

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文概要

論文題目

分裂酵母の性分化を抑制する長鎖ノンコーディングRNA nc1669の
解析

Analysis of a non-coding RNA nc1669, which represses sexual
differentiation of fission yeast

申請者

大野 悠
Yu ONO

生命医科学専攻 細胞骨格ロジスティクス研究

2023年5月

一般的に DNA の遺伝情報は RNA への転写を経てタンパク質へと翻訳される。細胞内で不可欠な機能を発揮する分子は酵素などタンパク質が大部分であるが、転写された RNA 情報がタンパク質に翻訳されるものはわずか数%に過ぎない。タンパク質へと翻訳されない RNA はノンコーディング RNA (ncRNA) と呼ばれる。200 塩基長以下の短鎖 ncRNA には、タンパク質の翻訳に必須の機能を担う運搬 RNA (tRNA) などがあり、古くから研究され機能が明らかになっているものが多い。他方、長鎖 ncRNA についての機能解明は遅れている現状がある。しかし近年、長鎖 ncRNA のなかには遺伝子発現を制御したり、あるいは特定のストレス環境下で発現したりという報告例が相次ぎ、細胞活動において重要な働きを担う長鎖 ncRNA が多く存在しうるとの認識が深まってきた。したがって、このような機能性長鎖 ncRNA をさらに発見し、その機能を解明することは、これまで主にタンパク質によってのみ理解されてきた細胞内現象の本来の姿を描く上で必須である。申請者が所属する研究室では、新たな機能性長鎖 ncRNA を発見するために、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* が有する長鎖 ncRNA の塩基配列と、予測される二次構造の進化的保存性の両方に着目した *in silico / in vivo* スクリーニングがおこなわれた。本研究ではそのスクリーニングから抽出された長鎖 ncRNA (*nc1669*) に着目し、これが分裂酵母の性分化に果たす機能を追究した。

第 1 章では、本研究の内容を理解する上で必要な背景、および本研究に先立ち実施され、本研究の基盤となった ncRNA の *in silico / in vivo* スクリーニングについて記載した。ncRNA 分子内の相補的塩基対により形成される二次構造は、細胞内での機能に重要な影響を及ぼす。重要な働きを担う機能性遺伝子は異なる生物種間での塩基配列および構造の保存性が高いといえる。したがって、塩基配列と二次構造が進化的に保存されている長鎖 ncRNA を分裂酵母 *S. pombe* およびその近縁種のゲノムデータベースからインフォマティクスを利用して探索・抽出すれば、生理的機能を持つ長鎖 ncRNA の発見に至る可能性がある。

実際の *in silico* スクリーニングにおいては、塩基配列と二次構造の両方が進化的に保存されていると判定された領域を Conserved Secondary-structure Motif (CSM) と名付けた。*S. pombe* の全 ncRNA 1,857 遺伝子のうち、CSM を有する ncRNA は 151 遺伝子であった。これらの中から、機能性長鎖 ncRNA の候補として絞り込まれた 14 遺伝子について、それぞれのノックアウト株を作製し、各種薬剤によるストレス環境下など、多様な培養条件下での表現型を観察した (*in vivo* スクリーニング)。その結果、*nc1669* のノックアウト株は性分化が亢進する表現型を示した。*S. pombe* の野生型株は窒素源を含む培地では性分化を行わないが、*nc1669* ノックアウト株では、性分化の第一段階である細胞どうしの接合が亢進する表現型がみられた。

次に、分裂酵母の性分化を制御するマスター転写因子 Ste11 に関する知見について説明した。分裂酵母は窒素源を含む培地では無性生殖（栄養増殖）を繰り返

すが、窒素源が枯渇すると性分化すなわち有性生殖（接合、減数分裂および孢子形成）を開始する。分裂酵母が性分化を開始する際、窒素源飢餓にตอบสนองして *ste11* 遺伝子の発現が上昇する。転写因子 Ste11 は性分化のマスターレギュレーターであり、性分化を遂行するために必須の因子を多数発現誘導する。これに対して、窒素源が豊富な環境下では性分化を開始しないように、Ste11 の発現は抑制される必要がある。窒素源存在下においては cAMP/PKA シグナル経路、TOR (TORC1) シグナル経路、Pat1 キナーゼ、長鎖 ncRNA *rse1* 等により、*ste11* mRNA あるいは Ste11 タンパク質は負に制御される。

