

学位論文題名

ヒト HP1結合タンパク質の網羅的同定とそこから
見いだされた新規 HP1結合タンパク質 POGZ の機能解析

学位論文内容の要旨

<研究の目的>

ヘテロクロマチンとは、光学顕微鏡による細胞の核の観察から他の核質に比べて濃く染色される領域として 80 年以上も前に定義された。ヘテロクロマチンは細胞周期を通じて凝縮していることから、不活性な染色体領域と長い間考えられてきたが、近年様々な遺伝子の発現制御、染色体の維持や伝達に重要な働きをしていることが明らかとなってきた。ヘテロクロマチンの主要な構成タンパク質として HP1 (Heterochromatin Protein 1) が知られており、ヘテロクロマチンのマークであるメチル化されたヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) に結合し、遺伝子の発現制御、動原体や染色体末端保護に関わるタンパク質など、様々なタンパク質を染色体上にリクルートする足場として働き、ヘテロクロマチン領域の特色を決めると考えられている。また HP1 は細胞周期を通じてダイナミックにその局在を変化させ、分裂期ではほとんどの HP1 は染色体腕部から解離することが知られている。このことは H3K9 の隣のセリン (H3S10) がクロモソームパッセンジャー複合体 (Chromosome Passenger Complex ; CPC) の構成因子の 1 つである Aurora B キナーゼによってリン酸化され、HP1 がメチル化された H3K9 に結合できなくなることによるとされている。しかしながら、HP1 の局在制御の詳しい分子メカニズムや意義は明らかになっていない。私は、プロテオミクスによる HP1 結合タンパク質の網羅的な同定を行うことによって、HP1 の機能やその制御を理解することを試みた。

<結果・考察>

Flag タグを付加した野生型 HP1 に加えて、6 種類の欠失あるいは変異 HP1 の発現を誘導できるヒト培養細胞株を樹立し、それぞれの HP1 複合体を免疫精製した。同定された HP1 結合タンパク質候補のそれぞれに対して、免疫沈降産物中のタンパク質量を定量することにより、結合プロファイルを作製した。このプロファイルをもとに再現性と濃縮効率の 2 つの指標を定義し、有意な HP1 α 結合タンパク質として 82 種類を同定した。その中には、今まで報告のあった動原体 Mis12 複合体、染色体合着関連因子 hSgo1、分裂期進行に関わる CPC だけでなく、ヒストンの修飾酵素やリモデリング因子などが含まれていた。従って HP1 は、染色体機能を制御する様々なタンパク質と結合することによって、特色ある染色体環境に変換するエフェクター因子として機能すると考えられた。

同定した 82 種類の HP1 結合タンパク質を、HP1 との結合様式によって分類するために、得

られた結合プロフィールを使い分類した結果、4種類のグループに分けることができた。HP1は2量体化し、さらに2量体化によって形成される疎水面を介してPxVxL (P=プロリン、V=バリン、L=ロイシン、x=任意のアミノ酸)配列モチーフ (PxVxLモチーフ)を持つ様々なタンパク質と結合することが知られている。同定したHP1結合タンパク質のうち79種類は、疎水面に変異の入ったHP1に結合しなかったことから、PxVxLモチーフを介して2量体化したHP1に直接結合するか、PxVxLモチーフと結合して間接的にHP1と結合していることがわかった。しかし、新規HP1結合タンパク質であるPOGZはHP1の疎水面を必要としなかった。このことから、POGZはHP1との特殊な結合様式を介して、他のHP1結合タンパク質とは異なる種類の機能に寄与していると考えられた。

酵母2ハイブリット法を用いることにより、POGZはPxVxLモチーフではなく、ジンクフィンガーによく似たHPZ (HP1 binding zinc finger like motif)を介してHP1と結合していることがわかった。POGZのHPZを含む60アミノ酸の断片をHeLa細胞に過剰発現させると、PxVxLモチーフを持つタンパク質と競合的にHP1に結合し、さらに、HP1がクロマチンから遊離した。これらの結果から、POGZはHPZを介してHP1と結合し、HP1とクロマチンおよびHP1結合タンパク質との結合を不安定化させる機能があることが示唆された。

