OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Transcription-induced gross chromosomal rearrangements at pericentromeric repeats in fission yeast
Author(s)	Xu, Ran
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105663
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　XU RAN　）	
論文題名	Transcription-induced gross chromosomal rearrangements at pericentromeric repeats in fission yeast （転写により誘発されるセントロメア反複配列を介した染色体異常の分子メカニズムの解明）

論文内容の要旨

A centromere is essential for accurate segregation of chromosomes. However, recombination between DNA repeats at centromeres can lead to gross chromosomal rearrangements (GCRs), causing cell death and genetic diseases. Heterochromatin, characterized by histone H3 lysine 9 methylation (H3K9me), assembles on pericentromeric DNA repeats and transcriptionally silences the pericentromeres. Importantly, the pericentromeric heterochromatin suppresses GCRs by transcriptional silencing. However, how transcription at pericentromeres causes GCRs in the absence of heterochromatin remains unclear.

Using fission yeast, I found that transcriptional pausing, backtracking, and restart (PBR) cycles at pericentromeres causes GCRs through forming R-loops. R-loop is a three-stranded structure that contains DNA-RNA hybrid and a displaced single-stranded DNA (ssDNA). DNA-RNA immunoprecipitation (DRIP) showed that loss of Clr4, the H3K9 methyltransferase essential for heterochromatin assembly, increased R-loop levels at pericentromeres. Overexpression of RNaseH1, which degrades R-loops, reduced both R-loop levels and GCRs in *clr4*Δ cells, demonstrating that R-loops cause GCRs. Seb1 pauses RNA polymerase II (RNAPII) at pericentromeres. A *seb1* mutation reduced R-loops and GCRs, showing that transcriptional pausing is required for the formation of R-loops that cause GCRs. Moreover, loss of Tfs1/TFIIS, which facilitate transcriptional restart, reduced R-loop levels and GCRs in *clr4*Δ cells, indicating that transcriptional PBR cycles create R-loops at pericentromeric repeats. Rad51- and Rad52-dependent recombination are the two major recombination pathways in fission yeast. I found that R-loops cause GCRs in a manner dependent on Rad52-specific recombination activity. *rad52-RK*, which impairs Rad52 single-strand annealing activity, but not *rad51*Δ, reduced GCRs in *clr4*Δ cells. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) revealed Rad52 localization at pericentromeres in a R-loop-dependent manner. An in vitro assay using purified proteins showed that Rad52 facilitates the formation of an Annealing-induced DNA-RNA loop (ADR-loop) using the displaced ssDNA region of R-loops and a complementary ssDNA. However, neither Rad51 nor the Rad52-RK mutant promoted ADR-loop formation. These data suggest that Rad52 bridges centromeric repeats using R-loops. Break-induced replication (BIR) and crossover that resolve the joint DNA molecules can result in GCRs. The endonuclease Mus81, involved in crossover, is not required for GCRs in *clr4*Δ cells. In contrast, mutation in Cdc27/Pol32/POLD3, the subunit of DNA Polδ that participates in BIR, reduced GCRs in *clr4*Δ cells, showing that GCRs occur through BIR in the absence of heterochromatin. Overall, these data suggest that, when heterochromatin is lost, transcriptional PBR cycles promote R-loop formation, and Rad52 converts R-loop into ADR-loop followed by Polδ-mediated BIR, resulting in homology-mediated GCRs. This study identifies a previously unrecognized mechanism of R-loop formation and defines a pathway by which R-loops induce genome instability.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　XU Ran　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	中川　拓郎
	副 査　教授	篠原　彰
	副 査　教授	小布施　力史

論文審査の結果の要旨

生物はそれぞれの種に固有の染色体を持つ。転座、欠失、逆位などの染色体異常が生じると、細胞が死んだり、ガンなどの遺伝性疾患が起きたりする。染色体のセントロメア領域は、DNA 反復配列を介した染色体異常が起こる脆弱領域である。しかし、通常、セントロメア領域は高度に凝縮したヘテロクロマチン構造を形成することで染色体異常の発生を抑制されている。興味深いことに、ヘテロクロマチン構造が正常に形成しないと、セントロメア領域で DNA を鋳型に RNA を合成する転写が起こり、転写依存的に染色体異常が発生する。しかし、転写が染色体異常を誘発する分子メカニズムは解明されていない。

XU Ran 氏は、転写が染色体異常を誘発するしくみを明らかにするために、分裂酵母 *S. pombe* を用いて DNA−RNA 免疫沈降（DRIP）を行った。その結果、ヘテロクロマチン欠損株では転写の進行停止（Pause）、後退（Backtrack）、再開（Restart）の PBR サイクルが起きることで R ループと呼ばれる DNA-RNA 二本鎖を含む特殊な核酸構造がセントロメア領域に蓄積すること、また、この R ループにより染色体異常が起きることを明らかにした。つぎに、クロマチン免疫沈降（ChIP）を行ったところ、ヘテロクロマチン欠損株では、組換え酵素 Rad52 が R ループ依存的にセントロメア領域に局在し、染色体異常の発生を促進することを明らかにした。更に、精製 Rad52 蛋白と人工合成した R ループを用いた生化学実験により、Rad52 は R ループと相補的塩基配列を持つ一本鎖 DNA との間のアニーリングを促進することで Annealing-induced DNA-RNA (ADR)ループと名付けた核酸構造を形成することを発見した。これらの結果から、セントロメア領域で転写が起きると R ループが蓄積し、Rad52 が反復配列間で R ループと一本鎖 DNA から ADR ループを形成することで染色体異常が起きると考えられる。

近年、ゲノム上の様々な領域で R ループが形成し、転写制御、DNA 二本鎖切断の修復、ゲノム不安定化などに関与することが報告されている。しかし、R ループの形成機構や R ループの作動機序などは明らかになっていない。XU Ran 氏は、ヘテロクロマチン欠損株のセントロメア領域では、特に、転写の PBR サイクルにより染色体異常を誘発する R ループが蓄積することを明らかにした。また、このようにして蓄積した R ループは、組換え酵素 Rad52 が ADR ループに変換することで DNA 反復配列を介した染色体異常の最初の中間体となるモデルを提唱した。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。