第 2 章では、本研究で使用した大腸菌株と分裂酵母株、試薬や培地の組成、実験手法について記載した。

第 3 章では、*nc1669* RNA の解析結果について記載した。まず、*nc1669* RNA について説明した。*nc1669* は 2 番染色体から転写される約 2,200 塩基の長鎖 ncRNA であり、その 3'末端側に 117 塩基長の保存された CSM 領域を有する。また、*nc1669* には他に 2 つの RNA 遺伝子がオーバーラップしている。5'末端側の相補鎖からは長鎖 ncRNA *nc1670* が、CSM 領域を含む相補鎖からは *tRNA_Glu08* が発現する。第 1 節では、*nc1669* RNA が *ste11* 遺伝子の発現抑制に必要であることを示した。*nc1669* ノックアウト株は接合亢進を示すことから、*nc1669* RNA は栄養存在下で *ste11* 遺伝子の発現を抑制する可能性が考えられた。そこで、窒素源を含む培地における *ste11* の発現量を測定したところ、野生型と比較して *nc1669* ノックアウト株では 2~3 倍程度上昇していた。また、野生型の *nc1669* の発現量は、窒素源非存在下では存在下に比べて 1/10 程度まで減少した。以上の結果から、*nc1669* RNA は窒素源を含む培地において *ste11* 遺伝子の発現の抑制を介して性分化の開始を阻止するが、窒素源飢餓下では *nc1669* の発現量が減少することで *ste11* 遺伝子の発現を誘導する分子機構が想起された。第 2 節では、*nc1669* ノックアウト株が示した接合亢進の原因が、*nc1669* の相補鎖から発現する他の 2 つの RNA 遺伝子を同時ノックアウトしたことによるものではないことを示した。*nc1669* の相補鎖からは *nc1670* と *tRNA_Glu08* が転写されるため、*nc1669* ノックアウト株では 3 つの ncRNA が同時に欠失されている。したがって、*nc1669* ノックアウト株の接合亢進の表現型は、*nc1670* あるいは *tRNA_Glu08* の欠失に起因する可能性が排除できない。そこで、*nc1669* ノックアウト株において、これらの RNA 遺伝子を異所的に発現させた場合に接合亢進の表現型を相補できるかを検証した。その結果、接合亢進は *nc1670* や *tRNA_Glu08* が欠失したことが原因ではなく、*nc1669* の欠失が原因であることを実証した。

二次構造を予測した結果、*nc1669* RNA の CSM 領域は tRNA 様のクローバー型の二次構造を形成することが示唆された。本研究の基盤となったスクリーニングでは、保存された二次構造が ncRNA の機能に重要であると想定していたため、第 3 節では *nc1669* RNA の配列のなかでも構造保存性の高い CSM 領域の二次構

造が機能ドメインである可能性について検証した。第 2 節同様、*nc1669* ノックアウト株で CSM 領域を除いた部分的な *nc1669* RNA を異所的に発現させたが、接合亢進を相補しなかった。したがって、*nc1669* RNA が接合亢進を抑制するためには CSM 領域が必須だと結論づけた。CSM 領域の二次構造の重要性をさらに検証するため、内在性の *nc1669* の CSM 領域が示す塩基配列をランダムにシャッフルして並び替えた CSM-*shf1* 配列を作成した。CSM-*shf1* 配列はオリジナルの CSM 領域とは異なり tRNA 様の二次構造を形成できない。細胞内の *nc1669* RNA の CSM 配列を CSM-*shf1* 配列に置換した変異体 (*nc1669-shf1* 変異体) もまた接合亢進を示した。この時、*ste11* の発現が野生型と比較して 2 倍程度上昇していた。以上の結果から、窒素源を含む培地において *ste11* の発現を抑制するためには、二次構造を形成する CSM 領域が重要であることが示された。

第 4 章では、これまでの知見を踏まえながら本研究の実験結果について考察した。第 1 節では、本研究の基盤となった *in silico / in vivo* スクリーニングについて評価した。第 2 節では、窒素源を含む培地において *nc1669* RNA が *ste11* の発現を抑制するメカニズムについて考察した。*ste11*、*nc1669* は同一染色体上の比較的近傍に位置することから、*nc1669* RNA は *ste11* の発現をシスに抑制する可能性がある。また、*nc1669* RNA と cAMP/PKA シグナル経路等、既知の経路との関係について考察した。

本研究では、長鎖 ncRNA *nc1669* が窒素源を含む培地において *ste11* の転写を抑制し、性分化の開始を阻止することを示した。この機能を発揮するには二次構造を形成する CSM 領域が必須である。このように本研究は、多層的に制御されている *ste11* の発現に、近縁種にて塩基配列と二次構造が保存されている長鎖 ncRNA *nc1669* が関与することを示し、分裂酵母の性分化の分子機構の解明に貢献した。加えて、本研究の基盤となった *in silico / in vivo* スクリーニングが、実際に機能性長鎖 ncRNA を発見するために有用であることを証明した。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名： 大野 悠

印

(2023年 9月 18日 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	題名: Structure-based screening for functional non-coding RNAs in fission yeast identifies a factor repressing untimely initiation of sexual differentiation 発表・発行掲載誌名: <i>Nucleic Acids Research</i> , 50 , 11229–11242. 発表・発行年月日: 2022年10月 連名者: ○Yu Ono, Kenta Katayama, Tomoki Onuma, Kento Kubo, Hayato Tsuyuzaki, Michiaki Hamada and Masamitsu Sato
講演	題名: 二次構造に着目した機能性ノンコーディングRNAのスクリーニング 学会名: 第55回酵母遺伝学フォーラム 発表年月日: 2022年9月 連名者: ○大野悠、片山研太、大沼友樹、久保顕登、露崎隼、浜田道昭、佐藤政充