

## 博士学位申請論文要旨

### *In vivo*におけるヌクレオソーム動態の解明に向けたヒストンの DNA 結合部位特異的的化学切断法の開発

理工学研究科 化学専攻 博士後期課程  
16D2-002 布施 智博

DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御するエピジェネティクスは発生と細胞の分化や生物におけるホメオスタシスに関与しており、また、エピジェネティクスの異常はがんなどのさまざまな疾患にも密接に関連している。真核生物では、遺伝情報を担うゲノム DNA はクロマチンとして細胞核内に収納されており、細胞分裂期ではクロマチンはさらに凝縮した染色体となる。クロマチン・染色体の基本単位構造であるヌクレオソームは、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 各 2 分子ずつから構成されるヒストン八量体のまわりに DNA が巻きついた複合体である。これまでの研究から、ゲノム DNA において機能的に重要な領域では、特定の位置にヌクレオソームが形成されること（ヌクレオソームポジショニングと呼ばれる）が示され、ゲノムにおけるヌクレオソームポジショニングは、遺伝子発現制御のみならずエピジェネティクスの分子機構のひとつとして捉えられている。さらに、最近、さまざまなヌクレオソーム構造の存在が示されたが、ゲノムにおける多様なヌクレオソームの構造、動態と形成機構についてはほとんど分かっていない。

従来、ヌクレオソームの解析には、ヌクレオソーム間のリンカー DNA を優先的に切断する *micrococcal nuclease* (MNase) が繁用されてきた。しかし、MNase による切断には塩基配列に対する選択性があり、ヌクレオソームの解析における短所として指摘されてきた。従って、ヌクレオソームの位置をより詳細かつ正確に決定し、その動態を解析する新規の方法の開発が強く求められている。本研究は、ヌクレオソームの多様な構造と動態を解明することを目指して、*in vivo* でのヌクレオソームのポジションと動態をより詳細に解析する実験系を開発することを目的とした。

第 1 章では、ヒストン H4 の S47C 残基を介した部位特異的的化学切断法に着目し、細胞核を MNase で限定消化するマッピング法と組み合わせて、通常の実験手法でヌクレオソームのポジションをより正確にかつ詳細に解析する方法を開発した。すなわち、出芽酵母の細胞核を基質として、MNase または化学切断法によりクロマチンを限定消化し、調製した試料を同一ゲル上で電気泳動法により両者を並行して解析するという、パラレルマッピング法を確立した。この方法を用いて、出芽酵母ミニ染色体

TRP1ARS1 とゲノム *TRP1* 遺伝子座においてヌクレオソームはその配置や転写などの影響を受け、個々のヌクレオソームでその構造的性質や動態が異なることを明らかにした。したがって、本論文で確立したパラレルマッピング法が、*in vivo* でのヌクレオソームのポジションとその動態の解析に極めて有効であることが実証された。

第2章では、*in vivo* でヌクレオソーム動態を解析するアッセイ系として、高度にポジショニングしたヌクレオソームから構成される出芽酵母ミニ染色体を構築した。第1章で確立したパラレルマッピング法を、従来よく用いられてきた出芽酵母ミニ染色体のヌクレオソームの解析に適用したところ、MNase 単独のマッピングでは知り得なかった事実を明らかにした。そこで、DNA の塩基配列とリンカーDNA 長を改変して、より安定にポジショニングしたヌクレオソームから構成される出芽酵母ミニ染色体の構築に成功した。この系は、ヒストンの翻訳後修飾、クロマチンリモデリング因子複合体などによるヌクレオソームの構造変換機構、非標準型ヌクレオソームの構造と動態の解明やエピジェネティック制御因子に作用する薬物のヌクレオソーム構造に及ぼす影響、エピジェネティック創薬のスクリーニングなどに利用されることが期待できる。

本論文における成果を基にして、4 種類のコアヒストンの局所的な DNA 結合部位を化学切断法で検出する方法の開発に着手した。各ヒストンの DNA 結合部位に Cys 変異を導入した株の構築を進めており、次世代シーケンサー (NGS) による各ヒストンの DNA 結合部位のゲノムワイド解析を計画している。従来、H4 S47C 残基を介した化学切断法や MNase による消化のゲノムワイド解析から、ヌクレオソーム単位のゲノム地図は示されているが、ヌクレオソームを構成する各コアヒストンの DNA 結合の挙動については不明である。本論文の成果を基盤として、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 の局所的な DNA 結合状態をゲノムワイドで明らかにすることによって、ヒストンテールを含むヌクレオソームの動態の解明に繋がり、クロマチンとエピジェネティクス分野において新たな視点からの研究が展開されることが期待される。

#### [主論文目録]

1. Fuse T, Katsumata K, Morohoshi, Mukai Y, Ichikawa Y, Kurumizaka H, Yanagida A, Urano T, Kato H, Shimizu M. Parallel mapping with site-directed hydroxyl radicals and micrococcal nuclease reveals structural features of positioned nucleosomes *in vivo*. ***PLoS One***, 12, e0186974 (2017).
2. Fuse T, Yanagida A, Shimizu M. The yeast minichromosome system consisting of highly positioned nucleosomes *in vivo*. ***Biol. Pharm. Bull.***, 42, 289-294 (2019).