

## 別紙 4

報告番号	※ 乙 第 号
------	---------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 アフリカツメガエル卵におけるヌクレオソームの形成を制御する  
ヒストンシャペロンの解析

氏 名 朱 睿 斌

## 論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞の染色体構造の構築と維持は、遺伝情報の保管と発現に極めて重要である。クロマチンの基本単位構造であるヌクレオソームは、DNA へのヒストンタンパク質の結合によって形成される。その形成は、ヒストンタンパク質と緊密に相互作用するヒストンシャペロンによって制御される。真核細胞のゲノム DNA の複製、修復や転写などの DNA プロセスと、精子クロマチンリモデリングやヘテロクロマチン構築などのクロマチン構造変化において、複数のヒストンシャペロンがヌクレオソームの形成に関与していると考えられているが、それらのヒストンシャペロンの役割とヌクレオソーム形成の分子機序に関しては不明な点が数多く残されている。本学位論文研究では、迅速な細胞増殖に伴うクロマチン複製が効率的に行われるツメガエル初期胚の細胞内現象を試験管内で再現できる卵抽出液の無細胞系を用いて、複製されたゲノム DNA のクロマチン構築の際に、DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成を媒介するヒストン H3-H4 シャペロン Asf1、CAF-1 および HIRA の役割分担を明らかにするとともに、これまでに十分に解析が進んでいない、HIRA-Asf1 複合体によるヌクレオソーム形成の分子機序を解明することを目的とした。

まず、ツメガエル初期胚細胞のヒストン H3-H4 シャペロンの相互関係を検討するために、卵抽出液に内在しているヒストンシャペロンタンパク質の定量化を試みた。主要な 3 つのヒストンシャペロンのうち、Asf1 は HIRA と CAF-1 に較べて、過剰に存在していることが明らかとなった。一般的な培養細胞と比較して、CAF-1 に対する HIRA の相対量は卵核胞崩壊直後に急激に増加することが判明した。また、HIRA は細胞周期に通じて Asf1 と安定的に結合しているのに対して、CAF-1 のごく一部分は間期にのみ Asf1 と相互作用することが示された。さらに、CAF-1 は PCNA に結合して、DNA 複製中のクロマチンに局在するが、HIRA のクロマチン結合は間期の間、維持されていることが分かった。これらの結果は、ツメガエル初期胚細胞において、Asf1 を中心とした CAF-1 及び HIRA、二つのヒストンシャペロン複合体が存在していることと、CAF-1-Asf1 複合体の形成は時間的・空間的な調節によって複製中の DNA 上に制限されるが、HIRA-Asf1 複合体の形成はこれらの制約を受けないことを示唆している。

次に、ゲノム DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成における Asf1、HIRA 及び CAF-1 の役割を検討するために、Asf1、CAF-1 及び HIRA もしくは CAF-1 と HIRA を同時に免疫除去した卵抽出液で複製

されたゲノム DNA をヌクレアーゼ切断し、その断片のパターンの比較及び定量解析を行うことで、複製されたゲノム DNA 上のヌクレオソーム形成の状態を調べた。対照の卵抽出液では、複製直後のゲノム DNA の大部分が速やかにヌクレオソームを形成し、複製の後にもヌクレオソーム形成が継続的に進行する。Asf1 を免疫除去した卵抽出液では、DNA 複製時、及びその後のいずれのヌクレオソーム形成も強く抑制された。CAF-1 と HIRA を共に免疫除去したものでは、Asf1 の除去と同様のヌクレオソーム形成の抑制が観察された。しかし、CAF-1 の免疫除去卵抽出液では、DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成が抑制されたが、複製後のヌクレオソーム形成によって、複製されたゲノム DNA の大部分にヌクレオソームが形成された。この DNA 複製後のヌクレオソーム形成は HIRA タンパク質の量に依存することも示された。一方、HIRA を免疫除去した卵抽出液では、ゲノム DNA 複製に共役するヌクレオソーム形成はほとんど影響を受けなかったが、DNA 複製の後で起こるヌクレオソーム形成はなされなかった。これらの結果は、ツメガエル初期胚細胞において、複製されたゲノム DNA のヌクレオソーム形成は、Asf1 を中心とした CAF-1 及び HIRA の両ヒストンシャペロン複合体によって媒介されること、および、CAF-1-Asf1 複合体は DNA 複製に共役したヌクレオソーム形成を促進するが、複製された DNA が完全にヌクレオソームを構築するためには HIRA-Asf1 による DNA 複製に共役しないヌクレオソームの形成が必要不可欠であることの 2 点を示唆している。

さらに、HIRA-Asf1 複合体によるヌクレオソーム形成の分子機序を明らかにするために、DNA 複製に共役していないヌクレオソーム形成に必要な HIRA 機能領域の同定を試みた。卵抽出液中加入したプラスミド DNA のスーパーコイル活性を指標にして、HIRA のヌクレオソーム形成活性部位を探索したところ、進化的によく保存された HIRA の N 末の WD40 と B ドメインはヌクレオソーム形成を媒介するために必要かつ十分であることが示された。そのうち、WD40 ドメインの 7 つの WD リピート中の N 末側の 3 つ (WD1-3) が極めて重要であることも明らかとなった。これらの結果は、WD40 と B ドメインは HIRA によるヌクレオソーム形成に十分であることを示唆している。また、同様な構造が保存された CAF-1 三量体の p60 サブユニットは DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成の極めて低い活性を示すことが見出された。HIRA と p60 のドメインの機能を比較したところ、B ドメインの Asf1 に対するアフィニティーの強さは HIRA のヌクレオソーム形成活性に相関することと、HIRA の WD40 ドメインはヌクレオソーム形成に決定的に重要であることが判明した。これらの結果は、HIRA の WD40 ドメインは DNA 複製に共役しないヌクレオソーム形成に中心的な役割を果たすこと、また、p60 のドメインはこのヌクレオソーム形成に適していないことを示唆している。従って、ヌクレオソーム形成を媒介する HIRA と CAF-1 の分子機序は異なると考えられる。

最後に、真核細胞の核内のゲノム DNA 上のヌクレオソーム形成制御に必要なシャペロン複合体の核内局在に必要な HIRA のドメインを同定した。HIRA 複合体の核内蓄積には、Asf1 と結合する B ドメインは必要でなく、HIRA の N 末にある WD40 ドメインと C 末端の広範な領域が必要であることが示された。また、HIRA のクロマチン結合は C 末側の Hir ドメインに依存することが明らかとなった。これらの結果は、HIRA の N 末の領域がヌクレオソーム形成を媒介するのに対して、C 末は主にヒストンシャペロン複合体の細胞内局在の制御に関与することを示している。従って、HIRA の両末領域はそれぞれ異なる役割を果たすと考えられる。

本学位論文研究では、ゲノム DNA の複製に伴うヌクレオソーム形成におけるヒストンシャペロンの Asf1、CAF-1 と HIRA の役割を明確した。また、ヌクレオソームの形成及びクロマチン結合に必要な HIRA の機能領域の同定からは、HIRA-Asf1 複合体の働き方を理解するための手がかりを初めて得た。さらに、ヌクレオソーム形成における HIRA と p60 の機能ドメインの比較は、両ヒストンシャペロン複合体によるヌクレオソーム形成の分子機序の違いを示唆した。