

論文審査の結果の要旨

氏名 湯川 将之

本論文は、ヒストン H2A および H3 変異体のゲノム上における分布をクロマチン免疫沈降 (Chromatin Immunoprecipitation: ChIP) とそれ引き続いての DNA シーケンス (以下 ChIPseq と略す) を行うことで網羅的に解析したものであり、以下のような内容となっている。

本研究では、ヒストン H2A および H3 の主な変異体として、それぞれ H2A、H2A. X、H2A. Z、macroH2A (mH2A)、および H3. 1、H3. 2、H3. 3 について解析を行った。ヒストン H3 変異体である H3. 1、H3. 2、H3. 3 はアミノ酸配列が非常によく似ており、これらのヒストン変異体を区別して反応するすぐれた抗体がないため、本研究ではまず、解析を行ったすべての H2A および H3 ヒストン変異体に関して、Flag-ヒストン変異体をコードする恒常発現用ベクターを作成した。そして、これらの Flag-ヒストン変異体ベクターをそれぞれマウス ES 細胞に導入し、Flag-ヒストン変異体を恒常発現する細胞株を樹立した。その後、それらの細胞をサンプルとして Flag 抗体を用いた ChIPseq を行い、ヒストン変異体のゲノム上の局在を解析した。

まず、マウス ES 細胞において各ヒストン変異体の分布が染色体によって異なっているどうかを調べた結果、常染色体では特に分布に偏りのある変異体は見られなかった。しかし Y 染色体においては H3. 3 の read 数の割合が低かった。このことから、ユークロマチン化に関わる H3. 3 は高度にヘテロクロマチン化されている Y 染色体から排除されているものと考えられた。

次いで、ヒストン変異体と遺伝子領域との関連について調べた。RNA シーケンスのデータから遺伝子を転写 active と転写 inactive の 2 つに大別し、それらの遺伝子内部と前後における各変異体の分布 profile を作成した。その結果、active な遺伝子では Transcription Start Site (TSS) においてヒストン変異体の局在が顕著に減少していることが明らかとなった。さらに TSS の周辺において H2AZ と H3. 3 の大きなピークが見られた。一方、inactive な遺伝子では上記のような特徴は見られず、どのヒストン変異体も遺伝子内部および前後において一定の局在を示していた。したがって、ヒストン変異体によって active, inactive な状態のクロマチンが形成され、転写の状態が決定されているものと考えられた。また、promoter 領域に CpG 配列が多い遺伝子 (HCP) と少ない遺伝子 (LCP) とではクロマチン状態や転写様式が異なっていることが報告されている。そこで、ヒストン変異体の局在と promoter における CpG の density および転写状態との間の相互関係を調べた。最初に、遺伝子を HCP と LCP に分類し、続いて active と inactive に分類して TSS 周辺の profile を作成した。その結果、H2AZ と H3. 3 の TSS 周辺における

ピークは HCP 遺伝子でのみ見られることが分かった。さらに前述した active な遺伝子に見られた TSS におけるヒストン変異体の局在量の低下は遺伝子が active, inactive な状態に依らず、遺伝子が HCP か LCP かどうかに依存していることが分かった。さらに転写に関わる様々な調節エレメントにおけるヒストン変異体の分布を調べたところ、転写因子結合サイトおよび CpG Island では、H2AZ と H3.3 が高いレベルで局在していることが分かった。

各ヌクレオソーム単位は、それを構成する H2A 変異体と H3 変異体の組み合わせにより、その性質が大きく異なると考えられている。そこで、特定の組み合わせのヌクレオソームが高頻度に存在するゲノム領域を特定するための解析方法を開発し、H2A 変異体と H3 変異体の各組合せの出現頻度を調べたところ、H2AZ と H3.3 の組み合わせが他の変異体同士の組み合わせのものよりも高いことが分かった。このことはヌクレオソームを形成する過程において H2AZ と H3.3 の親和性が高いことを示している。また、H2AZ と H3.3 はそれぞれ H3K4me3 と関係があると報告されている。そこで、H2AZ と H3.3 が重なり合う領域の H3K4me3 レベルを調べてみたところ、それぞれの変異体が単独で存在する領域よりも高いことが分かった。このことから H2AZ と H3.3 は一つのヌクレオソーム内で協調して働き H3K4me3 の修飾が入るクロマチン状態を作り出しているものと考えられた。

以上、本論文において、ヒストン変異体は遺伝子の活性化状態およびゲノム上の様々な調節領域で特異的な局在を示すことが明らかにされた。また H2A 変異体と H3 変異体の組み合わせには優位性があり、これがクロマチン状態に関与することが示された。これらの結果はヒストン変異体のクロマチン構造への関与を明らかにしたものであり、ゲノム機能を調節するメカニズムの解明に大きく寄与するものであると考えられる。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 2116 字