

## 論文の内容の要旨

論文題目 出芽酵母接合型遺伝子座における染色体機能領域と境界領域形成  
氏名 福田 紘己

真核細胞生物の遺伝子発現は主に3つの段階で制御されていると考えられる。

- i) 染色体機能領域および境界領域の形成 (サイレンシング・抗サイレンシング反応)
- ii) 染色体構造変換 (ヌクレオソーム・クロマチン構造変換反応)
- iii) 裸のDNAからの転写活性化・不活性化 (プロモーター特異的転写反応)

真核細胞生物の遺伝子発現制御の理解には、上記のiii)のレベルの制御に加え、更に高次の構造体であるi), ii)の染色体の領域レベルの制御の解明が不可欠であるが、この高次の制御の解明に関してはiii)の研究に比べてそれほどあるいはほとんど進んでいないのが現状である(1)。

i)の染色体からの遺伝子発現制御に関わる研究は、上述したように染色体の活性化・不活性化領域およびそれら機能領域間の境界領域の形成がどのようになされるのかという問題に置き換えることができる。染色体の主要構成要素であるヒストンは、ヒストン修飾酵素と脱修飾酵素両者による可逆的な反応を受け、その働きが正負に制御されている。本研究室ではこれまでに、この課題を解明するために出芽酵母のテロメア領域をモデル系として取り組み、テロメア領域での染色体不活性化状態とその隣接領域での染色体活性化状態が、進化上保存されたヒストンH4のN末端から16番目のリジン残基(H4-K16)に対して相対する酵素活性を持つ、ヒストン脱アセチル化酵素Sir2pとヒストンアセチル化酵素Sas2p(2,3,4)によって、規定されることを明らかにした(5)。この結果から、染色体上の機能領域を区別する境界が2種類の相異なる修飾酵素の同一基質部位に対するせめぎあいを介して生まれるといった新しい分子機構(negotiable border model)を提唱するに至った(5,6)。

発表者はこのNegotiable border modelを染色体機能領域及び境界領域形成の普遍的なモデル

として、反応系や生物種を越えた染色体からの遺伝子発現制御の基盤として成立しうるか否かを検討することにした。そこで、サイレンシング制御を受け、性決定の制御を司る接合型遺伝子座領域 (HM loci) での解析を進めた。染色体末端領域であったテロメア領域は活性化・不活性化領域間の境界領域を1箇所想定すればよいだけであった。それに対し、HM loci は染色体内部に存在するため最低3箇所の機能領域および2箇所の境界領域を想定する必要がある。このHM loci での解析を進めることで、より複雑な機能領域及び境界領域を想定する必要がある染色体領域における Negotiable border model の普遍性や多様性を検証できると考えた。

HM loci の一つである HMR locus はそれぞれ E サイレンサー、I サイレンサーと呼ばれる2種類の DNA エlement に挟まれた領域である。両サイレンサーの内側の領域はサイレンシング制御を受けており遺伝子は不活性化状態にあり、外側の領域は逆に抗サイレンシング制御を受けており遺伝子は活性化状態にある。Sas2, Sir2 活性のせめぎ合いによってヒストンは HMR locus 内側で低アセチル化状態に、HMR locus 外側で高アセチル化状態に調節されていると想定し、H4-K16Ac に対する抗体を使用したクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行うことで、HMR locus における H4-K16Ac の分布状況を測定した。WT(野生株)と sas2, sir2 欠損株との結果の比較により、E サイレンサー側で見出した境界に関しては、Sas2p, Sir2p 活性のせめぎ合いによって H4-K16Ac の局在が規定されていることが明らかになった。一方、サイレンシング因子 Sir3p の局在に関しては、WT 及び sir2 欠損株では、H4-K16Ac が低アセチル化状態となっている領域に Sir3p が高局在するといった相関性が見られ、H4-K16Ac の局在に対応して Sir3p の局在が規定される結果となった。一方、sas2 欠損株では、HMR locus 全領域にて H4-K16Ac が低アセチル化状態となるにもかかわらず Sir3p の局在が全体的に低下するという結果となった。この sas2 欠損時のサイレンシング領域における Sir3p 局在の低下はテロメア最末端においても見られる現象であるが、この現象が引き起こされているのは、ゲノムの全領域が低アセチル化状態となったため Sir3p の絶対量が不足して起こっていることが理由なのではないかと考えられる。

I サイレンサー側の境界に関しては、tRNA 遺伝子付近に存在することが示されたが、tRNA 遺伝子領域における低アセチル化及び Sir3p の高局在が Sir2p に依存せず維持されることより、Sas2, Sir2 の組み合わせでは説明できない未知の領域制御が存在することが明らかになった。

次に、H4-K16Ac の局在が HMR locus において、遺伝子発現レベルと関連しているかを検討した。HMR locus における個々の遺伝子からの mRNA 発現量を、野生株と各種変異株間で定量 RT-PCR で測定した。HMR locus ではテロメア領域同様、Sas2p, Sir2p によって形成される H4-K16Ac の局在に対応して遺伝子発現が規定されていることが明らかになった。

以上より、E サイレンサー側の境界に関して、染色体機能領域を形成する各要素が Sas2p, Sir2p の活性のバランスによって制御されていることを

示す結果を得られたことから、HMR locus においても Negotiable border model が適用可能であることが示された(Fig.1)。

HMR locus での解析から、tRNA 遺伝子領域では、Sas2p, Sir2p の組み合わせでは説明できない未知の領域が存在することが明らかとなった。この染色体領域形成における意義を考察する

