

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	RNAポリメラーゼIIの転写伸長段階を制御する新規ヒトタンパク質 Rtf1に関する研究
Title(English)	Study on Rtf1, an uncharacterized human protein that controls the elongation phase of RNA polymerase II transcription
著者(和文)	曹青福
Author(English)	Seifuku Sou
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10020号, 授与年月日:2015年11月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山口 雄輝,徳永 万喜洋,十川 久美子,川上 厚志,立花 和則
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10020号, Conferred date:2015/11/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

(2000字程度)

報告番号	乙 第 号	学位申請者		
論文審査員	氏 名	職 名	氏 名	職 名
	主査 山口 雄輝	教授	立花 和則	准教授
	徳永 万喜洋	教授		
	十川 久美子	准教授		
	川上 厚志	准教授		

本論文は「Study on Rtf1, an uncharacterized human protein that controls the elongation phase of RNA polymerase II transcription (RNAポリメラーゼIIの転写伸長段階を制御する新規ヒトタンパク質Rtf1に関する研究)」と題し、Rtf1というヒトタンパク質が新規な転写伸長因子として働くことを明らかにしたものであり、6章から構成されている。

第1章「General introduction」では、本研究の背景と目的が述べられている。出芽酵母においてTBPの変異を抑圧するサプレッサーとして同定されたRtf1は、Paf1複合体(PAF1C)の構成因子であるとして一般には認識されている。ところで、PAF1Cとはヒストンの翻訳後修飾(特にヒストンH2B-K120のモノユビキチン化)やPol IIの転写または転写後の過程に関与する多機能複合体であり、Paf1、Ctr9、Leol、Cdc73等のサブユニットから構成されている。しかし出芽酵母以外の生物種では、Rtf1ホモログはPAF1Cに含まれないという生化学的証拠が蓄積しており、Rtf1の分子機能はよく分かっていない。そこで、ヒトRtf1の機能解析を本研究の目的としたことが説明されている。

第2章「Identification of transcriptional activation potential of human Rtf1 in vitro」では、ヒトRtf1がそもそも転写因子として機能し得るかどうかに関する予備的な検討が行われ、ヒトRtf1が核局在タンパク質であり、ヒトHeLa細胞核抽出液を用いたin vitro転写系において転写に重要な役割を果たしていることが示されている。さらに、ヒトRtf1が作用する転写の段階について検討が行われ、ヒトRtf1がPol IIの転写伸長段階を促進していることが明らかにされている。

第3章「Identification of coactivator activity required for human Rtf1-mediated transcriptional activation」では、ヒトRtf1による伸長促進のメカニズムについて解析が行われている。部分精製画分を用いたin vitro転写系で解析した結果、ヒトRtf1による伸長促進には別の因子「Rtf1 coactivator」が必要であることが判明し、その精製が進められたが、「Rtf1 coactivator」の同定には至らなかったことが述べられている。そこで「Rtf1 coactivator」の絞り込みが行われ、候補因子と考えられたPAF1C、DSIF、Tat-SF1、TFIIS等が「Rtf1 coactivator」ではないことが示されている。

第4章「Structure-function analysis of human Rtf1」では、ヒトRtf1の伸長促進活性と、それ以外にヒトRtf1が持つと考えられる機能との関係を明らかにすることを目的として、ヒトRtf1の変異体解析が行われている。まず、shRNAを介したノックダウン・レスキュー系によりHeLa細胞内のモノユビキチン化H2B(H2Bub)を調べたところ、Rtf1のノックダウンによってH2Bubのレベルは顕著に低下し、全長Rtf1の共発現によってH2Bubレベルが回復したことが示されている。さらに変異体を用いた解析により、ヒトRtf1のN末端側に存在するHMDドメインがH2Bモノユビキチン化に重要であることが示されている。一方、変異体解析の結果、in vitroでの伸長促進活性には、ヒトRtf1の中央部分に位置するPlus3ドメインならびにC末端領域が重要であることが示され、ヒトRtf1のヒストン修飾促進活性と伸長促進活性には異なるドメインが関与していることが明らかとされている。

第5章「Non-overlapping functions of Rtf1 and the Paf1 complex in human HeLa cells」では、ヒトRtf1とPAF1Cの生細胞内での機能的差異を明らかにするため、RNA-seqやクロマチン免疫沈降(ChIP)解析が行われている。HeLa細胞でヒトRtf1ならびにPAF1CのサブユニットであるPaf1とSki8をそれぞれノックダウンし、遺伝子発現変化をRNA-seqや定量RT-PCRで解析したところ、多数の遺伝子の発現が共通して変化した一方、ヒトRtf1のノックダウンでのみ発現変動した遺伝子はそれ以上に多く存在していたことが示されている。さらに、ChIP解析によりRtf1とPAF1Cの標的遺伝子上へのリクルートを調べた結果、Rtf1のノックダウンはPAF1Cのリクルートにあまり影響せず、出芽酵母で得られていた知見に反して、ヒトPAF1CはRtf1非依存的に標的遺伝子上にリクルートされることが示されている。

第6章「Discussion」では、第2章から第5章で得られた結果に基づき、ヒトRtf1とPAF1Cの機能的な類似点と差異点、Rtf1の機能の種間の違い、といった観点から考察が行われている。

これを要するに、本論文は高等真核生物のRtf1を新規な転写伸長因子として再定義し、PAF1Cに依存しない独自のメカニズムによってPol IIの転写伸長を促進していることを明らかにしたものである。さらに、細胞レベルでヒトRtf1のヒストン修飾促進活性と伸長促進活性が分離可能であることを示し、ヒトRtf1によって特異的に制御される標的遺伝子群を同定したものであり、基礎医学上、意義深い。よって本論文は博士(理学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意:「論文審査の要旨及び審査員」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。