

学位論文

出芽酵母における
新規細胞質内局在化*EGDI* mRNAに関する研究

2011年3月

熊本大学大学院自然科学研究科

林 紗千子

目次

要旨 3

第一章 5

緒言

第二章 8

細胞内局在化RNAの網羅的探索による新規細胞質局在化*EGDI* mRNAの
同定と解析

第三章 19

EGDI mRNA 細胞質局在への Tag-GFP 法の検証及び局在領域の同定

第四章 34

EGDI mRNA と *EGDI* タンパク質局在の解析

第五章 45

EGDI 顆粒と既知の細胞内構造体に関する解析

第六章 50

EGDI 顆粒の性質

第七章 57

EGDI 顆粒の生物学的意義

謝辞 64

参考文献 65

要旨

RNA の局在化とは、DNA から転写された RNA が細胞内に一様に存在するのではなく、細胞内のある特定の場所に存在する現象をいう。遺伝情報は、遺伝子の本体である DNA から RNA に写し取られて発現するため、RNA の細胞内局在化は、遺伝子発現を空間的に制御するために不可欠な現象である。現在までに、細胞内に局在化する mRNA の例は単細胞生物である酵母からショウジョウバエやヒトの神経細胞に至るまで、さまざまな生物で報告されており、細胞の極性形成や分化誘導において非常に重要な役割を果たすことが示唆されている。しかし、局在化 RNA の全体像は不明なままとされており、個々の詳細なメカニズムに関して解明されているものも少ない。そこで、私はゲノムワイドな局在化 RNA の探索を行なうことで未知の局在化 RNA を発見し、新たな局在化機構や局在化の生理的意義を見いだすことを目指した。また、従来の研究は特定の細胞や細胞小器官にのみ着目していたため、細胞周期全体を通じた網羅的な局在化 RNA 研究に変えることで、今まで見過ごされてきた新たな局在化 RNA 機構の開拓も目指した。

本研究では、生きた細胞内で RNA 分子を可視化し、RNA 分子自体の動態を探る方法として Tag-GFP 法を用いた。この Tag-GFP 法は、Tag 配列を付加した RNA 分子と共に、その Tag 配列を認識し結合する Tag 結合タンパク質と GFP との融合タンパク質を同時に酵母細胞内で強制発現させることで、間接的に GFP 蛍光により RNA を可視化する手法である。実験材料としては高等生物同様、既知の局在化 RNA が存在し、遺伝学的解析が容易な出芽酵母を用いた。Tag-GFP 法を用いた約 3,100 個の RNA 局在観察の結果、細胞質に凝集した局在を示す RNA として、*EGDI* mRNA を初めて同定した。*EGDI* は出芽酵母の NAC (nascent polypeptide-associated complex) の β サブユニットをコードしている。NAC は酵母からヒトに至るまで広く保存されたタンパク質複合体であり、リボソーム付近において新生ポリペプチド鎖に結合し、このポリペプチド鎖が分解されるのを防ぐシャペロンのような役割を果たしていると考えられている。まず、スクリーニングで得られた *EGDI* mRNA の凝集した局在が実際の細胞内の様子を反映したものかを検証するため、*EGDI* mRNA 特異的プローブを用いた *in situ* hybridization を行った。その結果、Tag を付加していない *EGDI* mRNA を、自身のプロモーターを用いて多コピーで発現させた場合においても、細胞質への凝集した局在が確認できた。よって、この局在は Tag-GFP 法によって偶然に引き起こされたものではなく、実際に細胞内で起こっている可能性が示唆された。面白いことに、この *EGDI* mRNA の局在領域は、細胞分裂に伴い娘細胞へも分配される特徴を有していた。

EGDI mRNA の局在化に必要な領域を特定するため、RNA を断片化し、局在率の変化を Tag-GFP 法で比較する実験を行なった。その結果、*EGDI* の 5' 上流領域または ORF 領域

