

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：42676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23570011

研究課題名(和文) 分裂酵母新規DNA領域局在化RNA群の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel localized RNAs at the DNA region in the nucleus of fission yeast

研究代表者

竹内 知子(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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： 分裂酵母の核内のDNA領域に局在する新規RNAについて解析した。新たに解析した6個のうち、5つは約700塩基内に、残りの1つは約2,700塩基内に局在化配列が存在することが明らかになった。先行して解析を進めているB1199については、B1199と相補的なRNA配列もDNA領域に局在することが明らかとなった。また、B1199の局在化配列の付加によってmRNAが核内に係留されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Novel RNAs localized at the DNA region in the nucleus of fission yeast were analyzed. We newly analyzed 6 RNAs in this research, and found that 5 of these RNAs possess the localization sequences of ~700 bases and the other RNA possesses the localization sequence of ~2700 bases. We also analyzed B1199, whose analysis had been continued before this research, and found that not only B1199 but also its complementary sequence is localized at the DNA region of the nucleus. Besides, it was suggested that mRNA was held in the nucleus by addition of B1199 localization sequence.

研究分野：遺伝学

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。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(図1)。

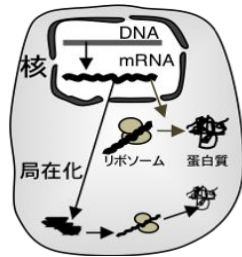


図1. RNA の局在化

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な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、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、現在までに出芽酵母で 11,600 個、分裂酵母で 6,520 個の RNA の細胞内局在を観察し(図2)、新規局在化 RNA を多数発見した。

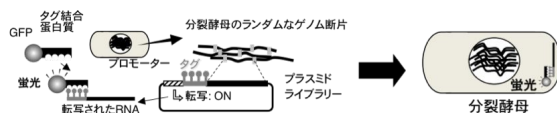


図2. 分裂酵母を用いた、局在化 RNA のスクリーニング方法

## 2. 研究の目的

本研究は、我々が分裂酵母で発見した新規局在化 RNA について、局在化機構やその生理的意義を解明することを目的として行なった。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(文献)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、分裂酵母を用いた研究では、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ことのできない新規な局在化 RNA を発見し解析できる可能性が高い。

我々はこれまでに、分裂酵母において特異的な局在を示す RNA の候補を、32 個取得している。これらの局在パターンは、核にドット状に局在する RNA が 23 個、核内の DNA 領域全体に局在する RNA が 8 個、細胞質にドット状に局在する RNA が 1 個であった。出芽酵母におけるスクリーニング(文献)では、核内や細胞質にドット状に局在する RNA を既に複数発見しており、解析を進めている。しかし、興味深いことに、核内の DNA 領域全体に局在する RNA (図3)は、分裂酵母を用いたスクリーニングによって初めて発見することができた。従って、本研究では、核内の DNA

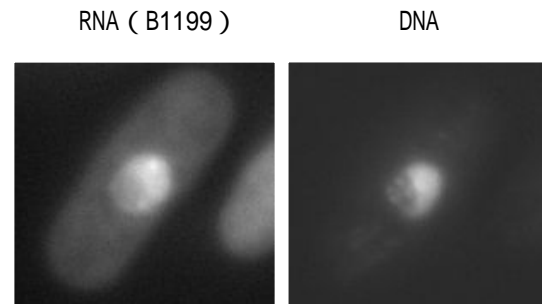


図3. DNA 領域局在化 RNA、B1199 の局在の様子

領域全体に局在する 8 個の新規局在化 RNA を中心に解析を進めた。これらのうち既に B1199 と F958 に関しては先行して解析を進めており、本研究の開始前に、少なくとも B1199 については non-coding RNA であることが示唆されていた。また、断片化実験により、これらの 2 個の局在化 RNA が、それぞれ異なる局在化配列を持つことも示唆されていた。従って、DNA 領域への局在に関しては複数種の局在化 RNA 配列が存在すると考えられた。本

