

様式第4号-1

学位論文審査の結果の要旨

氏名	岩見 亮	
学位の種類	博士 (理学)	
学位記番号	甲 第1770号	
学位授与の日付	令和3年3月25日	
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当	
学位論文題目	The function of Spt3, a subunit of the SAGA complex, in <i>PGK1</i> transcription is restored only partially when reintroduced by plasmid into <i>taf1 spt3</i> double mutant yeast strains	
主研究指導教員	古久保 哲朗	
論文審査委員	(主査) 片岡 浩介	准教授
	(副査) 大野 博司	大学院客員教授
	(副査) 鈴木 厚	教授
	(副査) 林 郁子	准教授

論文内容の要旨

真核生物におけるクラス II 転写は、コアプロモーター領域に基本転写因子群と RNA ポリメラーゼ II が集合し、転写開始前複合体 (PIC) を形成することにより開始する。出芽酵母の場合、クラス II 遺伝子のコアプロモーターは、TATA ボックスと TATA 様配列 (TATA ボックスと比較した場合、1 or 2 bp のミスマッチを有する) のいずれかを含む。基本転写因子 TFIID は、TBP と 14 種類の TAF 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、その他の因子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 末端ドメインは、TBP の DNA 結合において重要な役割を果たすと考えられているが、その仕組みの詳細については未だ明らかにされていない。

一方、TFIID の類縁複合体である SAGA は 19 種類のサブユニットから構成され、そのうちの Spt3/Spt8 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 (多くは TATA ボックス含有型) 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 (多くは TATA 様配列含有型) からの転写を制御すると考えられてきたが、近年、両者はほぼ全てのクラス II 転写に関与することが明らかとなりつつある。しかしながら、両者の役割分担については、未だ不明な点が多い。

申請者は、SAGA 依存的かつ TFIID 非依存的に転写されると考えられてきた TATA 含有型の *PGK1* プロモーターをモデルとし、野生株もしくは *taf1* and/or *spt3* 変異株におけるヒートショック (HS) 後の mRNA の消長 (キネティクス) を詳しく調べることにより、以下に述べる複数の興味深い知見を得た。

まず内在性の *PGK1* 転写のキネティクスについて調べたところ、HS の有無によらず mRNA 量は *spt3* 変異により約半分に低下したが、*taf1* 変異株の場合、HS 2 時間後には元のレベルに戻るものの、その途上において一過的な量的変動が見られ、*taf1 spt3* 二重変異株の場合には、HS 後にさらなる mRNA 量の低下が観察された。次に *VTC1* レポーターシステムを用いて、*PGK1* プロモーターの TATA ボックスを TBP が結合できない GAGA 配列に置換した際 (以下、*PGK1*[GAGA]と表記) の転写を調べたところ、*spt3* 変異株 (TATA 配列プロモーター) の場合と同様、mRNA 量は約半分に低下し、そこに *spt3* 変異を組み合わせてもさらなる低下は見られなかった。以上の結果は、①TFIID が *PGK1* 転写に関与すること、②Spt3 が TATA ボックス依存的に *PGK1* 転写を活性化することを示している。また、*PGK1*[GAGA]に *taf1* 変異を組み合わせてもさらなる影響は観察されなかった。これらの結果は、③TATA ボックスを GAGA 配列に変えても TFIID に依存するようにはならないことも示している。

次に、*TAF1 spt3* 株もしくは *taf1 spt3* 株に *SPT3* 発現プラスミドまたは empty vector を形質転換した株において *PGK1* 転写を比較した。*SPT3* 発現プラスミドを持つ株では、上記の *taf1* 変異株において観察された HS 後の一過的な変動はほぼ消失した。また、*PGK1*[GAGA]転写が *taf1* 変異によって有意に低下することが新たに観察された。以上のことから、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) の機能は全く同じではないことが明らかとなった。一方で、TATA ボックス依存的な *PGK1* 転写の促進活性は Spt3[genome]でも Spt3[plasmid]でも見られた。したがって Spt3 は、① TATA ボックス依存的な転写促進活性 (Spt3[genome]と Spt3[plasmid]に共通) と、② *PGK1*[GAGA]転写を TFIID 非依存性にする活性 (Spt3[genome]のみ) の少なくとも二種類の機能を有すると考えられる。また上記に加え、Spt3[plasmid]の場合も野生型 *PGK1* 転写における TFIID 依存性は低いままであることから、TFIID と同様、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する可能性が高いと考えられる。