を欠くと細胞質への局在が消失し、さらには Egd1p が正常に翻訳できない RNA 分子も細胞質に局在できないことが明らかとなった。これらの結果より、EGDI mRNA の局在化が Egd1p への翻訳と関連した現象であることが示唆された。そこで、次に Egd1p も EGDI mRNA と細胞質で共局在しているかを検証するため、*in situ* hybridization 及び抗体染色による二重染色を行なった。その結果、Tag 付き Egd1p は凝集した EGDI mRNA と共局在していることが示され、この過剰発現した EGDI mRNA と Egd1p により形成される細胞質構造体を EGDI 顆粒と名付けた。

EGDI 顆粒形成と細胞骨格との関連性を検証するため、細胞を微小管及びアクチン重合阻害剤で処理し、RNA の局在観察を行った。その結果、微小管の重合を Benomyl により阻害した細胞でのみ、EGDI mRNA の細胞質局在が消失した。よって、EGDI 顆粒形成が微小管依存的であることが分かった。また近年、mRNA の代謝に関わる細胞質顆粒として P-body が広く知られている。この P-body の因子に GFP が付加された株を用いて EGDI mRNA との局在解析を行ったところ、複数の P-body 因子が EGDI 顆粒と共局在している様子が観察された。しかし、P-body 因子の遺伝子欠損株を用いた解析により、EGDI 顆粒形成は P-body 非依存的であったことから、EGDI 顆粒と P-body は因子を共有するものの独立的な構造であることが示唆された。

EGDI 顆粒の生物学的意義を解明するため、恒常的に強く発現する TDH3 プロモーター制御下で EGDI 顆粒形成の影響を調べた。その結果、mRNA の 5' 上流領域の不足により EGDI 顆粒を形成できない細胞では、vector 及び EGDI 顆粒を形成できる細胞と比較して強い生育阻害や縦長や肥大化などの細胞形態変化が示された。さらに、通常、細胞内で Egd1p は Egd2p と共に NAC を構成しているが、興味深いことに、EGDI のパートナーである EGD2 の発現量を増加させると EGDI 顆粒形成に阻害が見られることが明らかとなった。このことから、現在、EGDI 顆粒の形成は、過剰な Egd1p を顆粒内に閉じ込め、同時に EGDI mRNA の局在化により細胞内での Egd1p の発現量を抑制するための現象でないかと考えている。

第一章

緒言

生物の複雑な生命現象は、遺伝子の本体であるDNAから転写されたRNAが、機能的に働くことによって支えられている。特に、核と細胞質が核膜によって物理的に隔てられている真核生物においては、転写されたmRNAが一度核外に輸送されてはじめて翻訳を受ける。そのため、転写された後のmRNAのプロセッシングや選択的スプライシング、核外輸送などの転写後調節が遺伝子発現調節において非常に重要な位置を占める(Hoshino 2003)。RNAの局在化もこの転写後調節機構に含まれる。

RNAの局在化は、主に細胞内での情報の偏りを生じさせることで細胞の極性形成や分化を誘導し、遺伝子発現を時空間的に調節する(St Johnston 2005)。ショウジョウバエの卵形成過程で働くbicoid mRNAやgurken mRNA、oskar mRNAは、細胞分裂の際、mRNAの不均等分配により受精後の体軸形成および細胞運命決定機構として働く。出芽酵母では、娘細胞の先端(Bud tip)に局在化するmRNA群が、出芽の際の娘細胞の運命を決定づける。よく知られている例として、出芽酵母のASH1 (asymmetric synthesis of HO1) mRNAはBud tipに局在することで娘細胞での接合型の変換を抑制している。一方、ヒトの神経細胞では樹状突起や軸索、シナプス部位などに局在化するRNA群が、神経突起の構成成分や刺激依存的なタンパク質の供給に寄与する。この神経細胞で見られるmRNAの局在化では、1分子のmRNAからは複数のタンパク質が翻訳されるため、翻訳されたタンパク質自身を輸送し局在化させるよりもエネルギー効率的に有利であると考えられる。また同時にRNAの局在化が、細胞内での情報の偏りを生み出し、細胞の極性をつくり出す役割も果たしている(Inoue 2003; St Johnston 2005)。

