

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06953

研究課題名(和文) コアプロモーター認識因子の選択によるmRNA運命決定機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of how core transcription factors are involved in regulating transcription and post-transcriptional mRNA fate

研究代表者

古久保 哲朗 (KOKUBO, TETSURO)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：10271587

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)：TFIIDはTBPと14種類のTAFから構成される巨大な複合体であり、SAGAとともにコアプロモーター(CP)上で働き、TBP-DNA相互作用を制御することによって転写の活性化を行う。最近我々は、同一のプロモーターからTFIIDまたはSAGAによって転写されるCLN2 mRNAが機能の異なる二種類のCln2に翻訳される可能性を示した。本研究では、さらに解析を進め、転写が「上流配列によるコア因子の選択 CP領域による被選択コア因子の活性制御」という二段階を経て進むこと、CLN2 mRNAの局所翻訳制御には二種類のRNA結合タンパク質が関与することを強く示唆する結果を得たので、以下に報告する。

研究成果の概要(英文)：TFIID, the largest GTF comprising TBP and 14 TAFs, and its related complex SAGA play critical roles in transcriptional activation by regulating TBP-DNA interactions. Previously, we suggested an intriguing possibility that CLN2 mRNA generated by TFIID or SAGA (designated as CLN2 mRNA [TFIID] or [SAGA], respectively) could produce two types of Cln2 that carry distinct functions.

Here we demonstrate that TFIID and/or SAGA are regulated in two steps: the UAS first specifies TFIID or SAGA as the predominant factor on a given promoter, and then the core promoter structure guides the pertinent factor to conduct transcription in an appropriate manner. Furthermore, we also demonstrate that two distinct types of RNA binding proteins are involved in translational control of CLN2 mRNA in conjunction with the RAM signaling pathway.

研究分野：分子生物学

キーワード：transcription TFIID SAGA mRNA RNA-binding protein gene regulation cell morphogenesis GTF

## 1. 研究開始当初の背景

出芽酵母の*SSD1*には、野生型*SSD1-V*とナンセンス変異(Y698stop)をもつ*ssd1-d*の二種類のアレルが存在する。これらのアレルの違いは、細胞周期のみならず、偽菌糸形成・熱ショック耐性・細胞内輸送・細胞極性・細胞寿命等、様々な生命現象に關与する遺伝子の変異の表現型に違いを与えることから、*SSD1*は多機能性因子と呼ばれている。Ssd1(全長1250 aa)はRNA結合モチーフ(RNB: 693-911 aa)を有し、実際種々のmRNAと結合することが明らかにされつつある。またRNAポリメラーゼII(pol II)の最大サブユニットであるRpb1のC末端領域(CTD)ともリン酸化型CTD相互作用ドメイン(PCID: 1-240 aa)を介して結合するとされているが、転写への寄与については長らく不明であった。

一方、基本転写因子TFIID(=TBP+Taf1-14)は、転写開始前複合体のアッセンブリーに際して核となる分子であり、転写調節因子から受け取った信号を転写量の増減へと変換する上で中心的な役割を果たす。我々はこれまで主に出芽酵母を用いてTafの生体内機能について解析を進めてきたが、その過程においてTaf1のN末端に存在するTBP機能阻害領域(TAND; Taf1 N-terminal domain)が、TFIIDによる転写活性化の分子スイッチとして機能することを見出し、“二段階ハンドオフモデル”と呼ぶ転写活性化の分子モデルを新たに提案した。このモデルでは、転写活性化ドメインがTANDの構造を分子的に擬態することによってTAND-TBP間の負の相互作用を解除し、最終的にはTBPをTATAボックスに送り込むことにより転写を活性化すると考えているが、その詳細については未だ不明な点が多い。またTFIID類縁複合体であるSAGA(5種類のTafをTFIIDと共有する)はTFIIDと重複した機能を持つとされているが、両者の機能分担についてはまだよく分かっていない。

我々は、*TAF1*の温度感受性(TS)アレル(*taf1-N568Δ*)を単離し、他のグループにより単離されたTSアレルとの比較を行った結果、G1サイクリン的一种である*CLN2*の転写阻害が後者においてのみ強く起こることを見出した。またこの違いは*TAF1*アレルの違いではなく、両研究において用いられた酵母株の*SSD1*アレルの違い(*SSD1-V* vs. *ssd1-d*)に起因することを明らかにした。さらに*CLN2*転写におけるSsd1とTFIID(Taf1)の協調的な相互作用を調べる過程において、当初の予想とは異なり、Ssd1はTFIIDではなく、むしろその類縁複合体であるSAGAと密接に關連することを見出した。詳細な解析の結果、Ssd1は5'-UTRとの結合を介して*CLN2* mRNAを安定化すること、

