

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 20 年度博士課程 進学  
氏 名 村田 拓哉  
指導教員名 加藤 茂明

### 論文題目 ヒストン H1 による特異的ヘテロクロマチン構造変換機構に関する研究

#### 第一章 序論

高等真核生物における遺伝子の時期・組織特異的な転写制御や DNA 複製・組換え・修復には、クロマチン高次構造のダイナミックな変換が必要とされる。クロマチン高次構造はゲノム全体で均一の構造ではなく、ヌクレオソームが弛緩したユークロマチン領域と、ヌクレオソームが凝集した構造を形成するヘテロクロマチン領域に大別される。

ヘテロクロマチンはその凝集した構造による染色体構造の安定性の維持が転写抑制を制御すると考えられている。ヘテロクロマチン形成の調節は、ヒストン修飾やヒストン H1 との結合により制御されることが知られている。ヒストン H1 はヌクレオソーム間のリンカー DNA 部分に結合する因子で、これまでに *in vitro* の解析からヌクレオソームを固定し、ヌクレオソームを凝集させることで 30nm ファイバーと呼ばれるクロマチン高次構造の形成に機能することが知られている。実際、ショウジョウバエ唾液腺染色体を用いた *in vivo* 解析より染色体全体にわたるヘテロクロマチン高次構造の形成・維持に重要であることが示されている。

近年、このようなヘテロクロマチン構造は必ずしも均一ではなく、染色体上の特定領域においては特徴的な構造を形成していることが明らかになりつつある。細胞分裂間期の間、セントロメア、テロメア領域は常に凝集し、ゲノムを安定化している。その一方、条件的ヘテロクロマチンと呼ばれる領域では、分化・発生過程や外的刺激によりクロマチン構造が可変的に変換される。そのため、ヒストン H1 もクロマチン上に一様に非特異的に結合す

るのではなく、領域特異的にリクルートされる機構の存在が示唆されている。しかしながら、ヒストン H1 タンパク自身には領域特異性を規定するモチーフは存在しない。そのため、ヒストン H1 のクロマチン局在を規定し、ヘテロクロマチン構造変換を制御するヒストン H1 に相互作用する未知因子の存在が示唆される。

そこで本研究ではヒストン H1 による特異的ヘテロクロマチン領域のクロマチン構造変換を制御する新規因子を同定し、その分子機構を解明することを目的とした。まず、ヒストン H1 の相互作用因子を生化学的アプローチにより取得・同定し、取得因子の機能を生化学的手法及びショウジョウバエ個体やその分子遺伝学的手法を用いて解析した。

## 第二章 ヒストン H1 の複合体精製と新規相互作用因子の同定

ヒストン H1 を介したクロマチン構造変換の分子メカニズムの解明のため生化学的手法によりヒストン H1 の相互作用因子の取得・同定を試みた。ショウジョウバエ胚由来 S2 細胞の核抽出液及びクロマチン画分からショウジョウバエヒストン H1 をベイトとした GST 精製をおこなった。その結果、質量分析法によりヒストン H1 相互作用因子の一つとして Bj1 を同定した。Bj1 はヒト RCC1 のショウジョウバエホモログである。RCC1 はタンパク質の細胞質—核間輸送、細胞分裂の際のスピンデル形成、核膜の再構成に重要である因子として知られており、これらの機能は RCC1 内の機能ドメインである RCC ドメインを介して発揮されている。通常、RCC ドメインは核輸送制御因子 RanGTPase に結合している GDP を GTP に交換することで RanGTPase を活性化させ、輸送などに機能している。一方、ヒストン H2A/H2B との直接結合を介してヌクレオソームに結合する機能が知られている。また、RCC1 のクロマチン上の局在が知られていることから、クロマチン構造変換機能を有することが示唆される。そこで次に Bj1 がヒストン H1 依存的なクロマチン構造変換に関与する可能性を考え、Bj1 に着目してその機能解析をおこなった。