これまで細胞内におけるmRNAの局在化の例は多数発見されている(St Johnston 2005)。しかし、mRNAだけでなく、すべてのRNA分子についてその局在を網羅的に調べた研究はなく、現在までに明らかになっている局在化RNA以外にも多くの局在化RNAが存在する可能性が高い。そこで私は未知の局在化RNAの発見を目指し、RNAにTagを付加して可視化し顕微鏡で観察する方法(Tag-GFP法)により、網羅的な局在化RNAの探索を行った(Andoh *et al.* 2006)。材料として、すでに多細胞生物と同様、細胞内で局在化するmRNAが発見されており、遺伝学的解析も容易な出芽酵母を用いた。方法としては、出芽酵母のランダムなゲノム断片にTag配列を付加し、このTag付きRNA分子を酵母細胞内で強制的に発現させる。それと同時に、そのTag配列を認識し結合するTag結合タンパク質とGFP融合タンパク質も一緒に酵母細胞内で発現させ、RNAの局在場所を可視化した。3,091個のRNAクローンの局在観察により、rRNAクローン106個と特異的な細胞内局在を示すRNAを11個同定した。局在の様子は様々であったが、特に、細胞質に局在するクローン302Sでは細胞質に大きく凝集したRNAの局在が

観察された。これまでに、細胞質のRNAが凝集体を形成することは報告されておらず、302Sで観察されたRNAの局在は、既知の局在化RNAには全く例のない、新規の局在様式であった。シーケンス解析の結果、この302SはEGDI遺伝子を含んでいた。

EGDI (*Enhancer of Gal4 DNA binding 1*) は出芽酵母のNAC (nascent polypeptide-associated complex)を構成する β サブユニットをコードしている(Rospert *et al.* 2002)。NACは酵母からヒトに至るまで広く保存されたタンパク質複合体で、出芽酵母では27 kDaの α サブユニットと21 kDaの β サブユニットからなる。 α サブユニットはEGD2によってコードされている(Rospert *et al.* 2002)。NACは高等真核生物においてリボソーム結合因子として新生ポリペプチド鎖付近に存在し、典型シャペロンのようにアミノ酸配列非依存的に、まだ立体構造をとっていない新生ポリペプチド鎖と相互作用すると考えられている(Rospert *et al.* 2002; Wegrzyn & Deuerling 2005)。その他、NACはタンパク質のERへの移行シグナル配列であるSRP (signal recognition particle)を持つ新生ポリペプチド鎖のERへの輸送や、ミトコンドリア前駆体タンパク質のミトコンドリアへの輸送にも関係していると指摘されている(George *et al.* 1998; Marc *et al.* 2002; Rospert *et al.* 2002)。さらに、ショウジョウバエのoskar mRNAの後方局在に必要であるとの報告もある(Braat *et al.* 2004)。

NACのリボソームとの結合は β NACによって仲介され、 β NACのN末端側11アミノ酸を欠いた出芽酵母ではリボソームとの結合が失われて、Egd1pは核内への局在異常を起こす(Franke *et al.* 2001; Wegrzyn & Deuerling 2005)。また、 β NACは、SRPを持たない新生ポリペプチド鎖を産生しているリボソームがER膜へと結合しないようにする役割を担っているとされている(Lauring *et al.* 1995; Moller *et al.* 1998; Beatrix *et al.* 2000)。リボソーム付近での新生ポリペプチド鎖との結合能は両サブユニットが有している(Wiedmann *et al.* 1994; Wegrzyn & Deuerling 2005)。

