

学位論文

栄養飢餓ストレス応答性の
長鎖非コード RNA を介した遺伝子発現制御

(Gene regulation by long noncoding RNAs
during glucose starvation in fission yeast)

平成 26 年 12 月博士 (理学) 申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻 小田 有沙

目次

要旨	3
Abstract	4
略語一覧	6
序章	7
1 セントラルドグマ、転写制御とクロマチン構造	7
2 非コード RNA と長鎖非コード RNA	7
3 真核生物細胞のグルコース飢餓ストレス応答	10
4 分裂酵母のグルコース飢餓ストレス応答性 lncRNA による転写制御 ...	10
5 <i>fbp1</i> アンチセンス RNA	11
6 モデル生物としての分裂酵母	11
7 数理モデル構築とシミュレーション	12
8 遺伝子ネットワークのダイナミクス	12
9 本研究の概説	13
結果	17
第 1 章 分裂酵母のグルコース飢餓ストレス応答のゲノムワイド解析	17
1.1 mRNA の転写応答	17
1.2 ストレス応答転写因子 Atf1 依存的な遺伝子発現制御	19
1.3 グルコース飢餓ストレス下でのクロマチン構造の変化	19
1.4 ncRNA の転写応答	20
1.5 <i>fbp1</i> ⁺ lncRNA の転写制御	20
1.6 mlonRNA 型 lncRNA の探索	21
1.7 mlonRNA 型 lncRNA とアンチセンス RNA	23
1.8 lncRNA の転写のストレス特異性	23
第 2 章 長鎖非コード RNA を介した糖新生遺伝子 <i>fbp1</i> ⁺ の発現制御機構 ..	43
2.1 <i>fbp1</i> -as の転写	43
2.2 <i>fbp1</i> -as と sense RNA の相関	44
2.3 グルコース再添加時の素早い <i>fbp1</i> ⁺ mRNA の不安定化	45
2.4 Dicer 依存的な分解による <i>fbp1</i> ⁺ mRNA の安定性制御	47
2.5 ヘテロクロマチン非依存的な Dicer 依存的な <i>fbp1</i> ⁺ mRNA 転写抑制	48
2.6 <i>fbp1</i> ⁺ mRNA の転写レベルの抑制	48

第3章	<i>fbp1</i> ⁺ 遺伝子発現制御の数理モデル	68
3.1	<i>fbp1</i> ⁺ mlonRNA / mRNA 転写活性化制御モデルの構築	68
3.2	mlonRNA による mRNA の転写活性化 3 変数モデル.....	70
3.3	<i>fbp1</i> ⁺ mlonRNA / mRNA / asRNA が相互作用する転写活性化モデル	72
3.4	<i>fbp1</i> ⁺ mRNA / asRNA の相互作用を考慮した転写抑制モデルの構築.....	74
3.5	転写抑制シミュレーション ; RNA 合成阻害剤の添加.....	74
材料と方法	85
考察	95
1	分裂酵母におけるグルコース飢餓ストレスへのグローバルな応答の観察	95
2	mlonRNA 型 lncRNA の探索	96
3	<i>fbp1</i> -アンチセンス RNA 発現	97
4	<i>fbp1</i> -アンチセンス RNA と mRNA 発現抑制	99
5	環境適応時の遺伝子発現制御に対する数理モデルによる検証.....	101
6	lncRNA の転写の生物学的な意義	102
7	頑強な遺伝子発現制御とゆらぎと適応	103
終わりに	106
謝辞	107
参考文献	108

要旨

細胞では多種の非コード RNA (ncRNA) が転写されており、そのうち 200 ヌクレオチドを超える長さを有する長鎖 ncRNA (lncRNA) は、クロマチンやヒストン修飾を介して高次生命現象の制御に関わる。所属研究室では、分裂酵母のグルコース飢餓時に糖新生遺伝子 *fbp1+* 上流域から転写される lncRNA を見出した(廣田ら、*nature*, 2008)。この lncRNA は、グルコース飢餓を契機に段階的に転写開始点が下流に移行し、これに伴いプロモーター領域のクロマチン再編成が生じ、遺伝子の大規模な活性化に至る。

本研究では *fbp1+* 領域の lncRNA と類似の lncRNA をゲノムワイドに探索するため、RNA-seq、及び抗ヒストン H3 抗体を用いた ChIP-seq を行った。まず、グルコース飢餓応答初期における mRNA や ncRNA の発現動態を、クロマチン構造変化と関連づけて解析した結果、一群の lncRNA で他のストレス遺伝子と類似の制御がみられた。さらに、RNA-seq の波形パターンを統計的に解析し *fbp1+* lncRNA と同じ性質を持つ 9 つの lncRNA を同定した。

さらに、グルコースが豊富な条件下で *fbp1+* 領域でアンチセンス lncRNA (*fbp1-as*) が、センス鎖 lncRNA や mRNA と相反的に転写されることを見出した。*fbp1-as* の誘導合成系を構築してセンス鎖 RNA への影響を調べたところ、*fbp1-as* の過剰発現がセンス鎖 RNA の発現レベルに大きな影響を与えることが判明した。また、飢餓時にグルコースを再添加するとダイサー依存的にセンス鎖 RNA の安定性が低下した。この過程に関して数理モデルを構築し制御機構のシミュレーションを行った。以上より、分裂酵母の栄養ストレス応答においてセンス・アンチセンス lncRNA からなる遺伝子制御ネットワークが重要な働きをすることが明らかになった。

Abstract

Recent genome-wide studies have revealed that eukaryotic cells express a variety of non-coding RNAs (ncRNA), some of which are rather long (> 200nt) ncRNAs transcribed by RNA polymerase II (long ncRNA, lncRNA). It has been postulated that lncRNAs plays critical roles in gene regulation through modulation of chromatin and epigenetic status, but the precise mechanisms are not fully understood yet.

I have been studying fission yeast lncRNAs important for gene activation and chromatin remodeling of genes activated during glucose starvation. Upon glucose starvation, a cascade of lncRNAs transcription starts from the 1.3-0.7 kb upstream noncoding segment of *fbp1*⁺, which encodes fructose-1,6-bisphosphatase, a key regulatory enzyme in gluconeogenesis. This gene activation is accompanied with stepwise chromatin remodeling in the 5' noncoding segment (Hirota et al., *Nature*, 2008). Such lncRNAs were referred to as mlonRNAs (metabolic stress-induced long non-coding RNA).

To search for similar lncRNAs induced in response to shortage of glucose, in this study I conducted strand-specific RNA sequencing experiments, together with analyses of chromatin landscape by histone H3-based immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq). The clustering analysis suggested the presence of three distinct classes of mRNAs and ncRNAs: early, middle, and later transcripts during response to glucose starvation. Substantial portion of them are expressed depending upon a CREB/ATF-type transcription factor Atf1 which is essential for fission yeast stress response.. To find out “mlonRNA-like lncRNAs”, a new computer program that examines dynamic changes in transcripts was developed. Using this program, several Atf1-dependent lncRNAs similar to the *fbp1*⁺ mlonRNA are newly identified. They are confirmed to be associated with local chromatin remodeling.

More importantly, overlapping with this lncRNA transcription, antagonistic expression of small amount of antisense RNAs (*fbp1*-as) was observed under glucose-rich conditions. Conditional induction of *fbp1*-as in the plasmid-borne reporter resulted in inhibition of sense mlonRNA and mRNA transcription on the same DNA molecule, even in glucose starved conditions. Moreover, when glucose-starved cells are refed with glucose, sense transcripts are rapidly destabilized, partly dependent on Dcr, in the presence of *fbp1*-as. Finally, I conducted mathematical modeling of transcriptional dynamics at the *fbp1*⁺ locus during glucose refeeding to estimate the

effect of antisense RNA transcription. From these, I propose that an integrated gene regulation network of sense and antisense lncRNAs plays pivotal roles in robust adaptation to glucose starvation.

略語一覽

asRNA	antisense RNA
ATF	activating transcription factor
ATP	adenosine triphosphate
cAMP	cyclic AMP; cyclic adenosine monophosphate
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
ChIP-seq	ChIP sequencing
CREB	cAMP response element-binding protein
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
<i>fbp1</i> -as	antisense RNA of <i>fbp1</i> ⁺
FPKM	fragments per kilobase of exon per million mapped fragments
GO	Gene ontology
HDAC	Histone Deacetylase
lncRNA	long noncoding RNA
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MDS	Multi dimensional scaling
mlonRNA	metabolic stress inducible long noncoding RNA
ncRNA	noncoding RNA
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RNA-seq	RNA sequencing
RNAP II	RNA polymerase II
SDS	sodium lauryl sulfate
Tris	tris hydroxymethyl aminomethane
TSS	transcription start site

序章

1 セントラルドグマ、転写制御とクロマチン構造

生物は自身の持つ遺伝情報をもとに自分自身を作り出し、また、遺伝情報を子孫に伝える。生物の遺伝情報は DNA にコードされている。ゲノム DNA 上の遺伝子領域は、mRNA へと転写され、細胞内で様々な機能を持つタンパク質へと翻訳される。つまり、ゲノム上の遺伝子領域の特定の DNA 塩基配列が、タンパク質の設計図の役割を果たしており、mRNA はタンパク質合成のための青写真の役割を果たす。この一連の生命情報の流れに関する概念は「セントラルドグマ」と呼ばれる。

酵素や構造タンパク質をはじめ、生命を維持する多くの事象には遺伝子がコードするタンパク質が関与している。遺伝子の発現は、細胞の状態によって巧妙に制御されており、必要なときに必要な量だけ遺伝子が発現される。遺伝子発現状態が細胞状態を決定するため、遺伝子発現の制御は生命現象全体にとってきわめて重要である。

タンパク質自体の発現量は直接的には、翻訳、翻訳後調節あるいはタンパク質の鋳型となる mRNA 量、局在などで調節される。mRNA の発現量についても、転写、転写後調節、などの様々な制御ステップがあり、各工程で多種の因子が複雑なカスケードやネットワークを構成して相互制御し合っているが、特に、mRNA の転写の調節には、転写因子やクロマチン構造の寄与が大きいと考えられてきた。

実際、ゲノム DNA を核内に収容する基本の構造であるクロマチン構造は、単にヒストンの凝縮、脱凝集だけでなく、ヒストンバリエーションや、ヌクレオソームの配置、あるいはメチル化やアセチル化などの化学修飾によるヒストンマークなどにより、細やかな制御が行われている。これらの制御はやはり機能性のタンパク質が主体となって行われているが、一方で、最近では遺伝子発現調節において小分子 RNA や長鎖非コード RNA が果たす役割も注目されている。

2 非コード RNA と長鎖非コード RNA

近年のトランスクリプトーム技術の発展によって、真核生物の細胞内では多くの RNA が転写されていることが明らかにされてきた。これらの RNA 研究により、驚くべきことに、細胞内では実に多種多様な非コード RNA (non-coding RNA; ncRNA)、すなわち、タンパク質をコードしていない転写産物が転写されている事が証明された。この ncRNA の中には、tRNA、rRNA、small RNA(microRNA、siRNA や piRNA)の前駆体だけでなく、200 ヌク

レオチドを超える長さの長鎖非コード RNA (long non-coding RNA; lncRNA) も含まれる。しかし、lncRNA のうちの多くは、未だ謎が多く、細胞内で何らかの機能を担っているかすら明らかにされていない(Djebali *et al.* 2012)。

真核生物のほとんどの lncRNA は mRNA と似通った特徴を持つ。例えば、多くの場合、mRNA も lncRNA も、RNA ポリメラーゼ II (RNAP II) に転写され、5'端にキャップ構造、3'端には polyA テールを持ち、スプライシングなどの修飾を受ける事もある。何ら機能を持たないという報告のある lncRNA も存在はするが(Struhl 2007)、一方で、特定の lncRNA が、細胞のシグナルや遺伝子制御など様々な局面において重要な役割を果たすという報告もなされている。比較的古くから研究が行われている機能性 lncRNA の一例としては X 染色体不活性化に関わる lncRNA、X-inactive specific transcript (*Xist*) と、その逆鎖から重複するように転写されるアンチセンス lncRNA (*Tsix*) が挙げられる。ほ乳類の発生段階において、*Tsix* は X 染色体の不活性化に中心的な役割を果たす(Pontier & Gribnau 2011)。

長い遺伝子間領域から転写される lncRNA は lincRNA (large intergenic/intervening noncoding RNA) とよばれ、代表的なものに、RoR (Regulator of Reprogramming) がある。RoR は、幹細胞の多分化能に関与する lncRNA で、分化を誘導する(Fatica & Bozzoni 2014; Loewer *et al.* 2010; Rinn & Chang 2012)。さらに、lncRNA はがんなどの病気における疫学的にも非常に重要な位置づけにあるものが多く知られ、病理学分野においても創薬のターゲットとして着目されている(Rinn & Chang 2012; Scheuermann & Boyer 2013)。

lncRNA の関与する遺伝子制御メカニズムに関してもさまざまな報告がなされつつある。ある種の lncRNA は転写因子の活性を阻害する機能を持つため”RNA decoy”と呼ばれる。また、RNA-タンパク質の相互作用によって”scaffold”の役割を果たしたり、クロマチン修飾因子の呼び込みに一役買って”guiding molecule”として働いたり、あるいは、ターゲット RNA の転写、スプライシングないし分解における制御、”controllers”としての役割を担うものもある(Fatica & Bozzoni 2014; Rinn & Chang 2012)。*Xist* (Penny *et al.* 1996)や *Kcnq1ot1* (Pandey *et al.* 2008)、*HOTAIR* (Tsai *et al.* 2010)、そして *HOTTIP* (Fatica & Bozzoni 2014; Wang *et al.* 2011)に代表される多くの lncRNA は染色体をターゲットとするクロマチン・エピジェネチック修飾関連タンパク質複合体をリクルートする。例えば、クロマチン修飾複合体 PRC2(Rinn *et al.* 2007; Tsai *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2010) や LSD1 (lysine specific demethylase 1)-CoRest (a neuronal gene repressor) 複合体 (Tsai *et al.* 2010) と相互作用する lncRNA の存在が知られている。もっとも、PRC2 複合体と lncRNA が本当に特異的に結合しているかは、依然議論の余地がある

(Cifuentes-Rojas *et al.* 2014; Davidovich *et al.* 2013; Kaneko *et al.* 2013)。

一方で、多くの lncRNA はタンパク質をコードする遺伝子の逆鎖から転写されている。すなわち、二本鎖染色体のうち、タンパク質をコードしている側の DNA 鎖をセンス鎖と定義したときに、タンパク質をコードしていない側の DNA 鎖 (アンチセンス鎖) 側もまた転写されることがあるのである。このようなアンチセンス鎖からの転写産物 (アンチセンス RNA ; asRNA) は決して少なくなく、ヒトにおいては、転写産物の 30%をも占めると言われている(Ozsolak *et al.* 2010)。

これまで機能が明らかにされているアンチセンス RNA の中には、*Xist* と *Tsix* のように、センス鎖転写産物と対になって役割を果たすと推定されているものがある (Pontier & Gribnau 2011)。さらには、アンチセンス RNA はセンス鎖の lncRNA と同様にエピジェネティック修飾関連因子と相互作用することで特定の遺伝子活性を制御するものも存在する (Pelechano & Steinmetz 2013)。前立腺がんにおいて高発現することが知られる *ANRIL/CDKN2B-AS1* (antisense lncRNA in INK4 locus) は、ヒストン H3K27 のメチル化を局所的に誘導して、腫瘍抑制遺伝子 *CDKN2B-CDKN2A* の転写を抑制する (Yap *et al.* 2010; Yu *et al.* 2008)。分裂酵母ではアンチセンス RNA は転写と共役して H3K4 や H3K36 のメチル化修飾などを引き起こすことによって、HDAC をリクルートし、センス鎖側の遺伝子発現を抑制し得る (Houseley *et al.* 2008; Kim *et al.* 2012; Pinskaya *et al.* 2009)。

lncRNA の中には、stress activated protein kinase (SAPK)-dependent *CDC28* lncRNA のように環境ストレスに応答して転写レベルが変化するものがある (Nadal-Ribelles *et al.* 2014)。分裂酵母では、フォスファターゼトランスポーターをコードする *PHO84* のアンチセンス RNA が、chronological aging stress に応じて誘導される事が報告されている (Camblong *et al.* 2007)。

出芽酵母の細胞をセリンが豊富な条件下で培養すると、*SER3* 遺伝子上流領域から *SRG1* lncRNA が転写される (Martens *et al.* 2004)。*SRG1* の転写はプロモーター周辺のヌクレオソーム構造により *SER3* の転写を抑制し (Hainer *et al.* 2011)、セリンの欠乏状態では *SRG1* の転写が抑制されることにより、*SER3* が活性化される (Martens *et al.* 2005)。

分裂酵母では、浸透圧ストレス応答性の lncRNA *SPNCRNA.1164* がストレス応答における主要な転写因子 Atf1 の制御を行なう (Leong *et al.* 2014)。このように、ストレス応答性の転写制御において、lncRNA ネットワークは極めて重要な役割を果たす。

3 真核生物細胞のグルコース飢餓ストレス応答

環境適応の中でも、エネルギー源飢餓への適応は生命が生き延びるために最も重要なストレス応答の一つである。とりわけ、グルコースはほとんどの生き物にとって主要エネルギー源である。細胞がグルコース欠乏の危機に瀕した時、代替エネルギー源（脂肪酸、アミノ酸、ピルビン酸、グリセロールなど）から ATP を得るため、糖新生の経路（Kanehisa *et al.* 2014; 図 1）が活性化される。この経路は自身の貯蓄を消耗したり、場合によっては「身を削る」ような戦略であるため、グルコースが豊富な環境下で糖新生経路が働けばむしろ、エネルギー効率を悪くするので、グルコース存在下では素早く抑制されていると考えられる。ゆえに、糖新生経路の抑制は関連遺伝子発現の頑健な停止システムが担っていると考えられる。

本研究でモデルとして用いた分裂酵母では、細胞がストレスに直面したときに、MAPK シグナル伝達系が活性化されることが知られる（Shieh *et al.* 1998; Nguyen *et al.* 2000）。また、分裂酵母ではグルコースまたは窒素源の飢餓が cAMP レベルを引き下げ、cAMP シグナリング経路によって、核内へとグルコースの飢餓情報が伝播され糖新生の遺伝子群が活性化されるメカニズム（図 2）が明らかにされている。（Hoffman *et al.* 2005; Ogihara *et al.* 2004; Welton *et al.* 2000; Landry *et al.* 2000; Zaragoza *et al.* 2001）。

4 分裂酵母のグルコース飢餓ストレス応答性 lncRNA による転写制御

所属する研究室の先行研究によって、分裂酵母細胞で、グルコース飢餓ストレス条件下において転写が誘導される mRNA 型の lncRNA が見いだされた。糖新生経路において不可逆反応を司る酵素 Fbp1 (fructose-1-6-bisphosphatase) をコードする遺伝子 *fbp1⁺* の mRNA は、グルコースが豊富な条件下では転写が抑制されているが、グルコース飢餓ストレスを受けると、lncRNA 依存的な転写が活性化される。この lncRNA は *fbp1⁺* の ORF から 0.7~1.3kb 上流のプロモーター内に複数の転写開始点をもち、*fbp1⁺* ORF 領域をも含むような長い転写産物である。しかし、この lncRNA からのタンパク質の発現はほとんど観察されない。グルコース飢餓ストレスを受けてこの lncRNA の転写開始点は下流へとシフトし、それに伴い、プロモーター領域のクロマチン構造の変化及び、プロモーター領域への転写因子の結合が段階的に起こることで、下流の *fbp1⁺* mRNA の頑強な転写活性化が誘導される。このような lncRNA を mlncRNA (metabolic stress induced long ncRNAs) と呼ぶことにする（Hirota *et al.* 2008; 図 3）。

5 *fbp1* アンチセンス RNA

トランスクリプトーム解析により、この *fbp1*⁺領域ではアンチセンス RNA (*fbp1-as*) も転写されていることがわかった (Rhind *et al.* 2011, Maugureat *et al.* 2012)。この asRNA はグルコースが豊富な環境下で観察され、飢餓ストレスを受けると、発現量が減少する、ストレス応答性の lncRNA であった。このアンチセンス lncRNA の存在量は mRNA や mlonRNA と比べて絶対量が少ないため、2008 年の報告(Hirota *et al.* 2008)では見落とされていたが、より高感度な検出技術によりその存在を分子生物学的な実験により証明することに成功した。

所属研究室の先行研究により、さらに、これらセンス mlonRNA 及びアンチセンス lncRNA の安定性制御が調べられた。asRNA、mlonRNA は mRNA と比べれば不安定であり、細胞質内へと運ばれるが mRNA とは異なる分解系で分解される事が明らかにされた (Galipon *et al.* 2013, ガリポン未発表データ)。実際に mlonRNA の大半は核内エクソソームによる 3'-5'の分解系では分解されず、細胞質のポリソームに移行するのが観察された (Galipon *et al.* 2013)。また、mlonRNA 及び asRNA は mRNA と比べて異常に短いコードンの読み枠を有していた。短い読み枠を多く持つ転写物を積極的に分解する経路ナンセンス変異依存 mRNA 分解(NMD)経路の主因子である *upf1*⁺の欠損変異株では asRNA が著しく安定化された (ガリポン未発表データ)。

6 モデル生物としての分裂酵母

酵母は真核単細胞生物であり、分子生物学のモデル生物として重用されている。酵母の中でも、分裂酵母は、ヒトやマウスと比べてゲノムサイズは約 1/200 と小さいながらも、真核生物細胞によく保存されたクロマチン構造を維持している。さらに、ゲノムの 4 割以上を占める非コード DNA 領域からは lncRNA や asRNA が転写されるなど、高等真核生物と類似の転写機構を持ち、真核生物のゲノム研究には恰好のモデル生物である。

しかも、分裂酵母は、単細胞であり、液体培養が可能であるため、培地の組成を調整するだけで、飢餓、浸透圧、酸化ストレスなど環境応答ストレスの研究が可能であり、応答も早い。大量培養が可能であるため、DNA、RNA やタンパク質などの大量精製が可能であり実験材料に適している。さらには、相同 DNA 換えによって簡単にゲノムの組換え変異体を作成することが可能であるため、分子メカニズムの研究に非常に有用である。一倍体でも二倍体でも安定的な維持が可能で、分子生物学遺伝学の研究が進んでおり、実験材料と

して株化され広く普及しているため、ゲノム配列や遺伝子情報、発現解析などの過去の研究成果がデータベース化されており多くの前提情報を踏まえた上で、研究をすすめることが可能な、優れた実験生物である。これらの利点から、本研究では、分裂酵母をモデル生物として扱った。

7 数理モデル構築とシミュレーション

細胞内の分子制御メカニズムは驚くほど複雑である。しかし、その複雑なネットワークにおいて鍵となる因子を抽出し、そのダイナミクスを数理モデル化することで、細胞の制御システムの主たるメカニズムを直感的にわかりやすく表現することができる。

細胞の制御システムの単純化は、どのように生物が設計されているか、なぜそのようなメカニズムで制御が行われるのか、という本質的な問いに答えるのに役立つ。さらに、その数理モデルを使ってシミュレーションすることで、実験的な実測が難しいパラメーターの推定を行う事が可能となり、実験だけでは実証が難しい事象であっても検証する事を可能とする。

細胞が変化する外界の環境に適応するときに見せるロバストな応答は、進化の過程で最適化されてきたシステムの一つである。このようなストレス応答をモデル化し解析すれば、生物の普遍的な生存戦略の解明につながる。

8 遺伝子ネットワークのダイナミクス

生物現象の数理モデル化は、その現象において本質的な要素を抽出するのに役立つ。一つの細胞を反応系と見なし、細胞内でおこる様々な生体物質の合成・分解や、酵素反応などの熱力学的な考察を加えることで、複雑なネットワークの各因子の量や相互作用、反応の時間などが制御される様子の動的な検証をすることが可能である。このことで、一連のカスケードにおいて、鍵を握る因子や反応を推察することができる。

遺伝子の発現制御ダイナミクスについては古くより、制御構造がシンプルな原核生物である大腸菌をモデルとした研究が盛んに行われてきた。中でも、代謝関連遺伝子の発現制御の研究では、J. Monod らによる大腸菌の *lacZ* の転写モデルが有名である (Jacob & Monod 1961)。

遺伝子の発現ダイナミクスの研究では、mRNA の転写やタンパク質の翻訳について、それぞれの因子の濃度や反応時間の実測値をふまえた上で、細胞内の分子濃度のダイナミクスと応答時間を計算する。RNA やタンパク質の産生速度と分解速度、細胞が分裂する場合には希釈速度などを考慮し、各物質の濃度変化を微分方程式で記述する。さらに、環境因

子などの外界からのシグナルや、転写因子などレギュレーターとして、遺伝子を正に制御するアクチベーターと負に制御するリプレッサーなどの要素が考慮され、遺伝子回路の入出力が規定される(Alon, 2006)。このような数理モデルを用いた遺伝子の発現ダイナミクスの解析により、細胞内での遺伝子制御メカニズムの効率や本質的な有意性などを見直すことが出来る。

9 本研究の概説

グルコースは細胞の生存にとって重要な栄養源であるため、その飢餓ストレスに細胞がいかに対応するかを俯瞰的に観察することは、生命の生存戦略を知る上で重要である。第1章では、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドな遺伝子及びノンコーディング RNA の発現応答を継続的に観察することにより、グルコース飢餓ストレス直後における転写の早期応答の動的な観察を行った。また、同時に、飢餓ストレス条件下でのクロマチン構造の変化を調べ、空間的な転写制御も考察した。

第2章では *fbp1*⁺ 遺伝子における lncRNA による転写制御分子メカニズムの分子生物学的な検証を行った。*fbp1*⁺ 近傍において転写されている動態の異なる 2 種類の lncRNA、センス鎖からの *fbp1*⁺ mlonRNA とアンチセンス鎖からの *fbp1*-as のうち、とくに *fbp1*-as に着目して、その機能の解明を目指した。

第3章では第2章で述べた *fbp1*⁺ 遺伝子のノンコーディング RNA 依存的な転写制御メカニズムをモデル化することで、一連のストレス応答を転写システムとして一般化した。特に本研究では、分裂酵母細胞がグルコース飢餓ストレスに対応するごく初期に見せる、センス鎖・アンチセンス鎖の双方が絡んだ複雑な遺伝子発現動態を数理モデル化することで、ノンコーディング RNA による遺伝子発現制御の意義を検証した。この方法により、ノンコーディング RNA が関与する遺伝子発現ネットワークの動的な制御を、一つのモデルシステムとして、直感的に理解しやすく表現することを提案する。

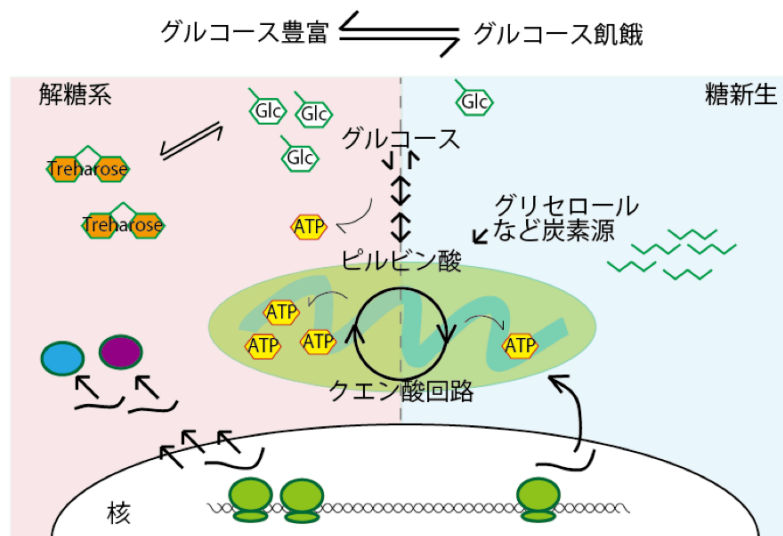


図1 糖新生経路

グルコースが豊富な条件下では解糖系によって活発に ATP が産生されている。飢餓ストレスを受けると糖新生の経路に切りかわり、グルコース以外の炭素源を主要エネルギー源とする。

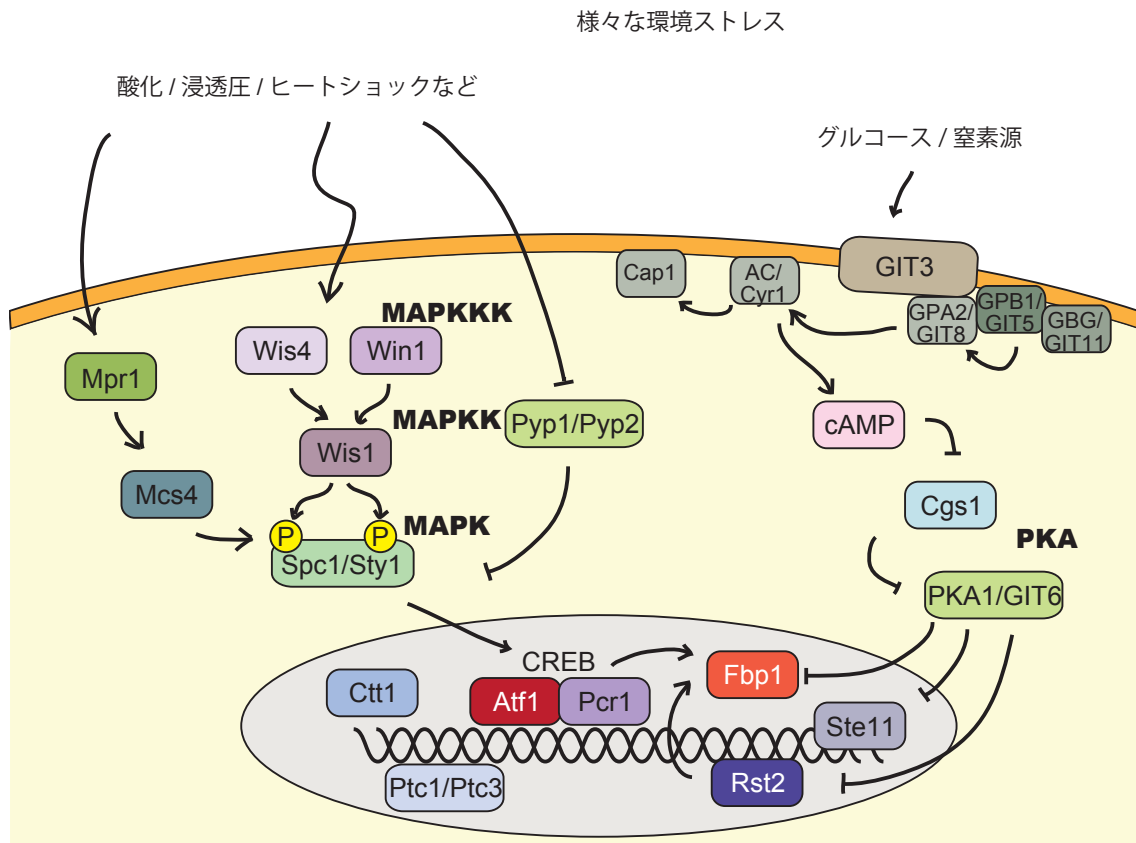


図2 分裂酵母の代表的なストレス応答経路；MAPK パスウェイと cAMP シグナリング経路

細胞外からの刺激は、MAPK 経路によりシグナル伝達され、核内でのストレス応答遺伝子の転写活性化を引き起こす。CREB ファミリータンパク質である Atf1 は、真核生物に広く保存された転写因子である。グルコースまたは窒素源飢餓ストレスを受けると、cAMP シグナリング経路が活性化され、核内ストレス応答遺伝子の転写を制御する。

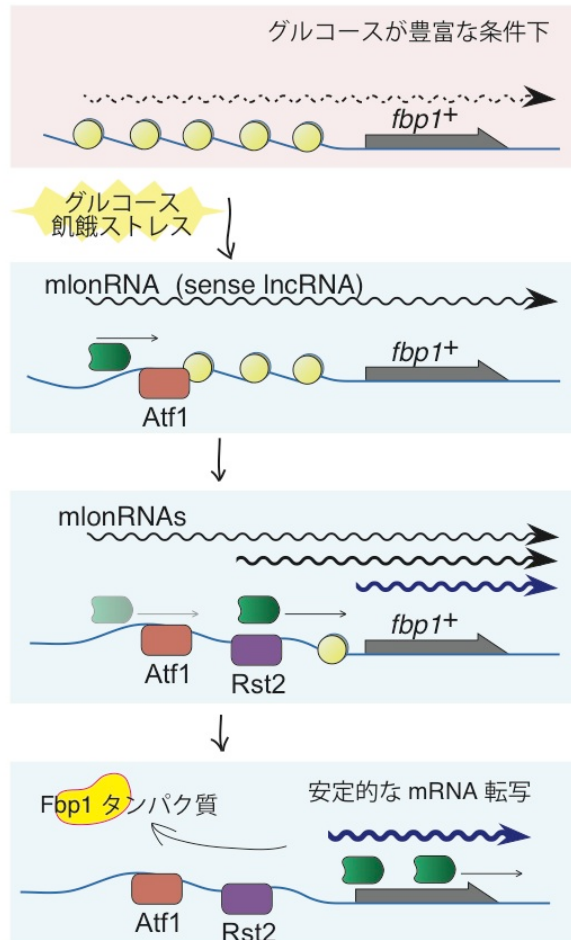


図3 *mlonRNA* による *fbp1+* 遺伝子の転写活性化メカニズム

グルコースが豊富な条件下では mRNA の転写が抑制されているが、上流領域から長い *mlonRNA* がわずかに転写されている。飢餓ストレスを受けると、*mlonRNA* の転写開始点が段階的に下流へと移行し、プロモーターのクロマチン構造が緩むのに伴い、転写因子が呼び込まれ、最終的には、下流の mRNA の大規模な転写活性化が引き起こされる。

結果

第1章 分裂酵母のグルコース飢餓ストレス応答のゲノムワイド解析

【本章の概要】グルコース飢餓は生物にとって致命的なストレスであり、遺伝子発現の大規模な変化が生じることが期待される。そこで、グルコース飢餓時の初期過程で、コード領域（遺伝子領域）・非コード領域の転写産物の発現がどのように変動していくかのゲノムワイドなダイナミクスを、鎖特異的な RNA-Seq の解析により調べた。発現変動が大きい遺伝子に関しては、クラスタリング解析や Gene Ontology 解析を実施し、ストレス応答下での細胞の状態遷移を検証した。さらに、ストレス応答に重要な役割を果たす事が知られている転写因子 Atf1 の欠損変異株を用いて同様の RNA-seq の実験を行い、Atf1 が遺伝子及び ncRNA のストレス応答性転写制御に及ぼす影響を調べた。また、RNA の転写とクロマチン構造があたえる影響を調べるために、抗ヒストン H3 抗体を用いた ChIP-seq を行い、飢餓ストレス初期応答におけるクロマチン密度変化を観察した。

1.1 mRNA の転写応答

まず、グルコースが豊富な条件下（6%グルコース; glucose rich）で培養した分裂酵母の細胞をグルコースの乏しい培地（0.1%グルコース、3%グリセロール）へと移しかえた。この急激なグルコース濃度変化ショックを与えることを「グルコース飢餓ストレス(glucose poor)」と呼ぶことにする。グルコース飢餓ストレスを与える前（0分）と飢餓ストレスを与えた後、15、60、120分の RNA を回収し、polyA⁺精製した後、illumina GAIIx を用いて鎖特異的な RNA-seq を行った。

このデータを用いて、遺伝子の階層的クラスタリング解析を実施した。各時間点の遺伝子あるいは ncRNA の各発現ユニットの発現量変化を定量的に議論するため、発現解析用のオープンツール、TopHat2 と Cufflinks (Kim *et al.* 2013; Roberts *et al.* 2011) を用いて、「fragments per kilobase of exon per million mapped fragments (FPKM)」値を計算した。この FPKM 値を用いて R により階層的クラスタリング解析を行った。

5,153 の遺伝子のうち、まず転写量の少ない (FPKM sum <10) 約 400 個の mRNA についてはクラスタリング対象から排除し、残りのうち、グルコース飢餓後に4倍以上の FPKM 値の変動を示した 638 個の遺伝子に着目して階層的クラスタリング解析を行った(図 4A)。その結果、第1クラスタ；発現が抑制される遺伝子群 (repressed; 245 遺伝子)、第2クラスタ；初期 (15分後) に発現上昇する遺伝子群 (early; 79 遺伝子)、第3クラスタ；中期 (60分) に発現上昇する遺伝子群 (middle; 147 個)、第4クラスタ；後期 (later; 120分)

