

Title	Interaction of the chromatin compaction-inducing domain(LR domain)of Ki-67 antigen with HP1 proteins
Author(s)	亀高, 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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	かめ 亀 たか 高 あい 愛
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 5 7 8 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 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. (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) 教 授 米田 悦啓 (副査) 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ム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・空間的關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。