

染色体の高次構造を形成するリンカーヒストン H1 バリエントの機能制御機構

阿部 真弓 (筑波大学 生物学類)

指導教員：奥脇 暢 (筑波大学 医学医療系)

背景と目的

細胞の分化・脱分化過程において、遺伝子の発現パターンは大きく変化する。この過程においてクロマチン構造が関与していることが示唆されているが、クロマチン構造の変換と、遺伝子発現の相関に関してはまだ明らかになっていない。クロマチン構造制御機構の解明は細胞の分化・脱分化のメカニズム解明や多能性幹細胞作製効率の向上などに貢献すると考えられる。DNA がヒストンに巻き付けられたクロマチン構造の中には遺伝子発現を制御する仕組みが隠されている。遺伝子発現の状態をオンにするにはクロマチンの高次構造を緩ませてヒストンを外す、もしくははずす必要がある。コアヒストンに関しては幅広い研究がなされているが、リンカーヒストン H1 に関してはまだ明らかになっていないことが多い。H1 には H1.1~H1.5, H1.0, H1X のバリエントが発現することが報告されているが、これらのバリエントの性質や細胞の分化・脱分化の過程でどのように制御されているかはわかっていない。そこで本研究では、リンカーヒストン H1 バリエントの細胞の分化・脱分化における発現の制御と意義を明らかにすることを目的として研究を進めている。

材料と方法

1. pEGFP-C1 H1 cell line in HeLa cell を用いた FRAP assay

GFP 融合タンパク質発現ベクターを作製するために pGEX-6P-1-H1.1~H1.5, H1.0, H1X からヒストン H1 の cDNA を切り出し pEGFP-C1 ベクターにのせかえた。作製したプラスミドを HeLa 細胞に導入し、G418 存在下で培養することで恒常的に GFP ヒストン H1 が発現する細胞株 (cell line) を作製した。これを用いて、FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) assay を行った。

2. 7 種類のリンカーヒストン H1 リコンビナントタンパク質の発現と結合実験

リンカーヒストン H1 (H1.1~H1.5, H1.0, H1X) の cDNA は、HeLa 細胞の cDNA よりクローニングし、pGEX-6P-1 ベクターに挿入した。作製したプラスミドを大腸菌 *RP* 株に導入して、タンパク質を発現させ、タンパク質は Glutathione sepharose を用いて affinity 精製した。コアヒストンシャペロンとして知られている TAF1B, B23.1, sNASP, NAPIL1, NAPIL4 は pET-14b ベクターにクローニングされたものを利用し、大腸菌 *BL21* 株を用いて発現させ、His タグ精製により精製した。Flag-tag 付き Nucleolin は、293T 細胞を用いて発現し、FLAG M2 affinity Gel を用いて精製した。精製したリンカーヒストン H1 リコンビナントタンパク質とシャペロンタンパク質を 300mM NaCl を含むバッファー中で 1 対 1 の割合で混ぜ、GST pull down を行った。

3. リンカーヒストンシャペロンとしての活性をみる実験

実験に用いた 196 bp の 5S rDNA は PCR により増幅し精製した。また、ヌクレオソームは精製した 5S rDNA とリコンビナント

のコアヒストンを用いて再構成した。リンカーヒストン H1 とシャペロンのリコンビナントタンパク質を試験管内で混ぜ 30°C で 30 分間反応させた後、5S rDNA あるいはヌクレオソームを添加し、さらに 30°C で 30 分間反応した。反応液を非変性ゲルで泳動し、Gel shift assay を行った。

4. NT2 細胞の培養

神経細胞へと分化するヒト胚性癌細胞株である NT2 細胞は、10% FBS と 2mM L-glutamine を含む DMEM 培地中、37°C の CO₂ インキュベーターで培養した。また、20 日間 10⁻⁶M のレチノイン酸を処理することにより分化を誘導した。

結果と考察

1. それぞれのバリエントの性質を明らかにするため、細胞内動態に着目し、FRAP assay を行った。その結果、H1 バリエントは、動きに関して大きく 3 つのパターンに分けられた。H1X がもっとも速く細胞内を移動しており、次に H1.1 と H1.2 が速かった。細胞内の移動が遅かったのは H1.3, H1.4, H1.5, H1.0 のバリエントであった。H1 の動きには C 末端領域 (CTD) の長さに関与するとの報告があるが、H1.0 は 7 種類の中で一番 CTD の長さが短く、報告と結果が矛盾する。このことから、H1 の動態は CTD の長さだけが影響するのではなく塩基性アミノ酸の個数が影響しているのではないかと考えた。また、H1.0 に特異的なリンカーヒストンシャペロンがあるとすれば、そのシャペロンの減少によって、H1.0 の動きが遅れた可能性が考えられる。

2. 細胞内動態の違いはヒストンシャペロンにより制御されている可能性がある。初めに GST-H1 バリエントと既知のコアヒストンシャペロンを用いて結合実験を行った。その結果、検討したすべての H1 バリエントとヒストンシャペロンが結合することがわかった。結合の強さや特異性についてより詳細に検討を進めている。これらのヒストンシャペロンが結合するだけではなく、リンカーヒストンシャペロンとしての活性を示すのかは材料と方法 3 の実験で検討中である。

4. 細胞分化過程における H1 バリエントや結合したヒストンシャペロンの発現量をみるために、NT2 細胞を用いた細胞分化系を用いて実験を進めている。H1 バリエントの分化段階における発現パターンを調べたい。

今後の展望

体細胞で発現するリンカーヒストンバリエントの機能的違いを明らかにする実験を行いつつ、これらが分化段階で、遺伝子発現制御における役割を明らかにする実験を進めていきたい。具体的には NT 細胞を用いて、H1 バリエントやそれらと特異的に相互作用するヒストンシャペロンの発現レベルを明らかにし、分化した細胞で発現する H1 やヒストンシャペロンのノックダウンを行い、細胞分化への影響をみたいと考えている。