

論文の内容の要旨

The RNA degradation system CCR4-NOT maintains
stability and transcription of ribosomal RNA gene

(リボソーム RNA 遺伝子の安定性と転写の維持に関わる
RNA 分解複合体 CCR4-NOT の機能解析)

氏名 細山田 舜

(序論)

リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA)は、あらゆる生物に存在し、mRNA からタンパク質への翻訳を担うリボソームの合成に必須の遺伝子である。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)のリボソームは、79 種類のリボソームタンパク質と 4 種類のリボソーム RNA からなり、それらはそれぞれ細胞内の総タンパク質の約 70%及び総 RNA の約 60%を占める。十分量のリボソームを供給するため、出芽酵母では、12 番染色体上に約 150 コピーのリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA)が存在する。rDNA の 1 ユニットは、35S 及び 5S の rRNA 遺伝子と、それらの間の領域に存在する複製開始配列 (ARS)、複製阻害点 (RFB)、及び双方向性非コードプロモーター (E-pro)から構成される。これらの遺伝子間領域の因子は、rDNA の増幅や維持に不可欠である。rDNA は多数の同一配列が存在するため、コピー間で組換えが生じ、コピーの脱落や環状の rDNA (ERC)が生じやすく、他のゲノム領域に比べ、極めて不安定な領域である。しかし、このような不安定性を持つにも関わらず、rDNA のコピー数は一定のレベルに維持されていることから、コピー数が減少した場合においても、元に戻し安定に維持するメカニズムがあると考えられている。このメカニズムについて、出芽酵母で、詳細な研究が行われてきた。出芽酵母の S 期では、rDNA 遺伝子間領域の複製阻害点および、そこに結合する Fob1 タンパク質が DNA 増幅組換えにおいて中心的な役割を果たしている。Fob1 タンパク質は複製阻害点に結合し、DNA 二本鎖切断 (DSB)を引き起こす。通常は、姉妹染色分体間をつなぎとめるコヒーシンが結合しているため、同一箇所の分体間で組換え及び修復が起き、コピー数の変動は生じない。一方、コピー数が減少した場合、ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 の発現量が低下し、rDNA の遺伝子間領域の非コードプロモーター (E-pro)から生じる双方向の転写が活性化する。この転写は、姉妹染色分体を束ねるコヒーシンの結合を阻害し、分体

間の“ずれた”組換えを引き起こす。E-pro からの転写によるずれた組換え機構により、2 度複製される領域が生じ、コピー数は上昇する。さらに、コピー数が野生型レベル（約 150 コピー）に達すると、Sir2 タンパク質の発現量が増加し、E-pro からの転写が抑制される。その結果、コピーシスが rDNA に再度結合し、ずれた組換えが抑えられ、同一箇所の姉妹染色

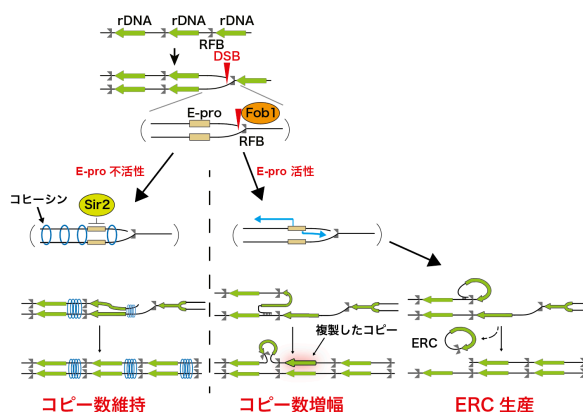


図 1. rDNA のコピー数変動機構

色分体間の組換えが起こり、コピーの上昇が止まる（図 1）。このような、複製阻害、二本鎖切断、E-pro からの転写を介した rDNA のコピー数維持機構の基本原理は明らかにされているが、rDNA の切断機構や、上昇後のコピー数の維持機構は明らかになっていない。これらの問題を解決するため、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）により、出芽酵母の非必須遺伝子欠損株ライブラリー（4876 株）に対する網羅的なスクリーニングを行い、rDNA の安定性維持機構に関与する新規遺伝子群を同定した。その結果、約 700 以上の候補遺伝子を特定した。続いて、Gene Ontology を用いて、DNA 代謝に関わる遺伝子を中心に、242 株まで絞り込みを行った。これらを、再度 PFGE を用い詳細に rDNA の表現型を調べた結果、顕著に rDNA が不安定化する 73 の変異株の絞り込みに成功した。

