

# 核内チロシンキナーゼによる KAP1 の チロシンリン酸化を介したヘテロクロマチン構造の形成阻害

千葉大学大学院医学薬学府 4年博士課程3年 久保田翔

Src 型チロシンキナーゼ (SFKs) や c-Abl などのチロシンキナーゼは、細胞増殖・接着・分化などの制御において重要なシグナル伝達を担う分子群である。チロシンキナーゼは主に細胞膜近傍に局在しているが、我々はチロシンキナーゼの一部が核内に局在していることに着目し研究を行なっている。当研究室では、核内チロシンリン酸化シグナル伝達によってクロマチン構造の変化が起こることを見出してきた。しかし、その詳細な分子メカニズムについては未解明である。そのため、我々は核内チロシンリン酸化によるクロマチン構造変換メカニズムの解明を目的として研究を行なった。

我々はまず SFKs の一つである Lyn に NLS(核局在シグナル配列)を付加した変異体である NLS-Lyn を作製し、その NLS-Lyn を安定的に発現する細胞株を作製した。NLS-Lyn 安定発現細胞株から Western blotting にてチロシンリン酸化を検出したところ、多くの核内基質の候補タンパク質を検出することが出来た (図1)。これらのタンパク質を、抗チロシンリン酸化抗体を用いて精製を行なった。そして、精製したタンパク質を質量解析し、チロシンリン酸化基質の同定を行なった。その結果、核内チロシンリン酸化基質として、ヘテロクロマチンの構造因子となっている KAP1 というタンパク質を同定することが出来た。

KAP1 とチロシンキナーゼを細胞に共発現させたところ、KAP1 は SFK, c-Abl, Brk といった複数のチロシンキナーゼによってチロシンリン酸化されることがわかった。次に、KAP1 のチロシン残基の同定を行なった。質量解析の結果から Tyr-517 のリン酸化が検出されていた。さらに、KAP1 の欠損変異体を作製し、チロシンリン酸化部位の推定を行なった。これらの結果から、Tyr-449, Tyr-458, Tyr-517 がチロシンリン酸化部位であることが示唆されたため、これらのチロシン残基をフェニルアラニンに置換したところ KAP1 のチロシンリン酸化が消失した。以上の結果から、Tyr-449, Tyr-458, Tyr-517 が KAP1 の主要なリン酸化部位であることがわかった。

次にチロシンリン酸化シグナルによる KAP1 の機能変化を解析した。細胞内に NLS-Lyn を発現させたところ、KAP1 のヘテロクロマチン領域への局在が減少していることが、共焦点レーザー顕微鏡(LSM)によって観察された。また、KAP1 と結合しているヘテロクロマチン結合タンパク

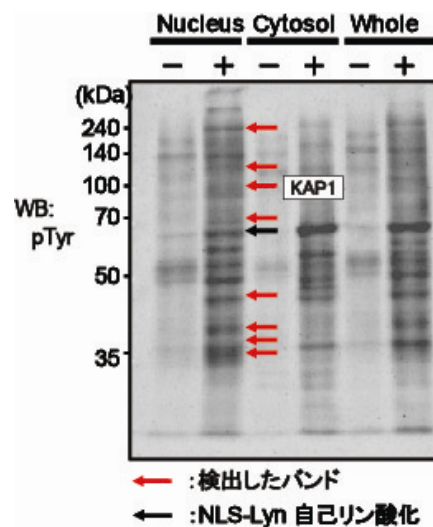


図1 NLS-Lynによってチロシンリン酸化されるタンパク質

HeLa S3細胞とHeLa S3/NLS-Lyn細胞にフォスファターゼ阻害剤のNa<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>でインキュベーションした。核精製を行なってから、抗チロシンリン酸化抗体にてウェスタンブロットングで検出した。

質 HP1 $\alpha$  の局在についても LSM で観察したところ、KAP1 と同様にヘテロクロマチン領域から減少していた。さらに、共免疫沈降によって KAP1 と HP1 $\alpha$  およびヘテロクロマチンのマーカーであるトリメチル化ヒストン H3(H3K9trime)との結合を解析したところ、チロシンリン酸化によって KAP1 と HP1 $\alpha$ , H3K9trime との結合が減少していた。これらのことから、KAP1 がチロシンリン酸化されることによって、ヘテロクロマチンタンパク質との結合が減少し、ヘテロクロマチン構造が緩む可能性が示唆された。

