

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21770189

研究課題名（和文）出芽酵母リボソームタンパク質遺伝子の転写制御機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of transcriptional regulation of ribosomal protein genes in budding yeast

研究代表者

笠原浩司 (Kasahara Koji)

横浜市立大学生命ナノシステム科学研究科・客員研究員

研究者番号：40304159

研究成果の概要（和文）：出芽酵母の HMGB ファミリータンパク質の一つ Hmo1 は、リボソームタンパク質遺伝子プロモーターに特異的に結合し、転写活性化や転写開始点の決定に関与する。研究代表者による Hmo1 の結合部位や機能について多角的な解析の結果、Hmo1 とヌクレオソームが、それぞれコアプロモーターの 5' 側、及び 3' 側に結合し、コアプロモーター以外の領域への非特異的な転写開始複合体形成を抑制することにより、正しい位置からの転写を促進することが明らかになった。このような機構は特異的なシス-トランスエレメントの相互作用に基づく転写開始位置決定とは概念的に異なるものである。

研究成果の概要（英文）：Hmo1, a HMGB family protein of *Saccharomyces cerevisiae*, specifically binds to the promoters of ribosomal protein genes, and is involved in the transcriptional activation and determination of transcription start site for these promoters. Our analyses for the function and a binding site of Hmo1 on the *RPS5* promoters revealed that Hmo1 and +1 nucleosome determine the 5' - and 3' -boundaries, respectively, of a zone available for PIC assembly, thereby directing PIC assembly at a biologically relevant site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：転写

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：リボソーム、転写、RNA ポリメラーゼ II、出芽酵母、ヌクレオソーム、PIC (転写開始前複合体)、Hmo1

1. 研究開始当初の背景

リボソームの生合成は 3 種類の RNA ポリメラ

ーゼ (Pol I、Pol II、Pol III) の協調的な活性と、膨大な資源、エネルギーを必要とし、細

胞の成長や分裂を始め様々な生物機能に密接に関与することから、その制御は細胞にとって極めて重要である。しかしながら、細胞内外の環境に応じて、これらリボソームの構成因子の遺伝子の転写がどのように制御されるかについては、関与する因子がいくつか同定されてはいるものの、それぞれの機能については不明な点が多い。本研究の開始以前に研究代表者は、出芽酵母の HMGB ファミリータンパク質の 1 つ Hmo1 が、リボソームタンパク質 (RP; ribosomal protein) 遺伝子のプロモーターに特異的に結合し、その転写制御に関わること、*HMO1* の遺伝子破壊によって RP 遺伝子群の転写開始点が本来よりも上流側にシフトすること、などの知見を得ており、この転写開始点のシフトという極めて興味深い形質の分子機構を明らかにすることが、RP 遺伝子プロモーターの転写における Hmo1 の重要な役割を解明する上で有効な手段であると考えた。

## 2. 研究の目的

リボソーム構成因子の生合成に深く関わる因子として研究代表者が独自に見いだした Hmo1 の機能解析を通して、主に RP 遺伝子の転写制御の詳細な仕組みを明らかにすることで、リボソーム生合成機構の全容解明のための手がかりを得ることを目的とする。とりわけ、*HMO1* 遺伝子破壊株において、RP 遺伝子の転写開始点が上流側にシフトするという極めて興味深い知見に元に、その分子機構を明らかにすることにより、目的の達成を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、主に遺伝学的な解析と、ChIP 解析による各種転写因子群の RP 遺伝子プロモーター上での結合位置の同定、さらに各種因子の結合 (量や位置) の相互依存性の解明、などを中心に研究を進めた。特に RP 遺伝子プロモーターへの Hmo1 の結合に必要なシスエレメントの同定と、Hmo1 の結合位置、さらにヌクレオソームや各種基本転写因子群の結合位置の同定、また *HMO1* 遺伝子破壊によって、それらがどのように変化するかを詳細に調べることにより、RP 遺伝子プロモーター上における転写開始前複合体 (PIC; pre-initiation complex)、及び染色体構造の重合に対する Hmo1 の役割を明らかにでき

ると考えた。

## 4. 研究成果

(1) 本研究以前に、酵母の転写開始点が上流側にシフトする変異として、RNA ポリメラーゼ II や TFIIF など PIC 内の因子の変異が知られていたが、研究代表者の見出した *HMO1* 遺伝子破壊株における転写開始点のシフトは、遺伝学的な解析から、これらとは異なる機構で起こっていることが示された。すなわち、前者では PIC 形成以後の RNA ポリメラーゼによる転写開始点の認識に異常が生じていたのに対し、*HMO1* 遺伝子破壊株では、PIC の形成位置自体が上流にシフトしていることが明らかとなった (後述)

(2) Hmo1 の主要な標的遺伝子である *RPS5*、及び Hmo1 の結合しない *RPL10* の両プロモーターからなるキメラプロモーターを用いて Hmo1 の結合に必要なシスエレメントの同定を行った結果、Hmo1 の結合には、転写活性化因子 Rap1 の結合する上流活性化配列 (UAS) と、基本転写因子群が重合して、PIC を形成するコアプロモーター (Core) の間に介在する機能未知の配列 (IVR: Intervenening region と命名) が必要であることが明らかとなった (図 1)。

