

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440009

研究課題名(和文) 出芽酵母におけるリボソームRNAの新規転写制御機構の解明

研究課題名(英文) A novel regulatory mechanism for transcription of ribosomal RNA in budding yeast

研究代表者

笠原 浩司 (Kasahara, Koji)

東京農業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：40304159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Fpr1/FKBP12は、薬剤ラパマイシンとの複合体の形で栄養環境に対する細胞応答の司令塔TORC1複合体に結合し、その活性を阻害することでリボソーム構成因子の合成を抑制するが、薬剤のない生理的状況でのリボソーム合成への関与は不明であった。本研究で我々は、リボソーム構成因子の協調的産生に関わる出芽酵母HMO1の遺伝子破壊との合成致死変異としてFPR1の変異を同定するとともに、ChIP-seq解析、及び変異型プロモーターを用いた解析から、Fpr1がリボソームタンパク質遺伝子プロモーターに、その主要転写因子であるRap1に依存的に結合し、共に転写を促進するという全く新しい役割を解明した。

研究成果の概要(英文)：Fpr1/FKBP12 make complex with rapamycin, a medically important immunosuppressive drug. This complex binds to and inhibits the kinase activity of TORC1, a key regulator of cellular responses to nutritional environment, thereby prohibiting a synthesis of ribosomal components. However, function(s) of Fpr1 in the natural cellular-condition without the drug has been unknown. In this study, we identified fpr1 mutation that showed synthetic lethality with the deletion mutant of HMO1 gene, which is involved in a coordinated synthesis of ribosomal components. As the results of genome wide ChIP-seq analysis and the ChIP analysis using variously modified promoters, we demonstrated that Fpr1 bound to the promoter of ribosomal protein genes dependently on Rap1, a master transcriptional regulator of those genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写 リボソーム 出芽酵母 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者(以下代表者)が基本転写因子 TFIID の結合タンパク質として同定した Hmo1 は、35S リボソーム RNA (以下 rRNA: Ribosomal RNA) 遺伝子のプロモーターとコーディング領域全体、及び約 70% のリボソームタンパク質遺伝子(以下 RPG: Ribosomal Protein Gene) のプロモーターに特異的に結合する。HMO1 遺伝子の破壊によりこれら標的遺伝子の転写が同時に低下することから、Hmo1 はリボソーム構成因子の協調的な生合成の制御に重要な因子であると考えられてきた。本研究の開始当初、代表者および海外の複数のグループから、Hmo1 の具体的な機能に関する報告が増え始め、とりわけ rRNA 遺伝子の特殊な染色体構造の形成への関与が注目を集めていた。そのような中、代表者は Hmo1 のさらなる未知の機能、あるいは Hmo1 のより詳細な役割を解明するためのアプローチとして、HMO1 遺伝子破壊 ( $\Delta hmo1$ ) と合成致死性を示す変異の探索を行い、FPR1 遺伝子の変異を同定した。Fpr1 は真核生物に広く保存される FKBP12(FK506 binding protein)の酵母オルソログであり、タンパク質の構造変換に関わると考えられる PPIase (Peptidylprolyl isomerase) 活性を持つ。Fpr1/FKBP12 は、栄養飢餓をミミックする薬剤ラパマイシンと結合した状態で、栄養環境に対する細胞応答の司令塔 TORC1 (Target of Rapamycin Complex 1) 複合体に結合し、そのキナーゼ活性を阻害することによりリボソーム構成因子の生合成を抑制するが、薬剤のない生理的条件下での TORC1 との関連は不明であり、リボソーム生合成への関与も知られていない。 $\Delta hmo1$  と  $\Delta fpr1$  の合成致死性は 1999 年に Heitman らにより既に報告されていたものの、その後の研究はほとんど行われておらず、合成致死の原因は不明であった。代表者は両遺伝子破壊による合成致死の原因を明らかにすることが、未だ不明な点の多い Hmo1 と Fpr1 の機能を知る上で重要な手がかりになると考えた。遺伝学的な解析の結果、この二重破

