

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

魚崎 祐一 印

Expression of replication dependent histone in post-mitotic neurons

(成熟ニューロンにおける複製依存性ヒストンの発現解析)

クロマチンの基盤構造因子であるヌクレオソームは、4種類のコアヒストンH2A、H2B、H3、H4の各2分子からなる8量体に147塩基対のDNAが巻き付いた構造をとる。H4を除くコアヒストンにはバリエーションが存在する。バリエーション間のアミノ酸配列の差はわずかであるが、クロマチンに取り込まれるバリエーションの違いや、バリエーション間での入れ替わりが遺伝子発現制御などのゲノム機能発現に重要な役割を果たしていることが理解されてきている。神経活動依存性の転写活性化は、ニューロンの機能に重要であるが、神経活動依存性の転写制御とヒストンバリエーションとの関連の詳細は不明な点が多い。本研究では、ニューロンにおけるヒストンバリエーションの発現制御の詳細を検討したい。

実験には、胎生17日目のマウスより調製した海馬ニューロンを10日間培養後に、GABA受容体拮抗薬bicucullineとカリウムチャンネル阻害薬4-Aminopyridineにて脱分極を誘導したものをを用いた。

まず、網羅的解析にて、ヒストンバリエーションH3.2をコードする遺伝子*Hist1h3f*の発現が増加することを見出した。H3.2は、分裂細胞において細胞周期S期に特異的に発現するDNA複製依存性ヒストンである。すなわち、細胞複製依存性と考えられていたヒストンH3.2の転写が最終分裂を終えたニューロンで神経活動依存的に増強するという予想外の結果であった。次に、定量的RT-PCR法にて*Hist1h3f*の発現誘導を再確認した。次に、*Hist1h3f*の発現が脳内でも認められるか確認するため、成体脳を用いて*in situ* ハイブリダイゼーション法を施行した。成体マウス海馬、小脳、嗅球において*Hist1h3f*または*Hist1h3e*の発現が認められ、1時間の痙攣誘発や1時間の強制ランニングにおいても発現が認められた。

次に、蛋白質レベルでもコアヒストンH3が増加するのかを検討した。抽出した細胞核に100 mM NaCl溶液を加え上清中に抽出されてくるH3をウエスタンブロッティングにより検出した。その結果、神経興奮誘導後1時間において、上清中のH3の増加が認められ、クロマチン非結合分画の増加が示唆された。次に、ニューロンにおけるH3の新規合成の更なる確認、および新規合成されている場合、その動態を明らかにする目的で、ニューロンで新規合成されるH3の代謝標識を行った。蛋白質標識には、アジド官能化メチオニンアナログであるL-アジドホモアラニン (Aha) による代謝ラベルを用いた。即ち、培養10日目の海馬ニューロンの培地をメチオニン不含培地に置換後、メチオニンアナログAhaを

培地に添加し、新規合成蛋白質へのAhaの取り込みを行った。細胞を回収後にアルキン化ビオチンを銅イオン、アスコルビン酸存在下で反応させて、新規蛋白質をビオチン化した。細胞核を抽出後MNaseにて処理し、クロマチンを精製、ストレプトアビジンビーズにより免疫沈降し、ウエスタンブロット法にて、Ahaを取り込んだ新規タンパク質の検出を行った。検出蛋白質は、脱分極により増加していた。蛋白質合成阻害剤によりスメア状のバンドが消失するため、蛋白質合成に依存していることすなわち新規合成タンパク質であることが示された。また、新規合成蛋白質中にはコアヒストンH3が含まれ、脱分極にて増加している一方で、H3.3は検出されず、神経活動依存的にヒストンH3.3以外のH3バリエーションが新しく合成され、クロマチンに取り込まれている可能性が示唆された。

今後、新たに合成されたヒストンH3/H4が取り込まれるゲノム領域を新たに同定し、転写プロファイルと合わせて神経細胞におけるヒストン代謝が神経活動依存性転写に与える意義を検討していきたい。