T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	RNA ポリメラーゼII転写産物の3’末端プロセシング経路の運命決定機構に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	山本淳一
Author(English)	Junichi Yamamoto
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9610号, 授与年月日:2014年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山口　雄輝,工藤　明,徳永　万喜洋,十川　久美子,立花　和則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9610号, Conferred date:2014/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

（論文博士）

論　文　要　旨（和文2000字程度）

（Summary）

報告番号	乙 第　　号	氏　名	山本　淳一

（ 要　旨 ）

高等真核生物において、RNA ポリメラーゼ II（Pol II）によって転写される遺伝子には 3 種類の 3’末端プロセシング経路が存在する。ほとんど全てのタンパク質をコードする遺伝子の 3’末端プロセシング反応は、ポリ（A）付加配列と下流の G / U rich 配列に基づき、pre-mRNA の 3’末端の切断とそれに続いたポリ（A）付加という 2 つの反応により形成される。一方で、Pol II により転写される遺伝子の中でヒストン遺伝子と snRNA 遺伝子は、例外的にポリ（A）付加を伴わない 3’末端プロセシングを受けることが知られている。これらは共にイントロンを持たない短い遺伝子であり、その 3’領域にヒストン遺伝子はステムループ配列と purine-rich histone downstream element（HDE）、snRNA は 3’box という遺伝子特異的なシスエレメントを持ち、それぞれの遺伝子特異的なプロセシング装置により 3’末端プロセシングを受ける。

DSIF と NELF は promoter-proximal pausing という転写開始点近傍における Pol II の一時停止を引き起こす転写伸長因子である。近年のゲノムワイドの研究によると、promoter-proximal pausing は非常に多くの遺伝子で観察され、普遍的な転写制御過程であることが強く示唆されている。また、NELF のゲノム上での分布は遺伝子の 5’領域に局在しており、この結果は promoter-proximal pausing という NELF の機能とよく一致していると考えられている。しかし、近年の我々や他のグループの報告から、NELF は一部の遺伝子においては 3’領域にも存在し、3’末端プロセシング反応や転写終結にも関与することが明らかになりつつある。一例として、私を含む研究グループはヒストン遺伝子において NELF が 3’領域にも存在し、ヒストン特異的な 3’末端プロセシング反応に関与していることを報告している。そして本研究によって、もう一方のポリ（A）付加を伴わない 3’末端プロセシング経路である snRNA 遺伝子の 3’末端プロセシング反応にも、NELF が関与することが明らかになり、その分子メカニズムの一端が解明された。

本研究では DSIF と NELF の細胞内機能の解明を目的とした相互作用因子の網羅的探索により、DSIF と NELF の共通の相互作用因子として、Integrator を同定した。Integrator は Pol II の C-terminal domain（CTD）に結合し、3’box に依存した snRNA の遺伝子特異的な 3’末端プロセシング反応に必要な因子として 2005 年に初めて報告された複合体である。さらに、NELF のノックダウンは Integrator のノックダウンと同様に、snRNA の 3’末端プロセシング反応の阻害を引き起こすことを明らかにした。一方で、DSIF のノックダウンは snRNA

の発現レベルの低下を引き起こしたことから、DSIF は snRNA の転写そのものに関与していることが示唆された。これらの結果から、DSIF と NELF は共に Integrator と相互作用するものの、snRNA 遺伝子上で DSIF は転写、NELF は 3'末端プロセシングとそれぞれ異なった機能を担っていることが示唆された。次に、DSIF と NELF の snRNA 遺伝子における機能をより詳細に解析するために、クロマチン免疫沈降法（ChIP）によって U1 snRNA 遺伝子上での各因子の分布を解析した。その結果、snRNA 遺伝子においても NELF が 3'領域にも存在していること、NELF のノックダウンにより転写終結も阻害されることが明らかになった。さらに、NELF が snRNA の 3'末端プロセシング反応を制御する分子メカニズムの解明を目指し、NELF のノックダウンによって生じた未切断の U1 snRNA の 3'末端の構造を RLM-RACE によって詳細に解析した。その結果、NELF のノックダウンによって、本来はポリ（A）付加を受けない U1 snRNA が異常なポリ（A）付加を受けていることが明らかになった。この結果から、NELF は snRNA 遺伝子上で、本来は選択されないポリ（A）付加を伴う経路を抑制することで snRNA の遺伝子特異的な 3'末端プロセシング経路へ Pol II を誘導しているのではないかと考えた。この仮説を検証するために、一般的なタンパク質をコードする遺伝子の 3'末端プロセシング装置である CPSF や CstF の U1 snRNA 遺伝子へのリクルートに NELF が与える影響を ChIP により解析した。その結果、NELF のノックダウンによって snRNA 遺伝子では本来リクルートされないと考えられる CstF が遺伝子の下流で増加していることが示唆された。

これまでPol IIが3種類の3'末端プロセシング経路の中で、どの経路を選択するかという運命決定は、ヒストン遺伝子とsnRNA遺伝子がいずれも3'領域に遺伝子特異的なシスエレメントを持つため、単純にDNA配列とそれを認識する因子の違いで説明されると考えられてきた。しかし、本研究と私を含む研究グループが報告した先行研究から、NELFという普遍的な転写因子が3'末端プロセシング経路選択の「運命決定因子」として働き、ヒストン遺伝子やsnRNA遺伝子において、ポリ（A）付加を伴う3'末端プロセシング反応を抑制し、遺伝子特異的な3'末端プロセシング経路へ誘導していることが示唆された。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).
注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

（論文博士）

論　文　要　旨（英文）

（300語程度）

報告番号	乙 第　　号	氏　名	山本　淳一

（要　旨）

In higher eukaryotes, transcripts produced by RNA polymerase II (Pol II) undergo one of three types of 3' processing. While most protein-coding genes produce polyadenylated mRNAs, replication-dependent histone genes produce mRNAs lacking poly(A) tails and require a distinct set of cis-elements and trans-acting factors for 3' processing. Pol II is also responsible for transcribing small, non-coding, non-polyadenylated small nuclear RNAs (snRNAs), which possess 3' ends that are generated via a series of processing reactions starting with site-specific cleavage at an evolutionarily conserved 3' box. During the production of polyadenylated mRNAs, transcription and 3' processing are tightly coupled; cleavage and polyadenylation factors are recruited during transcription, and transcript cleavage triggers transcription termination. However, it is unclear whether this tight coupling holds true for the other types of 3' processing. Moreover, little is known about the mechanisms by which the appropriate processing pathway is selected for a specific gene.

The elongation factors DSIF and NELF are responsible for promoter-proximal Pol II pausing, which is a widespread checkpoint that occurs during the transcription cycle. Our recent studies have revealed that NELF is also involved in 3' processing of non-polyadenylated histone mRNAs. Here we show that DSIF and NELF contribute to the synthesis of snRNAs through their association with Integrator, the large multisubunit complex responsible for 3' processing of pre-snRNAs. Pol II, Integrator, DSIF and NELF accumulate at the 3' end of the U1 snRNA gene. Knockdown of NELF results in misprocessing of U1, U2, U4 and U5 snRNAs, while DSIF is required for proper transcription of these genes. Knocking down NELF also disrupts transcription termination and induces the production of polyadenylated U1 transcripts caused by an enhanced recruitment of cleavage stimulation factor. Our results indicate that NELF plays a key role in determining the post-transcriptional fate of Pol II-transcribed genes.

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).
注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).