

氏名・(本籍)	ほり うち けん た ろう 堀 内 健 太 郎
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 第 7 3 5 号
学位授与年月日	昭 和 5 8 年 5 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
最終学歴	昭和47年 3 月 東北大学大学院理学研究科 (修士課程) 化学第二専攻修了
学位論文題目	ヒストンの酵素的アセチル化
論文審査委員	(主査) 教 授 田 宮 信 雄 教 授 高 瀬 嘉 平 教 授 小 倉 協 三

論 文 目 次

序 論	
第一章	細胞質可溶性画分のヒストンアセチル化酵素
第二章	フォスフォセルロースロ紙を用いてのヒストンアセチル化活性の測定
第三章	ヒストンのモデルとしての(Lys Gly Gly) ₅ および(Lys Gly Gly) ₁₀ ——DNAとの相互作用および子牛胸腺酵素によるアセチル化——
第四章	ヌクレオソームヒストンアセチル転移酵素
終 論	
文 献	
謝 辞	

論文内容要旨

序論

蛋白質に起こる修飾反応の研究の意義

DNAの塩基配列順序として記されている遺伝情報により支配されているアミノ酸の数は、20種のみである。しかし、実際に蛋白質を取り出してアミノ酸を調べると、200種以上の存在が知られている。これらのアミノ酸は、元の20種のアミノ酸のみでは蛋白質としての機能を発揮させることができないから生じたのである。また、これらのアミノ酸は、蛋白質合成後に、修飾反応を受けたことによって生じたのである。

故に、ある着目した蛋白質上に、その蛋白質が機能を発揮する際に、同調して起こる修飾反応があった場合、その修飾反応の性質を明らかにすることが、元になる蛋白質の生理的意味を明らかにすることにつながる。

ヒストンとは、真核細胞生物細胞核に、DNAと結合した状態で存在している塩基性蛋白質である。DNAとヒストンとの結合は、DNA分子中のフォスフォジエステル結合のリン酸基の負の電荷と、ヒストン分子中のリジンのあるいはアルギニンの正の電荷との間のイオン結合である。もし完全にイオン結合のみであれば、DNAとヒストンとの結合はかなり強固なものになって、遺伝子の転写は起り得ないと言われている。1960年代の研究により、DNAとヒストンとの結合力を弱める方向で働らく反応がいくつか存在することが見いだされた。ヒストン分子中のリジンの ϵ -アミノ基に起こるアセチル化反応もその1つである。(図-1にヒストンのアセチル化を模式的に示した)また、このヒストン分子上に起こるアセチル化反応は、遺伝子発現の前期に起こることが明らかにされていた。故に、このアセチル化反応を、酵素側あるいは基質側から明らかにして行くということは、複雑多岐に渡っていると考えられている遺伝子の発現制御現象の解明の糸口になり得るかも知れない。

そこで、以上の理由から、ヒストン分子に起こる酵素的アセチル化反応に着目し研究を行なった。

第一章 細胞質可溶性画分のヒストンアセチル化酵素

1973年以前、すでに幾つかの組織を用いてヒストンのアセチル化の研究がなされていた。しかし、細胞質由来の酵素か、核由来の酵素かの区別もまだ明確にはなされていなかった。更に、アセチル基受容体としてのヒストン側の研究では、生体内でのヒストンのアセチル化部位の研究は、一次構造の研究とあいまって、かなり明確になっていたが、試験管内でアセチル化したヒストンに関しては、殆んど行なわれていなかった。そこで、組織として子牛胸腺を用い、細胞質可溶性画分を酵素原として、ヒストンのアセチル化を行なわせ、アセチル化部位を明らかにし、次いで、アセチル化ヒストンの性質について検討した。

この章で明らかにしたことは、先ず細胞質可溶性画分の酵素によるアセチル化反応のアセチ

ル基受容体は、H4 ヒストン特異的であったという点である。次にアセチル化部位については、生体内でアセチル化されている部位と全く同じであったということを明らかにした。このアセチル化ヒストンは、子牛胸腺からとったヒストン脱アセチル化酵素の基質となった。しかし、サーモライシン消化して得られた H4 ヒストンのペプチドは基質にならなかった。

第二章 フォスフォセルロース口紙を用いてのヒストンアセチル化活性の測定

1975年以前に用いられていたヒストンのアセチル化活性測定法は、トリクロル酢酸を用い、アセチル化ヒストンを沈殿させ、その沈殿中の放射能を測定するという方法であった。ヒストンは比較的小分子の塩基性蛋白質であるため、沈殿力が弱く、それ故、再現性が低くしかもバックグラウンド値が高かった。更に、ヒストン類似な小分子のアセチル化反応測定などには使えない等、この方法には常に多くの問題が存在していた。

この章で示した方法は、フォスフォセルロース口紙を吸着材として用い、塩基性蛋白質であるヒストンを特異的に吸着させ、その中に取り込まれた放射能の量を測定するという方法である。

我々の開発したこの方法は、アセチル化した後でも塩基性であるということが必要条件であるが、この条件さえ満たされていれば、かなり小さいペプチドのような物質のアセチル化も測定することが可能である。

第三章 ヒストンのモデルとしての(Lys Gly Gly)₅および(Lys Gly Gly)₁₀——DNAとの相互作用および子牛胸腺酵素によるアセチル化——

ヒストン分子は、生理的イオン強度下で、分子間相互作用を行なうことが知られている。この分子間相互作用があるため、ヒストンのアセチル化による影響がなかなか観察されなかった。一方、ヒストンの一次構造が明らかになると、アセチル化部位において、かなり共通の構造があることが明らかにされた。そこで、アセチル化部位のモデルとして(Lys Gly Gly)₅および(Lys Gly Gly)₁₀を化学的に合成し、DNA との相互作用、そしてアセチル化酵素を用いてアセチル化した時のDNA との相互作用の変化等、詳細に検討を加えた。

