

令和 4 年 10 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18477

研究課題名(和文)非コードRNAを介した遺伝子発現制御によるマクロな適応現象の解明

研究課題名(英文)Macro level cellular adaptation by lncRNA mediated gene regulation

研究代表者

小田 有沙(Oda, Arisa)

東京大学・教養学部・特任助教

研究者番号：00760084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：環境変動ストレスへの応答機構の解明は生物の適応戦略を知る上で重要である。分裂酵母ではグルコース飢餓に反応して非コードRNAに依存した遺伝子発現制御が観察される。数多くの非コードRNAの普遍的な分子機能が報告されているがその意義やダイナミクスは殆ど未解明である。本研究は、ミクロな分子レベルでの非コードRNAを介した遺伝子制御がマクロな細胞・細胞集団レベルで適応に寄与する原理を実験・理論の両面から検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

lncRNA依存的な遺伝子発現の制御メカニズムを分子レベルで解明するだけでなく、マクロな細胞集団レベルでの適応における役割を検証し、従来の分子生物学の枠にとられない新たな切り口で現象を説明した。厳しい栄養飢餓環境下で、能動的な移動手段を持たない単細胞生物が、環境にうまく適応して自らのリネージが生き延びるリスクヘッジの様子を、実験・数理モデルの両面から説明した。

研究成果の概要(英文)：Long noncoding RNAs serve critical regulatory functions in many biological phenomena. Some sense and antisense long noncoding RNAs are known to have antagonistic regulation. In *S. pombe*, glucose starvation induces sense long noncoding RNA transcription which leads to chromatin changes around *fbp1* promoter. *fbp1* codes for a gluconeogenesis enzyme, fructose-1, 6-bisphosphatase and is repressed in glucose rich condition. Importantly, overlapping with the regions for sense long noncoding RNA transcription, small amounts of antisense RNAs are antagonistically transcribed in glucose rich condition. To estimate the effect of sense and antisense long noncoding RNA transcription, we conducted mathematical modeling of transcriptional dynamics at the *fbp1* locus during changes in glucose concentration. From this study, it is suggested that the long noncoding RNA mediated gene regulation system is beneficial for survival of yeast cells under stressed condition.

研究分野：細胞生物学

キーワード：酵母 ストレス応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞では多種の非コード RNA が転写されており、なかでも長鎖非コード RNA はクロマチンやヒストン修飾を介して高次の生命現象の制御に関わる。特に、高等動物において、ゲノムの非コード領域であっても、実に多様な lncRNA が転写されており、様々な生命現象において重要な役割を果たしていることが明らかにされてきたものの、その存在意義が明らかになっているものは、ほんの一部にとどまる。

lncRNA は高等生物だけでなく真核生物において、普遍的に存在している。真核生物の中でも比較的シンプルなゲノム構造を持つ単細胞モデルとして、酵母が挙げられるが、酵母でも機能性の lncRNA の存在が報告されている。たとえば、グルコース飢餓時に働く、糖新生の酵素をコードする遺伝子 *fbp1* の転写は上流域から転写される複数のセンス lncRNA 依存的に誘導される (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へと移行し、プロモーター領域のクロマチン再編成を伴って遺伝子の活性化を引き起こす。

一方で、グルコースが豊富な条件下では *fbp1* 領域では、アンチセンス RNA が転写されていることを報告してきた (Oda et al. 2015)。しかし、なぜ、*fbp1* 遺伝子座では、センス・アンチセンスの lncRNA の複数の lncRNA が遺伝子の発現を制御するのか、その、生物学的な意義、というものは説明が簡単ではない。

### 2. 研究の目的

今日までの科学研究において、様々なシグナルパスウェイやネットワーク、分子レベルでの遺伝子の機能や制御について、生物学的な解析がなされ、膨大なデータが蓄積されてきた。しかし、その、たんぱく質や核酸などの分子レベルでの生体内反応のひとつひとつの変化が統合して、複雑な生命の細胞や個体において、動態としてどのような生命現象として現れるのか、ということ解析するのは難しい。

そこで、本研究では、分子レベルでの遺伝子発現制御が細胞・細胞集団レベルでのマクロな生命現象や生存戦略に及ぼす効果を明らかにすることを目的とした。特に、上述の酵母のグルコース飢餓ストレス応答の過程に関して、*fbp1* 遺伝子発現ダイナミクスを解明することで、なぜ lncRNA 依存的な遺伝子発現制御が行われているのかを解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

このために、単細胞モデル生物である分裂酵母の飢餓応答を、分子生物学の実験と生物物理学的な理論の両方の切り口から評価し、複数のセンス・アンチセンス lncRNA の関与する複雑な遺伝子発現制御系の適応的なメリットを検証することにした。

特に、本研究では、グルコース濃度の変動に応じた *fbp1* 遺伝子と lncRNA の発現を実験的に調べ、lncRNA・mRNA の発現が、細胞ごとにどの程度ばらつくか、などに主眼を置いて検証した。また、細胞集団のグロースを定量的に評価する系を作成し、特定の環境下での細胞集団の適応状態を様々な環境で測定し、そのダイナミクスを観察した。

