

様式第 1 号

論文内容要旨

The function of Spt3, a subunit of the SAGA complex, in *PGK1* transcription is restored only partially when reintroduced by plasmid into *taf1 spt3* double mutant strains

学位申請者氏名：岩見 亮
研究指導教員：古久保 哲朗

真核生物におけるクラス II 遺伝子の転写は、コアプロモーター領域に基本転写因子群 (TFIIA, B, D, E, F, H)、ならびにメディエーターと RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が集合し、転写開始前複合体 (PIC) を形成後に特定の部位から開始することが知られている。出芽酵母の場合、TATA ボックスと TATA 様配列 (TATA ボックスと比較し、1 or 2 bp のミスマッチを有する) のいずれかを含む 2 種類のコアプロモーターが存在する。基本転写因子 TFIID は、TBP (TATA-binding protein) と 14 種類の Tafs (TBP-associated factors) から構成される巨大なタンパク質複合体であり、PIC 形成初期に TATA ボックスもしくは TATA 様配列に結合し、その他の基本転写因子群と Pol II をコアプロモーター上にリクルートする役割を有する。TFIID サブユニットの一つである Taf1 の N 末端ドメイン (TAND) は、TBP の TATA ボックスもしくは TATA 様配列への結合において重要な役割を果たすと考えられているが、その詳細な仕組みについては未だ明らかにされていない。

TFIID の類縁複合体である SAGA (Spt-Ada-Gnc5-acetyltransferase) は 19 種類のサブユニットから構成され、5 種類のサブユニット (TAF モジュールの構成成分) を TFIID と共有し、Spt3, Spt8 等から成る TBP モジュールの働きにより、TFIID と同様、TBP の活性制御を行うとされている。従来、SAGA はストレス誘導性遺伝子プロモーター (TATA ボックス含有型であることが多い) からの転写を、TFIID はハウスキーピング遺伝子プロモーター (TATA 様配列含有型であることが多い) からの転写を制御すると考えられてきたが(1)、近年、両者はほぼ全てのクラス II 遺伝子の転写に関与することが明らかとなった(2, 3, 4)。実際、当研究室においても、SAGA が TATA 様配列含有型プロモーターからの転写を媒介できることが示されている(5)。一方、いくつかの TATA 様配列含有型プロモーターにおいて、TATA ボックスの挿入が TFIID 依存性の消失もしくは低下に繋がることの報告があることから、TFIID を介した転写の仕組みは TATA ボックスの有無により異なると考えられている(6, 7, 8)。しかしながら、SAGA が TATA ボックスの有無に応じて異なる仕組みで転写するのかについてはまだよく分かっていない。本研究では *PGK1* プロモーターをモデルとし、TFIID と同様、SAGA は TATA ボックス含有型プロモーターからの転写と TATA 様配列含有型プロモーターからの転写を異なるメカニズムで媒介することを示した。また SAGA サブユニットの一つである Spt3 には、少なくとも二種類の機能 (TATA ボックスに依存して転写を促進する機能と *PGK1* プロモーターに対して TFIID 非依存性を付与する機能) が存在することを示した。

実験方法

ノザンプロットによる内在性 *PGK1* mRNA とレポーター遺伝子である *VTC1* mRNA の検出

本研究では 25°C から 37°C へ温度シフト後に TFIID 変異が *PGK1* 転写に与える影響を詳しく調べた。TFIID サブユニットの一つをコードする *TAF1* は必須遺伝子であるため、温度感受性変異体である *taf1-Δ TAND* または *taf1-N568Δ* を有する株を使用した。また *PGK1* プロモーター中の TATA ボックスの重要性については *VTC1* レポーターシステムを用いて解析を行った (図 1)。合成液体培地 (SC 培地) 中において前培養後 (25°C)、37°C にシフトし、15, 30, 45, 60, 90, 120 分後に酵母細胞を回収した。回収した酵母細胞から total RNA (10-20 ug) を抽出後、ホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動を行い、ナイロンメンブレンにトランスファーした。ランダムプライミング法により ³²P 標識した DNA プロブを含むハイブリダイゼーションバッファーにナイロンメンブレンを浸し、終夜インキュベートした。メンブレンは洗浄後、イメージングプレート(富士フィルム)に適切な時間露光し、Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare)によりバンドの検出を行った。バンドの定量は ImageQuant TL software version 8.1 (GE Healthcare)を用いて行った。

