



Title	反復配列がヘテロクロマチン形成を促進するメカニズムの研究
Author(s)	浅沼, 高寛
Citation	北海道大学. 博士(理学) 乙第7191号
Issue Date	2023-12-25
DOI	10.14943/doctoral.r7191
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91205
Type	theses (doctoral)
File Information	ASANUMA_Takahiro.pdf



[Instructions for use](#)

反復配列がヘテロクロマチン形成を促進するメカニズムの研究

2023年度

北海道大学総合化学院 生物有機化学研究室

浅沼高寛

目次

要旨	5
略語表	7
第一章 序論	
1-1: ヘテロクロマチンとユークロマチン	8
1-2: 反復配列はヘテロクロマチン形成を促進する	8
1-3: 分裂酵母における RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成機構	10
1-4: H3K9me 除去因子 Epe1	13
1-5: 本研究について	15
第二章 材料と方法	
2-1: <i>Schizosaccharomyces pombe</i> の培養、遺伝子操作、サイレシングアッセイについて	16
2-2: <i>ade6⁺</i> 遺伝子リピート株の作成	16
2-3: <i>ade6</i> ヘアピン RNA カセットの作成	17
2-4: サザンブロット解析	18
2-5: ノーザンブロット解析	19
2-6: RT-PCR 及び qRT-PCR	19
2-7: siRNA のノーザンブロット解析	19
2-8: ChIP-qPCR 及び ChIP-seq	20
2-9: CAGE-seq	20
2-10: small RNA (sRNA)-seq	21
2-11: 5'/3'RACE 解析	22
表 1 : 使用した菌株	24

表 2 : 使用したプライマー	32
-----------------	----

第三章 結果

3-1 : H3K9me 除去因子 Epe1 は RNAi 経路を活性化する	37
3-2 : Epe1 は、 <i>dg/dh</i> 配列全体に偏在する転写開始点から ncRNA の転写を誘導する	40
3-3 : <i>dg/dh</i> 配列は 2 つのタイプの転写開始点から構成されている	44
3-4 : Epe1 はヘテロクロマチン下の DNA 配列に従って転写を活性化する	46
3-5 : widespread TSS だけを含む DNA 断片で、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を確立できる	47
3-6 : タンデムリピートに配置した mRNA 遺伝子が RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を促進する	49
3-7 : タンデムリピートになった mRNA 遺伝子による RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成の促進は、その遺伝子量に起因するものではない	57
3-8 : タンデムリピートになった mRNA 遺伝子は cis-acting RNAi を促進する	59
3-9 : タンデムリピートになった mRNA 遺伝子は自律的な RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を確立できる (Repeat-induced RNAi)	60
3-10 : Repeat-induced RNAi には一定数以上のコピー数が必要である	64
3-11 : Repeat-induced RNAi には H3K9me 除去因子 Epe1 が必要である	65
3-12 : Epe1 は cis-acting RNAi の活性化に必要である	67
3-13 : 一部の株において <i>ade6⁺</i> TSS 上流領域で siRNA 産生が確認される	70
3-13 : H3K9me 修飾の伝達において、Epe1 はリピート依存的に真逆の役割を果たす	72

第四章 考察

4-1 : Repeat-induced RNAi のモデルについて	74
4-1-1 : 標的 RNA の局所濃度モデル	75
4-1-2 : 重合体としてのリピート mRNA 遺伝子と核膜吸着モデル	77

4-2 : Repeat-induced RNAi は H3K9me の補充と除去のバランスの上に成り立っている	78
4-3 : <i>ade6+</i> アリル上流領域で検出される siRNA について	78
4-4 : <i>dg/dh</i> 配列における RNAi と Repeat-induced RNAi の比較	80
4-4-1 : <i>dg/dh</i> 配列のみが持つ特徴について	80
4-4-2 : 「widespread TSS を持つ転写ユニット」と「タンデムリピートの mRNA 遺伝子」の類似性について	81
4-5 : Repeat-induced RNAi の普遍性について	83
4-5-1: RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成機構の普遍性について	83
4-5-2: 単純な反復配列における Repeat-induced RNAi についての考察	83
4-5-3: アンチサイレシング因子 Epe1 の普遍性について	84
参考文献	86
謝辞	91

要旨

真核生物のゲノム DNA は、ヒストン蛋白質に巻きついてヌクレオソームと呼ばれる構造を形成し、それが連なったクロマチンと呼ばれる高次構造をとって核内に収められている。クロマチンは、その性質に基づいてユークロマチンとヘテロクロマチンの2種類に大別される。ユークロマチン領域では遺伝子の発現が活発に行われる一方、ヘテロクロマチン領域では遺伝子の発現が強制的に抑制される。この2つの対照的な状態はヒストンの化学修飾によって決まり、例えばヘテロクロマチンの場合、そのヒストン H3 の9番目のリジンのメチル化修飾 (H3K9me 修飾) によって特徴づけられることが知られている。真核生物は、H3K9me 修飾酵素とその修飾を除去する酵素の両方を持っており、ヒストンの修飾を介してクロマチン状態の制御を行なっていると考えられている。

興味深いことに、ヘテロクロマチンは DNA が反復配列となっている領域で形成される傾向があることが知られている。その代表的な例は、セントロメア近傍領域に存在するヘテロクロマチンである。セントロメア近傍領域のヘテロクロマチンは染色体分配において重要な役割を果たしていると考えられており、多くの真核生物の染色体で共通してみられる特徴である。しかし、その領域の DNA 配列は生物種間で保存されておらず、それぞれの種特異的な反復配列で構成されている。この事実は、真核生物には DNA が反復配列になっていること自体を認識して、その領域のヘテロクロマチン形成を促進する機構が存在すること示唆している。しかし、その仕組みは未だ明らかになっていない。

モデル生物である分裂酵母において、セントロメア近傍領域は高等真核生物で見られるような反復配列ではなく、*dg/dh* と呼ばれる特定の塩基配列で構成されている。過去の研究から、*dg/dh* 配列からは non-coding RNA (ncRNA) が転写され、これが RNA 干渉

(RNA interference, RNAi) 経路の標的となることで、ヘテロクロマチン形成が誘導されることが明らかになっている。RNAi 経路は、二十数塩基の small interfering RNA (siRNA) と、siRNA を介して結合しそれと相補的な標的 RNA を認識する Argonaute 蛋白質を中心に構成されている。これまでの研究から、Argonaute 蛋白質が siRNA を介して核内で転写されている ncRNA を認識・結合する際に、H3K9me 修飾酵素をその領域にリクルートすることで、ヘテロクロマチン形成が促進されることが明らかになっている。しかし一方で、人工的な siRNA を用いることで、通常の mRNA 遺伝子をその標的として認識させても、ヘテロクロマチン形成は殆ど誘導されないことが明らかになっている。この結果は RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成には siRNA による認識以外の要因があることが示唆していたが、その実体はこれまで不明であった。

本研究ではまず、*dg/dh* 配列中には沢山の転写開始点が偏在していることを明らかにする。次にこの特徴こそが、*dg/dh* ncRNA を RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成の標的たらしめているという仮説を立て、通常の mRNA 遺伝子を用いてこの特徴を人為的に模倣することを試みる。その結果、タンデムリピートに配置した mRNA 遺伝子を用いる

ことで、*dg/dh* 配列と同様、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成が確立できることを示す。最後に、Repeat-induced RNAi と名付けたこの系を用いることで、H3K9me 除去因子 Epe1 が、リピートの数に応じて、「H3K9me 修飾の除去」と「RNAi 経路活性化による H3K9me 修飾の維持」という相反する二つの役割を果たしていることを明らかにする。この結果は、なぜ真核生物では反復配列においてヘテロクロマチン形成が促進されているのか、という問いに対する 1 つの解答を示すものである。

略語表

Ago1: 分裂酵母が持つ唯一の Argonaute protein

cenH: 性決定領域における *dg/dh* 配列

CLRC: Clr4 methyltransferase complex

Clr4: H3K9me histone methyltransferase

Dcr1: Dicer (dsRNA を siRNA にプロセッシングする機能を持つ)

Epe1: JmjC ドメインを持つ H3K9me 除去因子

dsRNA: double strand RNA (二本鎖 RNA)

fbp1: コントロールに用いられるユークロマチン領域の mRNA 遺伝子

H3K9me: ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化修飾

mRNA: messenger RNA

ncRNA: non-coding RNA: (本研究の場合、tRNA や rRNA ではなく、Pol2 によって転写される mRNA 型の ncRNA を指す)

OP: overproduction (過剰生産、過剰発現の意)

ORF: Open Reading Frame

Pol2: RNA polymerase II

PTGS: Post Transcriptional Gene Silencing(転写後抑制)

PMG: 合成最小培地の一種 (Pombe Minimal Glutamate)

RIGS: Repeat-induced Gene silencing

RNAi: RNA interference

RITS 複合体: RNA-Induced Transcriptional Silencing complex (Argonaute を含む複合体)

RDRC: RNA-dependent RNA polymerase complex (Rdp1 を含む複合体)

Rdp1: RNA-dependent RNA polymerase (RNA を鋳型に二本鎖 RNA を合成する機能を持つ)

Rik1: CLRC の構成因子の一つ。

siRNA: small interfering RNA (この RNA の塩基配列の相補性を利用して Argonaute 蛋白質が標的 RNA を認識する)

snoR58: snoRNA58 (loading control).

Swi6: H3K9me 結合蛋白質 HP1 ホモログ

TGS: Transcriptional Gene Silencing (転写抑制)

TSS: Transcription Start Site (転写開始点)

TTS: Transcription Termination Site (転写終結点)

第一章

序論

1-1: ヘテロクロマチンとユークロマチン

真核生物のゲノム DNA は、ヒストン 8 量体に巻き付くことでヌクレオソームを形成し、そしてこのヌクレオソームが数珠のように連なったクロマチンと呼ばれる構造をとって核内に収められている。このクロマチン構造は、その形状と性質からユークロマチン領域とヘテロクロマチン領域の 2 種類に大別されている。ユークロマチン領域は言わば数珠が弛緩した状態になっており、その領域の遺伝子は活発に発現している。一方ヘテロクロマチン領域は数珠が凝集し、遺伝子の発現が強制的に抑制される不活性な領域である。この 2 つの対照的な状態は、ヒストンの化学修飾に代表されるエピジェネティックな制御によって規定されている。DNA とヌクレオソームを形成しているヒストン 8 量体は、H2A, H2B, H3, H4 と呼ばれる 4 種のヒストンから構成されている。この時、各ヒストンタンパク質の N 末端は、DNA が巻き付いた 8 量体コア部分の外側に飛び出すような形に配置されている。ヒストンテールと呼ばれるこの領域は、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化を含む様々な修飾を受けており、DNA の塩基配列とは独立してその領域に更なる情報を付加する、もう一つのレイヤーとして機能していると考えられている(ヒストンコード仮説)。特にヘテロクロマチン領域の場合、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化修飾(H3K9me)、27 番目のリジンのメチル化修飾、及び全体的な低アセチル化状態などがその代表的な指標として知られている。これとは対照的に、ユークロマチン領域は H3K9 のアセチル化修飾を含む全体的な高アセチル化状態、H3 の 4 番目(H3K4me)、36 番目のリジンのメチル化修飾等で特徴づけられる。真核細胞は、これらの修飾に対応する修飾酵素(writer) とその修飾を除去する酵素(eraser)の両方を持っており、ヒストン修飾の制御を介して、クロマチン状態のコントロールを行なっていると考えられている [1]。

1-2: 反復配列はヘテロクロマチン形成を促進する

興味深いことに、その研究過程の 1940 年代から、ヘテロクロマチンは反復配列(特に縦列反復配列)になった DNA 領域において形成される傾向があることが指摘されてきた [2]。その最も代表的な例が、セントロメア近傍領域におけるヘテロクロマチンである。セントロメアは、細胞が分裂する際、倍加した染色体を娘細胞に分配するために紡錘糸が結合する動原体が形成される DNA 領域である。このセントロメア近傍には構成的にヘテロクロマチンが形成されていることが知られており、染色体分配において重要な役割を果たしていると考えられている。注目すべきことに、このセントロメア近傍におけるヘテロク

ロマチンは多くの真核生物の染色体で共通してみられる特徴であるにも関わらず、その領域の DNA 塩基配列は生物種間で全く保存されておらず、それぞれの種に特有な反復配列で構成されていることである[3,4]。この事実は、特定の塩基配列ではなく、DNA 配列が「繰り返し(リピート)になっている」こと自体が、その領域のヘテロクロマチン形成を促進するメカニズムが存在すること示唆している。しかし、その仕組みは未だ明らかになっていない。

また、反復配列においてヘテロクロマチン形成が促進される傾向は、セントロメア近傍領域のような特定の塩基配列の繰り返しから構成される反復配列に留まらない。高等真核生物においては、外部から遺伝子を導入した際、しばしば導入された外来遺伝子がリピートになった状態になってゲノム上に挿入されることが知られている。この時、リピートになった外来遺伝子の発現量はそのコピー数と比べて低くなる傾向があり、場合によっては完全に抑制されてしまう。現在までの研究の結果、リピートになった外来遺伝子の領域にはしばしばヘテロクロマチンが形成されることが明らかになっており、この現象は Repeat-induced Gene Silencing (RIGS)と呼ばれている[5]。この事実は、単純な反復配列だけでなく、mRNA 遺伝子単位の塩基配列が繰り返しになることによっても、ヘテロクロマチン形成が促進される傾向があることを示している。

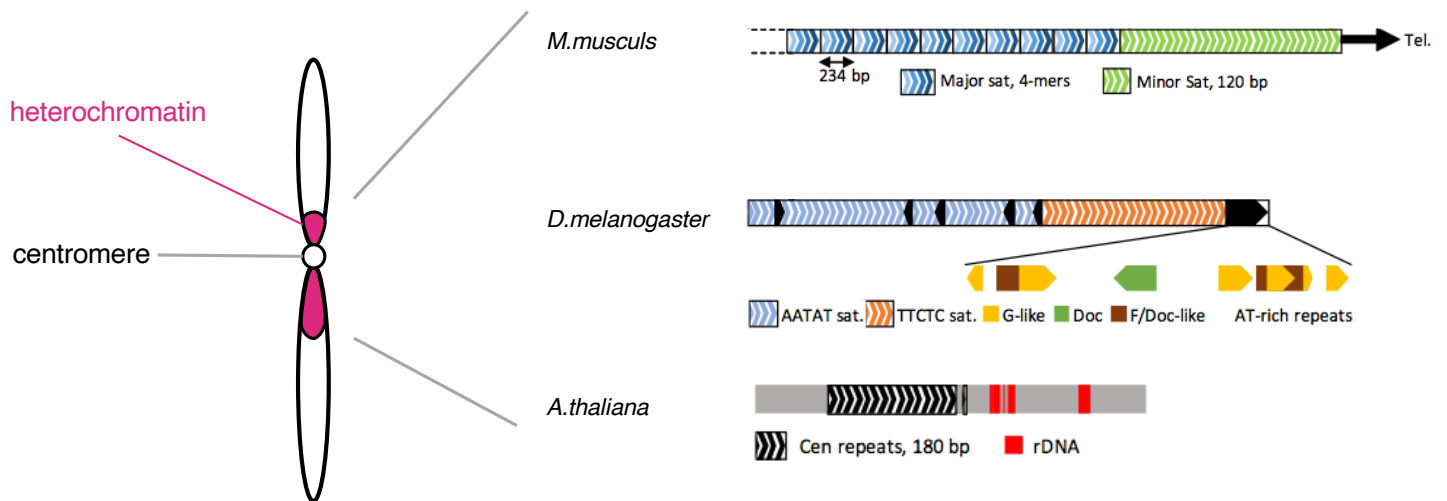


図1-1. 真核生物における染色体の模式図。

多くの真核生物の染色体では、動原体が形成されるセントロメア周辺領域に構成的なヘテロクロマチンが形成されている。このヘテロクロマチン領域におけるDNA配列は、保存されていない一方、反復配列で構成されているという共通点がある。[4] Muller et al., Trends Genet, 2019より一部改変して引用。

1-3: 分裂酵母における RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成機構

単細胞モデル真核生物である分裂酵母では、その染色体のペリセントロメア領域、サブテロメア領域、性決定領域に構成的なヘテロクロマチン領域が存在しており、他の真核生物と同様、これらのヘテロクロマチンは H3K9me 修飾で特徴づけられる[6]。一方、これらの領域の DNA 配列は高等真核生物で見られるような縦列反復配列でなく、*dgldh* と呼ばれる特定の塩基配列から構成されている(図 1-3)。これまでの研究の結果、*dgldh* からは non-coding RNA (ncRNA) が転写されており、その ncRNA が内在的な RNAi 経路の標的になることで、ヘテロクロマチン形成が誘導されていることが明らかになっている。RNAi 経路とは、二十数塩基の siRNA と、その siRNA を介してそれと相補的な配列を持つ標的 RNA を認識する Argonaute 蛋白質で構成されている仕組みのことをいう。この経路は様々な形で広く真核生物で保存されているが、共通しているのは標的になった RNA の発現が抑制されるという点である。この抑制には転写後抑制 (PTGS) と転写抑制 (TGS) という二つのタイプがある。PTGS は、主に細胞質において、標的となった mRNA が Argonaute 蛋白質によって切断されたり、その翻訳が阻害されたりすることで起きる。一方で TGS は、核内で転写中の標的 RNA が Argonaute 蛋白質に認識され、その領域においてヘテロクロマチン形成が誘導されることによって起きる。分裂酵母の *dgldh* ncRNA における RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成は、後者のタイプの代表例として、最も研究が進められている分野の 1 つである[7]。

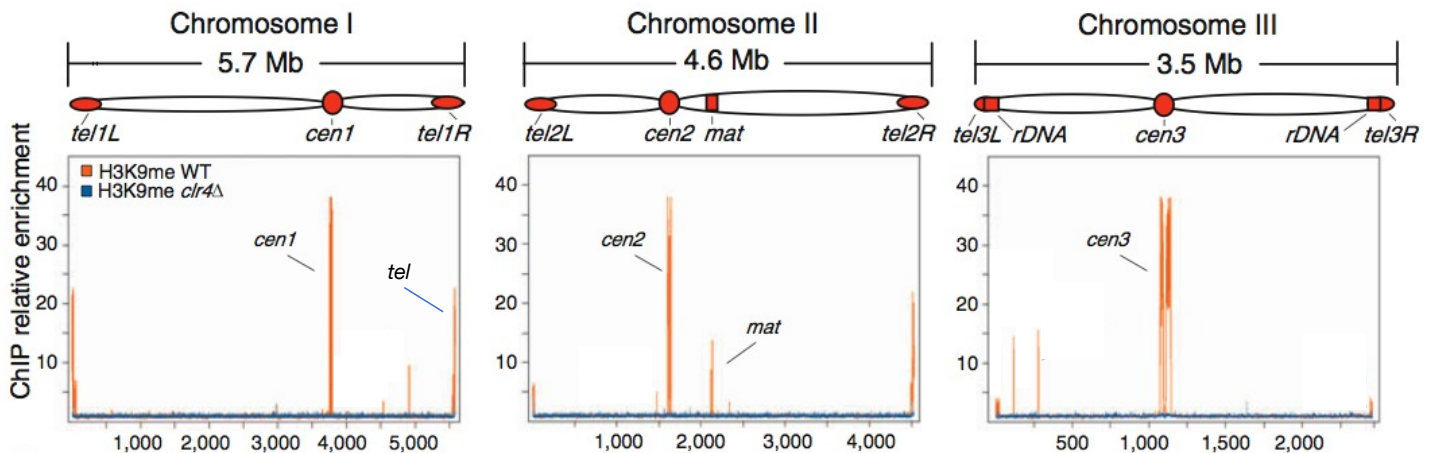


図1-2. 分裂酵母の染色体におけるヘテロクロマチン領域の分布。

野生型細胞(WT, 橙色)とH3K9メチル化酵素である*clr4+*の破壊株(*clr4Δ*, 青)におけるH3K9me分布をゲノムワイドに解析した結果を示す。セントロメア、サブテロメア、性決定領域に顕著にH3K9meが局在していることが分かる。[6] Cam *et al.*, *Nat Genet*, 2005 より一部改変して引用。

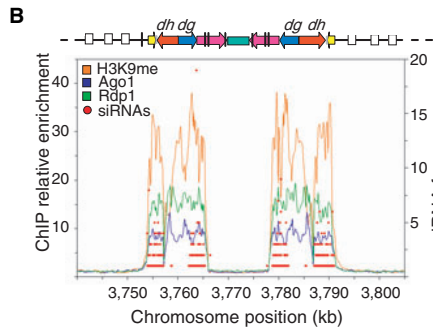
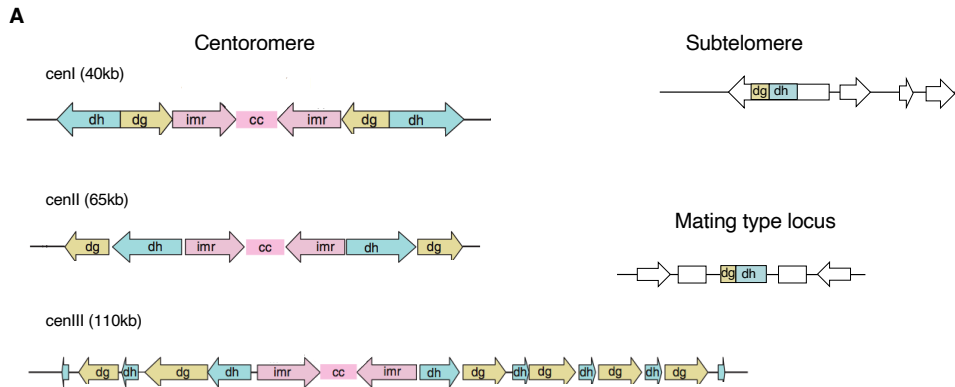


図1-3. 分裂酵母の構造的ヘテロクロマチン領域には共通して*dg/dh*配列が存在する。(A)分裂酵母のセントロメア、サブテロメア、性決定領域(Mating type locus)に存在する*dg/dh*配列の模式図を示す。各領域における*dg*、*dh*配列の向きと配置を表すため便宜的に矢印で表示していることに留意。*dg*と*dh*自体に相同性はない。*cc*はキネトコアが形成されるセントロメア配列、*imr*配列は最も内側で*cc*に隣接する保存された配列。(B)例として*cenI*におけるH3K9me、Argonaute蛋白質Ago1、RDRC構成因子Rdp1、siRNAの分布を示す。それぞれ [50]Djupedal *et al*, *EMBO*, 2009及び [6]Cam *et al.*, *Nat Genet*, 2005より一部改変して引用。

これまでの研究により、この RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成について、以下のようなモデルが描かれている(図 1-4)。RNA ポリメラーゼ II (Pol2) によって *dg/dh* 配列から転写される新生 *dg/dh* ncRNA は、それと相補的な配列を持つ siRNA を含む Argonaute 蛋白質複合体 (RNA-induced transcriptional silencing complex, RITS 複合体) によって認識される[8-10]。この際、RITS 複合体が、Suv39h ホモログである H3K9me メチル化酵素 Clr4 を含む CLRC 複合体をリクルートすることで、その領域におけるヘテロクロマチン形成が促進される[11]。一方でこの時、RITS 複合体は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ複合体(RDRC)も新生 ncRNA にリクルートすることが明らかになっている[12]。これにより RDRC は新生 ncRNA を鋳型として 2 本鎖 RNA(dsRNA)を合成し、その dsRNA が Dicer(Dcr1)によって切断されることで、二次的な siRNA が産生される。この二次的 siRNA は更なる RITS 複合体の呼び込みに機能することになり、その結果 siRNA 産生の正のフィードバックが形成されることになる[13-15]。これに加えて、H3K9me 修飾自体が、これら RITS 複合体や、RDRC 複合体のヘテロクロマチン局在を促進することも示されている。具体的には、RITS 複合体を構成する特定の因子自体が H3K9me と結合するドメインを持っていることや[14]、H3K9me 修飾特異的に結合する因子である HP1 ホモログ Swi6 が、RDRC を構成する因子と直接相互作用する因子を呼び込むことなどが報告されている[16, 17]。これらの結果は RNAi 経路とヘテロクロマチン形成は相互に強化し合う関係にあることを示している。

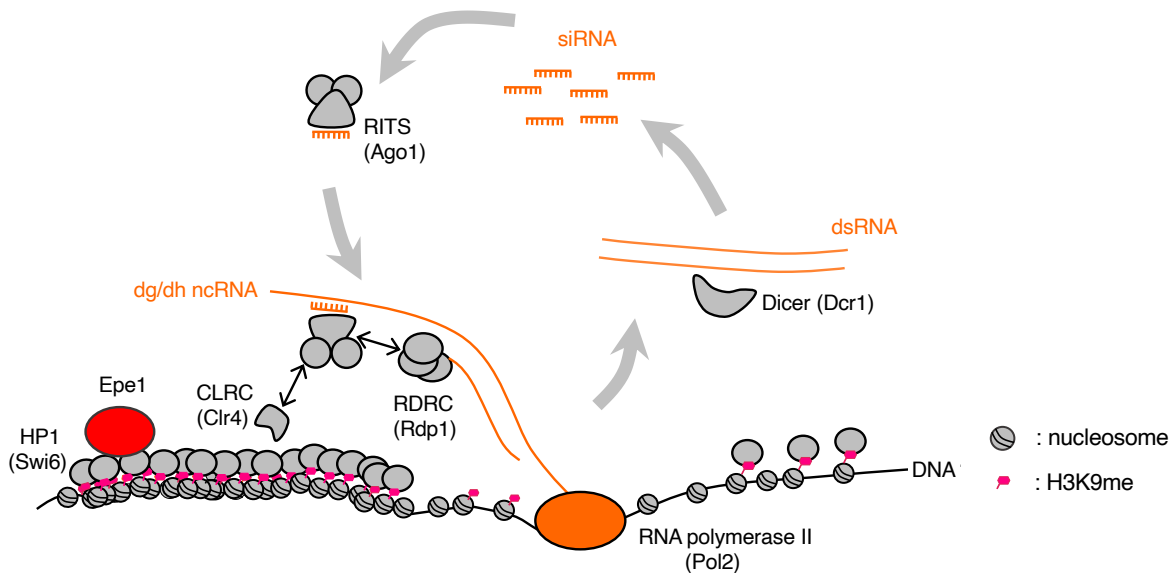


図1-4. RNAi経路を介したヘテロクロマチン形成機構のモデル図。

分裂酵母におけるRNAi経路を介したヘテロクロマチン形成機構のモデル図を簡略化したものを示す。本文中に出てくる主要な因子は遺伝子名も記載している。太い灰色の矢印はncRNAのプロセッシングを、黒い両矢印は複合体同士の物理的な相互作用を示す。H3K9meはピンクの旗で示す。尚、各因子の実際の大きさは考慮していない概念図であることに留意。説明は本文を参照。

前述の通り、RNAi経路はsiRNAを介して標的RNAを認識するという特徴があるため、細胞内で*dg/dh*以外の配列を持つ人工的なsiRNAを産生した場合、RNAi経路に任意のRNAをその標的として認識させることが理屈上可能である。しかしながら興味深いことに、以前の研究によれば、人工的なsiRNAを用いてユークロマチン領域に存在する通常のmRNA遺伝子を人為的にRNAi経路に認識させたとしても、ヘテロクロマチン形成が殆ど誘導されないということが報告されている[18-20]。また、かろうじて一度ヘテロクロマチン形成が誘導されたとしても、*dg/dh*配列でみられるようなsiRNA産生の正のフィードバックループは形成されず、相補的な配列を持つsiRNAが人工的に供給され続けられない限り、ヘテロクロマチンを維持できないことが明らかになっている[20, 21]。これらの結果は、RNAi経路を介したヘテロクロマチン形成の成立にはsiRNAによる認識以外に必要な要因があること示唆しており、*dg/dh* ncRNAには通常のmRNAにはない、RNAiを介したヘテロクロマチン形成にとって重要な特性があるということの意味していた。しかしながら、その実体はこれまでのところ明らかになっていなかった。

1-4: H3K9me 除去因子 Epe1

一方で、上記のように siRNA を介さず、H3K9me 修飾酵素 Clr4 を DNA 結合蛋白質と結合させ、ユークロマチン領域に直接係留(tethering)した場合、その領域には異所的なヘテロクロマチン形成が誘導される[22-23]。興味深いことに、この時、一度ヘテロクロマチンが形成された後に Clr4 をクロマチンからリリースすると、その領域に形成されていた異所的なヘテロクロマチンは急速に消失することが明らかになった。この急速な消失は細胞周期を停止した状態、つまり染色体複製などの影響がない状況下においても観察され、これらの結果から、細胞内ではクロマチン上の H3K9me 修飾は積極的に除去されていることが示唆された[22]。この H3K9me 修飾の除去を担っている因子の探索が行われた結果、JmjC ドメイン蛋白質 Epe1 がその役割を担っていることが明らかになった(図 1-5A)。JmjC ドメインはヒストン脱メチル化酵素に共通して見られるドメインである。実験の結果、Clr4 の係留によって誘導された異所的な H3K9me 修飾は、野生型の細胞(つまり Epe1 の存在下)では、係留された Clr4 がリリースされると急速に迅速に消失する一方、*epe1* 遺伝子を破壊した細胞(*epe1*Δ)においては、Clr4 がリリースされた後も維持され続けることが確認された [22-23]。この *epe1*Δ において形成された異所的なヘテロクロマチン領域は、体細胞分裂や減数分裂を経て娘細胞に伝達され、その維持に RNAi 経路が必要ないことが示されている。このようなヘテロクロマチンの”自己伝播”は、self-assembly, self-propagation と呼ばれ、H3K9me 修飾酵素である Clr4 がそのクロモドメインを介して既存の H3K9me 修飾に結合し、隣接するヌクレオソームに H3K9me 修飾を広げる活性を持っていることに由来していることが明らかになっている [22-24](図 1-5A)。まとめると、Epe1 が存在する場合、細胞は異所的なヘテロクロマチンの形成を阻止できる反面、セントロメア近傍領域のような生来の標的領域に形成されるヘテロクロマチンを維持するために、RNAi 経路のような維持機構が必要になる。一方で Epe1 が存在しない場合、RNAi 経路がなくてもヘテロクロマチンは自己伝播で維持されるが、一度形成された異所的なヘテロクロマチンが維持及び伝達されることを許容することになる、という関係がこれらの結果から示唆された。

次に注目すべきは、Epe1 と RNAi 経路の関係性である。興味深いことに、Epe1 は H3K9me 結合タンパク質である HP1 ホモログ Swi6 との相互作用して、ヘテロクロマチン領域に局在することが報告されている[25](図 1-5B)。H3K9me 除去因子として機能する Epe1 がヘテロクロマチン領域に局在する理由の一つとしては、ヘテロクロマチン領域とユークロマチン領域の境界線の確立に関与していることが挙げられる[26, 27]。実際、元来 Epe1 はヘテロクロマチン領域とユークロマチン領域の境界線の確立に寄与する因子のスクリーニングで同定された遺伝子である(Enhancer of Position Effect 1)[25]。しかし一方で、*epe1*Δ では *dgl/dh* 由来の siRNA 減少や、ヘテロクロマチン領域におけるサイレシングの欠損が観察されることから[28]、RNAi 経路に積極的に関与している可能性が示唆されていた。しかし、その正確な役割は未だ不明であった。

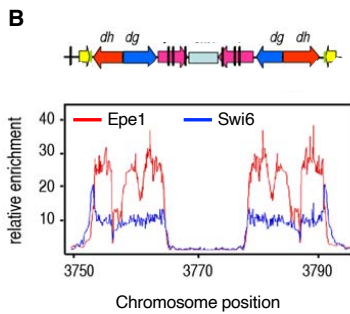
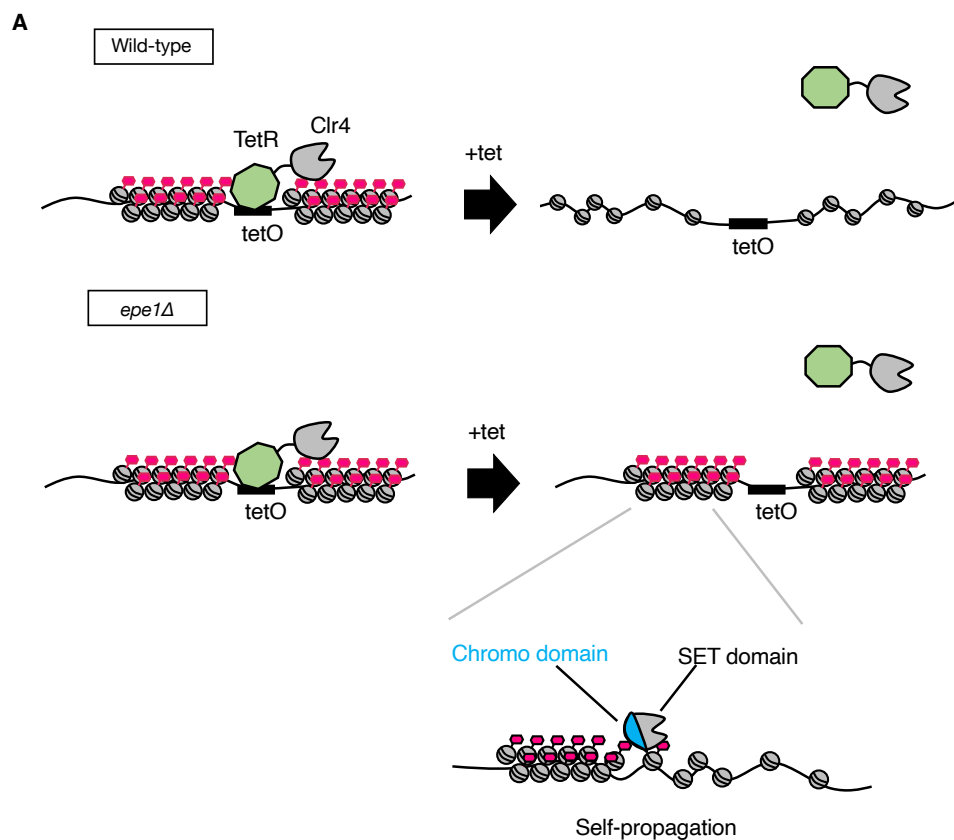


