

博士論文審査要旨

論文審査担当者

主査	明星大学	教授	香川 亘
副査	明星大学	教授	清水 光弘
副査	明星大学	准教授	須賀 則之
副査	明星大学	准教授	西條 純一

申請者氏名 讓原 秀隆

論文題目 ゲノムの安定維持にはたらく染色体構築タンパク質の
生化学的解析

(論文審査の結果の内容)

申請者は、染色体構築タンパク質としてヒストン複合体および Bqt1-Bqt2 複合体に着目し、それらの構造と機能の相関を解明するために必要な構造解析技術の開発を研究目的とした。本申請論文は、4 章から構成されている。第 1 章では、本申請論文の研究背景が述べられており、申請者が着目した染色体構築タンパク質が機能する場であるクロマチン構造と、染色体のテロメア領域に関するこれまでの知見がまとめられている。第 2 章では、多様なヌクレオソーム構造の解析技術の確立について述べている。第 3 章では、X 線結晶構造解析に適した Bqt1-Bqt2 複合体の大量調製法の確立に向けた取り組みについて述べている。そして第 4 章では、第 2 章と第 3 章で述べた研究成果をもとに、それらの技術を用いた構造解析の実現性について考察している。以下にその概要を述べる。

真核生物のゲノム DNA は、クロマチンと呼ばれる高度に凝縮した構造体を形成して細胞核内に収まっている。クロマチンの構造変化は、生命活動の維持に極めて重要であり、DNA 複製、転写、修復、組換えなどのゲノム安定維持機構に伴い、クロマチン構造がほどけたり、凝縮したりする。クロマチンの構造変化を理解するためには、その基本単位であるヌクレオソームにおける構造変化の詳細を明らかにすることが重要だが、クロマチンダイナミクスの理解に必要な構造基盤はよく分かっていない。

ていない。

また、真核生物のゲノム DNA の末端にはテロメアと呼ばれる特殊な構造が形成され、相同染色体の安定維持と娘細胞への正常な分配に重要な役割を担う。テロメアは、減数分裂の初期において核膜タンパク質と物理的に相互作用し、核膜上の 1 箇所に集合する。分裂酵母においてはテロメアと相互作用する核膜タンパク質群は同定されつつあるが、その立体構造は未だ解明されておらず、テロメアが集合する詳細な分子機構は未だ不明である。

第 2 章では、多様なヌクレオソーム構造を X 線結晶構造解析法によって明らかにするために開発した技術について述べている。本章では、多様なヌクレオソーム構造を明らかにする際に問題となる位相の決定方法に着目した。位相決定は X 線結晶構造解析において必要不可欠なステップであるが、ヌクレオソーム内でヒストンや DNA の配置が既知のヌクレオソームのそれと異なる場合、従来用いられてきた分子置換法による位相決定は困難であることが予想される。そこで、本研究ではセレノメチオニンを導入したヒトのヒストンタンパク質を大量調製し、それを用いて再構成した通常型ヌクレオソームの立体構造を、12 個または 16 個のセレン原子から得られる位相情報をもとに X 線結晶構造解析法により決定した。本研究において、申請者はセレノメチオニンを含むヌクレオソームの構造解析および得られた構造と既知のヌクレオソーム構造との詳細な比較解析において重要な貢献を果たした。本研究で確立した位相の決定方法により、ヒストンや DNA の配置が異なったヌクレオソームの構造決定に用いることが可能となった。

第 3 章では、テロメアと相互作用する Bqt1-Bqt2 複合体をリコンビナントタンパク質として大量調製するための技術の開発について述べている。従来、Bqt1-Bqt2 複合体は安定なヘテロ二量体を形成するが、その可溶性は著しく低く、大量調製が非常に困難であるという問題があった。そこで可溶性の高いマルトース結合タンパク質のホモログである Athe_0614 タンパク質を Bqt1 に融合し、Bqt1-Bqt2 複合体の可溶性を高めることを試みた。その結果、複合体の可溶性が格段に向上した。さらに、Athe_0614 タンパク質と Bqt1 をつなぐポリペプチドリンカーのアミノ酸配列の検討を行ったが、いずれの配列を用いた場合でも複合体の可溶性には影響がなかった。過去に、機能的に無関係なタンパク質を融合して目的タンパク質の可溶性を向上させ、その融合体の X 線結晶構造解析の成功例があることから、Bqt1-Bqt2 複合体の X 線結晶構造解析においても Athe_0614 の融合は技術的進歩として評価できる。

第 4 章では、本研究で開発した技術を用い、実際に通常型と異なる構造を有するヌクレオソームと Bqt1-Bqt2 複合体の X 線結晶構造解析を行う際の問題点が議論されている。ヌクレオソームの構造解析については、良質な結晶の作製が困難であることが挙げられる。近年、クライオ電子顕微鏡解析の発展により低分解能の立体構造を簡便に明らかにできるようになっている。本研究で確立したセレン原子を利用

した構造解析法が広く用いられるようになるためには、ヌクレオソームの結晶化とX線回折データの収集を簡便に行うための技術開発も必要であると議論している。Bqt1-Bqt2 複合体については、本論文において可溶化の問題を克服し、良質な結晶を作製することが最も困難なステップであることが判明した。結晶化を成功させる上でAthe_0614とBqt1をつなぐポリペプチドリンカーのアミノ酸配列を検討する必要性について議論している。

以上、本論文の成果は、通常型とは異なる構造を有するヌクレオソーム並びにBqt1-Bqt2複合体の構造生物学において一定の進展をもたらすことが期待される。よって、本申請論文は博士（理学）の学位授与に値するものと認める。

（試験および試問の結果の要旨）

本申請論文の審査は、構造生物学を専門とする香川亘教授（主査）、分子生物学・生化学を専門とする清水光弘教授（副査）、分子細胞生物学を専門とする須賀則之准教授（副査）、および物性物理化学を専門とする西條純一准教授（副査）によって行われた。

主査と副査による申請論文の予読後、申請者は論文について主査と副査より質疑とコメントを受け、その内容について検討し、申請論文の改善を行った。2020年2月14日に、主査および副査に加え、本学化学専攻の教員、化学専攻の大学院生など約30名の参加のもと公聴会が行われた。申請者による発表（約30分）の後に、副査3名に加えて、化学専攻教員から、研究背景、実験結果の解釈、及び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50分間質疑がなされた。質問に対し、適切な説明がなされていない場面は見られたが、専攻学術の知識は有するものと認められた。

外国語（英語）については、その最終試験として2019年12月16日に、主査（香川教授）、副査（清水教授、須賀准教授）の参加のもと、申請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、2019年10月に*Nature*誌に発刊された、「**Structure of the inner kinetochore CCAN complex assembled onto a centromeric nucleosome**」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。その後、主査と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理解していると判定され、課程博士としての英語の能力を合格とした。

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。