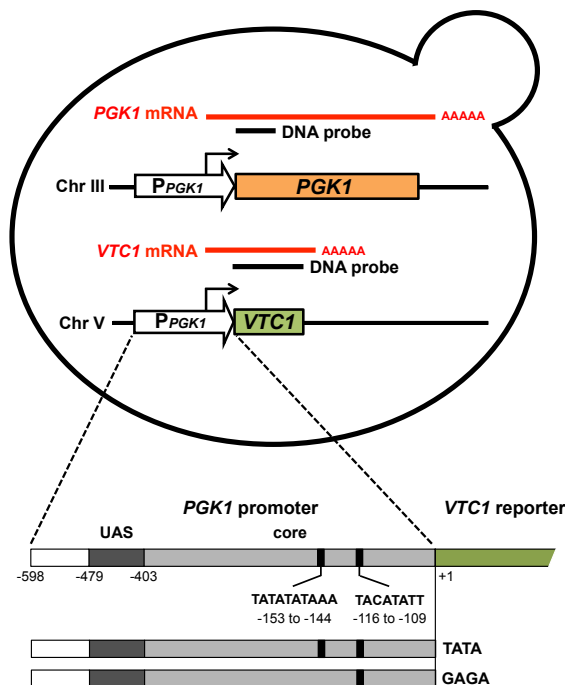


図 1. *VTC1* レポーターシステムの概要

本研究では内在性の *VTC1* プロモーターを *PGK1* プロモーターに置換した酵母株を使用した。プロモーター活性は ³²P 標識した *PGK1* もしくは *VTC1* DNA プロブを用いてノザンプロット法により測定した。

プライマー伸長法

プライマー伸長法を用いて、野生型 TATA ボックスもしくは変異型 TATA ボックス (TATA 様配列) 含有型 *PGK1* プロモーターの転写開始点を決定した。³²P 標識したプライマーを用いて *VTC1* mRNA を cDNA に逆転写し、逆転写産物を 6%尿素変性ポリアクリルアミドシーケンスゲルにより分離した。ゲルを乾燥後、イメージングプレート(富士フイルム)に適切な時間露光し、Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare)によりバンドの検出を行った。バンドの定量は ImageQuant TL software version 8.1 (GE Healthcare)を用いて行った。

研究結果

PGK1 転写の TFIID 依存性は *SPT3* 遺伝子の由来 (染色体上 or プラスミド上) に依存する

PGK1 転写は、TFIID ではなく SAGA に依存することが知られている。一方、ChIP 解析の結果は、①TFIID が *PGK1* プロモーターに結合すること、②ヒートショック後にその結合レベルが上昇することを示しており、TFIID が *PGK1* 転写に関与する可能性も十分に考えられる。そこで申請者は、TFIID 変異株において、ヒートショック後の *PGK1* 転写の消長 (キネティクス) を詳しく調べることにより、*PGK1* 転写における TFIID の関与の有無を明らかにできるのではないかと考えた。そこで、TFIID サブユニットの Taf1 と SAGA サブユニットの Spt3 を解析対象とし、各々の単独変異株ならびに二重変異株を作製することとした。具体的には、*TAF1* 欠失変異 (*taf1Δ*) 株に、野生型 *TAF1* アレル、温度感受性変異型 *taf1-Δ TAND* アレル、もしくは温度感受性変異型 *taf1-N568Δ* アレルのいずれかを有するプラスミドを導入した一連の酵母株に対して、*SPT3* 欠失変異 (*spt3Δ*) を導入し、さらに *SPT3* 発現プラスミドを形質転換することにより *SPT3* 株を作製した (註: 本研究では *spt3Δ* 変異導入前の *SPT3* 株と、当該変異導入後に *SPT3* 発現プラスミドの形質転換により作製した *SPT3* 株の二種類を使用していることに注意)。*spt3Δ* 変異導入前の *SPT3* 株と当該変異導入後の *spt3Δ* 株 (図 2A, C)、もしくは *spt3Δ* 株に *SPT3* 発現プラスミドまたは empty vector を形質転換した *SPT3* 株と *spt3Δ* 株 (図 2B, D) について、ヒートショック (培地を 25°C から 37°C へシフト) 後の *PGK1* 転写の詳細なキネティクスを調べた (図 2)。