Bj1 のクロマチン構造変換機能の有無を、ショウジョウバエ *white* 遺伝子の班入り位置効果の系を用いて評価したところ、Bj1 が Su(var)活性すなわちヘテロクロマチン化能を有する可能性が示唆された。さらに、ショウジョウバエ Bj1 ノックダウンシステムを用いて 3 齢幼虫の唾液腺多糸染色体における染色体構造への機能の評価したところ、染色体バンドパターンが破綻する表現型が観察された。この表現型はヒストン H1 をノックダウンした際の表現型と同じであった。これらの結果より、ヒストン H1 相互作用因子として同定された Bj1 がヒストン H1 と協調してクロマチン構造変換制御を担う因子であることが示唆された。

## 第三章 Bj1 のヒストン H1 クロマチンリクルートメントの機能解析

次に、クロマチン上での Bj1 とヒストン H1 との共局在を免疫染色により検討した。S2 細胞及び唾液腺染色体を用いた免疫染色の結果、Bj1 はヘテロクロマチン領域に局在し、その大部分がヒストン H1 との共局在を示した。一方、ヒストン H1 は Bj1 と共局在の他、広範囲に局在した。このことから、Bj1 とヒストン H1 の染色体上の共局在には特異性がある事が明らかになった。次に、GST プルダウン法により Bj1 とヒストン H1 の結合を検討し

たところ、両者は直接的に結合していた。また Bj1 の RCC ドメイン活性部位がヒストン H1 との結合にも重要であることを見出した。これらの結果より、Bj1 のクロマチン構造変換機能としてヒストン H1 のクロマチン結合の制御あるいはヒストン H1 のクロマチン結合後のクロマチン構造変換が考えられた。

そこで、Bj1 のクロマチン構造変換機能を明らかにするため、Bj1 をノックダウンした際のヒストン H1 のクロマチン結合能を調べた。ショウジョウバエ個体で Bj1 をノックダウンした結果、クロマチンの H1 依存的なマイクロコッカルスヌクレアーゼ(MNase)耐性の減弱が見られ、またヒストン H1 のクロマチンへの結合能が低下していた。また、Bj1 をノックダウンした唾液腺染色体ではヒストン H1 のクロマチン上の局在の消失が見られた。さらに *in vitro* クロマチン再構築系を用いた MNase アッセイをおこなった。その結果、Bj1 を加えることでヒストン H1 によるクロマチンの MNase 耐性の増強が認められ、その耐性増強は RCC ドメイン変異体により消失した。その結果より、Bj1 がヒストン H1 のクロマチンリクルートメントを促進していることが示唆された。

#### 第四章 Bj1 依存的なヒストン H1 のヘテロクロマチン構造変換の解析

次に H1 依存的なヘテロクロマチン領域における Bj1 のクロマチン構造変換調節活性を検討した。まず、クロマチン画分の免疫沈降法により Bj1 と結合するヌクレオソームのヒストン修飾を調べた。その結果、H3K9 ジメチル、H4K20 ジメチルと Bj1 の相互作用を検出した。S2 細胞の免疫染色においてもこれらヒストン修飾との共局在を認めた。一方でヒストンアセチル化修飾との相互作用は検出されなかった。次に S2 細胞における Bj1 のノックダウン後のヒストン修飾の変化を検討したところ、H3K9 ジメチル、H4K20 ジメチルが減少し、Bj1 がヘテロクロマチンの形成に必須であることが示唆された。次に、Bj1 を介した H1 依存的ヘテロクロマチン形成の分子機構解明を目指し、更に Bj1/ヒストン H1 相互作用未知機能因子の探索をおこなった。また、Bj1 をベイトとした精製をおこない、未知因子の同定を試みた。その結果、リボソーマルタンパクやスプライシング因子が Bj1 相互作用因子として同定された。これらの因子はヒストン H1 の精製では同定されなかったことから、Bj1 を介したヒストン H1 によるヘテロクロマチン形成のクロマチン特異性を規定する可能性が考えられた。