図1-5. H3K9me除去因子Epe1は構成的なヘテロクロマチン領域に局在する。

(A) Tet-OFFシステムを用いて異所的なヘテロクロマチンを形成し、その維持におけるEpe1の影響を解析した結果の模式図。Tet-OFFシステムでは、テトラサイクリン(tet)によってtetO配列へ結合しているTetR蛋白質を解放できる。この実験では、TetRとClr4を融合することでtetO配列周辺に異所的ヘテロクロマチン形成を誘導し、その後tetを加えてTetR-Clr4をリリースすることで、異所的なヘテロクロマチンがどうなるかを検討している。この時、Epe1が存在すると異所的ヘテロクロマチンは除去されてしまう一方、*epe1Δ*においては異所的ヘテロクロマチンが維持される。この維持はH3K9me修飾酵素Clr4が、H3K9me修飾を担うSETドメインに加えてH3K9meに結合できるクロモドメインを持つことによる自己伝播によるものである。(本文参照)。

(B)*cen1*におけるEpe1とHP1ホモログSwi6の分布。[25] Zofall and Grewal, *Mol cell*, 2006より一部改変して引用。

1-5：本研究について

本研究では、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成と Epe1 の関係を明らかにするため、まず始めに Epe1 を欠失した細胞、過剰発現した細胞を用い、それぞれの状況下における RNAi 経路への影響を解析する。またその過程で、*dgl/dh* 配列は実は沢山の転写開始点が偏在している特殊な転写ユニットであることを明らかにする。次にこの特徴こそが、*dgl/dh* ncRNA を RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成の標的たらしめているという仮説を検証するため、通常の mRNA 遺伝子を用いてこの特徴を人為的に模倣することを試みる。その結果、タンDEMリピートに配置した mRNA 遺伝子を用いることで、*dgl/dh* 配列と同様に自律的な RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を確立できることを示す。最後に、Repeat-induced RNAi と名付けたこの人工的な系を用いることで、H3K9me 除去因子である Epe1 が、リピートの数に応じて、「H3K9me 修飾の除去」と「RNAi 経路による H3K9me 修飾の維持」という相反する二つの役割を果たしていることを明らかにする。

第二章

材料と方法

2-1: *Schizosaccharomyces pombe* の培養、遺伝子操作、サイレンシングアッセイについて

本研究で使用したすべての株は、表 1 の株リストに記載されている。用いた菌株における標的遺伝子の破壊やエピトープタグの付加には、PCR に基づいた手法を用いた。導入フラグメントの組み込みは、全て colony-PCR またはサザンブロットによって確認されている。*ade6⁺* 遺伝子のサイレンシングアッセイは、アデニンの濃度を 10mg/L に減らした PMG 合成培地を用いて行った。*ade6* 遺伝子発現の抑制状態の確立または維持の効率を評価するために、それぞれ白色 (*ade6* 発現) または赤色 (*ade6* 抑制) シングルコロニーから、赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) コロニーが形成される効率の評価を行った。Epe1 過剰発現(以降 OP, overproduction)株 では、内在性の *epe1⁺* 遺伝子のプロモーターが、培地中のウラシルの有無によって発現が ON/OFF になる Purg1 プロモーター [29] に置き換えられている。Epe1 OP と高レベル Epe1 OP (多コピープラスミド pREP41 からの発現)[30] との比較は、図 3-29 を参照されたい。*ura4⁺* 遺伝子のサイレンシングアッセイにおいては、*ura4⁺* を発現する細胞に対して毒性を示す 5-フルオロオロチン酸 (FOA) を 0.2% 含ませたエディンバラ最小培地 (EMM) を使用した。

2-2: *ade6⁺* 遺伝子リピート株の作成

ade6⁺ リピート株の構築に使用したプライマーは、表 2 のリストに示されている。内在性の *ura4⁺* 座位に相同組み込めを起こすような *ade6⁺* リピートフラグメントを作成するため、*ade6⁺* 遺伝子フラグメントを段階的に増幅出来、且つこの増幅されたフラグメントが *ura4⁺* の 5' および 3' 末端領域に囲まれるようになるようなプラスミドの構築を行った。E. coli 内での複製起点とアンピシリン耐性遺伝子を含む pTL2M5(FYP2047, NBRP) の BbsI-Bst1107 フラグメントをバックボーンとし、*ura4⁺* 座位の上流および下流領域の各 PCR 産物、および同じく pTL2M5 由来の neomycin 耐性遺伝子 (neo) - hCVM プロモーター領域の PCR 産物を、In-Fusion クローニング (Takara, cat#Z9648N または Clontech, cat#639648) によって連結し、プラスミド pAP-339 とした。次に、neomycin 耐性遺伝子および今後の操作に不要な配列を除去するために、それぞれ領域に対応する逆向きプライマー (AG-714, 715 及び AG-720, 721) を用い、KOD Fx neo (TOYOBO, cat#KFX-201) による inverse PCR (iPCR) を連続して行った。その後、pAP-339 の hCMV プロモーターを *ade6⁺* 遺伝子フラグメントで置換した。具体的には pAP-339 を SpeI と NheI で切断し、In-

Fusion クローニングを用いて *ade6*⁺ PCR フラグメント (染色体 III、1315461-1318504) と連結した。*ade6*⁺ 遺伝子フラグメント内の不要な SpeI サイトは、iPCR (AG-751, 752) を用いた部位特異的突然変異によって破壊した。尚、iPCR 後またはサブクローニングの各ステップ後には塩基配列解析を行い、設計通りの構築ができているか、変異が入っていないかを確認を行った。得られた *ade6*⁺x1 プラスミド pAP-444 は、アンピシリン耐性遺伝子の中央に PvuI サイト、*ade6*⁺フラグメントの 5'末端に SpeI サイト、および *ade6*⁺フラグメントの 3'末端に NheI サイトを持っている (図 3-13、左パネル)。PvuI-*ade6*⁺-SpeI および PvuI-*ade6*⁺-NheI フラグメントを pAP-444 からそれぞれ切り出し再度ライゲーションを行うと、その結果できるプラスミドでは *ade6*⁺フラグメントが重複した状態になり、またライゲーションされた SpeI-NheI 接合部が制限酵素処理で切断されないようになっている。この複製プロセスを繰り返すことで、*ade6*⁺x2、x4、および x8 プラスミド (pAP-464, pAP-485, pAP-523) を作成した (図 3-13、中央パネル)。さらに、PvuI-*ade6*⁺x2-SpeI (pAP-464) および PvuI-*ade6*⁺x4-NheI (pAP-485) フラグメントを連結することで、*ade6*⁺x6 プラスミド (pAP-599) を得た。結果として得られたこれらの一連のプラスミドは、*ade6*⁺リピートフラグメントを挟む *ura4*⁺フラグメントの両末端に NotI サイトを有し、NotI 制限酵素処理により内在性の *ura4*⁺座位をターゲットとする *ade6*⁺リピートフラグメントを得ることを可能とする。一方で、*ade6*⁺リピートフラグメントの *ura4* 座位への相同組み替えを介した挿入の効率を上げるため、内在性の *ura4*⁺座位で二本鎖切断 (DSB) を誘発する CRISPR/Cas9 システムを使用した (図 3-13、右パネル)。*ura4*⁺ ORF をターゲットとする gRNA 配列を gRNA-Cas9 単一プラスミド pAH237[31]にクローニングし、pAP-562 を得た。*ura4*⁺をターゲットとする *ade6*⁺リピートフラグメントと *ura4* gRNA-Cas9 プラスミドを co-transformation するにあたり、古典的な LiOAc 法を用いた。具体的には 1x10⁸ の細胞に対して 1 μg の AP-562 と 500–1000 ng の *ade6*⁺リピートフラグメントを用いて形質転換を行った。内在性の *ura4*⁺遺伝子が *ade6*⁺リピートによって置換されたクローンを得るため、EMM 選択プレート (-ロイシン) で最初に選択された形質転換体は、その後、*ura4*⁺ 遺伝子が発現している細胞が感受性を示す 5-FOA プレートにレプリカした。5-FOA 耐性の形質転換体候補は再度 5-FOA プレート上にストリークすることでシングルコロニー化され、*ade6*⁺リピートが挿入されているかどうかの予備的な確認をするためコロニーPCRが行った。その後、gRNA-Cas9 プラスミドを失った形質転換体候補を分離するために、各候補の単一コロニーを YES プレート上でロイシン要求性を示すまで何度もリストリークを行った。最終的に得られた候補株からゲノム DNA を抽出し、予定通りに内在性の *ura4*⁺遺伝子が *ade6*⁺リピートによって置換されたクローンを選択するため、qPCR およびサザンブロット解析を行った (図 3-14)。*ade6*⁺遺伝子のコピー数と *ade6*⁺ mRNA の発現レベルとの相関は、Northern blot および qRT-PCR によって確認された (図 3-15)。

2-3: *ade6* ヘアピン RNA カセットの作成

ade6 ヘアピン RNA カセットの作成に用いられたプライマーは、表 2 に記載されている。*ade6* ヘアピン RNA を発現するカセットの作成に用いられたプラスミドの構造を図 3-17A に示す。Thiamine の有無によって発現の ON/OFF を調節することができる *nmt1*+プロモーターによって駆動される *ade6* ヘアピン RNA 発現カセットを生成するため、pREP1 プラスミド [30] をそのバックボーンとして使用した。*ade6* ヘアピン部分は、3つのフラグメントから構成されている。左腕および右腕は、*ade6*+ ORF の一部に対応する PCR 産物である (*ade6* hairpin I, 250 bp : *ade6* hairpin II, 750 bp)。第3のフラグメントは、スパーサーであり、*S.pombe rad9*+遺伝子の第一イントロンの PCR 産物が使用された。これらの3つのフラグメントを、SmaI および NdeI によって線形化された pREP1 プラスミドにクローニングするため、In-Fusion クローニング (Takara, cat#Z9648N または Clontech, cat#639648) を用いた。次にこのヘアピン RNA 発現カセットを内在性 *leu1*+座位に挿入するために、*leu1*+ターゲティングプラスミドとして pAP-509 を作成した。pAP-509 では、*leu1*+遺伝子 PCR 産物が pBluescript KS II (+) の SpeI-NotI サイトにサブクローニングされている。pREP1-*ade6* ヘアピン発現カセットプラスミドを、PstI および EcoRI で消化し、*nmt1*+プロモーター -*ade6* ヘアピン RNA カセット -*nmt1*+転写終結領域のフラグメントを回収した。このフラグメントを、PstI-EcoRI で消化された pAP-509 にライゲーションし、プラスミド pAP-512 (*ade6*-hairpin I) および pAP-513 (*ade6*-hairpin II) を作成した (図 3-17A)。これらのプラスミドを内在性 *leu1*+座位に挿入するため、*leu1*+遺伝子フラグメント内の NruI サイトを用いて線状化し、その後ロイシン要求性の *leu1*-32 株に形質転換した。形質転換体はロイシン要求性が回復することを指標によって選択され、*leu1*-32 座位にヘアピン発現カセットが挿入されているかどうかはコロニー-PCR およびサザンブロット解析によって確認した。*ade6* ヘアピン RNA 発現カセットを持つ菌株は、その操作中にヘアピン RNA 発現しないよう、thiamine の存在下(抑制条件下) で作成した。ヘアピン RNA の発現を誘導するため、細胞は 16 時間 thiamine のない液体培地で培養し、その後同じく thiamine のない PMG 培地に均一に植菌し、得られたコロニーを -80°C で保存したものを使用した。その後、野生株及びさまざまな変異株における *ade6* ヘアピン RNA 発現カセット由来の *ade6* siRNA の産生をノーザンブロット解析によって確認した (図 3-17B)

2-4: サザンブロット解析

ゲノム DNA 抽出は、先行研究の手順に従って行った (https://www.baumann-lab.org/documents/Nurselab_fissionyeasthandbook_000.pdf)。ゲノム DNA は、各制限酵素で一晩消化し、1xTris-Acetate-EDTA バッファを用いたアガロースゲル電気泳動によって分離した。その後、Amersham Hybond-N+ メンブレン (GE Healthcare, cat# RPN303B) に TurboBlotter System (Cytiva, cat#10416328) を用いてトランスファーを行った。その後、

メンブレンにブロットされた DNA に対し、UVP CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (120,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) を用いて UV クロスリンクを行った。DNA プローブは、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara, cat# 2021A) によって $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP で標識し、PerfectHyb Plus Hybridization buffer (Sigma, cat# H7033) 中で 42°C で一晩ハイブリダイズした。その後、メンブレンを 42°C で $2\times$ SSC 0.1% SDS バッファで洗浄し、イメージングプレートを用いて 1~2 日間の露光を行った。この解析に使用されたプライマーは、表 2 に記載されている。

2-5: ノーザンブロット解析

Total RNA はホットフェノール法を用いて調製し、RNasin Plus (Promega, cat# N2611) の存在下でリコンビナント DNase I (Takara, cat# 2270A) 処理を行った。サンプルは、1% アガロースと 6.7% ホルマリンを含む条件で電気泳動し、Amersham Hybond-N⁺ メンブレン (GE Healthcare, cat# RPN303B) に TurboBlotter System (Cytiva, cat#10416328) を用いてトランスファーした。その後ハイブリダイゼーションは、ノーザンブロット解析と同様に行った。この解析に使用されたプライマーは、表 2 に記載している。

2-6: RT-PCR 及び qRT-PCR

Total RNA は、ホットフェノール法を用いて抽出し、その後 RNasin Plus (Promega, cat#N2611) の存在下でリコンビナント DNase I (Takara, cat#2270A) を用いて DNA 分解処理を行った。逆転写には PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara, cat#2680A) を用い、製造元のプロトコールに従って逆転写を行った。qRT-PCR の定量部分は ChIP-qPCR と同じ方法で行なっている。解析に使用したプライマーは、表 2 の表に記載している。

2-7: siRNA のノーザンブロット解析

siRNA は mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, cat#AM1561) を用い、製品のプロトコールに従って抽出を行った。抽出した siRNA は、15% のシーケンシングゲル上で分離し、Trans-blot SD セミドライ電気泳動転送セル (Bio-Rad, cat#170-3940) を使用して Amersham Hybond-N⁺メンブレン (GE Healthcare, cat#RPN303B) にトランスファーした。UV クロスリンク後、ランダムプライミング (Takara, cat#6045) によって $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP で標識したプローブを用い、PerfectHyb Plus ハイブリダイゼーションバッファ (Sigma, cat#H7033) 中で 42°C オーバーナイトでハイブリダイゼーションを行った。 42°C の $2\times$ SSC 0.1% SDS バッファを用いて洗浄した後、メンブレンはイメージングプレートに 1~2 日間露光した。T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara, cat#2021A) によって $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP で標識された snoRNA58 に対するオリゴヌクレオチドプローブは、ローディングコントロールを検出する際に使用した。解析に使用したプライマーは表 2 の表に記載している。

2-8: ChIP-qPCR 及び ChIP-seq

ChIP-qPCR は、先行研究に記載されている方法に従って行った [32]。使用した抗体は、抗 H3K9me2 抗体 (mAbProtein, m5.1.1; 島根大学・浦野健博士からの提供)、anti-Histone H3 抗体 (Millipore, cat# 07-690)、ANTI-FLAG M2 抗体 (Sigma, cat# F1804)、anti-Myc タグ抗体クローン 4A6 (Millipore, cat# 05-724)、および anti-RNA polymerase II 抗体クローン CTD4H8 (Millipore, cat# 05-623) である。なお、抗 H3K9me2 抗体 (mAbProtein, m5.1.1) は H3K9 のモノメチル、ジメチル、トリメチルを認識することが後になって確認されている (浦野健博士、personal communication)。よって、文中の本実験で測定している値は H3K9me として記載する。RNAi 因子、CLRC 構成因子、および Pol2 の ChIP では、ユークロマチン領域の *fbp1*⁺ に対する濃縮で評価した。H3K9me の ChIP では、*fbp1*⁺ におけるバックグラウンドのシグナルが低すぎることを考慮し、全細胞抽出物における H3K9me の免疫沈降量 (input%) を計算し、同じく算出した H3 の input% でノーマライズした。図 3-1、図 3-2 では、H3K9me の免疫沈降量 input% は野生型細胞の値でノーマライズした。分析に使用したプライマーは、表 2 に記載している。ChIP-seq では、KAPA Hyper Prep Kit (KAPABIOSYSTEMS, cat#KK8504) を用いて製品のプロトコールに従って ChIP ライブラリを調製した。ライブラリは Illumina HiSeq 2500 システムでシーケンスした (シングルエンド、50 bp)。シーケンスされたリードは、bowtie (バージョン 1.2.1.1) を使用して、*ade6*⁺ が *ura4*⁺ 座位に挿入されているように一部修正された *S. pombe* ゲノムにマッピングを行った。データは SAMtools (バージョン 1.9) および IGVTools によって処理し、IGV で可視化するための tdf ファイルを作成した。

2-9: CAGE-seq

CAGE ライブラリの調製、シーケンシング、マッピング、および遺伝子発現解析は、株式会社ダナフォーム (神奈川県横浜市、日本) によって実施された。キャップ修飾された RNA の 5' 末端まで逆転写した一本鎖 cDNA を精製し、その後 CAGE バーコードタグを結合させた。シーケンスした CAGE タグは、リボソームまたは A/C/G/T 以外の塩基を含む RNA 由来のリードを排除した後、*S. pombe* ASM294v2 ゲノムに BWA ソフトウェア (0.7.15-r1140) を用いてマッピングをおこなった。*dgldh* 配列における転写開始点由来のリードの損失を避けるため、通常行うクラスタリングを行わずに CAGE タグデータを使用し、転写開始点と遺伝子発現プロファイルの可視化を行った。再現性を確認するため、Epe1 OP 細胞からの Total RNA に対して CAGE-seq は 2 回繰り返し、代表的なデータを論文中に示している。*dgldh* 配列中に含まれるコアプロモーターのコンセンサス配列解析のために、*dgldh* 配列の±両鎖 (具体的には染色体 I (3752407–3765008、37772666–3789949)、染色体 II (1602261–1618293、1630123–1643849)、染色体 III (1071176–

1092437、1106558–1139536)、および MTR (1–20128))中に含まれるユニークな CAGE TSSs (>0.05 CPM, count per million) に近接する±7 nt または±50 nt の配列を取得し、Weblogo3 [33]による解析を行った。解析の対照サンプルとして、同じ数の pseudo TSSs を *dg/dh* 配列中から無作為に抽出し、それらの pseudo TSSs に近接する±50 nt の配列を同じ方法で解析した。また同時に mRNA TSSs の解析も行うため、野生株のデータを用いて、ユークロマチン遺伝子の 5'-UTR (その上流 100 nt を含む) にマッピングされた CAGE TSSs (>0.05 CPM) をその発現レベル (CPM) に基づいて高、中、低の 3 つのグループに分類し、各グループについて、ユニークな TSSs に付随する±7 nt または±50 nt の配列を取得し、同じ方法で解析を行った。Inr (Y/R) 配列を-1/+1 に持ち、TSS の 25–32 nt 上流に A/T リッチ領域を持つ CAGE TSSs を抽出する解析のためにまず Biopython (<https://biopython.org/>) を使用して、Weblog 解析に使用された FASTA ファイルを用いて Position-Weight 行列ファイルを作成した。生成された行列ファイルは WebLogo の結果と一致していることを確認した。次にこの行列ファイルに基づき、FIMO (http://meme-suite.org/doc/fimo.html?man_type=web) を使用して Inr 配列と上流の A/T リッチ領域の両方を持つ CAGE TSSs を抽出し、ASM294v2 ゲノムにマッピングを行った。

2-10: small RNA (sRNA)-seq

15%のシーケンスゲルで siRNA を電気泳動した後、20–30 nt に対応するゲル断片部分を切り出し、抽出バッファー (0.3M NaCl) で破碎した。4°Cで一晩ローテートした後、エタ沈メイト (NIPPON GENE, cat# 318-01793) をキャリアーとして用いたエタノール沈殿法を用いて siRNA を回収した。siRNA ライブラリは、メーカーの指示に従って SMARTer smRNA-seq キット for Illumina (CLN cat#635029) を用いて構築した。最終的に siRNA ライブラリは AMPure XP (Beckman Coulter, cat# A63882) による精製を行った後、Illumina HiSeq 4000 システム (シングルエンド、51 bp) または HiSeqX システム (ペアエンド、151 bp) でシーケンスを行った。リード (ペアエンドの場合は Read 1) は、最初にライブラリ構築中に導入されたアダプタと A tailing の配列を取り除くため、cutadapt program [34] を使用してトリミングを行った。使用したパラメータは ; -m 15 -u 3 -a AAAAAAAAAA である。トリミングされたリードは、-M 1 --best parameters とした bowtie (version 1.2.1.1) を使用し、ネイティブの *ade6*⁺ ORF が削除され、*ura4*⁺ 遺伝子が *ade6*⁺x1 で置換された状態になっている修正した *S. pombe* ゲノムにマッピングを行った。IGV で可視化するための Bedgraph ファイルは、BEDTools プログラム (バージョン 2.26) の genomecov 機能によって生成され、総マッピング 100 万リード中の値 (cpm, count per million) として表示した。

cenH の truncation 解析 (図 3-12) では、-m 1 パラメータを用い、ユニークにマップされたリードのみを解析に使用した。IGV で可視化するための Bedgraph ファイルは、BEDTools プログラム (バージョン 2.26) の genomecov 機能によって生成し、その後、100 万個のトータルマッピングリード中の値に補正して表示した。siRNA リードをアノテーシ

ョンに基づいてカテゴリ分けするためには、BEDTools プログラムの coverage 機能を使用した (図 3-26A)。siRNA 長の解析 (図 3-26B,C) は、BEDTools プログラムの intersect 機能を使用し、*ade6⁺x1* 領域または *dg/dh* 領域にマップされたリードを抽出したものをを用いて行った。各リードの長さ情報は bed ファイルに基づいている。5'末端ヌクレオチドの解析 (図 3-26D,E) は、WebLogo プログラム[33]を使用することで行った。

2-11: 5'/3'RACE 解析

まず、指数増殖期の培養液から得られた 700×10^6 の細胞から、ホットフェノール法により total RNA を抽出した。この total RNA は、RNasin Plus (Promega, cat# N2611) の存在下でリコビナント DNase I (Takara, cat# 2270A) 処理され、その後 polyA Tract mRNA isolation system IV (Promega, cat# Z5310) を用い PolyA⁺ RNA の精製を行った。5'/3'RACE 解析は、SMARTer RACE 5'/3'キット (Clontech, cat# 634858) を用い、製品のプロトコールに従って行った。SMART テクノロジーは、逆転写酵素の末端転移酵素活性と呼ばれる性質を利用しており、キャップされたトランスクリプトの 5'末端を選択するため、テンプレートスイッチングと呼ばれる現象を利用している[35]。増幅およびクローニングステップで用いる製品付属の SeqAmpDNA ポリメラーゼと線状化された pRACE ベクターの代わりに、KOD Fx neo (TOYOBO, cat# KFX-201) および pUC18 から派生した自家製ベクターを使用した。*cenH* ncRNA の解析においては、PCR の特異性を高めるために、nested PCR を行なっている。5'-RACE の最初の PCR は、30 秒間の 94°C および 3 分間の 68°C で、45 サイクルの増幅を行った。続く 2nd PCR では、50 倍希釈した 1st PCR 産物の 5 μ L を使用して、30 秒間の 94°C および 3 分間の 68°C で、25 サイクルの増幅を行った。3'-RACE の 1st PCR は、5 サイクルの増幅が 94°C および 3 分間の 72°C で行われ、次に 5 サイクルの増幅が 94°C および 3 分間の 70°C、最後に 25 サイクルの増幅が 94°C および 3 分間の 68°C で行われるプログラムを用いた。2nd PCR は、50 倍希釈した 1st PCR 産物の 5 μ L を使用して、30 秒間の 94°C および 3 分間の 68°C で、25 サイクルの増幅を行った。Kint2::*ura4⁺* および *act1⁺* の RACE 解析では、*cenH* の 1st PCR と同じ方法で増幅を行った。最終的に得られた大腸菌のクローンから独立したサンプルをランダムに選択し塩基配列解析を行い、その RACE 産物のシーケンス結果を BLAST にかけることで、セントロメア近傍領域における *dg/dh* 配列ではなく *cenH* 配列に由来した RACE 産物であることを確認した。それぞれの変異体において、*cenH* ncRNA のセンス、アンチセンス転写産物について、5'RACE または 3'RACE 産物のクローンそれぞれ 30 個の塩基配列を解析した。この解析に使用されたプライマーは、表 2 の表に記載されている。実際の RACE 産物の配列データは [36] のサプリメントデータでダウンロードが可能である。

2-12: プラスミドベースのミニ染色体を用いた *cenH* 配列の truncation 解析

truncation された一連の *cenH* フラグメントを作成するため、まず最初に h90 株のゲノム DNA から 4.5 kb の *cenH* 配列を PCR で増幅した。希釈されたこの PCR 産物を、続く PCR のテンプレートとして使用し、truncation *cenH* フラグメントをそれぞれのプライマーを用いて作成した。各 PCR 産物には、プライマー由来の BamHI および NcoI サイトが含まれており、これを用いてプラスミドベースのミニ染色体である MC-L5 (Buscaino et al. 2013) の対応するサイトにクローニングを行った。これにより、本来 L5 フラグメントが挿入されていた領域が、一連の truncation *cenH* フラグメントに置き換えられたプラスミドベースのミニ染色体が作成された (pAP-275、pLCC-*cenH* 3.0 kb; pAP-315、pLCC-*cenH major*Δ *Rev TSS*; pAP-273、pLCC-*cenH major Rev TSS only*; pAP-269、pLCC-*cenH* 1.5 kb)。このミニ染色体を含む株は、その保持のためにアデニンとウラシルを欠く PMG 培地で培養した。pLCC-*cenH* truncation シリーズの作成に使用されたプライマーは、表 2 に記載している。

表 1 : 使用した菌株

* EH: *trans*-acting RNAi もしくは Repeat-induced RNAi もしくは self-propagation によって維持されている異所的ヘテロクロマチン(ectopic heterochromatin)

* hairpin-removed: *leu1-32* に存在する *leu1::ade6-hp II* が親株である *leu1-32* と掛け合わせることで取り除かれた細胞を示す。

Source	Name	Genotype
This study	HS-270	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, natMX6::3FLAG::ago1</i>
This study	HS-282	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, natMX6::3FLAG::ago1, epe1Δ::hphMX6</i>
This study	HS-309	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, natMX6::3FLAG::ago1, hphMX6::Purg1::epe1</i>
This study	HS-324	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, natMX6::3FLAG::ago1, hphMX6::Purg1::epe1, dcr1Δ::kanMX6</i>
This study	TS-873	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, rik1-13myc-hphMX6</i>
This study	KS-107	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, rik1-13myc-hphMX6, epe1Δ::natMX6</i>
This study	KS-708	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, rik1-13myc-hphMX6, kanMX6::Purg1::3FLAG-epe1</i>
This study	KS-840	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, rik1-13myc-hphMX6, kanMX6::Purg1::3FLAG-epe1 dcr1Δ::natMX6</i>
R.Allshire	FY2002	<i>h⁺, leu1-32, ade6-DN/N, ura4-DS/E, imr1L::ura4⁺, otr1R::ade6⁺</i>
This study	TS-179	<i>h⁺, leu1-32, ade6-DN/N, ura4-DS/E, imr1L::ura4⁺, otr1R::ade6⁺, hphMX6::Purg1::3FLAG-epe1</i>
This study	KS-960	<i>h⁺, leu1-32, ade6-DN/N, ura4-DS/E, imr1L::ura4⁺, otr1R::ade6⁺, hphMX6::Purg1::3FLAG-epe1, dcr1Δ::kanMX6</i>

Our lab stock	HS-95 (ISZ4)	<i>h⁺, ade6-DN/N, leu1-32, ura4-DS/E, imr1L(NcoI)::ura4⁺, otr1R(SphI)::ade6⁺, 3FLAG::epe1::kanMX6</i>
This study	HS-189	<i>h⁺, ade6-DN/N, leu1-32, ura4-DS/E, imr1L(NcoI)::ura4⁺, otr1R(SphI)::ade6⁺, hphMX6::Purg1::3FLAG::epe1::kanMX6</i>
Jun-ichi Nakayama	SPYB105	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺</i>
This study	KS-377	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, hphMX6::Purg1::3FLAG-epe1</i>
This study	JS-986	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x1</i>
This study	JS-988	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x8</i>
This study	JS-820	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x1, leu1⁺::ade6-hp I</i>
This study	JS-821	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x8, leu1⁺::ade6-hp I</i>
This study	JS-816	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x1, leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	JS-817	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x8, leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	BS-778	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x2, leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	BS-780	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x4, leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	BS-782	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x6, leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	BS-785	<i>h, leu1-32, ade6⁺, ura4Δ::ade6⁺x8, leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	BS-796	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6⁺x1], leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	BS-830	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6⁺x2], leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	BS-832	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6⁺x4], leu1⁺::ade6-hp II</i>

This study	BS-834	<i>h</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x6]</i> , <i>leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	BS-798	<i>h</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	JS-881	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i>
This study	JS-882	<i>h</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	KS-66	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i>
This study	BS-806	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i>
This study	BS-808	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>dcr1Δ::kanMX6</i>
This study	BS-809	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>epe1Δ::kanMX6</i> Red
This study	BS-810	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>epe1Δ::kanMX6</i> White
This study	BS-289	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i>
This study	BS-288	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>dcr1Δ::kanMX6</i>
This study	BS-268	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i>
This study	BS-271	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>ago1Δ::kanMX6</i>
This study	BS-148	<i>h</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>dcr1ΔkanMX6</i>
This study	BS-154	<i>h</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>ago1ΔkanMX6</i>
This study	BS-136	<i>h</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>epe1ΔkanMX6</i>
This study	BS-249	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i>
This study	BS-247	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>epe1Δ::kanMX6</i>
This study	BS-258	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i>

This study	BS-259	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>epe1Δ::kanMX6</i>
This study	BS-263	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i>
This study	BS-262	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>epe1Δ::kanMX6</i>
This study	BS-265	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i>
This study	BS-264	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>epe1Δ::kanMX6</i>
This study	CS-174	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>kanMX6::3FLAG::ago1</i>
This study	CS-228	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>kanMX6::3FLAG::ago1</i> , <i>epe1Δ::hphMX6 Red</i>
This study	CS-229	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>kanMX6::3FLAG::ago1</i> , <i>dcr1Δ::hphMX6</i>
This study	BS-800	<i>h</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x1]</i> , <i>leu1⁺::ade6-hp II</i> , <i>epe1Δ::hphMX6</i>
This study	BS-802	<i>h</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>leu1⁺::ade6-hp II</i> , <i>epe1Δ::hphMX6</i>
This study	BS-731	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x1]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>rdp1-13myc-kanMX6</i>
This study	BS-730	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x1]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>epe1Δ::hphMX6</i> , <i>rdp1-13myc-kanMX6</i>
This study	BS-602	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>rdp1-13myc-kanMX6</i>
This study	BS-598	<i>h?</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>EH[ura4Δ::ade6⁺x8]</i> , <i>hairpin-removed</i> , <i>epe1Δ::hphMX6</i> , <i>rdp1-13myc-kanMX6</i>
This study	BS-520	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6Δ::natMX6</i> , <i>rdp1-13myc-kanMX6</i>

