

氏名	橋本秀春
学位(専攻分野)	博士(生命科学)
学位記番号	生博第128号
学位授与の日付	平成19年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学研究所統合生命科学専攻
学位論文題目	ニワトリDT40細胞を用いたリンカーヒストンH1の遺伝学的解析

論文調査委員 (主査) 教授 眞貝洋一 教授 米原伸 教授 石川冬木

論文内容の要旨

146 bpのDNAがコアヒストン8量体に1.75回転巻き付き、ヌクレオソームが形成されることが最初のDNAの構造変換である。さらにヌクレオソーム間のリンカーDNAにヒストンH1が結合することによって染色体の高次構造が形成されると考えられているが、生体内でのヒストンH1の機能は不明のままである。これまでに単細胞生物であるテトラヒメナ、出芽酵母などでのヒストンH1様たんぱく質の遺伝学的解析が行われてきたが、高等動物細胞における生体内でのH1の機能は不明である。高等動物にはヒストンH1は複数のバリエーションが存在し、これまでの遺伝学的解析からこれらのバリエーションは相互に補完する機能を持ち合わせているため、生体内でのH1の機能を明らかにするためには、これら全てのH1遺伝子を全て欠損させた細胞・動物の樹立をすることが必要である。さらには、個々のH1バリエーションのもつ特異的な機能を明らかにすることも重要な課題である。そこで、本研究では、ニワトリB細胞由来のDT40細胞株を用い、全てのH1を欠損させた細胞株を樹立しその表現型を解析した。さらに、DNA損傷修復反応時におけるH1バリエーションの関わりを明らかにするため、各H1バリエーションが欠損したDT40細胞株を用いた遺伝学的解析を行った。

初めて樹立された、全てのH1を欠損したDT40細胞株は増殖可能で、分裂期、ヘテロクロマチン様の構造形成も正常細胞と同様に観察された。しかしながら染色体の不安定性が誘導されていた。また、染色体の不安定性とH1との関係を明らかにする目的で、H1バリエーションのシングル変異株を用いてメチルメタンスフホン酸(MMS)感受性を調べた。その結果、6種類のバリエーションがあるなかで、唯一H1R欠損株でのみMMS感受性が認められた。H1Rはエピスタシス解析からRad54を介した相同組換え修復経路に関わるものの、レポーターアッセイにより、H1R欠損細胞における二重鎖DNA切断修復能自体は低下していないという結果を得た。さらにMMSで処理したときにH1R-eGFPの核内でのダイナミクスが低下したことから、ヒストンH1Rは生体内で特異的に損傷DNAに親和性を持ち、Rad54を介した相同組換えに関与し、染色体の安定性に寄与しているということを示唆する結果を得た。染色体上で具体的にどのように染色体の安定性に寄与しているのかという詳しい分子メカニズム、位相についてはまだわかっていないが、本論文ではこれまでの実験結果や最近のDNA損傷修復の遺伝学的知見をふまえて、細胞内でのリンカーヒストンの役割についての考察を述べる。

論文審査の結果の要旨

リンカーヒストンH1は、核内の主要なクロマチンタンパク質であり、*in vitro*でクロマチンを凝縮させる活性があることから、クロマチンの高次構造や一般的な転写抑制に重要な役割を持つ分子であると考えられてきた。しかし、H1或いはH1様タンパク質は、酵母から高等真核生物に至るまで存在するものの、ヌクレオソームの構成成分であるコアヒストンタンパク質と比べると、そのアミノ酸配列やタンパク質構造の保存性は低い。また、テトラヒメナや酵母のH1(様分子)の欠損株の解析からは、H1がクロマチン構造に必須の役割を持つことは観察されず、ほとんどの遺伝子の発現はH1欠損に影響を受けないこと、細胞の増殖にも影響がない事が示されている。このように、1種類のH1(様)分子しか持たない生物種に

においてだけでなく、複数のリンカーH1バリエントを持つ高等真核生物においても、その生物学的機能・重要性は十分に理解されていない。そこで、複数のH1バリエントを持つ高等真核生物におけるH1の重要性と、異なるバリエントが特有の機能を有するかどうかを明らかにするために、ニワトリB細胞株DT40を用いた遺伝学的解析がなされた。

すでに、宮崎医科大学の中山・高見らは、6種類あるH1バリエントの5つまでを欠損させたDT40細胞株を樹立したが、完全H1欠損株を樹立できなかったことから、ニワトリにおいて完全H1欠損は細胞致死あるいは強い増殖不全を引き起こすと推察していた。そこで、この5種類のH1が欠損しているDT40細胞株を高見博士らより入手し、これをもとに、ホルモン依存的にH1遺伝子が完全に欠損する、コンディショナルH1欠損DT40細胞株が樹立された。この細胞をタモキシフェン処理することにより、完全H1欠損細胞を得た。解析の結果、完全H1欠損DT40細胞は得られるものの、高頻度で細胞死を起こして細胞増殖が低下することが判明した。また、分裂期において、染色体の切断が有意に増えている事が観察された。これらのことより、H1は脊椎動物において、染色体の安定性に重要な役割を持つ事が示唆された。

さらに、異なるバリエントH1が個別の生物学的機能を持つかを検討するため、6種類のバリエント特異的H1欠損DT40細胞株のDNA障害に対する感受性が調べられた。その結果、1つのバリエントHIRを欠損した細胞のみが、MMSに高感受性を示した。遺伝学的解析により、HIRによるMMS抵抗性はRad54を介した相同組換え系による事が判明した。しかし、HIR欠損DT40細胞株では、相同組換えによる二本鎖DNA切断修復の能力自体は低下していなかった。また、MMS処理された細胞では、H1L-eGFPの核内ダイナミクスは変化しないものHIR-eGFPの核内ダイナミクスが低下した。以上の結果より、MMS処理により、障害を受けたクロマチンにHIRが何らかの親和性を持つことで、相同組換え系によるクロマチン修復を正に調節していることが推察された。

今回の研究により明らかにされたことは、高等真核生物におけるH1の重要性および機能を理解する上でたいへん意味のある成果であり、この分野の研究の進展に貢献した、と評価できる。よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、平成19年7月3日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。