に発現上昇する遺伝子群 (114 個)、第 5 クラスタ ; その他 (others; 53 個)、の 5 つのクラスタに分類することができた (図 4B)。

次に、各クラスタに含まれる遺伝子の特徴を調べるために、gene ontology (GO) 解析を実施した (表 1)。Generic Gene Ontology Term Finder (Boyle *et al.* 2004; Wood *et al.* 2012) を用いて、各クラスタごとに有意なアノテーションを探索した。

第 1 グループの「抑制型クラスタ」には、翻訳関連、RNA 代謝関連の遺伝子、及び各種代謝系遺伝子が多く含まれていた。先行研究では、分裂酵母がグルコース飢餓のようなストレスを受けた際に、既に存在していたポリソームが一旦解離し、一時的な翻訳抑制を経た後、再度翻訳が回復することが示されている (Galipon *et al.* 2013)。翻訳関係の遺伝子が抑制されるのはおそらく、ストレス応答時に大規模な転写プロファイルの転換期に異常な翻訳物が生じることを回避するシステムがあると考えられる。

RNA 代謝遺伝子の抑制は、RNA 分解系や品質保証系などの切り替えに際した転写抑制の可能性がある。この点に関する更なる検証のため、“RNA metabolic process”のアノテーションを付与された遺伝子群を抽出し、それらの発現変化をもとに k-means 法を用いた非階層型クラスタリング (Hartigan & Wong 1979) を行ったところ、一部の遺伝子でグルコース飢餓前後に入れ替えが生じていることを示唆する結果を得た (図 5)。また、一群のグルコース依存性の“RNA metabolic process”の遺伝子発現が抑制されていることがわかる。

第 2 クラスタはあまり特徴的な GO は認められないが、RNA ポリメラーゼ II プロモーターの正の調節因子 である C₂H₂ Zn finger タンパク質をコードする *rsv2⁺* や、CREB/ATF 型転写因子である *pcr1⁺*、細胞質カタラーゼ *ctt1⁺* などのストレス遺伝子が見出される。また一群の“unannotated gene”も多数含まれている。これらの機能は不明であるが、未同定のストレス応答遺伝子が含まれているのかも知れない。

第 3 クラスタには、“catabolic and metabolic process”遺伝子、および“non-glycolytic fermentation genes”が含まれる。糖新生の必須遺伝子 *fbp1⁺* やクエン酸合成酵素 *cit1⁺* はこれに含まれる。これは代謝経路 の切り換えが起きていることから考えて妥当である。また、Pcr1 と複合体を作るストレス応答性 CREB/ATF 転写因子 Atf1 の遺伝子もこのクラスタに含まれる。

第 4 クラスタについては、単細胞生物に特徴的な“catabolic process gene”が多く含まれる。たとえば、*gal1⁺* (galactokinase)、*gal10⁺* (UDP-glucose 4-epimerase/aldose 1-epimerase)、などが含まれる。この段階になると恒常的にグルコース欠乏に適応するために必要な代謝系遺伝子が安定的に発現するようになると考えられる。

1.2 ストレス応答転写因子 Atf1 依存的な遺伝子発現制御

Atf1 はグルコース飢餓応答に関わる代表的なストレス応答転写因子の一つである。Atf1 はグルコース飢餓だけでなく、種々のストレス応答に必要であり、その欠損は各種のストレスに対する感受性を示す。そこで、グルコース飢餓時に Atf1 が転写に及ぼす影響を調べるために *atf1* 欠損株を用いて、上記同様の RNA Seq 解析を行った。その結果、5,153 遺伝子のうち 313 遺伝子 (6.1%) が、野生型に比較して有意に発現量への影響を示した (*atf1Δ* 株と野生株の FPKM の log2 比が平均値より 2σ 以上のものについて Atf1 依存性があると定義した)。これはおおむね 3.3 倍 (発現抑制する遺伝子の場合) もしくは 1/3.3 (発現上昇する遺伝子の場合) の転写量の変動差を示した (図 6A, B)。

各クラスタのうち、第 1 クラスタは Atf1 に対する依存性は強くなく、11%程度の遺伝子のみ影響を受ける。第 2、第 3、第 4 クラスタではほぼ半数の遺伝子が Atf1 欠損株で転写上昇が見られなくなる。以上から、グルコース飢餓で活性化を受ける遺伝子の大半 (約 50%) が Atf1 によって制御されており、一方抑制される遺伝子のほとんどが Atf1 非依存的であることが明らかになった (図 6C, D)。

なお、野生株及び *atf1* 欠損株において得られた RNA-seq のデータの詳細なクオリティ情報は「材料と方法」の表 6 にまとめた。

1.3 グルコース飢餓ストレス下でのクロマチン構造の変化

真核生物において遺伝子発現制御は、しばしばクロマチン構造の変化を通じて行われる。そこで、グルコース飢餓時の分裂酵母 (0, 15, 60 分) において、ゲノムワイドにクロマチン密度がどのように変動するか、ヒストン H3 に対する抗体を用いた ChIP Seq 実験を行って検証した。

クラスタ毎に転写開始点 (TSS) 近傍のヒストン H3 の平均密度の変化を解析した (図 7A)。TSS はデータベース PomBase (Wood *et al.* 2012) の遺伝子アノテーションをもとに、mRNA の転写開始点を定義した。その結果、15 分と 60 分で発現上昇する第 2 クラスタと第 3 クラスタで、遺伝子活性化のタイミングで転写開始点の平均ヒストン密度の低下が認められたが、第 1 クラスタではあまり大きな変化は見られなかった。図 7B には、第 1 ~ 第 3 クラスタの代表的な遺伝子の発現変化及び、ヒストン密度変化のヒートマップを挙げた (第 1 クラスタ ; *adh4⁺*、第 2 クラスタ ; *ctt1⁺*、第 3 クラスタ ; *ght1⁺*)。これらの遺伝子領域でも、上述のクロマチン構造変化が確認された。

ヒストン密度が大きな変化が見られる遺伝子では、転写開始部位近傍でクロマチン再編成が生じることで、遺伝子活性化が起こる可能性が示唆される。実際、これらのグループに属する *fbp1*⁺では、転写開始点近傍で局所的なクロマチン構造変化が起こり、「開いたクロマチン構造」が生じることが報告されている(Hirota *et al.* 2008)。第1クラスタではグルコース飢餓時における顕著な発現抑制が認められるが、遺伝子群全体としての平均値を見た場合、発現抑制過程で転写開始点近傍のクロマチン変化は認められなかった。なお、ChIP-seq のデータの結果の詳細なクオリティ情報は「材料と方法」の表8にまとめた。

1.4 ncRNA の転写応答

上記はコード領域に関する解析が主であった。次に遺伝子と同様に、ncRNA に関してグルコース飢餓時の発現変化に関する解析を行った。データベースにアノテーションが付与された 1,818 の ncRNA について、FPKM 値を計算し mRNA と同様に発現変化の大きい 303 の ncRNA について階層的クラスタリング解析を行った。その結果、遺伝子領域と同様に ncRNA も 5 つのクラスタに分類された(図8、第1クラスタ;発現が抑制される ncRNA 群 (136 個)、第2クラスタ;初期 (15 分後) に発現上昇する ncRNA 群 (69 個)、第3クラスタ;中期 (60 分) に発現上昇する ncRNA 群 (34 個)、第4クラスタ;後期 (120 分) に発現上昇する ncRNA 群 (48 個)、第5クラスタ;その他 (16 個))。

ncRNA の発現と mRNA の発現をクラスタ単位で見比べたとき、ncRNA の第1、第2クラスタが全体に対して占める割合は mRNA の第1、第2クラスタが占める割合よりも大きく、グルコース飢餓ストレスに対する ncRNA の素早い応答性が伺える。また、mRNA と同じく ncRNA についても同じ閾値で Atf1 依存性を定義したところ、ストレス応答する Atf1 依存的な ncRNA は各クラスタで 29-49%を占めた。このことから、ncRNA もまた mRNA の転写と同様に、ストレス依存的な積極的な転写制御を受けている可能性が示唆された。

1.5 *fbp1*⁺ lncRNA の転写制御

図9に、第3クラスタに含まれる遺伝子 *fbp1*⁺周辺について、グルコース飢餓ストレス下での、転写産物の時間変化を示した。先行研究よりこの領域ではグルコース飢餓ストレス応答性の *fbp1*⁺ lncRNA (mlonRNA) が転写されていることが報告されている(Hirota *et al.* 2008)。この領域ではグルコースが豊富な条件下でも *fbp1*⁺のプロモーター領域に TSS を持つ長さ約 3,000 nt の mlonRNA (transcript-a) が観察されるが、グルコース飢餓ストレス

を受けると、mlonRNA の TSS は下流へと移行し (transcript-b、transcript-c)、最終的に飢餓ストレスを受けてから 60 分後くらいに mRNA の転写が頑強に活性化することが明らかにされている。

RNA-seq のデータからはアンチセンス RNA も転写されているのが確認できた。このアンチセンス RNA については、のちに詳しく述べる。さらに、図 9 には RNA-seq のデータに加えてヒストン密度変化を示す ChIP-seq のデータも下に併記した。このデータから、グルコース飢餓ストレスをうけると、*fbp1+* のプロモーター付近でクロマチンが緩んでいるのが確認できる。

この、RNA-seq のデータから mlonRNA の量を見積もるために、*fbp1+* の 5'側の非コード DNA 領域にマップされたシーケンスタグをカウントしたところ、*fbp1+* ORF 領域にマップされるタグの 1/10 程度であった。これは、先行研究 (Hirota *et al.* 2008) で報告されたノザンプロット解析のデータ (図 10) と整合性のある数値である。また、最も長い mlonRNA である transcript-a の TSS 近傍には Atf1 の認識配列 UAS1 (upstream activation site1) が存在し、mlonRNA のカスケード転写、及び、mRNA の転写は転写因子 Atf1 に依存的であることが報告されている (Hirota *et al.* 2008)。

1.6 mlonRNA 型 lncRNA の探索

先行研究ではタイリングアレイにより mlonRNA の様なグルコース飢餓ストレス応答性 lncRNA の探索が行われた (Hirota *et al.* 2008)。しかしながら、lncRNA の転写量は比較的少ないものが多く、タイリングアレイの解像度も lncRNA の探索を行うには十分でなかった。そこで、今回の RNA-seq のデータから、*fbp1+* mlonRNA と同様に遺伝子のプロモーター領域から転写され、グルコース飢餓ストレスで転写が活性化される lncRNA のゲノムワイドな探索を行った。

mlonRNA 型の転写産物を探すために MATLAB を用いて、各遺伝子及びその上流非コード領域における飢餓ストレス後 0 分から 120 分の発現変化を統計的に解析した。この解析では、遺伝子上流領域に転写開始点を持つ lncRNA に着目するため、遺伝子上流のノンコーディング領域を 50bp ずつのセグメントに分割し、全遺伝子のセグメントごとの転写のパターンを *fbp1+* のそれと比較する事で、*fbp1+* に近い発現の波形パターンを持つ遺伝子を抽出した (図 11A)。

はじめに、遺伝子 j 、時間 t ($t=0, 15, 60, 120$) における遺伝子コーディング領域のリードのタグ数を $a_{0,j}(t)$ と定義した。次に、遺伝子 j の上流 2kb にわたるノンコーディング領域

を 50nt ずつ 40 のセグメントに分けて、各セグメント領域のタグ数をカウントし coding 領域から数えて i 番目のセグメントのカウントを $a_{i,j}(t)$ とした。さらに、時刻 t における遺伝子 j の $a_{i,j}(t)$ と $fbp1^+$ の $a_{i,fbp1}(t)$ の相関係数を求めた。最後に、相関係数の p -value の順に遺伝子を並べ替えて、 $fbp1^+$ と近い波形パターンを示す物を抽出した。この手法により、43 の $fbp1^+$ mlonRNA 様の lncRNA が同定された。

これらの転写のパターンが実際に $fbp1^+$ と類似の波形を示すかどうかを確認するために、多次元尺度法 (multidimensional scaling; MDS) により、高次元空間中の相対距離の確認を行ったところ、実際に $fbp1^+$ を含むこれらの候補遺伝子群は互いに近接したクラスタを形成することがわかった。図 11B には、3次元投射したプロットを示し、候補遺伝子群を青で示した。MDS 法を用いてもこれらの 43 候補領域はクラスタを形成しており、空間的に近い距離に偏在していることが確認できた。さらに、これらの領域のうち、十分な転写産物量の見られる領域でノザンプロットを行った (図 11C)。

ここで得られた候補領域のうち、上流非コード DNA 領域が十分な長さを持ち (2kb 以上) 上流遺伝子の影響を受けにくいもので、かつ、上流転写産物の転写量が少なすぎない (10 タグ以上) 9 つの領域に関して、さらに詳細な検証を行った。

まず、抗ヒストン H3 抗体を用いた ChIP-seq の実験から、 $fbp1^+$ mlonRNA 領域では ORF 上流において、ヒストン密度の減少が見られたが、ほとんどの lncRNA 候補領域においても $fbp1^+$ と同様に上流領域のヒストン密度の減少が確認された (図 12A-C)。

また、これらの lncRNA 候補遺伝子のアノテーションを解析すると、*SPBC1685.05* (serine protease) や *ght4⁺* (hexose transporter 4) (表 2) などの代謝ストレス応答性の遺伝子を多く含む事が分かった。ショートリードの次世代シーケンサーによる解析で抽出されたこれらの候補領域が実際に lncRNA を転写しているかを調べるために、確かに長い転写産物が存在する事を確認した (図 11C)。

また、候補領域の転写について、転写因子 Atf1 への依存性を *atf1* 欠損株の RNA-seq により調べたところ、多くの mlonRNA 候補領域 (9 つ中 8 つ) で mRNA の転写活性化は Atf1 に依存的であることが示された。実際に、 $fbp1^+$ 、*SPBC1685.05*、*ght4⁺* 領域についてノザンプロットでも、*atf1*Δ株では mRNA 及び ncRNA の転写パターンに変化が生じることが確認した (図 12A-D、表 2)。9 つ中 7 つがプロモーター付近に Atf1 の認識配列モチーフを持つので、これらの Atf1 依存性は、極めて整合性がある結果である。

これらのデータより、分裂酵母では、グルコース飢餓ストレスに応答して発現する少数の mlonRNA 型 lncRNA が存在する事が明らかとなった。しかも、これらの一部は Atf1 依存性や転写に伴うクロマチン構造の変化など $fbp1^+$ mlonRNA に見られる特徴を共有した。

1.7 mlonRNA 型 lncRNA とアンチセンス RNA

鎖特異的な RNA-seq から、グルコースが豊富な条件下では *fbp1+* の mRNA および mlonRNA の全域にわたり、アンチセンス RNA が合成されていることが確認された。このアンチセンス RNA の存在は先行研究でも示唆されていた (Rhind *et al.* 2011; Maugreat *et al.* 2012)。RNA-seq の結果から、この *fbp1+* アンチセンス RNA はグルコースが豊富な条件下で最も多く、グルコース飢餓ストレスを受けると、減少することがわかった。実際にノザンプロットを行うと *fbp1+* アンチセンス RNA はグルコース飢餓ストレスを受けると、その発現量が減少する事が分かった (図 13)。

さらに RNA-seq の結果から、前述の 9 つの領域すべてで、同様のアンチセンス RNA の転写がみられることを確認した。そのうちの 5 カ所では飢餓ストレスに応答してその発現が減少するようなアンチセンス RNA が転写されていた (表 2・図 12)。

fbp1+ 領域では二種類の lncRNA、センス鎖 mlonRNA とアンチセンス RNA、及び mRNA が飢餓ストレスに応答して転写されており、センス鎖 RNA とアンチセンス RNA の発現量は負の相関を示した。以上から、*fbp1+* 領域におけるセンス鎖 RNA とアンチセンス鎖 RNA の合成には相反的な制御メカニズムが存在するのではないかという推察に至った。

1.8 lncRNA の転写のストレス特異性

これまでの観察結果より mlonRNA の転写は転写因子やクロマチン構造に依存して、積極的に制御されていると考えられる。そこで、ストレス応答性の lncRNA の転写はストレス特異的に制御されているのかを調べることにした。

fbp1+ はグルコース飢餓ストレス依存的に転写される。*fbp1+* は糖新生における不可逆反応を触媒する酵素 fructose-1,6-bisphosphatase; Fbp1 をコードするため、グルコース飢餓ストレスを受けたときに *fbp1+* mRNA の転写が活性化されるのは生物学的に妥当である。しかしながら、*fbp1+* が他の細胞ストレスにどのように応答するかについては、ほとんど明らかにされていなかった。そこで、次に、*fbp1+* の他のストレスへの応答を調べた。

浸透圧ストレス (1M ソルビトール)、酸化ストレス (0.5mM H₂O₂)、ヒートショックストレス (39°C)、窒素元飢餓ストレスをかけて 2 時間の早期応答を観察したところ、これらのストレスを受けると mlonRNA の転写は活性化されるものの、2 時間以内には mRNA の転写活性化には至らなかった。また、Diploid の細胞に減数分裂誘導をおこなうと、mRNA の転写が活性化したが、その応答に際しては、活性化の過程では mlonRNA が

観察されなかった上に、発現誘導はグルコース飢餓ストレスをうけたときよりも遅かった（図 14）。

分裂酵母においてストレス依存的に転写される lncRNA の例として *SPNCRNA.1164* が知られている。*SPNCRNA.1164* は浸透圧ストレスや酸化ストレス条件下での転写が報告されている (Leong *et al.* 2014)。そこで、グルコース飢餓時にこの lncRNA が誘導されるかについて検討を行った。RNA-seq の結果から、グルコース飢餓ストレス早期では少量の *SPNCRNA.1164* のアンチセンス方向の転写産物は存在するものの、*SPNCRNA.1164* の転写産物は観察されないことを確認した（図 15）。

以上の結果から、ストレス依存的な lncRNA は、他のストレス遺伝子同様に、特定のストレスに特異的に反応して転写されることが明らかになった。

本章では、トランスクリプトーム解析により、遺伝子だけでなく、ncRNA もまた、積極的に転写の制御が行われていることが示唆された。また、*fbp1+* において観察される *mlonRNA* と類似の特徴を持つストレス応答性の lncRNA の存在を明らかにした。これらの lncRNA もまた、特定のストレス刺激に応答して何らかの役割を担っている可能性も考えられる。

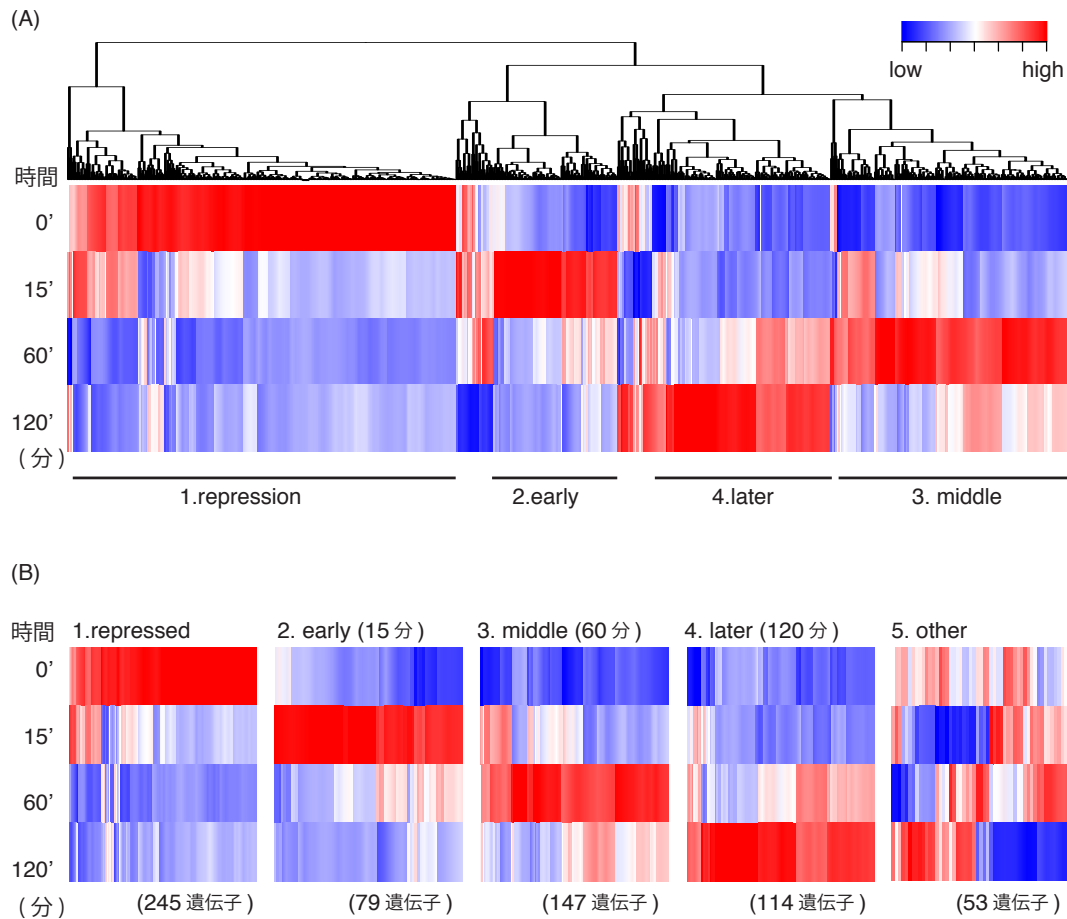


図4 分裂酵母のグルコース飢餓ストレス応答性遺伝子発現変化プロファイル

(A) 飢餓ストレス後に大きな発現変動を見せた mRNA について、転写の量とタイミングによりクラスタリングした。グルコース飢餓ストレスを受けて 0, 15, 60, 120 分後の polyA 付加された RNA の転写レベルを解析した RNA-seq データの中で、発現変動の大きい 638 の mRNA について階層的クラスタリングを行った。

(B) 5つのクラスタに分割した結果をクラスタごとに、ヒートマップで表示した。第1クラスタ；発現が抑制される遺伝子群 (repressed)、第2クラスタ；初期 (15分後) に発現上昇する遺伝子群 (early)、第3クラスタ；中期 (60分) に発現上昇する遺伝子群 (middle)、第4クラスタ；後期 (later) に発現上昇する。図中に各クラスタに含まれる RNA 数を記した。

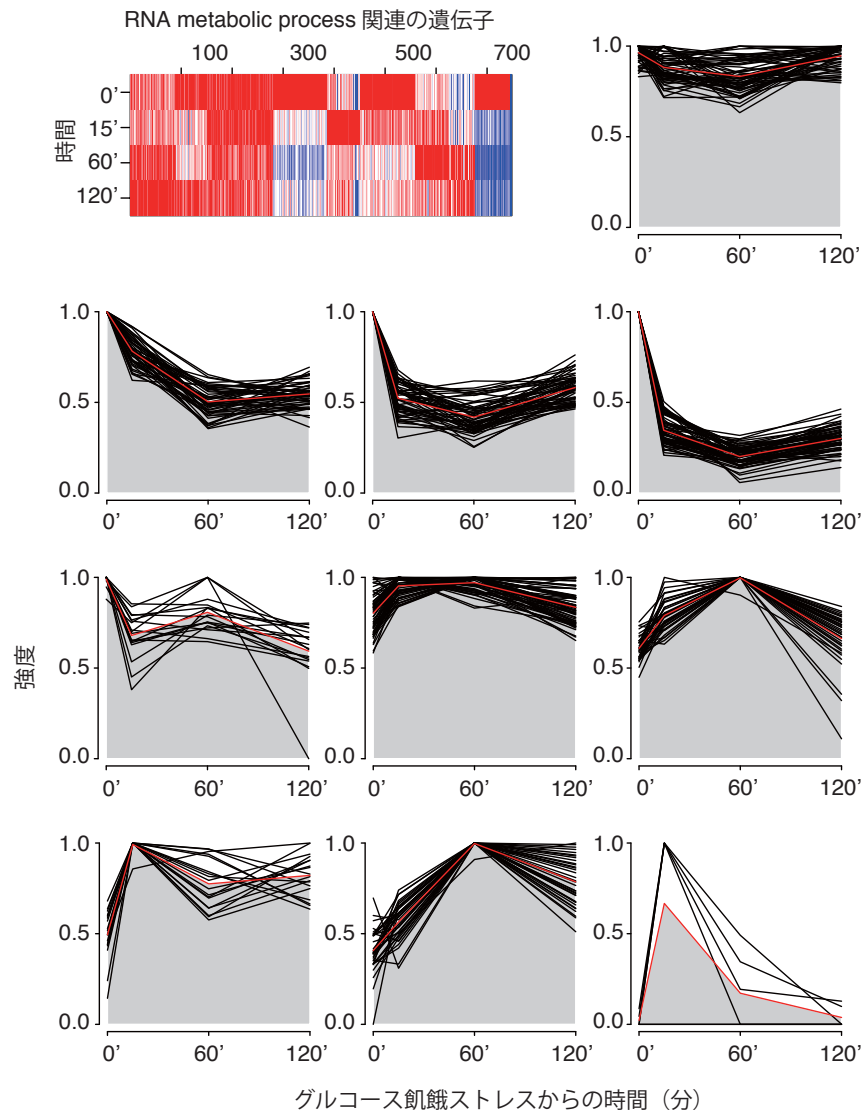


図 5 RNA metabolic process 関連遺伝子の転写パターン

RNA metabolic process 関連の 749 遺伝子の発現変動について、非階層的クラスタリング解析 (Hartigan & Wong 1979) を行い、ヒートマップで図示した。各クラスターの遺伝子発現変化を時間に対してプロットした。プロット中の赤線はクラスターの平均発現レベルを示す。

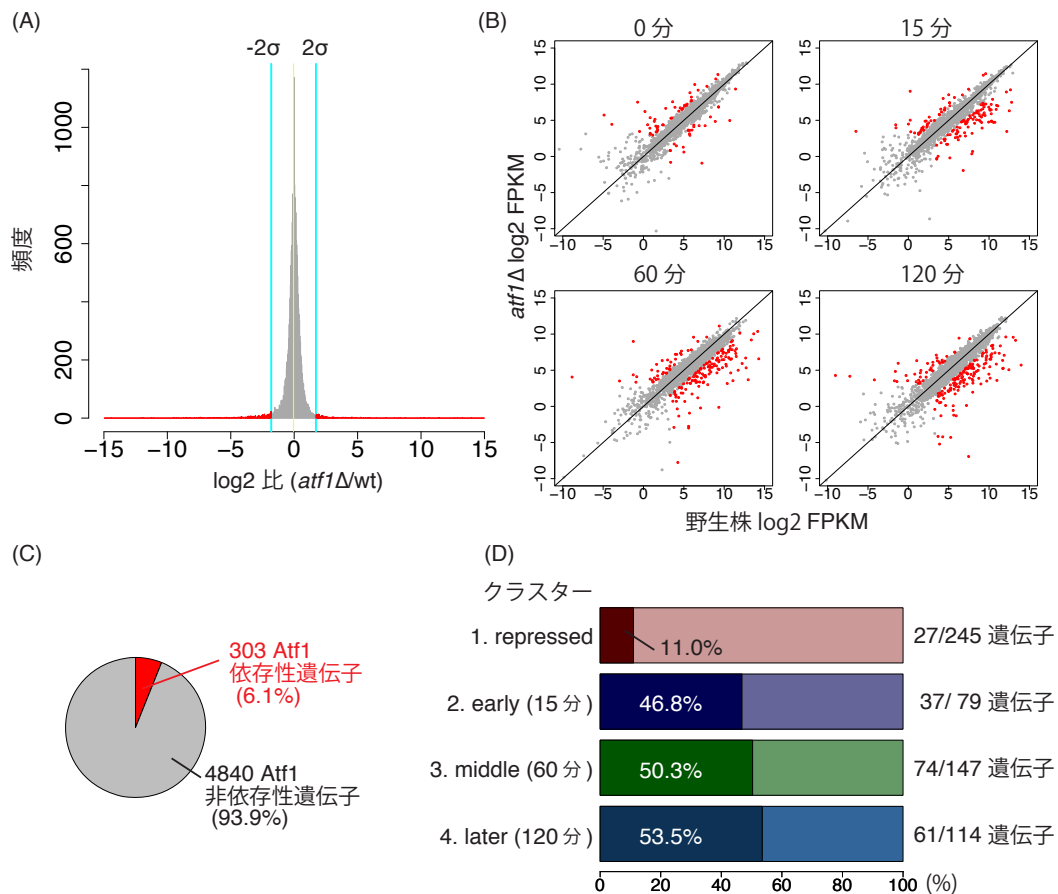


図 6 グルコース飢餓ストレス応答遺伝子の Atf1 依存性

(A) 野生株と *atf1* Δ 変異株の RNA-seq の FPKM の \log_2 比のヒストグラム。野生株と *atf1* Δ 変異株を比較することで *atf1* Δ で発現が変動する遺伝子を抽出した。黄色と水色の垂線は順に、平均値と平均から 2σ の距離である。絶対値が 2σ 以上となる赤で示した部分について Atf1 の影響を大きく受けた Atf1 依存性遺伝子として定義した。

(B) 野生株と *atf1* Δ 変異株の FPKM 値の散布図。各時間点について、縦軸に野生株、横軸に *atf1* Δ 変異株をプロットした。

(C) Atf1 依存性遺伝子が全遺伝子中で占める割合。

(D) クラスターごとの Atf1 依存性遺伝子の割合。

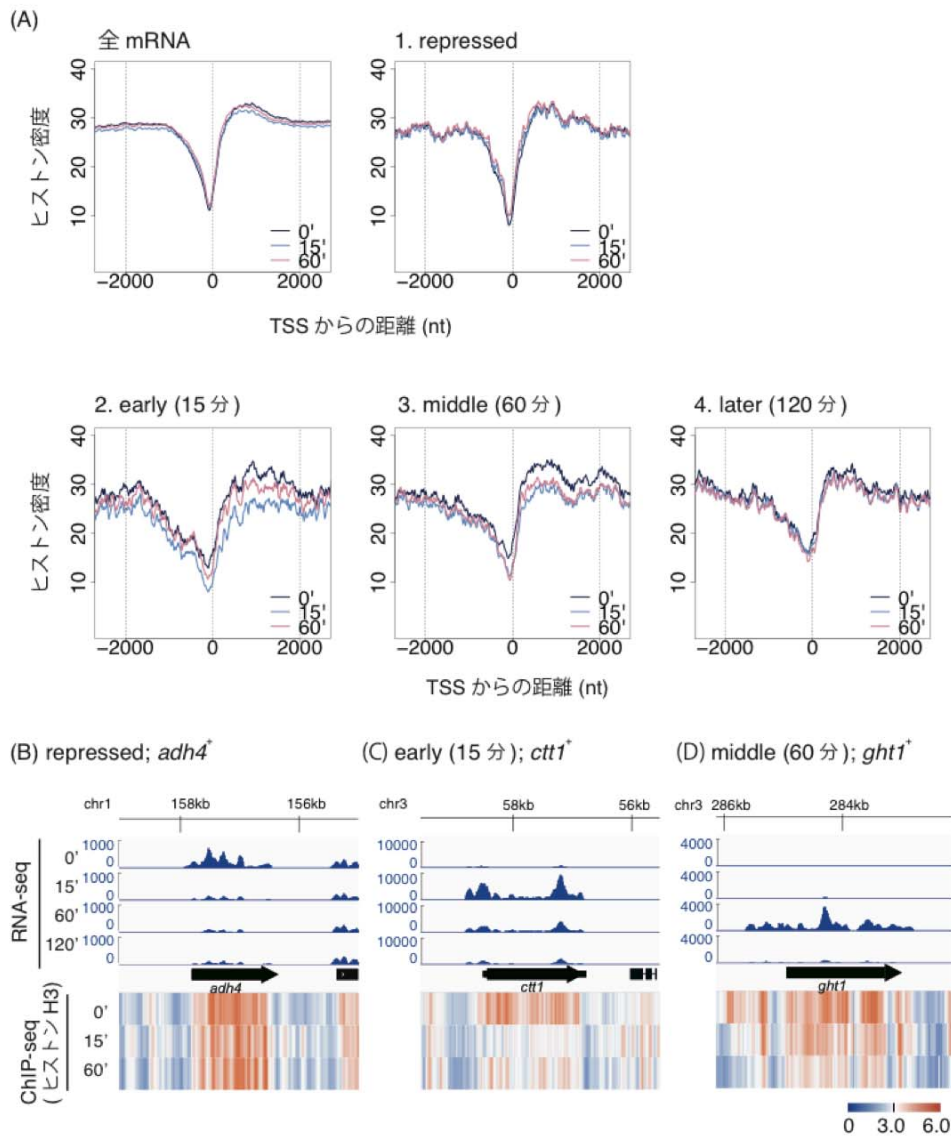


図 7 グルコース飢餓ストレス下でのヒストン密度の変化

(A) 各遺伝子の TSS 周辺 (-2,500~2,500bp) のヒストン H3 の密度変化の平均を、クラスタごとに飢餓からの時間を追ってプロットした。黒、青、桃色の線は順に、グルコース飢餓ストレスをうけてから 0 分、15 分、60 分のヒストン密度平均を示す。

(B-D) 各クラスタで典型的な発現パターンを示す遺伝子 (B- 第 1 クラスタ; *adh4*⁺、C- 第 2 クラスタ; *ctt1*⁺、D- 第 3 クラスタ; *ght1*⁺) の転写開始点の発現パターン (RNA-seq) とヒストン密度変化 (ChIP-seq)。