Our lab stock	KKS-273	<i>h⁺, leu1-32, ade6-m210, ura4-DS/E, otr1R(SphI)::ura4⁺, natMX6-ago1⁺ promoter-3FLAG-ago1, chp1-13myc-kanMX6</i>
This study	TS-813	<i>h⁺, leu1-32, ade6-m210, ura4-DS/E, otr1R(SphI)::ura4⁺, natMX6-ago1⁺ promoter-3FLAG-ago1, chp1-13myc-kanMX6 epe1Δ::hphMX6</i>
This study	TS-817	<i>h⁺, leu1-32, ade6-m210, ura4-DS/E, otr1R(SphI)::ura4⁺, natMX6-ago1⁺ promoter-3FLAG-ago1, chp1-13myc-kanMX6 clr4Δ::hphMX6</i>
This study	TS-290	<i>h⁺, leu1-32, ade6-DN/N, ura4-DS/E, imr1L::ura4⁺, otr1R::ade6⁺, rdp1-13myc-kanMX6</i>
This study	TS-909	<i>h⁺, leu1-32, ade6-DN/N, ura4-DS/E, imr1L::ura4⁺, otr1R::ade6⁺, rdp1-13myc-kanMX6, epe1Δ::hphMX6 Red clone</i>
This study	TS-865	<i>h⁺, leu1-32, ade6-DN/N, ura4-DS/E, imr1L::ura4⁺, otr1R::ade6⁺, rdp1-13myc-kanMX6, clr4Δ::hphMX6</i>
This study	TS-790	<i>h[?], leu1-32, ade6-DN/N, ura4-DS/E, imr1L::ura4⁺, otr1R::ade6⁺, 5FLAG-clr4, his[?]</i>
This study	TS-915	<i>h[?], leu1-32, ade6-DN/N, ura4-DS/E, imr1L::ura4⁺, otr1R::ade6⁺, 5FLAG-clr4, his[?], epe1Δ::hphMX6 Red clone</i>
This study	KS-72	<i>h[?], leu1-32, ade6-DN/N, ura4-DS/E, imr1L::ura4⁺, otr1R::ade6⁺, 5FLAG-clr4, his[?], dcr1Δ::kanMX6</i>
This study	HS-109	<i>h⁺, ade6-DN/N, leu1-32, ura4-DS/E, imr1L(NcoI)::ura4⁺, otr1R(SphI)::ade6⁺, pREP1::empty</i>
This study	HS-117	<i>h⁺, ade6-DN/N, leu1-32, ura4-DS/E, imr1L(NcoI)::ura4⁺, otr1R(SphI)::ade6⁺, pREP41::epe1::3FLAG</i>
This study	TS-893	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, epe1Δ::hphMX6</i>
This study	SS-908	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, dcr1Δ::hphMX6</i>

This study	KS-397	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, epe1Δ::hphMX6, dcr1Δ::kanMX6</i>
This study	SS-872	<i>h⁹⁰, ade6-M210, his2, leu1-32, ura4DS/E, Kint2::ura4⁺, clr4Δ::hphMX6</i>
Our lab stock	SP6	<i>h, leu1-32</i>
This study	KS-953	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6</i>
This study	OS-701	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x1</i>
This study	OS-707	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x2</i>
This study	BS-405	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x4</i>
This study	BS-431	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x6</i>
This study	JS-46	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x8</i>
This study	BS-236	<i>h?, leu1-32, ade6⁺, ura4Δ::ade6⁺x8</i>
This study	KS-66	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6</i>
This study	OS-778	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp I</i>
This study	OS-916	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp I, dcr1Δ::kanMX6</i>
This study	OS-856	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp I, epe1Δ::kanMX6</i>
This study	OS-860	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp I, rdp1Δ::kanMX6</i>
This study	OS-991	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp I, clr4Δ::kanMX6</i>
This study	OS-900	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp I, hphMX6::Purg1::3FLAG-epe1</i>
This study	OS-783	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	OS-889	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp II, dcr1Δ::kanMX6</i>
This study	OS-893	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp II, epe1Δ::kanMX6</i>
This study	OS-908	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp II, rdp1Δ::kanMX6</i>

This study	OS-987	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp II, clr4Δ::kanMX6</i>
This study	OS-968	<i>h⁺, leu1-32, ade6Δ::natMX6, leu1⁺::ade6-hp II, hphMX6::Purg1::3FLAG-epe1</i>
This study	JS-847	<i>h[?], leu1-32, ade6⁺, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6+x8], leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	JS-848	<i>h[?], leu1-32, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6+x8], leu1⁺::ade6-hp II</i>
This study	CS-39	<i>h[?], leu1-32, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6+x1], hairpin-removed</i>
This study	BS-865	<i>h[?], leu1-32, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6+x2], hairpin-removed</i>
This study	BS-879	<i>h[?], leu1-32, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6+x4], hairpin-removed</i>
This study	BS-952	<i>h[?], leu1-32, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6+x6], hairpin-removed</i>
This study	JS-888	<i>h[?], leu1-32, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6+x8], hairpin-removed</i>
This study	BS-466	<i>h⁻, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x1, leu1⁺::ade6-hp II, epe1Δ::hphMX6</i>
This study	BS-467	<i>h⁻, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6⁺x8, leu1⁺::ade6-hp II, epe1Δ::hphMX6</i>
This study	BS-674	<i>h⁻, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6+x1, leu1⁺::ade6-hp II, dcr1Δ::hphMX6</i>
This study	BS-677	<i>h⁻, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6+x1, leu1⁺::ade6-hp II, hphMX6::Purg1::3FLAG-epe1</i>
This study	BS-675	<i>h⁻, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6+x8, leu1⁺::ade6-hp II, dcr1Δ::hphMX6</i>
This study	BS-678	<i>h⁻, leu1-32, ade6Δ::natMX6, ura4Δ::ade6+x8, leu1⁺::ade6-hp II, hphMX6::Purg1::3FLAG-epe1</i>
This study	BS-358	<i>h[?], leu1-32, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6⁺x8], hairpin-removed</i>
This study	BS-357	<i>h[?], leu1-32, ade6Δ::natMX6, EH[ura4Δ::ade6⁺x8], hairpin-removed, kanMX6::Purg1::3FLAG-epe1</i>

This study	BS-145	<i>h, leu1-32, ade6Δ::natMX6, kanMX6::Purg1::3FLAG-epe1</i>
This study	RS-350	<i>h, leu1-32, ura4-D18, ade6-704</i>
This study	RS-421	<i>h, leu1-32, ura4-D18, ade6-704, pLCC-cenH 3.0kb</i>
This study	RS-549	<i>h, leu1-32, ura4-D18, ade6-704, pLCC-cenH 3.0kb, dcr1Δ::natMX6</i>
This study	OS-115	<i>h, leu1-32, ura4-D18, ade6-704, pLCC-cenH 3.0kb Δmaojr Rev TSS</i>
This study	RS-382	<i>h, leu1-32, ura4-D18, ade6-704, pLCC-cenH maojr Rev TSS only</i>
This study	RS-378	<i>h, leu1-32, ura4-D18, ade6-704, pLCC-cenH 1.5kb</i>

表 2 : 使用したプライマー

Name	ID	Sequence
dh Fw	AO-440	GATGCCCATGTTTCATTCCAC
dh Rv	AO-441	TCAGCAGTCCTTGGGAAATG
fbp1 Fw	AO-255	GTCGAACGGATGCTGCAAAC
fbp1 Rv	AG-385	CGCAAGTGACGGCATAGGAAC
cen-dh Fw	AG-380	TTCTCAACCTTCCGACGC
cen-dh Rv	AG-381	CTGTCATCCAAGTGGAAATG
cen-dg Fw	AG-382	CACCACTTCCACTTACCACTTCC
cen-dg Rv	AG-383	ACAGGATCATCGAGAAGAGTAG
snoRNA58	AG-384	GATGAAATTCAGAAGTCTAGCATC
act1 Fw	AO-436	TGCCGATCGTATGCAAAAAGG
act1 Rv	AO-437	CCGCTCTCATCATACTCTTG
ade6 (compatible with hairpin) Fw	AG-945	GCTTCAAGAGGGTTGCGTGTG
ade6 (compatible with hairpin) Rv	AG-946	GGAACGCCGATTACTGGAAGAG
ade6 ORF	AG-327	ATGAGCGAAAAACAGGTTGTAGG
ade6 ORF	AG-328	CTATGCAGAATAATTTTTCCAACCAAC
ura4	AO-261	GAATGGTTTGAGAAGCATACC
ura4	AO-262	GAGTACGATATTGCTGTCCC
epe1	PR42	ATGTCAGCGGAAAACGTA
epe1	PR43	GTCATTTGAAGATGTTAGCCAGG
cenH specific primer	AG-397	GCTAAGATCGATTGGTGACG
cenH specific primer	AG-398	AAGTTCAGTCTTATACACTGG

cenH 5'RACE 1st Rv (3'RACE nested Fw)	AG-399	GATTACGCCAAGCTTGCTAAGATCGATTGGTGACGACGATATTATC
cenH 5'RACE 1st Fw (3'RACE nested Rv)	AG-401	GATTACGCCAAGCTTGATAATATCGTCGTCACCAATCGATCTTAGC
cenH 5'RACE nested Rv	AG-404	GATTACGCCAAGCTTCTTTGGTTTTTATCGTCGATGTCTAAGAAGGATC
cenH 5'RACE nested Fw	AG-405	GATTACGCCAAGCTTCTCAAGTCCAATCGCACCATGTCCAATG
cenH 3'RACE 1st primer Fw	AG-416	GATTACGCCAAGCTTGATACAGATGTGGAAAACCAATTATCCATTTTCG
cenH 3'RACE 1st primer Rv	AG-417	GATTACGCCAAGCTTGATCCTTCTTAGACATCGACGATAAAAACCAAAG
Kint2::ura4 3'RACE sense	AG-458	GATTACGCCAAGCTTGAGACGGGCTGGGACAGCAATATCG
Kint2::ura4 5'RACE sense	AG-459	GATTACGCCAAGCTTCGATATTGCTGTCCCAGCCCGTCTC
RACE seq M13 (- 150bp)	AG-406	CATTCAGGCTGCGCAACTGTTG
for construction of pRACE based on pUC18	AG-414	GCCCTATAGTGAGTCGTATTAGGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAAC
for construction of pRACE based on pUC18	AG-415	AAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTG
act1 3'RACE	AG-402	GATTACGCCAAGCTTGCTCTTCCTCATGCTATCATGCGTCTTG
act1 5'RACE	AG-403	GATTACGCCAAGCTTCAAGACGCATGATAGCATGAGGAAGAGC
ade6 Southern blot	AO-260	GAGCACGCTGTTGAATTGAG

ade6 sense	AO-259	GTAGTACGCAGTTTAGACGG
ade6 ChIP-PCR Fw (Spel site)	AG-952	CCGAATAATGTGCTGCGACG
ade6 ChIP-PCR Rv (Spel site)	AG-953	GATCGTTTTGGTCCTACAGCTATATGC
iPCR to remove neo	AG-714	CTGACACACATTCCACAGGACATTG
	AG-715	CAATTCTTGAAGACGAAAGGGCTTC
iPCR to remove unnesessary sequence	AG-720	ACTAGTCAATAATCAATGTCCTGTGG
	AG-721	GCGTTACATAACTTACGGTAAATGG
ade6 fragment	AG-749	TTGATTATTGACTAGTCTGCATGAAATACTTCAGAAGCCTC
	AG-756	CAATGATGATGCTAGCATCGTTTTGGTCCTACAGCTATATGC
iPCR : ade6 spel site destruction	AG-751	CTAGTCTTAATATTGCATTTTTTG
	AG-752	CTATTAACCGATAATTAGTCTTC
gRNA ura4	AG-807	CACCGCAAAGCAACTTGTCAGTCG
	AG-808	AAACCGACTGACAAGTTGCTTTGC
colony PCR	AG-734	CTCATGAAGAATTGGTTATCCGTG
	AG-735	CAATTCTTGAAGACGAAAGGGCTTC
rad9 intron for hp I	AG-759	CTTCTCAGTTTGAAGCTCACCAGGTGTGTTGGAACTTTTTC
	AG-760	CTTCTCAGTTTGAAGCTCACTATCTTTACCAATTAGTTTTCAATG
ade6 hairpin I Fw	AG-757	AGTCGCTTTGTAAATCATATGGACCATTCAAAGGATAATGTTTGTC
	AG-758	GTGAGCTTCAAAGTGAAGTTGG

ade6 hairpin I Rv	AG-758	GTGAGCTTCAAACCTGAGAAGTTGG
	AG-761	GGGAGACATTCTTTTACCCGGGGACCATTCAAAGGATAATGTTTGTC
rad9 intron for hp II	AG-764	TAGGTATCAGATGCTTCTTGCAGGTGTGTTGGAACCTTTTTTC
	AG-765	TAGGTATCAGATGCTTCTTGTATCTTTACCAATTAGTTTCAATG
ade6 hairpin II Fw	AG-762	AGTCGCTTTGTAAATCATATGGTGTGAAAAAGCAGGCCAAG
	AG-763	CAAGAAGCATCTGATACCTACGTTT
ade6 hairpin II Rv	AG-763	CAAGAAGCATCTGATACCTACGTTT
	AG-766	GGGAGACATTCTTTTACCCGGGGTGTGAAAAAGCAGGCCAAG
leu1 fragment for pAP-509	AG-783	GGAAGCGGCCGCGCAATATTATCGATATCCAATCTGTAG
	AG-784	CCTTACTAGTGTAAGCGAGTATCGATTAAGTATGTGAG
colony PCR leu1 integrate	AO-348	TTGTAAAACGACGGCCAGTG
	AG-796	GTCTTTAAGGTCTGACGGCTCTCAAC
cenH fragment amplification	AG-540	GGAAGGATCCGACAACCCAATCGTAAGCTATTTG
	AG-541	CCTTCCATGGGTACTCTTCCGAGGTTTTGCTTATAC
cenH 3.0kb for pAP-275	AG-544	GGAAGGATCCCTACGTGTCTGATTCACGCAAAGG
	AG-545	CCTTCCATGGCTGAATGCTGAGAGGAAAGCTTC
cenH Δ major Rev TSS for pAP-315	AG-544	GGAAGGATCCCTACGTGTCTGATTCACGCAAAGG

	AG-611	CCTCCATGGCAATAAATGAGTCCTACTCCTACACC
cenH major Rev TSS only for pAP-273	AG-548	GGAAGGATCCCTGTTTGCCAAGATTCAGGACTTG
	AG-549	CCTCCATGGGAATGCTGAGAGGAAAGCTTCCAC
cenH 1.5kb for pAP-269	AG-542	GGAACATATGGGATCCCTGTTATCCAAGTGGGAATGAACATG
	AG-543	CCTTGCGGCCGCCCATGGCGTGAATGCCAGCCTGTAAATC

第三章

結果

3-1 : H3K9me 除去因子 Epe1 は RNAi 経路を活性化する

RNAi 経路が特定の領域で活性化している場合、CLRC や RDRC といった RNAi 経路の構成因子が、標的 RNA を認識した RITS 複合体によってクロマチン上にリクルートされる。そのため、RNAi 経路が該当領域で機能しているかどうかは、これら RNAi マシーナリーがその領域に局在するかどうかで判断することができる。そこでまず私は、Epe1 と RNAi 経路との関係性を明らかにするため、*epe1*⁺ の欠損株(*epe1*Δ) や Epe1 の過剰発現 (Epe1 OP) 株における RNAi マシーナリーの *dg/dh* 配列への局在を解析した。その結果、野生型細胞(*wt*) と比べ、*epe1*Δ では *dg/dh* 配列における RNAi マシーナリーの局在が大きく減少することが判明した (図 3-1A-C)。また、この時以前に報告されている結果と一致して、siRNA が減少していることが確認された(図 3-1D)。

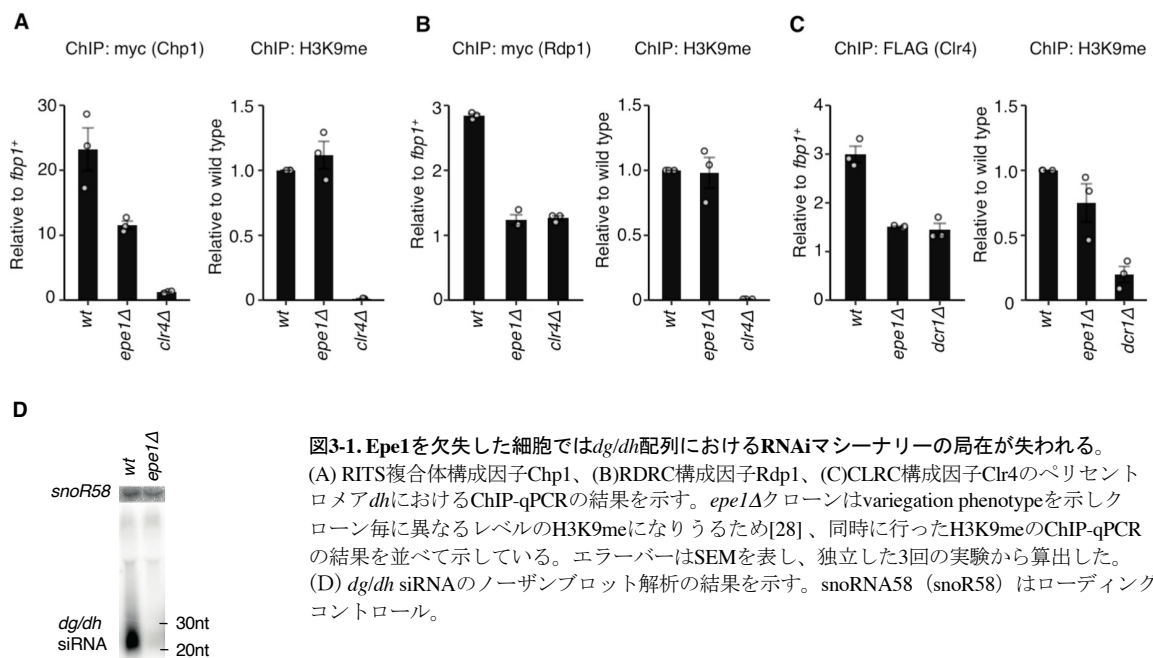


図3-1. Epe1を欠失した細胞では*dg/dh*配列におけるRNAiマシーナリーの局在が失われる。(A) RITS複合体構成因子Chp1、(B)RDRC構成因子Rdp1、(C)CLRC構成因子Clr4のペリセントロメア*dh*におけるChIP-qPCRの結果を示す。*epe1*Δクローンはvariegation phenotypeを示しクローン毎に異なるレベルのH3K9meになりうるため[28]、同時に行ったH3K9meのChIP-qPCRの結果を並べて示している。エラーバーはSEMを表し、独立した3回の実験から算出した。(D) *dg/dh* siRNAのノーザンブロット解析の結果を示す。*snoRNA58* (*snoR58*) はローディングコントロール。

次に今度は逆に Epe1 過剰発現 (Epe1 OP) 株における影響を調べたところ、RNAi マシーナリーの *dg/dh* 配列における局在量が顕著に増加し (図 3-2A)、またこの結果と一致して、siRNA の産生量が増加していることが確認された (図 3-3)。またこれらの結果はセントロメア近傍領域のヘテロクロマチンに限定されたものではなく、性決定領域のような他のヘテロクロマチン領域についても同様の結果が得られることが確認された (図 3-2C)。

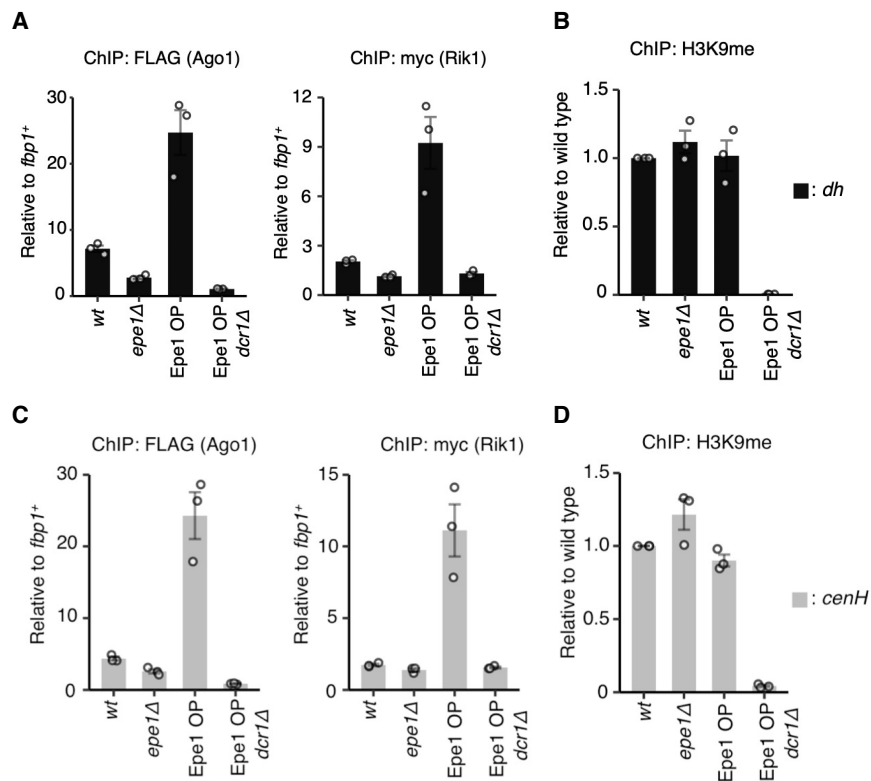


図3-2. Epe1 の過剰発現はRNAiマシーナリーのヘテロクロマチン局在を促進する。

(A)Ago1、CLRC構成因子Rik1、及び(B)H3K9meのペリセントロメア*dh*におけるChIP-qPCRの結果を示す。Epe1の過剰発現 (Epe1 OP) 株では、その*epe1*⁺の内在性プロモーターが*Purg1*プロモーターに置換されている[29]。(C) 性決定領域の*dg/dh*配列 (*cenH*) におけるAgo1、CLRC構成因子Rik1、および(D)H3K9meのChIP-qPCRの結果を示す。エラーバーはSEMを表し、独立した3回の実験から算出した。

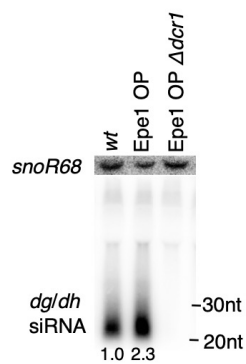


図3-3. Epe1 の過剰発現はRNAi経路を高活性化状態にする。

dg/dh siRNAのノーザンプロット解析の結果を示す。snoRNA58 (snoR58) はローディングコントロール。3回の独立した実験から計算したwtを1.0とした時の平均シグナル強度を下に示す。

またこの時、以前の研究で Epe1 が *dg/dh* ncRNA の転写を促進することが示唆されていたことに一致して[25, 37]、Epe1 OP によって *dg/dh* ncRNA の発現量や、ヘテロクロマチン領域における Pol2 の局在量が有意に増加することが確認された (図 3-4)。これらの結果から、Epe1 は *dg/dh* ncRNA の発現を促進することで、ヘテロクロマチン領域における RNAi マシーナリーの局在を促進する役割を持っていることが明らかになった。以前の研究によって、*epe1Δ*において siRNA が減少することは既に確認されていたが、これは RNAi 経路への直接的な影響によるものではないという解釈が為されており、これまで Epe1 と RNAi 経路の関係は明確にされていないままであった[28]。これに対し、今回の Epe1 OP によって RNAi 経路が高活性化状態になるという結果は、Epe1 が RNAi 経路に関与しているということを明確に示すものであった。注目すべきことに、H3K9me 除去因子 Epe1 を過剰発現している細胞では、ncRNA が高発現状態になるにもかかわらず、そのヘテロクロマチン上の H3K9me 量は野生型と変わらないレベルに維持されていた(図 3-2B, D)。しかしこの時、Epe1 OP に加えて RNAi 経路に必須の Dcr1 を更に破壊すると、H3K9me 修飾は完全に失われることが確認された(図 3-2B, D)。この結果は、Epe1 が RNAi 経路を促進する機能を持っているという結論を裏付けるもので、Epe1 OP 株で維持されていた H3K9me 修飾は、Epe1 OP によって高活性化状態にある RNAi 経路が H3K9me 修飾を補充しているためであることを示唆している。

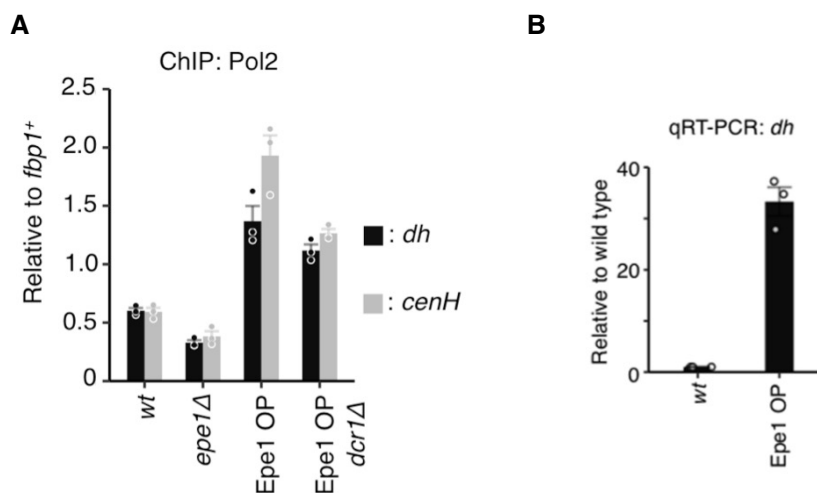


図3-4. Epe1は*dg/dh* ncRNAの発現を促進する。

(A) *dh*または*cenH*配列におけるPol2のChIP-qPCRの結果を示す。エラーバーはSEMを表し、独立した3回の実験から算出した。(B) 野生型細胞に対するEpe1 OP株における*dh*転写産物の相対量をqRT-PCRで算出したものを示す。

3-2 : Epe1 は、*dg/dh* 配列全体に偏在する転写開始点から ncRNA の転写を誘導する

野生型細胞において、*dg/dh* ncRNA の発現量は極めて低く抑えられている。この抑制はヘテロクロマチン形成による転写抑制と Dcr1 による ncRNA の分解に起因しているが、これにより、ヘテロクロマチンから転写される *dg/dh* ncRNA がどのような特徴を持つのか、その解析を行うことが非常に難しいという問題点があった。そこで次に私は、Epe1 OP によって *dg/dh* ncRNA の発現量が 30 倍以上増加することに着目し (図 3-4B)、この状況を利用して ncRNA の解析を行うことを試みた。CAGE-seq(Cap analysis of Gene expression-seq)は、Pol2 によって転写された転写産物の特徴である 5'キャップ構造を利用して、その転写産物の転写開始点(Transcription Start Site, TSS) を転写の強さに応じてゲノムワイドにプロファイリングすることができる解析手法である。上述したように、通常、野生型細胞では *dg/dh* ncRNA の発現量は極めて低く抑制されているため、CAGE-seq を用いて解析を行っても *dg/dh* ncRNA の TSS を検出することは殆ど不可能であった。一方で、Epe1 OP 細胞を用いて CAGE-seq を行ったところ、*dg/dh* 配列中の全体に万遍なく低いシグナルが検出されることが判明した (図 3-5A, 図 3-6)。これら低いシグナルを持つ TSS のコンセンサス配列解析を行ったところ、Y/R (Y = ピリミジン、R = プリン) ジヌクレオチドが -1/+1 位置に濃縮されること (図 3-5B) が判明した。また TSS に隣接する更に広い範囲のコンセンサス配列解析を行なったところ、TSS 上流の -25~32nt に A/T リッチ領域が存在することが明らかになった (図 3-7)。これらのモチーフは、mRNA 遺伝子の TSS のコンセンサス配列解析を行った際にも見られる Initiator (Inr) 配列と TATA ボックスに対応していると考えられる (図 3-5B, 図 3-7) [38]。これらの結果から、*dg/dh* 配列は多くの TSS から構成される特異な転写ユニットであることが明らかになり、その TSS は通常の mRNA と同様のコアプロモーター構造を持つ傾向があることが明らかになった (図 3-8)。

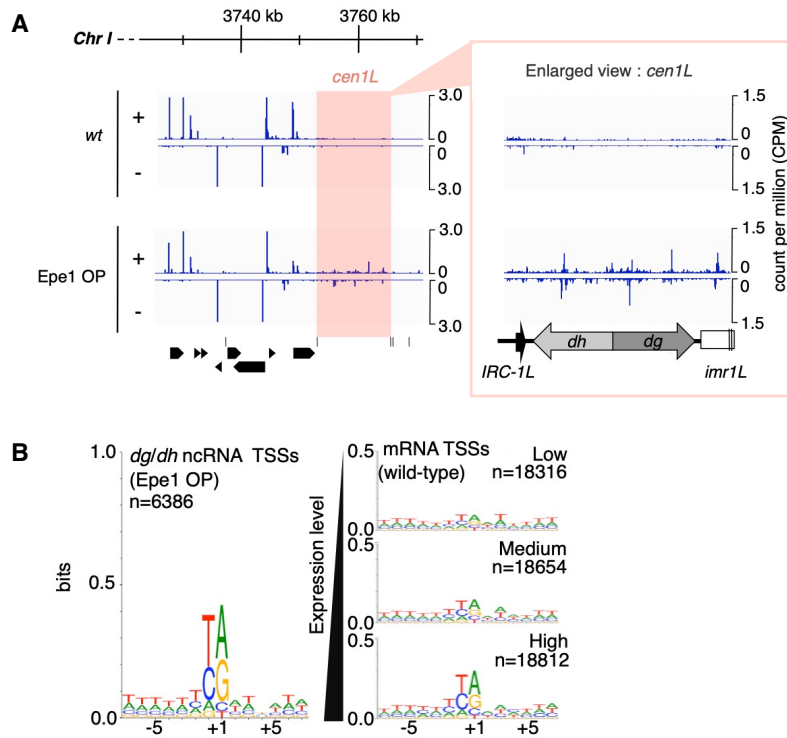


図3-5. Epe1は、*dg/dh*配列全体に偏在する転写開始点からncRNAの転写を誘導する。

(A) *wt*またはEpe1 OP株のCAGE-seqの結果。I番染色体の*cen1L* (左側のペリセントロメア) 近傍領域及びその*dg/dh*配列部分の拡大図を示す。シグナルの高さはそのTSSから起きる転写の強さを反映している。+はセンス鎖、-はアンチセンス鎖を示す。

(B) Epe1 OP株において検出された*dg/dh*配列に存在する0.05 CPM(count per million) 以上のTSSのコンセンサス配列解析。*wt*におけるmRNAのTSSを転写の強さに基づき3つにグループ分けした際のコンセンサス配列解析の結果を並べて示す。それぞれの解析に用いたユニークなTSSの数を "n" で示している。

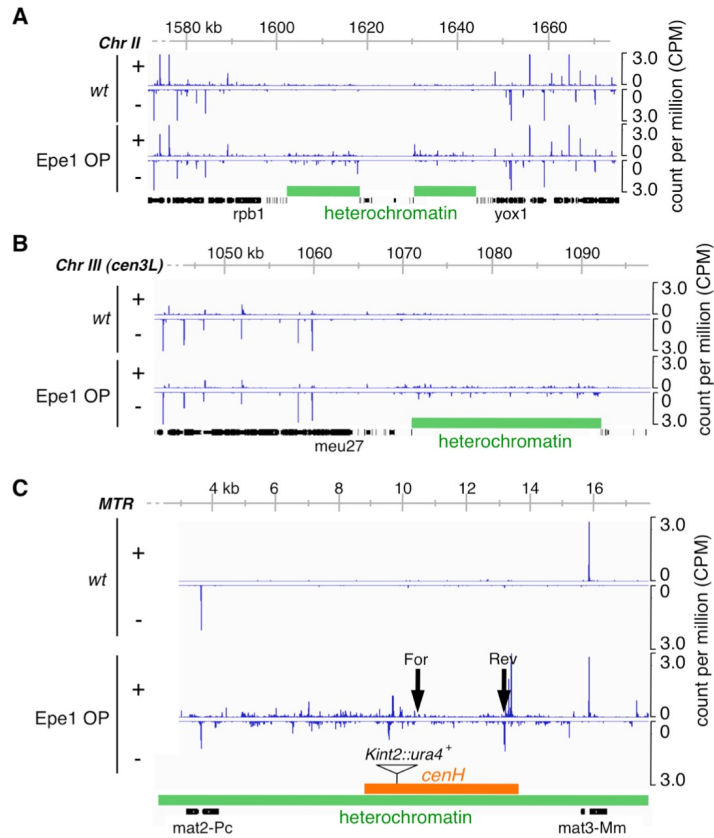


図3-6. Epe1 OPは、ヘテロクロマチン領域全体に広く遍在するTSSからのncRNA転写を促進する。
 (A)(B)(C)は、(A)II番染色体セントロメア、(B)III番染色体セントロメア、(C)性決定領域におけるwtとEpe1 OPのCAGE-seqの結果を示す。緑色の横棒はヘテロクロマチン領域を示す。オレンジ色の横棒は、図3-9で解析した*cenH*領域を示す。矢印は5'RACE解析によって同定されたForward鎖 (For) およびReverse鎖 (Rev) のmajor TSSの位置を示す (図3-9を参照)。

