

Title	Linker histone variants control chromatin dynamics during early embryogenesis
Author(s)	佐伯, 英昭
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46338">https://hdl.handle.net/11094/46338</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	佐伯英昭
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19713 号
学位授与年月日	平成 17 年 5 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科先端応用医学専攻
学位論文名	Linker histone variants control chromatin dynamics during early embryogenesis (リンカーヒストンバリエントは発生初期のクロマチンダイナミクスを規定する)
論文審査委員	(主査) 教授 金田 安史 (副査) 教授 辻本 賀英 教授 花岡 文雄

## 論文内容の要旨

## [目的]

クロマチンの高次構造形成に重要なリンカーヒストンは、他のコアヒストンより多くのバリエントを有し、しかも発生過程でそのタイプを変えている。特に卵母細胞由来のリンカーヒストンは体細胞とは異なった単一のバリエントからなり、胚胎の遺伝子発現開始時に劇的に体細胞型へと変換する。本研究ではこの異なったリンカーヒストンバリエントが全能性を持つ細胞と体細胞とでクロマチンのダイナミクスと機能にどのような違いを生み出しているかについて分子レベルで解明することを目的とした。

## [方法ならびに成績]

リンカーヒストンの結合状態を厳密に制御可能なダイスクレオソームを精製ヒストンと DNA から塩透析法により再構成した。リンカーヒストンを取り込ませた均一なクロマチンの再構成は、リンカーヒストンが極端な塩基性アミノ酸組成のため、凝集塊を形成して従来困難を極めたが、我々は NAP-1 (nucleosome assembly protein-1) をそのシャペロンとする新たな再構成法でまずこれを克服した。そして *Xenopus* の卵母細胞由来のリンカーヒストン B4 と体細胞型 H1A を取り込ませたクロマチンを各々再構成し、クロマチン構造のダイナミクスについてクロマチン構造変換因子の一つである ACF (ATP-utilizing chromatin assembling and remodeling factor) を用いてその作用を解析した。その結果、クロマチンリモデリングの活性は H1A の結合量に依存して減少し、結合量がヌクレオソームに対して化学量論的に 1 : 1 となった時にその殆どが消失した。これに対し、B4 の結合はクロマチンリモデリングを許容した。この機能の違いがどのようなクロマチン構造の違いに起因しているのかについて、更に DNase I によるフットプリンティング解析を行った。その結果、リンカー-DNA 部において H1A の結合では切断抑制が見られたのに対し、B4 の結合ではリンカー-DNA のアクセシビリティが保持されていることが判明した。クロマチンリモデリング因子はリンカー-DNA 部から作用することがこれまでに報告されているので、以上の結果からバリエントごとのクロマチンリモデリング活性の違いはリンカー-DNA のアクセシビリティの違いに起因していると結論した。

*Xenopus* の卵では非常に多くの B4/NAP-1 複合体が蓄積しており、MBT (midblastula transition) 後に徐々に

H1A へと置換していく。そこで、B4 アセンブリ後のクロマチンをスクロース密度勾配遠心で精製し、そこに過剰のリンカーヒストン複合体を加えることを試みた。その結果、精製した基質にも ACF によるリモデリングの活性が存在し、そして B4/NAP-1 複合体の添加はその活性に全く影響しなかった。これに対し H1A/NAP-1 複合体の添加は極めて強いリモデリングの抑制を導いた。このことはリンカーヒストンのバリエーションの違いが直接クロマチンリモデリング活性の差を生み出すことを示している。更に我々はフリーの NAP-1 が H1A によるクロマチンリモデリングの抑制を交換反応により濃度依存的に解除出来ることを新たに見出した。

以上より、生物はリンカーヒストンバリエーションの切り換えによって、発生初期の劇的なクロマチン構造の変換が予想される時期には卵母細胞由来の B4 によってクロマチンリモデリングを許容し、細胞の分化系統が決定されていく際には体細胞型 H1 によってクロマチンリモデリングが抑制された不活性なクロマチンを形成していることが明らかとなった。これは体細胞型 H1 による抑制の領域特異的な解除機構の存在を示唆し、厳密に制御された遺伝子発現機構に寄与するものと考えられる。我々はリンカーヒストンシャペロンにその可能性を見出した。マウス卵のリンカーヒストンは B4 ホモログの H1foo であることが報告されており、体細胞核移植によるクローン動物の発生異常は体細胞型 H1 から H1foo への置換が不十分であることによるのかも知れない。

#### [総括]

リンカーヒストンはクロマチンの高次構造を形成するというこれまでの知見に加え、そのバリエーションは異なったクロマチンダイナミクスを規定することを明らかにした。この結果は生物はリンカーヒストンバリエーションの切り換えによってゲノム環境を機能的に変化させていることを示している。また、リンカーヒストンシャペロンを用いたクロマチン再構成系の確立により、高次クロマチンの再構成への道を開いた。

#### 論文審査の結果の要旨

遺伝情報の本体であるゲノム DNA は核内においてはヒストンと結合し、クロマチンと呼ばれる制御された高次構造を形成している。申請者はリンカーヒストンがクロマチンの高次構造を形成するというこれまでの知見に加え、そのバリエーションは異なったクロマチンダイナミクスを規定することを、クロマチンを再構成することにより示した。発生初期の劇的なクロマチン構造の変換が予想される時期には卵母細胞由来のリンカーヒストンでクロマチンリモデリングを許容し、細胞の分化系統が決定されていく際には体細胞型リンカーヒストンでクロマチンリモデリングが抑制されたクロマチンを形成していることを明らかにした。これは体細胞型リンカーヒストンによる抑制の領域特異的な解除機構の存在を示唆し、厳密に制御された遺伝子発現機構に寄与することを示す。申請者はリンカーヒストンシャペロンにその可能性を見出した。申請者の再構成系を用いたクロマチンの構造と機能の解析はゲノムサイエンスに対する認識に大きく貢献し、学術的にも、そして臨床的にもその意義は大きく、それを推進するための強力な手段と成り得るものであると考えられる。よって申請者の論文は学位論文に値する。