NACは、生体内ではそのほとんどが複合体として存在する(Beatrix *et al.* 2000)。出芽酵母では、NACの欠損は明らかな形質異常を示さないが、野生型株で α NACのみを過剰に発現させると生育が遅延するとの報告がある(Reimann *et al.* 1999)。一方、 β NACを欠くとショウジョウバエやマウスでは胚性致死になり、出芽酵母では高温感受性を示す(Deng & Behringer 1995; Reimann *et al.* 1999; Markesich *et al.* 2000)。 β NACを欠損した出芽酵母では、アクチンをコードするACT1遺伝子や小胞輸送に関わるSSO1遺伝子の発現量が上昇することも知られている(Hu & Ronne 1994)。

NACは細胞質での機能以外に、核内での機能も示唆されている。具体的には、 α NACはDNAやrRNA、tRNAと結合能を持ち、単量体 α NACは核内へ移行できることから、転写調節機構への関与が考えられている(Franke *et al.* 2001; Rospert *et al.* 2002)。また、EGDIのヒトで

のホモログはBTF3である(Hu & Ronne 1994)。BTF3(basic transcription factor)は核内で転写因子として機能しており、転写を中心とした解析が進んでいる。

*Arabidopsis*ではBTF3が、翻訳開始因子の一つであるeIF4Eと相互作用することが報告され、mRNAの転写後調節機構への関与も示唆されている(Freire 2005)。さらには転写やmRNAの分解、転写後修飾など多機能な機能を持つCcr4-Not複合体が、NACのユビキチン化に関与していることが報告されている(Panasenko *et al.* 2006)。このように、NACは細胞内で多機能な役割を果たす複合体であると考えられている。しかし、詳細は不明な点が多く、未だにその全貌は明らかとなっていない。

近年、RNAの代謝調節に関与するRNPとして、様々な細胞質顆粒が同定され始めている。P-body (Processing body) は、2003年に初めて報告されたmRNAの分解や翻訳抑制に関わる細胞質の構造体である(Sheth & Parker 2003; Brengues *et al.* 2005; Nakamura 2005)。酵母からヒトまで高度に保存され、Dcp2pやDhh1p、Dcp1p、Xrn1p、Lsm1pなどmRNAの分解や翻訳抑制に関わる多数の因子が共局在している(Eulalio *et al.* 2007; Parker & Sheth 2007)。P-bodyの数やサイズは細胞環境によって変化し、出芽酵母ではグルコース枯渇や浸透圧ストレス、UVストレスなどの条件下でその数やサイズが増加するということが明らかとなっている(Teixeira *et al.* 2005)。また、ストレス条件下でのみ一過性に形成される細胞質構造体であるStress granule (SG) も種間での保存性があり、Heat Shock、塩ストレス、重金属ストレスなど、ストレスの種類に応じて構成因子や形態が異なる性質がある。このP-bodyとSGは相関性の高い構造であることが指摘されており、一部の因子は二つの構造体を行き来することも報告されている(Anderson & Kedersha 2009; Buchan & Parker 2009)。

また、mRNAは最終的にタンパク質へと翻訳されるが、そのタンパク質にも厳密な品質管理機構が存在する(Kubota 2009; Reynolds *et al.* 2010)。通常、異常タンパク質はプロテアソームなどにより分解を受けるが、その他にもAggresome やERAC、IPOD、JUNQといった異常タンパクを凝集することで処理する機構が知られている(Johnston *et al.* 1998; Huyer *et al.* 2004; Bagola & Sommer 2008; Kaganovich *et al.* 2008; Tyedmers *et al.* 2010)。

今回、スクリーニングにより同定した新規細胞質局在 *EGDI* mRNA について局在化機構や生理的意義の解明を目指し、詳細な解析を行った。その結果、*EGDI* mRNA は翻訳依存的、微小管依存的に局在し、Egd1p と細胞質 RNP 複合体 (*EGDI* 顆粒) を形成していることが明らかとなった。また *EGDI* 顆粒には P-body 因子が共局在し、*EGDI* 顆粒の欠損は生育阻害を引き起こした。これらの知見を統合し、*EGDI* mRNA 局在化機構についてこれまでに明らかになったことを報告する。

