

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 乙 第 号
------	---------

氏 名 朱 睿斌

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

論文審査担当者

主 査 名古屋大学大学院理学研究科 教 授 博士(理学) 大隅 圭太
委 員 名古屋大学大学院理学研究科 教 授 博士(理学) 五島 剛太
委 員 名古屋大学大学院理学研究科 准教授 博士(理学) 西山 朋子
委 員 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科 准教授
博士(理学) 田上 英明

論文審査の結果の要旨

別紙 1-2

真核生物のゲノム DNA はヒストンと結合してクロマチンの基本構造であるヌクレオソームを形成する。ヌクレオソーム形成における DNA とヒストンの結合は、ヒストンシャペロンと呼ばれる蛋白質群によって媒介され、ヒストン H3-H4 が DNA に結合する最初のステップが最も重要である。ヌクレオソームは DNA 複製依存的または非依存的に形成され、前者では CAF-1-Asf1 複合体、後者では HIRA-Asf1 複合体、2 種類のヒストンシャペロン複合体がヒストン H3-H4 の DNA への結合を媒介するとされている。しかしながら、二つの複合体がヒストンと DNA の結合を媒介するしくみは不明である。申請者は、両複合体によるヌクレオソーム形成を試験管内で再現するアフリカツメガエル卵抽出液の無細胞系を用いて、CAF-1-Asf1 および HIRA-Asf1、両複合体の役割を検討し、さらに、HIRA の機能領域の解析を通して HIRA-Asf1 複合体による複製非依存的なヌクレオソーム形成の分子機構を検討した。

ツメガエル卵の低速遠心抽出液 (LSE) は DNA 複製を伴う核構築を再現する。特異抗体を用いて LSH から HIRA、CAF-1 を選択的に除去し、精子クロマチンを基質にして、複製された DNA のヌクレオソーム形成を調べた結果、DNA 複製直後のヌクレオソーム形成は、CAF-1 除去により抑制されたが、HIRA 除去の影響は見られず、いずれの場合も、最終的なヌクレオソーム形成の効率は、対照の非除去 LSH に較べて 7~8 割程度にとどまった。よって、ツメガエル卵でも厳密な意味での複製依存的なヌクレオソーム形成は CAF-1 によって媒介されること、しかし、複製された DNA のヌクレオソーム形成は、HIRA によっても、CAF-1 と同程度になされること、完全なヌクレオソーム形成には両者が必要であることが示唆された。また、CAF-1 除去 LSH に外来性の HIRA を添加すると、複製された DNA のヌクレオソーム形成率が上昇したことから、複製依存的なヌクレオソーム形成の不備は、HIRA によって補完されることが示された。また、LSH から Asf1 を免疫除去すると、CAF-1 量には変化がなかったが、HIRA は共に除去され、複製依存的なヌクレオソーム形成が著しく阻害されたことから、CAF-1 による複製依存的なヌクレオソーム形成には Asf1 が必要であることが示された。

次に、プラスミド DNA に対する複製非依存的なヌクレオソーム形成を効率よく誘起するツメガエル卵の高速遠心抽出液 (HSE) を用いて複製非依存的なヌクレオソーム形成の各シャペロンへの依存性を調べた。その結果、HSE の複製非依存的なヌクレオソーム形成は HIRA-Asf1 複合体に完全に依存することが確認された。さらに、HIRA を除去した HSE に大腸菌で調製した HIRA-Asf1 複合体を添加したところ複製非依存的なヌクレオソーム形成の回復が認められたので、この戻し実験の系を用いて HIRA のどの領域が複製非依存的なヌクレオソーム形成に必要なかを検索した。その結果、Asf1 との複合体形成に必須の B 領域以外に、N 端にある WD40 領域が不可欠であること、7 つの WD40 反復のうち N 末側から 3 つの反復が必須で、特に 1 番目と 3 番目が重要な役割を果たすことが判明した。また、HIRA の WD40 領域と B 領域を含む N 末があれば複製非依存的なヌクレオソーム形成を誘起するのに十分であることが示された。また、LSE を用いて HIRA の核局在化およびクロマチン結合に必要な領域を検索したところ、核局在化には N 末、C 末の広範な領域が関与すること、クロマチン結合には C 末にある Hir 領域が不可欠であることが明らかにされた。

本研究により、申請者は、ツメガエル卵における複製された DNA のヌクレオソーム形成に対しての CAF-1、HIRA および Asf1 の役割を明確にし、ヒストンと DNA の結合を媒介する HIRA のしくみの中心に WD40 領域が位置することを初めて明らかにした。これらの成果は、ヒストンシャペロンによるクロマチン構築制御の分子機序を解明するための重要な礎となりうるものとして高く評価される。以上の理由により、申請者は博士(理学)の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。