

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00973

研究課題名(和文) 転写速度制御を介した統合的遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of total regulatory mechanism of gene expression mediated by transcription speed control

研究代表者

村上 洋太 (Murakami, Yota)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：20260622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では先行研究で見出した転写速度制御に重要なRNA polymerase II C末端領域(CTD)のSer7のリン酸化(S7リン酸化)に着目してその作用機構と機能について分裂酵母を用いて解析をおこなった。その結果S7リン酸化が転写のブレーキとして働くこと、そのブレーキ機能の一部は転写初期でのクロマチン構造制御を介した一時停止の亢進によりおこることを明らかにした。また、S7リン酸化による転写終結制御、ヘテロクロマチン形成制御、他のCTDリン酸化とのクロストーク、ストレス応答制御への関与、など多面的な機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞・生物が外的・内的環境変化に対応する仕組みの理解は生命理解のために重要であり、医学の進歩にも重要である。本研究では、生命の環境適応に重要な遺伝子発現制御について、特に遺伝子読み取り過程である「転写」の速度制御が最終的な遺伝子の発現に大きな影響を及ぼすことを示し、その分子機構の一部を明らかにしたものである。今まで転写速度という観点からの研究は少なく、この分野に新たな視点を導入した。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that phosphorylation of Ser7 (S7-P) of RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) is important for the regulation of transcription speed by RNA polymerase II. In this study, based on the previous results, we analyzed the function and action mechanism of S7-P using fission yeast. We found that S7-P functions as a “brake” of transcription at the transcription initiation site and that the braking mechanism includes the control of the chromatin structure at the initiation site. Furthermore, we indicated the multiple regulatory function of S7-P, including transcription termination, heterochromatin formation, other CTD phosphorylation and stress response.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：転写速度 遺伝子発現 クロマチン RNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

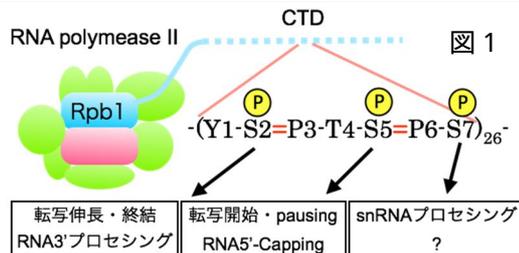
タンパク質をコードする遺伝子は RNA ポリメラーゼ II (Pol2) により mRNA として転写され、その後、RNA プロセッシング・RNA 運搬・翻訳のプロセスを経て発現に至る。一方、ゲノムの非コード領域の大部分は Pol2 により転写され、多くの non-coding RNA (ncRNA) を作り出す。ncRNA の多くは機能未知であるが、一部は核内に留まりヒストン修飾を介したエピゲノム制御にかかわるなど mRNA とは異なる運命・機能をもつ。転写から翻訳・RNA の機能発現に至る各過程は個々に制御される一方で、互いに協調的に制御され複雑な制御ネットワークを作り出す。特に遺伝子の機能発現の最初のステップである転写反応とそれに続く RNA プロセッシングや運搬などの RNA 運命決定の過程が協調的に制御されていることが示されつつある。さらに、転写調節の基盤となるクロマチン構造(=エピゲノム)を規定するヒストン修飾も転写と共役して制御されることも示されてきた。これら転写と共役した制御システムが遺伝子機能発現で果たす役割の大きさは認識されているものの、その研究対象は複雑かつ膨大で、その全体像や詳細な分子機構の大部分は明らかではない。

2. 研究の目的

上記の背景をふまえて本研究では、「RNA の運命やエピゲノムがどのように転写と協調的に制御されているのか」という問いに新たな切り口から迫ろうとするものである。

Pol2 の最大サブユニット Rpb1 の C 末には CTD (C terminal domain) と呼ばれる、種を越えて保存された 7 アミノ酸の繰り返し配列 (分裂酵母では 29 回) をもつドメインが存在し、その 2, 5 番目のセリン (CTD-S2, -S5) のリン酸化は転写開始・伸長・終結反応制御の他に RNA プロセッシングにも関与する (図 1)。これらのリン酸化に依存して、異なる制御因子が CTD に結合すると考えられている (Erick & Geyer 2013 Chem Rev.)。

CTD-S7 のリン酸化は CTD-S2, S5 に比べて解析が遅れており、その機能は未知の部分が多い。申請者は分裂酵母を用いて CTD-S7 リン酸化に関して解析をおこない、以下の知見を得た。



- (1) CTD-S7 リン酸化はゲノムワイドに転写に共役しておこり、転写伸長のブレーキとして機能する。
- (2) 分裂酵母はヘテロクロマチンから転写される ncRNA とそれから合成される siRNA に依存した RNAi 依存ヘテロクロマチン形成システムをもつ。CTD-S7 リン酸化は、siRNA を含み RNAi の effector 因子である RITS 複合体の Pol2 との結合を促進し、ncRNA のクロマチン結合・siRNA 合成を制御する。それにより、最終的にヘテロクロマチン形成に必須の機能を果たす (Kajitani et al. 2017 PNAS)。

