

| | |
|----------|--|
| 氏名 | もり さわ がく 森 澤 学 |
| 学位(専攻分野) | 博士(理学) |
| 学位記番号 | 理博第2347号 |
| 学位授与の日付 | 平成13年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科・専攻 | 理学研究科生物科学専攻 |
| 学位論文題目 | 高等植物由来のMAR結合タンパクに関する研究 (コムギ AHM1 とシロイヌナズナ AtHMR1 の機能解析) |
| 論文調査委員 | (主査) 助教 飯 哲 夫 教授 西村いくこ 教授 長谷あきら |

論 文 内 容 の 要 旨

染色体 DNA は MAR (matrix attachment region) と呼ばれる特定の領域を介して核内の骨格様構造である核マトリクスと相互作用することが知られている。MAR と核マトリクスの相互作用は染色体 DNA の機能的ドメインの構築をはじめ、その他種々の核内反応に重要であることが示唆されているが、その分子機構については不明の点が多い。本研究では、核機能発現における MAR の果たす役割を明らかにすることを最終目的とし、MAR と特異的に結合する 2 種の因子の解析を行った。申請論文の内容は大きく 2 つに分けられ、前半ではコムギ由来の AHM1 (AT hook-containing MAR binding protein 1) の同定と機能解析について、後半では AtHMR1 (*Arabidopsis thaliana* high mobility group-I/Y related protein 1) の同定と機能解析について詳述されている。

申請者は、AHM1 が 542 アミノ酸からなる multi-domain タンパクであり、特徴的な領域として、コシャペロンに見られる J ドメイン様の配列、Zn フィンガー様配列、DNA 結合モチーフとして知られる AT フックなどを持つことを示した。種々の変異タンパクの解析から、MAR との結合には AHM1 の C 端に位置する AT フックが必要不可欠であること、in vivo における結合においては、AT フックに加えて分子中央部にある Zn フィンガー様配列とその C 端の領域も補助的に機能することを明らかにした。DNA との結合特異性を詳細に解析し、AHM1 が MAR に対して非常に高い親和性を示すこと、その結合において AHM1 は MAR 配列中の AT 塩基対に富む部分の副溝側から相互作用することを明らかにした。また、抗 AHM 抗体を用いた解析により、AHM1 が核質に局在する核マトリクスタンパクであることを証明した。これは内部核マトリクスに局在する MAR 結合因子として植物では最初の同定となる。さらに、AHM1 が核質内の特定の構造体と共局在していることを示唆する結果も示している。申請者は、J ドメイン様配列と Zn フィンガー様配列をペアで持つ因子が植物には多数存在することを見だし、これら 2 つのドメインが協調して機能していることを示唆した。J ドメインはシャペロンである HSP70 と相互作用しタンパクの構造変化に関与するとされる。申請者は、AHM1 の機能について議論し、AHM1 は、核マトリクスと MAR 銀をつなぐとともに、J ドメインを介してシャペロンをリクルートし、核内のタンパク複合体の形成と維持に関与しているという仮説を提唱した。

AtHMR1 は、480 アミノ酸からなるタンパクで、N 末端近傍にはヒストン H1 のグロビュラードメインと相同性のある領域とグルタミンに富む領域が、中央部から C 末端の領域には 6 コピーの AT フックが存在する。申請者は、AtHMR1 と MAR の結合には AT フックを含む C 末端側の領域が重要であること、AtHMR1 は DNA の副溝を介して MAR と相互作用していること、核小体を除く核質部分に存在することを示した。AtHMR1 遺伝子のプロモーター領域には Type I エレメントをはじめ、ヒストンの転写制御に関わるシスエレメントと類似した配列が複数見出された。そこで、AtHMR1 の発現パターンの解析を行った。その結果、AtHMR1 mRNA はヒストン H1 mRNA と同様、細胞の増殖活性に依存して発現することを明らかにした。AtHMR1 は構造上ヒストン H1 と HMG-I のそれぞれに類似性を持つ。これらの因子は共通してヌクレオソームレベルで機能すると考えられる。発現様式の比較や AtHMR1 の MAR 結合能も合わせ、各因子の機能と

