

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0116

研究課題名(和文) 増殖中の分裂酵母細胞におけるリボソーム数制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of ribosomal protein gene expression in fission yeast

研究代表者

近重 裕次 (Chikashige, Yuji)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・研究マネージャー

研究者番号：60359081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、分裂酵母を用いて、増殖細胞における栄養源の増減に応じたリボソーム数維持制御機構の解明を目的とし、とくに「リボソームを作るために使われるリボソームの割合」に注目し、全 mRNA に対してリボソームタンパク質遺伝子の mRNA が占める割合 (r-fraction) を、さまざまな培養条件や変異体において、DNA マイクロアレイを用いて測定した。その結果、r-fraction の変動は、リボソームタンパク質遺伝子に固有の発現制御機構と染色体全域にわたるグローバルな遺伝子の発現制御機構が、協調的に働いて生じていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソームタンパク質遺伝子に限らず、多くの遺伝子は、遺伝子毎に、あるいは、機能的にカテゴライズされる関連遺伝子群毎に、それぞれに特異的な転写因子や染色体修飾によって、その発現が制御されていると考えられてきた(ローカルな遺伝子制御)。本研究で r-fraction という指標に注目して行った一連の測定から、染色体全域にわたって遺伝子発現のベースを調節する機構(グローバルな遺伝子制御)が存在し、それが、ローカルな遺伝子制御と協調することで、生育に至適な遺伝子発現を実現していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Because proliferating cells pay a high cost to the biogenesis of ribosomes, it is important to control the number of ribosomes adjusting to the environment. To understand how the number of ribosomes is adjusted to the environmental growth conditions, we measured the fraction of mRNA of the ribosome protein genes out of the total mRNA (r-fraction) by using DNA microarray in various culture conditions and mutants. As a result, the control mechanism specific for ribosomal protein genes and the global mechanism for the whole genome worked cooperatively to cause the change of the r-fraction.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム 分裂酵母

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

増殖細胞は、リボソームの生合成に、エネルギー的にも物質的にも多大のコストを割いており、その制御は、生存を左右する問題である。活発に増殖している分裂酵母細胞の mRNA レベルを、DNA マイクロアレイを用いて測定すると、計測された全 mRNA の内、約 50% をリボソームタンパク質遺伝子の mRNA が占めていた。これは、単純に考えれば、リボソームが行う翻訳開始反応の半分をリボソームタンパク質合成に費やしていることを意味する。そして、残りの半分で、その他の、増殖に必要なタンパク質を合成していることになる。リボソームが、細胞増殖に必要なタンパク質を合成するための道具であるなら、リボソームが多ければそれだけ、必要なタンパク質をすみやかに獲得できると考えられるが、一方で、道具としてのリボソームそのものの合成に、多くのリボソームを費やすことになる。細胞が置かれた環境での増殖に至適な数のリボソームを維持するには、「リボソームを作るために使われるリボソームの割合」を適切に保つ必要があると考えられる。我々は、「リボソームを作るために使われるリボソームの割合」を示すパラメータとして、全遺伝子の mRNA 数に対する全リボソームタンパク質遺伝子の mRNA 数の割合を r-fraction と呼んで、増殖細胞におけるリボソーム数制御の指標として提案し、たしかに、栄養条件の変動によって、この値が変動することを見出していた (Chikashige et al., 2015)。

### 2. 研究の目的

本研究では、「リボソームを作るために使われるリボソームの割合」を適切に保つこと、すなわち、増殖中の細胞が、栄養状態に応じて細胞内のリボソーム数を適切に維持管理する制御機構を明らかにすることを目的とする。そのために、本研究では、リボソーム合成やヒストン合成、ヒストン修飾、転写活性などに関与する遺伝子群に着目し、それぞれの変異体における、r-fraction の値を計測し、さらに増殖様態や遺伝子発現レベルを解析することにより、栄養源の変化にたいして、細胞がどのように適応し増殖を維持しようとしているのかを明らかにすることを目指す。

### 3. 研究の方法

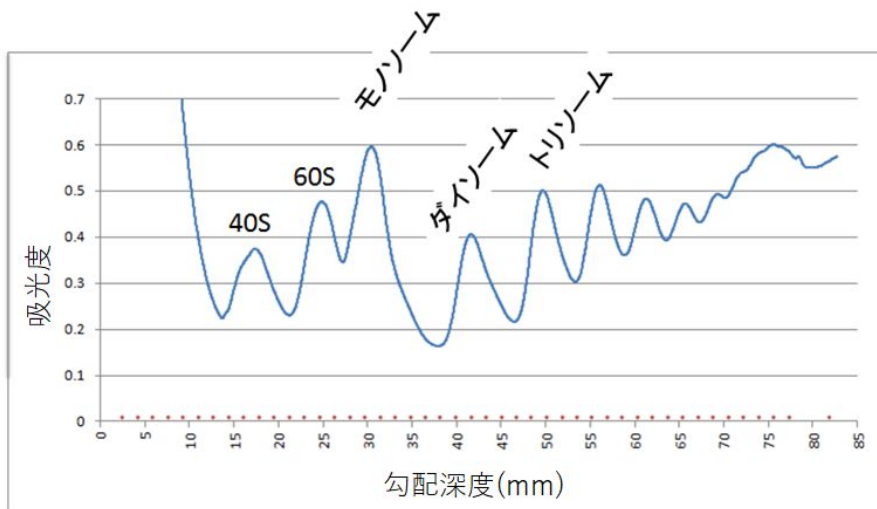
r-fraction の測定には、分裂酵母の野生型株の他、様々な変異体を用いる。培養は、おおむね、回分培養によったが、低栄養下の培養が必要な場合には、連続培養も利用した。分裂酵母細胞からの RNA の精製は、アシッドフェノール法によって行い、アジレント社製のラベリングキット (LowInput QuickAmp Labeling Kit) を用いて、ラベル後、DNA マイクロアレイ実験に供した。DNA マイクロアレイ実験は、アジレント社製のプラットフォームを用いて行い、(DNA Microarray Scanner (G2505C), 8 × 60 K array slides)、スキャン画像解析には、Feature Extraction Software (Agilent) を用いた。