POGZをRNA干渉法により機能阻害 (ノックダウン)すると、分裂期の進行に異常が観察され、さらに分裂期染色体では通常セントロメア付近に局在するHP1やINCENP、Aurora BキナーゼなどのCPC構成因子が染色体腕部全体に広がって局在した。加えて、Aurora Bキナーゼの活性が顕著に低下しており、分裂期染色体上でのH3S10のリン酸化が十分起こっていないことがわかった。このPOGZをノックダウンしたときの様々な表現型は、siRNAに耐性なPOGZを細胞に戻すことにより回復した。一方、HPZに変異を導入したPOGZはこれらの表現型を相補できないこと、HPZを含む60アミノ酸のペプチドを発現させるだけで表現型を相補できたことから、分裂前期のAurora Bキナーゼの活性化には、POGZが必須でありPOGZのHPZを介したHP1との相互作用が必要であることがわかった。CPCは、その構成因子であるINCENPのPxVxLモチーフを介してHP1に直接結合することで分裂前期に染色体腕部に結合することから、CPCの局在や活性は、POGZによって制御されていることが予測された。これらのことから、まず分裂前期の染色体腕部においてPOGZはHPZを介してCPCと競合的にHP1と結合し、CPCがHP1から遊離する。さらにHP1がクロマチン上で不安定となる。そして、HP1から解離することによって活性化したAurora Bキナーゼが露出したH3S10をリン酸化し、HP1はリン酸化されたクロマチンと再結合できないため染色体から遊離する、という一連の反応が考えられた。

<まとめ>

HP1結合タンパク質の定量プロテオーム解析から、HP1結合タンパク質を82種類同定し、さらにHP1と全く新規の結合様式をもつPOGZの存在が見いだされた。そしてPOGZの機能解析から、POGZはHP1との結合を介してAurora Bキナーゼの局在と活性を制御することが明らかとなった。このことは、これまで不明であった分裂前期のCPCのダイナミックな局在変化とAurora Bキナーゼの活性化のメカニズムの解明の大きな一歩である。またHP1はヘテロクロマチンの構造的な役割やHP1結合タンパク質の染色体上での単なる足場として働いているだけではなく、POGZのような分子と協調して、HP1結合タンパク質の機能にさらなる多様性や制御、他のイベントとの連携を付与するというHP1の機能の新しい側面が見えてきた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小布施 力 史
副 査 教 授 田 中 勲
副 査 准教授 福 井 彰 雅
副 査 教 授 村 上 洋 太 (総合化学院)

学位論文題名

ヒト HP1結合タンパク質の網羅的同定とそこから

見いだされた新規 HP1結合タンパク質 POGZ の機能解析

近年、ヘテロクロマチンの主要な構成タンパク質として知られる HP1 は、様々な結合タンパク質との結合を通じて、転写の抑制機構の構築・制御のみならず、染色体の維持・伝達に重要な役割をしていることが示された。しかし、その多くは HP1 と結合する個別のタンパク質の機能解析を中心とした研究であり、HP1 が如何に様々な相互作用因子とともにヘテロクロマチンの多様な特性に寄与するのかについて、分子生物学的な説明に乏しく、今後の解明が待たれている状況にある。

本論文は、このような現状にあるヘテロクロマチン機能における HP1 の作用メカニズムを明らかにするために、質量分析器を用いて HP1 結合タンパク質の網羅的な同定を行い、HP1 結合タンパク質の全体像を理解することにより、HP1 の機能やその制御を解明することを目的とした。その結果、HP1 結合タンパク質を 82 種類同定することに成功し、インフォマティクスを用いた半定量的な解析から得られた野生型あるいは変異型 HP1 との結合プロファイルから、HP1 結合タンパク質を HP1 への結合様式の違いにより 4 つのグループに分類することができた。この解析をとおして、新規 HP1 結合タンパク質 POGZ は、他の HP1 結合タンパク質とは異なり Zn フィンガー様モチーフを介して HP1 と結合することを見いだした。さらに、RNA 干渉法やイメージングを用いた解析から、POGZ は Zn フィンガー様モチーフにより HP1 に働きかけ、分裂期進行に必須なタンパク質として知られる Aurora B キナーゼの局在と活性を制御することを明らかとした。このことは、これまで不明であった Aurora B キナーゼのダイナミックな局在変化と活性化のメカニズムの解明にとどまらず、様々なタンパク質の染色体上で結合タンパク質の単なる足場として考えられてきた HP1 が、結合タンパク質の機能制御に積極的に関わるという新たな HP1 の機能とそれに関与するメカニズムを提唱したものである。さらに、Aurora B キナーゼは、様々な癌組織で過剰発現や機能亢進していることが知られており、これを阻害する化合物が抗癌剤として開発されているが、POGZ が HP1 を介して Aurora B キナーゼの活性制御を行うという本論文の知見は、Aurora B キナーゼの活性制御に対する新たな分子標的を供することができたという意味で大変有意義なものである。これを要するに、著者は、ヒト細胞において HP1 が如何にヘテロクロマチン形成、機能、制御に寄与しているのかについての分子生物学的な理解に大いに貢献したとともに、HP1 によって制御される Aurora B

キナーゼの活性化メカニズムについての新知見を得たものであり、染色体の分裂期進行メカニズムの解明、および、抗癌剤開発に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(生命科学)の学位を授与される資格あるものと認める。