

研究報告書

「RNAによる染色体分配制御機構の解明」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：杉山 智康

1. 研究のねらい

真核生物核内には、ヘテロクロマチンや核スペckルなどの機能性ドメインが数多く存在し、染色体分配や遺伝子発現調節などの重要な役割を担うと考えられている。近年の研究の進展により、これら機能性ドメインの構築に非コード RNA(ncRNA)や RNA interference(RNAi)が重要な役割を果たすことが明らかになりつつあるものの、各ドメインの詳細な機能、形成機構など未解明な点は多く残されている。本研究では染色体分配を中心に、RNA 制御と機能性ドメインの関わりを明らかにすることを目標にした。

2. 研究成果

遺伝学、分子生物学、細胞生物学的手法が利用できる分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)を主な研究材料とし、①RNA による染色体上の機能ドメイン(キネトコアおよびヘテロクロマチン)の制御、および②新規タンパク質 Red1 が形成する核内ドメインの機能および RNA 制御との関連について研究を進め、以下の成果を得た。

①RNA による染色体上の機能ドメインの制御

【キネトコア由来転写産物の解析】

キネトコアは染色体分配時に紡錘体から伸びてきた微小管が結合する染色体上の機能ドメインである。キネトコア領域では、通常のヌクレオソームではなくヒストン H3 の代わりに CENP-A が存在している。キネトコアの形成は、出芽酵母では DNA 配列に依存して起こるが、分裂酵母やヒトでは DNA 配列ではなく何らかの方法によってキネトコア領域を規定していることが知られている。

我々はヘテロクロマチン形成とキネトコア領域決定は共通点、つまり RNAi によって形成領域が決定されると仮説を立てた。この仮説が正しければ、キネトコア領域由来の RNA が RNAi により small interfering RNA (siRNA) に分解され、キネトコア siRNA が配列特異性を生じさせているものと想定される。この仮説を検証するために、キネトコア領域由来 RNA (kdRNA) の検出を試みた。すると、野生株では kdRNA の存在が認められなかったものの、RNAi 因子欠損株では kdRNA が検出された。さらに、kdRNA は CENP-A 局在化が異常になる変異体や複数のヒストン修飾酵素欠損株においても検出された。したがって、この kdRNA が何らかの形でキネトコアの形成あるいは機能に関与する可能性が示唆された。

【新規染色体制御因子の同定】

RNAi はキネトコア RNA の代謝に関与するだけでなく、ヘテロクロマチン形成や染色体高次構造形成にも重要であるため、新規 RNAi・染色体制御因子の同定は非常に重要である。

複数のデータベースサーチにより RNAi や染色体制御に関与すると予想される遺伝子を選抜し、欠損株の作成を行った。その結果、複数の欠損株がヘテロクロマチン領域での遺伝子発現抑制

(サイレンシング)異常や DNA 障害を引き起こす薬剤に対する高感受性を示した。これら欠損株のうち、ヘテロクロマチンの異常を示したものを *sde1* (silencing defective 1) および *sde2* と名付けた。*sde1* 欠損株はセントロメアでのみサイレンシング異常を示し、一方 *sde2* 欠損株はセントロメアとテロメアでサイレンシング異常を示した。*sde1* 欠損株で観察された表現型は RNAi 欠損株と類似している一方、*sde2* 欠損株の表現型はこれまで報告のないサイレンシング異常であり、非常に興味深いものであった。

Sde2 の更なる機能解析を行ったところ、Sde2 は核タンパク質であること、*sde2* 欠損株では DNA 障害および微小管重合阻害剤に対する感受性が上昇していること、Sde2 の働きによりヒストン脱アセチル化酵素複合体 SHREC (SNF2/HDAC repressor complex) がテロメアへリクルートされる事を明らかにした。また、他のグループにより Sde2 がスプライシング因子 Prp17 や Prp19 と結合すること (Ren et al, PLoS One, 2011)、およびスプライシング因子はヘテロクロマチン形成に必須であること (Bayne et al, Science, 2008) が報告された。したがって、Sde2 がスプライシング因子と協調的に染色体制御を行っている可能性、あるいは Sde2 がスプライシング因子の一つである可能性も示唆された。

②核内構造体形成因子 Red1 による選択的 mRNA 分解機構の解析

【Red1 の機能解析】

我々は蛍光タンパク質の局在を指標にしたスクリーニングにより、複数の機能未知遺伝子が核内構造体を形成することを見出している。このような因子の一つ、Red1 は核内に 1~4 個程度のドットを形成する。Red1 の機能を解析するために、*red1* 欠損株を作成し表現型の解析を行った。その結果、*red1* 欠損株では増殖速度、接合能および孢子形成能の低下が観察された。さらに、野生株と *red1* 欠損株間の遺伝子発現状態をマイクロアレイにより比較したところ、*red1* 欠損株では栄養増殖期であるにもかかわらず、減数分裂期 mRNA が蓄積していた。

