

平成 21 年 3 月 23 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510200
 研究課題名(和文) RNA ポリメラーゼ I の活性化の分子基盤とリボソーム合成調節との階層性
 研究課題名(英文) The molecular mechanism to coordinate activation of RNA polymerase I with ribosomal biogenesis
 研究代表者
 禾 泰壽 (NOGI YASUHISA)
 埼玉医科大学・医学部・教授
 研究者番号：60101937

研究成果の概要：RNA polymerase I (Pol I) と rDNA 転写因子 (Rrn3p) は対数増殖期には核小体に局在しているが、定常期には Pol I と rDNA 転写因子は細胞質に移動して rDNA の転写を低める。また酸化ストレス存在下では転写因子 Rrn3 が速やかに分解することにより rDNA 転写が停止する。従って Rrn3p の核小体内への局在が Pol I の活性化に必要である。この Rrn3p は N 末側と C 末側で相互作用するが、Rrn3p の N 末端はリボソームタンパク S0A と S0B とともに相互作用してその活性を調節している可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム調節, RNA polymerase I, リボソーム DNA, 転写

1. 研究開始当初の背景

すべての真核細胞には 3 種類の RNA polymerase がある。RNA polymerase I (Pol I) はリボソーム rDNA を転写し、35S リボソーム RNA (35S rRNA) 前駆体 (それらは 18S rRNA, 5.8S rRNA, 25S rRNA にプロセスされリボソームタンパクと会合し、5S rRNA もリボソーム形成に加わりタンパク合成に必要なリボ

ソームを構成する) を作り、RNA polymerase II (Pol II) はタンパクをコードする遺伝子 (リボソームタンパク遺伝子を含む) を転写して mRNA を作り、RNA polymerase III (Pol III) は tRNA や 5S リボソーム RNA のような低分子 RNA を作る。細胞はこれらの RNA の転写量を相互に調節してそのリボソーム量を調整し、タンパク合成を調節した恒常性を維持

している。増殖のよい細胞では 35S rRNA 転写量は RNA 全転写量の 60%を占め、Pol II の全転写の中で、リボソームタンパク遺伝子の転写は約 50%を占めるので計算上リボソームタンパク遺伝子は全 RNA 中 20%を占め、結果リボソームの合成には細胞全 RNA の 80%以上が消費される。細胞はこれらの別々の RNA polymerase により転写される RNA 量をエネルギー節約の必要性から調節して ATP を節約して必要十分量のリボソームを合成する機構を持っている (Pol III で転写される 5SrRNA の転写量も Pol I, Pol II の転写量に協調して調節されている)。この Pol I, Pol II, Pol III の活性調節機構の分子基盤を研究するには、細胞環境に増殖飽和状態、栄養不良状態、酸化等のストレスを加えて、この協調機構の変動に伴い挙動が変化する (転写量、翻訳量、細胞内局在性、タンパク修飾状態等) 関連分子を明らかにし、その調整機構を解析すればよい。上記ストレスが細胞にかかると Pol I, Pol II, Pol III は共通のストレスセンサーを介して各々の転写量を調節してリボソーム合成を調節し、タンパク合成を調整する。現在この共通のストレスセンサーは TOR(Target of Rapamycin)キナーゼであり、TOR キナーゼが Pol I, Pol II, Pol III の調節タンパク群をリン酸化することにより RNA 合成の調節が行われるというとする仮説が最も有力である。しかし Laferte et al., (Genes 6 Dev.20:2030, 2006))は出芽酵母において *RPA43-RRN3* 融合遺伝子を発現させると、Rapamycin によるリボソームタンパク遺伝子の転写阻害と rDNA 転写阻害の協調性が破綻している事を明らかにし、Rapamycin の第一標的は Pol I の Rrn3p による活性化阻害 (Rrn3p が Pol I に結合するのが調節される) であり、リボソームタンパク遺伝子転写阻害は rRNA の転写量減少が未知

