

遺伝子発現の転写後調節における
Pbp1 の機能解析

2 0 1 4

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

木 村 雄 一

概要

【背景】

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 への結合をきっかけに mRNA の局在、安定性、分解機構や翻訳制御機構を介して適切な時間および場所での遺伝子発現がファインチューニングされており、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。

これまでに当研究室では出芽酵母において RNA 結合タンパク質 Khd1 と Poly(A)分解酵素 Ccr4 が低分子量 G タンパク質である Rho1 の Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF)をコードする *ROM2* mRNA の安定化に作用し、Ccr4 が GTPase Activating Protein (GAP)をコードする *LRG1* mRNA の不安定化に作用することで Rho1 の GTPase 活性を調節し、正常な細胞壁合成関与していることを明らかにした。*KHD1* および *CCR4* 遺伝子を欠損させた *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、その結果として著しい増殖遅延を示す。しかしながら、Khd1 は 1000 以上もの mRNA を標的とし、Ccr4 は広範な mRNA の Poly(A)分解に機能していることから、細胞壁合成制御は Khd1 および Ccr4 が関与する遺伝子発現制御の 1 例にすぎないと考えられる。そこで、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、研究を行った。

【方法】

1. Khd1 および Ccr4 と遺伝的相互作用を示す因子の探索を行った。
2. Pbp1 はどのように細胞増殖制御に機能しているのか、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た。
3. Pbp1 はどのような因子と相互作用しているのかを明らかにする目的で、Yeast two-hybrid screening を行い、Pbp1 と結合する因子の探索を行った。
4. Pbp1 の機能に対するドメイン解析を行った。

【結果】

1. *pbp1Δ* 変異は *khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株の増殖遅延を抑制する
RNA レベルでの遺伝子発現制御に関わることが知られている既知の因子

と、Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用を検討した結果、Poly(A)-binding protein (Pab1) -binding protein (Pbp1)をコードする *PBP1* 遺伝子の欠損が *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧した。また、*pbp1Δ*変異は *khd1Δ pop2Δ*二重変異株の増殖遅延をも抑圧した。しかしながら、*khd1Δ dhh1Δ*二重変異株の増殖遅延は抑圧しなかった。さらに、*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。

2. Pbp1 は新規メカニズムを介して細胞増殖制御に機能する

Pbp1 と相互作用を示す既知の因子群 (Lsm12、Mkt1、Pbp4) と Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用を検討したが、これらの因子の遺伝子変異は *pbp1Δ*変異とは異なり、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧しなかった。また、Pbp1 は Ccr4 とは別に機能する Poly(A)分解酵素 Pan2 の活性を負に制御していることが知られている。*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株と比較して *khd1Δ ccr4Δ pan2Δ*三重変異株はさらに増殖遅延を示すが、*pbp1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ pan2Δ*三重変異株の増殖遅延も抑圧した。この結果から、Pbp1 は Pan2 依存的に Khd1 および Ccr4 を介した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を示した。

3. Pbp1 はリボソームタンパク質と結合する

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。また、Rpl12a および Rpl12b と Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用を検討した結果、*pbp1Δ*変異同様に *rpl12aΔ*および *rpl12bΔ*変異も *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧した。

4. Pbp1 の機能には Lsm および Lsm AD、Pab1 との結合が必要である

*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。Pbp1 は脊髄小脳変性症の原因として知られる ATXN2 の酵母オルソログであり、Lsm および Lsm AD の構造、Poly(A)鎖の制御やストレス顆粒への局在など機能は進化上保存されている。これまでに報告されていた Pbp1 との相互作用因子 Mkt1、Lsm12 や Pbp4 は、Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用を示さなかったことから、Pbp1 はこれまでとは異なるメカニズムで遺伝子発現制御に機能していることが考えられた。Pbp1 は Poly(A)分解酵素である Pan2 の活性制御に機能することから、Poly(A)鎖の分解を介した mRNA 安定制御に機能していると推測された。しかしながら、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。

Pbp1 はリボソームタンパク質 Rpl12a および Rpl12b と結合し、さらに *rpl12aΔ* および *rpl12bΔ*変異も *pbp1Δ*変異と同様に *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧した。また、Pbp1 の機能には Pab1 との結合が重要であることが示された。これらの結果から、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、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に対する基礎的知見として寄与できるものと考えられる。

【結論】

本研究では、Pbp1 が既知の相互作用因子とは異なった経路を通じて、Khd1 および Ccr4 を介した細胞増殖制御機構に機能した。Pbp1 はリボソームタンパク質、Rpl12a および Rpl12b と Pbp1 の RNA 結合ドメインを介して結合することを明らかにした。さらに、*pbp1Δ*変異同様に *rpl12aΔ*および *rpl12bΔ*変異も *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧した。Pbp1 の機能には RNA 結合ドメイン、Pab1 との結合が重要であった。以上の結果から、Pbp1 には、Poly(A)鎖の制御を介した RNA 代謝における既知の機能に加えて、リボソームタンパク質と協調して翻訳を制御する機能が存在する可能性が示唆された。

目次

	ページ
概要	. . . 1
目次	. . . 4
第1章 序論	
遺伝子発現における転写後調節	. . . 6
RNA 分解機構	. . . 7
Poly(A)-binding protein (Pab1)-binding protein, Pbp1 について	. . . 8
RNA 結合タンパク質 Khd1 と Poly(A)分解酵素 Ccr4 による細胞壁合成制御	. . . 9
第2章 材料と方法	. . . 12
第3章 <i>khd1Δ ccr4Δ</i>二重変異株において、Pbp1 は細胞増殖を負に制御する	
<i>pbp1Δ</i> 変異は <i>khd1Δ ccr4Δ</i> 二重変異株の増殖遅延を抑圧する	. . . 18
<i>pbp1Δ</i> 変異は <i>khd1Δ ccr4Δ</i> 二重変異株の cell lysis を部分的に抑圧する	. . . 19
<i>pbp1Δ</i> 変異は <i>pop2Δ</i> 変異の増殖遅延を抑圧するが、 <i>dhh1Δ</i> 変異株の増殖遅延を抑圧しない	. . . 20
第4章 Pbp1 の機能的な解析	
Pbp1は新規のメカニズムによりKhd1およびCcr4を介した制御に機能する	. . . 26
<i>Pbp1Δ</i> 変異は Pan2 依存的・非依存的に <i>ccr4Δ</i> 変異株の増殖遅延を抑圧する	. . . 26
第5章 Pbp1 と結合する因子の探索	
Pbp1 はリボソーム大サブユニットの構成因子、Rpl12a および Rpl12b と結合する	. . . 31
<i>rpl12aΔ</i> 変異および <i>rpl12bΔ</i> 変異は <i>khd1Δ ccr4Δ</i> 二重変異株の増殖遅延を抑圧する	. . . 32

第6章	Pbp1 のドメイン解析	
	Rpl12a および Rpl12b は Pbp1 の Lsm および Lsm AD に結合する	・・・ 36
	Pbp1 の Lsm および Lsm AD は <i>khd1Δ ccr4Δ</i> 二重変異株の細胞増殖を 負に制御する機能に必要なである	・・・ 36
	Pbp1 は Pab1 依存的に <i>khd1Δ ccr4Δ</i> 二重変異株の細胞増殖を 負に制御す	・・・ 37
第7章	総括および展望	
	Pbp1 による遺伝子発現制御	・・・ 42
	Pbp1 は <i>khd1Δ ccr4Δ</i> 二重変異株の細胞増殖を負に制御する	・・・ 43
	Pbp1 はリボソームと協調して細胞増殖に機能する	・・・ 44
	Khd1 および Ccr4 を介した細胞増殖制御において、Pbp1 の機能には Lsm ドメインおよび Pab1 との結合が必要とされる	・・・ 46
	展望	・・・ 49
	参考文献	・・・ 51
	謝辞	・・・ 57

第 1 章

序論

遺伝子発現における転写後調節

真核生物における遺伝子発現は、核内で DNA が mRNA へ転写され、転写された mRNA は核外へ輸送、細胞質で翻訳されてタンパク質が合成される。転写後の遺伝子発現制御は主にスプライシング、安定化、局在化、そして翻訳における制御が挙げられ、適切な時間および場所での遺伝子発現がファインチューニングされている。mRNA の段階における遺伝子発現の制御 (RNA 制御) の代表例として 3 つの事象が挙げられる。まず 1 つめは、細胞の非対称性の獲得であり、単一の細胞から非対称な細胞群が分化する。2 つめは、多様性の獲得である。分化の過程でスプライシングを介することで遺伝子産物が新たな機能を獲得し、細胞が多様性を獲得する。3 つめは RNA の品質管理である。RNA が厳密に管理されることは、RNA の段階における制御の正確性を保証するために重要な機構である。この RNA 制御は遺伝子発現のファインチューニングの制御を介して、迅速なストレスへの応答や恒常性の維持に大きく貢献している。さらに RNA 制御の理解を深めることは、疾患の分子機構、生物の進化や多様性、記憶や学習を含む神経機能など、様々な分野において課題解決のために必要とされるため、RNA 制御の全貌を明らかにすることが求められる。

遺伝子発現における転写後調節には種々多様な RNA 結合タンパク質が強く関与しており、それぞれのイベントで mRNA の発現制御を厳密に管理している (Hogan et al., 2008)。ヒト hnRNP K の酵母オルソログである RNA 結合タンパク質 Khd1 は K-Homology domain を持ち、CNN リピート配列に結合する。出芽酵母は出芽の際に接合型が変わらないように制御されており、エンドヌクレアーゼ *HO* が接合型の調節に機能している。この過程で Khd1 は *HO* の転写因子として知られる Ash1 をコードする *ASH1* mRNA に結合し、翻訳を抑制することで細胞の非対称性を制御している (Irie et al., 2002)。また、Khd1 は細胞膜センサーをコードする *MTL1* mRNA に結合して、mRNA の安定化に機能する (Hasegawa et al., 2008, Mauchi et al., 2010)。このように特定の分子における、遺伝子発現制御機構は日々報告されているが、まだまだ全貌を明らかにするにはならず、さらなる解析が求められる。

RNA 分解機構

転写された mRNA の 3'末端はポリアデニル化され、成熟 mRNA は Poly(A)尾部を有し、Poly(A)鎖の長さは mRNA の半減期に大きく影響している。この Poly(A)鎖には Poly(A)-binding protein (Pab1)が結合する (Sachs et al., 1986)。mRNA の 5'末端には 7-メチルグアニンキャップ構造が形成され、RNA 分解因子から RNA を保護する役割がある。このキャップ構造に eIF4E が結合し、eIF4G が足場タンパク質として eIF4E および Pab1 と結合することで環状構造を形成する (図 1A)。この環状構造は翻訳を始めとする様々な反応を効率よく進めるためである (Sonenberg et al., 2009)。前述したように mRNA は厳密に制御されており、この制御メカニズムの代表的な例として mRNA 分解が挙げられる。mRNA 分解機構は Poly(A)鎖の短縮から始まる。Poly(A)鎖の分解には Poly(A) ribonuclease である Pan2-Pan3 複合体と Poly(A)分解酵素 Ccr4 と Not ファミリーから構成される Ccr4-Not 複合体が高度に保存されており、Poly(A)鎖の分解に機能する (Collart et al., 2003; Parker, 2012)。出芽酵母において、Pan2 と Ccr4 はそれぞれの触媒サブユニットとして機能する。まず、最初に Pan2-Pan3 複合体がこの Pab1 と結合することにより Poly(A)鎖を短縮する。その後、Ccr4-Not 複合体が Pab1 と結合し、さらに Poly(A)鎖を短縮する。ほ乳類では Ccr4-Not 複合体は Tob タンパク質を介して PABP と結合するが、この Tob と Pan2 が競合して PABP に結合することで Poly(A)鎖の分解を制御している (Funakoshi et al., 2007)。Poly(A)分解が引き金となり、脱キャップ反応に関わる因子、Pat1 や Lsm1-7 複合体などが mRNA に結合し、プロセッシングボディ (P-body) を形成する。ここで mRNA はキャップ構造の分解酵素 Dcp1 および Dcp2 によって脱キャップ化される。脱キャップ反応には Dhh1、Edc3、Scd6、Pat1 が活性化因子として知られている。この過程で脱キャップ化された mRNA はエキソヌクレアーゼの Xnr1 による 5'→3'分解や、Ski7 などによる 3'→5'分解がされる。一方、脱キャップ化を逃れた mRNA は再利用され翻訳される (Parker 2012)。Ccr4 はグローバルな Poly(A)分解に機能すると推測され、*ccr4Δ*変異株は、G1/S 期チェックポイント阻害、細胞周期阻害、異常な細胞形態を示すことから様々な制御に機能していることが考えられるが、実際には CCR4 遺伝子欠損による mRNA の発現量への影響は 300 種類ほどに留まる (Manukyan et al., 2008; Nowel et al., 2009; Traven et al., 2009)。また RNA 結合タンパク質 Mpt5 は、標的 mRNA の 3' untranslated region (3' UTR)に結合し、Ccr4-Not 複合体を呼び込むことで Poly(A)分解の促進に機能するなど、Poly(A)

鎖の分解には多くの因子が関与していることが推測されているが、その制御メカニズムの全貌は明らかになっていない (Tadauchi et al., 2001, 2004; Goldstrohm et al., 2005)。