分裂酵母では、減数分裂期 mRNA は栄養増殖期・減数分裂期問わず転写が起きているが、栄養増殖期には RNA 結合タンパク質 Mmi1、ポリ A ポリメラーゼ Pla1、核内 RNase 複合体エキソソームの働きにより分解されている。この減数分裂期 mRNA 分解機構に Red1 が関与すると予想し、種々の実験を行った。その結果、Red1 は Mmi1/Pla1/Rp6 (エキソソームサブユニット) と結合および共局在した。また、減数分裂期 mRNA 分解にはポリ A 鎖の存在が必須であるが、Red1 非存在下ではポリ A の伸長化が起こらないことから、Red1 は標的 mRNA のポリ A 鎖伸長を促進することで分解に関与しているものと考えられる。

【Red1 の機能調節機構の解明】

Red1 は栄養増殖期において、減数分裂期 mRNA の分解を促進している。しかし、この分解機構は、減数分裂期には何らかの方法によって不活化される必要がある。栄養増殖期および減数分裂期の Red1 局在の観察から、Red1 の核内ドットが減数分裂期には消失することを見出した。また、Red1 の局在は減数分裂終了後の孢子で再び観察されること、ウエスタンブロットにより Red1 タンパク質量に変化は生じないことも明らかとなった。Red1 が消失している時期は、大部分の Red1 標的 mRNA が発現する時期とほぼ一致するため、Red1 の局在変化により Red1 の機能が調節されているものと予想される。

次に、減数分裂時の局在変化がどのような因子によって引き起こされるのかを検討した。Red1 の局在変化が減数分裂開始後の早い段階で起こること、および Mmi1 の局在を制御する

Mei2/*meiRNA*の欠損株においてもRed1 ドットの消失することから、窒素源枯渇、フェロモン応答、あるいは接合のいずれかがトリガーになっている可能性が考えられた。まず、接合が起こらない *fus1* 欠損株を減数分裂期に誘導したところ、野生株と同様にRed1 局在が消失した。次に、*h* および *h⁻ matPc*株を用いて同様の実験を行ったところ、*h⁻*では局在の変化が起こらなかったが、*h⁻ matPc*ではRed1 局在の変化が観察された。これらの結果は、Red1 の局在変化はフェロモン応答によって引き起こされることを示している。

【Red1 以外の減数分裂期 mRNA 抑制因子の探索】

我々が見出した核内構造体を形成する機能未知遺伝子の一つ、Red4 は核内に1~3個のドットを形成する。Red4 の機能を解析するために、*red4* 欠損株を作成し表現型の解析を行った。その結果、*red4* 欠損株では高温感受性が観察され、更に接合能および胞子形成能が若干低下していた。Red4 と結合する因子を探索したところ、pre-mRNAの3'プロセッシング因子との共沈が観察された。さらに、野生株と*red4* 欠損株間の遺伝子発現状態の違いを調べたところ、*red4* 欠損株では栄養増殖期であるにもかかわらず、一部の減数分裂期mRNAの上昇が確認された。*red4* および*red1* 欠損株で発現レベルが上昇していた減数分裂期mRNAを比較すると、ごく一部が重複するものの大半は別の遺伝子を標的としている結果が得られた。特に、*mei4^Δ/rec8^Δ*に代表されるRed1 およびMmi1 の標的遺伝子は殆ど含まれていなかった。これらの結果から、Red4 はRed1/Mmi1 とは異なる機構で減数分裂期mRNAの蓄積を抑制するものと考えられた。

3. 今後の展開

①RNAによる染色体上の機能ドメインの制御

本プロジェクトの結果より、キネトコア由来の非コードRNAであるkdRNAが何らかの役割を果たす可能性、新規RNAi因子Sde1によるヘテロクロマチン形成、Sde2による染色体末端テロメア制御を見出した。今後は、それぞれの因子が具体的にどのような役割を果たすのかを明らかにする必要がある。特に、kdRNAはブラックボックスの多いキネトコア形成におけるエピジェネティック因子の候補であるためは、非常に興味深い。また、Sde2とスプライシング因子の結合は、テロメア制御におけるスプライシングの重要性を示唆するものであり、今後重要な課題であると考えられる。

