

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840007

研究課題名(和文) ストレス交差耐性におけるクロマチン構造変化と遺伝子発現制御

研究課題名(英文) Regulation of chromatin structure and gene expression in cross-tolerance to environmental stress

研究代表者

樽本 雄介 (Tarumoto, Yusuke)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：70551381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、変動する環境からのストレス、特に低容量のストレスに対する細胞の応答を明らかにするため、ストレス適応応答の1つである交差耐性に着目して因子や分子機構の解析を行った。交差耐性とは、低容量で非致死のストレスにさらされた際に、その後さらされる異なる種類の高容量ストレスへの抵抗性を一過的に獲得する現象である。これまでに交差耐性に必要な因子として同定したCpc2が、ヌクレオソームの制御を介してストレス応答に必要な遺伝子の発現制御に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have studied cellular responses to low-dose environmental stress. Cross-tolerance is an adaptive phenomenon, in which exposure to low-dose stress confers transient resistance to other form of high-dose stress. Previously we have identified Cpc2 as an important factor for cross-tolerance. This study revealed that Cpc2 plays a role in the regulation of stress-induced gene expression via facilitating nucleosome remodeling.

研究分野：分子生物学

キーワード：ストレス応答 シグナル伝達 遺伝子発現制御 クロマチン

## 1. 研究開始当初の背景

生物は様々な環境の変化によるストレスにさらされており、そのストレスの強度、種類は時間とともに変動する。例えば、好気的環境下に生存する生物はみな低容量の酸化ストレスと紫外線ストレスにさらされている。そのようなストレスの多くは、それ単独では細胞死などの明確な表現型を示さないような低容量である。ストレスの蓄積が、細胞や個体の老化、幹細胞の再生能の低下などにつながることは近年明らかになっており、さらされる頻度が高いであろう低容量ストレスに対する応答が、個体や組織の維持に重要であることが示唆される。一方で、がん細胞は初期段階において低酸素、低栄養などの種々のストレスを断続的に受けることが知られており、低容量ストレス応答あるいは変動するストレス環境下での応答がその生存、悪性化に影響すると考えられる。このように、低容量ストレス応答や変動するストレス環境への応答は、細胞および生体の運命に大きく関わっていることから、低容量ストレスや変動するストレス環境に対する細胞の応答機構は生物が備える基本的な機能の1つとして進化の過程で発達してきたと考えられる。しかし、その理解は十分に進んでいない。その大きな原因として、低容量ストレス応答や変動するストレス環境への応答をきちんと評価できる系がなかったことが挙げられる。

交差耐性とは、低容量で非致死のストレスにさらされた際に、その後さらされる異なる種類の高容量ストレスへの抵抗性を一過的に獲得する現象である。酵母、哺乳類細胞など多くの生物種で観察されている。この現象では、単独では明確な変化が現れず解析が困難な低容量ストレス応答の表現型を、続けてさらされる高容量ストレスに対する抵抗性の上昇として客観的に観察できることから、申請者らはこの現象を利用して低容量ストレス応答に関与する分子の探索を行ってきた(Chujo M. et al. J. Biol. Chem 2012)。しかし、その分子機構は不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

本研究では、交差耐性を実験系として利用し、変動するストレス環境下および低容量のストレス環境下における細胞のストレス応答の分子機構を解明することを目的とする。申請者は、これまでに分裂酵母の交差耐性に Cpc2 と Slm9 が重要であることを見だし、特に、Slm9 がヌクレオソーム構造の制御を介してストレス応答性遺伝子の発現に関与することを明らかにしている(Chujo M. et al. J. Biol. Chem 2012)。それらを踏まえ、本研究では、特にクロマチン構造の調節と遺

伝子発現制御の観点からの解析を中心に進め、Cpc2 と Slm9 が交差耐性において機能する分子機構の解明から細胞のストレス応答への理解へと結びつける。交差耐性を利用した本研究によって、従来のストレス応答研究では見落とされてきた可能性のある新たなストレス応答因子の存在および制御機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

遺伝学的解析に優れた分裂酵母をモデル生物として用い、次の点を検討した。

(1) まず、Cpc2 がリボソーム結合タンパク質であることから、翻訳制御と Cpc2 との関連を検討した。特に、翻訳開始段階の制御に着目し、ストレス応答時の翻訳制御を介した遺伝子発現調節に Cpc2 がどのように機能するのか検討した。

(2) 次に、Cpc2 がストレス応答性遺伝子の発現制御にどの程度重要な役割を担っているのか検討するため、マイクロアレイ解析によってゲノムワイドな遺伝子発現パターンを調べた。ストレス応答性遺伝子の発現に重要なシグナル伝達経路であるストレス応答性 MAP キナーゼ経路との遺伝学的、物理的相互作用を調べ、遺伝子発現制御との関連を検討した。

