

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06063

研究課題名(和文) 基本転写装置と機能的に共役する液滴オルガネラの試験管内再構成とその機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of liquid droplet formed by coupling of specific RNA binding proteins and a basal transcription machinery

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝学的な解析により、(1)Mpt5の過剰発現が taf1-deltaTAND株特異的に生育阻害効果を示すこと、(2)Mpt5[5A変異体]及びSsd1の過剰発現は、TANDの有無にかかわらず生育阻害効果を示すこと、(3)Mpt5の過剰発現による生育阻害効果は、ssd1-d株において有意に増大することを明らかにした。これらの結果は、delta-RAM ssd1-d taf1-deltaTAND三重変異株における合成致死性がMpt5の機能昂進によるものであることを示唆している。またRNA-seq解析により、上記三重変異株の合成致死性の原因を遺伝子発現変化の観点から解明するための手がかりを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CLN2に関する詳細な解析から、TANDはTFIID/SAGAによる転写バランスを制御すると考えられてきたが、これまでゲノムワイドな知見がなく、その一般性については不明であった。今回、RAMシグナリングの下流に位置し、TAND依存的に産生されるmRNAを網羅的に同定できたことから、TFIID/SAGAによるmRNA運命決定機構を理解する上での貴重な手がかりが得られたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genetic analysis revealed that (1) overexpression of Mpt5 had a growth inhibitory effect specifically in the taf1-deltaTAND strain, (2) overexpression of Mpt5[5A mutant] and Ssd1 had a growth inhibitory effect in the presence or absence of TAND, and (3) the growth inhibitory effect of Mpt5 overexpression was significantly increased in the ssd1-d strain. These results suggest that the synthetic lethality of the delta-RAM ssd1-d taf1-deltaTAND triple mutant strain is due to the up-regulation of Mpt5 function. RNA-seq analysis also provided clues to elucidate the cause of synthetic lethality in this triple mutant strain from the aspect of gene expression profiles.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写調節 転写因子 局所翻訳制御 SAGA TFIID TAF TBP

1. 研究開始当初の背景

転写開始前複合体形成の核となる基本転写因子 TFIID は、TATA ボックス結合タンパク質 (TBP) と 14 種類の TBP 随伴因子 (Taf1-14) から構成される巨大なタンパク質複合体であり、コアプロモーター結合能 (正しい位置から転写を開始させる能力) 及び 転写活性化能 (転写調節因子に応答して転写量を調節する能力) を有する。真核細胞においてこれらの両機能を合わせ持つ転写因子は TFIID のみであることから、その作用機序の解明は極めて重要と考えられる。我々は、これまで主に発芽酵母を用いて Taf の生体内機能について解析を進め、Taf1 の N 末端に存在する TBP 機能阻害領域 (TAND; Taf1 N-terminal domain) の発見や新規コアプロモーター配列の同定等、種々の興味深い知見を報告してきたが、TFIID の分子機能については未だ不明な点が多い。

TFIID 類縁複合体である SAGA (5 種類の Taf を TFIID と共有し、計 19 種類のサブユニットから成る) は TFIID と重複した機能を持つとされているが (ただし自身はコアプロモーターに結合せず、Spt3 を介して TBP の活性制御を行う)、両者の機能分担についてはまだよく分かっていない。従来は、TFIID が主に TATA-less プロモーター (全ゲノム中約 90% の遺伝子が該当し、転写変動量が小さいハウスキーピング型遺伝子のプロモーターが数多く含まれる) を、SAGA は主に TATA box 含有プロモーター (その他約 10% の遺伝子が該当し、転写変動量が大きい遺伝子のプロモーターが数多く含まれる) を転写するとされてきたが、新生 RNA の定量技術の進展に伴い、むしろ両者がほぼ全てのプロモーターの転写に関与するというモデルが主流になりつつある。しかしながら、TFIID, SAGA の転写への寄与はプロモーターごとに異なることから、個々のプロモーター上において、これらの転写因子が具体的に何をするのか、両者の役割の違いは何かを理解することが当面の重要な課題と考えられている。