第二章

細胞内局在化RNAの網羅的探索による新規細胞質局在化

EGD1 mRNAの同定と解析

2-1 材料と方法

2-1-1 使用した株

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

BY4741a : *MATa, his3, leu2, met15, ura3*

2-1-2 使用した培地

【出芽酵母用】

• SD+LMU-medium

2% Glucose
0.67% Yeast Nitrogen Base
30 mg/l Leucine
30 mg/l Uracil
30 mg/l Methionine

プレートの場合は2% Agarを加えた。

• SR+LM-medium

2% Raffinose
0.67% Yeast Nitrogen Base
30 mg/l Leucine
30 mg/l Methionine

• SD+LMH-medium

2% Glucose
0.67% Yeast Nitrogen Base
30 mg/l Leucine
30 mg/l Methionine

- | | |
|---------|-----------|
| 30 mg/l | Histidine |
|---------|-----------|
- SD+LM-plate

2%	Glucose
0.67%	Yeast Nitrogen Base
30 mg/l	Leucine
30 mg/l	Methionine
2%	Agar

【大腸菌用】

- LB(amp)-medium

1%	Tryptone
0.5%	Yeast extract
1%	NaCl
50 µg/ml	Ampicillin

プレートの場合は2% Agarを加えた。

2-1-3 使用した試薬

【出芽酵母の形質転換用】

- 0.1 M LiAc solution

1 M LiAc	2 ml
10×TE	2 ml
dH ₂ O	16 ml

これらを50 mlのコニカルチューブ内で無菌的に混合した。

- Li-PEG

1 M LiAc	2 ml
10×TE	2 ml
50% PEG	16 ml

これらを50 mlのコニカルチューブ内で無菌的に混合した。

- ジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide ; DMSO)

- 10 mg/ml carrier DNA (from salmon tissue)

carrier DNA	100 mg
dH ₂ O	10 ml

これらを50 mlのコニカルチューブに量り入れ、オートクレーブ（120℃， 1 min）の後ボルテックスし、無菌的にエッペンドルフチューブ10本に分注した。（-20℃で保存。）

【Tag-GFP法でのRNA局在観察用】

- 2% Galactose
- Hoechst 33342 (10 mg/ml ストックを作成し、-20℃に保存。)

【出芽酵母からのプラスミド回収用】

- STES buffer
 - 0.5 M NaCl
 - 0.2 M Tris-HCl (pH 7.6)
 - 0.01 M EDTA
 - 1% SDS
- P.C.I. (phenol / CHCl₃ / isoamylalchol = 25: 24: 1)
 - Phenol 50 ml
 - Chloroform 48 ml
 - Isoamylalchol 2 ml

【大腸菌からのプラスミド回収用】

- TELT buffer
 - 1 M Tris-HCl (pH7.5)
 - 0.5 M EDTA
 - 0.4% TritonX-100
 - 0.625% LiCl

2-1-4 使用したプラスミド

【U1A-TAG付きRNA発現用】

- pGAL-U1A-*Bam* vector
 - pYES2 vector (Invitrogen) の*Hind*III-*Bam*HIサイトに、U1A-TAG配列を4つ挿入したプラスミドDNAである。
- Library1-1

pGAL-U1A-Bam vectorのBamHIサイトに、*S. cerevisiae* BY4741a株のゲノムDNAをSau3AIでpartial digestionしたランダムな平均6 kb以上のゲノム断片を導入したプラスミドDNAである。

【GFPとU1Aタンパク質の融合タンパク質発現用】

・pU1A-GFP

pCP-GFP vector(Beach *et al.* 1999) に存在する、GFP配列の上流のMET25プロモーターとMS2 coat protein配列をGALIプロモーターとU1Aタンパク配列に置換した約7 kbプラスミドDNAである。

* 以上のプラスミドは、安東（竹内）知子博士が作成した。

2-1-5 方法

【出芽酵母への形質転換】

(例：pU1A-GFPを持つBY4741a株へのLibrary1-1の導入)

