

相原仁 論文内容の要旨

主論文

Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo.

(Nucleosomal histone kinase-1はショウジョウバエ初期胚の分裂期においてヒストンH2Aの119番目スレオニンをリン酸化する)

相原仁、中川武弥、安井潔、太田力、広瀬進、堂前直、瀧尾壙士、金子真弓、武島幸男、村松正實、伊藤敬

Genes & Development 18 巻 8 号 877-888 2004 年

長崎大学大学院医学研究科生理系専攻

(指導教授：伊藤敬 教授)

緒言

真核生物のゲノム DNA はヒストン (H2A、H2B、H3 および H4) と規則的に結合し、クロマチンの基本構造であるヌクレオソームを形成している。近年、ヒストンの翻訳後修飾 (リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化等) が DNA 修復や癌化に深く関与していることが報告されている。しかしながら、未解析のヒストン修飾も数多く残されており、それらの生理的意義も不明である。本研究では、新奇のヒストンリン酸化酵素の同定およびその機能解析を目的とした。

対象と方法および結果

まず細胞核抽出液を用いてヒストンリン酸化活性の検出を試みた。その結果、フリーのヒストンを基質とした場合にはヒストンをリン酸化しないが、ヌクレオソームを基質とした場合にヒストンをリン酸化する活性を見出した。一般的に、フリーのヒストンをリン酸化する活性は細胞質中に多く存在することが知られているが、ヌクレオソーム特異的にヒストンをリン酸化する活性 (Nucleosomal histone kinase activity; NHK 活性) についてはこれまで報告されていなかった。生体内において NHK 活性がクロマチン構造中のヒストンを認識してリン酸化し、それに伴ってクロマチンの機能が制御される可能性が考えられることから、この NHK 活性本体が何であるかは非常に興味深いことである。そこで、まずこの NHK 活性成分の生化学的同定を試みた。

クロマチンを基質に用いたキナーゼアッセイを指標にして、カラムクロマトグラフィー法を用いて

細胞核抽出液から NHK 活性成分のタンパク質精製を進めた。最終精製のカラムクロマトグラフィーで NHK 活性と相関するペプチド断片をシーケンスした。得られたアミノ酸配列をもとにゲノムデータベースでサーチしたところ、このポリペプチドはキナーゼドメインを持ち、分子量約 70KDa であることが判明した。また、その機能については報告されていなかった。そこで、これを Nucleosomal Histone Kinase-1 (NHK-1) と命名した。

次に、ヒストンのリン酸化部位の同定を行った。³²P-ATP でリン酸化ラベルしたペプチド断片のシーケンス、組み換えヒストンタンパク質(リン酸化の候補となる部位をアラニンに変異させたもの)を用いたキナーゼアッセイなどの実験から、ヒストン H2A の C 末端部分 119 番目スレオニン (H2A Thr119) が特異的にリン酸化されることを証明した。

さらに NHK-1 タンパク質の機能解析および H2A のリン酸化動態を調べるために、NHK-1 遺伝子のサブクローニング、組み換え NHK-1 タンパク質 (rNHK-1) の作製、NHK-1 抗体および H2A Thr119 のリン酸化を特異的に認識する抗体を作製した。これらを用いた解析から、以下のことが判明した。

rNHK-1 は DNA やフリーのヒストンには結合できないが、ヌクレオソームには強く結合し、H2A Thr119 をリン酸化した。

ショウジョウバエ初期胚細胞の免疫染色により、M 期のクロマチンでは H2A Thr119 は顕著にリン酸化されているが、S 期のクロマチンではリン酸化のシグナルはほとんど確認されなかった。このリン酸化の動態と一致して、NHK-1 は M 期ではクロマチンに集積するが、S 期では細胞質に拡散していることがわかった。

ウエスタン解析から、細胞質中の H2A Thr119 はほとんどリン酸化されていないのに対してクロマチン画分ではリン酸化が顕著に見られた。このことは、生体内において NHK-1 がクロマチン特異的に H2A Thr119 をリン酸化することを強く示唆する。

NHK-1 のアミノ酸配列をもとにホモログ検索を行ったところ、興味深いことにヒト、マウス、アフリカツメガエル、線虫、出芽酵母等、多くの生物で相同なタンパク質が見つかった。また H2A Thr119 はほとんどの真核生物において保存されている。これらのことは、NHK-1 family による H2A Thr119 リン酸化の機能が進化的にも保存されていることを支持する。実際に HeLa 細胞でリン酸化されることを確認している。また出芽酵母抽出液にもクロマチン特異的に H2A Thr119 をリン酸化する活性が存在することを確認している。さらに、癌細胞では正常組織と比較してリン酸化が亢進する結果を得ており、癌治療のよい標的となる可能性が考えられる。

考察

本研究では、ヌクレオソーム特異的にヒストンをリン酸化する NHK-1 の精製・同定にはじめて成功し、NHK-1 が H2A Thr119 をリン酸化することを *in vitro* および *in vivo* において証明した。また NHK-1 によるリン酸化が種を越えて保存されており、このリン酸化は生理的に重要な意味を持つと考えられる。