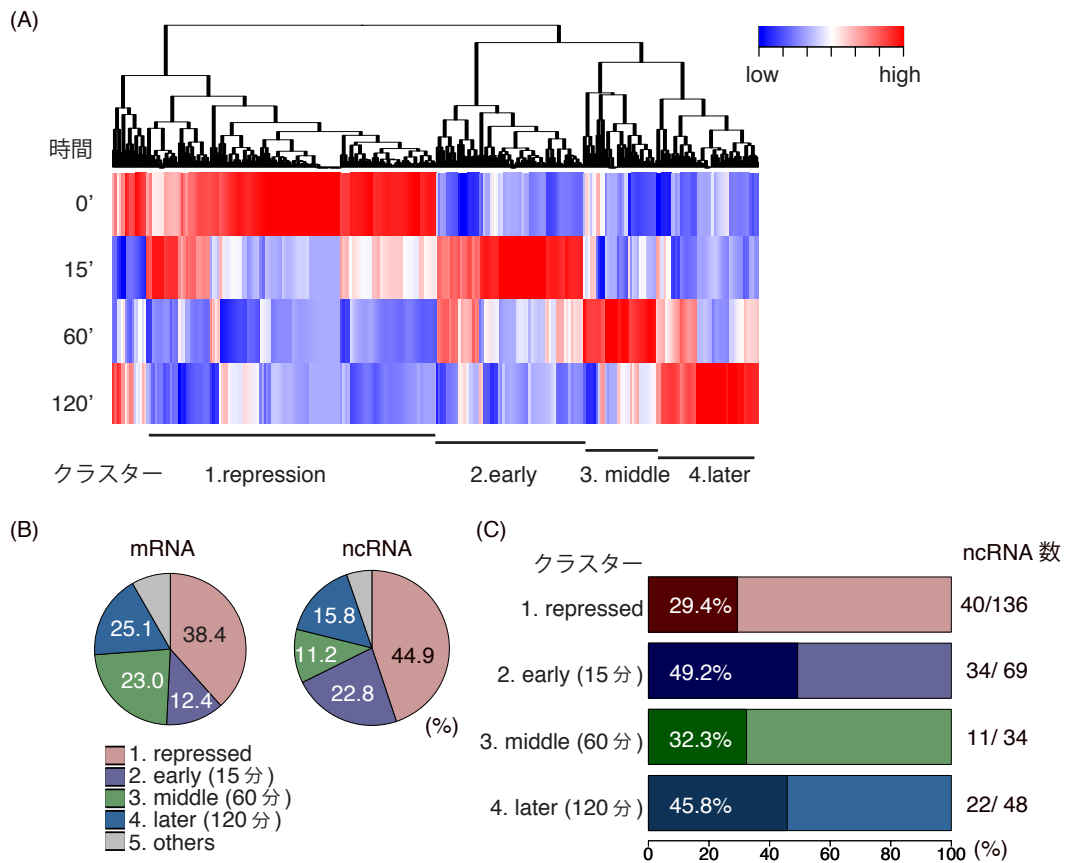


図8 ノンコーディング RNA の発現解析

(A) 発現変動の大きかった 303 のグルコース飢餓ストレス応答性 ncRNA について、階層的クラスタリングを行い、ヒートマップに示した。

(B) mRNA と ncRNA のクラスターごとの割合。円グラフ内の数字は母集団当たりの割合 (%)。

(C) 各クラスターにおける Atf1 依存性の ncRNA の割合。

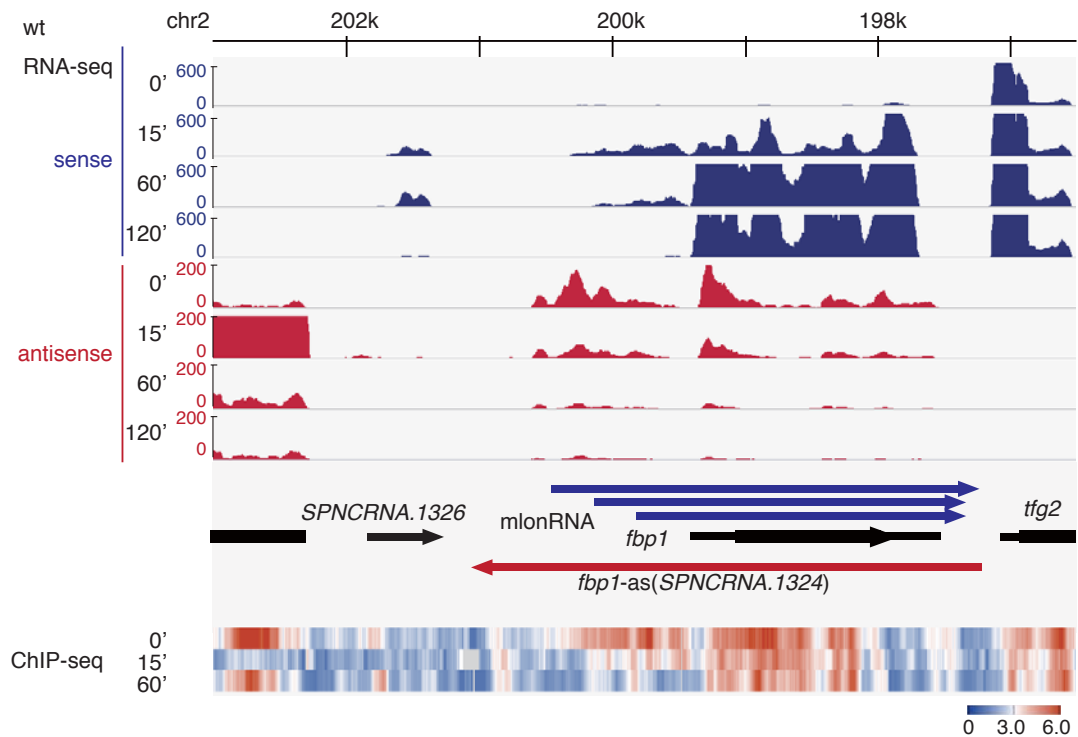
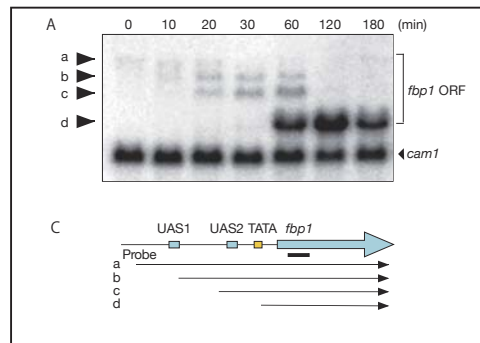


図9 *fbp1*⁺ の転写活性化と転写開始点の移動

グルコース飢餓ストレス条件下での *fbp1*⁺ 周辺の RNA-seq のマッピングデータを示した。黒、灰色、白の矢印は順に *fbp1*⁺ mRNA、*mlonRNA*、アンチセンス RNA の転写開始点を表す。データは IGV (Thorvaldsdóttir *et al.* 2012; Robinson *et al.* 2011) を用いて可視化した。ChIP-seq のデータはスムージングしたヒストン H3 の密度である。mRNA および *mlonRNA*、アンチセンス RNA の位置を矢印で示した。見やすいようにアンチセンス転写産物の y 軸スケールは、センスのものよりも拡大してある。



(Hirota *et al.* 2008より編集)

図 10 *fbp1*⁺ ノザンブロット (Hirota *et al.* 2008 より)

fbp1⁺の DNA ORF プローブを用いたノザンブロット。野生株と *atf1Δ*欠損変異株についてグルコース飢餓ストレス条件下 (0~180 分) での転写産物の変化を観察した。グルコース飢餓ストレスを与えてからの時間をレーンの上に記した。

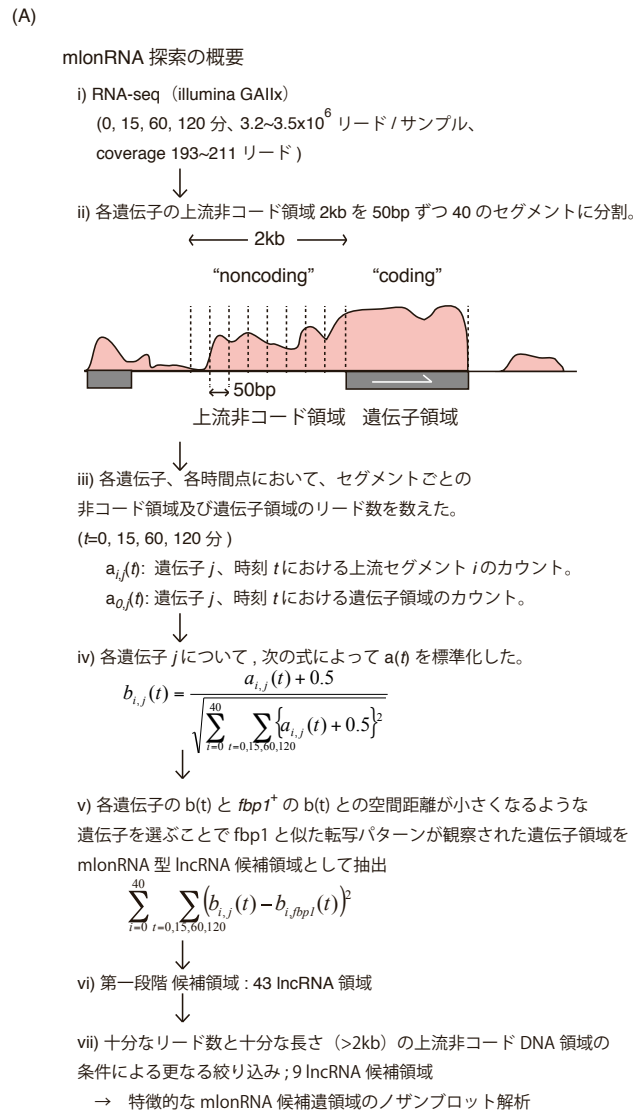
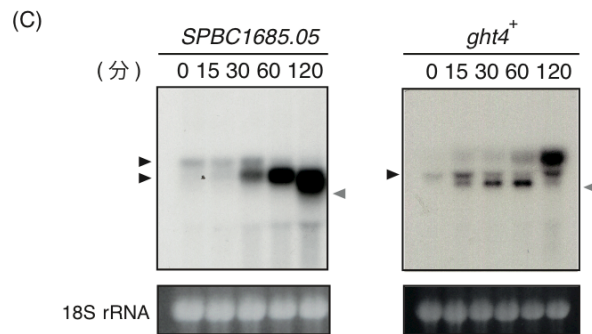
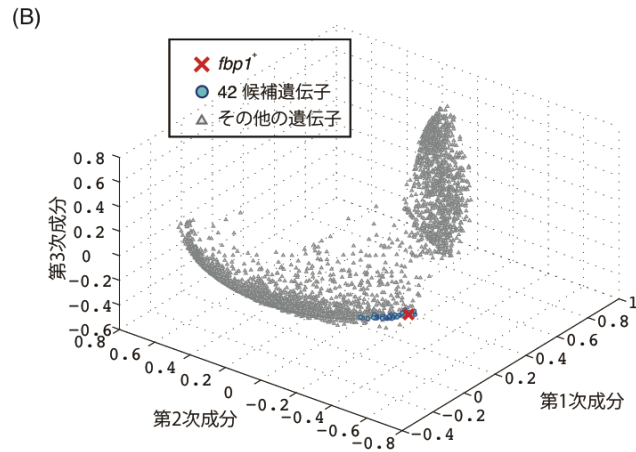


図 11 mIcnRNA 型 lncRNA の探索

(A) mIcnRNA 型の lncRNA を探索する概略。グルコース飢餓後の各観測時間点において、5' 端の非コード領域 (2kb 以内) を 50bp ずつ 40 のセグメントに分割し、各領域のシーケンスのタグを固有の発現量としてカウントとした。それぞれの発現量は遺伝子コーディング領域の発現量で正規化し、各セグメントの発現量を $fbp1^+$ の発現量と比較することで、 $fbp1^+$ と近い ncRNA 転写パターンを示す遺伝子領域を選んだ。43 の領域が mIcnRNA 型の lncRNA の候補領域として選ばれた。そのうち、上流プロモーター領域が 2kb 以内に別の遺伝子を含む、近傍遺伝子と重なっている、または、転写量が少なすぎる (<10 リード) ため偽陽性であると考えられる候補領域を除外した。(次項に続く)



(B) MDS 解析の 3D 散布図。*fbp1⁺*の発現パターンを赤、候補となった 42 の領域を青、その他の遺伝子を灰色でプロットした。赤、青の点がクラスタを形成しており、空間的に近い距離に偏在している。

(C) グルコース飢餓ストレス条件下(0~120 分)での *SPBC1685.05* と *ght4⁺* の ORF の DNA プローブを用いたノザンブロット。これらの候補領域では mRNA 以外の長さの転写産物が観察された。灰色の矢じりは mRNA、黒色の矢じりは lncRNA 候補を指す。ローディングコントロールとして 18S rRNA を載せた。

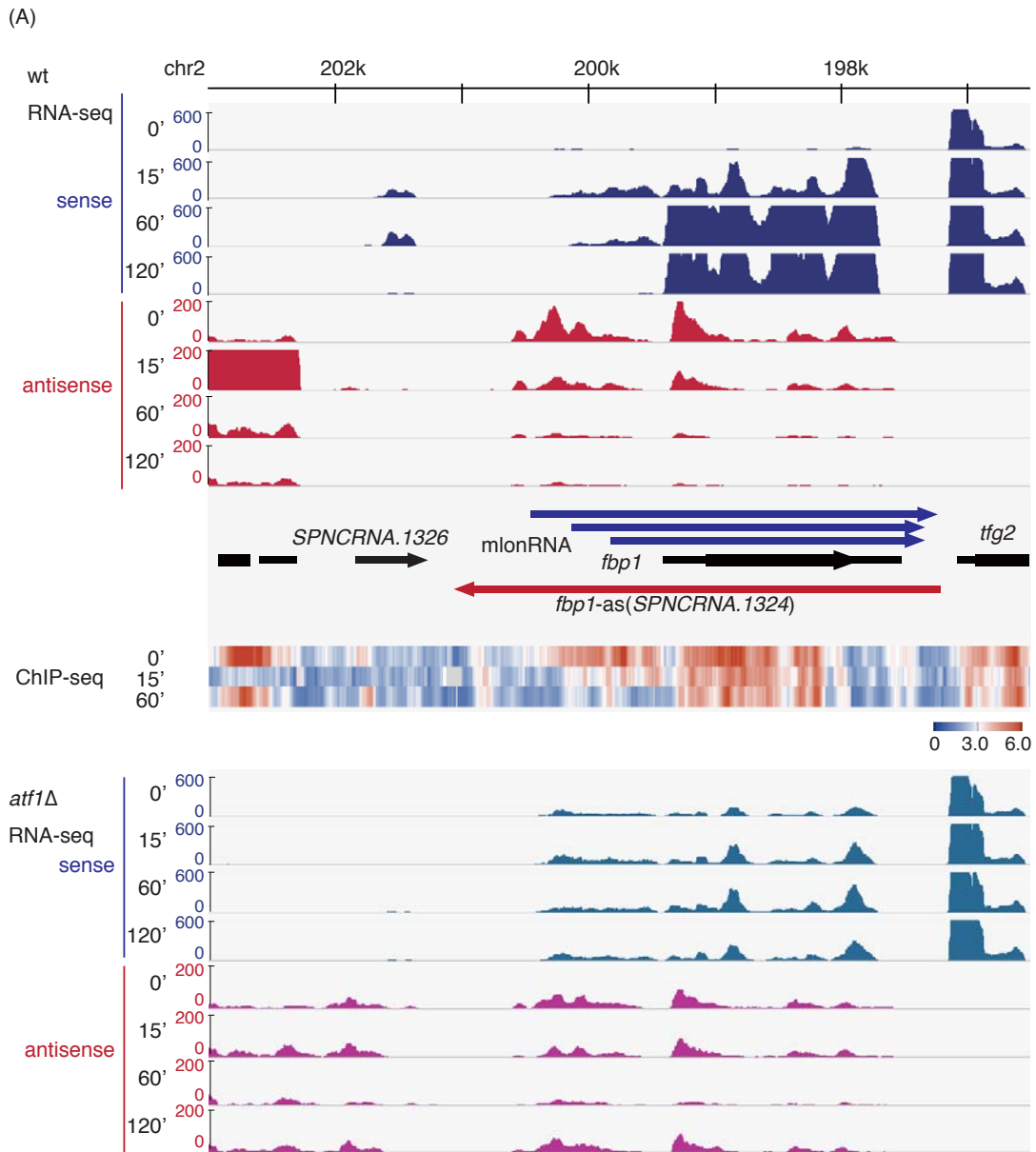


図 12 代表的な mlonRNA 型 lncRNA 候補遺伝子のプロファイル

(A) 代表的な mlonRNA 型 lncRNA 候補遺伝子の周辺 (*fbp1*⁺ 周辺) の RNA-seq 及びヒストン H3 抗体を用いた ChIP-seq データ。上が野生株の RNA-seq データ、中央に遺伝子アノテーションと ChIP-seq データ、下が *atf1Δ* 株の RNA-seq データである。RNA-seq のデータは、青、赤、青緑、赤紫色を用いて、順に、野生株センス鎖、野生株アンチセンス鎖、*atf1Δ* 変異株センス鎖、*atf1Δ* 変異株アンチセンス鎖のデータである。なお、センス鎖とアンチセンス鎖の y 軸スケールは見やすくするためにアンチセンス鎖の方が大きく設定してある。(次項に続く)

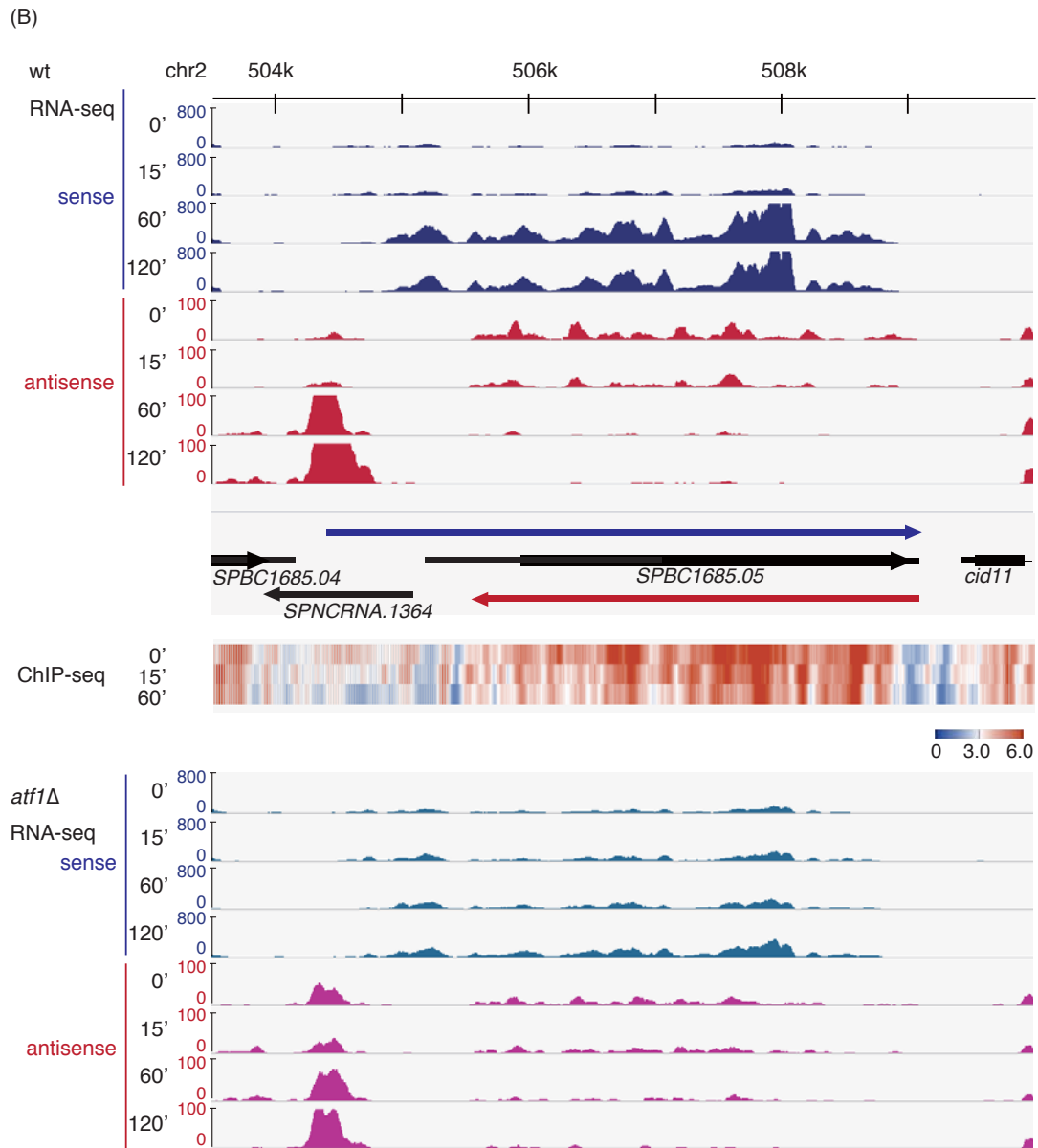


図 12 代表的な mlonRNA 型 lncRNA 候補遺伝子のプロファイル

(B) 代表的な mlonRNA 型 lncRNA 候補遺伝子の周辺 (*SPBC1685.05* 周辺) の RNA-seq 及びヒストン H3 抗体を用いた ChIP-seq データ。上が野生株の RNA-seq データ、中央に遺伝子アノテーションと ChIP-seq データ、下が *atf1Δ* 株の RNA-seq データである。RNA-seq のデータは、青、赤、青緑、赤紫色を用いて、順に、野生株センス鎖、野生株アンチセンス鎖、*atf1Δ* 変異株センス鎖、*atf1Δ* 変異株アンチセンス鎖のデータである。なお、センス鎖とアンチセンス鎖の y 軸スケールは見やすくするためにアンチセンス鎖の方が大きく設定してある。(次項に続く)

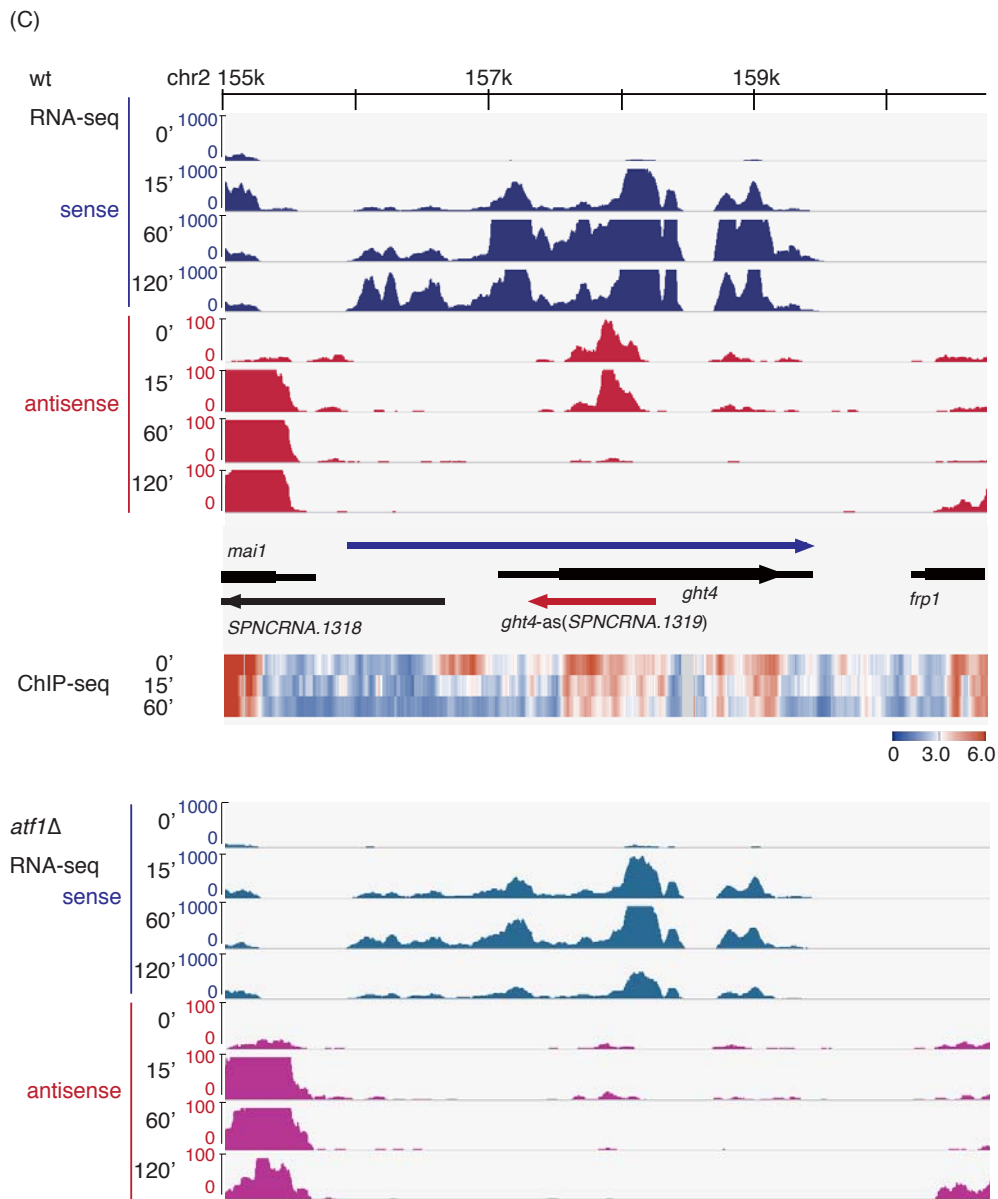


図 12 代表的な mlonRNA 型 lncRNA 候補遺伝子のプロファイル

(C) 代表的な mlonRNA 型 lncRNA 候補遺伝子の周辺 (*ght4*⁺周辺) の RNA-seq 及びヒストン H3 抗体を用いた ChIP-seq データ。上が野生株の RNA-seq データ、中央に遺伝子アノテーションと ChIP-seq データ、下が *atf1Δ* 株の RNA-seq データである。RNA-seq のデータは、青、赤、青緑、赤紫色を用いて、順に、野生株センス鎖、野生株アンチセンス鎖、*atf1Δ* 変異株センス鎖、*atf1Δ* 変異株アンチセンス鎖のデータである。なお、センス鎖とアンチセンス鎖の y 軸スケールは見やすくするためにアンチセンス鎖の方が大きく設定してある。(次項に続く)

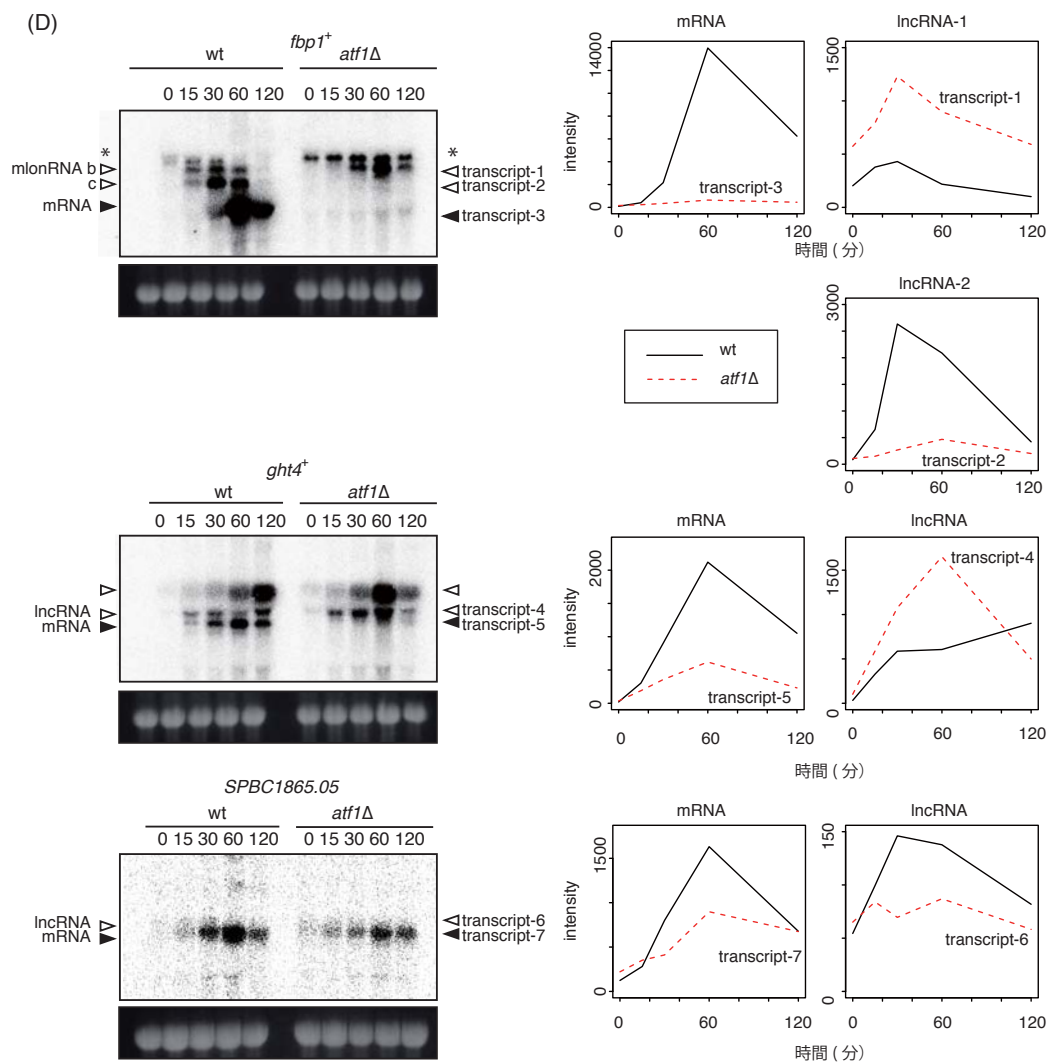


図 12 代表的な mlonRNA 型 lncRNA 候補遺伝子のプロファイル

(D) 野生株と *atf1Δ* 変異株をの転写産物の比較。図 11(C)と同じ DNA プローブを用いてノザンブロットを行った。黒抜き矢じりで mRNA、白抜き矢じりで lncRNA 候補を示した。*fbp1+*について*では、mlonRNA transcript-a とアンチセンス RNA の混合物が観察されている。右側に定量した結果を示した。

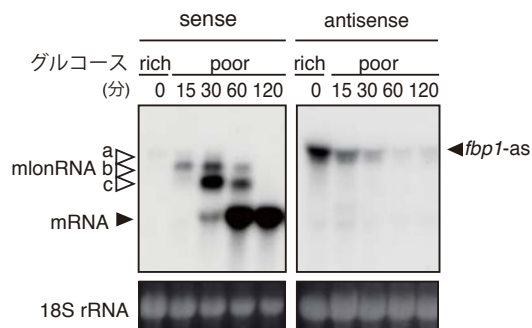


図 13 RNA プローブを用いた *fbp1*⁺ノザンブロット

RNAプローブ(リボプローブ)を用いてセンス鎖転写産物(mlonRNAおよび*fbp1*⁺mRNA)とアンチセンス鎖転写産物(*fbp1*-as)をそれぞれノザンブロットにより検出した。18S rRNAをローディングコントロールとして下に示した。図中に mlonRNA の transcript-a, b, c、mRNA、*fbp1*-as の位置を矢じりで印した。グルコース飢餓ストレスを与えてからの時間をレーンの上に記した。

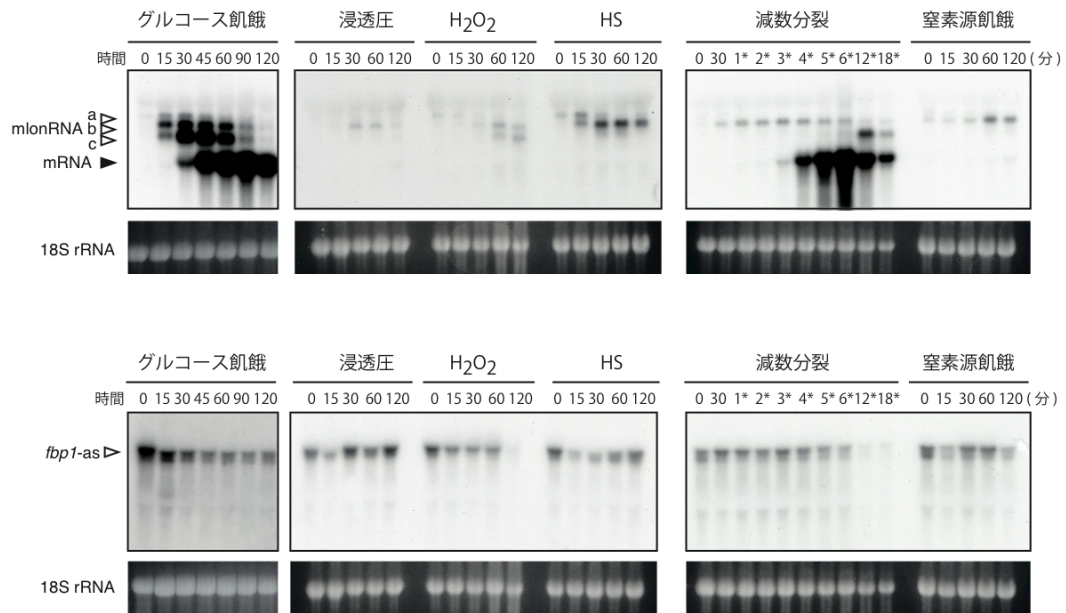


図 14 ストレス特異的な lncRNA の発現応答

グルコース飢餓ストレス、浸透圧ストレス、酸化ストレス (H_2O_2)、ヒートショック (HS)、減数分裂期(二倍体)、窒素源飢餓ストレス (一倍体) 下での *fbp1*⁺ のセンス・アンチセンスのノザンブロット。減数分裂のみ 0 分~18 時間の観察、他は 0~120 分の観察。レーンの上の数字はストレスを与えてからの時間、単位は分。ただし*の数字の単位は時間。

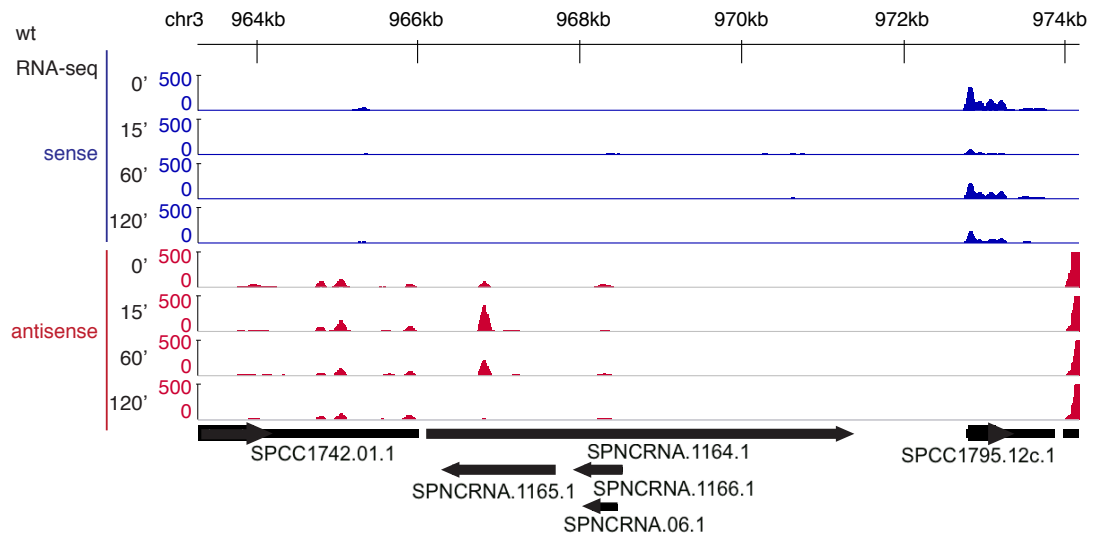


図 15 *SPNCRNA.1164* のグルコース飢餓ストレス下での lncRNA の発現抑制
 浸透圧ストレス下で転写が活性化される *SPNCRNA.1164* 周辺におけるグルコース飢餓ス
 トレス下での野生株の RNA-seq のデータ。センス、アンチセンス転写産物を、青、赤で示
 した。

GOID	TERM	CORRECTED_PVALUE	アノテーション付き 遺伝子の数
クラスター1: 抑制; repressed			
GO:0034470	ncRNA processing	5.07701E-31	69
GO:0006364	rRNA processing	8.13318E-29	56
GO:0016072	rRNA metabolic process	1.49147E-28	56
GO:0034660	ncRNA metabolic process	1.12575E-27	70
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	6.7833E-24	42
GO:0006396	RNA processing	9.05936E-20	73
GO:0044085	cellular component biogenesis	1.73861E-18	43
GO:0016070	RNA metabolic process	1.72315E-13	83
GO:0042254	ribosome biogenesis	3.11534E-12	26
GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic process	7.36008E-07	95
GO:0090304	nucleic acid metabolic process	8.53127E-07	84
GO:0046483	heterocycle metabolic process	5.93702E-06	97
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	7.1933E-06	107
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	8.206E-06	99
GO:0006725	cellular aromatic compound metabolic process	9.36627E-06	96
GO:1901360	organic cyclic compound metabolic process	2.69633E-05	98
GO:0042274	ribosomal small subunit biogenesis	8.44339E-05	8
GO:0030490	maturation of SSU-rRNA	0.000227254	11
GO:0042273	ribosomal large subunit biogenesis	0.000439963	8
GO:XXXXXXX	unannotated	0.000593425	5
クラスター2: 早期活性化; early (15') inducible			
GO:XXXXXXX	unannotated	7.07E-16	10
クラスター3: 中期活性化; middle (60') inducible			
GO:0008150	biological_process	0.000129887	45
GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	0.000178741	15
GO:0044275	cellular carbohydrate catabolic process	0.000623566	8
GO:0019563	glycerol catabolic process	0.001055282	4
GO:0006071	glycerol metabolic process	0.002318732	5
GO:0019405	alditol catabolic process	0.00309854	4
GO:0046174	polyol catabolic process	0.00309854	4
GO:0044724	single-organism carbohydrate catabolic process	0.003610202	9
GO:0019400	alditol metabolic process	0.003887733	5
GO:0016052	carbohydrate catabolic process	0.005138752	10
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	0.006964152	18
GO:0019588	anaerobic glycerol catabolic process	0.008053718	3
GO:0019662	non-glycolytic fermentation	0.008053718	3
クラスター4: 後期活性化; later (120') inducible			
GO:0044712	single-organism catabolic process	5.69914E-05	20
GO:0044724	single-organism carbohydrate catabolic process	0.005104007	8
GO:XXXXXXX	unannotated	1.07E-05	5

表1 クラスタごとの Gene ontology 解析

各クラスタ別の GO 解析で得られた有意なアノテーションをリストにした。GO 解析はオープンツール Generic Gene Ontology Term Finder (Elizabeth *et al.* 2004)を用いて行った。

