

Title	Identification and Characterization of a Novel Chromosomal Protein, HP1-BP74
Author(s)	林原, 加代子
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58365
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

氏名	林原加代子
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 24136号
学位授与年月日	平成22年6月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学位論文名	Identification and Characterization of a Novel Chromosomal Protein, HP1-BP74 (新規染色体タンパク質HP1-BP74の同定および特性解析)
論文審査委員	(主査) 教授 福井 希一 (副査) 教授 四方 哲也 教授 野地 博行 教授 大竹 久夫 教授 原島 俊 教授 金谷 茂則 教授 福崎英一郎 教授 紀ノ岡正博 教授 渡邊 肇 教授 清水 浩 教授 仁平 卓也 教授 藤山 和仁

論文内容の要旨

高等真核生物のゲノムDNAは、細胞内においてタンパク質との複合体であるクロマチンとして存在している。クロマチンは、間期には比較的弛緩した状態で核内に存在するが、細胞分裂期には分裂中期染色体と呼ばれる高度に凝縮した構造体を形成する。染色体の形成は、遺伝情報であるDNA、および染色体に取り込まれているタンパク質が娘細胞へ安全かつ均等に分配されるために必須であるが、その構造構築メカニズムに関する情報は非常に限られている。これまでに提唱された様々な染色体構造構築モデルに共通して見られるのが、クロマチンが染色体構造を形成するまでの凝縮過程において、タンパク質が重要な役割を担っているということである。そこで本研究では、新規の染色体タンパク質を同定しその特性解析を行うことで、クロマチン凝縮に関する新たな知見を得ることを目的とした。

新規染色体タンパク質を同定する方法として、塩処理を用いることにした。これは、染色体タンパク質を染色体との静電相互作用の強さに基づいて分類する生化学的な手法である。まず、HeLa S3細胞から単離および精製した単離染色体について、異なるNaCl濃度条件下における形態を観察したところ、0.35 Mまでは、極端な形態変化は見られず、0.4 Mではじめて顕著な脱凝縮が確認された。続いて、この条件下で染色体から解離したタンパク質を、プロテオーム解析の手法を用いて42種類同定した。これらのうち、Heterochromatin Protein 1-Binding Protein 74 (HP1-BP74)を特性解析の対象とした。HP1-BP74は553アミノ酸からなるタンパク質で、その一次構造から、リンカーヒストンの機能ドメインである球状ドメイン(GD)と相同性の高い領域(BP74GD; M153-T237)を有することが示された。再構築モノヌクレオソームを用いた実験により、BP74GDを含む領域であるBP74Md(K97-K274)はヌクレオソームに結合し、さらに約25 bpのリンカーDNAと相互作用することがわかった。また、NMRによる構造解析から、BP74GDとリンカーヒストンのGDは、一次構造のみならず立体構造の面でも非常に似通っていることが明らかとなった。以上より、HP1-BP74はリンカーヒストン様の構造のみならず、同様の機能も有するドメインを持つことが示された。

HP1-BP74は、マウスHeterochromatin Protein 1 α (HP1 α)の結合因子のスクリーニング(酵母Two-hybrid法)により同定されたタンパク質であり、その結合部位はBP74GD内に含まれるPxLxLモチーフ(P192-L196)であることが報告されていた。HP1 α はchromoshadow domain (CSD)を介して二量体を形成し、W174を通して様々なタンパク質と結合する。その結合タンパク質の多くは、CSD結合モチーフであるPxVxLモチーフもしくはそのバリエーションを有することが知られている。今回、組換えタンパク質を用いたブルダウンアッセイにより、HP1-BP74のHP1 α CSD結合部位が、既に報告されていたPxLxL (P192-L196)ではなく、PxVxL (P255-L259)であることを明らかにした。また等温滴定熱量測定により、BP74MdがHP1 α 二量体とモル比にして1対1で結合することも示した。さらに、BP74Mdのみならず、内在性の全長HP1-BP74もHP1 α と直接結合することを確認した。以上のようにHP1-BP74は、リンカーヒストン様の構造を有するBP74GDを介してヌクレオソームに結合することでクロマトソーム構造を形成し、さらにHP1 α と協調してより凝縮したクロマチン構造を形成すると考えられる。

本研究では、ヒト分裂期染色体の構造構築に関与するタンパク質として、新たにHP1-BP74を同定した。また、HP1-BP74がリンカーヒストン様の構造と機能を有し、さらにHP1 α と結合することを明らかにした。HP1 α は、クロマチン構造制御因子であり、また分裂期には染色体のセントロメア周辺に局在することが知られている。したがって、HP1-BP74は分裂期にはHP1 α と複合体を形成し、セントロメア周辺の染色体構造構築に寄与する可能性も示唆された。今後、HP1-BP74について*in vivo*における機能を明らかにすることで、クロマチン高次構造の構築メカニズムに関する新たな知見が得られると期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文では、分裂期染色体の構造構築に関わるタンパク質として新たにHP1-BP74を同定し、その特性解析を行った結果について述べている。

HP1-BP74は、リンカーヒストンがクロマトソーム構造を構築する際に必須である球状ドメイン(GD)と一次構造において相同性の高い領域(BP74GD)を有する。実際に、組換えHP1-BP74タンパク質と再構築ヌクレオソームを用いた解析から、HP1-BP74はリンカーヒストンと同様にクロマトソーム構造の構築に寄与するのであって、細胞内局在に関しても、リンカーヒストンとの類似性を強く示唆する。HP1-BP74は既知のクロマチン構造因子であるHP1と相互作用するものと考えられており、本論文ではその結合機構を明らかにしている。すなわち、HP1-BP74はPxVxLモチーフを介して、二量体を形成しているHP1のクロモシャドウドメインに結合する。

これまでに染色体構造構築に関わる因子として認められているのは、コンデンシン複合体をはじめとする数種類のタンパク質に限定されており、このことが染色体構造構築メカニズムの全容の解明を困難にしている。本論文では、新規の機能因子を同定し、さらにリンカーヒストンと同様の役割を担うことや、既知のクロマチン構造因子HP1と相互作用することを明らかにすることで、染色体構造構築メカニズムに新規の知見を加えることに大きく寄与するものである。

よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める。