

論文の内容の要旨

論文題目

分裂酵母の減数分裂進行に必須な長鎖ノンコーディング RNA である
meiRNA の機能解析

(Functional analysis of meiRNA, which is a long non-coding RNA
essential for the progression of meiosis in fission yeast)

氏名 七野 悠一

分裂酵母は、体細胞分裂から減数分裂へと移行する際、遺伝子発現パターンを大幅に切り換える。体細胞分裂期には、減数分裂特異的な遺伝子は転写レベルで抑制されている。それに加えて、分裂酵母には減数分裂特異的な転写産物を選択的に除去する機構が存在する。一群の減数分裂特異的な転写産物には、DSR (determinant of selective removal) と呼ばれる目印配列が存在する。この配列を RNA 結合タンパク質である Mmi1 が特異的に認識し、エキソソーム複合体による RNA 分解系へと誘導する (図 1)。この機構によって、体細胞分裂期には、減数分裂特異的な遺伝子の発現は強く抑制されている。

一方、減数分裂期には Mmi1 の活性を抑制し、減数分裂特異的な遺伝子を発現させる必要がある。減数分裂期に入ると、長鎖ノンコーディング RNA である meiRNA と減数分裂マスター制御因子 Mei2 が発現する。meiRNA と Mei2 は直接結合し、meiRNA をコードする *sme2* 遺伝子座に凝集して、Mei2 ドットと呼ばれる核内構造体を形成する。Mei2 ドットは核内に散在する Mmi1 を一箇所に束ねることで、Mmi1 の活性を抑制する (図 1)。これによって、減数分裂特異的な遺伝子発現パターンへの移行が促進される。

sme2 破壊株では、Mei2 ドットが形成されず、Mmi1 が抑制されないため、減数第一分裂で停止してしまう。このことから、meiRNA は転写された後、自らの遺伝子座に係留され、Mei2 ドットを形成するための足場として働き、減数分裂の進行に必須な役割を果たしていると考えられる。しかし、meiRNA の機能に関しては、自らの遺伝子座に凝集する機構も含めて不明な点が多い。そこで本研究では、meiRNA の詳細な機能解析を行った。

meiRNA は Mmi1 の擬似餌として働く

meiRNA には meiRNA-S (約 0.5 kb) と meiRNA-L (約 1.0 ~ 1.3 kb) の 2 種類のアイソフォームが存在する。meiRNA が単離された当初は、より発現量の多い meiRNA-S が主要な転写産物であり、

体細胞分裂期

減数分裂期

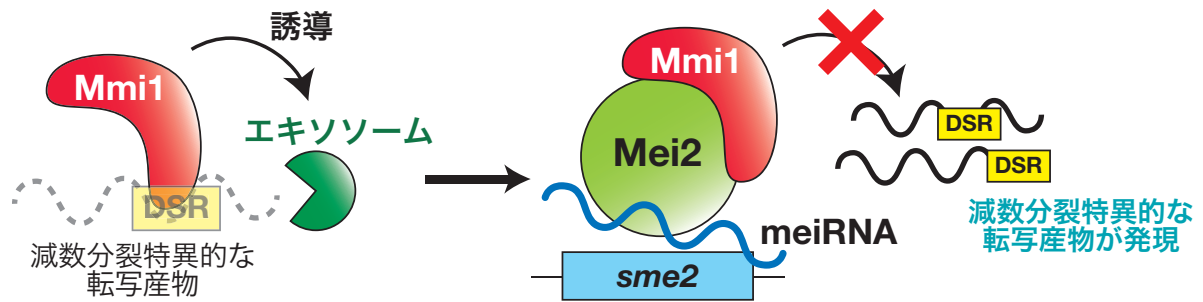


図1 Mei2-meiRNAによる減数分裂の概略

体細胞分裂期には Mmi1 が DSR を持つ減数分裂特異的な転写産物を認識し、エキソソームによる RNA 分解系へと誘導するため、減数分裂特異的な遺伝子の発現が低く抑えられる。減数分裂期には *sme2* 遺伝子座に meirRNA と Mei2 がドットを形成する。Mei2 ドットは Mmi1 を一つに束ね、その活性を抑制するため、減数分裂特異的な転写産物が分解されずに残り、減数分裂が進行する。

meirRNA-L はリードスルー産物であると考えられていた。しかし、meirRNA-L のみに含まれる領域の配列を詳細に解析したところ、Mmi1 が認識する 6 塩基の DSR モチーフ UNAAAC が多数含まれていることが分かった (図2)。このことから、meirRNA-L は Mmi1 のターゲットの一つであり、何らかの機能を持つという可能性が考えられた。

