

(続紙 1)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                    |    |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----|------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 博士（生命科学）                                           | 氏名 | 川上 慶 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 新規ヘテロクロマチン関連遺伝子 <i>dsh1<sup>+</sup></i> の同定とその機能解析 |    |      |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                    |    |      |
| <p>真核生物の染色体構造は、遺伝子発現の観点からユークロマチンとヘテロクロマチンに大別される。遺伝子の転写活性が高いユークロマチンとは対照的に、ヘテロクロマチンは遺伝子の転写、発現を高度に抑制する染色体ドメインである。分裂酵母においてヘテロクロマチンはセントロメア近傍、性を決める <i>mat</i> 座位、テロメア近傍に存在する。</p> <p>ヘテロクロマチン構造の安定な転写抑制能は、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化修飾 (H3K9me) を足場とした、種々の転写抑制因子の集積により保証される。近年、分裂酵母を用いた研究により、H3K9me が内在性の RNAi 機構に依存することが明らかになり、注目を集めている。RNAi 機構では、ヘテロクロマチン領域に由来する non-coding RNA が二本鎖 RNA 合成酵素 Rdp1 と二本鎖 RNA 切断酵素 Dcr1 により siRNA へと変換される。続いて siRNA は Argonaute タンパク質を含む RITS 複合体に取込まれる。RITS 複合体は siRNA と転写途中の non-coding RNA の塩基対相互作用を介してクロマチン上にリクルートされる。このとき RITS 複合体はヒストンメチル化酵素 Clr4 をリクルートし、H3K9me が引き起こされる。これまでの研究からヘテロクロマチン由来の siRNA は核内で生産されると考えられていたが、siRNA 合成の場が決定される機構の詳細は明らかではなかった。</p> <p>申請者はヘテロクロマチンの形成、維持に寄与する新規因子の同定を目的として、分裂酵母を用いた遺伝学的スクリーニングを行い、機能未知遺伝子<i>dsh1<sup>+</sup></i>(<i>defect of the gene silencing at centromeric heterochromatin</i>) を新規ヘテロクロマチン関連遺伝子として同定した。</p> <p><i>dsh1</i> 変異株ではセントロメアヘテロクロマチン領域の H3K9me レベルは顕著に低下しており、ヘテロクロマチン由来の siRNA も <i>dcr1</i> 変異株同様、検出されなかった。このことから、<i>dsh1</i> が siRNA 合成に必須の役割を果たすことでヘテロクロマチン形成に関与していることが明らかになった。さらに、Dsh1 が Dcr1 および Rdp1 と物理的に相互作用するとともに、核周縁部にドット状に共局在することを明らかにした。Dcr1 と Rdp1 は複合体を形成し siRNA の合成を行うことがわかっているが、<i>dsh1</i> 変異株において Dcr1 と Rdp1 の複合体形成ならびに核周縁部における共局在も失われていた。これらの結果から、Dsh1 は Dcr1-Rdp1 複合体を核周縁部の限られた区画で安定化することにより、siRNA 合成に寄与すると考えられた。</p> <p>また、Rdp1 のヘテロクロマチン局在が Dsh1 に完全に依存する一方、Dsh1 のクロマチン局在は Rdp1 非依存的に起こるという結果を得た。このことから、Dsh1 は Rdp1 をヘテロクロマチン上にリクルートすることで、siRNA の増幅をクロマチン上で保証する働きがあると考えられた。さらにバイオインフォマティクスの解析から、Dsh1 タンパク質に推定膜貫通ドメイン(TML ドメイン)が存在する可能性を見出した。TML ドメインを欠損した Dsh1 は核周縁部に局在できず、Dcr1-Rdp1 複合体は崩壊し、siRNA も合成されなかった。</p> <p>以上の解析から、Dsh1 が TML ドメイン依存的に核周縁部のクロマチン上に Dcr1-Rdp1 からなる siRNA 増幅の場を提供することが明らかとなった。</p> |                                                    |    |      |

(論文審査の結果の要旨)

ヘテロクロマチンは遺伝子発現制御だけでなく、染色体安定維持など核内機能に深く関わる重要なクロマチン高次構造である。分裂酵母のヘテロクロマチンは、ヘテロクロマチン内でRNAポリメラーゼⅡが転写するnon-coding RNAにより発動するRNAi系に依存して形成される。このシステムはRNAによるクロマチン構造制御のモデルとして注目され、精力的に解析が進められてきたが、その全貌はまだ明らかでない。一方、ほとんどの真核生物でヘテロクロマチンは核内で核膜近傍に局在するが、その生理的意義は不明であった。

申請者は分裂酵母を用いて、ヘテロクロマチン形成に欠陥を生じるような突然変異株のスクリーニングをおこなった。得られた変異株の原因遺伝子を遺伝学的手法で決定し、新規ヘテロクロマチン関連遺伝子*dsh1<sup>+</sup>*を同定した。*dsh1*破壊株の詳細な解析からDsh1が、核内の核膜内側に局在し、Rdp1とDcr1によるsiRNA増幅過程を促進することを示した。さらに、Dsh1がヘテロクロマチンに結合し、Rdp1とDcr1と相互作用しそれぞれの酵素の機能(二本鎖RNA合成とその分解)をヘテロクロマチン上で共役させることを示した。この結果から、ヘテロクロマチン形成に必要な「siRNA増幅の場」がDsh1を介して核膜内側に形成されているというモデルの提出に至った。これは、RNAiによるヘテロクロマチン形成機構の理解を新しい段階に推し進める発見であると共に、未知であったヘテロクロマチンの核膜近傍局在の生理的意義の一つを明らかにするもので、今後のRNAによるクロマチン構造制御の研究や核内構造の研究に大きく貢献することが予想される。

以上より、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

また、平成24年10月12日論文公聴会を開催し、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日