



Title	分裂酵母におけるH3K36 メチル化酵素Set2 依存的サイレンシング機構に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	鈴木, 詔大
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第11948号
Issue Date	2015-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59702
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shota_Suzuki_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 鈴木 詔大

学 位 論 文 題 名

分裂酵母における H3K36 メチル化酵素 Set2 依存的サイレンシング機構に関する研究

本学位論文は全 4 章で構成され、第 1 章序論、第 2 章材料と方法、第 3 章結果、第 4 章考察となっている。以下に本学位論文の研究背景と結果の概要について述べる。

酵母からヒトに至るまで真核生物の核内に存在する DNA はヒストンタンパク質に巻きついてクロマチン高次構造を取る。クロマチン高次構造には疎な状態のユークロマチンと凝集したヘテロクロマチンの二種類がある。この凝集したヘテロクロマチン領域においては転写が抑制されていることが知られている。ヘテロクロマチン形成はヒストンの翻訳後修飾によって行われる。分裂酵母ではヒストンメチル基転移酵素 Clr4 によるヒストン H3 の 9 番目のリジン (K9) のメチル化 (H3K9me) がヘテロクロマチン形成に極めて重要であり、H3K9me のためには siRNA を中心とした RNAi 経路が必要であることが知られている。しかし、近年の解析からヘテロクロマチン領域のサイレンシングには RNAi 経路以外にエキソソーム経路が関わるということが明らかになってきた。エキソソーム経路は細胞内の不要な RNA を分解するための機構であることが知られている。このようにヘテロクロマチン領域のサイレンシングには RNAi 経路とエキソソーム経路の両方が関わっているため、ヘテロクロマチンサイレンシングの機構は非常に複雑である。

ヒストン修飾酵素の一つである Set2 はヒストン H3 の 36 番目のリジン (H3K36) を特異的にメチル化 (H3K36me) し、ユークロマチン領域、ヘテロクロマチン領域で転写を抑制することが報告されている。しかし、Set2 の研究は主に出芽酵母で行われており、現在存在するモデル図も出芽酵母から得られた報告を元にしてしている。そのため、分裂酵母における Set2 のユークロマチン領域、ヘテロクロマチン領域のサイレンシング機構には多くの謎が残されている。

そこで本研究は分裂酵母 H3K36 メチル化酵素 Set2 によるユークロマチン領域、ヘテロクロマチン領域のサイレンシング機構解明を目的とした。

出芽酵母において、Set2 は転写と協調してクロマチン上に呼び込まれ、その呼び込みには RNA polymerase II が大きく寄与している。そのサブユニットの一つである Rpb1 は C 末端に YSPTSPS というアミノ酸配列が 26 回繰り返された反復配列を持つことが知られている。この反復配列の 2 番目のセリン (S) は転写伸長過程においてリン酸化される (S2P)。Set2 は自身の持つ SRI ドメインを介してこの S2P と相互作用することでクロマチン上に呼び込まれ、H3K36 をメチル化する。その後、ヒストン脱アセチル化複合体 (HDAC) が

H3K36me へ結合する。HDAC は RNA polymerase II が通過した後のヒストンを脱アセチル化し、遺伝子内の潜在的なプロモーター領域からの転写を抑制する。

出芽酵母では、Set2 が S2P を認識し Rpb1 と相互作用するためには Set2-Rpb1 interacting domain (SRI ドメイン) が必要であることが知られている。分裂酵母の Set2 においても SRI ドメインが保存されているが、Rpb1 との相互作用に必要なかどうかは証明されていない。私は分裂酵母 Set2 においても SRI ドメインが Rpb1 と相互作用するため必要かどうかを検討するため SRI ドメイン欠損変異体を作製した。H3K36 メチル化状態にはモノメチル (H3K36me1)、ジメチル (H3K36me2)、トリメチル (H3K36me3) の三種類があるが、SRI ドメイン欠損変異体では H3K36me3 のみ検出できなくなることが分かった。このことから SRI ドメインを介した Set2 と Rpb1 の相互作用は適切にヒストン H3 の K36 をメチル化するために重要であることが分かった。

set2 変異体を用いてセントロメア近傍のクロマチン状態を解析したところヒストン H3 の K9 メチル量は変化がなかった。さらに Set2 によるサイレンシング機構が RNAi 経路と同経路かどうか遺伝学的手法を用いて解析した。RNAi 経路に含まれるヒストン H3K9 メチル化酵素 *clr4* と *set2* の二重破壊株を作製し表現型を調べたところ、それぞれの単独破壊株より強い脱サイレンシングを示した。以上の結果から *set2* はヘテロクロマチン形成には直接関与せず、RNAi 経路非依存的な経路でヘテロクロマチンサイレンシングを行っていると考えられる。よって、もう一つのヘテロクロマチンサイレン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、エキソソーム経路に含まれる 3'-5' エキソリボヌクレアーゼ *rrp6* と *set2* の二重破壊株を用いて解析したところ、単独破壊株と同程度の脱サイレンシングを示した。このことから *set2* はエキソソーム経路に関与してヘテロクロマチンサイレンシングを行っていることが示唆された。

次にユークロマチン領域において *set2* 遺伝子破壊により発現上昇した遺伝子に関して解析をした。この領域では *set2* 遺伝子破壊により RNA polymerase II の局在量が増加していた。これはユークロマチンでは Set2 は転写そのものを抑えることを示唆する。この結果は H3K36me3 のみ検出できない SRI ドメイン欠損変異体においても同じであったので、サイレンシングには H3K36me3 が重要であることが示唆された。

また、SRI ドメイン欠損変異体を用いたマイクロアレイ解析からもユークロマチン領域、ヘテロクロマチン領域のサイレンシングには H3K36me3 が必要であることが判明した。

本研究は、分裂酵母 Set2 がヘテロクロマチン領域、ユークロマチン領域それぞれにおいて別の経路に関わりサイレンシングを行っていることを示した。また、そのサイレンシングには H3K36me3 が重要であることを明らかにした。