

Title	Nucleosome Assembly Protein-1、Nap-1の機能に関する研究
Author(s)	中田, 朋子
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38630">https://hdl.handle.net/11094/38630</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	中 田 朋 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 9 8 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 12 月 15 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Nucleosome Assembly Protein-1, Nap-1 の機能に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小 川 英 行
	(副査) 教 授 谷 口 維 紹 教 授 森 田 敏 照 講 師 小 川 智 子

### 論 文 内 容 の 要 旨

Nucleosome assembly protein-1 (Nap-1) は *in vitro* の生理的条件下でヌクレオソーム形成を促進するタンパク質としてヒト及びマウスの培養細胞から分離され、多くの真核生物に存在することが示唆されている。これまでに発芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) から *NAP-1* 遺伝子がクローニングされており、その塩基配列から推定される酵母 Nap-1 は417アミノ酸からなる分子量47,848のタンパク質で、酸性アミノ酸に富む領域が3ヶ所存在することが報告されている。

本研究では Nap-1 の構造と機能、特にヌクレオソーム形成活性に重要だと考えられてきた酸性アミノ酸に富む領域の機能を調べるために、クローン化したし酵母 *NAP-1* 遺伝子から種々の欠失変異タンパク質をコードする遺伝子を作成した。それらの活性を調べるため、先ず完全長の酵母 Nap-1 を T7 gene 10産物の数アミノ酸との融合タンパク質として大腸菌で大量に発現させた。そして、MonoQ カラムクロマトグラフィーにより部分的に精製した酵母 Nap-1 はヒトやマウス細胞から精製した Nap-1 と同等のヌクレオソーム形成活性を持つことを明らかにした。次に、いくつかの Nap-1 欠失変異タンパク質を同様の方法で大腸菌で発現させ、部分精製したものについてその活性を調べたところ、最長の酸性アミノ酸領域を含む C 末端側52残基を欠失させた変異タンパク質 ( $\Delta$ 366-417) にはヌクレオソーム形成活性があり、さらに上流31残基を欠失させた変異タンパク質 ( $\Delta$ 335-417) には活性がないことが判明した。一方、C 末端側52残基を欠失させ、さらに N 末端側42残基欠失させた変異タンパク質 ( $\Delta$ 1-42, 366-417) は活性があったが、さらに N 末端側を欠失させた変異タンパク質 ( $\Delta$ 1-126, 366-417) では活性がなくなることがわかった。この結果は43-365残基が活性に必要な十分な領域であることを示している。このことは、従来、酸性アミノ酸に富む領域はヌクレオソーム形成活性をもつタンパク質に共通して存在することから、塩基性タンパク質であるヒストンと結合するために重要であると考えられてきたが、少なくとも Nap-1 の C 末端側にある酸性アミノ酸に富む領域は必要ではなく他の領域が重要であることを示している。

次にヌクレオソーム形成活性のない欠失変異タンパク質はなぜ活性がなくなるかを調べた。ヒト Nap-1 とコアヒストンを混合すると12Sの複合体が形成されることが報告されている。種々の Nap-1 欠失変異タンパク質をコア

ヒストンと混合し、12Sの複合体形成を調べたところ、ヌクレオソーム形成活性のあるNap-1欠失変異タンパク質は12Sの複合体を作るが、ヌクレオソーム形成活性のないNap-1欠失変異タンパク質は12Sの複合体を全くあるいはほとんど形成させず異常な集合体を形成した。このことからヌクレオソーム形成活性にはNap-1とコアヒストンの12S複合体の形成が不可欠であることが判明した。

さらに、遺伝学的研究の比較的簡単にできる酵母を使って、Nap-1の*in vivo*での機能を調べた。酵母NAP-1遺伝子は第11染色体にあり、酵母の株によって半数体あたり1個あるいは2個存在することがわかった。YM161株を除いては、NAP-1遺伝子を破壊しても増殖に影響がないことから、NAP-1は必須遺伝子ではないと結論した。しかし、YM161株では、NAP-1遺伝子が破壊されると37°Cで生存率が低下することが判明した。この株を非許容温度に移した後の細胞は大きな芽を出した状態で止まっており、DAPIで染色した核は母細胞中あるいは娘細胞との中間付近に留まって、核の分配が異常になっていると思われる。生存率の低下はNap-1を発現するプラスミドpTN819を導入すると改善されることから、Nap-1は他のタンパク質と共同で核の分配に影響を与える反応に関与していると考えられる。

最後にマウスNap-1 cDNAを分離することにより、マウスと酵母のNap-1を比較し、Nap-1の機能に重要な領域の推定を試みた。ヒトNap-1モノクローナル抗体でマウス精母細胞cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、マウスNap-1のcDNAを得、その塩基配列を決定した。塩基配列から推定されるマウスNap-1は391アミノ酸からなり、分子量45,344であった。酵母とマウスNap-1のアミノ酸配列を比較すると、約30%が相同で、2ヶ所の非常に相同な領域に加えて、酸性アミノ酸に富む領域が保存されていることが明らかになった。

以上の結果から、Nap-1のヌクレオソーム形成活性には単にNap-1がヒストンに結合するだけでは不十分で、12Sの複合体形成が不可欠であり、この複合体形成にはC末端側にある酸性アミノ酸に富む領域は不必要であることが明らかになった。しかし、マウスNap-1にもC末端側に酸性アミノ酸に富む領域が存在することから、この領域はなんらかの機能をもっていることが示唆された。また、Nap-1は他のタンパク質と共同で核の分配に影響を与える反応に働いていることが示唆された。酸性アミノ酸に富む領域は他のタンパク質との相互作用に必要なものかもしれないが、この点に関しておよびNap-1が核の分配にどのようにして関与しているかについては今後の課題である。

## 論文審査の結果の要旨

ヌクレオソーム形成促進因子Nap-1蛋白質の遺伝子をマウスから分離し、酵母のそれと比較解析した。そしてその活性には、ヒストンと結合して12Sの複合体を形成することが不可欠で、それには、考えられていたC末端側の酸性アミノ酸領域は必要ないことを明かにした。またNap-1は他の蛋白質と共同で核の分配に関与していることを示唆した。これらの成果は博士(理学)の学位論文として十分価値のあるものと認める。