Poly(A)-binding protein (Pab1)-binding protein, Pbp1 について

出芽酵母 Pbp1 は ATXN2 の酵母オルソログであり、線虫、ショウジョウバエ、マウス、ヒトまで高度に保存されている RNA 結合タンパク質である。ヒト ATXN2 は神経変性疾患である脊髄小脳変性症 2 型の原因遺伝子として知られている。Pbp1 は Pab1 に結合するタンパク質として最初に同定され (図 1A)、ポリグルタミン (PolyQ) 領域は存在しないが、Like-Sm domain (Lsm)、Lsm associated domain (LsmAD) の RNA 結合ドメインと、3'末端領域に Self-interact region を有する (図 1B)。Pbp1 は Poly(A)分解酵素 Pan2 の活性を抑えることで Poly(A)鎖の長さを制御している (Mangus et al., 2004) (図 1D)。また、Pbp1 はポリソーム画分への局在やストレス条件下で翻訳を負に制御するストレス顆粒 (SGs) へ局在する (Tadauchi et al., 2004; Buchan et al., 2008; Swisher et al., 2010) (図 1C)。これらのことから、Pbp1 は RNA 代謝や翻訳制御に機能すると考えられている。過去の報告から、Pbp1 はヌクレアーゼ活性を持つ Mkt1 と協調して酵母のエンドヌクレアーゼ HO の発現制御に機能することや (Tadauchi et al., 2004)、ヒト ATXN2 は AU rich な配列に結合して標的 mRNA の安定化に機能することで結果的にタンパク質量が増加することが報告されている (Yokoshi et al., 2014)。遺伝子発現制御以外の機能として、熱ストレス条件下において Pbp1 は栄養応答性増殖因子 Target of rapamycin complex 1 (TORC1) を SG に取り込むことで熱ストレスによって生じる遺伝子突然変異を防いでいる (Takahara et al., 2012)。また先行研究で、*ccr4Δ*変異株は DNA 合成阻害剤に感受性を示すが、*pbp1Δ*変異がこの感受性を抑圧すること (Woolstencroft et al., 2006)、さらに近年、Pbp1 は RNA に結合して RNA-DNA 相互作用を抑えることで複製寿命を制御していることが示され (Salvi et al., 2014)、これまで報告されてきた遺伝子発現制御以外の機能として新規の役割も明らかにされつつあり、恒常性維持に機能していることが推測される。しかしながら、Pbp1 は高度に保存されているにもかかわらず、*pbp1Δ*変異は細胞増殖に著しい表現型を示さないため、その機能や生理的意義についてはまだ深く理解されていない。

RNA 結合タンパク質 Khd1 と Poly(A)分解酵素 Ccr4 による細胞壁合成制御

RNA 結合タンパク質 Khd1 は、ヒト hnRNP K の酵母オルソログである。過去の報告から、Khd1 は 1000 以上もの mRNA をターゲットとして持ち、転写因子 Ash1 の局在制御や細胞壁の膜センサー Mtl1 の発現制御に機能していることが知られているが、*khd1Δ*変異株は野生型と比較してその表現型に著しい変化を示さないため、その生理的意義の多くは理解されていなかった (Hasegawa et al., 2008, Mauchi et al., 2010)。そこで、Khd1 と遺伝的相互作用を示す因子のスクリーニングを行ったところ、Poly(A)分解酵素である Ccr4 と Khd1 をコードする遺伝子を欠損させた *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株は、野生型と比較して著しい増殖遅延を示した。Ccr4-Not 複合体の構成因子で、調節サブユニットをコードする *POP2* 遺伝子を欠損させた *khd1Δ pop2Δ*二重変異株も増殖遅延を示した。*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株および *khd1Δ pop2Δ*二重変異株は細胞溶解 (cell lysis) を起こし、さらに高温感受性を示した。また、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株に *KHD1* および *CCR4* を発現するプラスミドを導入すると、高温感受性は抑圧される。ところが、RNA 結合能を低下させた *KHD1-L284N*、触媒活性を低下させた *CCR4-E556A*、*CCR4-D713A* は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の高温感受性を抑圧しなかった (data not shown, 未発表データ)。このことから、Khd1 の RNA 結合能および Ccr4 の Poly(A)分解活性が細胞増殖制御に必要であることが示された。次に、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株に対して、マルチコピーサプレッサースクリーニングを行った結果、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* の過剰発現が *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧することを見出した。さらなる解析から、*ROM2* mRNA に対して Khd1 および Ccr4 は安定化に機能することが明らかになった。一方で、Rho の GTPase 活性化タンパク質 (GAP) をコードする *LRG1* mRNA に対しては Ccr4 が単独で不安定化に機能することが明らかになった。さらに、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株において活性型 Rho1 を過剰発現させると高温感受性が抑圧された。つまり、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株では *ROM2* mRNA の発現量が低下し、*LRG1* mRNA の発現量が増加することにより、Rho1 の活性低下が引き起こされることが推測される (Levin et al., 2005)。その結果として、正常な細胞壁合成が行われず cell lysis を生じることが原因となり著しい増殖遅延を招くことが考えられた。これらのことから、Khd1 と Ccr4 は Rho1 の GEF と GAP、つまり、Rom2 と Lrg1 の発現を mRNA レベルで調節することで細胞壁合成を制御していることが明らかとなった (Ito et al., 2011) (図 2)。

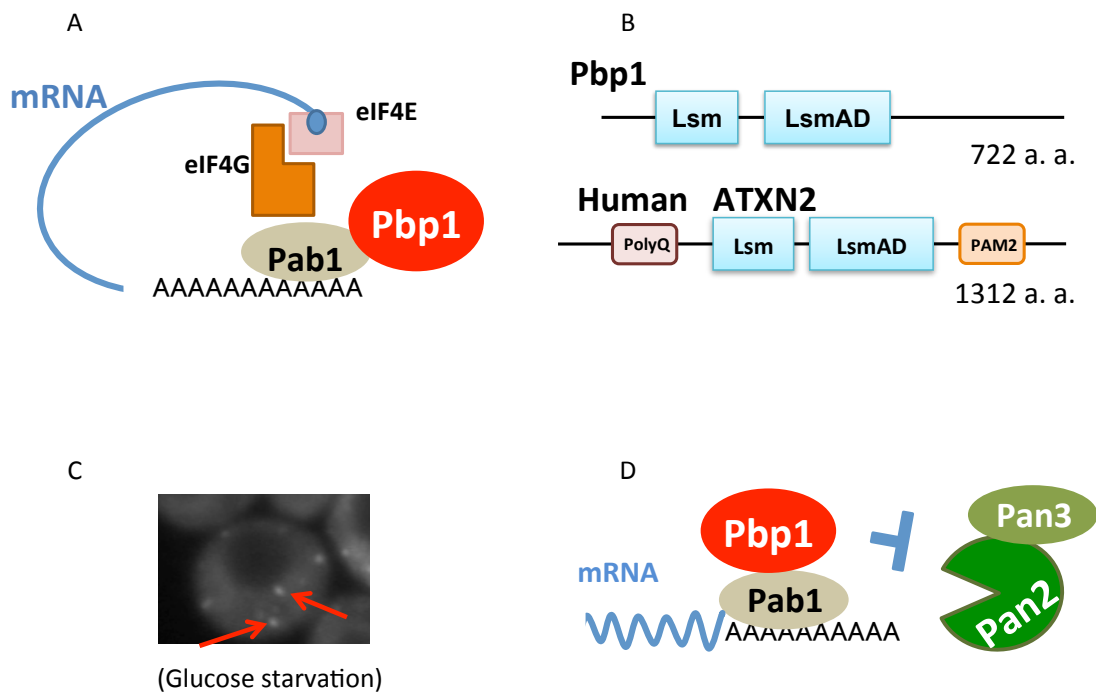


図 1 . Pbp1 について

- A. Pbp1 は Poly(A)-binding protein (Pab1)-binding protein として同定された。
- B. Pbp1 は ATXN2 の酵母オルソログであり、構造は高度に保存されている。
- C. グルコースを含まない液体培地で 10 分間処理をした後、蛍光顕微鏡で観察した。Pbp1 はストレス条件下で SG に局在する。
- D. Pbp1 は Pan2 の活性を抑えることで Poly(A)分解を制御している。

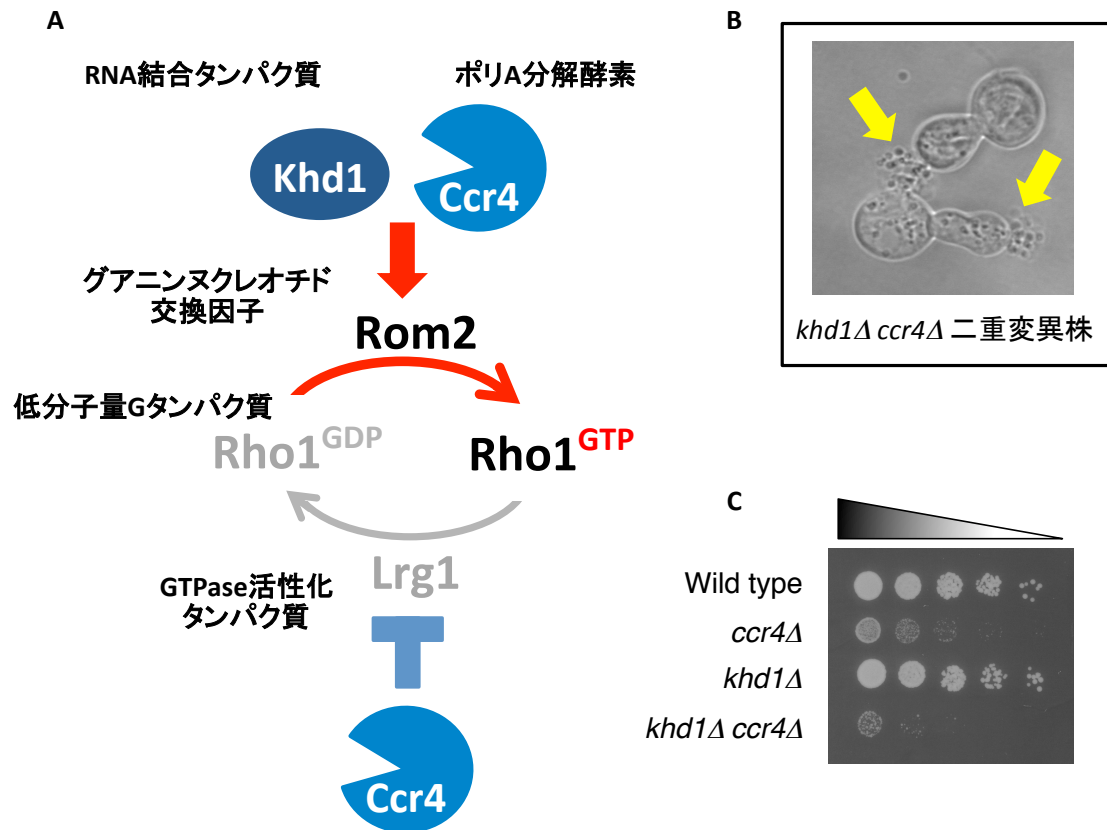


図 2. Khd1 および Ccr4 は細胞壁合成制御に機能している

- A. Khd1 と Ccr4 は協調して Rho GEF の ROM2 mRNA を安定化する一方で、Ccr4 が単独で Rho GAP の LRG1 mRNA を不安定化に機能することで Rho1 の活性を調節している。
- B. *khd1Δ ccr4Δ* 二重変異は Rho1 の活性が低下することから、細胞壁合成に異常を来たし、cell lysis を生じる。
- C. それぞれの変異株を培養後、SC 培地にスポットして 25°C で培養して、増殖速度を検討した。スポットはそれぞれ 5 倍希釈されている。

第 2 章

材料と方法

・細胞株と一般的な実験方法

本研究で用いた細胞株は表 1 に、プラスミドは表 2 示す。実験に使用した培地および標準的な遺伝学的手法、遺伝工学的手法、生化学的手法は既に確立された方法に従った(Gietz et al., 1988; Kaiser et al., 1994; Sambrook et al., 1989)。

・変異株の作製

遺伝子破壊は PCR-based gene deletion method (Baudin et al., 1993; Sakumoto et al., 1999) に従った。各プライマーセットは目的遺伝子の Open Reading Frame (ORF) 全域を、任意のアミノ酸をコードするマーカー遺伝子と置換するようにデザインした (表 3)。マーカー遺伝子の導入された株は栄養要求性によって選別し、目的とした遺伝子の破壊が正しく行われたかは Colony PCR 法によって確認した (Huxley et al., 1990; Longtine et al., 1998; Schneider et al., 1996)。

・スポットアッセイ

2%のソルビトールを含む Synthetic complete (SC) 液体培地で一晩培養した菌液を新鮮な 2%ソルビトール SC 液体培地に適量植菌し、25°Cで 4 時間培養後、OD600 の測定により菌量を一定に揃えて 5 倍希釈を 4 段階行い、SC 培地に 8 ul スポットした。

・Cell lysis assay

液体培地で一晩培養した菌液を新鮮な液体培地に適量植菌し、25°Cで 4 時間培養後、細胞をヨウ化プロピジウムで染色、PBS で洗浄し、観察した (Krause et al., 2002)。100 細胞を数え、100 細胞中に核が染色された細胞を数えた。1つのサンプルにつき 3 回行い、核が染色された細胞数の平均値を算出して比較した。

・ノーザンブロッティング解析

RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて細胞から全 RNA を抽出した。各サンプルから 2 ug の RNA を 1%アガロース変性ゲルにアプライし、50 V で 70 分泳動し

た。泳動後、20×SSC を用いたキャピラリートランスファー法によりナイロン膜へ転写後、UV crosslinker で RNA を固定して、メチレンブルー染色により rRNA を染色した。ジゴキシゲニン (DIG) 標識されたアンチセンスプライマーとハイブリダイズさせ、抗 DIG 抗体と反応後、CSPD ready to use (Roche) で発色させ、LAS4000 でシグナルを検出した。プローブ作製に用いたプライマー配列は下記に示す。

Gene	Sequence
<i>ROM2</i>	5' - TGACGATATGATGAGCTCCTCCTT ACGTCA - 3'
	5' - TTAACCCCAGAAATCTAACGACG - 3'
<i>LRG1</i>	5' - ATCCATGATTCAAAATTCTGCTGGTTA - 3'
	5' - GCCAATATTTATGAATTCCATAAC - 3'

・ ウェスタンブロッティング解析

細胞を 0.2 N 水酸化ナトリウム溶液で処理し集菌後、SDS PAGE ローディングバッファーを加え 100°C で 5 分加熱してサンプルを調製し、SDS-PAGE を行った。エレクトロブロッティングにより PVDF 膜へ転写後、5% スキムミルク TBS で 1 時間ブロッキング、5% スキムミルク TBS で希釈した任意の一次抗体と 4°C で一晩反応させた。その後、任意の二次抗体を用い室温で 1 時間反応、HRP で発色させ LAS4000 でシグナルを検出した。ローディングコントロールとして Mcm2 を指標とし、その検出には Mcm2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を使用した。

・ Yeast two-hybrid screening

Two-hybrid screening の方法および使用したゲノム DNA ライブラリーは既に確立された方法に従った (Tadauchi et al., 2004; James et al., 1996)。pGBD-PBP1 とゲノムライブラリーを PJ69-4A に導入し、1mM 3-aminotriazole を含んだ SC -leucine -tryptophan -histidine 培地で 30°C、4 日間培養後、SC -leucine -tryptophan -adenine 培地にレプリカプレーティングを行った。その後、His⁺、Ade⁺を示した形質転換細胞からプラスミドを抽出し、シーケンシングにより遺伝子を同定した。

