

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

2023年12月

大野 悠
Yu ONO

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

2023年12月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命医科学専攻 細胞骨格ロジスティクス研究

大野 悠

Yu ONO

目次

略語集	1
1 章 序論	2
1-1 ノンコーディング RNA とは	2
1-2 ncRNA の二次構造の重要性	5
1-3 分裂酵母の ncRNA	8
1-4 塩基配列と二次構造の進化的保存性に着目した機能性 ncRNA のスクリーニング	8
1-5 分裂酵母の性分化	12
1-5-1 cAMP/PKA シグナル経路による抑制	12
1-5-2 TORC1 シグナル経路による抑制	13
1-5-3 性フェロモン応答性 MAPK シグナル経路による活性化	14
1-5-4 ストレス応答性 MAPK シグナル経路による活性化	14
1-5-5 Pat1 キナーゼによる抑制	15
1-5-6 長鎖 ncRNA <i>rse1</i> による抑制	16
1-5-7 その他の因子による <i>ste11</i> の発現制御	16
2 章 材料と方法	19
2-1 本研究で用いた分細胞株	19
2-1-1 本研究で用いた大腸菌株	19
2-1-2 本研究で用いた分裂酵母株	19
2-2 本実験で用いた培地	19
2-2-1 大腸菌の培養に用いた培地	20
2-2-2 分裂酵母の培養に用いた培地	20
2-3 遺伝学的実験手法	22
2-3-1 分裂酵母ゲノム DNA の単離	23
2-3-2 本研究で用いたプラスミドの作製方法	24
2-3-3 大腸菌の形質転換	26
2-3-4 分裂酵母のプラスミドによる形質転換	27
2-3-5 分裂酵母の CRISPR/Cas9	28
2-4 分裂酵母の接合率の測定	32
2-5 分裂酵母 RNA の検出	33
2-5-1 細胞の回収	33

2-5-2	RNA の抽出	34
2-5-3	DNase 処理	35
2-5-4	逆転写反応	36
2-5-5	リアルタイム PCR	37
2-6	CSM- <i>shf1</i> 配列の作成	38
3 章	実験結果	39
3-1	<i>nc1669Δ</i> および <i>nc1669FLΔ</i> では <i>ste11</i> の発現量が上昇する	41
3-2	<i>nc1670</i> および <i>tRNAGlu08</i> の欠失は接合亢進の原因ではない	44
3-3	CSM 領域は <i>nc1669</i> RNA の機能にとって重要である	48
4 章	総合討論	51
4-1	本研究の基盤となったスクリーニングの評価	51
4-2	<i>nc1669</i> RNA はどのように <i>ste11</i> の発現を制御するのか	58
4-2-1	<i>nc1669</i> RNA と <i>rse1</i> RNA の関係についての考察	58
4-2-2	<i>nc1669</i> RNA と cAMP/PKA 経路および TORC1 経路との関係についての考察	59
4-2-3	<i>nc1669</i> RNA と Pat1 キナーゼとの関係についての考察	60
4-3	<i>nc1669</i> RNA の CSM 領域に関する考察	67
4-4	<i>nc1669</i> ノックアウト株の表現型の強弱に関する考察	67
4-5	本研究のまとめ	68
5 章	引用文献	70
	謝辞	85

略語集

AMPK: Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMP 活性化プロテインキナーゼ)

cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate (環状アデノシンーリン酸)

CSG: Conserved Secondary-structure Gene

CSM: Conserved Secondary-structure Motif

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DIC: Differential Interference Contrast (微分干渉)

H3K4/14: Histone H3 Lysine 4/14

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase (分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ)

ncRNA: non-coding RNA (ノンコーディング RNA)

PKA: Protein Kinase A

TORC1: Target Of Rapamycin Complex 1

tRNA: transfer RNA (トランスファーRNA、運搬 RNA)

WT: Wild Type (野生型)

1 章 序論

1-1 ノンコーディング RNA とは

遺伝情報の本体である DNA の多くの領域は、RNA へと転写される。この RNA の情報はリボソームという装置によって読み取られ、タンパク質へと翻訳される。この転写および翻訳、すなわち DNA から始まる RNA を介したタンパク質への遺伝情報の伝達はセントラルドグマと呼ばれ、細胞内現象の根幹を担う最も重要なイベントである (Fig. 1)。

細胞内の化学反応を触媒する酵素や、DNA の核内への格納に必須のヒストンなど、細胞にとり必要不可欠の機能を発揮する分子はタンパク質から構成されることが多い。ところが、細胞内に存在する全 RNA のうち、タンパク質へと翻訳されるメッセンジャー RNA (mRNA) が占める割合はほんの数%に過ぎないと言われている。細胞内の RNA のほとんどを占める、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、最新の知見ではヒト細胞においては数万種類も存在すると考えられている (Frankish et al., 2019; Iyer et al., 2015; The FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT), 2014; Peciña et al., 2002)。ncRNA はその機能により、ハウスキーピング RNA と調節性 RNA に大別される (Fig. 1)。ハウスキーピング RNA は細胞内に豊富かつユビキタスに発現し、転写や翻訳など細胞が有する普遍的な機能を制御する (Zhang et al., 2019)。運搬 RNA (tRNA)、リボソーム RNA (rRNA)、核内低分子 RNA (snRNA)、核小体低分子 RNA (snoRNA) などが該当し、1950 年代から今日にかけて機能解析がなされている。調節性 RNA は転写および転写後レベルにおいて、エピジェネティックに遺伝子発現を制御する (Zhang et al., 2019)。調節性 RNA はその塩基長によってさらに分類される (Fig. 1)。200 塩基長以下の短鎖 ncRNA には、マイクロ RNA (miRNA)、短鎖干渉 RNA (siRNA)、PIWI 相互作用 RNA (piRNA) など機能既知の種類が多く存在する。その一方で、より長い塩基長を有する長鎖 ncRNA については、細胞内での発現量がごく少量であるため長い間機能解析が進まず、細胞内で何らの機能も発揮しない「ジャンク」であるとみなされてきた (Fig. 1)。ところが、遺伝子発現の制御やストレスへの応答など、細胞内で重要な機能を担う長鎖 ncRNA の発見が 1990 年代以降相次いで報告されている。機能既知の長鎖 ncRNA の中で最も有名な例は XIST/Xist RNA であろう (Brown et al., 1991)。この長鎖 ncRNA はヒトやマウスなど哺乳類間で進化的に保存されており、X 染色体の不活性化に寄与することが知られている。XIST/Xist RNA はメス細胞が有する 2 本の X 染色体のうちの 1 本にポリコムタンパク質を呼び込み、遺伝子発現をエピジェネティックに抑制する (Zhao et al.,

2008)。この他にも、遺伝子発現を制御する長鎖 ncRNA や、タンパク質や他の RNA と結合する長鎖 ncRNA、ストレスに応答して発現量が上昇する長鎖 ncRNA などが報告されている (Hirose et al., 2014; Rinn et al., 2007; Wang et al., 2008; Gong et al., 2017)。このように、タンパク質同様、細胞内で必須の機能を発揮する機能性長鎖 ncRNA が数多く存在することが徐々に明かされつつある。ところが、機能が解明された長鎖 ncRNA は、全ての長鎖 ncRNA のうち 1%程度を占めるに過ぎない。それ故、さらなる機能性長鎖 ncRNA の発見は、転写産物である RNA は遺伝情報の媒介を担うのみであり、DNA の遺伝情報が翻訳されたタンパク質が機能性分子の主体であるという従来のセントラルドグマ観を一新し、ごく微量の RNA 分子もその機能を発揮するという細胞内現象の真実を描写する上で必要不可欠である。

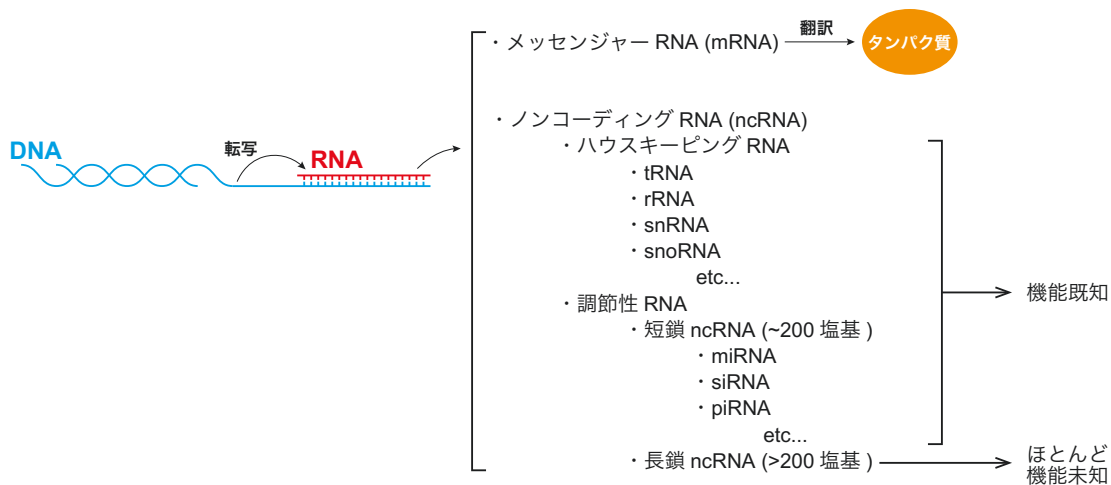


Figure 1 メッセージ RNA とノンコーディング RNA

DNA の情報は RNA へと転写された後タンパク質へと翻訳されるが、全ての RNA の情報が翻訳されるわけではない。一般的に、ヒトのゲノム DNA の 90%以上が RNA へと転写されるが、その中でもタンパク質へと翻訳される領域はほんの 1%程度に過ぎないと言われている。タンパク質へと翻訳されるメッセージ RNA (mRNA) に対して、ncRNA の機能は多岐に渡る。ハウスキーピング RNA は転写や翻訳などを制御し、tRNA (リボソームへとアミノ酸を運搬する)、rRNA (リボソームの構成因子)、snRNA (mRNA 前駆体のスプライシングに関与する)、snoRNA (rRNA などの化学修飾を触媒する) などが知られている。一方で、調節性 RNA は遺伝子発現を制御する。調節性 RNA は塩基長によって分類され、200 塩基長以下の短鎖 ncRNA には miRNA、siRNA、piRNA など機能既知の種類が含まれる一方、長鎖 ncRNA はほとんどが機能未解明である。

1-2 ncRNA の二次構造の重要性

新たな機能性長鎖 ncRNA を発見するため、今日までに数多くのスクリーニングが行われている。その一例に、7 種類のヒト培養細胞において 16,000 種類以上もの長鎖 ncRNA をノックダウンさせ、そのうち 499 種類が細胞増殖に必要であることを示した研究がある (Liu et al., 2017)。このような大規模かつ網羅的なスクリーニングは機能性長鎖 ncRNA を発見するために効果的ではあるが、大変な労力を要する。そこで近年では、ncRNA の進化的保存性に着目し、バイオインフォマティクス的手法を駆使した *in silico* スクリーニングが行われるようになった。ncRNA の進化的保存性は、塩基配列、遺伝子の位置関係、二次構造という 3 つの観点から評価される。タンパク質コード領域間に存在する長鎖 ncRNA のゼブラフィッシュとヒト・マウスといった脊椎動物間での比較、あるいは分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* とその近縁 3 種間での比較において、塩基配列の進化的保存性は低い一方、コード領域と長鎖 ncRNA の染色体上の位置関係については塩基配列よりも高度に保存されていることが知られている (Ulitsky et al., 2011; Rhind et al., 2011)。また、遺伝子の位置関係が保存されている長鎖 ncRNA は、近傍に位置する遺伝子の発現を制御する (Ard et al., 2014)。続いて、二次構造についてである。RNA は分子内においてワトソン-クリック塩基対 (A-U および C-G)、揺らぎ塩基対 (G-U) によって二次構造を形成する (Bugnon et al., 2022)。RNA の基本的な二次構造には、(i) stem、(ii) hairpin loop、(iii) bulge、(iv) internal loop、(v) multi-blanch loop といった種類が存在する (Bugnon et al., 2022) (Fig. 2)。このような基本構造が組み合わさることで、RNA 分子はより複雑な立体構造を形成する。RNA は立体構造を介してタンパク質や他の RNA 分子などと相互作用し、その機能を発揮する (Bugnon et al., 2022)。例えば、前述した XIST/Xist RNA がポリコム複合体を X 染色体へと呼び込むためには、5'末端側に存在する AUCG 配列が二次構造であるテトラループを形成することが必要である (Zhao et al., 2008)。このように、他の因子との相互作用を介するドメインが二次構造を適切に形成することが、ncRNA がその機能を果たすために重要である。

以上から、機能性 ncRNA はその二次構造が種を超えて進化的に保存されていることが考えられる。また、細胞内で必須の機能を担う遺伝子は塩基配列がどの生物種においても保存されており、そこからコードされるタンパク質の二次構造や立体構造も保存性が高い。これらを総合して考えると、塩基配列と二次構造の双方が進化的に保存されている長鎖 ncRNA をインフォマティクスにより探索すれば、重要な生理機能を持つ RNA を抽出できることが想定される。このようにして機能性長鎖 ncRNA の候補を絞り込み、

これらのノックアウト株を作製して細胞内での機能を検証すれば、網羅的な *in vivo* スクリーニングを行わずして新たな機能性長鎖 ncRNA を発見できる可能性が高い。ところが、これまでに塩基配列と二次構造が進化的に保存されている RNA を探索・抽出するインフォマティクススクリーニングはいくつか行われてはいるが、細胞内での機能を実際に検証した例はほとんどない (Steigele et al., 2007; Weinberg et al., 2017; Li et al., 2017; Weinberg et al., 2010; Smith et al., 2017; McCutcheon et al., 2003)。そこで、筆者の所属する研究室では、過去に分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* とその近縁 3 種において、塩基配列と二次構造が進化的に保存されている ncRNA の *in silico* / *in vivo* スクリーニングが行われ、本研究の基盤となった。

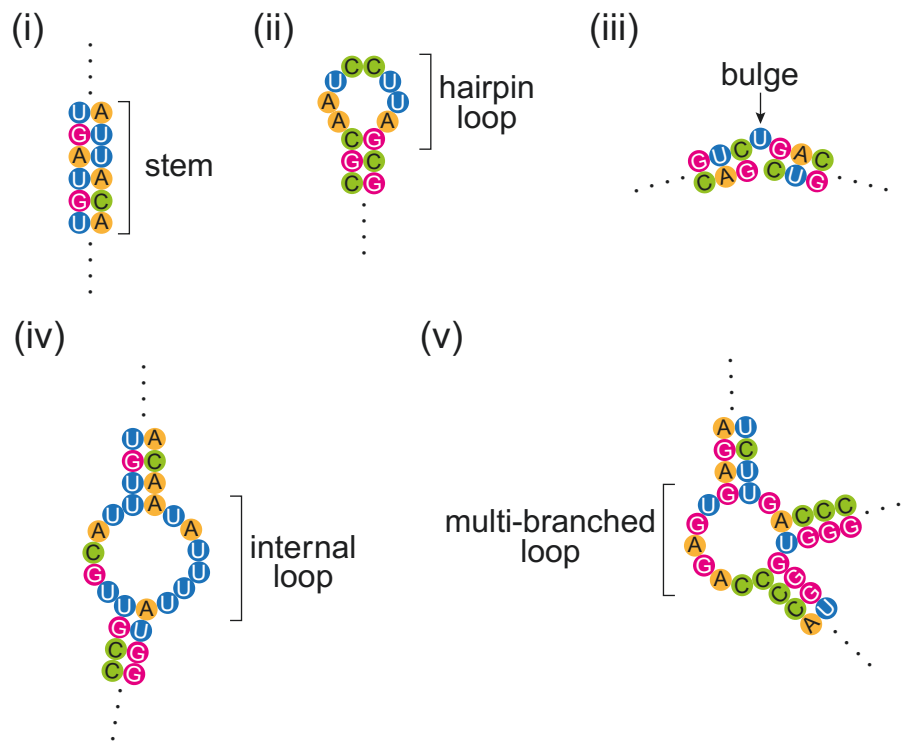


Figure 2 RNA の基本的な二次構造

RNA は分子内の塩基対 (A-U, C-G, G-U) により二次構造を形成する。その基本的な構造には、(i) 2 組以上の塩基対によって形成される二本鎖領域 (stem)、(ii) stem の末端に形成される一本鎖領域 (hairpin loop)、(iii) stem の片方の鎖に形成される一本鎖領域 (bulge)、(iv) stem 間に形成される一本鎖領域 (internal loop)、(v) 複数の stem が合流する一本鎖領域 (multi-branched loop) がある。Bugnon et al., 2022, Fig. 1 を参考に作成。

1-3 分裂酵母の ncRNA

分裂酵母 *S. pombe* は、遺伝学的実験操作（特定の遺伝子のノックアウト株の作製など）を簡便に行えること、ヒトなどの高等生物との間で多くの遺伝子が保存されていることなどといった利点から、モデル生物として用いられている。*S. pombe* には、本研究の基盤となった *in silico* スクリーニングが開始された 2016 年 6 月時点で 1,800 種類以上の ncRNA がアノテーションされており、また今日までにいくつかの機能性長鎖 ncRNA が発見されている。それらのうちで最も有名な例は meiRNA である。meiRNA は減数分裂の開始に必須である Mei2 タンパク質と結合することで、Mei2 の核内局在に寄与することが知られている (Watanabe and Yamamoto 1994; Ding et al., 2012, 2019; Andric et al., 2021)。この他にも、ストレス応答遺伝子の発現を制御する長鎖 ncRNA などが知られている (Ard et al., 2014; Hirota et al., 2008; Oda et al., 2015; Fauquenoy et al., 2018; Shah et al., 2014; Touat-Todeschini et al., 2017; Yamashita et al., 2016)。また、タンパク質コード領域間に存在する長鎖 ncRNA 141 遺伝子のノックアウト株を網羅的に作製するというスクリーニングが行われたが (Rodriguez-Lopez et al., 2022)、これまでに *S. pombe* において塩基配列と二次構造の進化的保存性に着目したインフォマティクススクリーニングは行われていない。

1-4 塩基配列と二次構造の進化的保存性に着目した機能性 ncRNA のスクリーニング

筆者の所属する研究室では、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* とその近縁 3 種 (*Schizosaccharomyces cryophilus*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Schizosaccharomyces octosporus*) (Fig. 3A) において、塩基配列と二次構造が進化的に保存されている ncRNA の *in silico* スクリーニングが以下の手順で行われた (Fig. 3B)。

- [1] *S. pombe* の既知の全 ncRNA の塩基配列に対して、それぞれの近縁種との間で、Ensembl Genome database (Kersey et al., 2018) の情報を基にペアワイズアライメントを行った。その結果、1つ以上の近縁種が類似した配列を有すると判断された ncRNA 1,053 遺伝子が、Conserved Primary-sequence Gene として抽出された。なお、この操作は 2016 年 6 月に行われ、その時点で判明していた *S. pombe* の全 ncRNA は 1,857 遺伝子である。
- [2] Conserved Primary-structure Gene 1,053 遺伝子に対して、MAFFT により構造ベースのアライメントを行った。MAFFT は塩基配列の情報に加え、二次構造を考慮したマルチプルアライメントを作成するソフトウェアである (Katoh et al., 2002)。
- [3] 続いてそのマルチプルアライメントを、120 塩基ずつ、80 塩基がオーバーラップす

るように断片化し、10,245断片が得られた。

- [4] それら 10,245断片の二次構造の進化的保存性を、RNAzにより判定した (Gruber et al., 2010; Washietl et al., 2005)。その結果、180モチーフの二次構造が *S. pombe* とその近縁3種間で進化的に保存されていると判断された。これらのモチーフを、CSM (Conserved Secondary-structure Motif) と名付けた。
- [5] 最後に、180モチーフのCSMをそれぞれ *S. pombe* のゲノム上にマッピングし、CSMを有するRNA遺伝子をCSG (Conserved Secondary-structure Gene) と名付けた。

上記の *in silico* スクリーニングの結果、*S. pombe* の全 ncRNA 1,857 遺伝子のうち、151 遺伝子が CSG であると判定された。CSG のうち、長鎖 ncRNA は 57 遺伝子を占め、これらは新規の機能性長鎖 ncRNA の候補である。そして、この 57 遺伝子のうち、相補鎖にタンパク質コード領域が重複しておらず、ノックアウトによる影響の検証が比較的容易な、遺伝子間に位置する長鎖 ncRNA 14 遺伝子のノックアウト株がそれぞれ作製され、DNA 合成阻害や微小管形成阻害などさまざまなストレス環境下における表現型の有無を検証する *in vivo* スクリーニングが行われた。その結果、*SPNCRNA.1669* (以下 *nc1669* と表記) という長鎖 ncRNA のノックアウト株 (*nc1669Δ* および *nc1669FLΔ* (Δ は遺伝子のノックアウトを表す)、詳細については後述) のみが顕著な表現型、すなわち性分化の異常亢進を示した。野生型の分裂酵母は窒素源存在下において栄養増殖を行うが、窒素源の枯渇に応答して増殖を停止させ、接合・減数分裂・配偶子形成過程から成る性分化を開始する。ところが *nc1669* ノックアウト株では、窒素源存在下において一部の細胞が性分化の最初のステップである接合を行うこと、接合した細胞の中には減数分裂まで性分化が進行する細胞が存在することが判明した (Fig. 3C (i), (ii))。このように、窒素源存在下であるにもかかわらず接合するという表現型は、一般的に「接合亢進 (hyper-mating)」と呼ばれる。この結果から、*nc1669* RNA は窒素源存在下において性分化の開始を抑制する可能性が示唆された。そこで本論文では、*nc1669* RNA がどのような分子メカニズムで分裂酵母の性分化を抑制するのかを解析した。

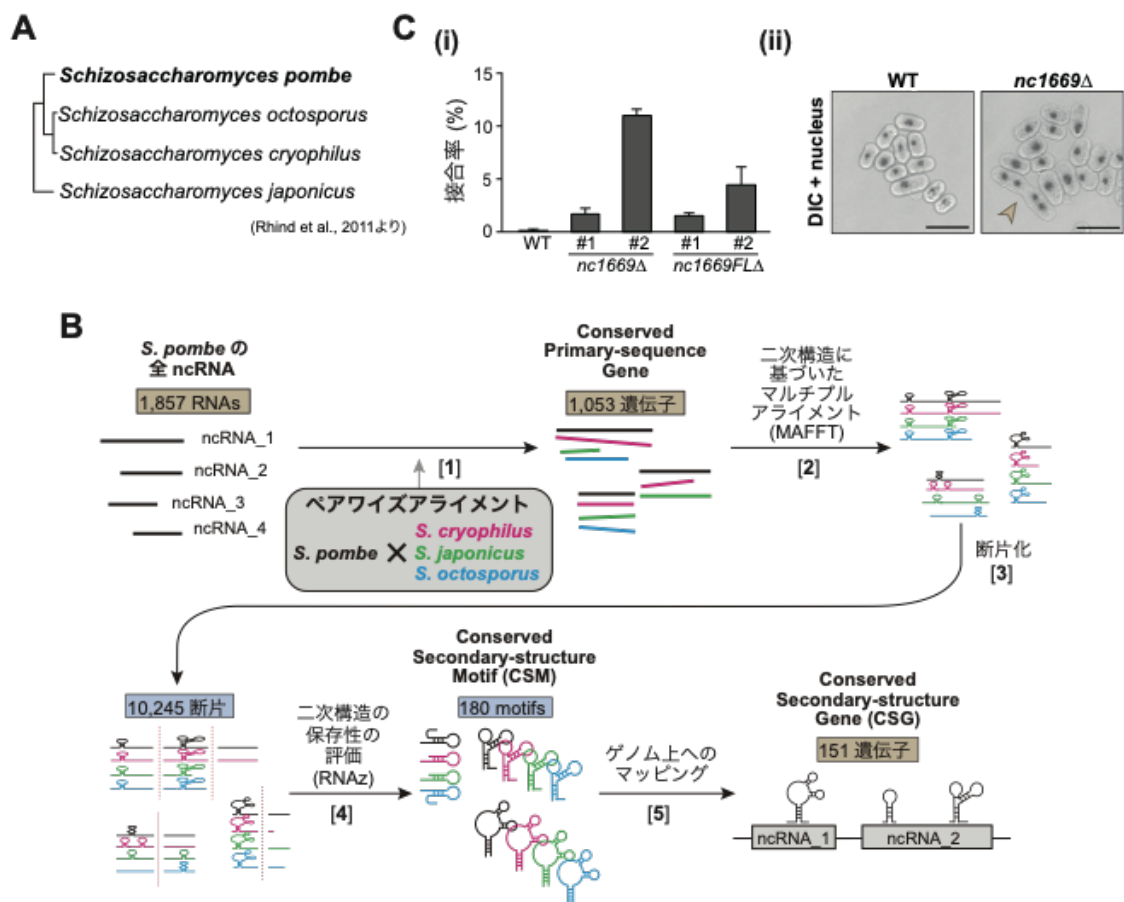


Figure 3 分裂酵母の性分化を抑制する長鎖 ncRNA *nc1669* の発見

(A) 分裂酵母 *S. pombe* とその近縁 3 種 (*S. cryophilus*, *S. japonicus*, *S. octosporus*) の系統樹。

