

論文の要旨

氏名 余斐斐

論文題目 Studies on the new functions of RSC chromatin-remodeling complex
in environmental response in budding yeast

(環境応答における出芽酵母の染色体構造変換因子 RSC の新たな役割)

出芽酵母の生育に必須な ATP 依存性クロマチンリモデリング因子 RSC は ATPase である Nps1 をサブユニットとして持ち、Rsc1 または Rsc2 を含む 2 種類の複合体として存在している。先行研究によって、RSC は転写制御、DNA 複製、修復、組み換え、染色体分配などに寄与していると考えられる。しかし、RSC の詳しい作用機構及び生理的意義について不明な点が多い。そこで本研究室では RSC と協調的に作用する因子を遺伝学的に探索し、両者の関係について解析したところ、RSC がミトコンドリア機能及びオートファジー制御に働く遺伝子群と機能的に関連し、これらの制御に必要な可能性が示唆された。両制御は細胞が環境変化に応答して生育する上で極めて重要である。そこで、本研究では三章にわたって、ミトコンドリア機能やオートファジー制御における RSC の機能について調べ、これまで未解明な点が多い環境応答における染色体構造変換因子の新たな役割について明らかにすることを目的とした。

第1章 ミトコンドリア機能における RSC の役割 (公表論文 1)

まず、RSC の変異によってミトコンドリア機能に異常が起こるかを調べたところ、*rsc* 変異株ではミトコンドリアの形態異常やミトコンドリア DNA の欠失に伴うプチコロニーの形成といった異常が観察された。さらに、ミトコンドリアの呼吸能が必要とされる非発酵性炭素源培地(YPEG)において *rsc* 変異株の生育が顕著に低下した。そこで、生育低下の原因をさらに解明するために、YPEG 条件下における野生株と *rsc* 変異株の遺伝子の転写をマイクロアレイ解析によって網羅的に比較した。その結果、*rsc* 変異株では、ミトコンドリア機能に必要な遺伝子群の転写量が野生株より低下していることがわかった。これらの遺伝子群の中には、ミトコンドリア呼吸能の促進に寄与する転写因子 HAP 複合体の標的遺伝子が多く含まれていた。

そこで、RSC が HAP 複合体と機能的に関連するかを調べた結果、(1)共免疫沈降実験において Nps1 が HAP 複合体の中心因子である Hap4 と結合すること、(2)Hap4 の高発現によって *rsc* 変異による YPEG 条件下の生育低下が部分的に抑圧されることが分かった。以上のことから、呼吸条件下における RSC の機能の一部は HAP 複合体とともにミトコンドリア機能に重要な因子の転写を促進することであることがわかった。また、この機能には Rsc1 または Rsc2 を含む 2 種類の複合体が重複して働いていることがわかった。

第2章 オートファジーにおける RSC の役割 (公表論文 2)

細胞の恒常性を維持するために必要なタンパク質分解系であるオートファジーは、タンパク質をリサイクルさせることで窒素源飢餓時の細胞に必須なアミノ酸を提供する役割がある。また、これ以外に、異常または過剰タンパク質や不要となった細胞小器官(ミトコンドリア)などを除去する重要な役割も果たしている。

rsc 変異株におけるオートファジーの活性を調べたところ、*rsc1* 変異株および *nps1-13* 変異株では野生株に比べてオートファジー活性が顕著に低下していることがわかった。しかし、*rsc2* 変異株ではこのような低下が観察されず、*rsc1* 変異株に *Rsc2* を高発現させても、*rsc1* 変異によるオートファジー活性の低下は抑圧されなかった。これらの結果から、*Rsc1* を構成因子に含む RSC 複合体(*Rsc1*-RSC) が特異的にオートファジーに機能することが分かった。

さらに、オートファジー活性の低下原因を調べたところ、*rsc1* 変異株ではオートファゴソームの形成に必要な *Atg8* の発現量が野生株に比べて極めて低下することが分かった。そこで、窒素源飢餓時に転写誘導される *ATG8* の mRNA 量を測定した結果、*rsc1* 変異株ではこの転写量が野生株より有意に減少した。そして、RSC は *ATG8* のプロモーター領域に結合することをクロマチン免疫沈降により確認できた。しかしながら、*rsc1* 変異株における *Atg8* タンパク質の発現量が野生型株の 10%以下となるのに対して *ATG8* の mRNA 量が 7割にしか減少しなかったことから、*Rsc1* が *ATG8* の転写制御以外に、他の経路にも機能する可能性が高いと考えられた。そこで、*Atg8* タンパク質の安定性を調べた結果、*rsc1* 変異株では *Atg8* の安定性が著しく低下することを見出した。