・免疫沈降法 (Immunoprecipitation ; IP)

対数期まで培養した細胞を XT バッファー (50 mM HEPES-KOH[pH 7.3]、20 mM potassium acetate、2 mM EDTA、0.1% Triton X-100、5% glycerol) で洗淨、集菌後、抽出バッファー (XT バッファー、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、aprotinin、leupeptin) を加え、ガラスビーズで破碎し、4,200 rpm で 10 分間遠心した。遠心後の上清を細胞粗抽出液とした。細胞粗抽出液と ANTI-FLAG M2-Agarose from mouse (SIGMA) を 4°C で 2 時間反応させた。反応後、XT バッファーで洗淨し、溶出バッファー (XT バッファー、0.1 ug/ul 3 × FLAG 抗体) を加え、4°C で 10 分間反応させて溶出した。ウェスタンブロッティングには抗 FLAG 抗体 (M2) および抗 myc 抗体を用いた。

表 1. 本研究に用いた細胞株

Strains	Genotype
10B	<i>MATα ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 GAL psi+ HOp-ADE2-HO 3' UTR</i>
10BD	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3</i>
10BD-c163	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 CCR4/ccr4Δ::CgLEU2</i>
10BD-p163	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 POP2/pop2Δ::CgLEU2</i>
10BD-d163	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 DHH1/dhh1Δ::CgLEU2</i>
10BD-c163-p1	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 CCR4/ccr4Δ::CgLEU2 PBP1/pbp1Δ::CgHIS3</i>
10BD-p163-p1	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 POP2/pop2Δ::CgLEU2 PBP1/pbp1Δ::CgHIS3</i>
10BD-d163-p1	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 DHH1/dhh1Δ::CgLEU2 PBP1/pbp1Δ::CgHIS3</i>
10BD-d163-l1	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 CCR4/ccr4Δ::CgLEU2 LRG1/lrg1Δ::CgHIS3</i>
10BD-c163-c1	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 CCR4/ccr4Δ::CgLEU2 CRT1/crt1Δ::CgHIS3</i>
10BD-c163-m1	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 CCR4/ccr4Δ::CgLEU2 MKT1/mkt1Δ::CgHIS3</i>
10BD-c163-p4	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 CCR4/ccr4Δ::CgLEU2 PBP4/pbp4Δ::CgHIS3</i>
10BD-c163-l12	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 CCR4/ccr4Δ::CgLEU2 LSM12/lsm12Δ::CgHIS3</i>
10BD-c163-pan2	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 CCR4/ccr4Δ::CgLEU2 PAN2/pan2Δ::CgHIS3</i>
10BD-c163-p1 pan2	<i>PBP1/pbp1Δ::KIURA3</i>
10BD-c163-12a	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 CCR4/ccr4Δ::CgLEU2 RPL12A/rpl12aΔ::CgHIS3</i>
10BD-c163-12b	<i>MATa/MATα ade2/ade2 trp1/trp1 can1/can1 leu2/leu2 his3/his3 ura3/ura3 KHD1/khd1Δ::CgTRP1 CCR4/ccr4Δ::CgLEU2 RPL12B/rpl12bΔ::CgHIS3</i>
c163-p1 1	<i>MATα ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3</i>
c163-p1 2	<i>MATa ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 ccr4Δ::CgLEU2</i>
c163-p1 3	<i>MATa ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 khd1Δ::CgTRP1</i>
c163-p1 4	<i>MATa ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 pbp1Δ::CgHIS3</i>
c163-p1 5	<i>MATa ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 ccr4Δ::CgLEU2 pbp1Δ::CgHIS3</i>
c163-p1 6	<i>MATa ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 khd1Δ::CgTRP1 ccr4Δ::CgLEU2</i>
c163-p1 7	<i>MATa ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 khd1Δ::CgTRP1 ccr4Δ::CgLEU2 pbp1Δ::CgHIS3</i>
c163-p1 L1	<i>MATa ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 LRG1-3HA-LRG1 3'UTR::KanMX6</i>
c163-p1 L2	<i>MATa ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 khd1Δ::CgTRP1 ccr4Δ::CgLEU2 LRG1-3HA-LRG1 3'UTR::KanMX6</i>
c163-p1 L3	<i>MATa ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 khd1Δ::CgTRP1 ccr4Δ::CgLEU2 pbp1Δ::CgHIS3 LRG1-3HA-LRG1 3'UTR::KanMX6</i>
c163-l12 1	<i>MATα ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 LSM12-myc::KanMX6</i>
c163-12a 1	<i>MATα ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 RPL12A-myc::KanMX6</i>
c163-12b 1	<i>MATα ade2 trp1 can1 leu2 his3 ura3 RPL12B-myc::KanMX6</i>
PJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4A gal80Δ GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ</i>

表 2. 本研究で用いたプラスミド

Plasmids	Relevant markers
YCplac33	<i>URA3, CEN-ARS</i>
YCplac33-PBP1 FLAG	<i>URA3, CEN-ARS, PBP1 FLAG</i>
YEplac195	<i>URA3, 2μ</i>
YEplac195-PBP1	<i>URA3, 2μ, PBP1</i>
YEplac195-PBP1 Δ LSM	<i>URA3, 2μ, PBP1 ΔLSM</i>
YEplac195-PBP1 Δ AD	<i>URA3, 2μ, PBP1 ΔLSMAD</i>
YEplac195-PBP1 Δ LSM Δ AD	<i>URA3, 2μ, PBP1 ΔLSM ΔLSMAD</i>
YEplac195-PBP1 Δ C	<i>URA3, 2μ, PBP1 (amino acids 1–476)</i>
YEplac195-PBP1 FLAG	<i>URA3, 2μ, PBP1</i>
YEplac195-PBP1 Δ C FLAG	<i>URA3, 2μ, PBP1 FLAG (amino acids 1–476)</i>
YEplac195-PAN2	<i>URA3, 2μ, PAN2</i>
pGBD-c1	<i>TRP1, 2μ, GAL4-BD sequence behind ADHI promoter</i>
pGBD-c1-PBP1	<i>BD-PBP1 sequence in pGBD-C1</i>
pGBD-c1-PBP1-n	<i>BD-PBP1 (amino acids 1–53) sequence in pGBD-C1</i>
pGBD-c1-PBP1-lsm	<i>BD-PBP1 (amino acids 54–130) sequence in pGBD-C1</i>
pGBD-c1-PBP1-ad	<i>BD-PBP1 (amino acids 173–297) sequence in pGBD-C1</i>
pGBD-c1-PBP1-lsm/ad	<i>BD-PBP1 (amino acids 54–297) sequence in pGBD-C1</i>
pGBD-c1-PBP1-c	<i>BD-PBP1 (amino acids 298–722) sequence in pGBD-C1</i>
pGAD-c1	<i>LEU2, 2μ, GAL4-AD sequence behind ADHI promoter</i>
pGAD-c1-RPL12A	<i>AD-RPL12A sequence in pGAD-C1</i>
pGAD-c1-RPL12B	<i>AD-RPL12B sequence in pGAD-C1</i>
pGAD-c1-LSM12	<i>AD-LSM12 sequence in pGAD-C1</i>
pCgLEU2	<i>C. glabrata LEU2 in pUC19</i>
pCgHIS3	<i>C. glabrata HIS3 in pUC19</i>
pCgTRP1	<i>C. glabrata TRP1 in pUC19</i>
pFA6a-13myc-kanMX6	<i>13myc-ADH 3'UTR-kanMX6</i>

表 3. 遺伝子破壊用プライマー

Gene	Sequence
<i>pbp1Δ</i>	5' - CCTCAGTCACGGAAGTAATTAAGGAGTTCATTACATTGAAACAATCACAGGAAACAGCTATGACC - 3'
	5' - CATGAATTTACTATATATTTGCTTTTTCTGACGTGCTTCCTTCAGTTGTAAAACGACGGCCAGT - 3'
	5' - TTGTACCGCACCATGAGTCGCAC - 3'
<i>crt1Δ</i>	5' - TTGTCATGGCGATTTGGGAAAAAGTTGAAAAAAAAAATAGCAGTAACACAGGAAACAGCTATGACC - 3'
	5' - CGTTATATTCTTTTTAAATATCCCATATACTAATGATAGAACTTGTGTGAAAACGACGGCCAGT - 3'
	5' - GTCCTACGATAGTCGTAATAACG - 3'
<i>lsm12Δ</i>	5' - GTTATCTAAGCTTGTAAGTAAAGAAATCAATTTGCATCTTTCGTCCACAGGAAACAGCTATGACC - 3'
	5' - CGGATAAAATATAACGTATATTATCGTTTCCGTCATTAATTAATGTTGTAAAACGACGGCCAGT - 3'
	5' - AGGTCAAGTTTTACCAAAGCGG - 3'
<i>pbp4Δ</i>	5' - TTTATTACTTATTTACGATACAATTTCCCTTTAATCTAGTACGAACACAGGAAACAGCTATGACC - 3'
	5' - TTGTTTGACTCCTTTTTGCGTTATGAAACGTGATGCTTCGATATTCGTTGTAAAACGACGGCCAGT - 3'
	5' - CACAAGCTATTGAGTATGCCGC - 3'
<i>pan2Δ</i>	5' - ACTAGAACACAATTGCTATACTGAGTTTCTGAATGGTGAATGTATTACAGGAAACAGCTATGACC - 3'
	5' - GGTGCGCTGGTGGCTCTTGAGATTACGTGAAAGGCACTGCACCATAGTTGTAAAACGACGGCCAGT - 3'
	5' - GGTCTCTAGAAAGCTTGAAGTC - 3'
<i>rpl12aΔ</i>	5' - TTTTGGGGTCTAGAAAGTCGACAACAAGAACAAGGATATACAAAACACAGGAAACAGCTATGACC - 3'
	5' - AACATAAAAAAACTAAAAAGCTTTGAAACTTCTTTAATTTTTTGTGTGAAAACGACGGCCAGT - 3'
	5' - CACCAAATATGTGTGGGTGTCA - 3'
<i>rpl12bΔ</i>	5' - TAAAGCAACCCCAAGTGCCCAATAGAAGGATAAATCAATAGTCAATCACAGGAAACAGCTATGACC - 3'
	5' - AGTACAGAATAATATATGGAATGGATTTTTGATGTTATAAACAACCGTTGTAAAACGACGGCCAGT - 3'
	5' - CTGTGGATGTTGGGTGTGTGA - 3'

第3章

*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株において、Pbp1は細胞増殖を負に制御する

目的

これまでの解析から Khd1 および Ccr4 が Rho1 の GEF をコードする Rom2 と GAP をコードする Lrg1 を mRNA の段階で安定性を制御することによって正常な細胞壁合成制御に機能していることが明らかにされた。*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株は Rho1 の活性が低下することから、著しい増殖遅延を示す。そこで Khd1 および Ccr4 を介した遺伝子発現制御機構の理解を深めるために、RNA レベルでの制御に機能することが知られている既知の因子を中心に、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧するサプレッサースクリーニングを行った。

結果

*pbp1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧する

Woolstencroft らは、*ccr4Δ*変異株は DNA 複製阻害剤 HU に感受性を示すことから、Ccr4 は DNA 複製ストレスに機能していることを示した。さらに彼らは、DNA 損傷により誘導される転写抑制因子 Crt1 と Poly(A)-binding protein (Pab1) – binding protein (Pbp1) をコードする遺伝子の欠損が *ccr4Δ*変異株の HU 感受性を抑圧することを明らかにした (Woolstencroft et al., 2006)。これまでに、*ccr4Δ*変異株は野生型と比較して増殖遅延を示し、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株は *ccr4Δ*変異株と比較して増殖遅延が増強することを明らかにした (Ito et al., 2011)。そこで、*crt1Δ*変異および *pbp1Δ*変異が *ccr4Δ*変異株の HU 感受性を抑圧したように、*ccr4Δ*変異株および *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧するかどうか検討した。その結果、*pbp1Δ*変異は *ccr4Δ*単独変異株および *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧した (図 3A、data not shown)。また、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株は 37°C の温度下では高温感受性を示すが、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株は 37°C でも増殖した (図 3B)。*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株は Cell lysis を引き起こすが、培地にソルビトールを添加して浸透圧を調節することにより少なからず増殖が回復する。*pbp1Δ*変異はソルビトールの有無に関わらず、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧した (図 3、図 6)。*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株に *PBP1* 遺伝子を含んだプラ

スミドを導入し、発現させた結果、コントロールと比較して増殖遅延を起こした (図 3C)。一方で、*crt1Δ*変異は、*ccr4Δ*単独変異株および *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧しなかった (data not shown)。これらのことから、Pbp1 は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖に対して負に制御していることが示された。

***pbp1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の cell lysis を部分的に抑圧する**

*ccr4Δ*単独変異株は高温培養条件下 (37°C) では cell lysis を引き起こし、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株ではその割合が増加する。*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株では、RhoGEF として機能する Rom2 の発現低下、および、RhoGAP として機能する Lrg1 の発現増加により Rho1 の活性が低下することが cell lysis の原因である。*pbp1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧したことから、次に *pbp1Δ*変異が cell lysis も抑圧しているのか検討した。Cell lysis assay の結果、*pbp1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の cell lysis を弱く抑えた (図 4)。*pbp1Δ*単独変異株は cell lysis を示さなかった。*pbp1Δ*変異はソルビトールの有無に関わらず、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧したことを踏まえ、これらの結果から Pbp1 は単に細胞壁合成制御を介して *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖に機能している訳ではないということが示された。

これまでに、*lrg1Δ*変異が *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の高温感受性を抑圧することを明らかにしていた。*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株は高温感受性を示すが、*khd1Δ ccr4Δ lrg1Δ*三重変異株は 37°C で増殖する。そこで、*pbp1Δ*変異と *lrg1Δ*変異による *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖への影響を検討した。YPD 培地では、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株と比較して *khd1Δ ccr4Δ lrg1Δ*三重変異株の方がやや増殖が速いが、YPD ソルビトール添加培地では同様な増殖速度を示した。対照的に、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株は YPD 培地および YPD ソルビトール添加培地のどちらでも *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株と比較して早い増殖速度を示した (図 6)。*lrg1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の高温感受性および、YPD 培地における増殖遅延の抑圧を示した一方で、*pbp1Δ*変異は室温および 37°C のどちらでも *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧するだけでなく、YPD ソルビトール添加培地においても *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧したことから、*pbp1Δ*変異による影響は *lrg1Δ*とは異なり、Pbp1 による制御は Lrg1 だけではないことが考えられた。