(B) RNA の塩基配列と二次構造の進化的保存性に着目した *in silico* スクリーニングの概要。まず、*S. pombe* の全 ncRNA 1,857 遺伝子について、各近縁種間とのペアワイズアライメントにより 1,053 遺伝子が Conserved Primary-structure Gene として抽出された [1]。それらに対して二次構造を考慮したマルチプルアライメントを行い [2]、断片化して 10,245 断片を得た [3]。それらの断片のうち、180 断片の二次構造が進化的に保存されていると評価され、これらを CSM (Conserved Secondary-structure Motif) と名付けた [4]。最後に、CSM を *S. pombe* のゲノム上にマッピングし、CSM を有する 151 遺伝子を CSG (Conserved Secondary-structure Gene) と名付けた [5]。

(C) CSG のうち、遺伝子間に位置する長鎖 ncRNA 14 遺伝子をそれぞれノックアウトした株の、さまざまなストレス環境下における表現型の有無を判定した結果、*nc1669*

が性分化を抑制する可能性が示唆された。*nc1669*Δおよび *nc1669FL*Δでは、野生型は性分化しない窒素源を含む培地（SD-3S寒天培地）においても一部の細胞が接合した。黄色い矢頭は接合した細胞を示す。なお、#1 と#2 は別コロニー由来の同じ遺伝子型の株である。平均値±標準誤差（3回試行）(i)。DIC画像にDAPI画像を重ね合わせた画像、スケールバー：10 μm (ii)。

Ono et al., 2022, Fig. 1A, 1B, 3B, 3C を改変して転載。

1-5 分裂酵母の性分化

分裂酵母 *S. pombe* は、富栄養存在下では一倍体として体細胞分裂を繰り返し自己の複製を増殖させる（無性生殖、栄養増殖）(Fig. 4A)。ところが、個体数が過剰に増加するなどして、栄養源とりわけ窒素源が枯渇し飢餓状態に陥ると体細胞周期が G1 期で停止し、性の異なる細胞が同時に存在する場合においては、性分化すなわち有性生殖を開始する (Fig. 4A)。そして、ストレス耐性がある配偶子（孢子）を形成し、休眠状態へと移行する (Fig. 4A)。孢子は一倍体細胞であり、栄養が供給されると発芽して体細胞周期を再開する (Fig. 4A)。

分裂酵母の性分化は主に 3 つの段階に分けられる。すなわち、性の異なる細胞が融合し二倍体細胞を作る「接合」、「減数分裂」、配偶子である孢子を形成する「孢子形成」である (Fig. 4A)。性分化が行われる際、栄養増殖期とは異なる遺伝子が発現し機能する必要がある。このため、性分化の開始には Ste11 という性分化特異的な転写因子が必須である (Sugimoto et al., 1991)。富栄養存在下では *ste11* 遺伝子の転写は抑制され、また Ste11 タンパク質はほとんど核外に局在するが (Fig. 4B (i))、窒素源の枯渇にตอบสนองして *ste11* 遺伝子の発現が上昇し、かつ Ste11 タンパク質が核内へと集積した結果、その後の性分化の進行に必要な不可欠の多数の因子を転写する (Sugimoto et al., 1991; Qin et al., 2003) (Fig. 4B (ii))。Ste11 は言わば性分化のマスターレギュレーターである。さらに、Ste11 タンパク質は *ste11* 遺伝子自身の転写を活性化するというポジティブフィードバックを行うことが知られている (Kunitomo et al., 2000; Kim et al., 2012) (Fig. 4B (ii))。このように、*ste11* の発現は性分化の進行を加速させることから、栄養増殖期には発現が過剰にならないよう（栄養増殖期でも全く発現しないわけではない、Fig. 6A (a) 参照）、また窒素源枯渇時に充分量発現するよう、複数の経路によって多層的に制御されている (Fig. 4B (i), (ii))。本論文で解析した *nc1669* RNA は窒素源存在下において *ste11* の発現を抑制することから、ここでは、窒素源存在下および窒素源飢餓下において、*ste11* が転写・翻訳・翻訳後レベルでどのように制御されるのかについて詳細に言及する。

1-5-1 cAMP/PKA シグナル経路による抑制

環状アデノシンーリン酸 (cAMP) は外的環境への応答におけるセカンドメッセンジャーとして細胞内で使用される。富栄養存在下では、分裂酵母においてはアデニルシクラーゼ Cyr1 により ATP から cAMP が合成されるが (Kawamukai et al., 1991) (Fig. 4B (i))、炭素源や窒素源が枯渇することで分裂酵母細胞内の cAMP 濃度が低下するこ

とが多数報告されている。窒素源が枯渇すると細胞内の cAMP レベルは 50%程度低下し、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) である Pka1 が不活化する (Mochizuki and Yamamoto, 1992) (Fig. 4B (ii))。

富栄養存在下では、Pka1 の制御因子である Cgs1 に cAMP が結合し、Cgs1 が Pka1 から解離することで Pka1 が活性化する (DeVoti et al., 1991; Maeda et al., 1994) (Fig. 4B (i))。そして、Pka1 が転写因子 Rst2 をリン酸化して核内への集積を阻害することで、転写因子 Rst2 による *ste11* の転写が抑制される (Kunitomo et al., 2000; Higuchi et al., 2002; Valbuena and Moreno, 2010; Gupta et al., 2011) (Fig. 4B (i))。また、Pka1 は Ste11 の核内集積を阻害することで、Ste11 による *ste11* の転写を抑制する (Valbuena and Moreno, 2010) (Fig. 4B (i))。

1-5-2 TORC1 シグナル経路による抑制

TORC1 シグナル経路は、栄養を感知して細胞を成長させたり増殖させたりするために必須の経路であり、真核生物に広く保存されている。分裂酵母における TORC1 の触媒サブユニットをコードする *tor2* の温度感受性変異体は、制限温度下では窒素源存在下であるにもかかわらず *ste11* の発現が上昇することにより、接合亢進の表現型を示す (Álvarez and Moreno, 2006; Uritani et al., 2006; Weisman et al., 2007; Matsuo et al., 2007)。TORC1 経路は Ste11 をリン酸化することで核内への集積を阻害し、Ste11 による *ste11* の転写を抑制する (Otsubo et al., 2017; Valbuena and Moreno, 2010) (Fig. 4B (i))。

転写因子 Gaf1 は TORC1 経路により核内に集積しないよう制御されており (Fig. 4B (i))、窒素源飢餓に応答して即座に核内へと集積する (Ma et al., 2015; Laor et al., 2015) (Fig. 4B (ii))。ところが、*gaf1* ノックアウト株では窒素源の有無にかかわらず *ste11* の発現量が上昇することから、Gaf1 は *ste11* の転写を抑制すると考えられる (Kim et al., 2012)。このため、窒素源飢餓下で TORC1 経路がオフになったために *ste11* の発現を抑制する転写因子 Gaf1 が核内に集積することは、TORC1 経路のオフが Ste11 を活性化させることと矛盾する結果であると言える。しかし、Gaf1 の核内集積は一時的であること (Ma et al., 2015; Laor et al., 2015)、Gaf1 は窒素源飢餓に即座に反応して発現するアミノ酸摂取に関わる因子の転写を活性化すること (Ma et al., 2015; Laor et al., 2015; Mata et al., 2002)、*ste11* は窒素源飢餓応答の後半に発現上昇する因子であること (Mata et al., 2002) から、Gaf1 は窒素源飢餓応答の最初期に *ste11* の発現を抑制しアミノ酸摂取に関わる因子を発現させることで、アミノ酸摂取を優先させて栄養増殖を

継続しようと試みた後に、性分化へ誘導するのだと考えられる。

1-5-3 性フェロモン応答性 MAPK シグナル経路による活性化

分裂酵母 *S. pombe* には P (Plus) 型 (遺伝子型: h^+) と M (Minus) 型 (遺伝子型: h^-) の 2 種類の接合型 (性) が存在する。接合型を決定する遺伝子は 2 番染色体の *mat1* 遺伝子座に存在し、窒素源飢餓に応答して *mat1* 遺伝子座からの転写が Ste11 により上昇する (Kelly et al., 1988; Sugimoto et al., 1991)。その後、P 型細胞と M 型細胞において、互いの性フェロモンの授受により性フェロモン応答性分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ経路 (Spk1 MAPK 経路) が作動する。その経路により Ste11 がリン酸化され活性化し、*ste11* の発現がさらに上昇する (Gotoh et al., 1993; Aono et al., 1994; Kjærulff et al., 2005; Xue-Franzen et al., 2006) (Fig. 4B (ii))。加えて、GTPase であるがん原遺伝子である Ras の分裂酵母オースログ Ras1 は、性フェロモン同様に Spk1 MAPK 経路を刺激し、その下流にある RNA 結合タンパク質 Msa1 は窒素源存在下において *ste11* の発現を抑制する (Jeong et al., 2004b) (Fig. 4B (i), (ii))。また、Ras1 を活性化する因子をコードする *ste6* は Ste11 によってその転写が活性化される (Hughes et al., 1994) (Fig. 4B (ii))。なお、本研究で用いた分裂酵母株は h^{90} というホモタリックな接合型であり 2 つの接合型の細胞が混在するため、この株単独での性分化が可能である。

また、Spk1 MAPK 経路は Ste11 の翻訳を制御することが報告されている。RNA 結合タンパク質 Nrd1 は転写を活性化する因子 Cpc2 と複合体を形成し、窒素源存在下では Cpc2 を阻害して Ste11 の翻訳を抑制する (Oowatari et al., 2011; Jeong et al., 2004a; Tsukahara et al., 1998; Shor et al., 2003) (Fig. 4B (i))。一方で、窒素源が枯渇して Nrd1 が Spk1 によりリン酸化され不活化されると Cpc2 が活性化し、Ste11 の翻訳が活発になると考えられている (Oowatari et al., 2011) (Fig. 4B (ii))。

加えて、14-3-3 タンパク質である Rad24 と Rad25 の複合体は、窒素源存在下において Spk1 MAPK 経路の MAPK キナーゼキナーゼである Byr2 を不活化させる (Ozoe et al., 2002) (Fig. 4B (i))。

1-5-4 ストレス応答性 MAPK シグナル経路による活性化

分裂酵母では、浸透圧、酸化、高温、栄養源枯渇などといったストレスにより、ストレス応答性 MAPK シグナル経路 (Sty1 MAPK 経路) が働くことが多数報告されている。ストレスの感受によって Sty1 MAPK 経路が活性化すると、転写因子 Atf1-Pcr1 へ

テロ二量体により *ste11* の発現が上昇する (Shiozaki et al., 1996; Kanoh et al., 1996; Wilkinson et al., 1996; Watanabe and Yamamoto, 1996) (Fig. 4B (ii))。また、転写因子 Atf1 は cAMP/PKA シグナル経路によって不活化されることも示唆されている (Kanoh et al., 1996) (Fig. 4B (i))。

また、Sty1 MAPK 経路によって Lsk1 キナーゼがリン酸化され、RNA ポリメラーゼ II (Rpb1) の 2 番目のセリン (Ser2) がリン酸化される (Sukegawa et al., 2011; Coudreuse et al., 2010) (Fig. 4B (ii))。Ser2 のリン酸化が起こらない *rbp1-S2A* 変異体では、窒素源が枯渇しても *ste11* の発現が上昇せず性分化が誘導されないため、Rpb1 の Ser2 のリン酸化が、窒素源枯渇時の *ste11* の発現上昇にとって必須であると考えられる (Sukegawa et al., 2011; Coudreuse et al., 2010; Materne et al., 2015) (Fig. 4B (ii))。Rpb1 の Ser2 がリン酸化されると、*ste11* プロモーター領域のヒストン H3K14 アセチル化とヒストンの離脱が起き転写が活性化する (Materne et al., 2015)。Sty1 MAPK 経路が活性化していない、すなわち Rpb1 の Ser2 がリン酸化されていない場合は、Rpb1 の 5 番目のセリン (Ser5) のリン酸化により H3K4 メチルトランスフェラーゼ Set1 とヒストンデアセチラーゼ Hos2 が *ste11* のプロモーター領域に呼び込まれ、転写が抑制される (Materne et al., 2015) (Fig. 4B (i))。

1-5-5 Pat1 キナーゼによる抑制

ヘテロタリック (*h*) 株の Pat1 キナーゼの温度感受性変異体 (*pat1-114* 変異体など) は、制限温度下かつ窒素源存在下において、接合することなく一倍体のまま異常な減数分裂を行う (このような表現型を「一倍体減数分裂 (haploid meiosis)」と呼ぶ) (Iino and Yamamoto, 1985a, b; Nurse, 1985)。このことから、Pat1 は栄養増殖と性分化を明確に隔てる重要な因子であると言える。栄養増殖期において Pat1 は核内に局在するが、その局在には前述の Cpc2 が必要である (McLeod et al., 2000) (Fig. 4B (i))。Pat1 は栄養増殖期において Ste11 と Mei2 をリン酸化し、それらの核内集積を阻害して性分化の進行を阻止している (Li and McLeod, 1996; Watanabe et al., 1997; Qin et al., 2003) (Fig. 4B (i))。加えて、Pat1 にリン酸化された Ste11 と Mei2 には 14-3-3 タンパク質 Rad24 が結合し、ユビキチン-プロテアソーム系により分解される (Kitamura et al., 2001) (Fig. 4B (i))。また、Rad24 が結合した Ste11 は転写因子としての活性が低下する (Kitamura et al., 2001)。

接合を経て二倍体細胞になると *mei3* が発現し、Pat1 による Ste11 と Mei2 のリン酸化を阻害する (McLeod et al., 1987; McLeod and Beach, 1988; Li and McLeod, 1996)

(Fig. 4B (ii)). Mei3 タンパク質には Ste11 と類似したアミノ酸配列があり、そのために Pat1 の偽基質として作用すると考えられている (Li and McLeod, 1996)。また、Pat1 のキナーゼ活性は Spk1 MAPK 経路によっても不活化されると考えられる (Kjærulff et al., 2005) (Fig. 4B (ii))。 *mei3* を過剰発現させたヘテロタリック変異体や、窒素源存在下であるにもかかわらず Spk1 MAPK キナーゼキナーゼ Byr2 が活性化するヘテロタリック変異体は、 *pat1-114* 変異体と同様に一倍体減数分裂を示す (McLeod et al., 1987; McLeod and Beach, 1988; Kjærulff et al., 2005)。

1-5-6 長鎖 ncRNA *rse1* による抑制

本論文で解析した *nc1669* RNA と同様、長鎖 ncRNA が *ste11* のシスな発現抑制に寄与しているという報告がある。 *ste11* の遺伝子座から 1000 bp ほど上流の相補鎖に存在する *rse1* という長鎖 ncRNA は、窒素源存在下においてのみ発現し Mug187 と複合体を形成する (Fauquenoy et al., 2018)。そして、ヒストン H3K4 デメチラーゼ Lid2 と H3K4 メチルトランスフェラーゼ Set1、ヒストンデアセチラーゼ Hos2 を *ste11* のプロモーター領域に呼び込む (Fauquenoy et al., 2018) (Fig. 4B (i))。その結果、 *ste11* プロモーター領域のヒストン H3K14 の脱アセチル化と多量のヒストンの呼び込みが起こり、 *ste11* の転写が抑制される (Fauquenoy et al., 2018)。

1-5-7 その他の因子による *ste11* の発現制御

上記で述べた経路以外にも、 *ste11* の発現を制御する因子がいくつか報告されている。 Pac2 は、窒素源存在下において *ste11* の発現を抑制する (Kunitomo et al., 1995) (Fig. 4B (i))。 Pac2 は既知のどのタンパク質とも類似しておらず、また cAMP/PKA シグナル経路とは別の経路で作用することは判明している (Kunitomo et al., 1995)。

Rcd1 は窒素源枯渇時の *ste11* の発現に必要な因子であり、cAMP/PKA 経路、ストレス応答性 MAPK 経路、 Pac2 とは独立した経路で作用する (Okazaki et al., 1998) (Fig. 4B (ii))。 Rcd1 は進化的に保存されており、 mRNA を分解する CCR4-Not 複合体の構成因子であるが (Tange et al., 2012)、具体的にどのような機構で *ste11* の発現を正に制御するのかは不明である。

オートファジー関連因子 Taf1 (Atg11) も Rcd1 と同様 *ste11* の発現に必要であるが (Ueno et al., 2001)、どのシグナル経路に関わるのかは不明である (Fig. 4B (ii))。

代謝のマスタースイッチであり、窒素源など栄養の枯渇により活性化する AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は、 *ste11* の発現だけでなく Ste11 の核内局在にも必

要である (Valbuena and Moreno, 2011) (Fig. 4B (ii))。

RNA 結合タンパク質 Csx1 は、窒素源の有無に関係なく *ste11* mRNA を安定化させ、*ste11* の正常な発現に必要である (Matia-Gonzalez et al., 2012) (Fig. 4B (i), (ii))。Csx1 は Sty1 MAPK 経路によってリン酸化されるが、このリン酸化が何に寄与しているのかは不明である (Rodríguez-Gabriel et al., 2003)。

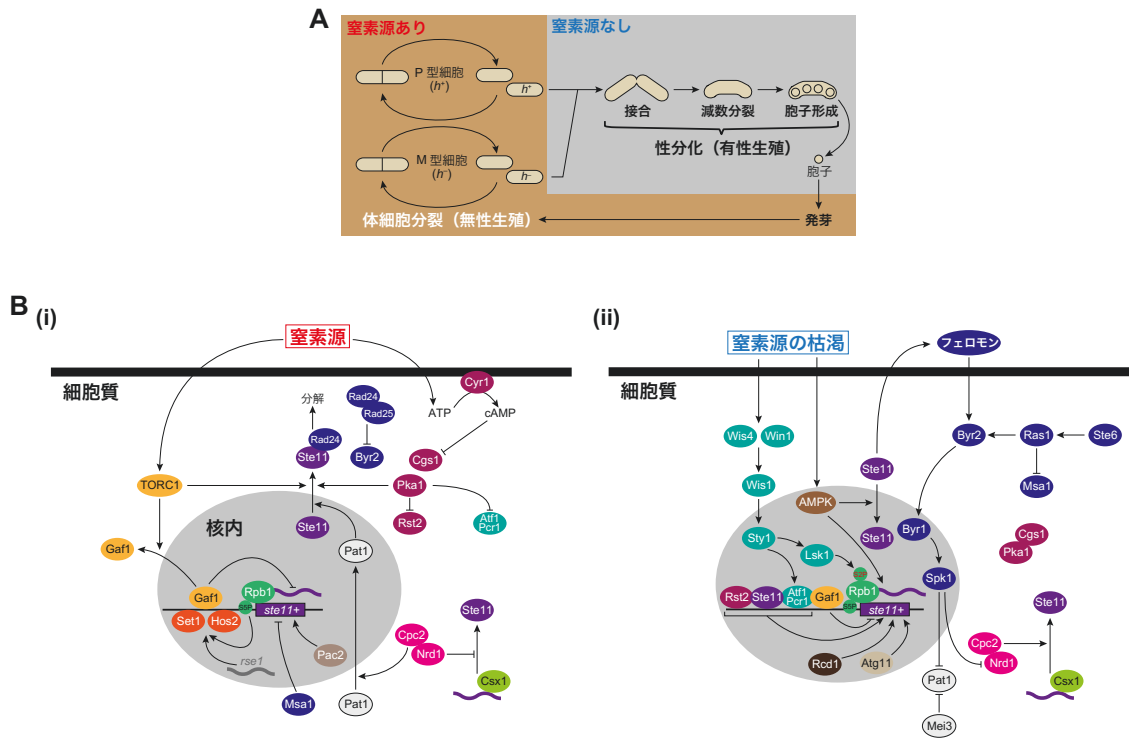


Figure 4 分裂酵母の性分化を制御するマスターレギュレーターSte11

(A) 分裂酵母は、窒素源などの栄養が豊富に存在する場合には一倍体として体細胞分裂（栄養増殖、無性生殖）を繰り返し自身のコピーを増殖する。一方で、周囲から栄養、特に窒素源が枯渇すると性分化（有性生殖）を開始する。まず、性の異なる2つの細胞が性フェロモンの授受を行って融合し、さらに細胞核もひとつに融合され二倍体細胞を形成する（接合）。次に減数分裂が行われ、染色体が4つに分配される。そして、配偶子であり次世代の個体である孢子が形成される。孢子にはストレス耐性があり、栄養が枯渇していても長期間休眠することが可能である。栄養が再び供給されると、孢子は発芽し体細胞分裂を開始する。

(B) Ste11は性分化の開始に必須の転写因子である。窒素源が培地中に豊富に存在する場合 (i) は負に制御され、枯渇する場合 (ii) は正に制御される。いずれの場合も、多くの経路や因子によって転写・翻訳・局在などが多層的に制御される。なお、図中の因子が細胞質あるいは核内に局在するののかについては、各因子についての研究と、タンパク質の局在を網羅的に観察した研究 (Matsuyama et al., 2006) を参考にして作図した。

2 章 材料と方法

2-1 本研究で用いた分細胞株

2-1-1 本研究で用いた大腸菌株

株名	遺伝子型
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔ M15 Tn10 (Tet^r)]</i>

