

出芽酵母細胞壁合成経路におけるポリ A 鎖分解酵素 Ccr4、Pop2 と

デキャッピング酵素活性化因子 Dhh1 の機能解析

大森 哲朗 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 入江 賢児 (筑波大学 医学医療系)

背景と目的

細胞における遺伝子発現は、DNA の転写から翻訳後制御に至るまで様々な段階で調節されており、そのなかで真核生物には複雑な mRNA の分解制御や翻訳制御が存在する。出芽酵母において、mRNA 分解制御や翻訳制御に機能する RNA 結合タンパク質 Khd1、ポリ A 鎖分解酵素 Ccr4 は、標的 mRNA の発現を制御することにより、細胞壁合成経路に関与している。Khd1 と Ccr4 は細胞壁合成経路で働く低分子量 G タンパク質 Rho1 の GDP/GTP 交換因子 (GDP/GTP exchange factor: GEF) をコードする *ROM2* mRNA の発現を正に制御し、Ccr4 は Rho1 の GTP アーゼ活性化因子 (GTPase activating protein: GAP) をコードする *LRG1* mRNA の発現を負に制御する。*khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株では、*ROM2* の発現が低下し、*LRG1* の発現が上昇する結果、Rho1 の活性が低下し細胞壁の合成異常を示す。

本研究では、Ccr4 と同じくポリ A 鎖分解酵素である Pop2 と、デキャッピング酵素活性化因子である Dhh1 についても、*ROM2* mRNA や *LRG1* mRNA の発現との関連を解析した。

方法

1. *pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株を作製し、*ROM2* mRNA および *LRG1* mRNA レベルをノザン解析により調べた。
2. *pop2Δ rom2Δ*、*dhh1Δ rom2Δ* 二重変異株、*pop2Δ rom2Δ lrg1Δ*、*dhh1Δ rom2Δ lrg1Δ* 三重変異株を作製し、その表現型を解析した。

結果と考察

1. Pop2 および Dhh1 は、*LRG1* mRNA の発現を負に制御する

Pop2 が *ROM2* mRNA 及び *LRG1* mRNA と関与しているかを調べることを目的として、野生型株、*pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株において *ROM2* mRNA と *LRG1* mRNA のノザン解析を行った。

その結果、*ROM2* mRNA レベルについては、野生型株、*pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株の間で差が見られなかった。よって、Pop2 および Dhh1 は *ROM2* mRNA の制御には関わらないことが示唆された。しかし、*ccr4Δ* 単独変異株で *LRG1* mRNA レベルが上昇していたのと同じように、*pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株においても、*LRG1* mRNA のレベルが野生型株に比べて上昇していた。このことから、Ccr4 と同様に、Pop2 および Dhh1 も *LRG1* mRNA の発現を負に制御していることがわかった。

2. *pop2Δ rom2Δ*、*dhh1Δ rom2Δ* 二重変異株は synthetic growth defect を示す

ccr4Δ rom2Δ 二重変異株の表現型は、*ccr4Δ* 単独変異株と比較して増殖が遅延することが分かっている。すなわち、*ccr4Δ* 単独変異株の増殖速度は野生型株と比較してやや低下し、*ccr4Δ rom2Δ* 二重変異株の増殖速度は *ccr4Δ* 単独変異株に比べて著しく低下する。これは、*ccr4Δ rom2Δ* 二重変異株で GEF である Rom2 の低下と GAP である Lrg1 の上昇が同時に生じることで Rho1 が不活性化するからであると考えられる。

そこで、Pop2 と Dhh1 についても、*LRG1* mRNA の発現を負に制御する効果が表現型に現れるかどうかを解析することを目的として、*pop2Δ* 変異と *rom2Δ* 変異をヘテロに持つ二倍体株、*dhh1Δ* 変異と *rom2Δ* 変異をヘテロに持つ二倍体株を作製し、四分子解析を行い、各変異株の増殖を比較した。

その結果、*pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株の増殖速度は野生型株と比較してやや低下し、*pop2Δ rom2Δ*、*dhh1Δ rom2Δ* 二重変異株の増殖速度はそれぞれ *pop2Δ*、*dhh1Δ* 単独変異株に比べて著しく低下した。以上の結果から、Pop2 と Dhh1 は、Ccr4 と同様に *LRG1* mRNA の発現を負に制御し、その効果が表現型に顕著に現れることがわかった。

3. Pop2 および Dhh1 は、*LRG1* mRNA 以外の因子も制御して細胞増殖に関与している

次に、*pop2Δ rom2Δ*、*dhh1Δ rom2Δ* 二重変異株が示す表現型が、*ROM2* mRNA 及び *LRG1* mRNA レベルに関係した Rho1 の不活性化が原因であるかどうかを明らかにする目的で、それぞれの株に対して *lrg1Δ* 変異を持たせた二倍体株を作製し、四分子解析を行い、各表現型の増殖を比較した。

その結果、*rom2Δ lrg1Δ* 二重変異株の増殖速度は野生型株と比較してやや低下するが、*pop2Δ rom2Δ lrg1Δ*、*dhh1Δ rom2Δ lrg1Δ* 三重変異株の増殖速度は *rom2Δ lrg1Δ* 二重変異株よりも低下した。このことから、Pop2 および Dhh1 は、*LRG1* mRNA 以外の mRNA も制御して細胞増殖に関与していることが示唆された。今後は、マルチコピーサプレッサーなどを行い、*LRG1* mRNA 以外の mRNA を同定していく予定である。