



線虫Caenorhabditis elegansの18SリボソームRNAプロセシングに必要なRNA結合タンパク質RBD-1の解析

西條, 栄子

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2009-06-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3163

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003163>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 298 】

氏 名・(本 籍) 西條 栄子 (茨城県)

博士の専攻分野の名称 博士(理学)

学 位 記 番 号 博い第268号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

線虫*Caenorhabditis elegans*の18SリボソームRNAプロセッシング
に必要なRNA結合タンパク質RBD-1の解析

審 査 委 員

主 査 教 授 坂本 博
教 授 米澤 一仁
教 授 川井 浩史

これまでに蓄積された真核生物におけるリボソーム生合成経路の知見は、生化学および分子遺伝学の系が確立された出芽酵母を材料とした研究に依るところが多い。真核生物のリボソーム生合成経路の保存性から、出芽酵母で蓄積された知見を多細胞生物に応用することは可能であるが、酵母は単細胞生物であるため、複数の細胞で一個体を成している多細胞生物とは、リボソーム生合成戦略が異なっていることが予想される。近年、ショウジョウバエやアフリカツメガエルを用いた生化学的な解析により、多細胞生物の経路も次第に明らかとなってきた。しかしながら、細胞を用いた解析が主要であり、発生との相関は不明であった。分子生物学的側面から個体発生をみると、転写因子によるmRNAの転写制御が重要であることは間違いない。しかしながら、近年ではmRNAの安定性や局在化による制御機構の存在も明らかになり、転写がすなわちタンパク質合成とは言いつれないことが明らかになってきた。タンパク質合成の場であるリボソームの量も、発生過程において活発にタンパク質合成を行っている細胞と休止している細胞とでは、その必要量に応じて制御を受けている可能性がある。したがって、リボソーム生合成制御も正常な個体発生の重要な制御段階の一つであることが予想される。

そこで、多細胞生物の発生とリボソーム生合成制御の相関を解析し、個体発生の調節機構の側面の解明を試みることにした。リボソーム生合成研究には生化学的解析が不可欠であり、発生途上の多細胞生物からは、生化学的解析に必要な大量の試料を得るのは容易ではない。また、多細胞生物は比較的世代時間が長いこと、変異体作製にも手間を要する。したがって、発生とリボソーム生合成の相関を解析するのは容易ではない。そこで、本研究では、RNAi法と呼ばれる手法が利用でき、大量培養も可能であるモデル生物、線虫*C. elegans*を用いた。線虫*C. elegans*はおよそ1000細胞からなる多細胞生物である。RNAi法は操作が簡便で抑制効果が高く、変異原で作製した変異体と異なり、標的遺伝子だけを抑制できるので特異性も高い。さらに線虫*C. elegans*は発生段階の特定が可能であり、身体が透明で表現型が観察しやすい。その上、線虫*C. elegans*の世代時間は3.5日と短いため、各発生段階の表現型を速やかに解析することができる。そのため、線虫*C. elegans*を用いることにより、発生過程におけるリボソーム生合成解析が可能になると考えた。

リボソーム生合成は多段階から成る過程であるが、rRNAプロセシングの過程は鍵となる段階のひとつである。そこでrRNAプロセシング因子を解析の標的とした。線虫*C. elegans*のリボソーム生合成因子に関する報告はないため、真核生物における生合成因子の役割は保存されていると仮定し、出芽酵母rRNAプロセシング因子Mrp1の相同遺伝子産物、線虫*C. elegans* RBD-1の解析を行うことにした。

発生段階によるリボソーム生合成制御を調べるため、はじめに線虫*C. elegans* 各発生段階におけるRBD-1の発現パターンをウェスタンブロットングにより解析した。その結果、RBD-1は幼虫期から成虫期にかけては高発現しているが、胚形成期には発現が抑制されていることが明らかになった。そこで、さらに胚形成期での発現を、抗体染色法を用い

て詳細に解析したところ、初期胚ではRBD-1の発現は抑制されており、細胞分裂速度の低下する形態形成期から発現が起こることが判明した。

線虫*C. elegans* rRNAの転写は1細胞期から起こっていることが報告されているので、胚形成の初期には、リボソームの生合成の鍵となる、リボソームRNAプロセシングが抑制されている可能性が示唆された。しかしながら、RBDタンパク質群の機能の多細胞生物における保存性は不明であった。そこで、RBD-1のリボソーム生合成における機能を検討し、発現様式がリボソーム生合成を反映しているかどうかを明らかにすることにした。