2-1-2 本研究で用いた分裂酵母株

株番号	本論文内での呼称	遺伝子型	由来	図
JY3	WT	<i>h⁹⁰</i>	研究室ストック	3C, 6A, 7B, 7C, 8A, 8B, 8C, 9B, 9C, 10B, 10C
KEN0040	<i>nc1669Δ #1</i>	<i>h⁹⁰ SPNCRNA.1669::kan^R #1</i>	研究室ストック	3C, 10B
KEN0041	<i>nc1669Δ #2</i>	<i>h⁹⁰ SPNCRNA.1669::kan^R #2</i>	研究室ストック	3C, 6A, 8A, 10B
KEN0187	<i>nc1669FLΔ #1</i>	<i>h⁹⁰ SPNCRNA.1669FL::kan^R #1</i>	研究室ストック	3C, 10B
KEN0188	<i>nc1669FLΔ #2</i>	<i>h⁹⁰ SPNCRNA.1669FL::kan^R #2</i>	研究室ストック	3C, 6A, 8A, 10B
TO0005	WT+vector	<i>h⁹⁰ +pREP1 nat^R</i>	本研究	7B, 7C, 8B, 8C, 9B, 9C
TO0006	<i>nc1669FLΔ</i> +vector	<i>h⁹⁰ SPNCRNA.1669FL::kan^R #2</i> <i>+pREP1 nat^R</i>	本研究	7B, 7C, 8B, 8C, 9B, 9C
TO0007	<i>nc1669FLΔ</i> +p[FL]	<i>h⁹⁰ SPNCRNA.1669FL::kan^R #2</i> <i>+pREP1 nat^R-SPNCRNA.1669FL</i>	本研究	7B, 7C, 9B, 9C
TO0008	<i>nc1669FLΔ</i> <i>+p[ΔCSM]</i>	<i>h⁹⁰ SPNCRNA.1669FL::kan^R #2</i> <i>+pREP1 nat^R-SPNCRNA.1669</i> without CSM	本研究	9B, 9C
TO0021	<i>nc1669FLΔ</i> <i>+p[tRNA]</i>	<i>h⁹⁰ SPNCRNA.1669FL::kan^R #2</i> <i>+pREP1 nat^R-SPBTRNAGLU.08</i>	本研究	8B, 8C
TO0023	<i>nc1669FLΔ</i> <i>+p[Δnc1670]</i>	<i>h⁹⁰ SPNCRNA.1669FL::kan^R #2</i> <i>+pREP1 nat^R-SPNCRNA.1669</i> without <i>SPNCRNA.1670</i>	本研究	7B, 7C
YO0619	<i>nc1669-shf1</i>	<i>h⁹⁰ SPNCRNA.1669-shf1</i>	本研究	10B, 10C

2-2 本実験で用いた培地

本研究では、大腸菌および分裂酵母の培養を液体または寒天培地で行った。全ての培

地はオートクレーブ処理（120°C、20分）を行い、その後必要に応じて抗生物質などを添加した。

2-2-1 大腸菌の培養に用いた培地

大腸菌の培養はLB培地で行った。オートクレーブ処理後、必要に応じてアンピリシンナトリウム（明治製菓ファルマ）を終濃度40 µg/mLになるよう添加した。寒天培地として使用する際は、TS寒天SSP（タイショーテクノス）を15 g/L加えた。以下に1 Lあたりの組成を示す。

LB 培地（1 L あたり）	
Bacto™ Tryptone (BD Biosciences)	10 g
Bacto™ Yeast Extract (BD Biosciences)	5 g
塩化ナトリウム（富士フィルム和光純薬）	5 g

2-2-2 分裂酵母の培養に用いた培地

分裂酵母の基本的な培養方法は、Moreno et al., 1991 に従った。完全培地としてYE5S培地、合成培地としてSD培地またはEMM培地を使用した。寒天培地として使用する際は、TS寒天SSP（タイショーテクノス）を20 g/L加えた。以下に、それぞれの培地の1 Lあたりの組成を示す。

YE5S 培地（1 L あたり）	
Bacto™ Yeast Extract (BD Biosciences)	5 g
D (+) -グルコース（富士フィルム和光純薬）	30 g
5 Supplements* ¹	0.35 g

*1

5 Supplements (1 L あたり)	
アデニン硫酸塩二水和物（東京化成工業）	0.1 g
L-ヒスチジン（富士フィルム和光純薬）	0.1 g
L-ロイシン（富士フィルム和光純薬）	0.05 g
L-リシン塩酸塩（富士フィルム和光純薬）	0.05 g

ウラシル (富士フィルム和光純薬)	0.05 g
-------------------	--------

SD 培地 (1 L あたり)	
Yeast nitrogen base w/o amino acids (BD Biosciences)	6.7 g
D (+) -グルコース (富士フィルム和光純薬)	20 g

EMM 培地 (1 L あたり)	
フタル酸水素カリウム (富士フィルム和光純薬)	3 g
リン酸水素二ナトリウム (富士フィルム和光純薬)	2.2 g
50x MM*2	20 mL
Four Vitamins*3	1 mL
Trace Elements*4	100 µL
クエン酸 (富士フィルム和光純薬) (1 g/100 mL)*5	100 µL
D (+) -グルコース (富士フィルム和光純薬)*6	100 mL
塩化アンモニウム (富士フィルム和光純薬)*7	20 mL

*2

50x MM (1 L あたり)	
塩化マグネシウム六水和物 (富士フィルム和光純薬)	53.3 g
塩化カルシウム二水和物 (富士フィルム和光純薬)	0.735 g
塩化カリウム (富士フィルム和光純薬)	50 g
硫酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬)	2 g

-20°C で保存。

*3

Four Vitamins (100 mL あたり)	
(+) -パントテン酸カルシウム (富士フィルム和光純薬)	0.1 g
ニコチン酸 (富士フィルム和光純薬)	0.1 g
myo-イノシトール (Sigma-Aldrich)	1 g
ビオチン (Sigma-Aldrich)	1 mg

H₂O に試薬を混合させた後、ザルトラボ RF フィルター付ファンネル+濾液ボトル、PES,0.22 μm (Sartorius AG) および吸引加圧両用 Chemical Duty ポンプ (メルク) でフィルター滅菌。4°C で保存。

*4

Trace Elements (100 mL あたり)	
ホウ酸 (富士フィルム和光純薬)	0.5 g
硫酸マンガン (II) 五水和物 (富士フィルム和光純薬)	0.4 g
硫酸亜鉛七水和物 (富士フィルム和光純薬)	0.4 g
塩化鉄 (III) 六水和物(富士フィルム和光純薬)	0.2 g
モリブデン (VI) 酸二ナトリウム二水和物 (富士フィルム和光純薬)	0.16 g
ヨウ化カリウム (富士フィルム和光純薬)	0.1 g
硫酸銅五水和物 (富士フィルム和光純薬)	0.04 g

-20°C で保存。

*5

-20°C で保存。

*6

オートクレーブ処理後、20% (w/v) 水溶液 (オートクレーブ処理済) を終濃度 2% となるように加えた。

*7

オートクレーブ処理後、EMM+N 培地を作製する際は 25% (w/v) 水溶液 (オートクレーブ処理済) を終濃度 0.5% となるように加えた。EMM-N 培地を作製する場合は加えなかった。

2-3 遺伝学的実験手法

分裂酵母を扱う実験を行う際は、空気中に浮遊するカビなどのコンタミを防ぐため、全ての実験操作を滅菌下で行った。

2-3-1 分裂酵母ゲノム DNA の単離

まず、 -80°C で冷凍ストックしてある分裂酵母株を YE5S 寒天培地に塗り広げ、 30°C で一晚培養した。寒天培地上の細胞を Breaking Buffer^{*8} 0.2 mL に懸濁し、Glass beads, acid-washed 425-600 μL (30-40 U.S. sieve) (Sigma-Aldrich) 0.3 g と UltraPureTM Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v) (Thermo Fisher Scientific) 0.2 mL を加えた。ビーズ式破碎装置 FastPrep 24 Instrument Version.4 (MP-Biomedicals) で細胞を破碎 (強度 5、10 秒) し、TE^{*9} 0.2 mL を加え遠心 (10,000 rpm、5 分、室温) した。その後、上層 0.2 mL のみを回収し、エタノール (99.5) (富士フィルム和光純薬) 1 mL を加えて転倒混和し室温にて 5 分間静置した。遠心 (10,000 rpm、3 分、室温) し、上清を除去した。続いて、70%エタノール (エタノール (99.5) (富士フィルム和光純薬) をもとに作製) 0.5 mL を DNA ペレットを動かさないように慎重に加え、遠心 (10,000 rpm、30 秒、室温) し上清を除去した。上清を除去し、DNA ペレットをデシケーターおよびダイアフラム型ドライ真空ポンプ DA-20D (アルバック機工) で風乾させた後、TE 50 μL に懸濁した。

*8

Breaking Buffer (100 mL あたり)	
H ₂ O	66.8 mL
塩化ナトリウム (富士フィルム和光純薬) (5 M 水溶液)	2 mL
1 M Tris-HCl (pH 8.0) ^{*10}	1 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0) ^{*11}	0.2 mL
Triton-X 100 (ナカライテスク) (10% (v/v) 水溶液)	20 mL
ラウリル硫酸ナトリウム (ナカライテスク) (10% (w/v) 水溶液)	10 mL

H₂O のみオートクレーブ処理後、滅菌下でその他の試薬を混合した。

*9

TE (100 mL あたり)	
オートクレーブ処理済 H ₂ O	98.8 mL
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	1 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.2 mL

*10

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール（富士フィルム和光純薬）水溶液に塩酸（富士フィルム和光純薬）を加えて pH 8.0 に調整（卓上型 pH メーター（堀場アドバンスドテクノ）で3点補正後に測定）し、1 M の水溶液を作製した。その後、オートクレーブ処理した。

*11

エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸二ナトリウム塩二水和物（富士フィルム和光純薬）水溶液に塩酸（富士フィルム和光純薬）を加えて pH 8.0 に調整（卓上型 pH メーター（堀場アドバンスドテクノ）で3点補正後に測定）し、0.5 M の水溶液を作製した。その後、オートクレーブ処理した。

2-3-2 本研究で用いたプラスミドの作製方法

本研究では、pREP1 および pCR2.1-*nat^R*、分裂酵母ゲノム DNA をもとに以下のプラスミドを作製し、分裂酵母株を作製した。

プラスミド名	作製した分裂酵母株とその遺伝子型
pREP1 <i>nat^R</i>	TO0005 (<i>h⁹⁰</i> + pREP1 <i>nat^R</i>) TO0006 (<i>h⁹⁰</i> <i>SPNCRNA.1669FL::kan^R#2</i> + pREP1 <i>nat^R</i>)
pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPNCRNA.1669FL</i>	TO0007 (<i>h⁹⁰</i> <i>SPNCRNA.1669FL::kan^R#2</i> + pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPNCRNA.1669FL</i>)
pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPNCRNA.1669</i> without CSM	TO0008 (<i>h⁹⁰</i> <i>SPNCRNA.1669FL::kan^R#2</i> + pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPNCRNA.1669</i> without CSM)
pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPBTRNAGLU.08</i>	TO0021 (<i>h⁹⁰</i> <i>SPNCRNA.1669FL::kan^R#2</i> + pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPBTRNAGLU.08</i>)
pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPNCRNA.1669</i> without <i>SPNCRNA.1670</i>	TO0023 (<i>h⁹⁰</i> <i>SPNCRNA.1669FL::kan^R#2</i> + pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPNCRNA.1669</i> without <i>SPNCRNA.1670</i>)

pREP1 には、分裂酵母用選択マーカーとして *LEU2* マーカーが含まれている。pREP1 を分裂酵母に形質転換する際、宿主株には *leu1-32* バックグラウンドの株、すなわちロイシン要求性の株を用いる。ところが、このような栄養要求性は性分化の進行に影響を

与える可能性があるため、本研究では pREP1 の *LEU2* マーカーをノーセオスリシン耐性遺伝子 (*nat^R*) に置換した pREP1*nat^R* を作製した。また、pREP1*nat^R* からは、pREP1 に元々クローニングされている *nmt1* プロモーターおよびターミネーターが除かれている。pREP1*nat^R* の作製をギブソンアッセンブリー反応 (Gibson et al., 2009; Nakayama and Shimamoto, 2014) により行った後、大腸菌へと形質転換し目的のプラスミドを得た。ギブソンアッセンブリー反応に用いた PCR 断片は、以下の反応液の組成 (PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (タカラバイオ) とその付属品を使用) およびプロトコルで作製した。なお、いずれのプラスミドにおいても、内在性のプロモーターおよびターミネーターを確保するため、目的遺伝子の前後約 1,000 bp を含めてクローニングした。

PCR 反応液の組成	
5x PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	10 μL
dNTP Mixture	5 μL
プラスミド DNA	2.5 μL
プライマー#1 (5 μM)	2.5 μL
プライマー#2 (5 μM)	2.5 μL
H ₂ O	27 μL
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	0.5 μL
合計	50 μL

PCR プロトコル		
1.	95°C	3 min
2.	95°C	30 sec
3.	52°C	30 sec
4.	72°C	1 min/1k bp
5.	go to step 2	additional 29 cycles
6.	12°C	forever

TAE ゲル電気泳動により正しい産物が得られたことを確認した後、PCR 産物を GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN) によりカラム精製した。

pREP1*nat^R*および分裂酵母ゲノム DNA をもとに、同様の反応によりその他のプラスミドを作製した。

使用したプライマーの配列を以下に示す。

作製したプラスミド	鋳型とした DNA	プライマー配列 (5'-3')
pREP1 <i>nat^R</i>	pCR2.1- <i>nat^R</i>	GCTATGACCATGATTACGCCAAGCCAGTATAGCGACCAGCATTAC CGCTGATGACTTATTCTGTCTTGGTTAAGGAGTTAGACTCGCC
	pREP1	GTGAATGCTGGTCGCTATACTGGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC GGCGAGTCTAACTCCTTAACCAAGACAGAATAAGTCATCAGCG
pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPNCRNA.1669FL</i>	分裂酵母ゲノム DNA	GGCTACTGGATGGTTCAGTCACAGCGCATAGTGGGAGAAGC CCAAGAAGTAGTCTCAGAGCATGTATCAATGGGATGCCAATGG
	pREP1 <i>nat^R</i>	GCTTCTCCCACTATCGCCTGTGACTGAACCATCCAGTAGCC CCATTGGCATCCCATGATACATGCTCTGAGACTACTTCTTGG
pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPNCRNA.1669</i> without CSM	pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPNCRNA.1669FL</i>	GCCCAAAATACCAAAAAATCCAATGTCGACGAAATAACCCCAATGACC GGTCATTGGGGTTATTTTCGTCGACATTGGATTTTTTGGTATTTTGGGC
pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPBTRNAGLU.08</i>	分裂酵母ゲノム DNA	CGTCTAAGGATACAGAAGATTGTTTCGGCAAAGTCGCATGTTAG CCAAGAAGTAGTCTCAGAGCAGATGCCAATGGATGCTTAGC
	pREP1 <i>nat^R</i>	CTAACATGCGACTTTGCCGAACAATCTTCTGTATCCTTAGACG GCTAAGCATCCATTGGCATCTGCTCTGAGACTACTTCTTGG
pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPNCRNA.1669</i> without <i>SPNCRNA.1670</i>	pREP1 <i>nat^R</i> - <i>SPNCRNA.1669FL</i>	CTACATAACCACTCTCAAACCTCACCTTTAACAGCCGAAAACCTAAGACG CGTCTTAAGTTTTTCGGCTGTAAAGGTGAGTTTGGAGTGGTTATGTAG

2-3-3 大腸菌の形質転換

-80°C で保存されていた大腸菌コンピテントセルを氷上で解凍し、コンピテントセルの容量の 1/10 の DNA 溶液を加えた。氷上で 10~60 分静置した後、42°C で 30 秒間、直後に氷上で 90 秒間静置した。室温に取り出し、アンピシリン含有 LB 寒天培地に播種し 37°C で一晩 (16 時間以下) 培養した。大腸菌コロニーから細胞を掻き取り、アンピシリン含有 LB 液体培地 1.5 mL に懸濁し 37°C、130 rpm で一晩 (16 時間以下) 培養した。その後、核酸自動分離装置 PI-80X (クラボウ) によりプラスミドを抽出した。なお、プラスミドを増幅する目的で大腸菌の形質転換を行った場合は、氷上 90 秒静置の後、溶液全量をアンピシリン含有 LB 液体培地 1.5 mL に加え、37°C、130 rpm で一

晩（16 時間以下）培養した後、核酸自動分離装置 PI-80X（クラボウ）によりプラスミドを抽出した。

2-3-4 分裂酵母のプラスミドによる形質転換

-80°C で冷凍ストックしてある分裂酵母株を YE5S 寒天培地に塗り広げ、30°C で一晩培養した。細胞を掻き取り、YE5S 液体培地 50 mL に懸濁して 30°C、130 rpm で一晩培養した。細胞濃度が $0.5\sim 1.0 \times 10^7$ cells/mL に達したら遠心（3,000 rpm、3 分、室温）して上清を除去し、オートクレーブ処理済 H₂O 1 mL で細胞を懸濁した。遠心（3,000 rpm、3 分、室温）して上清を除去し、TE/LiOAc^{*12} 0.2 mL で細胞を懸濁した。続いて、プラスミド DNA 2 μL、Yeastmaker™ Carrier DNA（タカラバイオ）1 μL、細胞懸濁液 20 μL、40% (w/v) PEG 溶液^{*13} 50 μL を混合した。30°C、130 rpm で 1~4 時間振盪し、ジメチルスルホキシド（富士フィルム和光純薬）43 μL を加えて 42°C で 10 分間ヒートショックした。その後、全量を YE5S 寒天培地に播種し、30°C で一晩培養した。YE5S 寒天培地上の細胞を、clonNAT (Werner BioAgents) 含有（終濃度 0.05 g/L）YE5S 寒天培地へとレプリカし、30°C で培養した。3~4 日後に生じたコロニーを形質転換体として単離した。

*12

TE/LiOAc (100 mL あたり)	
H ₂ O	80 mL
10x TE (pH 7.5) ^{*14}	10 mL
10x LiOAc (pH 7.5) ^{*15}	10 mL

全て混合した後、オートクレーブ処理を行った。

*13

ポリエチレングリコール#4000（ナカライテスク）を TE/LiOAc に溶かして 40% (w/v) とし、フィルター滅菌（テルモシリンジ 10 mL（テルモ）および Millex-HV フィルター、0.45 μm, PVDF, 33 mm, ガンマ線滅菌済（メルク）を使用）した。

*14

*10 と同様に作製した 1M Tris-HCl (pH 7.5) と、*11 と同様に作製した 0.5 M EDTA

(pH 7.5) を、それぞれ終濃度 0.1 M、0.01 M になるよう H₂O に加えた。その後、オートクレーブ処理した。

*15

酢酸リチウム（富士フィルム和光純薬）水溶液に塩酸（富士フィルム和光純薬）を加えて pH 7.5 に調整（卓上型 pH メーター（堀場アドバンスドテクノ）で 3 点補正後に測定）し、1 M の水溶液を作製した。その後、オートクレーブ処理した。

2-3-5 分裂酵母の CRISPR/Cas9

nc1669-shf1 変異体を作製するため、CRISPR/Cas9 を行った。CRISPR/Cas9 の手法は、Li et al., 2021 に従った。

Cas9 および sgRNA を発現するプラスミドは、pSR6 および以下のプライマーを用いてギブソンアッセムブリー反応により行った。

5'-TTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGACGGAGTATTTTTATCAAAA-3'

5'-GCCAAAAACATAACCTGTACCGAAGAATTTGATAAAAATACTCCGTC-3'

また、*nc1669* の sgRNA の配列は以下を用いた。

5'-GACGGAGTATTTTTATCAAAA-3'

これにより作製したプラスミドを pTO1 と命名した。

続いて、CSM 領域が CSM-*shf1* 配列に置換された *nc1669* の DNA 断片を以下の要領で作製した。まず、CSM 領域 117 bp の前後 100 bp を含む *nc1669* の領域 337 bp について、CSM 領域を CSM-*shf1* 配列に置換した 337 bp がクローニングされたプラスミド (pUCFa-CSM-*shf1*) の作製を人工遺伝子合成サービス (FASMAC) に依頼した。次に、分裂酵母ゲノム DNA を鋳型に、以下の反応液の組成およびプロトコルで 1st PCR を行った。

1st PCR 反応液の組成	
5x PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	4 μL

dNTP Mixture	2 μ L
分裂酵母ゲノム DNA	1 μ L
プライマー#1 (5 μ M) ^{*16}	1 μ L
プライマー#2 (5 μ M) ^{*16}	1 μ L
H ₂ O	10.5 μ L
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	0.5 μ L
	合計 20 μ L

*16

プライマー#1 と#2 のペアは、

p1: 5'-AAAGAGGACAAGACAGGACAAGG-3'

p2: 5'-GTGCGCGCATGATTATGTTAAGTATTGGATTTTTTGGTATTTTTGGGC-3'

または

p3: 5'-

CGCATATGGGCCACATTATTTAAAAAGTTATATTCATATTATTAACAATTATT
AGAG-3'

p4: 5'-GTAAAGAGTATATGGGGACAGCGTATCC-3'

である。

PCR プロトコル		
1.	95°C	3 min
2.	95°C	30 sec
3.	52°C	30 sec
4.	72°C ^{*17}	45 sec
5.	go to step 2	additional 29 cycles
6.	12°C	forever

*17

p3 と p4 のペアで PCR を行った場合は、47°C とした。

p1 と p2 を用いた 1st PCR の産物の 3'末端、p3 と p4 を用いた 1st PCR の産物の 5'末

端は CSM-*shf1* 配列の両端約 20 bp と同じ配列であるため、1st PCR 産物と pUCFa-CSM-*shf1* で 2nd PCR が可能である。また、1st PCR の産物はいずれも約 500 bp であるので、2nd PCR では約 1100 bp の産物が得られる。TAE ゲル電気泳動により 1st PCR 産物を確認した後、GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN) によりカラム精製した。2nd PCR の反応液の組成およびプロトコルを以下に示す。

2nd PCR 反応液の組成	
5x PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	4 μ L
dNTP Mixture	2 μ L
pUCFa-CSM- <i>shf1</i>	1 μ L
プライマー-p1 (5 μ L)	2 μ L
プライマー-p4 (5 μ L)	2 μ L
1st PCR 産物 (p1 + p2)	1 μ L
1st PCR 産物 (p3 + p4)	1 μ L
H ₂ O	6.5 μ L
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	0.5 μ L
合計	20 μ L

PCR プロトコル		
1.	95°C	5 min
2.	95°C	30 sec
3.	52°C	30 sec
4.	72°C	1 min
5.	go to step 2	additional 34 cycles
6.	12°C	forever

TAE ゲル電気泳動により 2nd PCR 産物を確認した後、GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN) によりカラム精製した。

pTO1 と 2nd PCR 産物を用いて、JY3 を宿主株とした形質転換を行った。 -80°C で冷凍ストックしてある分裂酵母株を YE5S 寒天培地に塗り広げ、 30°C で一晩培養した。細胞を掻き取り、YE5S 液体培地 50 mL に懸濁して 30°C 、130 rpm で一晩培養した。

細胞濃度が $0.5\sim 1.0 \times 10^7$ cells/mL に達したら遠心 (3,000 rpm、3 分、室温) して上清を除去し、オートクレーブ処理済 H_2O 1 mL で細胞を懸濁した。遠心 (3,000 rpm、3 分、室温) して上清を除去し、TE/LiOAc 0.2 mL で細胞を懸濁した。続いて、pTO1 10 μ L、2nd PCR 産物 10 μ L、Yeastmaker™ Carrier DNA (タカラバイオ) 1 μ L、細胞懸濁液 100 μ L を混合して 30°C、130 rpm で 10 分間振盪した。40% (w/v) PEG 溶液 240 μ L を混合し、30°C、130 rpm で 4 時間振盪した。ジメチルスルホキシド (富士フィルム和光純薬) 43 μ L を加えて 42°C で 10 分間ヒートショックした。遠心 (5,000 rpm、10 秒) して上清を除去し、EMM-N 培地 3 mL に懸濁して室温で 16 時間静置した。遠心 (2,000 rpm、1 分 30 秒) して上清を除去し、オートクレーブ処理済 H_2O 50 μ L で細胞を懸濁した。細胞液を clonNAT 含有 (終濃度 0.05 g/L) YE5S 寒天培地に播種し 30°C で培養した。5~6 日後に生じたコロニーからごく少量の細胞を掻き取り、再度シングルコロニーを取得できるよう YE5S 寒天培地に塗り広げた。その後コロニーを YE5S 寒天培地および clonNAT 含有 YE5S 寒天培地にレプリカした。clonNAT 感受性を示すコロニーに対して、目的の形質転換体であるかどうかを判別するため、以下の組成およびプロトコルでコロニーPCR を行った。

