

氏名(本籍)	ふく だ とし ゆき (秋田県) 福 田 敏 之 (秋 田 県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5477 号		
学位授与年月日	平成 22 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	ストレス応答における RNA 結合タンパク質 hnRNP K と RBM42 の機能解析		
主 査	筑波大学教授	理学博士	石 井 哲 郎
副 査	筑波大学准教授	医学博士	内 田 和 彦
副 査	筑波大学講師	博士(理学)	三 輪 佳 宏
副 査	筑波大学助教	博士(薬学)	船 越 祐 司

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

動物細胞が種々のストレスに晒された時に、転写と翻訳の両方を制御して、そのストレスを回避する仕組みが存在する。ストレス負荷時において、翻訳制御や mRNA 安定化制御など RNA レベルでの制御機構に関する因子として、RNA 結合タンパク質の一つである hnRNP K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K) が知られているがその詳細な機能については不明なことが多い。本研究では、動物細胞において hnRNP K の機能を解析するために新規結合因子である RBM42 (RNA binding motif protein 42) をクローン化し、hnRNP K との相互作用を検討し、ストレス解除後の細胞内 ATP 濃度の回復を指標としてストレス防御機能を検討した。

### (対象と方法)

Yeast two hybrid 法を用いて、ラット肺 cDNA ライブラリーより hnRNP K に結合する新規の結合因子の探索を行った。その結果、RBM42 という機能未知のタンパク質を選別した。実験系としては MTD-1A 細胞や HeLa 細胞など高等動物株化細胞を用いた。RBM42 と hnRNP K の細胞内での相互作用を確認するために抗体を作成し、免疫染色および細胞分画により hnRNP K と RBM42 の細胞内局在を調べた。また、hnRNP K および RBM42 をそれぞれノックダウンした細胞を用いてストレス条件下での細胞内 ATP 量の測定を経時的に行い、hnRNP K および RBM42 の ATP 量回復の効果を検討した。他に、ノーザンブロット法、ウェスタンブロット法、レトロウイルスベクターによる強制発現系も一部の実験で用いた。ストレス剤としてピューロマイシン、亜ヒ酸、浸透圧ショック等を用いた。

### (結果)

免疫沈降実験により、hnRNP K と RBM42 は細胞内で RNA 依存的に相互作用することを確認した。また、精製したタンパク質を用いた in vitro binding assay でも hnRNP K と RBM42 の結合を確認した。細胞内局在については、hnRNP K および RBM42 の免疫染色では核内が強くと染色されたが、細胞分画によると hnRNP K および RBM42 とともに核と細胞質の両方の画分に存在することを確認した。ストレス条件下では、両者は核

内と細胞質に形成される Stress Granule で共局在することを明らかにした。ストレス応答における両タンパク質の役割を調べるため、それぞれノックダウンして比較を行った。細胞ストレスとその回復の評価を細胞内 ATP 量の変化を指標として行った。コントロール細胞では、ストレス源を取り除くと低下した ATP が速やかに回復するが、hnRNP K のノックダウン細胞では、ATP 量の回復が十分でないことが観察された。一方、RBM42 のノックダウン細胞では ATP 量の回復は正常であった。興味深いことに、RBM42 と hnRNP K とのダブルノックダウンでは、hnRNP K 単独のノックダウンの効果を増大させることが観察された。また RNA 結合能を低下させた hnRNP K を発現させた細胞では ATP 量回復低下をレスキューしなかった。従って、hnRNP K の RNA 結合能がストレス耐性に関与していると考えられる。

#### (考察)

Stress Granule はストレス条件下で翻訳の停止した mRNA や RNA 結合タンパク質が凝集することにより形成される構造物であり RNA を一時的に保存する場であると考えられている。hnRNP K は Stress Granule に局在することが知られていたが、本実験により RBM42 が hnRNP K と挙動を共にし、ストレス耐性に寄与していることを証明した。両タンパク質の相互作用については、hnRNP K の C 末端および RBM42 の C 末端同士の間接の結合を示したが、hnRNP K の N 末側にある RNA 結合ドメインの KH1 および KH2 ドメインにより hnRNP K および RBM42 の結合が調節されている可能性が考えられた。細胞内 ATP 量の測定実験から hnRNP K および RBM42 がストレス状態からの復帰における ATP 量の回復過程に関与することが示唆された。hnRNP K は RNA との結合を介して RBM42 と相互作用し、ATP 量の制御に関与するものと考えられる。その仕組みについては、ミトコンドリア局在のタンパク合成が関与している可能性があるが、今後の検証が必要である。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、高等動物細胞のストレス応答に関与する hnRNP K の新規結合因子として RBM42 を同定し、両者の相互作用とストレスに対する協調的な細胞防御機構について解析した優れた研究成果であると評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。