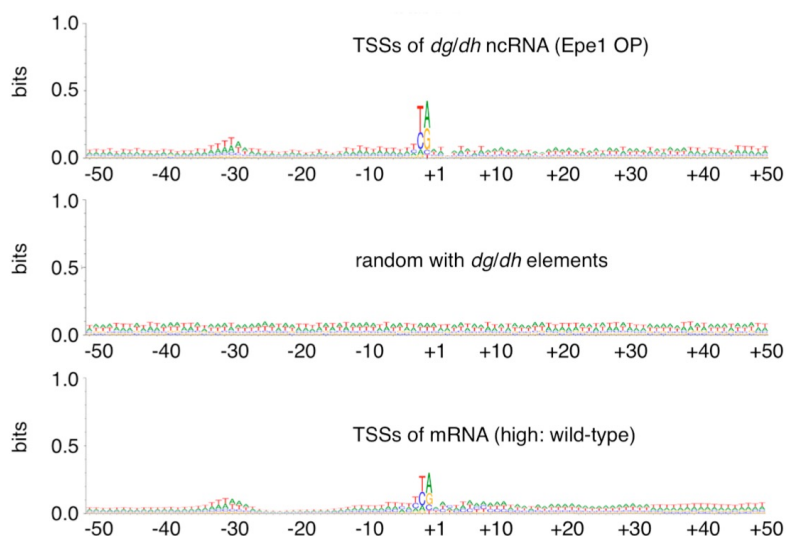


図3-7. *dg/dh*配列に存在するTSS±50 ntのコンセンサス配列解析。

*dg/dh*配列に存在するwidespread TSSのコンセンサス配列解析の結果を示す。Epe1 OPで0.05 CPM以上を示した*dg/dh*配列内のTSSに隣接する±50 ntの塩基配列をWebLogo [33] を用いて解析した。また、コントロールとして*dg/dh*配列からランダムに選んだpseudo TSS±50 ntの配列も解析した。野生型細胞のmRNA遺伝子のTSSは、発現強度によって3つのグループに分類され、そのうちの高発現に分類されたmRNAのユニークなTSSに隣接する±50 ntの配列の解析結果を示す。横軸はTSSに対する相対位置(+1)を示す。*dg/dh*配列とユークロマチン領域のmRNA遺伝子のTSSは共通して、-1/+1位におけるInr (Y/R) 配列と25-32 nt上流にA/Tリッチ領域を持つ傾向にあることがわかる。

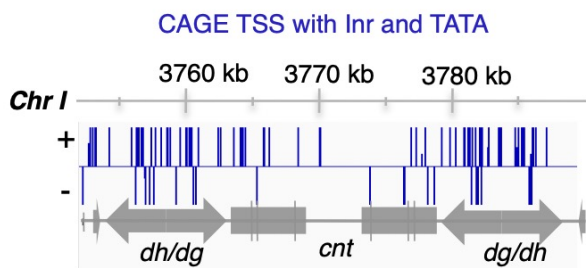


図3-8. *dg/dh*配列には、mRNAと同じコアプロモーター構造を持つ傾向があるTSS が遍在している。

Inr配列とTATA box様のA/Tリッチ領域の両方を持つCAGEリードを抽出し、I番染色体ペリセントロメア領域にマッピングした結果を示す。

3-3 : *dg/dh* 配列は2つのタイプの転写開始点から構成されている

次に私は *dg/dh* 配列の更に詳細な解析を行うため、PCR を用いて特定の転写産物の転写開始点と転写終結点を同定することができる 5'/3' RACE 法を用いて *dg/dh* ncRNA の解析を行った。この実験では、性決定領域の *dg/dh* 配列(*cenH* と呼ばれる) を、*dg/dh* 配列のモデルとして選択して解析を行った。*cenH* 配列は、ペリセントロメア領域に存在する *dg/dh* 配列と高い相同性を持っている一方で、他の *dg/dh* 配列と区別することを可能にする挿入配列を含んでいる (図 3-9) [39]。 *dg/dh* 配列は各染色体セントロメアに再編成されながら冗長に存在しており (図 1-3A)、これも *dg/dh* ncRNA 解析を難しくする一因になっているが、これにより特定の *dg/dh* 配列に限定してその転写産物を解析することが可能になる。加えて、この性決定領域のヘテロクロマチン形成は、RNAi 経路を介した Clr4 のリクルートメント以外にも、DNA 結合タンパク質である Atf1/Pcr1 を介して Clr4 をリクルートメントする経路を持つという特徴がある[40]。この特徴により、RNAi 経路が欠損している変異体においても、ヘテロクロマチン形成が維持された状態を保ったまま、その領域で転写されている ncRNA を解析することが可能となる。Epe1 は H3K9me 結合因子 HP1 ホモログ Swi6 を介してヘテロクロマチン領域に局在するため、Epe1 がその領域の ncRNA 転写にどのような影響を与えるかは、ヘテロクロマチンを維持したまま解析する必要がある。従って、上記のような特徴を持つ *cenH* は、ncRNA 転写へに Epe1 が与える影響を解析するのに非常に適していると考えられた。

まずヘテロクロマチンが存在しない状態では (図 3-9A、*clr4Δ*)、*cenH* 配列のセンス鎖アンチセンス鎖それぞれにおいて主要な転写開始点(major TSS)が検出され、またその major TSS に挟まれた領域のセンス鎖アンチセンス鎖には minor な転写開始点(widespread TSS)が偏在していることが確認された。この結果は、以前の報告で、*clr4Δ*株を用いてセントロメア近傍領域の *dg/dh* 配列で 5'RACE 解析を行った際にも、そのセンス鎖アンチセンス鎖の両鎖で複数の TSS が検出されたことと一致している[41]。次に、ヘテロクロマチン存在下での転写パターンを調べるため、まず野生型細胞で同様の解析を試みた。しかし、やはりその発現量の低さに起因して *cenH* ncRNA の 5'RACE 産物をクローニングすることが殆どできなかった。そこで次に RNAi 経路が欠損している *dcr1Δ*株を用いて、ヘテロクロマチンが存在下での転写パターンを解析した。*dcr1Δ*株では、ncRNA の発現は Dcr1 による分解を受けないため、ncRNA の検出量が増え 5'RACE 解析することが可能になった (図 3-9B, RT-PCR)。注目すべきことに、ヘテロクロマチン存在下では widespread TSS がヘテロクロマチン非存在下より相対的に活性化されており、これを反映して 5'RACE 産物を電気泳動するとスメア状になることが確認された (図 3-9B、*dcr1Δ*)。また、この widespread TSS の活性化は Epe1 に依存しており、*dcr1Δ*細胞において更に *epe1+* 遺伝子を破壊すると、その活性化が顕著に抑制されることが明らかになった (図 3-9A,B、*dcr1Δepe1Δ*)。この結果と一致して、*epe1+*の単独破壊株においても、major TSS の

みが検出されるという結果が得られた (図 3-9A、*epe1Δ*)。 *epe1* を欠損した状態においても major TSS が活性化されていることは、以前の研究による *epe1Δ*細胞でも ncRNA 転写が検出されるという報告と一致していた (図 3-9B, RT-PCR) [25]。一方、CAGE-seq の結果と一致して、Epe1 OP は widespread TSS の高い活性化を引き起こし、電気泳動でスメア状の 5'RACE 産物が検出された (図 3-9A, B、Epe1 OP)。これらの結果は、*dg/dh* 配列が、「ヘテロクロマチンによるサイレンシングに耐性である major TSS」と、「ヘテロクロマチンによるサイレンシングに感受性の widespread TSS」という 2 種類の TSS から構成されていることを示していた。*epe1Δ*細胞でも ncRNA 転写が確認されるという以前の報告は [25]、Epe1 が ncRNA 転写においてどのような機能を果たしているかを考える際に一つの疑問点となっていたが、これにより Epe1 は後者の TSS を活性化する役割を持っていることが明らかになった。

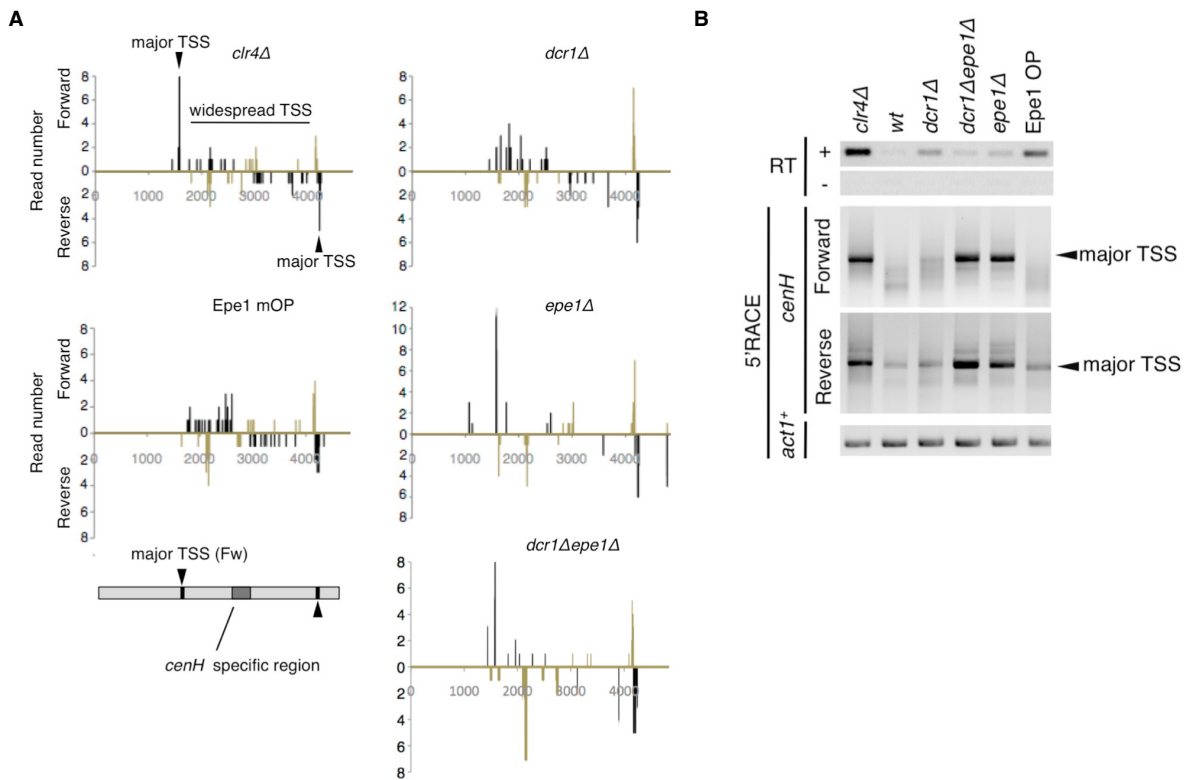


図3-9. *dg/dh* 配列は異なる 2 つのタイプの転写開始点から構成されている。

性決定領域における *dg/dh* 配列である *cenH* 領域の 5'/3'RACE 解析の結果。(A) 各変異体を用いて、5'/3'RACE で同定された Forward および Reverse 鎖由来の *cenH* ncRNA の TSS/TTS を *cenH* 上にマップした (それぞれ 30 個ずつ同定)。尚、野生型細胞では RACE 産物のクローニングが不十分であったため、TSS を同定できなかった。下段の模式図に示しているように *cenH* には他の *dg/dh* 配列にはない特異的な挿入があり、これにより *cenH* ncRNA をペリセントロメア由来の *dg/dh* ncRNA と区別することができる [39]。(B) Forward および Reverse 鎖由来の *cenH* ncRNA、*act1+* mRNA の 5'RACE 産物を電気泳動後、EtBr 染色した際の結果を示す。上段には oligodT プライマーを用いた際の *cenH* ncRNA の RT-PCR の結果を示す。

次に私は 3'RACE を用いてこれらの変異体における *cenH* ncRNA の転写終結点 (Transcription Termination Site, TTS) の同定を試みた。その結果、*cenH* 領域には複数の TTS が存在することが検出された (図 3-9)。この結果は転写産物の 3'末端をゲノムワイドに解析できる PolyA-seq を用いた以前の報告で、*dg/dh* 配列中に複数の転写終結点が発見された結果と一致している[42]。しかし、TSS に対するその効果と比較して、Epe1 の有無は TTS の分布には顕著な影響を与えなかった (図 3-9)。そのため、Epe1 が RNAi 経路で果たしている役割は、ヘテロクロマチン存在下で widespread TSS からの ncRNA 転写を促進することにあると予想された。

3-4 : Epe1 はヘテロクロマチン下の DNA 配列に従って転写を活性化する

次に私は Epe1 によって誘導されるヘテロクロマチン領域における転写の性質を調べるため、*cenH* 領域に挿入された *ura4⁺* mRNA 遺伝子(*Kint2::ura4⁺*) [40]の 5'/3'RACE 解析を行った。以前の研究により、Epe1 OP によってヘテロクロマチン内に挿入された mRNA 遺伝子が脱抑制することが報告されており[25, 26, 28]、このことと一致して、Epe1 OP によって *Kint2::ura4⁺* の発現が脱抑制されることが確認された (図 3-10A, B)。またこの転写は、*ura4⁺* には H3K9me が存在している状態で誘導されていることが確認された (図 3-10C)。

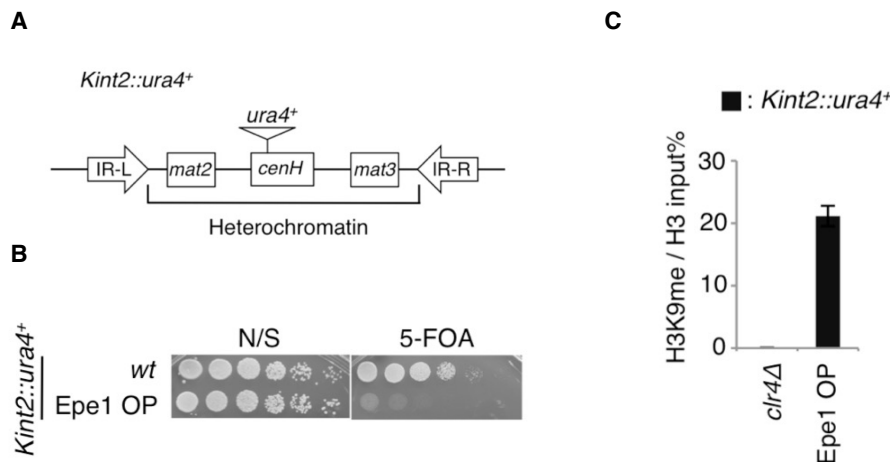


図3-10. Epe1 OPによってヘテロクロマチンに挿入されたmRNA遺伝子が脱抑制する。

(A) 性決定領域の模式図。*cenH*と、その領域に挿入された*ura4⁺* (*Kint2::ura4⁺*, [40]) の位置関係を示す。*mat2*, *mat3*は性決定に寄与する遺伝子、*IR-L*, *IR-R*はユークロマチンとの境界配列を示す。(B) *Kint2::ura4⁺*株のサイレンシングアッセイの結果を示す。5-フルオロオロチン酸 (FOA) は*ura4⁺*を発現する細胞に対して毒性を示す。N/Sは非選択培地。(C) *Kint2::ura4⁺*におけるH3K9meのChIP-qPCRの結果を示す。

この時 *Kint2::ura4+* の 5'/3'RACE 解析を行ったところ、Epe1OP によって脱抑制している *Kint2::ura4+* の転写産物の TSS/TTS は、ユークロマチン領域で転写されている時に検出されるものとほぼ同一であることが明らかになった (図 3-11)。この結果から、Epe1 によってヘテロクロマチンからの転写が誘導される際には、その転写パターンはヘテロクロマチン下の DNA 配列に従うことが示唆された。この結果は、Epe1 OP 株の CAGE-seq において検出された *dgldh* 配列で検出された転写開始点のコンセンサス配列解析が、コアプロモーター構造と一致する傾向があるという上記の結果を裏付ける一方、*dgldh* 配列の転写ユニットとしての特異性を改めて示すものであった。

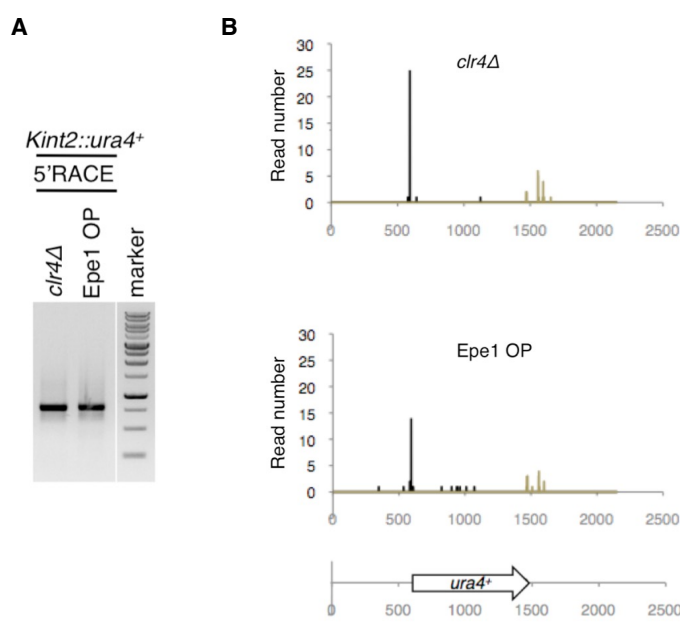


図3-11. Epe1はヘテロクロマチン下のDNA配列に従って転写を活性化する。

(A) Epe1 OP及び*clr4Δ*を用いて5'RACE解析を行った際、*Kint2::ura4+*の5'RACE産物を電気泳動後、EtBr染色した時の結果を示す。(B)5'/3'RACEで同定したTSS/TTSを*Kint2::ura4+*上にプロットした(それぞれ30個ずつ同定)。*clr4Δ*はヘテロクロマチンが存在しない状態になることに留意。*cenH* ncRNAの結果とは対照的に、*Kint2::ura4+*ではEpe1 OPの5'RACE産物はスメアにならず、*clr4Δ*と同じTSSを主に活性化した。また、TTSも*clr4Δ*と一致している

3-5 : widespread TSS だけを含む DNA 断片で、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を確立できる

5'RACE 解析の結果、*cenH* には、ヘテロクロマチン耐性で Epe1 非依存的な転写開始点 (major TSS) と、ヘテロクロマチン感受性で Epe1 依存的な転写開始点 (widespread TSS) という、2つのタイプの TSS が含まれていることが明らかになった。そこで次に私は、*cenH* フラグメントを削って major TSS, widespread TSS を一部しか含まないような一連の *cenH* フラグメントを作成し、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成にどの TSS

が重要であるのかの検討を行った。具体的には、一連の *cenH* フラグメントをプラスミドベースのミニ染色体 [41]にクローニングし、これを *cenH* 配列が完全に失われている変異体である *h^s* 株に導入し、削られた各 *cenH* フラグメントにおいて siRNA 産生と H3K9me 修飾が起きるかどうかの解析を行った(図 3-12A)。その結果、widespread TSSs のみを含む *cenH* フラグメントが挿入されているミニ染色体においても、ヘテロクロマチンが形成され、またその領域で siRNA が産生されることが確認された (図 3-12B,C)。この結果は、ヘテロクロマチン耐性の Epe1 非依存的な major TSS は、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成に必須ではないことを示していた。

次に私は、上記の widespread TSS のみを含む *cenH* フラグメント(約 1.5 kb)に存在している全ての TSS を破壊することで、widespread TSS の重要性を検討する実験を行うことを考えた。しかし、このフラグメント内で同定された widespread TSS の数は非常に多く、最も近い隣接した TSS 間の距離はわずか 3 bp であった。そのため、これらの TSS を破壊するための塩基置換を行うと、結果として元の配列と大きく異なる DNA 配列になってしまうため、このような実験は実行不可能であった。

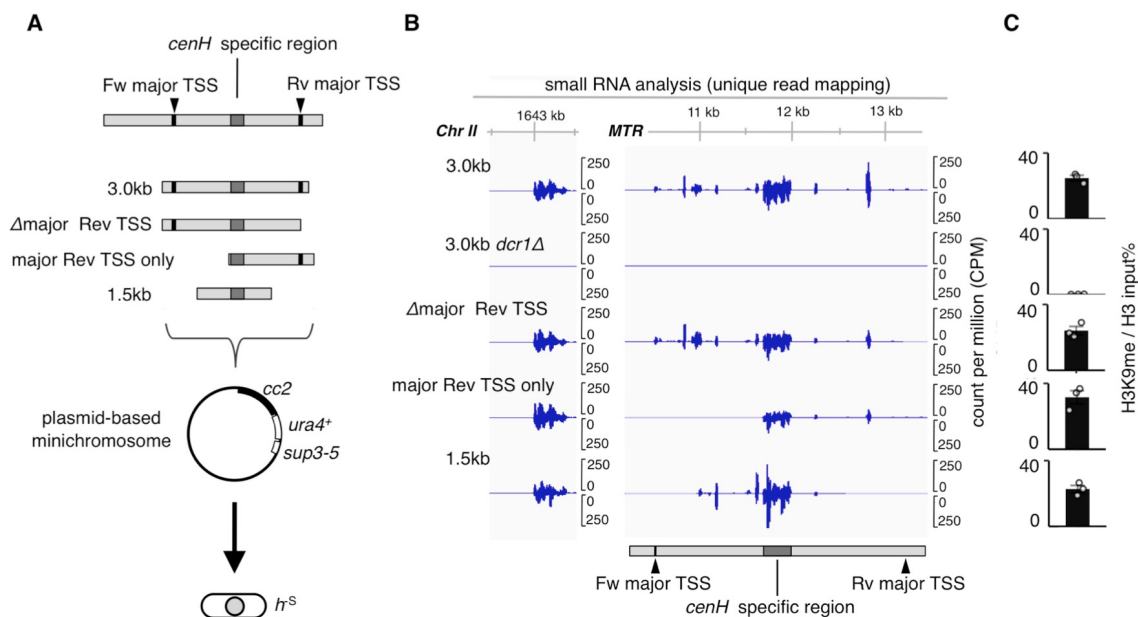


図3-12. widespread TSSだけを含む*cenH*断片はRNAi経路を介したヘテロクロマチンを確立できる。

(A) *cenH*のtruncation解析の模式図。一連の*cenH*断片をプラスミドベースのミニ染色体 [41]にクローニングし、内在性の*cenH*領域が完全に失われている*h^s*株に形質転換した。5'RACEによって同定されたForward鎖及びReverse鎖におけるmajor TSSの位置を示す(図3-9参照)。また、*cenH*フラグメントにおけるsiRNA産生とH3K9me蓄積を評価するために利用した、*cenH*特異的挿入配列を記す[39]。(B)(C)一連の株における(B)small RNA-seq及び(C)H3K9meのChIP-qPCR。small RNA-seq解析に関しては、II番染色体ペリセントロメア(一部抜粋)と*cenH*断片における結果を示す。*cenH*断片上におけるsiRNAの産生を検出するため、ゲノム上にユニークにマップされたリードのみを抽出している。(C) *cenH*特異的領域プライマーを用いたH3K9meのChIP-qPCR。エラーバーはSEMを表し、独立した3回の実験から算出した。

3-6 : タンデムリピートに配置した mRNA 遺伝子が RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を促進する

RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成におけるパラドックスは、「サイレント」なヘテロクロマチンを形成するためにその領域の「転写」が必要ということである。そのため、*dg/dh* 配列中に *widespread TSS* が存在するという上記の結果は、このように多数の TSS がヘテロクロマチン領域に存在することによって、転写が抑制されるサイレントなクロマチン条件下においても、Epe1 によって RNAi 経路に十分な量の標的 RNA を供給することが可能になるのではないかということ想像させた。そこで次に私は、細胞内で人工的な siRNA を産生することで、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を mRNA 遺伝子に対して誘導しても、ヘテロクロマチン形成がほとんど誘導されないという以前の報告に着目した [18-20]。そこでもしもこの時、標的 mRNA 遺伝子がゲノム上の一箇所でクラスター化して存在した場合、*dg/dh* 配列と同様ヘテロクロマチン存在下でも十分な標的 RNA を供給することが出来、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成が成立するようになるのではないかという仮説を立てた。

この仮説を検証するため、私は mRNA 遺伝子 *ade6+* が 1 から 8 コピー、リピートになってゲノム上の内在性 *ura4+* 座位に挿入されている一連の細胞を生成した。この時、より状況を単純化するため、*ade6+* は縦列反復（タンデムリピート）を形成するようにした（図 3-13, 3-14）。

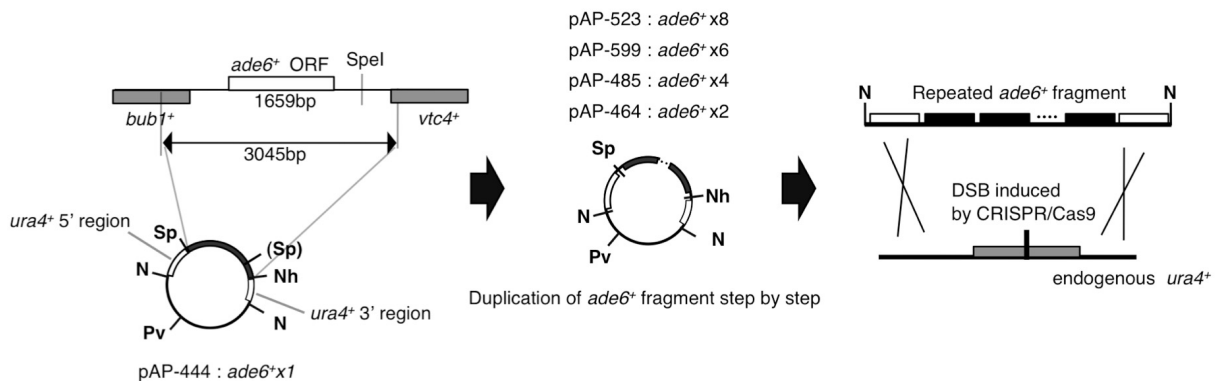


図3-13. *ade6+*タンデムリピートフラグメントの作製。

ade6+ リピート株作成の模式図。*ade6+*断片をプラスミド上の *ura4+* 相同配列間にクローニングし、制限酵素処理を用いた切断と結合を繰り返すことで段階的に増幅を行った。CRISPR/Cas9システムを用いて内在性 *ura4+* 遺伝子座位に二本鎖切断を誘導することで、相同組換えによる *ade6+* リピート断片の相同組み替えを促進した。*ade6+* リピート断片の作成に用いた主な制限部位として N は NotI, Sp は SpeI, Nh は NheI, Pv は PvuI を示す。括弧は iPCR を用いた点突然変異によって破壊された制限サイトを示す。

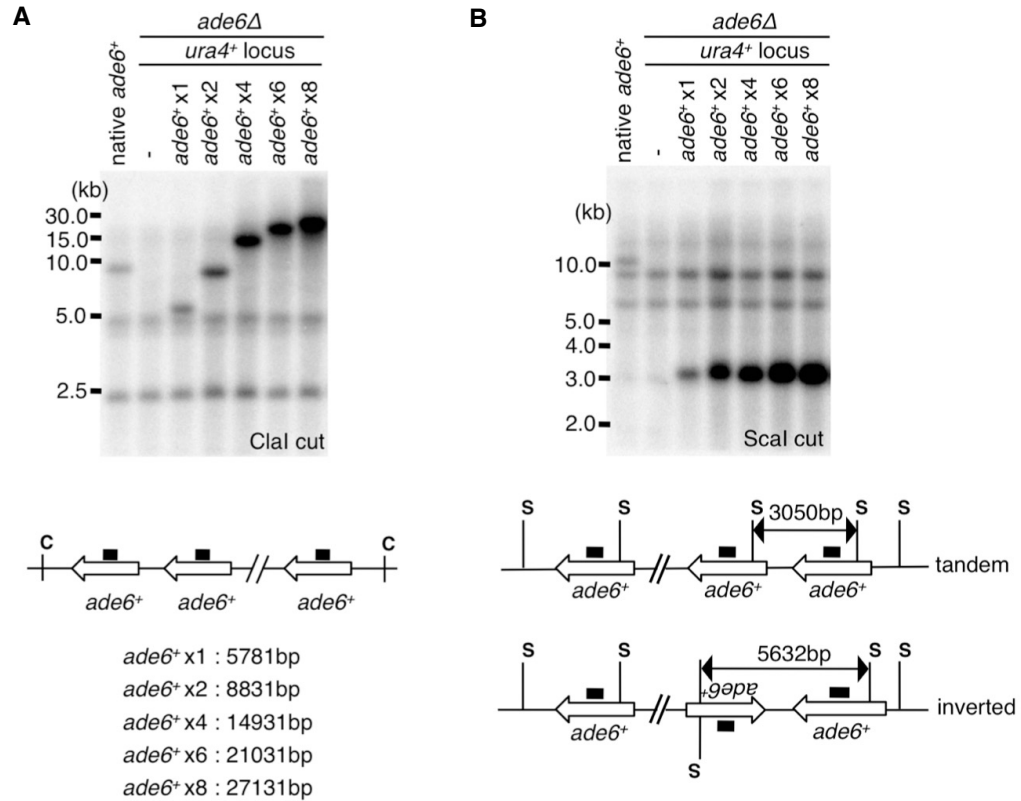


図3-14. *ade6⁺* タンデムリピート株の作製。

内在性の *ura4⁺* 遺伝子座に *ade6⁺* リピートを持つ株のサザンブロット解析。これらの株では内在性の *ade6⁺* 遺伝子が欠失されていることに留意。ゲノムDNAを(A)ClalIまたは(B)ScaIで消化し、それぞれ *ade6⁺* リピートの長さタンデムリピートになっているかを評価した。ブロットの下の図は、各サザンブロットのスキームを示している。■は用いた *ade6⁺* プローブの位置を示す。

次にノーザンブロット解析及びセンス・アンチセンス鎖特異的プライマーを用いた RT-PCR 解析によって、*ade6⁺* リピートアリアル特異的な read-through 転写産物やアンチセンス転写産物が検出されないことの確認を行った (図 3-15A,B)。更に、オリゴ dT プライマーを用いた qRT-PCR によって、*ade6⁺* mRNA 遺伝子の発現量を測定したところ、各 *ade6⁺* リピート株における *ade6⁺* mRNA の発現量はそのコピー数と一致していることが確認された (図 3-15C)。

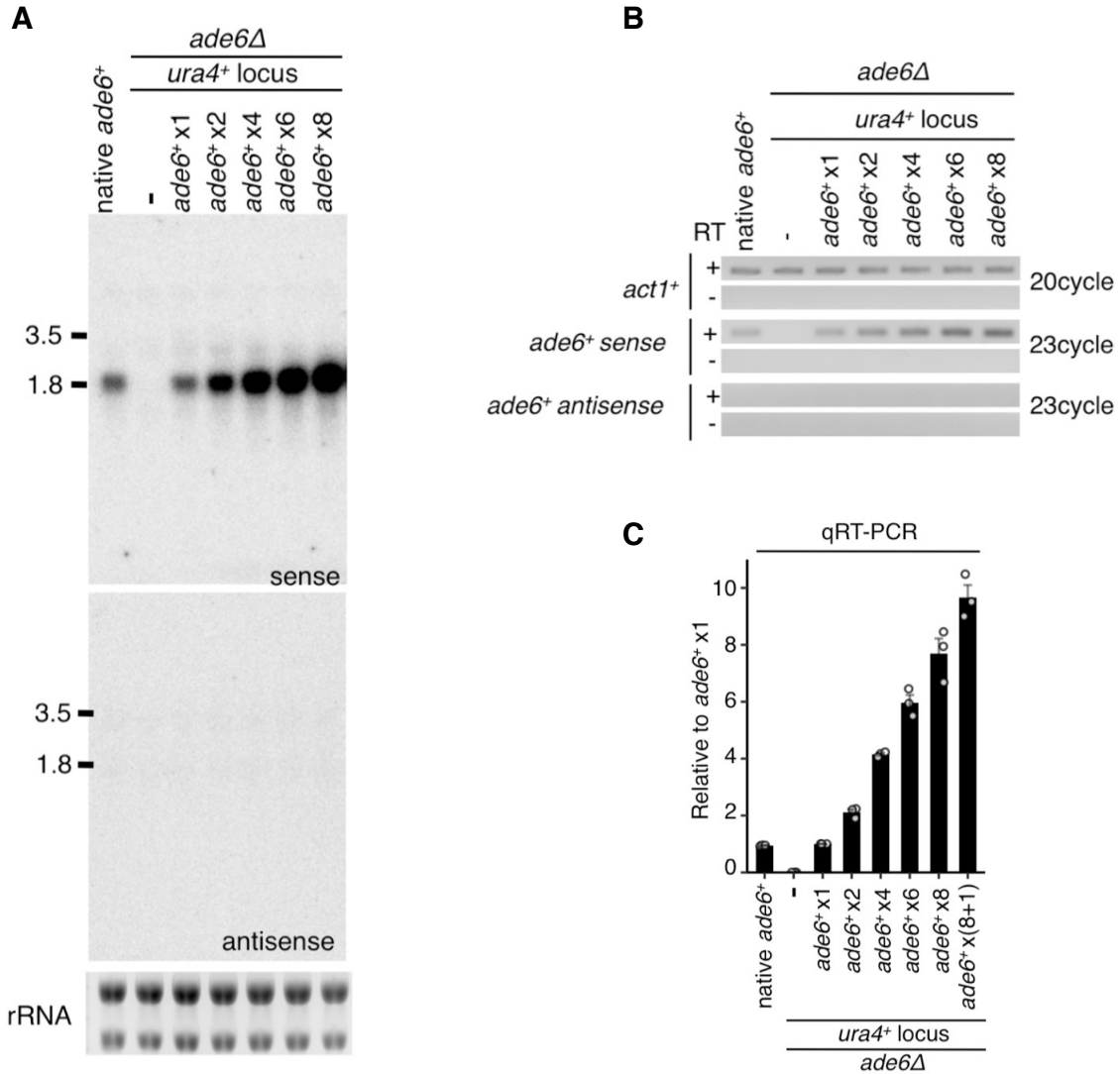


図3-15. *ade6⁺* タンデムリピートの転写産物の確認。

(A) *ade6⁺* リピートを持つ一連の株の total RNA を用いたノーザンブロット解析。 *ade6⁺* のセンスプローブとアンチセンスプローブを用いた結果を示す。電気泳動の際エチジウムブロマイドで染色した rRNA をローディングコントロールとして示す。(B) *ade6⁺* リピートを持つ一連の株の total RNA を用いた、 *ade6* のセンス・アンチセンス鎖特異的なプライマーを用いた RT-PCR。逆転写酵素 (RT) の存在下 (+) または非存在下 (-) の結果を示す。(C) オリゴdT プライマーを逆転写に使用した *ade6⁺* mRNA の qRT-PCR の結果を示す。エラーバーは SEM を表し、独立した 3 回の実験から算出した。

ade6⁺ 遺伝子を標的 mRNA 遺伝子として選んだ理由は、*ade6⁺* の発現が抑制されると、低アデニン含有培地において細胞は赤色のコロニーを形成するようになるため、*ade6⁺* mRNA 遺伝子上にヘテロクロマチンが形成されているかどうかをその表現型で簡便に判別することができるためである(サイレンシングアッセイ)。

