

氏名 大羽玲子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第62号

学位授与の日付 平成5年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 活性クロマチンドメインの in vitro 再構成

論文審査委員 主査 教授 石浜 明

教授 瀬野 悍 二

教授 池村 淑 道

助教授 山尾 文 明

教授 半田 宏（東京工業大学）

論文内容の要旨

真核生物のクロマチンDNAは互いに独立なトポロジーをとりうる多数のループ状の構造を形成している。こうしたクロマチンのループ構造は、ゲノム内の異なる領域を種々の程度に超らせん化することを可能にしており、それによって転写が調節を受けていると考えられる。この考えを検証するため、私は、いろいろなトポロジーをもつDNAから *in vitro* でヌクレオソームを再構成し、その転写活性を調べ、以下の結果を得た。

(1) アデノウイルス後期主要プロモーターDNA上にヌクレオソームを形成させるとRNAポリメラーゼIIによる転写開始が阻害された。

(2) ヌクレオソーム形成に先立ち転写開始複合体をプロモーター領域に形成させておくと、ヌクレオソームを形成したDNAを鋳型として転写が進行した。

(3) 転写開始複合体の形成とヌクレオソームの形成を競合させると、線状DNAと弛緩型環状DNAではプロモーター領域へのヌクレオソーム形成により転写が阻害された。一方、適度に超らせん化したDNA（超らせん化密度-0.036）では、プロモーター領域でのヌクレオソームの形成に先行して速やかに転写開始複合体の形成が起こり、転写が進行した。

(4) ショウジョウバエHSP70プロモーターDNA上にヌクレオソームを形成させるとRNAポリメラーゼIIによる転写開始が阻害された。

(5) ヌクレオソーム形成に先立ち転写開始複合体をプロモーター領域に形成させておくと、HSP70プロモーターDNAにおいてもヌクレオソームを形成したDNAを鋳型として転写が進行した。

(6) 転写開始複合体の形成とヌクレオソームの形成を競合させると、HSP70プロモーターDNAでは、線状DNA、弛緩型環状DNA、超らせん化したDNAのいずれにおいてもプロモーター領域でのヌクレオソームの形成に先行して速やかに転写開始複合体の形成が起こり、転写が進行した。

(7) H1ヒストンを除いたヒストンをヌクレオソーム形成に用いてもH1ヒストンを含むヒストンを用いた場合と同様の結果が得られた。

(8) アセチル化ヒストンをヌクレオソーム形成に用いても普通のヒストンを用いた場合と同様、ヌクレオソーム形成によって転写開始が阻害された。

これらの結果は活性クロマチンドメインの形成にDNAの超らせんが重要な役割を果たしている遺伝子とそうでない遺伝子が存在することを示唆している。

論文の審査結果の要旨

出願論文「活性クロマチンの *in vitro*再構成」に関する公聴会を開催した後、その際の質疑応答をも参考として、論文審査を実施した。その要点は下記の通りである。

真核細胞では、巨大なDNAがヒストンを主体とする核蛋白と会合し、凝縮された染色体構造をとっている。染色体構造体でも、遺伝子が転写され情報発現がなされる。そのときには、局所的に活性化状態が形成され、転写装置のDNAへの接近が可能になるはずである。その分子機構として、出願者はヒストン集合体と転写装置のDNA結合における競合モデルを想定し、必要成分を単離し、試験管内クロマチン（DNA蛋白会合体）再構成系での実証を試みた。審査会では、困難な課題に挑戦した先駆的試みであると評価した。本大学院の学生が挑戦するに相応しい研究課題で、しかもその課程で、分子生物学の基礎的素養の習得もできたに違いないと判断した。その上で、実験系を更に洗練する必要性が指摘された。たとえば、ヒストンを散在状態で添加せずにクロマチン形成の単位、いわゆるヒストンオクタマーとして調製し添加すること、ヒストンオクタマー結合位置の同定とヌクレオソーム形成の速度論的解析を行うこと、転写装置とヒストンオクタマー共存下での両者の結合位置と結合量を直接定量すること、などが指摘された。また、添加DNA中で転写されるDNA量が、現状では、極めて少なく、ヌクレオソーム形成が転写に及ぼす影響を定量的に調べるためには、その点の改善が最大のポイントとなろう。これらの問題についても、出願者はすでによく理解していた。

論文はよく推敲され、作文上の難点は殆どない。論文作成の訓練もよくなされていると判断された。また、研究成果の一部はすでに *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 誌に公表されている。以上の結果、審査委員は一致して、本論文が学位論文として評価し得ると判定した。