

氏名(本籍)	こまつてつろう (神奈川県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第5575号			
学位授与年月日	平成22年11月30日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	<b>The mechanism of adenovirus gene expression and structural change of viral chromatin</b> (アデノウイルスクロマチン構造変換による転写制御機構)			
主査	筑波大学教授	医学博士	久武幸司	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	齋藤慎二	
副査	筑波大学講師	博士(理学)	小林麻己人	
副査	筑波大学講師	獣医学博士	國田智	

## 論文の内容の要旨

### (目的)

アデノウイルス (Ad) は、転写のモデル系として転写制御機構の解明に寄与してきた。しかし、Ad 自身の転写制御機構についてはまだ不明な点が存在している。感染初期におけるウイルスクロマチン構造、そして後期における DNA 複製に依存した後期遺伝子の活性化の機構は未だ明らかとされていない。そこで、本研究では感染初期および後期における Ad のクロマチン構造変換による転写制御機構を明らかにすることとした。また、Ad のクロマチン構造による制御機構と初期発生におけるクロマチンリモデリングとの類似性について考察し、Ad が初期発生のモデルとなり得るか検討した。

### (対象と方法)

Ad の感染初期において細胞のヒストンがウイルスクロマチンに取り込まれる可能性が示唆されていたため、抗ヒストン抗体によるクロマチン免疫沈降法等を用いてその可能性を検討した。また、感染初期ではウイルスクロマチンにウイルス由来の塩基性タンパク質であるコアタンパク質が結合していることが示されていたが、その細胞内での機能は不明であった。そこでリコンビナントのコアタンパク質と DNA とで再構成した複合体を細胞内に導入して、細胞内における転写への機能を検討した。また、リコンビナントのコアタンパク質を用いてゲルシフトアッセイ等の生化学的手法を行い、その機能を解析した。

感染後期において、後期遺伝子は DNA 複製に強く依存していることが知られているが、その詳細は不明であった。そこで、DNA 複製の前後におけるウイルスの遺伝子発現パターンを RT-PCR 法で確認した。その結果から、後期遺伝子の活性化には高次クロマチン構造による制御機構の存在が示唆された。そこで、高次クロマチン構造に関与することが報告されている CTCF の後期遺伝子発現制御への関与をクロマチン免疫沈降法で検討した。また、ウイルスの DNA 複製の場である複製 foci について間接蛍光抗体法によって検討した。

## (結果)

感染初期において、ウイルスクロマチンはウイルス由来のコアタンパク質と細胞のヒストンが共に結合して、転写の鋳型として機能していることが明らかとなった。このとき、ウイルスクロマチンにはヒストンバリエーションの一つである H3.3 が結合していた。また、転写に抑制的に機能すると考えられていたコアタンパク質は、細胞内において転写を促進する機能を有していることが示された。

感染後期において、DNA 複製により後期遺伝子の活性化がグローバルに制御されていることが示唆された。クロマチンループを形成することが報告されている CTCF の DNA 複製依存的なウイルスクロマチンへの結合が明らかとなった。また、感染後期においてウイルス DNA 複製 foci において、ヒストンおよび DNA の局在変化が観察された。

## (考察)

感染初期において、ウイルスクロマチン上に結合したヒストンの修飾状態等から、細胞のクロマチンと同様の転写制御機構が存在していることが示唆された。また、受精の際に精子クロマチンに取り込まれることが知られている H3.3 がウイルスクロマチンにも取り込まれていたことから、Ad の感染初期におけるウイルスクロマチン構造変換は精子クロマチンのリモデリングに類似していることが示唆された。また、試験管内では抑制的に機能すると考えられていたコアタンパク質は、細胞内においては転写に正に機能した。この効果はコアタンパク質が細胞内においてウイルスクロマチン構造を制御するためであると考えられた。

感染後期において、初期遺伝子と後期遺伝子は DNA 複製によってその発現パターンがグローバルに制御されていた。この制御において CTCF による高次クロマチン構造の関与が示唆された。また、ウイルス DNA 複製 foci において、ウイルス DNA 複製関連因子 DBP がヒストン等の局在変化に関与している可能性が示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、アデノウイルスを用いて生化学的および細胞生物学的に実験を進め、アデノウイルスの転写制御について詳細な解析を行った。感染初期と後期におけるクロマチン構造と転写に関して、ウイルス由来因子と細胞由来因子間の機能的関係を明らかにし、特にコアタンパク質、ヒストン H3.3、CTCF などの因子がどのようにアデノウイルスの転写制御に関与するかを示した。さらに、この系でみられるクロマチン構造変換制御が初期発生と類似した点にまで考察を行い、アデノウイルスのクロマチン構造変換が発生時と類似の制御を受けている可能性を示したことは、高く評価される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。