のセンサーに検出され、リボソームタンパク遺伝子転写が阻害されるという二次的な現象であるという仮説を提案した。

2. 研究の目的

我々は以前に分裂酵母において Rrn3p の Pol I への結合が Pol I の活性化をもたらす、その結合には RPA21(RPA43 の分裂酵母ホモログ)が必要で Ker1p がその結合を促進することを報告した (Imazawa et al., JBC.280.11467)。本研究では Rrn3p の Pol I への結合による活性化で rDNA 遺伝子の転写促進がおき、リボソームタンパク遺伝子の転写が活性化されることで Pol I と Pol II の活性の協調性が維持され、リボソーム合成が調節され、最終的に細胞のタンパク合成の恒常性が維持されている可能性について出芽酵母なみの分子遺伝解析ができ、かつヒト細胞により近い分裂酵母で明らかにする。

3. 研究の方法

(1)分裂酵母の Rrn3p が出芽酵母 *rrn3* 変異を相補するか否かを調べるために分裂酵母 *rrn3* 遺伝子を出芽酵母発現ベクターにつなぎ *ADH1p* で発現できるプラスミドを構築した。出芽酵母 *rrn3* 変異株は我々の保存株より 416-5A (*rrn3-416*) を用いた。(2) Rrn3p の Pol I への結合を Ker1p が促進すること、RPA21 が Rrn3p の標的であることを調べるために *rrn3-ker1-tdimer2*, 及び *rrn3-rpa21-tdimer2* 融合遺伝子を構築した。*ker1* 欠失株は我々の保存株 Y128-5B を用いた。(3) Pol I サブユニット RpA190, Ker1p, rDNA 転写因子 Rrn3p の各遺伝子に赤色蛍光タンパク遺伝子 DsRed (*tdimer2* 遺伝子) を融合した遺伝子を構築し、KanMX6 マーカー (G418 耐性) を用いて酵母染色体の本来の位置 (本来のプロモーターで融合遺伝子を発現させるため) に置換法で分裂酵母野生株 JY742 (*ade6*,

leu1, ura4)に形質転換した。核小体のマーカーとして核小体局在タンパク fibrillar in の遺伝子 *fib1* に緑色蛍光を発現する GFP 遺伝子を融合せしめ上述の形質転換体に導入した。これらの二重蛍光標識株に細胞増殖ストレス(増殖定常期、栄養源飢餓、酸化ストレス等)を加え、核小体局在性の変化を調べた。(4)Pol Iの活性化を担うのは Rrn3p である。Rrn3p にどのようなタンパクが相互作用して Rrn3p の Pol I 結合性に影響を与えるかを調べるために Rrn3p を bait にして酵母 two-hybrid 法で Rrn3p に相互作用するタンパクを同定した。そのために pAS2-1 の GAL4BD に Rrn3p の全長を融合させて、two-hybrid 法レポーター株出芽酵母 Y190 に導入した。導入株に分裂酵母の全 cDNA を GAL4AD に融合せしめた pGAL4AD 分裂酵母 cDNA バンクを prey として形質転換して、3-AT(amino triazole)耐性形質転換株を選択した。選択された 3-AT 耐性株より GAL4AD-cDNA を回収し、単離された cDNA の配列を決め、相互作用する遺伝子を同定した。

4. 研究成果

(1)分裂酵母(*S. pombe*)の Rrn3p が出芽酵母(*S. cerevisiae*)*rrn3* 変異を相補する。出芽酵母の *rrn3-416* 変異株(35SrDNA 遺伝子が *GAL7* promoter で転写されるため、ガラクトース培地で増殖できるが、グルコース培地では増殖できない)に *ADH1p*で *S. pombe* の *rrn3* を発現できるようにした plasmid (pKI105)を導入したところ、*S. pombe rrn3* 導入株はグルコース培地で増殖できた。従って分裂酵母 Rrn3p の機能は酵母種を超えて保存されている事が明らかになった(図1)。

