

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	田中 直子
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2016年（平成28年）3月19日
学位授与の要件	本学学位規程第18条第1項該当者（学位規則第4条第1項）
学位論文の題名	出芽酵母のコレギュレーター複合体 Cyc8p-Tup1p による転写制御機構に関する研究
審査委員 主査	教授 蔡 晃植
副査	教授 伊藤 正恵
副査	教授 山本 博章

論文内容要旨

生命活動の維持に遺伝子発現調節は欠かせないものであり、この調節段階の中で最初に起こる転写開始レベルの制御は特に重要である。真核生物では、DNA 結合活性をもつアクチベーターあるいはリプレッサータンパク質がプロモーター配列に結合し、そこへ転写を実質的に調節する働きもつ DNA 非結合性のコアクチベーターあるいはコリプレッサータンパク質が引き込まれることにより遺伝子の転写が制御される。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Cyc8p と Tup1p タンパク質は、それぞれ1分子と4分子で複合体を形成し、コリプレッサーとして機能することがよく調べられている。Cyc8p-Tup1p 複合体は、転写装置と相互作用してその機能を阻害することと、低アセチル化状態のヒストンと相互作用してヘテロクロマチン構造を形成することにより標的遺伝子の転写を抑制する。最近、この複合体がコアクチベーターとしても働くことが報告され、コリプレッサーおよびコアクチベーターのどちらとしても機能する「コレギュレーター」であることが示された。本研究では、真核生物におけるコレギュレーターのモデルとして、出芽酵母 Cyc8p-Tup1p 複合体による転写制御機構を理解することを目指した。

Tup1p (713 アミノ酸) は、自己4量体形成および Cyc8p との結合に必要な N 末端領域 (1-72 アミノ酸位)、ヒストンとの結合に必要な中央領域 (73-328 アミノ酸位)、リ

プレッシャーとの会合に必要な C 末端領域 (329-713 アミノ酸位) の 3 つの機能領域をもつ。先行研究から、Tup1p の N 末端 1-92 アミノ酸領域が 4-ヘリックスバンドル構造をとることを明らかにした。この X 線結晶構造を基に様々な Tup1p 変異体を作製し、Tup1p による転写抑制に重要なアミノ酸の同定を試みた。Tup1p と Cyc8p が静電相互作用により複合体を形成すると考え、Tup1p の 4 量体表面に広がる負電荷領域が縮小するようなアミノ酸置換を導入したが、その Tup1p 変異体の転写抑制能は失われなかった。Tup1p の 74 アミノ酸位から 3 つ連続したグルタミン酸をすべてアラニンまたはアスパラギン酸に置換すると、その転写抑制能は失われた。Tup1p にランダム変異を導入して転写抑制能を欠損する変異体をスクリーニングすると、その多くは 4 量体の内側に位置する非極性アミノ酸が置換されていた。従って、Tup1p の N 末端領域に位置する 3 連続グルタミン酸と 4 量体の内側に位置する非極性アミノ酸が Tup1p による転写抑制に重要であると結論した。これらのアミノ酸側鎖の向きや性質から、3 連続グルタミン酸はヒストンと結合する可能性が考えられ、非極性アミノ酸は 4 量体構造を安定化する役割をもつと推察した。

Tup1p の N 末端 4-ヘリックスバンドル領域が決められたので、これと C 末端 WD リピート領域の間にあり、安定な立体構造をとらないとされる 93-281 アミノ酸位の領域を新しく Tup1p 中央領域と定義した。Tup1p の 73-385 アミノ酸位がヒストンと結合するので、この中央領域が転写抑制に重要であるかどうかを検討した。この中央領域を欠失させた *tup1* 変異株は *TUP1* 遺伝子破壊株と同じ変異形質を示すと考えたが、意外にも野生型株と同程度の接合能を有していた。この中央領域欠失変異株において、Tup1p により転写が抑制される遺伝子の中で、*SUC2* (グルコース抑制) 遺伝子の転写は抑制されていなかったが、*ANB1* (酸素抑制) と *STE2* (接合型制御) 遺伝子の転写は野生型と同じように抑制されていた。そこで、*ANB1* や *STE2* のように Tup1p による転写抑制に中央領域を必要としない遺伝子を知るために、出芽酵母全遺伝子に対して DNA マイクロアレイ解析を行った。中央領域欠失変異株では、グルコース抑制遺伝子群の転写は抑制されていなかったが、酸素抑制遺伝子群や接合型制御遺伝子群の転写は抑制されていた。以上より、Tup1p 転写抑制における中央領域の必要性は Tup1p を標的遺伝子プロモーターヘリクルートする制御系特異的なリプレッサーに依存すると結論した。クロマチン免疫沈降実験から、Tup1p は中央領域を欠失させても *STE2* と *SUC2* 遺伝子プロモーターへ結合していることを確認した。これらの結果から、Tup1p による転写抑制メカニズムとして、中央領域以外でのヒストンとの結合を介して転写抑制する可能性、あるいはヒストンとの結合を介さずに転写抑制する可能性を考察した。

