

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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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25830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 勲

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。エビ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られる。

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、修飾価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、単一修飾H3K9me3を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られる。

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かわえるものであり、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。