1. pU1A-GFPで形質転換されたBY4741a株をSD+LUM-medium 5 mlに懸濁し、30°Cで一晩前培養した。
2. 前培養液 5 mlを新しいSD+LUM-medium 20 mlに加え、30°Cで3～4 h培養した。
3. 遠心（3,000 rpm, 3 min, 室温）後、細胞を回収し、0.1 M LiAc solutionを2 ml加えた。
4. 30°Cで1～5 h培養後、再び遠心（3,000 rpm, 3 min, 室温）して細胞を回収した。
5. 0.1 M LiAc solution 100 μ l、carrier DNA 10～20 μ l、plasmid DNA 適量 (Library1-1では1 μ l)を加え、混合した。
6. 30°Cで30min静置後、Li-PEG 700 μ lを加えて再び30°Cで30 min静置した。
7. DMSO 80 μ lを添加後、軽くボルテックスを行い、42°Cで5 min保温した。
8. 遠心（3,000 rpm, 3 min, 室温）後、dH₂Oを加え、穏やかにピペッティングした。
9. 100 μ lずつSD+LM-plateに撒き、30°Cで2～3日培養した。

【96穴プレートを用いたTag-GFP法でのRNA局在観察】

1. 96穴プレート（A～Hレーン）中、48穴（A～Dレーン）にSR+LM-mediumを100 μ l/wellずつ分注した。
2. SD+LM-plateから爪楊枝でかきとった出芽酵母を懸濁し、30°Cで12～24 h培養した。

3. 前培養後、残りの48穴（E-Hレーン）に新たにSR+LM-mediumを200 μ l/wellずつ分注し、A-Dレーンの前培養液を Eレーンへ20 μ l、Fレーンへ18 μ l、Gレーンへ16 μ l、Hレーンへ12 μ lずつ加え、30°Cで2 h（E）、3 h（F）、4 h（G）、5 h（H）培養した。
4. 2% Galactoseを24 μ l/well加え、30°Cで60 min培養し、発現誘導させた。
5. Hoechst (2 mg/ml) 2.5 μ lが入ったエッペンドルフチューブに培養液を全量移し、遠心 (5,000 rpm, 1 min, 室温) 後、上清を220~230 μ l程除き、残りの上清 (約10~20 μ l) で沈澱を懸濁した。
6. 懸濁液 1.6 μ lをスライドグラス上に置き、カバーグラスをかけ、マニユキアを用いてシールした。
7. 蛍光顕微鏡 (Olympus AX70 fluorescence microscope、Nikon ECLIPSE 80i、Keyence BIOREVO BZ-9000) により、対物レンズ100倍で観察した。

【出芽酵母からのプラスミド回収】

1. 新鮮な状態の細胞をSD+LMH-medium 6 mlで16~24 h、30°Cで培養した。
2. 前培養後、遠心 (3,000 rpm, 3 min, 4°C) して上清を除き、沈澱をエッペンドルフチューブに移し、再び遠心 (15,000 rpm, 1 min, 4°C) した。
3. 沈澱にSTES buffer 60 μ lとガラスビーズを適量加え、ボルテックスミキサーを用いて5 min 懸濁した。
4. P.C.I. 60 μ lを加え、再度5 minボルテックスした。
5. dH₂O 100 μ lを加えて遠心 (15,000 rpm, 10 min, 室温) 後、DNAの層のみを新しいエッペンドルフチューブに移した。
6. 等量のクロロホルムを加えて再び遠心 (15,000 rpm, 10 min, 室温) し、再度DNA層のみを新しいエッペンドルフチューブに移した。
7. 1/10量の3 M NaClと2.5倍量の100% EtOHを加えて-80°Cに15 min静置後、遠心 (15,000 rpm, 10 min, 4°C) した。
8. 沈澱に70% EtOH 800 μ lを加え遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) した。
9. 沈澱を真空乾燥後、15 μ lのdH₂Oに溶解した。

