

氏名	うしじま ゆうた <b>牛島 悠太</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第672号
学位授与の日付	平成25年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	<b>Studies on the structure and the roles of <i>Drosophila</i> G9a histone H3 methyltransferase</b> (ショウジョウバエヒストンメチル化酵素 dG9a の構造と役割についての研究)
審査委員	(主査)教授 山口政光 教授 竹谷 茂 教授 森 肇

### 論文内容の要旨

申請論文は第1章「序論」、第2章「ショウジョウバエ G9a ヒストン H3 メチル化酵素の核局在シグナルの同定」、第3章「ショウジョウバエ精子形成過程におけるヒストン H3 メチル化酵素の役割」から構成されている。

序論では、本論文の背景と目的が述べられている。真核生物ではヒストンの化学修飾による遺伝子発現のエピジェネティックな制御は、様々な生物学的プロセスで重要な役割を果たしている。例えばヒストン H3 のリジン残基のメチル化は、転写調節、組換え、修復、ヘテロクロマチン形成や X 染色体不活化に関与することが知られている。ショウジョウバエではヒストン H3 の N 末端から 9 番目のリジン残基 (H3K9) をメチル化する酵素として、dG9a, SU(VAR)3-9 と DmSETDB1 の 3 つが知られている。dG9a は核に局在し、ユークロマチン領域の H3K9 のモノメチル化とジメチル化を触媒するが、これらの観察はこれまで培養細胞を用いて行われてきた。一方ショウジョウバエ初期胚では、dG9a は卵細胞質と核を行き来することが明らかになった。そこで申請者はこのシヤトルの仕組みを明らかにする手始めとして、ショウジョウバエ培養細胞での dG9a 核局在シグナルの同定を試みた。また、G9a をはじめとするマウスのヒストン H3K9 メチル化酵素は生殖系列の発生に必須であるが、ショウジョウバエ精子形成過程でのこれらの酵素の役割はまだわかっていない。そこで申請者は、精子形成過程での G9a をはじめとするヒストン H3K9 メチル化酵素の機能解析を行った。

第1章では、まずショウジョウバエ G9a の一連の欠失変異体を作製し、それらと緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の融合タンパク質を培養細胞で産生し、それらの細胞内局在を解析することにより、dG9a タンパク質の持つ核局在シグナル (NLS) を同定したことについて述べている。同定した NLS は哺乳動物 G9a のそれとは、アミノ酸配列も G9a タンパク質内の位置も異なることが明らかになった。申請者はこれらのことから、各生物種での核移行の調節機構に合わせて、ショウジョウバエと哺乳動物の G9a がそれぞれ独立に NLS を進化させて来たものと推測している。

第2章では、最初に dG9a に特異的な抗体を用いた免疫染色法により解析したショウジョウバエ精子形成過程での dG9a の動態について述べられている。精子形成の growth 期から elongation 期

まで dG9a が細胞質内に局在することを明らかにした。一方 canoe 期の初期では、dG9a は核だけに見られ、この時期のクロマチン構造の制御に関与していることが示唆された。しかし、モノ、ジもしくはトリメチル化された H3K9 シグナルは、ホモ接合の dG9a null 変異体の精子形成中で減少しなかった。一方、モノ及びトリメチル化された H3K9 は、*DmSetdb1* 変異体の精子形成中に減少した。そして、モノメチル化された H3K9 はホモ接合の *Su (var) 3-9* 変異体でも減少した。これらの結果は、精子形成において、DmSETDB1 は H3K9 のモノ及びトリメチル化に、SU (VAR) 3-9 は主にモノメチル化に寄与していることを示していると申請者は結論している。しかしながら、減数分裂前の精母細胞の H3K9 のメチル化の消失は精子の減数分裂で X-Y 染色体分離に影響しなかったことから、申請者はヒストンのメチル化はショウジョウバエの精子形成に必須の役割を果たしていないと考察している。

### 論文審査の結果の要旨

真核生物では、ヒストンの共有結合修飾による遺伝子発現のエピジェネティックな制御は、クロマチン構造制御等多種多様な生物学的プロセスにとって重要である。ヒストンの翻訳後修飾には、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化とスモ化がある。G9a は染色体上ユークロマチン領域でヒストン H3 の N 末端から 9 番目のリジン残基 (H3K9) のモノメチル化及びジメチル化を行う酵素として知られており、ユークロマチン領域での遺伝子発現抑制で重要な役割を担っている。哺乳類の G9a は、いくつかの機能的領域 (GHD (G9a homology domain)、ANK、preSET、SET、PostSET) が明らかとなっている。これらの領域は、哺乳類とショウジョウバエの間で高く保存されている。哺乳類の G9a は N 末端領域に核局在シグナル (NLS) を持つが、ショウジョウバエでは明らかになっていない。そこで、申請者はショウジョウバエ G9a (dG9a) の欠失変異体を作製し、ショウジョウバエ培養細胞内での挙動を調べ、dG9a の NLS が哺乳類の G9a とは位置及びアミノ酸配列も異なっていることを明らかにした。これらの知見は今後 dG9a の細胞内動態を理解する上で重要な基盤となり評価できる。

ヒストンの共有結合修飾は、生殖系列細胞の発生にとっても重要である。哺乳類での精子形成において、G9a、SETDB1、SUV39H といった H3K9 特異的なヒストンメチル化酵素は重要な役割を担っている。しかし、ショウジョウバエのヒストンメチル化酵素については明らかになっていない。そこで、申請者は dG9a に特異的な抗体を用いて免疫染色を行い、精子形成の growth 期から elongation 期まで dG9a が細胞質内に局在することを明らかにした。一方、canoe 期の初期では、dG9a は核だけで見られ、この時期のクロマチン構造の制御に関与していることが示唆された。しかし、モノ、ジもしくはトリメチル化された H3K9 シグナルは、ホモ接合の dG9a null 変異体の精子形成中で減少が見られなかった。一方、モノ及びトリメチル化された H3K9 は、*DmSetdb1* 変異体の精子形成中に減少し、モノメチル化 H3K9 シグナルはホモ接合の *Su (var) 3-9* 変異体でも減少した。これらの結果から、申請者は精子形成において、DmSETDB1 は H3K9 のモノ及びトリメチル化に、SU (VAR) 3-9 はモノメチル化に寄与していると結論した。これらの研究は、精子形成過程でのヒストン H3K9 メチル化酵素の役割を明らかにすることとなり、その学問的意義は高く評価できる。学位論文は英文で丁寧に作成されており、論旨も明解であった。本論文の内容は、申請者が筆頭著者である 1 編を含む、査読制のある国際的学会誌にすでに発表済みの下記の 2 編の論文を基礎としている。

- 1) Kato, Y., Ushijima, Y. and Yamaguchi, M. : Identification of nuclear localization signals of *Drosophila* G9a histone H3 methyltransferase. Cell Struct. Funct. 36, 121-129, 2011.
- 2) Ushijima Y., Inoue, Y. H., Konishi, T., Kitazawa, D., Yoshida, H., Shimaji, K., Kimura, H. and Yamaguchi, M. : Roles of histone H3K9 methyltransferases during *Drosophila* spermatogenesis. Chromosome Res. 20 (3), 319-331, 2012.