

論文内容の要旨

論文題目

分裂酵母 Mmi1 タンパク質による減数分裂特異的な mRNA 排除機構の解析

(Analysis of the Mmi1-dependent selective removal of
meiosis-specific mRNAs in fission yeast)

氏名 山中 総一郎

個体および細胞内における遺伝子発現に関する知見は分子生物学の根幹をなすものの一つであり、その黎明期から多くの研究者がこの問題に取り組んできた。遺伝子発現の結果、産生されたタンパク質は、化学反応を促進させる酵素としての働きや、生物を形作る構造としての働きなど、生体内において必要不可欠の多種多様な役割を担っている。個々のタンパク質の量はそれが関与する生命現象と密接に関係し、厳密な制御を受けている。タンパク質が合成される速度は、主にそのタンパク質をコードする mRNA の量によって決まり、また、mRNA の量はそれが転写される割合と分解される割合によって規定される。よって、mRNA の安定性は遺伝子発現制御において非常に重要なパラメーターの一つである。実際、これまでの研究により mRNA の安定性を制御する機構が多数明らかにされており、生命現象におけるそれら制御機構の重要性は広く認識されている。

本研究で用いた分裂酵母は通常 1 倍体単細胞で安定に存在し、体細胞分裂を繰り返すことで増殖する。培地中の栄養源、特に窒素源が枯渇すると、相異なる接合型を持つ個体同士が接合して 2 倍体化し、減数分裂過程に進行する。減数分裂の結果できた 4 つの胞子は、外界の栄養条件が増殖に適したものとなると発芽し、新たな個体となる。RNA 結合タンパク質である Mei2 は、その活性

化型アリルを栄養増殖期の細胞に発現させると、1倍体からでも強制的に減数分裂過程に誘導できることから、減数分裂開始を制御する主要な因子と考えられている。この Me12 をはじめ、減数分裂期にのみ働く多くの因子は、発現時期が精密にコントロールされており、その発現制御は転写因子の働きによって説明される場合が少なくなかった。

しかし、近年になって、減数分裂期に発現する種々の遺伝子の mRNA が、栄養増殖期において核内で積極的に排除されるというシステムが発見された。Mmi1 は、この減数分裂特異的 mRNA の排除機構に必須な因子として単離された。Mmi1 による発現制御を受けるものには、減数分裂期にのみ発現し減数第一分裂での還元分裂を可能にするコヒーシンサブユニットの Rec8 や、減数分裂の進行に必須な転写因子である Me14 など、減数分裂期に非常に重要な働きを持つタンパク質をコードする遺伝子が種々含まれている。Mmi1 によって細胞内から排除される mRNA 群は全て、機能的にその領域が定められた DSR(Determinat of Selective Removal)という配列を有しており、Mmi1 は DSR 配列に対して高い親和性を持つ RNA 結合タンパク質である(以降、DSR 配列を持つ減数分裂特異的 mRNA のことを DSR-RNA と略す)。Mmi1 を欠失させた株は野生株に比べて著しい生育阻害が観察され、Mmi1 の機能が低下したアリルを持つ株や *mmi1* の温度感受性株(以下、*mmi1-ts* と示す)では、栄養増殖期でも DSR-RNA が異所的に発現する。Mmi1 は YTH ドメインという保存された RNA 結合ドメインを持ち、標的となる mRNA 中の DSR 領域と直接結合するが、Mmi1 中にリボヌクレアーゼドメインといった RNA の排除を実際に担うような明確なドメインは現在のところ見出されておらず、DSR-RNA の排除を実際に行うような因子は他に存在すると考えられる。そこで、私は Mmi1 と協調して RNA を排除するような因子を探るツーハイブリッドスクリーニングを行うことから研究を開始し、その結果種々のポリ A 鎖に関与する因子が単離された。

単離された因子の内の一つは Rna15 と呼ばれるもので、ポリ A 付加複合体のサブユニットの一つである。このポリ A 付加複合体はほぼ全ての mRNA の 3' UTR のターミネーター内に存在するポリ A 付加シグナルをもとに、切断点の認識、切断、ポリ A 付加および転写終結の役割を担う。2 種の内、残りの一つは Pab2 というポリ A 結合タンパク質である。

また、研究をとおしてエキソソームと呼ばれる、種間でよく保存されたりボヌクレアーゼ複合体が今回の mRNA 排除機構に関与していることが明らかになってきた。エキソソームは核にも細胞質にも存在するが、その構成因子に若干

