

論文の内容の要旨

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)

氏 名 小 田 有 沙

【背景】 生物の細胞では多種の非コード RNA(ncRNA)が転写されている。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の生命現象に関わる。これらの lncRNA は mRNA と同様に RNA ポリメラーゼ II によって転写され、5'キャップや polyA テールを持つなどの特徴を持つ。このような lncRNA の中には、発生や細胞制御などにおいて重要な役割を果たすことが報告されているものもあるが、多くは未だ機能が解明されておらず、謎に包まれている。

所属研究室では、分裂酵母で、グルコース飢餓時に糖新生遺伝子 *fbp1+* 上流から転写される lncRNA を見いだした(Hirota *et al.*, 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。この lncRNA は *fbp1+* ORF 領域も含む長い転写物であるが、mRNA とは異なる RNA 品質保証系で分解の制御を受けている事が明らかにされてきた (Galipon *et al.*, 2013)。

【結果と考察】 本研究では、まず、分裂酵母の *fbp1+*領域に見られる 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、グルコース飢餓ストレス応答における 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。RNA-seq データを用いて、グルコース飢餓ストレス直後に大きな発現変動を見せる遺伝子を階層的クラスタリング解析したところ、ストレス応答初期に見られる翻訳抑制に対応して翻訳系遺伝子群が抑制されること、代謝系遺伝子群が応答中期から後期にかけて誘導されることなどが明らかになった。グルコース飢餓に応答して転写が活性化される遺伝子群についてその特徴を調べると、その多くが転写開始点付近でストレス応答時にクロマチン構造の変化を伴う傾向を示した。また、遺伝子だけでなく ncRNA についても別途クラスタリングを実施したところ、ストレス遺伝子同様の制御を受けていることを示唆する結果を得た。しかし、一群の ncRNA においては、応答初期に顕著な誘導が認められた。この時期はタンパク質翻訳が全体に抑制されており、タンパク質群の切り替えに先行して lncRNA が合成されることでその間隙を埋めていることが示唆された。

次に、真核生物の様々なストレス応答において普遍的に重要な役割を果たす ATF/CREB ファミリー (Activation transcription factor /cAMP response element-binding protein) の転写因子である Atf1 欠損変異体を用いて、同様の RNA-seq を実施した。その結果、多くのストレス遺伝子同様、一群の lncRNA の発現制御においても Atf1 への強い依存性が観察された。上記の結果を総合すると、lncRNA 転写が単なる転写ノイズでなく、ストレス応答において重要な制御的役割を果たすと考えられる。

fbp1+ lncRNA と類似の性質を有する lncRNA をゲノムワイドに検索する目的で RNA-seq データの波形パターンを統計的に解析するツールを作成した。このツールを用いて *fbp1+* lncRNA と同じ性質を有する 9 つの lncRNA 候補領域を同定した。ノザン解析や ChIP-seq 解析、*atf1Δ*変異体を用いた実験により、多くの候補領域が実際に連続的な lncRNA を合成すること、Atf1 依存性を示すこと、グルコース飢餓時に局所的なクロマチン構造変化を伴うことを示した。これらの lncRNA はいずれもグルコース飢餓ストレスに対応する遺伝子群であり、*fbp1+*遺伝子と同様な制御系の支配下にあるレギュロンを構成することが示唆された。

本研究の鎖特異的な RNA-seq 解析の結果から、*fbp1+*を含め、上記の lncRNA 候補領域のいずれにおいても、グルコースが豊富な条件下で同じ領域でアンチセンス lncRNA が転写されていた。このうち 5 カ所については、グルコース飢餓ストレスに応答したセンス鎖

RNA の転写の活性化に伴いアンチセンス RNA の発現量が減少していた。すなわち、センス RNA とアンチセンス RNA の発現に逆相関が認められた。この結果は、センスとアンチセンス RNA の間に何らかの相反的な制御ネットワークが存在することを示唆する。そこで次に、グルコースが豊富な条件下で *fbp1*⁺コード領域で転写されるアンチセンス lncRNA (*fbp1-as*) に注目し、*fbp1-as* がセンス鎖の *fbp1*⁺ lncRNA や mRNA の発現にどのような役割を果たすのか検討した。