Systematic ID	P-value	遺伝子間距離 (bp)	asRNAの有無	センス/アンチセンス相関	Atf1結合サイト (CREB)の有無	Atf1 依存性	Gene ontology annotation
1 SPBC1198.14c (fbp1+)	0	3122	y	y	y	y	fructose-1,6-bisphosphatase Fbp1
2 SPBC1685.05	3.42E-170	2073	y	y	n	y	serine protease (predicted)
3 SPAP7G5.06 (per1+)	1.19E-145	4866	y	y	y	y	plasma membrane amino acid permease PER1
4 SPBC1683.08 (ght4+)	4.67E-140	2254	y	y	y	y	hexose transporter Ght4
5 SPAPJ691.02	7.59E-139	2463	y	n	y	n	yippee-like protein
6 SPCC132.04c (gdh2+)	1.67E-119	2647	y	n	n	y	NAD-dependent glutamate dehydrogenase Gdh2
7 SPBC1271.05c	3.82E-111	3099	y	n	y	y	zf-AN1 type zinc finger protein
8 SPAC4H3.03c	9.32E-104	2481	y	y	y	y	glucan 1,4-alpha-glucosidase (predicted)
9 SPCC191.11 (inv1+)	3.45E-103	2029	y	n	y	y	beta-fructofuranosidase
10 SPAC186.02c	4.30E-121	4238	§				
11 SPAC11D3.19	2.30E-119	2590	§				
12 SPCC1235.18	1.66E-132	3204	‡				
13 SPAPB1A11.03	4.13E-130	3197	‡				
14 SPCC794.16	9.91E-115	2278	‡				
15 SPAC6C3.04	3.61E-112	2041	‡				
16 SPCC1739.08c	2.32E-110	2345	‡				
17 SPCC1235.14	1.29E-107	5443	‡				
18 SPAC22H10.13	3.35E-197	89	†				
19 SPAC869.08	8.52E-178	817	†				
20 SPBPB21E7.06	5.42E-175	1130	†				
21 SPAC1F7.06	6.53E-167	861	†				
22 SPBC3H7.08c	3.74E-165	1803	†				
23 SPAC869.06c	4.88E-146	1483	†				
24 SPBC1683.08	5.36E-139	1778	†				
25 SPBC8E4.05c	4.95E-138	1571	†				
26 SPAC3C7.13c	1.97E-134	1168	†				
27 SPAC3A11.10c	3.02E-134	852	†				
28 SPCC338.12	2.07E-133	653	†				
29 SPAP8A3.04c	1.67E-128	1922	†				
30 SPBC215.11c	9.12E-125	1222	†				
31 SPCC285.04	5.28E-119	1138	†				
32 SPBC1198.01	7.30E-119	834	†				
33 SPCC1393.12	9.28E-117	1442	†				
34 SPAC4G9.12	3.37E-116	950	†				
35 SPAC19G12.09	8.53E-116	1963	†				
36 SPCC338.18	5.34E-107	1470	†				
37 SPBC25H2.09	5.68E-106	853	†				
38 SPBC216.03	1.33E-105	961	†				
39 SPBC32F12.03c	5.14E-105	1923	†				
40 SPAC15E1.02c	8.40E-104	693	†				
41 SPCC70.02c	2.16E-103	1091	†				
42 SPBC21B10.14	1.07E-102	168	†				
43 SPAC1610.04	3.34E-101	1328	†				

§ 転写量が少なすぎる (10リード以下)

‡ 近傍遺伝子と重なっている

† 上流プロモーター領域が2kb以内に別の遺伝子を含む

表 2 43 の lncRNA 候補領域中の 9 つの mlonRNA 型 lncRNA 候補領域

43 の lncRNA 候補領域のうち、上流プロモーター領域が 2kb 以内に別の遺伝子を含む、近傍遺伝子と重なっている、または、転写量が少なすぎるため偽陽性であると考えられる候補をそれぞれ †、‡、§ で印した。9 つの mlonRNA 型 lncRNA 候補領域に関しては、その機能と、アンチセンス RNA の転写、クロマチン構造の変化、Atf1 結合サイト、Atf1 依存性の有無を右側に印した。「y」、「n」は順に、「有る」、「無い」ことを指す。

第2章 長鎖非コード RNA を介した糖新生遺伝子 *fbp1*⁺ の発現制御機構

【本章の概要】これまでの研究から、飢餓ストレスを受けて *fbp1*⁺ 領域で *mlon*RNA や *m*RNA などセンス方向の転写が段階的に活性化するメカニズムが明らかになってきた。これに加え、今回の RNA-seq の結果から *fbp1*⁺ 領域においてグルコースが豊富な時にアンチセンス RNA が転写されていることが示された。*mlon*RNA や *m*RNA がグルコース飢餓ストレスを受けて転写が活性化するのは逆に、*fbp1*⁺ アンチセンス RNA は培地中にグルコースが潤沢な条件下で合成され、飢餓ストレスを受けると存在量が減少した。すなわち、センス方向の転写産物とアンチセンス方向の転写産物には量的に負の相関が認められる。そこで、グルコース飢餓条件下で人為的にアンチセンス RNA の過剰発現を行った。その結果、センス側の *m*RNA および *mlon*RNA の転写量が減少した。さらに、グルコース飢餓によりアンチセンス RNA を消失させたのちにグルコースを再添加する実験（グルコース再添加実験）を行った。その結果、アンチセンス RNA の転写量が再び増加し、*m*RNA が急速に失われることを見いだした。グルコース再添加時の *m*RNA の不安定性の原因を調べるために、Dicer の欠損変異体を用いた解析を行ったところ、*m*RNA の安定性が Dicer に部分的に依存することを見いだした。

2.1 *fbp1-as* の転写

第1章でも述べた通り、*fbp1*⁺ 領域において、グルコースが豊富な条件下に見られ、飢餓ストレスを受けると消失するアンチセンス RNA の存在が RNA-seq データから示された。

そこで、このアンチセンス RNA の詳細を解析するため、5' RACE 解析や RNA プローブ（リボプローブ）を用いたノザンプロット解析により、*fbp1*⁺ アンチセンス RNA の転写開始部位や長さなどについて解析を行った。

5'RACE の結果、*fbp1*⁺ の 3'UTR 周辺の複数の転写開始点から 5' のプロモーター領域に至るまで、連続した長いアンチセンス RNA が転写されていることが明らかになった(図 16)。また、リボプローブを用いた鎖特異的なノザンプロットから、この転写産物が 3,000nt 以上の長さを有し、飢餓ストレス後に存在量が徐々に減少することが確かめられた(図 13)。これらのデータは RNA-seq のデータと矛盾しない。以上の結果から、*fbp1*⁺ において、グルコースが豊富な条件下でアンチセンス lncRNA（「*fbp1-as*」と略記する）が合成され、グルコース飢餓時にセンス方向の転写が活性化すると、*fbp1-as* は徐々に量が減少していくことが示された。

2.2 *fbp1-as* と sense RNA の相関

fbp1-as と、*fbp1*⁺のセンスの転写産物の半定量的なキネティクスを比較すると転写量変化にあきらかな負の相関が認められた (図 13)。このことから、センスの mlonRNA 型の lncRNA とアンチセンス RNA は、グルコース濃度変化に応じて相反的な制御を受ける、という仮説に至った。

そこで、mlonRNA または *fbp1-as* をプラスミド上で誘導合成する系を構築し、グルコース豊富時および欠乏時のそれぞれで、アンチセンス、またはセンス鎖 RNA への影響を調べた。実験には、チアミン濃度を変えることによって発現誘導が可能な *nmt1* プロモーターを持つプラスミドを用いた。このプラスミドの *nmt1* プロモーターの下流に mlonRNA 及び *fbp1-as* の転写開始点を含む領域のゲノム配列を挿入し、そのプラスミドを *fbp1*Δ の株に導入した。これにより、内在性の *fbp1*⁺に配慮することなく、*fbp1-as* または *fbp1*⁺の最も長い mlonRNA である transcript-a の過剰発現の影響を調べることが可能になった。なお、グルコース濃度の変化は *nmt1* プロモーターの活性に影響を与えないこと、また、これらのプラスミド上では *nmt1* プロモーターに依存してその下流に配置した mlonRNA や *fbp1-as* が転写されることを確認した。以上により、目的の *fbp1-as* または mlonRNA transcript a の人為的発現制御系が構築できたと判断した。

次に上記の実験系のうち、*fbp1*⁺ mlonRNA transcript-a の過剰発現株 (pREP-*fbp1*-mlon プラスミド導入 *fbp1*Δ 株) を用いて、チアミンの濃度を変えて転写産物の観察を行った。その結果、チアミンの非存在/グルコース豊富条件下 (図 17B; 0 分) では、transcript-a を過剰発現することでは、下流の transcript-b 及び-c のカスケード転写、および mRNA の転写が起こらないことを見いだした。一方、グルコース飢餓条件下では、transcript-a の発現誘導を続けているにもかかわらず、transcript-a の発現は減衰し、変わって transcript-b、-c および mRNA の発現が誘導された。以上のことから、mlonRNA transcript-a 転写の強制的な誘導だけでは、下流の lncRNA や mRNA へのカスケード転写には不十分であること、また mlonRNA のカスケード転写にはグルコース飢餓ストレスのシグナルが重要な役割を果たすことが示された。

次に、*fbp1-as* の過剰発現株 (pREP-*fbp1-as* プラスミド導入 *fbp1*Δ 株) を用いて、*fbp1*⁺ 転写産物への影響を解析した。その結果、*fbp1-as* の過剰発現条件下では mlonRNA と mRNA の転写量が、グルコース飢餓条件下においても大幅に減少することが判明した (図 17)。*fbp1-as* 過剰発現比誘導下ではグルコース飢餓ストレスを受けてから 15~30 分で mlonRNA の転写が活性化するのに対し、*fbp1-as* を過剰発現するとセンス鎖 RNA の転写は 15 分では見られず、30 分になってもごく微量のセンス鎖 RNA しか検出されなかった。

60~120 分を経過しても、mRNA の転写レベルは過剰発現誘導しない場合と比べて依然として低かった。また、誘導的に発現させた *fbp1-as* の存在量はほとんど減少しなかった。以上の結果から、pREP-*fbp1-as* 株において、*fbp1-as* の過剰発現は *fbp1+* mRNA の転写を抑制することが示された。また、pREP-*fbp1-as*RNA プラスミドを *fbp1+* 野生株に導入し、*fbp1-as* をトランスに過剰供給した場合でも、染色体に存在する正規の *fbp1+* 領域から合成される *mlon*RNA と mRNA は、対照と比べて若干弱くはなるものの、完全には抑制されなかった (図 18)。このことから、*fbp1-as* のセンス鎖 RNA への転写抑制効果はシス作用効果が大きいことが示唆された。

次に、上記の傾向をプラスミドだけではなく、染色体上のアレルでも確認する目的で、*fbp1-as* の TSS 周辺のゲノム領域に変異を導入して、内在性 *fbp1-as* の発現量の変化した株の構築を試みた (図 19A)。数種の *fbp1-as* 転写開始点部位の欠失変異体を作製してノザンブロット解析を行ったところ、予想に反して、*fbp1-as* 転写量の増大が認められた。いずれの欠損株も新たな潜在的な転写開始点が発見され、*fbp1-as* の転写を完全に遮断することが実験的に実現できなかった。しかしながら、*fbp1-as* 転写の増加が見られた株を調べると、センス鎖由来の転写産物が顕著に減少し、センス鎖 RNA とアンチセンス鎖の相反的な関係が改めて確認された (図 19B)。

以上の結果を総合すると、センス鎖 *mlon*RNA とアンチセンス鎖 *fbp1-as* は互いに相反的な発現制御を受けることが確認された (図 20)。

2.3 グルコース再添加時の素早い *fbp1+* mRNA の不安定化

fbp1+ は糖新生の酵素をコードする遺伝子である。したがって、グルコース飢餓時にその mRNA 転写が増大し、グルコース豊富時に発現が抑制されることは、生物学的に合理的な反応である。しかしながら、グルコース飢餓条件から豊富条件へシフトした場合、どのような遺伝子制御がおこなわれるのか、またセンス鎖/アンチセンス鎖 RNA の相反的制御が見られるかは不明であった。

そこで、グルコース飢餓条件下にある分裂酵母に、グルコースを再付与した場合、*fbp1+* mRNA の発現がどのように変化するか、時系列的に解析を行った。上述のようにグルコースが豊富な培地 (グルコース 6%) から、飢餓培地 (グルコース 0.1%、グリセロール 3%) へと移し、グルコース飢餓条件下で 120 分間適応させた分裂酵母細胞を、再びグルコースが豊富な培地へと戻す実験を行った (グルコース再添加実験)。以降、この実験で飢餓から

回復させる条件を「グルコースの再添加 (glucose refeeding)」と呼ぶこととする。

図 21 にノザンブロット解析の結果を示す。*fbp1⁺* mRNA はグルコースの再添加から 30 分以内に急速に消失することが今回はじめて明らかになった (図 21、120~150 分)。一方、*fbp1-as* は mRNA が消失する頃から存在量が徐々に増加した (図 21、165 分~)。すなわち、グルコースの再添加時にもセンス鎖とアンチセンス鎖の RNA には相反的な関係があることがわかった。

*fbp1⁺*のセンス鎖の転写活性化に関与する転写因子 Atf1 と Rst2 は、それぞれ *fbp1* プロモーターに存在するコンセンサス配列 UAS1 (upstream activation site1) と UAS2 (upstream activation site2) に特異的に結合する (Neely *et al.* 2000)。これらの転写因子の欠損株は *fbp1⁺* mRNA の転写に大きな影響を及ぼす (Hirota *et al.* 2008; 図 10)。グルコースを再添加すると、*atf1Δ*、*rst2Δ*変異株では、mRNA の存在量が大幅に減少した。一方、*fbp1-as* の存在量は増加した (図 22A)。UAS1Δ、UAS2Δ変異株についてもグルコースを再添加する実験を行ったところ、転写因子結合部位の欠損変異株の mRNA の存在量は野生型と比べ減少し、*fbp1-as* の存在量は増加した (図 22B)。また、アンチセンス RNA を過剰発現する株についても調べたところ、グルコース再添加時にセンス鎖 RNA と *fbp1-as* が相反的な関係を示すことが確認された (図 22C)。

グルコースを再添加をすると、*fbp1⁺* mRNA が急速に消失したので、次に Fbp1 のタンパク質レベルでの安定性をウェスタンブロットにより調べた。その結果、グルコースの再添加後に mRNA と同様に Fbp1 タンパク質も素早く消失することがわかった (図 23A)。タンパク質の安定性を、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを用いて測定したところ、Fbp1 タンパク質はグルコース濃度に依存することなく常に不安定であることがわかった (図 23B)。以上の結果から、Fbp1 の存在量は主として、mRNA レベルで制御されている可能性が示唆された。

Fbp1 タンパク質は解糖系の逆反応を実行する酵素であるため、グルコースが豊富な条件下で存在するとエネルギー効率的に不利になる。したがって、グルコースの再添加時に mRNA が急速に消失するのは理にかなっている。おそらくは、mRNA の転写の抑制とともに、mRNA 分解の促進が同時進行で起こることで、急速な mRNA の消失が起こるのではないかと考えた。

次に、*fbp1⁺* mRNA の半減期を測定するために、グルコースの再添加と同時に転写阻害剤であるフェナントロリン (1,10-phenanthroline) を加え、グルコース再添加時の mRNA の安定性を調べた。ただし、1,10-フェナントロリンは遷移金属に対するキレート性配位子であるため、RNA ポリメラーゼ II を含め、Mg²⁺などの金属イオンと結合して働く酵素全

般に影響を及ぼす可能性がある (Johnston, 1994)。

まず、フェナントロリンを加えなかった場合について、グルコース再添加時の *fbp1*⁺ mRNA の半減期を測定したところ 7.6 分であった (図 24A-B、表 3)。この値をグルコース飢餓時の mRNA の半減期約 130 分 (Galipon *et al.* 2013) と比較すると、*fbp1*⁺ mRNA が、グルコース再添加後に急速かつ顕著に不安定化していることがわかった。

グルコースの再添加をした直後は *fbp1-as* はほとんど観察されない。そこで次に、グルコース再添加と同時にフェナントロリンを添加することにより、*fbp1-as* がほとんどない条件下での *fbp1*⁺ mRNA の半減期を測定した。その結果、フェナントロリン同時添加の *fbp1*⁺ mRNA の半減期は 65.4 分であった。この半減期はグルコース飢餓条件下での mRNA 半減期である約 130 分に比べると約半分の値であり、*fbp1-as* がほとんどない条件下でもグルコース再添加により若干の不安定化が起こることがわかった。しかしながら、より重要なこととして、フェナントロリンを加えなかった対照の半減期は既に述べた通り 7.6 分であり、これと比較すると 8.6 倍程度も mRNA が安定であることは注目すべきである。すなわち、*fbp1-as* 比存在下ではグルコース再添加時でも mRNA は顕著に安定化しているのである (図 24A-B、表 3)。

以上の結果から、グルコースの再添加時の *fbp1*⁺ mRNA は、*fbp1-as* 依存的に不安定化されることが強く示唆された。

2.4 Dicer 依存的な分解による *fbp1*⁺ mRNA の安定性制御

分裂酵母の Dicer 遺伝子 *dcr1*⁺ は RNA 干渉における主たる構成因子をコードする (Grewal *et al.* 2010)。分裂酵母の Dcr1 は (細胞質にも存在するという報告はあるものの) 主に核内に局在し、RNAi 依存的な条件的ヘテロクロマチンを介した転写抑制に関与する。また、セントロメアではヒストン H3K9 のジまたはトリメチル化と恒常的ヘテロクロマチンの形成を誘導する。

グルコース再添加後、比較的初期の細胞においては、*fbp1*⁺ mRNA と *fbp1-as* の両方が共存する。したがって、細胞内で両者が対合して、Dicer の基質となる二本鎖 RNA を生成することは十分可能である。実際、分裂酵母唯一の Dicer をコードする *dcr1* 遺伝子の破壊株で、*fbp1*⁺ mRNA と *fbp1-as* への影響を調べたところ部分的ではあるものの顕著な安定化が観察された (図 25)。さらに、図 24A より、*fbp1*⁺ mRNA の安定性は *fbp1-as* の有無によって大きく変化する。これらを総合すると、Dicer 依存的な二本鎖 RNA 分解経路がグルコース再添加時の mRNA 不安定化に関与する可能性が想定された。

そこで次に、グルコース再添加時の *fbp1*⁺ mRNA および *fbp1-as* の半減期についても、

*dcr1Δ*の影響を検討した。この実験では、*fbp1⁺* mRNA と *fbp1-as* 双方の安定性を調べるため、両者が共存し、両者の動態が観察可能なグルコースの再添加後 30 分の時点で培地にフェナントロリンを加え、半減期の測定を行った。その結果、*dcr1Δ*株では、*fbp1⁺* mRNA の半減期が 37.4 分と、野生株の 18.5 分と比べて 2 倍程度長くなることがわかった(図 24C-D、表 3)。一方、*fbp1-as* の半減期を測定したところ、野生株では 8.7 分だったのに対し、*dcr1Δ*株では、24.4 分と、やはり 3 倍近くも長くなっていた(図 24C-D、表 3)。

次にグルコース再添加直後の *fbp1-as* がほとんど存在しない状態での *dcr1Δ*株における mRNA 安定性を解析した。*dcr1Δ*株でグルコース再添加直後(0 分後)にフェナントロリンを添加して mRNA の半減期を測定すると、87.3 分であった(図 24A-B、表 3)。これは野生株で同じ条件で測定した半減期 65.4 分と比べて若干長めであるが、その差はごくわずかである。以上の結果から、*fbp1⁺* mRNA のターンオーバーは基本的に *fbp1-as* に依存し、また部分的ながらも Dicer 依存的であることが明らかになった。

2.5 ヘテロクロマチン非依存的な Dicer 依存的な *fbp1⁺* mRNA 転写抑制

センス鎖とアンチセンス鎖の転写物がオーバーラップする分裂酵母染色体領域では、Dicer 依存的に条件的なヘテロクロマチンが形成され、遺伝子発現が抑制されることがある(Grewal *et al.* 2010)そこで、*fbp1⁺*領域で Dicer 依存的なヘテロクロマチン形成が起こっているかを検証した。実験としては、ヘテロクロマチンのマーカーであるヒストン H3K9me2 のレベルを ChIP-qPCR により定量的に調べた。グルコース飢餓に適応した野生型株にグルコースを再添加し、この細胞について抗ヒストン H3K9me2 抗体を用いた ChIP-qPCR を行った。その結果、グルコース豊富条件・飢餓条件のいずれの場合でも、H3K9me2 レベルは陽性対照領域である *prp3* と比して極めて低いことが明らかになった(図 26)。したがって、グルコース存在下での遺伝子発現抑制時に、*fbp1⁺*領域ではヘテロクロマチンかが起きていないことが示唆された。以上の結果から、Dicer 経路は *fbp1⁺* mRNA の素早い分解には関与するものの、必ずしもヘテロクロマチンの形成には重要でないと思われる。

2.6 *fbp1⁺* mRNA の転写レベルの抑制

前述の実験より、グルコース再添加時に *fbp1⁺* mRNA が素早く分解されることが分かった。次にグルコース再添加時の mRNA 転写活性について検証する目的で、*fbp1⁺*のプロモーター領域への転写活性化因子 Rst2 の結合を ChIP-qPCR により定量的に解析した。その結果、

グルコース飢餓条件下ではプロモーター領域の UAS2 に結合していた Rst2 が、グルコースの再添加直後に急速に（数分以内）脱理することが明らかになった（図 27A）。

逆に、グルコース飢餓ストレス条件下で *fbp1-as* を過剰発現させた場合についても、UAS2 への Rst2 の結合を ChIP-qPCR で調べた結果、*fbp1-as* 過剰発現によりグルコース飢餓ストレス下においても、Rst 2 の UAS2 への結合が減弱することが明らかになった。（図 27B）。

これらの結果から、グルコース再添加時に見られる急速な *fbp1+* mRNA 減少は、第 1 に Dicer・*fbp1-as* を介した迅速な分解、第 2 に *fbp1+* mRNA 転写の急速な抑制、という少なくとも 2 つのプロセスが関わっていると考えられる。

以上の結果を総合してモデル化した「グルコース再添加時の *fbp1+* mRNA の抑制メカニズム」を図 28 に示す。

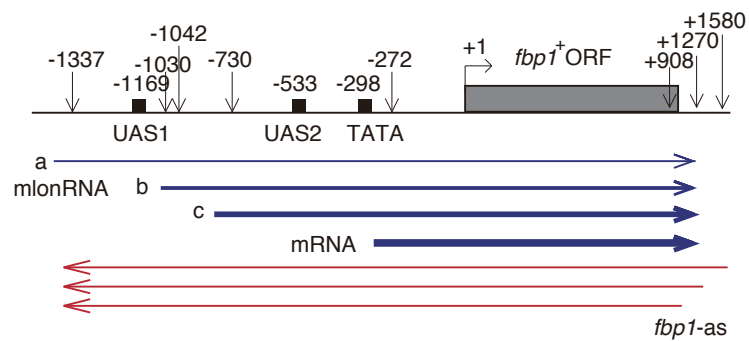


図 16 *fbp1+*転写産物の転写開始点

*fbp1+*関連の転写産物を図に示した。*fbp1-as* の転写開始点を 5' RACE により決定した。図中の数字は *fbp1+* の 1st ATG からの距離(bp)である。mRNA 及び mlonRNA の転写開始点、TATA box は先行研究のデータを使用した(Hirota *et al.* 2008; Hoffman and Winston 1989)。UASs (upstream activation sites) 1 & 2 は、それぞれ、転写因子 Atf1/Pcr1 と Rst2 の結合サイトである(Neely and Hoffman 2000)。

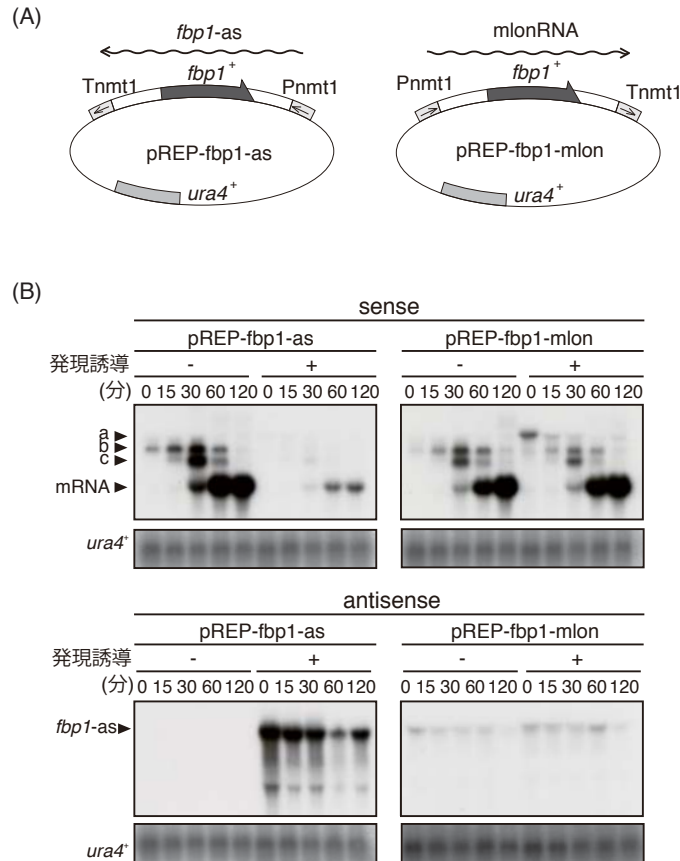


図 17 プラスミドを用いた *fbp1-as* 過剰発現

(A) 過剰発現系のプラスミドの構築。*fbp1-as* を過剰発現する pREP-*fbp1-as* と、*mlonRNA* を過剰発現する pREP-*fbp1-mlon* を作成した。チアミンの非存在下でプロモーター(Pnmt1)から過剰発現が誘導される。

(B) pREP-*fbp1-as* 及び pREP-*fbp1-mlon* のプラスミドを *fbp1Δ*株に導入し、*fbp1*⁺転写産物を過剰発現させて *fbp1*⁺ ORF のリボプローブでノザンブロットを行った。チアミンを加えた場合と加えていない場合で、発現誘導の+/+とした。グルコース飢餓ストレスを与えてからの時間をレーンの上に記した。 *ura4'*をローディングコントロールとした。

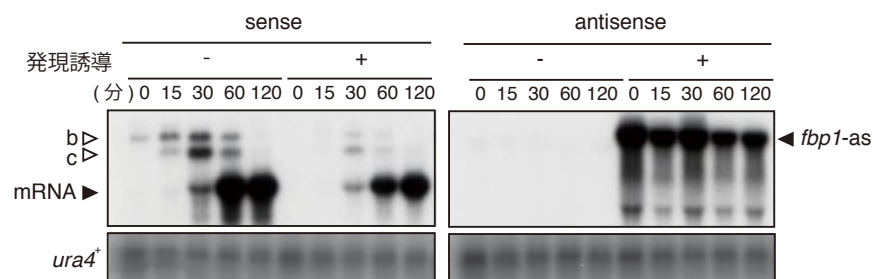


図 18 過剰発現した *fbp1-as* が内在性の mRNA に与える影響

pREP-*fbp1-as*RNA プラスミドを *fbp1*⁺の野生株に導入し、過剰発現させたときに、グルコース飢餓ストレス条件下で、内在性の *fbp1* 転写産物に与える影響を調べた。内在性の RNA もプラスミド由来の転写産物も同じリボプローブで検出されている。

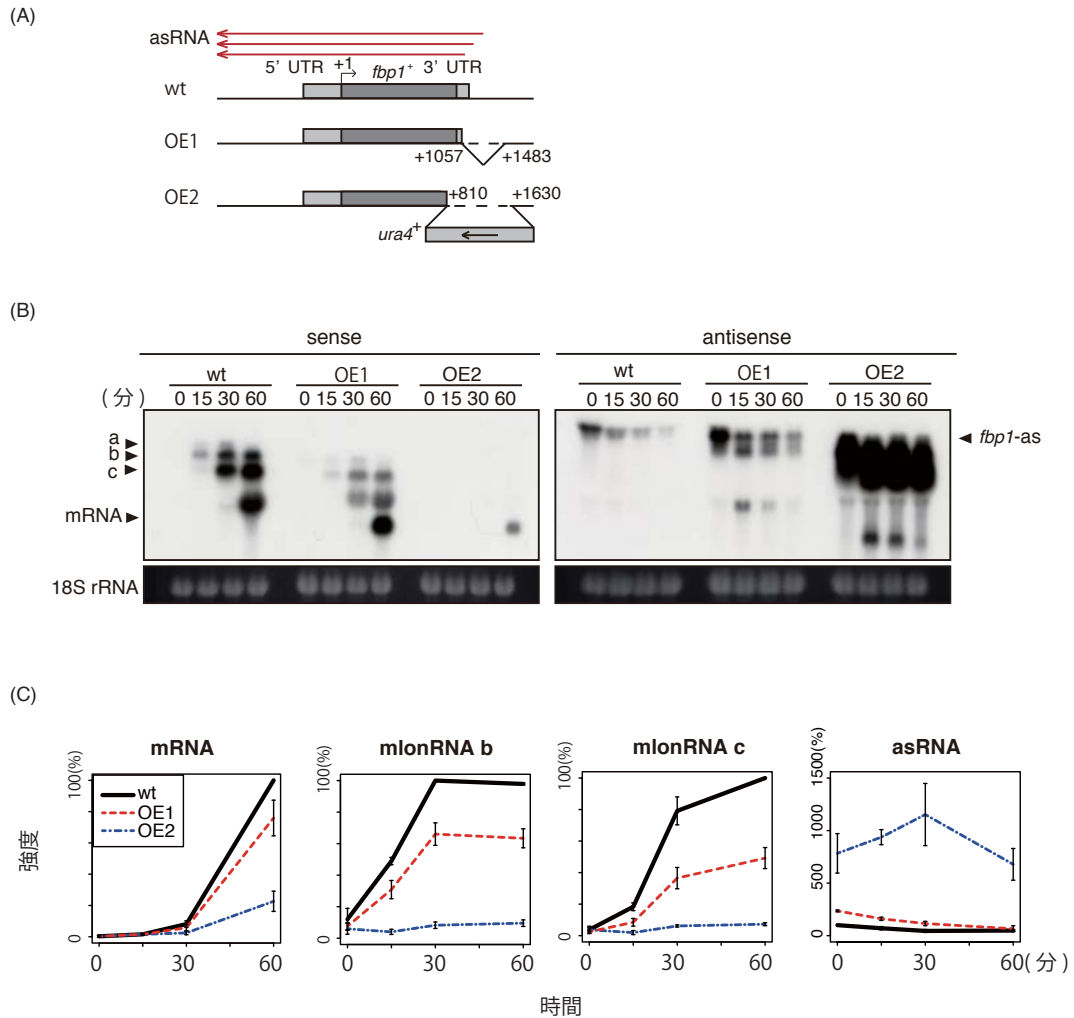


図 19 ゲノム由来 *fbp1-as* 過剰発現

(A) *fbp1*+ 3'UTR 付近に部位の部分欠損や遺伝子挿入させた変異株を作成した。OE1 は *fbp1*+ 3'UTR を約 400bp 欠損させた株である。OE2 は *fbp1*+ 3'UTR 付近に *ura4*+ 遺伝子を挿入した株である。

(B) OE1、OE2 株のグルコース飢餓ストレス応答を *fbp1*+ ORF のリボプローブによりノザンブロットにより調べた。グルコース飢餓ストレスを与えてからの時間をレーンの上に記した。18S rRNA をローディングコントロールとした。(次項へ続く)

(C) B のノザンブロットのシグナル強度を定量しグラフ化した。y 軸は、野生型のシグナルの最大値を 100% として相対値を求めた。実験は 3 度繰り返し、標準誤差値をエラーバーとして表示した。

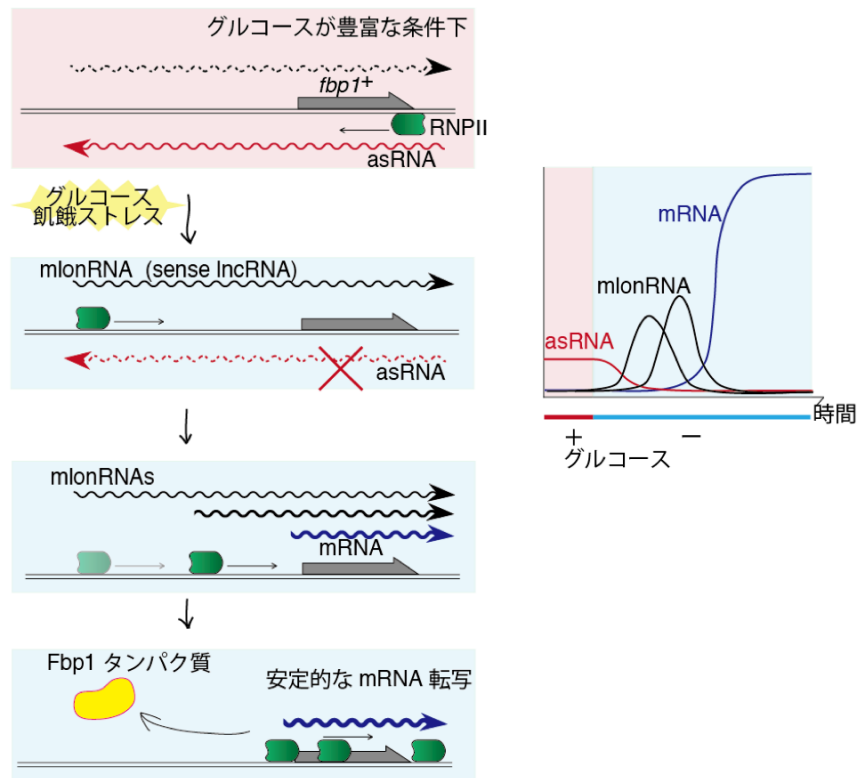


図 20 モデル図; グルコース飢餓ストレス下でセンス/アンチセンス鎖転写産物が負の相関を示す

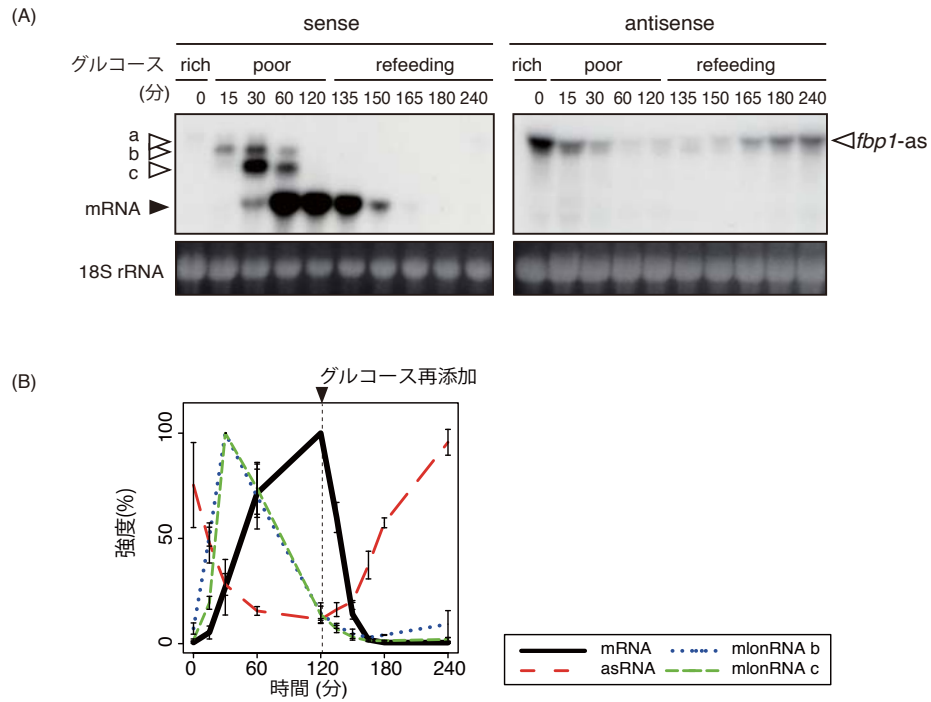


図 21 グルコース再添加時の *fbp1*⁺転写応答

(A) *fbp1*⁺ ORF のリボプローブのノザンプロット。グルコースが豊富な培地で培養(rich)した酵母細胞にグルコース飢餓ストレスを与えて (poor) 120 分後、再び、グルコースが豊富な培地に戻した(refeeding)。18S rRNA をコントロールとした。

(B) A のシグナル強度を定量した。y 軸は各転写産物の最大強度を 100%として、相対値を求めた。実験は 3 度繰り返し、標準誤差値をエラーバーとして表示した。

