OUKA
Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Interaction of the chromatin compaction-inducing domain(LR domain)of Ki-67 antigen with HP1 proteins |
| Author(s) | 亀髙, 愛 |
| Citation | 大阪大学, 2003, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/43850 |
| 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">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

【8】

| | |
|---|---|
| 氏名 | 亀高（かめたか） 愛（あい） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学） |
| 学位記番号 | 第 17578 号 |
| 学位授与年月日 | 平成15年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科情報伝達医学専攻 |
| 学位論文名 | Interaction of the chromatin compaction-inducing domain (LR domain) of Ki-67 antigen with HP1 proteins.<br>（クロマチン凝縮を誘導するKi-67抗原のLRドメインはHP1タンパク質と相互作用する） |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授 米田 悦啓<br>（副査）<br>教授 内山 安男　教授 近藤 寿人 |

## 論文内容の要旨

【目的】

ヒトKi-67抗原は細胞増殖と密接に関わるとされる核・核小体タンパク質であるが、その機能は未知である。Ki-67抗原は細胞周期を通してその細胞内局在を変化させ、分裂期には染色体表層に局在し、間期には核小体内とセントロメアとテロメアを含むヘテロクロマチン領域に局在することが示されている。さらに、生化学的な解析によりKi-67抗原のほとんどがヘテロクロマチンに結合していることが示されており、Ki-67抗原のクロマチン構造構築への関与が想定される。

当研究室では、先にKi-67抗原の有袋類ホモログであるクマドリンを単離し、そのC末端領域のLRドメインの過剰発現がクロマチン凝縮を引き起こすことを報告した。本研究では、LRドメインの解析を中心にして、クロマチン凝縮機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

【方法ならびに成績】

本研究では、まず有袋類クマドリンとヒトKi-67抗原のLRドメインがクロマチン凝縮を種を超えて引き起こすことを見出した。つまり、Ki-67抗原のLRドメインの過剰発現はヒト培養細胞及び有袋類培養細胞にクロマチン凝縮を誘導した。逆に、クマドリンのLRドメインもヒト培養細胞にクロマチン凝縮を誘導した。このことは、LRドメインが動物種を超えて機能的に保存され、高次クロマチン構造の構築に関与することを示唆している。

LRドメインのクロマチン凝縮活性に関わる分子機構を理解するために、Ki-67抗原のLRドメインの結合パートナーを酵母ツーハイブリッド法により探索し、HP1との相互作用を見出した。さらに、HP1とヒトLRドメインタンパク質の直接的な結合が、組替えタンパク質を用いた試験管内結合実験で確認された。また、HP1のchromo shadow domain (CSD) がLRドメインとの結合に必要十分であることが酵母ツーハイブリッド法と試験管内結合実験により確認された。

HP1はショウジョウバエでヘテロクロマチン結合タンパク質として初めに同定された、非ヒストンクロマチンタン

パク質である。HP1は、広く真核生物で同定されており、クロマチン上に様々な巨大分子複合体を会合させる構造アダプター因子として機能し、遺伝子サイレンシングや核アッセンブリーに関与していると考えられている。中でもSU(VAR)3-9－HP1複合体は、HP1の介するサイレンシング状態を近傍のクロマチンへと広げてDNA複製中のヘテロクロマチン状態を安定に維持すると考えられ、HP1をクロマチン成分へリクルートすることがヘテロクロマチン形成における重要なイベントであると予想されている。しかし、実際にクロマチン凝縮を引き起こすHP1を含む複合体の構成因子に関してはほとんど明らかにされていない。

そこで、LRドメインとHP1のクロマチン凝縮における役割を明らかにするために、LRドメインとHP1タンパク質の時間的・空間的関係をヒト培養細胞で観察した。固定細胞を特異的抗体で染色したところ、G1期初期の細胞核でKi-67抗原が一部のHP1 fociの近傍に局在することが認められ、Ki-67抗原は核小体構造が未成熟な時期にHP1との相互作用することが示唆された。そこで、分裂期を終え間期に入る時期のKi-67抗原のLRドメインとHP1の挙動を経時的な生細胞観察によって同時に追跡した。LRドメインは分裂期中期の染色体と結合していたのが次第に分裂期終期の染色体上に小さな点状に集まり、これに遅れてHP1が蓄積し、G1期初期にはヘテロクロマチン領域で共局在した。後の同期では、Ki-67抗原の大半は核小体に再局在しHP1はヘテロクロマチン領域に留まった。

【総括】

Ki-67抗原のLRドメインは、過剰発現させた細胞核でクロマチンを異常に凝縮させるという驚くべき潜在的な活性を示した。さらに、そのLRドメインは直接HP1と結合することがわかった。これらのことから、Ki-67抗原がHP1を介するクロマチン凝縮機構に中心的役割を果たしている可能性が示唆される。また、両者の細胞内局在様式から、HP1とKi-67抗原のクロマチンへ作用する順序が推測される。すなわち、核の再構築過程において間期ヘテロクロマチン構造が再形成される際に、HP1のCSDとLRドメインとの相互作用を通してKi-67抗原はHP1をリクルートし、他のヘテロクロマチン成分を間期ヘテロクロマチンを形成すべき領域にリクルートすることが予想される。このように、本研究によってKi-67抗原とHP1の相互作用が高次クロマチン構造の状態を制御することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は増殖細胞のマーカータンパク質Ki-67抗原のC末端領域LRドメインに着目し、高次クロマチン構造の構築機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした研究である。

本研究において、クロマチン凝縮を誘導するKi-67抗原LRドメインの結合因子を酵母ツーハイブリッド法により探索しHP1タンパク質が同定された。HP1はヘテロクロマチン構築に寄与する核タンパク質であり、これとの相互作用の発見はLRドメインのクロマチン構造構築における機能を考える上で、非常に重要な手掛かりとなり得る。

HP1タンパク質とKi-67抗原LRドメインの直接結合を試験管内結合実験により確認した上で、相互作用することの生理的意義を考えるために、本研究ではさらに細胞内における両タンパク質の局在様式を、固定細胞及び生細胞の蛍光顕微鏡観察により解析した。それらの結果から、分裂期の終わりからG1期初期にかけHP1とKi-67抗原が凝縮クロマチン上で共局在することが示唆され、クロマチン構造の分裂期染色体から間期ヘテロクロマチンへの変換にKi-67抗原がHP1と協調的に関わっている可能性が示された。

HP1を含む間期ヘテロクロマチン構造の構成成分のうちいったい何がクロマチンの凝縮活性を司っているのか未だ明らかではない。本研究で示された、クロマチン凝縮活性を有するKi-67抗原のLRドメインとHP1との相互作用は、高次クロマチン構造の構築分子メカニズム解明に向けた研究の端緒として、意義深い成果である。

以上の点から、本研究は学位の授与に値すると考えられる。