

氏 名	ひ づめ こう じ 日 詰 光 治
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	論 理 博 第 1465 号
学位授与の日付	平 成 18 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Chromatin Formation Mechanisms Revealed from <i>In Vitro</i> Reconstitution and Nano-Scale Observation (試験管内再構築実験およびナノスケール観察により明らかにされたクロマ チン構造構築メカニズム)
論文調査委員	(主 査) 教 授 杉 山 弘 教 授 三 木 邦 夫 教 授 吉 川 研 一

論 文 内 容 の 要 旨

ヌクレオソームは真核生物における染色体の最基本構造であり、11 nm 幅の“糸に通したビーズ”状のファイバーを形成する。このクロマチンファイバーが30 nm 幅のファイバーを形成する高次構造形成の分子機構は未だ明らかではないが、転写や複製の制御に重要な役割を担っていると考えられている。本研究では、ヌクレオソーム形成およびクロマチン高次構造形成のメカニズムを解明するため、凶雑物を含まず他のタンパク質因子の影響を受けることの無い「試験管内再構成クロマチン法」を確立し、得られたクロマチンの構造を原子間力顕微鏡下にナノスケールで解析した。

まず、DNA の形状的性質がヌクレオソーム形成効率に及ぼす影響を調査する目的で、3 kb から106 kb までの長さの異なる環状 DNA と精製コアヒストンとを用いてクロマチン再構成を行なった。その結果、ヌクレオソームの形成効率は、DNA 鎖長と負のスーパーコイルとに依存することが判明した。すなわち、負のスーパーコイルを保有する環状 DNA に限り、DNA 鎖長が長いほどヌクレオソーム形成効率は高かった。また、環状 DNA を直鎖状にした場合、著しく形成効率が低下し、トポイソメラーゼ I によりリラックスさせた環状 DNA 場合は、直鎖状 DNA よりもさらに形成効率が低下した。すなわち、正のスーパーコイルはヌクレオソーム形成を阻害することが分った。

つぎに、ヌクレオソームがどのように高次構造を形成するかを理解するために、100 kb DNA に再構成したクロマチンが、溶液の塩濃度変化やリンカーヒストン H1 の添加で、どのように構造変化を引き起こすかを調べた。50 mM の塩濃度下では、ヌクレオソームの“糸に通したビーズ”状構造は適度に拡がり、ヌクレオソーム構造ひとつひとつがはっきりと確認できた。しかし、100 mM の塩濃度下ではヌクレオソーム同士の相互作用が促進され、部分的な凝集が生じた。ヒストン H1 を添加した場合は、20 nm から30 nm の幅を持つファイバー構造が形成された。このファイバー幅は溶液の塩濃度に依存して変化し、50 mM 塩濃度下では20 nm、100 mM 塩濃度下では30 nm 幅であった。以上の結果から、①ヌクレオソームを基に形成される太いファイバー構造はヒストン H1 依存的に形成されること、②塩濃度の影響によりヌクレオソーム同士の相互作用は変化し、それは、また、ヌクレオソーム同士の凝集効果や、H1 依存的ファイバーを太くする効果を持つことが明らかとなった。

本研究に使用した100 kb という DNA 鎖長は、生体内で核内の足場構造 (Nuclear Matrix) に繋ぎとめられて形成されるループ構造の長さにほぼ対応する。in vivo で一つの単位として機能するクロマチンループ構造の動的性質を理解する上で、本研究のような再構成実験系でクロマチンの物性を解析することは重要な手段であり、新規なアプローチである。また、凶雑物を含まない純粋な試験管内実験系により、構造変化を引き起こす要因を特定し、その効果を評価するうえで、原子間力顕微鏡によるナノスケール可視化解析は直接的で有効な手法であることが示された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

真核生物のゲノム構造は、ヌクレオソーム構造を基本単位として、種々のタンパク質の影響を受けて、ダイナミックに構造変化を引き起こしていると考えられている。本研究では、長鎖クロマチンファイバーの試験管内再構成系を独自に開発し、

ヌクレオソームが高次構造を形成する機構を原子間力顕微鏡によるナノメートルスケールの微細構造観察により捉え、ゲノム高次構造構築の原理を解明しようと試みた。

申請者は、まず、100 kb 鎖長のプラスミド DNA に対してヌクレオソームを効率よく形成させることを目指し、それに成功している。従来、ヌクレオソーム再構成実験は数百 bp から数 kb の DNA に対して行われてきた。しかし、これらの DNA にはヌクレオソームがせいぜい~800 bp に 1 個（全体で数個~十数個）しか形成されず、そのような実験系では多数のヌクレオソームを基に形成される高次構造を解析することは不可能であった。申請者が用いた100 kb という鎖長は、数百のヌクレオソームが形成されうるものであり、核内でのゲノム DNA の状態を反映した現象を示すのに十分な長さといえる。実際本論文において、この DNA 上に400個のヌクレオソームを形成させる実験結果を示し、ヌクレオソーム形成に DNA の鎖長と supercoil の状態とが多大な影響を与えることを明らかにした。DNA の supercoil がヌクレオソームの安定性に寄与するという定性的なモデルは過去にも提唱されていたが、本論文では「鎖長に対応して協調的にその効果が促進する」という現象を定性的に解析した。これは、生細胞内で見られる染色体特定領域の協調的な活性 ON/OFF という現象を理解するうえでも重要な、ヌクレオソームの物性的な知見である。

また、申請者はこの再構成実験系を用いて、溶液条件（塩濃度）、リンカーヒストンの有無、ノンヒストンタンパク質の添加などの影響を受けて、クロマチンファイバーがさらなる構造変化を示すことを明らかにした。その構造変化は、個々の要因に対してそれぞれ独自の様式で誘引された。すなわち、塩濃度依存的なヌクレオソームの凝集、リンカーヒストン依存的なファイバー構造の形成、転写因子 PC4 による局所的な球状凝集の形成など、それぞれ明確に区別できる構造変化が存在することが明らかとなった。これらの結果は、転写因子がクロマチンの構造に対して凝縮作用をもち、その凝縮作用はリンカーヒストンによるファイバー形成とは明らかに異なる様式であることを示したものであり、核内でのゲノム存在様式と遺伝子活性との関係を理解するうえで非常に有用な知見である。

以上のように、近年、分子生物学的あるいは細胞生物学的手法に偏重しがちであった染色体研究分野において、ナノスケールイメージングという構造生物学的手法と試験管内再構築系という生化学的手法を組み合わせた新たな実験系を確立した点において、本研究は独自性の高い研究である。また、染色体に局在し、その構造に影響を及ぼすことが期待されるタンパク質因子が多数同定されてきている現在、本論文に示したような、クロマチンに対する構造的影響を直接示すことが出来る再構成実験系は、今後大いに応用されることが期待される。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、また、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。