コロニーPCR 反応液の組成	
SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (タカラバイオ)	5 μ L
プライマー#1 (5 μ L) ^{*18}	0.1 μ L
プライマー#2 (5 μ L) ^{*18}	0.1 μ L
H_2O	4.8 μ L
細胞	ごく少量
合計	10 μ L

*18

プライマー#1 および#2 の配列を以下に示す。

プライマー#1: 5'-CCTACAACATCCTGAACGCATATG-3'

プライマー#2: 5'-GTAAAGAGTATATGGGGACAGCGTATCC-3'

PCR プロトコル		
1.	98°C	3 min

2.	98°C	5 sec
3.	52°C	5 sec
4.	72°C	15 sec
5.	go to step 2	additional 29 cycles
6.	12°C	forever

TAE ゲル電気泳動により目的の産物が得られたことが確認できた形質転換体を、*nc1669-shf1* 変異体として単離した。

2-4 分裂酵母の接合率の測定

-80°C で冷凍ストックしてある分裂酵母株を YE5S 寒天培地に塗り広げ、30°C で一晚培養した。細胞を掻き取り、LeuUra 混合液 (L-ロイシン(富士フィルム和光純薬)水溶液 (20 mg/mL) とウラシル (富士フィルム和光純薬) 水溶液 (2.5 mg/mL) を 1:1 で混合) に、細胞濃度が 0.4×10^7 cells/mL になるよう懸濁した。その細胞懸濁液 5 μ L を SD-3S 寒天培地 (SD 培地に 5 Supplements のうち窒素源としてアデニンとロイシンのみを加えた培地、必要に応じて clonNAT を終濃度 0.05 g/L で添加) に滴下した。26.5°C で 2 日間培養した後、細胞を H₂O 0.8 mL に懸濁し、16% Formaldehyde (w/v), Methanol-free (Thermo Fisher Scientific) 0.2 mL を加えて混和した。常温で 2 時間静置し、遠心 (2,000 rpm、1 分、室温) して上清を除去した。細胞のペレットを 1x PBS^{*19} 0.5 mL に懸濁し、遠心 (2,000 rpm、1 分、室温) して上清を 0.4 mL のみ除去した。残った細胞液に対して、凝集した細胞を解離させるため、超音波式ホモジナイザー VP-050N (タイテック) でソニケーション処理 (ON TIME 0.2 sec, OFF TIME 0.4 sec, POW SET 40%, START PWM 2%, 45 sec) を行った。細胞液 1 μ L をスライドガラスに塗り広げて自然乾燥させ、VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI (VECTOR LABORATORIES) 1 μ L を滴下しカバーガラスを被せた。遮光して常温で 2 時間静置し、顕微鏡観察を行った。

*19

10x PBS (1 L あたり)	
リン酸二水素ナトリウム二水和物 (富士フィルム和光純薬)	2.3 g
リン酸水素二ナトリウム (富士フィルム和光純薬)	11.6 g

塩化ナトリウム (富士フィルム和光純薬)	85 g
----------------------	------

10x PBS を H₂O で 10 倍希釈し、1x PBS として使用した。

DIC (Differential Interference Contrast、微分干渉) 画像および DAPI による蛍光画像は、DeltaVision-SoftWoRx system (Applied Precision) により撮影した。蛍光画像は細胞を z 軸方向に 0.4 μm ずつ 12 セクションに分割して撮影し、SoftWoRx ソフトウェアによりデコンボリューション処理とプロジェクション処理 (Quick Projection, Max Intensity) を行った。

接合率は以下の計算式により求めた。

$$2 \times \text{接合した細胞の数} / (2 \times \text{接合した細胞の数} + \text{接合しなかった細胞の数})$$

2-5 分裂酵母 RNA の検出

分裂酵母 RNA を以下の方法で細胞から抽出し、発現量をリアルタイム PCR によって定量化した。なお、RNA を取り扱う実験を行う際は、ゴム手袋とマスクを着用し、実験台や使用する器具を 3%過酸化水素水 (過酸化水素 (富士フィルム和光純薬) から作製) で処理した。また、基本的に全ての実験操作を滅菌下かつ氷上で行った。リアルタイム PCR の実験操作は、ゴム手袋を着用の上、滅菌下で行った。

2-5-1 細胞の回収

(Fig. 7C, 8A, 8C, 9C での回収方法)

2-3-5 で述べた方法で SD-3S 寒天培地にスポットし 2 日間 30°C で培養した細胞を 10~15 スポット分掻き取り、DEPC 処理水^{*20} 1 mL に懸濁した。遠心 (2,000 rpm、5 分、4°C) して上清を除去し、液体窒素で急冷し-80°C フリーザーで保管した。

(Fig. 6A, 10C での回収方法)

-80°C で冷凍ストックしてある分裂酵母株を YE5S 寒天培地に塗り広げ、30°C で一晚培養した。細胞を掻き取って SD+5 Supplements 液体培地 10 mL に懸濁し、30°C、130 rpm で一晚培養した。細胞濃度が 0.5~1.0x 10⁷cells/mL に達した培養液の一部を EMM+N 液体培地 50 mL に加えて 30°C、130 rpm で一晚培養した。細胞濃度が 0.5~1.0x 10⁷cells/mL に達したら、(i) 一部を EMM+N 液体培地に全量が 50 mL になるよう、かつ細胞濃度が 0.1x 10⁷cells/mL になるよう加え、(ii) また一部を EMM-N 液体培地で洗浄 (2,000 rpm、1 分、室温で遠心) し、EMM-N 液体培地に全量が 50 mL になるよう、かつ細胞濃度が 0.2x 10⁷cells/mL になるよう加えた。(i) の EMM+N 細胞培養液、

(ii) の細胞培養液を 30°C、130 rpm で 4 時間培養したら（細胞濃度 0.5×10^7 cells/mL 程度）、遠心（2,000 rpm、5 分、4°C）して上清を除去し、液体窒素で急冷し-80°C フリーザーで保管した。

*20

DEPC 処理水（100 mL あたり）	
H ₂ O	99.9 mL
二炭酸ジエチル（富士フィルム和光純薬）	0.1 mL

36°C で一晩保温し完全に溶かした後、オートクレーブ処理を行った。4°C で保存。

2-5-2 RNA の抽出

2-5-1 で回収し-80°C フリーザーで一晩保管した細胞を氷上で融解し、TES^{*21} 520 μL とフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール 25:24:1 pH 5.2（ナカライテスク）520 μL を加えて 10 秒間ボルテックスした。その後、65°C で 1 時間（10 分おきに 10 秒間ボルテックス）熱処理を行った。10 秒間ボルテックスして氷上に 5 分間静置し、10 秒間ボルテックスして遠心（14,000 rpm、15 分、4°C）した。上層のみ 400 μL 回収してフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール 25:24:1 pH 5.2（ナカライテスク）400 μL を加え、10 秒間ボルテックスして氷上に 5 分間静置し、10 秒間ボルテックスして遠心（14,000 rpm、15 分、4°C）した。上層のみ 350 μL 回収し、クロロホルム（富士フィルム和光純薬）400 μL を加えて 10 秒間ボルテックスし、遠心（14,000 rpm、5 分、4°C）した。上層のみ 300 μL 回収し、1.5 M sodium acetate^{*22} 60 μL とエタノール（99.5）（富士フィルム和光純薬）750 μL を加えて 10 秒間ボルテックスした。その後、動かさないように-20°C で一晩保管し RNA 沈殿を行った。

*21

TES（40 mL あたり）	
H ₂ O	39 mL
0.5 M EDTA（pH 7.5）	0.8 mL
二炭酸ジエチル（富士フィルム和光純薬）	40 μL

（上記まで加えたら二炭酸ジエチルを 36°C で一晩溶かし、オートクレーブ処理を行った後常温に戻す）

1 M Tris-HCl（pH 7.5）	0.4 mL
----------------------	--------

ラウリル硫酸ナトリウム (ナカライテスク)	0.2 g
-----------------------	-------

全ての試薬を混合した後、フィルター滅菌 (テルモシリンジ 50 mL (テルモ) および Millex-HV フィルター, 0.45 μ m, PVDF, 33 mm, ガンマ線滅菌済 (メルク) を使用) を行った。4°C で保存。

*22

1.5 M 酢酸ナトリウム三水和物 (富士フィルム和光純薬) 水溶液に 1/1000 の二炭酸ジエチル (富士フィルム和光純薬) を加えて 36°C で一晩溶かし、オートクレーブ処理を行った。25°C で保存。

サンプルを遠心 (14,000 rpm、20 分、4°C) し、RNA ペレットに注意して上清を除去した。RNA ペレットを動かさないよう慎重に 70%エタノール (DEPC 処理水とエタノール (99.5) (富士フィルム和光純薬) から作製) 100 μ L を加え、遠心 (14,000 rpm、1 分、4°C) した。上清を除去し、RNA ペレットを室温で 5 分間乾燥させた。RNA ペレットを DEPC 処理水 50 μ L で懸濁し、Freeze and Thaw (-80°C で 15 分間静置と室温で 15 分間静置) を 3 回繰り返した。TAE ゲル電気泳動によって RNA が抽出されたことを確認し、GeneQuant 1300 (GE ヘルスケア) で吸光度および RNA の濃度を測定した。RNA サンプルは-80°C で保存した。

2-5-3 DNase 処理

2-5-2 で抽出した RNA サンプルに対して、TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific) により以下の組成で DNase 処理を行った。

DNase 反応液の組成	
RNA	8 μ g
10x TURBO™ DNase Buffer	5 μ L
TURBO™ DNase	1 μ L
DEPC 処理水	\leq 50 μ L
合計	50 μ L

試薬を全て混合した後、37°C で 30 分間保温した。その後、DNase Inactivation Reagent

5 μL を加えて 10 秒間ボルテックスし、室温で 5 分間静置した。遠心 (14,000 rpm、5 分、室温) して上清 40 μL を回収し、DEPC 処理水 60 μL を加えた。DNase 処理済 RNA サンプルは -80°C で保存した。

2-5-4 逆転写反応

DNase 処理済 RNA サンプルを遠心 (14,000 rpm、2 分、 4°C) し、上清に対して High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) により逆転写反応を以下の組成およびプロトコルで行った。

逆転写反応液の組成	
DEPC 処理水	1.2 μL
10x RT Buffer	2 μL
25x dNTP Mix (100 mM)	0.8 μL
10x RT Random Primers ^{*23}	2 μL
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 μL
DNase 処理済 RNA サンプル	13 μL
合計	20 μL

*23

遺伝子特異的逆転写反応を行う場合は、Random Primers ではなく、cDNA を作製したい特定の遺伝子用のプライマー (1 μM) を 2 μL 加えた。使用したプライマーの配列を以下に示す。

cDNA を作製した遺伝子	プライマー配列 (5'-3')
<i>act1</i>	GTCACGAACAATTTACGTTTCGG
<i>ste11</i>	GAAGGTCCCAATGAGTTAGCATC
<i>tRNAGlu08</i>	CCGTCAGGGGGAATCGAAC
<i>nc1669</i>	CGGTTGATGGTTGCTCAGAAATAAC
<i>nc1670</i>	CGTTCCTTACATTCTACAACGTC

逆転写反応プロトコル	
------------	--

25 °C	10 min
37 °C	120 min
85 °C	5 min
4 °C	forever

cDNA サンプルは-20 °C で保存した。

2-5-5 リアルタイム PCR

RNA の発現量を定量化するため、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (東洋紡) および StepOne™リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) によりリアルタイム PCR を行った。以下に PCR 反応液の組成およびプロトコルを示す。

リアルタイム PCR 反応液の組成	
オートクレーブ処理済 H ₂ O	0.6 μL
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	10 μL
プライマー#1 3 μL *24	2 μL
プライマー#2 3 μL *24	2 μL
50x ROX reference dye	0.4 μL
cDNA	5 μL
合計	20 μL

*24

検出した遺伝子により、使用したプライマーが異なる。以下にプライマーの配列を示す。

検出した遺伝子	プライマー配列 (5'-3')
<i>act1</i>	TGAGGAGCACCCCTTGCTTGT
	TCTTCTCACGGTTGGATTTGG
<i>ste11</i>	CGTATTTATACGGCCAAGAGACCG
	GACGAAGAGACGCATGTATAGCC
<i>tRNA^{Glu}08</i>	CCAGTGGCTAGGATTCATCGC
	CGTCAGGGGGAATCGAACC

<i>nc1669</i> (Fig. 7C, 8C, 9C)	TCGTTCCATGCTAACGATTTCGC
	TTCAGCGCCTCTTTCTATTCCG
<i>nc1669</i> (Fig. 6A (b), 10C (b))	GGGAAGGAGGACAAATTTGTAAATAG
	GCAGATACCCGATTGTGTCC
<i>nc1670</i>	CGTCGTACCCTCAACATAGTAC
	GGTATGGGTCAATTAGCATGCTAC

Fig. 6A (b) および 10C (b) で使用した *nc1669* を検出するプライマーは、*nc1669*Δ株において残存する *nc1669* の 3'側領域に設計した。

リアルタイム PCR プロトコル		
1.	95°C	1 min
2.	95°C	15 sec
3.	60°C	1 min
4.	go to step 2	additional 39 cycles
5.	95°C	15 sec
6.	60°C	1 min
7.	95°C	15 sec

ステップ 5 以降は融解曲線を得るためのプロトコル。

2-6 CSM-*shf1* 配列の作成

CSM-*shf1* 配列の作成は、以下の要領で行った。まず、*nc1669* のオリジナルの CSM 配列 117 bp を、構成する塩基を変えないよう uShuffle (Jiang et al., 2008) によりランダムにシャッフルした。その結果得られた 50,650 配列に対して、ループ形成率を ParasoR (Kawaguchi and Kiryu, 2016) により計算した。オリジナルの CSM 配列のループ形成率は 0.4496 である。CSM 配列をシャッフルして得られた 50,650 配列のうち、ループ形成率が 0.5819 で最も高い、すなわち二次構造を最も形成しにくい配列を CSM-*shf1* 配列とした。なお、CSM-*shf1* 配列の作成は久保顕登氏に行っていた。

3 章 実験結果

まず、*nc1669*をノックアウトした2種類の株、*nc1669Δ*と*nc1669FLΔ*の違いについて説明する。*nc1669*は2番染色体から転写される2,258塩基長の長鎖ncRNAである(Fig. 5A)。*nc1669*は、その3'末端側に117塩基長のCSM領域(本研究の基盤となった*in silico*スクリーニングにおいて、塩基配列と二次構造の進化的保存性が高いと判定された領域)を有する。また、*nc1669*には他の2種類の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である*SPNCRNA.1670*(以下*nc1670*と表記)が、CSM領域を含む相補鎖の一部からは、tRNAである*SPBTRNAGLU.08*(以下*tRNAGlu08*と表記)が転写される(Fig. 5A)。つまり、*nc1669*全長をノックアウトすると、*nc1669*、*nc1670*、*tRNAGlu08*の3種類のncRNAが同時に欠失されることになる。そこで、*nc1669*をノックアウトした際の影響を最小限に抑えるために、1章で言及した*in vivo*スクリーニングでは、*nc1669*の5'末端側を欠失させた株、*nc1669Δ*が用いられた(Fig. 5A)。この株では、*tRNAGlu08*遺伝子の下流約500bpが維持されているため*tRNAGlu08*の発現に影響はないことが期待されるが、*in vivo*スクリーニングの段階では実際に*tRNAGlu08*が発現するか否かは未検証であった(Fig. 5B)。また、*nc1669*の全長を欠失させた株、*nc1669FLΔ*も*in vivo*スクリーニングの段階で作製されている(Fig. 5A)。どちらの変異体も接合亢進を示すが、いずれも弱い表現型を示す#1と強い表現型を示す#2が単離されている(Fig. 3C (i))。

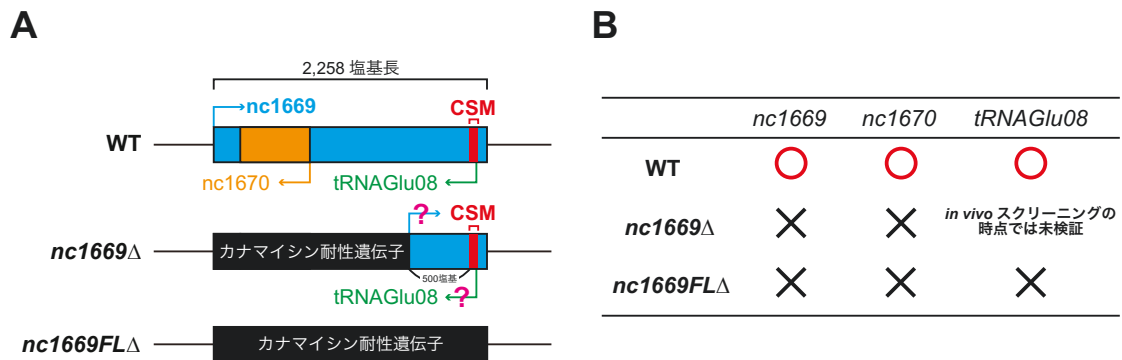


Figure 5 *nc1669* 遺伝子とそのノックアウト株について

(A) WT、*nc1669*Δ、*nc1669FL*Δの *nc1669* 遺伝子周辺の模式図。*nc1669*Δでは、*tRNAGlu08*の発現に影響がないよう *nc1669*がカナマイシン耐性遺伝子に置換されている。*nc1669FL*Δでは、*nc1669*全長がカナマイシン耐性遺伝子に置換されている。

(B) *nc1669*Δでは、*nc1669*、*nc1670*がノックアウトされている一方で、*tRNAGlu08*が実際に発現するか否かは *in vivo* スクリーニングの時点では未検証であった。*nc1669FL*Δでは *nc1669*、*nc1670*、*tRNAGlu08*の3種類の ncRNA がノックアウトされている。

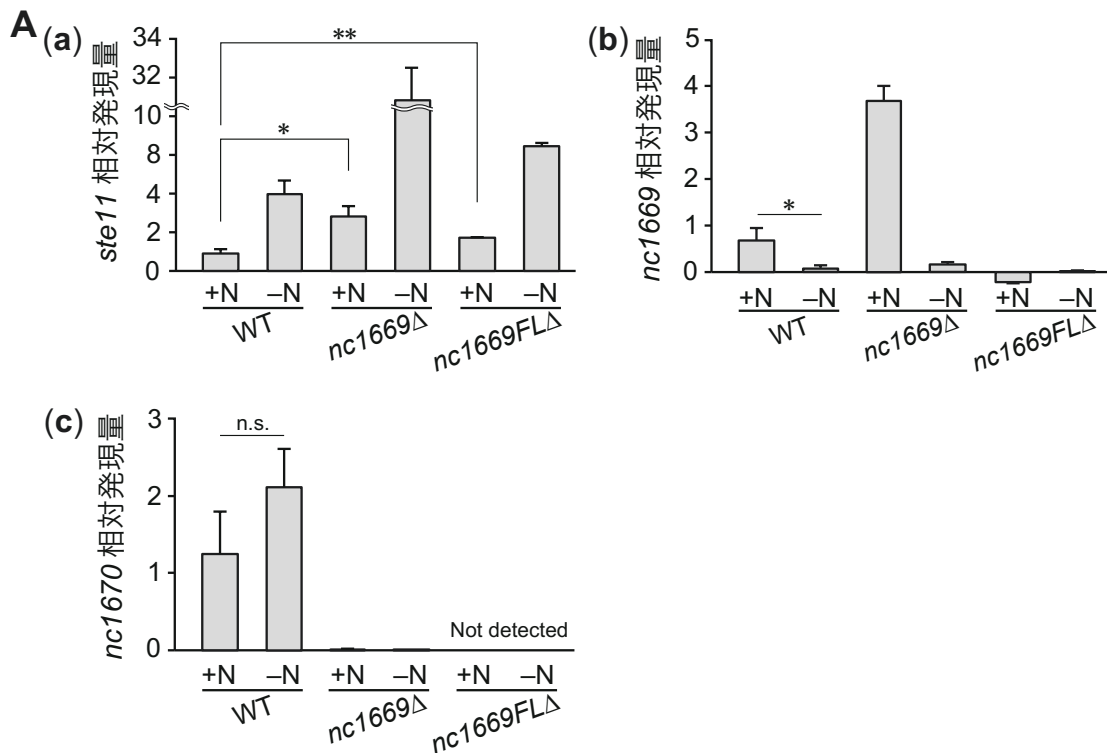
Ono et al., 2022, Fig. 3D を改変して転載。

3-1 *nc1669*Δおよび *nc1669FL*Δでは *ste11* の発現量が上昇する

nc1669 をノックアウトすると接合亢進の表現型を示したことから、*nc1669* RNA は窒素源を含む培地において、性分化に関与する因子の発現を制御している可能性が考えられた。そこで、*nc1669*Δおよび *nc1669FL*Δにおける *ste11* の発現量を測定した。1-5 で言及した通り、*ste11* は性分化に必須のマスター転写因子をコードする遺伝子であり、窒素源飢餓に応答して発現量が増加することが知られている (Sugimoto et al., 1991)。*nc1669*Δあるいは *nc1669FL*Δでは、窒素源を含む培地において *ste11* の発現量が WT と比べ 2 倍から 3 倍程度上昇し、窒素源を含まない培地においても WT と比較すると多量の *ste11* が発現していた (Fig. 6A (a))。他方、*nc1669* の発現量は、窒素源を含まない培地で細胞を 4 時間培養すると、窒素源を含む場合と比較して 1/10 程度まで減少した (Fig. 6A (b))。このことから、*nc1669* RNA は、窒素源を含む培地においては *ste11* の発現を抑制することで性分化の開始を阻止する一方で、窒素源を含まない培地においては発現量が著しく減少するために *ste11* の発現量が上昇し性分化が誘導されることが考えられる (Fig. 6B)。また、*nc1670* の発現量は、窒素源を含む培地と比較して、窒素源を含まない培地では 2 倍程度増加したが、有意差は認められなかった (Fig. 6A (c))。

*nc1669*Δでは窒素源を含む培地において *tRNA^{Glu08}* の発現の維持のために残存させた *nc1669* の一部分が発現していたが (Fig. 6A (b))、これは *nc1669* をノックアウトするために挿入したカナマイシン耐性遺伝子のプロモーターの影響が及んだためだと考えられる。また、窒素源を含まない培地において *nc1669*Δ株で残存する部分長の *nc1669* の発現が見られなくなった理由として、カナマイシン耐性遺伝子のプロモーターが窒素源飢餓下では活性が低下する可能性、あるいは窒素源飢餓に応答して *nc1669* 遺伝子座全体の転写が抑制された可能性が考えられる。

nc1669 が完全に欠失されている *nc1669FL*Δは *nc1669*Δと同様に接合亢進の表現型を示すことから、この *nc1669* RNA の部分的な転写産物は CSM 領域を含むが、窒素源存在下において *ste11* の転写を抑制するという *nc1669* RNA 本来の機能を失っていると考えられる。



