

氏 名 飯 田 哲 史

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第679号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 The roles of DNA polymerase ϵ and yCHRAC of budding yeast in epigenetic inheritance of telomere position effect

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 桂 勲
教授 廣瀬 進
教授 山尾 文明
助教授 深川 竜郎
教授 原島 俊 (大阪大学)

論文内容の要旨

Relocation of euchromatic genes near a heterochromatin region often results in mosaic gene silencing in eukaryotes. In *Saccharomyces cerevisiae*, when a wild-type gene is located near a telomere, it is subjected to telomere position-effect variegation (TPE), which includes transcriptional silencing and which provides heritable silent and expressed states as well as reversible switching between the epigenetic states. The silent state of a telomeric gene is attributable to heterochromatin-like structure, which is composed of several proteins such as Sir-proteins and hypoacetylated histones and which spreads from the telomeric end. While many modifiers of telomeric heterochromatin have been identified, the molecular nature for the switching and heritable propagation of epigenetic states is not well understood. To explain the stochastic nature of phenotypic variegation and stable inheritance of the epigenetic states, it has been proposed that these phenomena are attributed to competition between the assembly of heterochromatin and the establishment of active-chromatin. Because the silent state of a telomeric gene is altered to the expressed state by a *trans*-activator in G2/M-phase-arrested cells but not in G1- or early S-phase-arrested cells, it has been suggested that progression through the S-phase is required in TPE for switching from the silent to the expressed state. Furthermore, mutant forms of the replication protein PCNA are defective in silencing and interaction with CAF-1, a replication-coupled chromatin assembly factor, suggesting that DNA replication machinery is linked to silencing at heterochromatin.

One of replicative polymerases, DNA polymerase ϵ (Pol ϵ), is composed of the catalytic-subunit Pol2, Dpb2, Dpb3 and Dpb4 in *S. cerevisiae*, and the feature of the subunit composition of Pol ϵ is evolutionally conserved in eukaryotes. Although Pol2 and Dpb2 are essential for DNA replication, Dpb3 and Dpb4, which contain the histone-fold motif related to chromatin metabolisms, are dispensable,

and their function is not clear. To gain insight into possible roles of Pol ϵ in chromatin configuration, I examined TPE in mutant cells defective in Pol ϵ .

In the assay of silencing with telomeric *URA3*, *dpb3 Δ* , *dpb4 Δ* and *pol2-11* (C-terminal mutant of *POL2*) cells displayed a partial defect of silencing, and this defect was most evident in *dpb3 Δ* cells. The silencing defect of *pol2-11* cells was completely suppressed by simultaneous introduction of high copy *DPB3* and *DPB4*. Moreover, the silencing level in the *dpb3 Δ dpb4 Δ* double mutant was similar to that in *dpb4 Δ* , indicating that the *dpb4 Δ* mutation is epistatic to the *dpb3 Δ* mutation. In parallel, I also observed the expression of telomeric *ADE2*, which gave rise to red and white sector colonies in the wild-type strain because of mosaic gene silencing by TPE. I found that *dpb4 Δ* mutant cells form non-sectored light pink colonies and *dpb3 Δ* mutant cells form white colonies. These results suggest that the mutations in Pol ϵ increase the switching frequency between alternative epigenetic states in TPE.

To monitor the switching between a silent and an expressed state in each cell division, I developed a single-cell telomeric silencing assay, with which I could distinguish between a silent state (off) and an expressed state (on) of telomeric $\alpha 2$ gene in a single cell on an α -factor-containing medium. With this assay, I measured switching rates from "on" to "off" and from "off" to "on", and found that both switching rates increased in *dpb4 Δ* cells, whereas in *dpb3 Δ* cells the switching rate from "off" to "on" specifically increased. These results suggest that Dpb4 plays a role in the stable inheritance of both silent and expressed states, while Dpb3 is involved only in the stable inheritance of a silent state.

The epistasis of *dpb4 Δ* to *dpb3 Δ* , together with different switching patterns in

these mutants, suggests that Dpb4 is shared by Pol ϵ and an unknown complex that plays a counteracting role in TPE. I thus purified protein complexes containing Dpb4 using anti-Flag antibody and the 5Flag-epitope tagged Dpb4 protein, and found that two distinct protein complexes, Pol ϵ and yCHRAC, share Dpb4. yCHRAC is a putative homologue of the chromatin accessibility complex CHRAC in higher eukaryotes, and composed of a WAC-motif protein Itc1, an ISWI-chromatin remodeling factor homologue Isw2, a novel histone-fold protein Dpb31, and Dpb4. Since Pol ϵ and CHRAC in human cells also share a histone-fold protein that is a counterpart of Dpb4, it is suggested that the relationship between Pol ϵ and the CHRAC-like complex is evolutionally conserved.