この章で示したように、(Lys Gly Gly)₅および(Lys Gly Gly)₁₀は、DNA との相互作用に関しても、ヒストンアセチル化酵素の基質としての性質に関しても、かなり特徴的性質を示し、これらペプチドは、ヒストンのアセチル化部位で、しかも、DNA と相互作用を行なう部位の良いモデルとなるという結論を得た。

第四章 ヌクレオソームヒストンアセチル転移酵素

この章の研究が開始される以前までに、ヒストンのアセチル化酵素には、少なくとも細胞質の酵素と、核内の酵素の二種が存在していると言われていた。そうすると、核内のアセチル化酵素の基質としては、クロマチンの構成単位であるヌクレオソームであることが十分に考えられ

たが、その様な方向からの研究は全くなされていなかった。

そこで、この章では、先ず、クロマチンに結合しているヒストンアセチル化酵素の基質が、ヌクレオソームを構成しているヒストンであることを明らかにし、次に、クロマチンからその酵素を抽出してもやはりヌクレオソーム構成ヒストンが基質になるということを明らかにした。

この研究がなされる以前では、核内のヒストンアセチル化酵素に関して、基質特異性がかなり広いという考えがあった。しかし、ヌクレオソーム構成ヒストンが基質であるとする、この酵素はかなり高い基質特異性を持つということになる。

終 論

各章で明らかにした点をそれぞれまとめると

第一章 細胞質の酵素は H4 ヒストンに対して特異的にアセチル基を導入した。

第二章 P-セルロースろ紙を用いたヒストンのアセチル化活性測定法は非常に有用であった。

第三章 (Lys Gly Gly)₅ および (Lys Gly Gly)₁₀ はヒストン分子のアセチル化、および DNA との相互作用の研究において良いモデルとなった。

第四章 核内ヒストンアセチル化酵素の基質はヌクレオソームを構成しているヒストンである。

ということになる。

しかし、本研究を開始した時点から現在に至るまでヒストンのアセチル化の意味について歴然と明らかになったということはない。その原因の1つとして、酵素の精製がなかなか進まないということが指摘できる。そこで今後の課題として最も大切であると考えている点は、酵素の精製である。抗体の作成可能なまで精製できることが一番必要のように思える。

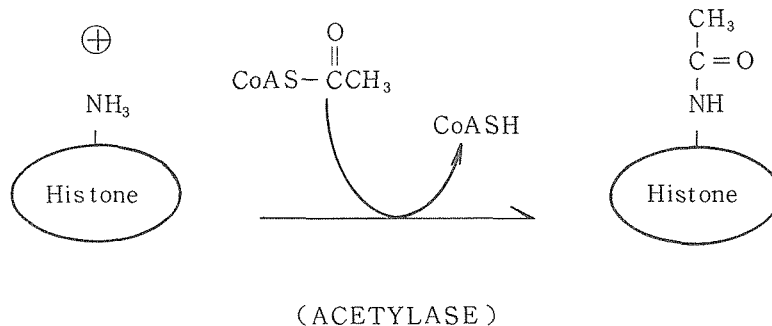


図-1 ヒストンのアセチル化の模式図

論文審査の結果の要旨

堀内健太郎提出の論文は高等動物の細胞質および細胞核に存在するヒストンをアセチル化する酵素につき、新しい測定法を開発し、その方法を用いて本酵素の諸性質を明らかにしたものである。

ヒストンは真核生物細胞核内にデオキシリボ核酸と結合して存在する塩基性タンパク質である。デオキシリボ核酸は遺伝子の本体であるが、ヒストンと強く結合した状態では遺伝情報を発現し得ない。核内に存在するヒストンアセチラーゼはヒストンをアセチル化することによりこのタンパクの塩基性を中和し、核酸との結合を弱める作用をもつ。又細胞質に存在するヒストンアセチラーゼは細胞質中で合成された塩基性タンパクヒストンを核内に輸送するため電荷の一部を中和するものと考えられる。

ヒストンアセチラーゼはこのように生理的に重要な働きをされるとされる酵素である。堀内は放射性をもつアセチルコエンチーム A とヒストンを基質とし、本酵素を作用させたときに生じる放射性をもつヒストンをホスホセルロースの膜に吸着させ、膜の放射能を測定するという簡単な測定方法を開発した。

ついで細胞質のヒストンアセチラーゼにつき、この酵素が H4 ヒストンの12位, 16位のリシンの ϵ -アミノ基をアセチル化することを示した。またこの酵素が合成ペプチド(Lys Gly Gly)₃ および(Lys Gly Gly)₁₀ をアセチル化し、アセチル化された合成ペプチドは DNA との結合が弱まることを示した。

堀内はついで細胞核内に存在する酵素について検討し、この酵素がクロマチンの中に内在するヒストン、特に H4 ヒストンをアセチル化することを示した。またこの酵素は 0.6M KCl で可溶化することができ、可溶化した酵素はヌクレオソームコアを形成するヒストン成分全てをアセチル化することを明らかにした。

以上堀内健太郎提出の論文は生体における遺伝子、デオキシリボ核酸に結合して存在するタンパク質ヒストンをアセチル化する酵素、ヒストンアセチラーゼにつき、測定法を開発し、その方法を用いて多くの実験を行い、ヒストンアセチラーゼの性質を調べたものである。

以上の成果はヒストンおよびヒストンアセチラーゼの研究に大いに貢献したものであり著者が独立して研究活動を行うために必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって堀内健太郎提出の論文は理学博士の学位論文として合格と判定する。