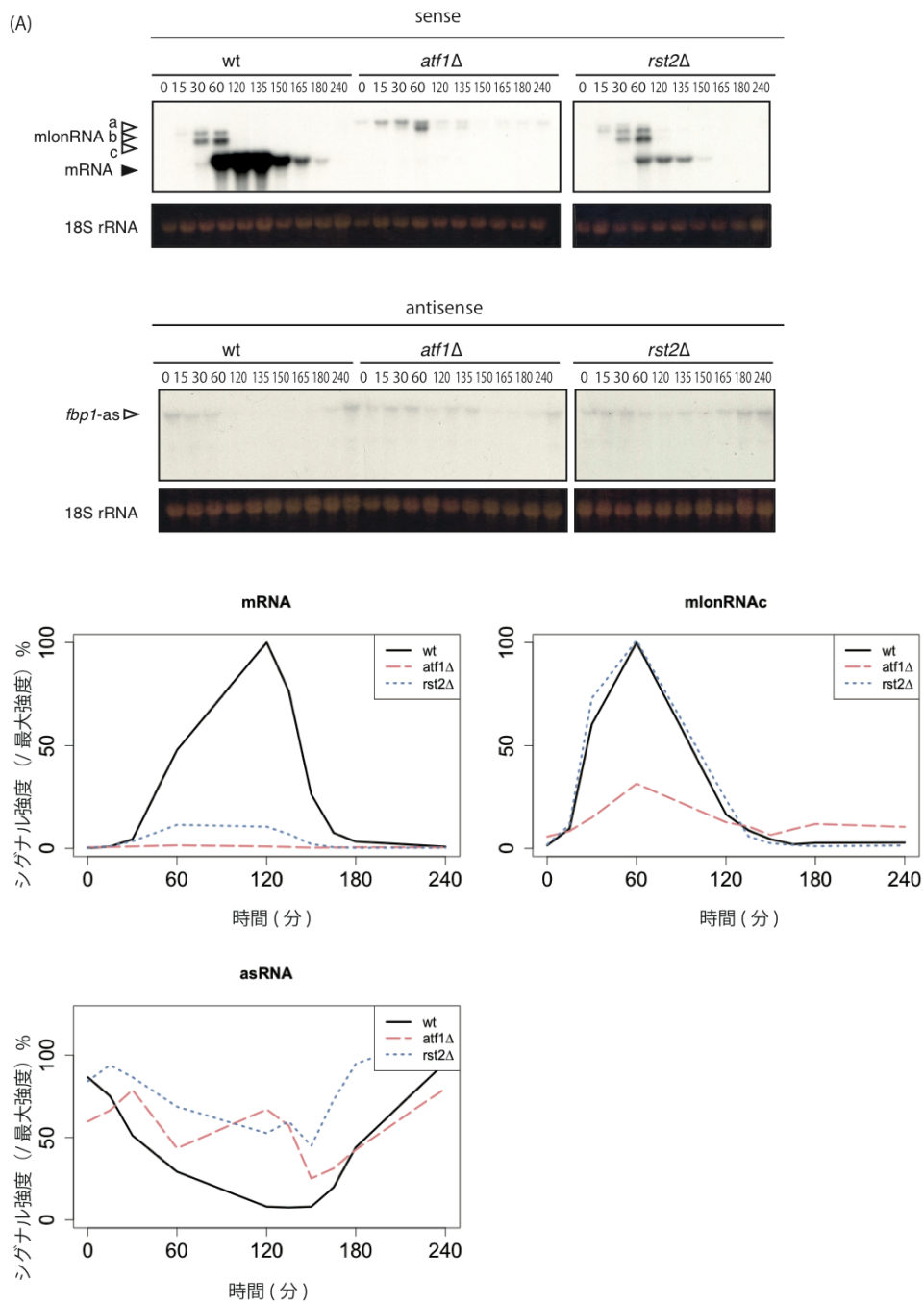


図 22 転写活性化因子及びその結合サイト欠損変異と *fbp1-as* 過剰発現株のグルコース再添加時の転写応答

(A) *fbp1+* ORF のリボプローブのノザンブロット。グルコースが豊富な培地で培養した *atf1Δ*、*rst2Δ* 株の細胞にグルコース飢餓ストレスを与えて 120 分後、再び、グルコースが豊富な培地に戻した。18S rRNA をコントロールとした。(次項へ続く)

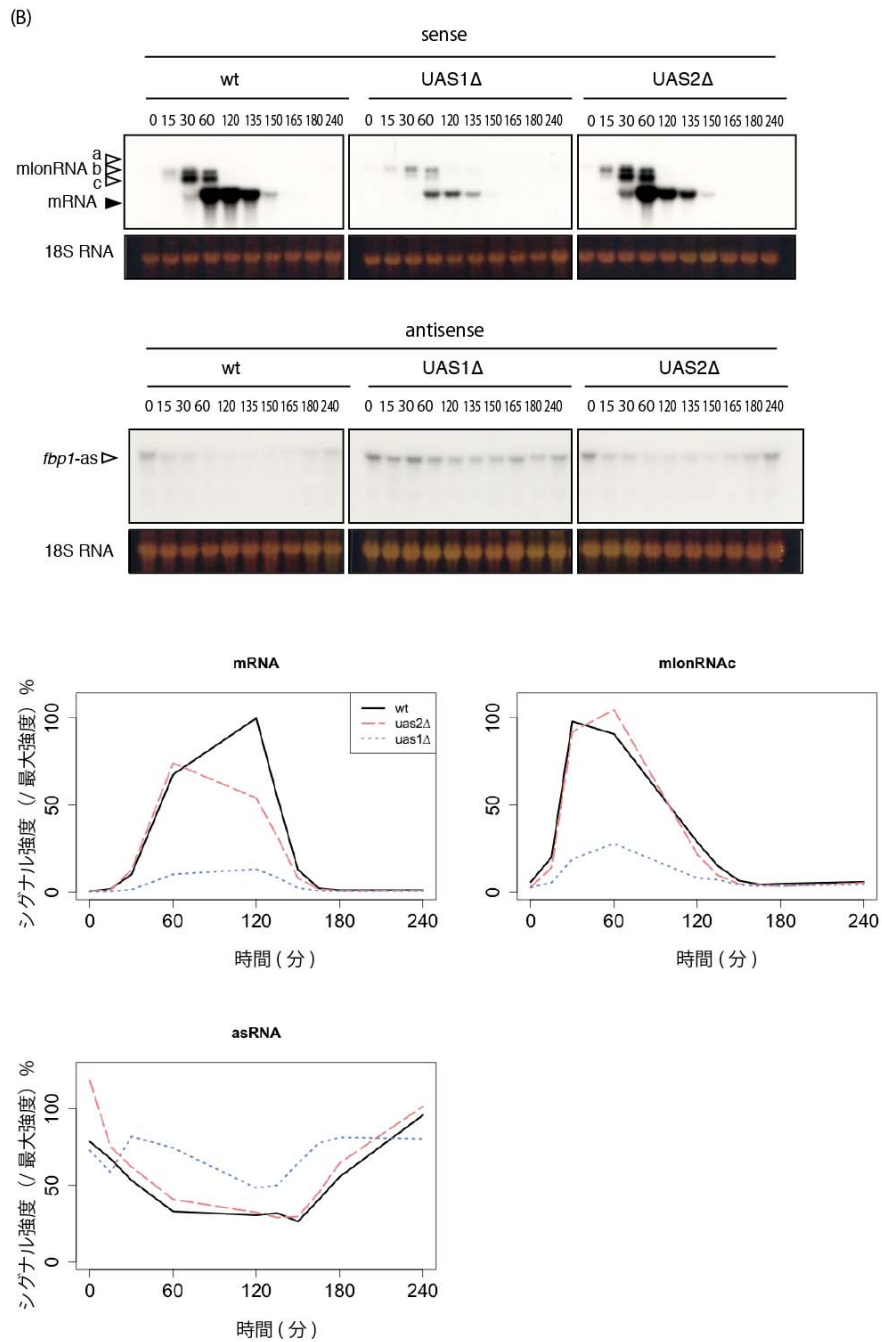


図 22 転写活性化因子及びその結合サイト欠損変異と *fbp1-as* 過剰発現株のグルコース再添加時の転写応答

(B) *fbp1+* ORF のリボプローブのノザンプロット。グルコースが豊富な培地で培養した UAS1Δ、UAS2Δ株の細胞にグルコース飢餓ストレスを与えて 120 分後、再び、グルコースが豊富な培地に戻した。18S rRNA をコントロールとした。(次項へ続く)

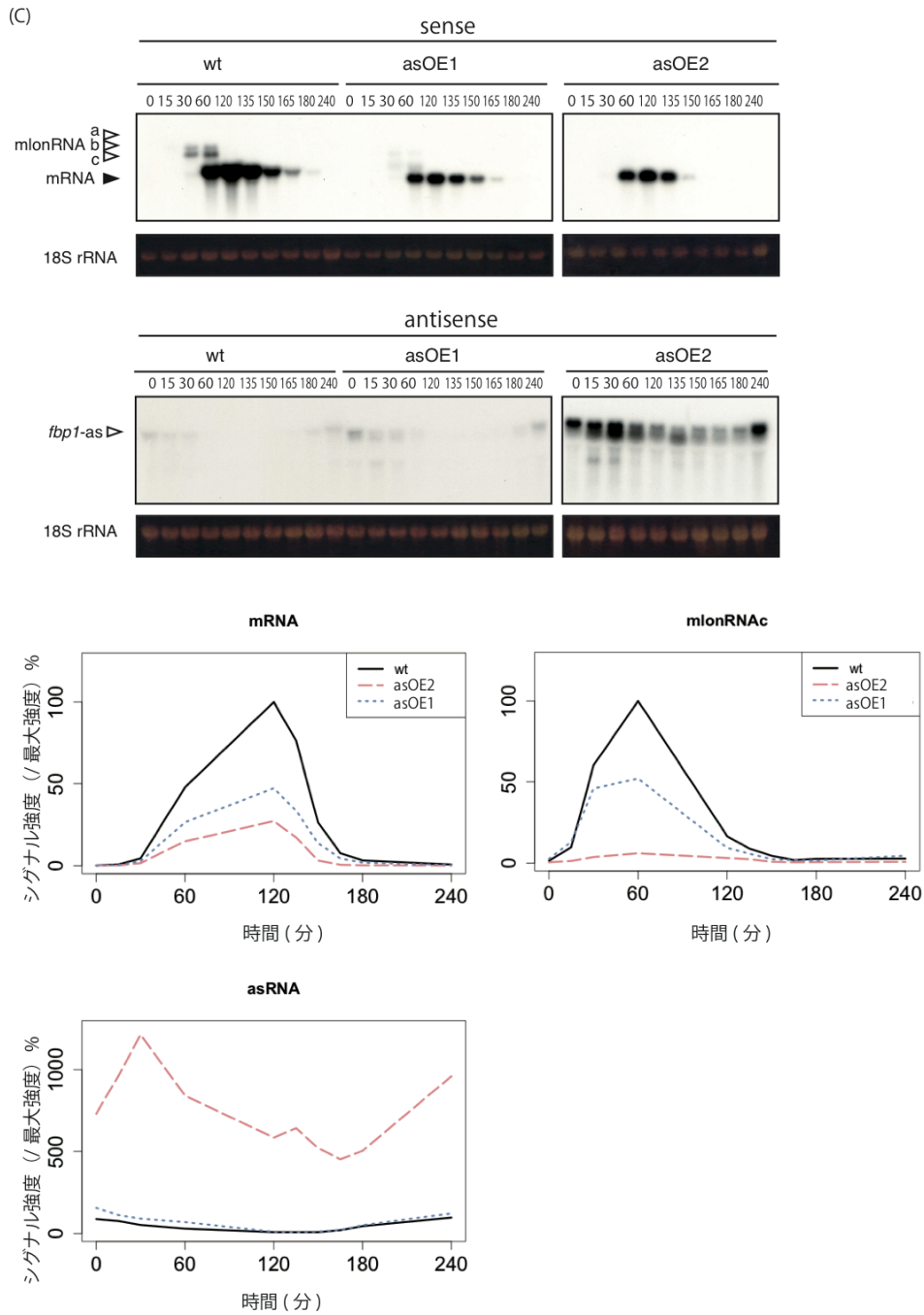


図 22 転写活性化因子及びその結合サイト欠損変異と *fbp1-as* 過剰発現株のグルコース再添加時の転写応答

(C) *fbp1+* ORF のリボプローブのノザンプロット。グルコースが豊富な培地で培養した *fbp1-as* 過剰発現株 (図 19 で用いた株) の細胞にグルコース飢餓ストレスを与えて 120 分後、再び、グルコースが豊富な培地に戻した。18S rRNA をコントロールとした。

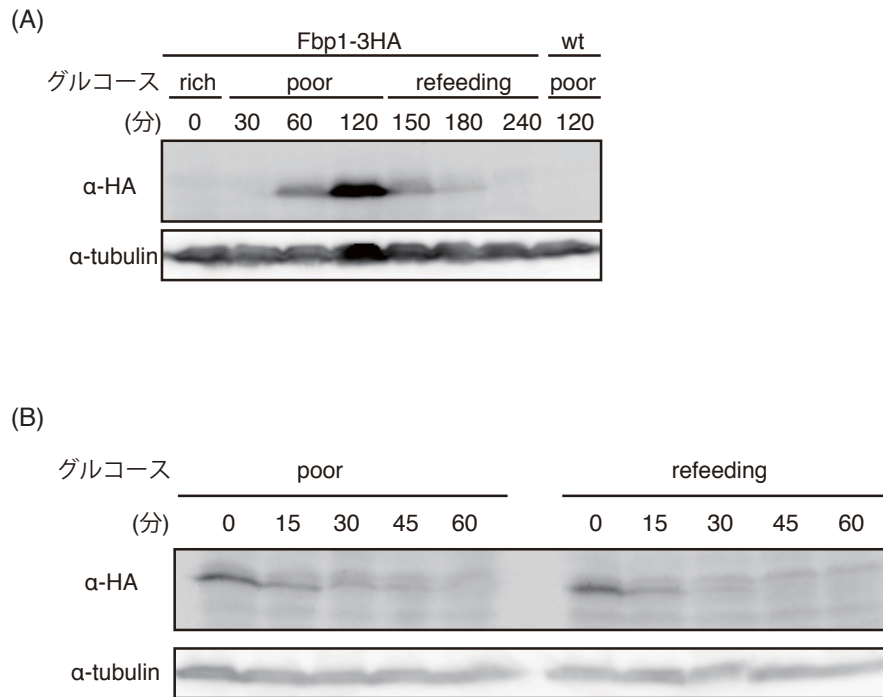


図 23 グルコース濃度変化ストレスと Fbp1 タンパク質の発現変化

(A) Fbp1-3HA 株を用い、グルコース飢餓ストレスを与えてからグルコースを再添加して Fbp1-タンパク質の発現変化を抗 HA 抗体で検出した。ネガティブコントロールとして HA タグなしの野生株を右端にロードした。ローディングコントロールには、チューブリンを用いた。

(B) タンパク質の安定性を調べるために、グルコース飢餓ストレスをかけ始めてから 130 分後の細胞と、グルコース再添加後 10 分後の細胞にシクロヘキシミドを加え、翻訳抑制条件下でタンパク質の消滅速度を観測した。Fbp1-3HA タンパク質はどちらの条件下でも、素早く消失した。

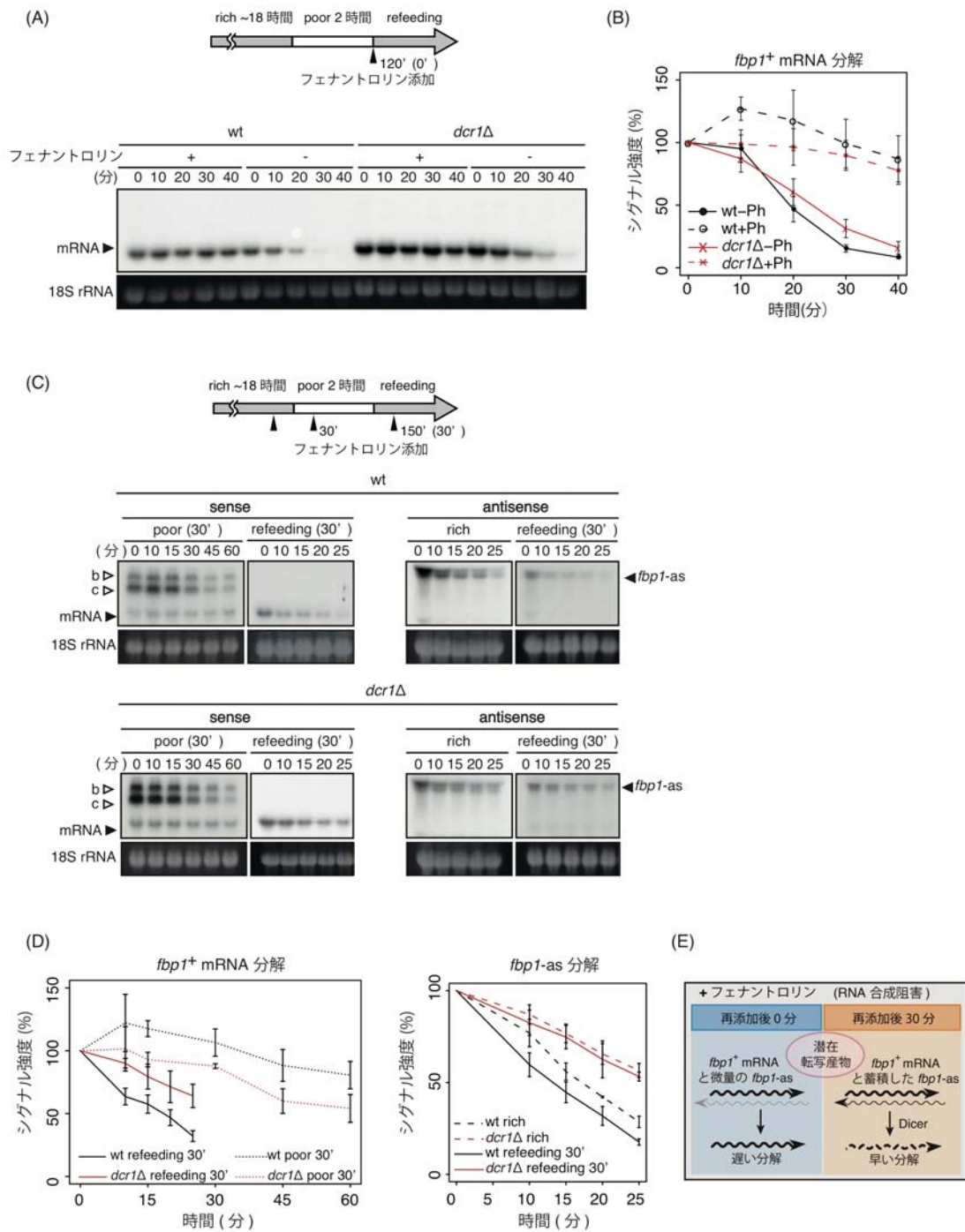


図 24 *fbp1*⁺転写産物の安定性変化と Dcr1 依存的な分解系
 (次項へ続く)

(A) 野生株と *dcr1*Δ変異株を用い、グルコース飢餓ストレスを与えてからグルコースを再添加すると同時にフェナントロリンを加え、*fbp1*⁺ ORF のリボプローブを用いてノザンブロットを行い、*fbp1*⁺ mRNA の発現変化を調べた。グルコース及びフェナントロリンを加えてからの時間をレーンの上部に記した。

(B) A のシグナル強度を定量した。黒線、赤線はそれぞれ、野生株、*dcr1*Δ変異株を表し、破線はフェナントロリンを加えたサンプル、実線は加えなかったサンプルである。0 分時点のシグナルを 100%として相対値を y 軸にとりプロットした。実験は 3 度繰り返し、標準誤差値をエラーバーとして表示した。

(C) 野生株と *dcr1*Δ変異株を用い、グルコース飢餓ストレスを与えてから 30 分ごと、グルコースを再添加して 30 分後にフェナントロリンを加え、*fbp1*⁺ ORF のリボプローブを用いてノザンブロットを行い、*fbp1*⁺ mRNA の発現変化を調べた。また、グルコースが豊富な条件下と、グルコースを再添加して 30 分後にフェナントロリンを加え、*fbp1*⁺ ORF のリボプローブを用いてノザンブロットを行い、*fbp1-as* の発現変化を調べた。フェナントロリンを加えてからの時間をレーンの上部に記した。

(D) C のシグナル強度を定量した。黒線、赤線はそれぞれ、野生株、*dcr1*Δ変異株を表し、実線はグルコース再添加後 30 分にフェナントロリンを加えたサンプルである。破線は、mRNA についてはグルコース飢餓ストレスを与えてから 30 分後、*fbp1-as* についてはグルコースが豊富な条件下でフェナントロリンを加えたサンプルである。

0 分時点のシグナルを 100%として相対値を y 軸にとりプロットした。実験は 3 度繰り返し、標準誤差値をエラーバーとして表示した。

(E) A~D のまとめ。

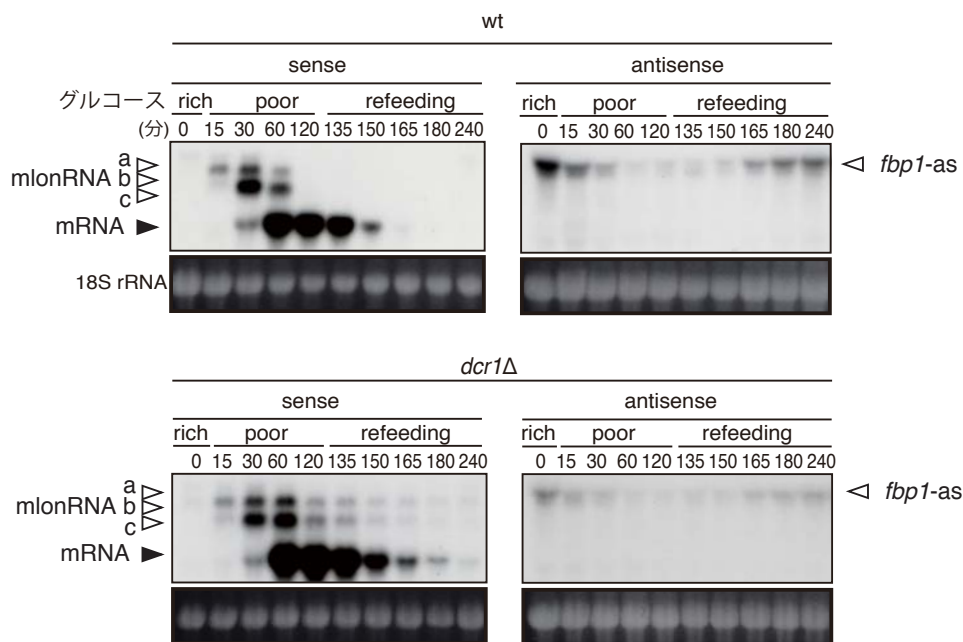


図 25 *fbp1*⁺転写産物の安定性制御への分解系の寄与

dcr1 Δ変異株を用いてグルコース飢餓ストレスを与えてからグルコースを再添加し、*fbp1*⁺ ORF のリボプローブを用いてノザンブロットを行い、センス鎖、アンチセンス鎖それぞれの発現変化を調べた。

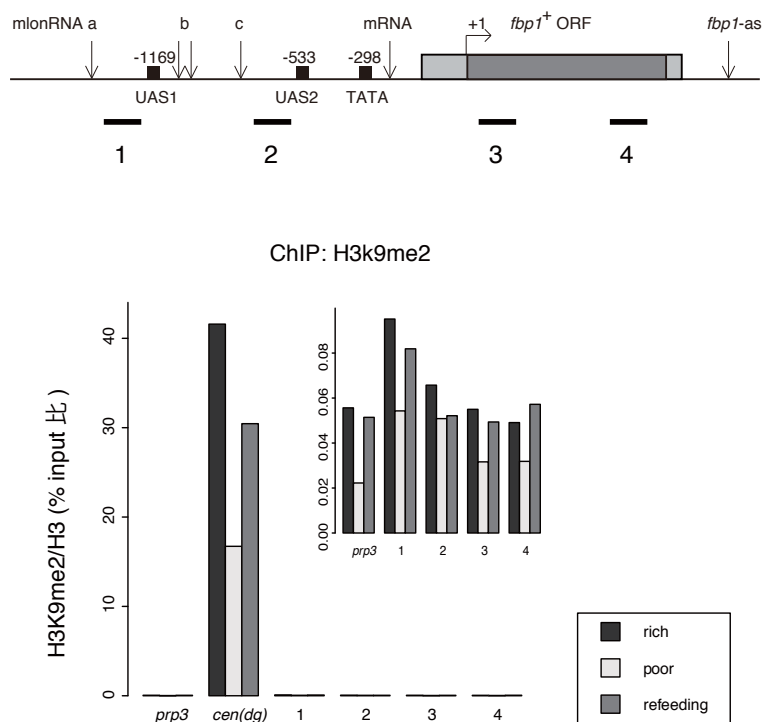


図 26 ヘテロクロマチン非依存的かつ、Dicer 依存的な *fbp1⁺* mRNA 転写抑制
 抗ヒストン H3K9me2 抗体を用いて *fbp1⁺* 周辺について ChIP-qPCR を行った。プライマーの位置は上部に図示した。 *prp3* と *cen(dg)* (*dg repeats at centromere*) をネガティブ・ポジティブコントロールとして用いた。 *cen(dg)* 以外について、y 軸スケールを大きくしたものを別に表示した。グルコースが豊富な条件下(黒; rich; 0 分)、グルコース飢餓ストレス後 120 分 (薄灰色; poor; 120 分)、グルコース飢餓に 120 分適応させた後にグルコース再添加後 120 分(濃灰色; refeeding; 240 分)に関して ChIP-qPCR を行った。用いたプライマーの配列は「材料と方法」に記載した。

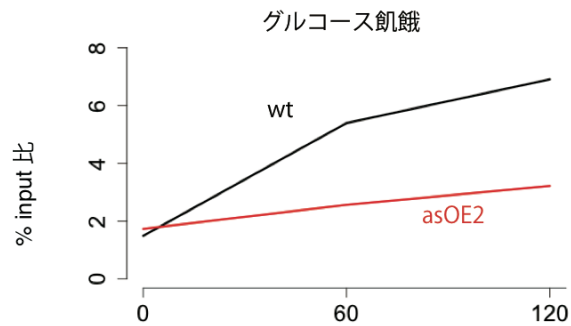
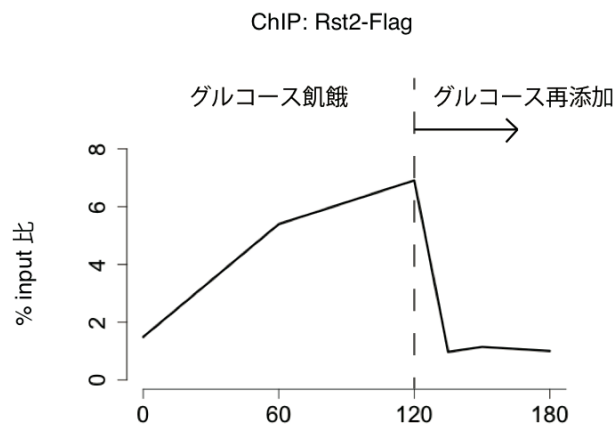
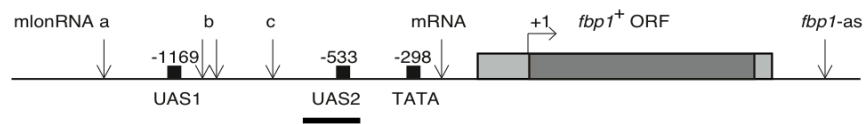


図 27 グルコース再添加時の転写因子 Rst2 の乖離

(A) Rst2-Flag 株を用いて、グルコース飢餓ストレス～グルコース再添加時に UAS2 における Rst2 の結合を ChIP-qPCR により確認した。

(B) Rst2-Flag×*fbp1*-asOE2 株を用いて、グルコース飢餓ストレス条件下で、*fbp1*-as を過剰発現させた場合の UAS2 における Rst2 の結合を ChIP-qPCR により確認した。

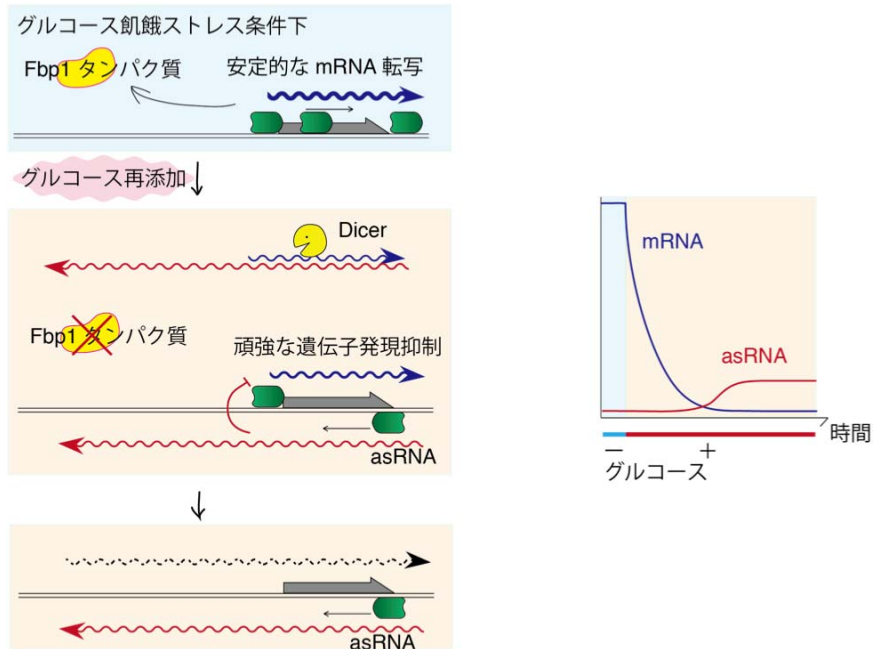


図 28 モデル図；グルコース再添加時に *fbp1*⁺ mRNA が素早く抑制される

(A) *fbp1*⁺ mRNA と *fbp1-as* の半減期 (+ フェナントロリン) (分)

	mRNA		<i>fbp1-as</i>	
	wt	<i>dcr1</i> Δ	wt	<i>dcr1</i> Δ
グルコース - 再添加後 0'	65.4±13.7	87.3±8.0	—	—
- 再添加後 30'	18.5±3.7	37.4±10.0*	8.7±2.0	24.4±5.4**
- 飢餓 30'	132±19	132±33	—	—
- 豊富	—	—	10.7±0.9	25.2±5.4*

(B) *fbp1*⁺ mRNA の分解速度 (- フェナントロリン) (分)

	wt	<i>dcr1</i> Δ
グルコース再添加	7.6±0.4	13.5±1.8**

t-test; * P<0.05, ** P<0.01

表 3 mRNA と *fbp1-as* の分解速度

(A) RNA 分解半減期のまとめ。実験は 3 度以上繰り返し、Student's t 検定により *dcr1*Δ 変異株と野生株の有意差を検定した。ただし、フェナントロリンを加えてから安定的な効力を現すまでの時間を考慮して、半減期の計算には、フェナントロリンを加えてから 10 分後以降のシグナル強度の値を使用し、フェナントロリンを加える前の 0 分時点のシグナル強度は計算に入れていない。

(B) RNA 消失速度のまとめ。フェナントロリンを加えていない条件下での *fbp1*⁺ mRNA の消失速度を定量した。Student's t 検定により *dcr1*Δ 変異株と野生株の有意差を検定した。

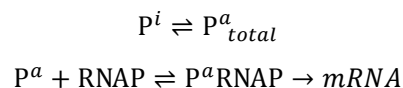
第3章 *fbp1*⁺遺伝子発現制御の数理モデル

【本章の概要】第2章では *fbp1*⁺のセンス鎖 RNA とアンチセンスの lncRNA が相互に制御し合うメカニズムを分子生物学的に検証した。その結果、*fbp1*⁺の転写活性化にはセンス鎖 lncRNA である mlonRNA が寄与し、アンチセンス RNA が Dicer 依存的な分解制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。このことから、図 29 のモデルが予測される。この章では、*fbp1*-as とセンス鎖 mRNA が相互制御するメカニズムをシミュレーションによって検証する。

3.1 *fbp1*⁺ mlonRNA / mRNA 転写活性化制御モデルの構築

まず、グルコース飢餓ストレス時の *fbp1*⁺ mRNA 転写活性化の制御システムをモデル化する。そのために、RNA の発現系としてプロモーターと RNA ポリメラーゼ (RNAP) を考える。プロモーターは活性化状態 (active; P^a) と不活性化状態 (inactive; P^i) の二状態をとり、活性化状態のときのみ RNAP が RNA を転写できるとする。

はじめに、もし、mRNA が lncRNA 非依存的に転写されると仮定すると、mRNA の発現を次のような反応で表現できる。



ただし、 P^a_{total} は、 P^a と P^aRNAP の総量である。

つまり、図 30A の概念図のように、グルコースが存在する条件下ではプロモーターは閉じていて、グルコース飢餓ストレスの入力に応答して、プロモーターが開き、そのうちの一部が RNAP に結合し mRNA を転写する。このとき、グルコースはリプレッサーとして働く。ただし、グルコースがプロモーターに作用する訳ではなく、実際は序章で述べた通り、シグナル伝達系の因子がプロモーターに作用して活性化するが、簡略化のために、模式的にはグルコースがプロモーターを開くように表現した。ここでは、グルコース濃度をプロモーターへの入力とする。また、グルコース濃度からプロモーターへの効果の入力関数は、ヒルの式の形とした。ここで、要素 x の濃度を $[x]$ と表記することになると、不活性化状態プロモーター、活性化状態プロモーター、ポリメラーゼ、及び、その複合体、RNA の濃度は次の常微分方程式で表せる。

$$[P^i] = \frac{1}{\tau_p} \left\{ -\frac{K_{glu}^n}{glu^n + K_{glu}^n} [P^i] + k_p^i ([P^a] + [P^a RNAP]) \right\}$$

$$[P^a] = \frac{1}{\tau_p} \left\{ \frac{K_{glu}^n}{glu^n + K_{glu}^n} [P^i] - k_p^i [P^a] \right\} + \frac{1}{\tau_c} \{ -[P^a][RNAP] + k_p^d [P^a RNAP] \}$$

$$[P^a RNAP] = -\frac{1}{\tau_p} k_p^i [P^a RNAP] + \frac{1}{\tau_c} \{ [P^a][RNAP] - k_p^d [P^a RNAP] \}$$

$$[mRNA] = \frac{1}{\tau_s} \{ k_m^s [P^a RNAP] - k_m^d [mRNA] \}$$

$$[RNAP] = \frac{1}{\tau_p} k_p^i [P^a RNAP] - \frac{1}{\tau_c} \{ [P^a][RNAP] - k_p^d [P^a RNAP] \}$$

ここでは、グルコースによるプロモーターの不活性化の係数を K_{glu} 、活性化プロモーターの不活性化レートを k_p^i 、プロモーター-RNAP の乖離定数を k_p^d とする。また、プロモーターの活性化、複合体形成、RNA 合成の時定数を τ_p 、 τ_c 、 τ_s とする。そして、mRNA の合成、分解のレートを k_m^s 、 k_m^d とした。

このような発現系であれば、図 30B のように入力直後に RNA が発現することになる。mLonRNA 非依存的な素早い転写活性化を見せる遺伝子ならば、このモデルで表現可能であると考えられる。

しかし、*fbp1+* 領域では、まず、mLonRNA が転写され、上流プロモーター領域が開いた状態になってから、下流の mRNA の転写の活性化がおこる。そこで、mRNA の活性化反応を、mLonRNA のプロモーターの活性化と mRNA のプロモーターの活性化の二段階で表現することとした (図 31A)。