その結果、過去の知見と一致し、内在性の *PGK1* 転写は、*spt3Δ* 変異により約半分に低下したが(図 2A, C [b, d])、*taf1* 変異の影響はほとんど受けないことが明らかとなった (図 2A, C [e, g, i, k]; 37°C シフト 2h 後に注目)。しかしながら、キネティクスを詳しく調べたところ、37°C にシフト後において、*taf1-Δ TAND* 株(図 2A, C [e, g])及び *taf1-N568Δ* 株

(図 2A, C [i, k])については、*PGK1* mRNA の一過的な減少と上昇がそれぞれ観察された。また *taf1* 変異と *spt3Δ* 変異の両方を有する二重変異株では、いずれの場合も *PGK1* 転写の有意な低下が観察された(図 2A, C [f, h, j, l])。

次に *VTC1* レポーターシステムを用いて、*PGK1* プロモーター中の TATA ボックスを GAGA 配列に置換した際の転写 (以下、*PGK1*[GAGA]転写と表記) のキネティクスを調べたところ、*spt3Δ* 変異株の場合(図 2A, C [n])と同様、約半分に低下することが明らかとなったが(図 2A, C [o])、そこに *spt3Δ* 変異を組み合わせてもさらなる低下は見られず(図 2A, C [p])、両 *taf1* 変異による影響も観察されなかった(図 2A, C [s, w])。以上の結果は、①Spt3 は TATA ボックス依存的に *PGK1* 転写を活性化すること、及び②TATA ボックスを GAGA 配列に変えても TFIID 依存性は付与されないことを示している。一方、*taf1-Δ TAND* 株において、GAGA 変異は温度シフト後の一過的な変動 (Spt3 依存的な mRNA レベルの低下とその後の回復) に影響を与えなかったが (図 2A, C [q, s])、*spt3Δ taf1-Δ TAND* 二重変異株の場合は、*PGK1*[GAGA]転写の有意な低下が観察された (図 2A, C [r, t])。これらの結果は、Spt3 欠損時において、TAND が TATA ボックス依存的に *PGK1* 転写を促進する機能を有することを示唆している。

spt3Δ 株に *SPT3* 発現プラスミドまたは empty vector を形質転換した *SPT3* 株と *spt3Δ* 株を比較したところ、上記の *taf1-Δ TAND* 株において観察された温度シフト後の一過的な変動はほぼ消失し (図 2B, D [e, g, q, s]; q においてのみ弱い変動が残存)、*taf1-N568Δ* 変異による *PGK1*[GAGA]転写の有意な低下が新たに観察されたことから (図 2B, D [w])、プラスミド上の遺伝子に由来する Spt3 (以下 Spt3[plasmid]と表記) の機能と染色体上の遺伝子に由来する Spt3 (以下 Spt3[genome]と表記) の機能は互いに異なることが明らかとなった。一方、Spt3[genome]と同様、Spt3[plasmid]についても、TATA ボックス依存的な *PGK1* 転写の促進活性が見られたことから (図 2B, D [a, b, m, n])、Spt3 は、少なくとも二種類の機能 (Spt3[genome], Spt3[plasmid])に共通して見られる①TATA ボックス依存的な転写促進活性、及び Spt3[genome]のみで見られる②*PGK1* プロモーター対して TFIID 非依存性を付与する機能) を有すると考えられる。