（結果）

rDNA の不安定性を調べるため、スクリーニングに用いられる PFGE 法は、rDNA の安定性を調べる方法として確立されているが、定量性が低いという問題点がある。そこで、rDNA の不安定性を示す別の方法として、rDNA 組換え時の副産物として生じる環状 rDNA（ERC）量を指標として、rDNA が顕著に不安定化した 73 の変異株について、定量的なスクリーニングを行った。

その結果、61 の変異株において、野生株に比べ、ERC 量の増加が見られた。その内、最も ERC 量が顕著に増加した変異株が *pop2* であった（約 46 倍）。Pop2 は 3'末端の脱アデニル化を担う CCR4-NOT 複合体の構成タンパク質の 1 つである。出芽酵母の CCR4-NOT 複合体は、Ccr4 や Pop2 による 3'末端の脱アデニル化反応の制御に加え、転写開始や伸長、E3 ユビキチンリガーゼである Not4 を介したタンパク質分解の制御など、遺伝子発現のあらゆる段階に関わる多機能複合体である。出芽酵母の CCR4-NOT 複合体は、Not1 を足場タンパク質として、Not2~5, Caf40, Caf130, Ccr4, Pop2 の 9 つのタンパク質から構成される巨大複合体である。加えて、RNA ヘリカーゼである Dhh1 を補因子として持つ。また、この複合体の構成因子及び酵素活性は酵母とヒト間で

高い保存性があることが明らかになっている。しかし、先行研究において、リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の安定性維持に対する CCR4-NOT 複合体の役割は明らかになっていなかった。本研究において私は、出芽酵母のリボソーム RNA 遺伝子の安定性に対する CCR4-NOT 複合体の機能解析を行った。rDNA の安定性に対する CCR4-NOT 複合体の関与を調べるため、CCR4-NOT 複合体の変異株を作製し、PFGE を用い、rDNA の安定性を調べた (図 2)。

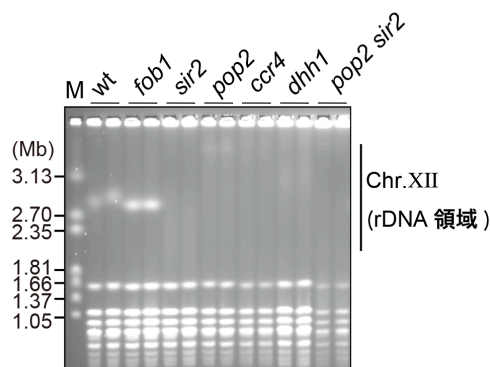


図 2. CCR4-NOT 複合体変異株の PFGE の結果の一部。M はマーカーを表す。

その結果、*pop2*, *ccr4*, *dhh1*, *not4* の変異株では、rDNA 領域を含む XII 番染色体のバンドが極めてブロード、すなわち不安定化していることが示された。rDNA 組換えと CCR4-NOT 複合体の関係を調べるため、CCR4-NOT 複合体の構成因子と *fob1* の二重変異株を作製した。その結果、いずれの二重変異株でも、rDNA の安定性が回復した。以上の結果より、CCR4-NOT 複合体は rDNA の不安定化において、Fob1 タンパク質の結合による DSB 後に機能していることが示唆された。続いて、CCR4-NOT 複合体の持つ脱アデニル化活性が rDNA の安定性に関与しているかどうかについて調べた。CCR4-NOT 複合体の構成因子の内、Pop2 と Ccr4 は細胞質の RNA 分解に対し、脱アデニル化活性を有すると考えられている。そこで、これら 2 つのタンパク質の脱アデニル化活性を欠失した点変異を有するプラスミドを作製し、相補実験を行った。その結果、*pop2* と *ccr4* の欠損変異株に対し、*POP2* と *CCR4* の野生型遺伝子を持つプラスミドを入れた場合、XII 番染色体が 3Mb 近傍でシャープになり、rDNA の安定性が回復したが、Ccr4 の脱アデニル化活性を欠失させたプラスミド *ccr4* (E556A) を *ccr4* 欠損株に入れた場合、XII 番染色体はブロードなバンドになり、rDNA は不安定化したままであった。Pop2 の脱アデニル化活性を欠失させたプラスミド *pop2* (S44A E46A) を *pop2* 欠損株に入れた場合、2.8Mb 近傍にシャープなバンドが観察され、rDNA の安定性が回復した。これらの結果より、Ccr4 の脱アデニル化活性が rDNA の安定性を維持するために必要であることが示唆された。