さらに実験データを元にした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。シミュレーションで得られた結果から、考えられる細胞集団の環境変動のリスクヘッジのモデルを考え、さらに、この知見を生かして、特定の変異株を作成し、実験にフィードバックをすることでさらなる理解を目指した。

### 4. 研究成果

まず、定量的な適応状態の評価のために、分裂酵母の細胞増殖の定量系を確立した。この系では、試験管内にセットした酵母を一定の条件でカルチャーしながら、毎分、連続的に濁度を測定し続けることで、細胞が環境変動下で、どの程度の速度で増殖しているのかを評価できるようになった。増殖の増分の測定だけでは、細胞の生死などの状態は評価しきれないので、酵母の生死判定に一般的に使用される(蛍光)色素や FACS、顕微鏡などを併用して、1つ1つの細胞、あるいはその(分裂直後の)リネージがどの程度元気に増殖しているかも評価できるよう、観測系を整えた。

その上で、分裂酵母にグルコース飢餓ストレスや、グルコースを再添加して、炭素源環境の変動時における *fbp1* 遺伝子のセンス・アンチセンス lncRNA、および mRNA の発現の切り替わりを観察したところ、センス lncRNA

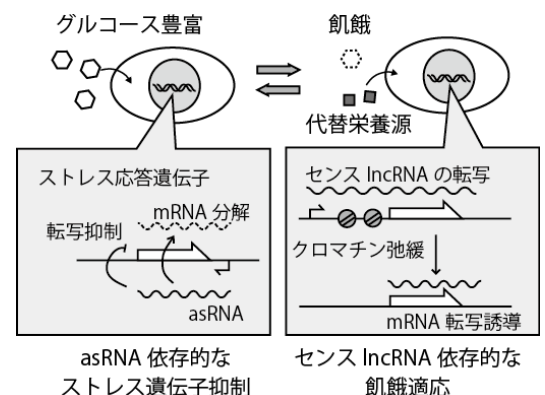


図 1 lncRNA 依存的 *fbp1* 遺伝子の発現制御

は、プロモーター領域のクロマチン構造を弛緩させ、転写因子やエピジェネティック因子などと相互作用することにより、飢餓時に mRNA を適切なタイミングで、一気に発現させることが明らかになった(NAR, 2016)。一方で、アンチセンス lncRNA は、グルコースが豊富な条件下では、mRNA が転写されないように、mRNA の転写抑制や分解の促進などの機能を担う可能性が示唆された(図 1)。ただし、mRNA の発現量に比して、lncRNA の量は少なく、微量の lncRNA が、環境に応じて、mRNA の発現を頑強かつタイミングよく制御しているモデルが想定された。

そこで、この実験結果をもとに、微量のセンス・アンチセンスの lncRNA を介した遺伝子発現の決定論的な数理モデルを構築し、グルコース飢餓ストレスへの応答シミュレーションを行なった(図 2)。その結果、これらの lncRNA が複雑に関与する制御は、環境変動に対して明確な遺伝子発現の on/off のスイッチングを可能とする ultrasensitivity 系として作用する可能性が示唆された。この lncRNA 依存的な発現制御モデルについて、環境変動に対する生物の適応的な意義を説明した。このモデルでは、各細胞が、*fbp1* mRNA 遺伝子の発現が on または off のどちらかの状態をとる方が、すべての細胞で中間的な発現量の mRNA を発現するよりも、細胞集団レベルでの適応性を増すことが説明された。このことから、lncRNA 依存的な遺伝子発現制御が細胞集団として、環境変動へのリスクヘッジを行い、自らのリネージが生き残る生存戦略が考えられた。

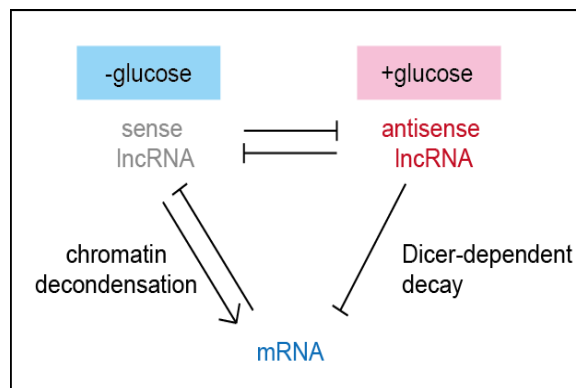


図 2 センス/アンチセンス lncRNA の制御

この結果から、さらに、細胞集団レベルでの適応を実験的に定量することで、ミクロな分子レベルでのストレス応答とマクロな細胞集団レベルでの適応を対応づけた。酵母のストレス応答時に、細胞内での分子状態が細胞集団としての安定的な適応を引き起こす包括的なシステムを説明し、自ら積極的な移動手段を持たない酵母が、変動する環境下で生き延びるための、生存戦略への理解を深めた。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Linear Regression Links Transcriptomic Data and Cellular Raman Spectra.