Ssd1により安定化された*CLN2* mRNAはそのままではタンパク質に翻訳されないこと(RAM [regulation of Ace2 activity and cellular morphogenesis] シグナル経路によるSsd1の不活化を介して局所翻訳制御を受け

る可能性が高いこと)、Ssd1による*CLN2* mRNAの安定化はTFIID非依存的・SAGA依存的に起こること、Ssd1により安定化される*CLN2* mRNAはTFIID非依存的・SAGA依存的に転写されること、Ssd1のmRNA安定化活性は高温シフト後に昂進すること、Ssd1の有無にかかわらず*taf1-N568Δ*株のG1/S期移行は制限温度下において阻害されること(おそらくSsd1/SAGA依存的に蓄積する*CLN2* mRNAはG1/S期移行には利用できないこと)、 $\alpha$ -factorによるG1期停止後の正常な細胞周期進行にはSsd1の機能が不要であること等を明らかにした。

興味深いことに、上記TANDの欠損変異(*taf1ΔTAND*変異)は複数のRAM欠損変異(*cbk1*, *tao3*)に対して合成致死性を示すことから、RAM標的遺伝子の転写制御においてTANDは必須の役割を果たすと考えられる。一方、本研究の端緒となった*taf1-N568Δ*アレル(高温下の*CLN2*転写において*ssd1-d*アレルとの合成欠損効果を示す)は上記RAM変異に対して合成致死性を示さないことから、*CLN2*転写におけるTANDの役割についても解析が必要と考えられた。そこで*taf1ΔTAND*変異株において高温下の*CLN2*転写を調べたところ、転写量が大きく変化することはないものの、Ssd1によって安定化される*CLN2* mRNA量が約2倍に増加することが明らかとなった。すなわち*taf1ΔTAND*変異によりTFIID依存的な*CLN2*転写が減少し、その分SAGA依存的な*CLN2*転写が増大したものと考えられる。また*SSD1*と遺伝学的に相互作用する*MPT5*(RNA結合タンパク質の一種)の欠損変異( $\Delta$ *mpt5*)は*taf1ΔTAND*変異と $\Delta$ RAM変異間の合成致死性を抑圧することも明らかとなった。以上の結果は、*taf1ΔTAND*変異により産生量が増加したSAGA依存的な*CLN2* mRNAの正常な利用をMpt5が妨げている可能性を示唆しており、大変興味深い。上記の背景のもと、*CLN2* mRNAの作り分け([TFIID] or [SAGA])の分子機構の解明を主たる目的として本研究を進めることとした。

## 2. 研究の目的

基本転写因子TFIIDはTATAボックス結合タンパク質(TBP)と14種類のTBP随伴タンパク質(Taf)から構成される巨大なタンパク質複合体であり、その類縁複合体であるSAGAとともにコアプロモーター上で働き、TBP-DNA相互作用を制御することによって転写の活性化を行う。我々は、同一のプロモーターからTFIIDまたはSAGAによって転写される*CLN2* mRNAが、同一の一次構造を有するにもかかわらず、機能の異なる二種類のCln2に翻訳される可能性を示した。またTFIID内部の分子スイッチと考えられるTANDやRNA結合タンパク質であるSsd1/Mpt5等が、これら二種類のCln2を適正量産生する上で重要な役割を果たすことを強く

示唆する結果を得た。そこで本研究では、上記の可能性をさらに検証するとともに TFIID と SAGA による mRNA の運命決定機構を解明し、"転写反応と共役した翻訳産物の機能制御"という新規コンセプトの確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 出芽酵母株の作製と培養

PCR 法により増幅した DNA 断片 (栄養要求性を相補する遺伝子もしくは各種薬剤耐性遺伝子を含む) を直接出芽酵母細胞に形質転換することにより、目的の出芽酵母株 (以下酵母株) を作製した。必須遺伝子を欠失する酵母株を作製する場合には、プラスミドシャフリング法を用いた。作製した酵母株の培養は、YPD, SC, SD 液体培地もしくは同寒天培地を用いて行った。

#### (2) ノザンプロット解析

ホットフェノール法により全 RNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動により分離後、ニトロセルロース膜にトランスファーした。各種プローブをランダムプライム法により  $^{32}\text{P}$  標識し、ハイブリダイゼーションを行った。洗浄後イメージングプレートに感光させ、BAS2500 (富士フィルム) を用いてシグナルの検出・定量を行った。