*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株では野生型と比較して、Lrg1 の発現量が増加する。そこで、*pbp1Δ*変異による Lrg1 の発現量を検討した。*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株では

野生型と比較して *LRG1* mRNA の発現量が増加するが、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株と比較して、*LRG1* mRNA の発現量は著しい変化を示さなかった (図 5A)。また、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株では野生型と比較して *Lrg1* タンパク質の発現量が増加するが、同様に *khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株と比較して、*Lrg1* タンパク質の発現量は著しい変化を示さなかった (図 5B)。これらのことから、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株において、*Pbp1* による制御には *Lrg1* が含まれないことが示唆された。

***pbp1Δ*変異は *pop2Δ*変異の増殖遅延を抑圧するが、*dhh1Δ*変異株の増殖遅延を抑圧しない**

Ccr4-Not 複合体は Poly(A)鎖の分解に機能する主要巨大分子であり、*Ccr4* や *Pop2* も構成因子として含まれる。*Ccr4* は触媒機能を持ち、*Pop2* は複合体の構造維持に機能している。これまでに、*POP2* 遺伝子の欠損と *khd1Δ*変異が合成増殖遅延を示すことを明らかにした (Ito et al., 2011)。*pop2Δ*単独変異株は *ccr4Δ*単独変異株同様に増殖遅延を示し、*khd1Δ pop2Δ*二重変異株は著しい増殖遅延および cell lysis を示す。そこで次に、*pbp1Δ*変異が *pop2Δ*単独変異株および *khd1Δ pop2Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧するか検討した。その結果、*pbp1Δ*変異は *ccr4Δ*変異株の増殖遅延を抑圧したのと同様に、*pop2Δ*単独変異株および *khd1Δ pop2Δ*二重変異株の増殖遅延も抑圧した (図 7A)。さらに、*khd1Δ pop2Δ*二重変異株は高温感受性を示すが、*pbp1Δ*変異はこの高温感受性も抑圧した (data not shown)。

RNA ヘリカーゼ、*Dhh1* は *Ccr4-Not* 複合体からのシグナルを介して mRNA のキャップ構造を分解する酵素 *Dcp1* および *Dcp2* の活性化に機能し、また、*DHH1* の過剰発現は *ccr4Δ*変異株および *pop2Δ*変異株の増殖遅延を抑圧することから、*Ccr4* および *Pop2* の下流で機能することが知られている (Hata et al., 1998)。さらに、*Pbp1* のヒトオルソログ *ATXN2* は *Dhh1* のヒトオルソログ *DDX6* と結合する (Nonhoff et al., 2007)。*dhh1Δ*単独変異株は増殖遅延を示すことから、次に、*pbp1Δ*変異は *dhh1Δ*単独変異株の増殖遅延を抑圧するか検討した。その結果、*dhh1Δ pbp1Δ*二重変異株は *dhh1Δ*単独変異株と比較して、より増殖遅延を示した (図 7B)。

*pbp1Δ*変異は *dhh1Δ*変異株ではなく、*ccr4Δ*変異株および *pop2Δ*変異株の増殖遅延を抑圧したことから、遺伝学的に *Pbp1* は *Ccr4* および *Pop2* の下流かつ、*Dhh1* の上流で機能することが示唆された。

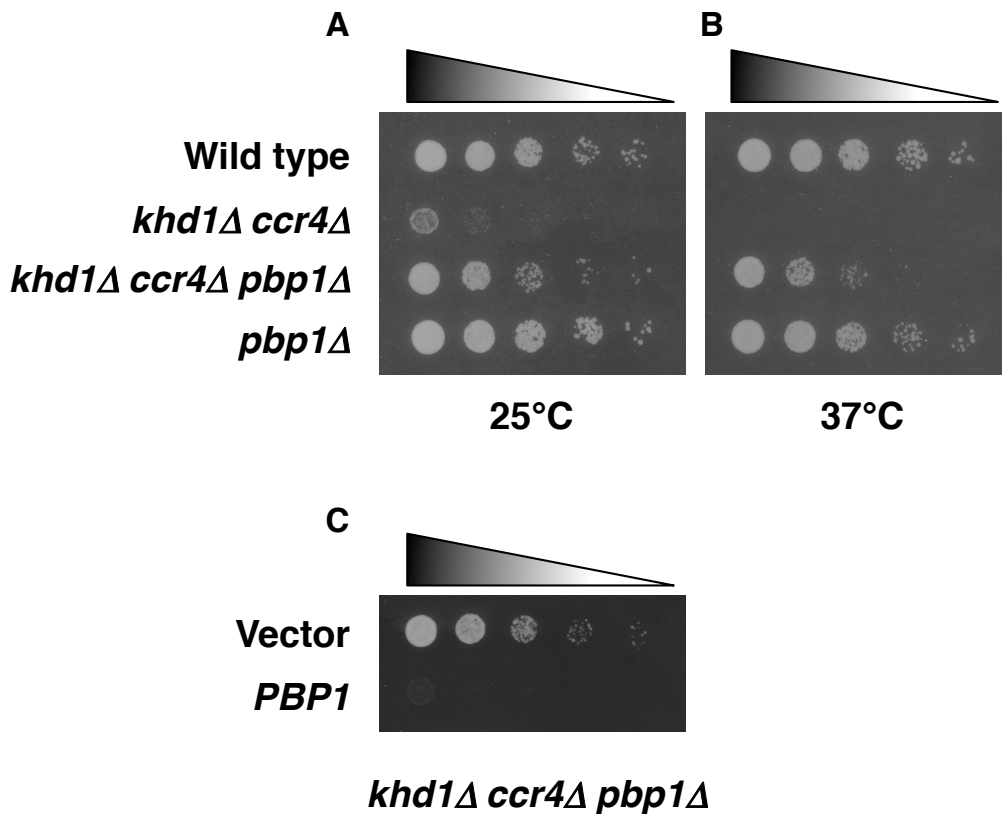


図 3. *pbp1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧する

- A. それぞれの変異株を SC 培地にスポットし、25°Cで培養して、増殖速度を検討した。スポットはそれぞれ 5 倍希釈されている。
- B. それぞれの変異株を SC 培地にスポットした。高温感受性を比較するために 37°Cで培養した。スポットはそれぞれ 5 倍希釈されている。
- C. *khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株に Vector と *PBP1* 遺伝子を発現するプラスミドを導入し、スポットアッセイにより増殖への影響を検討した。スポットはそれぞれ 5 倍希釈されている。

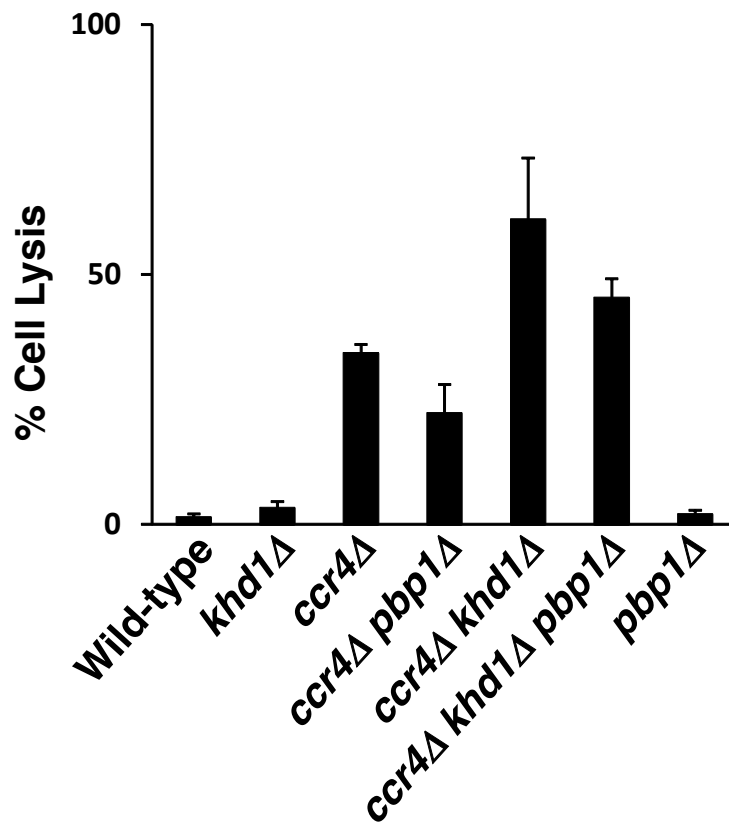


図4. *pbp1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の cell lysis を弱く抑える

Cell lysis アッセイにより、それぞれの変異株における cell lysis の割合を検討した。

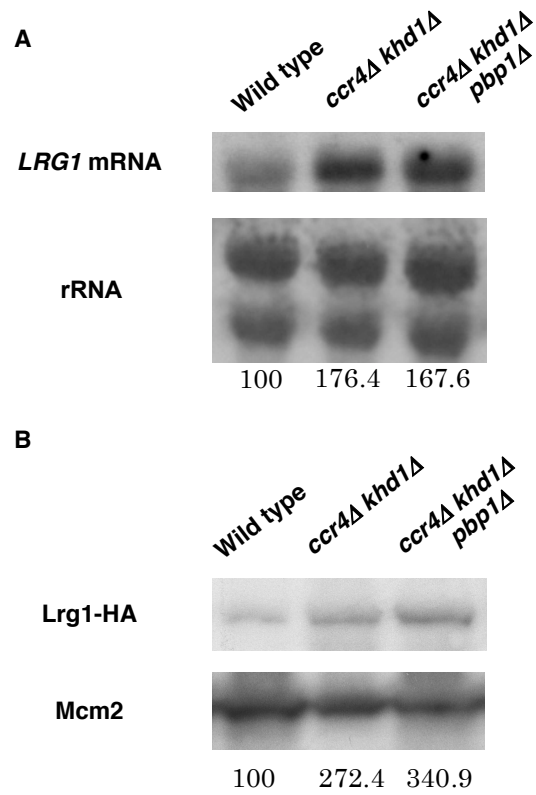


図 5. Pbp1 は Lrg1 の発現制御には影響しない

- A. それぞれの変異株における *LRG1* mRNA の発現量をノーザンブロットティング法によって比較した。
- B. それぞれの変異株における Lrg1 の発現量をウエスタンブロットティング法によって比較した。ローディングコントロールとして Mcm2 を用いた。

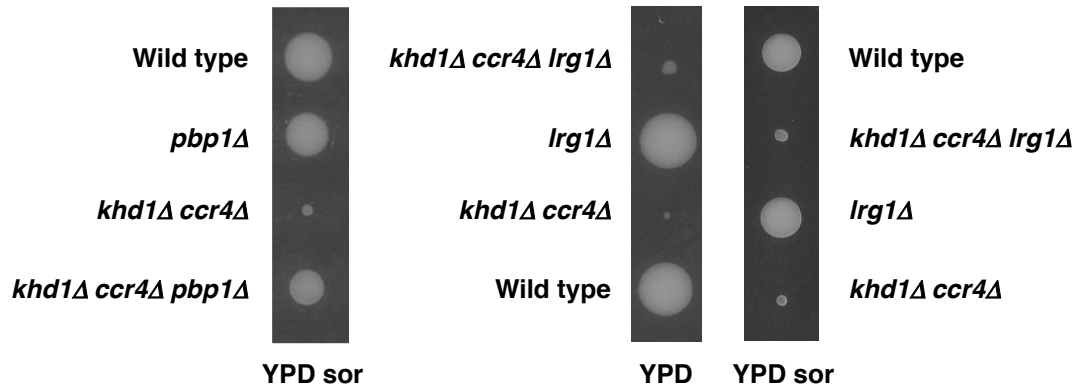


図 6. *pbp1Δ*変異は *lrg1Δ*変異とは異なり、ソルビトール添加培地上でも *khd1Δ pop2Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧する

10BD-c163-p1 および 10BD-c163-l1 株を四分子解析し、25°Cで培養後、それぞれの変異株における増殖速度の違いを検討した。

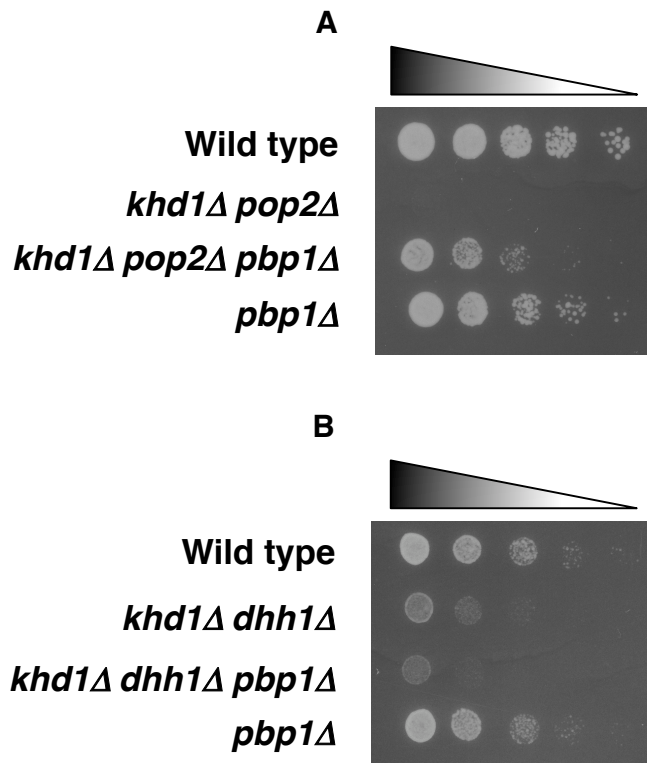


図 7. *pbp1Δ*変異は *khd1Δ pop2Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧する

AB. それぞれの変異株を SC 培地にスポットして 25°Cで培養後、Pbp1 と Pop2 および Dhh1 との遺伝的相互作用を検討した。スポットはそれぞれ 5 倍希釈されている。

第 4 章

Pbp1 の機能的な解析

目的

これまでの解析から、*pbp1Δ*変異が *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧することが示された。しかしながら、Pbp1 がどのように細胞増殖制御に機能しているかは不明である。そこで、次に Pbp1 との関連性が知られている既知の因子、Like Sm 12 (Lsm12)、Maintenance of K2 Killer Toxin (Mkt1)、Pbp1p Binding Protein (Pbp4)、Poly(A)-binding protein-dependent poly(A) ribonuclease (Pan2) と Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用を検討した。

