

論文の内容の要旨

論文題目

分裂酵母における長鎖非コード RNA を介した
ストレス応答・クロマチン制御機構

氏名

竹俣直道

〈序論〉

DNA がもつ遺伝情報は、転写反応によって RNA に写し取られた後、タンパク質へと翻訳されることでその機能を果たす。ごく一部のものを除き、RNA 分子は遺伝情報の中間伝達物質としてのみ働くと考えられてきた。しかし、2000 年代以降のトランスクリプトーム解析によって、真核生物のゲノムからはタンパク質情報をもたない長鎖 RNA (長鎖非コード RNA、lncRNA) が多数転写されていることが明らかになった。lncRNA は、当初は機能をもたないジャンク分子だと考えられていたが、近年になって細胞分化や疾患といった高次の生命現象に関わることが次々と報告されている。また、ヒトなどの複雑な生物では、ゲノムの大部分がタンパク質情報をもたない代わりに、これらの領域から lncRNA が多数転写されている。このような知見から、lncRNA はタンパク質の数だけでは説明できない生命の複雑さを生み出すのに重要な分子なのではないかと考えられ、注目を集めている。

lncRNA の分子機能には未だ不明な点が多いが、近年の研究により、lncRNA が遺伝子発現制御に関わることが明らかになってきた。真核生物では、DNA がヒストンなどのタンパク質と結合することで凝縮したクロマチン構造を形成し

ているため、転写を行うためにはこの構造を再編成する必要がある。lncRNA は、転写制御タンパク質の機能や局在を制御することでクロマチンに作用し、遺伝子発現の調節を行うと考えられている。

lncRNA はゲノム中の様々な領域から転写されており、プロモーターやエンハンサーといった遺伝子制御領域の周辺からも lncRNA が転写されている。このような lncRNA の発現レベルは、近傍の遺伝子制御領域の活性と相関していることから、遺伝子制御領域から転写される lncRNA も遺伝子発現調節に関わる可能性が示唆されている。しかしながら、遺伝子制御領域から転写される lncRNA は多数存在するにも関わらず、その分子機能はほとんど明らかにされていない。

所属研究室では、真核生物のモデル生物である分裂酵母において、糖新生遺伝子 *fbp1*⁺ のプロモーター周辺から転写される lncRNA を発見した (Hirota et al. 2008)。そしてこの lncRNA を *mlon*RNA (metabolic stress-induced long noncoding RNA) と名付けた (Galipon et al. 2013)。*mlon*RNA は *fbp1*⁺ mRNA の転写開始点上流から転写され、その発現はグルコース飢餓時に活性化される。*mlon*RNA の転写が活性化されると、*fbp1*⁺ のプロモーター領域でクロマチンの脱凝縮が促進され、その結果 *fbp1*⁺ mRNA の発現が大規模に活性化される。また、同様の lncRNA 転写は他のストレス応答遺伝子でもみられており、これらの遺伝子プロモーターでも lncRNA の転写に伴うクロマチン脱凝縮が観察されている (Oda et al. 2015)。

本研究では、「遺伝子制御領域から転写される lncRNA がクロマチン構造や遺伝子発現の制御にどう関わるか」を、*fbp1*⁺ などのストレス応答遺伝子をモデルとして解析した。上述したように、lncRNA は転写制御タンパク質に作用することで遺伝子発現制御を行うと考えられている。そこで、*fbp1*⁺ のクロマチン・転写制御に関わるタンパク質因子に着目し、これらが *mlon*RNA 転写とどのように協調して機能するかを調べた。さらに、ゲノムワイド解析も合わせて行うことで、得られた知見の一般性を検証した。

〈結果および考察〉

1. *mlon*RNA の転写はストレス応答性転写因子 Atf1 の結合を促進する

ストレス応答性転写因子 Atf1 は、*fbp1*⁺ プロモーターに結合してクロマチンの脱凝縮を促進することが知られている。そこで *mlon*RNA と Atf1 がどのように協調して機能するかを検証した。*fbp1*⁺ プロモーターでの Atf1 結合をクロマチン

免疫沈降 (ChIP) により定量したところ、Atf1 の結合がグルコース飢餓時に観察された。転写阻害剤や *fbp1*⁺プロモーターへの変異導入によって *mlonRNA* の転写を抑制すると、この結合は著しく減少し、これに伴ってクロマチンの脱凝縮も阻害された。一方、*fbp1*⁺プロモーター中の Atf1 結合領域を欠損させた株では、*mlonRNA* の発現が阻害された。すなわち、*mlonRNA* 転写と Atf1 結合の間には相互依存的な関係がみられた。以上の結果から、*mlonRNA* の転写を介した正のフィードバックによって Atf1 の結合が促進されることで、クロマチン脱凝縮や *fbp1*⁺の転写が活性化されることが示唆された。また、異所的に *mlonRNA* を発現させても Atf1 の結合は促進されなかったことから、この促進効果はシス作用性であることが明らかになった。

2. 転写依存的な Atf1 結合のゲノムワイド解析

続いて、*fbp1*⁺と同様の機構が他の遺伝子でもみられるかを検証するために、超並列 DNA シーケンサーを用いた ChIP (ChIP-seq) を行い、グルコース飢餓時の Atf1 結合をゲノム全域で調べた。その結果、転写阻害剤によって Atf1 の結合が阻害される領域 (転写誘導性サイト) を 50 カ所同定した。多くの転写誘導性サイトでは、グルコース飢餓に応答して *lncRNA* が転写されており、これに伴って Atf1 の結合やクロマチン脱凝縮が促進されていた。したがって、多くの転写誘導性サイトでは *fbp1*⁺と同様、近傍から起こる *lncRNA* 転写が Atf1 の結合を促進することで、クロマチンの脱凝縮が促進されていると考えられる。

3. *lncRNA* 転写は、コリプレッサー Tup11・Tup12 の機能を阻害することで Atf1 結合を促進する

続いて、*lncRNA* の転写以外にどのような因子が Atf1 の結合制御に関わるかを調べた。Groucho/Tup1 様転写コリプレッサーの Tup11・Tup12 は *fbp1*⁺の発現を抑制することから、Tup11・12 が Atf1 の結合抑制に関わるのではないかと考え、これを検証した。*tup11Δ tup12Δ*二重破壊株を用いて ChIP を行ったところ、*fbp1*⁺プロモーターでの Atf1 結合がグルコース飢餓条件下で異常に亢進していた。また、二重破壊株では *mlonRNA* の転写を阻害しても Atf1 の結合が減少しなかった。これらの結果と *mlonRNA* 転写のシス作用性から、(1) Tup11・12 が Atf1 の結合を抑制すること、(2) *mlonRNA* の転写により、*fbp1*⁺領域での Tup11・12 の作用が局所的に弱められ、その結果 Atf1 の結合が促進されることが明らかに

なった。免疫沈降により *mlonRNA* と *Tup11・12* の間に相互作用がみられたことから、*mlonRNA* は *Tup11・12* と結合することでその機能を阻害しているのかもしれない。

続いて、*tup11Δ tup12Δ*二重破壊株を用いて *Atf1* の ChIP-seq を行った。その結果、*Tup11・12* は多くの転写誘導性サイトで *Atf1* の結合を抑制していることがわかった。これらのサイトはグルコース代謝に関わる遺伝子のプロモーター領域に位置しており、また近傍から *lncRNA* が転写されているのも確認された。このことから、*lncRNA* と *Tup11・12* による拮抗的な制御は、グルコース代謝関連遺伝子群において *Atf1* の結合を制御するのに特に重要だと考えられる。

4. *lncRNA* 転写と *Tup11・Tup12* は遺伝子活性化のストレス種特異性を制御する

*tup11Δ tup12Δ*二重破壊株では、グルコース飢餓以外のストレスによっても *fbp1⁺*の発現が活性化されることが報告されている。*tup11Δ tup12Δ*二重破壊株を用いて ChIP を行ったところ、破壊株では、*fbp1⁺*プロモーターでの *Atf1* 結合がグルコース飢餓以外のストレスによっても誘導されていた。このことから、*mlonRNA* 転写と *Tup11・12* による正負の制御は、*Atf1* 結合のストレス種特異性を規定するのに重要であることが明らかになった。また、*tup11Δ tup12Δ*二重破壊株では、*fbp1⁺*の発現がグルコース飢餓以外のストレスによっても活性化されていた。したがって、*Atf1* 結合のストレス種特異性を制御することは、異なるストレスに対して適切な遺伝子発現応答を行う上で重要な機構だと考えられる。

以上から、遺伝子のプロモーター領域で起こる *lncRNA* 転写は、転写因子の結合を制御することで、クロマチン構造の制御や複雑な遺伝子発現応答に寄与することが示唆された。