

学位論文審査の結果の要旨

氏名	田苗勝裕
審査委員	<p>主査 川向 誠 (印)</p> <p>副査 中川 強 (印)</p> <p>副査 戒能 智宏 (印)</p> <p>副査 松下 一信 (印)</p> <p>副査 東 政明 (印)</p>
題目	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
<p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>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、染色体の高次複合体構造をさす。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。</p> <p>著者は分裂酵母<i>Schizosaccharomyces pombe</i>においてAsf1の果たす必須の役割を調べるため、<i>asf1</i>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<i>asf1-33</i>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、<i>asf1-33</i>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、<i>asf1-33</i>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、<i>asf1-33</i>株においてDNA損傷が発生していることがわかった。</p>	

続いて、マイクロソカルヌクレアーゼの制限温度下における感受性は*asf1-33*株では、野生株より上昇していることを見だし、*asf1*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*株では変異型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ヤ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。

次に、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。加えて、*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。

さらに、筆者は*asf1-33*株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ーションCENP-Aのヒストンシヤペロンをコードする*sim3*遺伝子を単離した。Sim3の過剰発現は、*asf1-33*と*asf1-30*変異株の温度感受性を抑圧したこと及び*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損傷の発生を抑圧したことを示した。加えて、*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。これら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 Δ sim3*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、*Δ sim3*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している。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ヤ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のシヤ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。以上の研究成果は、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ことから、本論文は博士（農学）の学位論文に値すると認められる。