結果

Pbp1は新規のメカニズムにより Khd1およびCcr4を介した制御に機能する

Pbp1はRNA代謝に機能するLsm12およびPbp4と結合することが知られている (Mangus et al., 1998 & 2004; Buchan et al., 2008; Fleischer et al., 2006; Simon et al., 2007)。また、Pbp1はMkt1と相互作用して酵母のエンドヌクレアーゼ、*HO*の発現調節に機能することが報告されている (Tadauchi et al., 2004)。そこで、*pbp1Δ*変異同様に*lsm12Δ*変異、*pbp4Δ*変異、*mkt1Δ*変異も*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧するか検討した。その結果、*khd1Δ ccr4Δ lsm12Δ*三重変異株、*khd1Δ ccr4Δ pbp4Δ*三重変異株、*khd1Δ ccr4Δ mkt1Δ*三重変異株は*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株と同様の増殖速度を示した。つまり、*pbp1Δ*変異とは異なり、*lsm12Δ*変異、*pbp4Δ*変異、*mkt1Δ*変異は*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧しなかった (図 8ABC)。これらの結果は、Pbp1はこれまでに相互作用することが報告されている既知の因子、Lsm12、Pbp4、Mkt1とは非依存的にKhd1およびCcr4を介した経路に機能していることが示唆された。

Pbp1Δ変異は Pan2 依存的・非依存的に ccr4Δ変異株の増殖遅延を抑圧する

Poly(A)鎖の分解機構には Pan2-Pan3 複合体と Ccr4-Not 複合体の 2 つの複合体が関与している。*pbp1Δ*変異株における Poly(A)鎖の短縮は、*pan2Δ*変異によって観察されなくなることから、Pbp1 は Pan2 の活性を負に制御することが報告され

ている (Mangus et al., 2004)。このことから、*pbp1Δ*変異による *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延の抑圧は、*pbp1Δ*変異によって Poly(A)鎖の短縮が関係しているのではないかと考えられた。そこでまず、*ccr4Δ*変異株および *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株において、*PAN2* 遺伝子を過剰発現させて、その影響を検討した。もし *pbp1Δ*変異により *Pan2* の活性が上昇しているならば、*PAN2* の過剰発現は *ccr4Δ*変異株および *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧すると推測される。その結果、*PAN2* の過剰発現は *ccr4Δ*変異株および *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧した (図 9)。

次に、*pbp1Δ*変異による *ccr4Δ*変異株および *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延の抑圧において、*Pan2* が関与しているか検討した。もしこの制御に *Pan2* が必要であれば、*pan2Δ*変異のバックグラウンドでは *pbp1Δ*変異による影響は観察されないことが考えられる。解析の結果、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株と比較して、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ pan2Δ*四重変異株は増殖遅延を示した (図 10)。このことから、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延の原因として、Poly(A)鎖の長さが関与している可能性が示された。しかしながら、*khd1Δ ccr4Δ pan2Δ*三重変異株と比較して、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ pan2Δ*四重変異株は増殖が回復した。また、*ccr4Δ pan2Δ*二重変異株と比較して、*ccr4Δ pbp1Δ pan2Δ*三重変異株はやや増殖が回復した (図 10)。

これらの結果から、*Pbp1* は *Pan2* の制御を介して *ccr4Δ*変異株の増殖遅延に機能する一方で、*Pbp1* が *Pan2* 非依存的に機能することが示唆された。

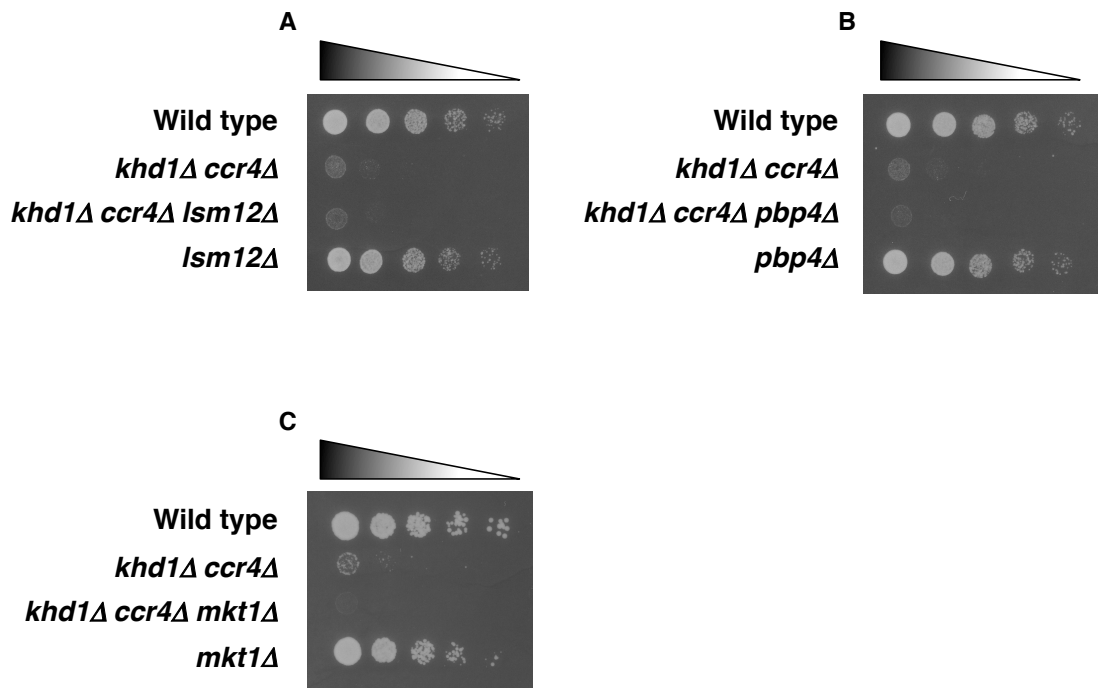


図 8. *lsm12Δ*変異、*pbp4Δ*変異、*mkt1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧しない

ABC. それぞれの変異株を SC 培地にスポットして 25°C で培養後、Lsm12、Pbp4、Mkt1 と Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用を検討した。スポットはそれぞれ 5 倍希釈されている。

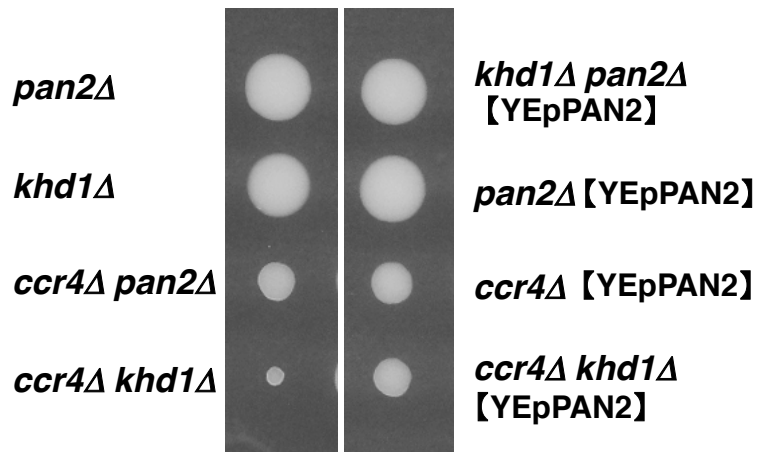


図 9. *PAN2* の過剰発現は *khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株の増殖遅延を抑制する

10BD-c163 *pan2* 株と YEplac195-*PAN2* を導入した 10BD-c163 *pan2* 株をそれぞれ四分子解析し、25°C で培養した。その後、*PAN2* 過剰発現における細胞増殖への影響を検討した。

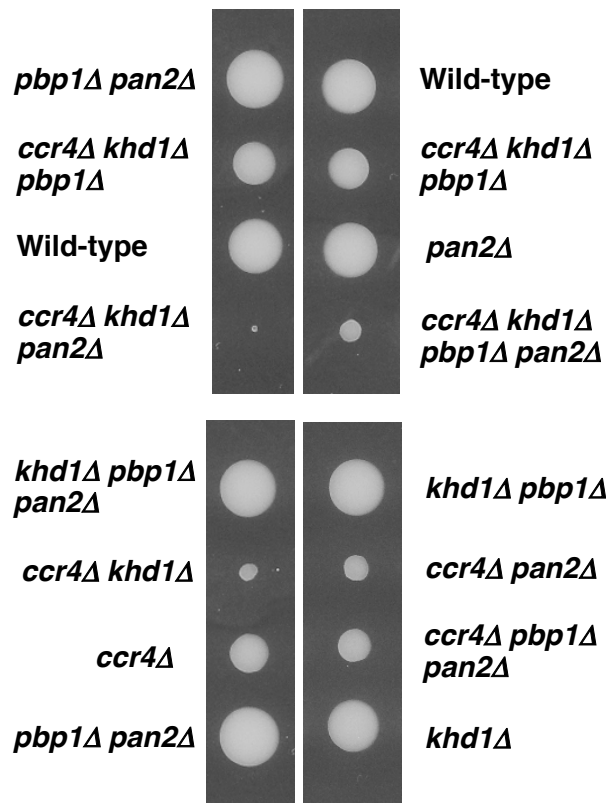


図 10. Pbp1 は Pan2 の制御を介して *khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株の増殖遅延を抑圧する一方で、新規のメカニズムを介して細胞増殖を制御する

10BD-c163-p1 *pan2* 株を四分子解析し、25°Cで培養後、それぞれの変異株における増殖速度を検討した。

第 5 章

Pbp1 と結合する因子の探索

目的

Pbp1 との関連性が報告されている因子群 (Lsm12、Mkt1、Pbp4) と Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用は示さなかった。また、Pbp1 の機能には Pan2 依存的な制御と Pan2 非依存的な制御があることが示された。このことから、Pbp1 は新規のメカニズムを介して細胞増殖に機能していることが示されたが、Pbp1 はどのような因子と協調して機能しているか不明である。そこで次に、Pbp1 と結合する新規の因子の探索を行った。

結果

Pbp1 はリボソーム大サブユニットの構成因子、Rpl12a および Rpl12b と結合する

Pbp1 は Lsm12、Pbp4、Mkt1 とは非依存的に Khd1 および Ccr4 を介した経路に機能するというこれまでの解析結果から、Pbp1 はこれまでに報告されていない因子と相互作用して機能することが推測された。そこで、Pbp1 と相互作用を示す新規の結合因子を探索するために、Pbp1 を Bait として Yeast two-hybrid screening を行った。その結果、リボソームタンパク質 Rpl12a および Rpl12b を同定した (図 11)。ポジティブコントロールとして Lsm12 を示した。Rpl12a および Rpl12b はリボソーム大サブユニットの構成因子であり、ヒトの L12 の酵母オルソログである。Rpl12a および Rpl12b は、リボソーム大サブユニットの P0/P1/P2 複合体への相互作用を介してトランスロケーションの活性中心を担っている P-stalk の安定性に機能し、トランスロケーションを制御している (Briones et al., 1998; Jenner et al., 2012)。

次に、*in vivo* での Pbp1 と Rpl12a および Rpl12b との結合を確認するために、免疫沈降法を行った。FLAG タグを融合させた Pbp1 (Pbp1-FLAG) と Myc タグを融合させた Rpl12a および Rpl12b (Rpl12a-myc および Rpl12b-myc) を細胞に導入した。ポジティブコントロールとして Lsm12-myc を用いた。抗 FLAG 抗体で細胞抽出液から Pbp1-FLAG を免疫沈降すると Lsm12-myc が共沈降し、抗 Myc

抗体により検出された。これと同様に、Rpl12a-myc および Rpl12b-myc も検出された (図 12)。これらの結果から、細胞内で Pbp1 は Rpl12a および Rpl12b と結合することが示された。

***rpl12a*Δ変異および *rpl12b*Δ変異は *khd1*Δ *ccr4*Δ二重変異株の増殖遅延を抑圧する**

次に、*pbp1*Δ変異と同様に *rpl12a*Δ変異および *rpl12b*Δ変異が *khd1*Δ *ccr4*Δ二重変異株の増殖遅延を抑圧するかどうか検討した。スポットアッセイの結果から、*khd1*Δ *ccr4*Δ *rpl12a*Δ三重変異株は *khd1*Δ *ccr4*Δ二重変異株よりも早い増殖を示した。また、*khd1*Δ *ccr4*Δ *rpl12b*Δ三重変異株も *khd1*Δ *ccr4*Δ二重変異株より早い増殖を示した (図 13)。これらの結果から、*rpl12a*Δ変異および *rpl12b*Δ変異は *khd1*Δ *ccr4*Δ二重変異株の増殖遅延を抑圧することを示した。しかしながら、*rpl12a*Δ単独変異株および *rpl12b*Δ単独変異株は野生型と比較して増殖遅延を示すため、*rpl12a*Δ変異および *rpl12b*Δ変異が *ccr4*Δ単独変異株の増殖遅延を抑圧するかどうかは評価できなかった。これらの結果から、Rpl12a および Rpl12b は Pbp1 と共に、*khd1*Δ *ccr4*Δ二重変異株における細胞増殖を負に制御することが示唆された。

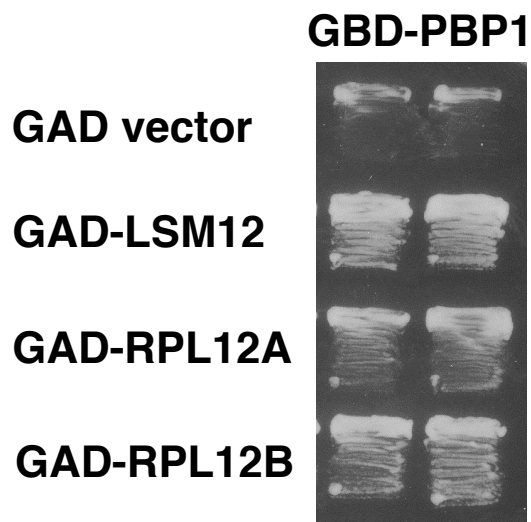


図 11. Pbp1 はリボソームタンパク質と相互作用する

Yeast two-hybrid screening 用細胞、PJ69-4A 株に Bait として pGBD-c1-PBP1 と、Prey として pGAD-c1-LSM12、pGAD-c1-RPL12A、pGAD-c1-RPL12B をそれぞれ導入後、-Leu -Trp -His 培地および -Leu -Trp -Ade 培地上で培養した。図は -Leu -Trp -His 培地を示すが、-Leu -Trp -Ade 培地でも同様の結果を得た。