窒素源飢餓時にオートファジーが誘導されるためには、TOR シグナル経路が不活性化される必要がある。そこで次に、*Rsc1*-RSC によるオートファジーの制御が TOR 経路と関連するかについて調べた。結果として、(1)TOR 経路で働く *Tor1* キナーゼの欠損によって、*rsc1* 変異によるオートファジー活性の低下と *Atg8* タンパク質量の低下が抑圧されること、(2)オートファジーの開始に必要で TOR が不活性化されることによって起こる *Atg13* の脱リン酸化が *rsc1* 変異によって遅延し、この遅延が *tor1* 欠損によって抑圧されることが分かった。しかし、*rsc1* 変異株の *ATG8* の転写量低下は *tor1* 欠損では抑圧されなかった。以上の結果より、窒素源飢餓時に RSC は TOR 経路非依存的に *ATG8* の転写活性化に寄与し、また同時に TOR 経路の不活性化に働いて *Atg8* の安定性を保持する機能を果たしていることが分かった。

TOR 活性は *Rho1* GTPase が *Tor* 複合体の構成因子である *Kog1* と結合することにより抑制されることが知られている。また先行研究により RSC と *Rho1* GTPase のシグナル経路が深いかわりを持つことが明らかにされていた。そこで、RSC が *Rho1* GTPase を介して TOR の不活性化に働くのかを明らかにするため、*Rho1*-*Kog1* の結合量を野生株と *rsc1* 変異株で比較したところ、変異株ではその結合量が低下していた。以上の結果から、RSC は *Rho1* を介して TOR の不活性化に働き *Atg8* の安定化に寄与していると考えられた。

第3章 マイトファジーにおける RSC の役割 (投稿準備中)

第 1 章で報告した *rsc* 変異株における呼吸能低下以外のミトコンドリア異常の

原因をさらに調べるために、ミトコンドリアの品質管理に働き、異常または過剰なミトコンドリアを選択的に除去する機構であるマイトファジーに着目した。まず、マイトファジーの誘導条件において、ミトコンドリアの外膜タンパク質 Por1 の分解を指標にしてマイトファジーの進行を調べたところ、窒素源飢餓時のオートファジー活性を欠く *rsc1* 変異株に加え、この活性を正常にもつ *rsc2* 変異株でも Por1 の分解が抑制されて、マイトファジーに異常があることが分かった。

マイトファジーの異常原因をさらに調べた。マイトファジーはオートファジーの分解系を利用し、ミトコンドリアを選択的に分解し、その活性はオートファジーの活性に依存的である。そこで、まずマイトファジー誘導条件下でのオートファジーの活性を調べた。その結果、第 2 章の報告に一致して、*rsc1* 変異株ではオートファジーと Atg8 の発現が抑制された。ゆえに、*rsc1* 変異株でのマイトファジーの異常原因はオートファジーの異常によるものだと考えられた。一方、*rsc2* 変異株ではオートファジーが正常に起こったことから、マイトファジーに特異的な経路や因子に異常があることが示唆された。そこで、マイトファジーに特異的な因子である *ATG32* の mRNA 量を測定した。その結果、*rsc2* 変異株では野生株より *ATG32* の転写量が抑制されていた。また RSC は *ATG32* のプロモーター領域の TATA box 近傍に結合することを確認できた。以上のことから、RSC は *ATG32* の転写活性化を介してマイトファジーの誘導にも重要であることが分かった。

以上に述べた三つの章の研究により、RSC はミトコンドリア機能及びオートファジー、マイトファジーに重要な役割を果たすことがわかった。ATP 依存性クロマチンリモデリング因子のミトコンドリアおよびオートファジーにおける働きを明らかにした研究は、本研究が初めてである。これらの制御は密接に関連しており、オートファジー、マイトファジーの異常によって生じた異常なミトコンドリアの蓄積が *rsc* 変異株におけるミトコンドリアの機能不全を誘発した可能性も考えられる。

RSC のヒトホモログはがん抑制因子として働くことが知られているが、この抑制機構については不明な点が多い。また、ミトコンドリア機能及びオートファジー、マイトファジーの制御機構もヒトまで高度的に保存されており、これらの破綻はがんやパーキンソン病のような神経変性疾患などの発症と進展に深く関わる。このことから、本研究で得られた新たな知見はこれらの病気の予防と治療に役立つことが期待される。