

氏名	わこう としゆき 若生 俊行
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	乙第44号
学位授与年月日	平成16年 9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Dynamics of histone H4 acetylation during a cell cycle revealed by three-dimensional imaging methods in barley (三次元画像解析法によるオオムギ細胞周期におけるヒストンH4アセチル化の動態解析)
学位論文審査委員	(主査) 辻本 壽 (副査) 細木高志 中田 昇 濱村邦夫 執行正義

## 学位論文の内容の要旨

農作物の生産性向上を図るにあたって、有用遺伝子の発現促進および有害遺伝子の発現抑制を制御することが重要である。遺伝子の発現制御のためにプロモーターの改変、エンハンサーやサイレンサーなどの制御配列の付加など DNA 配列レベルでの研究が長年行われてきている。その一方で DNA 配列によらない遺伝子発現制御のシステムとして、近年ヌクレオソームヒストンの N 末端テールに生じる可逆的翻訳後修飾が注目されている。翻訳後修飾にはいくつかの種類があるが、遺伝子発現促進に深く関わるのはリジン残基(K)におけるアセチル化である。アセチル化はヒストン-DNA 相互作用およびヌクレオソーム間の相互作用に影響してクロマチン構造を弛緩させ転写因子などがプロモーターやコード領域の DNA へ到達しやすくする。逆に脱アセチル化状態では、転写因子と DNA との会合がクロマチン構造によりブロックされることにより、転写が抑制される。このようにヒストンのアセチル化は、DNA 配列レベルより上位で転写を制御するため、作物における効率的な発現制御の実現のためにはアセチル化と転写との関連を詳細に明らかにする必要がある。作物を含む真核細胞では体細胞分裂時に転写が休止されて分裂終了後に再開されること、そして染色体の凝縮および脱凝縮という構造変化が起きることが良く知られている。そこでヒストンのアセチル化はゲノム全体にわたる転写制御および染色体構造に関与している可能性を明らかにするため、本研究では主要作物の一つであるオオムギ(*Hordeum vulgare*)を用いて細胞分裂時のヒストンアセチル化の動態を解析した。

ゲノム全域にわたるアセチル化の動態を調査するには、ゲノムの総体である細胞核ならびに染

染色体の全体像を顕微鏡下で得ることのできる細胞生物学的手法が適している。細胞生物学的研究において画像解析法は定量的解析のために必要不可欠な手法の一つであり、染色体研究では広く用いられているが、間期核への適用は数少ない。そこで画像解析法を間期核に適用するにあたりオオムギに限定せず植物一般に適用できる条件を検討した。Orchidの育種に関係のある *Spranthes sinensis* を用いて間期核で観察されるクロモセーター(CCs)の正確な画像解析を行なった。画像に対して単一の閾値を設けた場合は過不足が生じるのに対し、アンシャープマスク処理により大小多数のCCsを正確に同定できた。さらに交雑親和性の指標に用いられるCCsの分布様式を統計的に判別するための基本手法を開発し、CCsの分布がランダム型あるいはクラスター型であるかの判定を行なえるようになった。これにより間期核の二次元的イメージングおよび定量的画像解析が可能となった。

間期核は球状構造を有しているため、三次元構造を保ったまま対象であるアセチル化ヒストンを可視化しなければならない。そして三次元撮影の可能な共焦点顕微鏡またはデコンボリューション顕微鏡を用いる必要がある。そこでまず二種類の三次元顕微鏡システムの特徴を蛍光ビーズを用いて比較した。両者はほぼ同じ特性を持ち、微小試料ほど大きさを過大に見積もる傾向があり、特にZ方向の長さの過大評価が顕著であることが判明した。次に間接蛍光抗体法によりインタクトな無固定核においてH4K5の高度アセチル化領域(HARs)が核膜近傍でリング状のクラスターを形成していることが示され、アセチル化ヒストンの三次元的可視化法が確立された。

細胞分裂にともなうH4のK5およびK16の2つのリジン残基におけるアセチル化の動態を、間接蛍光抗体法および共焦点顕微鏡法により明らかにし、さらに画像解析法によってアセチル化強度の定量的解析を行なった。間期核でのアセチル化領域は動原体およびテロメア配列を用いたFISH法により同定した。間期核におけるK5の高アセチル化領域は動原体近傍であり、染色体凝縮の始まる前期も同様であった。前中期には動原体近傍のアセチル化が低レベルになり、rRNA遺伝子の座乗する仁形成部位(NOR)の高アセチル化が始まった。染色体凝縮の最も進んでいる中期および後期はNORにおいて高レベルのアセチル化が維持されていた。終期に再び動原体近傍が高アセチル化され、NORは脱アセチル化を受けた。NORは中期においても非凝縮部位である二次狭窄を形成しており、終期には早くもrRNAの転写が再開されることから、K5のNORにおける高アセチル化はNORの凝縮を防いで終期における転写再開へ備えていることが考えられた。本結果はK5を高アセチル化することにより分裂中期の染色体凝縮を抑制できることを示唆する。K16のアセチル化は、間期核においてテロメア側半球で強く観察された。オオムギではテロメア近傍にジーンリッチ領域があることが知られている。分裂前期、中期ともテロメア近傍でK16アセチル化が見られたが、染色体凝縮に伴って強度は低下した。分裂後期および終期にK16のアセチル化強度は再び上昇していた。K16高アセチル化領域がジーンリッチ領域に見られたことから、このK16アセチル化は転写されるゲノム領域をマークするという、転写活性のための必須条件であると思われた。また目的の遺伝子の発現抑制にはK16を脱アセチル化により可能になることが示唆された。

