



| | |
|--------------|--|
| Title | How the lysine methylation at position 9 of H3 in nucleosome structure is recognized by the protein that specifically binds to the methylated lysine |
| Author(s) | 三島, 優一 |
| Citation | 大阪大学, 2013, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/60101 |
| 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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|---------------|--|
| 氏 名 | 三 島 優 一 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (理学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 2 5 8 3 0 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 25 年 3 月 25 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻 |
| 学 位 論 文 名 | How the lysine methylation at position 9 of H3 in nucleosome structure is recognized by the protein that specifically binds to the methylated lysine (リシン残基のメチル化修飾に特異的に結合する蛋白質によるヌクレオソーム構造内の H3 の 9 番目のメチル化リシンの選択的認識機構に関する研究) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 田嶋 正二 (副査) 教 授 平岡 泰 教 授 篠原 彰 准教授 末武 熱 |

論 文 内 容 の 要 旨

真核生物のゲノムは、4種のヒストンの核（コア）に巻きついた、ヌクレオソームと呼ばれる構造を基本単位として核内に収納されている。ヒストンは様々な化学修飾（メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化など）を受けることで、クロマチン構造を変化させ、遺伝情報の発現を制御している。体制が複雑に進化した高等真核生物では、クロマチン状態の凝集を介して遺伝情報の発現を抑制制御する機構の重要性が増している。

核内でヒストンは一つの分子に同時に多数の修飾を受けていると考えられるため、従来の遺伝学的研究や生体から調製した試料を用いた研究では、ひとつの修飾の効果を明らかにすることは原理的に難しい。もちろん、特異的修飾を含む合成ペプチドとの試験管内での結合様式も報告されてはいるが、この系ではヌクレオソーム構造の寄与を考慮できない。実際、ヒストン修飾酵素や修飾を認識する蛋白質が、ヌクレオソームという構造内にヒストンやその修飾が存在して初めて認識できる例が報告されている。エピジェネティック機構に寄与するヒストン修飾の分子機構を明らかにするためには、ヌクレオソーム構造を用いた生化学研究は必須であると考える。

遺伝情報の発現抑制に寄与するヒストン修飾のなかでも、リシン残基のε-アミノ基のメチル化修飾は特に重要である。リシン残基のメチル化には、モノ（me1）、ジ（me2）、トリ（me3）の3状態があり、修飾値数に依存した特異的な機能が報告されている。ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基（H3K9）のトリメチル化修飾は、遺伝情報発現抑制に働いている。H3K9me3 は、ヘテロクロマチンの形成と維持に寄与する主要因子である、ヘテロクロマチン蛋白質 1（HP1）により認識される。HP1 は N 末端に位置する領域のクロモドメイン（CD）を介して K9 メチル化 H3 に結合することが合成ペプチドを用いて示されており、また、CD と C 末端側のクロモシャドウドメイン（CSD）を繋ぐヒンジ配列（HR）が核酸に結合することが報告されている。これらの報告は、HP1 が分子全体を使って H3K9me3

を含むヌクレオソームを認識している可能性を示唆している。私は、单一修飾 H3K9me3 含むヌクレオソーム（H3K9me3 ヌクレオソーム）を再構成し、ヌクレオソーム内の H3K9me3 が HP1 によってどのように認識されるかを解析した。

HP1 は真核生物に広く存在し、ヒトやマウスなど哺乳類にはヴァリアントの HP1α、HP1β、HP1γ が存在する。これら HP1 ヴァリアントは、CD を介して K9me3 を含むヒストン H3 のテールペプチドを、同程度の親和性で認識・結合することが報告されている。しかし核内では、HP1αが H3K9me3 の豊富なヘテロクロマチン領域に局在するのに対して、HP1γはユーロクロマチン領域に存在し、局在が異なる。メチル化した H3 テールペプチドを用いた結合研究からは、CD の K9me3 を含む H3 テールペプチドに対する解離定数は HP1αと HP1γで同等であり、その局在の違いは説明できない。私は、ヌクレオソームを基質に用いることで、HP1αが H3K9me3 ヌクレオソームに結合するのに対して、HP1γ は結合できないことを見出した。すなわち、再構成 H3K9me3 ヌクレオソームを基質にすることにより、その中に含まれるヒストン修飾の認識が、K9me3 に対して同等の親和性を有する CD を持つ HP1αと HP1γ で異なることを示した。これは、HP1αと HP1γの核内での局在の違いの一端を説明しうる結果である。

HP1αの欠失変異体の H3K9me3 ヌクレオソームへの結合をしらべたところ、HP1αは CD だけでは H3K9me3 ヌクレオソームに選択的に結合できず、HR の N 末端側約半分が選択的な結合に必要であった。HR をすべて含めると、ヌクレオソームに対する非特異的な結合が高くなり、K9me3 に特異的な結合を示さない。HR による非特異的なヌクレオソーム結合は、CSD により抑制された。HP1αの H3K9me3 ヌクレオソームへの選択的結合は、HR の塩基性アミノ酸残基による DNA 結合活性と、CSD 表面の酸性アミノ酸残基による HR の DNA 結合活性の抑制という、HP1α分子全体の各領域の荷電バランスによって成り立っていることを明らかにした。

均一で特異的な H3K9me3 修飾を持つ再構成ヌクレオソームを用いることにより、HP1αと HP1γ の選択的 H3K9me3 認識機構を明らかにすることができた。今後、特定のヒストン修飾を均一に含むヌクレオソームを用いた実験を発展させることで、様々な修飾の認識機構と、その修飾が遺伝子発現制御に与える影響を解明する手がかりが得られるものと考える。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

三島優一君は、9番目のリシン残基にトリメチル化修飾をほどこしたヒストン H3（H3K9me3）を調製し、それによりヌクレオソームを再構成し、ヌクレオソーム構造内のメチル化修飾がどのようにヘテロクロマチン蛋白質 1（HP1）により認識されるのかについて解析をおこなった。その結果、HP1 によるヌクレオソーム内の H3K9me3 認識には、HP1 分子全体が寄与していることを明らかにした。これは、これまでの HP1 による H3K9me3 の認識に新たな知見をつけてくれるものであり、結論を導き出す実験の質、量ともに充分である。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。