

氏名(本籍)	ひさ おか み はる 久岡美晴(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第6211号
学位授与年月日	平成24年3月23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	nucleophosmin/B23のrRNA遺伝子クロマチンへの標的化制御機構
主査	筑波大学教授 薬学博士 金保安則
副査	筑波大学教授 医学博士 久武幸司
副査	筑波大学講師 博士(医学) 矢藤繁
副査	筑波大学教授(連携大学院) 理学博士 石井俊輔

論文の内容の要旨

(目的)

遺伝情報を含むDNAは、ヒストン等と結合して高次のクロマチン構造を形成する。遺伝子発現制御には、このクロマチン構造の変換が重要である。ヒストンシャペロンは、ヒストンと直接結合してクロマチン構造変換に関与することが明らかになっている。しかし、ヒストンはゲノム全体に存在する因子であることから、ヒストンシャペロンの特異的なクロマチン領域への標的化機構の詳細は不明である。

本論文では、rRNA遺伝子クロマチン上で機能することが明らかになっている核小体ヒストンシャペロン nucleophosmin/B23のrRNA遺伝子クロマチンへの標的化制御機構を解析することで、ヒストンシャペロンの特異的なクロマチン領域への標的化機構を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

B23のRNA結合活性の低下と核小体からの離脱に相関性が見られることに着目し、B23のRNA結合活性とrRNA遺伝子クロマチンとの相互作用の関連性について検討した。B23のRNA結合活性は、B23の分裂期リン酸化により低下することから、分裂期リン酸化を模倣した変異体等を用いて、B23のRNA結合活性とrRNA遺伝子クロマチン結合活性の関連性を検討した。さらに、核小体特異的な転写因子UBFによる、B23のrRNA遺伝子クロマチンへの標的化への影響を検討した。

B23は、rRNA遺伝子クロマチンとの相互作用に自身のRNA結合活性を必要としたため、B23のRNA結合様式について検討した。RNA結合活性が極めて低いB23のスプライシングバリエントB23.2とB23.3でそれぞれ欠損する、C末端の立体構造形成領域(CTD)と分裂期リン酸化を受ける塩基性アミノ酸に富む領域(Basic domain)のRNA結合活性を検討した。また、B23の様々な欠損変異体を作成し、ドメイン間の相互作用と、これらの相互作用がB23のRNA結合活性に与える影響を考察した。

B23のRNA結合様式の解析と並行して、B23と結合するRNA分子の同定を試みた。生化学的手法により、細胞抽出液から精製したB23の画分に含まれるRNA、あるいは試験管内でリコンビナントのB23と結合するRNAをクローニングして配列を決定した。

(結果)

B23 の *rRNA* 遺伝子クロマチンとの相互作用が分裂期に失われることが明らかとなった。B23 の分裂期リン酸化を模倣した変異体を用いた実験から、分裂期リン酸化による B23 の RNA 結合活性の抑制は、B23 の *rRNA* 遺伝子クロマチンとの相互作用を抑制することが明らかとなった。同変異体を発現させても、B23 のノックダウンによる *rRNA* 転写の低下を回復しなかった。UBF をノックダウンすると、B23 の *rRNA* 遺伝子クロマチンとの相互作用が抑制された。

B23.1 の CTD は、比較的選択的だが弱い RNA 結合活性を示し、Basic domain は、非特異的だが強い RNA 結合活性を示した。B23 の Acidic domain の欠損変異体は、全長の B23.1 と比較して強い RNA 結合活性を示した。B23.1 の Acidic domain-Basic domain-CTD から成る変異体は単量体と 2 量体を形成したが、B23.2 型の同様の変異体は単量体を形成したことから、B23.1 は多量体中で分子間相互作用をしている可能性が示唆された。また、B23.2 は、Acidic および Basic domain が分子内で相互作用するために、RNA 結合活性が抑制された状態であることが示唆された。

B23 と結合する RNA に配列の類似性は見られないが、比較的ステム構造をとる領域の多い傾向が見られた。

(考察)

RNA との複合体形成と転写因子の 2 つに依存した B23 の *rRNA* 遺伝子クロマチン領域への標的化機構、および B23 分子内および分子間で RNA 結合活性を調節することで自身のクロマチンとの相互作用を制御することが示唆された。

UV 照射等で DNA 損傷が生じ、*rRNA* の転写量が低下した細胞において、B23 の Basic domain のリン酸化、核質への移行がそれぞれ観察されている。B23 の Basic domain は B23 の RNA 結合活性に重要な領域であるため、B23 の RNA 結合活性が抑制され、*rRNA* 遺伝子クロマチンから乖離すると考えられる。したがって、本研究で明らかにした B23 の RNA 結合活性の制御を介した *rRNA* 遺伝子クロマチン構造変換機構は、細胞増殖機構の解明のみならず、細胞のストレス応答機構の解明にもつながることが期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、RNA との結合に依存して核小体に局在化し、*rRNA* の転写を調節すると考えられる B23 に関して、その RNA との結合機構と転写調節機構について解析している。その結果、B23 はリン酸化型と非リン酸化型が存在し、非リン酸化型に RNA が結合して *rRNA* の転写を促進すること、および、この制御が細胞周期と関連しているを明らかにした点で興味深い研究成果であり、すでに国際専門誌に公表され評価を受けている。この研究成果は、細胞増殖機構を理解するうえで重要であると評価できる。

平成 23 年 12 月 22 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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。