

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310114

研究課題名（和文） 酵母をモデルとした機能性 RNA 探索戦略の開発

研究課題名（英文） Strategies to search functional RNAs using yeast as a model system

研究代表者

伊藤 隆司 (ITO TAKASHI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：90201326

研究成果の概要（和文）：真核生物のゲノムが全般的に転写されて多数の非コード RNA を生成する事実は周知となったが、その意義については議論が絶えない。我々は、細菌ゲノムを人工染色体として保持する酵母の解析から、機能を持たない筈の細菌ゲノムも酵母ゲノムと同等の頻度で転写されることを見出した。また、転写容量を削減した酵母では、最近の研究で見出された新規非コード RNA の量が優先的に減少することを見出した。これらの結果は、ゲノムの全般的な転写の大半が機能を持たないとする説に矛盾しない。

研究成果の概要（英文）：It is well documented that eukaryotic genome is pervasively transcribed to generate numerous novel non-coding RNAs, but the significance of such transcription remains controversial. We found that yeast cell transcribes a bacterial genome maintained as an artificial chromosome, which should have no biological function, as efficiently as its natural chromosomes. We also showed that limiting transcriptional capacity of yeast leads to a preferential decrease in the level of novel non-coding RNA species identified in recent studies. These results do not contradict with the idea that pervasive transcription is largely functionless.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：非コード RNA

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムでは蛋白質配列をコードする部分は全ゲノムの1.5%に過ぎず、イントロンを含めても RNA に転写される部分はゲノム全体の25%相当とされてきた。ところが、近年のタイリングアレイ解析や完全長 cDNA 解析によって、従来は遺伝子として認識されてい

なかった部分も、そのほとんどが ncRNA に転写されることが明らかになった。しかし、miRNA に代表される小型の ncRNA とは対照的に、mRNA 様の大型 ncRNA に関してはその機能が未だよく分からず、重要な制御分子であるという期待がある一方、大半はノイズに過ぎないという見方も根強い。いずれにせよ、多

数の ncRNA の中から効率的に機能性 ncRNA を選別する為の方法論が求められている。

我々は、真核細胞を分子のシステムとして理解する為のモデルとして出芽酵母を取り上げ、ゲノム科学の立場から様々な解析を行ってきた。トランスクリプトームに関しては、絶対定量や転写因子の恒常活性化による標的遺伝子探索に取り組んできたが、それらに必要な基盤情報として、転写単位構造の確立が必要であることを痛感し、ベクター・キャッピング法による完全長 cDNA 解析を行なった。その結果、世界最大の転写開始点 (TSS) データを得るとともに、TSS やスプライシングの多様性などの新知見も得て、ゲノム・アノテーションの向上に大きく貢献した (Miura et al. PNAS 2006)。

この解析では 3,303 ORF 上流に TSS が同定されたのに対して、既知遺伝子間領域に由来する転写物、ORF 内部に TSS を持つセンス鎖転写物、既知遺伝子に対するアンチセンス転写物が総計で 1,865 種も見出された。これらは、我々自身や他のグループによるタイリングアレイ実験でも確認された。以上の結果は、ゲノムワイドな転写と多種多様な ncRNA の存在は、高等生物の特性ではなく、むしろ真核生物に共通の性質と考えるべきであることを示している。

さて、Struhl によると、生物分子認識における識別能を考えると、ゲノムワイドにノイズ的転写が起こるのは不可避であるという (Nat. Struct. Mol. Biol. 14, 103, 2007)。識別力の高い厳密な転写装置の創成よりも、ノイズ的転写の許容の方が、進化的コストは低かったであろう。ノイズ的転写は、それが cis に及ぼす影響や転写産物の trans 作用が一定限度を越えない限りは、存在を許される中立的なものである。そう考えると、これらの ncRNA が一般に進化的保存性が悪く、またその発現量も通常の遺伝子のそれに比較すると平均的には低いことも説明がつく。

しかし、こうした転写であっても、それがひとたび cis あるいは trans の機能を獲得すると、自然選択の対象となり、潜在的プロモータはよりソリッドなものへと進化を始めるであろう。転写されたりされなかったりする揺らぎの大きな潜在性プロモータが、より確実性の高いプロモータへと進化し、最終的には転写因子による発現制御を獲得し生理学的応答のコンテキストへと組み込まれる。つまり、転写装置がアクセスしやすいような物理化学的特性によってのみ転写されていた脆弱でノージーな潜在性プロモータが、生物学的要請によって転写される頑強なプロモータへと進化する。この考えによれば、ゲノム中に散在する多数の潜在性プロモータ活性は、新しい遺伝子獲得におけるプロモータのリソースとしての進化的意味を持って

