

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	邹 婷婷 (ZOU TINGTING)
論文題目	Chemical Biology Approaches for Investigating Nucleosome Structure and Accessibility (ケミカルバイオロジー的アプローチによるヌクレオソーム構造とアクセシビリティの研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>Nucleosome, the basic repeating unit of chromatin, consists of an octamer of four core histone proteins (H3, H4, H2A, H2B), with 145-147 base pairs segment of DNA. The core histones assemble into a spool-like structure onto which the core DNA is wrapped, in about 1.75 left-handed superhelical turns. These nucleosome core particles were connected by linker DNA and joined together into chromatin fibers. Over the past decades, many important breakthrough researches have been reported, which significantly improve our understanding about gene regulation and accelerate the progressing of epigenetic research. In this study, we mainly focused on investigating the influence of histone binding on nucleosomal DNA's accessibility with exploring chemical biology approaches. Besides, we identified a new non-nucleosome structure, termed as H3-H4 octasome. A new synthetic molecule, PIP-L conjugating with the activator of HAT, also was confirmed that highly associated with regulating nervous system development upon the potentiality of altering nucleosome dynamic.</p> <p>1. In vitro evaluation of nucleosome's accessibility for duocarmycin B₂</p> <p>To evaluate the reactivity of antitumor agents in a nucleosome architecture, we conducted in vitro studies to assess the alkylation level of duocarmycin B₂ on nucleosomes with core and linker DNA using sequencing gel electrophoresis. Our results suggested that the alkylating efficiencies of duocarmycin B₂ were significantly decreased in core DNA and increased at the histone-free linker DNA sites when compared with naked DNA condition. Our finding that nucleosome assembly alters the accessibility of duocarmycin B₂ to duplex DNA could advance their design as antitumor agents.</p> <p>2. Investigating the accessibility of nucleosome for Fe(II)·peplomycin and MNase using capillary electrophoresis</p> <p>we adopted capillary electrophoresis coupling with DNA 5' Texas Red labelling to investigate the accessibility of nucleosome. Duocarmycin B₂, peplomycin · Fe(II) and MNase was adopted for the evaluation, and distinct accessibility patterns of nucleosome for these reactions were observed. Duocarmycin B₂ was still able to enter into core region though the alkylating efficiency was</p>			

significantly decreased. Peplomycin's intercalation in nucleosomal core region also was highly suppressed, but the reaction sites locating in nucleosomal core end was still accessible, which implied the flexibility of core DNA end. MNase was completely shut off from approaching to nucleosome core, and exhibited a higher site-specificity for targeting DNA sites locating close to core region.

3. Octasome constructed by histone H3-H4 and DNA, possesses different characteristics comparing to nucleosome

H3-H4 tetramer was reported to be more important as orientating the nucleosome positioning, and regulating the nucleosome's structure by high frequency of histone modifications. Here under the in vitro reconstitution system, we confirmed that DNA can wrap with two H3-H4 tetramers to form a stable octasome structure. Based on AFM imaging technology, the clear difference between tetrasome, octasome and nucleosome were demonstrated. Tetrasome showed significant short core DNA region encapsulating with one H3-H4 tetramer, while octasome occupied similar core proteins as nucleosome, but relatively short core DNA length (around 110 bp). These results were further affirmed by investigating the accessibility, both MNase and peplomycin approached to some DNA sites locating in the nucleosome core region where was clearly inaccessible in nucleosome. The two tetramers dissociated from DNA simultaneously around 87°C without strengthening octasome's thermal stability, which might indicate that two tetramers were simply packaged together into DNA without interconnection.

4. PIP conjugating with HAT activator regulates brain genes' expression

Brain is the critical organ that plays pivotal role in the nervous system by precisely governing other organs in the body. Therefore, malfunction in brain cell's intricate gene network lead to wide-range of neurological disorders. Synthetic dual-functional ligands targeting specific DNA sequences and histone-modifying enzymes have the capability to achieve regulatory control over multi-gene networks in living cells. CTB-PIP conjugates are such new class of synthetic dual-functional genetic switches that can site-selectively induce active epigenetic marks. Using Microarray and q-PCR studies, here we report new artificial genetic switching molecule (CTB-PIP-L) that trigger upregulation of therapeutically important brain function-related genes in human foreskin fibroblast, including CNTNAP2 and FZD8. Development of such tailor made genetic switches have the potential to restore the complicated disorders in brain cells.

(論文審査の結果の要旨)

真核細胞では DNA は 2 分子のヒストン H2A、H2B、H3、H3 で構成されるヒストン 8 量体に巻きつきモノヌクレオソームを形成し、様々な核タンパクと複合体を形成し染色体として核内に収納されている。DNA と小分子との相互作用はヌクレオソームのコア部分とリンカー部分で異なることが予想されるが、これまでの研究ではこれらの間での分子レベルでの詳細な議論は少なかった。例えば DNA 副溝に結合しアルキル化するデュオカルマイシンの反応では、ヌクレオソームコアで部分もリンカー部分と同じ反応性があることが報告されていた。

申請者は再構成させたヌクレオソームを用いてまずデュオカルマイシン B2 による配列選択的なアルキル化の反応性を調べた。その結果ヌクレオソームコア部分ではアルキル化反応の明確な抑制が見られたが、リンカー部分では逆にアルキル化反応が促進されることを示した。また一番反応が抑制された部分はヌクレオソームコアにおいて DNA の構造が大きく歪んでいる部分であることも示唆された。

次に定量性に優れたキャピラリー電気泳動を用いて再構成させたヌクレオソーム上での反応を詳細に検討した。ブレオマイシン鉄錯体を用いて DNA の切断反応を行うと、報告されているように 5' -GC-3' および 5' -GT-3' 配列で選択的に反応が起きたが、ヌクレオソームではコア部ではほぼ反応が抑制されることが示された。例外的にコア分の末端の部分でも反応が見られた。またマイクロコッカルヌクレアーゼによる反応ではコア部分の外側で効率よく加水分解が起こることが示された。これらの結果キャピラリー電気泳動を用いる方法は、再構成系のヌクレオソーム上での反応解析に非常に有効であることが示された。

次に申請者はヌクレオソーム形成の中間体であることが示唆されているヒストン H3 と H4 テトラマーと DNA との複合体形成を電気泳動や原子間力顕微鏡さらには蛍光色素の結合などを用いて詳細に調べた。その結果、DNA の当量が低いところでは DNA とテトラマーが 1 : 1 の複合体が形成されるがテトラマーの当量をあげると 1 : 2 の複合体が形成されることが示された。SYPROORANGE を用いた実験から 1 : 2 の複合体は H3 と H4 オクタソームであることが示唆された。さらにブレオマイシン鉄錯体やマイクロコッカルヌクレアーゼによる反応性を調べると H3 と H4 オクタソームではヌクレオソームと比べてコア部分が短いことが示された。

再構成させたヌクレオソームを用いてその化学反応性を詳細に解析する系は新しく、またオクタソームの形成を観測したことは独創的である。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成30年1月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降