すなわち、このモデルでは、グルコースの存在下では上流のプロモーター領域 (P1) は抑制されているが、グルコース飢餓ストレスの入力をうけると、まず、P1 が活性化され、活性化状態の P1 に RNAP が結合し、mLonRNA が転写される。さらに mLonRNA の転写が、下流のプロモーター領域 (P2) を活性化すると、活性化状態の P2 に RNAP が結合し、mRNA の転写を活性化する。このとき、P2 プロモーターには、一度開くと開き続ける正のフィードバックを設定し、下流のプロモーターが開くと RNAP が P1 ではなく P2 に優先的に結合しやすくなり、結果、mRNA の誘導がかかる (図 31B)。これを式であらわすと、

$$\begin{aligned}
[\dot{P}_1^i] &= \frac{1}{\tau_{P1}} \left\{ -\frac{K_{glu}^n}{glu^n + K_{glu}^n} [P_1^i] + k_{P1}^i [P_1^a]_T \right\} \\
[\dot{P}_1^a] &= \frac{1}{\tau_{P1}} \left\{ \frac{K_{glu}^n}{glu^n + K_{glu}^n} [P_1^i] - k_{P1}^i [P_1^a] \right\} + \frac{1}{\tau_c} \{ -[P_1^a][RNAP] + k_{P1}^d [P_1^a RNAP] \} \\
[\dot{P}_1^a RNAP] &= -\frac{1}{\tau_{P1}} k_{P1}^i [P_1^a RNAP] + \frac{1}{\tau_c} \{ [P_1^a][RNAP] - k_{P1}^d [P_1^a RNAP] \} \\
[\dot{ncRNA}] &= \frac{1}{\tau_s} \{ k_{nc}^s [P_1^a RNAP] - k_{nc}^d [ncRNA] \} \\
[\dot{P}_2^i] &= \frac{1}{\tau_{P2}} \left\{ -\left(\frac{[ncRNA]^m}{[ncRNA]^m + K_{nc}^m} + \frac{[P_2^a]_T^l}{[P_2^a]_T^l + K_{fb}^l} \right) [P_2^i] + k_{P2}^i [P_2^a]_T \right\} \\
[\dot{P}_2^a] &= \frac{1}{\tau_{P2}} \left\{ \left(\frac{[ncRNA]^m}{[ncRNA]^m + K_{nc}^m} + \frac{[P_2^a]_T^l}{[P_2^a]_T^l + K_{fb}^l} \right) [P_2^i] - k_{P2}^i [P_2^a] \right\} \\
&\quad + \frac{1}{\tau_c} \{ -[P_2^a][RNAP] + k_{P2}^d [P_2^a RNAP] \} \\
[\dot{P}_2^a RNAP] &= -\frac{1}{\tau_{P2}} k_{P2}^i [P_2^a RNAP] + \frac{1}{\tau_c} \{ [P_2^a][RNAP] - k_{P2}^d [P_2^a RNAP] \} \\
[\dot{mRNA}] &= \frac{1}{\tau_s} \{ k_m^s [P_2^a RNAP] - k_m^d [mRNA] \} \\
[\dot{RNAP}] &= \frac{1}{\tau_c} \{ -[P_1^a][RNAP] + k_{P1}^d [P_1^a RNAP] - [P_2^a][RNAP] + k_{P2}^d [P_2^a RNAP] \} + \frac{1}{\tau_{P1}} k_{P1}^i [P_1^a RNAP] \\
&\quad + \frac{1}{\tau_{P2}} k_{P2}^i [P_2^a RNAP]
\end{aligned}$$

ここで、 $[P_1^a]_T = [P_1^a] + [P_1^a RNAP]$ 、 $[P_2^a]_T = [P_2^a] + [P_2^a RNAP]$ である。また、mIonRNAの濃度を $[ncRNA]$ とし、ncRNAをP2プロモーターを活性化状態にするためのアクチベーターとし、 K_{nc} はその活性化係数である。さらに、P2プロモーターに対する正のフィードバック効果については、 K_{fb} を活性化係数とした。

この設定条件でシミュレーションを行うと図31Cのようになる。

3.2 mIonRNAによるmRNAの転写活性化3変数モデル

上記のモデルにおいては、9つの変数を使用したが、さらに単純化する。

RNAP、P1プロモーター、P2プロモーター、活性型P1の総量は保存するので、

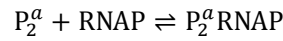
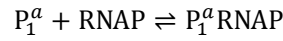
$$[P_1^a \text{RNAP}] + [P_2^a \text{RNAP}] + [\text{RNAP}] = [\text{RNAP}]_T$$

$$[P_1^i] + [P_1^a] + [P_1^a \text{RNAP}] = [P_1]_T$$

$$[P_2^i] + [P_2^a] + [P_2^a \text{RNAP}] = [P_2]_T$$

$$[P_2^i] + [P_2^a]_T = [P_2]_T$$

が成り立つ。また、活性型 P1、活性型 P2 への RNAP の結合乖離速度が非常に早いと仮定すると ($\tau_c \ll \tau_{P1}, \tau_{P2}, \tau_s$)、次の 2 状態を定常状態として近似的に扱うことが可能である。

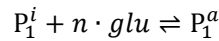


これらが平衡のとき

$$\frac{1}{\tau_c} \{-[\text{RNAP}][P_1^a] + k_{P1}^d [P_1^a \text{RNAP}]\} = 0$$

$$\frac{1}{\tau_c} \{-[\text{RNAP}][P_2^a] + k_{P2}^d [P_2^a \text{RNAP}]\} = 0$$

が成り立つ。さらに、P1 プロモーターの活性型／不活性型の二状態の遷移速度も非常に早いとして ($\tau_{P1} \ll \tau_{P2}, \tau_s$)、以下の反応を平衡として扱う。



このとき、

$$\frac{1}{\tau_{P1}} \left\{ -\frac{K_{glu}^n}{glu^n + K_{glu}^n} [P_1^i] + k_{P1}^i [P_1^a]_T \right\} = 0$$

が成り立つ。

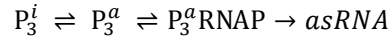
これらの条件から、3.1 の式から変数を減らすと、3 変数のシンプルなモデルになる (図 32A)。

$$\begin{aligned}
[ncRNA] &= \frac{1}{\tau_s} \left\{ k_{nc}^s \frac{[RNAP]}{[RNAP] + k_{p1}^d k_{p1}^i glu^n + (1 + k_{p1}^i) K_{glu}^n} [P_1]_T - k_{nc}^d [ncRNA] \right\} \\
[P_2^a] &= \frac{1}{\tau_{p2}} \left\{ \left(\frac{[ncRNA]^m}{[ncRNA]^m + K_{nc}^m} + \frac{[P_2^a]_T^l}{[P_2^a]_T^l + K_{fb}^l} \right) ([P_2]_T - [P_2^a]_T) - k_{p2}^i [P_2^a]_T \right\} \\
[mRNA] &= \frac{1}{\tau_s} \left\{ k_m^s \frac{[RNAP]}{[RNAP] + k_{p2}^d} [P_2^a]_T - k_m^d [mRNA] \right\} \\
[RNAP]_T &= \frac{[RNAP]}{[RNAP] + k_{p1}^d k_{p1}^i glu^n + (1 + k_{p1}^i) K_{glu}^n} [P_1]_T + \frac{[RNAP]}{[RNAP] + k_{p2}^d} [P_2^a]_T + [RNAP]
\end{aligned}$$

このモデルを用いてシミュレーションすると図 32B に示した結果が得られた。この手法を使えば、本質を損なわずにモデルを簡略化することが可能である。

3.3 *fbp1*⁺ *mIcnRNA* / *mRNA* / *asRNA* が相互作用する転写活性化モデル

続いて、グルコースが豊富な条件下で転写されていたアンチセンス RNA についても考慮する。3.1 節の 9 変数モデルに以下の *asRNA* を発現するプロモーター (P3) の情報を追加した。



として、また、先行研究より、Dicer はグルコース飢餓条件後 30 分時点の *mIcnRNA* の安定性に関与していることが明らかにされている (ガリポン未発表データ)。そこで、アンチセンス RNA とセンス鎖 RNA が相互作用して分解される項を加えた。

センス鎖 RNA の転写活性化と同様、プロモーターが開いて活性型になったときに RNAP が結合して、アンチセンス RNA が転写される。ただし、アンチセンス RNA はグルコース存在下で転写されるので、プロモーターを開くためのアクチベーターとして扱い、グルコース濃度の入力関数はヒルの式の形を取った (図 33A)。

これらの条件を加え、*mIcnRNA*、*mRNA* 及び *fbp1-as* の発現は下記のように制御されると表現できる。

$$[P_3^i] = \frac{1}{\tau_{p3}} \left\{ \frac{glu_{gl3}^j}{glu^j + K_{gl3}^n} [P_3^i] + k_{p3}^i [P_3^a]_T \right\}$$

$$\begin{aligned}
[P_3^i] &= \frac{1}{\tau_{P_3}} \left\{ \frac{glu^j_{gl3}}{glu^j + K_{gl3}^n} [P_3^i] - k_{P_3}^i [P_3^a] \right\} + \frac{1}{\tau_c} \{ -[P_3^a][RNAP] + k_{P_3}^d [P_3^a RNAP] \} \\
[P_3^a RNAP] &= -\frac{1}{\tau_{P_3}} k_{P_3}^i [P_3^a RNAP] + \frac{1}{\tau_c} \{ [P_3^a][RNAP] - k_{P_3}^d [P_3^a RNAP] \} \\
[asRNA] &= \frac{1}{\tau_s} \{ k_{as}^s [P_3^a RNAP] - k_{as}^d [asRNA] \} - k_c^b \{ [mRNA][asRNA] + [ncRNA][asRNA] \} \\
[P_1^i] &= \frac{1}{\tau_{P_1}} \left\{ -\frac{K_{glu}^n}{glu^n + K_{glu}^n} [P_1^i] + k_{P_1}^i [P_1^a]_T \right\} \\
[P_1^a] &= \frac{1}{\tau_{P_1}} \left\{ \frac{K_{glu}^n}{glu^n + K_{glu}^n} [P_1^i] - k_{P_1}^i [P_1^a] \right\} + \frac{1}{\tau_c} \{ -[P_1^a][RNAP] + k_{P_1}^d [P_1^a RNAP] \} \\
[P_1^a RNAP] &= -\frac{1}{\tau_{P_1}} k_{P_1}^i [P_1^a RNAP] + \frac{1}{\tau_c} \{ [P_1^a][RNAP] - k_{P_1}^d [P_1^a RNAP] \} \\
[ncRNA] &= \frac{1}{\tau_s} \{ k_{nc}^s [P_1^a RNAP] - k_{nc}^d [ncRNA] \} - k_c^b [ncRNA][asRNA] \\
[P_2^i] &= \frac{1}{\tau_{P_2}} \left\{ -\left(\frac{[ncRNA]^m}{[ncRNA]^m + K_{nc}^m} + \frac{[P_2^a]_T^l}{[P_2^a]_T^l + K_{fb}^l} \right) [P_2^i] + k_{P_2}^i [P_2^a]_T \right\} \\
[P_2^a] &= \frac{1}{\tau_{P_2}} \left\{ \left(\frac{[ncRNA]^m}{[ncRNA]^m + K_{nc}^m} + \frac{[P_2^a]_T^l}{[P_2^a]_T^l + K_{fb}^l} \right) [P_2^i] - k_{P_2}^i [P_2^a] \right\} \\
&\quad + \frac{1}{\tau_c} \{ -[P_2^a][RNAP] + k_{P_2}^d [P_2^a RNAP] \} \\
[P_2^a RNAP] &= -\frac{1}{\tau_{P_2}} k_{P_2}^i [P_2^a RNAP] + \frac{1}{\tau_c} \{ [P_2^a][RNAP] - k_{P_2}^d [P_2^a RNAP] \} \\
[mRNA] &= \frac{1}{\tau_s} \{ k_m^s [P_2^a RNAP] - k_m^d [mRNA] \} - k_c^b [mRNA][asRNA] \\
[RNAP] &= \frac{1}{\tau_c} \{ -[P_1^a][RNAP] + k_{P_1}^d [P_1^a RNAP] - [P_2^a][RNAP] + k_{P_2}^d [P_2^a RNAP] - [P_3^a][RNAP] \\
&\quad + k_{P_3}^d [P_3^a RNAP] \} + \frac{1}{\tau_{P_1}} k_{P_1}^i [P_1^a RNAP] + \frac{1}{\tau_{P_2}} k_{P_2}^i [P_2^a RNAP] + \frac{1}{\tau_{P_3}} k_{P_3}^i [P_3^a RNAP]
\end{aligned}$$

この条件でシミュレーションを行うと、図 33B に示した結果が得られた。ここでは、mRNA と mlonRNA が等しく asRNA 依存的に分解される設定としたが、Dicer はグルコース飢餓条件後 30 分時点での mRNA 安定性への寄与はさほど大きくないので（ガリポン未発表データ；表 3）、転写活性化時における mRNA と asRNA の相互作用の効果については検討す

る余地がある。

3.4 *fbp1*⁺ mRNA / asRNA の相互作用を考慮した転写抑制モデルの構築

グルコース再添加時には mRNA の素早い抑制と asRNA の転写活性化が観察された。続いて、グルコース再添加時の *fbp1*⁺ mRNA の転写抑制のシステムをモデル化する。ここでは、mRNA-asRNA の複合体による Dicer 依存的な分解の速度を中心に考察する (図 34A)。

mRNA の濃度を $[mRNA]$ 、asRNA の濃度を $[asRNA]$ 、mRNA と asRNA の複合体の濃度を $[C]$ として、それぞれの時間変化を考える。mRNA、asRNA 合成のレートをそれぞれ、 k_s^s 、 k_a^s とし、mRNA、asRNA の分解のレートを k_s^d 、 k_a^d とする。また、mRNA と asRNA は、 k_c^b のレートで複合体を形成して、 $k_c^b \cdot \exp(-\beta E_b)$ のレートで乖離する (図 34B)。ただし、 β は逆温度であるが、実験は定温で行っているので定数とし、 E_b は結合エネルギーである。この設定から、mRNA と asRNA の濃度変化を微分方程式であらわすと、次のようになる。

$$\begin{aligned} \dot{[mRNA]} &= k_s^s - k_s^d [mRNA] - k_c^b ([mRNA][asRNA] - \exp(-\beta E_b)[C]) \\ \dot{[asRNA]} &= k_a^s - k_a^d [asRNA] - k_c^b ([mRNA][asRNA] - \exp(-\beta E_b)[C]) \\ \dot{[C]} &= k_c^b ([mRNA][asRNA] - \exp(-\beta E_b)[C]) - k_c^d [C] \end{aligned}$$

ただし、mRNA と asRNA の複合体としての分解は、それぞれ単独での分解よりも速度が早くなるようにパラメーターを設定 ($k_c^d > k_s^d$ 、 k_a^d) した。この設定により、一本差 RNA をゆっくり合成・分解し、二本鎖 RNA を形成した場合には素早く分解されるという効果を表現できる。また、初期状態はグルコース飢餓中で mRNA が転写された状態とし、グルコース再添加などの環境変化を受けた場合を想定して、それぞれの合成、分解レートのパラメーターを変化させて、その応答をシミュレーションした。グルコースの再添加を受けると、mRNA のプロモーターの転写因子が乖離することが実験的に確かめられている (図 27)。そこで、グルコースの再添加のパラメーターとして、mRNA の合成速度を落とし、asRNA の合成速度を上げた。その結果、mRNA 濃度の急激な減少と、それに続く asRNA の蓄積が観察できた (図 34C)。

3.5 転写抑制シミュレーション ; RNA 合成阻害剤の添加

続いて、合成阻害剤であるフェナントロリンの添加を想定したシミュレーションを行った。ここでは、前述の設定のもと、RNAP 阻害剤であるフェナントロリンの効果として、添加

と同時に mRNA 及び asRNA の合成レートを 0 に変える。図 25A の実験においてフェナントロリンをグルコース再添加と同時に加えた。また、図 25C では、グルコース再添加後 30 分後にフェナントロリンを加える実験を行った。この実験の再現として、それぞれ、グルコース再添加後 0 分、30 分で、mRNA 及び asRNA の合成速度を 0 とした。結果、図 34D、E の結果が得られた。この結果から、フェナントロリン添加をした場合、フェナントロリンを添加しなかった場合に比べて、mRNA 分解が遅延することが確かめられた。このモデルにおいて、mRNA の素早い分解に対して、mRNA と asRNA の複合体への寄与が明確に現れた。

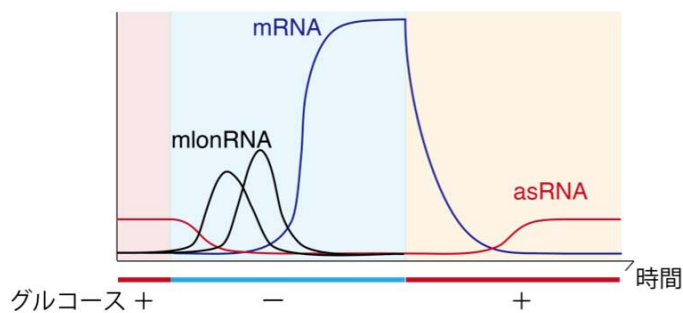
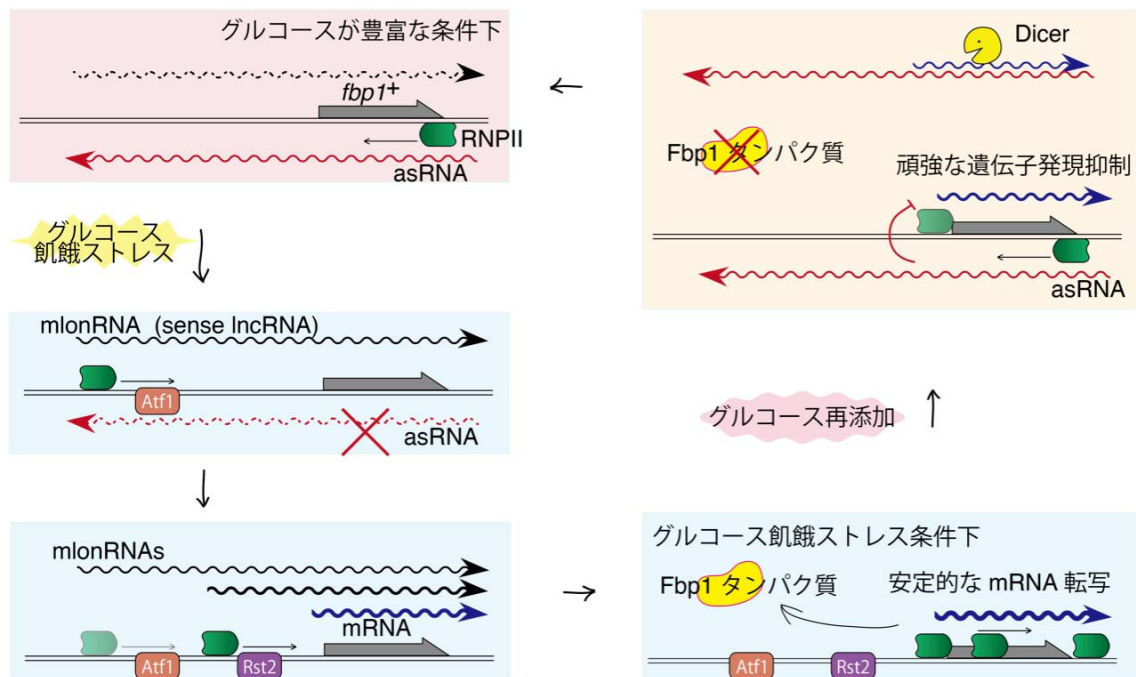


図 29 モデル; センス・アンチセンス lncRNA 依存的な $fbp1^+$ mRNA 発現制御

グルコースが豊富な条件下では主に asRNA が転写される。飢餓ストレスを受けると、上流プロモーター領域のクロマチン構造がゆるみ、mlonRNA が転写され下流の mRNA の安定的な転写活性化を引き起こす。飢餓時にグルコースを再添加すると、RNA の分解と転写抑制が起こり mRNA の発現が素早く押さえられる。

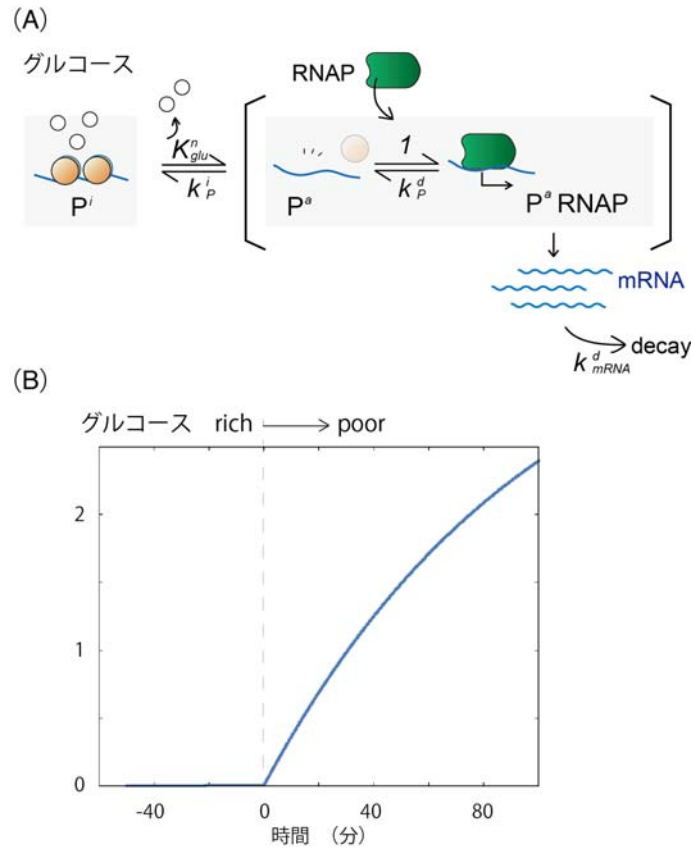


図 30 プロモーター依存的な RNA 発現モデルの構築

(A) 概念図。仮想的な RNA 発現系。プロモーターの活性化が起こると、RNA が発現する系を想定している。

(B) 仮に lncRNA 非依存的に mRNA の転写が活性化すると想定したときの、グルコース飢餓ストレスへの mRNA 発現応答。y 軸は mRNA 濃度。0 分でグルコース飢餓ストレスを与える設定として、 $\text{time} < 0$ で $\text{glu} = 1.0$ 、 $\text{time} \geq 0$ で $\text{glu} = 0.0$ とした。パラメーターは $\tau_{P1} = 1/10$ 、 $K_{glu} = 0.5$ 、 $k_{P1}^i = 0.5$ 、 $\tau_c = 1/30$ 、 $k_p^d = 7.5$ 、 $\tau_s = 1.0$ 、 $k_m^s = 1.0$ 、 $k_m^d = 0.1$ に設定した。

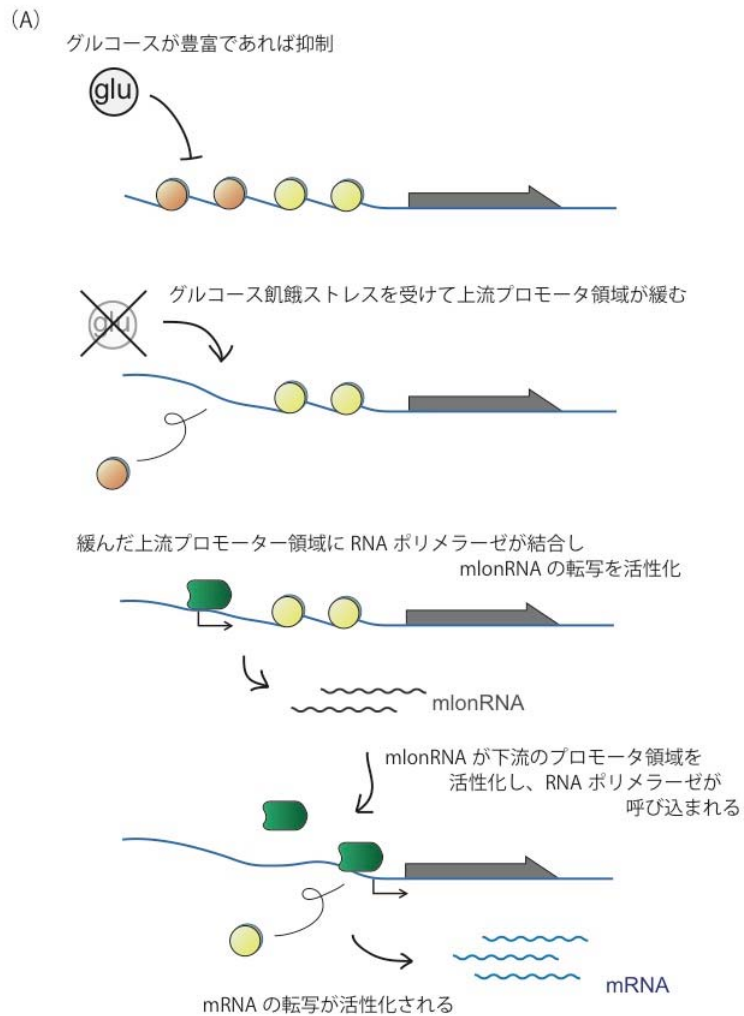
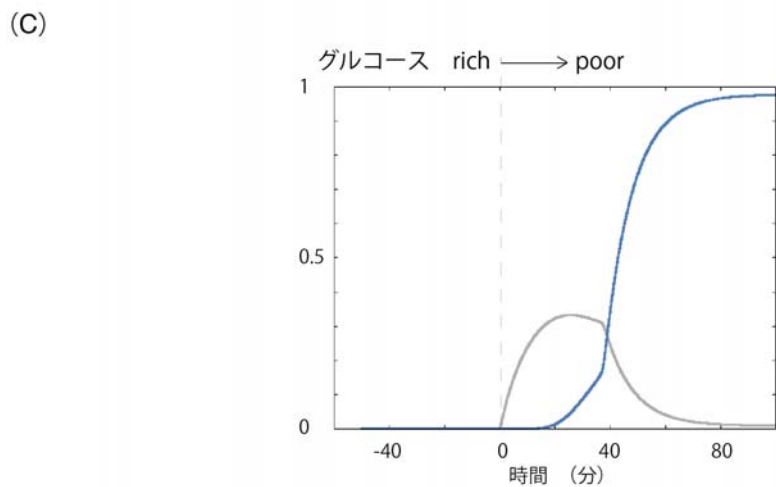
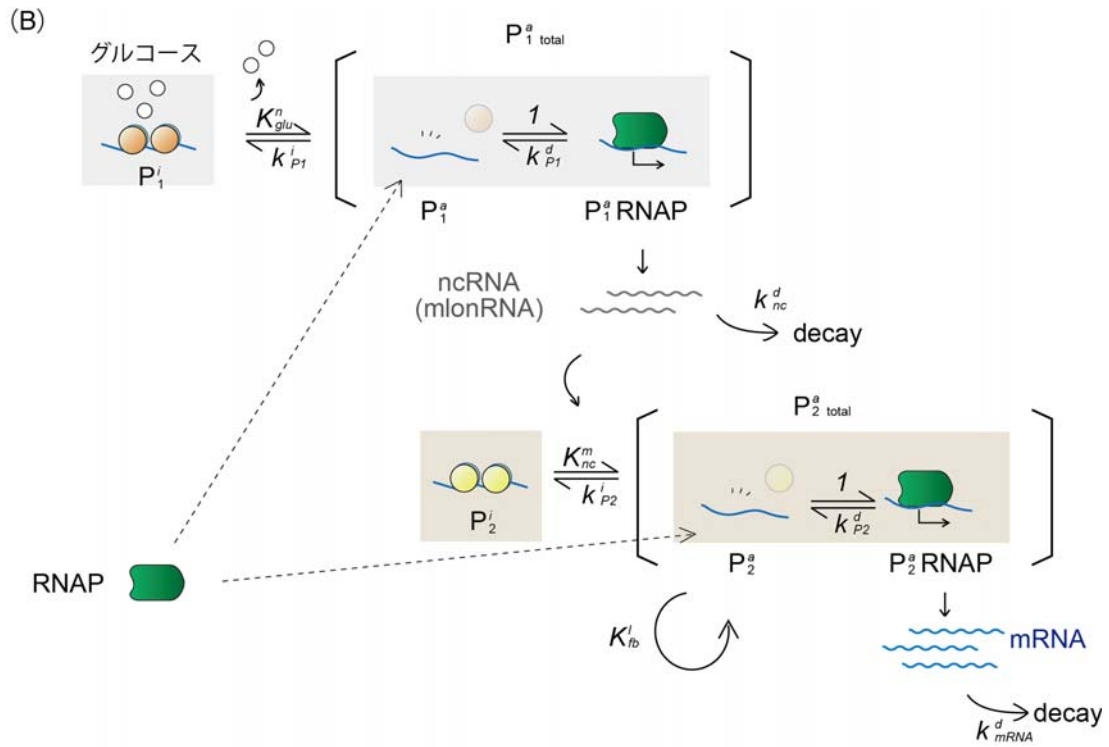


図 31 *fbp1⁺* mlonRNA/mRNA 転写活性化制御モデル

(A) sense 転写産物のモデル化のために発現制御システムを概念化した。グルコースが存在する条件下ではプロモーターは閉じている。グルコース飢餓ストレスの入力に応答して、プロモーターが開き、そのうちの一部が RNAP に結合し mRNA を転写する。

(次項へ続く)



(B) 9 変数シミュレーションの概念図と各因子の乖離定数。

(C) 9 変数シミュレーション実行結果。灰色、青線はそれぞれ、mIcnRNA、mRNA を示す。y 軸は mRNA 濃度。0 分でグルコース飢餓ストレスを与える設定として、time<0 で glu=1.0、time \geq 0 で glu=0.0 とした。パラメーターは、 $\tau_{P1} = 1/10$ 、 $K_{glu} = 0.5$ 、 $n = 10.0$ 、 $k_{P1}^i = 0.5$ 、 $\tau_c = 1/30$ 、 $k_{P1}^d = 7.5$ 、 $\tau_s = 1.0$ 、 $k_{nc}^s = 1.0$ 、 $k_{nc}^d = 0.1$ 、 $\tau_{P2} = 2.0$ 、 $K_{nc} = 0.5$ 、 $m = 10.0$ 、 $K_{lb} = 0.2$ 、 $l = 10$ 、 $k_{P2}^i = 0.01$ 、 $k_{P2}^d = 0.01$ 、 $k_{se}^s = 0.2$ 、 $k_{se}^d = 0.1$ 。

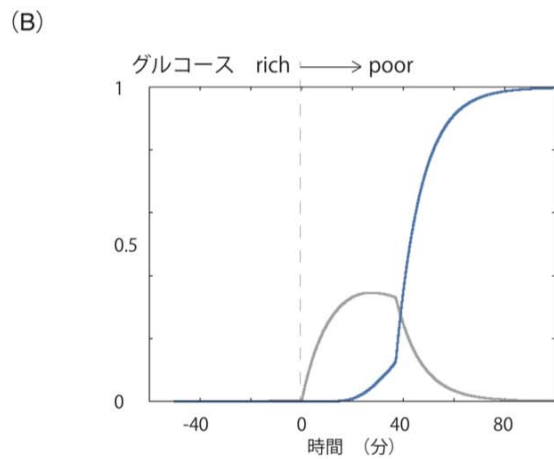
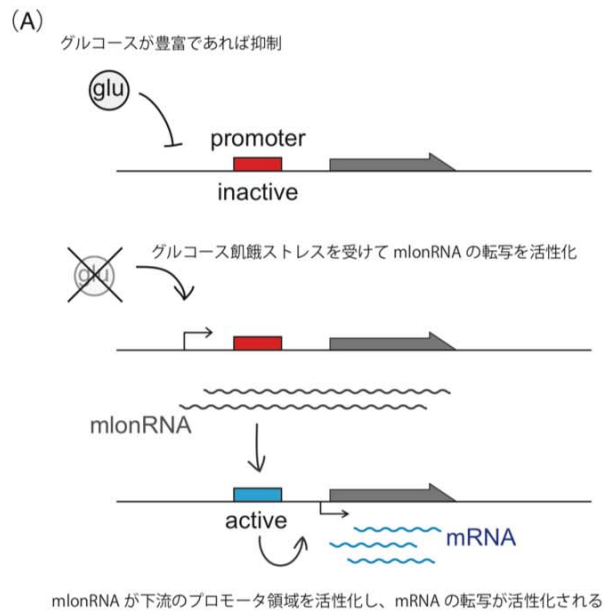


図 32 mlonRNA 依存的 mRNA 発現活性化の 3 変数モデル

(A) mlonRNA による mRNA 活性化の概念図。mlonRNA により mRNA が誘導される。

(B) 灰色、青線はそれぞれ、mlonRNA、mRNA を示す。3 変数シミュレーション実行結果。パラメーターは、 $K_{nc} = 0.65$ 、他のパラメーターは図 31 (C) と共通。y 軸は mRNA 濃度。0 分でグルコース飢餓ストレスを与える設定として、 $time < 0$ で $glu = 1.0$ 、 $time \geq 0$ で $glu = 0.0$ とした。

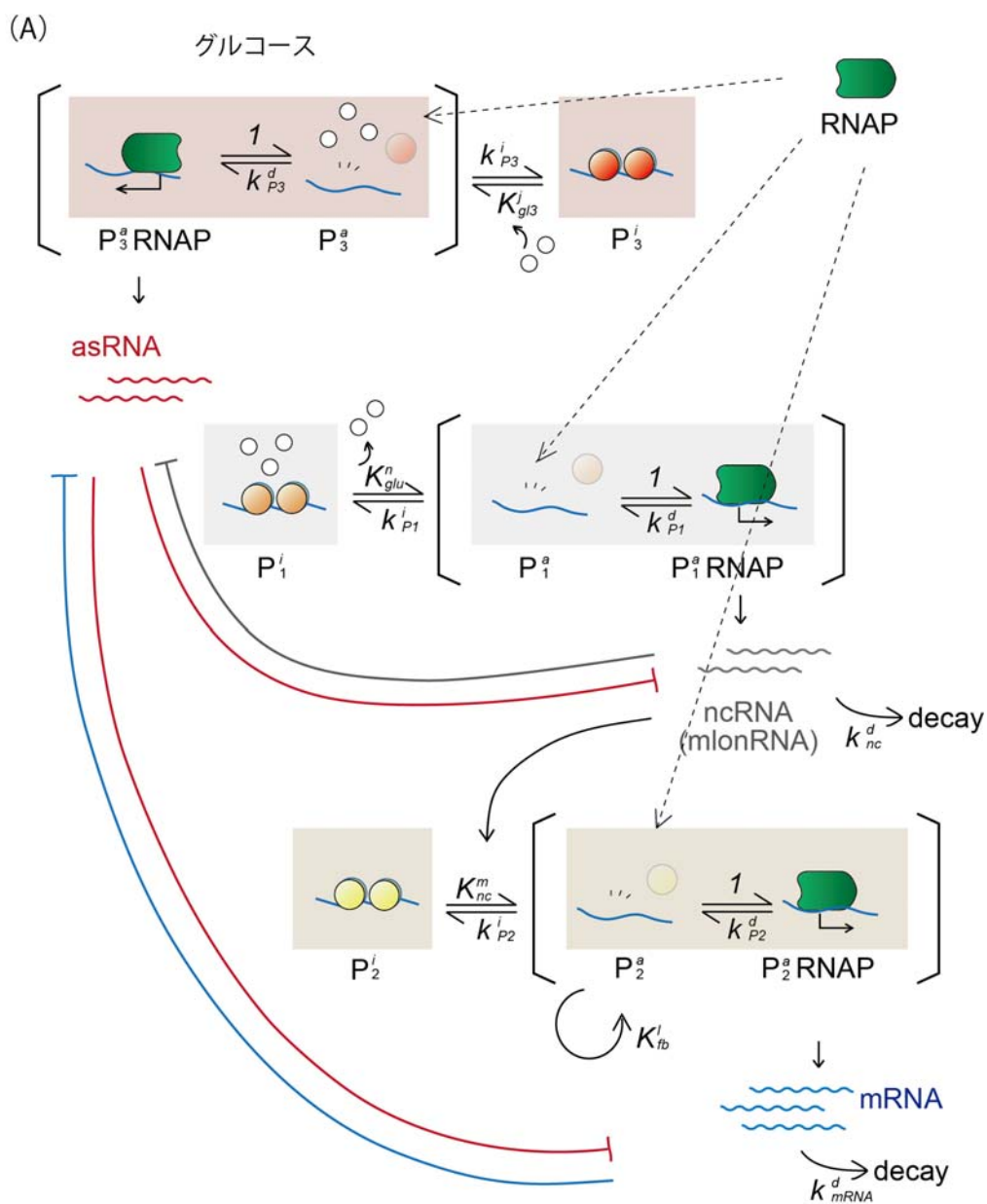
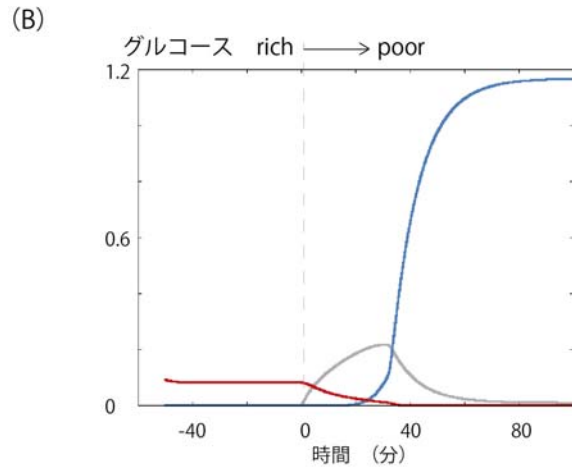