いることになる。

## 2. 研究の目的

我々は出芽酵母の完全長 cDNA 解析によって、予想外に多数の非コード RNA (ncRNA) の発現を見出した (Miura et al. PNAS 2006)。本研究では、モデル生物としての酵母の特性を活用しながら、これら多数の ncRNA の中から機能性分子を同定する方法論を開発する。

## 3. 研究の方法

具体的には、以下の 3 点を行なう。

(1) 酵母人工染色体とタグカウント技術を用いて、異種生物ゲノム配列からの転写開始を解析し、非生物学的なノイズ性転写の基盤にある物理化学的特性を明らかにする。

(2) 細胞の転写容量が制限された場合においても、発現が頑強に維持される ncRNA をタイリングアレイや高出力タグカウント技術を用いて同定する。

(3) 転写因子の恒常活性化に伴って発現が誘導される ncRNA を同定する。

上記(1)により得られた知見に基づいて非生物学的転写を排除しつつ、(2)や(3)から機能性 ncRNA 候補を濃縮し、それらの機能を遺伝学的手法で証明する。これによって、酵母トランスクリプトームの理解を深めるとともに、他生物にも応用可能な ncRNA の機能探索戦略の提示を目指す。

## 4. 研究成果

(1) 酵母人工染色体と高出力タグカウント技術を用いて、異種生物ゲノム配列からの転写開始を解析し、非生物学的なノイズ性転写の基盤にある物理化学的特性の解明を試みた。具体的には、マイコプラズマゲノムを人工染色体として保持した酵母株について、独自に改良を重ねた RNA-PET による発現タグカウントを行ない、特定のパターンを持った転写が起こることを確認した (図 1, 2)。

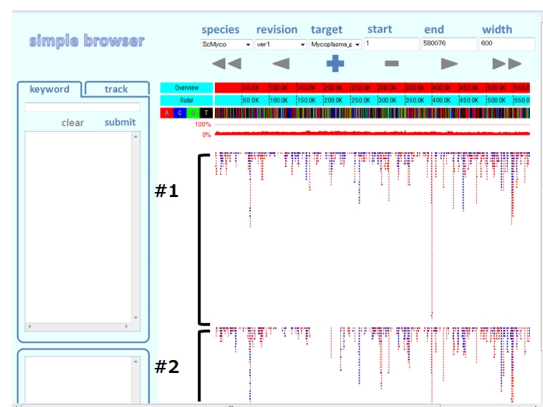


図 1: 酵母細胞内でのマイコプラズマゲノムの転写状況

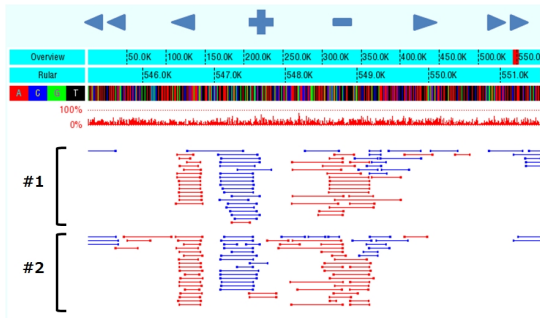


図 2：酵母細胞内でのマイコプラズマゲノムの転写状況（拡大図）

酵母ゲノムとマイコプラズマゲノムにおける転写の頻度を比較してみると、発現量の高い遺伝子を除くと、後者も前者とほぼ同等レベル転写されることが分かった（図 3）。したがって、生物学的機能の有無に関わらず、ゲノムはある一定レベルで転写されてしまうことが示唆された。

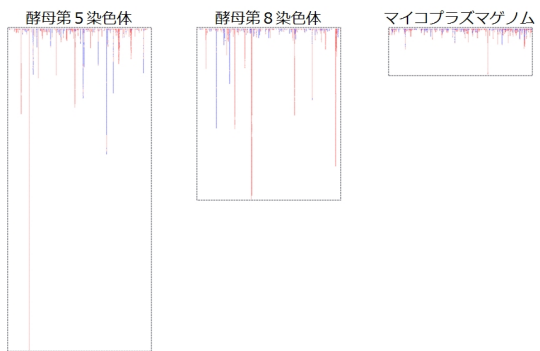


図 3：酵母ゲノムとマイコプラズマゲノムの転写頻度

しかしながら、そこには特定のパターン（強弱）が現れるので、ゲノムDNAの何らかの特性が転写され易さ、され難さを決めていられると考えられる。その一要因としてヌクレオソーム配置を考慮して、MNase-Seq によるヌクレオソーム配置の決定を行った。ヌクレオソームについては、それを好む配列と好まない配列が示されており、それらも含めた観点からの解析を進行している。

