

## 審査の結果の要旨

氏名 福田 紘 己

1961年にオペロン説が提唱されて以降、転写制御研究の分野では、構造遺伝子と個々の遺伝子の発現特異性を担う DNA エlement、DNA エlementに結合する DNA 結合性因子を基本的なセットとして DNA-蛋白質相互作用を中心に研究が進められ、その後さらに蛋白質-蛋白質相互作用による説明も加えられ、現在に至るまで各々の遺伝子、各々の転写因子を用いて、広く研究がなされている。しかしながら、DNA が塩基性蛋白質ヒストンに巻きつくことでヌクレオソーム構造をとり、さらに高次の構造であるクロマチン構造をとる真核細胞生物においては、従来の裸の DNA を対象としたモデルでは説明しきれない複雑な転写制御機構が働いていることが明らかになっている。近年になって、ヒストンシャペロン、ATPase、ヒストン化学修飾酵素に代表されるクロマチン関連因子によってヌクレオソームの構造変換が行われ、それによって DNA がヌクレオソーム状態から解かれ、転写活性化状態となることが明らかにされてきている。このような反応が、エピジェネティックに制御されているという概念形成がなされ、現在でも最先端研究分野として世界中で凌ぎが削られている。

本研究では、更に高次の制御である、染色体の広い範囲のクロマチン構造を制御するメカニズムを明らかにすることを目的としている。染色体の広い範囲の領域制御機構の解明に関しては、世界的に見てもほとんど進んでおらず、制御機構を説明しうる新たな概念の確立が待たれている状態であった。それでも、染色体上の領域を制御する機構の研究は 1991 年以降、ある種の DNA 配列をエンハンサーやサイレンサーと標的遺伝子の間に挿入することで、それぞれの影響が遮断されるという解析から進められている。この特殊な DNA エlementはインシュレーターと呼ばれ、塩基配列の異なる複数のインシュレーターが同定されている。このように、エンハンサーやサイレンサーの活性を遮断するという解析系で研究が行われたことにより、染色体領域形成機構に関しては、DNA エlement上に壁のような境界を形成する固定された境界「Fixed border」を想定するモデルが主流となっている。しかしながら、このようなモデルでは Position Effect Variegation で見られるような、遺伝型が同一な細胞群内で異なる位置効果が現れるといった変動的な領域形成等、説明できない現象が存在する。そこで、我々は、テロメア領域での研究により、染色体領域制御機構に対して、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通して生まれるといった新しいモデル(Negotiable border model)を提唱するにいたっている。本研究は、テロメアとは異なる領域である HMR locus において Negotiable border model を検証することで、モデルの普遍性を示すと共に、HMR locus に含まれる tRNA 遺伝子領域付近の領域制御機構についても解析を進めることでモデルの多様性をも検証したものである。

本研究室のテロメア領域における解析より、転写活性化領域ではヒストンアセチル化酵素 Sas2p によってヒストン H4 の N 末端から 16 番目のリジン (H4-K16) が高アセチル化状態に保たれ、転写不活性化領域では逆にヒストン脱アセチル化酵素 Sir2p によって H4-K16 が低アセチル化状態に保たれていること、これら染色体機能領域間に存在する境界領域は、Sas2p, Sir2p のバランスの保たれる領域において形成されていることを明らかにしている。また、Sir2p によって低アセチル化状態が維持されている領域には、ヒストンテイルの低アセチル化状態を認識してヒストンに結合することが知られているヘテロクロマチンを形成する因子 Sir3p が局在することも明らかにしている。