Kobayashi-Kirschvink KJ, Nakaoka H, Oda A, Kamei KF, Noshio K, Fukushima H, Kanasaki Y, Yajima S, Masaki H, Ohta K, Wakamoto Y  
Cell systems 7(1) 104-117.e4 2018 年 査読有  
DOI: 10.1016/j.cels.2018.05.015

Phenotypic diversification by enhanced genome restructuring after induction of multiple DNA double-strand breaks.

Muramoto N, Oda A, Tanaka H, Nakamura T, Kugou K, Suda K, Kobayashi A, Yoneda S, Ikeuchi A, Sugimoto H, Kondo S, Ohta C, Shibata T, Mitsukawa N, Ohta K  
Nature communications 2018 年 査読有  
<https://www.nature.com/articles/s41467-018-04256-y>

Three-dimensional reconstruction of single-cell chromosome structure using recurrence plots.

Hirata Y, Oda A, Ohta K, Aihara K, Scientific reports 2016 年 査読有  
<https://www.nature.com/articles/srep34982>

Local potentiation of stress-responsive genes by upstream noncoding transcription.

Takemata N, Oda A, Yamada T, Galipon J, Miyoshi T, Suzuki Y, Sugano S, Hoffman CS, Hirota K, Ohta K, Nucleic acids research 2016 年 査読有  
DOI: 10.1093/nar/gkw142

医学のあゆみ 269 巻 4 号 ncRNA の医科学と医療 II: 『lncRNA の機能 クロマチンへの制御機能』 小田有沙・太田邦史(2019/4) 査読無

バイオサイエンスとインダストリー誌 Vol.76 No.5 『制限酵素を用いた新しいゲノム改良技術～大規模ゲノムシャuffling 「TAqing システム」』 小田有沙、太田邦史 (2018/9) 査読無

『Hi-C という染色体の立体パズルを解く』、小田有沙、平田祥人、太田邦史、合原一幸、実験医学別冊『シングルセル解析 実験ガイド』(2017年9月号) 査読無

〔学会発表〕(計 11件)

Arisa Oda, Takahiro Nakamura, Nobuhiko Muramoto, Hidenori Tanaka, Kazuto Kugou, Kunihiro Ohta, Artificial Genome Rearrangement System using a Restriction Enzyme, CSHL meetings 2018, The Biology of Genomes, 2018

小田有沙, 中村隆宏, 村本伸彦, 田中秀典, 久郷和人, 光川典宏, 太田邦史, TAQing: 制限酵素を用いたゲノムシャッフリング技術, 生命科学系フロンティアミーティング 2018 (国立遺伝学研究所研究会), 2018

小田有沙, 平田祥人, 太田邦史, 合原一幸, Hi-C データで得られる染色体の距離情報を扱う, 日本遺伝学会第90回大会, 2018

A. Oda, T. Nakamura, N. Muramoto, H. Tanaka, K. Kugou, K. Ohta, "TAQing : Artificial Genome Rearrangement by a Restriction Enzyme, TaqI.", The 11th 3R&3C Symposium, 2018

Arisa Oda Yoshito Hirata Kunihiro Ohta & Kazuyuki Aihara, 3D chromosome structure reconstruction from single-cell Hi-C data using recurrence plots, 6th Annual Winter q-bio Meeting, 2018

小田有沙, 中村隆宏, 村本伸彦, 田中秀典, 久郷和人, 光川典宏, 太田邦史, 制限酵素を用いた人為的ゲノム再編誘導, 第35回染色体ワークショップ 第16回各ダイナミクス研究会, 2017

小田有沙, 平田祥人, 太田邦史, 合原一幸, Hi-C のデータから染色体の立体構造を解く, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017

Arisa Oda Tetsuhiro Hatakeyama Kunihiro Kaneko & Kunihiro Ohta, Transcriptional dynamics of sense and antisense long noncoding RNAs during glucose starvation, The 9th International Fission Yeast Meeting, 2017

小田有沙, 平田祥人, 太田邦史, 合原一幸, 1細胞Hi-Cを用いた染色体3次元構造解析手法, 第34回染色体ワークショップ 2017

Arisa Oda Yoshito Hirata Kunihiro Ohta & Kazuyuki Aihara, Reconstruction of single-cell chromosome 3D structure using recurrence plots, 2017

小田有沙, 平田祥人, 太田邦史, 合原一幸, 1細胞Hi-Cによる染色体3次元構造解析手法, 第39回日本分子生物学会年会 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 『空間的な近さの概念を用いた生体分子データの3次元構造の再構成方法』

発明者: 平田祥人、小田有沙、太田邦史、合原一幸

権利者: 同上

種類:

番号: 2016-023214

出願年: 2016

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：畠山哲央  
ローマ字氏名：Tetsuhiro S. Hatakeyama

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。