まず、*fbp1-as* について、RACE 解析や、ノザンプロット解析を実施し、*fbp1-as* がセンス鎖 lncRNA の転写領域とほぼ重複するように転写される lncRNA であることを明らかにした。しかも、*fbp1-as* はグルコース飢餓条件下では発現が見られず、グルコース飢餓ストレス条件下において転写されるセンス鎖 lncRNA や mRNA とは相反的に発現した。

次に、誘導性プロモーターを持つプラスミド上にこの *fbp1-as* 遺伝子を配置して誘導合成系を構築し、*fbp1-as* の誘導発現によりセンス鎖 RNA の転写への影響を調べた。その結果、*fbp1-as* を過剰発現させると、グルコース飢餓時であっても同じ DNA 分子上からのセンス鎖 RNA 合成が著しく抑制された。

fbp1-as の発現が見られるのは、主にグルコースが豊富な条件下である。そこで、グルコース飢餓状態にある細胞にグルコースを再添加する実験を行い、*fbp1*⁺の発現を調べた。その結果、グルコースの再添加によって、mRNA が急速に消失した。一方で、*fbp1-as* は mRNA の消失にやや遅れて発現量が回復した。

上記の実験結果から、*fbp1-as* はセンス方向の転写物を負に制御することが示唆された。またグルコース再添加時に mRNA が急速に消失したことから、mRNA の分解に *fbp1-as* が何らかの役割を果たすのではないかと考えた。

この仮説を検証するため、次にグルコース再添加時における *fbp1*⁺ mRNA の不安定化機構を解析した。グルコース再添加時には、一時的に mRNA と *fbp1-as* が共存する時期があることを考慮し、二本鎖 RNA の分解制御に関わる RNase の一種 Dicer に注目した。結果として、グルコース再添加時に、部分的ではあるものの Dicer 依存的に mRNA の安定性が低下することを見出した。ただし、グルコース飢餓条件下ではこのような Dicer 依存的な mRNA の不安定化は見られなかった。また、グルコース再添加と同時に RNA 合成阻害剤であるフェナントロリンを加え、*fbp1-as* の合成を抑制した上で mRNA の安定性を調べたところ、mRNA の著しい安定化が観察された。このことから、グルコース再添加時に、少なくとも部分的に Dicer が *fbp1-as* に依存して mRNA の安定性を制御することが示唆された。

*fbp1⁺*の発現は通常の遺伝子発現の時間経過に比べると、①一定期間の活性化遅延が存在する、②mRNA 抑制は急速であるという傾向がある。このような発現制御は、双安定性スイッチ(bistable switch)やミカエリス・メンテン型の制御系と類似のシステムを構成していると考えられる。lncRNA には遺伝子発現制御に重要な役割を果たすものがあり、特に、哺乳類の X 染色体不活化の制御に関わるセンス鎖・アンチセンス鎖 lncRNA である *Xist/Tsix* などは相反的で双安定な制御を取ることが知られる。

そこで、*fbp1⁺*における転写制御の過程に関する数理モデルを構築し、*fbp1⁺*の転写のダイナミクスをシミュレーションし、センス鎖 lncRNA 及びアンチセンス lncRNA の mRNA 発現制御への寄与を検証した。シミュレーションの結果、グルコース飢餓ストレスを受けると、プロモーター領域で転写される lncRNA が mRNA の発現タイミングを遅らせる「遅延装置」のような役割を果たすことが確認された。また、グルコース飢餓ストレス下からグルコースを再添加する状況をシミュレーションすると、*fbp1⁺* mRNA と *fbp1-as* の発現が急速に交替するダイナミクスが確認できた。

最後に上記の様な lncRNA の制御ネットワークが必要とされる理由を考察した。*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 をシャットダウンする必要がある。上記のような確実でメリハリのある応答をする場合に 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示した。同様なセンス・アンチセンス lncRNA ネットワークを介した遺伝子発現制御は、他の真核生物の遺伝子発現においても綿密かつ頑強な遺伝子発現制御に関わっているものと考えられる。