【回収したプラスミドの大腸菌への形質転換】

1. 大腸菌のcompetent cell (DH5 α) 80 μ lに、DNAサンプル 5 μ lを加え、氷上で30 min静置した。
2. LB(amp)-plateに全量を撒き、37°Cで16 h培養した。

【コロニーPCR (簡易的rDNAクローンの判定)】

1. 形質転換させた大腸菌のコロニーをランダムに4つ選んで爪楊枝で掻き取り、10 μ lのdH₂Oに懸濁した。
2. 沸騰させた鍋で5 min熱し、氷上で急冷しTemplate DNAを作成した。
3. rDNAに対するプライマーを用い、PCR反応を行った。

Takara Ex Taq	0.1 μ l
10 \times Ex Taq buffer	2 μ l
dNTP Mixture	1.6 μ l
Template DNA	1 μ l
Primer 1 or 5 (0.2 μ M)	0.1 μ l
Primer 2 or c (0.2 μ M)	0.1 μ l
dH ₂ O	15.1 μ l / 20 μ l

(Primerの配列)

Primer 1 : 5'-AGACCAACTAGGACGGTC-3'

Primer 2 : 5'-AAATAGAACCAAACGTCC-3'

Primer 5 : 5'-TGCAAGATCGTAAGTTCC-3'

Primer c : 5'-TAACAACAAGGCTACTCT-3'

(PCR reaction)

1. 95°C 1 min
2. 95°C 30 sec
3. 50°C 30 sec
4. 68°C 1.5 min ※2～4は30サイクル

4. PCR反応後、サンプル全量に6 \times Loading Dyeを加え、マーカー (λ styl) 4 μ lと共にアガロースゲル電気泳動を行った。約0.8 kbのDNAが増幅されたサンプルはribosomal DNAを含むものと判断した。

【大腸菌からのプラスミド回収 (Boiling法)】

1. プレートからコロニーを3つ選び、LB(amp)-medium 6 mlに懸濁し、37°Cで8～10 h振盪培養した。
2. 遠心 (3,000 rpm, 5 min, 4°C) 後、デカンテーションにより上清を捨て、沈澱をエッペンチューブに移し、再び遠心 (15,000 rpm, 1 min, 4°C) した。
3. 沈澱にTELT buffer 170 μ lを加え懸濁し、沸騰した鍋で40 sec熱した。
4. 氷上で急冷後、遠心 (15,000 rpm, 10 min, 室温) し、沈澱を爪楊枝で取り除いた。
5. イソプロパノール150 μ lを加え、軽くボルテックスした。

6. 遠心 (15,000 rpm, 10 min, 室温) 後、沈澱に70% EtOHを800 μ l加えて再び遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) した。
7. 真空乾燥後、沈澱をdH₂O 50 μ lに溶解した。

【制限酵素処理によるタンパク質側プラスミドの除去】

1. 大腸菌から回収したDNAサンプル (1サンプルにつき3クローン) を用いて、*Hind*IIIによる制限酵素処理を行った。
2. 約2 kbと約4 kbのバンドが得られたサンプルはタンパク質側プラスミド (GFPとU1A結合タンパク質の融合タンパク質発現用プラスミド) であると判断した。

【PEG沈】

1. DNAサンプル 100 μ lにPEG6000/2.5M NaCl 150 μ lを加え、よくボルテックスした後、氷上に30 min置いた。
2. 遠心 (15,000 rpm, 10 min, 4°C) 後、沈澱に70% EtOHを800 μ l加えて再び遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) した。
3. 真空乾燥後、沈澱をdH₂O 30~40 μ lに溶解した。

