

名古屋市立大学 博士学位論文

スナップショット法を用いた  
可溶性ヒストン複合体の分子機能解析

2012 年

加藤 麻希

名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科

# 要旨

真核生物のクロマチンは、H2A/H2B/H3/H4 をそれぞれ 2 分子ずつ含むヒストン八量体に DNA が巻き付いたヌクレオソーム構造を基本単位として構成されている。有糸分裂期に、クロマチンがダイナミックな構造変化を起こすことはよく知られているが、間期においても転写や DNA 修復などでダイナミックな挙動を示す。近年、ヒストンは、ヒストンシャペロン/ATP 依存的なクロマチンリモデリング因子などによって動的制御を受けることが明らかになってきたがその詳細は不明である。

ヒストンの挙動を理解することは、クロマチンのダイナミックな構造変化の解明につながる。本研究では、クロマチンダイナミクスを理解するために、最も単純な真核生物である酵母を用いて、クロマチンに挿入されていない可溶性ヒストン複合体を反応中間体としてスナップショット解析を行った。スナップショット解析は、阻害剤・培養条件など様々な状況下における反応中間体を得ることにより、多角的にヒストンダイナミクスを捉えることを可能にする。ヒストンを含む多くのタンパク質は、酵母からヒトまで保存されているだけでなく似た働きを示すことから、スナップショット解析から知り得たヒストンダイナミクス制御の詳細はヒトにも通じると考えられる。

出芽酵母における可溶性ヒストン複合体解析から、可溶性 H2A/H2B 量が H3/H4 量よりも多く存在することを見いだした。可溶性 H2A/H2B は、H2A/H2B シャペロンである Nap1 および転写や DNA 複製への関与が報告されている FACT を含む複合体を形成していたことから、H2A/H2B の遊離しやすさは Nap1 および FACT に起因すると考えられた。転写/DNA 複製に依存して可溶性 H2A/H2B-FACT 複合体が形成されるのか、また、H2A/H2B ダイナミクスにおける Nap1 と FACT の関係性についてスナップショット解析を行った。様々な阻害剤および欠失株を用いた可溶性 H2A/H2B 複合体のスナップショット解析から、Nap1 および FACT は独立的に H2A/H2B と相互作用することが明らかとなった。また、Nap1/FACT は転写/DNA 複製に依存せず対数増殖期における H2A/H2B ダイナミクスの基盤となることが示唆された。本研究から、出芽酵母における FACT の作用と H2A/H2B ダイナミクスについて新しい知見が得られた。

分裂酵母におけるヒストン複合体解析から、新規ヒストン H3 結合因子として同定された HiTAP1 について生理機能解析を行った。本研究では、H3/H4 シャペロン ASF1 との比較解析を行った。HiTAP1(Histone H3(three) associated protein)は、1996年に分裂酵母において大量発現により染色体分配異常を起こす遺伝子として同定された Mlo2(Missegregation & lethal when over expressed)と同一である (Javerzat J.P. et al.,1996)。これまでの *in vitro* 解析の結果を支持するように、生体内でも全長の HiTAP1 が H3 と優先的に結合することを明らかにした。HiTAP1 と H3 との相互作用がもたらす生理的意義は何か。生化学的、遺伝学的手法を用いて生理機能解析を行った結果、H3 量的制御に対する HiTAP1 の関与と、転写活性に対する HiTAP1 の関与が示唆された。様々な側面から反応中間体を捉えるスナップショット解析の有効性と、明らかになってきた新しいヒストンダイナミクス制御について本論で論ずる。

## 博士論文審査結果の要旨及び最終試験結果の要旨

論文提出日	平成 24 年 1 月 20 日
学位試験日	平成 24 年 2 月 17 日

受付番号	1	論文提出者	加藤 麻希
博士論文審査結果			
学位審査委員	主査 田上 英明	副査	木藤 新一郎、鈴木 善幸、 大隅 圭太 (名古屋大学・教授)
主論文題目	スナップショット法を用いた可溶性ヒストン複合体の分子機能解析		
論文審査結果の要旨 ヒストン修飾に代表されるエピジェネティック情報は様々な生体機能に関わるが、クロマチン構造制御はダイナミックであることが明らかとなっており、その分子機構の理解が求められる。 本論文では、クロマチンに挿入されていない少量の可溶性ヒストンをクロマチン制御の反応中間体と捉え、酵母をモデル系にした独自の複合体スナップショット解析系を確立することで、以下の点を明らかにした。1) 出芽酵母において、NAP1 と FACT (Spt16,Pob3)が独立的に可溶性 H2A/H2B と複合体を形成し、従来は転写や DNA 複製時における関与が示されてきた FACT が H2A/H2B ダイナミクスを担う基盤因子として機能する。2) 分裂酵母において、新規 H3/H4 複合体因子として単離した HiTAP1 が、細胞内でも H3 と優先的に結合し、転写活性制御やヒストン量的制御に関わりうる。 本論文で明らかになった HiTAP1 による新規クロマチンダイナミクス機構は、従来考えられなかった H3/H4 解離制御という点で非常に興味深い。今後、その生理機能についてさらに解析を進めることで影響力のある研究成果として国際誌に公表することが望まれる。本研究は実験手法の開発、新しいクロマチン制御モデルの提唱など、独創的な研究への努力が認められる観点からも評価された。			
最終試験結果			
最終試験担当者	主査 田上 英明	副査	木藤 新一郎、鈴木 善幸、 大隅 圭太 (名古屋大学・教授)
最終試験結果の要旨 審査委員会は、申請者の公聴会における研究発表と質疑応答、および学位審査会における応答から、専門領域や周辺学問領域についての学識と研究能力を持つものと判断した。多岐にわたる諮問に対して概ね対応できたが、より広い生体情報分野の学識については今後さらなる研鑽を積むことが期待される。様々な実験手法を駆使して難しい生体内での機能解析に挑戦し、多くの新事実を明らかとした点は高く評価される。複数の国際学会における発表経験も評価できる。副論文は1年以内に発表できる見込みである。これらを総合し、審査委員会は申請者が博士の学位（生体情報）に値すると判断した。			