



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Mediator as a regulator of heterochromatin assembly [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大屋, 恵梨子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第11091号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53916
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Eriko_Oya_abstract.pdf, 「論文内容の要旨」



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理 学） 氏 名 大屋 恵梨子

学 位 論 文 題 名

Study on Mediator as a regulator of heterochromatin assembly
(ヘテロクロマチン形成の制御因子としてのメディエーターに関する研究)

真核生物の長いDNAは、染色体中でクロマチンと呼ばれる構造によって効率良く折りたたまれ、小さな核の中に機能的に収納されている。特に、染色体上のセントロメアやテロメアには、高度に凝集した構成的なヘテロクロマチン構造が見られ、染色体上の反復配列や転移因子の発現や組換えを抑制して、染色体の機能維持に寄与するほか、エピジェネティックな遺伝子発現制御にも重要な役割を果たしている。ヘテロクロマチンのヒストンは総じて低アセチル化状態にあり、ヒストンH3のK9がメチル化されており、それを認識するタンパク質HP1 (Heterochromatin Protein 1) が結合している。ヘテロクロマチンは、長らくの間、その凝集した外観から、RNAポリメラーゼII (RNAPII) による転写が起きない「不活性なクロマチン構造」だと思われてきた。

ところが、近年の解析から、このヘテロクロマチンは非常にダイナミックな構造であり、その非コード領域からの non-coding RNA (ncRNA) の転写や様々な機構がその構造の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。特に、高等真核生物のヘテロクロマチン研究のモデル真核生物である分裂酵母のセントロメア周縁部において、RNA 干渉に類似した機構、および RNA 分解酵素であるエキソソーム複合体が関与する RNA プロセシング機構が ncRNA の転写と共役し、ヘテロクロマチンが構築、維持されることが知られている。しかしながら、その機構には未だに多くの謎が残されている。

本研究では、転写とプロセシング機構に関与する RNAPII と相互作用する因子がその共役に関与していると仮定し、その因子を介して、ヘテロクロマチン形成機構を解明することを目的とした。

我々はいくつかの既知のRNAPII相互作用因子の中から、メディエーター (Mediator) に着目した。メディエーターは真核生物に保存された20個以上のサブユニットから成る巨大なタンパク質複合体であり、RNAPII と相互作用してその転写を制御する。また、構造的な解析から、メディエーターは4つの構造的ドメイン (ヘッド、ミドル、テール、キナーゼ) から構成されることが明らかになっている。

まず、この複合体の構成サブユニットの変異株を用いて、ヘテロクロマチン構築への必要性を検討することにした。その結果、4つのサブユニット Med18、Med20、Med8、Med31 の各々の変異により、セントロメア周縁部のヘテロクロマチン崩壊とサイレンシング異常をもたらすことを発見した。これらの4つのサブユニットはヘッド、もしくはその近傍ドメインに属することから、メディエーターが主にヘッドメインを介してセントロメア周縁部ヘテロクロマチンにおいて機能することが示唆された。

また、これらのメディエーターサブユニットの変異において、RNAi 因子の変異と同様に、セントロメア周縁部以外のヘテロクロマチンには影響を与えず、細胞内にセントロメア周縁部ヘテロクロマチン領域由来の転写産物が蓄積した。さらに、RNAi 依存的経路への関与を調査したところ、これらの変異により、転写産物のプロセシングにより生産されるはずの siRNA の合成に欠損を示した。また、*med18Δ*変異によって、RNAi の構成因子である RITS (RNA-induced transcriptional silencing) や RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ複合体 RDRC (RNA-dependent RNA polymerase complex) のセントロメア周縁部ヘテロクロマチン領域への結合に影響を与えないことから、メディエーターはこれらの結合には必要ではなく、転写産物から効率的に siRNA を合成するのに必要であることが示唆された。

メディエーターの RNAi 依存的経路への関与が示唆された為、RNAi 因子である Dicer

とメディエーターの二重変異株 (*med18Δ dcr1Δ*) を用いて更なる解析を行った。その結果、予想に反して、この二重変異株では、各々の一重変異株 (*med18Δ*、*dcr1Δ*) と比較して、セントロメア周縁部におけるヒストン H3K9 メチル化修飾および HP1 の局在レベルが著しく減少していた。これは、メディエーターが RNAi 依存的経路とは異なる経路で機能することを示唆していた。

よって、もう一つのプロセッシング経路であるエキソソーム経路への関与を検証する為、エキソソーム複合体の構成因子一つである Rrp6 とメディエーターの二重変異株 (*med18Δ rrp6Δ*) を用いて更なる解析を行った。その結果、驚くべきことに、この二重変異株と各々の一重変異株 (*med18Δ*、*rrp6Δ*) では、セントロメア周縁部におけるヒストン H3K9 メチル化修飾レベルは同等であった。これは、メディエーターがセントロメア周縁部において、エキソソーム依存的なヒストン H3K9 メチル化に必要であるということを意味していた。

さらに、メディエーターは転写因子である為、ヘテロクロマチンへの転写への関与を調べた。その結果、メディエーターは、セントロメア周縁部ヘテロクロマチン領域に転写が起こる S 期特異的に RNAPII と共に局在することが明らかになった。また、ヘテロクロマチン構造が維持された領域では、*med18Δ* 変異により RNAPII の呼び込みにくくなることから、メディエーターはヘテロクロマチンにおける効率的な転写の活性化に必要であることが示唆された。

上述の結果より、メディエーターがヘッドドメインを介して、セントロメア周縁部ヘテロクロマチンの転写の効率的な活性化、およびその後のプロセッシング機構である RNAi 依存的およびエキソソーム依存的システムの両方に関与し、ヘテロクロマチン構築に貢献していることが明らかになった (図 1)。

本研究は、メディエーターが RNAPII と協調的に働き、転写とその後のプロセッシングを共役している可能性を強く示唆したものである。本研究で得られた知見は、ヘテロクロマチンが関与する染色体の機能維持やエピジェネティックな遺伝子発現制御の理解に寄与するものである。

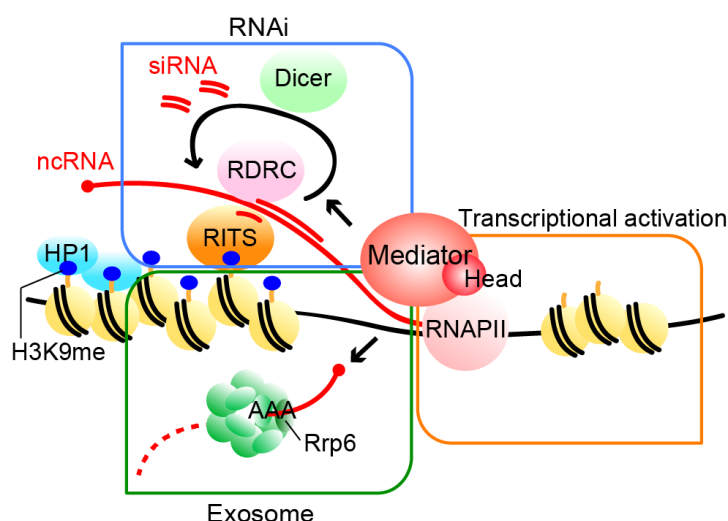


図 1 セントロメア周縁部ヘテロクロマチン形成におけるメディエーターの役割