B

窒素源を含む培地



窒素源を含まない培地



Figure 6 窒素源を含む培地において *nc1669* RNA は *ste11* の発現を抑制する

(A) *ste11* (a)、*nc1669* (b)、*nc1670* (c) の相対発現量。窒素源を含む培地 (EMM+N 液体培地) または窒素源を含まない培地 (EMM-N 液体培地、4 時間) で培養した細胞の RNA を抽出して遺伝子特異的逆転写反応を行った。その後、逆転写反応を行ったサンプルと行っていないサンプルにおいて目的遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により測定し、その差をハウスキーピング遺伝子である *act1* (アクチンをコードする遺伝子) の発現量によって標準化した。平均値 ± 標準誤差、3 回試行、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、n.s.: not significant (スチューデントの *t* 検定)。

(B) 窒素源を含む培地では、*nc1669* が発現し *ste11* の発現を抑制することで性分化の進行を阻止する。一方、窒素源を含まない培地では *nc1669* の発現が減少することで

ste11 の発現が上昇し性分化が進行する。
Ono et al., 2022, Fig. 4 を改変して転載。

3-2 *nc1670* および *tRNA^{Glu08}* の欠失は接合亢進の原因ではない

nc1669Δ および *nc1669FLΔ* では、*nc1669* だけでなく *nc1670* も同時に欠失されている (Fig. 5)。そのため、*nc1669Δ* および *nc1669FLΔ* が示す接合亢進が、*nc1670* を欠失させたことが原因である可能性を排除できない。そこで、接合亢進の表現型が *nc1669*、*nc1670*、どちらの ncRNA 遺伝子の欠失が原因であるのかを探るため、*nc1669FLΔ* において、*nc1669* または、*nc1670* を欠失させた *nc1669* (*nc1669 Δnc1670*) をプラスミドから異所的に発現させ、接合亢進が抑圧されるか否かを検証した (Fig. 7A)。なお、ここでは、プラスミドを有する細胞を確実に選別するため、培地には抗生物質 clonNAT を加え、使用した全てのプラスミドにはそれに対する耐性物質をコードするノーセオスリシン耐性遺伝子 (*nat^R*) をクローニングした。すなわち、プラスミドを有する細胞のみ、clonNAT 含有培地上で生育可能である。また、WT および *nc1669FLΔ* には、コントロールとして、プラスミド作製の際にベクターとして使用した pREP1*nat^R* (vector) を導入した。加えて、異所的な ncRNA 遺伝子は、ゲノム由来の内在性プロモーターおよびターミネーターにより発現させた。

まず、窒素源を含む培地における WT+vector および *nc1669FLΔ*+vector の接合率はそれぞれ 0.5%、6%程度であり、ベクターを導入していない場合とほぼ同程度であったこと (Fig. 3C (i), Fig. 7B) から、ベクタープラスミド pREP1*nat^R* の導入が接合率に影響を与えないことを確かめた。続いて、*nc1669FLΔ* に *nc1669* 全長を発現するプラスミド (p[FL]) を導入し *nc1669* を異所的に発現させた株 (*nc1669FLΔ*+p[FL]) の接合率を測定したところ、3%程度にまで減少した (Fig. 7B)。加えて、*nc1669 Δnc1670* を発現するプラスミド (p[*Δnc1670*]) を導入した株 (*nc1669FLΔ*+p[*Δnc1670*]) では、*nc1669FLΔ*+p[FL]と同様、接合率が3%程度にまで減少した (Fig. 7B)。さらに、この時、プラスミドからの異所的な *nc1669* または *nc1669 Δ1670* の発現量は、内在性の *nc1669* の発現量と比較するとそれぞれ約 20 倍、約 10 倍であった (Fig. 7C)。このように、*nc1670* を欠失させた *nc1669* を異所的に発現させた場合に *nc1669FLΔ* の接合亢進が抑圧されたことから、*nc1669Δ* と *nc1669FLΔ* が接合亢進を示したのは、*nc1670* の欠失ではなく *nc1669* の欠失が原因であることを証明した。

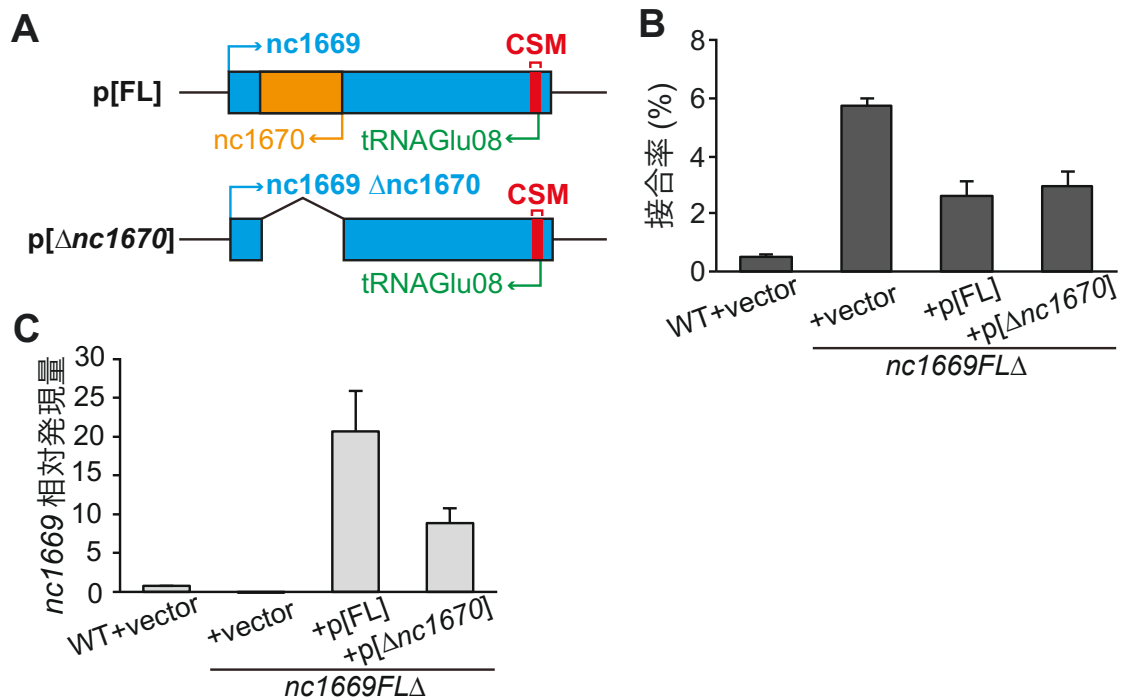


Figure 7 *nc1670* の欠失は接合亢進の原因ではない

(A) *p[FL]* および *p[Δnc1670]* の部分的な模式図。

(B) 窒素源を含む培地 (SD-3S+clonNAT 寒天培地) における接合率。平均値 ± 標準誤差、3 回試行 (それぞれ 1,000 細胞以上計測)。

(C) *nc1669* の相対発現量。SD-3S+clonNAT 寒天培地で培養した細胞の RNA を抽出して逆転写反応を行った。その後、逆転写反応を行ったサンプルと行っていないサンプルにおいて目的遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により測定し、その差をハウスキーパー遺伝子である *act1* (アクチンをコードする遺伝子) の発現量によって標準化した。平均値 ± 標準誤差、3 回試行。

Ono et al., 2022, Fig. 5 を改変して転載。

前述の通り、*nc1669Δ*では、CSM 領域を含む相補鎖の一部から発現する *tRNAGlu08* の発現が WT と同程度に維持されることを意図し、*tRNAGlu08* の下流約 500 塩基を残存させる形で *nc1669* を欠失させた (Fig. 5)。これは、*tRNAGlu08* が発現する *nc1669Δ* と、発現しない *nc1669FLΔ* を比較することで、*tRNAGlu08* の欠失が接合亢進の原因であるか否かを検証するためであった。ところが、*nc1669Δ* では *tRNAGlu08* の発現量が WT と比べて有意に減少することが新たに判明した (Fig. 8A)。つまり、*nc1669Δ* においても *nc1669FLΔ* と同様に、*nc1669*、*nc1670*、*tRNAGlu08* の 3 種類の ncRNA 遺伝子が欠失されていることになる。加えて、出芽酵母においては、tRNA とその関連因子が性分化を制御することが知られている (Kamada 2002; Otsubo et al., 2018)。これらのことから、*nc1669Δ* および *nc1669FLΔ* が接合亢進を示すのは、*tRNAGlu08* の欠失が原因である可能性を排除できない。そこで *nc1670* の場合と同様に、*nc1669FLΔ* に *tRNAGlu08* を発現するプラスミド (p[*tRNA*]) を導入し、接合亢進が抑圧されるか否かを検証した。その結果、p[*tRNA*] を導入した株 (*nc1669FLΔ*+p[*tRNA*]) では、*nc1669FLΔ*+vector と同程度の接合率となり、接合亢進は抑圧されなかった (Fig. 8B)。またこの時、*nc1669FLΔ*+p[*tRNA*] における *tRNAGlu08* の発現量は、WT における発現量の約 2 倍であった (Fig. 8C)。以上から、*nc1670* 同様、*tRNAGlu08* が欠失されたことが接合亢進の原因ではないことが示された。

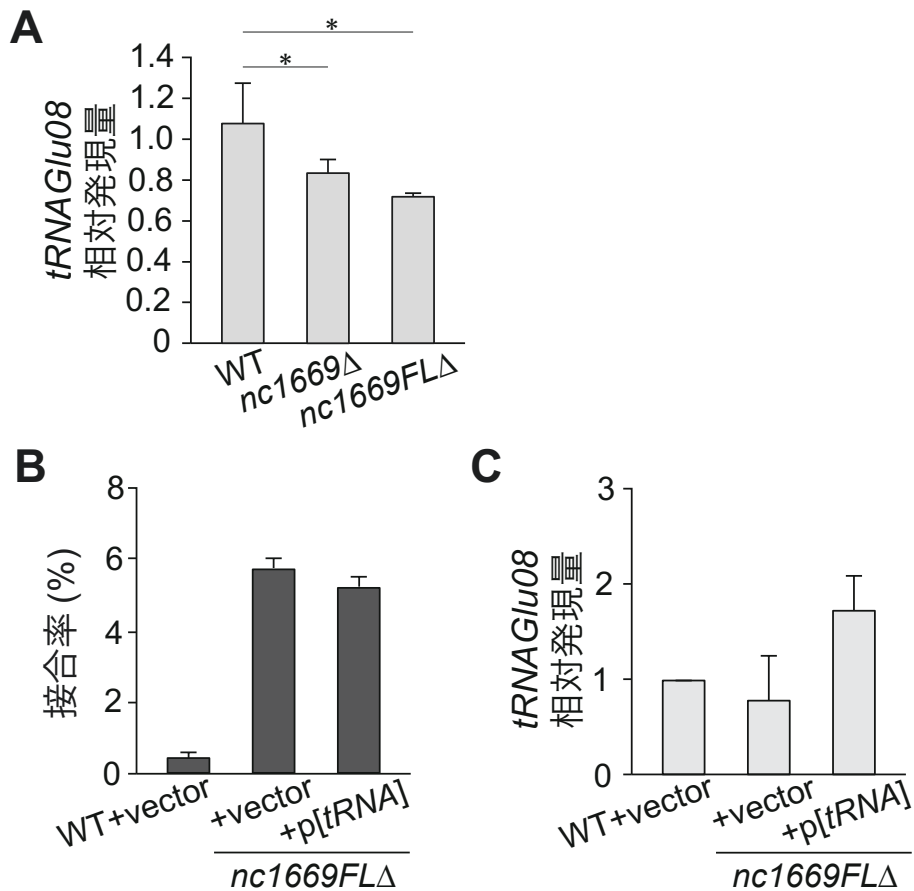


Figure 8 *tRNA^{Glu08}* の欠失は接合亢進の原因ではない

(A) *tRNA^{Glu08}* の相対発現量。SD-3S 寒天培地で培養した細胞の RNA を抽出して遺伝子特異的逆転写反応を行い、リアルタイム PCR により発現量を測定した。なお、発現量はハウスキーピング遺伝子である *act1* (アクチンをコードする遺伝子) の発現量によって標準化した。平均値 ± 標準誤差、3 回試行、* $p < 0.05$ (スチューデントの *t* 検定)。

(B) 窒素源を含む培地 (SD-3S+clonNAT 寒天培地) における接合率。平均値 ± 標準誤差、3 回試行 (それぞれ 1,000 細胞以上計測)。

(C) *tRNA^{Glu08}* の相対発現量。SD-3S+clonNAT 寒天培地で培養した細胞の RNA を抽出して逆転写反応を行った。その後、逆転写反応を行ったサンプルと行っていないサンプルにおいて目的遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により測定し、その差をハウスキーピング遺伝子である *act1* (アクチンをコードする遺伝子) の発現量によって標準化した。平均値 ± 標準誤差、3 回試行。

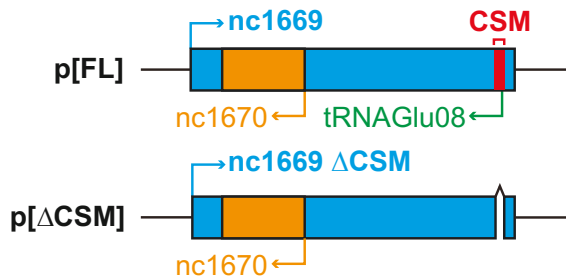
Ono et al., 2022, Fig. 6B, 6C, 6D を改変して転載。

3-3 CSM 領域は *nc1669* RNA の機能にとって重要である

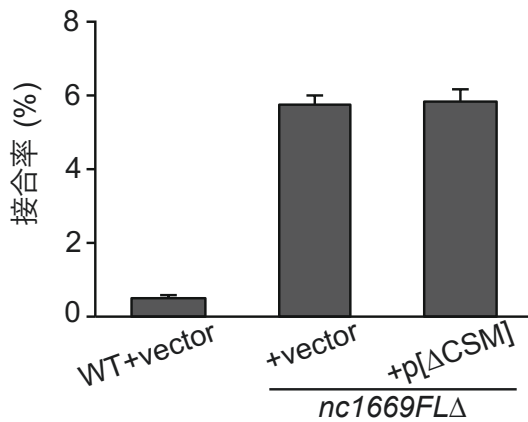
1-4 で言及した通り、*nc1669* RNA は、*S. pombe* とその近縁 3 種で塩基配列と二次構造が進化的に保存されていると判定された CSM 領域を有する。本研究の基盤となった *in silico* スクリーニングでは、CSM 領域が ncRNA の機能にとって重要であることを想定していた。つまり、*nc1669* RNA の CSM 領域が形成する二次構造が、*nc1669* RNA の機能ドメインである可能性が考えられる。そこで、*nc1669FLΔ*において、CSM 領域を欠失させた *nc1669* (*nc1669 ΔCSM*) を発現するプラスミド (p[ΔCSM]) を導入し、接合亢進が抑圧されるか否かを検証した (Fig. 9A)。その結果、p[ΔCSM]を導入した株 (*nc1669FLΔ+p[ΔCSM]*) では、接合亢進は抑圧されなかった (Fig. 9B)。またこの時、*nc1669 ΔCSM* の発現量は、内在性の *nc1669* の発現量と比較して 10 倍以上であった (Fig. 9C)。これらのことから、CSM 領域は *nc1669* RNA が接合亢進を抑制するために必要であることが示唆された。

nc1669 RNA の CSM 領域が形成する二次構造の重要性をさらに検証するため、内在性 *nc1669* の CSM 領域を、CSM-*shf1* 配列に置換した *nc1669-shf1* 変異体を作製した。CSM-*shf1* 配列は、*nc1669* RNA の CSM 領域を構成するヌクレオチドの組成を変えずにランダムにシャッフルし、本来の二次構造を形成することができないように改変した配列である。RNAalifold (Bernhart et al., 2008) による二次構造予測の結果、*nc1669* RNA の CSM 領域は tRNA 様のクローバー型構造を形成する一方で (Fig. 10A (a))、CSM-*shf1* 配列は直線状の構造を形成し、オリジナルの CSM 領域が有するクローバー型構造を形成できないことを確かめた (Fig. 10A (b))。続いて、*nc1669-shf1* 変異体が接合亢進を示すか否かを検証したところ、*nc1669-shf1* 変異体の窒素源を含む培地における接合率は 1.5%程度であり、WT と比較して有意に上昇した (Fig. 10B)。加えてこの時、*nc1669-shf1* 変異体では *ste11* の発現量が WT と比較して 2 倍程度上昇していた (Fig. 10C (a))。これらのことから、(1) CSM 領域の tRNA 様の二次構造が *ste11* の発現を抑制するという *nc1669* RNA の機能にとって重要である、(2) *shf1* 変異により *nc1669-shf1* RNA が不安定化され分解された、という 2 通りの可能性が考えられた。どちらの考えが正しいのかを検証するため、窒素源を含む培地における *nc1669-shf1* の発現量を測定した。その結果、*nc1669-shf1* は、*nc1669* と比較して発現量が有意に上昇した (Fig. 10C (b))。以上から、*shf1* 変異は *nc1669* RNA を不安定化させないこと、CSM 領域が tRNA 様の二次構造を形成することが、*ste11* の発現を抑制し性分化の進行を阻止するという *nc1669* RNA の機能にとって必要であることが示唆された。

A



B



C

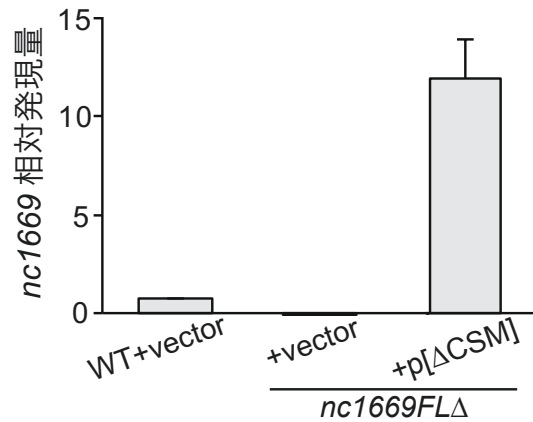


Figure 9 *nc1669* RNA の CSM 領域は接合亢進の抑制に必要である

(A) p[FL]および p[ΔCSM]の部分的な模式図。

(B) 窒素源を含む培地 (SD-3S+clonNAT 寒天培地) における接合率。平均値 ± 標準誤差、3 回試行 (それぞれ 1,000 細胞以上計測)。

(C) *nc1669* の相対発現量。SD-3S+clonNAT 寒天培地で培養した細胞の RNA を抽出して逆転写反応を行った。その後、逆転写反応を行ったサンプルと行っていないサンプルにおいて目的遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により測定し、その差をハウスキーパー遺伝子である *act1* (アクチンをコードする遺伝子) の発現量によって標準化した。平均値 ± 標準誤差、3 回試行。

Ono et al., 2022, Fig. 6E, 6F, 6G を改変して転載。

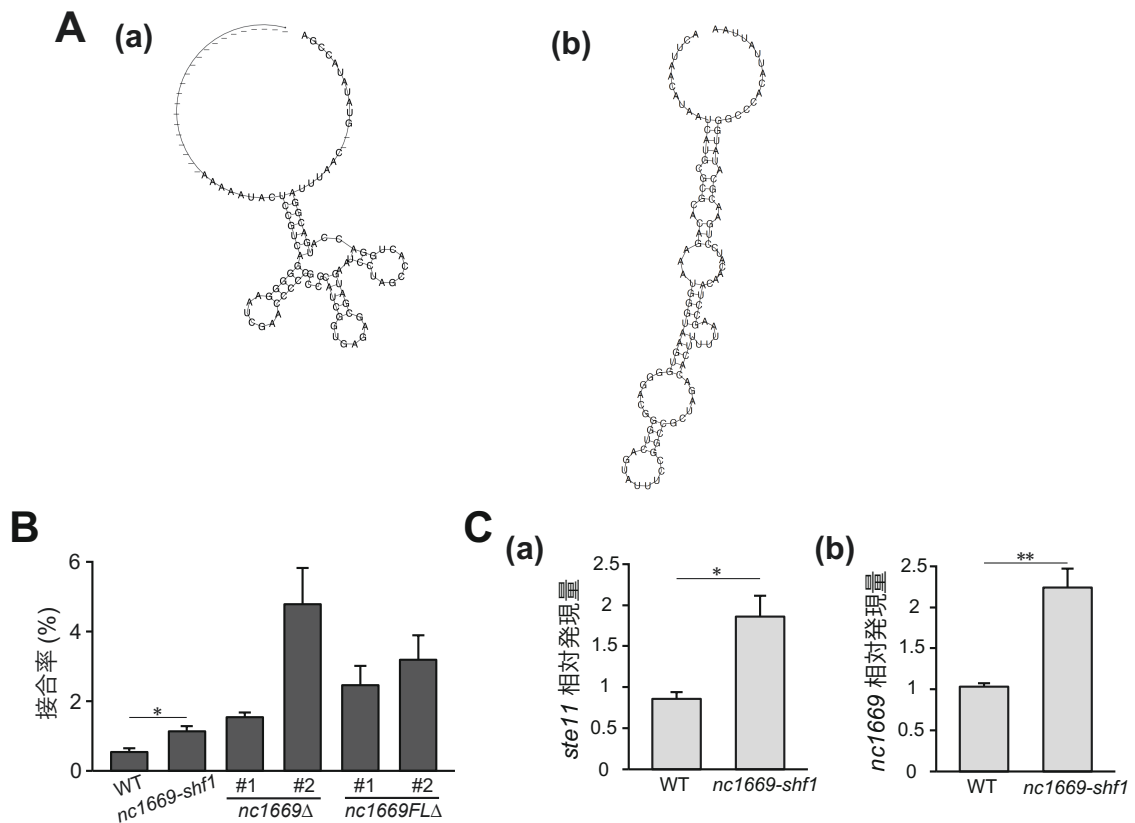


Figure 10 CSM 領域の形成する二次構造が *nc1669* RNA の機能に必要なである

(A) RNAalifold により予測された、*nc1669* RNA のオリジナルの CSM 領域 (a) および CSM-*shf1* 配列 (b) の二次構造。

(B) 窒素源を含む培地 (SD-3S 寒天培地) における接合率。平均値 ± 標準誤差、4 回試行 (それぞれ 2,000 細胞以上計測)。* $p < 0.05$ (χ^2 検定)。

(C) *ste11* (a) と *nc1669* (b) の相対発現量。EMM+N 液体培地で培養した細胞の RNA を抽出して遺伝子特異的逆転写反応を行った。その後、逆転写反応を行ったサンプルと行っていないサンプルにおいて目的遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により測定し、その差をハウスキーピング遺伝子である *act1* (アクチンをコードする遺伝子) の発現量によって標準化した。平均値 ± 標準誤差、3 回試行。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (学生検定の t 検定)。

Ono et al., 2022, Fig. 6A, 6H, S9 を改変して転載。

4 章 総合討論

4-1 本研究の基盤となったスクリーニングの評価

1-4 で言及した通り、筆者の所属する研究室において、分裂酵母 *S. pombe* の全 ncRNA 1,857 遺伝子の塩基配列と二次構造の進化的保存性に着目した *in silico* スクリーニングが行われた。その結果、151 遺伝子の塩基配列と二次構造が、*S. pombe* とその近縁 3 種間において進化的に保存されていると判定された。ここでは、本 *in silico* スクリーニングが、実際に塩基配列と二次構造の保存性の高い ncRNA 遺伝子をどの程度の確度で検出できたのかについて考察する。