オオムギでは動原体がリング状のクラスターを形成するが、HARsもK5、K8、K12の3つのリ

ジン残基において同様の空間配置を取ることが明らかとなった。動原体と K5 の HARs の位置関係を詳細にデコンボリューション顕微鏡により解析したところ、両者はほぼ同じ位置に検出された。個々の HAR は中心部分の極めて強いアセチル化を受けた 2 つのコアと周辺領域とから構成され、動原体配列は周辺領域の一部とのみ重なりを持っていた。オオムギでは動原体周辺に強く凝縮したヘテロクロマチンが存在するので、H4 の高度アセチル化はゲノム中でも最も重要な機能部位の一つである動原体をヘテロクロマチンから保護していると考えられた。したがって転写不活性なヘテロクロマチン化を防ぐ、あるいは脱ヘテロクロマチン化のために、K5、K8 および K12 の高度アセチル化を利用できる。

これらの知見はゲノムの主要な機能的領域において、ヒストン H4 アセチル化が分裂期ステージ特異的に動的変化することを示し、さらに分裂期進行にともなう転写制御および染色体構造と密接に関わっていることを示唆する。したがってアセチル化および脱アセチル化の制御により染色体構造の改変および転写制御が可能となることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

近年、遺伝子が正常に発現制御されるにはプロモーターやエンハンサーなど、DNA 配列情報に定義される調節因子のみでは不十分であることが、明らかになってきた。本論文は、染色体のヌクレオソーム構成タンパク質であるヒストンの翻訳後修飾の動態を明らかにするために行った研究についてまとめたものである。

論文では、まず動態観察をするための技術開発から始めている。多数のヘテロクロマチン領域を含み、間期核において明瞭に濃染される斑点（クロモセーター）を現すラン科植物、ネジバナをモデル植物として実験材料に用い、このクロモセーターを、画像処理により抽出することを試みた。抽出のためには、濃淡の閾値を設けて画像を取得するだけでは不十分であることが分かり、周りの濃淡状況を加味することの必要性を見出し、最終的にクロモセーターを正しく計数できる方法を開発した。さらに、核内におけるクロモセーターの分布がランダムであるかを、統計学的に解析する方法を考案した。この最初の研究によって、画像処理による核内情報の解析法のための基礎を確立し、次の研究に推移した。

次の研究では、オオムギ根端細胞核を、蛍光条件下で立体的に観察する方法を考案した。立体的画像の取得には、焦点の合っていないぼけた画像の消去が必要であり、あらかじめぼけた画像を取得しない共焦点法と、ぼけを画像取得後に計算式によって、画像上で消去するデコンボリューション法を試した。まず、大きさの分かっている蛍光マイクロビーズを用い、両手法の有効性を比較した結果、両手法とも有効であるが、デコンボリューション法がより優れていることを明らかにした。次に、第 5 リジン残基がアセチル化されているヒストン H4 (H4K5) を認識する抗体を用い、実際に、オオムギの無固定核における、リジン残基の修飾部位を間接免疫抗体法で

明らかにした。その結果、高度にアセチル化を受けている領域は、核膜近傍でリング状のクラスターを形成していることを立体的に示すことに成功した。

技術的基盤が確立できたので、次に、この方法によって、細胞周期におけるヒストンの翻訳後修飾の動態を調査した。そのために、第5または第16リジン残基においてアセチル化しているヒストンH4の抗体をオオムギの分裂各期の細胞に適用し、デコンボリューション法で調査した。この研究では、さらに、染色体の部位を同定するために、テロメアまたは動原体の特異的反復配列をプローブとした蛍光 *in situ* hybridization を行った。その結果、両リジン残基とも極めてダイナミックな修飾を受けていることを明らかにした。第5リジン残基の高度アセチル化は、間期核では動原体部分にみられるが、分裂期には仁形成体に生じること、また第16リジン残基のアセチル化は、テロメア近傍の遺伝子密集領域に存在することを見出した。ヒストンがアセチル化されるとヒストンコアは、互いに反発し、ヌクレオソームを伸ばし、またヒストンのN末端部分がDNAから離れるため、転写因子をDNAに近づけやすくすることが知られているが、この研究で見られた高アセチル化部位は、おおむね転写活性の高いところであり、説明できるものである。ただし、動原体領域は通常、高度にヘテロクロマチン化されているため、第5リジン残基が間期核で、高アセチル化される理由は、明らかにならなかった。

そこで、間期核の動原体部における、ヘテロクロマチン化とリジン残基のアセチル化の関係を詳細に調査した。その結果、ヘテロクロマチンと高度アセチル化領域は、重なっていないことが明らかになった。このことは、多数の反復配列が存在しヘテロクロマチン化しやすい動原体領域において、その最も中心部が高度にアセチル化し、活性のあるキネトコアを形成していることが予想された。

現在では、ヒストンの修飾が遺伝子の発現制御に重要であることが、広く認められるようになってきたが、この研究が始まった当初は、ほとんど知られておらず、この研究によって始めて、植物細胞におけるヒストンの翻訳後修飾の動態が明らかにされたといっても過言ではない。まず、高度な立体顕微技術の開発から始まり、最終的には抗体を用いて、ヒストンの修飾の動態を見事に示した本研究は、大いに評価できるものである。

遺伝子が正常に働くためには、DNAの配列情報のみでは不十分である。このことは、強いプロモーターをつけた遺伝子を植物に導入しても発現しない多くの事例から見ても明らかである。今後の植物育種において、導入遺伝子が世代をわたって安定的に発現するためには、染色体・クロマチン構造と遺伝子発現の研究を解明しなければならない。本論文は、これからの植物遺伝子の発現調節に大きく影響をもたらすものであり、このような点から判断して、本論文は学位論文としての水準を大きく上回っているものと判定することができた。