我々は、TFIID と SAGA が *CLN2* mRNA (G1 サイクリンの一種である Cln2 をコードする) の産生に関与すること、TAND 欠失株 (*taf1ΔTAND* 株) では、TFIID 依存性 mRNA (mRNA[TFIID]) 産生量が減少し、その分 SAGA 依存性 mRNA (mRNA[SAGA]) 産生量が増加すること (すなわち TAND は TFIID, SAGA による転写バランスを制御すること)、

mRNA[TFIID], mRNA[SAGA] から翻訳される Cln2 は各々細胞増殖・細胞成長に関与し、後者のみが Ssd1 及び Mpt5 (いずれも RNA 結合タンパク質) による局所翻訳制御を受ける可能性が高いこと等を見出した。Ssd1 と Mpt5 はいずれも 6 種類のコンポーネント (Sog2/Hym1/Kic1/Tao3/Cbk1/Mob2) から成る RAM [Regulation of Ace2 activity and cellular Morphogenesis] シグナル経路の下流に位置し、最終エフェクターキナーゼである Cbk1 によりリン酸化される分子と考えられている。

近年、液滴オルガネラ (核内の核小体・カハール体や細胞質内の P ボディ・ストレス顆粒など) の正体が明らかになりつつある。これらは膜無しオルガネラとも呼ばれ、プリオン様ドメイン (PrD) 内に何らかのリガンド結合能を有するモチーフを複数もつタンパク質が (多くの場合は核酸との複合体を形成し) 高濃度に濃縮されることにより液-液相転移 (LLPS: liquid-liquid phase separation) を起こし、細胞内で液滴様の構造体を形成したものと考えられている。上記の Ssd1, Mpt5 は P ボディの構成成分であり、Cbk1 によりリン酸化された Ssd1 は P ボディから解離し、その結果、標的 mRNA の翻訳が可能になると推定されるがその詳細な分子機構は不明である。

以上の背景のもと、我々は「SAGA 転写を介した Ssd1/Mpt5 含有液滴オルガネラ (P ボディ) の生成と Cbk1 によるその溶解 (機能発現)」という新たな分子モデルを構築し、その検証を進めることとした。

2. 研究の目的

基本転写因子 TFIID とその類縁複合体である SAGA は、5 種類の Taf をサブユニットとして共有し、いずれも TBP のコアプロモーター結合能を制御するが、転写における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、SAGA 依存的に転写される mRNA (の

うち少なくとも一部)は、RNA 結合タンパク質である Ssd1 や Mpt5 により標識され、液滴オルガネラとして知られる P ボディを形成後、必要に応じて Cbk1-Mob2 [RAM]によるリン酸化を受け、溶解・翻訳される; TFIID 依存的に転写される mRNA は、その多くがハウスキーピング機能を担うため、P ボディに貯蔵されることなく、すぐに翻訳される; というモデルを独自に考案した。本研究では、Ssd1/Mpt5/Cbk1-Mob2 と適切な RNA を混合することにより、液滴様構造体の試験管内再構成を試み、その動態観察を目指す。また遺伝学的な解析を平行して実施することにより、基本転写装置が細胞質内の液-液相転移 (LLPS) を制御する新たな生命現象の解明に繋がたいと考えている。

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 ³²P 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 ³²P 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) 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に関する遺伝学的な解析

Δ RAM *SSD1* 株の致死性は Cbk1-S745F (constitutive active form) の構成的発現により部分的に抑圧可能である。また Δ RAM *cbk1-S745F SSD1* 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。興味深いことに、 Δ RAM *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 Δ RAM *cbk1-S745F ssd1* 株は一切得られず (ただし Δ RAM *cbk1-S745F SSD1* 株は得られる)、 Δ RAM *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 Δ RAM *cbk1-S745F ssd1* 株を得ることができる。前者の掛け合わせ時にのみ Δ RAM *cbk1-S745F ssd1* 株を得ることができない理由について検討するため、*cbk1-S745F ssd1* 株に *SSD1* 発現プラスミドを導入し、 Δ RAM *ssd1* 株と掛け合わせた後、四分子解析を行ったところ、問題なく Δ RAM *cbk1-S745F ssd1* 株を得ることができた。またこの株に *SSD1* 発現プラスミドを導入し、継代後に同プラスミドを喪失させても生育に問題は見られなかった。以上の結果は、掛け合わせ前の *cbk1-S745F SSD1* 株内において、 Δ RAM 欠損時に Ssd1 の正常な機能を必要とする何らかの後天的な状態変化が生じたこと、またこの状態変化は *cbk1-S745F ssd1* 株 (+ *SSD1* 発現プラスミド) 株では再現できないことを示している。

その他種々の遺伝学的な解析を行うことにより、Mpt5 の過剰発現が、*taf1* Δ TAND 株特異的に生育阻害効果を示すこと (TAF1 株では生育阻害効果を示さないこと)、Mpt5[5A] (Cbk1 のコンセンサス標的配列を含む 5 箇所のセリンをアラニンで置換した非リン酸化型変異体) 及び Ssd1 (野生型・非リン酸化型変異体) の過剰発現は、TAND の有無にかかわらず生育阻害効果を示すこと、Mpt5 の過剰発現による生育阻害効果は、*ssd1-d* 株において有意に増大することを明らかにした。これらの結果は、本研究の端緒となった Δ RAM *ssd1*-

d taf1ΔTAND 三重変異株における合成致死性が Mpt5 の機能昂進によるものであること、Mpt5 と Ssd1 が標的 mRNA に対して一部競合的に結合すること等を示唆している。

(2) ΔRAM *ssd1-d taf1ΔTAND* 三重変異株の合成致死性の原因を解明するための新たな実験系の構築とその応用

ΔRAM *ssd1-d taf1ΔTAND* 三重変異株における合成致死性の原因を分子レベルで明らかにするため、Taf1 から TAND 領域を欠失させた直後の遺伝子発現変化を追跡し得る新たな実験系の構築を行った。具体的には、染色体上に存在する TAF1 の C 末端側にオーキシングロン (AID) を組み込み、さらに TAND 欠失型 Taf1 を発現するプラスミドを形質転換した酵母株を作製後、当該株を IAA 含有培地中で培養することにより、30 分以内に TFIID を野生型から TAND 欠失型へと置換可能な系の構築を試みた。多コピーの AID を組み込んだ場合には強い細胞毒性が見られたため、1 コピーのみを組み込むこととし、得られた株において、TFIID 依存的な転写が IAA 添加により特異的に阻害されることを確認した。

その後、(RAM or ΔRAM) *ssd1-d TAF1-AID* 株 (各々 *TAF1* 発現プラスミド, *taf1ΔTAND* 発現プラスミド, empty プラスミドのいずれかを有する) を作製し、RNA-seq 解析法を用いて Taf1 から TAND 領域を欠失させた直後の遺伝子発現変化を調べた。上記 6 種類の株について IAA 添加後の遺伝子発現プロファイルを比較したところ、 ΔRAM 変異の効果は *taf1ΔTAND* 発現プラスミドを有する株において特に顕著に見られたことから、 ΔRAM *ssd1-d taf1ΔTAND* 三重変異株の合成致死性の原因を遺伝子発現変化の観点から解明するための手がかりが得られたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Y. Wei, D. Resetca, Z. Li, I. Johansson-Akhe, A. Ahlner, S. Helander, A. Wallenhammar, V. Morad, B. Raught, B. Wallner, T. Kokubo, Y. Tong, L. Z. Penn, M. Sunnerhagen	4. 巻 26
2. 論文標題 Multiple direct interactions of TBP with the MYC oncoprotein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Struct Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 1035-1043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-019-0321-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 K. Kasahara, R. Nakayama, Y. Shiwa, Y. Kanesaki, T. Ishige, H. Yoshikawa, T. Kokubo	4. 巻 16
2. 論文標題 Fpr1, a primary target of rapamycin, functions as a transcription factor for ribosomal protein genes cooperatively with Hmo1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008865	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 R. Iwami, N. Takai, T. Kokubo	4. 巻 95
2. 論文標題 The function of Spt3, a subunit of the SAGA complex, in PGK1 transcription was restored only partially when reintroduced by plasmid into taf1 spt3 double mutant yeast strains.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 151-163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.20-00004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Kasahara, S. Takahata, T. Kokubo	4. 巻 94
2. 論文標題 Transcriptional activation is weakened when Taf1p N-terminal domain 1 is substituted with its <i>Drosophila</i> counterpart in yeast TFIID.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 51-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.19-00001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笠原浩司、中山理紗、志波優、兼崎友、石毛太一郎、吉川博文、古久保哲朗
2. 発表標題 ラパマイシンの標的分子FKBP12の出芽酵母における役割
3. 学会等名 第52回 酵母遺伝学フォーラム 研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 綾奈、宮崎 允、日比谷 優子、富山 新太、古久保 哲朗、市村 幸一
2. 発表標題 p53活性化剤とCDK8阻害剤の併用は神経芽腫に対し細胞死を誘導する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩見 亮、高井 直樹、古久保 哲朗
2. 発表標題 出芽酵母においてSpt3/SAGAの一過的な機能喪失がもたらす解糖系遺伝子プロモーターのTaf1/TFIID依存的な転写活性化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笠原 浩司、中山 理紗、志波 優、兼崎 友、石毛 太一郎、吉川 博文、古久保 哲朗
2. 発表標題 出芽酵母のFK506/ラパマイシン結合タンパク質Fpr1は、リボソームタンパク質遺伝子の転写因子として働く
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------