そこで、線虫*C. elegans* RBD-1とリボソーム生合成との関連を解析するため、RNAi法を用いてRBD-1の発現を抑制し、リボソームRNAおよびサブユニット生成への影響を調べた。まず、RBD-1を抑制した線虫*C. elegans* における18S、および26S rRNA量を生化学的に定量した結果、18Sのみが減少しており、RBD-1は18S rRNA生成に特異的に必要な因子であることが示唆された。また、ショ糖密度勾配遠心法を用いてリボソームサブユニット生成量を測定した結果、RBD-1の抑制によって18S rRNA が含まれる40Sサブユニットの合成量が減少することが明らかになった。この結果から、RBD-1は酵母Mrp1と同様、18S rRNAプロセシングに関わる因子であることが強く示唆された。そこで、18S rRNA生合成におけるRBD-1の機能の解析を試みた。しかしながら、線虫*C. elegans* rRNAのプロセシング経路に関する知見は本研究以前には非常に乏しかった。そこでまず、線虫*C. elegans* におけるrRNAのプロセシング経路の解明を試み、その概要を明らかにした。線虫*C. elegans* rRNAのプロセシング経路では、rRNA前駆体はプロセシングによって除かれる内部スパーサー領域内に二カ所の切断部位を持っていることが判明し、切断部位Ⅲ、およびⅣと名付けた。そして次に、得られた情報と、野生型、およびRBD-1の発現を抑制した線虫*C. elegans* でのrRNAプロセシング経路とを比較解析した。その結果、RBD-1は少なくともrRNA前駆体の切断部位Ⅲのプロセシングに必要なリボソーム生合成因子であることが明らかになった。RBD-1はリボソームプロセシング因子であり、かつ、初期胚での発現が著しく低いことから、線虫*C. elegans* 初期胚ではリボソームのプロセシングが抑制されていることが強く示唆された。

胚形成期は体積が一定のまま細胞数のみが増加する時期であるが、体積、細胞数共に成長する胚形成期以降では、リボソーム量の減少により、翻訳に必要な組織により重篤な障害を与えると予想される。そこで、リボソーム生合成量の減少によって引き起こされる胚形成以降の表現型を調べた。成虫になるまでに4回の脱皮を経る線虫*C. elegans* では、約2時間で終了する脱皮の度に全ての外皮を作り直さねばならない。したがって、外皮タンパク質の合成は、量および時間的に最も急激な翻訳を要する過程であると考えられる。RNAi法によりRBD-1の発現を抑制した結果、個体の成長が著しく遅延し、半数は幼虫期で死に至ることが明らかとなった。このことから、RBD-1は胚形成以降の時期において、胚形成以降の生育に必須のタンパク質であることが示された。さらにRBD-1を抑制した個体の表

(氏名：西條栄子 NO. 3)

現型を実体顕微鏡、および電子顕微鏡を用いて詳細に解析した結果、脱皮異常や陰門形成の異常、外皮構造体alaeの形態異常が観察された。このことから、全体的なりボソーム量の低下は、生育遅延や致死性を引き起こすだけではなく、特異的な組織の発達にも影響を及ぼすことが明らかになった。

リボソームの生合成は細胞の生育に必須の過程である。本解析では線虫*C. elegans*のリボソームRNAのプロセシング経路の概略を明らかにし、その情報に基づいて、RBDタンパク質のリボソームRNA生成における機能の多細胞生物での保存性を示した。さらにリボソームRNAプロセシング因子であるRBD-1の発現が初期胚で抑制されていることを発見し、多細胞生物の初期発生ではリボソーム生合成の各段階は協調しておらず、初期胚においてはリボソームRNA前駆体が蓄積しているという可能性を示した。この解析によって、多細胞生物初期発生とリボソーム生合成制御の関連の一端が明らかになった。