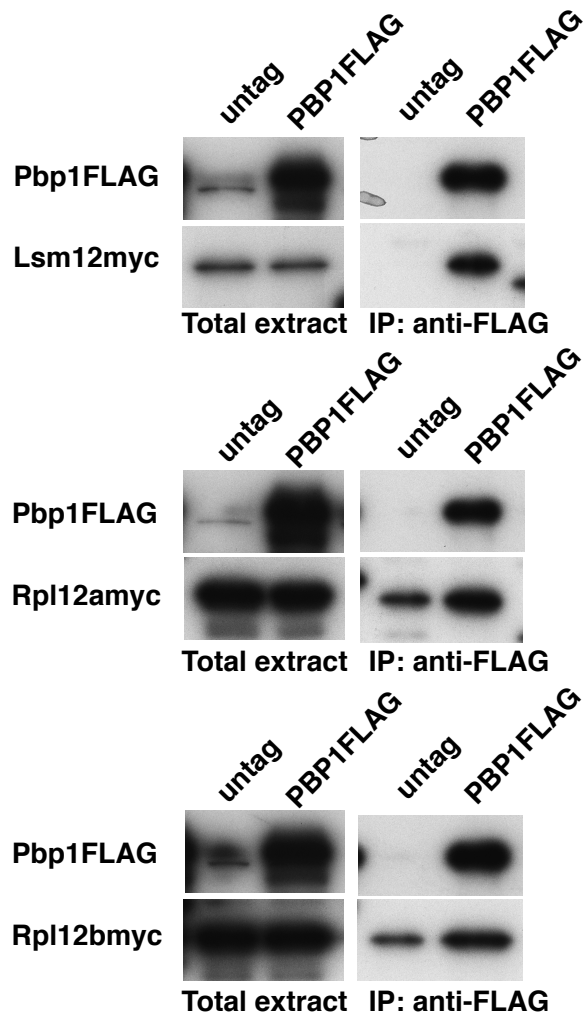


図 12. In vivo において Pbp1 はリボソームタンパク質と相互作用する

c163-112、c163-12a、c163-12b 株に YCplac33-PBP1 FLAG を導入し、免疫沈降法により、Pbp1 と Lsm12、Rpl12a、Rpl12b との結合を検討した。

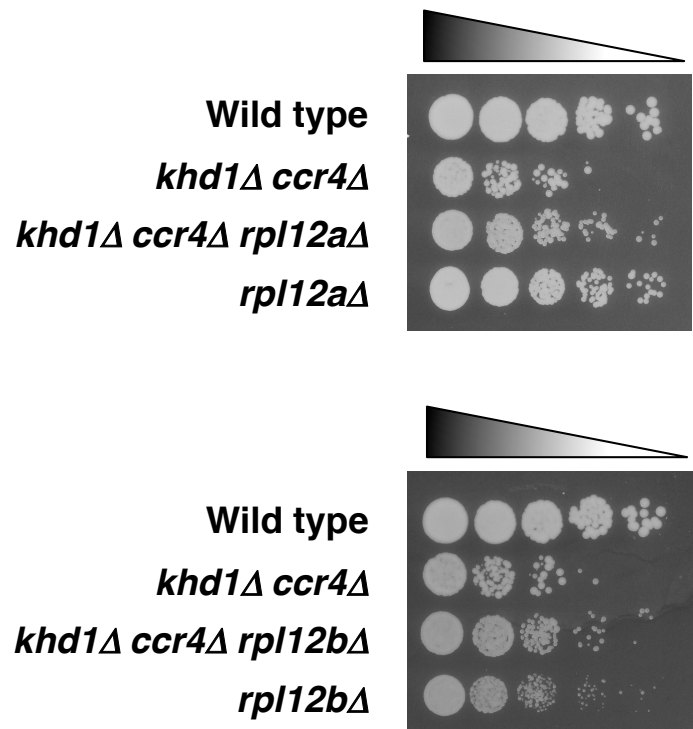


図 13. *rpl12aΔ*変異および *rpl12bΔ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧する

それぞれの変異株を YPD 培地にスポットして 30°C で培養後、Rpl12a および Rpl12b と、Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用を検討した。スポットはそれぞれ 5 倍希釈されている。

第 6 章

Pbp1 のドメイン解析

目的

これまでの解析から、Pbp1 は Rpl12a および Rpl12b と結合することを明らかにした。次に、Pbp1 と Rpl12a および Rpl12b との結合領域を調べた。さらに、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の細胞増殖制御において、Pbp1 と Rpl12a および Rpl12b が結合することが重要であるか検討した。また、Pbp1 は Pab1 結合タンパク質であるが、Pab1 非依存的な機能も報告されているため、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の細胞増殖制御において、Pbp1 は Pab1 依存的に機能しているのか検討した。

結果

Rpl12a および Rpl12b は Pbp1 の Lsm および Lsm AD に結合する

Pbp1 が Rpl12a および Rpl12b と協調してどのようなメカニズムで細胞増殖を制御しているのか明らかにするために、Rpl12a および Rpl12b は Pbp1 のどの領域に結合するのか検討した。Pbp1 は RNA 結合ドメイン Lsm および Lsm AD、C 末端領域に self-interacting region を持ち (Ralser et al., 2005; Mangus et al., 1998; Takahara et al., 2012)。Pbp1 を様々な長さにデザインしたフラグメントを構築し、two-hybrid アッセイを用いて Rpl12a および Rpl12b との結合領域を調べた。その結果、Rpl12a および Rpl12b は Lsm に結合することを見出した。さらに、Rpl12a および Rpl12b は Lsm および Lsm AD を含んだ領域は Lsm だけの結果と比較して強い結合を示した。しかしながら、Lsm AD との結合は全く示さなかった。これらの結果は、Pbp1 の Lsm 領域は Rpl12a および Rpl12b と結合するために必要であり、さらに Lsm AD はその結合を促進することが示唆された (図 14)。

Pbp1 の Lsm および Lsm AD は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の細胞増殖を負に制御する機能に必要である

次に Pbp1 と Rpl12a および Rpl12b との結合が *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の細胞増殖を負に制御することに重要であるのか検討した。Rpl12a および Rpl12b との結合領域である Lsm、Lsm AD および両方のドメインを欠損させた *PBP1* プラスミ

ドを *khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ* 三重変異株に導入し、その影響を調べた。*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ* 三重変異株に野生型の *PBP1* を導入すると、高温感受性により細胞増殖を示さない。*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ* 三重変異株に *PBP1 ΔLSM ΔLSMAD* を導入すると、高温感受性を示さず、*pbp1Δ* 変異による表現型は相補されなかった。興味深いことに、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ* 三重変異株に *PBP1 ΔLSM* もしくは *PBP1 ΔLSMAD* を導入した結果、*pbp1Δ* 変異による表現型は完全には相補されなかった。この結果から、*PBP1 ΔLSM* もしくは *PBP1 ΔLSMAD* は部分的な機能が残っていることが示唆された。また、これらの結果から、Rpl12a および Rpl12b との結合領域である Pbp1 の Lsm ドメインは Pbp1 の機能に必要なことが示唆された (図 15)。

Pbp1 は Pab1 依存的に *khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株の細胞増殖を負に制御する

これまでの解析から、Pbp1 の機能には Lsm ドメインが必要であることが示唆された。またその他のドメインとして、Pbp1 は C 末端に self-interacting region を持ち、この領域にはプロリンおよびメチオニンが豊富なアミノ酸配列が含まれる。Pbp1 はこの領域を介して二量体を形成するだけでなく、結合因子である Pab1 とも結合し、その結合にはプロリンおよびメチオニンが豊富なアミノ酸配列が必要である。*PAB1* は必須遺伝子であるため、*PAB1* 遺伝子欠損は致死を示す。ところが、過去の報告で *pbp1Δ* 変異が *pab1Δ* 変異の致死性を抑圧することが知られている (Mangus et al., 1998)。Pab1 は Poly(A) 分解や翻訳制御において主要な因子であり、*pbp1Δ* 単独変異株と比較して、*pbp1Δ pab1Δ* 二重変異株下で mRNA は異常に長い Poly(A) 鎖を有し、リボソーム 80S の蓄積を示す (Mangus et al., 1998)。これらのことから、Pbp1 は Pab1 に結合することで Poly(A) 分解や翻訳制御に機能している可能性が考えられる。そこで次に、*khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株の細胞増殖制御に対して、Pbp1 は Pab1 との結合を介して機能しているのか検討した。468 番目から 722 番目のアミノ酸を欠損させた Pbp1 は Pab1 と結合しない (Takahara et al., 2012)。まず、Pab1 との結合領域である Pbp1 の 468 番目から 722 番目のアミノ酸を欠損させ、FLAG タグを融合させた Pbp1 Δ C-FLAG と、Pab1 に Myc タグを融合させた Pab1-myc を構築し、免疫沈降法により結合実験を行った。免疫沈降法の結果、完全長の Pbp1-FLAG では Pab1-myc が共沈降する一方で、Pbp1 Δ C-FLAG では Pab1-myc は共沈降しなかった。続いて、Pab1 との結合領域である C 末端領域を欠損させた *PBP1 Δ C* プラスミドを *khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ* 三重変異株に導入し、その影響を調べた。先の解析と同様に、野生型の *PBP1* を導

入した *khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ* 三重変異株は *pbp1Δ* 変異の表現型を相補した。しかしながら、*PBP1ΔC* を導入した *khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ* 三重変異株は *pbp1Δ* 変異の表現型を相補しなかった。これらの結果は、Pbp1 は Pab1 との結合を介して *khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株の細胞増殖に機能していることが示唆された (図 16)。

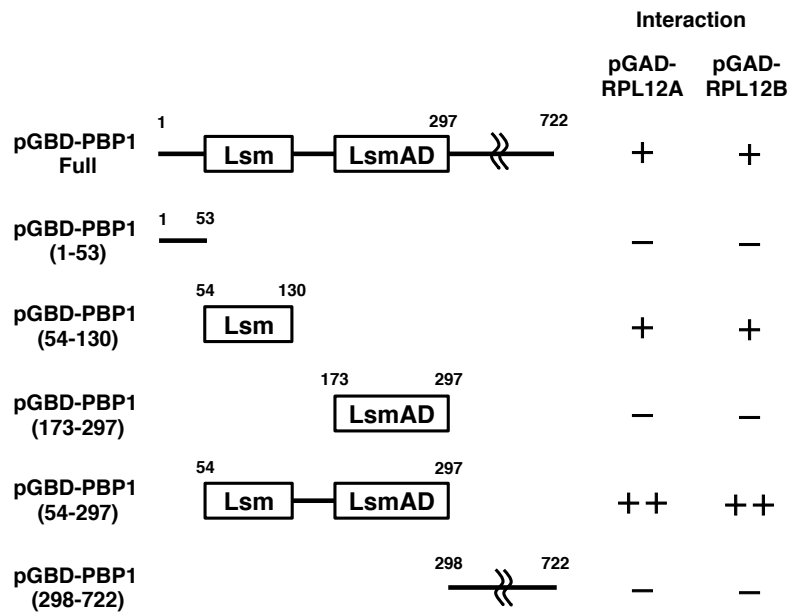


図 14. Rpl12a および Rpl12b は Pbp1 の Lsm ドメインに結合する

Yeast two-hybrid screening 用細胞、PJ69-4A 株に Bait として様々な長さに構築した pGBD-PBP1 と Prey として pGAD-c1-RPL12A、pGAD-c1-RPL12B をそれぞれ導入し、Two-hybrid アッセイにより、結合領域を検討した。

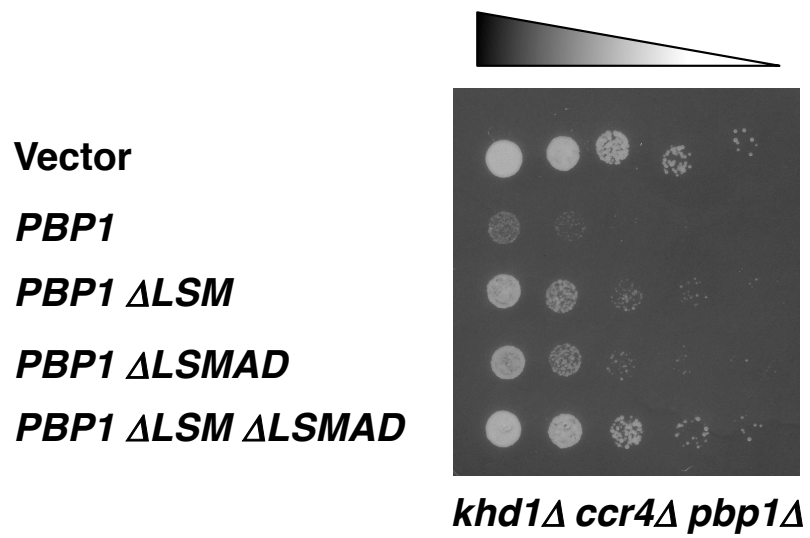


図 15. Pbp1 の機能には Lsm ドメインが必要である

Rpl12a および Rpl12b との結合領域を欠損させた *PBP1* を *khd1* Δ *ccr4* Δ *pbp1* Δ 三重変異株に導入し、スポットアッセイにより細胞増殖の影響を検討した。スポットはそれぞれ 5 倍希釈されている。

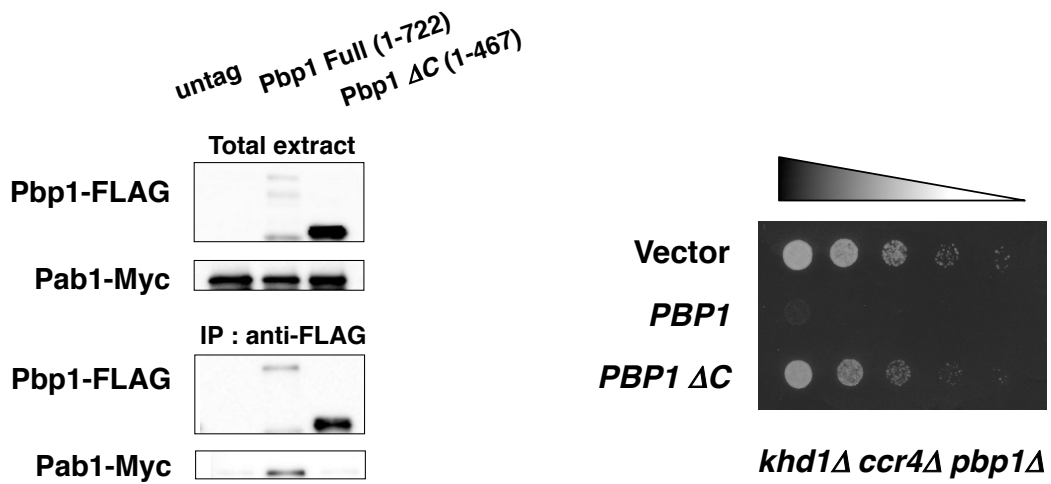


図 16. Pbp1 は Pab1 依存的に細胞増殖制御に機能する

免疫沈降で Pab1 が Pbp1ΔC と共沈降しないことを確認した後、*PBP1 ΔC* を *khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ* 三重変異株に導入し、スポットアッセイにより細胞増殖への影響を検討した。スポットはそれぞれ 5 倍希釈されている。