CYC8 と *TUP1* 遺伝子はどちらかを破壊しても同じ多面表現型を示すが、*TUP1* 遺伝子

破壊株が野生型株と同じように増殖するのに対して *CYC8* 遺伝子破壊株は極めて増殖が遅かった。この *CYC8* 欠失変異の増殖遅延を多コピーで抑圧する遺伝子としてトリプトファン取り込み酵素遺伝子 *TAT1* と *TAT2* を分離した。これら *TAT* 遺伝子の転写量は *CYC8* と *TUP1* 遺伝子破壊株の両方で減少していた。従って、Cyc8p と Tup1p の両方が *TAT* 遺伝子の転写を活性化すると結論した。*TAT* 遺伝子は、他のアミノ酸トランスポーター遺伝子と同様に、Stp1p と Stp2p アクチベーターにより制御され、Cyc8p と Tup1p は *TAT* 遺伝子以外のアミノ酸トランスポーター遺伝子の転写にも必要であった。クロマチン免疫沈降実験から、野生型株でみられた *TAT* 遺伝子プロモーター領域への Tup1p の結合が *stp1 stp2* 二重遺伝子破壊により損なわれることを明らかにした。以上より、Cyc8p-Tup1p 複合体は Stp1p/Stp2p を介して *TAT* 遺伝子のプロモーターに結合し、その転写を活性化するコアクチベーターであると結論した。

本研究では、Tup1p の立体構造情報を利用することにより、Tup1p の転写制御に関する重要な分子機能を明らかにすることができた。また、Cyc8p-Tup1p コレギュレーターによる転写制御様式は同じアクチベーターやリプレッサーによって制御される標的遺伝子に対しても一概ではなく、Cyc8p-Tup1p 複合体は個々の遺伝子プロモーターごとに多様な制御パターンを生み出すことが理解できた。出芽酵母 Cyc8p と Tup1p に関する本研究成果は、高等真核生物のコレギュレーターによる転写制御メカニズムを理解するための有用な知見となり得る。

論文審査結果要旨

本論文ではまず、出芽酵母Tup1pのN末端領域における4-ヘリックスバンドル構造を基に様々なTup1p変異体を作製したところ、Tup1pのN末端領域に存在する3連続グルタミン酸と4量体の内側に位置する非極性アミノ酸がTup1pによる転写抑制に重要であることを示した。次に、ヒストンと結合するTup1p中央領域における転写抑制機能を調べるため、この部位を欠失した変異株を作製したところ、Tup1p遺伝子破壊株とは異なる変異形質を示すことを示した。そこで、この中央領域によって転写抑制されている遺伝子を調べたところ、中央領域欠失変異株ではグルコース抑制遺伝子群の転写は抑制されていなかったが、酸素抑制遺伝子群や接合型制御遺伝子群の転写は抑制されていた。このことから、転写抑制におけるTup1p中央領域の必要性はTup1pを標的遺伝子プロモーターヘリクルートする制御系特異的なリプレッサーに依存すると結論した。さらに、クロマチン免疫沈降法等を用いた実験を行い、Cyc8p-Tup1p複合体がStp1p/Stp2pを介して*TAT* 遺伝子のプロモーターに結合し、その転写を活性化するコアクチベーターであることを初めて示した。本研究は、出芽酵母Tup1p-Cyc8p複合体について、その立体構造に基づく詳細な分子機能、標的遺伝子プロモーターに依存した転写様式の多様性、および新しいコアクチベーターとしての機能を明らかにしたものであり、その研究結果は大いに評価できる。研究は膨大な実験データに裏打ちされた論理性が高いものであり、本論文の研究結果は完成度が高い。論文審査におけるプレゼンテーションも良く、口頭試問においてもこの分野における高い知識を有していることが確認された。さらに、英語論文としては筆頭著者で1報、共著者で1報、また学会でも複数回の発表を行っている。この様なことから、審査員は全員一致で、本論文が長浜バイオ大学の博士（バイオサイエンス）の学位論文として相応しいものと結論づけた。