本研究では、転写に関与する RNA ポリメラーゼの種類に注目すると、出芽酵母のサイレンシング領域が、RNA ポリメラーゼ II 系のテロメア領域、RNA ポリメラーゼ II, III 系の HM loci、RNA ポリメラーゼ I, III 系の rDNA 領域というように制御の機構を分類することが可能であると考えている。そこで、テロメア領域において明らかにした RNA ポリメラーゼ II 系の領域形成機構の普遍性の検証と同時に、RNA ポリメラーゼ II, III 系の染色体領域制御機構の関係性も検証可能な領域として、出芽酵母の性遺伝子座 HM loci の一つの領域である HMR locus を選び、解析を進めている。HMR locus では、サイレンサー E と I との間に挟まれ転写不活性化制御を受けている a1, a2 遺伝子を含む領域は、Sir2p によって H4-K16 低アセチル化及び Sir3p の高局在が維持され、それ以外の転写活性化領域は Sas2p によって H4-K16 高アセチル化及び Sir3p の低局在が維持されていることが予想された。また、これら機能領域の間の境界領域がサイレンサー E と I の外側にそれぞれ一箇所の合計二箇所存在し、Sas2p, Sir2p のせめぎあいによって制御されていることが予想された。こういった予想を検証するため、H4-K16Ac 及び Sir3p の局在をクロマチン免疫沈降法(ChIP)によって解析し、転写活性の変化を mRNA 発現量の測定によって解析している。H4-K16Ac の局在に関しては、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を明らかにした。Sir3p の局在に関しては、野生株及び sir2 欠損株では、H4-K16 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ことを示している。しかしながら、sas2 欠損株では、HMR locus 全領域において H4-K16 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。この現象は、sas2 欠損によってゲノムの全領域が低アセチル化状態となりテロメア領域等に Sir3p が取られてしまい、HMR locus における 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察した。Sir3p の大量発現株においては HML locus でも Sir3p の高局在が見られるという考察を支持する予備的な実験結果も得ている。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も明らかにしている。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ている。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 で測定した結果、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を明らかにしている。

以上の解析を通して、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し、HMR locus においても Negotiable border model が適用可能であることを示した。

本研究では、tRNA 遺伝子領域が I サイレンサー側の境界領域を形成していることを明らかにしているが、この Sas2, Sir2 の組み合わせによる Negotiable border model だけでは説明できない染色体領域形成機構の存在することは、転写に参与する RNA ポリメラーゼの種類によって染色体領域制御機構が分類されるとした仮説を支持するとして注目している。その上で、tRNA 遺伝子領域の領域形成機構の分子メカニズムの解析を、いくつかの可能性を検証する形で進めている。第一に、この tRNA 遺伝子領域で検出された H4-K16 低アセチル化の要因が、ヒストンが局在していないからだという可能性に関して検証している。tRNA 遺伝子領域におけるヒストンの局在をヒストン H3, H4 に対する ChIP によって検証し、十分な量のヒストンが局在していることを示したことで、この可能性に関しては否定している。第二に、Sir2p 以外のヒストン脱アセチル化酵素が関与している可能性を検証している。出芽酵母に存在する全てのヒストン脱アセチル化酵素と SIR2 との二重欠損体の tRNA 遺伝子領域におけるアセチル化局在を解析し、低アセチル化状態を解除する組み合わせが無いかどうかを検証したが、該当するものはなかったことより、この可能性に関しても否定している。最後に、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ている。tRNA 遺伝子領域で見られた Sir3p の高局在に関して、ヒストンの様々な化学修飾部位に対する点変異株でその局在に影響を与えるものがないか Sir3p に対する ChIP により解析したところ、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ている。新たに見つかった化学修飾部位には、これまでサイレンシング制御への関与が知られていなかったものも多数含まれていた。この結果によって、H4-K16 以外の新しい化学修飾部位によって tRNA 遺伝子領域の機能領域形成が制御されていることを考察している。

本研究において Negotiable border model がテロメア領域以外の領域にも適用可能なことを示したことによって、モデルの普遍性を示している。このことより、染色体の広い領域における高次の制御機構を説明する Negotiable border model を確立することができた。また、tRNA 遺伝子領域の領域形成機構に関しては、世界的に見ても、クロマチン構造変換との関連性を示唆する結果を得たのは初めての例である。こういった結果は、RNA ポリメラーゼの分化と染色体領域制御機構の分化との進化的な関係といった、今迄誰も考えていなかった事象の解明へとつながる研究になったと考えられる。これらのことより本研究に関して、学位（薬学）に十分値すると判断した。