



Title	In vitro co-expression chromatin assembly and remodeling platform for plant histone variants [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	BANKO, Petra Zsuzsanna
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第15769号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/92643
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Banko_Petra_Zsuzsanna_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学） 氏名 BANKO Petra Zsuzsanna

審査担当者 主査 教授 尾之内 均
副査 教授 小池 聡
副査 准教授 高須賀 太一（国際食資源学院）

学位論文題名

***In vitro* co-expression chromatin assembly and remodeling platform for plant histone variants**
(植物変種ヒストンを用いた *in vitro* 共発現系によるクロマチン構造およびリモデリング機能再構築法の確立)

本論文は英文 54 頁、図 6（補助資料 10）、表 3、2 章からなり、参考論文 2 編が付されている。

ヒトや植物を含む全ての真核生物では、膨大なゲノム DNA 情報が、細胞核内に収納されており、この構造を染色体と呼ぶ。染色体は、高次のゲノム DNA の収納を可能とする凝縮した構造を保持するとともに、細胞周期に応じた DNA の複製や遺伝子の発現制御等を可能にする動的な機能を担う事が示唆されているが、分子生物学的、生化学的観点からの詳細なメカニズムは分かっていない。その大きな理由として、活性のある機能的な染色体の試験管内における再構築技術が無かった点が挙げられる。本研究は、機能的な植物染色体を試験管内で再構築する技術を確立し、さらに染色体の構造変化や、染色体再構成に関わるタンパク質因子の新規生化学的同定を行った結果をまとめたものである。

1) 染色体研究及びモデル植物 *Arabidopsis thaliana*（シロイヌナズナ）におけるクロマチン研究の背景

第一章では、植物染色体における現在までの知見について先行論文による報告を詳細に調べ、考察したものである。染色体高次構造は、クロマチン繊維からなり、その最小単位はヌクレオソームと呼ばれる。ヌクレオソームは、4 種類のヒストンタンパク質（H2A、H2B、H3、H4）がそれぞれ 2 つずつ集まった八量体の周りを二本鎖 DNA が ~1.7 回巻き付いた構造をしている。そのため、ヌクレオソーム、クロマチン、クロマチン繊維と、それぞれのレベルで高次の DNA 折りたたみを可能とする。通常、ヌクレオソームを構成するヒストンは、細胞の DNA 合成期にリボソームによって合成され、DNA 複製フォーク複合体（レプリソーム）によって、DNA 新生鎖に巻き付く。これらのヒストンは、カノニカルヒストン、または正規ヒストンと呼ばれるが、正規ヒストン以外にも、H2A、H2B、H3 についてはそれぞれ変種ヒストンと呼ばれるホモログが確認されている。これら変種ヒストンは、染色体上において存在が確認されているが、正規ヒストンと比べて明確な機能については下

等真核生物である酵母における少ない知見に留まる。植物では、これら変種ヒストン種が動物や微生物に比べて多い事が報告されている。モデルシロイヌナズナ植物においては、それぞれのヒストンで代表的な例として、変種ヒストン H2A.X、H2A.W、H2A.Z、H2B.7、H3.3 と CENH3 が挙げられる。これら変種ヒストンから構成されるヌクレオソームについては、遺伝学的手法による研究報告や、植物体のオミクス解析等から得られた知見に留まり、これらヌクレオソームの構造や機能についてはほとんど報告がない。そのため、多様な変種ヒストンを含む試験管内ヌクレオソーム再構築技術の確立が必要と考察している。特に、細胞核内におけるこれら多様なヌクレオソームに作用する因子（例：リモデリング複合体等のヌクレオソーム再編成因子やヌクレオソームの形成を補助するヒストンシャペロン因子等）を解明する事は、植物の遺伝子発現や遺伝子機能の抜本的な理解につながると考察されている。

2) 新規植物クロマチン再構築法の確立と機能性の実証

第二章では、試験管内タンパク質共発現クロマチン再構築技術を用いる事で、モデル植物シロイヌナズナ染色体の再構成を行ったものである。本実験系では、共発現系として使用する小麦胚芽無細胞抽出液中に、ヌクレオソームの形成を促進する未知の因子が含まれている事を先行研究で明らかになっていた。そこで、小麦と同様の植物を由来とするヌクレオソームの再構築が可能と考え、ヒストンをコードする遺伝子の調製、mRNA への転写、共発現クロマチン再構築法を、正規ヒストン4種（H2A、H2B、H3、H4）に加え、変種ヒストン H2A.X、H2A.W、H2A.Z、H2B.7、H3.3 と CENH3 について行った。これら正規および変種ヒストンからなるヌクレオソームの組合せは、24 通りあり、それぞれについて共発現クロマチン再構築した後、ヌクレオソームの評価を Supercoiling 法及び Micrococcal nuclease 法によって行った。24 通り中、再構築出来た 7 通りについては、これらが細胞核内と同様に機能するか確認するため、酵母クロマチンリモデリング複合体のホモログとして知られるシロイヌナズナ Chr11-DDR4 複合体に着目し、共発現クロマチン再構築反応に Chr11-DDR4 を加え解析している。その結果、リモデリング反応の基質として使用した 7 通りのヌクレオソームの組合せ全てにおいて、ヌクレオソームの再編成が確認されている。興味深い事に、再編成は、変種ヒストンの組合せによって異なる事も示された。さらに、7 通り以外の再構築出来なかった組合せについて、再構成補助因子として知られるシロイヌナズナ NAP1;3 ヒストンシャペロン因子を共発現したところ、2 通りの組合せについて、NAP1;3 がヌクレオソーム形成を促進するを明らかにされている。本結果において、NAP1;3 のシャペロン機能は、H2A.Z と H2B.7 を含むヌクレオソームの組合せに特異的に働く事が示されている。

本研究結果は、機能的な植物ヌクレオソームを試験管内で再構築出来る事を示しており、今後、モデル植物以外においても同様の手法から、植物遺伝子制御に関わる染色体機能の根幹の理解と応用に大きく寄与するものである。

よって審査員一同は、BANKO Petra Zsuzsanna が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。