#### (3) プライマー伸長法

ホットフェノール法により抽出した全 RNA 画分もしくは試験管内で生成した転写反応産物に対して  $^{32}\text{P}$  標識したプライマーを添加し、AMV reverse transcriptase XL による逆転写反応を行った。逆転写産物はポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離後、イメージングプレートに感光させ、BAS2500 を用いてシグナルの検出・定量を行った。

### 4. 研究成果

(1) TATA ボックス or TATA 様配列からの SAGA 依存的な転写活性化効率を測定するための新規実験系の開発

出芽酵母由来のクラス II 遺伝子のコアプロモーターエレメント (CE) は TATA ボックス (TATA[A/T]A[A/T][A/G]) もしくは TATA 様配列 (TATA ボックスとの比較において 1~2 bp のミスマッチを有する配列) のいずれかに分類される。これまで TATA ボックス含有型 or TATA 様配列含有型プロモーターへの TBP 結合は、各々 SAGA, TFIID を介して起こると考えられてきたが、近年、いずれのタイプの転写においても、SAGA/TFIID の両者がともに関与することが明らかにされつつある。しかしながら、SAGA 単独で TATA 様配列含有型プロモーターの転写をどの程度効率よく活性化できるかについてはまだよく分かっていない。

そこで我々は、*taf1-N568Δ* 株を制限温度下にシフト後 (TFIID を失活させた後)、SAGA 依存性 *AGP1* プロモーター (野生型 or TATA ボックスをあらかじめ種々の TATA 様配列に置換した複数のコンストラクトを使用) の転写を測定することにより、SAGA 単独での CE 転写活性化効率を定量的に評価し得る新たな実験系の開発を行い、その有効性を確認・検証した。

(2) TFIID 依存性 *CYC1* or TFIID 非依存性 *AGP1* プロモーター及びそれらのキメラ型プロモーターを用いた TFIID, SAGA の機能解析

前項記載の実験系を用いて TFIID の失活後に各種 TATA 様配列を含む *AGP1* プロモーターの転写活性を測定したところ、いずれも失活前とほぼ同程度の活性が見られたことから、少なくとも活性の強い一部の TATA 様配列については SAGA 単独による効率的な転写活性化が可能なものと考えられる。また *CYC1* プロモーターの TATA ボックスを各種 TATA 様配列に置換し、(野生型株及び *taf1-N568Δ* 株において) その転写活性を測定したところ、いずれも TFIID 依存性を示すことが明らかとなった。次に両者のキメラ型プロモーター (及びその CE 置換体) を複数種類作成し、TFIID or SAGA 依存性を付与する領域の決定を試みたところ、*CYC1* プロモーターの UAS (上流配列) が TFIID 依存性を、また *AGP1* プロモーターのコアプロモーター領域 (ただし TATA ボックス or TATA 様配列を含まない) が SAGA 依存性を付与することが明らかとなった。以上の結果は、出芽酵母におけるクラス II 転写が、UAS によるコア因子 (TFIID or SAGA) の選択、CE 以外のコアプロモーター領域を介した被選択コア因子の活性制御という二段階を経て進むことを示唆しており、大変興味深い。

(3) *taf1ΔTAND* 変異と  $\Delta$ RAM 変異の合成致死性に関する解析

すでに我々は、*taf1ΔTAND* 株において Ssd1 依存的に分解から保護される *CLN2* mRNA [SAGA] 量が有意に増加すること、複数の  $\Delta$ RAM 変異が *taf1ΔTAND* 変異に対して特異的な合成致死性を示すこと、当該合成致死性は  $\Delta$ *ampt5* 変異により抑圧されること等を明らかにした。さらに RAM シグナル経路の最終エフェクターキナーゼである Cbk1 の活性を自在に制御し得る *cbk1-as2* 株を作製し、1-NA-PP1 (Cbk1[as2] に対する特異的な阻害剤) 存在下において安定化型 *CLN2* mRNA [SAGA] の蓄積量が顕著に増加すること、また逆に *cbk1-S745F* 株 (構成的活性化型変異株) では有意に低下することも明らかにした。以上の知見をもとに、本研究ではさらに遺伝学的な解析を進め、*cbk1-as2 taf1ΔTAND* 二重変異株の生育が 1-NA-PP1 に対して高感受性を示すこと (上記合成致死性の chemical mimicry の確認)、*taf1ΔTAND* 変異と  $\Delta$ RAM 変異が示す合成致