(別紙1) 論文審査の結果の要旨

氏名	西條 栄子		
論文 題目	線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> の 18S リボソーム RNA プロセシングに必要な RNA 結合タンパク質 RBD-1 の解析		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	坂本 博
	副 査	教 授	米澤 一仁
	副 査	教 授	川井 浩史
	副 査		印
	副 査		印
要 旨			
これまでに蓄積された真核生物におけるリボソーム生合成経路に関する知見は、生化学および分子遺伝学の系が確立された出芽酵母を材料とした研究によるところが多い。真核生物のリボソーム生合成経路の保存性から、出芽酵母で蓄積された知見を多細胞生物に応用することは可能であるが、酵母は単細胞生物であるため、複数の細胞で一個体を形成している多生物生物とは、リボソーム生合成の制御が異なっていることが考えられる。多細胞生物におけるリボソームの量は、活発にタンパク質合成を行っている細胞と休止している細胞とは、その必要量に応じて自ずと異なる制御を受けている可能性がある。このため、リボソーム生合成の制御は多細胞生物の正常な個体発生において重要な調節段階のひとつであることが予想される。近年、ショウジョウバエやアフリカツメガエルを用いた生化学的な解析により、多細胞生物のリボソーム生合成経路も次第に明らかになってきているが、これらは主に細胞レベルの解析であり、リボソーム生合成制御と発生などの高次生命現象との関連は不明であった。 本研究では、多細胞生物の発生とリボソーム生合成制御の連関を解析するために、RNAi法と呼ばれる遺伝子発現抑制法が適用可能で、大量培養も可能である多細胞生物である線虫<i>Caenorhabditis elegans</i>を用いている。リボソーム生合成は多段階からなる過程であるが、リボソームRNA (rRNA) の成熟、すなわちプロセシングの過程は必要不可欠である。そこで、本研究では、出芽酵母のrRNAプロセシング因子Mrd1pの<i>C. elegans</i>相同遺伝子産物RBD-1を材料にして、多細胞生物の発生とリボソーム生合成制御の連関の解析を行っている。 本論文は第一章の「序論」、第二章から第四章の「結果」、第五章の「考察」、第六章の「材料と方法」の全六章で構成されている。 第一章の序論では、現在までのリボソーム生合成に関する研究についてまとめるとともに、多細胞生物におけるリボソーム生合成制御の重要性を議論している。 第二章では、<i>C. elegans</i>の各発生段階におけるRBD-1の発現パターンをウエスタンブロッティング法により解析している。その結果、RBD-1は幼虫期から成虫期にかけては高発現しているが、胚形成期には発現が抑制されていることを明らかにしている。そこで、さらに胚形成期での発現を抗体染色によって詳細に解析し、初期胚ではRBD-1の発現は抑制されているという結果を得ている。さらに、他生物でよく解析されているrRNAプロセシング因子FIB-1の発現がRBD-1と同様に初期胚では抑制されているということを明らかにしている。 第三章では、酵母の場合と同様に、RBD-1が実際に<i>C. elegans</i>のリボソーム生合成に必要であるかどうかを解析するために、RNAi法を用いてRBD-1の発現を抑制し、rRNAおよびリボソーム形成への影響を調べている。まず、RBD-1を抑制した<i>C. elegans</i>における18S、および26S rRNA量を生化学的に定量した結果、18Sのみが減少していることを明らかにしている。また、ショ糖密度勾配遠心法を用いてリボソームサブユニット生成量を測定し、RBD-1の抑制によって18S rRNA が含まれる40Sサブユニットの合成量が減少することを明らかにしている。また、本研究以前には、<i>C. elegans</i>のrRNAのプロセシング経路に関する知見は非常に乏しかったため、<i>C. elegans</i>におけるrRNAのプロセシング経路の解明を試みている。その結果、<i>C. elegans</i>では、rRNA前駆体の内部スパーサー領域内に二カ所の切断部位が存在することを明らかにしている。そして次に、野生型、およびRBD-1の発現を抑制した<i>C. elegans</i>でのrRNAプロセシング経路を比較解析している。その結果、RBD-1は少なくともrRNA前駆体の一カ所の切断部位でのプロセシングに必要な因子であることを明らかにしている。これらの結果を総合して、RBD-1は18S rRNAの成熟に必要な不可欠なプロセシング因子であることを結論している。			

氏名

西條 栄子

第四章では、リボソーム生合成量の減少によって引き起こされる胚形成以降の表現型を調べている。RNAi法によりRBD-1の発現を抑制すると、個体の成長が著しく遅延し、半数は幼虫期で死に至ることを明らかにしている。さらにRBD-1の発現を抑制した個体の表現型を実体顕微鏡、および電子顕微鏡を用いて詳細に解析した結果、脱皮異常や陰門形成の異常、外皮構造体 α laeの形態異常が起こることを見いだしている。これらの結果から、全体的なリボソーム量の低下は、生育遅延や致死性を引き起こすだけでなく、特異的な組織・器官の形成にも影響を及ぼすことが明らかになった。

第五章では、本研究で得られた結果を総合し、発生過程におけるリボソーム生合成制御の意義及び真核生物のrRNAプロセッシング経路の保存性について議論している。また、*C. elegans*のrRNAの転写は1細胞期から起こるという報告と、本研究で得られた胚発生初期にrRNAプロセッシング因子であるRBD-1やFIB-1が発現しないという事実から、*C. elegans*の胚発生初期にはrRNAの転写とプロセッシングが必ずしも共役していないという可能性を提唱している。

以上のように、本研究では *C. elegans* の rRNA のプロセッシング経路の概略をはじめて明らかにするとともに、RBD-1 が 18S rRNA のプロセッシングに必要不可欠な因子であることを明らかにしている。さらに、rRNA プロセッシング因子である RBD-1 や FIB-1 の発現が初期胚で抑制されていることを発見し、多細胞生物の初期発生では必ずしもリボソーム生合成の各段階は協調していないという興味深い可能性を提起している。これらの知見は、多細胞生物におけるリボソーム生合成制御と発生などの高次生命現象との関連を強く示唆する新規かつ重要なものであり、価値ある集積であることを認める。よって、学位申請者の西條栄子は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。