

博士論文審査報告書

論文題目

ヌクレオソームの構造安定性に関する研究
Study on structural stability of nucleosomes

申請者

田口	裕之
Hiroyuki	TAGUCHI

電気・情報生命専攻 構造生物学研究

2018年2月

複製、転写、修復、組換えなどのゲノム DNA の機能は、細胞毎に異なったパターンで制御されている。このような遺伝情報の制御機構によって、独自の遺伝子機能の発現パターンが形成され、様々な種類の細胞への分化が誘導される。ゲノム DNA の機能は、DNA 配列に依存した調節機構に加えて、DNA 配列によらない制御機構によってもコントロールされている。このような DNA 配列によらない制御機構は、DNA とタンパク質が結合したクロマチンと呼ばれる高次構造によって担保されており、その主要構成因子はヌクレオソームである。ヌクレオソームは 4 種類のヒストン (H3、H4、H2A、H2B) が 2 分子ずつで構成されるヒストン八量体に、DNA が約 150 塩基対巻きついた円盤状の構造体である。ヌクレオソーム中のヒストンや DNA に、翻訳後修飾と呼ばれる化学修飾やヒストンバリエーションと呼ばれる特殊なタンパク質などによってエピジェネティックマークが付加されることで、さまざまな物理化学的性質を持ったヌクレオソームが形成される。ヌクレオソームの重要な性質の一つに、構造安定性が挙げられる。ヌクレオソームの構造安定性は転写、修復、組換えなどの DNA 代謝の制御と相関していると考えられている。近年、DNA 代謝において、ヌクレオソーム中のヒストンは全て脱落するわけではなく、反応に応じて部分的に脱落したり、移動したりすることが報告されている。つまりヌクレオソーム全体の構造安定性だけでなく、どのようにヌクレオソーム構造が変動していくのか、その詳細なダイナミクスを明らかにする必要がある。

ヒストンバリエーションは、ヌクレオソームの構造安定性に影響を与えるエピジェネティックマークの一つであり、細胞内に豊富に存在する通常型ヒストンと置き換わりが可能なタンパク質である。ヒストンバリエーションの主要なもの、通常型ヒストンと異なる役割を担っていることが明らかになってきた。例えばヒストンバリエーション CENP-A は、セントロメア領域のクロマチンに取り込まれ、染色体分配に重要な染色体領域を構築することがわかっている。このようにヒストンバリエーションは、細胞内で重要な役割を担っていることが示唆されているが、近年発見された新規ヒストンバリエーションをはじめ、未だ機能未知のヒストンバリエーションが多数存在しており、それらの解析は不十分であった。

このような研究背景から、本研究では、DNA 代謝に影響する多様なヌクレオソームの構造安定性を測定するために、蛍光色素とヌクレオソームを用いた新しい解析手法 (熱安定性試験) を確立した。さらに新規ヒストンバリエーションをリコンビナントタンパク質として精製し、ヌクレオソーム形成能及び、熱安定性試験、X 線結晶構造解析を行うことで、詳細な分子機構を明らかにしている。

本博士論文は全 5 章で構成されている。各章の要旨と本論文の評価を以下に記す。

第 1 章は序論である。本研究に関する背景を、これまでの先行研究に基づ

き記述している。まず、クロマチン構造の基本事項の概説と、DNA 配列によらないクロマチンの遺伝子発現制御機構であるエピジェネティクスについて説明されている。次にエピジェネティクスのマークが、クロマチンにどのような影響を与えるのかについて記述されている。さらに、ヌクレオソームの構造安定性がクロマチンに与える影響と、構造安定性を測定する生物学的意義について先行研究を交えて述べられている。本章は、本論文の研究内容を理解する上で、必要な背景を過不足なく記述していると評価できる。