まず、*mmi1* 変異株における meirRNA の発現を、ノザンプロッティングにより解析した。meirRNA の発現は、野生株においては、体細胞分裂期の細胞ではみられず、減数分裂期の細胞でのみ観察される。しかし、*mmi1* 変異株では、体細胞分裂期の細胞においても meirRNA-S および meirRNA-L の発現が上昇していた。次に、meirRNA-L と Mmi1 の結合を EMSA (electro mobility shift assay) 法により検討した。meirRNA を meirRNA-S に相当する 5' 側と、それ以降の部分である 3' 側に分割して EMSA を行ったところ、Mmi1 は meirRNA-L の 3' 側に直接結合し、5' 側とは結合しないことが分かった。また、同様の実験を Mei2 について行ったところ、Mei2 は meirRNA-L の 5' 側に結合し、3' 側とは結合しないことが明らかとなった。以上から、meirRNA-L は DSR モチーフを多数含む 3' 側の領域を介して Mmi1 と結合し、RNA 分解系へと誘導されていることが明らかになった。

次に、meirRNA の機能領域を探索するため、5' 側と 3' 側のそれぞれをクローニングして *sme2* 破壊株に導入し、減数第一分裂で停止する表現型が抑圧されるかどうかを検討した。meirRNA-L の 5' 側を導入した場合は、抑圧は起こらなかったが、3' 側を導入した場合は抑圧がみられた。よって、3' 側

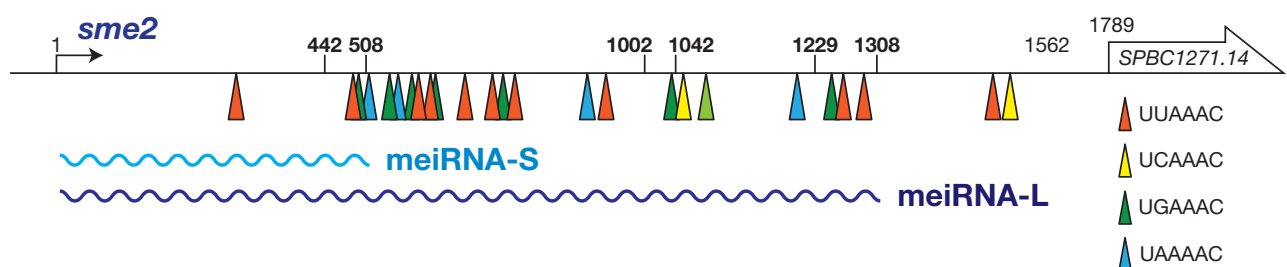


図2 *sme2* 遺伝子における DSR モチーフの位置

矢頭は各 DSR モチーフの位置を、波線は 2 種類の meirRNA アイソフォームの位置を示す。太字の数字は、検出された meirRNA の 3' 末端の位置を表す。

の領域が *meiRNA* の減数分裂を進行させる能力に重要であることが分かった。これらの株における *meiRNA* の発現を検討したところ、3' 側を発現させた場合は 5' 側を発現させた場合に比べて、発現量が顕著に低かった。よって、*meiRNA-L* の 3' 側は DSR として働き、*Mmi1* を介した RNA 分解を受けていると考えられた。さらに、*sme2* 遺伝子の全 DSR モチーフを破壊した *sme2-DSRless* 株を作製したところ、この株は減数第一分裂で停止する表現型を示した。以上から、*meiRNA* の減数分裂を進行させる能力には DSR モチーフが重要であることが分かった。これらの結果から、*meiRNA* は *Mmi1* の擬似餌として働き、*Mmi1* の活性を抑えているというモデルが考えられる。

meiRNA のドット形成には *Mmi1* の自己相互作用が重要である

meiRNA の局在を生細胞内で観察するため、バクテリオファージの MS2 コートタンパク質を利用した。MS2 コートタンパク質は、ステムループを形成する MS2 配列に特異的に結合する。そこで、MS2 配列を導入した *meiRNA* と、MS2 コートと蛍光タンパク質の融合タンパク質を同時に発現する株を作製した。この株では、減数分裂進行中の細胞の核内において、単一の蛍光ドットが観察された。このドットは蛍光タンパク質で標識した *sme2* 遺伝子座や *Mei2* ドットと共局在しており (図 3)、本来の *meiRNA* の局在を反映していると考えられた。

この系を用いて、*meiRNA* を 5' 側および 3' 側のみ発現させ、その局在を観察した (図 3)。5' 側のみを発現させた場合は、*meiRNA* のドットは観察されなかった。この株では、*sme2* 破壊株と同様に、*Mei2* ドットは形成されず、*Mmi1* が核内に散在していた。一方、3' 側のみを発現させた場合は、*meiRNA* のドットが観察された。この株では、*Mmi1* は *meiRNA* のドット上に集められ、一点となっていたが、*Mei2* のドットは観察されなかった。さらに、*sme2-DSRless* 株における *meiRNA* の局在を観察したところ、ドットは観察されなかった。また、*sme2-DSRless* 株では 5' 側のみを発現させた場合と同様に、*Mei2* ドットは形成されず、*Mmi1* が核内に散在していた。以上から、3' 側領域に存在する DSR モチーフが、*meiRNA* のドット形成に必須であり、*Mei2* と結合する 5' 側の領域は、*Mei2* ドットの形成に必須であることが分かった。