KAP1 のチロシンリン酸化による細胞への影響を詳しく調べるために、チロシンリン酸化を受けないフェニルアラニン(YF)変異体を使って更なる解析を行なった。内在性の KAP1 をノックダウンした後、野生型の KAP1(KAP1-WT)とチロシンリン酸化を受けない KAP1-YF をそれぞれ発現する細胞株を作製した。チロシンリン酸化シグナルによって起こる HP1 $\alpha$  のヘテロクロマチン領域からの減少は、KAP1-YF の細胞株では一部回復していた。さらに、我々は KAP1 が DNA 損傷応答の際にクロマチンとの結合の変化によって、p21 の転写を制御していることに着目した。KAP1-YF 発現細胞では KAP1-WT 発現細胞に比較して、p21 の転写量が減少していることがわかった。このことから、KAP1 のチロシンリン酸化によるクロマチン構造の変化が DNA 損傷応答に関わっていることが示唆された。

本研究では、KAP1 のチロシンリン酸化がヘテロクロマチン構造の維持に関わっていることを示した。チロシンリン酸化シグナルは DNA 損傷応答だけでなく、増殖刺激、分化など様々な刺激によって活性化することが知られている。本研究で示した KAP1 のチロシンリン酸化による機能の変化が、様々な細胞応答に関わっている可能性が考えられる。今後、KAP1 のチロシンリン酸化に関わる細胞の機能について、更なる解析を進めて行きたいと考えている。

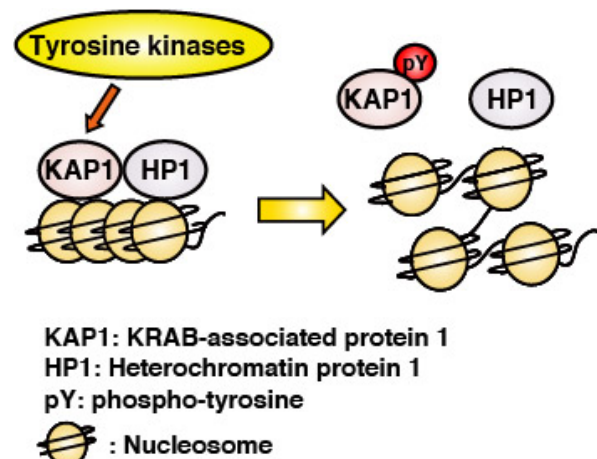


図2 チロシンリン酸化による KAP1 の機能変化

(発表論文 1) **Sho Kubota**, Yasunori Fukumoto, Kazumasa Aoyama, Kenichi Ishibashi, Ryuzaburo Yuki, Takao Morinaga, Takuya Honda, Noritaka Yamaguchi, Takahisa Kuga, Takeshi Tomonaga, and Naoto Yamaguchi: Phosphorylation of KRAB-associated protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by nuclear tyrosine kinases inhibits the association of KAP1 and heterochromatin protein 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ ) with heterochromatin. *J. Biol. Chem.*, **288**: 17871-17883 (2013)

(発表論文 2) Kenichi Ishibashi, Yasunori Fukumoto, Hitomi Hasegawa, Kohei Abe, Shoichi Kubota, Kazumasa Aoyama, **Sho Kubota**, Yuji Nakayama, and Naoto Yamaguchi: Nuclear ErbB4 signaling through H3K9me3 is antagonized by EGFR-activated c-Src. *J. Cell Sci.*, **126**: 625-637 (2013)

(発表論文 3) Kazumasa Aoyama, Yasunori Fukumoto, Kenichi Ishibashi, **Sho Kubota**, Takao Morinaga, Yasuyoshi Horiike, Ryuzaburo Yuki, Akinori Takahashi, Yuji Nakayama, and Naoto Yamaguchi: Nuclear c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation induces chromatin structural changes through histone modifications that include H4K16 hypoacetylation. *Exp. Cell Res.*, **317**: 2874-2903 (2011)