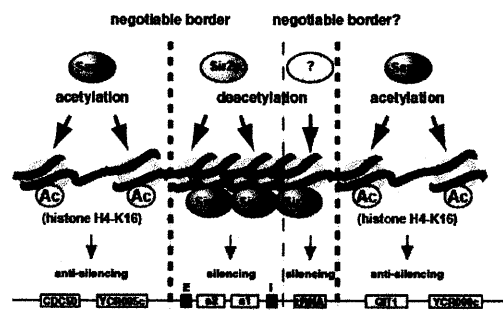


Fig.1 HMR locusにおける染色体領域形成モデル

ため、tRNA 遺伝子の欠損株での H4-K16Ac 及び Sir3p の局在性を解析した。HMR locus I サイレンサーの隣に存在する GIT1 遺伝子領域では、H4-K16Ac 局在の低下と Sir3p の局在増加が見られ、tRNA 遺伝子領域が HMR locus におけるサイレンシング活性の I サイレンサー側への移動を防いでいることが明らかになった(Fig.2)。

HMR locus の tRNA 遺伝子領域で検出された H4-K16 低アセチル化の要因は、ヒストンの量が不足することではなく未知の制御によってこの領域でのヒストンのアセチル化が阻害されていることが考えられた(Fig.3)。この結果に基づき、H4-K16 部位以外でのヒストン化学修飾による制御の可能性を検討した。tRNA 遺伝子領域で見られた Sir3p の高局在を、ヒストンの様々な化学修飾部位に対する点変異株で解析したところ、Sir3p の局在に影響を与えるヒストン化学修飾部位を複数検出した。H4-K16 以外の化学修飾によって tRNA 遺伝子領域の機能領域形成が制御されていることが示唆された(Fig.4)。

HM loci での検証によって、テロメア領域以外の染色体領域で見られた、染色体機能領域および境界領域形成の Negotiable border model が大筋で適用可能であることを明らかにした。

その一方、新たな課題として、tRNA 遺伝子領域にはテロメア領域で明らかにした染色体機能領域形成機構では説明されない点がみられた。ヒストン化学修飾部位点変異株を用いた解析により、H4-K16 以外の部位の化学修飾によって制御されている可能性が示唆され、この制御を担う化学修飾酵素の同定を行い制御機構の解明を進める必要がある。tRNA 遺伝子は RNA ポリメラーゼ III 系の遺伝子であり、HMR locus の解析結果によって、染色体領域制御機構が RNA ポリメラーゼ II, III の種類ごとに異なっているらしいことが明らかになったので、各々の関係を明らかにすることが今後の課題である。例えば、機能不明とされている高等生物のゲノムの大半を占める Alu 配列に代表される繰り返し配列の多くが RNA ポリメラーゼ III によって転写されるものであることから、これらの染色体機能領域形成の意義を解明しうる鍵になると考えられる。更には RNA ポリメラーゼ I 系の遺伝子領域である rRNA 遺伝子座におけるサイレンシング機構の解明を進めることで、真核細胞生物で起こった RNA ポリメラーゼ分子の分化に関して、単に転写される RNA の種類による多様性といった従来の考え方だけでなく、染色体機能領域及び境界領域の形成機構の分化といった染色体レベルでの多様性といった新しい考えを導入することが可能になると考えられる。

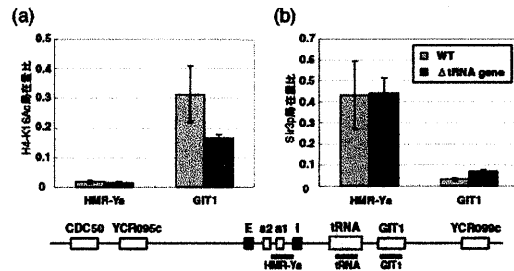


Fig.2 tRNA 遺伝子の欠損による染色体領域形成への影響の検証 (a) H4-K16Ac局在 (b) Sir3p局在

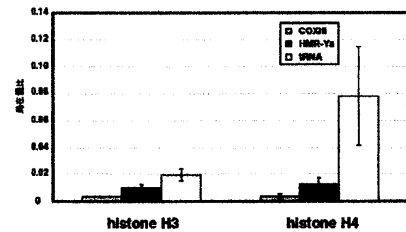


Fig.3 tRNA 遺伝子領域におけるヒストンの局在

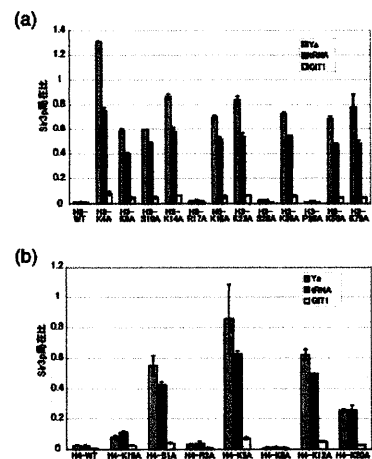


Fig.4 HMR locus tRNA 遺伝子近傍領域における Sir3p 局在に対するヒストン化学修飾部位点変異株の影響 (a) ヒストン H3 (b) ヒストン H4

(1) Fukuda et al. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 5, 190-208 (2006) (2) Yamamoto & Horikoshi *J. Biol. Chem.* 272, 30595-30598 (1997) (3) Ikura et al. *Cell* 102, 463-473 (2000) (4) Adachi et al. *J. Biol. Chem.* 277, 35688-35695 (2002) (5) Kimura et al. *Nature Genet.* 32, 370-377 (2002) (6) Kimura & Horikoshi *Genes Cells* 9, 499-508 (2004)