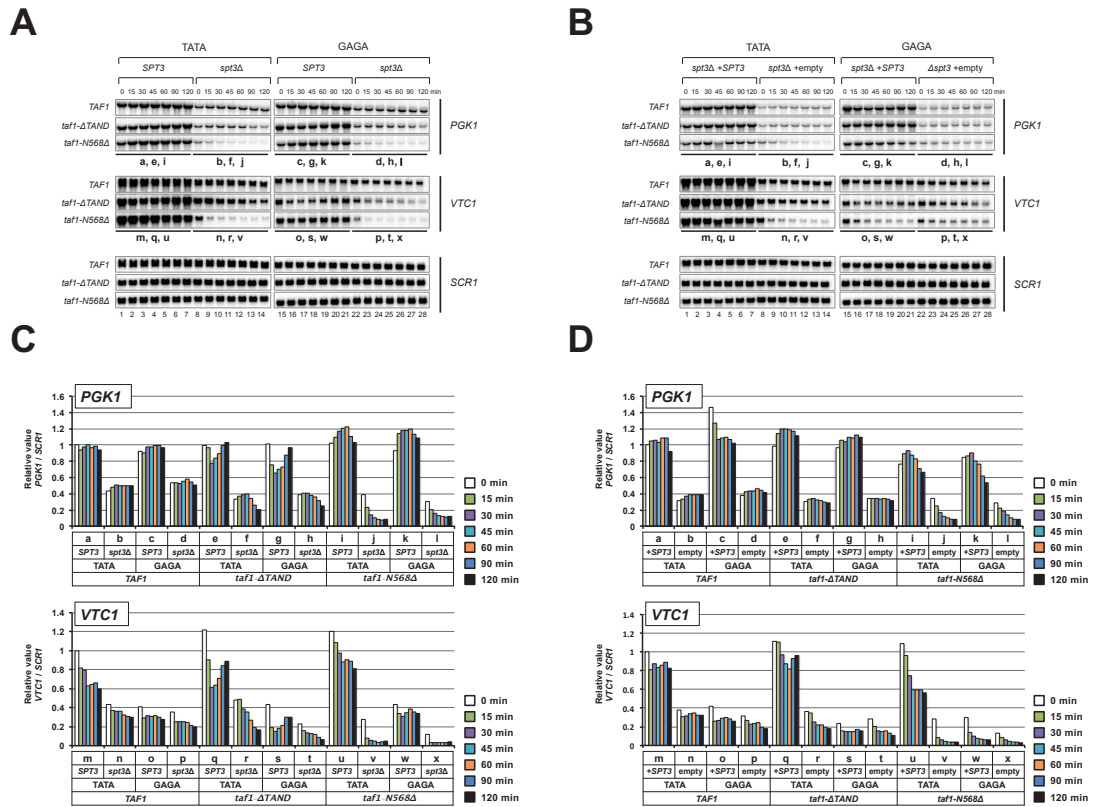


図 2. *taf1* 変異株、*spt3Δ* 変異株または二重変異株における温度シフト後の *PGK1* プロモーターの活性変化

VTC1 (中央パネルの m, q, u, n, r, v, o, s, w, p, t, x)、*PGK1* (上パネルの a, e, i, b, f, j, c, g, k, d, h, l) 及び *SCR1* (コントロール：下パネルのレーン 1-28) のノザンプロット解析結果。全ての株は、野生型 TATA ボックス含有型 (TATA と表記) もしくは変異型 TATA ボックス含有型 (GAGA と表記) *PGK1* プロモーターにより駆動される *VTC1* レポーターを有する。

(A) 染色体上に *SPT3* 遺伝子を有する株の場合は *SPT3* と表記し、欠失株の場合は *spt3Δ* と表記した。また全ての株は染色体上の *TAF1* 遺伝子を欠失しており、その代わりに *TAF1*, *taf1-ΔTAND* もしくは *taf1-N568Δ* アレルのいずれかをプラスミド上に有している。

(B) *spt3Δ* 株 (A で使用) に *SPT3* 発現プラスミド (*spt3Δ* + *SPT3* と表記) もしくは空ベクター (*spt3Δ* + empty と表記) を形質転換した株 (*TAF1* に関する表記は A と同様) を使用した。

(C), (D) (A), (B) の結果を定量し、グラフに示した。*PGK1* 及び *VTC1* mRNA の値を *SCR1* RNA 値で補正し、最も左に示した株の値に対する相対値を示した。

PGK1 プロモーターの転写開始部位は Spt3[plasmid]の導入や GAGA 配列への置換により変化しない

Spt3[plasmid]の導入や GAGA 配列への置換が *PGK1* プロモーターの転写開始部位 (TSS) に影響を及ぼすかについて調べるため、プライマー伸長実験を行った。その結果、図 2 において見られた転写強度の変化は、各 TSS バンドの強度変化として現れたが、TSS プロファイル (各 TSS バンド間の強度比の変化、新たなバンドの出現や既存バンドの消失等) 自体に変化は見られないことが明らかとなった (図 3A, B)。すなわち、図 2 において観察された複数の変化 (*spt3Δ* 変異の導入や GAGA 配列への置換により生じた mRNA レベルの低下、Spt3[genome]と Spt3[plasmid]の機能の違い等) は全て TSS の変化を介さずに起こることが示された。従って、Spt3[plasmid]を有する株においてのみ見られた *PGK1*[GAGA]転写の TFIID 依存性は、TFIID による TSS 決定機構の異常によるものではないと考えられる。

