

## 研究主論文抄録

論文題目            分裂酵母スプライシング変異株 *prp13-1* の解析  
(Analyses of the fission yeast splicing mutant *prp13-1*)

熊本大学大学院自然科学研究科 理学専攻 生命科学講座  
(主任指導 谷 時雄 教授)

論文提出者            知念まどか  
( by Madoka Chinen )

### 主論文要旨

真核生物の遺伝子は、タンパク質に翻訳されるエクソン配列がタンパク質には翻訳されないイントロン配列によって分断されている。そのため、機能を持ったタンパク質として翻訳されるには、正確にイントロン配列が取り除かれる必要がある。イントロン配列は、DNA から mRNA へと遺伝情報が転写された後、スプライシング反応によって取り除かれる。また、スプライシング反応はイントロン配列を取り除くだけでなく、つなぎ合わせるエクソンの選択を変えることで、一つの遺伝情報から複数のタンパク質を作り出す選択的スプライシングを行うことにより、遺伝子発現の多様性を生み出すことにも重要な役割を果たしている。

真核生物種間において、スプライシング反応のメカニズムは高度に保存されている。スプライシング反応は、5種類の核内低分子 RNA (U1、U2、U4、U5、U6 small nuclear RNA:snRNA) と多くのタンパク質から構成されるスプライソソームと呼ばれる巨大な複合体により行われている。

本研究では分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のスプライシング変異株 *prp13-1* について解析を行った。分裂酵母は単細胞真核生物で世代時間が短く、一倍体で生育するため遺伝学的解析が容易であるだけでなく、ゲノムプロジェクトが終了しているため遺伝子の同定が容易である。また、出芽酵母ではイントロンを保持する遺伝子の割合が約 4% であるのに対し、分裂酵母は約 46% の遺伝子がイントロンを持つ。さらに出芽酵母に存在しない RNAi 機構が分裂酵母には存在するなど、スプライシングにとどまらず、RNA の研究を行う上で非常に優れたモデル生物である。

本研究で解析を行った *prp13-1* 変異株は、33°C 以上の温度では生育できない温度感受性を示し、スプライシング反応に必須な U4 snRNA の 5' stem-loop 領域に存在する 35 番目の G が A に変異している。この領域には Snu13p が結合することがヒトや出芽酵母で知られているため、まず U4 snRNA と Snu13p との結合について解析

を行った。HA タグを融合した Snu13p を *prp13-1* 変異株で発現させ、免疫沈降実験を行った結果、*prp13-1* 変異株においては U4 snRNA と Snu13p との結合が野生型株に比べて低下していることが示された。

*prp13-1* 変異株は、スプライシング変異株であるが、微小管重合阻害剤である Thiabendazole に対して高感受性を示し、さらに染色体分配が異常な細胞で M 期において生じる lagging chromosome が高頻度で観察された。この表現型の原因を調べた結果、*prp13-1* 変異株ではセントロメア領域のヘテロクロマチン化形成が異常であることが明らかとなった。さらに他のスプライシング変異株のいくつかもヘテロクロマチン形成に異常を示した。

分裂酵母において、セントロメア領域のヘテロクロマチンは、セントロメアから転写される non-coding RNA から siRNA が生成され、RNA interference (RNAi) 機構を介して形成される事が知られている。*prp13-1* 変異株において RNAi 関連因子の pre-mRNA のスプライシングに阻害は検出できず、スプライシング変異株が示すセントロメア領域のヘテロクロマチン化の異常という表現型は、スプライシング阻害による二次的影響ではなく、スプライシング因子の変異が直接的に関与している可能性が示唆された。さらに、免疫沈降実験により、スプライシング因子 Prp14p が RNAi 関連因子である Cid12p と相互作用する事が示された。

最近、Allshire らのグループにより、スプライシング因子 Prp10p が RNAi 関連因子 Cid12p と相互作用し、セントロメア領域のヘテロクロマチン化に関与する可能性が報告された (Science, 2008)。しかし、スプライシング因子がどの様にヘテロクロマチン形成に関与するのかについては明らかにされていなかった。

本研究において、セントロメア領域から転写される non-coding RNA が mRNA タイプのイントロン配列を含んでおり、実際にスプライシングを受ける事を新たに発見した。現在までに解析した結果に基づき、スプライシング因子がイントロン配列の認識を介してセントロメア non-coding RNA 上へと集合し、さらに、それらのスプライシング因子と Cid12p との相互作用によって RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ複合体がセントロメア領域へ誘引され、セントロメア特異的なヘテロクロマチン形成が起こるモデルを提唱した。