HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	鈴木, 詔大
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/59703
Type	doctoral thesis
File Information	Shota_Suzuki_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 約

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 polymeraseⅡ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 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 PolⅡ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 機構と同経路かどうか遺伝学的手法を用いて解析した。RNAi 機構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 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 *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*Δset2* 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*Δset2* により RNA polymeraseⅡ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 が重要であることが明らかになった。

また、Set2 と結合する因子は RNA polymerase II のサブユニットのひとつである Rpb1 以外に報告されていないが、本研究結果は Rpb1 以外の結合因子が存在することを示唆している。出芽酵母、分裂酵母においてこのような知見は無いので，新規結合因子の発見は今後の重要課題である。

H3K36me はゲノムワイドに存在するにも関わらず、分裂酵母において Set2 を中心とした研究は行われてこなかった。そのため、本研究による Set2 の機能解明は分裂酵母を

理解する上で非常に重要である。また、H3K36me はヒトにも保存されているため，今回の結果は将来的にヒトにも応用が利くことが期待される。これは本研究が分裂酵母に限らず、生命現象を理解するのに有用であることを示している。