本 *in silico* スクリーニングが目的の ncRNA を検出した確率（検出効率）を計算するために、tRNA に着目した。tRNA はクローバー型の二次構造を形成することがその機能にとって必須であり、この構造は生物種を超えて保存されていることから、CSG における tRNA の割合が、本 *in silico* スクリーニングの検出効率であると考えられる。*S. pombe* の全 ncRNA 1,857 遺伝子のうち、長鎖 ncRNA は 1,522 遺伝子、tRNA は 196 遺伝子を占める (Fig. 11A)。*S. pombe* の全 ncRNA において、塩基配列のみが保存されている Conserved Primary-structure Gene 1,053 遺伝子のうち、長鎖 ncRNA は 788 遺伝子を占め約 51.8% が検出された一方で、tRNA は 159 遺伝子を占め約 81.1% が検出された (Fig. 11B)。他方、塩基配列と二次構造の両方の保存性が高い CSG 151 遺伝子のうち、長鎖 ncRNA は 72 遺伝子、tRNA は 49 遺伝子を占めた (Fig. 11C)。この値から本 *in silico* スクリーニングの検出効率を計算すると、 $49/196=25\%$ であった。残りの 75% はなぜ検出されなかったのだろうか。二つの理由が考えられる。第一に、種を超えて同等の機能を有する ncRNA であっても、その塩基配列と二次構造が必ずしも進化的に保存されているわけではないということである。第二に、二次構造の保存性を判定したアルゴリズムである RNAz が、二次構造の保存性が不十分であると判断した可能性である。RNAz は RNA の二次構造の保存性を、塩基配列の類似性、二次構造の類似性、熱力学的安定性などにより評価する (Gruber et al., 2010; Washietl et al., 2005)。具体的には、Structure Conserved Index (マルチプルアライメントのコンセンサス最小自由エネルギーと、マルチプルアライメント内の各配列の最小自由エネルギーの平均値の比、1 に近い値であれば構造が保存されていると言える)、Z スコア (各配列の最小自由エネルギーを正規化した値、小さいほど熱力学的に安定であることを示す)、各配列の正規化シャノンエントロピー (マルチプルアライメント内の各 RNA 配列内の各塩基において塩基の出現頻度を示した値、小さいほど塩基配列が保存されていることを示す) を計算し、これらを元に、サポートベクター回帰によって二次構造の保存性を示す値 P が出力される (Gruber et al.,

2010; Washietl et al., 2005)。本 *in silico* スクリーニングでは、構造保存性を示す値 P が 0.5 以上の ncRNA を抽出した。このため、二次構造の保存性は高いと判定された一方で、熱力学的安定性が低く不安定で分解されやすいと判定された RNA は、細胞内で実際に形成される二次構造が進化的に保存されていたとしても検出されない。また、RNAz は RNA の一次配列の情報によってのみ二次構造の保存性を評価するため転写後修飾の影響を考慮しておらず、細胞内で化学修飾などにより二次構造が安定している tRNA (Motorin and Helm, 2010) など同様に検出されない。実際に、本 *in silico* スクリーニングにおいて、全 tRNA のうち 80% 以上の塩基配列が保存されていると判定されたが、CSG として抽出された tRNA の割合、すなわち検出効率は 25% に止まった (Fig. 11B, C)。塩基配列の保存性が高いにもかかわらず CSG として検出されなかった tRNA の Z スコアは、CSG として抽出された tRNA の Z スコアと比較して大きい値をとる傾向にあった。このことから、二次構造の保存性が高いが熱力学的安定性の低い RNA は、本 *in silico* スクリーニングでは検出されないことが考えられる。

分裂酵母 *S. pombe* において良く知られた機能性長鎖 ncRNA である meiRNA は、今回の *in silico* スクリーニングでは検出されなかった。そこで、本スクリーニングにおいて、塩基配列と二次構造が進化的に保存されているにもかかわらず meiRNA が検出されなかった可能性を排除するため、*S. pombe* の近縁 3 種において meiRNA を blastn 検索した。その結果、meiRNA と類似する配列は存在しなかった。また、meiRNA は Mei2 タンパク質と結合することから、Mei2 を同様に blastp 検索すると、meiRNA とは異なり全ての近縁種で類似する RNA 結合タンパク質が検出された。これらのことから、*S. pombe* の近縁 3 種には Mei2 タンパク質のオーソログが存在し Mei2 と同等の機能を有する一方で、その結合相手である ncRNA は、meiRNA とは塩基配列と二次構造が異なるということが考えられる。つまり、meiRNA のように細胞にとって必要不可欠な機能を有する RNA だとしても、塩基配列と二次構造が進化的に保存されない場合があることが考えられる。

また、本 *in silico* スクリーニングにおいて、塩基配列と二次構造の進化的保存性が高くないにもかかわらず検出される確率は、RNAz により 6.1% であると計算された。つまり、CSG であると判断され塩基配列と二次構造の保存性が高いと予想された ncRNA 151 遺伝子のうち、9 遺伝子は偽陽性である可能性が高い。ところが、1-4 で述べたように、*in silico* スクリーニングの後に *in vivo* で機能性 ncRNA をさらにスクリーニングしたため、この程度の偽陽性率で充分であると言える。また、今回の *in silico* スクリー

ニングでは、先述した通り、RNAzによって算出された構造保存性を示す値 P の閾値を 0.5 としたが、0.9 を閾値とすると偽陽性率は 1.3% にまで減少する。その一方で、検出効率は 25% から 16% にまで低下する。つまり、偽陽性率と検出効率はトレードオフの関係であると言える。

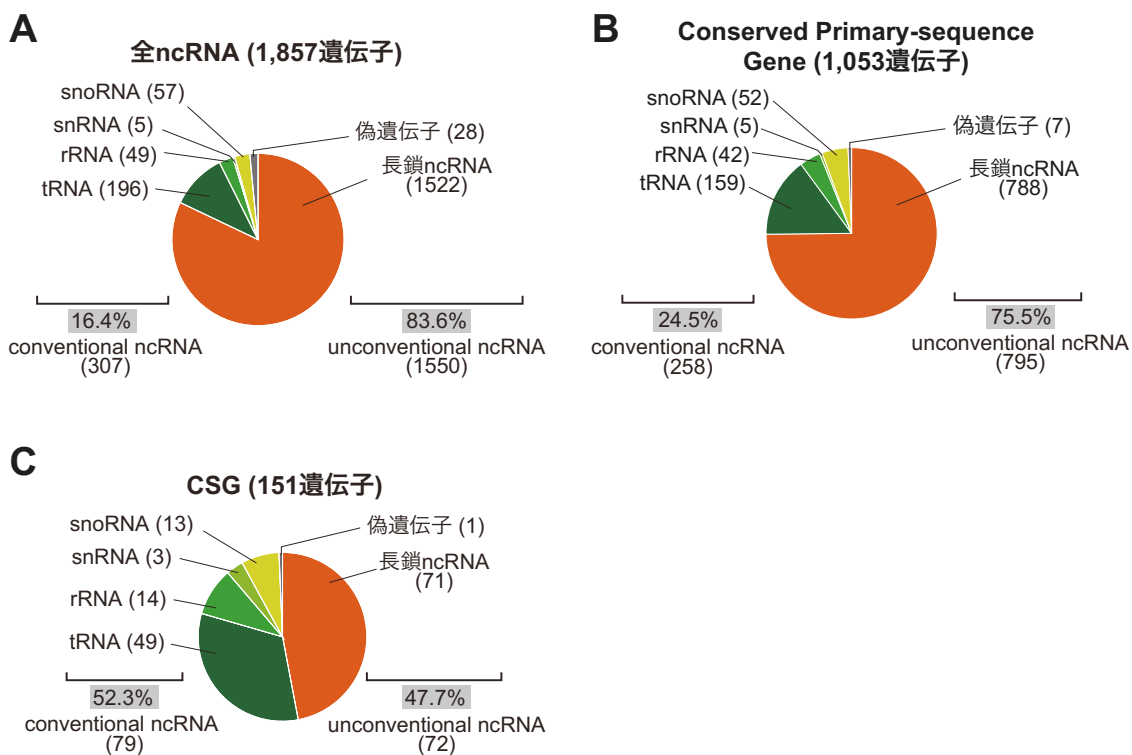


Figure 11 *S. pombe* の全 RNA および CSG の内訳

(A) *S. pombe* の全 RNA 1,857 遺伝子の内訳。

(B) *S. pombe* とその近縁 3 種間において、塩基配列が保存されていると判定された Conserved Primary-Structure Gene 1,053 遺伝子の内訳。

(C) *S. pombe* とその近縁 3 種において、塩基配列と二次構造が進化的に保存されていると判定された CSG 151 遺伝子の内訳。

Ono et al., 2022, Fig. 1C, 1D を改変して転載。

この *in silico* スクリーニングの後、CSG のうち機能未知の長鎖 ncRNA のノックアウト株が作製され、多様な培養条件下での表現型が観察され、*nc1669* が発見された。しかし、技術的な制約があり、*in silico* スクリーニングの後の *in vivo* スクリーニングでは、CSG と判断された機能未知の長鎖 ncRNA 71 遺伝子全てのノックアウト株の作製が完了したわけではない。

長鎖 ncRNA には、相補鎖からタンパク質をコードする遺伝子が発現するアンチセンス RNA と、コード領域間に存在する遺伝子間 RNA の 2 種類が存在する (Fig. 12A)。遺伝子間 RNA のみのノックアウトは容易であり、また他の ncRNA 遺伝子が重複していたとしても、本論文で行ったような相補実験により目的 ncRNA の機能の検証が可能である。一方で、アンチセンス RNA のみのノックアウトは技術的に困難である。なぜなら、アンチセンス RNA をノックアウトすると、相補鎖から発現する遺伝子も同時に欠失されるためである。つまり、ノックアウト株が示す表現型の原因が、目的の ncRNA、その相補鎖から発現する遺伝子のどちらの欠失によるのかを判断することができない。このため、本 *in vivo* スクリーニングにおいては、CSG と判断された機能未知の長鎖 ncRNA 71 遺伝子のうち、遺伝子間 RNA である 14 遺伝子を解析の対象とし、それらのノックアウト株のみが作製された (Fig. 12B)。残りの 57 遺伝子の中に、重要な機能を担う長鎖 ncRNA が含まれている可能性は大いにある。それでは、どのようにしてアンチセンス RNA のみを欠失させ、その機能を検証すれば良いのだろうか。CSM 領域に着目すれば、この技術的困難を解決できる可能性がある。本研究において、*nc1669* RNA がその機能を十分に果たすためには、CSM 領域の二次構造が必要であると示した。この場合と同様に、他の機能性長鎖 ncRNA の候補にとっても CSM 領域の二次構造が機能ドメインである可能性が考えられる。そこで、目的 ncRNA の CSM 領域に、その二次構造の形成に影響を与えかつ相補鎖から発現するタンパク質のアミノ酸配列を変化させないようなサイレント変異を導入した株を作製することは技術的に可能である。

本 *in vivo* スクリーニングではさまざまな環境下での表現型が観察されたが、顕著な表現型を示したのは *nc1669* をノックアウトした場合のみであった。本 *in vivo* スクリーニングでは、高温・低温感受性、DNA 損傷 (紫外線) および合成阻害 (ヒドロキシ尿素)、微小管形成阻害 (チアベンダゾール (TBZ))、細胞周期進行阻害 (カフェイン)、酸化ストレス (過酸化水素)、重金属ストレス (硫酸カドミウム)、浸透圧ストレス (ソルビトール)、性分化への影響について観察されたが (Fig. 12C)、検証していない条件

が残されている可能性は十分に存在する。実際に、遺伝子間 RNA のノックアウト株を網羅的に作製する研究 (Rodriguez-Lopez et al., 2022) では、140 近くもの条件下での表現型が観察され、本 *in silico* スクリーニングで CSG と判断された遺伝子間に位置する長鎖 ncRNA のうち、*SPNCRNA.475*、*507*、*515*、*808*、*965* はストレス環境下、あるいは細胞周期の進行において表現型を示すと報告されている。

本研究の基盤となった *in silico* スクリーニングが行われたのは 2016 年 6 月であり、この時点では分裂酵母 *S. pombe* は 1,857 遺伝子の ncRNA を有することが判明していた。ところが、この *in silico* スクリーニングの後に、*S. pombe* において新たに 5,775 遺伝子の長鎖 ncRNA が発見された (Atkinson et al., 2018)。このため、これらの長鎖 ncRNA を対象とした同様の *in silico* / *in vivo* スクリーニングを行い、これらの中に機能性 ncRNA が存在するか否かを今後検証する必要がある。

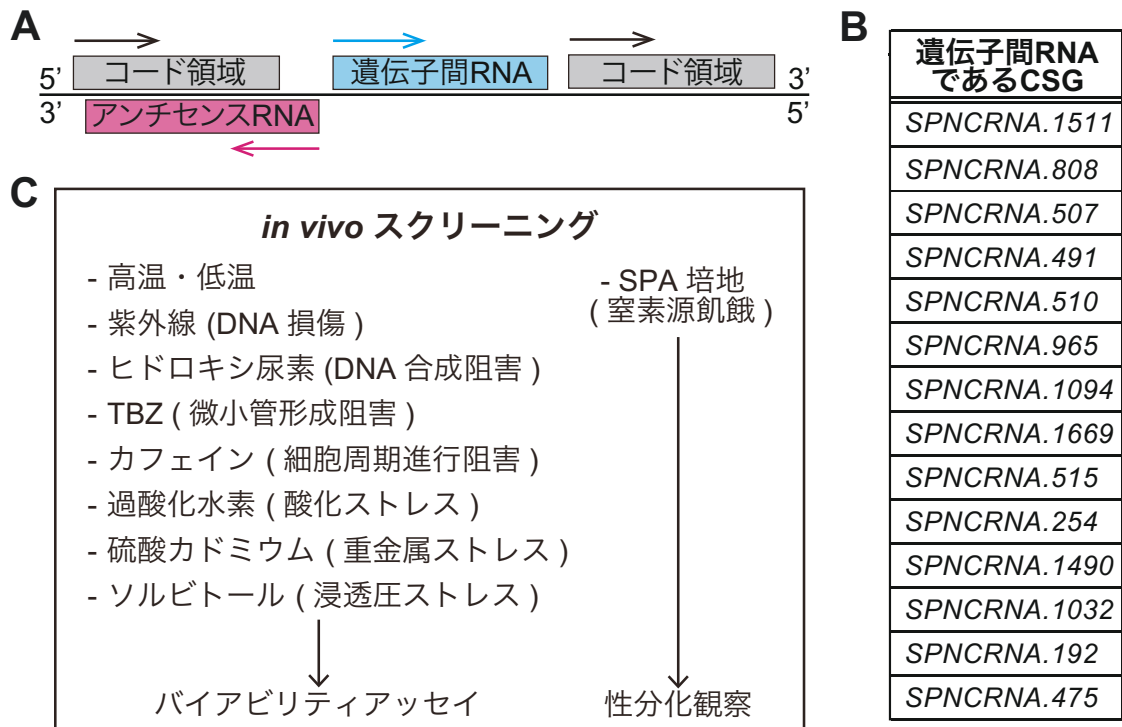


Figure 12 本研究の基盤となった *in vivo* スクリーニングについて

(A) アンチセンス RNA と遺伝子間 RNA の模式図。

(B) *in vivo* スクリーニングでノックアウト株が作製された遺伝子間に位置する長鎖 ncRNA の一覧。

(C) *in vivo* スクリーニングで観察された表現型の条件。

Ono et al., 2022, Fig. 2B, 2C を改変して転載。

4-2 *nc1669* RNA はどのように *ste11* の発現を制御するのか

4-2-1 *nc1669* RNA と *rse1* RNA の関係についての考察

ゲノムデータベースにより *nc1669* と *ste11* の遺伝子座を比較すると、両者は共に 2 番染色体上に約 125,000 塩基ほど離れて存在する遺伝子であり、比較的近傍に位置することが判明した (*nc1669*: 4109819-4107562, *ste11*: 3983404-3987400)。一般に ncRNA は、近傍の遺伝子に対して作用するシス因子と、遠方に位置する遺伝子に対して作用するトランス因子に分類される。多くの長鎖 ncRNA はシスに作用すると報告されており、隣接する、あるいは相補鎖から発現する遺伝子に対して発現制御を行う (Gil and Ulitsky, 2020)。 *ste11* と *nc1669* の遺伝子座の差は約 125,000 塩基であるため隣接してはいないが、マウスでは 1,500,000 塩基離れた遺伝子の発現をシスに制御する長鎖 ncRNA が知られている (Groff et al., 2018)。これに加えて、 *nc1669FLΔ* においてプラスミドから異所的に *nc1669* を発現させた場合、接合亢進が一部回復したものの完全には抑圧されなかったこと (Fig. 7B) から、 *nc1669* は *ste11* をシスに抑制することが考えられる。また、1-5-6 で述べた通り、 *ste11* のプロモーター領域から発現する長鎖 ncRNA *rse1* が、栄養増殖期においてヒストン脱アセチル化酵素を呼び込み *ste11* の発現を抑制することが知られている (Fauquenoy et al., 2018)。つまり、 *rse1* RNA は *ste11* の発現をシスに抑制しており、 *nc1669* RNA は *rse1* RNA と共に栄養増殖期において *ste11* の発現をシスに抑制する可能性が考えられる (Fig. 13)。

シスに作用する長鎖 ncRNA の作用機序には、(1) 長鎖 ncRNA の転写産物が転写産物に作用する、(2) 転写やスプライシングの過程で標的遺伝子に作用する、(3) 長鎖 ncRNA の DNA 配列が作用する、という 3 通りが考えられる (Kopp and Mendell, 2018)。 *ste11* と *nc1669* の遺伝子座の差が約 125,000 塩基であるため転写装置や DNA 配列が *ste11* の発現を抑制するとは考え難いこと、異所的な *nc1669* の転写が接合亢進を完全ではないが抑圧したこと (Fig. 7B) から、(2) と (3) ではなく、(1) の *nc1669* の転写産物が *ste11* の発現抑制に寄与することが考えられる。

本研究により *nc1669* RNA が *ste11* の発現をシスに抑制することが示唆された。そこで、今後の課題として、 *nc1669* RNA による *ste11* 発現抑制のより詳細な分子機構を以下の 3 つのステップにより探る必要がある。第一に、 *rse1* と *nc1669* の遺伝学的相互作用を検証する。具体的には、 *rse1* と *nc1669* の二重ノックアウト株を作製し、窒素源を含む培地における接合率を測定する。単独ノックアウト株の接合率と同程度であれば、 *nc1669* は *rse1* と同じ経路で *ste11* の発現を抑制していることが考えられる。第二に、 *nc1669* RNA が *ste11* の転写のどの部分に影響を与えるのかを検証する。 *rse1* RNA は *ste11* のプロモーター領域のヒストンを脱アセチル化させ転写を抑制する (Fauquenoy et al., 2018) ため、まずは *nc1669* ノックアウト株において *ste11* プロモーター領域のヒストンが野生型と比較して高度にアセチル化されているか否かを検証する必要がある。

る。第三に、*nc1669*RNA がどのタンパク質と相互作用するのかを検証する。一般的に、ncRNA はタンパク質と相互作用してその機能を発揮するといわれる。そのため、*nc1669* RNA も何らかのタンパク質と結合することで *ste11* の発現抑制に寄与する可能性が高いが、*nc1669*RNA と結合するタンパク質を RNA-タンパク質共免疫沈降法などにより *in vivo* でスクリーニングして見出すのは煩雑である。そこで、*nc1669*RNA と結合するタンパク質を、まずはインフォマティクス的手法により予測する必要がある。RNA-タンパク質間の相互作用を簡便に評価する手法として、*cat*RAPID (Armaos et al., 2021) が挙げられる。*cat*RAPID は任意の RNA-タンパク質間の相互作用を、(1) 既知の RNA 結合タンパク質との比較、(2) 二次構造の予測・水素結合・疎水性・ファンデルワールス結合など物理化学的特性の計算を組み合わせることで評価する (Armaos et al., 2021)。試験的に、*nc1669*RNA と *ste11* プロモーター領域のヒストン脱アセチル化に関わる因子 (Set1、Mug187、Lid2、Hos2) との相互作用を評価したところ、Set1、Mug187、Lid2 と CSM 領域が相互作用する可能性が示唆された (Fig. 14A)。これに対して、*nc1669-shf1*RNA においては、*shf1*領域とこれらとの相互作用は認められなかった (Fig. 14A)。以上から、*nc1669*RNA は CSM 領域を介して Ste1、Mug187、Lid2 と相互作用することで、*rse1* RNA と共に *ste11* の発現をシスに抑制するという機能を発揮する可能性が考えられる。しかし、ここでの *cat*RAPID の使用はあくまで例示であり、どのアルゴリズムを使用するのかを含め更なる検討が必要である。

また、窒素源非存在下において *nc1669* の発現量が減少する一方で、相補鎖から発現する *nc1670* の発現量は有意差が認められなかったものの増加した (Fig. 6A (c))。このことから、窒素源飢餓に応答して発現量が増加した *nc1670* により、*nc1669* の発現がシスに抑制される分子機構が考えられる。

4-2-2 *nc1669*RNA と cAMP/PKA 経路および TORC1 経路との関係についての考察

1-5 で言及した通り、窒素源など栄養源が存在する場合、cAMP/PKA シグナル経路および TORC1 シグナル経路という二つの経路によって、*ste11* の発現が主に抑制されている。*nc1669Δ* では窒素源を含む培地で *ste11* の発現量が上昇したこと (Fig. 6A (a)) から、*nc1669*RNA は栄養増殖期において cAMP/PKA 経路および TORC1 経路と共に *ste11* の発現を抑制すると考えられる。cAMP/PKA シグナル経路と TORC1 経路は、Ste11 の核内への蓄積を阻害し、かつ転写因子 (Rst2、Atf1-Pcr1 二量体、Ste11) が *ste11* のプロモーター領域に集積しないよう制御している (Fig. 4B (i))。 *nc1669*RNA がシスに作用することを考えると、*nc1669*RNA が *ste11* の発現を抑制する分子メカニズムと

して、Ste11 の核内への蓄積を阻害する可能性ではなく、これら 3 種類の転写因子の *ste11* プロモーター領域への集積を阻害する可能性が考えられる (Fig. 13)。

今後の課題として、Rst2、Atf1-Pcr1 二量体、Ste11 と *nc1669* RNA の関連を明らかにする必要がある。具体的には、*rse1* RNA の場合と同様、まずこれらの転写因子と *nc1669* の二重ノックアウト株の接合率を単独ノックアウト株の接合率と比較し、*nc1669* との遺伝学的相互作用を検証する。加えて、クロマチン免疫沈降法などにより、*nc1669* ノックアウト株の *ste11* プロモーター領域におけるこれらの転写因子の結合量を測定する。*nc1669* RNA がこれらの転写因子の集積を阻害するならば、*nc1669* ノックアウト株では野生型と比較して結合量が増加することが考えられる。さらに、*nc1669* RNA とこれらの転写因子の結合可能性を *catRAPID* により評価したところ、Ste11 を除く転写因子と CSM 領域を介して結合することが示唆された (Fig. 14B)。このことから、*nc1669* RNA の CSM 領域を介した結合によりこれらの転写因子が阻害される可能性が考えられる。

4-2-3 *nc1669* RNA と Pat1 キナーゼとの関係についての考察

続いて、*nc1669* RNA と Pat1 キナーゼの関係について考察する。1-5-5 で述べた通り、Pat1 は性分化の開始に必須の Ste11 と、減数分裂の開始に必須の Mei2 をリン酸化して阻害することで、栄養増殖と性分化を明確に隔てる重要なキナーゼである。この Pat1 は、Ste7 というタンパク質と密接に関係することが知られている。*ste7* 遺伝子は窒素源の有無にかかわらず発現するが、窒素源飢餓下において Ste11 によって発現が上昇する (Matsuyama et al., 2000)。また、Ste7 は Pat1 と相互作用すること、接合に必須であること、減数分裂の開始を抑制することが知られている (Matsuyama et al., 2000)。