壊株は実際には致死ではなく、生育が大きく遅延していることが明らかとなり、二重破壊株をそのまま以後の研究に使用することにした。なお、この二重破壊株からは生育が  $\Delta hmo1$  単独破壊株並みに回復するサプレッサー変異株が高頻度に出現するが、その形質の安定性は様々であり、全ゲノム解析において、シーケンスリードの質、量ともに十分であるにもかかわらず、変異点の特定に至らないことなどから、本形質が単純な DNA 配列の変異によるものではなく、エピジェネティックな様式で支配されているのではないかと考えた。以上の様な背景の元に、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究計画の大きな目的は、Hmo1、Fpr1 の機能、特に両者が関与する染色体構造の変化を介した未知のリボソーム構成因子、特にリボソーム RNA の転写制御機構を解明することであり、そのためのより具体的な目標として、 $\Delta hmo1\Delta fpr1$  二重破壊株の生育遅延の原因の究明、特に二重破壊株で起こっている遺伝子発現異常の解明、及びこの二重破壊株の生育を回復させるサプレッサー変異株の変異点の同定を目指した。

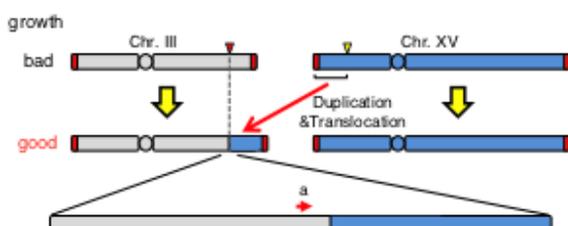
## 3. 研究の方法

上記目標を達成する方法として、まずリボソーム構成因子に限定せず、二重破壊株のゲノムワイドな遺伝子発現の変動を同定・把握することが研究のベースになると考え、申請時に記載したとおり、野生株、 $\Delta hmo1\Delta fpr1$  二重破壊株、及びそれぞれの単独破壊株( $\Delta hmo1$ ,  $\Delta fpr1$ )における遺伝子発現の差異を RNA-seq 法によって解析することとした。またこれと並行して行ったサプレッサー変異株の探索において、得られた多くの株は、その形質が不安定で、解析が困難であったのに対し、数個の株が安定した形質を示し、遺伝学的な解析から、これらは全て同一遺伝子座の変異であることが示唆されたことから、NGS を用い

た全ゲノムシーケンス解析によって、その変異点の特定を行うこととした。上記2つの全ゲノムレベルの解析から得られた結果を踏まえて、さらに詳細な遺伝学的解析と、各種転写因子のDNA結合の場所や仕組みをChIP解析、さらにNGSを用いたChIP-seq解析によって明らかにすることにより、以下に記載する成果を得ることに成功した。

#### 4. 研究成果

上記3に記した二重破壊株のサプレッサー変異株の全ゲノムシーケンスを行った結果、それまで気づいていなかった染色体の大きな再編成を見出した。詳細な解析の結果、三番染色体の末端約25kbpを欠失し（この領域内には必須遺伝子は存在しなかった）、十五番染色体の末端約110kbpが重複し、そこに融合する形での転座が起こっていることが明らかとなった（下図）。



独立して単離され、同一遺伝子座に変異を持つと予想された二株についてNGS解析を行った結果、全く同じ再編成が確認された。この染色体の再編成による生育回復の原因が、三番染色体の末端が失われたことにあるのか、十五番染色体の末端が倍加したことにあるのかを、これらの領域を分割してプラスミドにのせて酵母に形質転換することを繰り返して行った結果、最終的に十五番染色体の上にあるRPL25遺伝子のコピー数が重複によって2倍になったことがその原因であることが明らかとなった。

上記の *hmo1 fpr1* 二重破壊株のRNA-seq解析の結果、予想通りRPGの多くが、発現レベルが低下した遺伝子群の上位にリストとアップされ、その中でRPL25はRPGのみなら