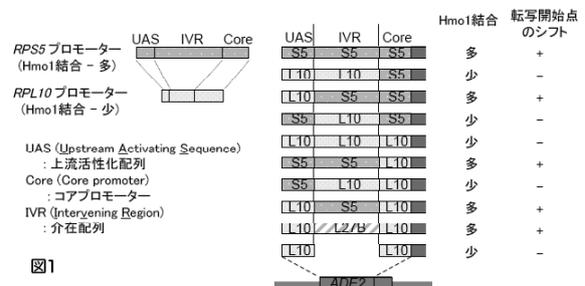
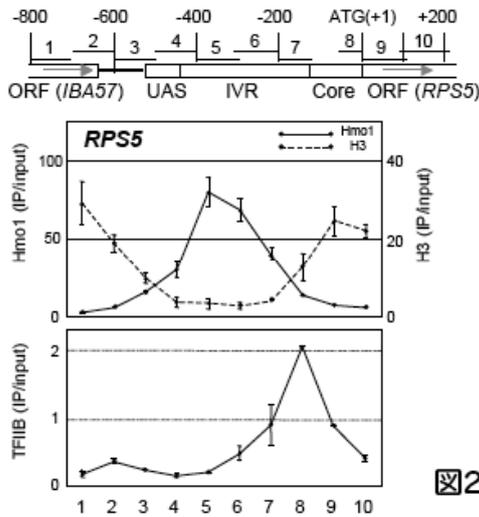


図 1

(3) Hmo1 の結合位置をより正確に決定するために行った高分解能 ChIP 解析の結果、① Hmo1 の RP 遺伝子プロモーター上における結合位置を IVR 内に特定すると共に、②ヌクレオソームが Hmo1 と排他的な領域に結合すること、③RNA ポリメラーゼや基本転写因子群から構成される PIC が Hmo1 とヌクレオソームの間に位置するコアプロモ領域に結合すること、などを明らかにした (図 2)。加えて ④*HMO1* 遺伝子破壊によって、PIC の結合位置が、本来 Hmo1 が結合している領域へとシフトし、このことが *HMO1* 遺伝子破壊株

における転写開始点のシフトの原因となっていることも明らかとなった。



(4) これらの発見に基づき研究代表者は、Hmo1 とヌクレオソームが、それぞれコアプロモーターの 5' 側、及び 3' 側に結合し、コアプロモーター以外の領域への非特異的な PIC の形成を抑制することにより、正しい位置からの転写を促進するという新しい転写開始位置決定の制御機構のモデルを提示するに至った (図 3)。このような機構は特異的なシストランスエレメントの相互作用に基づく転写開始位置決定とは概念的に異なるものであり、転写制御の分野における全く新しい制御機構として学術的価値の高いものと考えている。

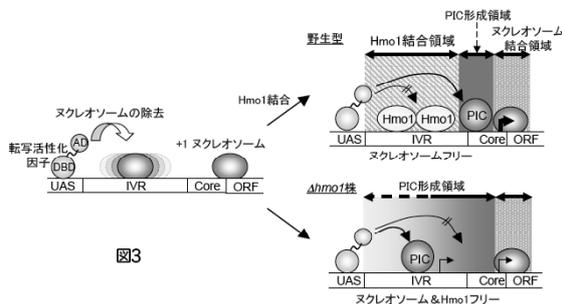


図3

## 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 5 件)

### 1. 笠原浩司

出芽酵母におけるリボソームタンパク質遺伝子の新規転写開始制御機構  
生化学, 83: 736-742 (2011)  
査読有

2. Kasahara K., Ohyama Y., and Kokubo T.  
Hmo1 directs preinitiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region.  
*Nucleic Acids Res.* 39(10):4136-4150 (2011)  
査読有

3. Ohyama Y., Kasahara K., and Kokubo T.  
*Saccharomyces cerevisiae* Ssd1p promotes *CLN2* expression by binding to the 5' -untranslated region of *CLN2* mRNA  
*Genes to Cells* 15(12):1169-88 (2010)  
査読有

4. Sugihara F., Kasahara K., and Kokubo T.  
Highly redundant function of multiple AT-rich sequences as core promoter elements in the TATA-less RPS5 promoter of *Saccharomyces cerevisiae*  
*Nucleic Acids Res.* 39(1):59-75 (2010)  
査読有

5. Ohtsuki K., Kasahara K., Shirahige K., Kokubo T.  
Genome-wide localization analysis of a complete set of Tafs reveals a specific effect of the *taf1* mutation on Taf2 occupancy and provides indirect evidence for different TFIID conformations at different promoters.  
*Nucleic Acids Res.* 38(6): 1805-20 (2010)

査読有

6. Takahashi H., Kasahara K., Kokubo T.  
*Saccharomyces cerevisiae* Med9 comprises  
two functionally distinct domains that  
play different roles in transcriptional  
regulation.

*Genes to Cells* 14(1): 53-67 (2009)

査読有

〔学会発表〕(計2件)

1. 笠原浩司、大山良文、古久保哲朗  
出芽酵母リボソームタンパク質遺伝子の新規  
転写制御機構  
日本分子生物学会年会、2011/12/15 (パシフ  
ィコ横浜)

2. Ohyama Y., Kasahara K., Kokubo T.  
Deletion of the N-terminal domain of *TAF1*  
(*taf1-TAND*) exhibits synthetic lethality  
with mutations of the RAM signaling network  
in budding yeast  
日本分子生物学会年会、2009/12/9-12/12 (パ  
シフィコ横浜)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠原浩司 (Kasahara Koji)  
横浜市立大学生命ナノシステム科学  
研究科・客員研究員  
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：