

氏名	なか やま ゆう じ 中山 祐 二
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第49号
学位授与年月日	平成17年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	A Nuclear Targeting Determinant for SATB1, a Genome Organizer in the T cell Lineage (T細胞内核構造オーガナイザーSATB1の核局在化シ グナル)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤 健 三 (副査) 林 眞 一 押村光雄

## 学位論文の内容の要旨

胸腺特異的発現を示し、T細胞の活性化と共に核内に特殊な局在を示す核タンパク質 SATB1 (Special AT-rich Sequence Binding Protein 1) は、BUR(Base Unpairing Region)と呼ばれる、負の巻き戻し力が働く時に二重鎖が解離することによって局所的に非 B 型 DNA 構造を取るような特殊な配列を認識し、クロマチンループ基底部分を核マトリックスにつなぎ止めることで種々の遺伝子の発現制御に関わっている。SATB1には主として、二量体化に不可欠である PDZ ドメインと、DNA 結合に関する MAR 結合ドメイン、およびホメオドメインの 3つのドメインがある。しかし、SATB1の核内への移行を司る核局在化シグナル (NLS: Nuclear Localization Signal) は見つかっていなかった。本論文では SATB1の核局在化シグナルの同定を試み、発見した報告をする。

### 方 法

異種間の SATB1 ファミリータンパク質のアミノ酸配列の相同性は、Hidden Markov Model をベースにしたアルゴリズムを用いて解析した。細胞内局在を解析するために、N 末端側に EGFP タグのついた SATB1 の様々な変異体(部分欠損またはアミノ酸置換変異体)を作製した。さらに SATB1 の核局在化シグナルの最小領域を同定するため、SATB1 の N 末端側由来の種々の領域を EGFP および細胞質内局在タンパク質である Pyruvate Kinase の下流に融合させたキメラタンパク質を発現させ、同様に解析した。各々の発現ベクターは骨肉腫由来細胞株である U2OS 細胞、または子宮頸部ガン由来細胞株である HeLa 細胞にリポフェクション法により導入し、発現したキメラタンパク質の EGFP シグナルを蛍光顕微鏡下で観察することで細胞内局在を解析した。それぞれの EGFP 融合キメラタンパク質の発現はウエスタンブロット法を用いて確認

した。

## 結 果

アミノ酸 89 番目以前の N 末端側全部を欠損したクローン（以下 変異体 89）および、N 末端側 89 番目のアミノ酸までの領域で特によく保存されているアミノ酸（26-41）配列（以下、領域 1）の欠損体はどちらも核に局在しなかった。一方で領域 1 を含む種々の長さの断片すべてが細胞質内局在タンパク質である pyruvate kinase を核内に移行させたことから、N 末端側のアミノ酸（20-40）領域が SATB1 の核局在化シグナルの最小責任領域であることを示した。さらにこの領域内で、異種間で非常によく保存されているいくつかのアミノ酸に着目し、1 アミノ酸置換変異体を作製したところ、29 番目の K（リジン）および 32 番目の R（アルギニン）をアラニンに変換した変異体において核移行が阻害されるという結果を得た。また様々な生物種のアミノ酸配列を比較、解析した結果、SATB1 および SATB2 には種を超えたタンパク質ファミリーが存在していることが示された。

## 考 察

従来報告されている核局在化シグナルのモチーフには主として正の電荷を持つリジンやアルギニンが複数個連なった配列が 1 つ、または 2 つ含まれている (classical 核局在化シグナル) が、SATB1 の領域 1 内のアミノ酸配列は classical 核局在化シグナルのいずれとも相同性がなかった。また classical 核局在化シグナルとして分類されない既知の核局在化シグナルとの比較においても、領域 1 はそのどれとも相同性は見られなかった。さらに核局在化シグナルを予測するアルゴリズムを用いて、SATB1 の全アミノ酸領域を調べたが、領域 1 を含めて核局在化シグナルと考えられる配列は見つからなかったことから、領域 1 が SATB1 の新規の核局在化シグナルとして同定された。

本研究において様々な種を超えて、SATB1 および SATB2 にアミノ酸の相同性が高いファミリータンパク質が存在することが示唆された。驚くべき事にショウジョウバエという無脊椎動物においても、そのアミノ酸配列の相同性が高い *dve* という遺伝子が見つかった。*dve* (*defective proventriculus*) 遺伝子は胚でよく発現している核内タンパク質で、種々の組織の発生過程に関与している AT-DNA 結合因子として知られている。このことから考えても、SATB1 が担っている BUR を介したクロマチンループ構造の制御と遺伝子発現調節という機能が、種を超えて普遍的なものであると考えられる。BUR は AT に富んだ特殊な DNA 配列であり、従来 junk 配列やリピート配列の一種としてゲノム上の大部分を占める機能不明の配列の中に分類されていた。しかし、BUR のような配列が確かな機能的意味を伴ったものであるかどうかを網羅的にあるいは局所的に解析していけば、ゲノム DNA のドメイン構造レベルでの遺伝子発現制御機構の解明に大きく貢献するはずである。その点において、組織特異性と種を超えた普遍的機能性を兼ね備えた SATB1 は、他に類を見ない絶好の解析対象である。

## 審査結果の要旨

本研究は、胸腺特異的に発現し、特にT細胞分化過程において種々の遺伝子の発現制御に関わっている核タンパク質 SATB1 の、核局在化シグナルを同定したものである。また本研究では無脊椎動物をも含めた様々な種間で、SATB1 のタンパク質ファミリーが存在している事が示された。SATB1 はクロマチンループ基底部を核内骨格構造である核マトリックスにつなぎ止める事により、そのループ構造を制御し、種々の遺伝子発現制御を行っている。このことから、SATB1 は核内構造と遺伝子発現制御の関係を直接的につなげる、T細胞特異的な遺伝子発現のオーガナイザーとして注目に値する。その核タンパク質である SATB1 の核局在化シグナルが同定されたことは SATB1 の活性化の機構およびその下流の遺伝子発現制御機構のメカニズムの解明に大きく寄与すると思われる。本研究は核内構造と遺伝子発現制御のメカニズムを解明するために有用な情報を含むものであり、核内構造の研究分野において、明らかに学術水準を高めたものと認める。