(3) Cpc2 と Slm9 の遺伝学的、物理的相互作用を検討し、クロマチン免疫沈降法やヌクレオソームスキニング法を用いてクロマチン構造の変化における Cpc2 の果たす機能を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 細胞がストレスにさらされると、翻訳開始因子の1つである eIF2 $\alpha$ がリン酸化され、細胞全体の翻訳開始効率が大きく低下する。一方で、一部のストレス応答遺伝子の翻訳効率が相対的に上昇することが知られており、この eIF2 $\alpha$ のリン酸化はストレス応答時の遺伝子発現制御に重要である。本研究では、Cpc2 がこのストレス応答機構に重要であることを見だし、報告した(Tarumoto Y. et al. J. Biol. Chem 2013)。eIF2をリン酸化するキナーゼは分裂酵母では3種類あり、この中で特に Gcn2 の活性化に Cpc2 が必要であった。cpc2 の遺伝子欠損株では、ストレス応答時の Gcn2 の活性化(自己リン酸化)および eIF2 $\alpha$  のリン酸化が起こらず、ストレス応答性遺伝子の発現が十分に増加しないため細胞はストレス感受性となった。このことから、Cpc2 がストレス応答に機能する分子機構の一部は翻訳制御によるものであることが示された。

(2) ストレス処理時の *cpc2* 欠損株での遺伝子発現パターンをマイクロアレイ解析により網羅的に調べたところ、野生型株と比較して全体的にストレス誘導性遺伝子の発現量の増加が少なかった。*cpc2* 欠損株で発現量に差がある遺伝子を選択し、他の遺伝子破壊株の遺伝子発現パターンと比較したところ、*atf1* の遺伝子破壊株で発現量が低下する遺伝子と大部分重なった。*Atf1* は転写因子であり、ストレス応答性 MAP キナーゼによるリン酸化を受けて活性化し、転写を誘導すると言われている。*cpc2* 欠損株では細胞内の *Atf1* タンパク質の量が減少することがすでに報告されており、このことがストレス応答性遺伝子の発現低下につながった可能性が考えられた。実際、*Atf1* タンパク質の発現量が低下する *atf1-11M* 変異体での遺伝子発現パターンは、*cpc2* 欠損株の遺伝子発現パターンとより類似することをマイクロアレイ解析によって見いだした。ただし、*Cpc2* がストレス応答性 MAP キナーゼのシグナル伝達を制御することでこのストレス応答性遺伝子の発現制御に関与している可能性は現時点では否定できない。

(3) *Slm9* はヌクレオソーム構造の制御を介して遺伝子発現制御に関わることをすでに報告しており、*Cpc2* が同様にストレス応答時のヌクレオソーム構造の制御に重要であるか調べた。ストレス応答性遺伝子である *ctt1* の転写開始点近傍のヌクレオソームの配置を調べたところ、野生型株ではストレス処理時にヌクレオソームの消失が起こるのに対して、*cpc2* 欠損株ではこの消失の程度が少ないことが明らかとなった。リボソームに結合できない *Cpc2* の変異体では、ストレス応答時のヌクレオソーム構造の変化は正常に観察されたことから、*Cpc2* による翻訳制御がヌクレオソームの配置の制御には必要でないことが示唆され、*Cpc2* はリボソーム上とは異なる細胞内の場所でヌクレオソームの配置を制御することが考えられた。

#### 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 2 件)

(1) 樽本雄介、石川冬木「低容量ストレスに対する細胞応答」領域融合レビュー、査読有、3 巻、2014、e004、  
DOI: 10.7875/leading.author.3.e004

(2) Yusuke Tarumoto, Junko Kanoh, and Fuyuki Ishikawa. "Receptor for Activated C-kinase (RACK1) homolog *Cpc2* facilitates the general amino acid control response through *Gcn2* kinase in fission yeast. The

Journal of Biological Chemistry. 査読有、288 巻、2013、19260-19268、  
DOI: 10.1074/jbc.M112.445270

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 滝川雅大、樽本雄介、石川冬木「分裂酵母 *Stn1* の染色体構造維持における役割」第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日(横浜市、パシフィコ横浜)

(2) Yusuke Tarumoto, Moeko Chujo, Koichi Miyatake, Eisuke Nishida, and Fuyuki Ishikawa. "Fission HIRA histone chaperone facilitates stress-induced transcriptional response" IAS Research Conference 2014: Chromatin Decoding, May 13, 2014 (京都市、国際高等研究所)

(3) 樽本雄介、加納純子、上野敏秀、間野博行、石川冬木「分裂酵母 *Cpc2* はストレス応答性 MAP キナーゼを介したストレス応答を促進する」第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日(横浜市、パシフィコ横浜)

(4) Yusuke Tarumoto. "Cellular response to low-dose stress in fission yeast and mammals" 第 15 回生命科学研究所シンポジウム、2013 年 7 月 4 日(京都市、京都大学芝蘭会館)

(5) Yusuke Tarumoto, Junko Kanoh, Toshihide Ueno, Hiroyuki Mano, and Fuyuki Ishikawa. "Fission yeast *Cpc2* facilitates stress-activated MAP kinase-mediated stress response" EMBO Conference on Fission Yeast: *Pombe* 2013, Jun 27, 2013. (London, UK)

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)  
該当なし

取得状況(計 0 件)  
該当なし

〔その他〕

石川研究室ホームページ

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/fish/>  
京都大学大学院生命科学研究所ホームページ

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

樽本 雄介 (TARUMOTO, Yusuke)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号：70551381

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし