

## 審査の結果の要旨

氏名 櫻井 京子

恒常性を維持するために、細胞は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、細胞の核・細胞質内に様々な 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された。このうち、Processing body (以下 P-body) は mRNA と種々の RNA 分解酵素からなる細胞質中の凝集体であり、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、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。「低分子量 G 蛋白質 RhoA による P-body の形成制御機構と mRNA 分解機構の解析」と題した本論文において、RhoA がその標的であるセリン・スレオニンキナーゼの ROCK1 を介して P-body の形成を制御し、グルコース飢餓などの P-body の形成が促進した状態で、ARE-mRNA の P-body への局在化および速やかな分解が抑制されることを見出している。

### 1. RhoA の活性化により P-body の形成が促進する

微小管脱重合促進が P-body の形成を促進するという知見から、細胞骨格系を制御する低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー分子が P-body の形成に関与するのではないかと考えた。そこで、種々の Rho 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出した。P-body の形成促進における RhoA のグアニンヌクレオチド結合型について検討したところ、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、P-body の形成は RhoA の活性化を介して制御されていることが明らかになった。

### 2. RhoA の過剰発現は ARE-mRNA の P-body への局在及び速やかな分解を抑制する

RhoA の過剰発現により P-body の形成が促進した状態において、RNA 代謝がどのような影響を受けるのか、通常 P-body に局在して速やかな分解を受ける AU-rich element (ARE) mRNA の分解と局在について検討を行った。NIH3T3 細胞において、GM-CSF の ARE 配列を付加した  $\beta$ -globin-ARE-mRNA の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  $\beta$ -globin-ARE の速やかな分解が抑制された。このときの細胞内局在を *in situ* hybridization により検討したところ、RhoA 過剰発現細胞では  $\beta$ -globin-ARE の P-body への局在化が抑制された。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された。

### 3. グルコース飢餓は RhoA を活性化して P-body の形成を促進する

HeLa 細胞をグルコース飢餓したところ、P-body が増加した。このとき  $\beta$ -globin-ARE の分解は遅延し、P-body への局在化は抑制された。このグルコース飢餓時の P-body の形成促進に、RhoA の活性化が関与しているのかを、活性型 RhoA と特異的に結合する Rhotekin の RhoA 結合ドメイン (RBD) を用いたプルダウンアッセイにより検討した。その結果、P-body 数は飢餓開始から増加したが、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ることを見出した。さらに、Rhotekin-RBD を細胞に発現して RhoA シグナルの下流への伝達を抑制したところ、グルコース飢餓時の 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 を介して 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 過剰発現およびグルコース飢餓により 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。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して TTP 蛋白量を測定した結果、TTP 蛋白量が減少することを見出した。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 に局在化しなくなり、その速やかな分解が抑制される可能性が示された。

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

RhoA が複数あるエフェクターのうち、どの分子を介して P-body の形成を制御しているかを検討した。各種のエフェクターと親和性が異なる種々の RhoA 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の 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、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。

本論文から、RhoA が Processing body の形成を制御することが示され、P-body の形成が ARE-mRNA 分解に必要であることが明らかにされた。本論文は、細胞質に形成される RNA 凝集体 P-body の形成メカニズムとその意義について、新たに重要な知見を提示しており、博士 (薬学) の学位として十分な価値があるものと認められる。