まず、サイレンシングアッセイの結果、最小コピー数の *ade6⁺x1* 株と最大コピー数である *ade6⁺x8* 株は両方とも白い (*ade6* 発現) 表現型を示すコロニーのみを形成することが確認された (図 3-16, 図 3-18)。この結果は、qRT-PCR の結果とも一致しており、mRNA 遺伝子がタンデムリピートになっていること自体はヘテロクロマチン形成を直接的に引き起こす原因にならないことを示していた。次に私は *ade6-hp I* および *ade6-hp II* という 2 つのヘアピン RNA 発現カセットを構築した。*ade6-hp I* および *ade6-hp II* は、*ade6* ORF の一部、それぞれ 250 bp および 750 bp の領域に対応する siRNA を産生するように設計されている (図 3-17)。これらのヘアピン RNA 発現カセットを内在性の *leuI⁺* 座位に挿入し、trans に RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を誘導することを試みた(trans-acting RNAi) (図 3-18)。

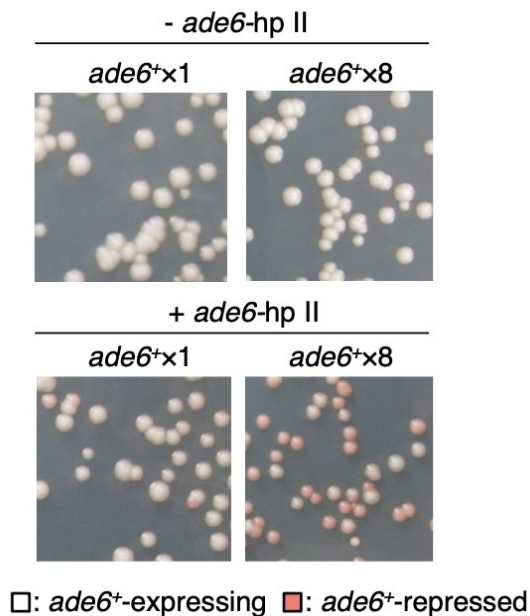


図3-16. *ade6⁺* リピート株の実際の表現型の代表例。
ade6-hpII が存在する時としない時の、*ade6⁺x1* 株と *ade6⁺x8* 株のサイレンシングアッセイの表現型の代表例を示す。

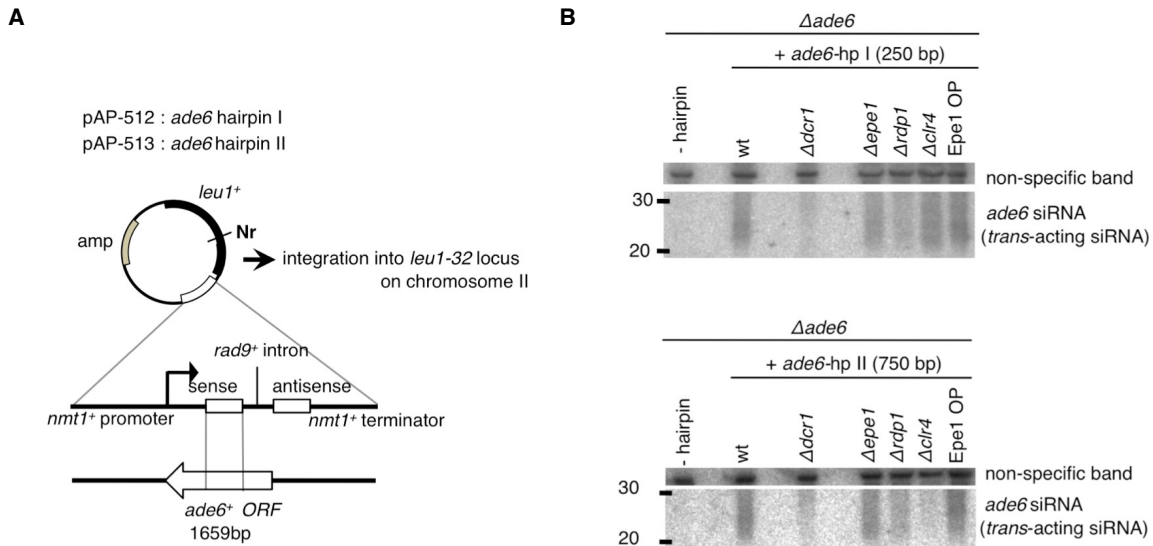


図3-17. trans-acting RNAiを駆動する $ade6$ ヘアピンRNAカセットの作成。

(A) $ade6$ ヘアピンRNA発現カセット作成の模式図。 $ade6$ ヘアピンI ($ade6$ -hp I) または $ade6$ ヘアピンII ($ade6$ -hp II) カセットは、それぞれ $ade6^+$ ORFの621-871 ntまたは386-1132 ntに対応する250 bpまたは750 bpの断片を持つ。この断片が $rad9^+$ の第一イントロンに由来するスペーサー配列を挟んで逆向きに配置されていることでヘアピン部分が形成される。 $nmt1^+$ プロモーター[30]がこのカセットからのヘアピンRNA発現を誘導する。最終的に作成されたプラスミドは制限酵素処理で線状化された後、宿主細胞のII番染色体上の $leu1$ -32遺伝子座に組み込まれる。直鎖化に用いたNruI制限酵素部位をNrで示す。(B) $ade6^+$ プローブを用いたノーザンプロット解析を行い、 $ade6$ -hp Iまたは $ade6$ -hp II由来の siRNAを検出した。ローディングコントロールとして非特異的なバンドを示している。この実験に用いた株は内在性の $ade6^+$ 遺伝子及び $ura4^+$ 遺伝子座位の $ade6^+$ アレルの両方を持たないため、blotの結果はヘアピンRNAから産生された初期型siRNAのみを反映していることになる。 $epe1\Delta$ またはEpe1 OPは、ヘアピンRNAからのsiRNA産生に影響しないことが分かる。

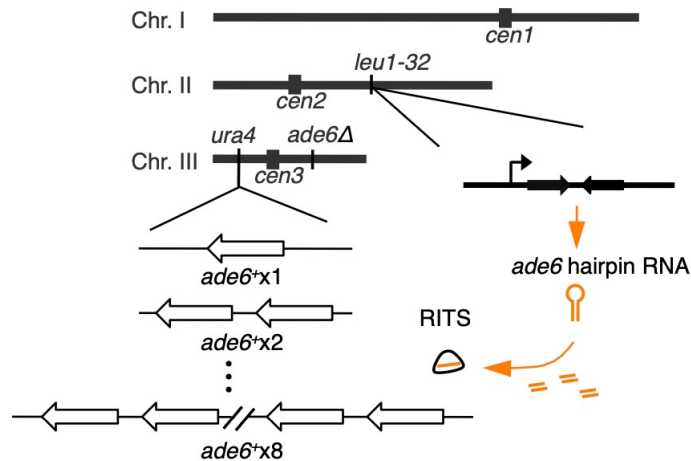


図3-18. リピートになったmRNA遺伝子 $ade6$ にRNAiを人工的にターゲティングする実験(trans-acting RNAi)の模式図。分裂酵母の持つ3本の染色体をChr. I, Chr. II, Chr. IIIで示し、ヘアピンRNAカセットが挿入された $leu1^+$ 座位、 $ade6^+$ リピートが挿入された $ura4^+$ 座位、破壊された内在性 $ade6^+$ 遺伝子($ade6\Delta$)の位置関係を記す。 $cen1$, $cen2$, $cen3$ は各染色体におけるセントロメアを表す。

先行研究の結果から RNAi 経路による PTGS は分裂酵母ではほぼ検出されないことが分かっている[18-20]。そのため、ヘアピン RNA を用いた人工的な siRNA の産生によって、赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) の表現型を示すコロニーが出現すれば、それは *ade6*⁺ mRNA 遺伝子上のヘテロクロマチン形成(TGS)を反映していることになる。そこまでまず私は、ヘアピン RNA 発現時に白色コロニー(*ade6* 発現) から赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) が出現する頻度を測定することにより、*ade6*⁺mRNA 遺伝子上にヘテロクロマチン形成が誘導される効率の解析を行った。

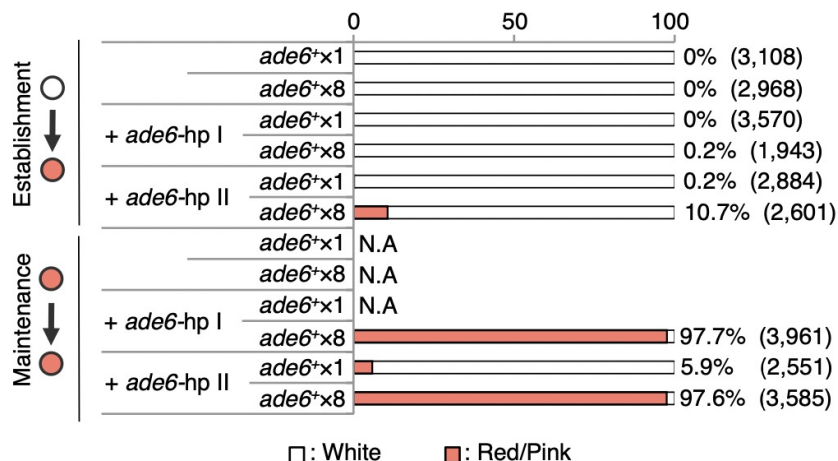


図3-19. リポートになったmRNA遺伝子はRNAiを介したヘテロクロマチン形成を促進する。

trans-acting RNAiによってヘテロクロマチン形成を誘導した時のサイレンシングアッセイの結果。白(*ade6*発現)の表現型を示すコロニーから赤/ピンク(*ade6*抑制)の表現型を示すコロニーが出現する頻度をヘテロクロマチンの確立、赤/ピンク(*ade6*抑制)の表現型を示すコロニーから赤/ピンク(*ade6*抑制)の表現型を示すコロニーが出現する頻度をヘテロクロマチンの維持としてその効率を評価した。評価したコロニー数を括弧内に示す。尚、該当する株について赤色/ピンク(*ade6*抑制)の表現型を示すコロニーが出現しなかった場合は、その維持の効率は計測不可能であるため、N.Aと表記した。

その結果、これまで報告されている研究の結果と一致して、*ade6*-hp I または *ade6*-hp II によって RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を *ade6*⁺x1 アリルに誘導した場合、赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) の表現型を示すコロニーは、非常に低い効率 (0%および0.2%) でしか出現しなかった (図 3-19, Establishment +*ade6*-hp I or II の *ade6*⁺x1 アリル)。一方、*ade6*-hp I または II によって RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を *ade6*⁺x8 アリルに誘導した場合、赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) コロニーの出現効率がそれぞれ 0.2%および 10.7%と増加することが確認された (図 3-19, Establishment +*ade6*-hp I or II の *ade6*⁺x8 アリル)。この時、*ade6*-hp I および *ade6*-hp II で赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) コロニーの誘導効率に差がある原因の一つは、ヘアピン RNA によって産生される siRNA がカバーする領域の範囲の広さが違うことにあると考えられる。

次に、赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) から赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) が出現する頻度を測定す

ることで、一度 *ade6* 遺伝子上に形成されたヘテロクロマチンがどれくらい安定に維持されるかの解析を行った。その結果、*ade6*⁺x1 アリルで確立された赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) コロニーの表現型は非常に不安定であり、赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) コロニー由来の細胞の 90%以上が白 (*ade6* 発現) の表現型に戻ることが確認された (図 3-19, Maintenance +*ade6*-hp I or II の *ade6*⁺x1)。これに対して、*ade6*⁺x8 アリルで確立された赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) コロニーの細胞が再び赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) コロニーを形成する頻度は非常に高く、*ade6*-hp I および *ade6*-hp II それぞれのヘアピン RNA の場合で両方とも 97%以上であった (図 3-19, Maintenance +*ade6*-hp I or II の *ade6*⁺x8)。これらの結果は、タンデムリピートになった mRNA 遺伝子が、独立して存在している mRNA 遺伝子よりも trans-acting RNAi に適した標的であることを示唆しており、これは主に *ade6*⁺x8 アリルでは一度形成されたヘテロクロマチンが効率的に維持されることに由来していることが明らかになった。

次にタンデムリピートになった mRNA 遺伝子の効果を更に検証するため、*ade6*⁺mRNA 遺伝子リピートの一連の株、*ade6*⁺x2, *ade6*⁺x4, *ade6*⁺x6 を *ade6*-hp II と組み合わせた場合の赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) 表現型の確立と維持の効率を同様に検証した。その結果、リピートの含むコピー数の増加に相関してヘテロクロマチン形成は促進される傾向があり、特にヘテロクロマチンの維持においてリピートの効果はより顕著に見られることが明らかになった (図 3-20)。

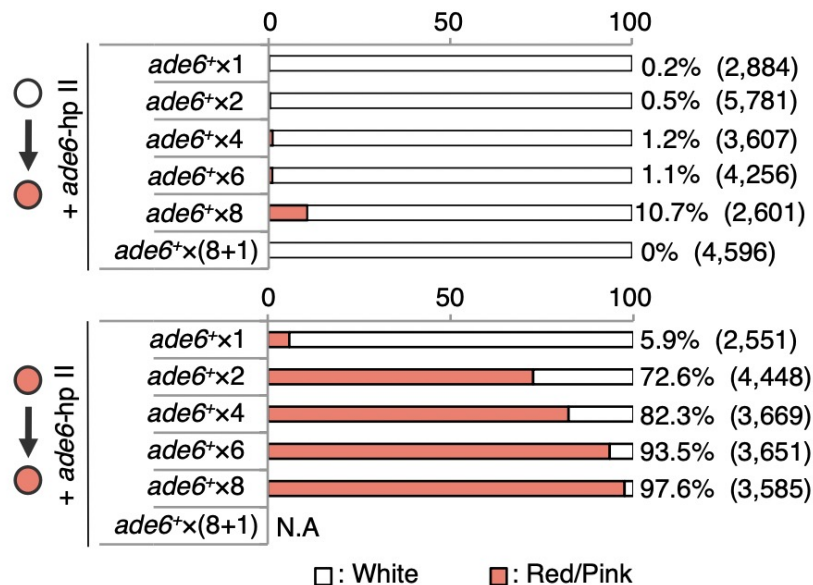


図3-20. mRNA遺伝子のリピート数に相関して、ヘテロクロマチン形成は促進される (I)。

ade6-hpIIをtrans-acting RNAiに用いた際の、一連の*ade6*⁺リピート株におけるサイレシングアッセイの結果。比較のために、図3-19の*ade6*⁺x1, *ade6*⁺x8の結果も並べて示す。該当する株について赤色/ピンク(*ade6*抑制)の表現型を示すコロニーが出現しなかった場合は、その維持の効率は計測不可能であるため、N.Aと表記した。

また、これら一連の *ade6*⁺ リピートの赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) クローンから単離された細胞を用いて、その *ade6*⁺ mRNA 遺伝子の H3K9me レベルを解析すると、*ade6*⁺ 上の H3K9me レベルとコピー数との間に明確な正の相関が観察された。驚くべきことに、この時、最大コピーである *ade6*⁺x8 アリルでは、*ade6*⁺ mRNA 遺伝子上の H3K9me 量はペリセントロメアにおける *dgl/dh* 配列に匹敵するレベルになっていることが明らかになった (図 3-21)。

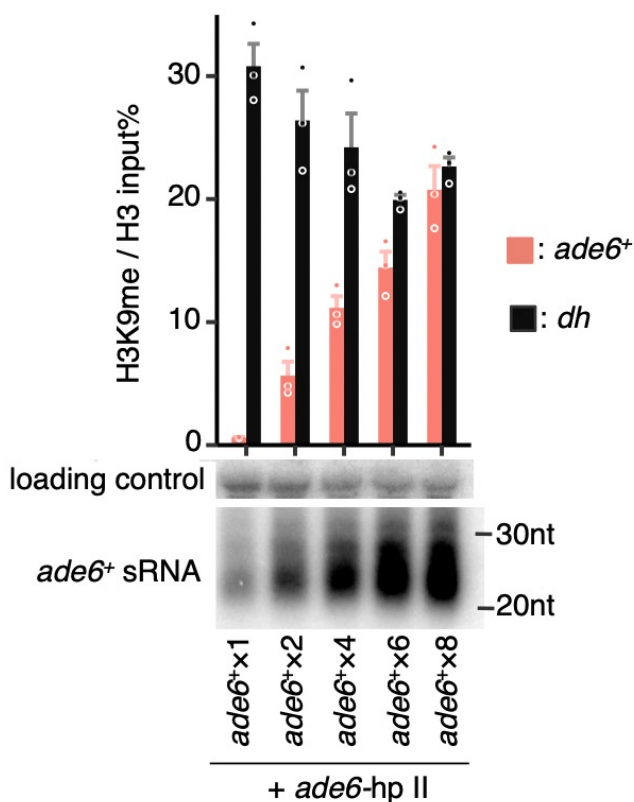


図3-21. mRNA遺伝子のリピート数に相関して、ヘテロクロマチン形成は促進される (II)。
 (上段)図-3-20で単離された一連の*ade6*⁺リピート株の赤-ピンク (*ade6*抑制) クローンをを用いて行ったH3K9meのChIP-qPCRの結果を示す。input%を計算しているため、*ade6*⁺の値は1コピー当たりの値に補正されていることに留意。
 (下段) 同じ細胞を用いた*ade6*⁺ siRNAのノーザンブロット解析の結果。非特異的バンドをローディングコントロールとして用いている。

3-7 : タンデムリピートになった mRNA 遺伝子による RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成の促進は、その遺伝子量に起因するものではない

次に私は、タンデムリピートになった mRNA 遺伝子が RNAi 経路によるヘテロクロマチン形成を促進する理由が、その遺伝子量(つまりはゲノム中におけるコピー数)に起因しているのかどうかを検証した。この検証のため、接合によって *ade6⁺x(8+1)* という株を作成した。この株では *ura4⁺* 座位に組み込まれた *ade6⁺* リピートとは離れた部位に、細胞が生来持っている内在性の *ade6⁺* 遺伝子が存在している (図 3-22A, *ade6⁺x(8+1) + ade6-hp II*)。作成した *ade6⁺x(8+1)* 株は、*ade6-hp II* が存在しない時、*ade6⁺* mRNA の発現量はそのコピー数と一致していることが qRT-PCR で確認された(図 3-15C)。この株を用いて *ade6-hp II* による trans-acting RNAi を用いたサイレンシングアッセイを行ったところ、*ade6⁺x8* 株の結果とは対照的に、*ade6⁺x(8+1)* 株では赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) コロニーが一切出現しなくなることが明らかになった (図 3-20)。原理的には、細胞内に複数の *ade6⁺* 遺伝子が存在する場合、そのうちの 1 つだけでも発現していれば、他の *ade6⁺* 遺伝子がサイレンシングされていても白い (*ade6* 発現) 表現型を示すコロニーを形成することになる。したがって、*ade6⁺x(8+1)* 株で赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) コロニーの形成が一切観察されなかったことは、独立して存在している *ade6⁺* 遺伝子と *ade6⁺x8* アリルの間で、ヘテロクロマチン形成能に偏りがあることに起因している可能性が考えられた。しかし、*ade6⁺x(8+1)* 株では白い (*ade6* 発現) 表現型のコロニーしか観察されないため、実験上最初の集団の中から *ade6⁺* 遺伝子にヘテロクロマチンが形成されたクローンを単離することが出来ない。そのため、*ade6⁺x(8+1)* 株でこの可能性を検証するのは困難であった。そこで次に私は、既に *ade6-hp II* によってヘテロクロマチン形成が誘導されている *ade6⁺x8* アリルと、内在性 *ade6⁺* 遺伝子を組み合わせた株を接合によって作成した (図 3-22A, *ade6⁺x(8*+1) + ade6-hp II*)。この *ade6⁺x(8*+1)* 株は赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) コロニーを形成したが、同時に作成されたコントロールとなる *ade6⁺x8** 株と比較して、その赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) の表現型が不安定であることが明らかになった(図 3-22B)。そこで、*ade6⁺x8* アリルと、それとは別に独立して存在する内在性 *ade6⁺* 遺伝子を区別可能な半定量的 ChIP-PCR を用いて、それぞれの H3K9me レベルの解析を行った。その結果、*ade6⁺x(8*+1)* 株では、独立して存在する内在性 *ade6⁺* 遺伝子上に H3K9me が殆ど存在していないことが明らかになった (図 3-22C, D)。これらの結果から、タンデムリピートになった mRNA 遺伝子が RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を促進する理由は、その遺伝子量に起因している訳ではない事が明らかになった。

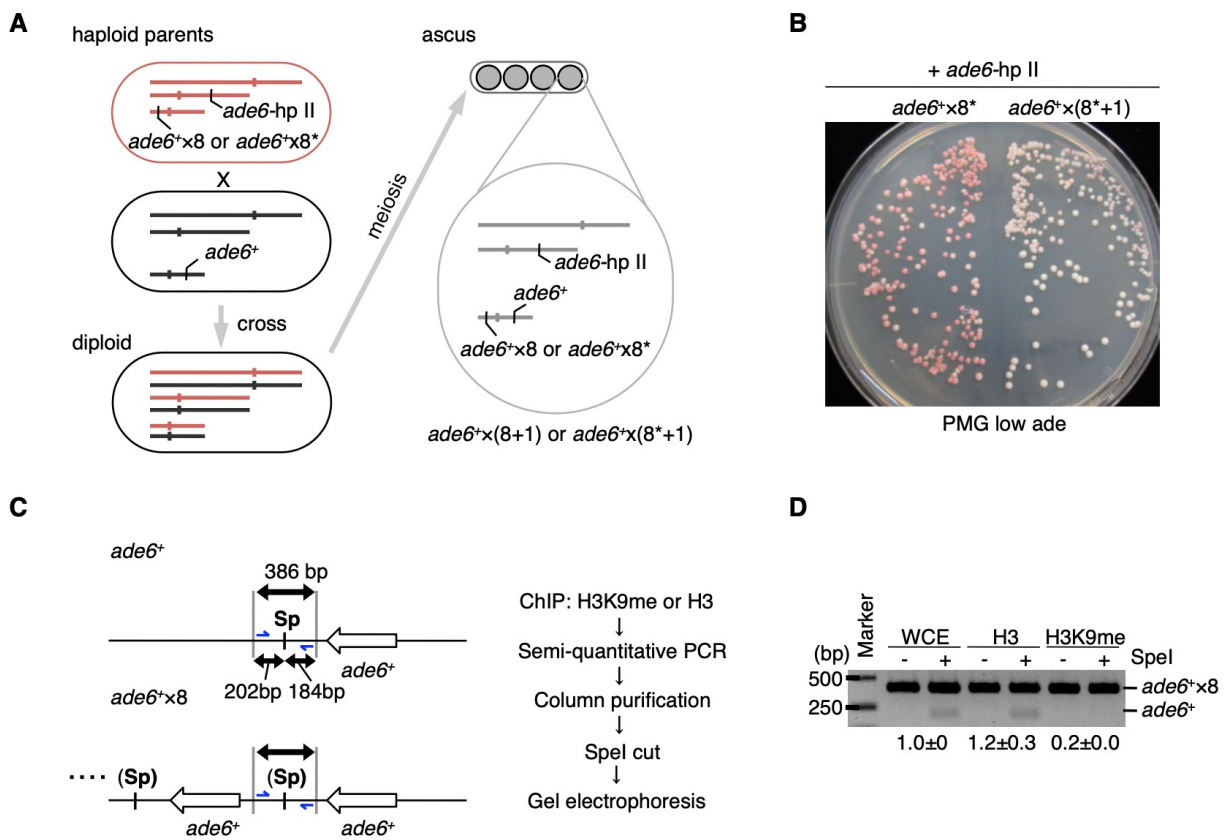


図3-22. リpeatになったmRNA遺伝子は、その遺伝子量によってRNAiを介したヘテロクロマチン形成を促進している訳ではない。(A)内在性 $ade6^+$ 遺伝子と $ade6^+x8$ アレルが同時に存在する $ade6^+x(8+1)$ 株と $ade6^+x(8^*+1)$ 株を接合によって作成する模式図。 $ade6^+x(8^*+1)$ では、 $ade6^+x8$ アレルはすでにtrans-acting RNAiによってヘテロクロマチン化されている (アスタリスク)。(B) $ade6^+x8^*$ 株と $ade6^+x(8^*+1)$ 株のサイレンシングアッセイの結果。赤色 ($ade6$ 抑制) クローンを2回連続して単離した後の表現型を示す。同系由来の $ade6^+x8^*$ 株と比較して、 $ade6^+x(8^*+1)$ 株の赤ピンクの表現型はほとんど維持されていない。(C) 独立して存在する内在性 $ade6^+$ 遺伝子と $ade6^+x8$ アレルを区別する半定量的ChIP-PCRの実験スキームの模式図。 $ade6^+$ ORFの下流に位置するSpeIサイトは、 $ade6^+x8$ を構築する際に点変異を導入することで除去されている (\$, 補足図S5も参照)。したがって、この制限部位領域 (青矢印) を増幅するプライマーを用いた半定量的ChIP-PCRと、それに続くSpeIによる制限酵素処理によって、免疫沈降したDNAが独立して存在する内在性の $ade6^+$ 遺伝子由来のものか、それとも $ade6^+x8$ アレル由来のものかを区別することができる。(D) H3K9me抗体もしくはH3抗体を用いて半定量的ChIP-PCRを行い、そのPCR産物をSpeI消化あり(+)/なし(-)という両条件で用意した後、ゲル電気泳動で分離した。電気泳動後、ゲルを臭化エチジウムで染色し、imageJソフトウェアを用いて各バンドの密度を測定した。独立して存在する内在性 $ade6^+$ 遺伝子に由来するバンドの強度を、 $ade6^+x8$ アレルに由来するバンドと比較して評価し、WCEの結果で相対化した。3回の独立した実験から算出した平均シグナル強度を示す。また、電気泳動の代表的な画像を示す。

3-8: タンデムリピートになった mRNA 遺伝子は cis-acting RNAi を促進する

リピートになった mRNA 遺伝子が何故 RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を促進するのか、その原因を詳細に調べるため、次に私はリピートになった mRNA 遺伝子が siRNA の産生に及ぼす影響を解析した。本研究の実験系では、*ura4+* 座位の *ade6+* リピートとは異なる染色体上にある *leu1* 座位に存在するヘアピン RNA カセットから、*ade6+* mRNA 遺伝子と相補的な配列を持つ siRNA を産生している(図 3-18)。このような trans-acting な siRNA によって RITS 複合体が標的 *ade6+* mRNA を認識すると、その際にリクルートされる RDRC により *ade6+* mRNA を鋳型とした dsRNA の合成が起きると予想される。この dsRNA が Dcr1 によるプロセッシングを受けると、ヘアピン RNA 由来の言わば初期型 siRNA に対し、二次型 siRNA と呼ぶべき siRNA が *ade6* リピートから産生されることになる。二次型 siRNA は RDRC によって標的 mRNA から合成された dsRNA に由来しているため、初期型 siRNA とは異なり、ヘアピン RNA にコードされていない領域に対応する siRNA を含むことになる。また、この二次型 siRNA は RITS 複合体を介して更に RDRC を呼び込むことになるため、正のフィードバックループを描く(図 1-4)。この時、RNAi 経路は標的 mRNA から産生される二次型 siRNA によって駆動されているため、初期型 siRNA によって駆動される trans-acting RNAi に対し、cis-acting RNAi と呼ぶことができる(図 3-23A)。

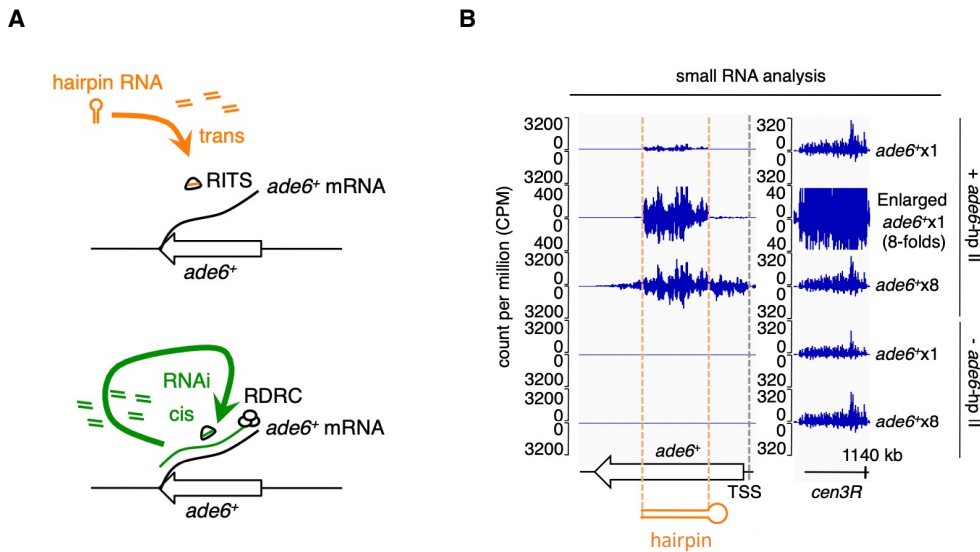


図3-23.リピートになったmRNA遺伝子は、独立して存在するmRNA遺伝子よりも効率的にcis-acting RNAiを促進する。(A) 上段はtrans-acting RNAiを示し、*ade6*ヘアピンRNAに由来するsiRNAがトランスにRNAi経路を*ade6+* mRNAにターゲティングする模式図。下段はcis-acting RNAiで、*ade6+* mRNAに由来するsiRNAがRNAi経路をシスに*ade6+* mRNAにターゲティングすることを示す。もし、trans-acting RNAi (初期型siRNA)がcis-acting RNAiを活性化すると、RDRCによるdsRNA合成及びそれに続くDcr1によるプロセッシングにより、初期型siRNAにコードされていない領域を含む二次型siRNAが生成されると考えられる。(B) *ade6+*アリルとIII番染色体ペリセントロメアにおけるsmall RNA-seqの結果を示す。オレンジの破線は、trans-acting RNAi (*ade6-hp II*) が標的とする領域を示す。*ade6+x1*と*ade6+x8*のコピー数の差による影響を考慮し、*ade6+x1*を8倍に拡大した図も並べて示した。

注目すべきことに、sRNA-seq を用いて *ade6⁺x1*, *ade6⁺x8* 両株の siRNA を解析したところ、*ade6⁺x8* 株では *ade6-hp II* によってコードされていない siRNA、つまり二次型 siRNA の産生が顕著に促進されていることが明らかになった (図 3-23B)。この結果は、*ade6⁺x8* アリルではヘアピン RNA 由来の trans-acting RNAi が、*ade6⁺* mRNA における cis-acting RNAi を効果的に活性化したことを意味している (図 3-23A)。一方で、*ade6⁺x1* 株でも二次型 siRNA の産生が検出されたものの、*ade6⁺x8* 株と比較するとその量は非常に少ないことが確認された (図 3-23B)。この結果から、リピートになった mRNA 遺伝子は、独立して存在する mRNA 遺伝子よりも効率的に cis-acting RNAi を活性化することができることが明らかになった。

また一方で、一連の *ade6⁺* リピート株の *ade6* siRNA の total 量 (*ade6-hp II* から産生される初期型 siRNA と cis-acting RNAi によって産生される二次型 siRNA の合計) は、タンデムリピートになった *ade6⁺* 遺伝子のコピー数と正に相関していることが確認された (図 3-21、下段)。ヘアピン RNA 由来の初期型 siRNA 量は全ての株で一様である為、この結果は cis-acting RNAi の活性化の効率が *ade6⁺* 遺伝子のリピート数と正に相関していることを示唆していた。この時、その H3K9me 量も *ade6⁺* 遺伝子のリピート数と正の相関があることを考えると、cis-acting RNAi の活性化効率の違いが、そのアリルにおける H3K9me レベルの違いを説明すると考えられた。

3-9 : タンデムリピートになった mRNA 遺伝子は自律的な RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を確立できる (Repeat-induced RNAi)

