

## 審査の結果の要旨

氏名 合田 哲

本論文は、ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A の特徴的な分子構造であるホモ二量体形成と、機能の関連性を理解することを目的として、分子生物学的手法に基づく解析を行った論文である。

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 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 (me<sup>2</sup>/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、その詳細な酵素学的知見は報告されていない。JMJD1A の特徴的な分子構造であるホモ二量体形成と機能の関連性を理解することは、JMJD1A の生体内における役割を明らかにする上で必要不可欠であるとともに、JMJD1A を標的とした抗癌剤創製研究への展開のためにも大変意義のある研究である。

第 1 章は序論であり、JMJD1A の生体内における機能、癌との関連性、および構造と酵素学的機能に関する先行研究について概説し、本研究の目的と意義を述べている。

第 2 章では、リコンビナント JMJD1A を精製し、Blue-Native PAGE および免疫沈降法を用いた解析結果に基づき、JMJD1A がホモ二量体を形成していることを示している。

第 3 章では、種々のドメイン欠損蛋白質を用いた免疫沈降実験により、触媒活性に必須の領域が二量体界面に含まれていることを明らかにしている。この結

果に基づき、次章以降では、ホモ二量体形成という特徴的な分子構造と機能との関連性の解析を行っている。

第4章では、ホモ二量体形成と細胞内局在の関連性に関する解析を行っている。ドメイン欠損蛋白質を用いた免疫染色実験により、JMJD1Aの局在が、二量体界面と異なるN末端領域により制御されていることを明らかにした。続いて、核移行制御領域を欠損した蛋白質が、完全長JMJD1A共存下で核移行することを見出し、JMJD1Aは細胞質で二量体形成した後に核に移行することを明らかにした。

第5章では、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、ホモ二量体形成と酵素活性制御の関連性に関する解析を行っている。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)を二段階精製により調製し、ビーズに固定化した状態で、活性型ホモ二量体(Wt/Wt)と酵素活性を比較している。二段階精製により得られた二量体の定量化に際しては、濃度既知であるBSA蛋白質のCBB染色像を基にした定量化手法の確立に成功している。本手法では、BSAの検量線が良好な線形性を示し、再現性の高い定量手法であることを示している。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を示した。

第6章では、本論文の総括と展望を述べている。

以上、本論文はJMJD1Aの二量体形成と機能の関連性について分子生物学的手法を用いて証明したものであり、これらの成果は細胞内におけるJMJD1Aの役割を明らかにする上での重要な手がかりであるとともに、JMJD1A阻害剤創製における分子設計においても有用な知見である。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。