また、これらの結果は原核細胞ゲノムが真核細胞内に移動した際に容易に転写される可能性を示唆している。真核生物では転写にカップルしてキャップ構造が付加されるし、原核細胞の SD 配列のような配列を翻訳開始に必要とはしない。したがって、こうして転写された RNA は翻訳される可能性も高いと考えら得る。それが選択を受ければ、容易に遺伝子の水平移動が成立する可能性もあり、進化的観点からも興味深い結果であると考えられた。

(2) 細胞の転写容量が制限された場合においても、発現が頑強に維持される ncRNA をタイリングアレイや高出力タグカウント技術を用いて同定するために、RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニット Rpb1 をコードする *RPB1* 遺伝子のプロモータ置換を試みた。具体的には、プロモータを培地中の Leu によって発現を抑制できる *LEU2* および *LEU2d* プロモータに置換した *RPB1* 遺伝子をプラスミドシヤリングで *rpb1* 欠損株に保持された株を作成した。これらの株を様々な条件で培養し、活性型 RNA ポリメラーゼ II の量をリン酸化 CTD に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングで検討し、転写容量が野生株に比較してそれぞれ 60%および 90%減少した株の取得に成功した。これらの株は野生株に比較して、倍化時間がそれぞれ 10%と 30%延長したものの十分に生育が可能であった。

そこでこれらの株から RNA を調製して、タイリングアレイ解析を行なった（図 4, 5）。その結果、タンパク質コード遺伝子よりも Cryptic Unstable Transcript (CUT) の発現の方が転写容量制限に対して敏感である一方、機能性 ncRNA である snoRNA の発現はタンパク質コード遺伝子と同様の頑強性を示すことを見出した。また、非コード RNA であっても既知の snoRNA はタンパク質コード遺伝子と同様の挙動を示すことが分かった。

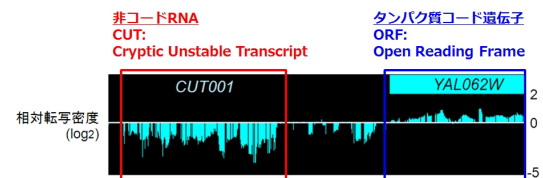


図 4：タイリングアレイを用いた転写容量制限による転写物変動の解析

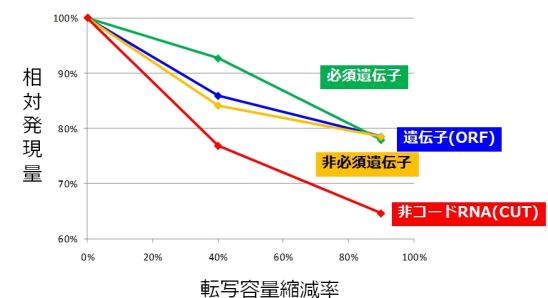


図 5：転写容量制限に伴う CUT と ORF の発現量変動

(3) 転写因子の恒常活性化に伴って発現が誘導される ncRNA を同定するために、減数分裂を制御する転写因子 Ume6 を活性化ドメインとのキメラ化で恒常活性化した株の発現

タイリングアレイ解析を行い、何種類かの興味深い挙動の ncRNA を同定した。また、同じく減数分裂期に誘導される減数分裂期に発現誘導される ncRNA として、CLN1 および CLN2 の上流に由来する uCLN1 と uCLN2 を同定し、転写因子 Ndt80 による制御を受けることを示す結果を得た。

#### 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 3 件)

①Xia, X., MacKay, V., Yao, X., Wu, J., Miura, F., Ito, T., Morris, D.R.: Translation initiation: a regulatory role for poly(A) tracts in front of the AUG codon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 査読有, 189, 2011, 469-478, DOI:10.1534/genetics.111.132068

②Ito, T., Miura, F., Onda, M.: Unexpected complexity of the budding yeast transcriptome. *IUBMB Life*, 査読有, 60, 2008, 775-781, DOI:10.1002/iub.121

③Miura, F., Kawaguchi, N., Yoshida, M., Uematsu, C., Kito, K., Sakaki, Y., Ito, T.: Absolute quantification of budding yeast transcriptome by means of competitive PCR between genomic and complementary DNAs. *BMC Genomics*, 査読有, 9, 2008, 574, DOI:10.1186/1471-2164-9-574

[学会発表] (計 2 件)

①前橋慶一、太田一寿、恩田美雪、伊藤隆司: 転写容量の制限によるトランスクリプトーム変動の解析. 第 32 回日本分子生物学会, 2009. 12. 9-2009. 12. 12, 横浜

②Takashi Ito: Unexpected complexity of the budding yeast transcriptome. ASBMB2008, 2008. 4. 6, San Diego, USA

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 隆司 (ITO TAKASHI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号: 90201326

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし