

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

鈴木 絵里子

---

申請者氏名

クロマチン高次構造は転写反応を時空間的に制御することが知られている。クロマチン構造はユークロマチン、ヘテロクロマチン、両者の境界であるクロマチンバウンダリーの 3 種類に大別される。現在までに、クロマチン高次構造調節因子が多く知られているが、これら因子のみでは、クロマチン高次構造調節機構全貌を理解することは不可能である。本論文では、クロマチンバウンダリーを規定する DNA 配列インシュレーターに着目し、ショウジョウバエ分子遺伝学的手法を用いることで、新規クロマチン高次構造調節因子の探索を試みている。

第一章の序論に続き、第二章では、ショウジョウバエを用いて新規インシュレーターモデルショウジョウバエの作出を試みている。この新規インシュレーターモデルショウジョウバエは、蛍光タンパク質の発現強度を指標にクロマチン状態が評価可能な系である。作出したインシュレーターモデルショウジョウバエにおいて、外来性インシュレーターがクロマチンバウンダリーを構築することを確認している。この新規インシュレーターモデルショウジョウバエの特徴として、二点挙げられる。第一の特徴はインシュレーター配列として、*scs,scs'* を用いていることである。*scs,scs'* はショウジョウバエ唾液腺染色体で観察されるユークロマチン領域 *heat shock puff* の境界領域に位置する。従って、新規インシュレーターモデルショウジョウバエを用いて分子遺伝学的手法により見出された未知クロマチン高次構造調節因子の生体内解析が、*heat shock puff* の形態観察により可能となっている。第二の特徴は既存の系では評価できないクロマチンバウンダリーに隣接したヘテロクロマチン状態を評価できることである。このことにより、インシュレーターのユークロマチン及びヘテロクロマチンに対する制御を同時に評価することが可能となった。

第三章では、作出された新規インシュレーターモデルショウジョウバエを用い、新規クロマチン高次構造調節因子の分子遺伝学的探索を試みている。特に近年、ヘテロクロマチン調節機構との関与が示唆されている RNA サイレンシング装置に着目することで、新規クロマチン高次構造調節因子 Dcr-2 及び Ago2 を見出すことに成功している。ショウジョウバエ唾液腺染色体での heat shock puff を用いた解析により、Dcr-2 は heat shock puff に存在し、Dcr-2 及び Ago2 が heat shock 刺激後の puff 弛緩を促進することが示された。また、heat shock puff 領域に存在する hsp70 遺伝子 mRNA の経時的変化の検討により、heat shock 後、Dcr-2 及び Ago2 が hsp70 遺伝子発現を抑制することが示している。従って、Dcr-2 及び Ago2 がインシュレーターによるクロマチンバウンダリー制御を介して、HS 後の puff 弛緩を促進することを示唆した。

第四章では、scs,scs' インシュレーター配列より non-coding RNA (ncRNA) が転写されていることを見出している。scs ncRNA は恒常的に発現する。一方、scs' ncRNA は heat shock 依存的に発現量が増加していることを見出した。また、RT-PCR 及び in situ 法によりこれら ncRNA は二本鎖 RNA であることが示された。次に、Ago2 抗体を用いた免疫沈降によって、scs' ncRNA は long form RNA として存在することが示されている。さらに、scs' ncRNA のトランスジェニックショウジョウバエを作出し、唾液腺染色体での heat shock puff 形成を観察した結果、scs' ncRNA は heat shock puff 形成を阻害し、puff の境界にヘテロクロマチン領域が出現することが示された。以上の知見から、scs' ncRNA はインシュレーターのクロマチンバウンダリー形成を抑制化し、HS 後の puff 弛緩を促進することが推察している。

第五章では、上述の結果を踏まえ、scs' ncRNA によるクロマチンバウンダリー構造調節の分子機構について議論している。

本論文では、インシュレーターによるクロマチンバウンダリー制御機構に着目し、ショウジョウバエ分子遺伝学的手法を駆使し、インシュレーター由来 ncRNA を見出すことに成功している。従って、これらの成果は、新規クロマチン高次構造調節機構の存在を示唆するものであった。よって、審査員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと

認めた。