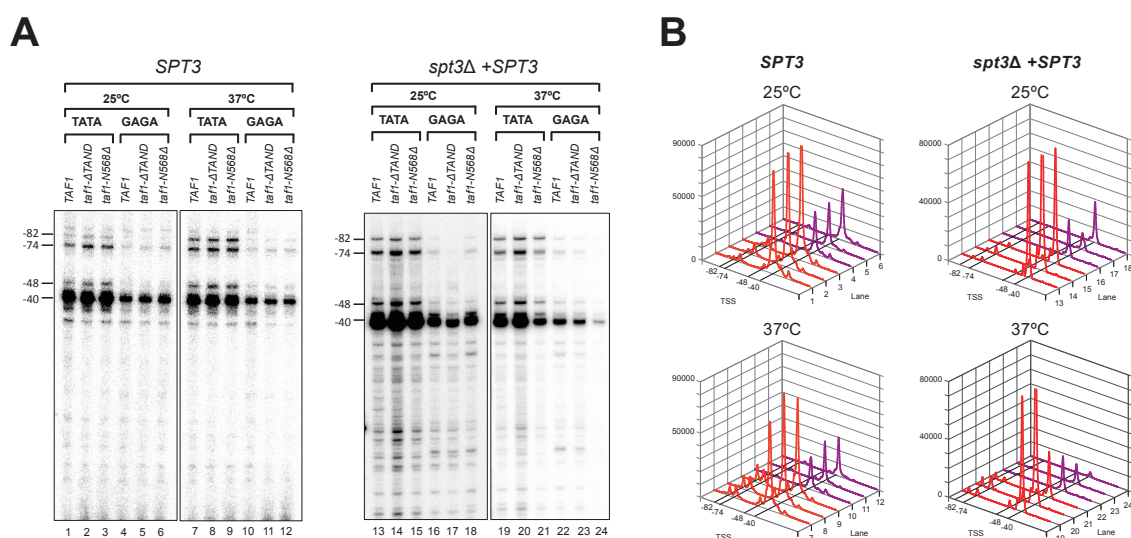


図 3. 図 2 で使用した株における *VTC1* レポーター遺伝子の転写開始部位 (TSS) の決定 (A) 図 2 で使用した株における 25°C (レーン 1-6, 13-18) もしくは 37°C にシフト 2h 後 (レーン 7-12, 19-24) の条件下における *VTC1* レポーター遺伝子の転写開始部位をプライマー伸長法により解析した結果を示した。開始コドン ATG の最初の A を +1 とし、TSS の位置をゲル画像の左に示した。(B) (A) で決定した各 TSS の強度を定量化し、グラフに示した。

PGK1 コアプロモーター中の CATAAATT 配列及び TACATATT 配列はコアプロモーター配列 (2 bp のミスマッチを有する TATA 様配列) として機能する

VTC1 レポーター実験において、GAGA 配列への置換は *PGK1* 転写レベルを約半分に低下させたが (図 2A, D 及び図 3A, B)、依然として残り半分の転写は影響を受けないことか

ら、*PGK1* コアプロモーター中には、TATA ボックス以外のコアプロモーター配列 (CPE) が存在する可能性が高いと考えられる。そこで、*PGK1* コアプロモーター中に存在する二種類の TATA 様配列 (いずれも 2 bp のミスマッチを有する)、CATAAATT 配列 (図 4A, #2) 及び TACATATT 配列 (図 4A, #3) が CPE として機能できるかを調べた。その結果、いずれの TATA 様配列も、TATA ボックスの存在下では CPE として機能するようには見えなかったが (図 4C, レーン 1 [WT], 3-5 [mut 2-4])、TATA ボックス非存在下 (図 4C, レーン 2 [mut 1]) では、CATAAATTT 配列のみが CPE として機能し (図 4C, レーン 2 [mut 1], 6 [mut 5], 7 [mut 6]) を比較)、TATA ボックス及び CATAAATTT 配列非存在下 (図 4C, レーン 7 [mut 6]) では、TACATATT 配列も CPE として機能する (図 4C, レーン 7 [mut 6], 8 [mut 7]) を比較) ことが明らかとなった。以上の結果は、① *PGK1* プロモーター中には 3 種類の CPE が存在すること、及び②これらの CPE 間には機能的な極性がある (各 CPE が機能するためには、最も上流側に位置する必要がある) ことを示唆している。