以上の知見をふまえ、本申請ではクロマチン研究のモデル生物として優れた分裂酵母を用いて「CTD-S7 リン酸化による転写速度制御を介して遺伝子発現が統合的に制御されているメカニズムを理解する」ことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CTD-S7 リン酸化による転写速度調節とそれにもなうクロマチン構造やクロマチン結合因子の動態変化の解析: CTD-S7 リン酸化は転写の初期及び集結近傍で上昇する事を ChIP-seq の結果から見いだしていたので、野生型株と S7 リン酸化がおきない CTD-S7A 変異株を使い、CTD-S7 リン酸化と転写一時停止や転写終結との関連を、転写高精度解析 PRO-seq、転写・クロマチン制御因子の ChIP-seq、プロテオミクス解析、クロマチンアクセシビリティ解析 ATAC-seq を組み合わせて解析した。

(2) CTD-S7 リン酸化のヘテロクロマチンでの機能: CTD-S7A 変異株では RNAi に依存するヘテロクロマチン形成に障害が生じる。これは CTD-S7A 変異による転写速度上昇が原因との仮説をたてていた、そこで転写速度を上昇させる事が知られている変異を導入し、ヘテロクロマチンへの解析をおこなった。

(3) Pol2 転写速度調節に関わる因子の遺伝学的解析: リン酸化状態を模倣する CTD-S7E 変異は致死となる。これは転写速度が極度に低下するためと考えられる。一方 CTD の繰り返しを野生型の 29 から 18 に減少しても細胞は生育出来るが、この状態で S7 を E に置換すると (CTD-S7Ex18) 高温 (36 度)・低温 (18 度)、では生育出来ないが通常温度 (30 度) では生育できる (Schwer et al. 2012 PNAS)。これは高温・低温のストレス条件下での生育に転写速度制御が重要であることを示唆している。この減少を利用して、CTD-S7Ex11 株から高温で生育可能となる抑制変異株を単離する。抑制変異株では CTD-S7Ex11 変異による転写速度低下を復帰させる変異、すなわち転写速度低下に関わる因子に変異が予想される。したがって、復帰変異株での変異遺伝子を同定することで転写速度抑制に関わる因子を同定できると考えた。

4. 研究成果

(1) CTD-S7 リン酸化による転写一時停止制御機構の解明

合成途中の nascent RNA を検出し転写の動態を観察できる PRO-seq を用いて野生型株と *CTD-S7A* 変異株での転写プロファイルを比較したところ、確かに *CTD-S7A* 変異株では転写速度が上昇していることが確認できた。

一方、ChIP-seq の結果から、CTD-Ser7 リン酸化は、転写開始点近傍の転写一時停止部位に顕著な局在のピークがあることを見出していたので、CTD-S7 リン酸化が転写一時停止を促進している可能性について解析を進めた。詳細な PRO-seq 解析、クロマチンのアクセシビリティを解析する ATAC-seq、から一時停止部位に重要な転写開始直後に存在する+1ヌクレオソームの局在が CTD-S7 リン酸化で制御されていることが明らかになった。さらに ChIP-seq により、このリン酸化は転写一時停止部位への各種ヒストンシャペロン集積を制御する事を明らかにした。以上から CTD-S7 リン酸化は、ヒストンシャペロン局在を抑制する事で、転写一時停止の立体障害となる+1ヌクレオソーム交換反応を介して転写一時停止の安定化と解除のバランスを制御するという新規モデルを提唱するに至った (Kajitani et al. 投稿準備中)。

(2) CTD-S7 リン酸化による転写終結制御

PRO-seq 解析から CTD-Ser7 リン酸化は転写早期終結を抑制する機能があることを見出した。CTD と相互作用することが知られている転写終結因子 Pcr11, Seb1, Rhn1 の ChIP-seq の結果から、CTD-Ser7 リン酸化は転写終結因子 Pcf11 と Seb1 を遺伝子内部、特に転写終結領域に集積させる機能があることを見出した。以上の結果から、CTD-S7 リン酸化は転写終結因子を呼び込むタイミングを制御することで正しい転写終結を引き起こすのではないかと考えている。

(3) CTD-S7 リン酸化による RNAi 依存性ヘテロクロマチン制御

CTD-S7A 変異株ではセントロメア RNAi 依存ヘテロクロマチンの欠損がおこる。これが *CTD-S7A* による転写速度上昇に起因するとの仮説をたてた。これを確認するために、転写速度が上昇することがすでに知られている Pol2 の最大サブユニットの変異 *rpb1-E1106G* が RNAi 依存ヘテロクロマチンに及ぼす影響を検討した。すると *rpb1-E1106G* 変異は *CTD-S7A* 変異と同様のヘテロクロマチン欠損の表現型を示し、転写速度制御がヘテロクロマチン形成に重要であることが確認できた。

