

博士論文審査要旨

論文審査担当者

主査	明星大学	教授	清水	光弘
副査	明星大学	准教授	香川	亘
副査	明星大学	准教授	須賀	則之
副査	東京大学	教授	胡桃坂	仁志

申請者氏名 布施 智博

論文題目 *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結合部位特異的切断法の開発

(論文審査の結果の内容)

本論文は緒論、第1章、第2章、総括から構成される。緒論において、研究背景となるクロマチンとエピジェネティクスならびにクロマチンの基本単位であるヌクレオソームの構造と機能に関するこれまでの知見がまとめられている。そのうえで、現状のヌクレオソームの解析法についての問題点を指摘し、申請者の行った研究の目的とその位置づけを述べている。第1章では、*in vivo*におけるヌクレオソームポジションの解析法であるパラレルマッピング法の開発について、第2章では、ヌクレオソームの構造とその動態を解析する実験系として、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開発について、各章では緒言、実験、結果と考察、結論に従って述べられている。総括では、総合的考察と本研究の今後の展開について言及している。以下にその概要について述べる。

真核細胞では、遺伝情報を担うゲノムDNAはヒストンタンパク質などと会合し、クロマチンとして細胞核内に収納されている。ゲノムにおけるヌクレオソームの配置は、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おり、ヌクレオソームの正確なポジションを明らかにすることは重要な研究テーマである。これまでの研究において、*in vivo*でのヌクレオソームの解析結果には意見の分かれる報告や

曖昧な点があり、今なお議論の余地がある。さらに、ゲノムにおけるヌクレオソームの多様な構造、動態と形成機構についてはよくわかっていない。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。

このような研究背景を踏まえて、第 1 章において、出芽酵母の細胞核を基質とする部位特異的的化学切断と MNase 消化によるパラレルマッピング法を確立した。過去の MNase マッピング単独の結果と比較して、パラレルマッピングによってヌクレオソームの位置をより正確に決定できることが示された。申請者は、TRP1ARS1 ミニ染色体とゲノム *TRP1* 遺伝子座において、個々のヌクレオソームの構造と動態は、ヌクレオソームの位置とそこに置かれている領域の特性に強く関連していることを示した。すなわち、本法によって、化学切断部位からヌクレオソームの中心点 (dyad) が決定され、MNase のアクセシビリティからヌクレオソームの構造的性質と動態を明らかにできることが示された。

第 2 章では、*in vivo* でのヌクレオソームの構造と動態を解析するための実験系として、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を開発した。申請者は、まず、出芽酵母ミニ染色体 TALS におけるヌクレオソームのポジジョンとその占有率を、第 1 章で確立したパラレルマッピング法によって解析し、個々のヌクレオソームの占有率が異なっていることを新たに見出した。著者は、DNA の塩基配列とリンカー DNA の長さを操作することによって出芽酵母ミニ染色体の実験系を改良し、*in vivo* において高度にポジショニングしたヌクレオソームを形成させることに成功した。リンカー DNA の長さによってヌクレオソームポジジョンの安定性が変化することは極めて興味深い知見であり、ヌクレオソームポジジョンの分子機構に新たな視点を与えた。本研究で開発されたミニ染色体の実験系は、*in vivo* でのヌクレオソーム動態の解析のみならず、エピジェネティック創薬や、エピジェネティック異常とヌクレオソーム動態との関係を解明するための有用なツールとなることが期待される。

総括では、クロマチンとエピジェネティクスの研究分野の最近の動向とクロマチン解析法の現状を踏まえて、第 1 章と第 2 章の知見から総合的に考察した。さらに、申請者は、本論文で開発したパラレルマッピング法の展開として、4 種類のコアヒストンの DNA 結合部位の解析法の発展に言及している。これまでに、ヌクレオソーム中心点 (dyad) のゲノム地図は明らかにされたが、各コアヒストンのゲノムワイドでの挙動については未だ不明である。以上、本論文の成果を基盤として、染色体の機能領域におけるヌクレオソームの動態や非標準型ヌクレオソームの構造と形成機構の解明など、クロマチンとエピジェネティクスの研究分野に新たな展開と新知見がもたらされることが期待される。

よって、本研究は博士（理学）の学位を授与するに十分価値あるものと認める。

（試験および試問の結果の要旨）

本申請論文の審査は、主査として分子生物学・生化学を専門とする清水光弘教授、副査として、構造生物学・生化学を専門とする香川亘准教授、分子細胞生物学を専門とする須賀則之准教授、クロマチン研究の世界的権威のひとりである東京大学・胡桃坂仁志教授によって行われた。

各審査委員による申請論文の予読後、申請者は各審査委員より論文について質疑とコメントを受け、その内容について十分に検討し、申請論文の改善を行った。平成 31 年 1 月 31 日に、主査および副査に加えて、本学化学専攻教員、化学専攻大学院生など約 40 名の参加のもと公聴会が行われた。申請者による発表（40 分）は、各審査委員のコメントと議論を取り入れており、発表内容の論旨は明快でプレゼンテーション能力にも優れていた。発表後、副査 3 名に加えて、化学専攻教員、研究背景、実験結果の解釈、関連研究分野での本研究成果の位置づけなどについて、約 40 分質疑がなされたが、いずれの質問に対しても論理的で適切な説明がなされ、専攻学術の知識は十分であると認められた。

外国語（英語）については、その最終試験として、平成 30 年 12 月 17 日、主査、副査（香川准教授、須賀准教授）の参加のもと、博士論文に関連する最新の原著論文の紹介を行った。申請者は、2018 年 11 月に *Nucleic Acids Research* 誌に掲載された「Characterizing the nuclease accessibility of DNA in human cells to map higher order structures of chromatin」を選び、その内容についてスライドを用いて約 30 分説明した後、主査、副査から論文内容について質疑がなされた。その結果、原著論文の内容について深く理解していると判定された。また、本学位論文の内容が 2 報の原著英語論文として国際学術誌に掲載されていること、それらの原著論文における引用文献の英語論文読解力が十分であることから、課程博士としての英語の能力を合格と判定した。

以上のことを踏まえて、慎重に審査した結果、合格と判定した。