

論文の内容の要旨

論文題目

低分子量 G 蛋白質 RhoA による P-body の形成制御と mRNA 分解機構の解析

氏名 櫻井 京子

【序論】

細胞は恒常性を維持するために外界からの多様な刺激に応じた適切な遺伝子発現が必要であり、転写過程及び翻訳過程を通じて厳密に制御されている。近年、核・細胞質中に様々な RNA-蛋白質凝集体が存在し、RNA 代謝を空間的に制御することでそれぞれが効率的な反応を行っていることが明らかになった。また、RNA 凝集体は癌化や老化、様々な疾患と関連することが明らかになりつつあり、その役割が注目されている。

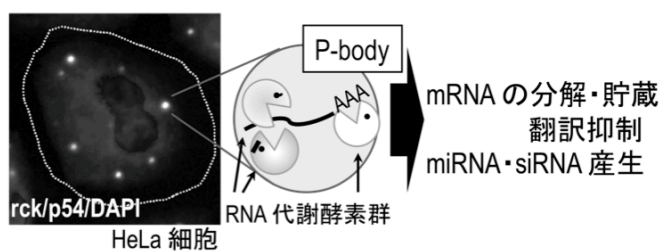


図1 細胞内構造体 P-body

RNA 凝集体の中で、Processing body (以下 P-body)は mRNA と蛋白質からなる細胞質中の凝集体である。P-body に局在する mRNA としては翻訳抑制や分解を受ける mRNA に加え、遺伝子発現の抑制を行う miRNA や siRNA が知られている。また蛋白質とし

ては脱アデニル化酵素、脱キャップ酵素や 5'-3' 方向のエクソヌクレアーゼなどの RNA 分解酵素や、RNAi 経路に置いて働く RISC の構成因子 Ago2 など様々な蛋白質が含まれることが明らかになっている。これらの構成因子によって P-body は mRNA の分解や一時的な翻訳抑制の場を形成していると考えられるが(図 1)、その形成機構および詳細な機能は不明な点が多く残されている。

本研究において私は、P-body の形成制御機構および P-body の形成が RNA 代謝に与える影響を明らかにすることを目的として研究を行った。本研究により、低分子量 G 蛋白質 RhoA が ROCK1 を介して P-body の形成を制御する因子であること、グルコース飢餓などの P-body の形成が促進した状態では、ARE-mRNA の P-body への局在化および本来行われるはずの速やかな分解が抑制されることを明らかにしたので報告する。

【方法と結果】

1. RhoA の活性化により P-body の形成が促進する

まず私は微小管の脱重合促進が P-body の形成を促進するという知見から、P-body の形成に細胞骨格系を制御している低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー分子が関与するのではないかと考えた。そこで、種々の Rho ファミリー分子を過剰発現し、P-body 構成因子 rck/p54 の抗体を用いて HeLa 細胞の免疫染色による P-body の形態変化を指標としたスクリーニングを行い、RhoA によって P-body が小型化することを見いだした。RhoA は、アクチンフィラメントや微小管などの細胞骨格系を制御している分子である。RhoA を過剰発現した細胞は、rck/p54 陽性凝集体の形成が促進するという表現型を示した(図 2A, B)。この構造体が P-body であることを、他の P-body の構成因子である脱キャップ酵素 Dcp1a や翻訳開始因子 eIF4E などが局在することにより確認した。次に P-body の形成促進における RhoA のグアニンヌクレオチド型の依存性について検討を行ったところ、野生型および GTP 型 RhoA のみが P-body の増加を引き起こしたため、RhoA の活性化を介して P-body の形成が制御されていることが明らかになった。