その他、コアプロモーター配列や転写開始点 TSS を詳細に解析し、①Spt3[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こと、②*PGK1* プロモーター中には機能的な極性 (上流側が優先される) を有する 3 種類のコアプロモーター配列が存在すること、③Spt3[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こと等を明らかにした。また、転写が TFIID 依存性かどうかはプロモーター配列によって一義的に決まると従来は考えられてきたが、本研究において初めて、同一の塩基配列を持つプロモーターであっても、遺伝的背景の履歴によって TFIID 依存性が変化し得ることが示された点も評価できる。

論文審査結果の要旨

本論文の審査は、提出論文の内容、発表会（令和3年2月17日午後1時15分～）および審査会での質疑応答（令和3年2月17日午後2時50分～）に基づき、4名の審査員（主査：片岡浩介 准教授、副査：大野博司 大学院客員教授、副査：鈴木厚 教授、副査：林郁子 准教授）によって行われた。発表会に引き続き審査会を行ったため、審査会ではあらためて内容の要約を發表することはせず、すぐに本研究の専門性、関連科目の知識、英語力に関して、審査員と申請者の間で以下の質疑応答が行われた。

片岡主査からは、①SAGAがTBP deliveryを行うといわれるようになった歴史的な経緯は何か、②実際にSAGAサブユニットの変異でプロモーター上のTBP結合量が低下する例は知られているのか、③*spt3Δ*変異の存在下ではTFIIDが代替していると考えて良いのか、④熱ショック後の一過的な発現変動の再現性はあるのか、⑤Spt3[plasmid]がPGK1[GAGA]転写にTFIID依存性を付与するという表現の仕方をするのはなぜか等の質問があった。それに対して、①SPT3/8とSPT15(TBP)間には遺伝学的・生化学的な相互作用があること、②*spt3Δ*変異株ではGAL1プロモーター上のTBP結合量が低下すること、③自身のデータからはそのように考えられること、④実験全体の試行は1回のみであるが、独立した株間において同様の変動が見られることから実質的にはN=2と考えられる等の回答が得られた。⑤については、発表資料中では「Spt3[genome]がTFIID非依存性を付与する」となっていたことから、単純な言い間違いのように思われるが、申請者本人はそのことに気が付いていない様子であった。その他、⑥今回PGK1転写について分かったことの生理的な意味は何か（鈴木副査からも同様の質問あり）、⑦今後さらに分子機構の詳細を明らかにしていくためにはどのようにしたらよいと思うか等を問われ、回答内容にやや不十分な点も見受けられたが（特に⑥）、自身の考えを述べることができた。

大野副査からは、①Spt3[genome]とSpt3[plasmid]の機能の違いとは具体的に何を指すのか、②transcript buffering effectと呼ばれる現象では何が起きているのかについて問われた。①については、「Spt3の発現量の違いが原因とは考えておらず、*taf1*変異と*spt3Δ*変異の共存下において細胞側に生じる何らかのepigeneticな変化が原因と考えている」と回答したため、大野副査からは、もしそうであれば表現の仕方が間違っているのではないかとの指摘を受けた。さらにSpt3[plasmid]存在下において*spt3Δ*変異を導入した場合の表現型を問われ、現在までに得られている結果の詳細（plasmid vs genome, locus, promoterの種類等は一切関係がなく、Taf1とSpt3の同時機能欠損のみにより、このような違いが生じること）を説明した。また②については、本現象の概略を再度説明した上で、大野副査との間で議論が交わされた。大野副査からの「TATAボックス含有型 or TATA様配列含有型プロモーターから発現する二種類のRNA結合タンパク質が関与すると考えれば、本現象を説明できるのではないか」とのコメントに対し、意図が汲み取れないように見えた点はやや残念であった。