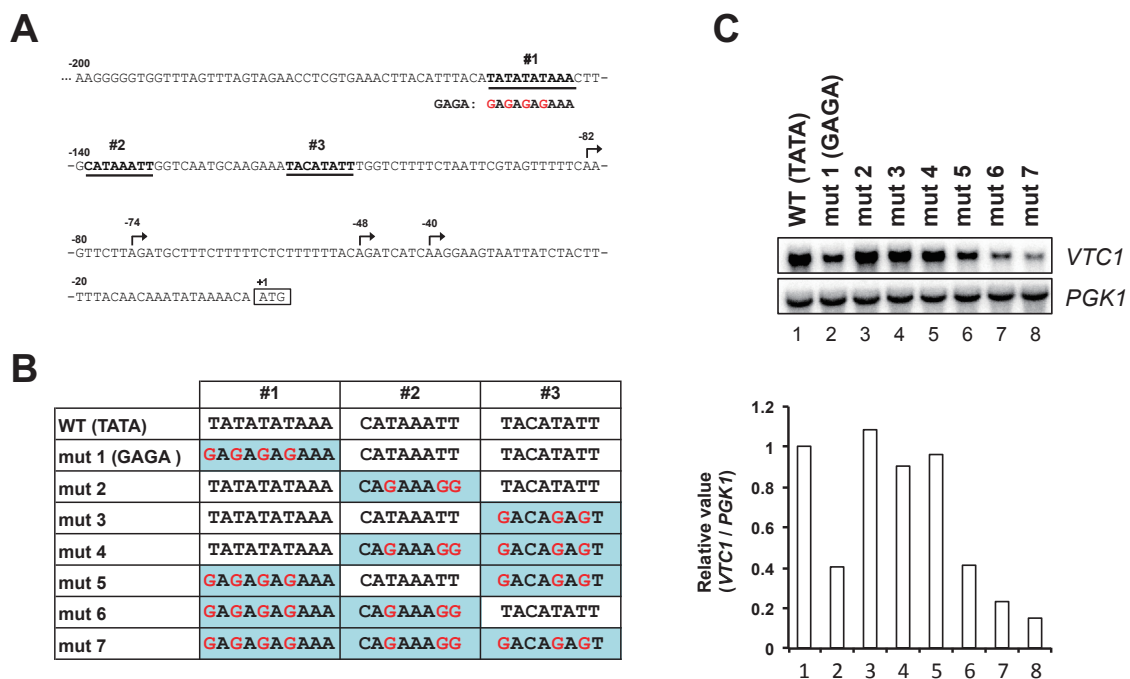


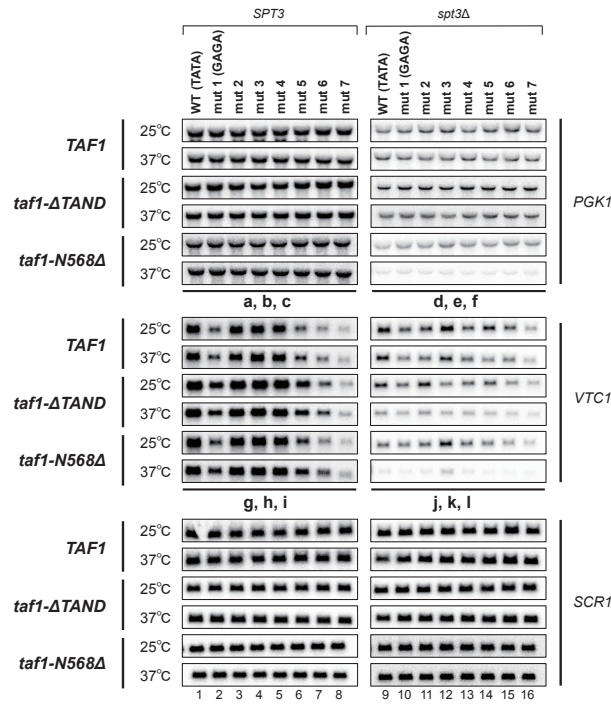
図 4. *VTC1* レポーターシステムによる *PGK1* コアプロモーター中に存在する 3 種類の CPE の活性評価

(A) *PGK1* コアプロモーター中に存在する 3 種類の CPE (#1; TATATATAAA, #2; CATAAATT, #3; TACATATT) に下線を付けた。#1, #2 は以前に CPE として報告されているが、その機能については統一的な見解が得られていない。黒矢印は図 3 において決定した TSS を示す。(B) 3 種類の CPE 配列(#1, 2, 3)に導入した変異のまとめ。(C) (B)に示した一連のプロモーターコンストラクト (*VTC1* レポーターシステムを使用) のノザンプロット解析結果 (上パネル) とその定量結果 (下パネル)。 *VTC1* mRNA 量を *PGK1* mRNA 量で補正し、レーン 1 に対する相対値を示した。