I next addressed whether yCHRAC counteracts Pol ϵ for TPE. In the assays with telomeric *URA3* and *ADE2*, the *itc1* Δ and *dpb31* Δ mutations enhanced telomere silencing and restored it in *dpb3* Δ cells to the level of *dpb4* Δ cells, whereas they did not affect it in *dpb4* Δ cells. Moreover, in contrast to the *dpb3* Δ mutation, the *dpb31* Δ mutation increased the switching rate from "on" to "off", but did not affect that from "off" to "on". Therefore, these results suggest that yCHRAC regulates the stable inheritance of the expressed state of TPE independent of Pol ϵ , while yCHRAC and Pol ϵ counteract each other for TPE.

In conclusion, position effect variegation at yeast telomeres is caused not only by simple competition between the assembly of heterochromatin and the establishment of active-chromatin but also by specific factors such as Pol ϵ and yCHRAC, which serve for the stable inheritance of the epigenetic states.

論文の審査結果の要旨

出芽酵母染色体テロメア付近のヘテロクロマチン領域に挿入された遺伝子は、サイレンシングの変化により、遺伝子の発現する on 状態と発現しない off 状態のいずれかをとる。どちらの状態も比較的安定に次世代に継承されるが、時折、状態間の転換が起こる。したがって、*ade2* 変異を持つ株のテロメア領域に *ADE2* 遺伝子を挿入した株は白色(on 状態)と赤色(off 状態)がセクターになったコロニーを形成する。この転換には細胞周期の S 期を通ることが必要なので、飯田哲史君は、DNA 複製装置の一部がこの状態転換を調節していると推測した。DNA ポリメラーゼ ϵ のサブユニット *DPB3*、*DPB4* に欠失変異があると、*ADE2* 遺伝子挿入株はそれぞれ白色と薄いピンク色のコロニーを形成し、*dpb4* Δ は *dpb3* Δ に対しエピスタティックだった。

ピンク色のコロニーでは on \rightarrow off と off \rightarrow on の両方の頻度が増加している可能性がある。これを証明するために、飯田君は、テロメア付近の遺伝子発現が on か off かを個々の細胞で調べるアッセイ法を開発した。それは、*MATa* の酵母のテロメア付近に *MAT* $\alpha 2$ 遺伝子を挿入し、 α 因子を含む培地で培養するという方法である。こうすると、*MAT* $\alpha 2$ 遺伝子が on 状態の場合は細胞分裂が正常に起こり、off 状態の場合は shmoo という洋梨型の細胞になって細胞分裂を停止する。この方法を使って飯田君は細胞の世代ごとに on か off かを調べ、*dpb4* Δ 変異体では on \rightarrow off と off \rightarrow on の両方の頻度が増加し、*dpb3* Δ 変異体では off \rightarrow on の頻度のみが増加していることを示した。

この現象を説明するために、飯田君は、Dpb4p と Dpb3p の両方を含む DNA ポリメラーゼ ϵ が off \rightarrow on の頻度を抑制し、Dpb4p を含み Dpb3p を含まない未知の複合体が on \rightarrow off の頻度を抑制するのではないかと考えた。そして、*DPB4* 遺伝子にタグを付け免疫沈降法とカラムクロマトグラフィーを使って、予想された複合体を精製した。この複合体は、Itc1, Isw2, Dpb31, Dpb4 から成り、哺乳類のクロマチンリモデリング因子 CHRAC に似るので、yCHRAC と名付けられた。さらに、*DPB31* や *ITC1* の欠失変異株では on \rightarrow off の頻度が増加するが off \rightarrow on の頻度は野生型株と同じなので、yCHRAC が on \rightarrow off 頻度の抑制という、予想した機能をもつことが示された。

このように、飯田君は、酵母遺伝学の伝統の上に立って、個々の細胞の on \rightleftharpoons off 両方向の転換頻度を測定する巧妙なアッセイ法を考案した。また、その測定結果から、新しい機能に対応する複合体が存在することを予測し、複合体を実際に精製して証明した。この研究の進め方は実に見事である。この研究の結果、出芽酵母のテロメア・サイレンシングの調節に DNA ポリメラーゼ ϵ と yCHRAC が働き、この2つがそれぞれ off \rightarrow on、on \rightarrow off の転換頻度の抑制を役割分担していることが明らかになった。

以上の理由で、審査委員会は、全員一致で、この論文が博士論文として十分であるとの結論に達した。

博士論文審査会では、論文の内容およびその基礎となる分野全般について、様々な質問が出たが、飯田君は適切な解答をした。この受け答え、および公開発表の内容から判断して、飯田君は専門分野および基礎分野で、博士号を得るのに十分な知識と理解力を持つと結論した。また、博士論文自体が英語で書かれているので、これを読んで飯田君は十分な英語能力を持つと判断した。