窒素源を含む培地において、*pat1-114* 変異体は制限温度下では一倍体減数分裂を示すが、半許容温度下では一倍体減数分裂ではなく接合亢進を示す (Beach et al., 1985; Matsuyama et al., 2000) (Fig. 15A, B)。ところが、半許容温度下では *pat1-114 ste7Δ* 二重変異体は一倍体減数分裂を示す (Matsuyama et al., 2000) (Fig. 15B)。つまり、半許容温度下において、*pat1-114* 変異体では 114 変異により Pat1 のキナーゼ活性が一部抑制された一方で、*pat1-114 ste7Δ* 二重変異体では 114 変異に加え、*ste7* がノックアウトされたことで Pat1 のキナーゼ活性が完全に抑制されたと考えられる (Fig. 15B)。

nc1669Δ や *nc1669FLΔ* は、制限温度下における *pat1-114* 変異体のように一倍体減数分裂ではなく、接合亢進を示したことから、*nc1669* RNA が欠失されたことで Pat1 のキナーゼ活性が一部抑制されたことが考えられる (Fig. 15C)。すなわち、*nc1669* RNA

は Ste7 と共に Pat1 に結合して Pat1 のキナーゼ活性を正に制御し、Ste11 の核内集積を阻害する可能性が考えられる (Fig. 13)。

今後、Pat1 と *nc1669* RNA の関連を検証する必要がある。まず、*pat1-114 nc1669Δ* 二重変異体が、半許容温度下において一倍体減数分裂を示すか否かを観察する。また、*nc1669* RNA と Pat1 および Ste7 との結合可能性を *cat*RAPID により評価したところ、CSM 領域を介して結合することが示唆された (Fig. 14C)。

窒素源あり

細胞質

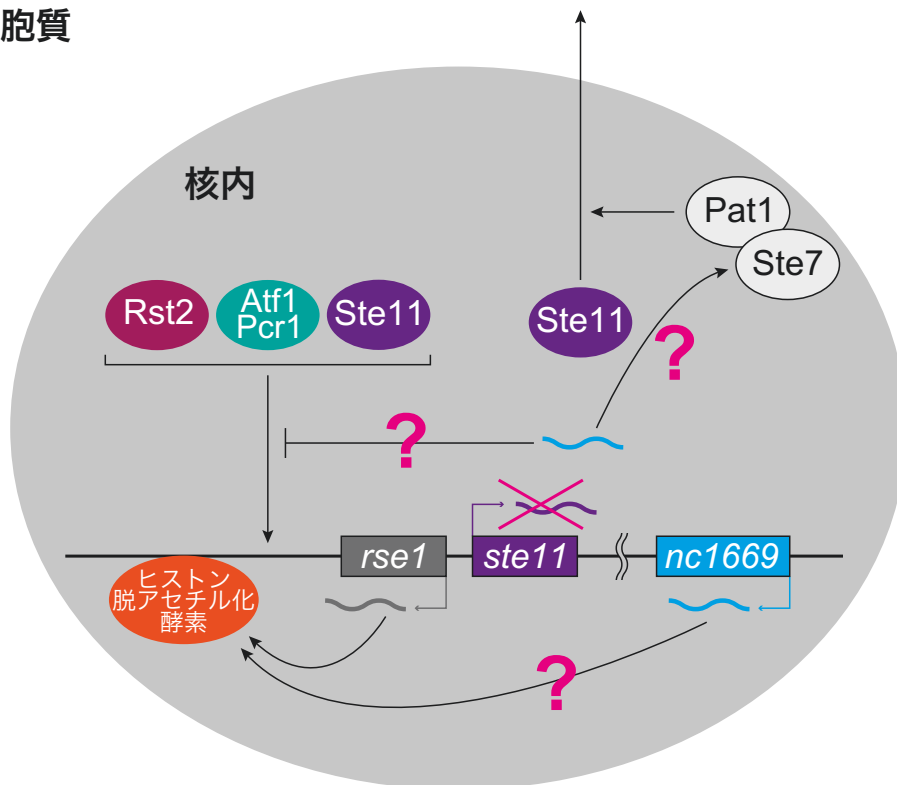


Figure 13 *nc1669* RNA は *ste11* の発現をシスに抑制する可能性が考えられる
nc1669 RNA が *ste11* の発現をシスに抑制するメカニズムとして、(1) *rse1* RNA と共に *ste11* のプロモーター領域にヒストン脱アセチル化酵素を呼び込む、(2) *ste11* のプロモーター領域に転写因子が集積するのを阻止する可能性が考えられる。また、Pat1 と Ste7 の関係から、*nc1669* RNA は Ste7 と共に Pat1 を活性化させ、Ste11 の核外輸送に寄与する可能性も考えられる。

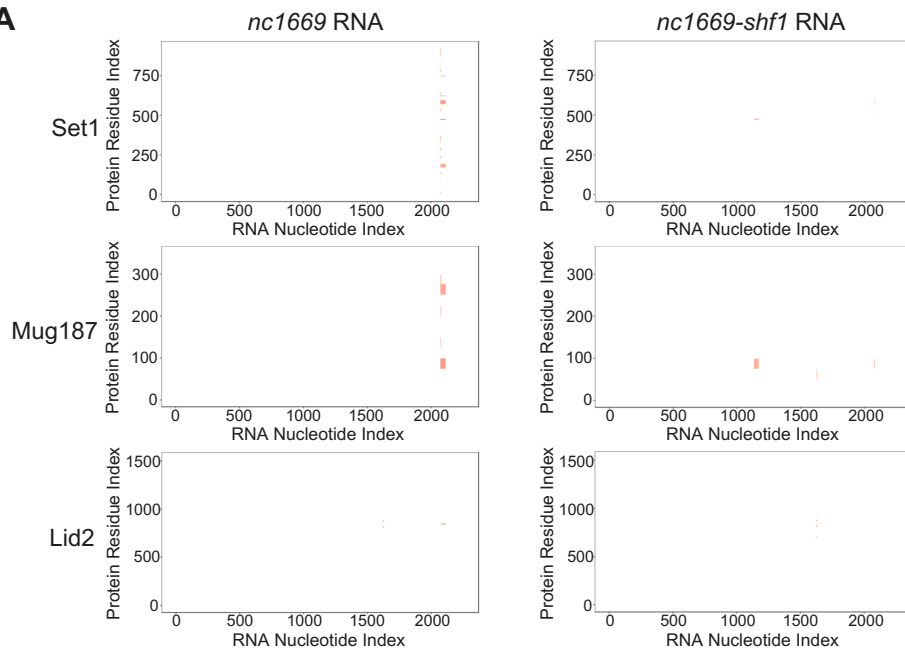
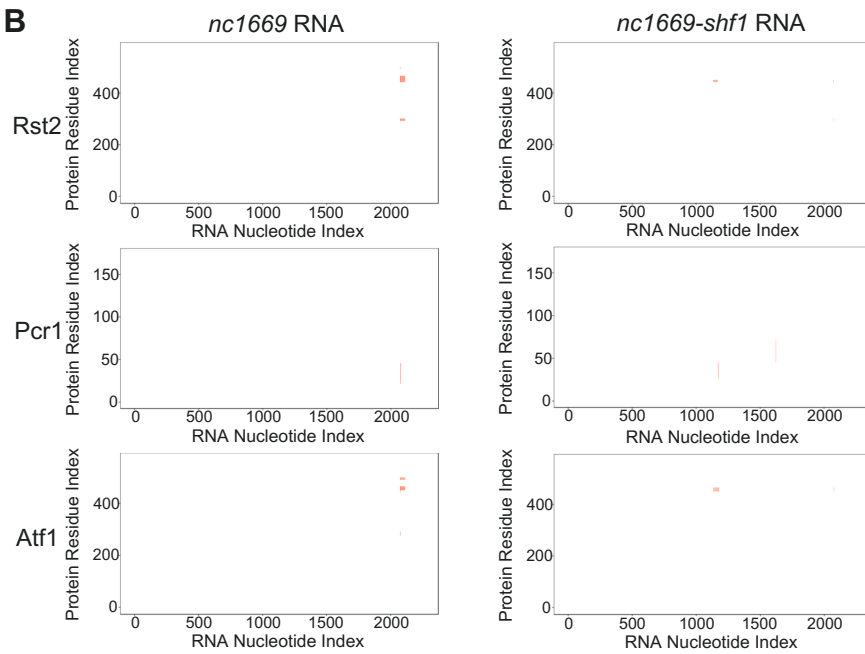
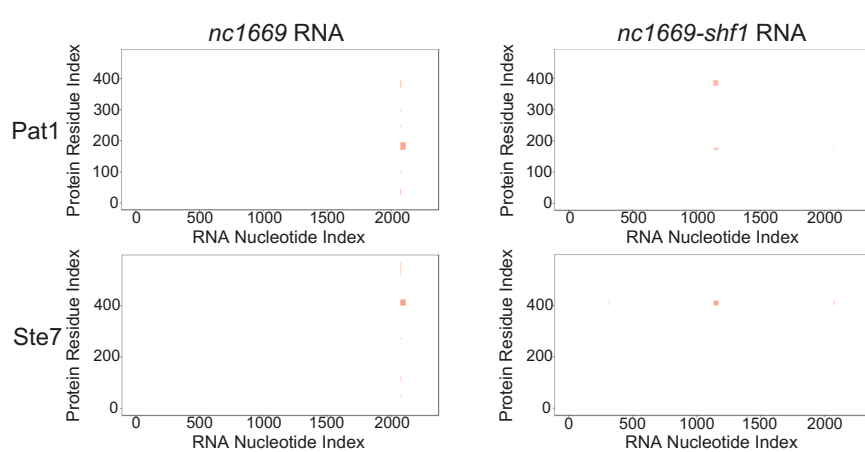
A**B****C**

Figure 14 *nc1669* RNA とタンパク質の *in silico* による結合予測
*cat*RAPID による、*nc1669* RNA および *nc1669-shf1* RNA と、ヒストン脱アセチル化酵素やその関連因子 (A)、*ste11* の転写因子 (B)、Pat1 キナーゼと Ste7 (C) との結合可能性を表した interaction map。縦軸はタンパク質の残基番号、横軸は RNA の塩基番号を示す。赤い箇所が RNA-タンパク質間の結合の可能性が高い箇所を示す。

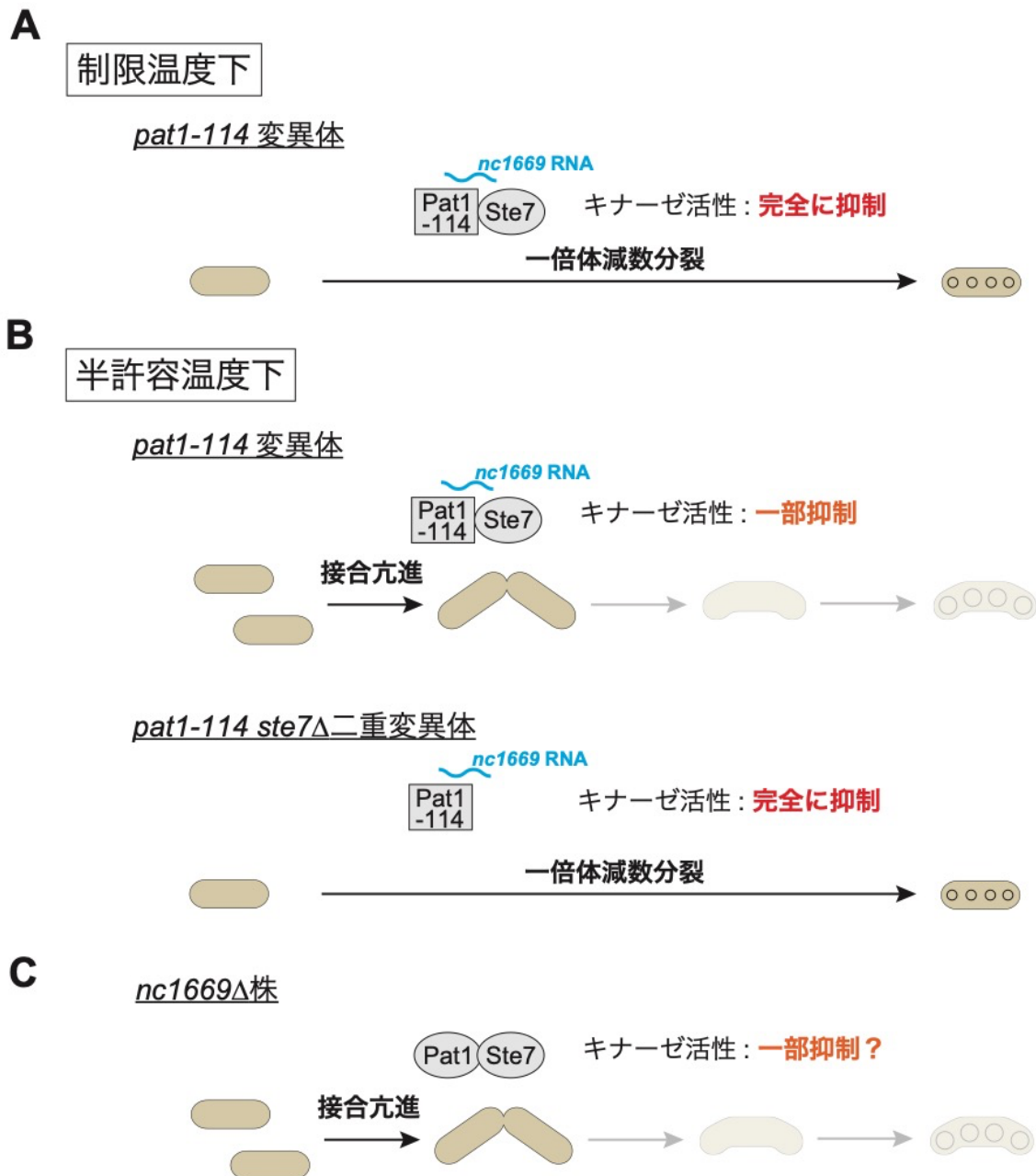


Figure 15 *pat1-114*変異体の表現型から考察した、Pat1 と Ste7、*nc1669* RNA との関係

制限温度下において、*pat1-114*変異体は一倍体減数分裂を示すことから、Pat1-114変異タンパク質のキナーゼ活性は完全に抑制されていることが考えられる (A)。半許容温度下では、*pat1-114*変異体は接合亢進を示すが、*pat1-114 ste7Δ*変異体は一倍体減数分裂を示す (ii)。これらのことから、半許容温度下では Pat1-114 のキナーゼ活性は一部が抑制されるが、Ste7 の欠失により完全に抑制されることが考えられる (ii)。*nc1669*ノックアウト株は接合亢進を示すことから、*nc1669* RNA の欠失により Pat1

のキナーゼ活性が一部抑制されたことが考えられる (C)。

4-3 *nc1669* RNA の CSM 領域に関する考察

続いて、*nc1669* RNA の CSM 領域に関する考察である。*nc1669* RNA の CSM 領域は tRNA 様のクローバー型二次構造を形成し、この構造を形成できない *nc1669-shf1* 変異体は接合亢進を示した (Fig. 10A, B)。このことから、*nc1669* RNA が *ste11* の発現を抑制するためには、CSM 領域が特徴的な二次構造を形成することが必要であると考えられる。しかし、*nc1669Δ* では CSM 領域を含む *nc1669* の 3'末端側が残存しており、かつその部分的 *nc1669* が野生型 *nc1669* と比較して 3 倍以上も発現しているにもかかわらず、*nc1669Δ* は接合亢進を示す (Fig. 5A, 6A (b), 3C (i), 10B)。加えて、窒素源を含む培地における接合率は、*nc1669-shf1* と比較して *nc1669Δ* と *nc1669FLΔ* の方が高い (Fig. 10B)。すなわち、*nc1669* RNA が機能を完全に発揮するためには、CSM 領域と 5'末端側に存在する構造保存性の低い領域の両方が必要であり、この 2 つの領域が機能ドメインとして協働すること、少なくとも一方の領域があれば接合亢進が一部抑圧されること、*nc1669* RNA の中心的な機能ドメインは 5'末端側の領域である可能性が考えられる。加えて、*nc1669* RNA の CSM 領域はタンパク質と相互作用するために必要であることが *catRAPID* により予測された (Fig. 14) 一方で、5'末端側の領域は *nc1669* RNA を *ste11* 遺伝子座へと誘導するために必要である可能性が考えられる。

続いて、CSM 領域が *nc1669* RNA の安定性を負に制御する可能性についての考察である。*nc1669-shf1* RNA は、野生型 *nc1669* RNA と比較して発現量が有意に上昇した (Fig. 10C (b))。このことから、*nc1669-shf1* RNA は安定性が増加した、すなわち CSM 領域は *nc1669* RNA の不安定性に寄与していると考えられる。また、一般的に mRNA の 3'末端に付加されるポリ A 鎖は mRNA の安定性を増加させると言われており、ヒト細胞においては長鎖 ncRNA が RNA ポリメラーゼ II によって転写され、その多くにはポリ A 鎖が付加されている (Yang et al., 2011)。分裂酵母においても、長鎖 ncRNA は RNA ポリメラーゼ II によって転写され、転写終結メカニズムも mRNA と同様であることが示唆されている (Larochelle et al., 2018)。これらを合わせて考えると、窒素源存在下において *nc1669* は RNA ポリメラーゼ II によって転写される可能性、CSM 領域によりポリ A 鎖の付加が阻害される可能性が考えられ、今後検証する必要がある。

4-4 *nc1669* ノックアウト株の表現型の強弱に関する考察

nc1669Δ および *nc1669FLΔ* では、同じ遺伝子型であるにもかかわらず表現型が弱い株#1 と強い株#2 が単離されている (Fig. 3C (i), 10B)。戻し交配をしてもこの傾向が見られたことから、*nc1669* 欠失以外の変異がこの表現型の強弱の原因である可能性は低

い。そこで、第一に考えられる原因は *ste11* の発現量の差である。表現型の強い#2 では、弱い#1 と比較して窒素源存在下における *ste11* の発現量が高い可能性が考えられる。ところが、*nc1669-shf1* と *nc1669FLΔ* #2 では、窒素源を含む培地における接合率に2倍近くの差があるが、*ste11* の発現量はほとんど同程度であったこと (Fig. 6A (a), 10B, C (a)) から、接合亢進の表現型の強弱と *ste11* の発現量には必ずしも相関があるわけではないことが考えられる。この場合、Ste11 の標的遺伝子の発現量の差が原因である可能性がある。先述した通り、窒素源飢餓下において接合型の異なる細胞が接合するためには、Ste11 によってさまざまな因子が転写される必要がある。このような Ste11 の標的遺伝子のクロマチン状態が、#1 と#2 では異なる可能性がある。つまり、#1 では Ste11 の標的遺伝子がヘテロクロマチンに近い状態にあり、Ste11 による転写が比較的抑制されている一方で、#2 ではこれらがユークロマチンに近い状態にあり発現量が大きくなること、これらのクロマチン状態がエピジェネティックに遺伝されることが考えられる。

また、表現型の強いロックアウト株であっても、窒素源を含む培地における接合率は10%以下であり多くの細胞は接合しないことから、*nc1669* RNA を介した *ste11* の発現抑制は多数ある経路の中のひとつであり、補助的な経路である可能性が考えられる。

4-5 本研究のまとめ

本研究では、分裂酵母 *S. pombe* の性分化を抑制する長鎖 ncRNA *nc1669* の機能を詳細に解析した。*nc1669* をロックアウトした株では、窒素源を含む培地においても接合する接合亢進の表現型を示した。この時、性分化のマスターレギュレーターである *ste11* の発現量が上昇していたことから、*nc1669* RNA は栄養増殖期において *ste11* の発現を抑制し、性分化が進行しないよう制御することが示された。また、塩基配列と二次構造が進化的に保存されている *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予測された。この構造が、*nc1669* RNA が *ste11* の発現を抑制する際に必要であることを示した。

今後の課題として、*nc1669* RNA が具体的にどの経路によって *ste11* の発現を制御するのかを追究したい。また、細胞内で *nc1669* RNA の CSM 領域が実際に予測通りの二次構造を形成するのかを追究したい。細胞内の RNA の二次構造を推定する手法として、DMS-MaPseq (Zubradt et al., 2017) などがあるが、分裂酵母でこれらが行われた例はない。このため、*in vivo* での RNA の二次構造を決定する手法を、分裂酵母において最適化したいと考えている。

本研究の基盤となった、塩基配列と二次構造が進化的に保存されている ncRNA を探索する *in silico* / *in vivo* スクリーニングは、実際に機能性長鎖 ncRNA を発見するために有用であることが本研究により証明された。*in silico* と *in vivo* を融合させたスクリーニングで発見された機能性長鎖 ncRNA の候補の解析は本研究が最初の事例である。このスクリーニングは分裂酵母以外の生物種にも応用可能であることから、今後は、同様のスクリーニングとその後の機能解析が分裂酵母以外の生物種においても行われ、新たな機能性 RNA が発見されることが期待される。

5 章 引用文献

Álvarez,B. and Moreno,S. (2006) Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *Journal of Cell Science*, **119**, 4475–4485.

Andric,V., Nevers,A., Hazra,D., Auxilien,S., Menant,A., Graille,M., Palancade,B. and Rougemaille,M. (2021) A scaffold lncRNA shapes the mitosis to meiosis switch. *Nature Communications*, **12**, 770.

Aono,T., Yanai,H., Miki,F., Davey,J. and Shimoda,C. (1994) Mating Pheromone-induced Expression of the *mat1-Pm* Gene of *Schizosaccharomyces pombe*: Identification of Signalling Components and Characterization of Upstream Controlling Elements. *Yeast*, **10**, 757–770.

Ard,R., Tong,P. and Allshire,R.C. (2014) Long non-coding RNA-mediated transcriptional interference of a permease gene confers drug tolerance in fission yeast. *Nature Communications*, **5**, 5576.

Armaos,A., Colantoni,A., Proietti,G., Rupert,J. and Tartaglia,G.G. (2021) *catRAPID omics v2.0*: going deeper and wider in the prediction of protein–RNA interactions. *Nucleic Acids Research*, **49**, 72–79.

Atkinson,S.R., Marguerat,S., Bitton,D.A., Rodríguez-López,M., Rallis,R., Lemay,J.-F., Cotobal,C., Malecki,M., Smialowski,P., Mata,J., Korber,P., Bachand,F. and Bähler,J. (2018) Long noncoding RNA repertoire and targeting by nuclear exosome, cytoplasmic exonuclease, and RNAi in fission yeast. *RNA*, **24**, 1195–1213.

Beach,D., Rodgers,L. and Gould,J. (1985) *RANI*⁺ controls the transition from mitotic division to meiosis in fission yeast. *Current Genetics*, **10**, 297–311.

Bernhart,S.H., Hofacker,I.L., Will,S., Gruber,A.R. and Stadler,P.F. (2008) RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments. *BMC Bioinformatics*, **9**, 474–474.

Brown,C.J., Ballabio,A., Rupert,J.L., Lafreniere,R.G., Grompe,M., Tonlorenzi,R. and Willard,H.F. (1991) A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*, **349**, 38–44.

Bugnon,L.A., Edera,A.A., Prochetto,S., Gerard,M., Raad,J., Fenoy,E., Rubiolo,M., Chorostecki,U., Gabaldón,T., Ariel,F., Di Persia,L.E., Milone,D.H. and Stegmayer,G. (2022) Secondary structure prediction of long noncoding RNA: review and experimental comparison of existing approaches. *Briefings in Bioinformatics*, **23**, 1–14.