研究では、残り6個の新規DNA領域局在化RNAについても局在化配列を同定し、合計8個のDNA領域局在化配列を比較・分類することで、DNA領域への局在化に必要な保存配列を明らかにしたいと考え、解析を進めた。また、それぞれの局在化RNAの局在化機構および局在化の生理的意義を解析することで、新たな局在化RNA像を解明したいと考え、解析を進めた。

### 3. 研究の方法

本研究では、スクリーニングで得た局在化RNAのクローン配列を断片化し、局在化配列の同定を試みた。スクリーニングの際には、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可視化のためのタグを付加したライブラリーを用いていた(図2)。未解析の6個の局在化クローンについて、それぞれの配列を調べたところ、およそ6,000~12,000塩基のゲノム断片を含んでいることが明らかとなった。これらのゲノム断片をさらに短く断片化していき、短い断片から転写されるRNAの局在を観察することで、局在化に必要な配列の同定を試みた。

また、先行して解析を進めていたB1199については、B1199の局在化配列をマーカー遺伝子につないで酵母の細胞に導入し、マーカー遺伝子のみを導入した場合と比べ、マーカー遺伝子の遺伝子産物(蛋白質)の発現量に差が出るか否かを測定した。B1199の局在化配列を付加することにより、マーカー遺伝子由来のmRNAが核内に係留され細胞質への移動が制限されるなら、B1199の局在化配列の付加によってマーカー遺伝子の遺伝子産物の発現量が減少するであろうと予想し、この実験を行なった。予備実験により、B1199の局在化配列の付加によってマーカー遺伝子の遺伝子産物の発現量が減少することは示唆されていたが、本研究では、マーカー遺伝子のmRNAの発現量が等しい株同士を使って、厳密に比較した。

その他、B1199の内在性の発現をRT-PCR法によって解析した。また、成功はしなかったが、*in situ* hybridization法によるB1199の局在の検出を試みたり、F958の局在化配列の遺伝子破壊を試みたりした。

### 4. 研究成果

B1199とF958以外の6つのDNA領域局在化RNAについて、断片化実験を行ない、局在化配列の同定を進めた結果、6つのうち5つは約700塩基内に、残りの1つは約2,700塩基内に局在化配列が存在することが明らかになった。

B1199について、内在性の発現を確認したところ、細胞内ではB1199の配列の他に、B1199と相補的な配列も転写されており、いずれのRNA鎖もDNA領域への局在を示すことがわかった。また、B1199の局在化配列をマーカー遺伝子につないで酵母の細胞に導入し、マーカー遺伝子のみを導入した場合と比べ、マーカー遺伝子の遺伝子産物の発現量に差が出るか否かを、マーカー遺伝子のmRNAの発現量が等しい株同士で比較したところ、B1199の局在化配列の付加によって、マーカー遺伝子の遺伝子産物の発現量が約1/3に減少することを確認した。この結果から、B1199の局在化配列の付加によって、マーカー遺伝子由来のmRNAが核内に係留され、細胞質への移動が制限されることが示唆された。

#### <引用文献>

Bähler J, Wood V. The molecular biology of *Schizosaccharomyces pombe*. Berlin: Springer-Verlag (2004)

Andoh T, Oshiro Y, Hayashi S, Takeo H, Tani T. Visual screening for localized RNAs in yeast revealed novel RNAs at the bud-tip. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 4:999-1004

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Takeuchi-Andoh T, Ohba S, Shinoda Y, Fuchita A, Hayashi S, Nishiyoshi E, Terouchi N, Tani T. A simplified vector system for visualization of localized RNAs in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 80:1362-1367 (2016) 査読有り。

DOI: 10.1080/09168451.2016.1158633

[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

### (2)連携研究者

谷 時雄 (TANI, Tokio)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号：80197516

### (3)研究協力者

清水 まさき (SHIMIZU, Masaki)

西吉 恵美 (NISHIYOSHI, Emi)