価

JMJD1A が酵素活性に必須のドメインを含む領域を介して二量体形成することから、JMJD1A のホモ二量体形成と脱メチル化活性制御の関連性について検証した。具体的には、一方に活性型 (Wt)、もう一方に局所変異 H1120Y を加えた不活性型 (Mut) を用いたヘテロ二量体 (Wt/Mut) を調製し、その酵素活性について活性型ホモ二量体 (Wt/Wt) と比較した。まず、SF タグ、あるいは mycHA タグをそれぞれ N 末端に付加した JMJD1A (Wt あるいは Mut) を 293T 細胞に共発現させた。細胞を可溶化後、FLAG M2 アガロースによるアフィニティ精製、および抗 myc 抗体結合ビーズを用いた免疫沈降による二段階精製により、二量体の精製を行った。得られた精製物について SDS-PAGE および CBB 染色を行った。濃度既知の BSA を用いて作成した検量線に基づいて、ビーズ上への二量体の固定化量を算出した。次に、二量体結合ビーズを用い、基質として H3K9me2 修飾ペプチドを用いた脱メチル化反応を行った。継時的に反応上清を回収し、MALDI-TOF-MS により基質および脱メチル化体の相対存在量の継時変化を追跡した。その結果、Wt/Mut では Wt/Wt に対して、H3K9me2 を基質とした二段階の脱メチル化反応産物である H3K9me0 の生成量が著明に減少した。一方、H3K9me1 修飾ペプチドを基質とした脱メチル化反応における H3K9me0 の生成量については、同様の減少は見られなかった。以上の結果から、JMJD1A ホモ二量体の有する二つの活性中心が、H3K9me2 を基質とした二段階の脱メチル化反応において協調的な作用を発現していることが示唆された。

【結語】

本研究により、JMJD1A が酵素活性に必須のドメインを含む領域を介してホモ二量体を形成していることが明らかとなった。そして、二量体形成と細胞内局在制御との関連性の解析により、JMJD1A は核外で二量体形成した後に核移行することが明らかとなった。さらに、二量体形成と酵素活性制御の関連性解析から、JMJD1A ホモ二量体の有する二つの活性中心の協調的な脱メチル化作用を見出すことに成功した。