死性は*ssd1-8A*変異(Cbk1によるリン酸化が不可能な変異体)によりミミックできること、*taf1**LATAND*変異と上記[*ΔRAM* or *ssd1-8A*]変異の合成致死性は、いずれも*Amp5*変異により抑圧できること、Cbk1-S745Fの構成的発現により、野生型*Ssd1*の存在下における*ΔRAM*単独変異の致死性を弱いながら回復できること等を明らかにした。以上の結果は、*CLN2* mRNA[SAGA] (及び生育に必須の機能を有する他の未同定mRNAを含む)の局所翻訳制御には二種類のRNA結合タンパク質(*Ssd1*, *Mpt5*)が関与し、それらはいずれもRAMシグナル経路の下流に位置することを強く示唆している。

(4) RAMシグナル経路による*Ssd1*-*Mpt5*-mRNA高次複合体(液滴オルガネラ)のエピジェネティックな形成制御

前述のように、*ΔRAM SSD1*株の致死性はCbk1-S745Fの構成的発現により部分的に抑圧可能である。興味深いことに、*ΔRAM SSD1 cbk1-S745F*株の微弱な生育(部分的な抑圧状態)は、数回~数十回の細胞分裂を経て通常の生育速度へとepigenetic & stochasticに変化することが明らかとなった。さらに複雑なことに、*ΔRAM ssd1*株と*cbk1-S745F SSD1*株を掛け合わせた二倍体株からは、四分子解析後に*ΔRAM cbk1-S745F ssd1*株は一切得られず(ただし*ΔRAM cbk1-S745F SSD1*株は得られる)、*ΔRAM ssd1*株と*cbk1-S745F ssd1*株を掛け合わせた二倍体株からは、問題なく四分子解析後に*ΔRAM cbk1-S745F ssd1*株が得られることも明らかとなった。以上の結果は、掛け合わせ前の*cbk1-S745F SSD1*株内において、*Ssd1*の正常な機能が必須となる何らかの状況変化が後天的に生じたことを示唆している。

以上の知見をもとに、現在我々は「*Ssd1*/*Mpt5*が標的mRNAとともにP-body(液滴オルガネラの種類)を形成し、RAMはその溶解を誘起する、液滴オルガネラの性状は、*Ssd1* & RAMの活性状態によってepigeneticに変化する」という分子モデルを新たに構築し、その検証を試みている。

## 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4件)

Watanabe K, Yabe M, Kasahara K, Kokubo T.; 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.*; *PLoS One.* 2015 Jun 5;10(6): e0129357. doi:10.1371/journal.pone.0129357. 査読有

Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, Shirogami-Ikejima H, Uchida Y, Ohshima Y, Kokubo T., Fujimura Y.; A novel quantitative hemolytic assay coupled with restriction fragment length polymorphisms analysis enabled early diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome and identified unique predisposing mutations in Japan.; *PLoS One.* 2015 May 7;10(5):e0124655. doi: 10.1371/journal.pone.0124655. 査読有

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

Watanabe K, Kokubo T.; SAGA mediates transcription from the TATA-like element independently of Taf1p/TFIID but dependent on core promoter structures in *Saccharomyces cerevisiae.*; *PLoS One.* 2017 Nov 27;12(11):e0188435. doi: 10.1371/journal.pone.0188435. 査読有

[学会発表](計4件)

渡邊清、矢部誠、古久保哲朗; 出芽酵母のRNAポリメラーゼII系遺伝子における新規コアプロモーターエレメントの同定ならびにその機能解析; 日本分子生物学会第38回年会. 2015.12.1., 神戸

此村直人、新井直人、古久保哲朗、柴田武彦; ATP/ADP結合型RecAによる*E. coli*/T4 DNA LigaseのDNA末端結合活性促進の生化学的特性; 日本分子生物学会第39回年会. 2016.11.30., 横浜

高井直樹、Ehmed Ekrem、櫻井堅介、大山良文、古久保哲朗; 基本転写因子TFIIDのサブユニットであるTAF8における天然変性領域の機能解析; 日本分子生物学会第39回年会. 2016.12.2., 横浜

高井直樹、Ehmed Ekrem、櫻井堅介、大山良文、古久保哲朗; 基本転写因子TFIIDの構成因子TAF8の天然変性領域の機能解析; 2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio 2017). 2017.12.8., 神戸

[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

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/mcbl/index2.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

古久保 哲朗 (KOKUBO TETSURO)  
横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・  
教授  
研究者番号：10271587

### (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

( )