DNA マイクロアレイによる計測から、r-fraction (r) は、次式によって計算した。

$$r = \frac{\text{RPGのmRNA数}}{\text{RPGのmRNA数} + \text{non-RPGのmRNA数}} \quad (1)$$

mRNA ごとの被翻訳頻度を推定する目的で、ポリソーム分析を行った。図 1 は、増殖中の分裂酵母の細胞破碎液をショ糖密度勾配遠心により分画したときのプロファイルである。各分画には、リボソームを含まないものから、40S、60S、モノソーム、ダイソーム、トリソーム・・・を含むピークが含まれる。

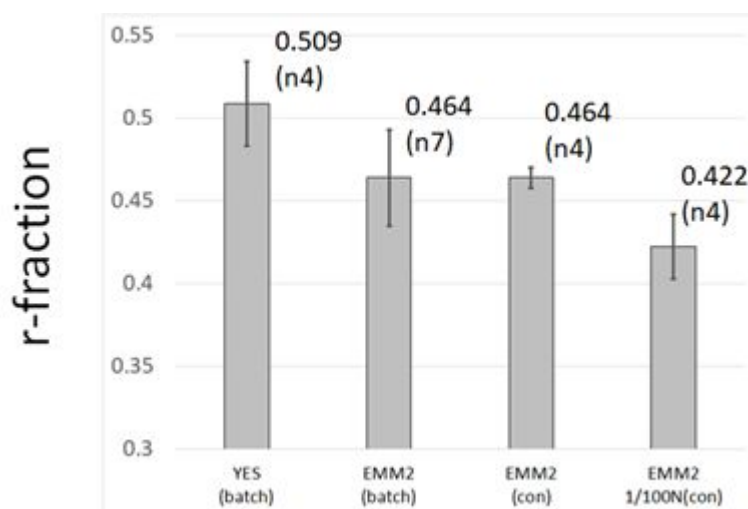
図 1 : ポリソーム分析



#### 4 . 研究成果

図 2 は、( 1 ) で計算した r-fraction の測定結果の一部である。さきに、我々は、分裂酵母野生型株を最小培地で連続培養した場合、培地に含まれる窒素源の濃度によって、r-fraction が、変動すること、即ち、低窒素 ( 100 分の 1 ) の場合には、通常の窒素源を与えた場合が、0.46 であるのに対し、0.42 まで低下することを見出していた ( Chikashige et al. , 2015 )。一方、富栄養培地と最小培地 ( いずれも、回分培養 ) とを比べると、最小培地が 0.46 だったのに対し、富栄養培地では、0.51 にまで上昇していた。

図 2 : 分裂酵母野生型株の r-fraction。YES(富栄養培地)、EMM2(最小培地)、batch(回分培養)、con(連続培養)、1/100N:最小培地中の窒素源濃度を 100 倍に希釈したもの。



こうした、r-fraction の変化は、リボソームタンパク質遺伝子の mRNA が、その他の遺伝子の mRNA の変動にくらべ、より大きく増減するために生じたものと考えられる。一方、ポリソーム分析によって調べた限り、それぞれの mRNA の翻訳されやすさの違いに大きな偏りは、認められなかったことから、リボソーム数の維持においては、リボソームタンパク質遺伝子の mRNA レベルが大きく寄与していることが示唆された。

ついで、リボソーム数維持に直接関与すると考えられる I 型 RNA ポリメラーゼ遺伝子およ

び、mRNA 転写に直接関与すると考えられる II 型 RNA ポリメラーゼ遺伝子の変異体について解析した。加えて、リボソーム数維持に直接関与すると考えられるリボソームタンパク質遺伝子 (RPG) については、分裂酵母の 142 個ある、RPG の内、110 遺伝子についてその破壊株を作成し、それぞれの増殖能を解析した。さらには、RPG の転写制御に関与する可能性のあるいくつかの転写因子の変異体についても解析を行った。

こうした、リボソーム関連遺伝子群の解析に加え、遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていると考えられている、ヒストン修飾関連遺伝子群の変異体についても同様の解析を行った。一連のこうした解析の結果、r-fraction の上昇あるいは減少が顕著に認められた変異体が複数、見出された。これら r-fraction の変動が認められた破壊株間の 2 重変異体などについても解析をすすめた。

以上の一連の解析の結果、r-fraction の変動は、リボソームタンパク質 (リボソーム生合成関連遺伝子群も含む) の転写を特異的、個別的に制御している機構 (ローカルな遺伝子制御) に加え、染色体全域にわたって、遺伝子の発現レベルの分布を制御しているグローバルな遺伝子制御と呼ぶべき機構に依存している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近重裕次、森 知栄、堤 千尋、山本孝治、福田紀子、佐伯恵里、丁 大橋、原口徳子、平岡 泰
2. 発表標題 分裂酵母リボソームタンパク質遺伝子の発現制御機構
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ
4. 発表年 2019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
研究協力者	森 知栄  (Mori Chie)		
研究協力者	堤 千尋  (Tsutsumi Chihiro)		
研究協力者	福田 紀子  (Fukuta Noriko)		
研究協力者	佐伯 恵里  (Saeki Eri)		