

研 究 主 論 文 抄 録

論文題目 出芽酵母における新規細胞質内局在化 *EGD1* mRNA に関する研究
(Studies on a novel cytoplasmic localized mRNA, *EGD1*, in *Saccharomyces cerevisiae*)

熊本大学大学院自然科学研究科 理学専攻 生命科学講座
(主任指導 谷 時雄 教授)

論文提出者 林 紗千子
(by Sachiko Hayashi)

主論文要旨

遺伝情報は、遺伝子の本体である DNA から RNA に写し取られて発現する。そのため、RNA の細胞内局在化は、遺伝子発現を空間的に制御するために不可欠な現象である。しかし、従来の局在化 RNA に関する研究は特定の細胞や細胞小器官にのみ着目されて行なわれてきた。よって、細胞周期全体を通じた網羅的な局在化 RNA の全体像は不明なままであり、個々の詳細なメカニズムに関して解明されている例が少ない。そこで私は、ゲノムワイドな局在化 RNA の探索を通して未知の局在化 RNA を発見し、新たな局在化機構や局在化の生理的意義を見いだすことを目指した。

本研究では、生きた細胞内で RNA 分子を可視化し、RNA 分子自体の動態を探る方法として Tag-GFP 法を用いた。この方法は、タグ配列を付加した RNA 分子と共に、そのタグ配列を認識し結合するタグ結合タンパク質と GFP との融合タンパク質を同時に酵母細胞内で強制発現させることで、間接的に GFP 蛍光により RNA を可視化する。実験材料としては高等生物同様、既知の局在化 RNA が存在し、遺伝学的解析が容易な出芽酵母を用いた。Tag-GFP 法を用いた RNA 局在観察の結果、細胞質に凝集した局在を示す RNA として、*EGD1* mRNA を初めて同定した。

EGD1 は出芽酵母の NAC の β サブユニットをコードしている。NAC は酵母からヒトに至るまで広く保存されたタンパク質複合体であり、リボソーム付近において新生ポリペプチド鎖に結合し、このポリペプチド鎖が分解されるのを防ぐシャペロンの役割を果たしていると考えられている。まず、スクリーニングで得られた *EGD1* mRNA の凝集した局在が実際の細胞内の様子を反映したものかを検証するため、*EGD1* mRNA 特異的プローブを用いた *in situ* hybridization を行った。その結果、タグを付加していない *EGD1* mRNA を、自身のプロモーターを用いて多コピーで発現させた場合においても、細胞質に凝集して局在することが確認できた。よって、この局在が Tag-GFP 法によって偶然に引き起こされたものではなく、実際に細胞内で起こっている可能性が示唆された。

EGD1 mRNA の細胞質内局在化に必要な領域を特定するため、RNA を断片化し、局在率の変化を Tag-GFP 法で比較する実験を行なった。その結果、*EGD1* の 5' 上流領域または ORF 領域を欠くと細胞質への局在が消失し、さらには Egd1p が正常に翻訳できない RNA 分子も細胞質に局在できないことが分かった。これより *EGD1* mRNA の局在化が Egd1p への翻訳と関連した現象であることが示唆された。そこで、次に Egd1p も *EGD1* mRNA と細胞質で共局在しているかを検証するため、*In situ* hybridization 及び抗体染色による二重染色を行なった。その結果、タグ付き Egd1p は凝集した *EGD1* mRNA と共局在していることが示された。この過剰発現した *EGD1* mRNA と Egd1p により形成される細胞質構造体を *EGD1* 顆粒と命名した。

EGD1 顆粒形成と細胞骨格との関連性を検証するため、微小管及びアクチン重合阻害剤で処理した細胞における RNA の局在観察を行った。その結果、微小管の重合を Benomyl により阻害した細胞でのみ *EGD1* mRNA の細胞質局在が消失し、*EGD1* 顆粒形成が微小管依存的であることが分かった。また近年、mRNA の代謝に関わる細胞質顆粒として P-body が広く知られている。この P-body の因子に GFP が付加された株を用いて、*EGD1* mRNA との局在解析を行ったところ、複数の P-body 因子が *EGD1* 顆粒と共局在している様子が観察された。しかし、P-body 因子の遺伝子欠損株を用いた解析により、*EGD1* 顆粒形成は P-body 非依存的であったことから、*EGD1* 顆粒と P-body は因子を共有するものの独立的な構造であることが示唆された。

EGD1 顆粒の生物学的意義を解明するため、恒常的に強く発現する *TDH3* プロモーター制御下での *EGD1* 顆粒形成の影響を調べた。その結果、mRNA の 5' 上流領域の不足により *EGD1* 顆粒を形成できない細胞では、vector 及び *EGD1* 顆粒を形成できる細胞と比較して強い生育阻害や縦長化や肥大化などの細胞形態変化が示された。さらに、通常、細胞内で Egd1p は Egd2p と共に NAC を構成しているが、興味深いことに、*EGD1* のパートナーである *EGD2* の発現量を増加させると *EGD1* 顆粒形成に阻害が見られることが明らかとなった。このことから、*EGD1* 顆粒の形成は、過剰な Egd1p を顆粒内に閉じ込め、同時に *EGD1* mRNA の局在化により細胞内での Egd1p の発現を抑制するための現象である可能性が示唆された。