

氏名（本籍）	木村 雄一
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 7423 号
学位授与年月	平成 27 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	遺伝子発現の転写後調節における Pbp1 の機能解析

主査	筑波大学教授	医学博士	久武 幸司
副査	筑波大学講師	博士（医学）	詫間 浩
副査	筑波大学助教	博士（医学）	川口 敦史
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）

真核生物における転写後の遺伝子発現制御は、ストレス応答や恒常性の維持に重要な役割を果たしている。この制御には RNA 結合タンパク質による mRNA の局在、安定性、分解機構や翻訳制御機構が重要で、この基礎的なメカニズムは高度に進化上保存されている。

出芽酵母において、RNA 結合タンパク質 Khd1 と Poly(A)分解酵素 Ccr4 が、低分子量 G タンパク質 Rho1 のグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）をコードする *ROM2* mRNA を安定化し、Ccr4 が GTPase-activating Protein をコードする *LRG1* mRNA を不安定化することで、Rho1 の GTPase 活性を介して細胞壁合成を制御している。そのため、*khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株は Rho1 の活性低下による細胞壁合成阻害、細胞溶解（Cell lysis）を起こし、著しい増殖遅延を示す。本研究では、Khd1 および Ccr4 を介した転写後の遺伝子発現制御機構の理解を深めることを目的とした。

（対象と方法）

まず、Khd1 および Ccr4 と遺伝的相互作用を示す Poly(A)-binding protein (Pab1) -binding protein 1 (Pbp1) との関連性が報告されている既知の因子との遺伝的相互作用を検討し、Pbp1 による細胞増殖制御機構について解析した。次に、Yeast two-hybrid screening を行い、Pbp1 と結合する因子の探索を行った。Pbp1 のドメイン解析を行い、各ドメインの機能を明らかにした。

（結果）

Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用を検討した結果、Pbp1 をコードする *PBP1* 遺伝子の欠損が *khd1Δ*

*ccr4Δ*二重変異株および *khd1Δ pop2Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧したが、*khd1Δ dhh1Δ*二重変異株の増殖遅延は抑圧しなかった。しかしながら、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株では野生型と比較して Rom2 の発現量が低下し、Lrg1 の発現量が上昇するが、*pbp1Δ*変異はこれらの発現量に影響しなかった。また、Pbp1 と相互作用を示す既知の因子群 (Lsm12、Mkt1、Pbp4) は Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用を示さなかった。さらに、Ccr4-Pop2 とは別の poly(A)分解酵素 Pan2 との遺伝学的解析から、Pbp1 は Pan2 依存的に Khd1 および Ccr4 による細胞増殖制御に関わる一方で、Pbp1 は Pan2 非依存的にも細胞増殖を制御する可能性が示された。以上より、Pbp1 を介した新規の細胞増殖制御機構の存在が示唆された。

Yeast two-hybrid screening の結果、Pbp1 がリボソームタンパク質 Rpl12a および Rpl12b と結合することを見出し、さらにこの結合は Pbp1 の RNA 結合ドメインである Lsm ドメインおよび Lsm AD ドメインを介して結合することを明らかにした。さらに、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株に野生型の *PBP1* を導入すると *pbp1Δ*変異の表現型は相補されるが、Rpl12a および Rpl12b との結合領域を欠損させた *PBP1 ΔLSM ΔLSM AD* は相補しなかった。また、Pab1 との結合領域である 468~722 番目のアミノ酸配列を欠損させた場合も *khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株における *pbp1Δ*変異の表現型は相補されなかった。

(考察)

Khd1 および Ccr4 を介した細胞増殖制御機構において、Pbp1 は細胞増殖を負に制御している可能性が示唆された。この作用は、Pbp1 の既知の相互作用因子群 (Lsm12、Mkt1、Pbp4) とは異なるメカニズムを介していることが示唆された。一方、Pan2 との遺伝的相互作用の報告から、Poly(A)鎖分解を介した mRNA 安定性制御に機能していると推測されたが、実際には Pan2 を介した制御は部分的であり、Pan2 非依存的な制御の存在も示唆された。さらに、Pbp1 はリボソームと協調、そして Pab1 との結合を通して翻訳制御に機能することで、Khd1 および Ccr4 を介した細胞増殖制御に関与している可能性が考えられた。*khd1Δ ccr4Δ*二重変異下において、Pbp1 は Poly(A)鎖の制御に機能するだけでなく、翻訳制御にも機能することで、細胞増殖を負に制御していることが示唆された。

本研究の結果は、出芽酵母における遺伝子発現制御機構の解明だけでなく、Pbp1 のオルソログである ATXN2 の機能解析、ひいては脊髄小脳変性症の発症メカニズム解明の一助となることが期待される。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、Pbp1 が Khd1 および Ccr4 を介した細胞増殖制御機構に機能し、その RNA 結合ドメインを介してリボソームタンパク質 Rpl12a および Rpl12b と結合することを明らかにした。また、Pbp1 の機能には RNA 結合ドメインおよび Pab1 との結合が重要であることも示した。以上の結果から、Pbp1 は、Poly(A)鎖の制御を介して RNA 代謝に関与するのみならず、リボソームタンパク質と協調して翻訳を制御する可能性が示唆された。転写後の遺伝子発現調節において、RNA 結合タンパク質が新規のメカニズムで作用することを示した点で、本研究は高く評価できる。

平成 26 年 12 月 24 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。