先行研究によると、例えヘアピン RNA 発現による trans-acting RNAi が mRNA 遺伝子においてヘテロクロマチン形成を誘導しても、その後ヘアピン RNA 発現カセットを細胞から取り除くと、形成された異所的ヘテロクロマチンは維持されずに消失することが報告されている [20, 21]。そこで次に私は、*ade6⁺x8* アリル上に形成された異所的なヘテロクロマチンの維持にも、持続的な trans-acting RNAi、つまりは初期型 siRNA の供給が必要かどうかの検証を行った。具体的には、ヘテロクロマチン形成が誘導された *ade6⁺x8* アリルを持つ細胞を親株である *leu1-32* 変異体と掛け合わせることで、*leu1* 座位に挿入されている *ade6-hp II* を減数分裂を経て取り除く実験を行った (図 3-24、左)。その結果驚くべきことに、*ade6-hp II* を取り除いた後も、*ade6⁺x8* 細胞は元の *ade6⁺x8* 細胞と同様、赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) の表現型を維持し続け (図 3-24、右)、実際にこの表現型と一致して *ade6⁺x8* アリル上の H3K9me レベルも維持されていることが明らかになった (図 3-24B)。

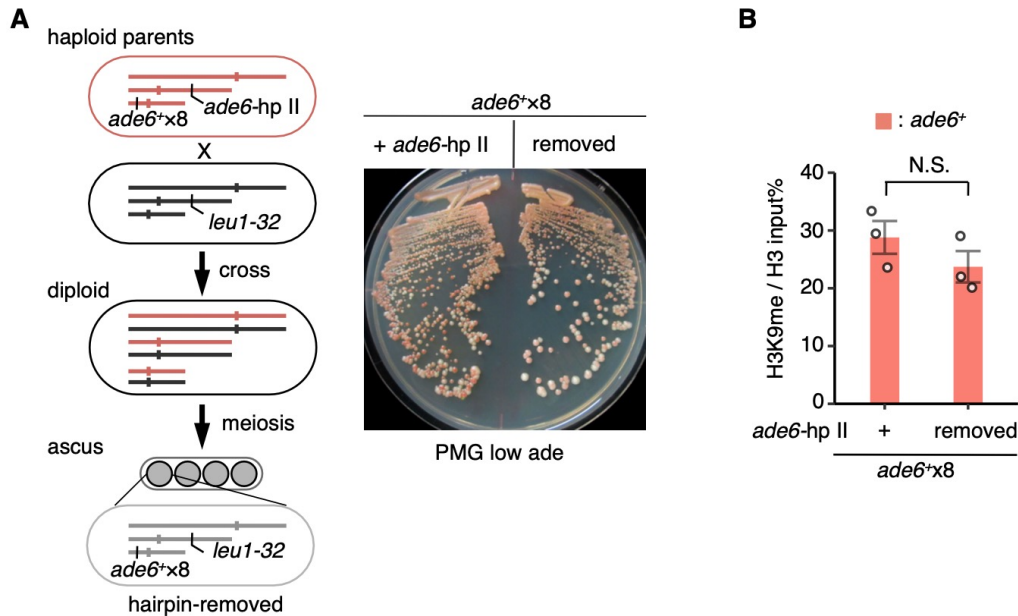


図3-24. trans-acting RNAiがなくなった後も、*ade6+ x8*のヘテロクロマチンは維持される。

(A) (左) 接合によって *ade6-hp II* を *ade6+ x8* アリルを持つ細胞から取り除く模式図。 *ade6-hp II* によって *ade6+ x8* アリルにヘテロクロマチン形成を誘導後、単離された赤い (*ade6* 抑制) クローンに親株である *leu1-32* 変異体 (ロイシン要求性株) を掛け合わせる。接合後に減数分裂を経ることで、*ade6-hp II* を失い、*ade6+ x8* アリルのみを引き継いだ子孫を単離することが可能になる。 *ade6-hp II* は *leu1+* マーカーで *leu1-32* 座位に挿入されているので、その有無はロイシン要求性で区別することができる。(右) *ade6-hp II* が取り除かれた子孫および取り除かれなかった同系子孫のサイレンシングアッセイの結果を示す。(B) (A) で示したクローンの *ade6+* 遺伝子における H3K9me の ChIP-qPCR の結果を示す。エラーバーは SEM を表し、独立した3回の実験から算出した。N.S. は Not Significant を示す ($P=0.27$, two-sided Student's t-test)。

そこで次にこの *ade6-hp II* を取り除いた株の siRNA 解析を行ってみると、*ade6-hp II* が亡くなった後も、*ade6+ x8* アリルからは二次型 siRNA と同じパターンの *ade6* siRNA が産生され続けていることが明らかになった(図 3-25A)。この時、*ade6+ x8* アリルから自律的に産生されている *ade6* siRNA は、その塩基長の分布や 5' 末端塩基の傾向が *dgldh* siRNA のそれと同じであった (図 3-26)。また、*dgldh* 配列におけるヘテロクロマチンと同様、*ade6+ x8* アリル上のヘテロクロマチンも有糸分裂と減数分裂を経て伝達され、その維持は RNAi 因子に依存的であることが明らかになった(図 3-25B)。これらの結果から、タンDEM リピートになった mRNA 遺伝子はそれ自体では直接的にヘテロクロマチン形成を誘導しないものの、一度 RNAi 経路によって認識されると、*dgldh* 要素と同様、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成のプラットフォームとして機能することが明らかになった。これまで用いられてきた RIGS (Repeat-Induced Gene Silencing) という用語はそのメカニズムを定義していないため、私はこのリピートになった mRNA 遺伝子上で成立した「自律的な cis-acting RNAi」を RIGS に倣って「Repeat-induced RNAi」と名付けた。

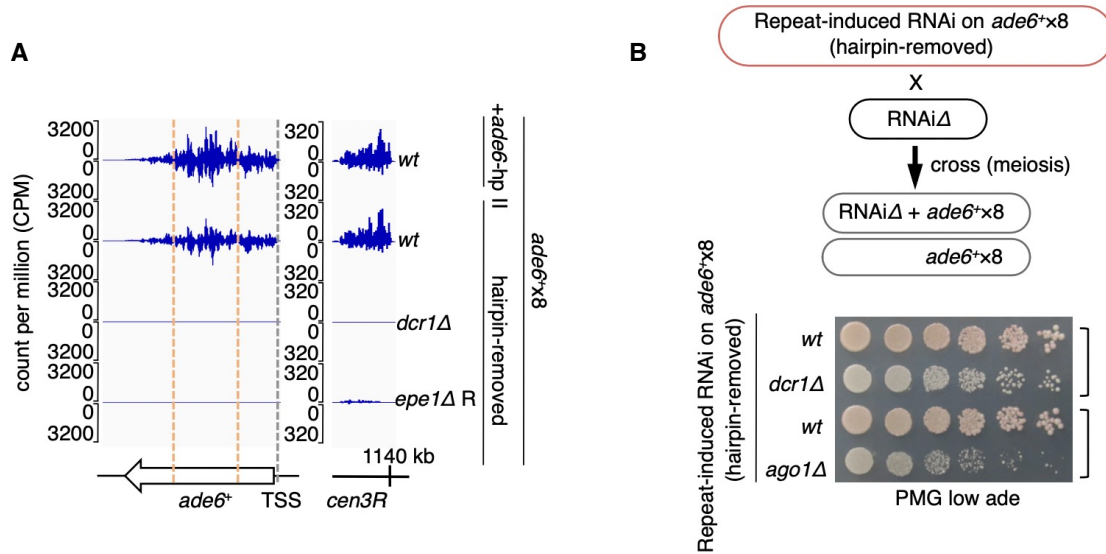


図3-25. *ade6+x8*アレルにおいて自律的なcis-acting RNAiが成立する (Repeat-induced RNAi)。
 (A) 図3-24で示した*ade6-hp II*が取り除かれなかった株、取り除かれた株、及び後者の派生株である*dcr1Δ*と*epe1Δ R*におけるsmall RNA-seq解析。*ade6+x8*アレルとIII番染色体ペリセントロメア(一部抜粋)の結果を示す。Dcr1及びEpe1依存的に*ade6+x8*アレルで自律的にsiRNA産生が行われていることが分かる。(B) Repeat-induced RNAiにより自律的にヘテロクロマチンが維持されている *ade6+x8*アレル株を、RNAi欠損変異体である*dcr1Δ*、*ago1Δ*と接合によって組み合わせた時のサイレシングアッセイの結果。コントロールとして、同じ接合体由来で*ade6+x8*アレルのみを受け継いだ子孫クローンの結果も角括弧で並べて示した。*epe1Δ*の略号 "R" は、図3-28で示す*epe1Δ*の赤色 (*ade6*抑制) クローン由来の細胞を意味する。

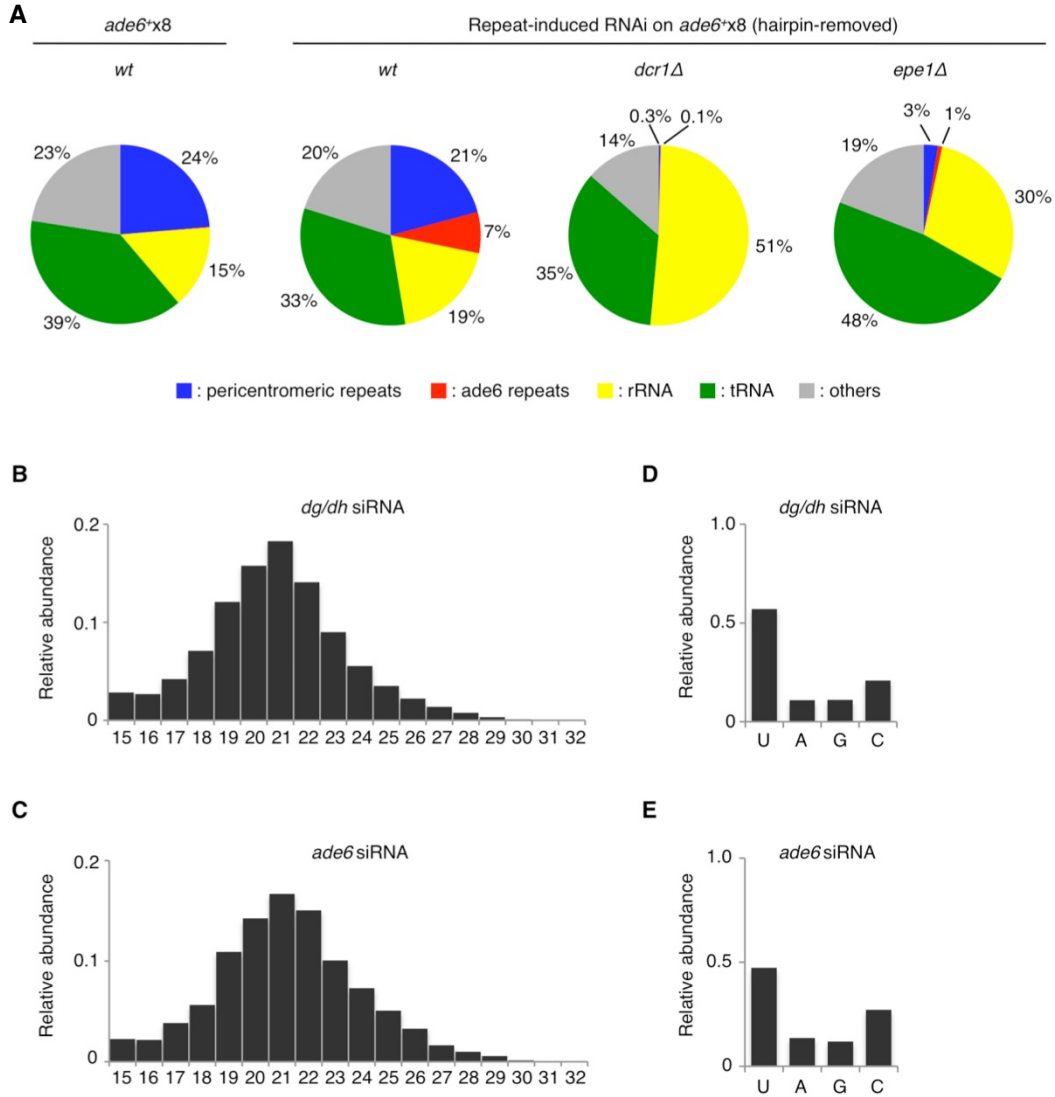


図3-26. *ade6⁺x8*におけるRepeat-induced RNAiによって産生されるsiRNAは、*dg/dh*配列由来のsiRNAと同じ特徴を持つ。
 (A) Repeat-induced RNAi成立前、あるいは成立後の*ade6⁺x8*アレル株、更に後者に*dcr1Δ*または*epe1Δ*を組み合わせた株のsmall RNA-seqの結果。円グラフにより、small RNAリード全体に対する各small RNAカテゴリーの割合を示す。尚、これらの株は*ade6-hp II*(つまり初期型siRNA)は持っていないことに留意。(B)(C)(D)(E) Repeat-induced RNAi成立後の*ade6⁺x8*アレル株のsiRNA-seqデータを用い、そのサイズ分布と5'ヌクレオチド嗜好性を解析した。(B)*dg/dh*配列または(C)*ade6⁺x8*由来のsiRNAのサイズ分布を示す。横軸は塩基数、縦軸は相対量を示す。(D)*dg/dh*配列または(E)*ade6⁺x8*由来のsiRNAにおいて、各塩基が5'末端を占める相対的な割合を示す。

3-10 : Repeat-induced RNAi には一定数以上のコピー数が必要である

trans-acting RNAi を一連の *ade6*⁺ リピートに対して行った時の結果から、cis-acting RNAi が活性化される効率はリピートになった mRNA 遺伝子のコピー数と相関しているということが予想された(図 3-21)。そこで次に私は、Repeat-induced RNAi の確立も標的 mRNA 遺伝子のリピート数に依存するかどうかの解析を行った。具体的には、trans-acting RNAi によって *ade6*⁺ アリルにおいてヘテロクロマチンが形成された一連の *ade6*⁺ リピート株の赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) の細胞を、先程と同じく親株である *leu1-32* 変異体と接合することで *ade6-hp II* を取り除き、*ade6-hp II* がいない状態で赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) の表現型を維持する子孫の割合を各々の株で測定した(図 3-27A)。その結果、4 コピー以上の *ade6*⁺ 遺伝子を持つ *ade6*⁺ リピート株の子孫は、*ade6-hp II* を取り除いた後もそのほとんどが赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) の表現型を示すことが明らかになった。しかし一方で、*ade6*⁺x1 株または *ade6*⁺x2 株の子孫は、全て白い (*ade6* 発現) の表現型を示した(図 3-27A)。この表現系の結果と一致して、これらの子孫クローンの H3K9me レベルと siRNA 産生を解析したところ、上記の赤-ピンク色 (*ade6* 抑制) の表現型を示した子孫では自律的な *ade6* siRNA の産生及び *ade6*⁺ mRNA 遺伝子上の H3K9me 修飾の維持が観察された一方、*ade6*⁺x1 または *ade6*⁺x2 株の白い (*ade6* 発現) 表現型の子孫ではこのような RNAi 経路を介した *ade6*⁺ アリルにおけるヘテロクロマチンの維持は観察されなかった(図 3-27B)。これらの結果から、Repeat-induced RNAi の確立には、一定数以上のコピー数で mRNA 遺伝子がリピートになっていることが必要であることが明らかになった。

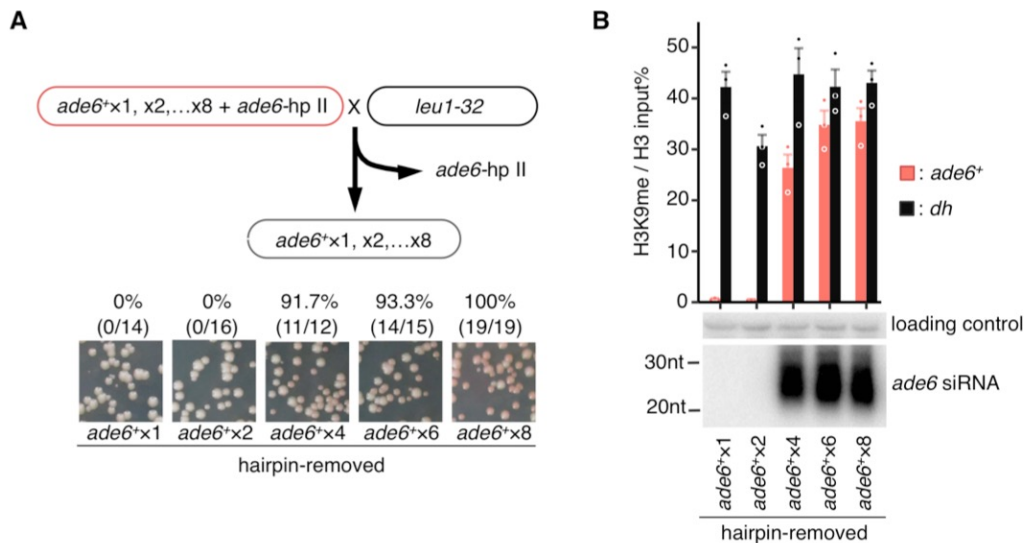


図3-27. Repeat-induced RNAiには一定数以上のコピー数が必要である。

(A) *ade6-hp II*によってヘテロクロマチン形成が誘導された一連の*ade6*リピート株の赤色(*ade6*抑制) クローンを、親株 *leu1-32*と接合することで、*ade6-hp II*を取り除いた。この時*ade6-hp II*がなくても赤/ピンク色 (*ade6*抑制) の表現型を維持した子孫の割合を測定した。括弧内は実験で実際に得られた子孫の数と、そのうちの赤/ピンク色 (*ade6*抑制) の表現型を示した子孫の数を示す。(B) (A)で得られた子孫クローンを用い、H3K9meのChIP-qPCR (上段)、及び*ade6* siRNAのノーザンブロット解析(下段)を行った。非特異的バンドをローディングコントロールとして用いている。

3-11: Repeat-induced RNAi には H3K9me 除去因子 Epe1 が必要である

次に私は、*dgldh* 配列における RNAi 経路の活性化に Epe1 が必要であることを念頭に (図 3-1)、*ade6⁺x8* アリルにおける Repeat-induced RNAi にも Epe1 が必要かどうかの解析を行った。まず、*ade6⁺x8* アリルにおける Repeat-induced RNAi が確立している細胞において *epe1⁺* 遺伝子を破壊すると、細胞は著しい variegation phenotype を示すようになった (図 3-28)。そこで次に *epe1Δ* 赤色 (*ade6* 抑制) クローン (*epe1Δ R*)、つまり *ade6⁺x8* アリルにヘテロクロマチンが形成されていることが予想されるクローンにおいて、RNAi 経路が機能しているかどうかの解析を行った。その結果、Epe1 の欠失によりその領域における RITS 複合体の局在が著しく減少し、同時に *ade6* siRNA の産生が失われることが確認された (図 3-28B, C, 図 3-25A)。

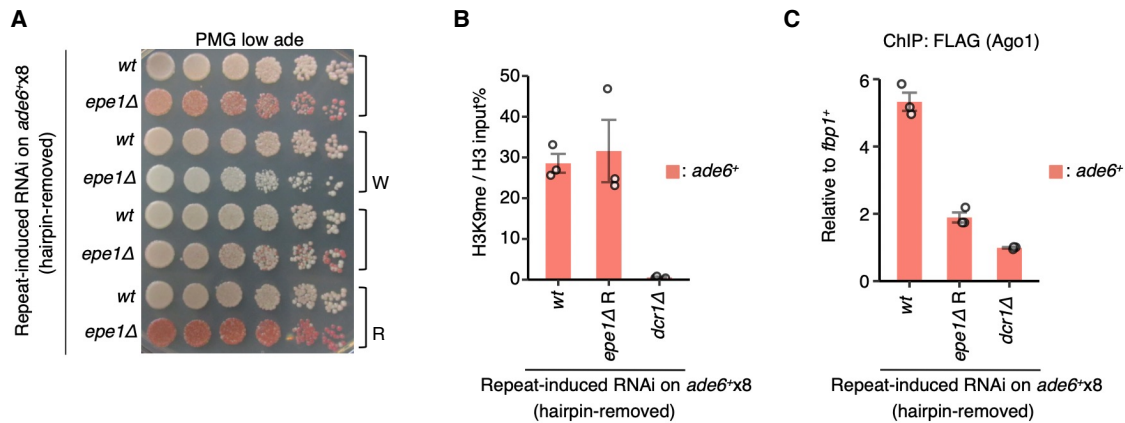


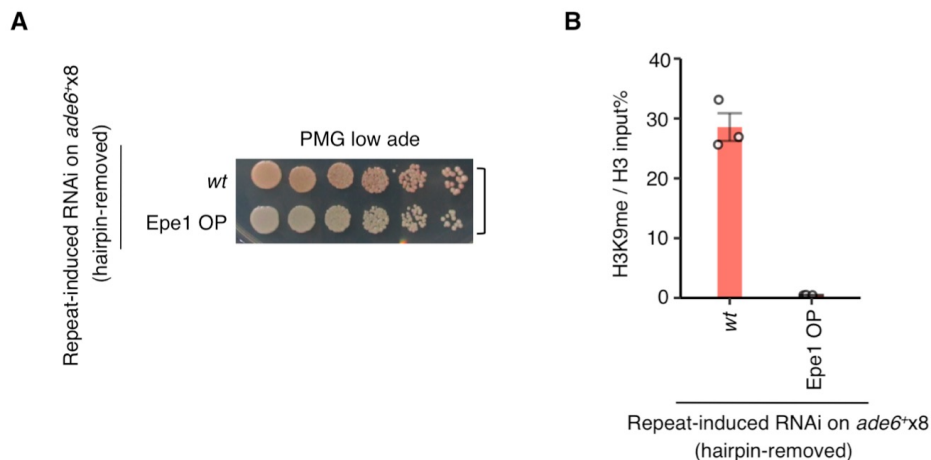
図3-28. Repeat-induced RNAiにはEpe1が必要である。

(A) Repeat-induced RNAiにより自律的にヘテロクロマチンが維持されている *ade6⁺x8* アリル株と *epe1Δ* を接合して得られた子孫のサイレンシングアッセイの結果。コントロールとして、同じ接合体由来で *ade6⁺x8* アリルのみを受け継いだ子孫クローンの結果も角括弧で並べて示した。これらのクローンのうち、以降の解析に用いた赤い表現型(*ade6*発現)のクローンをR、白い表現型(*ade6*抑制)のクローンをWとして記す。(B) (C)表記した株の *ade6⁺x8* アリルにおける(B)H3K9meと(C)Ago1のChIP-qPCRの結果を示す。

この結果は、*epe1Δ R* (*ade6* 抑制) 細胞における *ade6⁺x8* アリル上のヘテロクロマチンは RNAi 経路を介しておらず、H3K9 メチル化酵素 Clr4 がそのクロモドメインを介して既存の H3K9me に結合し、隣接するヌクレオソームに H3K9me を広げる自己伝播に依って維持されていることを示していた[22, 23]。一方で、*epe1Δ* 白色 (*ade6* 発現) クローン (*epe1Δ W*)の解析を行ってみると、その表現系にも関わらず、高いレベルの H3K9me が検出されることが明らかになった (data not shown, 図 3-29, 下段)。前述したように、理屈上、*ade6⁺x8* アリルのうちの1つでも *ade6⁺* 遺伝子が発現すれば、細胞は白色 (*ade6* 発現) のコロニーを形成することになる。その為、この表現型と H3K9me レベルの齟齬は、

ade6⁺x8 リピート中における部分的な脱抑制を反映してしているものだと予想された。また、この *epe1ΔW* (*ade6* 発現) 細胞においても、*epe1ΔR* (*ade6* 抑制) と同様、*ade6⁺* siRNA が失われていることが確認され、維持されている H3K9me は自己伝播によるものであることが明らかになった (図 3-29)。これらの結果は、*dg/dh* 配列における RNAi 経路と同様、Repeat-induced RNAi の活性化には Epe1 が必要であることを示していた。*epe1Δ* 細胞が野生型細胞と比べて著しい variegation phenotype を示すのは、*ade6⁺* 遺伝子がペリセントロメアの *dg/dh* 配列領域に挿入された細胞でも見られる現象である[28]。このような不安定な表現型は、RNAi 経路による H3K9me 修飾の補充がない中で、自己伝播によって維持されているヘテロクロマチンが不安定であることを反映していると思われる。

一方で前述したように、*epe1Δ*とは逆に、Epe1 OP は *dg/dh* 配列における RNAi 経路の高活性化状態を引き起こす (図 3-2, 図 3-3)。そこで次に私は *ade6⁺x8* アリルでヘテロクロマチンを維持している Repeat-induced RNAi も、Epe1 OP により高活性化状態になるかどうかの検証を行った。その結果、Epe1 OP は *ade6⁺x8* アリルにおける repeat-induced RNAi の高活性化は誘導せず、寧ろその領域の H3K9me 修飾を完全に取り除いてしまうことが明らかになった(図 3-29A, B)。この結果は、*ade6⁺x8* アリルに形成されたヘテロクロマチンにおいても、Epe1 が本質的には H3K9me 除去因子として機能していることを示していた。また、この結果と一致して、Epe1 の過剰発現のレベルを更にあげると、*dg/dh* 配列においても H3K9me が減少することが明らかになった(図 3-29, C-E)。



(図 3-29)次ページに続く

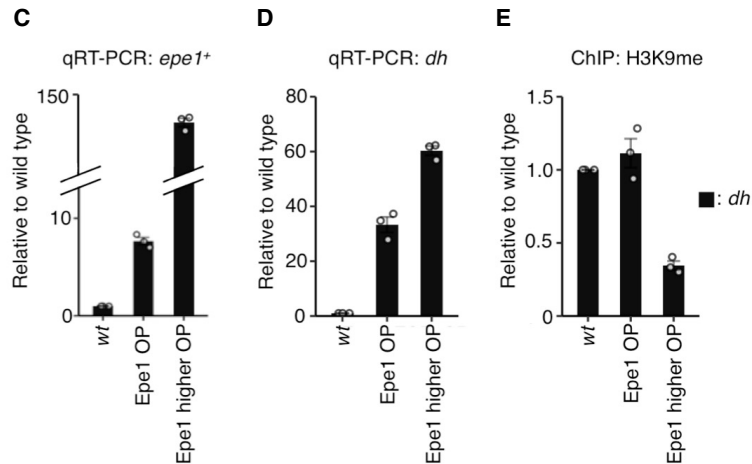


図3-29. Epe1 OPはRepeat-induced RNAiにより形成されていたヘテロクロマチンを除去する。

(A) Repeat-induced RNAiがヘテロクロマチンを維持している $ade6^+x8$ アリルを持つ株とEpe1 OP株を接合によって組み合わせた時のサイレンシングアッセイの結果を示す。コントロールとして、同じ接合体の由来で $ade6^+x8$ アリルを受け継いだ野生型細胞の結果も角括弧で並べて示した。(B) (A)の細胞を用いた $ade6^+$ におけるH3K9meのChIP-qPCR。Epe1 OPによって $ade6^+x8$ アリルからH3K9meが完全に除去されたことが分かる。この実験は図4Fと並行して行われたため、野生型細胞(wt)についてはそれと同じデータが示されている。エラーバーはSEMを表し、独立した3回の実験から算出した。(C)(D)(E), Epe1 OP ($epe1^+$ の内因性プロモーターを*Purg1* [29]で置換した場合と更に高レベルのEpe1 OP (マルチコピープラスミドpREP41[30]から発現)を行なった場合の影響の比較。(C) それぞれの条件における $epe1^+$ mRNA発現量をqRT-PCRで測定した結果を野生型細胞に対する相対量で示す。(E) *dh* ncRNAのqRT-PCRの結果を野生型細胞に対する相対量で示す。(F) *dh*におけるH3K9meのChIP-qPCRの結果を野生型細胞に対する相対量で示す。

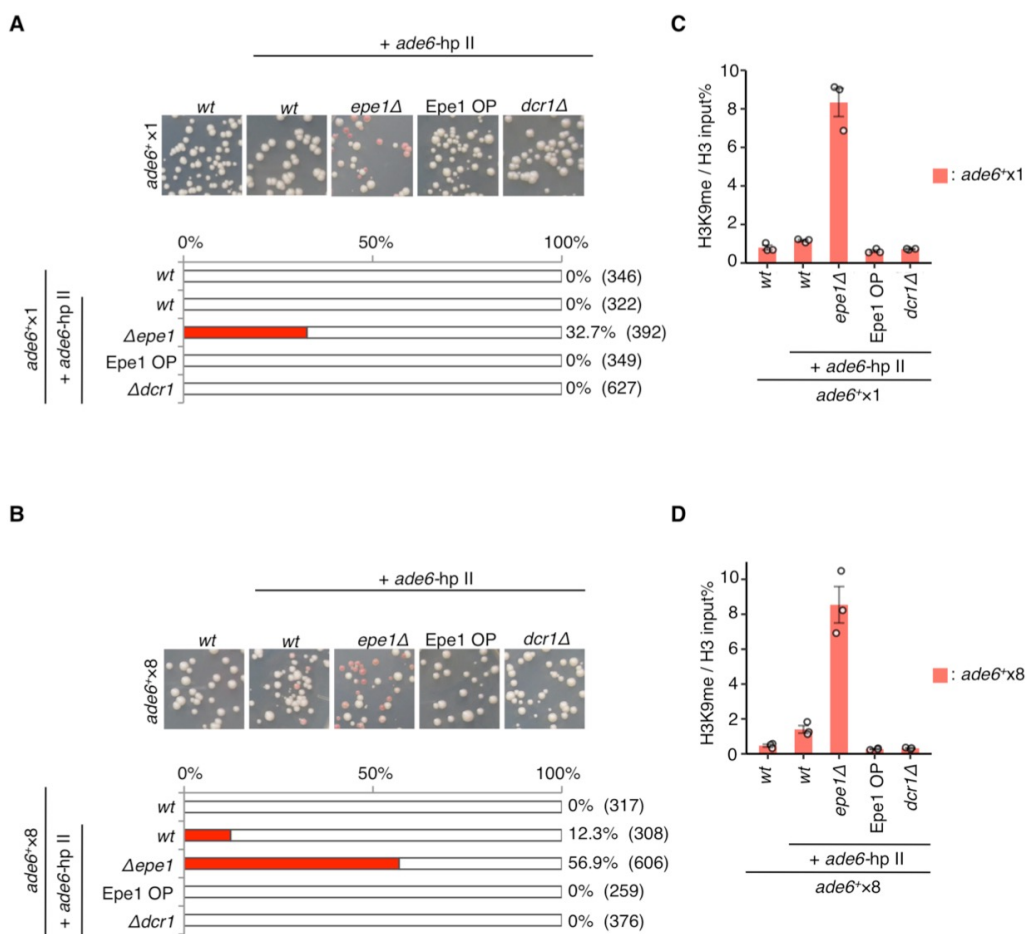
3-12: Epe1 は cis-acting RNAi の活性化に必要である

前述したように、RNAi 経路介したヘテロクロマチン形成では、siRNA 産生が正のフィードバックループを形成していることが知られている[13-15]。そのため、 $\Delta epe1$ によって引き起こされる siRNA 産生の欠如が、このループのどのステップに由来しているのかを、通常の *dg/dh* 配列における RNAi 経路を用いて解析することは難しい。そこで次に私は、本研究の人工的な系を利用し、ヘアピン RNA による trans-acting RNAi と、それによって活性化される cis-acting RNAi を用いて、Epe1 の機能を明らかにすることを試みた。

ヘアピン RNA によって trans-acting RNAi を行う際には、ヘアピン RNA の dsRNA 部分を Dcr1 がプロセシングすれば siRNA が産生されるため、Epe1 が欠失しても *ade6-hp II* からの *ade6* siRNA 産生は失われない (図 3-17)。そこでまずこの trans-acting RNAi を用いることで、siRNA を介して $ade6^+$ mRNA 遺伝子上にヘテロクロマチン形成を誘導する際に、Epe1 の有無がどのように影響するのか解析を行った。その結果、Epe1 の欠失により、 $ade6^+x1$ アリル及び $ade6^+x8$ アリル両方において trans-acting RNAi を介したヘテロクロマチン形成が効率的に誘導されるということが明らかになった (図 3-30)。この結果は、siRNA が trans に供給される場合、Epe1 は RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成に必

要ないということを示していた。そして野生型細胞よりも *epe1Δ*においてより効率的にヘテロクロマチンが形成されるというこの結果は、siRNA は本来 *ade6⁺x1* アリルが標的であっても効率的にヘテロクロマチン形成を誘導することができるが、Epe1 によってそのヘテロクロマチン形成が抑制されているということを示していた。

次に私は *cis*-acting RNAi の活性化に Epe1 の欠失が及ぼす影響の解析を行った。これまでの解析の結果、野生型細胞の場合、*trans*-acting RNAi によって *ade6⁺x8* アリルでのみ異所的なヘテロクロマチン形成が誘導され、同時に顕著な二次型 siRNA の産生が確認されることが分かっている (図 3-21, 図 3-23)。一方で *epe1Δ*では、*trans*-acting RNAi によって、*ade6⁺x1* および *ade6⁺x8* アリルの両方において、異所的なヘテロクロマチン形成が誘導された (図 3-31)。しかし、siRNA 解析を行ったところ、これらの異所的ヘテロクロマチンでは、たとえば *ade6⁺x8* アリルであっても、野生型で見られるような二次型 siRNA 産生が誘導されていないことが明らかになった (図 3-31)。この結果は、Epe1 は *cis*-acting RNAi を活性化するために必要であることを示していた。