第7章

総括および展望

本研究では、Pbp1 が Khd1 および Ccr4 を介した細胞増殖制御に機能していることを見出した。はじめに、*pbp1Δ*変異が *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧することを示した (図 3)。この制御には、これまでに Pbp1 との関連性が報告されている既知の因子、Lsm12、Pbp4、Mkt1 とは協調せず、また、Pbp1 は Pan2 の活性抑制を介した機能が細胞増殖制御には部分的に働くことを示した (図 8、9、10)。次に、Pbp1 の新規結合因子としてリボソームタンパク質 Rpl12a および Rpl12b を同定し、*rpl12aΔ*変異および *rpl12bΔ*変異が *pbp1Δ*変異同様に *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧することを示した (図 11、12、13)。Rpl12a および Rpl12b は Pbp1 の Lsm ドメインを介して結合すること、さらに、Pbp1 の機能には Lsm ドメインが必要であることを示した (図 14、15)。以上の結果から、Pbp1 はこれまでに報告されていた Poly(A)鎖の制御に機能する一方で、リボソームと協調して Khd1 および Ccr4 を介した細胞増殖制御に機能しているというモデルが考えられた (図 17)。

Pbp1 による遺伝子発現制御

Pbp1 はヒト脊髄小脳変性症 2 型 (SCA2) の原因因子 ATXN2 の酵母オルソログである。Pbp1 と ATXN2 は、Lsm および LsmAD を持つこと、Poly(A)結合タンパク質への結合、ポリソーム画分や SG への局在など、構造や機能に類似点が多く、酵母からヒトまで高度に保存されている (図 1)。Pbp1 は Pab1 に結合することから、RNA 代謝に機能すると考えられている。実際に、*CYCI* のレポーターアッセイの解析から、Poly(A)分解酵素 Pan2 の活性制御に機能することで RNA 代謝に機能することが知られている (Mangus et al., 2004)。また、Pbp1 はポリソーム画分や SG への局在が報告されていることから翻訳制御に機能していると考えられている。Pbp1 は Mkt1 と協調して、出芽酵母のエンドヌクレアーゼ *HO* の mRNA の安定性制御ではなく翻訳制御に機能することが報告されている (Tadauchi et al., 2004)。また、ヒトを対象とした研究では、様々なシグナル伝達経路の中心的なキナーゼである Src と、その下流因子である Grb2 の遺伝

子発現について健常者と SCA2 患者とで比較したところ、*SRC* mRNA の発現量は両方で差が認められないが、タンパク質レベルでは健常者と比較して、SCA2 患者では有意に減少した。さらに、*GRB2* mRNA の発現量は健常者と比較して、SCA2 患者では有意に高いにも関わらず、タンパク質レベルでは有意な差は認められなかった (Drost et al., 2013)。近年の報告では、*ATXN2* は標的 mRNA の 3' UTR に存在する AU-rich な配列に結合し、mRNA の安定化に機能することで、その結果として、タンパク質の発現量を増加させていることが明らかにされた (Yokoshi et al., 2014)。これらのことから、Pbp1-*ATXN2* の機能について着々と報告されてきている。その他に、Pbp1 による RNA 代謝や翻訳制御以外の機能として、*ccr4Δ*変異株は DNA 合成阻害剤の HU に対して感受性を示すが、*pbp1Δ*変異がこの感受性を抑圧することから、G1/S 期チェックポイントに機能する可能性や、最近では DNA-RNA hybridization に対して阻害的に機能することで複製寿命の制御に機能することなど、新規の機能が明らかにされつつある (Woolstencroft et al., 2006; Salvi et al., 2014)。以上のように、Pbp1 は高度に保存されており、生命の恒常性維持に機能していることが推測されるが、*pbp1Δ*単独変異株はその表現型に著しい変化を示さないため、その機能や生理的意義の完全な理解には遠く、さらなる解析が求められる。

Pbp1 は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の細胞増殖を負に制御する

本研究において、*pbp1Δ*変異が *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧したことから、Pbp1 は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の細胞増殖に対して負に制御することが示された (図 2)。前述のように、*pbp1Δ*変異は *ccr4Δ*変異株の HU 感受性を抑圧するが、増殖遅延に対しても抑圧した。*ccr4Δ*変異株の増殖遅延の原因の一つとして、cell lysis が挙げられる。細胞壁合成に異常のある変異株はソルビトールの添加により培地の浸透圧を調節することで、cell lysis を抑えられる (Hata et al., 1998)。Pbp1 の結合タンパク質をコードする *PAB1* は必須遺伝子であり、*pab1Δ*変異は致死を示す。驚くことに、*pbp1Δ*変異は *pab1Δ*変異による致死性を抑圧することが報告されている (Mangus et al., 1998)。さらに、ソルビトール添加培地では、*pab1Δ pbp1Δ*二重変異株の増殖遅延が回復する。これらのことから、Pbp1 は細胞壁合成制御に関与する可能性が考えられた。そこで cell lysis アッセイを行った結果、*pbp1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の cell lysis を弱く抑えた。注意深く観察すると、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株は *ccr4Δ*単独変異株よりも cell

lysis の比率が高いにも関わらず、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株と比較して *ccr4Δ* 単独変異株の方が増殖遅延を示す (図 4)。さらに、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株と *khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株では、Rho GAP の Lrg1 の発現量に有意な差は認められなかった (図 5)。これらの結果から、Pbp1 は細胞壁合成だけでなく、その他の制御にも機能することで *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の細胞増殖を負に制御していることが示唆された。過去の遺伝学的解析による報告から、Ccr4 の上流では Pop2 が、下流では Dhh1 が機能することが明らかにされた (Hata et al., 1998)。そこで、Pop2 および Dhh1 と Pbp1 との遺伝的相互作用を検討したところ、*pbp1Δ* 変異は *pop2Δ*変異株の増殖遅延も抑圧した (図 7A)。Pbp1 と Ccr4 および Pop2 が遺伝的相互作用を示したことから、前述したように、Pbp1 は Poly(A)分解を介して細胞増殖制御に機能していると考えられた。一方で、*dhh1Δ pbp1Δ*二重変異株は *dhh1Δ*単独変異株と比較して増殖遅延を示した (図 7B)。Dhh1 は脱キャップ酵素の活性化だけでなく、リボソーム 40S の mRNA への結合を阻害することで翻訳を負に制御する (Parker 2012)。また、過去の報告から、ATXN2 と Dhh1 のヒトオルソログ DDX6 が Processing body (P-body) および SG に局在することが知られている (Nonhoff et al., 2007)。このことから、*pbp1Δ*変異によって、Poly(A)鎖の短縮がされた mRNA が Dhh1 の欠損により、本来ならば分解されるはずの mRNA が異常な翻訳をされることによって合成されたタンパク質が細胞増殖に影響しているのではないかと考えられる。

Pbp1 はリボソームと協調して細胞増殖に機能する

前項で、Pbp1 は RNA 代謝を介して細胞増殖制御に機能していることが示されたが、どのようなメカニズムで作用しているのかは明らかになっていない。そこで、Pbp1 との関連性が報告されており、RNA 代謝に機能する因子、Lsm12、Pbp4、Mkt1 と Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用を検討した。その結果、*lsm12Δ*変異、*pbp4Δ*変異、*mkt1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧しなかった (図 8)。このことから、Pbp1 はこれまでに報告されていたメカニズムではなく、新規のメカニズムによって細胞増殖制御に機能していることが考えられた。

Pbp1 は Pan2 の活性を負に制御することで Poly(A)鎖の分解を調節しているが、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の細胞増殖には、Poly(A)鎖の制御を介した機能かどうか検討した。もし、Pbp1 が Pan2 の活性制御を介して *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の細

胞増殖に機能しているとするならば、*pan2Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株に対して増殖遅延を引き起こすことが推測される。その結果、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ pan2Δ*四重変異株は *khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株と比較して増殖遅延を示した (図 10)。このことから、Pbp1 は Pan2 の活性制御を介して細胞増殖に機能していることが考えられた。ところが、一方で、*pan2Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を悪化させるが、*pbp1Δ*変異は *khd1Δ ccr4Δ pan2Δ*三重変異株の増殖遅延を抑圧することを示した (図 10)。この結果は、Pbp1 は Pan2 の活性制御を介した制御だけでなく、Pan2 非依存的な制御に機能していることが考えられた。

Pbp1 は RNA 代謝の制御を介して細胞増殖に機能するだけでなく、その他の制御にも機能している可能性が考えられた。しかしながら、Pbp1 がどのような因子と協調して、どのような制御に機能しているのかは不明であった。そこで、この問題を解決するために Yeast two-hybrid screening を行った結果、リボソーム大サブユニットの構成因子である Rpl12a および Rpl12b を新規の結合因子として同定した (図 11、12)。Pbp1 はポリソームに局在し、ヒトやショウジョウバエの研究から、ATXN2 は RNA 結合ドメインもしくは PABP 結合モチーフ (PAM2) のどちらかが欠損していてもポリソームに局在することが報告されているが (Satterfield et al., 2006)、本研究で初めてリボソームタンパク質と結合することを明らかにした。次に、この Rpl12a および Rpl12b が Pbp1 と重複した機能を持つのか、Khd1 および Ccr4 との遺伝的相互作用を検討した結果、*rpl12aΔ*変異および *rpl12bΔ*変異も *khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧することを示した (図 13)。これらの結果から Pbp1 をリボソームタンパク質と協調した翻訳制御を介して、細胞増殖に機能していることが考えられた。リボソームタンパク質は、これまでリボソームの構成因子だと考えられてきたが、Kondrashov らによって、リボソームタンパク質が *HOX* 遺伝子特異的な発現を調節することで、マウスの胚発生のパターンを制御していることが明らかにされた (Kondrashov et al., 2011)。この報告を皮切りに、リボソームタンパク質特異的な遺伝子発現制御機構や疾病への関連性について報告されつつある (Fumagalli et al., 2012; Martin et al., 2014)。これらのことから、Pbp1 と Rpl12a および Rpl12b は重複した機能を持つことが示されたが、これらの相互作用がどのようなメカニズムで翻訳制御に機能しているのか、また、その制御は標的特異性があるのか、もしくは、リボソーム依存的な制御なのかどうかは現時点では不明である。今後は

Pbp1 と Rpl12a および Rpl12b の重複したターゲット mRNA を CLIP 法やマイクロアレイ法などで同定し、それらの mRNA をモデルとして、詳細な制御メカニズムの検討を行う必要がある。

Khd1 および Ccr4 を介した細胞増殖制御において、Pbp1 の機能には Lsm ドメインおよび Pab1 との結合が必要とされる

Yeast two-hybrid screening の結果から Pbp1 はリボソームタンパク質 Rpl12a および Rpl12b と結合し、免疫沈降法で *in vivo* でも結合することが示された。さらに、*rpl12a* Δ 変異および *rpl12b* Δ 変異も *pbp1* Δ 変異同様に *khd1* Δ *ccr4* Δ 二重変異株の増殖遅延を抑圧したから、Pbp1、Rpl12a、Rpl12b は重複した機能をもつことが考えられた。そこで、Pbp1 と Rpl12a および Rpl12b がどのように相互作用するのか検討した。その結果、Rpl12a および Rpl12b は Pbp1 の Lsm ドメインを介して結合し、さらにその結合は LsmAD によって強化されることを示した (図 13)。次に、Pbp1 のドメイン解析を行った。その結果、Rpl12a および Rpl12b との結合領域である Lsm および LsmAD を欠損させた Pbp1 Δ Lsm Δ LsmAD は *khd1* Δ *ccr4* Δ *pbp1* Δ 三重変異株の細胞増殖に対して *pbp1* Δ 変異による表現型を相補しなかった。この結果から、Pbp1 の機能として Lsm および LsmAD が必要であること、また、Rpl12a および Rpl12b との結合が重要であることが示された。ところが、Rpl12a および Rpl12b とは結合を示さなかった LsmAD は細胞増殖への機能を示したことから、Pbp1 は Rpl12a および Rpl12b と協調するだけでなく、また別の因子と結合して細胞増殖制御に機能していることが考えられた。

Pbp1 は Pab1 結合タンパク質であるが、*pbp1* Δ 変異は *PAB1* 遺伝子欠損による致死性を抑圧する (Mangus et al., 1998)。このことから、Pab1 は Pbp1 の機能を制御していることが考えられる。そこで、*khd1* Δ *ccr4* Δ 二重変異株の増殖制御に対して、Pbp1 は Pab1 との結合を介して細胞増殖制御に機能するのか検討した。その結果、Pbp1 は Pab1 との結合を介して機能することが示された (図 16)。Pbp1 は Pab1 に結合することで Pan2 による Poly(A)分解を阻害することから、Pbp1 による細胞増殖制御は RNA 代謝を介していると考えられる。一方で、①Khd1 および Ccr4 を介した細胞増殖制御において、Pbp1 は Pab1 に結合していても、Lsm および LsmAD が存在しなければ機能を失うこと (図 15) (Mangus et al., 1998)、②Pbp1 および ATXN2 はそれぞれ Pab1 および PABP と結合しなくてもポリソームに局在する (Mangus et al., 1998; Satterfield et al., 2006)、③ATXN2 の

結合はタンパク質の発現量を増加させる (Yokoshi et al., 2014)、④*rpl12a* Δ 変異および *rpl12b* Δ 変異も *khd1* Δ *ccr4* Δ 二重変異株の増殖遅延を抑圧する (図 13)。これらの結果や知見から、*khd1* Δ *ccr4* Δ 二重変異によって細胞増殖に対して負に機能するような特定の安定化された mRNA が、Pbp1 がリボソームタンパク質と協調することで翻訳を促進し、その結果として、異常に増加したタンパク質が *khd1* Δ *ccr4* Δ 二重変異株の増殖遅延を引き起こすことが考えられる。しかしながら、Pbp1 の標的遺伝子は明らかにされていないため、今後は Pbp1 の標的遺伝子の同定を含めた、詳細な翻訳制御メカニズムの解析が必要とされる。

