

氏名	緒方規男
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第559号
学位授与の日付	昭和55年7月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	ADP-ribosylation of Histone H1 (ヒストン H1 の ADP-リボシル化)

論文調査委員 (主査) 教授 沼正作 教授 村地孝 教授 早石修

### 論文内容の要旨

ポリ(ADP-リボース)は、酸化還元の助酵素 NAD より真核細胞の核において合成される核酸様高分子である。その機能については未だ不明な点が多いが、DNA 合成、DNA 修復、細胞分化、癌化に関連しているといういくつかの報告がある。細胞核内においてポリ(ADP-リボース)はヒストン、その他の核蛋白質と結合していることが示唆されているが、その詳細はいまだ不明である。著者は本ポリマーがヒストンに結合していることの証明と、その機能の手がかりを得るため、ヒストン上の結合部位の解析を行った結果、グルタミン酸残基の側鎖及びC末に結合することを明らかにした。

ラット肝より得たクロマチンを [ $^{14}\text{C}$ (リボース)]NAD と反応後、ヒストン H1 画分を5%過塩素酸にて抽出した結果、主としてモノADP-リボシル化されたヒストン H1 を得た。化学的安定性の解析より、ADP-リボースとヒストンとの結合はエステルであることが示唆された。

結合部位の解析を進めるため、まずADP-リボシルヒストン H1 をN-ブromoサクシイミドで二分した後、N末側及びC末側二つの断片をそれぞれ蛋白分解酵素により消化し、生じたペプチドの精製を行うという手段をとった。まずN末断片をトリプシン及び蛇毒ホスホジエステラーゼにより消化し、放射活性を持つペプチドを精製したところ、N末1~15残基に由来する断片を得た。これをさらに他の蛋白分解酵素で処理することにより、最終的にN末1~3及び11~15残基に由来するペプチドを得た。これらのペプチドは [ $^{14}\text{C}$ ADP-リボース残基に由来する [ $^{14}\text{C}$ ]リボース-5-リン酸をそれぞれ当モル量結合していた。これらのペプチドは2番目及び14番目におおの1個ずつグルタミン酸残基を有しており、結合の状態がエステルであること、及び電気泳動における移動度より、ADP-リボースはこれらの残基の $\gamma$ -カルボキシル基に結合していることが明らかとなった。一方、C末断片において同様の解析を行った結果、ADP-リボースはC末のリジン残基の $\alpha$ -カルボキシル基にエステル結合していることが明らかとなった。この知見は蛋白質のC末の修飾という点において、きわめて珍しい例である。

ヒストン H1 においてはその分子の両端附近においてADP-リボシル化が起ることを明らかにしたが、

この部分は極性な残基に富み、DNA との相互作用に関与すると考えられている。従って、ポリ(ADP-リボシル)化はヒストン・DNA 相互作用に大きな影響を及ぼすと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

ラット肝より得られたクロマチンを [ $^{14}\text{C}$ (リボース)]NAD と孵置した後ヒストン H1 を5%過塩素酸で抽出し、モノ ADP-リボシル化されたヒストン H1 を得た。化学的安定性の解析から ADP-リボースとヒストンの結合はエステルであると推論された。次に ADP-リボシルヒストン H1 を N-ブロモサクシמידで切断し、得られた2個のペプチドを種々のたん白分解酵素で消化し、放射活性をもつペプチドの断片を分離精製して、電気泳動における移動度や化学的安定性を調べた結果から、ADP-リボースはヒストン H1 の2番目及び14番目のグルタミン酸残基の  $\gamma$ -カルボシル基および C 末のリジン残基の  $\alpha$ -カルボキシル基にエステル結合している事が証明された。このようにヒストンの両端近傍に ADP-リボースによる修飾がおこることは、この部分が DNA との相互作用に関係するという従来の知見から考え、ADP-リボシル化反応がヒストンと DNA 相互作用の調節に重要な役割を演じている事を示している。

以上の研究は ADP-リボシル化反応のたん白化学的解析に貢献し、その生理的意義の解明に寄与するところが多い。

したがって本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。