#### 第五章 総合討論

本研究では生化学的手法によりヒストン H1 の新規相互作用因子として Bj1 を同定し、ヒストン H1 が Bj1 によりクロマチンへのリクルートメントの制御を受けて、ヘテロクロマチン領域のクロマチン抑制化構造変換をすることを見出した。

ヒストン H1 によるヘテロクロマチン領域の構造変換において、染色体上での特異性を規定するメカニズムはこれまで不明であった。本研究により Bj1 がヒストン H1 のリクルートメントを介してクロマチン局在を規定する可能性が示唆された。また、Bj1 により調節を受けた H3K9、H4K20 メチル化修飾は条件的ヘテロクロマチンの指標と知られていること

から、この機構は条件的ヘテロクロマチンにおけるクロマチン構造変換を制御していることが示唆された。これまでヒストン H1 とヒストン修飾酵素の関連は知られていないが、Bj1 がヒストン修飾酵素の活性あるいはクロマチン局在を制御し、両者の相互作用の介在する可能性も考えられる。

これまでにリボソーマルタンパク RpL22 がヒストン H1 と相互作用し転写抑制に機能すると報告されているが、本研究の Bj1 相互作用因子の精製によりそれと異なるリボソーマルタンパク RpL3 や RpL4 を同定した。このことから、種々のリボソーマルタンパクがヒストン H1 依存的なクロマチン構造変換の特異性を規定し、ヘテロクロマチンにおける構造の多様性を制御している可能性が考えられた。これまでに、non-coding RNA を介したヘテロクロマチン構造変換機構が提唱されていることから、リボソーマルタンパクが RNA 結合能を有することから Bj1 を介したヒストン H1 クロマチン構造変換の特異性には RNA が介在している可能性が示唆された。

これまでヒト RCC1 の機能として細胞質―核間輸送や細胞分裂時のスピンドル形成および核膜再構成の制御が知られていたが、間期におけるそのクロマチン局在の意義は不明であった。本研究の解析により初めてショウジョウバエホモログ Bj1 がクロマチンの構造変換を制御する機能を持つことを見出し、Bj1 のクロマチン局在の意義の一端を明らかにした。また、核輸送とクロマチン構造変換がカップリングした転写制御が近年提唱され、核膜再構成後に染色体のクロマチン構造の再構築の必要性が指摘されている。そのため、Bj1 のヒストン H1 リクルートメント機能を介したヘテロクロマチン構造変換が、この細胞周期に依存した染色体構造の再構築に関与する可能性が考えられる。

以上、本研究ではヒストン H1 によるヘテロクロマチン構造変換機構においてクロマチン上の特異性を示す新規因子の同定とそれによるヘテロクロマチン構造変換機構の一端を明らかにした。今後、Bj1 およびヒストン H1 のゲノム上の特異性を規定するさらに上流の分子機構やヒストン H1 によるクロマチン凝集とヒストン修飾などの他のヘテロクロマチン高次構造変換機構との相互作用を解明することにより、ヘテロクロマチン領域特異的なクロマチン構造変換の一連の分子機構を明らかにできると考えられる。

(参考文献)

Murata T., Suzuki E., Ito S., Sawatsubashi S., Zhao Y., Yamagata K., Tanabe M., Fujiyama S., Kimura S., Ueda T., Matsukawa H., Kouzmenko A., Furutani T., Kuranaga E., Miura M., Takeyama K., Kato S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,72, 2255-2261 (2008)

Sawatsubashi S., Murata T., Lim J., Fujiki R., Ito S., Suzuki E., Tanabe M., Zhao Y., Kimura S., Fujiyama S., Ueda T., Umetsu D., Ito T., Takeyama K., Kato S. *Genes Dev.*, 24, 159-170 (2010)