

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名

濱本 航多

生物の個体内に存在するあらゆる細胞内には全ゲノム情報が等しく含まれている。一方で、個々の細胞はそこから必要な遺伝子のみを、適切な時期・適切な細胞で発現させる必要がある。転写活性の時空間的な特異性の制御において中心的な役割を担っているのは、エンハンサーと呼ばれるゲノム上の調節領域である。興味深いことに、近年の網羅的なゲノム解析により、タンパク質情報をコードしていないエンハンサー領域上においても自身の内部から転写が生じていることが明らかになりつつある。しかし、エンハンサー領域における非コード RNA 転写活性と、標的遺伝子の転写活性に関しては現時点では単なる相関レベルでの理解に留まっており、その分子作用機序や生物学的意義については全くと言ってよいほど理解が進んでいない。そこで本研究では、エンハンサー領域での転写発生が標的遺伝子の発現制御に果たす役割を、機能的な側面から解明することを最大の目的とし、エンハンサー領域における転写様式の違いが、どのように標的遺伝子の活性化に与えるかについて定量的解析を行なった。

本論文は序章、材料と方法、結果、考察から構成されている。序章では、エンハンサーによる転写活性化の作用機序について関連論文を引用しながら議論を行うとともに、本研究で用いたショウジョウバエの初期胚におけるエンハンサーの機能や、そこへ結合し機能する転写因子について具体例を含めた背景を紹介している。加えて、エンハンサー領域における非コード RNA 転写の機能について、過去の研究から示唆されている機能仮説について、参考論文を引用しながら議論を行っている。

材料と方法の章では、本研究の中心的な実験手法である共焦点顕微鏡を用いたイメージング方法について、ショウジョウバエ系統の作製から観察標本の準備方法、実際の観察条件、観察後の定量手法まで詳細に記述している。本研究において新たに構築した、二つの異なる領域に由来する転写活性の同時可視化手法や、ある特定の転写活性領域における転写因子の局所的な存在量の定量方法について、具体的なプロトコルを細部に渡り記載している。

結果の章ではまず、ショウジョウバエ初期胚を用いエンハンサー領域上で転写を人間的に誘導することで、エンハンサー領域と標的遺伝子領域に由来する転写活性を同時かつ 1 細胞レベルで可視化する転写ライブイメージング系を確立している。次に、本手法を駆使し、エンハンサー領域において起こる非コード RNA の転写が、標的遺伝子の活性化に与える機能的な影響について定量的な画像解析を行うことで、エンハンサー領域における転写が標的遺伝子の活性化を抑制している、という作用機序を新たに見出した。さらに、エンハンサー領域における非コード RNA 転写の強度や方向・配置といった個別のパラメーターの変化による影響をシステムティックに解析した。その結果、1) エンハンサーと遺伝子の距離、2) 産生されるノンコーディング RNA そのもの、3) エンハンサーおよび遺伝子領域の持つ転写開始点の方向性の組み合わせといった要素は、本研究によって見出された遺伝子発現の抑制に寄与していないことが明らかとなった。一方で、転写を担う RNA ポリメラーゼ

II と呼ばれる酵素がエンハンサー領域上を通過するという事象そのものが標的遺伝子の転写活性化の抑制において中心的な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、超解像顕微鏡を用いて内在転写因子の局在様式を詳細に解析したところ、エンハンサー領域上を通過する RNA ポリメラーゼ II が、転写因子のエンハンサーへの安定的な結合を妨害することにより、抑制効果を発揮しているという具体的な分子作用機序を解明することに成功した。

また、ショウジョウバエにおける CAGE-seq や ChIP-seq などの公開論文データを利用した解析により、内在ゲノムにおいて内部から転写を発生させているエンハンサーを新たに同定することに成功した。新たに同定されたエンハンサーを本レポーター系に組み込むことにより、内在エンハンサーの内部から起こる非コード RNA の転写と、標的遺伝子の転写活性を同時に計測する実験系を構築した。詳細な解析の結果、内在エンハンサーに由来する非コード RNA 転写も、転写因子結合領域に向かって RNA ポリメラーゼ II が転写伸長する際に、抑制的な効果を発揮していることが強く示唆された。一方で、エンハンサー内部からの転写が転写因子結合領域に対し反対方向に進行する場合は、むしろ活性化に対して促進的な役割を持つ可能性が示された。

最後に、内在ゲノムにおける新たな転写開始点の形成が与える影響を検証している。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いて *rhomboid* と呼ばれる初期発生遺伝子の転写ライブライメーシング系を構築した。本ショウジョウバエ系統を用いて二段階目のゲノム編集を行うことで、エンハンサー領域に転写開始点を新たに付加し、非コード RNA の転写活性を同時可視化する実験系を確立した。これまでのレポーター系の解析結果と一致して、内在ゲノムにおいても RNA ポリメラーゼ II がエンハンサー上を通過する際においてのみ、標的遺伝子の転写活性化を大きく抑制されることが判明した。以上の結果を踏まえると、進化の過程においてゲノム上の調節領域近傍に新たな転写開始点が形成されることが、遺伝子の転写活性の制御に多様性を生み出す重要な調節機構として働いてきたという新たな可能性を示唆している。

考察では、結果の章において明らかとなった、エンハンサー領域における転写を介した遺伝子発現の抑制機構について、関連文献を踏まえながらその具体的な分子作用機序や、生物学的意義について議論している。

以上のように本研究は、これまで単なる現象論的理解に留まっていたエンハンサー領域からの非コード RNA 転写の生物学的意義、およびその分子作用機序について明確な説明を与えるものであると同時に、具体的な因果関係を解明するための新規転写ライブライメーシング系を一から構築した点において特筆すべきものである。エンハンサーからの非コード RNA 転写は遺伝子の発現に対して促進的に働くと考えられてきた従来の画一的な理解を覆し、その機能が転写様式の変化に伴って柔軟に変化しうることを実験的に明らかとした点において、十分な学術的貢献が認められる。よって本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認められる。