の違いがあることが知られている。エキソソームのサブユニットの内、核内特異的と考えられている *rrp6* を欠失した細胞は著しい生育遅延を示した。いっぽう、細胞質にも核にも存在するサブユニットと考えられている *dis3* を欠失した細胞は致死であった。そこで、*rrp6*, *dis3* に関して温度感受性株(以下、それぞれ *rrp6-ts*, *dis3-ts* と記す)を単離した。これらの温度感受性株を制限温度下で培養すると、Mmi1 の標的となる DSR-RNA が蓄積することが確認された。また、エキソソームの変異体において蓄積する RNA は、*mmi1-ts* において蓄積する RNA よりも分子量が大きい。この長さの違いは、ポリ A 鎖の長さの違いであることがわかり、エキソソームの変異体において蓄積する mRNA の保持する異常に伸長したポリ A 鎖は、ポリ A 付加複合体のサブユニットの中で唯一のポリ A 付加酵素と考えられている Pla1 の働きによるものであることがわかった。

ポリ A 付加複合体サブユニットの Rna15 と Pla1 は生育に必須であり、これらに関して温度感受性株を単離した(以下、*ma15-ts*, *pla1-ts* と示す)。また、ポリ A 結合タンパク質である Pab2 を欠失した細胞(以下、*pab2Δ* と示す)は生育可能であった。制限温度で生育させた *ma15-ts* と *pla1-ts* 細胞、および *pab2Δ* 細胞において DSR-RNA の部分的な蓄積が観察された。このことから、ポリ A 付加複合体および Pab2 は DSR-RNA の排除に必要であることが示された。

DSR-RNA の排除におけるポリ A 鎖の重要性をさらに検証するために snRNA のターミネーターを用いた。snRNA のターミネーターは RNA ポリメラーゼ II によって転写を受けるのにもかかわらず、mRNA のターミネーターとは異なりポリ A 鎖が付加されない。DSR-RNA のターミネーターを snRNA のターミネーターで置換したところ、転写された RNA は DSR 配列を持つにもかかわらず細胞内から排除されずに蓄積することが見られた。さらに、snRNA のターミネーターをもつ DSR-RNA に対してポリ A 鎖をシス配列として挿入したところ、再び排除されるようになった。ポリ A 鎖の代わりにポリ T 鎖を挿入しても DSR-RNA が排除されないことから、ポリ A 鎖が Mmi1 による減数分裂特異的 mRNA の排除に不可欠の働きをもつことが示された。

次に、Mmi1 の栄養増殖期における細胞内局在を蛍光ラベルにより解析を試みた。Mmi1 は核内において複数のドット状に観察される。同様に、Rrp6、Dis3、Pla1、Pab2 も核内において複数のドット構造を形成することが見られた。これらのドットは Mmi1 の示すドットと高い共局在性を示した。また、DSR-RNA に特異的なシス配列を導入して非分解型にし、RNA の局在を観察すると、核内でドット構造を形成した。これらのドットは Rrp6、Pla1、Pab2 の示す核内ドット

トとよい共局在性を示した。非分解型でない DSR-RNA をエキソソーム変異体において発現させた場合も核内でドット構造を作ることが観察された。このことから、核内で Mmi1 の示す複数のドット構造が、DSR-RNA の排除などの RNA 代謝を担う可能性が考えられる。

ポリ A 鎖を介した mRNA 分解機構は、原核生物で広く知られている。原核生物の mRNA はポリ A 鎖を持たず、代わりにステムループ構造を持つことでその安定性を獲得している。mRNA が分解される際には 3'末端にポリ A 鎖が付加され、mRNA の分解機構は付加されたポリ A 鎖を足がかりにして RNA を分解すると考えられている。このように、原核生物におけるポリ A 鎖は主に RNA 分解に寄与するのに対して、真核生物におけるポリ A 鎖は RNA の安定化、細胞質への輸送や翻訳の促進に寄与する。しかし近年、真核生物のポリ A 鎖も分解に寄与するという報告が複数の研究室によってなされ、TRAMP(Trf4/5-Air1/2-Mtr4 polyadenylation)複合体は分解を誘導することに特化したポリ A 付加複合体である。本研究で解析した DSR-RNA の分解に TRAMP 複合体が関与する可能性は低く、そのかわりに一般的な mRNA の 3'端の成熟を担うポリ A 付加複合体が深く関与していることがわかってきた。

エキソソームは、その構造の類似性から、タンパク質の分解機構であるプロテアソームとしばしば機能的な比較がなされる。広く知られているように、プロテアソームによる分解の引き金として標的タンパク質のユビキチン化が挙げられるが、エキソソームによる分解の活性化因子に関しては未解明な部分が多い。Mmi1 やポリ A 鎖はエキソソームの活性化因子とも考えられ、エキソソームの分解特異性に関する重要な発見である。

出芽酵母や培養細胞において研究が進んでいる P-body は細胞質において複数のドットとして観察され、種々の RNA 代謝を担うことがこれまでに示されている。本研究において見出した特徴的なドット状の構造体は P-body とは異なり核内に形成される。分裂酵母の核内において RNA 代謝を担う各種のタンパク質や、さらには非分解型 DSR-RNA が特異的な領域に凝集するという結果は、現在までにほとんど報告されたことのない知見であり、今後のさらなる解析が待たれる。