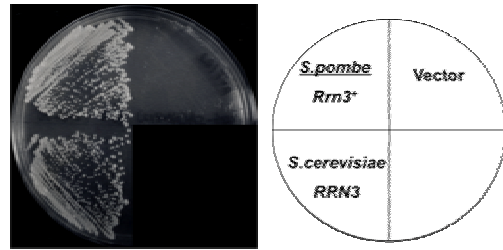


図1. *S. pombe rrn3* は *S. cerevisiae rrn3* 変異を相補する。

(2)Ker1p は Pol I サブユニット RPA21(RPA43 ホモログ)を介して Rrn3p の Pol I への結合を促進する。我々は以前に *ker1* 欠失変異が *rrn3* または *rpa21* の過剰発現で抑制される事を見いだした。本論文ではさらに

rrn3-ker1-tdimer2 及び

rrn3-rpa21-tdimer2 融合遺伝子を構築し、*ker1* 欠失株 YI28-5B の *rrn3* 遺伝子座に置換挿入して、*ker1* 欠失株の温度感受性増殖が抑制されるか否を調べた。つまり *rrn3* 結合型 Pol I を構築してそれが *ker1* 非依存的に機能するかを調べた。その結果

rrn3-ker1-tdimer2 は強く

rrn3-rpa21-tdimer2 は中間程度に温度感受性を抑制した(図2)。この事で Ker1p は Rrn3p と RPA21 の相互作用を促進している仮説が支持された。

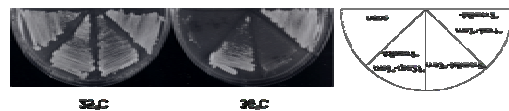


図2. *rrn3-ker1-tdimer2* 融合遺伝子と *rrn3-rpa21-tdimer2* 融合遺伝子は *ker1* 欠失変異株の温度感受性増殖を抑制する。

(3) 対数増殖期と定常期で RPA190, Ker1p, Rrn3p の核小体局在性を明らかにするために分裂酵母 RNA ポリメラーゼ I (Pol I) サブユニット RPA190, Ker1p, リボソーム DNA (rDNA) 転写因子 Rrn3p の各々と DsRed (赤色蛍光タ

ンパク)との融合遺伝子を構築し、染色体の本来の遺伝子の位置にそれぞれ置換挿入した。核小体のマーカーとして fibrillar in に GFP を融合せしめた遺伝子 (*fib1-GFP*) を構築し上記の株に形質転換した。これらの二重形質転換株(核小体は緑色蛍光、RPA190, Ker1p, Rrn3p は赤色蛍光を発する)を最小培地で増殖せしめ、対数増殖期 (A600 が約 0.3-06) と定常期 (A600 が約 3.0 以上) にサンプルを分離し、核を Hoechst33342 で染色し、Fib1-GFP (核小体マーカー) と各 RPA190-DsRed, Ker1p-DsRed, Rrn3p-DsRed の局在性について生細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより調べた。その結果対数増殖期には RPA190, Ker1p(それぞれが Pol I サブユニット)、Rrn3p(rDNA 転写因子)は核小体に局在しているが、定常期にはそれぞれは細胞質に塊状で多数分散していることが示された(図3)。この事から定常期になり rDNA 転写が減衰するのは特異的なサブユニットが核小体から離脱するためではなく、むしろ Pol I 全体が核小体から離脱する事が転写減衰の原因であることを明らかにした。

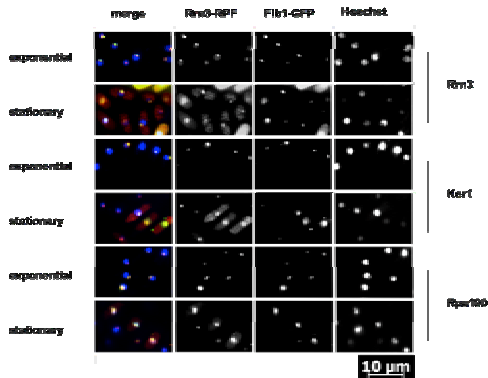


図3 .Rrn3p, Ker1p と RPA190 は対数増殖期は核小体に局在するが、定常期には細胞質に移動する。

(4) rDNA 転写が核小体構造の維持に必要である。温度感受性 *rpa190* 変異 (*nuc1*) を用いた研究から Pol I サブユニット RPA190 は核小