Coudreuse,C., van Bakel,V., Dewez,M., Soutourina,J., Parnell,T., Vandenhaute,J., Cairns,B., Werner,M. and Hermand,D. (2010) A Gene-Specific Requirement of RNA Polymerase II CTD Phosphorylation for Sexual Differentiation in *S. pombe*. *Current Biology*, **20**, 1053–1064.

DeVotil,J., Seydoux,G., Beach,D. and McLeod,M. (1991) Interaction between *ran1*⁺ protein kinase and cAMP dependent protein kinase as negative regulators of fission yeast meiosis. *The EMBO Journal*, **10**, 3759–3768.

Ding,D.-Q., Okamasa,K., Katou,Y., Oya,E., Nakayama,J., Chikashige,Y., Shirahige,K., Haraguchi,T. and Hiraoka,Y. (2019) Chromosome-associated RNA-protein complexes promote pairing of homologous chromosomes during meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Communications*, **10**, 5598.

Ding,D.-Q., Okamasa,K., Yamane,M., Tsutsumi,C., Haraguchi,T., Yamamoto,M. and Hiraoka,Y. (2012) Meiosis-specific noncoding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. *Science*, **336**, 732–736.

The FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT) (2014) A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*, **507**, 462–470.

Fauquenoy,S., Migeot,V., Finet,O., Yague-Sanz,C., Khorosjutina,O., Ekwall,K. and Hermand,D. (2018) Repression of cell differentiation by a *cis*-acting lincRNA in fission yeast. *Current Biology*, **28**, 383–391.

Frankish,A., Diekhans,M., Ferreira,A.-M., Johnson,R., Jungreis,I., Loveland,J., Mudge,J.M., Sisu,C., Wright,J., Armstrong,J. et al. (2019) GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic Acids Research*, **47**, D766–D773.

Gibson,D.G., Young,L., Chuang,R.-Y., Venter,J.C., Hutchison III,C.A. and Smith,H.O. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, **6**, 343–345.

Gil,N. and Ulitsky,I. (2020) Regulation of gene expression by *cis*-acting long non-coding RNAs. *Nature Reviews Genetics*, **21**, 102–117.

Gong,S., Wang,Y., Wang,Z. and Zhang,W. (2017) Computational methods for modeling aptamers and designing riboswitches. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, 2442.

Gotoh,Y., Nishida,E., Shimanuki,M., Toda,T., Imai,Y. and Yamamoto,M. (1993) *Schizosaccharomyces pombe* Spkl is a Tyrosine-Phosphorylated Protein Functionally Related to *Xenopus* Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular and Cellular Biology*, **13**, 6427–6434.

Groff,A.F., Barutcu,A.R., Lewandowski,J.P. and Rinn,J.L. (2018) Enhancers in the *Peril* lincRNA locus regulate distant but not local genes. *Genome Biology*, **19**, 219.

Gruber,A.R., Findeiß,S., Washietl,S., Hofacker,I.L. and Stadler,P.F. (2010) RNAz 2.0: improved noncoding RNA detection. *Pacific Symposium on Biocomputing*, **2010**, 69–79.

Gupta,D.R., Paul,K., Oowatari,Y., Matsuo,Y. and Kawamukai,M. (2011) Multistep

regulation of protein kinase A in its localization, phosphorylation and binding with a regulatory subunit in fission yeast. *Current Genetics*, **57**, 353–365.

Higuchi,T., Watanabe,Y. and Yamamoto,M. (2002) Protein Kinase A Regulates Sexual Development and Gluconeogenesis through Phosphorylation of the Zn Finger Transcriptional Activator Rst2p in Fission Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 1–11.

Hirose,T., Mishima,Y. and Tomari,Y. (2014) Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy. *EMBO Reports*, **15**, 489–507.

Hirota,K., Miyoshi,T., Kugou,K., Hoffman,C.S., Shibata,T. and Ohta,K. (2008) Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature*, **456**, 130–134.

Hughes,D.A., Yabana,N. and Yamamoto,M. (1994) Transcriptional regulation of a Ras nucleotide-exchange factor gene by extracellular signals in fission yeast. *Journal of Cell Science*, **107**, 3635–3642.

Iino,Y. and Yamamoto,M. (1985a) Mutants of *Schizosaccharomyces pombe* which sporulate in the haploid state. *Molecular and General and Genetics*, **198**, 416–421.

Iino,Y. and Yamamoto,M. (1985b) Negative control for the initiation of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **82**, 2447–2451.

Iyer,M.K., Niknafs,Y.S., Malik,R., Singhal,U., Sahu,A., Hosono,Y., Barrette,T.R., Prensner,J.R., Evans,J.R., Zhao,S. et al. (2015) The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature Genetics*, **47**, 199–208.

Jeong,H.T., Oowatari,Y., Abe,M., Tanaka,K., Matsuda,H. and Kawamukai,M. (2004a)

Interaction between a Negative Regulator (Msa2/Nrd1) and a Positive Regulator (Cpc2) of Sexual Differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **68**, 1621–1626.

Jeong,H.T., Ozoe,F., Tanaka,K., Nakagawa,T., Matsuda,H. and Kawamukai,M. (2004b) A Novel Gene, *msa1*, Inhibits Sexual Differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, **167**, 77–91.

Jiang,M., Anderson,J., Gillespie,J. and Mayne,M. (2008) uShuffle: A useful tool for shuffling biological sequences while preserving the k-let counts. *BMC Bioinformatics*, **9**, 192.

Kamada,Y. (2017) Novel tRNA function in amino acid sensing of yeast Tor complex1. *Genes to Cells*, **22**, 135–147.

Kanoh,J., Watanabe,Y., Ohsugi,M., Iino,Y. and Yamamoto,M. (1996) *Schizosaccharomyces pombe gad7⁺* encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes to Cells*, **1**, 391–408.

Katoh,K., Misawa,K., Kuma,K. and Miyata,T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, **30**, 3059–3066.

Kawaguchi,R. and Kiryu,H. (2016) Parallel computation of genome-scale RNA secondary structure to detect structural constraints on human genome. *BMC Bioinformatics*, **17**, 203.

Kawamukai,M., Ferguson,K., Wigler,M. and Young,D. (1991) Genetic and biochemical analysis of the adenylyl cyclase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Regulation*, **2**, 155–164.

- Kelly,M., Burke,J., Smith,M., Klar,A. and Beach,D. (1988) Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *The EMBO Journal*, **7**, 1537–1547.
- Kersey,P.J., Allen,J.E., Allot,A., Barba,M., Boddu,S., Bolt,B.J., Carvalho-Silva,D., Christensen,M., Davis,P., Grabmueller,C. et al. (2018) Ensembl genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Research*, **46**, D802–D808.
- Kim,L., Hoe,K.-L., Yu,Y.M., Yeon,J.-H. and Maeng,P.J. (2012) The Fission Yeast GATA Factor, Gaf1, Modulates Sexual Development via Direct Down-Regulation of *ste11*⁺ Expression in Response to Nitrogen Starvation. *PLoS One*, **7**, e42409.
- Kitamura,K., Katayama,S., Dhut,S., Sato,M., Watanabe,Y., Yamamoto,M. and Toda,T. (2001) Phosphorylation of Mei2 and Ste11 by Pat1 Kinase Inhibits Sexual Differentiation via Ubiquitin Proteolysis and 14-3-3 Protein in Fission Yeast. *Developmental Cell*, **1**, 389–399.
- Kjærulff,S., Lautrup-Larsen,I., Truelsen,S., Pedersen,M. and Nielsen,O. (2005) Constitutive Activation of the Fission Yeast Pheromone-Responsive Pathway Induces Ectopic Meiosis and Reveals Ste11 as a Mitogen-Activated Protein Kinase Target. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 2045–2059.
- Kopp,F. and Mendell,J.T. (2018) Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*, **172**, 393–407.
- Kunitomo,H., Higuchi,T., Iino,Y. and Yamamoto,M. (2000) A Zinc-Finger Protein, Rst2p, Regulates Transcription of the Fission Yeast *ste11*⁺ Gene, Which Encodes a Pivotal Transcription Factor for Sexual Development. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 3205–3217.

- Kunitomo,H., Sugimoto,A., Wilkinson,C.R. and Yamamoto,M. (1995) *Schizosaccharomyces pombe pac2⁺* controls the onset of sexual development via a pathway independent of the cAMP cascade. *Current Genetics*, **28**, 32–38.
- Laor,D., Cohen,A., Kupiec,M. and Weisman,R. (2015) TORC1 Regulates Developmental Responses to Nitrogen Stress via Regulation of the GATA Transcription Factor Gaf1. *mBio*, **6**, e00959–15.
- Larochelle,M., Robert,M.-A., Hébert,J.-N., Liu,X., Matteau,D., Rodrigue,S., Tian,B., Jacques,P.-É. and Bachand,F. (2018) Common mechanism of transcription termination at coding and noncoding RNA genes in fission yeast. *Nature Communications*, **9**, 4364.
- Li,S. and Breaker,R.R. (2017) Identification of 15 candidate structured noncoding RNA motifs in fungi by comparative genomics. *BMC Genomics*, **18**, 785.
- Li,P. and McLeod,M. (1996) Molecular Mimicry in Development: Identification of *ste11⁺* As a Substrate and *mei3⁺* As a Pseudosubstrate Inhibitor of *ran1⁺* Kinase. *Cell*, **87**, 869–880.
- Liu,S.J., Horlbeck,M.A., Cho,S.W., Birk,H.S., Malatesta,M., He,D., Attenello,F.J., Villalta,J.E., Cho,M.Y., Chen,Y. et al. (2017) CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells. *Science*, **355**, eaah7111.
- Ma,Y., Ma,N., Liu,Q., Qi,Y, Manabe,R. and Furuyashiki,T. (2015) Tor Signaling Regulates Transcription of Amino Acid Permeases through a GATA Transcription Factor Gaf1 in Fission Yeast. *PLoS One*, **10**, e0144677.
- Maeda,T., Watanabe,Y., Kunitomo,H. and Yamamoto,M. (1994) Cloning of the *pkal* Gene Encoding the Catalytic Subunit of the CAMP-dependent Protein Kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 9632–9637.

- Mata,J., Lyne,R., Burns,G. and Bähler,J. (2002) The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nature Genetics*, **32**, 143–147.
- Materne,P., Anandhakumar,J., Migeot,V., Soriano,I., Yague-Sanz,C., Hidalgo,E., Mignon,C., Quintales,L., Antequera,F. and Hermand,D. (2015) Promoter nucleosome dynamics regulated by signalling through the CTD code. *Elife*, **4**, e09008.
- Matia-Gonzalez,A.M., Sotelo,J. and Rodriguez-Gabriel,M.A. (2012) The RNA Binding Protein Csx1 Promotes Sexual Differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One*, **7**, e30067.
- Matsuo,T., Otsubo,Y., Urano,J., Tamanoi,F. and Yamamoto,M. (2007) Loss of the TOR Kinase Tor2 Mimics Nitrogen Starvation and Activates the Sexual Development Pathway in Fission Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 3154–3164.
- Matsuyama,A., Arai,R., Yashiroda,Y., Shirai,A., Kamata,A., Sekido,S., Kobayashi,Y., Hashimoto,A., Hamamoto,M., Hiraoka,Y., Horinouchi,S. and Yoshida,M. (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Biotechnology*, **24**, 841–847.
- Matsuyama,A., Yabana,N., Watanabe,Y. and Yamamoto,M. (2000) *Schizosaccharomyces pombe* Ste7p is required for both promotion and withholding of the entry to meiosis. *Genetics*, **155**, 539–549.
- McCutcheon,J.P. and Eddy,S.R. (2003) Computational identification of non-coding RNAs in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative genomics. *Nucleic Acids Research*, **31**, 4119–4128.
- McLeod,M. and Beach,D. (1988) A specific inhibitor of the *ran1*⁺ protein kinase regulates entry into meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, **332**, 509–514.

McLeod,M., Shor,B., Caporaso,A., Wang,W., Chen,H. and Hu,L. (2000) Cpc2, a Fission Yeast Homologue of Mammalian RACK1 Protein, Interacts with Ran1 (Pat1) Kinase To Regulate Cell Cycle Progression and Meiotic Development. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 4016–4027.

McLeod,M., Stein,M. and Beach,D. (1987) The product of the *mei3⁺* gene, expressed under control of the mating-type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. *The EMBO Journal*, **6**, 729–736.

Mochizuki,N. and Yamamoto,M. (1992) Reduction in the intracellular cAMP level triggers initiation of sexual development in fission yeast. *Molecular and General Genetics*, **233**, 17–24.

Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology*, **194**, 795–823.

Motorin,Y. and Helm,M. (2010) tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry*, **49**, 4934–4944.

Nakayama,H. and Shimamoto,N. (2014) Modern and simple construction of plasmid: saving time and cost. *Journal of Microbiology*, **52**, 891–897.

Nurse,P. (1985) Mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* which alter the shift between cell proliferation and sporulation. *Molecular and Genetral Genetics*, **198**, 497–502.

Oda,A., Takemata,N., Hirata,Y., Miyoshi,T., Suzuki,Y., Sugano,S. and Ohta,K. (2015) Dynamic transition of transcription and chromatin landscape during fission yeast adaptation to glucose starvation. *Genes to Cells*, **20**, 392–407.

Okazaki,N., Okazaki,K., Watanabe,Y., Kato-Hayashi,M., Yamamoto,M. and Okayama,H.

(1998) Novel Factor Highly Conserved among Eukaryotes Controls Sexual Development in Fission Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 887–895.

Oowatari,Y., Jeong,H., Tanae,K., Nakagawa,T. and Kawamukai,M. (2011) Regulation and role of an RNA-binding protein Msa2 in controlling the sexual differentiation of fission yeast. *Current Genetics*, **57**, 191–200

Otsubo,Y., Nakashima,A., Yamamoto,M. and Yamashita,A. (2017) TORC1-Dependent Phosphorylation Targets in Fission Yeast. *Biomolecules*, **7**, 50.

Otsubo,Y., Matsuo,T., Nishimura,A., Yamamoto,M. and Yamashita,A. (2018) tRNA production links nutrient conditions to the onset of sexual differentiation through the TORC1 pathway. *EMBO Reports*, **19**, e44867.

Ozoe,F., Kurokawa,R., Kobayashi,Y., Jeong,H.T., Tanaka,K., Sen,K., Nakagawa,T., Matsuda,H. and Kawamukai,M. (2002) The 14-3-3 Proteins Rad24 and Rad25 Negatively Regulate Byr2 by Affecting Its Localization in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 7105–7119.

Peciña,A., Smith,K.N., Mézard,C., Murakami,H., Ohta,K. and Nicolas,A. (2002) Targeted stimulation of meiotic recombination. *Cell*, **111**, 173–184.

Qin,J., Kang,W., Leung,B. and McLeod,M. (2003) Ste11p, a High-Mobility-Group Box DNA-Binding Protein, Undergoes Pheromone- and Nutrient-Regulated Nuclear-Cytoplasmic Shuttling. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 3253–3264.

Rhind,N., Chen,Z., Yassour,M., Thompson,D.A., Haas,B.J., Habib,N., Wapinski,I., Roy,S., Lin,M.F., Heiman,D.I. et al. (2011) Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science*, **332**, 930–936.

Rinn,J.L., Kertesz,M., Wang,J.K., Squazzo,S.L., Xu,X., Bruggmann,S.A., Goodnough,L.H.,

Helms,J.A., Farnham,P.J., Segal,E. et al. (2007) Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, **129**, 1311–1323.

Rodríguez-Gabriel,M.A., Burns,G., McDonald,W.H., Martín,V., Yates III,J.R., Bähler,J. and Russell,P. (2003) RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *The EMBO Journal*, **22**, 6256–6266.

Rodriguez-Lopez,M., Anver,S., Cotobal,C., Kamrad,S., Malecki,M., Correia-Melo,C., Hoti,M., Townsend,S., Marguerat,S., Pong,S.K. et al. (2022) Functional profiling of long intergenic non-coding RNAs in fission yeast. *Elife*, **11**, e76000.

Shah,S., Wittmann,S., Kilchert,C. and Vasiljeva,L. (2014) lncRNA recruits RNAi and the exosome to dynamically regulate *pho1* expression in response to phosphate levels in fission yeast. *Genes and Development*, **28**, 231–244.

Shor,B., Calaycay,J., Rushbrook,J. and McLeod,M. (2003) Cpc2/RACK1 is a ribosome-associated protein that promotes efficient translation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 49119–49128.

Shiozaki,K. and Russell,P. (1996) Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcriptional factor in fission yeast. *Genes and Development*, **10**, 2276–2288.

Smith,M.A., Seemann,S.E., Quek,X.C. and Mattick,J.S. (2017) DotAligner: identification and clustering of RNA structure motifs. *Genome Biology*, **18**, 244.

Steigele,S., Huber,W., Stocsits,C., Stadler,P.F. and Nieselt,K. (2007) Comparative analysis of structured RNAs in *S.cerevisiae* indicates a multitude of different functions. *BMC Biology*, **5**, 25.

Sugimoto,A., Iino,Y., Maeda,T., Watanabe,Y. and Yamamoto,M. (1991)

Schizosaccharomyces pombe ste11+ encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes and Development*, **5**, 1990–1999.

Sukegawa, Y., Yamashita, A. and Yamamoto, M. (2011) The Fission Yeast Stress-Responsive MAPK Pathway Promotes Meiosis via the Phosphorylation of Pol II CTD in Response to Environmental and Feedback Cues. *PLoS Genetics*, **7**, e1002387.

Tange, Y., Kurabayashi, A., Goto, B., Hoe, K.-L., Kim, D.-U., Park, H.-O., Hayles, J., Chikashige, Y., Tsutumi, C., Hiraoka, Y., Yamao, F., Nurse, P. and Niwa, O. (2012) The CCR4-NOT Complex Is Implicated in the Viability of Aneuploid Yeasts. *PLoS Genetics*, **8**, e1002776.

Touat-Todeschini, L., Shichino, Y., Dangin, M., Thierry-Mieg, N., Gilquin, B., Hiriart, E., Sachidanandam, R., Lambert, E., Brettschneider, J., Reuter, M. et al. (2017) Selective termination of lncRNA transcription promotes heterochromatin silencing and cell differentiation. *The EMBO Journal*, **36**, 2626–2641.

Tsukahara, K., Yamamoto, H. and Okayama, H. (1998) An RNA Binding Protein Negatively Controlling Differentiation in Fission Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 4488–4498.

Ueno, M., Kurokawa, R., Renauld, H., Watanabe, K., Ushimaru, T., Uritani, M., Yoshinaga, K. and Hiraoka, Y. (2001) *Schizosaccharomyces pombe taf1+* is required for nitrogen starvation-induced sexual development and for entering the dormant G0 state. *Current Genetics*, **38**, 307–313.

Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C.H., Sive, H. and Bartel, D.P. (2011) Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell*, **147**, 1537–1550.

Uritani, M., Hidaka, H., Hotta, Y., Ueno, M., Ushimaru, T. and Toda, T. (2006) Fission yeast

Tor2 links nitrogen signals to cell proliferation and acts downstream of the Rheb GTPase. *Genes to Cell*, **11**, 1367–1379.

Valbuena,N. and Moreno,S. (2010) TOR and PKA Pathways Synergize at the Level of the Ste11 Transcription Factor to Prevent Mating and Meiosis in Fission Yeast. *PLoS One*, **5**, e11514.

Valbuena,N. and Moreno,S. (2011) AMPK phosphorylation by Ssp1 is required for proper sexual differentiation in fission yeast. *Journal of Cell Science*, **125**, 2655–2664.

Wang,X., Arai,S., Song,X., Reichart,D., Du,K., Pascual,G., Tempst,P., Rosenfeld,M.G., Glass,C.K. and Kurokawa,R. (2008) Induced ncRNAs allosterically modify RNA binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature*, **454**, 126–130.

Washietl,S., Hofacker,I.L. and Stadler,P.F. (2005) Fast and reliable prediction of noncoding RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **102**, 2454–2459.

Watanabe,Y., Shinozaki-Yabana,S., Chikashige,Y., Hiraoka,Y. and Yamamoto,M. (1997) Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast. *Nature*, **386**, 187–190.

Watanabe,Y. and Yamamoto,M. (1994) *S. pombe mei2⁺* encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell*, **78**, 487–498.

Watanabe,Y. and Yamamoto,M. (1996) *Schizosaccharomyces pombe pcr1⁺* Encodes a CREB/ATF Protein Involved in Regulation of Gene Expression for Sexual Development. *Molecular and Cellular Biology*, **16**, 704–711.

Weinberg,Z., Lünse,C.E., Corbino,K.A., Ames,T.D., Nelson,J.W., Roth,A., Perkins,K.R.,

- Sherlock,M.E. and Breaker,R.R. (2017) Detection of 224 candidate structured RNAs by comparative analysis of specific subsets of intergenic regions. *Nucleic Acids Research*, **45**, 10811–10823.
- Weinberg,Z., Wang,J.X., Bogue,J., Yang,J., Corbino,K., Moy,R.H. and Breaker,R.R. (2010) Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genome Biology*, **11**, R31.
- Weisman,R., Roitburg,I., Schonbrun,M., Harari,R. and Kupiec,M. (2007) Opposite Effects of Tor1 and Tor2 on Nitrogen Starvation Responses in Fission Yeast. *Genetics*, **175**, 1153–1162.
- Wilkinson,M.G., Samuels,M., Takeda,T., Toone,W.M., Shieh,J.-C., Toda,T., Millar,J.B. and Jones,N. (1996) The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes and Development*, **10**, 2289–2301.
- Xue-Franzén,Y., Kjærulff,S., Holmberg,C., Wright,A. and Nielsen,O. (2006) Genomewide identification of pheromone-targeted transcription in fission yeast. *BMC Genomics*, **7**, 303.
- Yamashita,A., Shichino,Y. and Yamamoto,M. (2016) The long non-coding RNA world in yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1859**, 147–154.
- Yang,L., Duff,M.O., Graveley,B.R., Carmichael,G.G. and Chen,L.-L. (2011) Genomewide characterization of non-polyadenylated RNAs. *Genome Biology*, **12**, R16.
- Zhang,P., Wu,W., Chen,Q. and Chen,M. (2019) Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *Journal of Integrative Bioinformatics*, **16**, 20190027.
- Zhao,J., Sun,B.K., Erwin,J.A., Song,J.-J. and Lee,J.T. (2008) Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*, **322**, 750–756.

Zubradt,M., Gupta,P., Persad,S., Lambowitz,A.M., Weissman,J.S. and Rouskin,S. (2017)
DMS-MaPseq for genome-wide or targeted RNA structure probing in vivo. *Nature
Methods*, **14**, 75–82.

謝辞

佐藤政充教授、戸谷美夏准教授には、学部4年から6年間という長きに渡りご指導賜りました。角井康貢講師には、博士1年からの3年間、ご指導賜りました。深く感謝申し上げます。また、本研究の基盤となったスクリーニングは、佐藤研究室の卒業生である片山研太氏、大沼友樹氏、露崎隼博士、そして共同研究者である浜田道昭教授によって行われたものです。このスクリーニングがなければ、本研究を行うことができませんでした。感謝に堪えません。加えて、本研究のインフォマティクス部分は、浜田研究室の久保顕登氏が行ってくださいました。深く感謝申し上げます。

合田亘人教授、常田聡教授、浜田道昭教授には、本博士論文の副査を引き受けていただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

佐藤研究室の皆様方には、活発な議論など、研究生を送る上でさまざまな刺激をいただきました。感謝申し上げます。

最後に、研究生生活をさまざまな面で支援してくださった、家族、友人に心からの感謝を申し上げます。

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