

氏 名	こ ぼり とし ろう 小 堀 俊 郎
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 96 号
学位授与の日付	平 成 19 年 1 月 23 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 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Comparative Structural Biology of the Genome - Physicochemical Properties of the Chromatin Fiber - (ゲノムの比較構造解析—クロマチンの物理化学的性質の解明—)
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 安 邦 夫 教 授 松 本 智 裕 教 授 山 本 憲 二

論 文 内 容 の 要 旨

全ての真核生物のゲノム DNA はヒストンタンパク質と結合してクロマチンを形成し、限られた空間である細胞核に高度に折り畳まれて存在する。クロマチンの構造的秩序は、遺伝子発現、複製、そして染色体によるゲノムの次世代への継承など、核機能のみならず細胞機能を制御するうえで非常に重要な役割を果たしている。しかしながら、DNA からクロマチンへの折り畳み機構、特にヌクレオソームからヌクレオソームビーズ構造を通じて 30nm ファイバーが形成されるメカニズムについては、非常に多くの研究がなされてきたにもかかわらず解明には至っていない。そこで本研究では、リンカーヒストンとヌクレオソーム密度がクロマチン構造に及ぼす影響という観点から、主に以下のような解析を行った。

(1) 比較顕微鏡学的解析によるリンカーヒストンの有無とクロマチン構造の相関。リンカーヒストンが存在するヒト HeLa 細胞、鶏赤血球、及びリンカーヒストンが存在しない *S. pombe* から各々単離した核を、基板上で展開させることにより、クロマチン繊維を原子間力顕微鏡で直接観察した。その結果、リンカーヒストンの有無に関わらず、30-40nm のクロマチンファイバーが安定的に組織化されることを明らかにした。

(2) 化学的に誘起したクロマチンの構造変化とヌクレオソーム密度の関係についての解析。*S. pombe*, *S. cerevisiae*, 及び鶏赤血球から核クロマチンを単離し、塩環境に対する構造応答についてナノレベルで解析した。その結果、酵母クロマチンは塩の添加によって 40nm 構造から 115nm 構造へのダイナミックな構造変化が引き起こされたが、これはヒストンの溶出を伴わない可逆的なクロマチンの脱凝縮であると考えられた。一方、同様の処理を鶏赤血球クロマチンに施したところ、リンカーヒストンが溶出した脱凝縮構造 (beads-on- α -string 構造) を呈し、酵母クロマチンで観察された可逆性は認められなかった。こうした構造応答の差異は、ゲノムに結合するヌクレオソーム密度によって異なる可能性があることを示した。

(3) ヌクレオソーム密度とリンカーヒストンの関係についての解析。(1)(2)の結果より、クロマチン構造が構築されるにあたり、ゲノム中のヌクレオソーム密度とリンカーヒストンの有無が大きく関与すると考えられた。そこで、*S. pombe* 細胞中でヒトリンカーヒストンを発現させた。その結果、リンカーヒストンは核局在を示したものの、ヌクレオソームリピートには影響を及ぼさなかったため、リンカーヒストンはヌクレオソームが密に存在するクロマチンには結合しないと考えられた。

本研究で得られた成果は、コアヒストンのみで 30nm ファイバーが構築されることを示唆しており、クロマチンファイバーの形成・維持機構を一般化する上で有用な知見となると考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

真核生物のゲノム DNA は細胞核内でクロマチンとして収納されている。クロマチンはヌクレオソームを構造単位として形成されており、ヌクレオソームがゲノムDNA に連続して結合してできる beads-on-a-string ファイバーの形成機構は明

らかになりつつある。本研究は、これまで未解明である beads-on-a-string ファイバーより高次クロマチン構造の形成機構の解明に向けて、リンカーヒストンやヌクレオソーム間距離の違いに着目して研究を進めたものであり、その評価できる内容は以下の通りである。

(1) リンカーヒストンの有無やヌクレオソーム間距離が各々異なるヒト HeLa細胞、ニワトリ赤血球細胞、分裂酵母から細胞核を単離し、“on-substrate”lysis 法によりクロマチン構造を原子間力顕微鏡により直接観察した。その結果、いずれの細胞核からも 40nm 幅のクロマチンファイバーが観察され、リンカーヒストンやヌクレオソーム間距離の相違はクロマチン高次構造には影響を及ぼさないことを明らかにした。

(2) リンカーヒストンの存在しない分裂酵母クロマチンを中心にして、イオン環境によるクロマチン高次構造の変化について解析し、同様の処理を行った出芽酵母やニワトリ赤血球クロマチンとの構造応答の差異を解析した。分裂酵母や出芽酵母クロマチンでは塩濃度の上昇に伴い、高次構造が相転移を起こすこと、この相転移はコアヒストンの溶出を伴わない現象であること、塩濃度に依存して可逆的に起きることを明らかとした。またファイバーの持続長の見積もりから、この塩濃度上昇による相転移は 40nm ファイバーから beads-on-a-string 様構造への脱凝縮を反映していることが示唆された。一方、ニワトリ赤血球クロマチンでは、リンカーヒストンがクロマチンから解離し、beads-on-a-string ファイバーとなることを明らかとした。この構造変化は塩濃度依存的な可逆性を示さず、リンカーヒストンが 40nm ファイバー形成を担うことを示した。これらの結果は、ヌクレオソーム間距離の相違がイオン環境に対する構造応答の違いを生じさせるとともに、高次構造形成に関与することを示唆した。

(3) リンカーヒストンとヌクレオソーム間距離の間の関係を明らかにすることを目的として、分裂酵母細胞内でヒト由来リンカーヒストン H1 を発現させた際の影響を解析した。その結果、H1 は核局在を示したが、ヌクレオソーム間隔に変化が見られなかったことから、ヌクレオソームが密に存在するクロマチンには結合できないことを明らかにした。

以上の結果は、クロマチン高次構造形成においては、リンカーヒストンに加えてヌクレオソーム間距離も構造形成に影響しうることが明らかにしたという点において、真核生物のゲノム格納機構を理解する上で非常に有用な知見である。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。

なお、平成18年11月13日、論文内容について口頭試問を行い、それに関連して高等真核生物でのリンカーヒストン発現抑制の影響や、*in vitro* クロマチン再構成実験への展開等についての論議・質疑応答を行った結果、博士（生命科学）の学位を授与される能力が十分にあるものと認めた。