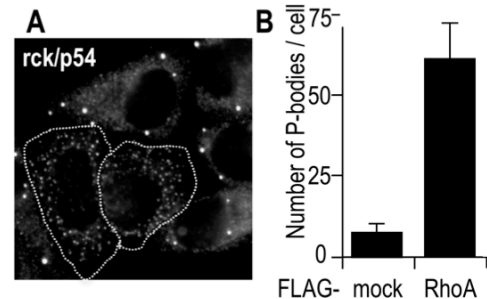


図2 RhoA の過剰発現により P-body の形成が促進する

- (A) RhoA の過剰発現時の P-body (点線で示す)
(B) (A)の定量結果

2. RhoA 発現細胞では ARE-mRNA の P-body への局在及び速やかな分解が抑制される

RhoA の発現により P-body の形成が促進した状態において、P-body で行われている RNA 代謝がどのような影響を受けるのか、通常 P-body に局在することが知られている AU-rich element (ARE) mRNA の局在と分解について検討を行った。ARE 配列は TNF α , GM-CSF(顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子)をはじめとするサイトカインや c-myc, c-fos に代表される転写因子などの一過的に発現する mRNA に見られ、mRNA を不安定化することが知られている。

GM-CSF の ARE 配列を付加したレポーター mRNA, β -globin-ARE の細胞内局在を *in situ* hybridization により検討したところ、RhoA 過剰発現細胞では β -globin-ARE の P-body への局在化が抑制されていた(図 3A, 下段)。また、NIH3T3 細胞における β -globin-ARE の mRNA 分解をノザンブロットにより検討したところ、RhoA の発現により β -globin-ARE の速やかな分解が抑制された(図 3B, 右)。これらの結果から、RhoA を介したシグナル伝達経路により ARE-mRNA の P-body への局在化および分解が制御されている可能性が示唆された。

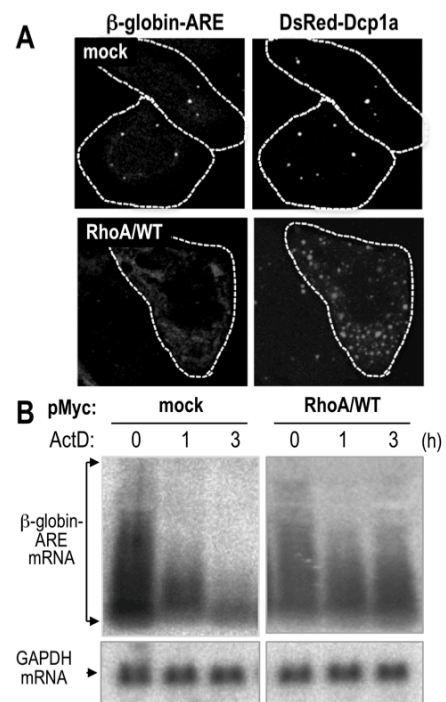


図3 RhoA の発現は効率的な mRNA 分解を阻害する

- (A) RhoA 発現時の β -globin-ARE の局在
(B) RhoA 発現時の β -globin-ARE の分解

3. グルコース飢餓時に RhoA が活性化して P-body の形成が促進する

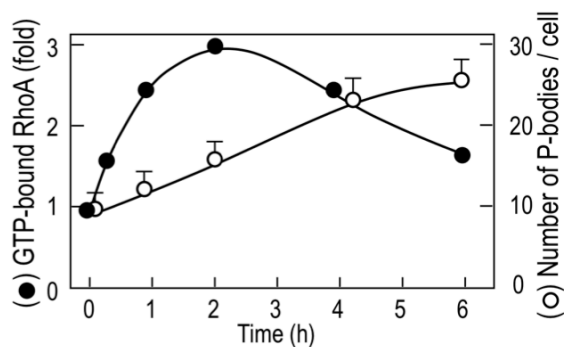


図4 グルコース飢餓時に RhoAが活性化し P-bodyが増加する

次に、細胞にストレス刺激を与えたときの P-body の形成状態を検討する目的で、酵母において P-body が形成されることが知られているグルコース飢餓処理を HeLa 細胞に行い、タイムラプス観察を行った。グルコース飢餓により P-body は増加したが、それは既存の P-body が分裂するのではなく新たな P-body が形成されて増加しているということが見いだした。このとき β -globin-ARE の P-body への局在化は RhoA 発現時と同様に抑制され、分解も遅延した。次にグ