第2章は、本研究にて用いられた材料および実験方法について記載されている。まず、本研究で行われた実験方法について詳述されている。各種ヒストンの精製法、ヒストン複合体の精製法、ヌクレオソームの精製法について詳述されている。次に本論文で行った解析手法について記述されている。熱安定性試験、ヌクレオソームの結晶化、X線結晶構造解析、変異体解析の方法について記述されている。本章では本研究の材料、実験手法、解析の意義について明確に記述されており、本論文の研究結果を理解するために必要な情報が提供されていると評価できる。

第3章は、ヌクレオソームの熱安定性試験の開発に関する結果について記述されている。まずヌクレオソームと蛍光色素 **SYPRO Orange** を混合し、熱によってヌクレオソームが崩壊する現象を蛍光色素で測定できることを検証した。**SYPRO Orange** は、変性した水溶性タンパク質の疎水性表面に結合することで蛍光を発する。このような原理に基づき、**SYPRO Orange** とヌクレオソームを混合して実験を行ったところ、温度上昇に伴い 75°C 周辺と 85°C 周辺で2段階の蛍光ピークが検出されている。これらの蛍光ピークが、ヌクレオソームに特有のシグナルであることを、ヒストン単体およびヒストン八量体を用いた熱安定性試験で確認している。次に2段階の蛍光ピークがヌクレオソームのどのような崩壊状態を示しているのかを明らかにするため、温度毎のヌクレオソームの状態を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって解析している。その結果、2段階の蛍光ピークは、それぞれ **H2A-H2B** と **H3-H4** が DNA から解離する際に生じた蛍光ピークであることを示した。さらに塩化ナトリウム濃度の違いによるヌクレオソームの構造安定性の変化、ヒストンバリエントを含むヌクレオソームの構造安定性の違いについて解析し、溶媒条件やヒストンバリエントによるヌクレオソームの構造安定性の違いを評価できることを示している。本研究で開発したヌクレオソームの熱安定性試験は、ヌクレオソームの多段階的な崩壊を高い再現性で検出することができる新しい試験法である。さらに、非変性ポリアクリルアミドゲル解析などの他の解析技術と組み合わせることにより、広範な応用が考えられる。これらのことから、本章の研究成果は当該分野の研究の発展に寄与する成果であると評価できる。

第4章は、新規ヒストンバリエント **H3.6**、**H3.7**、**H3.8** に関する実験結果について記述した。従来の試験管内での再構成法では、**H3.7** を含むヒストン

複合体は形成されないことを示している。また、H3.8を含むヌクレオソームは形成されるが、非常に不安定であることを見出している。一方で、H3.6を含むヌクレオソームは効率よく再構成され、既知のヒストンバリエントH3.3との比較研究を行うことで、H3.6ヌクレオソームはH3.3ヌクレオソームと全く異なる、不安定なヌクレオソームであることが明らかになった。X線結晶構造解析及び変異体解析を行うことで、H3.6ヌクレオソームの構造不安定性の責任残基（H3.6Val162）を同定した。本章では、新規ヒストンバリエントを含むヌクレオソームの物理化学的性質を明らかにした。本研究で得られた知見によってH3.6、H3.7、H3.8は既知のヒストンバリエントと異なる役割を担っていることが示唆された。本章の研究成果は当該分野に重要な知見を与える研究成果であると評価できる。

第5章は、本研究で得られた知見と先行研究を比較し、関連研究の今後の発展性について考察した。本章では本論文で得られた知見と今後解決すべき課題、解決へのアプローチが論述されており、当該分野の発展に貢献すると評価できる。

以上から、本論文では、ヌクレオソームの構造安定性を評価できる熱安定性試験の確立及びその実用化を実現しており、さらに新規のヒストンバリエントの構造的性質を明らかにしている。本論文で確立された手法及び、得られた知見は、真核生物の細胞核内でヌクレオソームがどのように機能しているのか、その制御機構を理解する上で価値のあるものである。従って、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものとして認める。

2018年2月

審査員

(主査)	早稲田大学教授	博士（学術）	埼玉大学	胡桃坂 仁志
	早稲田大学教授	博士（理学）	東京大学	木賀 大介
	早稲田大学教授	博士（理学）	名古屋大学	岩崎 秀雄