出芽酵母 (*S. cerevisiae*) における先行研究より、rDNA 領域の組換えは、3 つの要因によって影響を受けることが示されている。それぞれ、1)複製阻害点 (RFB) の活性、2)複製阻害後に生じる 2 本鎖切断 (DSB) の活性、3)E-pro から非コード RNA の転写である。私は、CCR4-NOT 複合体の変異株において、これら 3 つの要因のどれが影響を受けているかを調べた。rDNA が不安定化した *pop2*, *ccr4*, *dhh1*, *not3*, *not4* の各変異株において、これらの活性を調べた。1)について、S 期の rDNA 領域における RFB 活性を検出するために、2 次元 (2D)ゲル電気泳動を行った。その結果、これら 5 つの変異株のシグナル強度は wt と同程度だった。2)について、RFB 後の DSB 活

性を検出するために、1次元(1D)ゲル電気泳動を行った。その結果、*pop2*, *ccr4* 変異株の DSB 活性は wt より約 1.6 倍高く、有意差が見られた。3)について、E-pro から転写される非コード RNA の発現量をノザンプロットを用いて調べた。その結果、*pop2*, *ccr4*, *dhh1*, *not4* の変異株において、E-pro からの両方向の転写産物 (IGS1-R, IGS1-F)の顕著な増加が見られた。上記の結果より、CCR4-NOT 複合体の変異株において rDNA が不安定化した主要因は、細胞内の非コード RNA の増加であると示唆された。続いて、非コード RNA の増加による影響について解析した。*sir2* 変異株において、E-pro からの転写量の増加は、コヒーシンの rDNA 領域への結合を阻害し、rDNA の増幅を引き起こす事が示されている。E-pro からの転写産物の増加が見られる *pop2* 変異株においても同様の変化が見られるのではないかと考えた。この仮説を検証するため、ChIP-qPCR 法を用いて、rDNA 領域におけるコヒーシンサブユニット Mcd1 の結合量を調べた。その結果、*pop2* 変異株においても、Mcd1 の結合量が *sir2* 変異株と同程度に減少していることが示された。また、コンデンシンについても、rDNA の安定性に影響を及ぼすことが知られていたが、E-pro からの転写との関係については、明らかではなかった。同様に ChIP-qPCR 法により、rDNA 領域におけるコンデンシンサブユニット Smc2 の結合量を調べた。その結果、*sir2* と *pop2* の両方の変異株において、コンデンシンの結合量は wt レベルの半分以下に減少した。この結果より、*sir2* および *pop2* 変異株における E-pro 転写産物の増加がコヒーシン及びコンデンシンの結合量を低下させ、rDNA の不安定化を引き起こしている事が示唆された。

pop2 と *sir2* の変異株はいずれも E-pro からの転写が見られるが、*pop2* 変異株では *sir2* 変異株に比べ、著しい生育の悪化が観察された。この点について、E-pro からの転写産物との衝突により rRNA の合成が抑制されているのではないかと考えた。この仮説を検証するため、rRNA 産物の量を測定した。その結果、*pop2* 変異株において、25S, 18S rRNA の発現量が野生株に比べ、50 %程度まで減少していることが観察された。この結果より、*pop2* 変異株においては、rRNA の転写あるいはプロセシングに至る過程に異常が生じていることが示唆された。

(総括)

本研究で私は、PFGE に加え、ERC を指標とした定量的なスクリーニングにより、これまで見出されていなかった rDNA の安定性に影響を及ぼす新規遺伝子の同定に成功し、その解析結果より、RNA 分解系である CCR4-NOT 複合体が rDNA の安定性維持に強く関与する事を発見した。

また、CCR4-NOT 複合体の欠損に伴う rDNA の不安定化が、rDNA 領域における非コード RNA の発現量増加により引き起こされるコヒーシン・コンデンシンの結合量低下が原因である事を明らかにした。近年の研究において、rDNA の不安定化が、癌や老化といった細胞機能の異常を引き起こす事が知られてきており、本研究の成果が、これらの異常な分子機構の解明につながる事が今後期待される。