

機関番号：42676

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570005

研究課題名 (和文) 分裂酵母を用いた細胞内局在化 RNA のゲノムワイドスクリーニング

研究課題名 (英文) Genome-wide screening of localized RNAs in *Schizosaccharomyces pombe*

研究代表者

竹内 (安東) 知子 (TAKEUCHI-ANDOH TOMOKO)

大妻女子大学短期大学部・家政科・准教授

研究者番号：20294548

研究成果の概要 (和文)：分裂酵母を用い、新たに 5,316 個 (累計 6,520 個) のランダムな RNA を可視化して観察し、細胞内で特異的な局在を示す RNA を探索した。その結果、核内にドット状に局在する RNA 候補を 25 個、DNA 領域特異的に局在する RNA 候補を 5 個、核小体領域特異的に局在する RNA 候補を 9 個、新たに取得した。DNA 領域に局在する RNA のうち 2 つについて調べたところ、それぞれ異なる局在化配列を有することが明らかとなった。またこれらの RNA 配列が、遺伝子発現に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In screening of new 5,316 RNAs (6,520 in total), we found 39 candidate RNAs showing subcellular localization. 25 RNAs showed localization as dots in the nucleus, and 5 RNAs and 9 RNAs were localized in the DNA region and in the nucleolus region of the nucleus, respectively. Analysis of 2 RNAs localized in the DNA region revealed that RNA sequences required for the localization were different between the two RNAs. We obtained data suggesting that the RNA sequences of the two RNAs have ability to regulate gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：分裂酵母、RNA、局在化

1. 研究開始当初の背景

細胞内に核を持つ真核細胞では、mRNA は核内の DNA から転写された後、細胞質に運ばれて蛋白質へと翻訳される。しかし、mRNA の中には、細胞質に運ばれた後すぐに翻訳されるのではなく、さらに細胞内の特定の場所に輸送された後に翻訳されるものがある (図 1)。

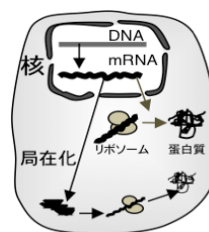


図 1. RNA の局在化

このように、RNA が、細胞内に一様に存在するのではなく、細胞内の特定の場所に局在化する現象を「RNA の局在化」と言う。

RNA の局在化により、細胞内では情報の偏りが生じ、細胞の極性形成や分化が誘導される。ヒトから酵母に至る様々な生物において、多数の局在化 RNA が発見されており、これらが細胞の極性形成や分化に必要不可欠であることが知られている。

しかしながら、局在化 RNA について、これまでに網羅的な解析は行われていない。我々は、出芽酵母を用いて、世界で初めて細胞内局在化 RNA を網羅的に探索するプロジェクトを進めてきた。RNA を可視化することで、現在までに 10,400 個の RNA の細胞内局在を観察し、新規局在化 RNA を多数発見した。この結果から、我々の局在化 RNA 探索法が実際に有効であることが明らかとなった。これまでに non-coding RNA を含むすべての局在化 RNA についての網羅的な探索を行なっているグループは我々以外にはなく、未だに多数の局在化 RNA が発見されずにいる。RNA はゲノム上の様々な部位から転写されるため、ゲノムプロジェクト終了後も細胞内で発現している RNA の全貌は不明である。本研究では、独自のゲノムライブラリーを用いることで、non-coding RNA を含め、未知の局在化 RNA を網羅的に探索することを試みた。

2. 研究の目的

本研究では、新たに分裂酵母を用いて「細胞内のすべての RNA の局在を見る」ことを目指した。RNA を可視化し、細胞内の特定の場所に局在化する RNA をできる限り網羅的に探索した。網羅的スクリーニングによって局在化 RNA を多数発見し、局在場所および局在化配列により局在化 RNA の分類を行なうことを目指した。同時に、各々の局在化 RNA について局在化機構やその生理的意義を解明していくことで、局在化 RNA の全貌解明に貢献できると考えた。

RNA 動態研究のためのモデル生物として、分裂酵母は出芽酵母に比べ、いくつかの点で優れている。出芽酵母では全遺伝子の 5%だけがイントロンを持つのに対し、分裂酵母では 43%の遺伝子がイントロンを持ち、98%以上の

遺伝子がイントロンを持つヒトなどの高等生物により近いと考えられる。また、多くの高等生物に共通する短鎖 RNA による RNA 干渉 (RNAi) システムの構成因子も、出芽酵母には存在しないが、分裂酵母には保存されている。従って、本研究により、蛋白質をコードしない non-coding RNA を含め、出芽酵母では決して得る事のできない新規な局在化 RNA を発見できる可能性が高いと予想した。

出芽酵母を用いてミトコンドリアなどの細胞内小器官を分画し、そこに含まれる mRNA を網羅的に調べるという手法は海外の複数のグループによって行なわれている (Marc, *et al.*, EMBO rep. 3 159-164, 2002; Shepard *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 11429-11434, 2003)。細胞分画とマイクロアレイを組み合わせたこれらの手法は mRNA のみをターゲットとしており、その他の RNA を見落としているばかりでなく、分画可能な既知の細胞内ドメインについてしか解析できないという限界がある。本研究は、すべての RNA の局在を生きた細胞内で可視化できる点の特徴であり、RNA によって構成される未知の細胞内ドメインが存在する場合にも、それを発見することが可能である。本研究が、新規な細胞内ドメインの発見につながれば、その生物学的意義は測り知れないと考えた。

