

(様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏名:田苗 勝裕

題目:Roles of histone chaperone Asf1 in genome stability and its relationship with Sim3 in fission yeast

(分裂酵母のヒストンシャペロンAsf1のゲノム安定性における役割とSim3との関連性)

真核生物のゲノムDNAは、ヒストンタンパク質と結合し、クロマチン構造を形成する。クロマチンは、ヒストンH2A, H2B, H3, H4よりなるコアヒストンタンパク質とDNAから形成されるヌクレオソームを単位とする、染色体の高次構造をさす。

クロマチンは、DNA複製、転写、組み換え、修復といった際にその構造を変化させる。これは、クロマチン構造がDNA上で機能する様々な因子にとっては物理的な障壁となっており、必要に応じてその構造を変化させてオープンな構造にする必要があるからである。

これらのクロマチン構造の変換はヒストンシャペロンと呼ばれる因子により仲介される。ヒストンシャペロンは、ヒストンタンパク質と結合する活性を有し、クロマチン構造を変換させるためにヒストンをクロマチンに組み込んだり、あるいはクロマチンから取り除いたりする。ヒストンシャペロンは、結合するヒストンタンパク質がH3/H4であるかあるいはH2A/H2Bであるかにより大まかに2つに分類される。H3/H4のヒストンシャペロンとして代表的なものは、CAF1やAsf1、HIRAなどであり、H2A/H2Bのヒストンシャペロンとして代表的なものはNap1である。ヒストンH3/H4のヒストンシャペロンであるAsf1は、クロマチンの形成および解体、ヒストン交換反応、転写制御、特定のクロマチン領域のサイレンシングなどに関わっている。

本論文の第二章で、筆者は分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*においてAsf1の果たす必須の役割を調べるため、*asf1*の温度感受性変異株をPCRを用いたランダム変異導入法により構築した。そのうちの*asf1-33*と命名した変異株を77つのキナーゼ遺伝子破壊株と掛け合わせて合成致死を誘導する破壊株を探索した。その結果、*asf1-33*はDNA損傷チェックポイント因子であるRad3, Chk1を制限温度下での生存のために必要とすることがわかった。また、*asf1-33*株ではCds1ではなくChk1が制限温度下においてリン酸化されており、DNA損傷チェックポイントが活性化されていることが示された。加えて、パルスフィールドゲル電気泳動により染色体DNAの分解とDNA損傷発生のマーカーとなるRad22のfociの形成が見られた事より、*asf1-33*においてDNA損傷が発生していることがわかった。*asf1-33*におけるマイクロコッカルヌクレアーゼの制限温度下における感受性は野生株より上昇しており、*asf1*遺伝子の変異がクロマチン構造全域にわたる異常を引き起こすことが示唆された。また、*asf1-33*では変異型Asf1タンパク質とヒストンH3との結合能が低下しており、Asf1の細胞内局在も異常となっていた。これらのことを合わせて考えると、Asf1タンパク質のヒストンシャペロンとしての機能低下によりクロマチン構造異常が引き起こされ、さらにそれによりDNA損傷が

発生して細胞周期チェックポイントの活性化に至っていることが示された。

ヒトにおいてAsf1は、ヒストンシャペロンとしてDNA複製の進行を制御しているという報告があるが、筆者が*asf1-33*変異株におけるDNA複製の進行をモニターしたところ、複製の進行には一切の遅延が見られなかった。このことより、分裂酵母のAsf1はDNA複製の進行においては必要とされない因子であることが示唆された。さらに、*asf1-33*株においてはセントロメア*otr*領域のヒストンH3レベルが低下しており、ヘテロクロマチン構造の異常も見られた。そして、*asf1-33*の表現型を抑圧する強力なサプレッサーとして、セントロメア特異的ヒストンバリエントCENP-Aのヒストンシャペロンをコードする*sim3*遺伝子を単離した。これらの結果により筆者は、Asf1が*S. pombe*においてゲノム安定性を維持するのに必須の役割を果たしていることを示した。

本論文の第三章では、*asf1-33*株の高温感受性のサプレッサーとして単離した*sim3*遺伝子に着目して研究を行った。まず筆者は、CENP-AヒストンシャペロンSim3の過剰発現により*asf1-33*と*asf1-30*変異株の温度感受性が抑圧されたこと及び*asf1-33*における制限温度下におけるクロマチン構造の異常とDNA損傷の発生が抑圧されたことを示した。さらに、*asf1-33*変異株と*sim3*遺伝子破壊株との二重変異株が合成致死になることを見出した。この結果と一致するように、プラスミド由来の*sim3*遺伝子の発現が維持されている*asf1-33 Δsim3*二重変異株で*sim3*遺伝子の発現をシャットオフすると生育が著しく悪化した。加えて、*Δsim3*株はチューブリン合成阻害剤であるTBZとDNA複製阻害剤であるHUに対する感受性を示した。このことは、*sim3*がクロマチン構造の維持において広範な役割を果たしていることを示唆するものである。これまでに、Sim3はセントロメア結合タンパク質CENP-Aに特異的なヒストンシャペロンとして報告されている点と、またSim3とAsf1のアミノ酸配列及び立体構造上の共通点がほぼない点を考慮すると、Sim3がAsf1と同様にH3/H4のシャペロンとしても機能し得るというのは大変興味深い結果である。

このように筆者は、Asf1のゲノムの安定性に関わる機能の解明とSim3がAsf1と機能の類似性を示すことを本論文で報告した、これらの研究成果は、染色体のクロマチン構造の形成機構を考える上で、重要な新たな知見を提供している。