PGK1 転写の TFIID 依存性は CPE の組み合わせを変更しても付与できない

*spt3Δ taf1-N568Δ*株に *SPT3* 発現プラスミドを導入した *SPT3 taf1-N568Δ*株では、*PGK1*[GAGA]転写が TFIID 依存性を示したことから(図 2B, D [w])、*PGK1* プロモーターには TFIID 依存的に転写されるポテンシャルがあると考えられる。そこで、Spt3[genome]の存在下、CPE の組み合わせを様々に変更することにより、*PGK1* 転写における TFIID 依存性の有無の変化を調べた。その結果、いずれの場合も *PGK1* 転写は TFIID 非依存性を示したことから(図 5A, B [g, h, i])、少なくとも Spt3[genome]の存在下において、シス配列の変更により TFIID 依存性を新たに付与することはできないと考えられる。また Spt3[genome]による TATA ボックス依存的な転写促進活性は、CATAAATTT 配列や TACATATT 配列の非存在下においても同等であったことから(図 5B, WT 及び mut2-4)、当該活性にこれらの配列は不要と考えられる。

A



B

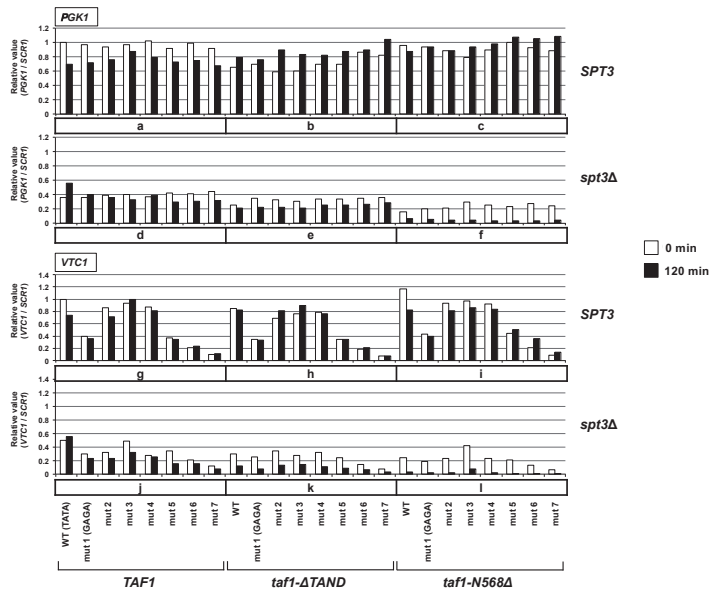


図5. *PGK1* 転写の Taf1/TFIID 依存性に及ぼす CPE の影響

(A) 図 1A, C で使用した株 (WT [TATA]および mut 1 [GAGA])、及び図 1A, C と同様の方法により構築した CPE 変異型 *PGK1* プロモーターを有する株(mut 2-7)の *VTC1* (中央パネルの g, h, i, j, k, l)、*PGK1* (上パネルの a, b, c, d, e, f) または *SCR1* (コントロール; 下パネルのレーン 1~16) のノーザンブロット結果。(B) (A)の結果を定量し、図 2 に記した方法によりグラフ化した。各株における *PGK1*, *VTC1* mRNA 量は、WT (TATA) 株における mRNA 量に対する相対値として示した。

考察

本研究において、Spt3[plasmid]は、*PGK1*[GAGA]転写の TFIID 非依存性を保持する活性を喪失する一方(図 2B, D [w])、Spt3[genome]と同様、TATA ボックスに依存して転写を促進する活性については *taf1-N568A*変異の存在下においても保持していること(図 2B, D [m-p, u-x])が明らかとなった。すなわち、Spt3 には二種類の機能が存在し、TATA ボックスに依存して転写を促進する活性は、*PGK1*[GAGA]転写が TFIID 依存性を示すようになった Spt3[plasmid]においても保持されていたことから、TFIID とは独立に発現する活性であると考えられる。またこのことは、TATA 様配列含有型プロモーターからの転写 (*PGK1*[GAGA]転写) と TATA ボックス含有型プロモーターからの転写 (野生型 *PGK1* 転写) において必要な Spt3 の機能が異なること (註 ; Spt3[plasmid]は前者の活性のみを欠損している)、すなわち TFIID のみならず SAGA も TATA ボックスの有無に応じて異なるメカニズムにより転写を媒介していることを明確に示している。