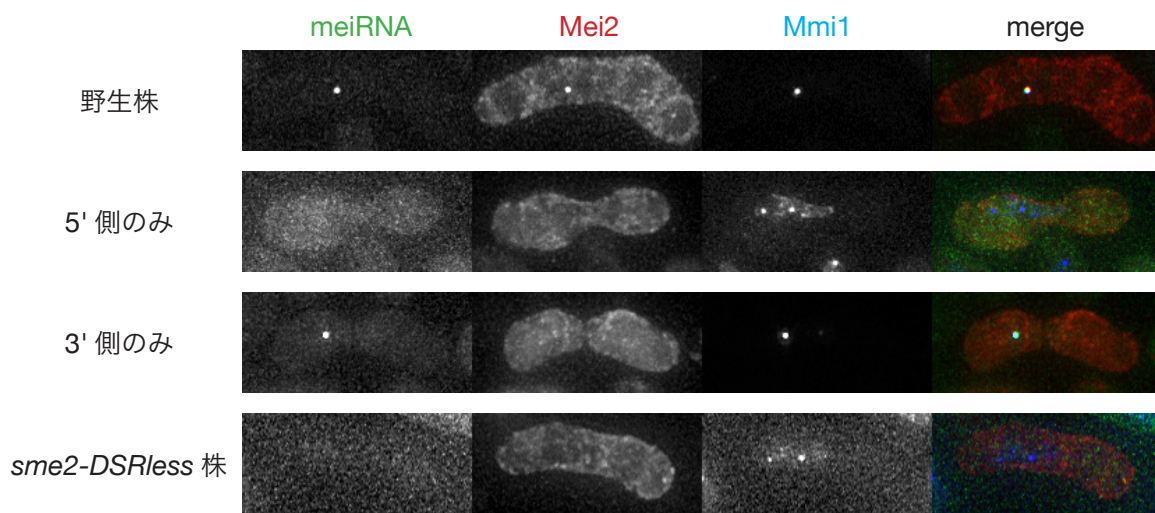


図 3 *meiRNA* のドット形成には DSR モチーフが必要である
各 *sme2* 変異体における *meiRNA*、*Mei2*、*Mmi1* の局在を観察した。*meiRNA* は MS2 コートタンパク質を用いて可視化した。

DSRモチーフが *meiRNA* のドット形成に重要であることが分かったので、*meiRNA* の局在に対する *Mmi1* の寄与を検討したところ、*mmi1* 破壊株では *meiRNA* のドットが形成されないことが明らかとなった。また、*Mmi1* は N 末端側の領域によって自己相互作用しており、この領域を欠損した *mmi1* 変異体では、*meiRNA* の凝集が観察されないことが分かった。以上から、*meiRNA* は *Mmi1* の自己相互作用を介して自らの遺伝子座で凝集し、減数分裂進行を促していると考えられる。

meiRNA は *Mmi1* を一つに束ね、活性を低下させる

体細胞分裂期における *Mmi1* の局在を詳細に観察したところ、*Mmi1* の一部が *sme2* 遺伝子座に強く局在していることが分かった。この *Mmi1* の *sme2* 遺伝子座への局在化は、*sme2* 遺伝子の転写量が著しく低下している *sme2-m* 変異体や、DSRモチーフを全て破壊した *sme2-DSRless* 変異体では観察されなかった。よって、転写された *meiRNA* の DSRモチーフを *Mmi1* が認識することで、*Mmi1* が *sme2* 遺伝子座に誘引されていると考えられる。

Mmi1 は *meiRNA* の転写依存的に *sme2* 遺伝子座へ誘引されることが分かったので、体細胞分裂期において *meiRNA* を過剰発現したところ、*Mmi1* が *sme2* 遺伝子座に一点に局在している細胞の割合が増加した。3' 側のみを過剰発現した場合も、*Mmi1* が一点に集められている細胞の割合が増加することが分かった。*meiRNA* の過剰発現による *Mmi1* の凝集は、*mei2* 破壊株でも同様に観察された。さらに、*mmi1* の機能を若干低下させた状態で *meiRNA* を過剰発現すると、DSRをもつ mRNA の発現量が増加することが明らかとなった。よって、*meiRNA* の過剰発現によって *Mmi1* は一点に束ねられ、その結果、活性低下が誘導されると考えられる。

以上の結果から、本論文の結論は以下の通りである。*meiRNA* は DSRモチーフを介して *Mmi1* と結合し、*Mmi1* の自己相互作用依存的に、自らの遺伝子座に局在してドットを形成する。自らの遺伝子座に局在した *meiRNA* は、*Mmi1* の擬似餌として働くことで *Mmi1* をさらに誘引し、*Mmi1* の活性低下を誘導している。