

氏名(本籍)	むらのけんさく 村野健作(千葉県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第4839号		
学位授与年月日	平成20年7月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	細胞増殖における核小体および核質に局在するヒストンシャペロンの機能		
主査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保
副査	筑波大学教授	薬学博士	金保安則
副査	筑波大学講師	博士(理学)	依馬正次
副査	筑波大学講師	博士(理学)	梶和子

## 論文の内容の要旨

### (目的)

細胞分化と細胞増殖の協調的な関係は生命体の維持に欠かすことができない生命現象である。細胞分化の過程で生じる遺伝子発現パターンの変化はクロマチン構造を含む核内高次構造の動的変動に依存していると考えられている。しかしながらクロマチン構造変換因子と細胞増殖制御機構の関連については解析が進んでいない。著者らはアデノウイルスのクロマチン様構造を鋳型とした複製反応促進活性を指標としてクロマチン構造の変換に関与するヒストンシャペロンとして TAF-I と TAF-III/B23 を同定してきた。本研究では、核小体に局在する B23.1 に重点をおいて核内高次構造変換機構と細胞増殖制御の関連を明らかにすることを目的とした。

### (対象と方法)

細胞を用いた解析では、主にヒトがん細胞である HeLa 細胞と 293T 細胞を用いた。研究対象とした B23.1 の rRNA 遺伝子への結合はクロマチン免疫沈降法と定量 PCR 法を用いて検討した。rRNA 遺伝子の転写活性は単離細胞核を用いた Run-on 法により検出した。また、HeLa 細胞核抽出液と rRNA 遺伝子プロモーターを用いた転写反応系を用いて、B23.1 が rRNA 遺伝子の転写反応に与える影響を試験管内において検討した。このとき、HeLa 細胞から抽出精製したヒストンを用いて作製した再構成クロマチンを転写反応の鋳型に使用した。また、細胞内における B23.1 のヒストンシャペロンとしての機能を検討するため、B23.1 のヒストン結合活性のドミナントネガティブ変異体、B23ΔC を作製した。B23.1 はアミノ末端側のオリゴマー形成ドメインを介して、5 量体あるいは 10 量体を形成する。B23ΔC はオリゴマー形成ドメインを持つがヒストンシャペロン活性に重要な酸性アミノ酸領域を欠くため、B23.1 のヒストン結合活性を阻害する。また、マウスメラトカルシノーマ細胞である F9 細胞に B23ΔC を発現させ、細胞増殖と細胞分化の関係について検討した。

### (結果と考察)

始めに B23.1 の細胞内局在を検討し、rRNA 遺伝子の転写や rRNA プロセッシングをはじめとするリボソーム生合成の場で、ある核小体に局在することが示された。そこで核小体クロマチン免疫沈降法を用いて B23.1 と rRNA 遺伝子クロマチンとの相互作用を検討した。その結果、B23.1 は、RNAPolymerase I (Pol I)

による転写の基本転写因子複合体の構成因子である TBP と同様に rRNA 遺伝子の転写開始点付近の領域に結合していることが示された。次に、細包の増殖速度と rRNA 遺伝子の転写レベルには正の相関があることが知られていることから、細胞増殖と B23 の合成速度について検討した。293T 細胞を 1%あるいは 10%血清存在下で培養し、B23 の合成速度と rRNA の転写レベルをそれぞれ <sup>35</sup>S メチオニンによるパルスラベルと Run-on 法を用いて解析した。その結果、細胞増殖速度の変化にともない、B23 の合成速度と rRNA 遺伝子の転写速度も正の相関を示しながら変動することが明らかとなった。次に、rRNA 遺伝子プロモーターを含む再構成クロマチンを鋳型にした試験管内転写反応を用いて、rRNA 遺伝子の転写に対する B23 の関与を検討した。再構成したクロマチンを鋳型とした転写反応系において、B23.1 の添加により Pol I 依存的転写反応が促進された。さらに、B23.1 のヒストンシャペロンとしての機能を解析するため、B23.1 のヒストン結合活性に対するドミナントネガティブ変異体、B23ΔC を作製した。再構成クロマチンを鋳型とした転写反応において B23ΔC を添加したところ、B23.1 の転写反応促進活性を阻害した。このことから B23.1 は多量体を形成してヒストンと相互作用することで、クロマチン構造を鋳型とした Pol I による試験管内転写反応を促進していることが明らかとなった。次に細胞内における B23.1 のヒストンシャペロンとしての機能を解析するため、B23ΔC を 293T 細胞に過剰発現し、rRNA 遺伝子の転写レベルや細胞増殖速度への影響を検討した。その結果、B23ΔC の過剰発現により rRNA の転写レベルは減少し、細胞増殖速度も減少した。以上の結果から、著者らは B23.1 は細胞内においてヒストンシャペロンとして機能し、rRNA 遺伝子のクロマチン構造変換を介して転写反応を制御することにより、細胞増殖過程に関与していることが示唆されると述べている。

さらに、細胞分化にともなう細胞増殖制御過程における B23.1 の機能を解析した。F9 細胞の分化にともない B23.1 の発現量は大きく減少した。そこで、F9 細胞に B23ΔC を導入した細胞株を樹立した。B23ΔC を発現する F9 細胞株は野生株に比較して rRNA 遺伝子の転写レベルは減少し、細胞増殖産度も低下していた。しかしながら、野生株と比べて細胞分化状態に違いは見られず、分化誘導因子であるレチノイン酸に対する応答にも差は見られなかった。このことから B23.1 の機能抑制による rRNA 転写の低下のみでは細胞分化を引き起こさないことが明らかとなった。

(結論)

ヒストンシャペロンである B23.1 は試験管内においても細胞内においても rRNA 遺伝子のクロマチン構想変換を介した転写反応制御に関与していることが示された。また、申請者らは F9 細胞の分化誘導系を用いた解析から B23.1 の低下は細胞分化を引き起こす原因ではなかったものの、細胞分化誘導の際の細胞増殖制御過程に関与していることが示唆されたと述べている。

## 審査の結果の要旨

本研究は、ヒストンシャペロン B23.1 が核小体に分布し rRNA の転写制御を介して細胞増殖に関与していることを明らかにしている。明確な研究目的を持ち、実験研究の進め方も慎重で信頼性の高い明瞭な結果を得ている。質の高い独創的な研究で、すぐれた研究であると評価される。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。