鈴木副査からは、①Spt3の発現量の違いではないとする根拠は何か、②想定しているepigeneticな変化は細胞分裂後も残るものなのか、③Spt3にTATAボックス依存的な転写促進活性があることは以前から分かっていたことではないのか、④*spt3Δ*変異の存在下でTFIIDがPGK1転写を支えるのならTFIIDの関与は最初から分かっていたことにならないのか、⑤TFIID依存性を付与する活性の有無はどのデータから分かるのか、

⑥後半でTSS, CPEの影響を調べる実験を行った動機は何か、⑦transcript buffering effectにおいてmRNAの安定性が変化していることを示す証拠はあるのか等の質問がなされた。それに対して、①low copy plasmidの使用や染色体上の複数箇所への組み込み、種々のプロモーターの使用等によりSpt3の発現量を様々なレベルに変えても結果が同じであったこと、②継代後も表現型が失われないこと、③同一プロモーターにおいてGAGA変異と*spt3Δ*変異を組み合わせた場合の影響を調べたのは今回が初めてであること等を回答した。④については、TFIIDとSAGAの機能重複についてすでに分かっていることをまず説明すべきであったが、それをしなかったため正確に答えることはできなかった。⑤⑥⑦については、一部不十分な点が見られたものの、概ね適切に回答した。

林副査からは、①GAGA配列に変更したのはVTC1側のみか、②*taf1*変異や*spt3Δ*変異の存在下において、TFIID or SAGA複合体のターンオーバーはどのようになっているのか、③ターンオーバーの違いが今回の結果（例えば、Spt3[genome]とSpt3[plasmid]の機能の違い）に影響を及ぼす可能性はないのか、④コントロールとして使用しているSCR1はどのような遺伝子か、⑤*taf1-ΔTAND*変異と*taf1-N568Δ*変異の違いは何か、⑥TFIIDとSAGA間でサブユニットの交換は起こるのか、⑦一つのプロモーター内にTATA配列が複数存在するのはよくあることなのか、⑧SAGAのみに働くactivatorは知られているか等について問われ、概ね適切な回答がなされた。しかしながら、⑦⑧に関連し、activatorとSAGAの間をつなぐ因子をUASから釣ってくる実験は可能か、TBPが同一プロモーター中に存在するCPEに同時に結合することは可能か等、議論が進むにつれ、副査の質問の意図を汲み取れない場面が目立ったのはやや残念であった。

関連科目の知識について、まず片岡主査から、出芽酵母のモデル生物としてのメリット・デメリットを問われ、一倍体・二倍体の生活環を有することのメリットは失念していたようであるが、概ね適切な回答が得られた。大野副査からは、温度感受性変異とはどのようなものかを問われ、こちらも概ね適切に回答することができた。鈴木副査からは、①tet ON, OFFシステムのように、温度感受性変異体を使用しない他の方法を考えなかったのはなぜか、②出芽酵母の細胞内シグナル伝達系について例を挙げて説明してほしい等の質問があった。①についてはde novo合成を介することのデメリットについて言及すべきであったが、温度感受性変異体を用いることで過去の研究との比較が可能になると回答した。②については、Gal4, Hsf1といった転写因子がらみの知識はあるようであったが、一般的なシグナル伝達経路については上手く答えることができなかった（栄養状態に応じてTORC活性が変化することまでは答えられたが、TORCが何をリン酸化するかは分からないとのことであった）。林副査からは、リコンビナント技術を用いて巨大な複合体を調製する場合と細胞からnativeな複合体を精製・調製する場合の各々についてメリット・デメリットを説明してほしいと求められ、自身の知るところを述べたが、やや不十分な回答であった。

英語力（外国語科目）の審査に関しては、スライド1枚を用いて英語での口頭説明が行われたが、準備不足のせいもあり、科学的な内容を正確に伝えるという観点からは、やや不満足な内容であった。また英文報告書の表記においては、deliverがderiverとなるなど、単純なスペルミスが多いとの指摘がなされた。分量が多く、本人の熱意は感じられるものの、やや冗長であり、短い文章を書く訓練が必要との指摘もあった。

質疑応答終了後に審査員全員で討議を行った。研究内容については、学位に十分値するとの評価を受けた。また、専門分野のみならず、関連科目に関する質疑応答、英語力等全てを総合的に判断して、申請者は学位を得るにふさわしい十分な資格を有すると判定された。