3. 研究の方法

本研究では、分裂酵母を用い、ひとつひとつの RNA の局在を顕微鏡下で観察する方法を採用した。分裂酵母の利点として、(1) 遺伝学的解析が容易である、(2) ゲノムサイズが小さく、網羅的解析に適している、といった点が挙げられる。したがって、効率的なスクリーニングが行なえること、および個々の局在化 RNA の解析をスムーズに行なえることから、分裂酵母を研究対象として選定した。

蛋白質をコードする mRNA だけでなく、ゲノム上の様々な場所から転写される未知の non-coding RNA の検出をも視野に入れ、ランダムなゲノム断片にタグを付加したプラスミドライブラリーを構築した。このライブラリーを用いてタグ付き RNA を細胞内で強制発現させると同時に、タグ結合蛋白質と蛍光蛋白質との融合蛋白質を発現させると、発現さ

せた RNA に融合蛋白質が結合し、RNA の局在場所に蛍光が観察できる (図 2)。この方法を用いて、本研究開始前に、我々はすでに 1,204 個の RNA を観察し、non-coding RNA を含む多数の新規局在化 RNA 候補を取得していた。

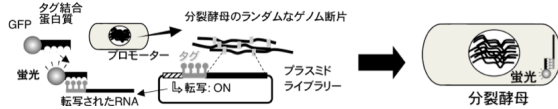


図 2. スクリーニング方法

本研究では、上記の方法により、毎年、新たに RNA の局在を観察し、局在化 RNA の同定を行った。また、DNA 領域に局在する 2 つの局在化 RNA について、局在化に必要な配列および局在化機構、局在化の意義について調べた。

4. 研究成果

分裂酵母を用い、新たに 5,316 個 (累計 6,520 個) のランダムな RNA を可視化して観察し、細胞内で特異的な局在を示す RNA を探索した。その結果、核内にドット状に局在する RNA 候補を 25 個、DNA 領域特異的に局在する RNA 候補を 5 個、核小体領域特異的に局在する RNA 候補を 9 個、新たに取得した。

これらのうち、DNA 領域に局在する F958 と B1199 について局在化配列の解析を行なった。その結果、F958 クローンに含まれていた配列のうち、タンパク質をコードしない 175 塩基の non-coding 領域に局在化に必要な配列が存在することが明らかになった。F958 と同じく DNA 領域に局在する B1199 では、局在領域が 26 塩基であったが、F958 の場合は、175 塩基をさらに断片化すると、局在が極端に弱まることがわかった。したがって、これら 2 つのクローンは、異なる局在化配列を持つことが示唆された。

次に、これらの RNA 配列が遺伝子発現に影響を与える可能性について、調べた。まず、F958 の局在化に必要な 175 塩基の non-coding 領域が、*spo9* 遺伝子の 3'UTR に含まれることを突き止めた。*spo9* mRNA には、3'UTR の長いものと短いものが 1 種類ずつ存在し、F958 の

局在化配列は、このうち 3'UTR の長い *spo9* mRNA のみに含まれることがわかった。また、減数分裂の進行に伴って、3'UTR の長い *spo9* mRNA の発現が誘導されることから、局在化配列が *spo9* の発現に対して、何らかの制御を行なう可能性が示唆された。B1199 については、B1199 の局在配列をゲノム上から欠失させた、B1199 局在領域欠失株を作成したところ、野生型株と比べて通常の細胞増殖には影響がないことがわかった。また、B1199 のゲノム上の前後の遺伝子の mRNA のレベルの発現量にも、B1199 局在領域の欠失による変化は見られなかった。しかし、B1199 の局在化配列を含む 370 塩基の領域を β -ガラクトシダーゼ遺伝子の下流に挿入すると、 β -ガラクトシダーゼ蛋白質の発現量が増加したことから、この領域が遺伝子発現を制御する能力を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Sachiko Hayashi, Tomoko Andoh, and Tokio Tani. *EGD1* (β -NAC) mRNA is localized in a novel cytoplasmic structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*, vol. 16:316-329 (2011) 査読有り。

[学会発表] (計 5 件)

1. 湊田綾子、分裂酵母 *spo9* の 3'UTR 内に存在する核内局在化 (核係留) RNA 配列の解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 7 日～10 日、神戸ポートアイランド

2. 湊田綾子、分裂酵母における核内局在化 (核係留) RNA 配列の同定と解析、第 12 回日本 RNA 学会年会、2010 年 7 月 27 日～29 日、一橋記念講堂 (東京都)

3. 湊田綾子、分裂酵母における細胞内局在化 RNA の網羅的探索と解析、RNA フロンティアミーティング 2009、2009 年 9 月 26 日～28 日、IPC 生産性国際交流センター

4. 大庭沙耶歌、分裂酵母における細胞内局在化 RNA の網羅的探索と新規核内局在化 non-coding RNA の解析、第 31 回日本分子生

物学会年会・第81回日本生化学会大会
合同大会、2008年12月12日、神戸ポート
アイランド

5. 大庭 沙耶歌、分裂酵母における網羅的
な局在化RNA のスクリーニングと遺伝子発
現調節機構の解析、第60回日本細胞生物学
会大会、2008年6月30日、パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.paw.hi-ho.ne.jp/t-takeu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 (安東) 知子 (TAKEUCHI-ANDOH
TOMOKO)

大妻女子大学短期大学部・家政科・准教授
研究者番号：20294548