体構造の維持に構造的に必須であると信じられているが rDNA 転写は必要ないと考えられている。 *ker1* 失株に *rrn3*-DsRed, *fib1*-GFP をもつ plasmid を形質転換し、rDNA 転写の停止する非許容温度で核小体構造を蛍光で調べると核小体が核より離脱していることが示され、核小体構造の維持には Pol I サブユニットよりも rDNA 転写が必要であることが示された。許容温度では Ker1p 非存在下で核小体構造は維持されていて、Rrn3p も核小体に局在していた(図4)。

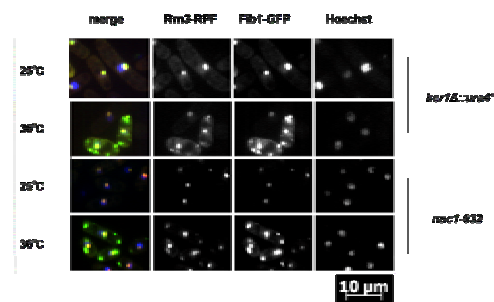


図4 .rDNA 転写が核小体構造の維持に必要である。

(5) 酸化ストレスが環境中(培地)に加わると Rrn3p は分解する。酸化ストレスとして過酸化水素によるストレス (4mM H₂O₂) を細胞に加えると少数の RPA190, Ker1p は核に残るが、大多数は細胞質に分散し、Rrn3p は核より消失した。酸化ストレスは Pol I より Rrn3p 自体が主要な標的である事を示した。

(6) Rrn3p の全長を bait にして酵母 two-hybrid法で Rrn3p と相互作用するタンパクを同定した。Rrn3p と相互作用するのは Rrn3p の C 末 (393-599 amino acid) とリボソームタンパク S0A と S0B であった(図4)。さらに Rrn3p の欠失解析から Rrn3p の N 末側 (1-431 amino acid) が Rrn3p の C 末端側 (393-599 amino acid) と相互作用すること、Rrn3p の N 末端側 (1-236 amino acid) はリボ

ソームタンパク S0A と S0B と相互作用することを明らかにした。欠失変異の解析では Rrn3p の C 末側の相作用必須領域は 393-549 amino acid の領域であり、C 末端そのものは不必要であった。一方 Rrn3p の N 末端側から 431 amino acid までの領域は N 末端側として必要である。また N 末側にはリボソームタンパク S0A または S0B が結合するので、Rrn3p の N 末端側と Rrn3p の C 末端側の相互作用がリボソームタンパク S0A と S0B で調節されている事が示唆された。つまり rDNA 転写因子が翻訳機構から何等かのシグナルを受ける機構があると予想できる。

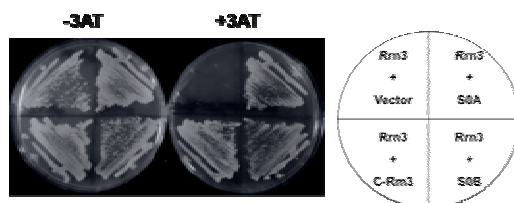


図5 .Rrn3p は Rrn3p の C 末端、リボソームタンパク S0A, S0B と相互作用する。

7)出芽酵母の Rrn3p が rDNA 転写開始後、転写身長反応に移るときに Pol I から離脱するのに Pol I サブユニット RPA49 と RPA34 が必要であることを P. Thuriaux (France) との共同研究で明らかにした(文献1)

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Beckouet F, L.-Marriottte S, Albert B, Imazawa Y, Werner M, Gadal O, Nogi Y & Thuriaux P. Two RNA polymerase I subunits control the binding and release of Rrn3 during transcription. Mol. Cell. Biol. 28:1596-1605 (2008), 査読有り

[学会発表](計1件)

井田 唯、荒木智之、松本征仁、中村光裕、平崎正孝、光澤浩、山下朗、山本正幸、禾 泰壽. 分裂酵母リボソームRNA (rDNA) 転写制御因子 Rrn3P (TIF1A) の細

胞内局在性と rDNA 転写調節、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会(2008)神戸ポートアイランド

6 . 研究組織

(1)研究代表者

禾 泰壽 (NOGI YASUHISA)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60101937