図 33 mlonRNA / mRNA / asRNA の相互作用する転写活性化モデル

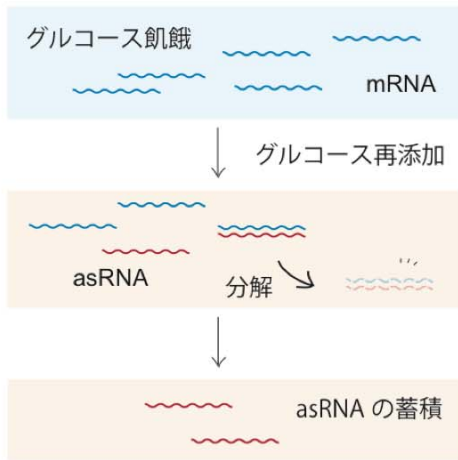
(A) mlonRNA、mRNA、asRNA 及びそれぞれのプロモーター、RNAP の 13 変数モデル。

(次項へ続く)

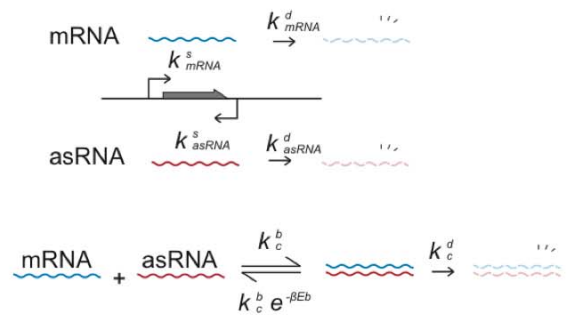


(B) 灰色、青、赤線はそれぞれ、mlonRNA、mRNA、asRNAを示す。パラメーター $k_{p_1}^i = 1.0$ 、 $\tau_{p_3} = 1/5$ 、 $K_{glu3} = 0.3$ 、 $j = 1.0$ 、 $k_{p_3}^i = 0.01$ 、 $k_{p_3}^d = 0.5$ 、 $k_{as}^s = 0.1$ 、 $k_{as}^d = 0.3$ 、 $k_c^d = 1.0$ 、それ以外のパラメーターは図 31(C)と同じ。y 軸は mRNA 濃度。0 分でグルコース飢餓ストレスを与える設定として、 $time < 0$ で $glu = 1.0$ 、 $time \geq 0$ で $glu = 0.0$ とした。

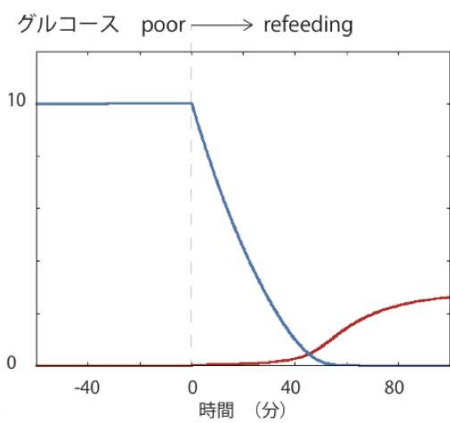
(A)



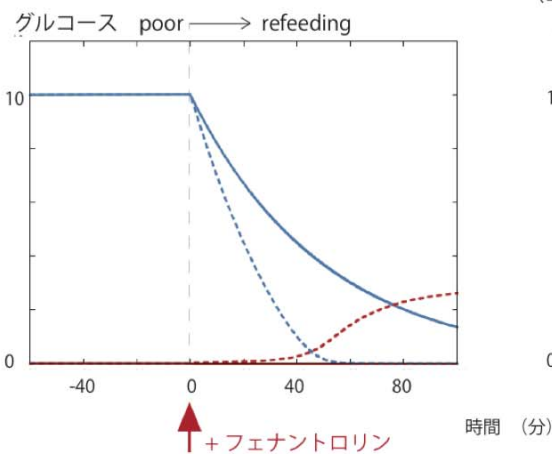
(B)



(C)



(D)



(E)

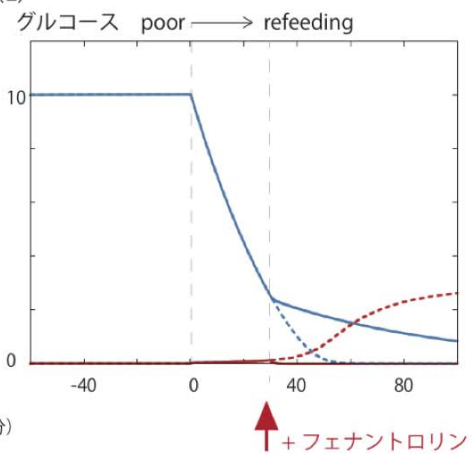


図 34 mRNA 発現抑制モデル

(A) asRNA 依存的な RNA 分解の概念図。

(B) 各 RNA とその乖離定数の模式図。

(次項へ続く)

(C) グルコース再添加時の mRNA 抑制シミュレーション。y 軸は mRNA 濃度。青、赤線はそれぞれ mRNA、asRNA をあらわす。パラメーターは、 $\beta=1.0$ 、 $E_b=1.0$ 、 $k_c^d = 1.0$ 、 $k_c^b = 1.0$ 、 $k_s^d = 0.02$ 、 $k_a^d = 0.05$ とした。また、グルコース飢餓条件下 ($\text{time} < 0$) では $k_s^s = 0.25$ 、 $k_a^s = 0.05$ で、グルコースを再添加後 ($\text{time} \geq 0$) は、 $k_s^s = 0.01$ 、 $k_a^s = 0.15$ へと変化させた。

(D) C の設定で、グルコースと同時にフェナントロリンを加えた。パラメーターは、グルコース飢餓条件下では同じであるが、0 分でグルコース再添加をした時の RNA 合成レートは、 $k_s^s = 0.0$ 、 $k_a^s = 0.0$ とした。青、赤の実線が、それぞれ、mRNA、asRNA で、比較のため、青、赤の破線で C の条件の mRNA、asRNA を表示した。

(E) C の設定で、グルコースと同時にフェナントロリンを加えた。グルコース飢餓条件下と、グルコース再添加後 30 分間のパラメーターは同じであるが、グルコース再添加後 30 分での RNA 合成レートは、 $k_s^s = 0.0$ 、 $k_a^s = 0.0$ とした。青、赤の実線が、それぞれ、mRNA、asRNA で、比較のため、青、赤の破線で C の条件の mRNA、asRNA を表示した。

材料と方法

分裂酵母細胞の培養

本実験に使用した分裂酵母の株は下の表 4 に、基本の培養、グルコース飢餓ストレス、浸透圧ストレス、酸化ストレス、減数分裂、窒素源飢餓ストレスの誘導に用いた培地は表 5 に挙げた。

Strain name	Genotype
K131	<i>h⁻ ade6-M26 leu1-32</i>
K176	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 leu1-32</i>
AR6	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 leu1-32 fbp1-3'Δ</i> (emb CU329671.1 chromosome II, 197659-198083 の欠損)
AR1	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 leu1-32 fbp1_3'::ura4⁺</i> (emb CU329671.1 chromosome II,197513-198331::ura4)
AR19	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 leu1-32 fbp1Δ</i> (emb CU329671.1 chromosome II,197561-200480 の欠損)
JK556	<i>h⁻ ade6-M26 leu1-32 fbp1-3HA<<KanMX6</i>
JY450	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1-32</i>
JG4	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1-32 dcr1::hphMX6</i> Galipon <i>et al.</i> 2013
JG3	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1-32 upf1::KAN</i>
JG10	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1-32 rrp6::HPH</i>
JG25	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1-32 exo2::HPH</i>
JG22	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1-32 fbp1-UAS2Δ</i> (emb CU329671.1 chromosome II, 200247-200345 の欠損)
JG23	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1-32 fbp1-UAS1Δ</i> (emb CU329671.1 chromosome II, 199619-199691 の欠損)
PKH64	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 his3-D1 atf1::ura4⁺</i>
PKH108	<i>h⁻ ade6-M26 leu1-32 rst2::KAN</i>
TY16	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 leu1-32 Δatf1-D15::ura4</i>
TY452	<i>h⁺ ade6-M216 ura4-D18 his5-303 leu1-32</i>
TY384	<i>h⁻ ade6-M210 ura4-D18 his5-303 leu1-32</i>

表 4 使用した酵母株の系統

グルコース濃度変動ストレスを与える分裂酵母細胞は 30°C の培地 YES で一晩前培養した後、栄養培地である YER で 16~22 時間培養し細胞濃度を $1.5\text{-}2.2 \times 10^7$ cells/mL とした。その細胞にグルコース飢餓ストレスを与えるために YED に移して培養した。グルコースの再添加を行う場合は、YED で 2 時間培養した後に、再び YER に戻した。

浸透圧ストレス、酸化ストレス、ヒートショック、窒素源飢餓ストレスの誘導には K131 株を用いた。また、減数分裂誘導には TY452 と TY384 を掛け合わせた二倍体株を用いた。浸透圧ストレスの誘導は、前述の様に YES で前培養した分裂酵母細胞を、ソルビトール（終濃度 1M）を含む YES に移して培養した。また、酸化ストレスの誘導には、前述の様に YES で前培養した分裂酵母細胞を H₂O₂（終濃度 0.5mM）を含む YES に移して培養した。ヒートショックは 30°C の YES で前培養した分裂酵母細胞を 39°C の YES に移して培養した。窒素源飢餓ストレスを与える細胞は前述のように YES で一晩前培養した後、MM-N に移して培養した。

減数分裂を誘導するために、TY452 と TY384 を掛け合わせて二倍体株を得た。掛け合わせは SPA プレート*上で接合させ、25°C で約 16 時間おいて孢子形成誘導した。得られた二媒体を SD-ade プレートに移しシングルコロニー化し、30°C の SD-ade 液体培地で前培養した。さらに、MM-N-ade 培地に移し、減数分裂を誘導した。細胞はペレットにし時間点ごとに液体窒素で凍結した。

*SD-ade プレートにはアガロースを終濃度 2%、SPA プレートには終濃度 3% となるように加えた。

	YES	YER	YED
Bacto yeast extract	5%	5%	5%
グルコース	3%	6%	0.1%
グリセロール	-	-	3%
アデニン	200mg/ml	200mg/ml	200mg/ml
ロイシン	200mg/ml	200mg/ml	200mg/ml
ウラシル	100mg/ml	100mg/ml	100mg/ml
ヒスチジン	200mg/ml	200mg/ml	200mg/ml

	SD-ade	mm+N-ade	mm·N-ade	mm·N	SPA
グルコース	2%	2%	2%	2%	1%
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	0.1%
DYB w/o a.a.	0.67%	-	-	-	-
NH ₄ Cl	-	93.5mM	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	-	15.5mM	15.5mM	15.5mM	-
フタル酸水素カリウム	-	14.7mM	14.7mM	14.7mM	-
50x Salt stock *1	-	20ml/L	20ml/L	20ml/L	-
1000x vitamins *2	-	1ml/L	1ml/L	1ml/L	1ml/L
10000x minerals *3	-	100μl/L	100μl/L	100μl/L	100μl/L
1000x trace elements *4	-	1ml/L	1ml/L	1ml/L	-
アデニン	-	-	-	200mg/L	100mg/L
ロイシン	200mg/L	200mg/L	200mg/L	200mg/L	100mg/L
ウラシル	100mg/L	100mg/L	100mg/L	100mg/L	100mg/L
ヒスチジン	200mg/L	200mg/L	200mg/L	200mg/L	100mg/L

*1 50x Salt stock (2.62M MgCl₂, 34.3mM CaCl₂, 6.7M KCl, 141mM Na₂SO₄)

*2 1000x vitamins (1g/L calcium D-pantothenate, 1g/L nicotinic acid, 10g/L myo-inositol)

*3 10000x minerals (10mg/L D-biotin, 1g/L citric acid)

*4 1000x trace elements (1g/L H₃BO₃, 1.06g/L MnSO₄ · 4H₂O, 0.8g/L ZnSO₄ · 7H₂O, 0.4g/L FeCl₃ · 6H₂O, 2g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · H₂O, 0.2g/L KI, 80mg/L CuSO₄ · 5H₂O)

表 5 基本培地の組成

RNA 精製

凍結した細胞ペレットは 65°C に予熱したビーズバッファー (75mM NH₄OAc; 10mM EDTA, pH8.0) に再懸濁し 0.8 倍量の acid-washed glass beads (Sigma) に SDS (終濃度 1%)、1.2 倍量の acid phenol chloroform (Ambion) を加えた。1 分おきに 65°C での静置をはさみつつ、1 分間ずつボルテックスで懸濁することを 3 度繰り返し、さらに 10 分間 65°C で加熱した後、さらに 1 分間の再懸濁を経て、室温で 15 分間、16,000 x g で遠心した。上清に等量の Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v) (Invitrogen) を加え、ボルテックスした後、4°C で 15 分間、16,000 x g で遠心した。さらに、その上清を 7.5M NH₄OAc

(終濃度 0.51M) と 2 倍量の 100%エタノールを加え、4°C で 30 分間、16,000 x g で遠心した沈殿を 70%エタノールでリンス、風乾させ、RNase-free の水に溶かした。RNA は用時まで-80°Cで保存した。

ノザンブロット、RNA の半減期の測定

10-20 μg の RNA をホルムアルデヒドゲル (3% ホルムアルデヒド、1.2-1.5% アガロース) で電気泳動し、Hybond-XL membrane (Amersham)に転写した。

fbp1⁺ ORF のノザンブロットは、RNA 鎖特異的に検出するため、リボプローブを用いて行った。その他のノザンブロットは DNA プローブを用いた。

リボプローブは *fbp1*⁺ ORF 領域の配列を $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP で放射線標識した。プローブは、Riboprobe (Promega) キットを用いて合成した。リボプローブをハイブリバッファー (50% ホルムアミド、100mM Tris-HCl、600mM NaCl、1mM EDTA、1.5% スキムミルク、1% SDS) に加え、65°C でメンブレンを一晩ハイブリダイゼーションした。メンブレンは、室温で 10 分間 0.2xSSC、0.2% SDS で 2 度洗浄した後、65°C で 30 分間 0.1xSSC、0.1% SDS で 2 度洗浄し BAS-2500 (Fuji) で検出、ImageQuant TL toolbox を用いて定量した。

ura4⁺コントロールや *mlon*RNA 探索に用いた DNA プローブは $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP で放射線標識した。ハイブリダイゼーションには Church Buffer (0.5M Na₂PO₄ (pH 7.3), 7% SDS, 1mM EDTA, 1% BSA) を用い、62°C で一晩インキュベートした後、62°C の 40mM NaPO₄, 1%SDS, 1mM EDTA で 15 分間ずつ 4 度洗浄した。

半減期の測定には転写阻害剤であるフェナントロリン (1,10-phenanthroline monohydrate ; Sigma-Aldrich) を終濃度 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で用いた。RNA の存在量を計算した。フェナントロリンを加える前の RNA 量を時間 0 とした時の RNA 残量の割合をプロットした。半減期の計算には、フェナントロリンの効果が現れるまでの時間を考慮して、フェナントロリン添加後、10 分後以降の値を用いて計算した。実験の再現性を確認するためそれぞれ 3 度以上繰り返した。実験群の半減期が対照群の半減期と有為差があるかを確かめるため t 検定を行った。

RNA-seq

RNA-seq のサンプルには、グルコースが豊富な条件下 (時刻 t=0 分) と、グルコース飢餓ストレス条件下 (時刻 t=15, 60, 120 分) の計 4 点について、野生株と *atf1* Δ 株の分裂酵母細胞の RNA を前述の通り回収し、用いた。RNA のライブラリ調整は illumina 社の

「directional mRNA-seq Sample preparation method」 (illumina property Part # 15018460 Rev.A)に従い、cDNA ライブラリは mRNA-Seq Sample Prep Kit (illumina) を用いて行った。illumina GAIIx によりシングルエンドで 76bp のシーケンシングを行った。RNA-seq のデータは DDBJ (accession number: DRA002273)にて入手可能である。RNA-seq データの詳細なクオリティ情報は表 6 にまとめた。

株	時間 (分)	リード長 (bp)	フィルターパス したリード数	マップ 率 (%)	カバレッジ	遺伝子あたりリ ード数の中央値
wt	0	76	3.49x10 ⁷	92.3	211.1	5,210
wt	15	76	3.42 x10 ⁷	90.8	207.1	4,421
wt	60	76	3.41 x10 ⁷	91.3	206.4	5,251
wt	120	76	3.21 x10 ⁷	91.4	193.9	4,875
<i>atf1Δ</i>	0	76	3.30 x10 ⁷	90.7	199.7	4,554
<i>atf1Δ</i>	15	76	3.10 x10 ⁷	84.2	187.2	4,914
<i>atf1Δ</i>	60	76	2.40 x10 ⁷	91.2	145.1	3,734
<i>atf1Δ</i>	120	76	3.18 x10 ⁷	91.5	192.1	4,669

表 6 シーケンシングの基本クオリティ情報

野生株及び *atf1* 欠損株において得られた RNA-seq データのクオリティ情報。

mlonRNA 型 lncRNA 探索解析

RNA-seq により得られたタグを分裂酵母のリファレンスゲノム (PomBase より入手) に対し、ELAND (illumina) でミスマッチを許容せずにマップした。

野生型、0 分~120 分の RNA-seq のデータについて、分裂酵母の遺伝子アノテーション情報 (PomBase、Schizosaccharomyces group database at the Broad Institute) を参照して、マップしたタグを「遺伝子領域」と「非コード領域」にわけた。さらに、遺伝子上流の 2kbp にわたる非コード領域を 50bp ずつ 40 のセグメントに分割し、遺伝子領域と上流非コードセグメントのそれぞれの領域におけるタグ数を定量し、発現強度とした。

各時間点の各遺伝子のセグメント毎に、*fbp1*⁺のそれと比較し、*fbp1*⁺に近い転写パターンを示す遺伝子を抽出したところ、*fbp1*⁺を含め 43 の遺伝子領域が *fbp1*⁺ mlonRNA 様の lncRNA を持つ候補領域として選ばれた。これらの候補から、偽陽性を除くため、上流 2kbp 以内に他の近隣遺伝子アノテーションを含まず、信頼性のある十分な発現量を持つ (≧10 タグ) 遺伝子領域が選ばれた。

クラスタリング解析と Atf1 依存性

野生型の RNA-seq のデータをもとに発現変動を調べるクラスタリングを行った。PomBase から入手したゲノム配列と、遺伝子及び ncRNA のアノテーション情報をもとに、TopHat2/Cufflinks (Kim *et al.* 2013; Roberts *et al.* 2011) を用いて遺伝子または ncRNA ごとの FPKM 値 (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments) を計算した。5,153 の遺伝子領域と 1,818 の ncRNA のうち、FPKM が 10 以下のほとんど発現がみられなかった遺伝子を除外し、グルコース飢餓ストレス 0~120 分のうちいずれかのタイミングで 4 倍以上の発現変動があった遺伝子に着目してクラスタリングを行った。クラスタリングは R (<http://cran.r-project.org/>) のパッケージ「stats」中の関数 `dist` のマンハッタン法で距離を求め、関数 `hclust` を用いて階層的クラスタリングを行った。ヒートマップは、R のパッケージ「gplots」の `heatmap.2` 関数を用いた。

ChIP-qPCR と ChIP-seq

ヒストン密度やクロマチン修飾を調べるために、クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) を行った (Hirota *et al.* 2007; Miyoshi *et al.* 2012)。50ml の培養液中の分裂酵母細胞に、ホルムアミド (終濃度 1%) 加え、室温で 15 分間固定し、グリシン (終濃度 125mM) でクロスリンクを止めた。その細胞ペレットを TBS で 3 回洗浄して、液体窒素で凍結し、用時まで -80°C で保存した。その後、細胞は 400 μ l の Lysis Buffer I (50mM HEPES/KOH, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate) + 1x complete protease inhibitor (Roche) に溶解し、マルチビーズショッカー (安井機械) とジルコニアビーズで細胞破碎を行った。細胞溶解物を Handy Sonic (UR-20P; Tomy Seiko) にかけることにより、染色体を平均 500bp 以下に断片化した。さらに、細胞溶解物を 4°C、20,400xg で 5 分、15 分の 2 度遠心し細胞抽出液を得た。免疫沈降には、Dynabeads Protein A (Life Technologies) 及び、抗 H3 抗体 (ab1791, Abcam) または、抗 H3K9me2 抗体 (ab1220, Abcam)、抗 Flag 抗体 (Wako) を使用した。細胞抽出液をビーズに固定した抗体とともに 4°C で 3 時間インキュベートし、Lysis Buffer I で 2 度、Lysis 500 Buffer (0.1% Na-deoxycholate, 1mM EDTA, 50mM HEPES/KOH, 500mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100) で 1 度、Wash Buffer (0.5% Na-deoxycholate, 1mM EDTA, 250mM LiCl, 0.5% (v/v) NP-40, 10mM Tris) で 2 度、最後に TE で 1 度洗浄した。免疫沈降タンパク質は 50 μ l elution buffer (20mM Tris, 100mM NaCl, 20mM EDTA, 0.1%(v/v) SDS) で、65°C で 15 分間、2 度にわたり溶出し、75°C で一晩置き脱架橋処理を行った。その後、DNA サンプルに 1 μ l の proteinase K (20mg/ml, Invitrogen) を加え 55°C

で3時間置いた後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics) の標準プロトコルでDNA精製を行った。ChIP-qPCRにはKAPA SYBR FAST ABI Prism Kit (Kapa Biosystems) と fast real-time PCR system 7300 (Applied Biosystems) を用いた。H3K9me2のIP効率はヒストンH3レベルで補正した。PCRに用いたプライマーを表7に挙げる。

プライマー名	配列	
cen-dg_F	AATTGTGGTGGTGTGGTAATAC	(Tashiro <i>et al.</i> 2013)
cen-dg_R	GGGTTTCATCGTTTCCATTGAG	(Tashiro <i>et al.</i> 2013)
fbp1-UAS1_F	CTCCTCCTACTAACTACTCCATCC	
fbp1-UAS1_R	TGATGAGTACTAATGCTTTGTGACG	
fbp1-ORF_F	AGCAGAGTTGGTAAATCTCATTGG	
fbp1-ORF_R	GTTTCATCGCCAGTGGAATTGAC	
fbp1-UAS2_F	AATTGCAGTATGTCATTTGTTTAGCAG	
fbp1-UAS2_R	ACTACAGGGCAATGCTGTTTCA	
fbp1_3ORF_F	GCAGGAGGTATTGCGGTAAAC	
fbp1_3ORF_R	GTTTTGGGTACCAAATCCAGAATG	
prp3_F	GCACAGTCGTTGTACAAATTCGTATTCCC	(Yamada <i>et al.</i> 2013)
prp3_R	ACGATTCTAAACGCCTCTTGTTACGATCC	(Yamada <i>et al.</i> 2013)

表7 ChIP-qPCRのプライマー

ChIP-seqには、グルコースが豊富な条件 (t=0) とグルコース飢餓ストレス下 (t=15, 60) におけるinput DNAと抗H3抗体によるH3 ChIP DNAを用意した。前述の方法により、eluteしたDNAをilluminaのプロトコル(GAIIx-v5, TruSeq)に従いcDNAライブラリ化、PCR増幅し、GAIIxを用いて36bpのシングルエンドのシーケンシングを行った。得られた36bpのタグをbowtie2により酵母ゲノムにミスマッチを許容せずにマッピングした。結果を表にまとめた。ChIP-seqの解像度はヒストン結合サイトを決定するのに十分な解像度が得られなかったため、RのKernel Regression smootherを用いて、シグナルをwindow size 50bpでスムージングし、ゲノムワイドなヒストン密度の推定を行った。ChIP-seqのデータは、DDBJで入手可能である (accession number: DRA002273)。

RNA-seqデータの詳細なクオリティ情報は表8にまとめた。

抗体	時間 (分)	リード長 (bp)	フィルターパスした リード数	マップ率 (%)	カバレッジ
α -H3	0	36	4.13×10^7	86.0	102.0
α -H3	15	36	4.05×10^7	85.2	98.8
α -H3	60	36	3.86×10^7	91.2	100.8
input	0	36	3.57×10^7	84.0	85.8
input	15	36	3.65×10^7	87.8	91.8
input	60	36	3.54×10^7	87.6	88.8

表 8 ChIP-seq データのクオリティ情報

asRNA 5'-RACE

RACE 実験は、SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用い、このキットのプロトコル通りの条件で行った。YER 培地から回収した total RNA を random primer により逆転写し *fbp1*⁺ の 5'末端を検出するよう PCR を行った。用いたプライマー配列は GTACAACACTATACCAAAGCAGCAC である。

RNA の過剰発現実験

fbp1⁺ の最も長いセンス鎖の転写産物 *mlonRNA transcript-a* の転写開始点から、アンチセンス RNA の転写開始点の全域を含むゲノム領域を酵母の発現ベクター pREP にクローニングした。pREP プラスミドはチアミン濃度特異的に発現をコントロールできる *nmt1* プロモーターを持ち、培地にチアミンを加えないとプロモーター依存的に *mlonRNA transcript-a* または、*fbp1-as* を強制発現出来、4 μ M チアミンを加えると発現をほぼ抑制できる。プラスミドが分裂酵母の *ura4* を持つのでセレクションのため SD-*ura* または mm 培地を用いた。用いた培地を下の表 9 に挙げる。

	SD- <i>ura</i>	mmR-th	mmD-th	mmR+th	mmD+th
グルコース	2%	6%	0.1%	6%	0.1%
グリセロール	-	-	3%	-	3%
チアミン	-	-	-	4 μ M	4 μ M

DYB w/o a.a.	0.67%	-	-	-	-
NH4Cl	-	93.5mM	93.5mM	93.5mM	93.5mM
Na2HPO4	-	15.5mM	15.5mM	15.5mM	15.5mM
フタル酸水素カリウム	-	14.7mM	14.7mM	14.7mM	14.7mM
50x Salt stock *1	-	20ml/L	20ml/L	20ml/L	20ml/L
1000x vitamins *2	-	1ml/L	1ml/L	1ml/L	1ml/L
10000x minerals *3	-	100μl/L	100μl/L	100μl/L	100μl/L
1000x trace elements *4	-	1ml/L	1ml/L	1ml/L	1ml/L
アデニン	200mg/L	200mg/L	200mg/L	200mg/L	200mg/L
ロイシン	200mg/L	200mg/L	200mg/L	200mg/L	200mg/L
ヒスチジン	200mg/L	200mg/L	200mg/L	200mg/L	200mg/L

表 9 過剰発現実験用培地の組成

*fbp1Δ*の変異株と野生株にプラスミドをトランスフォーメーションし、SD-ura 液体培地で前培養した。*mlonRNA transcript-a* と *fbp1-as* の過剰発現実験は *mmR-th* で一晚培養したプラスミド保持酵母を *mmD-th* に移し、チアミン非存在下でグルコース飢餓ストレスを誘導した。過剰発現を行わない対照実験は *mmR+th* で同様に培養した酵母を *mmD+th* に移し、チアミン存在下で飢餓ストレスを誘導した。

ウェスタンブロット、タンパク質の半減期測定

実験には HA タグ付きの Fbp1 タンパク質を発現する Fbp1-3HA 変異株と野生株の二種を用いた。まず、前述の方法にて回収した分裂酵母細胞を Lysis Buffer I に溶解し、ジルコニアビーズ及びマルチビーズショッカーにより細胞壁破壊し、タンパク質を抽出した。その後、SDS-PAGE を行った。タンパク質サンプルは Lysis Buffer I 中の酵母タンパク質を SDS 変成し、12%アクリルアミドゲルで 1 レーン当たり 200 μg 泳動した。さらに、そのゲルを Immobilon-P transfer membrane (Millipore Corporations) に転写し、3%スキムミルクを含む 1xTNT バッファー (20mM Tris, 140mM NaCl, 0.05%(w/v), Tween20) でブロッキングした。その後、一次抗体に 30°C で 1 時間インキュベートし、1xTNT で 3 度洗浄した。続いて、30°C で 30 分間二次抗体と反応させ、同様に 3 度洗浄した。検出は ECL (GE Healthcare) と LAS4000 (GE Healthcare) を用いて行った。

Fbp1-3HA を検出する一次抗体には抗 HA 抗体 (α -HA clone 12CA5; Roche、1/5000 希釈) を、コントロールには抗 Tubulin 抗体 (α -Tubulin, T6074; Sigma、1/5000 希釈)、二次抗体は抗マウス HRP 抗体 (α -mouse HRP、1/5000 希釈) を用いた。

タンパク質分解速度の測定には、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (終濃度 100 μ g/ml) を使用した。

遺伝子発現ダイナミクスのシミュレーション

モデルごとに、各 RNA、その RNA を転写するプロモーターの状態、RNA ポリメラーゼなどの量の遷移を常微分方程式で記述した。そして各モデルを 4 次のルンゲクッタ法でシミュレーションした。さらに、解を gnuplot (Williams & Kelley 2011) でプロットすることで、ストレス応答の動的な RNA 発現ダイナミクスをシミュレーションした。

考察

生命は、外界環境の変化に耐え、確実に生き延びるための様々な適応システムを有する。そのストレス応答システムの多くは、刺激に対して適切で確実な遺伝子応答を必要とする。また、生命にとって不可欠な反応として、エネルギー・物質代謝がある。外界の有機物や無機物を取り込み、自身と同化させたり、エネルギー源として利用したりすることで、成長、増殖をおこなう。なかでも、グルコースは多くの生命体にとって、重要なエネルギー源である。

近年のゲノム解析から、高等真核生物ではタンパク質をコードする領域は限定的であることが明らかになった。たとえば、ヒトゲノムにおいてはタンパク質をコードする部分はわずか 1.5%程度である。残りの非コード DNA 領域は従来「ジャンク DNA」と呼ばれ、それほど重要な機能を有していないと考えられてきた。しかし、ここ数年の ENCODE などの研究成果から、これら非コード DNA 領域からも活発に RNA が転写されていることが明らかになってきた。これらの非コード RNA は、遺伝子発現の制御にも重要な役割を果たす。とくに、mRNA と構造が類似した 200 ヌクレオチドよりも長い lncRNA（長鎖非コード RNA）は、クロマチン構造やエピゲノム修飾の制御因子として重要な働きをしていることが次々に明らかにされている。

本研究では、グルコース濃度変化という環境ストレス応答への適応における、分裂酵母細胞の遺伝子の発現制御機構に関して、lncRNA やクロマチン構造変化という観点から研究を行った。

1 分裂酵母におけるグルコース飢餓ストレスへのグローバルな応答の観察

分裂酵母は単細胞真核生物であり、核ダイナミクスや細胞シグナリングなどの研究に重宝されてきた。分裂酵母を用いた環境ストレス応答の研究も盛んであり、これまでも減数分裂、浸透圧、熱ショック、酸化ストレス、DNA 損傷などのトランスクリプトーム研究がなされてきた (Lackner *et al.* 2007; Leong *et al.* 2014; Marguerat *et al.* 2012; Wilhelm *et al.* 2008)。しかしながらグルコース飢餓ストレスの早期応答に関する詳細なトランスクリプトームの研究はあまりなされていなかった。一方、所属研究室の先行研究で、グルコース飢餓ストレスに応答して、*fbp1*⁺遺伝子上流から転写される lncRNA が見いだされた (Hirota *et al.* 2008)。この lncRNA は分裂酵母が飢餓ストレスを受けると転写され、プロモーター領域のクロマチン構造変化を伴いながら、ATF1/CREB ファミリーの転写因子 Atf1 依存的に下流の mRNA の転写活性化が引き

起こされる。このような lncRNA を介した遺伝子発現の制御機構は、タンパク質の発現を待つことなく迅速にストレスに適応することを可能とするため、他のストレス応答性遺伝子においても重要な役割を果たすと推察される。

この考えをふまえ、第1章では、グルコース飢餓ストレス直後の細胞内の mRNA 及び ncRNA の遺伝子発現について、RNA-seq 解析を行い、lncRNA によって制御を受ける遺伝子の探索を行い、以下の点を明らかにした。

第一に、グルコース飢餓ストレスへの応答時に、様々な遺伝子の発現が活性化あるいは抑制されており、それらは応答キネティクスにより 5 つのクラスに大別されることがわかった。ストレスで活性化する遺伝子については 3 つのクラスに分類され、グルコース飢餓ストレスを受けて 15 分以内に転写が活性化するクラス（初期）、15-60 分で発現が最大となるクラス（中期）、60-120 分で発現が最大となるクラス（後期）の存在が示された（図 4）。初期に転写が素早く活性化する遺伝子には、細胞内シグナリング関連因子が多く含まれていた。たとえば、*git5⁺* (a heteromeric G protein β subunit) や *cgs1⁺* (cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit) は共に、cAMP/PKA シグナリングパスウェイの因子であり (Hoffman *et al.* 2005; 図 2)、*msy1⁺* や *msy2⁺* はイオンチャネルタンパク質として働く (Nakayama *et al.* 2012)。mRNA だけではなく、*fbp1⁺* mlonRNA を含む多くの ncRNA も、ストレス応答初期に発現誘導を受けていた（図 8）。これらの ncRNA の多くは機能未知であるが、ストレス初期応答シグナリングや遺伝子発現制御などに関与していることが想定される。

一方で、中期～後期に転写が活性化する遺伝子群の中には、*fbp1⁺* を含め代謝関連遺伝子が多く含まれていた。細胞はこの時期にはストレスに十分「適応」し、細胞内の代謝系が新たなシステムに移行した様子が伺える。これらの遺伝子の発現誘導には多くの場合クロマチン構造変化が伴っており、転写の活性化にクロマチン再編成が重要な役割をしていることがわかる（図 7）。また、これらのストレス応答性の遺伝子・ncRNA 発現制御の機構であるが、これらの多くがストレス応答転写因子 ATF1 への依存性を示していた（図 6）。このことから、遺伝子だけでなく、ncRNA もストレス応答転写制御の重要なターゲットになっていることが推測される。

2 mlonRNA 型 lncRNA の探索

本研究の目的の一つは、*fbp1⁺* mlonRNA と類似の遺伝子発現制御メカニズムが他の

分裂酵母遺伝子にも存在するかを検証することである。本研究では MATLAB をベースとしたツールにより、グルコース飢餓により誘導される *mlonRNA* 型のノンコーディング RNA を抽出することに成功した。このツールを用いて、RNA-seq の発現パターンから *mlonRNA* 型の *lncRNA* が転写されている可能性が高い領域を探し出し、実際そのうちの幾つかの領域において *lncRNA* が飢餓ストレス依存的に転写されていることを実験的に確認した (図 11)。このツールによって選び出された 9 つの領域について、その特徴をさらに詳細に確認したところ、そのほとんどにおいて、局所的なクロマチン構造変化や随伴するアンチセンス RNA 転写の存在が確認された。しかも、それらの領域の下流遺伝子の多くは、*fbp1⁺ mlonRNA* と同様に、*Atf1* 依存的な発現機構によって支配されていた。以上から、これらの新規 *lncRNA* は、グルコース飢餓ストレス応答性の *mlonRNA* と同じタイプの *lncRNA* であると結論づけた (表 2)。

これらの候補 *lncRNA* の下流遺伝子の機能に着目すると、*ght4⁺* (hexose transporter 4) や *SPBC1685.05* (protease involved in cellular protein catabolic process) など、代謝ストレス関連因子が多い。ゆえに、*mlonRNA* が関連した転写制御は、一群の代謝ストレス応答反応において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

類似の *lncRNA* の報告例としては、最近の出芽酵母研究で明らかにされた RNA 結合タンパク質 *Nrd1* に依存した遺伝子上流の *ncRNA* 群が挙げられる (Schulz *et al.* 2013)。この *ncRNA* 群は双方向性のプロモーターにおいて遺伝子上流または下流で発現するアンチセンス RNA で、*Nrd1* に依存して選択的に転写が終結されることによって、下流の *mRNA* の転写を制御することが明らかにされている。

