HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Contribution of Trimethyl Guanosine Synthase Tgs1 to Heterochromatin Formation in Fission Yeast [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	愉, 彦樺
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(総合化学)
Dissertation Number	甲第14613号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82286
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	YU_Hiroki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（総合化学）　氏名　愉　彦樺

学 位 論 文 題 名

Study on Contribution of Trimethyl Guanosine Synthase Tgs1 to Heterochromatin Formation in Fission Yeast
（トリメチルグアノシン合成酵素 Tgs1 の分裂酵母ヘテロクロマチン形成での役割に関する研究）

本学位論文は七章で構成されている。

第一章では、本学位論文の総括的な背景として、遺伝子発現の調節に重要であるヘテロクロマチン構造とその形成メカニズムについてまとめ、問題点としてヘテロクロマチンの新規形成メカニズムが未解明な点が多いことについて述べた。分裂酵母を始めとする真核生物の細胞では、クロマチン構造は大きく分けて転写活性型のユークロマチンと不活性型のヘテロクロマチンに分類される。ヘテロクロマチンはヒストン H3 リジン 9（H3K9me）とヘテロクロマチンタンパク質 HP1/Swi6 の結合によって定義される。また、本学位論文の中心となるトリメチルグアノシンキャップ修飾（TMG）酵素 Tgs1 についてまとめ、様々な生物種における Tgs1 欠損による表現型について述べている。mRNA を含む多くの RNA はモノメチルグアノシンキャップ修飾（MMG）を受けて、CBC などの因子と結合して核外輸送される。Tgs1 は MMG 修飾を TMG 修飾へと変換する唯一の酵素として知られている。

第二章では、*tgs1* 遺伝子破壊および Tgs1 不活性化変異体によってヘテロクロマチン形成に異常が生じることについて述べた。当研究室の先行研究では、ヘテロクロマチン形成に関与する遺伝子の網羅的スクリーニングを行っており、その 1 つとして Tgs1 を同定した。アデニン代謝経路遺伝子 ade6 遺伝子がサイレンシングされた株を使ったスクリーニング実験から、*tgs1* 遺伝子破壊によってヘテロクロマチンが部分的に崩壊した表現型が得られた。また、ヘテロクロマチンが崩壊した表現型を示したコロニー由来細胞はヘテロクロマチン領域にコードされた遺伝子が脱サイレンシングしており、ヘテロクロマチン形成マーカーである H3K9me レベルも低下していた。Tgs1 タンパク質の触媒ドメインは生物種間で高度に保存されていることから、分裂酵母 Tgs1 における推定基質認識アミノ酸である 153 番目のトリプトファンのアラニン置換変異体についてもヘテロクロマチン形成への影響を調べ、*tgs1* 破壊細胞と同じくヘテロクロマチン形成に影響することを示した。

第三章では、ヘテロクロマチンの新規形成における Tgs1 の関与について述べた。H3K9me 修飾酵素である *clr4* 遺伝子の破壊した後、再導入することで RNAi 因子が存在しない場合のヘテロクロマチン新規形成について調べることが出来る。この *clr4* 遺伝子破壊再導入した株を用いた実験の結果から、Tgs1 が存在しない場合に *clr4* 遺伝子を導入しても一部の細胞でのみ H3K9me が見られた。これらの結果から、Tgs1 は効率的な H3K9 メチル化修飾に必要であることが示された。

第四章では、Swi6 非依存的な siRNA 産生における Tgs1 の寄与について述べた。先行研究から、ヘテロクロマチンは RNAi 経路による自己強化ループによって形成・維持される。このメカニズムには siRNA が必須であり、Swi6 依存的に産生されると考えられていた。一方で、*swi6* 破壊細胞においても siRNA 産生は消失しないことが報告されている。Tgs1 による siRNA 産生について調べた結果、Tgs1 と Swi6 は互いに独立して siRNA 産生に寄与しており、いずれかの単独破壊では siRNA 産生に大きく影響しないが、*tgs1* と *swi6* の両破壊によって siRNA 産生が消失することが示された。また、siRNA の傾向と一致して両破壊細胞では H3K9me も消失していた。これらの結果から、Tgs1

は Swi6 には依存しない siRNA 産生に関与しており、互いにバックアップのようなシステムになっていることが示唆された。

第五章では、Tgs1 欠損によるスプライシング効率への影響について述べた。Tgs1 欠損によって様々な生物種で異常表現型が観察される。出芽酵母では、低温で生育出来なくなる低温感受性を示し、ショウジョウバエやマウスでは発生過程で異常が生じることが報告されている。スプライシング因子の構成要素である U RNA は Tgs1 による TMG 修飾を受ける。Tgs1 欠損によって生じたこれらの表現型はスプライシング異常が原因ではないかと考えられている。TMG 修飾を認識する抗体を用いて、TMG 修飾された RNA を免疫沈降法（TMG-RIP）によって回収し、スプライシング因子構成要素である U RNA が TMG 修飾を受けていることが示された。また、スプライシング異常を解析する際によく用いられる遺伝子である *tbp1* や RNAi 因子の一つである *ago1* は Tgs1 欠損によってスプライシング効率が低下した。一方で、同じく RNAi 因子である *hrr1* は *tgs1* 破壊による影響を受けなかった。これらの結果から、全てのイントロン含有転写産物が *tgs1* 破壊によるスプライシング効率低下の影響を受けるわけではないことが示唆された。さらに、第四章で述べたように Tgs1 単独欠損によって siRNA 量はそれほど影響を受けなかったことから、Tgs1 による RNAi 因子のスプライシング効率への影響は限定的だと考えられる。また、ヘテロクロマチンによるサイレンシングは完全ではなく、ヘテロクロマチン領域にコードされている遺伝子からも少量の転写産物が生じる。これらイントロン含有ヘテロクロマチン由来転写産物も Tgs1 欠損によるスプライシング効率の影響を受けることが明らかとなった。

第六章では、ヘテロクロマチン由来転写産物における TMG 修飾とクロマチン上での局在への寄与について述べた。ヘテロクロマチン領域での遺伝子発現はセントロメア領域だけではなく、テロメア領域でも起こっている。近年、テロメア領域転写産物が TMG 修飾を受けており転写産物量に関与することが報告されている。ヘテロクロマチン由来転写産物である *antisense dg* 転写産物が TMG 修飾を受けていることが明らかとなった。当研究室の先行研究では、ヒストン H3 に対する抗体を用いて RNA を免疫沈降（H3-RIP）することでクロマチン上に局在している RNA を解析できることを報告している。H3-RIP の結果、TMG 修飾が *antisense dg* 転写産物のクロマチン上での局在に寄与することが示された。

第七章では、本学位論文で得られた結果を総括し、ヘテロクロマチンの新規形成における Tgs1 による TMG 修飾の意義と予想されるモデルおよび残された課題について述べた。第四章に示した siRNA 産生の結果から、Tgs1 と Swi6 が互いに独立した経路で機能しており、相互補完的なバックアップのようなシステムであることを示唆している。また、スプライシング因子の安定化および hncRNA の安定化を介して siRNA 産生に寄与しており、特に Swi6 が一過性に欠失する *de novo* ヘテロクロマチン形成においては Tgs1 による siRNA 産生が重要であると考えられる。