植物のクロマチン構造の独自性について考察した。

論文審査の結果の要旨

核マトリクスは核内の骨格様構造であり、ほぼ全ての核内反応はこの核マトリクス上で起こると考えられている。染色体 DNA も MAR と呼ばれる特定の領域を介して核マトリクスと相互作用しており、その結果生じる染色体 DNA のループはある種の機能単位を形成していると考えられている。また、MAR は転写、複製、組み換えなど様々な核内反応にも関与していることが示唆されている。しかし、MAR を介した核機能発現の分子機構については未だ不明な点が多く、特に植物細胞の核内構造ならびに MAR 結合因子に関する知見は極めて乏しい。申請者は、植物の核機能の発現に関する理解を深めることを目的とし、MAR と核マトリクスの相互作用ならびに MAR 結合因子に着目して研究を進めた。申請論文は大きく分けて2つの内容からなる。前半ではコムギ由来の MAR 結合因子 AHM1 の解析結果が、後半ではアラビドプシス由来の AtHMR1 の解析結果が詳述されている。

申請者は、まず、AHM1 の全構造を明らかにし、ついで MAR との結合に必要なドメイン解析、結合特異性の解析をした。その結果、MAR の結合には AHM1 の C 末端近傍の AT フックが必要不可欠であること、Zn フィンガー様配列を含む分子中央部も補助的に機能することを明らかにした。MAR に共通する性質は、数百塩基対以上の長さの AT に富む領域であるということだけで、そこには明確なコンセンサス配列は見いだされていない。申請者は他に例のないきめ細かな結合実験を繰り返し、AHM1 が単なる AT 指向性の DNA 結合タンパクではなく、極めて MAR 特異的に結合することを示した点は評価できる。次に、AHM1 の細胞内局在性を抗体を用いて検討し、AHM1 が内部マトリクスに局在することを明らかにした。さらに、AHM1 が核質内の構造体と共局在することを示唆する結果を提出している。これは、内部核マトリクスを構成する MAR 結合タンパクとして植物では最初の同定である。申請者は AHM1 の N 末端近傍に J ドメイン様配列を見いだした。J ドメインがシャペロンとの相互作用に関わる領域であることを踏まえ、AHM1 の機能について、多くの因子から構成される核内の複合体（反応装置）形成への関与、あるいは熱ストレスなどからの核機能の回復への関与を議論している。また、J ドメイン様配列とともに Zn フィンガー様配列をペアで持つタンパクが植物にのみ多数存在することを指摘している。以上の議論は MAR のもつ新たな機能を予想するものであり、また植物独自の複合体構築の機構を想像させるものでもある。今後の研究の1つの方向性を明示している点で意義深い。

申請者は、AtHMR1 についても、MAR との結合に必要な領域、MAR との結合特異性、核質への局在を明らかにした。また、AtHMR1 がヒストン H1 と同様の増殖活性に依存した発現様式を取ることを示した。AtHMR1 の特徴はヒストン H1 と HMG-I の両者に類似性を持つことである。このことや発現解析の結果などを踏まえ、これらの因子のヌクレオソームレベルでの機能およびその共通性と独自性、さらに植物のクロマチン構造の特殊性を議論している。

植物においてはこれまで内部マトリクスに局在する MAR 結合タンパクについての情報は得られていなかった。この点で、申請者による AHM1 の同定は高く評価できる。AtHMR1 に関しては類似の因子が報告されているが、タンパクレベルでの解析は全くなされていない。MAR の示す多様な機能は、多数の MAR 結合タンパクの働きによるものと考えられる。申請者による MAR 結合タンパクの研究は、核機能発現のメカニズムを理解するための基礎をなすものである。このように本申請論文は、優れた内容をもつ大変意義深い論文であり、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成13年1月17日主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心にして、これに関連研究分野について口頭試問した結果、合格と認めた。