また CTD-S7 リン酸化が呼び込む転写終結因子がヘテロクロマチン形成にも関与しているか、検討を行ったところ、*CTD-S7A* と転写終結因子 *pcf11* 破壊の 2 重変異株でヘテロクロマチンの増強がおこることがわかった。この増強がおこる分子機構は現時点で不明だが、転写速度・転写終結制御とエピゲノム制御のリンクを考える上で重要な知見と考えている。

(4) CTD-S7 リン酸化による他の CTD リン酸化の制御

CTD のリピートを形成するアミノ酸のうち Ser7 のリン酸化以外にも、Tyr1, Ser2, Ser5 のリン酸化が知られており、それぞれ転写調節、RNA プロセッシング制御に関与することが知られている。*CTD-S7A* 変異体を用いた解析から CTD-S7 リン酸化が Tyr1, Ser2 のリン酸化を抑制していることを明らかにした。特に Ser2 リン酸化は転写伸長時間から終結にかけておこるリン酸化で、転写伸長因子や終結因子を制御する事が知られている。したがって、Ser7 リン酸化が転写速度を抑制するメカニズムのすくなくとも一部はこの Ser2 リン酸化抑制であると考えられる。

(5) CTD7 リン酸化と遺伝学的相互作用を示す因子の探索

リン酸化状態を模倣する *ctdS7E* 変異は致死となるが CTD のリピート数を野生型の 29 から 18 に減少させると、18°Cあるいは 36°Cでは生育できない温度感受性を示す。そこで、「3. 研究の方法」で示した様に CTD-S7 リン酸化と遺伝学的に相互作用する因子を同定するために、高温での生育阻害を抑制する復帰変異株の単離を試み、複数の候補株を得た。特にヒストンアセチル化複合体 SAGA のサブユニットをコードする遺伝子の変異体を多く得た。SAGA は転写制御に広範に関わることが知られている複合体で、アセチル化だけではなくヒストン H2B ユビキチン化にかかわる DUB モジュールも含む。今回得られた復帰変異は特にこの DUB を構成する因子に集中している。実際 DUB モジュールの *Sgf73* の欠損は *S7Ex18* の温度感受性を抑制する事を確認した。従って SAGA/DUB モジュールが CTD-S7 リン酸化による転写制御に関与する事、またその制御が細胞の熱応答制御に関与することが示唆された。我々を含む複数の先行研究から、ヘテロクロマチン形成因子の標的として熱ストレス応答遺伝子が同定されていること、他の生物種では、熱ストレス応答遺伝子は転写一時停止の優れたモデル遺伝子座であることが知られている。以上から、転写速度制御が、エピゲノム変化を介してストレス応答を制御するという仮説をたてるに至った。

以上、本研究では CTD-S7 のリン酸化による転写速度制御を中心にその分子機構やアウトプットの解析を進めてきた。CTD の各種リン酸化のなかでも S7 リン酸化の研究は遅れているが、その中で我々の解析は重要な知見を蓄積しているといえよう。今後各項目について分子機構の詳細を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ray J., Kruse A., Ozer A., Kajitani T., Johnson R., MacCoss M., Heck M., Lis J.	4. 巻 48
2. 論文標題 RNA aptamer capture of macromolecular complexes for mass spectrometry analysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 e90-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa542	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 Yu H., Tsuchida M., Ando M., Hashizaki T., Shimada A, Takahata S., Murakami Y.	4. 巻 26
2. 論文標題 Trimethylguanosine synthase 1 (Tgs1) is involved in Swi6/HP1 independent siRNA production and establishment of heterochromatin in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 203-218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12833	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 Tsukii K., Takahata S., Murakami Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Histone variant H2A.Z plays multiple roles in the maintenance of heterochromatin integrity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 93-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12911	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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶谷卓也, John Lis, 村上洋太, 沖昌也
2. 発表標題 RNA polymerase IIリン酸化による転写一時停止はエピジェネティクス情報不均一さを抑制する
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第38回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶谷卓也、Damien Hermand, John Lis, 沖昌也、村上洋太
2. 発表標題 RNA polymerase IIによるエピジェネティクス転写とヒストン修飾の安定性制御
3. 学会等名 日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶谷卓也
2. 発表標題 転写装置RNA polymerase II CTD-Ser7リン酸化は転写一時停止とヘテロクロマチン形成を促進する。
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶谷卓也
2. 発表標題 細胞周期が遺伝子発現不均質性を生み出す可能性の検証
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部例会（招待講演）
4. 発表年 2021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 分 担 者	梶谷 卓也 (Kajitani Takuya) (20883078)	福井大学・その他部局等・日本学術振興会特別研究員 (13401)	

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			
米国	Cornel University			
ベルギー	Namur Research Collage			