(図 3-30)次ページに続く

図3-30. Epe1はtrans-acting RNAiによるヘテロクロマチン形成を抑制する。

*ade6-hp II*を用いたtrans-acting RNAiのサイレンシングアッセイ。(A) *ade6⁺x1*アレル株と(B) *ade6⁺x8*アレル株の表記された変異体における結果を示す。本文中にあるように、*epe1⁺*の欠損はヘテロクロマチンの不安定化を引き起こし、赤白の variegation phenotypeを伴う (図3-28も参照)。このような*epe1Δ*細胞の特徴は、サイレンシングアッセイによるヘテロクロマチンの確立と維持の評価に影響を与える可能性がある。そのため、本実験ではヘアピンRNA発現誘導直後の細胞を用いて、ヘテロクロマチン形成の確立のみを評価している。計測に用いたコロニーの数は括弧内に記した。

(C)(D) (A)と(B)の細胞を用いてH3K9meのChIP-qPCRを行った際の、*ade6⁺*における結果を示す。エラーバーはSEMを表し、独立した3回の実験から算出した。ヘアピンRNAによって産生されるsiRNAの量は、*epe1Δ*またはEpe1 OPによって影響されないことに留意 (図3-17)。

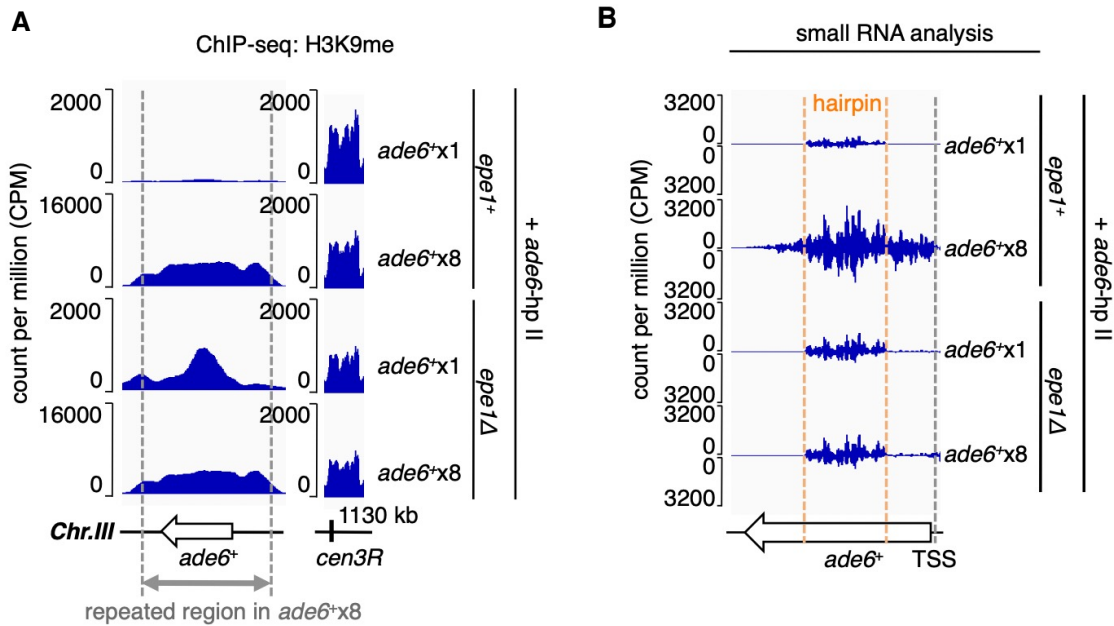


図3-31. Epe1はcis-acting RNAiの活性化に必要である。

*ade6-hp II*によりヘテロクロマチン形成が誘導された*ade6⁺x1*, *ade6⁺x8*アレルを持つ*epe1Δ*株の(A) ChIP-seqと(B) small RNA-seqにおける*ade6⁺*遺伝子とIII番染色体ペリセントロメア(一部抜粋)の結果を示す。

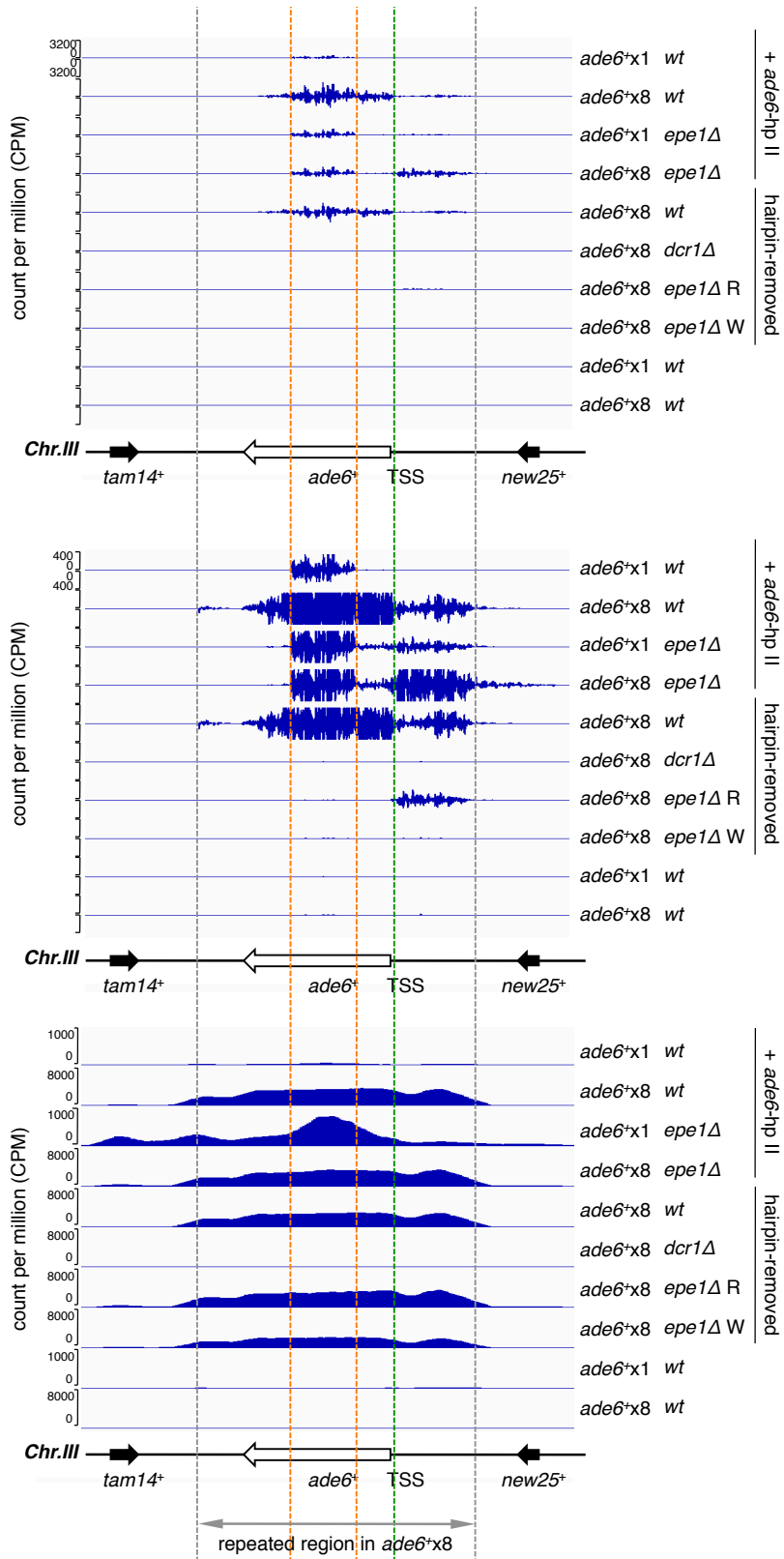
比較のため、それぞれ*epe1⁺*細胞の結果も示す(small RNA-seqに関しては図3-23と同一のデータを引用)。

3-13: 一部の株において *ade6*⁺TSS 上流領域で siRNA 産生が確認される

一方、一連の実験を行なっている過程で、私は幾つかの株において *ade6*⁺TSS 上流領域において予期せず siRNA 産生が検出されることに気がついた(図 3-32)。*ade6*⁺がリピートになっていない場合、*ade6* siRNA が産生されていない場合、Epe1 が存在しない場合 (*epe1*Δ)でもその産生が確認されることから、この siRNA は本研究で解析している Repeat-induced RNAi とは異なったメカニズムで産生されていると考えられた (考察 4-3 を参照)。

(次ページ) 図3-32. 一部の株において、*ade6*⁺TSS上流領域でsiRNA産生が検出される。

本研究で用いた一連の株において、*ade6*⁺アレル近傍領域にマッピングされたsiRNAの全体像を上段のパネルに示す。またその拡大図を中央のパネルに示す。*ade6*⁺x1 wt + *ade6*-hp IIのトラック以外のトラックでは、100万リードあたりのカウント数の表記は省略している。比較のため、同じ株を用いたH3K9meのChIP-seqの結果を下段に示す。*ade6*⁺x8アレル由来のリードは、可視化を容易にするために*ade6*⁺x1コンストラクト上にマッピングした。この時、*ade6*⁺x8株は*ade6*⁺遺伝子を8コピー持っているため、これらの株の*ade6*⁺におけるChIP-seqリードは8倍にスケールアップして示されている。オレンジの破線は、*ade6*-hp II (trans-acting RNAi) が標的とする領域を示す。緑の破線は*ade6*⁺のTSSを示し、灰色の破線は*ade6*⁺アンプリコン(リピート単位)の両端を示す。また各パネルの下に、*ade6*⁺アレルと隣接する遺伝子である*new25*⁺と*tam14*⁺の位置と方向を矢印で示している。*ade6*⁺x8 *epe1*Δ RまたはWの表記は、解析したクローンがそれぞれRed (*ade6*抑制)の表現型を示す細胞由来であるか、White (*ade6*発現)の表現型を示す細胞由来であることを示している。



3-13: H3K9me 修飾の伝達において、Epe1 はリピート依存的に真逆の役割を果たす

上記の結果は、trans-acting RNAi でヘテロクロマチン形成を誘導した際、*ade6⁺x8* アリルにおいて Epe1 は cis-acting RNAi を活性化することでヘテロクロマチン形成を促進する役割を担っていることを示していた。しかしながら対照的に、*ade6⁺x1* アリルでは Epe1 存在下でも cis-acting RNAi の活性化が見られず、ヘテロクロマチン形成も効率よく誘導されない(図 3-31)。この結果は、Epe1 による cis-acting RNAi の活性化は標的 mRNA 遺伝子がリピートであることに依存的である可能性を示唆していた。ただし、Epe1 は H3K9me 結合タンパク質 HP1 ホモログ Swi6 を介してヘテロクロマチンに局在することが知られている [25]。そのため、*ade6⁺x1* アリルでは別の何らかの理由で H3K9me レベルが低いために Epe1 が局在できず、その結果 cis-acting RNAi が活性化されないという、もう一つの可能性も考えられた。そこでこれら 2 つの可能性を検証するために、次に私は *ade6⁺x1* または *ade6⁺x8* アリルに既に存在する異所的ヘテロクロマチンに対して、Epe1 がどのように機能するかを解析した。具体的には、*epe1Δ*細胞において *ade6-hp II* による trans-acting RNAi によって *ade6⁺x1* または *ade6⁺x8* アリル上に異所的ヘテロクロマチンを形成した後、接合によって *ade6-hp II* を取り除くと同時に *epe1⁺* 遺伝子を戻すという実験を行った (図 3-33A)。コントロールとして、*epe1⁺* 遺伝子を戻さず *epe1Δ* のまま *ade6-hp II* を取り除いた細胞では、*ade6⁺x1* と *ade6⁺x8* アリルの両方で異所的ヘテロクロマチンが維持されることが確認された (図 3-33)。一方で *epe1⁺* 遺伝子を戻した場合には、*ade6⁺x1* アリルと *ade6⁺x8* アリルの細胞でそれぞれ異なる結果が得られた。*ade6⁺x1* アリルの細胞に *epe1⁺* 遺伝子を戻した場合、その接合で生じた全ての子孫が白色 (*ade6* 発現) の表現型を示すコロニーを形成し、この表現型と一致して *ade6⁺x1* アリル上の異所的ヘテロクロマチンは完全に除去されていることが明らかになった (図 3-33)。この結果とは対照的に、*ade6⁺x8* アリルの細胞に *epe1⁺* 遺伝子を戻した場合、赤色-ピンク (*ade6* 抑制) の表現型を示す子孫が頻繁に出現し、それらの *ade6⁺x8* アリルにおける H3K9me レベルは元の状態が維持されていることが明らかになった (図 3-33A,B)。これらの細胞を用いて RNAi 経路の活性化状態を確認してみると、*ade6⁺x8* アリルにおいてのみ、*epe1⁺* 遺伝子を戻した際に RNAi 因子の局在が増加し、*ade6* siRNA の自律的な産生が起きるようになることが確認された (図 3-33C)。以上の結果から、Epe1 による cis-acting RNAi の活性化は mRNA 遺伝子のリピート数依存的であり、また Epe1 が cis-acting RNAi を活性化しなかった場合には、Epe1 によってその領域のヘテロクロマチンは除去されてしまうことが明らかになった。これらの結果は、H3K9me 除去因子である Epe1 は、標的 mRNA 遺伝子のリピート数に応じて、「H3K9me 修飾の除去」と「RNAi 経路の活性化による H3K9me 修飾の維持」という相反する二つの役割を果たしていることを示していた。

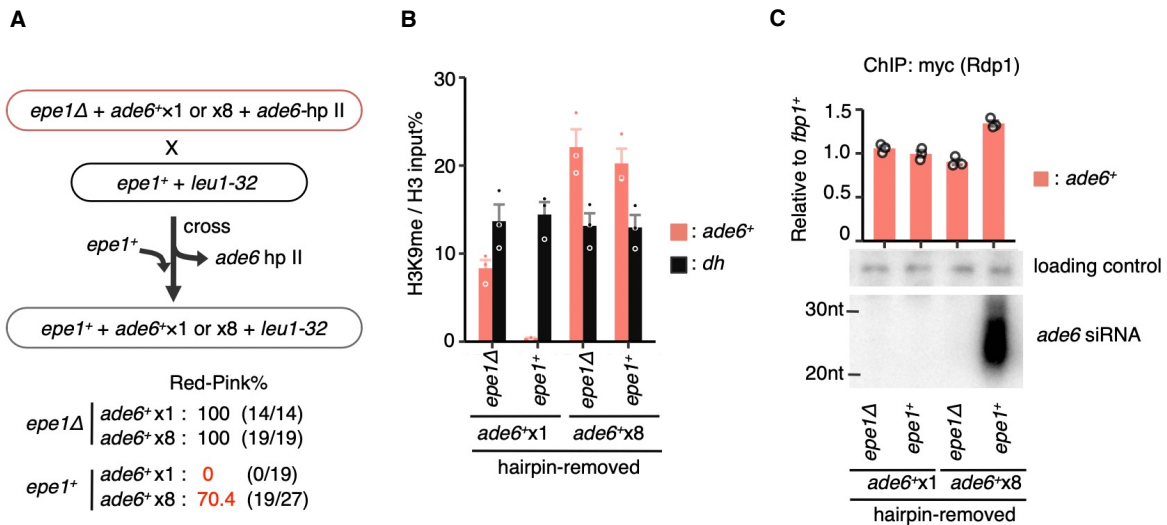


図3-33. H3K9meの伝達においてEpe1はリピート依存的に相反する二つの役割を果たす。

(A) *ade6-hp II* によってヘテロクロマチン化された*ade6⁺x1*または*ade6⁺x8*アレルを保有する*epe1Δ*株の赤/ピンク色 (*ade6*抑制) クローンを、親株の*epe1⁺*細胞と接合することで、*ade6-hpII*を取り除くと同時に*epe1⁺*遺伝子を戻す模式図。結果得られた各子孫クローンにおいて、*ade6-hp II*が取り除かれた後も赤/ピンク色 (*ade6*抑制) の表現型を維持するクローンが出現する割合(%)を示す。括弧内は実際に検証した子孫数の内訳を示す。

(B)(C)次にこの子孫クローンを(B)H3K9me、(C)RDRC構成要素Rdp1のChIP-qPCR (上段) と*ade6* siRNAのノーザンブロット解析 (下段) に用いた結果を示す。エラーバーはSEMを表し、独立した3回の実験から算出した。

第四章

考察

真核細胞におけるヘテロクロマチンは反復配列上において形成される傾向があることが古くことから指摘されてきたが、この結びつきを担う分子機構は未だ明らかになっていない。本研究ではモデル生物である分裂酵母を用い、タンデムリピートに配置された mRNA 遺伝子が、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を促進することを明らかにした。タンデムリピートになった mRNA 遺伝子それ自身はヘテロクロマチン形成を誘導しないものの、一度 trans に siRNA が供給されると、標的 mRNA 遺伝子がリピートになっている時に限り RNAi 経路が cis に siRNA を再生産し、その領域のヘテロクロマチンを維持するようになった。このリピートに配置された mRNA 遺伝子における自律的な RNAi 経路の活性化は、標的 mRNA 遺伝子のリピート数と、ヘテロクロマチン下の転写ユニットを脱抑制できる H3K9me 除去因子 Epe1 に依存的であった。解析の結果、Epe1 は標的 mRNA 遺伝子がリピートになっている場合、RNAi 経路を cis に活性化することでその領域のヘテロクロマチン形成を促進する一方、標的 mRNA 遺伝子が単独で存在している場合はその領域のヘテロクロマチンを除去してしまうことが明らかになった。ヘテロクロマチンの Eraser がリピートの数によって相反する 2 つの役割を果たすという今回の結果は、「なぜ真核細胞では反復配列においてヘテロクロマチン形成が促進されるのか」という問いに対して 1 つの解答を示すものである。

4-1 : Repeat-induced RNAi のモデルについて

「タンデムリピートになった mRNA 遺伝子によってヘテロクロマチン形成が促進される」という観点からみると、本研究における Repeat-induced RNAi は、これまで高等真核生物における遺伝子導入時に観察される現象として報告されてきた RIGS を、分裂酵母を用いて人工的な系で再現することに成功したものであると言える。上述したように、RIGS は様々なモデル生物で報告されてきた真核生物における普遍的な現象である。しかし一方でそのメカニズムに関しては未だコンセンサスが得られておらず、現在までに幾つかのモデルが提唱されている。これらのモデルで共通しているのが、タンデムに連なった mRNA 遺伝子自体が、ヘテロクロマチン形成の直接的な原因になるという点である。具体的には、これらのモデルでは、タンデムに連なった mRNA 遺伝子が i) DNA-DNA 相互作用、ii) 遺伝子量の閾値の超過、iii) 異常な転写産物などの原因となり、こういった異常が細胞に認識されることで RIGS が起きる可能性が考えられている[43-45]。これに対し本研究は、タンデムになった mRNA 遺伝子それ自身はヘテロクロマチン形成の原因にはならないことを示す一方で、cis-acting RNAi を促進するという特性があることを明らかにした。またこの特性に

より、一度 siRNA が供給されれば、その領域におけるヘテロクロマチンは RNAi 経路によって自律的に維持されるようになるということを示した。このように、本研究で明らかになった Repeat-induced RNAi は、RIGS における新しい考え方の枠組みを提案している。

4-1-1 : 標的 RNA の局所濃度モデル

本研究の結果、Repeat-induced RNAi の成立はタンデムになった標的 mRNA 遺伝子のリピート数に依存していることが明らかになった(図 3-27)。またこれと同時に、ヘテロクロマチン領域に存在する mRNA 遺伝子を脱抑制することができる H3K9me 除去因子 Epe1 も、その活性化に必要であることが明らかになった(図 3-28)。これらの結果から考えられるモデルは、ヘテロクロマチン領域下にリピートになった標的 mRNA 遺伝子が存在している場合、Epe1 による脱抑制によって RNAi 経路に必要な標的 RNA を十分量供給することが可能となり、その結果、その領域における cis-acting RNAi が促進されるというものである。加えて *ade6^{x(8+1)}* 株を用いた解析から、タンデムリピートになった mRNA 遺伝子が RNAi 経路を促進する効果は、そのコピー数に依存しているのではなく、標的 mRNA 遺伝子がゲノム上の一箇所にまとまって存在していることが重要であることが示された(図 3-22)。これらの結果を併せて考えると、タンデムリピートのようにゲノム上の一箇所に標的 mRNA がまとまっている場合にのみ、Epe1 による脱抑制が標的 RNA の濃度を核内で局所的に高めることが可能になるというのが最も蓋然性が高い説明だと考えられる(図 4-1)。先行研究において、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成には標的 mRNA 遺伝子の転写が必要である一方、その転写活性が強すぎるとヘテロクロマチン形成に対して逆効果であることが報告されている[46]。標的 mRNA 遺伝子がタンデムリピートであることによって、一つ一つの転写量は低いまま、RNAi 経路に十分量の標的 RNA を供給することができるというこのモデルは、不活性なヘテロクロマチン領域の形成にその領域の転写が必要という RNAi 経路の矛盾をうまく説明することができる。

注目すべきことに、本研究と同じく、ヘアピン RNA による trans-acting RNAi を用いた以前の研究によると、i) 標的 mRNA 遺伝子の 3'UTR を破壊した場合や、ii) 転写終結や、新生 RNA のクロマチン上からの解離に欠損が出る Pol2 結合因子複合体 Paf1C の変異体においては、標的 mRNA 遺伝子が単独で存在する状態でも RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成が促進されることが報告されている[18, 42]。これらの結果は転写終結異常等によって新生 RNA がクロマチン上に保持されることによっても、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成が促進されることを示唆している。特に Paf1C 変異体の研究では、一度 trans-acting RNAi によって *ade6* mRNA 遺伝子上にヘテロクロマチンが形成されると、ヘアピン RNA による siRNA の供給がなくなった後も、そのヘテロクロマチンは体細胞分裂、減数分裂を経て維持されるようにみえる結果が報告されている[18]。この結果は、Paf1C 変異体においては、単独で存在する *ade6* mRNA 遺伝子上で Repeat-induced RNAi と同様、自律的な cis-acting RNAi が確立することを示唆している。この結果は、転写終結異常等によって新

生 RNA がクロマチンから解離するステップが欠損すると、核内における標的 RNA の局所的な濃度が増加することで、タンデムになった mRNA 遺伝子と同じ効果を生み出すのではないかということを想像させる。

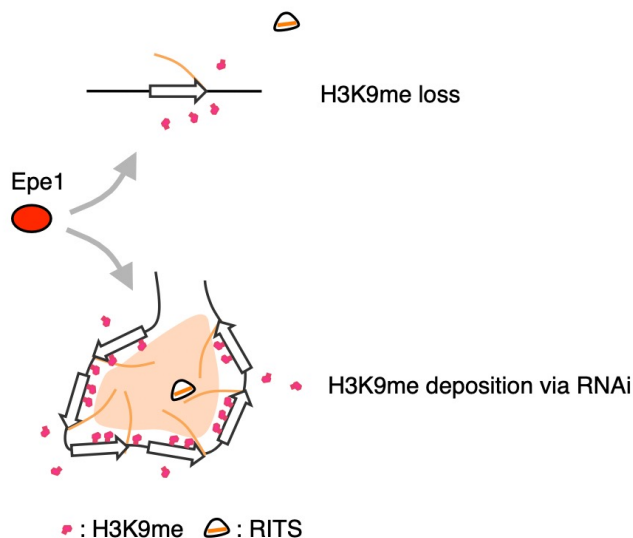


図4-1. H3K9me除去因子Epe1を介したRepeat-induced RNAiのモデル図。

サイレントなヘテロクロマチン下に標的mRNA遺伝子が独立して存在する場合、Epe1による脱抑制はRNAiマシーナリーが認識するのに十分量の標的RNAを供給できず、その結果H3K9meは除去される。一方、標的mRNA遺伝子がリピートになって存在している場合、Epe1による脱抑制によってRNAiマシーナリーが認識するのに十分量の標的RNAが供給され、その結果、その領域にH3K9meが補充されてヘテロクロマチンは維持されることになる。

一方最近の研究で、ヘアピン RNA の代わりに、ユークロマチン領域の一部をまるごとセントロメア近傍領域のヘテロクロマチン領域に挿入するという方法で trans な siRNA を産生した結果が報告されている[21]。この場合、挿入した領域に該当するユークロマチン領域に異所的なヘテロクロマチン形成が一度でも誘導されると、その後は trans な siRNA がなくなっても、その領域のヘテロクロマチンが維持されるということが示されている。注目すべきことに、この時の異所的なヘテロクロマチンの維持はその領域内に存在する隣り合った遺伝子群からの自律的な siRNA 産生を伴っている[21]。論文の著者らはこの siRNA の産生に Epe1 が必要かどうかの検討は行っていないため、Repeat-induced RNAi に沿った考え方をして良いのはまだ未確定であるものの、この結果は、複数種の siRNA がゲノム上で隣接する複数種の標的 mRNA 遺伝子を認識した場合、その標的 mRNA 遺伝子群は今回の研究におけるリピートになった mRNA 遺伝子と同様に機能し、自律的な cis-acting RNAi を確立するのではないか、ということ想像させる(図 4-2)。

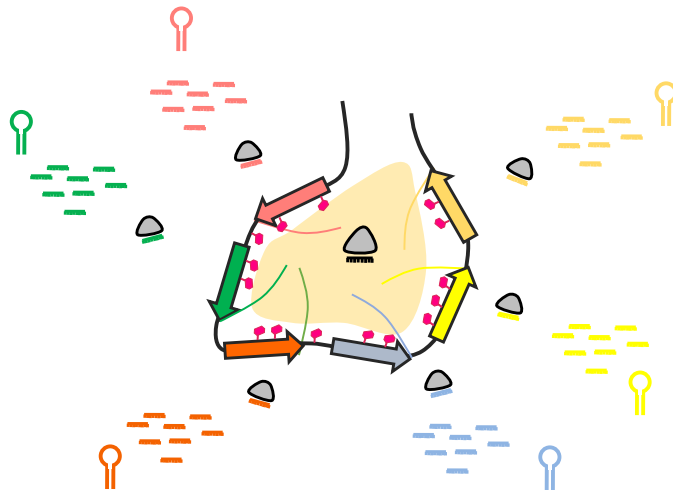


図4-2. 複数のsiRNAがゲノム上で隣接する標的mRNA遺伝子を認識した場合の模式図。

ゲノム上で互いに隣接した複数の標的遺伝子に対し、それぞれに対応する複数のsiRNAが同時に産生された場合、タンデムリピートに配置された単一の標的遺伝子の時と同じように、自律的なcis-acting RNAiを可能にするかもしれない。

4-1-2: 重合体としてのリピート mRNA 遺伝子と核膜吸着モデル

上記のような標的 RNA の局所濃度モデルとは別に、リピートになった mRNA 遺伝子それ自体がもつ物質的特性も、何らかの形で RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成に寄与している可能性がある。本研究で示した Repeat-induced RNAi は、これまで *dg/dh* 配列という特殊な ncRNA 転写ユニットに基づく現象であった RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を、「タンデムに配置された mRNA 遺伝子」という非常に単純な形にして再現したものであるといえる。このような単純化は、これまで RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成には難しかった生物物理学的なアプローチを可能にすると思われる。私は本研究に基づき、北海道大学創成研究機構化学反応創成拠点(WPI-ICReDD)の山本哲也特任准教授と共同研究を行い、生物物理学の理論を用いた Repeat-induced RNAi のモデル構築を試みた。その結果、リピートになった mRNA 遺伝子を構成ユニットの重合体としてみなすことで、その siRNA 産生におけるアドバンテージを説明できる可能性が示唆された[47]。具体的には、重合体はその構成ユニットの数が増えるほど表面吸着が促進するという物性を持つというソフトマター物理学の理論と、先行研究において Dcr1 が核膜に局在にしていることが報告されていることに着想を得て、mRNA 遺伝子がリピートになることで核膜への吸着効率が増し、その結果 siRNA 産生が促進されるというモデルを構築した [47]。この理論は幾つかの前提の上に成り立っているものの、本研究における実験結果をうまく説明しており、リピートとなった mRNA 遺伝子で RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成が促進さ

れる理由を別の視点から説明している。このモデルは前節のモデルと背反するものではなく、両者の効果が同時に寄与している可能性も考えられる。昨今、ヘテロクロマチンと相転移の関係性について指摘する論文が相次いでいる。プロモーターの強さ、mRNA 遺伝子の長さ、リピートの数など各種パラメータを任意に設定することが出来る Repeat-induced RNAi は、今後こういった生物物理学的な視点から RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成を解析する際に良い研究対象となる可能性がある。

4-2 : Repeat-induced RNAi は H3K9me の補充と除去のバランスの上に成り立っている

注目すべきことに、Epe1 OP は *dg/dh* 配列においては RNAi 経路の過剰な活性化を引き起こす一方で、*ade6⁺x8* アリルにおける Repeat-induced RNAi では過剰な活性化を誘導せず、むしろ H3K9me 修飾を取り除いてしまった(図 3-29A,B)。この結果は、Repeat-induced RNAi を介したヘテロクロマチン形成が、RNAi 経路による H3K9me の補充と、Epe1 による H3K9me 除去のバランスの上に成り立っていることを如実に示している。通常のエペ1の発現レベルでは *ade6⁺x8* アリル上の Repeat-induced RNAi における H3K9me の補充と除去はバランスが取れている一方、Epe1 を過剰発現するとこのバランスが崩れ、H3K9me の除去が優勢になるのだと考えられる。一方で、*dg/dh* 配列における RNAi 経路においても、Epe1 OP によって RNAi 経路が過剰に活性化されるにも関わらず、その領域の H3K9me 量の増加は確認されなかった(図 3-2)。また更に Epe1 OP のレベルを増加させると、*dg/dh* 配列における H3K9me が減少することが確認されている(図 3-29C, D, E) [25]。この結果は、Repeat-induced RNAi と同様、*dg/dh* 配列における RNAi 経路も、H3K9me の補充と除去のバランスの上に成り立っていることを示唆している。このバランスがどこで成立するかは、Epe1 の量、リピート数、および標的 RNA の性質といった要因が影響を与えたと考えられる。

4-3 : *ade6⁺*アリル上流領域で検出される siRNA について

留意すべきこととして、small RNA-seq 解析の過程で、幾つかの株で *ade6⁺* TSS の上流に少ないながらも有意なレベルで siRNA が産生されていることが確認された(図 3-32)。これらの siRNA は *ade6⁺x1* 株 (*ade6⁺x1 epe1Δ +ade6-hp II*) でも検出されたことから、その産生はリピートになった *ade6⁺* 遺伝子アリルの構造に由来している訳ではないことが示唆された。更に、これらの siRNA は *ade6* siRNA が産生されていない状況下でも検出されたことから、*ade6* siRNA の産生とは独立したメカニズムに由来していることが示唆された (*ade6⁺x8 epe1Δ R hairpin-removed*)。その一方で、*dcr1Δ*によってこの siRNA 産生は消失することから、RNAi 経路による siRNA 産生であることは間違いないと考えられた (*ade6⁺x8 dcr1Δ hairpin-removed*)。注目すべきことに、*ade6⁺* TSS の上流で siRNA 産生が確認される株を調べてみると、その領域が高いレベルの H3K9me 修飾で覆われている、という共通点があった(図 3-32, 下段)。このことから考えられる説明としては、H3K9me はそれ自身で

RDRC のヘテロクロマチン局在を促進する性質があるため[16,17]、*ade6*⁺アリルに形成された異所的ヘテロクロマチンに向かって外側のユークロマチン領域から流れ込んでくるような転写が起きた場合、その転写産物が *ade6*⁺アリルに形成されている異所的ヘテロクロマチンに局在している RDRC によって認識され、このような siRNA の産生に至っているという可能性が考えられた。実際、*ade6* アリルに向かってこのような転写を起こす可能性のある遺伝子の候補としては *new25*⁺遺伝子などがあるが、これらの株ではこの遺伝子は H3K9me に覆われておらず、転写が起きていることが予想された。