ず、全ての生育に必須の遺伝子の中で最も発現レベルの低下が大きいものであった。以上の結果は、*hmo1 fpr1* 二重破壊株の生育遅延が、RPL25の発現量の低下によって引き起こされることを強く示唆している。ノザン解析からも、この結果が裏付けられる一方、*hmo1 fpr1* 二重破壊株で転写産物の量が最も低下していたのは、Pol Iによって転写されるrRNA（特に25S rRNA）であった。現在までに、Fpr1のrRNA遺伝子への結合は検出されておらず、直接の標的ではないと考えており、その転写量の低下は、*hmo1 fpr1*の生育異常による間接的影響、もしくはリボソーム構成因子の数的バランスを保つための仕組みによるものと考えているが、いずれにせよ直接の標的であるRPL25を始めとするRPGよりも大きな影響が出ていることは興味深く、今後明らかにすべき課題であると考えられる。

Fpr1はラパマイシとの複合体としてTORC1キナーゼを阻害することが知られているが、本来の生理的条件における役割については、ほとんど明らかにされていない。上記のようにFpr1がRPG、その他の遺伝子発現に影響を与えるという知見をもとに、代表者はFpr1が、それらの遺伝子のプロモーターに転写因子として結合している可能性をChIP法により検証した。その結果、驚くことに、Fpr1がRPL25その他のRPGのプロモーターに特異的に結合することが明らかとなった。続いて、Fpr1の標的遺伝子をゲノムワイドに同定するために行ったChIP-seq解析から、Fpr1はほぼ全てのRPGプロモーターに極めて特異的に結合していることが明らかとなった。全138個のRPGプロモーターには、一部を除き主要な転写活性化因子であるRap1が結合しているが、Fpr1はRap1が結合しているRPGプロモーターにのみ特異的に結合していた。RPL25プロモーターにおけるRap1とFpr1の結合位置を分解能を高めたChIP解析にて調べた結果、両者は同じに結合しており、さらにRPL25プロモーター領域を様々に欠失させ

た改変型プロモーターを用いて調べた結果、Rap1 結合配列の欠失により Fpr1 の結合は失われた。以上の結果は、Fpr1 の標的遺伝子への結合は Rap1 に依存することを示しており、Fpr1 が Rap1 のコアクティベーターとして転写を活性化する役割を持つことを強く示唆している。一方で *HMO1* の欠失により Fpr1 の結合は大きくは低下せず、両者は独立に RPG の転写促進に関与しているものと推測される。Fpr1 は PPlase 活性を持つことから、RPG プロモーター上に重合する転写因子やヌクレオソームとの相互作用や構造変換を介して、転写を促進する可能性が考えられる。

本研究で解析の中心となったサプレッサー変異株は、当初想定した「Hmo1、Fpr1 による染色体構造の制御を介した転写活性化の仕組み」に関与するものではなく、他の変異株については未だ変異点の同定に至っていないことから、研究開始当初の目標そのものを達成できたとはいえないが、発見から 20 数年来、その役割がほとんど分かっていなかった Fpr1/FKBP12 の生理的な機能を明らかにした点で、遺伝子発現制御の分野のみならず、生物学全般に少なからず寄与することができたと考えている。

#### 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 3 件)

1. Oligomerization of Hmo1 mediated by box A is essential for DNA binding *in vitro* and *in vivo* (査読有) **Kasahara K.** Higashino A, Unzai S, Yoshikawa H, Kokubo T, *Genes to Cells* 21(12):1333-1352 (2016) doi: 10.1111/gtc.12449.

2. A Random Screen Using a Novel Reporter Assay System Reveals a Set of Sequences That Are Preferred as the TATA or TATA-Like Elements in the *CYCI* Promoter of *Saccharomyces cerevisiae* (査読有) Watanabe K, Yabe M, **Kasahara K.** Kokubo T, PLoS One 10(6):e0129357 (2015) doi:

10.1371/journal.pone.0129357.

3. Both HMG boxes in Hmo1 are essential for DNA binding *in vitro* and *in vivo* (査読有)

Higashino A, Shiwa Y, Yoshikawa H, Kokubo T,

**Kasahara K.** *Biosci Biotechnol Biochem* 79(3):

384-393 (2015)

doi:10.1080/09168451.2014.978258.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

笠原 浩司 (Kasahara Koji)

東京農業大学・生命科学部・准教授

研究者番号: 40304159

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )