

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	仲間 美奈
論文題目	DNA:RNAハイブリッドを介した、RNAiによるヘテロクロマチン化システム		
(論文内容の要旨)			
近年、真核細胞で多くの非コードRNAが発見され、その機能はクロマチン制御を介した遺伝子発現抑制など多岐にわたる。分裂酵母のセントロメア領域にも多くのリピート配列が存在し、ヘテロクロマチン構造であるにもかかわらずその領域では非コード配列が転写されている。過去の研究で当該領域由来のsiRNAが同定されており、かつRNAi系で機能する分子装置（RITS複合体やRDRC等）が非コードRNAと結合することが示された。このようにセントロメア由来の非コードRNAがRNAi系において重要な機能を持つことが想定されるため、本研究では、非コードRNAのクロマチン局在を確かめ、ヘテロクロマチンにおける非コードRNAの役割を見出すことを目的とした。 まず、RNA のヒストン結合性を検討するため、RNA免疫沈降実験とDNA:RNA ハイブリッドの免疫染色を行い、非コードRNAのクロマチン局在を検出した。また、当該RNAがヘテロクロマチン構造依存的な機構あるいは特定配列により誘導される機構によって、DNA:RNA ハイブリッドを形成していることが示された。 続いてDNA:RNA ハイブリッドのRNAi系における機能を解析するため、RNAポリメラーゼⅡに対するRNA免疫沈降実験により、このハイブリッド形成が転写と共役したものであることが示された。さらにChp1（RITS複合体のサブユニット）に対するRNA免疫沈降実験により、DNA:RNA ハイブリッドをターゲットに、RITS複合体がクロマチン上へ呼び込まれる可能性が示された。 次に細胞内のDNA:RNA ハイブリッドの量が、ヘテロクロマチン形成に与える影響を検討するため、RNase Hの過剰発現株と欠損株を用いた解析を行った。その結果、それぞれDNA :RNA ハイブリッドの減少と増加が見られたことから、ハイブリッドを除去する因子の一つはRNase Hである可能性が示された。 また、ハイブリッドの減少や増加に伴い、ヘテロクロマチンに特徴的なヒストン修飾と関連因子の局在に異常が見られた。また、人為的ヘテロクロマチン系については、構築と維持に異常を示した。よってDNA:RNA ハイブリッド量の適切な調整が、ヘテロクロマチン化にとって重要であると考えられた。さらに、ハイブリッドを適当量に調整する因子として、ヘテロクロマチン化に係わる因子（Swi6、Clr4、Chp2）も含まれる可能性がある。 以上、本研究により、非コードRNAがDNA:RNA ハイブリッドを形成してクロマチンに局在し、RNAi依存的ヘテロクロマチンの構築と維持に関与することが見出された。			

(論文審査の結果の要旨)

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 (ncRNA)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。現在広く認められているRNAi依存的ヘテロクロマチン形成モデルでは、ヘテロクロマチン由来ncRNAが転写後もクロマチン上に残り、siRNA合成の基質となるとともに、RNAi因子のプラットフォームとして機能していると考えられている。しかし、ncRNAのクロマチン結合を直接示す実験的証拠は得られていなかった。

申請者はこの分裂酵母ヘテロクロマチンncRNAのクロマチン結合の確認とそのメカニズムの解明を目指して研究をおこなった。まず、ヒストンを標的とするRNA免疫沈降法(RNA-immunoprecipitation法, RIP法)により、ヘテロクロマチンncRNAが通常のmRNAとは異なり、クロマチンに結合していることを初めて明確に示した。また、ncRNAが転写と共役して鋳型DNAとDNA:RNAハイブリッドを形成することによってクロマチン上に残り、RNAi因子のプラットフォームとして機能していることを示した。

これらの結果は、ヘテロクロマチンncRNAの特異な動態を明らかにしたもので、RNAi依存性ヘテロクロマチン形成機構の理解に大きく貢献するものである。また、この研究の過程で、ユークロマチン領域でもハイブリッド形成が起きることを示唆する結果も得ている。これは細胞にとって有害と考えられていたハイブリッドが、ゲノム機能制御に積極的に活用されていることを示唆しており、今後のRNAによるクロマチン構造制御の研究に新たな視点を与えることが期待できる。

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1月23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