論文内容の要旨

申請者氏名 立木 賢 輔

真核生物の核内ゲノム構造として、クロマチンよりも高次な構造としてクロマチンループ構造が提唱されている。これは、ゲノムに一定の間隔で核の骨格である核マトリックスに結合する DNA 領域 (matrix attachment region, MAR) が存在し、MAR に挟まれたクロマチンがループ状になる構造モデルである。植物の MAR は動物の核マトリックスに結合し、また、その逆も起きることから、MAR は真核生物で共通すると考えられる。しかしながら、MAR の役割は、遺伝子発現の制御、DNA 複製・修復の起点、インシュレーターなど、多くの機能が示唆されているが、これらの機能に対して否定的な報告も多く、一概に MAR の機能を断定する事は難しい。そこで本研究では、高等植物のシロイヌナズナにおける MAR を介した核内ゲノム高次構造の決定、並びに、MAR の機能を解明することを目的とした。

本研究では、PCR を用いた *in vivo* MAR の同定系を確立し、シロイヌナズナ BAC クローンの 3 領域の計 80kb の *in vivo* MAR の平均間隔を調査した。その結果、MAR の平均間隔は 4.7kb であり、近年の *in silico* 解析結果の 5kb と一致した。次に、MAR と核マトリックスの結合機構を調べるため、シロイヌナズナの plastocyanin locus MAR (PC-MAR, 540bp) の AT-rich 配列を用いた *in vitro* の結合実験を行った。その結果、PC-MAR の配列の長さに比例して、核マトリックスとの結合レベルが増減することが示されたことから、MAR の結合機構は、AT-rich 配列が複数作用して核マトリックスとの全体の結合が安定する、mass binding の結合形式であることが示された。これまでに、MAR は多くの遺伝子間に存在し、さらに、MAR が RNA polymerase II の進行の阻害することや、MAR がインシュレーター機能を有することが示唆されたことから、MAR は遺伝子間の「壁」の機能を有すると推察される。そこで本研究において、内在の *heat shock protein (HSP)* 遺伝子の新規 RNA 合成範囲を調べたところ、MAR が遺伝子の 3'末にある *HSP* 遺伝子では目的領域を超えた RNA 合成の進行は見られず、逆に、MAR のない *HSP* 遺伝子では、下流遺伝子まで RNA 合成が続く事が判った。この結果は、MAR が遺伝子間の壁として機能し、DNA 上を伝搬する転写・転写抑制の影響を遮断する機能を有することを示唆する。さらに、シロイヌナズナの *HSP* 遺伝子ファミリーは、熱誘導に伴い転写と核マトリックスへの結合が同時に起こることを示し、転写時に遺伝子が転写装置やスプライシング因子を介して核マトリックスに結合するクロマチンループの転写モデルを支持する結果を得た。

本研究により、高等植物の核内では MAR が遺伝子間の壁の役割を果たすことで、クロマチンループ単位で転写・転写抑制が行われ、さらに、転写時にはループ上の遺伝子が核マトリックスに結合するダイナミックな構造変換を起こすことが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 立木賢輔

核内のゲノム高次構造を規定する MAR の存在は多くの真核生物（酵母、昆虫、植物、動物）で報告されており、主に遺伝子間に存在することが示唆されている。しかしながら、MAR の配列は AT 含有率が 70% 前後の AT-rich 配列であるという特徴があるものの、これまでに共通配列は見つかっていない。さらに、MAR の機能については、遺伝子発現制御、DNA 複製・修復の起点など、多くの機能を示唆する報告がなされている一方で、それらに否定的な報告もあり、真核生物における MAR 研究の現状は混沌としている。申請者は、高次のゲノム構造の変化を伴う植物の遺伝子発現制御機構を明らかにするためには、MAR の機能を解明することが重要課題であると考え、真核生物の中でも研究が遅れている高等植物における MAR を介した核内のゲノム高次構造の決定、並びに、MAR の機能を解明することを目的とし、モデル植物のシロイヌナズナを実験材料として *in vivo* における MAR 解析を行った。

まず申請者は、高等植物の核内のゲノム高次構造を規定する *in vivo* における MAR を同定するための実験系を確立した。実際に、この手法を合計 80kb のシロイヌナズナのゲノム領域に適用することにより、効率的に *in vivo* の MAR を同定することに成功した。その結果、既存の *in silico* 解析による予測法では検出不可能であった結合様式が不安定な遺伝子間の MAR の存在が新たに示された。さらに申請者は、遺伝子の 3' 側に存在する MAR に着目し、実際にクロマチンループ上の遺伝子の転写伸長の影響が下流遺伝子にまで及ぶ転写干渉を防ぐ壁として MAR が遺伝子間で機能することを明らかにした。さらに、遺伝子の転写に伴って動的に出現する MAR の存在を示したことにより、一般的な既成概念となっている静的で安定な MAR に加え、それとは異なる種類の動的で不安定な MAR が高等植物の核内で機能しているという新たな概念を導く結果を示した。

これまで *in silico* 解析により予測されていたシロイヌナズナの MAR 領域と申請者が本論文で同定した MAR 領域の結果を比較した結果、一部で一致しない領域が存在したことから、今後は *in silico* 解析で網羅的に予測された MAR が *in vivo* で実際に MAR として機能しているのかを検証するためにも、本論文で申請者が確立した実験系を用いることが有用であると考えられる。

以上のように、本論文は高等植物の核内における遺伝子発現制御に関わる MAR の機能解明に重要な新たな研究手法と知見をもたらすもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。