

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 末岡 拓馬

ゲノムDNAとヒストンタンパク質によってヌクレオソーム構造が形成されており、その構造の変化によって遺伝子発現が精密に制御されている。この制御機構の鍵となるのがヒストンでの多様な翻訳後修飾であり、新たな修飾の発見・機能解明がエピジェネティクス研究の一大分野として盛んに研究されてきた。ある特定の翻訳後修飾が与える影響を分子レベルで理解するためにはその修飾のみを有するヒストンを人工的に作製することが不可欠となるが、一方で従来の生物工学的手法では作製手法が限られており、汎用性に限界があることが難点であった。近年進展の著しいタンパク質化学合成法は、任意の部位に目的の官能基を導入することを可能とするため、様々な生物学研究への応用が模索され始めている。本論文では、化学合成を基盤としたヒストン H2A ならびに H2B の作製法の確立と、合成ヒストンを用いたエピジェネティクス研究への応用について述べている。本論文は五章より構成されている。

第一章では、本論文の背景を概説し、研究の目的を述べている。前半ではヒストンならびにその翻訳後修飾に関わる生物学的な事象について紹介し、後半ではヒストン研究への有機化学的なアプローチについて、化学的全合成を中心に詳述している。

第二章では、ヒストン H2A の合成手法の確立と、試験管内ならびに生細胞アッセイへの応用が報告されている。まず H2A タンパク質全長を三フラグメントに分割する合成ルート設計を行い、ペプチド固相合成法とネイティブケミカルライゲーション法を組み合わせることで世界初の H2A の化学合成が達成された。H2A-H2B 二量体の作成ならびにヌクレオソームの再構成実験を通して、合成 H2A が大腸菌発現により得られた H2A と同様に機能することが示された。また、蛍光色素結合 H2A を作成し、これを用いた生細胞アッセイを行うことで、合成ヒストンの細胞導入法の検証および合成ヒストンの細胞内局在のイメージングについて示した。最後に、3 か所に異なる 3 種類の修飾（メチル化・アセチル化・リン酸化）を導入した H2A を合成し、これらの修飾がヌクレオソーム構造に与える影響を熱安定性評価により確かめている。

第三章では、H2A の 57 番目チロシン残基になされるリン酸化が有する機能について議論している。このリン酸化は転写の伸長に関わるとされており、本章ではヌクレオソーム構造におけるチロシン残基の位置から、リン酸化が H2A-H2B 間の相互作用変化を促すのではないかと仮説を立て、その検証を行っている。第二章で確立した手法を用いてリン酸化チロシンを有する H2A を合成し、試験管内アッセイに適用した。H2A-H2B 二量体の安定性評価実験から、リン酸化が二量体を不安定化することが示され、塩による静電遮蔽に大きく影響を与えていることが示唆された。また、ヌクレオソームを用いた同様の評価から、リン酸化がヌクレオソームからの H2A-H2B 二量体解離を促していることが明らかになった。一方で、酵素によるヌクレオソーム DNA の分解実験により、このリン酸化はヒストン-DNA 間の相互作用には寄与しないことが示された。これらの結果より、対象のリン酸化が二量体形成を制御する初めての修飾であること、リン酸化そのものが転写に寄与する可能性についてまとめている。

第四章では、これまであまり明らかでなかった H2A と H2B の二量体形成について着目し、その可視化を実現するための人工ヒストンを合成している。単量体と二量体との平衡を評価する系として分子内の Förster 型共鳴エネルギー移動 (FRET) を選択し、ヒストン H2B の適切な箇所に二種類の蛍光色素を導入する合成ルートのデザインを展開した。固相合成法およびネイティブケミカルライゲーション法と直交的な蛍光色素の付加により目的の H2B を化学合成し、これを用いて H2A との二量体の形成の確認を行っている。H2A-H2B 二量体形成時には高効率での FRET が見られる一方で、H2B が単量体の時や他のヒストンタンパク質 H3、H4 と共存している時は FRET が小さいことが、蛍光測定によって示された。二量体形成特異的な蛍光シグナル変換は、H2A-H2B 二量体に変性剤を加える解離実験からも示された。

第五章では本論文の総括と、今後の展望が述べられている。

以上のように、本論文ではエピジェネティックな生物学的現象を分子レベルから深く理解するために、有機化学的アプローチによる H2A ならびに H2B の統合的な研究が示されている。タンパク質化学合成法によってヒストン H2A を初めて合成し、それを翻訳後修飾研究に応用した点、適切な合成デザインにより分子内 FRET を可能とする H2B を作製したことは本研究における独創性であるといえる。また、化学合成から生物学研究への道筋をつけたことから、今後のエピジェネティクス分野の発展に大きく寄与することが見込まれる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。