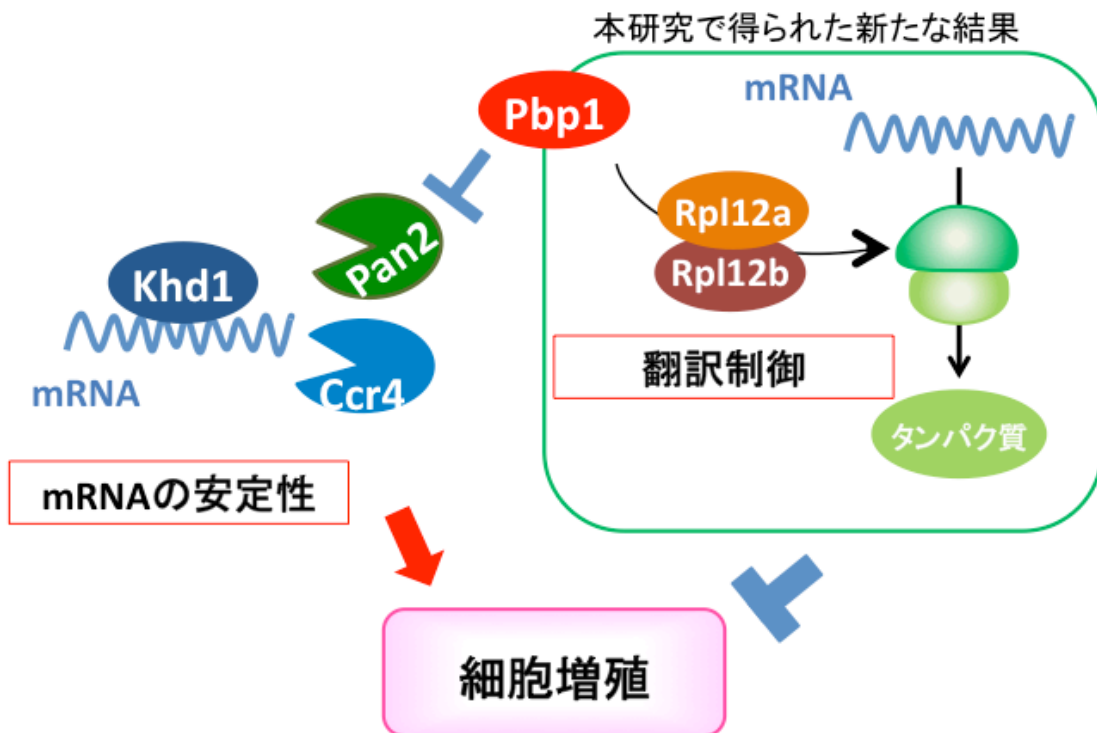


図 17. Pbp1 による細胞増殖制御機構のモデル図

Pbp1 はこれまで Poly(A)鎖の制御に対するメカニズムは知られていた。本研究では、RNA 代謝だけでなく、リボソームタンパク質と協調して翻訳制御に機能することで細胞増殖を制御しているというモデルが考えられた。

展望

脊髄小脳変性症は特定難病疾患に認定されており、その治療法はいまだ確立されていない。脊髄小脳変性症 2 型はポリグルタミン病に分類され、*ATXN2* が原因遺伝子として同定されている。ポリグルタミン病は一般的に、原因遺伝子にグルタミンをコードする *CAG* の繰り返し配列が存在し、罹患者は健常者と比較してこの繰り返し数が多いことが知られている。その結果、この異常に増加したグルタミンは、神経細胞内での蓄積や凝集が観察され、つづいて神経萎縮や細胞死を引き起こす。このことがポリグルタミン病発症の主な原因であると考えられているが、なぜ *CAG* の繰り返し配列が多くなるとグルタミンが蓄積するのか、*ATXN2* はおよそ全身で発現しているにも関わらず、なぜ神経細胞特異的に障害を来すのかなど、その詳細な発症メカニズムは明らかにされていない。また、ポリグルタミンによる *ATXN2* の機能損失が起きたとき、特定の遺伝子については *ATXN2* のノックアウトとは異なる発現パターンを示すことや、*CAG* の繰り返し回数によって脊髄小脳変性症 2 型か筋萎縮性側索硬化症に分かれることから、*ATXN2* による神経変性疾患はポリグルタミンによる細胞障害だけでなく、遺伝子発現やその他のメカニズムを介した発症原因が考えられる。

出芽酵母 *Pbp1* は *ATXN2* の酵母オルソログであり、ポリグルタミン領域は存在しないが、ドメイン構造や *SG* およびポリソームへの局在など類似点が多く、高度に保存されている。このことから、*Pbp1* の機能解析を遂行することは、*ATXN2* の機能の理解を深めることにつながる。本研究において、*Pbp1* はリボソームと協調して *khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株の細胞増殖に対して負の制御に機能することが明らかにされた。さらに、*Pbp1* は *Pab1* に結合することから多くの mRNA に相互作用する可能性が考えられたが、Cross-link IP およびマイクロアレイ解析の結果から、*Pbp1* にはターゲット特異性がある可能性が示されている（未発表データ）。このことから *Pbp1* は広範に発現する因子にも関わらずターゲット特異的な遺伝子発現制御に機能していることが推測される。しかしながら、なぜ *Pbp1* は *khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株の細胞増殖を負に制御しなければならない理由については疑問である。この解決の糸口として、熱ストレスによって生じる突然変異を *Pbp1* は防いでいるということから、ただ単に細胞増殖を負に制御している訳ではなく、恒常性の維持に寄与していることが考えられる。こ

のことから、今後は Pbp1 による遺伝子発現制御を介した細胞増殖制御機構だけでなく、その生理的意義についても深く検討していくことが必要である。

最後に、本研究成果が将来的に、ポリグルタミンによる神経萎縮や細胞死による発症原因だけでなく、ATXN2 による遺伝子発現制御を介した発症メカニズムの解析など、脊髄小脳変性症 2 型の発症メカニズムの全貌解明のための一助になることを願っている。

参考文献

1. Baudin, A., K. O. Ozier, A. Denouel, F. Lacroute, and C. Cullin. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21:3329-3330.
2. Briones, E., C. Briones, M. Remacha, and J. P. Ballesta. 1998. The GTPase Center Protein L12 Is Required for Correct Ribosomal Stalk Assembly but Not for *Saccharomyces cerevisiae* Viability. *J. Biol. Chem.* 273:31956-31961.
3. Buchan, J. R., D. Muhrad, and R. Parker. 2008. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 183:441-455.
4. Collart, M. A. 2003. Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. *Gene* 313:1-16.
5. Fleischer, T.C., Weaver, C.M., McAfee K. J., Jennings, J.L., and A. J. Link. 2006. Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev.* 20:1294-1307.
6. Funakoshi, Y., Y. Doi, N., Hosoda, N. Uchida, M. Osawa, I. Shimada, M. Tsujimoto, T. Suzuki, T. Katada, and S. Hoshino. 2007. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev.* 21:3135-3148.
7. Gietz, R. D., and A. Sugino. 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74:527-534.
8. Goldstrohm, A.C., B. A. Hook, D. J. Seay, and M. Wickens. 2006. PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:533-539.

9. Hasegawa, Y., K. Irie, and A. P. Gerber. 2008. Distinct roles for Khd1p in the localization and expression of bud-localized mRNAs in yeast. *RNA* 14:2333-2346
10. Hata, H., H. Mitsui, H. Liu, Y. Bai, C. L. Denis, Y. Shimizu, and A. Sakai. 1998. Dhh1p, a putative RNA helicase, associates with the general transcription factors Pop2p and Ccr4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148:571-579.
11. Hogan, D. J., D. P. Riordan, A. P. Gerber, D. Herschlag, and P. O. Brown. 2008. Diverse RNA-Binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol.* 6:2297-2313
12. Irie, K., T. Tadauchi, P. A. Takizawa, R. D. Vale, K. Matsumoto, and I. Herskowitz. 2002. The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *EMBO J.* 21:1158-1167.
13. Ito, W., X. Li, K. Irie, T. Mizuno, and K. Irie. 2011. RNA-binding protein Khd1 *Saccharomyces cerevisiae*. 2002. *Eukaryot Cell.* 2011 10:1340-1347.
14. James, P., J. Hallady, and E. A. Craig. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425-1436.
15. Jenner L., S. Melnikov, N. G. de Loubresse, A. Ben-Shem, M. Iskakova, A. Urzhumtsev, A. Meskauskas, J. Dinman, G. Yusupova, and M. Yusupov. 2012. Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22:759-767.
16. Kaiser, C.A., A. Adams, and D. E. Gottschling. 1994. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
17. Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C. R., Shimizu, K., Hsieh, A. C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., and Barna, M. 2011. Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* 145:383-397.

18. Krause, S. A., and J. V. Gray. 2002. The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* 12:588-593.
19. Levin, D. E. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:262-291.
20. Longtine, M.S., A. R. McKenzie, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, and J. R. Pringle. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 953-961.
21. Mangus, D. A., N. Amnari, and A. Jacobson. 1998. Pbp1p, a Factor Interacting with *Saccharomyces cerevisiae* Poly(A)-Binding Protein, Regulates Polyadenylation. *Mol. Cell Biol.* 18:7383-7396.
22. Mangus, D. A., M. C. Evans, N. S. Agrin, M. Smith, P. Gongidi, and A. Jacobson. 2004. Positive and negative regulation of poly(A) nuclease. *Mol. Cell Biol.* 24:5521-5533.
23. Manukyan, A., J. Zhang, U. Thippeswamy, J. Yang, N. Zavala, M. P. Mudannayake, M. Asmussen, C. Schneider, and B. L. Schneider. 2008. Ccr4 alters cell size in yeast by modulating the timing of CLN1 and CLN2 expression. *Genetics* 179:345-357.
24. Martin, I., Kim, J. W., Lee, B. D., Kang, H. C., Xu, J. C., Jia, H., Stankowski, J., Kim, M. S., Zhong, J., Kumar, M., Andrabi, S. A., Xiong, Y., Dickson, D. W., Wszolek, Z. K., Pandey, A., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. 2014. Ribosomal Protein s15 Phosphorylation Mediates LRRK2 Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Cell* 157:472-485.
25. Mauchi, N., Y. Ohtake, and K. Irie. 2010. Stability control of MTL1 mRNA by the RNA-binding protein Khd1p in yeast. *Cell Struct. Funct.* 35:95-105.

26. Nonhoff, U., Ralser, M., Welzel, F., Piccini, I., Balzereit, D., Yaspo, M. L., Lehrach, H., and Krobitch, S. 2007. Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Molecular biology of the cell*, 18:1385-1396.
27. Parker, R. 2012. RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191:671-702.
28. Ralser, M., M. Albrecht, U. Nonhoff, T. Lengauer, H. Lehrach, and S. Krobitch. 2005. An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2. *J. Mol. Biol.* 346:203-214.
29. Sachs, A. B., M. W. Bond, and R. D. Kornberg. 1986. A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression. *Cell* 45:827-835.
30. Sakumoto, N., Y. Mukai, K. Uchida, T. Kouchi, J. Kuwajima, Y. Nakagawa, S. Sugioka, E. Yamamoto, T. Furuyama, H. Mizubuchi, N. Ohsugi, T. Sakuno, K. Kikuchi, I. Matsuoka, N. Ogawa, Y. Kaneko, and S. Harashima. 1999. A series of protein phosphatase gene disruptants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:1669-1679.
31. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning; a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
32. Satterfield, T. F., and Pallanck, L. J. 2006. Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Human molecular genetics*, 15:2523-2532.
33. Salvi, J. S., Chan, J. N., Szafranski, K., Liu, T. T., Wu, J. D., Olsen, J. B., Khanam, N., Poon, B. P., Emili, A., and Mekhail, K. 2014. Roles for Pbp1 and Caloric Restriction in Genome and Lifespan Maintenance via Suppression of RNA-DNA Hybrids. *Dev. Cell* 30:177-191.

34. Schneider, B. L., B. Steiner, W. Seufert, and A. B. Futcher. 1996. pMPY-ZAP: a reusable polymerase chain reaction-directed gene disruption cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12:129-134.
35. Simón, E., and B. Séraphin. 2007. A specific role for the C-terminal region of the Poly(A)-binding protein in mRNA decay. *Nucleic Acids Res.* 35:6017-6028.
36. Sonenberg, N., and A. G. Hinnebusch. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136:731-45.
37. Swisher, K. D., and R. Parker. 2010. Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 5:e10006.
38. Tadauchi, T., K. Matsumoto, I. Herskowitz, and K. Irie. 2001. Post-transcriptional regulation through the HO 3'-UTR by Mpt5, a yeast homolog of Pumilio and FBF. *EMBO J.* 20:552-561
39. Tadauchi, T., T. Inada, K. Matsumoto, and K. Irie. 2004. Posttranscriptional Regulation of HO Expression by the Mkt1-Pbp1 Complex. *Mol. Cell Biol.* 24:3670-3681.
40. Takahara, T., and T. Maeda. 2012. Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress. *Mol. Cell* 47:242-252.
41. Traven, A., T. H. Beilharz, T. L. Lo, F. Lueder, T. Preiss, and J. Heierhorst. 2009. The Ccr4-Pop2-NOT mRNA deadenylase contributes to septin organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 182:955-966.
42. Woolstencroft, R. N., T. H. Beilharz, M. A. Cook, T. Preiss, D. Durocher, and M. Tyers. 2006. Ccr4 contributes to tolerance of replication stress through control of CRT1 mRNA poly(A) tail length. *J. Cell Sci.* 119:5178-5192.

43. Yokoshi, M., Li, Q., Yamamoto, M., Okada, H., Suzuki, Y., and Kawahara, Y. 2014. Direct Binding of Ataxin-2 to Distinct Elements in 3' UTRs Promotes mRNA Stability and Protein Expression. *Mol. Cell.* 55:186-198.

謝辞

本研究の遂行および本論文の執筆において、終始暖かく御指導、御鞭撻を賜りました、医学医療系分子細胞生物学研究室の入江賢児教授に、心から御礼申し上げます。また、実験の指導や研究方針、盛んな議論に多くの時間をかけていただきました、水野智亮助教ならびに須田恭之助教には深く感謝申し上げます。また入江研究室の皆様には多くの助言をいただきましたことを感謝いたします。

最後に、家族には経済面、精神面において大いなる援助をいただきました。本当にありがとうございました。