②核内構造体形成因子Red1による選択的mRNA分解機構の解析

本プロジェクトの成果は、分裂酵母における不要なmRNA(=減数分裂期mRNA)分解機構の理解に繋がった。しかし、この分解機構の完全な理解には更なる研究が必要である。今後、分裂酵母減数分裂期mRNA分解機構の全容解明のために、この機構に関わる因子を遺伝学的、生化学的および細胞学的手法を用いて網羅的に同定していく。さらに、分裂酵母で発見された選択的mRNA分解機構が進化的保存されているのか、保存された機構がmRNA分解を介して細胞分化の抑制に関与しているのかを検討する。また、分裂酵母選択的mRNA分解と非常に似た機構が、ヒトにおいてカポジ肉腫ウイルスの病原性と深く関わっていることが明らかになってきており、非常に興味深い。したがって、本研究が進展することにより、真核生物における分化抑制機構、とりわけ体細胞の生殖細胞化の阻害や幹細胞の未分化状態維持へのmRNA分解の関与、およびウイルスによる病態発症機構の理解にも繋がると予想される。これらの研究を進めることにより、分裂酵母のみならず多細胞生物における選択的mRNA分解機構の生理的な役割を明らかにしていきたい。

4. 自己評価

①RNA による染色体上の機能ドメインの制御

染色体制御(キネトコアおよびヘテロクロマチン形成、テロメアサイレンシング、ゲノム安定性)について、一定の成果は得た。しかしながら、当初の目的である「RNA あるいは RNA 制御因子がどのようにして染色体分配を調節するのか」という点については、明らかに出来ず非常に残念である。今後、これまでとは異なるアプローチも含めて、新たな進展ができるよう検討していきたい。

②核内構造体形成因子 Red1 による選択的 mRNA 分解機構の解析

我々が同定した Red1 の機能、局在部位、Red1 機能の調節機構を明らかにし、分裂酵母以外の生物でも、同様の機構が働いている可能性を得た。しかし、具体的にどのようにして Red1 が mRNA 分解を促進するかなどの詳細な機構、および Red1 以外の分解促進因子についての成果を得る、または発表するまでの段階には至っていない。これらについて、早急に論文発表を行うことが現在の課題である。

5. 研究総括の見解

本研究では、分裂酵母を研究材料とし、RNA による染色体分配制御機構解明を目指したが、この目標を達成することは出来なかった。しかしながら、RNA による染色体上の機能ドメイン(キネトコアおよびヘテロクロマチン形成など)の制御に関し評価に値する成果を挙げた。また、新規核内構造体形成因子 Red1 による選択的 mRNA 分解機構についての研究では、Red1 の機能および調節機構、局在部位などを明らかにし、今後の研究の基盤を築いた。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. #Sugiyama T. and Sugioka-Sugiyama R. (#corresponding author). (2011). Red1 Promotes the Elimination of Meiosis-Specific mRNAs in Vegetatively Growing Fission Yeast. *The EMBO J.*, 30(6): 1027-1039.
2. *Sugioka-Sugiyama R. and #*Sugiyama T. (*: equal contribution, #: corresponding author). (2011). Sde2: a novel nuclear protein essential for telomeric silencing and genomic stability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406(3): 444-448.

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果

【主要な学会発表】

1. 杉山智康、杉岡(杉山)梨恵 “Red proteins that localize as nuclear dots promote selective elimination of meiotic mRNA in vegetative fission yeast“

第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 16 日(口頭発表)

2. Sugiyama T. and Sugioka-Sugiyama R. “Red1, which forms nuclear bodies, promotes the elimination of meiosis-specific mRNAs in vegetative fission yeast”

The 16th Annual Meeting of the RNA Society, 京都、2011 年 6 月 16 日(ポスター発表)

3. 杉山智康 「核内構造体を形成する Red1 による減数分裂期 mRNA 除去」

第 62 回日本細胞生物学会大会、大阪、2010 年 5 月 19 日(口頭発表)

4. Sugiyama T. and Sugioka-Sugiyama R. “A novel protein, which forms nuclear bodies, mediates the down-regulation of meiosis-specific genes during mitosis”

The 5th International Fission Yeast Meeting, 東京、2009 年 10 月 29 日(口頭発表)

5. 杉山智康、杉岡(杉山)梨恵「減数分裂特異的 mRNA 分解機構の解析」

第 11 回日本 RNA 学会年会、新潟、2009 年 7 月 27 日(口頭発表)

【受賞】

第 62 回日本細胞生物学会大会 日本細胞生物学会若手優秀発表賞 (2010)

【プレス発表】

「不要な mRNA を選択的に分解するしくみを解明 -医療応用への新規番を目指す-」

2010 年 2 月 12 日 筑波大学発表

2010 年 3 月 3 日 日刊工業新聞に掲載