本研究では、特にグルコース飢餓ストレスへの応答に焦点を絞って解析を行った。別の種では、他のストレス (浸透圧や熱ショックなど) においても *lncRNA* が周辺遺伝子の発現制御に関与することが報告されている。したがって、*mlonRNA* 型 *lncRNA* による遺伝子発現制御は、グルコース飢餓以外のストレスにおいても重要な貢献を果たすと考えられる。

3 *fbp1*-アンチセンス RNA 発現

RNA-seq の結果から、*fbp1⁺* 遺伝子の逆鎖からアンチセンス *lncRNA* が転写されていることが確かめられ、しかも、それらはグルコース飢餓時に発現量が減少することが明らかになった (図 20)。第 2 章ではこの *fbp1-as* の発現動態を詳細に解析した。

fbp1-as は、センス鎖 RNA の転写が活発なときに発現量が少なく、逆にセンス鎖 RNA の転写が抑制されているときに増大した。このことから、*fbp1⁺* において、センスとア

ンチセンスの転写は互いに相反的に制御されている可能性が示唆された。

特筆すべきこととして、*mlonRNA* 型 *lncRNA* の候補領域の多くで、アンチセンス RNA の転写が確認されたことが挙げられる。そのうちの半分以上で、センス鎖 RNA とアンチセンス RNA の発現量に相反的な関係が認められた。このことは、アンチセンス RNA がストレス応答遺伝子制御において、普遍的に何らかの役割を担っていることを示唆する。その発現動態から推測すれば、この種の一群のアンチセンス RNA が mRNA を負に制御するような機能を持つ可能性も考えられる。先行研究においても、分裂酵母のストレス応答性のアンチセンス RNA に関して、アンチセンス RNA の発現量が多い領域では、センス鎖 RNA の発現量が抑制されがちであるという報告がある (Leong *et al.*, 2014)。これらの結果も、遺伝子の発現制御を担うアンチセンス RNA の存在を伺わせる。また、出芽酵母についても、ストレス応答性の遺伝子領域におけるアンチセンス RNA が複数報告されている (Ni *et al.* 2010; Xu *et al.* 2011; Bitton *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012)。

アンチセンス RNA を介した発現制御の可能性を実験的に検証するため、本研究では *mlonRNA*、及び、*fbp1-as* の過剰発現系を構築した。グルコース濃度非依存的に発現誘導ができる *nmt1* プロモーターの下流に、センス及びアンチセンスの *fbp1+* の最も長い転写産物全域を配置した分裂酵母用プラスミドを作製した (図 17)。このプラスミドを用いて、グルコースが豊富な条件下で *mlonRNA* を過剰発現させた場合、*mlonRNA* のカスケード転写や mRNA の大規模活性化を誘導することは出来なかった。これは、*mlonRNA* 転写の下流の反応が誘導されるためには、*mlonRNA transcript-a* の転写だけでは不十分であり、グルコース飢餓というストレスシグナルの応答系が必須であることを意味する。これらの結果は、グルコース飢餓時に見られる *mlonRNA* の転写開始点の下流へのシフトが、Atf1 などのストレス応答経路によって制御されている可能性を示唆する。

一方で、*fbp1-as* 過剰発現は、グルコース飢餓ストレス下においても、プラスミド由来のセンス鎖 RNA の発現を大幅に弱めることがわかった。しかしながら、プラスミド由来の *fbp1-as* 過剰発現は、染色体上の *fbp1+* 領域からのセンス鎖 RNA 合成には部分的な影響しか与えないことが明らかになった (図 18)。したがって、*fbp1-as* は同一 DNA を鋳型としたセンス鎖 RNA 合成に対しシスに抑制をおこなうが、別の DNA を鋳型とするセンス鎖 RNA 合成に対するトランスの合成抑制作用は極めて限定的であることが示唆された。

fbp1-as の転写活性化の機構は未だに不明である。*fbp1⁺* の 3'領域付近に複数の *fbp1-as* 転写開始点を検出しており、この付近の染色体領域が *fbp1-as* のプロモーターとして機能している可能性が高い。しかしながら、これまでの解析では、この領域の欠失変異体のいずれもが *fbp1-as* を合成できることが明らかになっている。したがって、特定の配列が *fbp1-as* の転写を活性化しているのではなく、何らかの染色体構造またはクロマチン構造が転写活性化に関与するのではないかと考えている。例えば、グルコース豊富時に *fbp1⁺* の 3'領域と 5'側が「遺伝子ループ」のような高次構造を取っていて、グルコース飢餓時にこのループが *fbp1⁺* の 5'側で生じるように転換し、センス鎖とアンチセンス鎖の転写が交互に活性化するというモデルも想定できる。

4 *fbp1*-アンチセンス RNA と mRNA 発現抑制

本研究の結果から、*fbp1-as* が迅速な mRNA 発現抑制と mRNA の分解制御に関与することが示唆された。グルコース飢餓中にある細胞に、グルコースを再添加する実験では、mRNA の発現が急速に抑制されるとともに、*fbp1-as* 発現量が回復した (図 21)。また、グルコース再添加時に *fbp1⁺* mRNA が急速に分解するが、これには *fbp1-as* と Dicer が部分的ではあるが関与することがわかった (図 25)。

fbp1-as と Dicer は相互に関連しているのであろうか。RNA 転写阻害剤であるフェナントロリンをグルコース再添加と同時に加えた場合、*fbp1-as* の存在量は非常に少ない状態に維持される。このような条件下では、*fbp1⁺* mRNA の安定性が劇的に向上した (図 24)。一方、グルコース再添加後しばらくして *fbp1-as* の存在量が増えた時期にフェナントロリンを添加すると、上記のような劇的な安定化は見られず、部分的な安定化のみが観察された。グルコース再添加後しばらくすると mRNA と *fbp1-as* が共存するようになるので、この段階になると両者が二本鎖 RNA を形成し、分解が促進されるものと推測される。また、Dicer による分解産物自身がさらに分解を触媒することで、分解にポジティブフィードバックがかかる可能性もある。実際この時期の mRNA 分解は部分的ではあるものの Dicer 依存的であることは上記の考えを支持する。

しかしながら、この実験結果だけでは、*fbp1-as* が mRNA の分解を制御しているという証拠には不十分である。*fbp1-as* を合成できないような変異体を作製して解析するのが重要であるが、これまで構築した *fbp1-as* 転写開始点の欠失株全てで、潜在的な新規転写開始点が出現したため、そのような株を用いた解析が実現できていない。また、二本鎖 RNA を基質とした Dicer 分解の中間産物として、短い RNA 分子の道程を試み

たが、20~30ヌクレオチドの分子は同定できず、微量の70-100ヌクレオチドの分子しか検出できなかった。今後は、別の方法で *fbp1-as* 欠損株を構築したり、より高感度の低分子 RNA 検出法を用いて解析を行う予定である。

また実際に、グルコース再添加後に、センス・アンチセンス RNA が細胞内で共局在しているのかも確たる証拠が不足している。出芽酵母の *PHO84* 遺伝子のアンチセンス RNA に関する先行研究では、細胞ごとにセンス・アンチセンスどちらかの RNA を排他的に転写しているという報告がある (Castelnuovo *et al.* 2013)。本研究の解析は、ノザンブロットなどにより総体としてセンス・アンチセンスの転写産物を観察しているに留まるため、1細胞レベルでセンス・アンチセンス RNA が共発現しているかについては、高感度イメージング技術の導入や二本鎖 RNA 検出法などの導入により、さらなる解析が必要である。

アンチセンス RNA が転写を抑制するメカニズムに関しては、いくつかの先行研究が参考になる。本研究で扱った現象に近い事例としては、グラム陽性細菌の RNaseIII によるセンス・アンチセンス RNA 二本鎖の分解系が挙げられる (Lasa *et al.* 2011)。ただし、*fbp1+* の事例では、アンチセンス RNA の発現量はセンス鎖の転写産物よりも相当少ないので、両者が化学両論的にバランスしていない。したがって、グラム陽性細菌のケースとは異なり、アンチセンス RNA がなんらかの触媒的な作用によって、センス鎖の分解を制御している可能性がある。

別の可能性として、アンチセンス RNA による転写抑制型のクロマチン修飾（ヒストンマーク）の導入という機構が考えられる。分裂酵母においては、隣接する向かい合わせの遺伝子の間の領域では、センス鎖・アンチセンス鎖 RNA がオーバーラップする領域に局所的なヒストン H3K9 のトリまたはジメチル化が誘導される (Gullerova *et al.* 2008; Gullerova *et al.* 2012)。しかしながら、本研究においてみられる *fbp1-as* 転写領域周辺では、ヒストン H3K9me2 のマークはほとんど検出されなかった (図 26)。

また、アンチセンス RNA の転写がヒストン脱アセチル化酵素などのヒストン修飾酵素をリクルートして、抑制的なクロマチン状態を誘導する例も報告されている (Houseley *et al.* 2008; Pinskaya *et al.* 2009; Kim *et al.* 2012; Camblong *et al.* 2007; Takayama *et al.* 2013; Berretta *et al.* 2008)。出芽酵母では、Set1 依存的な H3K4 メチル化を通じた antisense Xrn1-sensitive unstable transcripts (XUTs) による転写のサイレンシングのメカニズムが明らかにされている (van Dijk *et al.* 2011)。分裂酵母において Exo2 は Xrn1 のホモログであり、予備的な実験では *fbp1-as* および *fbp1+* mRNA の分解は Exo2 に依存的であることが示唆されている。*fbp1-as* は出芽酵母で報告され

ている Xrn1 類縁型 lncRNA である可能性がある。

グルコースを再添加時に見られる mRNA の急速な分解は、部分的に Dicer 依存性を示した (図 24)。Dicer 依存性が部分的である理由としては、Dicer の細胞内の局在が一つの可能性として考えられる。Dicer は、その大部分が核周縁部に局在すると言われている (Emmerth *et al.* 2010)。一方、先行研究では、mlonRNA、*fbp1*⁺ mRNA、*fbp1*-as は共に、細胞質へと輸送され、ポリソームに入ることが確認されている (Galipon *et al.*, 2013; Galipon, 未発表)。したがって、核内で Dicer によって分解される割合は部分的に留まると考えられる。細胞質に移行した RNA については、翻訳と共役する他の分解経路が関与している可能性がある。

アンチセンス RNA 依存的な分解制御の利点は何なのであろうか。mRNA の転写の抑制のみでは、それまでに転写され蓄積した mRNA を急速に失わせることはできない。分裂酵母の *fbp1*⁺ mRNA はグルコース飢餓時には大量に転写され、少なくともグルコース飢餓時には安定な転写産物である。グルコースを再添加すると、転写の抑制が素早く起こっていると考えられるが、そのままでは既に合成された mRNA はなかなか消失しないことが予想される。このため、グルコースが再添加されたときに mRNA の安定性が劇的に低下することは、理にかなった反応であると考えられる。しかも、グルコース濃度が復帰した際に迅速に mRNA の発現レベルを下げるためには、新たな分解系タンパク質の合成を待っている時間的余裕はない。そのため、同じ遺伝子領域で合成されるアンチセンス RNA を介して分解を促進すれば、急速な応答が可能になってくる。また、アンチセンス RNA 転写が mRNA 分解だけでなく、センス鎖 RNA の合成を抑制する機能も有していれば、多面的に遺伝子の急速シャットダウンが可能になるこのようなプロセスは、著しい環境変動にさらされる単細胞生物にとって、存在上大きなメリットがあるのかもしれない。

5 環境適応時の遺伝子発現制御に対する数理モデルによる検証

第3章では、センス・アンチセンス lncRNA の相互依存的な発現制御に関する過程を数理モデル化することで、lncRNA が関与する遺伝子発現の生物学的な意義を検証した。まず、mRNA の転写活性化段階のモデルにおいては、環境ストレス刺激の入力直後にセンス lncRNA が mRNA の発現を遅延させる機能を有し、かつ環境ストレス刺激から一定の時間経過後に確実に大量の mRNA の発現を爆発的に誘導する過程が再現された。また、この時期においては、少量のアンチセンス RNA の転写は mRNA の転写活性化にはさほど大きな

影響を与えないことも示された (図 33)。

一方で、mRNA の転写抑制段階のモデルにおいては、mRNA と asRNA 及びその複合体の 3 体のダイナミクスとしてモデル化を行った。このモデルでは、環境ストレス刺激の入力直後に、すばやく mRNA の発現が抑制された後に、少し遅れて asRNA の発現が回復する様子が再現できた (図 34)。分子生物学の手法を用いても、実験的には、離散的な時間点における各 RNA の濃度の平均値を測定することしかできないため、分解 RNA 量のリアルタイム計測は極めて困難である。そこで、実験的に測定可能な RNA の半減期や RNA の濃度変化の実測値に、理論によるシミュレーションをあわせることで、分解機構の詳細な検討に非常に有効な議論が可能になる。

6 lncRNA の転写の生物学的な意義

次に、上記の様な lncRNA の制御ネットワークの意義を考察する。*fbp1+* のコードする Fbp1 (fructose 1,6-bisphosphatase) は糖新生経路で不可逆反応を司る鍵となる酵素である。一方、グルコースが存在する環境下における糖新生経路の活性化は、細胞にとってむしろエネルギー的な損失を招く。グルコース濃度は自然界では変動すると考えられるが、一定期間グルコース濃度が継続して低下し、本当に飢餓状態になった時だけ遺伝子を活性化することが求められ、再びグルコース濃度が上昇すれば、すぐさま *fbp1+* mRNA を発現停止する必要がある。上記のような確実でメリハリのある応答をするためには、本モデルのような lncRNA を介したネットワーク遺伝子制御が適していると思われる。

本研究では分裂酵母のモデル系を用いて、グルコース飢餓というストレス応答に際してセンス・アンチセンス lncRNA からなる遺伝子制御ネットワークが重要な役割を果たすことをはじめて示した。ヒトの細胞には、15,000 以上もの lncRNA が存在し、そのうちの 3,000 以上はアンチセンス RNA であると言われている (Derrien *et al.* 2012)。ヒトや高等真核生物においても、例えば X 染色体の不活化に関わる *Xist* や *Tsix* などのように、センス・アンチセンス lncRNA は重要な役割を果たしていることが示されつつある。分裂酵母で見いだされたストレス応答性のセンス・アンチセンス lncRNA ネットワークを介した遺伝子発現制御系は、他の真核生物においても綿密かつ確実な遺伝子発現制御として保存されている可能性が高い。

7 頑強な遺伝子発現制御とゆらぎと適応

生命は、外界環境の変化に耐え、確実に生き延びるための様々な適応システムを有する。その多くは刺激に対する頑強な遺伝子発現制御を必要とする。

センス・アンチセンス lncRNA ネットワークを介した mRNA の発現制御は、明確な on/off の切り換えを可能とするスイッチング制御をもたらす。このスイッチング制御は、環境変化に応じて mRNA を確実に、かつ切れ味よく制御することに向いている。

また、微量の lncRNA を介した発現制御は、「超高感度 (ultrasensitivity) ダイナミクス」と呼ばれる制御系を可能とすると考えられる。超高感度ダイナミクスでは、微量な制御因子の動態が増幅され、巨視的な変化が大規模に展開される。*fbp1⁺* mRNA の転写の活性化メカニズムにおいて、実験では mRNA の大量発現に先立ち、少量の mlonRNA の発現が観察された。この過程についての数理モデルでは、プロモーター間で RNA ポリメラーゼを競合的に取り合う系により、この超高感度な制御系を再現した。また、*fbp1⁺* mRNA 発現抑制においては、mRNA・*fbp1-as* が二本鎖を合成することが超高感度なダイナミクスを生み出す要因となっている。阻害因子がターゲットに対し選択的かつ強固な結合をした場合、系全体にその阻害の効果を増幅させ、結果として鋭敏なターゲット遺伝子活性制御ダイナミクスを実現することが提唱されている (McCarrey & Riggs 1986)。このような反応キネティクスは、エネルギー収支的に栄養豊富時に不利なグルコース飢餓応答遺伝子のシャットダウンには非常に適しているものと考えられる。

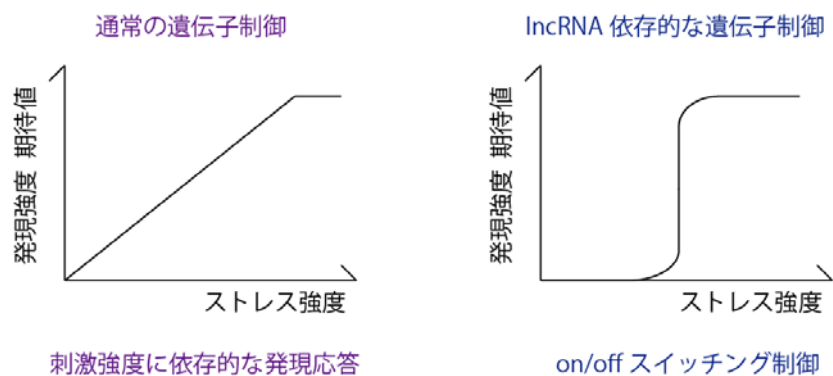
単一の細胞にとって、超高感度な遺伝子発現の切り換え制御システムを有することは、中途半端な遺伝子発現状態を取ることを防ぐ (図 35 A)。*fbp1⁺* のようにエネルギー効率を左右するような代謝系の切り換えの鍵となる遺伝子の発現制御は、ストレスに敏感に反応して、on/off の切り換えが出来るシステムが効率的であると考えられる。

一方で、超高感度なダイナミクスによる発現制御では、少しの濃度変化で発現の on/off の切り換えが起こるので、特定のストレス強度に対し、ストレスに応答する細胞と応答しない細胞の両方が共存することが起こりうる (図 35 B)。この遺伝子発現のゆらぎは、細胞集団としてみれば、より有利な適応性を生み出す。本研究では一細胞レベルでの観測は行っていないが、本研究でモデル化された発現システムでは遺伝子発現が確率的に細胞ごとの「ゆらぎ」を生み出す可能性が示唆される。

生命現象は「ゆらぎ」を多分に含み、必ずしも決定論的なダイナミクスに依らずに確率的に、より安定な状態へと変化する。特に、遺伝子発現ゆらぎは、細胞の環境への適

応に非常に重要であることが知られている。たとえば、大腸菌 (*Escherichia coli*) などで見られる「パーシスタンス」という現象が知られている。大腸菌に抗生物質を作用させると大半の細胞が死滅するが、ごく一部の細胞で抗生物質のターゲットとなる *hipA* 遺伝子の発現ゆらぎがあるために「耐性」が獲得される (Rotem *et al.* 2010; Wakamoto *et al.* 2013)。この例では細胞ごとに発現レベルが確率的にゆらぐことが、環境変動に対する細胞集団全体の頑強性を高めることになるのであろう。本研究における lncRNA を介した超高感度なネットワーク制御により、遺伝子発現が細胞レベルでゆらぐことで、環境変動に高い適応性を生み出している可能性が示唆される。

(A)



(B)

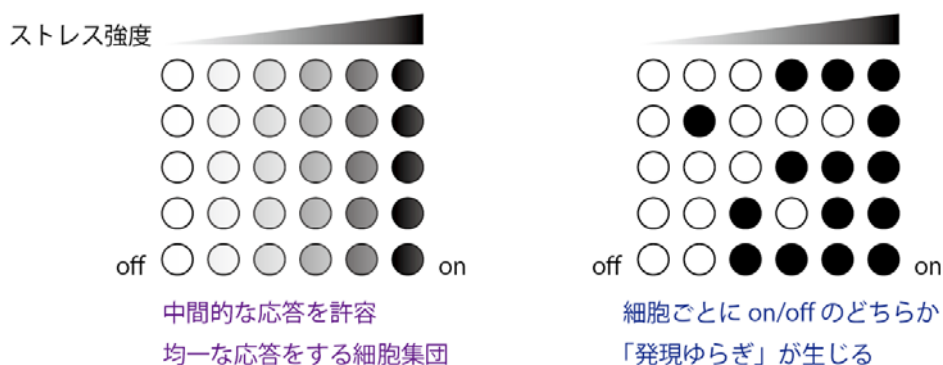


図 35 lncRNA を介した遺伝子発現制御の意義

(A) 単一細胞のストレス応答時の遺伝子発現の概念図。超高感度なダイナミクスである lncRNA 依存的な遺伝子発現のスイッチング制御 (右) と典型的なストレス強度依存的な発現制御(左)

(B) 細胞集団としてのストレス応答時の遺伝子発現の概念図。超高感度なダイナミクスであれば細胞ごとに発現のゆらぎが生じる (右)。ストレス強度依存的な発現をする遺伝子は中間的な発現強度をとることが可能となり、各状態においては細胞集団が均質となる (左)。

終わりに

生命とは何か。生き物を生き物たらしめる特徴の一つに、生き物は自身を取り囲む世界と自身との間に明確な境界を持った独立な存在であるということが上げられる。もし、外界の環境が多少変化しても、生物は自身を、あるいは己の子孫を、独立な系として維持していくための環境適応システムを有する。自己のおかれた状況に合わせて自分自身を調節することで、恒常的に生命を維持しながらも環境を受け入れてゆく。

本研究では、環境変動の一例として、栄養状態の変化を扱った。生命の維持に、エネルギー源は必須であり、生命は外界環境から栄養となる物質や光などのエネルギーそのものを取り込むことによって自己を維持、発展させるためのエネルギーを作り出す。たとえ厳しい環境にあっても、生命は安定的なエネルギー源を確保するために、いくつもの予備のシステムを持ち、環境の変動をうけると、その状況において最適なシステムへの切り替えが行われる。この環境適応を司る最も重要な制御機構の一つが遺伝子発現の制御であり、遺伝子の発現状態は、決定論的には細胞の次の状態を決める大事な要素となる。このため、遺伝子発現は無数の制御因子や制御メカニズムにより頑強に、しかし、繊細に調整されている。この遺伝子発現の調節メカニズムを明らかにすることは、生命システムの一端を明らかにすることにつながるだろう。

謝辞

指導教員である教授の太田邦史博士には、研究計画から実験、博士論文作成に至るまで、多大なご指導、お力添えを賜りました。また、一部の実験は三好知一郎博士の指導の下でおこないました。RNA-seq の解析には平田祥人博士、鈴木穰博士にご助力いただきました。lncRNA のストレス応答モデルの構築は畠山哲央博士にご助力いただきました。

ChIP および ChIP-seq の実験の一部は研究室の竹俣直道さんに、RNA 半減期に関する実験は一部を研究室の石井智子さんに行っていただきました。

RNA-seq 及び ChIP-seq を行うにあたって菅野純夫博士にご協力いただきました。実験・解析に関しては金子邦彦博士、Charlie Hoffman 博士、山田貴富博士、久郷和人博士、山田真太郎博士、Josephine Galipon 博士、伊藤将博士にご助言頂きました。

また、Josephine Galipon 博士から *dcr1Δ*, *UAS1Δ*, *UAS2Δ*株をご供与いただきました。廣田耕治博士からは *atf1Δ*, *rst2Δ*株を、山田貴富博士からは *atf1Δ*株を提供いただきました。また、日常の議論を通じて多くの示唆を下された太田研究室の皆様へ感謝します。心よりお礼を申し上げます。

参考文献

- Alon U. 2006. *An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits*. Chapman and Hall/CRC.
- Berretta J, Pinskaya M, Morillon A. 2008. A cryptic unstable transcript mediates transcriptional trans-silencing of the Ty1 retrotransposon in *S. cerevisiae*. *Genes & development* **22**: 615-626.
- Bitton DA, Grallert A, Scutt PJ, Yates T, Li Y, Bradford JR, Hey Y, Pepper SD, Hagan IM, Miller CJ. 2011. Programmed fluctuations in sense/antisense transcript ratios drive sexual differentiation in *S. pombe*. *Molecular systems biology* **7**: 559.
- Boyle EI, Weng S, Gollub J, Jin H, Botstein D, Cherry JM, Sherlock G. 2004. GO::TermFinder—open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics* **20**: 3710-3715.
- Camblong J, Iglesias N, Fickentscher C, Dieppois G, Stutz F. 2007. Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell* **131**: 706-717.
- Castelnuovo M, Rahman S, Guffanti E, Infantino V, Stutz F, Zenklusen D. 2013. Bimodal expression of PHO84 is modulated by early termination of antisense transcription. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 851-858.
- Chen HM, Rosebrock AP, Khan SR, Fitcher B, Leatherwood JK. 2012. Repression of meiotic genes by antisense transcription and by Fkh2 transcription factor in *Schizosaccharomyces pombe*. *PloS one* **7**: e29917.
- Cifuentes-Rojas C, Hernandez Alfredo J, Sarma K, Lee Jeannie T. 2014. Regulatory Interactions between RNA and Polycomb Repressive Complex 2. *Mol Cell* **55**: 171-185.
- Davidovich C, Zheng L, Goodrich KJ, Cech TR. 2013. Promiscuous RNA binding by Polycomb repressive complex 2. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 1250-1257.
- Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG et al. 2012. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene

- structure, evolution, and expression. *Genome Research* **22**: 1775-1789.
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F et al. 2012. Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**: 101-108.
- Emmerth S, Schober H, Gaidatzis D, Roloff T, Jacobeit K, Buhler M. 2010. Nuclear retention of fission yeast dicer is a prerequisite for RNAi-mediated heterochromatin assembly. *Developmental cell* **18**: 102-113.
- Fatica A, Bozzoni I. 2014. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature reviews Genetics* **15**: 7-21.
- Galipon J, Miki A, Oda A, Inada T, Ohta K. 2013. Stress-induced lncRNAs evade nuclear degradation and enter the translational machinery. *Genes to cells* **18**: 353-368.
- Grewal SIS. 2010. RNAi-dependent formation of heterochromatin and its diverse functions. *Current opinion in genetics & development* **20**: 134-141.
- Gullerova M, Proudfoot NJ. 2008. Cohesin Complex Promotes Transcriptional Termination between Convergent Genes in *S. pombe*. *Cell* **132**: 983-995.
- Gullerova M, Proudfoot NJ. 2012. Convergent transcription induces transcriptional gene silencing in fission yeast and mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 1193-1201.
- Hainer SJ, Pruneski JA, Mitchell RD, Monteverde RM, Martens JA. 2011. Intergenic transcription causes repression by directing nucleosome assembly. *Genes & development* **25**: 29-40.
- Hartigan JA, Wong MA. 1979. A K-Means Clustering Algorithm. *Applied Statistics* **28**: 100-108.
- Hirota K, Miyoshi T, Kugou K, Hoffman CS, Shibata T, Ohta K. 2008. Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature* **456**: 130-134.
- Hirota K, Steiner WW, Shibata T, Ohta K. 2007. Multiple Modes of Chromatin Configuration at Natural Meiotic Recombination Hot

- Spots in Fission Yeast. *Eukaryotic Cell* **6**: 2072-2080.
- Hoffman CS. 2005. Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical Society Transactions* **33**: 257-260.
- Hoffman CS, Winston F. 1989. A transcriptionally regulated expression vector for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **84**: 473-479.
- Houseley J, Rubbi L, Grunstein M, Tollervey D, Vogelauer M. 2008. A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast GAL gene cluster. *Mol Cell* **32**: 685-695.
- Jacob F, Monod J. 1961. Genetic Regulatory Mechanism in the Synthesis of Proteins. *Journal of Molecular Biology* **3**: 318-356.
- Jonstone JR. 1949. *Molecular genetics of yeast: a practical approach*. Oxford University Press.
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2014. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic acids research* **42**: 199-205.
- Kaneko S, Son J, Shen SS, Reinberg D, Bonasio R. 2013. PRC2 binds active promoters and contacts nascent RNAs in embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 1258-1264.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* **14**: R36-R36.
- Kim T, Xu Z, Clauder-Munster S, Steinmetz LM, Buratowski S. 2012. Set3 HDAC mediates effects of overlapping noncoding transcription on gene induction kinetics. *Cell* **150**: 1158-1169.
- Lackner DH, Beilharz TH, Marguerat S, Mata J, Watt S, Schubert F, Preiss T, Bähler J. 2007. A Network of Multiple Regulatory Layers Shapes Gene Expression in Fission Yeast. *Molecular Cell* **26**: 145-155.
- Landry S, Pettit MT, Apolinario E, Hoffman CS. 2000. The fission yeast *git5* gene encodes a Gbeta subunit required for glucose-triggered adenylate cyclase activation. *Genetics* **154**: 1463-1471.
- Lasa I, Toledo-Arana A, Dobin A, Villanueva M, de los Mozos IR,

- Vergara-Irigaray M, Segura V, Fagegaltier D, Penadés JR, Valle J et al. 2011. Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 20172-20177.
- Leong HS, Dawson K, Wirth C, Li Y, Connolly Y, Smith DL, Wilkinson CR, Miller CJ. 2014. A global non-coding RNA system modulates fission yeast protein levels in response to stress. *Nature communications* **5**: 3947.
- Loewer S, Cabili MN, Guttman M, Loh YH, Thomas K, Park IH, Garber M, Curran M, Onder T, Agarwal S et al. 2010. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nature genetics* **42**: 1113-1117.
- Marguerat S, Schmidt A, Codlin S, Chen W, Aebersold R, Bahler J. 2012. Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes in proliferating and quiescent cells. *Cell* **151**: 671-683.
- Martens JA, Laprade L, Winston F. 2004. Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* SER3 gene. *Nature* **429**: 571-574.
- Martens JA, Wu PY, Winston F. 2005. Regulation of an intergenic transcript controls adjacent gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* **19**: 2695-2704.
- McCarrey JR, Riggs AD. 1986. Determinator-inhibitor pairs as a mechanism for threshold setting in development: a possible function for pseudogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 679-683.
- Miyoshi T, Ito M, Kugou K, Yamada S, Furuichi M, Oda A, Yamada T, Hirota K, Masai H, Ohta K. 2012. A central coupler for recombination initiation linking chromosome architecture to S phase checkpoint. *Mol Cell* **47**: 722-733.
- Nadal-Ribelles M, Sole C, Xu Z, Steinmetz LM, de Nadal E, Posas F. 2014. Control of Cdc28 CDK1 by a stress-induced lncRNA. *Mol Cell* **53**: 549-561.
- Nakayama Y, Yoshimura K, Iida H. 2012. Organellar mechanosensitive

- channels in fission yeast regulate the hypo-osmotic shock response. *Nature communications* **3**: 1020.
- Neely LA, Hoffman CS. 2000. Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways antagonistically regulate fission yeast *fbp1* transcription by employing different modes of action at two upstream activation sites. *Molecular and cellular biology* **20**: 6426-6434.
- Nguyen AN, Lee A, Place W, Shiozaki K. 2000. Multistep Phosphorelay Proteins Transmit Oxidative Stress Signals to the Fission Yeast Stress-activated Protein Kinase. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 1169-1181.
- Ni T, Tu K, Wang Z, Song S, Wu H, Xie B, Scott KC, Grewal SI, Gao Y, Zhu J. 2010. The prevalence and regulation of antisense transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. *PloS one* **5**: e15271.
- Ogihara H, Shima F, Naito K, Asato T, Kariya K, Kataoka T. 2004. Direct Activation of Fission Yeast Adenylyl Cyclase by Heterotrimeric G Protein *gpa2* *Kobe J Med Sci* **50**: 111-121.
- Ozsolak F, Kapranov P, Foissac S, Kim SW, Fishilevich E, Monaghan AP, John B, Milos PM. 2010. Comprehensive polyadenylation site maps in yeast and human reveal pervasive alternative polyadenylation. *Cell* **143**: 1018-1029.
- Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J, Nagano T, Mancini-Dinardo D, Kanduri C. 2008. *Kcnq1ot1* antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell* **32**: 232-246.
- Pelechano V, Steinmetz LM. 2013. Gene regulation by antisense transcription. *Nature reviews Genetics* **14**: 880-893.
- Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. 1996. Requirement for *Xist* in X chromosome inactivation. *Nature* **379**: 131-137.
- Pinskaya M, Gourvennec S, Morillon A. 2009. H3 lysine 4 di- and tri-methylation deposited by cryptic transcription attenuates promoter activation. *The EMBO journal* **28**: 1697-1707.
- Pontier DB, Gribnau J. 2011. *Xist* regulation and function explored. *Human*

- genetics* **130**: 223-236.
- Rhind N, Chen Z, Yassour M, Thompson DA, Haas BJ, Habib N, Wapinski I, Roy S, Lin MF, Heiman DI et al. 2011. Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science* **332**: 930-936.
- Rinn JL, Chang HY. 2012. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual review of biochemistry* **81**: 145-166.
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E et al. 2007. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**: 1311-1323.
- Roberts A, Trapnell C, Donaghey J, Rinn JL, Pachter L. 2011. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias. *Genome Biology* **12**: R22-R22.
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. 2011. Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology* **29**: 24-26.
- Rotem E, Loinger A, Ronin I, Levin-Reisman I, Gabay C, Shoresh N, Biham O, Balaban NQ. 2010. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 12541-12546.
- Scheuermann JC, Boyer LA. 2013. Getting to the heart of the matter: long non-coding RNAs in cardiac development and disease. *The EMBO journal* **32**: 1805-1816.
- Schulz D, Schwalb B, Kiesel A, Baejen C, Torkler P, Gagneur J, Soeding J, Cramer P. 2013. Transcriptome Surveillance by Selective Termination of Noncoding RNA Synthesis. *Cell* **155**: 1075-1087.
- Shieh JC, Martin H, Millar JB. 1998. Evidence for a novel MAPKKK-independent pathway controlling the stress activated Sty1/Spc1 MAP kinase in fission yeast. *Journal of Cell Science* **111**: 2799-2807.
- Struhl K. 2007. Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 103-105.

- Takayama K, Horie-Inoue K, Katayama S, Suzuki T, Tsutsumi S, Ikeda K, Urano T, Fujimura T, Takagi K, Takahashi S et al. 2013. Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. *The EMBO journal* **32**: 1665-1680.
- Tashiro S, Asano T, Kanoh J, Ishikawa F. 2013. Transcription-induced chromatin association of RNA surveillance factors mediates facultative heterochromatin formation in fission yeast. *Genes to Cells* **18**: 327-339.
- Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics* **14**: 178-192.
- Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammamaparast N, Wang JK, Lan F, Shi Y, Segal E, Chang HY. 2010. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* **329**: 689-693.
- van Dijk EL, Chen CL, d'Aubenton-Carafa Y, Gourvennec S, Kwapisz M, Roche V, Bertrand C, Silvain M, Legoix-Ne P, Loeillet S et al. 2011. XUTs are a class of Xrn1-sensitive antisense regulatory non-coding RNA in yeast. *Nature* **475**: 114-117.
- Wakamoto Y, Dhar N, Chait R, Schneider K, Signorino-Gelo F, Leibler S, McKinney JD. 2013. Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. *Science* **339**: 91-95.
- Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, Lajoie BR, Protacio A, Flynn RA, Gupta RA et al. 2011. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* **472**: 120-124.
- Welton RM, Hoffman CS. 2000. Glucose monitoring in fission yeast via the Gpa2 galpha, the git5 Gbeta and the git3 putative glucose receptor. *Genetics* **156**: 513-521.
- Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, Schubert F, Wood V, Goodhead I, Penkett CJ, Rogers J, Bahler J. 2008. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* **453**: 1239-1243.
- Wood V, Harris MA, McDowall MD, Rutherford K, Vaughan BW, Staines

- DM, Aslett M, Lock A, Bahler J, Kersey PJ et al. 2012. PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic acids research* **40**: D695-699.
- Xu Z, Wei W, Gagneur J, Clauder-Munster S, Smolik M, Huber W, Steinmetz LM. 2011. Antisense expression increases gene expression variability and locus interdependency. *Molecular systems biology* **7**: 468.
- Yamada S, Ohta K, Yamada T. 2013. Acetylated Histone H3K9 is associated with meiotic recombination hotspots, and plays a role in recombination redundantly with other factors including the H3K4 methylase Set1 in fission yeast. *Nucleic acids research* **41**: 3504-3517.
- Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ, Zhou MM. 2010. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell* **38**: 662-674.
- Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, Cui H. 2008. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature* **451**: 202-206.
- Zaragoza O, Gancedo JM. 2001. Elements from the cAMP signaling pathway are involved in the control of expression of the yeast gluconeogenic gene FBP1. *FEBS Letters* **506**: 262-266.
- Zhao J, Ohsumi TK, Kung JT, Ogawa Y, Grau DJ, Sarma K, Song JJ, Kingston RE, Borowsky M, Lee JT. 2010. Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Mol Cell* **40**: 939-953.
- Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. 2008. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* **322**: 750-756.