PGK1 プロモーター中に存在する複数の CPE の組み合わせを変更しても *PGK1* プロモーターに TFIID 依存性を付与することはできなかった (図 5)。当研究室の以前の研究において、転写の活性化は、①上流活性化配列 (UAS)に結合した転写調節因子がコア因子 (TFIID または SAGA のいずれか) を指定する、②指定されたコア因子がコアプロモーター配列に応じて適切な様式で転写を媒介する、という二段階を経て起こるというモデルが提唱されている (5)。このモデルが正しければ、UAS に変異を導入しない限り、TFIID 依存性は変化しないと考えられることから、今回の結果を合理的に説明することができる。ただし UAS に変異を導入することなく、Spt3[plasmid]は *PGK1*[GAGA]転写の TFIID 非依存性を喪失したことから、当該 Spt3 を含む SAGA は転写調節因子との相互作用に異常をきたし、その結果として異なるコア因子 (SAGA ではなく TFIID) が指定され、*PGK1* コアプロモーターが TFIID にも適応可能な CPE を有していたために今回の現象が観察されたのではないかと考えている。

結論

- ① Spt3 には二種類の活性が存在する
- ② Spt3[plasmid]は *PGK1*[GAGA]転写の TFIID 非依存性を保持する活性を失っている
- ③ Spt3[plasmid]による *PGK1*[GAGA]転写の TFIID 依存性は、TFIID の TSS 決定能の変化によるものではない
- ④ *PGK1* プロモーター中の CATAAATT 配列は TATA 様配列として機能する
- ⑤ Spt3[genome]存在下ではシス配列の組み合わせを変更しても *PGK1* プロモーターに TFIID 依存性を付与することはできない

- ⑥ TFIID だけではなく、SAGA も TATA ボックスの有無により、異なるメカニズムで転写を媒介する能力を有する

主論文

- 1) **Ryo iwami**, Naoki Takai, Tetsuro Kokubo. (2020) The function of Spt3, a subunit of the SAGA complex, in *PGK1* transcription is restored only partially when reintroduced by plasmid into *taf1 spt3* double mutant strains. *Genes Genet Syst.* 95(3), 151-163. doi: 10.1266/ggs.20-00004.

参考文献

- 1) Huisinga, K.L., and Pugh, B.F. (2004) A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **13**, 537-585.
- 2) Baptista, T., Grunberg, S., Minoungou, N., Koster, M.J.E., Timmers, H.T.M., Hahn, S., Devys, D., and Tora, L. (2017) SAGA is a general cofactor for RNA polymerase II transcription. *Mol. Cell* **68**, 130-143.
- 3) Warfield, L., Ramachandran, S., Baptista, T., Devys, D., Tora, L., and Hahn, S. (2017) Transcription of nearly all yeast RNA Polymerase II-transcribed genes is dependent on transcription factor TFIID. *Mol Cell.* **68**, 118–129.
- 4) Fischer, V., Schumacher, K., Tora, L., and Devys, D. (2019) Global role for coactivator complexes in RNA polymerase II transcription. *Transcription* **10**, 29–36.
- 5) Watanabe, K., and Kokubo, T. (2017) SAGA mediates transcription from the TATA-like element independently of Taf1p/ TFIID but dependent on core promoter structures in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **12**, e0188435.
- 6) Tsukihashi, Y., Kawaichi, M., and Kokubo, T. (2001) Requirement for yeast TAF145 function in transcriptional activation of the *RPS5* promoter that depends on both core promoter structure and upstream activating sequences. *J. Biol. Chem.* **276**, 25715-25726.
- 7) Tsukihashi, Y., Miyake, T., Kawaichi, M., and Kokubo, T. (2000) Impaired core promoter recognition caused by novel yeast *TAF145* mutations can be restored by creating a canonical TATA element within the promoter region of the *TUB2* gene. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2385-2399.
- 8) Cheng, J. X., Floer, M., Ononaji, P., Bryant, G., and Ptashne, M. (2002) Responses

of four yeast genes to changes in the transcriptional machinery are determined by their promoters. *Curr. Biol.* **12**, 1828-1832.