ルコース飢餓において観察された P-body の形成促進に、RhoA の活性化が関与しているのかについての検討を行った。細胞内の GTP 型 RhoA 量は Rhotekin の RhoA 結合ドメインを用いたプルダウンアッセイにより測定し、同時に P-body 数についても測定を行った。その結果、RhoA は 2 時間をピークに活性化しその後活性が定常状態に戻ったが(図 4, ●で示す)、P-body の数は飢餓開始から増加することを見いだした(図 4, ○で示す)。さらに Rhotekin の Rho 結合ドメインを細胞に発現し、RhoA の下流へのシグナル伝達を抑制した細胞にグルコース飢餓処理を行ったところ、グルコース飢餓時に観察されていた P-body の増加が抑制された。以上の結果から、培養細胞においてグルコース飢餓時に RhoA を介したシグナル経路により P-body の形成が促進し、ARE-mRNA の局在や分解が制御されることが示唆された。

4. RhoA 発現時およびグルコース飢餓時に Tristetraprolin の蛋白量が減少する

ARE-mRNA の分解には ARE-mRNA 結合蛋白質 Tristetraprolin(以下 TTP)が ARE-mRNA を P-body に局在化させることが重要であることが示されている。そこで、FLAG-TTP 発現細胞に、RhoA 過剰発現・グルコース飢餓処理を行いこのときの TTP 蛋白量を検討したところ、TTP の蛋白量が減少することを見いだした。このことから、TTP の蛋白量が減少することにより、ARE-mRNA が P-body に局在化しなくなることでその速やかな分解が抑制されている可能性が示唆された。

5. RhoA による P-body の形成制御は Rho effector ROCK1 を介する

RhoA のエフェクターはこれまでに数多く同定されていることから、RhoA がどのエフェクターを介して P-body の形成を制御しているかを検討した。それぞれのエフェクターとの親和性を低下させる各種変異体を細胞に発現させ、P-body の形成に与える影響を検討した。その結果、セリン・スレオニンキナーゼ ROCK1 との相互作用が低下した変異体では RhoA により引き起こされる P-body の小型化が抑制された。さらに、ROCK1 発現抑制細胞では P-body が消失したことから(図 5, 右)、P-body の形成には ROCK1 を介した RhoA シグナル経路が重要であることが示された。

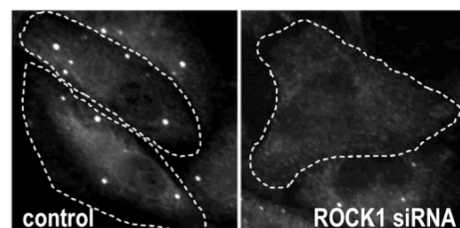


図5 ROCK1 発現抑制は P-body が消失する

【まとめ】

本研究の結果から、P-bodyはARE-mRNAの分解の場であることが考えられる。グルコース飢餓などを含むストレス時にRhoAが活性化しROCK1を介して細胞骨格系もしくは他の標的因子のリン酸化状態を変化させることでシグナルを伝え、同時にTTPの蛋白量が減少し、ARE-mRNAを含まないP-bodyが形成されることでmRNAの分解を抑制し、サイトカインや転写因子の産生を亢進していることが想定される。(図6)。

Rhoファミリー低分子量G蛋白質は広範な細胞応答を調節していることがよく知られているが、本研究によりRhoAがストレス状態のP-bodyダイナミクスを変化させることでARE-mRNAの局在と分解の調節に関与していることが初めて示された。本研究において得られた知見はP-body形成分子機構の解明およびP-bodyで行われているRNA代謝の解明に対して新たな手がかりを与えるものと期待される。

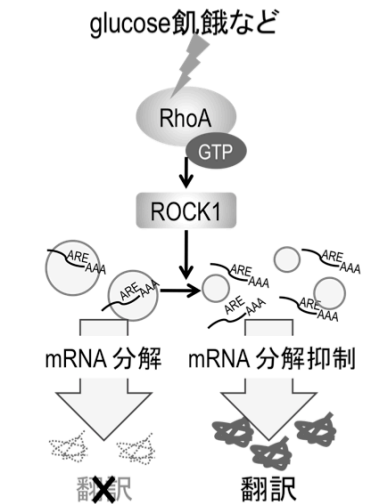


図6 RhoA活性化時のP-body形成制御のモデル