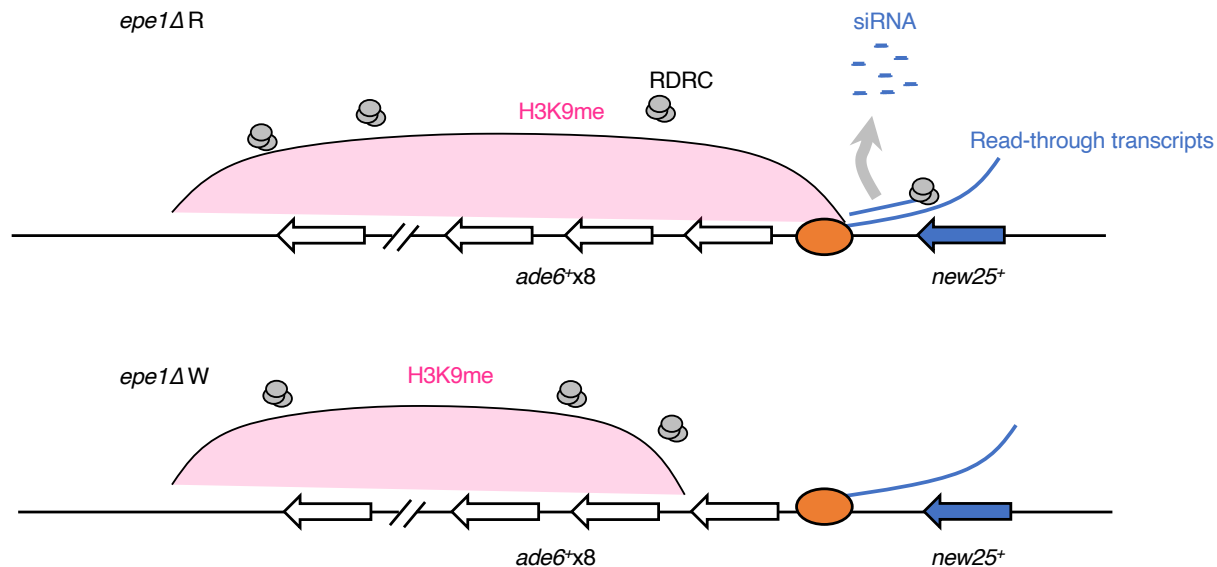
上記の仮説を支持する一つの根拠としては、*ade6*⁺ TSS 上流の siRNA の有無が *ade6*⁺x8 *epe1*Δ hairpin-removed クローンの赤 (*ade6* 抑制) と白 (*ade6* 発現) の表現型と連動していることが挙げられる (図 3-32, *ade6*⁺x8 hairpin-removed *epe1*Δ R または W)。理屈上、*ade6*⁺x8 株は、その *ade6*⁺コピーのうちの 1 つが脱抑制されただけでも、細胞は白い (*ade6* 発現) 表現型のコロニーを形成する。ChIP-seq の解析上では H3K9me 量は W 株と R 株であまり変わらないように見えるが、この *ade6*⁺x8 *epe1*Δ W 株の白い表現型は *ade6*⁺x8 アリルのコピーの一つが H3K9me 修飾を失い脱抑制していることを示唆している (ChIP-seq 解析では *ade6*⁺x8 アリルにおける各 *ade6*⁺コピーの H3K9me レベルを区別できないことに留意)。よって、*ade6*⁺x8 *epe1*Δ R で存在する *ade6*⁺ TSS 上流の siRNA が *ade6*⁺x8 *epe1*Δ W では消失するというこの結果は、*ade6*⁺ TSS 上流の siRNA 産生が *ade6* アリルに形成されたヘテロクロマチンに起因していることを示唆している。具体的には、*ade6*⁺x8 *epe1*Δ W 細胞では、外部から流れ込んでくる転写に直面する *ade6*⁺x8 アリルの最も外側の *ade6* コピーが H3K9me 修飾を失っているため、この siRNA の産生が見られなくなっている、といったことが予想される (図 4-3)。ヘテロクロマチン領域の外側から転写を起こして標的 RNA を供給することでも、siRNA 産生を誘導することが出来る可能性がある、というこの考察に立って考えると、Epe1 とリピートになった標的 mRNA 遺伝子という組み合わせは、標的 RNA の供給をヘテロクロマチン内部で成り立たせるための仕組みであると解釈することができる。

図4-3. *epe1*Δの表現型と*ade6*⁺アリル上流でのsiRNA産生が連動することを説明する仮説

*epe1*Δ R (Red, *ade6*⁺抑制) と *epe1*Δ W (White, *ade6*⁺発現) の表現型クローンにおける予想される異所的ヘテロクロマチンの分布とそれに伴う siRNA 産生メカニズムを示す。 *epe1*Δ R において *new25*⁺ から流れ込んでくる Read-through 転写産物が *ade6*⁺x8 アリルに形成されているヘテロクロマチンに到達すると、その領域に H3K9me 依存的に呼び込まれている RDRC に認識され、siRNA 産生に至る。一方、*epe1*Δ W では一番外側の *ade6*⁺ コピーが脱抑制しており、Read-through 転写産物はヘテロクロマチンに到達できない。

(次ページ、図 4-3)

(図 4-3、続き)



4-4 : *dg/dh* 配列における RNAi と Repeat-induced RNAi の比較

4-4-1 : *dg/dh* 配列のみが持つ特徴について

dg/dh 配列において RNAi 経路がヘテロクロマチン形成を促進していることが明らかになって以来、何故 *dg/dh* から転写される ncRNA が RNAi 経路の標的になっているのか、という問いはこの分野の重要なテーマの一つであった。これまでの研究により、*dg/dh* 配列は通常の mRNA 遺伝子とは異なる幾つかの特徴を持っていることが報告されてきた。これにはヘテロクロマチン耐性プロモーターの存在 [9, 41]、センス鎖アンチセンス鎖の両鎖が転写される双方向性転写[48]などが含まれ、こういった特徴は *dg/dh* 配列が RNAi 経路の標的として機能することに関与していると考えられてきた。また、これらの特徴に加えて、*dg/dh* ncRNA のスプライシングが RNAi 経路の活性化に寄与する可能性も指摘されている[49]。

本研究で行った 5'RACE 解析により、性決定領域における *dg/dh* 配列である *cenH* 配列には、Epe1 非依存的なヘテロクロマチン耐性 TSS (major TSS) と、Epe1 依存的なヘテロクロマチン感受性 TSS (widespread TSSs) の 2 種類の TSS が存在していることが明らかになった。このうち Epe1 非依存的なヘテロクロマチン耐性 TSS は、セントロメア近傍領域の *dg/dh* 配列において以前報告されたヘテロクロマチン耐性プロモーターのカウンターパートだと思われる[9, 41]。一方で、本研究で行ったプラスミドベースのミニ染色体を用いた *cenH* 配列の truncation 解析により、widespread TSS のみを含む *cenH* 領域の断片のみで RNAi

経路を介したヘテロクロマチン形成を確立できることが明らかになった(図 3-12)。この結果は、Epe1 非依存的なヘテロクロマチン耐性 TSS は RNAi を介したヘテロクロマチン形成には必須ではないことを意味していた。同じくプラスミドベースのミニ染色体を用いた以前の研究で、ヘテロクロマチン耐性プロモーターが RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成に必要であるとの報告があるが[41]、論文中に記載されているプライマー情報を確認したところ、プライマー位置の誤認に起因した誤った結論であることが確認された。

本研究で作成したタンデムリピートになった *ade6* アリルにおいては、少なくともノーザンブロット 解析や RT-PCR 解析でみる限り、リピート特異的なアンチセンス転写産物は確認されなかった(図 3-15)。*ade6*⁺リピートからこういった異常な転写産物が産生されていないことを完全に証明することは不可能であるが、Repeat-induced RNAi における siRNA 産生パターンが *ade6* 遺伝子の転写ユニットと一致しているという結果は(図 3-25)、*ade6* mRNA 自体がその標的になっていることを示唆している。また今回 Repeat-induced RNAi の標的遺伝子として用いた *ade6*⁺遺伝子は、イントロンを持っていない mRNA 遺伝子である。したがって、本研究において、リピートになった *ade6*⁺mRNA 遺伝子で Repeat-induced RNAi が成立することが示されたことによって、上記で挙げた *dg/dh* ncRNA の特徴、ヘテロクロマチン耐性プロモーターの存在、センス鎖アンチセンス鎖の双方向転写、そしてスプライシングは、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成に必須ではないことが明らかになった。これらの特徴は、本研究でヘアピン RNA によって代替されている初期型 siRNA の産生や、標的 RNA が RNAi 因子にもっと効率的に認識される仕組みに関与している可能性がある。実際先行研究によって、RDRC が欠損した細胞においても *dg/dh* 配列から siRNA が産生されていることが報告されており、*dg/dh* 配列はそれ自身に初期型 siRNA を産生する仕組みを内包していることが予想される[42]。また、本研究の解析では *dg/dh* 配列全体で ncRNA が転写される widespread TSS の存在が確認されたが、先行研究によれば *dg/dh* siRNA の産生領域は *dg/dh* 配列の一部の領域に限定されていることが報告されており[50]、*dg/dh* ncRNA の一部の集団はより効率的に RNAi 因子に認識される仕組みを持っていることが予想される。

4-4-2: 「widespread TSS を持つ転写ユニット」と「タンデムリピートの mRNA 遺伝子」の類似性について

dg/dh 配列における RNAi 経路とタンデムリピートになった mRNA 遺伝子における Repeat-induced RNAi を比較する際に、転写ユニットの存在様式の違いが重要なポイントとして挙げられる。タンデムリピートになった mRNA 遺伝子は、その名の通り、プロモーター領域、5'UTR, ORF, 3'UTR, 転写終結点を含む領域がアンプリコン(単位配列)としてリピートになることで構成されている。本研究において、Epe1 によって誘導される転写産物はヘテロクロマチン下の DNA 配列に依存していることが示されていることから(図 3-11)、Repeat-induced RNAi によるヘテロクロマチン形成が起きている際に Epe1 によって産生される標

的 mRNA はこの転写ユニットに沿ったものになっていると予想される。一方で *dg/dh* 配列の場合、タンDEMリピートになった mRNA 遺伝子に相当した役割を担っていると考えられるのは *widespread TSS* という特徴だが、この *widespread TSS* が具体的にどのような転写産物を産生しているかは現段階では不明である。これを解明するには例えば *Epe1 OP* によって *dg/dh ncRNA* の発現量を増加させた条件下で完全長 cDNA 合成を行い、ロングリードを解析可能なナノポアや Pacbio と行った第三世代シーケンサーで塩基配列決定を行うことが考えられる。ただし、*dg/dh ncRNA* の発現量は *Epe1 OP* 条件下であっても他の mRNA 遺伝子と比べて特段に高い訳ではないので、十分な解析を行うためにはかなりのリード数を読む必要があると思われる。予備的な実験として、私は *Epe1OP* 株で完全長 cDNA ライブラリーを作成後、*SLIP* と呼ばれる方法で *dh* や *cenH* 由来の cDNA クロームを選択的に濃縮し、その塩基配列の決定を試みている。しかし、この方法では計二十個程度の cDNA の塩基配列の決定に成功した程度で、その全体像を把握することは出来なかった。この解析で確認できた事実としては、同一の転写開始点から転写されている ncRNA が異なった転写終結点で終わる場合があることや、異なった転写開始点から転写されている ncRNA が同一の転写終結点で終わっているものが存在するということであった。先行研究において、RNAi 経路が欠損している細胞を用いて PolyA-seq 解析を行い、転写終結点をプロファイリングした実験では、*dg/dh* 配列内に複数の転写終結点が発見されたことが報告されている[42]。また、このこと一致して、本研究で行った *cenH ncRNA* の 3'RACE 解析においても、解析領域中に複数の転写終結点が発見された(図 3-9)。これらの結果から推測するに、*dg/dh ncRNA* の実体は、*widespread TSS* から転写された RNA が *dg/dh* 配列内に複数存在する polyA サイトにおいて、ランダムに転写終結したヘテロな集団であることが予想される。

このような ncRNA が転写されていることが予想される *dg/dh* 配列がどのようにタンDEMリピートになった mRNA 遺伝子と同等の機能を果たしているのか、そのメカニズムはやはり *widespread TSS* という特徴と関連していると予想される。CAGE-seq の結果によれば、*widespread TSS* は *dg/dh* 配列全体に偏在しており、実際に 5'RACE で *cenH ncRNA* の詳細な解析を行った場合も、検出された最も近い隣接した TSS 間の距離はわずか 3 bp であることが確認された(図 3-9)。理屈上、このように非常に近接した TSS から転写が起きると、それらの TSS から産生される ncRNA は互いに同じ配列を含むことになる。このことが、タンDEMになった mRNA 遺伝子と同様に、ヘテロクロマチン存在下で標的 RNA の濃度を局所的に高くする効果を持つ理由である可能性が考えられる。

留意しなければならないのが、そもそも *dg/dh* 配列は種を超えて高度に保存されているような特別な配列ではないことである。分裂酵母の近縁種ですらこの配列は保存されており、これらの近縁種におけるセントロメア近傍領域の配列は、他の塩基配列からなるリピート配列やトランスポゾンのクラスターによって構成されている[51]。*dg/dh* 配列の由来は正確には明らかになっていないが、この配列も元々はトランスポゾンに由来している可能性が提案されている[52]。本研究によって、タンDEMリピートになった mRNA 遺伝子で RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成が成立することが明らかになったことを考える

と、*dg/dh* 配列も当初は転写ユニットが連なったような単純な構造をしていたのが、進化の過程で最適化され、RNAi 経路に必要な要素のみから構成される特殊な転写ユニットに変化していった可能性が予想される。

4-5 : Repeat-induced RNAi の普遍性について

4-5-1:RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成機構の普遍性について

分裂酵母は、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成の研究が最も進んでいるモデル生物の一つである。RNAi 機構自体は広く真核生物に保存されていることが知られており、分裂酵母で見られるような siRNA を介したヘテロクロマチン形成機構は他の多くの真核生物にも存在していることが予想される。実際、特に植物においては分裂酵母における RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成機構と非常に似たメカニズムが存在することが知られており、その研究が進められている。しかしその一方で、ヒトを含む哺乳類においては、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成機構の研究はあまり進んでいないのが実情である。分裂酵母を用いた研究で、RNAi 因子を欠失した細胞でセントロメア近傍領域のヘテロクロマチンが欠損することが明らかになった後[48]、哺乳類細胞を用いて RNAi 経路を欠損した時に同様の影響が見られるかどうかの解析が行われたが、この時、そこまで明確な結果が得られなかったことが、その後研究があまり進まなくなった原因の一つであると思われる[53,54]。また、RIGS における RNAi 経路の関与については、ハエや線虫、そして植物においては RIGS に RNAi 因子が関与していることを示唆する研究結果が報告されている一方 [44, 55, 56]、アカパンカビや哺乳類細胞に関しては RNAi 経路の関与を否定する結果が報告されている[57, 58]。気をつけなければならないのは、幾つかの異なった経路が冗長に機能してヘテロクロマチンを維持している場合や、ヘテロクロマチンの自己伝播能自体が何らかの仕組みで補強されている場合、単純に RNAi 経路を破壊しただけではその影響が見えにくくなっているケースがあることである。今後更に研究が進むことで、RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成がヒトを含む高等真核生物でどの程度保存されているのか、明らかになってくるとと思われる。

4-5-2:単純な反復配列における Repeat-induced RNAi についての考察

また、Repeat-induced RNAi の普遍性について考える際に特に考慮すべき点は、例えばヒトやマウスの染色体のセントロメア近傍領域に存在するサテライトリピートのような、特定の塩基配列が繰り返される単純な反復配列においても、今回の Repeat-induced RNAi と同様の機構が機能するかどうかということである。本研究は、分裂酵母の染色体のセントロメア近傍領域に存在している *dg/dh* 配列には、mRNA と同じコアプロモーター構造を持つ傾向がある TSS が遍在しており(図 3-8)、そこから転写される ncRNA によって活性化され

る RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成は、Epe1 依存的であること示した(図 3-1,2)。この結果は、*dg/dh* 配列における RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成は、タンデムリピートになった mRNA 遺伝子における Repeat-induced RNAi の言わば”変化形”であることを示唆している。このような Repeat-induced RNAi の柔軟性を考えると、mRNA 遺伝子をコードしていない単純な反復配列であっても、転写さえ起きるのであれば同様の機構が機能するのではないかと予想される。実際、哺乳類細胞を用いた研究でも、セントロメア近傍領域に存在するサテライトリピート由来の転写産物が確認されることが広く知られている。

4-5-3: アンチサイレンシング因子 Epe1 の普遍性について

本研究で明らかにされた Repeat-induced RNAi の最も興味深い点は、その成立に本来は逆の役割を持つ H3K9me 除去因子 Epe1 が必要なことである。Epe1 はヒストン脱メチル化酵素で共通してみられる JmjC ドメインを持っており、そのドメインのアミノ酸配列からはヒトにおける KDM2A/B のオーソログであると推測されている。しかし、その全長のアミノ酸配列からみてオーソログと断定できる高等真核生物の遺伝子は現在のところ同定されていない。留意しなければならないのが、Epe1 は *in vivo* では明らかに H3K9me 除去の役割を担っているものの[22,23]、*in vitro* の実験ではその脱メチル化活性が検出されていないことである[59]。また一方で、Epe1 の N 末端にはそれ単独で転写活性可能をもつドメインが存在するのではないかということが幾つかの論文によって指摘されている。その根拠は、出芽酵母を用いた Y2H などの実験を行った際に、Epe1 や Epe1 の N 末端を DNA 結合ドメイン(bait)と融合させただけで、レポーター遺伝子の発現が観察されることなどに基づいている[60,61]。この結果と一致して、Epe1 の JmjC ドメインの変異体を過剰発現した時にも、ヘテロクロマチン領域において転写活性化が起きることが報告されており、JmjC ドメインの機能がその転写活性化に必須ではないことが示唆されている[28]。(ただしこの結果は、「OP 条件下では」という条件付きであることに留意せねばならない。)このような背景があるため、実際のところ、Epe1 が H3K9me 除去することによってヘテロクロマチン領域内の転写を活性化するのか、もしくは転写を活性化することによってヒストンのターンオーバーが起き H3K9me が除去されるのか、現在のところ明確な結論は出ていない。

Epe1 がどのようにヘテロクロマチン領域の転写を促進しているのか、そのメカニズムを明らかにする方法の一つとしては、Epe1 OP によってヘテロクロマチン内部に挿入された mRNA 遺伝子が脱抑制することを利用して(図 3-10)、その発現が再度抑制されることを指標にした遺伝学的スクリーニングを行うことが挙げられる。このようなスクリーニングを行うことで、Epe1 がヘテロクロマチン領域の転写を活性化するために必要なファクターXだけでなく、Epe1 自体の変異体も多数単離することが出来る。この時、もし Epe1 に存在する特定のドメインがその転写活性化に必要だった場合、取れてくる Epe1 変異体の変異箇所がそのドメイン領域に集中することが期待された。実際にそのようなスクリーニングを予備的に行った結果、私は多数の Epe1 変異体を単離することに成功した。しかし、予想

に反して、それらの変異体の変異箇所は Epe1 蛋白質の特定の領域に集中しておらず、その全体に満遍なく散らばっていた。このような結果が得られた理由の一つは、Epe1 の挙動自体が複雑な制御を受けていることに起因していると思われる。具体的な例としては、一見 Epe1 がヘテロクロマチンに局在することとは無関係に思われるような JmjC ドメインの点変異体でも、Epe1 のヘテロクロマチン局在能が欠損してしまうことが先行研究によって報告されている[61]。

一方で、この時のスクリーニングで、私は最終的に Swi6/HP1(T278A)という変異体の単離にも成功している。T278A は、Swi6 の CSD (Chromo-Shadow Domain) と呼ばれる領域のミスセンス変異体である。CSD は、HP1 ホモログ Swi6 がホモダイマーを形成するのに必要なドメインで、そのダイマー形成により CSD ドメイン領域にできるポケットは様々な蛋白質と結合することが知られており、ヘテロクロマチン領域にエフェクターを呼び込むプラットフォームとして機能すると考えられている。その後の解析で T278A 変異体にはダイマー形成能に異常がないこと、ヘテロクロマチン領域における H3K9me 量は野生株レベルに維持されていること、Swi6 自体のヘテロクロマチン結合量は半減するものの維持されていることなどが確認されている[62]。このような Swi6 変異体が Epe1 OP スクリーニングで取れてくるということは、「Epe1 OP 条件下による脱抑制においても」Epe1 が H3K9me 結合因子である Swi6 を介してその機能を発揮していることを示唆している。このように、H3K9me 除去因子が H3K9me 結合因子を介してその機能を発揮するという状況は、Epe1 がどう H3K9me 除去能を発揮しているのかという問題を考える際にあたってより事態を複雑化している。H3K9me 修飾、H3K9me 結合因子 Swi6、そして H3K9me 修飾除去因子 Epe1 の関係性を明らかにするには、in vivo による解析だけでは不十分で、ヘテロクロマチンを部分的に再現したような高度な in vitro の実験系が必要だと思われる。

一方で、Repeat-induced RNAi を成り立たせるには、ヘテロクロマチン下の DNA の転写を活性化するような仕組みが必要なのであって、それが必ずしも H3K9me 脱メチル化酵素である必要はないと考えられる。実際、ヘテロクロマチン領域に直接基本転写因子を呼び込むことでヘテロクロマチン領域の転写を誘導するアンチサイレンシング機構の存在が植物やハエで報告されており[63, 64]、このようなメカニズムは普遍的であることが予想される。Epe1 もそういった機構の一つの形である可能性がある。このようなアンチサイレンシング機構を介して、今回明らかにした Repeat-induced RNAi と同様のメカニズムが高等真核生物においても機能しているかどうかを明らかにするため、今後も更なる研究が期待される。

参考文献

1. Allshire, R. C. & Madhani, H. D. Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 229–244 (2018).
2. Pontecorvo G. Structure of heterochromatin. *Nature.*, 153:365–367. (1944)
3. Saksouk, N., Simboeck, E. & Déjardin, J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* **8**, 3 (2015).
4. Muller, H., Gil, J. & Drinnenberg, I. A. The Impact of Centromeres on Spatial Genome Architecture. *Trends Genet.* **35**, 565–578 (2019).
5. Henikoff, S. Conspiracy of silence among repeated transgenes. *BioEssays* **20**, 532–535 (1998).
6. Cam, H. P. *et al.* Comprehensive analysis of heterochromatin- and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome. *Nat. Genet.* **37**, 809–819 (2005).
7. Holoch, D. & Moazed, D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 71–84 (2015).
8. Kato, H. *et al.* RNA Polymerase II Is Required for RNAi-Dependent Heterochromatin Assembly. *Science* **309**, 467–469 (2005).
9. Djupedal, I. *et al.* RNA Pol II subunit Rpb7 promotes centromeric transcription and RNAi-directed chromatin silencing. *Genes Dev.* **19**, 2301–2306 (2005).
10. Verdell, A. *et al.* RNAi-Mediated Targeting of Heterochromatin by the RITS Complex. *Science* **303**, 672–676 (2004).
11. Bayne, E. H. *et al.* Stc1: A Critical Link between RNAi and Chromatin Modification Required for Heterochromatin Integrity. *Cell* **140**, 666–677 (2010).
12. Motamedi, M. R. *et al.* Two RNAi Complexes, RITS and RDRC, Physically Interact and Localize to Noncoding Centromeric RNAs. *Cell* **119**, 789–802 (2004).
13. Colmenares, S. U., Buker, S. M., Buhler, M., Dlakić, M. & Moazed, D. Coupling of Double-Stranded RNA Synthesis and siRNA Generation in Fission Yeast RNAi. *Mol. Cell* **27**, 449–461 (2007).

14. Noma, K. *et al.* RITS acts in cis to promote RNA interference–mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat. Genet.* **36**, 1174–1180 (2004).
15. Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Moazed, D. & Grewal, S. I. S. RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 152–157 (2005).
16. Hayashi, A. *et al.* Heterochromatin protein 1 homologue Swi6 acts in concert with Ers1 to regulate RNAi-directed heterochromatin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 6159–6164 (2012).
17. Rougemaille, M. *et al.* Ers1 links HP1 to RNAi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 11258–11263 (2012).
18. Kowalik, K. M. *et al.* The Paf1 complex represses small-RNA-mediated epigenetic gene silencing. *Nature* **520**, 248–252 (2015).
19. Simmer, F. *et al.* Hairpin RNA induces secondary small interfering RNA synthesis and silencing in trans in fission yeast. *EMBO Rep.* **11**, 112–118 (2010).
20. Iida, T., Nakayama, J. & Moazed, D. siRNA-Mediated Heterochromatin Establishment Requires HP1 and Is Associated with Antisense Transcription. *Mol. Cell* **31**, 178–189 (2008).
21. Yu, R., Wang, X. & Moazed, D. Epigenetic inheritance mediated by coupling of RNAi and histone H3K9 methylation. *Nature* **558**, 615–619 (2018).
22. Audergon, P. N. C. B. *et al.* Restricted epigenetic inheritance of H3K9 methylation. *Science* **348**, 132–135 (2015).
23. Raganathan, K., Jih, G. & Moazed, D. Epigenetic inheritance uncoupled from sequence-specific recruitment. *Science* **348**, 1258699 (2015).
24. Zhang, K., Mosch, K., Fischle, W. & Grewal, S. I. S. Roles of the Clr4 methyltransferase complex in nucleation, spreading and maintenance of heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 381–388 (2008).
25. Zofall, M. & Grewal, S. I. S. Swi6/HP1 Recruits a JmjC Domain Protein to Facilitate Transcription of Heterochromatic Repeats. *Mol. Cell* **22**, 681–692 (2006).
26. Ayoub, N. *et al.* A Novel jmjC Domain Protein Modulates Heterochromatization in Fission Yeast. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4356–4370 (2003).

27. Wang, J. *et al.* Epe1 recruits BET family bromodomain protein Bdf2 to establish heterochromatin boundaries. *Genes Dev.* **27**, 1886–1902 (2013).
28. Trewick, S. C., Minc, E., Antonelli, R., Urano, T. & Allshire, R. C. The JmjC domain protein Epe1 prevents unregulated assembly and disassembly of heterochromatin. *EMBO J.* **26**, 4670–4682 (2007).
29. Watt, S. *et al.* urg1: A Uracil-Regulatable Promoter System for Fission Yeast with Short Induction and Repression Times. *PLoS ONE* **3**, e1428 (2008).
30. Maundrell, K. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127–130 (1993).
31. Hayashi, A. & Tanaka, K. Short-Homology-Mediated CRISPR/Cas9-Based Method for Genome Editing in Fission Yeast. *G3: GenesGenomesGenet.* **9**, 1153–1163 (2019).
32. Kawakami, K., Hayashi, A., Nakayama, J. & Murakami, Y. A novel RNAi protein, Dsh1, assembles RNAi machinery on chromatin to amplify heterochromatic siRNA. *Genes Dev.* **26**, 1811–1824 (2012).
33. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S. E. WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190 (2004).
34. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high- throughput sequencing reads. *EMBnet J.* **17**: 10–12 (2011).
35. Plessy, C. *et al.* Linking promoters to functional transcripts in small samples with nanoCAGE and CAGEscan. *Nat. Methods* **7**, 528–534 (2010).
36. Asanuma, T., Inagaki, S., Kakutani, T., Aburatani, H. & Murakami, Y. Tandemly repeated genes promote RNAi-mediated heterochromatin formation via an antisilencing factor, Epe1, in fission yeast. *Genes Dev.* **36**, 1145–1159 (2022).
37. Bao, K., Shan, C.-M., Moresco, J., Yates, J. & Jia, S. Anti-silencing factor Epe1 associates with SAGA to regulate transcription within heterochromatin. *Genes Dev.* **33**, 116–126 (2019).
38. Li, H. *et al.* Genome-wide analysis of core promoter structures in *Schizosaccharomyces pombe* with DeepCAGE. *RNA Biol.* **12**, 525–537 (2015).
39. Grewal, S. I. S. & Klar, A. J. S. A Recombinationally Repressed Region Between *mat2* and

- mat3 Loci Shares Homology to Centromeric Repeats and Regulates Directionality of Mating-Type Switching in Fission Yeast. *Genetics* **146**, 1221–1238 (1997).
40. Jia, S., Noma, K. & Grewal, S. I. S. RNAi-Independent Heterochromatin Nucleation by the Stress-Activated ATF/CREB Family Proteins. *Science* **304**, 1971–1976 (2004).
41. Buscaino, A. *et al.* Distinct roles for Sir2 and RNAi in centromeric heterochromatin nucleation, spreading and maintenance. *EMBO J.* **32**, 1250–1264 (2013).
42. Yu, R., Jih, G., Iglesias, N. & Moazed, D. Determinants of Heterochromatic siRNA Biogenesis and Function. *Mol. Cell* **53**, 262–276 (2014).
43. Gladyshev, E. & Kleckner, N. DNA sequence homology induces cytosine-to-thymine mutation by a heterochromatin-related pathway in *Neurospora*. *Nat. Genet.* **49**, 887–894 (2017).
44. Luo, Z. & Chen, Z. Improperly Terminated, Unpolyadenylated mRNA of Sense Transgenes Is Targeted by RDR6-Mediated RNA Silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 943–958 (2007).
45. Schubert, D. *et al.* Silencing in *Arabidopsis* T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects. *Plant Cell* **16**, 2561–2572 (2004).
46. Shimada, Y., Mohn, F. & Bühler, M. The RNA-induced transcriptional silencing complex targets chromatin exclusively via interacting with nascent transcripts. *Genes Dev.* **30**, 2571–2580 (2016).
47. Yamamoto, T., Asanuma, T. & Murakami, Y. Polymeric nature of tandemly repeated genes enhances assembly of constitutive heterochromatin in fission yeast. *Commun. Biol.* **6**, 796 (2023).
48. Volpe, T. A. *et al.* Regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by RNAi. *Science* **297**, 1833–1837 (2002).
49. Bayne, E. H. *et al.* Splicing Factors Facilitate RNAi-Directed Silencing in Fission Yeast. *Science* **322**, 602–606 (2008).
50. Djupedal, I. *et al.* Analysis of small RNA in fission yeast; centromeric siRNAs are potentially generated through a structured RNA. *EMBO J.* **28**, 3832–3844 (2009).
51. Rhind, N. *et al.* Comparative Functional Genomics of the Fission Yeasts. *Science* **332**, 930–936 (2011).
52. Dawe, R. K. RNA Interference, Transposons, and the Centromere. *Plant Cell* **15**, 297–301

(2003).

53. Kanellopoulou, C. *et al.* Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* **19**, 489–501 (2005).
54. Murchison, E. P., Partridge, J. F., Tam, O. H., Cheloufi, S. & Hannon, G. J. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 12135–12140 (2005).
55. Pal-Bhadra, M. *et al.* Heterochromatic Silencing and HP1 Localization in *Drosophila* Are Dependent on the RNAi Machinery. *Science* **303**, 669–672 (2004).
56. Kim, J. K. *et al.* Functional Genomic Analysis of RNA Interference in *C. elegans*. *Science* **308**, 1164–1167 (2005).
57. Wang, F. *et al.* The Assembly and Maintenance of Heterochromatin Initiated by Transgene Repeats Are Independent of the RNA Interference Pathway in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4028–4040 (2006).
58. Freitag, M. *et al.* DNA Methylation Is Independent of RNA Interference in *Neurospora*. *Science* **304**, 1939–1939 (2004).
59. Tsukada, Y. *et al.* Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811–816 (2006).
60. Braun, S. *et al.* The Cul4-Ddb1Cdt2 Ubiquitin Ligase Inhibits Invasion of a Boundary-Associated Antisilencing Factor into Heterochromatin. *Cell* **144**, 41–54 (2011).
61. Sorida, M. *et al.* Regulation of ectopic heterochromatin-mediated epigenetic diversification by the JmjC family protein Epe1. *PLoS Genet.* **15**, e1008129 (2019).
62. Takahata, S. *et al.* Two secured FACT recruitment mechanisms are essential for heterochromatin maintenance. *Cell Rep.* **36**, 109540 (2021).
63. Andersen, P. R., Tirian, L., Vunjak, M. & Brennecke, J. A heterochromatin-dependent transcription machinery drives piRNA expression. *Nature* **549**, 54–59 (2017).
64. Law, J. A. *et al.* Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. *Nature* **498**, 385–389 (2013).

謝辞

本研究を行うにあたり、最後までやり切らせて頂いた村上洋太先生に厚く御礼申し上げます。主体的に研究することの楽しさと苦しさを教えて頂いたことに深く感謝致します。

本研究における ChIP-seq 解析、sRNA 解析におけるドライ解析を担当して頂いた稲垣宗一博士、角谷徹二博士、油谷裕幸先生に厚く御礼申し上げます。特に稲垣宗一博士には労力が無駄になる可能性があった当初から惜しみないお力添えをして頂き、感謝です。

また、菌株やプラスミドを分けて頂いた Robin Allshire 博士、中山潤一博士、H3K9me 抗体を分譲して頂いた浦野健博士、ChIP-seq 解析のアドバイスを頂いた加藤太陽博士、CAGE-seq において特注の解析を行なって頂いた株式会社ダナフォームの山口格様に感謝致します。

異なった研究背景を持つ視点から、控えめながらも的確なアドバイスを頂いた高橋正行博士に深く感謝致します。いつももう一度考え直す契機になりました。

厳しい言葉で発破をかけると同時に、ミスドや鮮魚の差し入れでしばしば激励してくれた高畑信也博士に深く感謝致します。深夜に語って下さった米国時代の話はとても励みになりました。

京都時代から最後まで伴走することになった常峰悟博士に深く感謝致します。密林に一人潜むゲリラ兵も同じ境遇の人がいるから最後まで頑張れるのだと思いました。

また本研究について議論し意見を述べてくれた村上研の全てのドクター陣に深く感謝致します。

修士時代にラボに受け入れて下さった松本智裕博士及び当時のラボの先輩方に深く感謝致します。松本研を経験していたか、していなかったかで、その後に見えていた風景もかなり違っていたと思います。

私の意志を尊重し続けてくれた両親と姉に深く感謝致します。その意味があったと少しでも思っただけ、今後とも精進致します。

最後に、とても長い間支え続けてくれた妻に、決して言葉では言い尽くせない、深い感謝の意を表します。

浅沼高寛