【シーケンス解析】

PEG沈により精製したDNAサンプルを用いて、ABIおよびBECKMANのプロトコルに従い、シーケンスにかけた。

2-2 結果

【一次スクリーニング及びrDNAクローンの除去】

Tag-GFP法を用いた顕微鏡観察により、3,091個について一次スクリーニングを終了した。次にRNA側のプラスミド回収を行い、rDNAに対するプライマーを用いてコロニーPCRを行った。1S-2276S株までのコロニーPCRの結果、85株がrDNAを含んでいると判断した。

【二次スクリーニング（再現性の確認）】

コロニーPCRでrDNAでないと判断した株について二次スクリーニングを行い、細胞内局在化RNAクローンとして33株を同定した。シーケンス解析の結果、そのうち22株はribosomal RNA遺伝子を含むクローン（3株はアンチセンス鎖）であった。局在率は平均で、センス鎖：約30%、アンチセンス鎖：約5.5%であった。残り11株のうち、核に局在するRNAクローンは7株（26S、55S、299S、585S、677S、1510S、2108S）、核と細胞質に局在するRNAクローンは1個（2238S）、Bud-tipと核に局在するRNAクローンは2個（29S、1600S）、細胞質に局在するRNAクローンは1個（302S）であった。詳細はTable 1に記す。

局在の様子は、rDNAクローンでは核小体と思われる場所に蛍光が観察されたが、核全体や核を囲むようにドット状に観察される株、核内の数カ所に局在が観察される株もあった（Figure 1B）。核局在クローンでは、核全体へのうすい局在や核でのドット（26S、55S）や核を囲むようなドット（299S、677S）が観察された。585Sおよび、1510S（Figure 1B）では核の端付近にドットが観察された。2108Sでは、核の端の一部（1-3カ所）に局在が観察された。核と細胞質局在クローン（2238S）では、細胞質に複数のドットが観察されると共に核を囲むようなドットが観察され、核でのドット状局在のみが観察される細胞もあった。Bud-tipと核局在クローンでは、budや母細胞の核を囲むようなドット状局在（29S）を示した。1600Sではbudの先端付近だけではなく、budの中（娘細胞の細胞質）に局在が観察される細胞もあり、ある程度成長したbudでのみ局在が観察された。また、1600Sのbud-tipでの局在シグナルはとても弱かった（Figure 1B）。細胞質局在クローン（302S）では、細胞質にRNAの凝集した局在が観察された。細胞により局在の大きさに違いがあったが、大きい細胞では核と同等程のRNAの凝集が観察された。また、主に細胞1個あたり1つの凝集した局在が観察され、出芽している細胞では娘細胞にも局在が観察されることもあった（Figure 1C）。

2-3 考察

Tag-GFF 法を用いた細胞内局在化 RNA の網羅的探索の結果、多数の rDNA クローンが得られた。出芽酵母の rRNA には、5S、5.8S、25S、18S rRNA がある。これらの遺伝子は第 12 番目染色体の短鎖に繰り返し配列で存在し、5.8S、25S、18S は 37S 前駆体として転写され、その後、プロセッシングを受けて 3 種類の rRNA が作られる。5S rRNA は独立した転写ユニットを形成しており、転写方向も他の rRNA とは逆方向である。この 8.8 kb の rRNA 遺伝子の繰り返し配列は、出芽酵母の strain によって反復配列の長さにバリエーションがあるものの、約 100–200 コピーあり、全部で約 1.3 Mb を占める(Wegrzyn & Deuerling 2005)。出芽酵母の染色体は 16 本存在し、ゲノム全長の長さは約 12–13 Mb とされているので、全ゲノム DNA に対する rRNA 遺伝子の割合は約 1/10 となり、計算上では、RNA 局在観察のスクリーニングにおいて 10 個に 1 個は rRNA 遺伝子を含むクローンが取れてくることになる。そのため、1S–2276S 株の局在観察の結果、106 個の rRNA 遺伝子を含む局在クローンが得られたと推測される。局在場所は核小体と思われる場所にシグナルが観察されるものが多かったが、核に複数のドットや、核小体とその反対側に 1 つのドットが観察される細胞も観察された。核小体内部の構造は酵母からