

氏名・(本籍)	いの 井	うえ 上	あきら 晃
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	理	博 第 2 5 7 号	
学位授与年月日	昭和 4 6 年 3 月 2 5 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
研究科専門課程	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)化学第二専攻修了		
学位論文題目	ヒストンデアセチラーゼの研究		
論文審査委員	(主査) 教授 田 宮 信 雄	教授 瀬 戸 秀 一	教授 旗 野 昌 弘
		助教授 藤 本 大三郎	

論 文 目 次

序	論
第 一 章	研究計画
第 二 章	酵素活性の測定法
第 三 章	Deacetylase の予備的検索
第 四 章	Histone Deacetylase
第 五 章	Labeled Histone の characterization
第 六 章	基質特異性
第 七 章	Histone Deacetylase の 2, 3 の性質
第 八 章	酵素の Multiplicity
第 九 章	Deacetylase の RNA による阻害
第 十 章	核内 Deacetylation
終	論

論文内容要旨

序 論

高等生物のDNAはHistone, Non-histone 蛋白などとComplexを作り, chromatinと呼ばれる構造体を形成している。

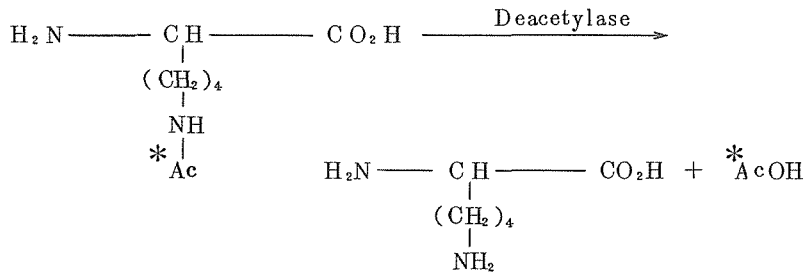
Histoneは1) 分子levelで修飾反応を受け, Lysの ϵ -NH₂基がアセチル化, 脱アセチル化される。2) このアセチル基のturnoverはHistone自身のturnoverに比べて, はるかに速やかです。1), 2)の2点からアセチル基を切断する酵素——Histone Deacetylase——の存在が予想される。

一方, HistoneはDNA依存のRNA合成に対して抑制的な作用を持つが, アセチル化されるとこの抑制作用は減少する。従って, Histone DeacetylaseはRNA合成の調節に関与する可能性があり興味もたれる。

こうした背景のもとに, Histone Deacetylaseについて研究を行った。

第一章 研究計画

Histone Deacetylaseは, アセチル基をlabelしたHistoneから遊離する酢酸の放射能を測定し, 検出, 定量することができる。



まず, radioactive 酢酸を測定する方法(酵素活性の測定法)を確立した。

Deacetylaseの存在が明らかにされたので, 次いで酵素の性質を調べた。

さらに, 本酵素を用いて, Histoneのアセチル化, 脱アセチル化が, RNA合成調節の関係につき, 予備的実験を行った。

第二章 酵素活性の測定法

酵素反応系から酢酸を分離し, その放射能を測定するには, 有機溶媒で抽出する方法が最も再現的であった。

溶媒としては, 抽出効率の高い酢酸エチルを用いた。抽出効率は反応系(水層)の容積によって変わるので, その関係を表わす抽出効率標準曲線を求めた。

酵素活性の測定は, 次の様に行う。

酵素反応が終わったら冷却し、塩酸-酢酸溶液を加えて final 0.125N HCl-0.016M AcOH 溶液とする。これに酢酸エチル 3 ml を加えて冷却後、激しく振盪し、遠心する。透明となった上清(有機層) 2 ml を取り、15 ml の Dioxane scintillator と混ぜて、放射能を測定する。必要な場合は、測定値を描出効率と Counter の計数効率で補正した値 (dpm) で表示する。

第三章 Deacetylase の予備的検索

Histone Deacetylase の存在を予備的に調べた。 ^{14}C -無水酢酸で化学的にアセチル化した仔牛胸腺 Histone を基質として、マウス肝核に Deacetylase 活性を検出した。

至適 pH は 7 である。可溶性酵素と不溶性酵素の 2 種類が存在する。NaOAc, mercaptoethanol, EDTA (いずれも 1.4 mM) で 60~40% 程度、酵素活性が阻害される、などが明らかとなった。

第四章 Histone Deacetylase

基質として native な Histone — 仔牛胸腺の核と ^{14}C -酢酸を incubate し、核内 Histone のアセチル基を label した標品; Labeled Histone — を調製し、Deacetylase についてさらに検討し仔牛胸腺 homogenate に Deacetylase 活性を見出した。

酵素反応で遊離する radioactive Species が酢酸であることを確かめ、この酵素反応は脱アセチル化反応、従って本酵素は Deacetylase であることがわかった。

第五章 Labeled Histone の Characterization

基質 (Labeled Histone) の characterization を行った。

Labeled Histone の放射能はアセチル基に label されており、その 97% が N-アセチルである (第四章)。

Histone を各成分に分け、 $f_2 a_1$, $f_2 a_2$ を純粋に取り出すことが出来た。各成分の Specific activity は $f_3 > f_2 a_2 > f_2 a_1 > f_2 D$, f_1 の順であった。

f_3 , $f_2 a_1$ が酢酸を取込むことは既に報告されているが、 $f_2 a_2$ については初めての観察である。

第六章 基質特異性

Labeled Histone を pronase で消化すると、脱アセチル化されなくなる。

化学的にアセチル基を導入した Histone は、よい基質とはならない。

酵素反応で脱アセチル化した Histone を回収し、polyacrylamide gel 電気泳動で Check した所、Histone の分解は起きていない。

従って、脱アセチル化は intact な Histone で起こること、Histone のアセチル基のうち特定のものを分解することが判る。本酵素は "Histone Deacetylase" である。

第七章 Histone Deacetylase の 2, 3 の性質

1. 本酵素は -20° で半年以上保存できるが凍結融解の操作を繰返すと、しだいに失活する。
2. $65^{\circ}10$ 分又は $37^{\circ}20$ 時間の加温で完全に失活する。
3. 透析や凍結乾燥の操作では、ほとんど失活しない。
4. 反応生成物の NaOAc (13mM) で 80% 阻害される。ε-N-Ac-Lys や塩基性低分子化合物 (NH_4^+ , guanidium chloride, Spermidine) は阻害効果がない。
 Hg_2^{+} , PCMB, $\text{ICH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 等の SH 試薬は 1.4 mM の濃度で酵素を強く阻害する。活性中心に SH 基の存在することが予想される。
5. 高濃度の塩 ($>1\text{MNaCl}$) で、ほぼ完全に阻害される。透析脱塩により、活性は回復する。
6. 至適 pH は 7.0
7. Michaelis 定数は Histone の平均分子量を +2000 として、 $2 \times 10^{-4}\text{M}$ (pH 7.0) である。
8. 本酵素の大部分の活性は、 $10^5 \times g$ の上清に回収される。
活性は核よりも 15~40 倍細胞質に高い。
9. Sephadex G-200 のゲルロは、酵素がカラムの void volume の直後に現われ、本酵素が大きな分子であることを示し、multisubunit enzyme であることが示唆される。

第八章 酵素の Multiplicity

酵素は DEAE-Cellulose に強く吸着し、0.1~0.4 M の NaCl で溶離する。Stepwise の column chromatography では NaCl の 0.20, 0.25, 0.40M の各濃度で溶離し、多成分からなる酵素であること (酵素の multiplicity) が示唆された。
実際、Linear gradient に NaCl 濃度を変えた chromatography を行った所、4つの活性ピークが観察され、酵素の Multiplicity が明らかとなった。

第九章 Deacetylase の RNA による阻害

マウス肝 homogenate について、Labeled Histone を基質とした場合の酵素活性を調べた所、Deacetylase を強く阻害する物質の存在することが判った。
非透析性で、 $10^5 \times g$ pellet に沈澱し、RNase 消化で、その阻害効果が消え、Pronase 消化で増大することから、これは (ribosome の) RNA であると考えられた。
実際、本酵素が RNA で阻害されることが確かめられた。

第十章 核内 Deacetylation

前章までは free の Histone の脱アセチル化を検討したが、次に、DNA との Complex (Chromatin) の level での脱アセチル化について調べた。次の点が明らかとなった。

1. 核内 Histone のアセチルは turnover している (in vitro)
2. 核の Deacetylase は chromatin に結合している。

3. 核膜を毀わして、Chromatin を medium 中に露出しても脱アセチル化反応は起こり、酵素反応に対する Chromatin の susceptibility を増加させる。
4. 可溶性酵素 (exogeneous Soluble enzyme) も chromatin の脱アセチル化を行う。

終 論

仔牛胸腺とマウス肝のHistone Deacetylase を見出し、その2,3の性質について調べた。

今後の課題として、本酵素の精製と作用機作の研究、本酵素にRNA合成調節機構との相関性の研究などが残されている。

論文審査結果の要旨

井上晃提出の論文はヒストンデアセチラーゼの発見とその性質を明らかにしたもので序論および11章より成り立つ。

ヒストンは細胞核内においてDNAと結合して見出される塩基性タンパクであるが、このものが生体内においてアセチル基を得たり、失ったりする反応があることが、最近次第に明らかにされた。

このアセチル化、脱アセチル化はDNAの生理作用の発現、抑制、すなわち遺伝子の働きの発現、抑制に関係をもつ可能性がある。井上はこのような見地からヒストンデアセチラーゼの存在を予想し、その測定法を開発して実際にその酵素を見出した。

すなわち放射性同位元素をもつアセチル基を含むヒストンを作り、このものが胸腺、肝臓等に存在する酵素により脱アセチル化されることを放射性酢酸を定量することにより観察した。

この酵素はヒストン分子にのみ作用しヒストンを加水分解したフラグメントには働かない。すなわち、ヒストンデアセチラーゼである。

この酵素は凍結保存に耐え、加熱で失活し、透析や凍結乾燥に耐える。また生成物であるアセテートで阻害され、また Hg^{2+} 、PCMP、 $I CH_2COOH$ 等で阻害される。至適pHは7.0、ミカエリス定数はヒストンに対し $2 \times 10^{-4} M$ である。

以上井上晃の論文は生理的に重要な意味をもつと予想されるヒストンデアセチラーゼを発見し、その性質を明らかにしたものである。よって審査員らは井上晃提出の論文は理学博士の学位論文として、合格と認めた。