

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 赤井 祐介

本論文では、これまで全く不明であったヒストンの化学修飾からヌクレオソーム構造変換に至る分子機構を解明するため、X線結晶構造解析の手法を用いて、アセチル化ヒストンを特異的に認識するダブルプロモドメイン(DBD)とヌクレオソーム構造変換因子であるCIAによる複合体の立体構造を決定し、ヌクレオソーム構造の変換機構の解明を行っている。本論文の構成は、第一章「序論」、第二章「精製」、第三章「結晶化」、第四章「構造計算」、第五章「CIA-DBD複合体の構造解析」、第六章「相互作用解析」、第七章「ヌクレオソーム構造変換の分子機構の解明に向けた研究」、第八章「細胞内におけるCIAとDBDの関連性」の全八章からなる。

第二章では、結晶化および相互作用解析に使用するタンパク質を大腸菌の発現系を用いて大量調製し、精製の検討を行っている。

第三章では、第二章で精製したCIA、DBDのタンパク質溶液を用いて結晶化を行っている。結晶化条件のスクリーニングの結果、得られたCIA-DBD複合体の結晶は構造解析には不向きな双晶を形成していることが示されている。CIAのC末端領域が結晶中で不安定な構造をとっていることが示唆されたため、長さを少しずつかえたCIAのコンストラクトを使用することで、CIA-DBD複合体の双晶が解消されるかどうかを確認している。複数のコンストラクトを用いて結晶化条件の最適化を行った結果、CIA-DBD複合体の単結晶を得ることに成功し、最大で3 \square 分解能のX線回折データを収集することに成功している。

第四章および第五章では、第三章で得られたX線回折データを用いて、CIA-DBD複合体の構造解析を行っている。まず、単波長および多波長異常分散法による初期位相の決定を行っているが、分解能が低いことなどから初期位相を得ることはできていない。そこで、分子置換法を利用して構造解析を行っている。結晶構造解析の結果、1分子のDBDに対して2分子のCIAが独立に相互作用した複合体を形成することが明らかにされている。結晶における両者の接触面積は700~800 \AA^2 と非常に小さいことから、両者の相互作用は非常に弱く、結晶中のartifactではないかと強く懸念されると述べている。

第六章では、結晶中で観測されたCIA-DBD複合体が溶液中においても形成されるかどうかを評価するため、両者の相互作用解析を行っている。両者の接触面積の大きさから、

両者の相互作用は結晶中の artifact ではないかと強く懸念されたため、点変異体を用いた GST プルダウンアッセイ、等温滴定カロリーメトリー、分析超遠心による様々な実験手法を用いて両者の相互作用を確認している。相互作用解析の結果、溶液中においても結晶構造を反映した複合体を形成することを明らかにしている。

第七章では、第五章で明らかとなった CIA-DBD 複合体の機能を理解するため、アセチル化ヒストン H4（ヒストンテイル領域）やヒストン H3-H4（ヒストンコア領域）を用いて相互作用解析を行っている。アセチル化ヒストン H4、CIA、DBD による相互作用解析では、CIA-DBD-アセチル化ヒストン H4 による 3 者複合体が形成されることが示されている。一方、ヒストン H3-H4、CIA、DBD による相互作用解析では、ヒストン H3-H4 と DBD が CIA に対して競合的に相互作用し、CIA の DBD からヒストン H3-H4 への転移が不可逆的進行することが示されている。これらの結果から、「アセチル化ヒストン H4 に相互作用した DBD がヌクレオソーム構造変換因子である CIA を特定領域のヌクレオソーム上にリクルートし、その後、CIA がヒストン H3-H4 と相互作用することで、ヌクレオソーム構造を破壊する」という分子機構モデルを支持する結果であると述べている。

第八章では、クロマチン免疫沈降法により、*in vitro* 解析により想定された分子機構モデルが細胞内においても利用されていることを証明している。以上の結果から、*in vitro* および *in vivo* 解析により証明した分子機構は、これまでの研究結果に基づくものであり、十分信頼性のおける妥当なモデルであると言える。

各研究はすべて論理的に行われており、最終的に得られた知見は新規性が極めて高く、かつその妥当性も申し分ない。また、本研究は学術上非常に興味を置かれている分野において、全く新規の分子機構を提唱するに至っている。そのため、本研究で得られた知見は、学術上貢献するところ大である。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。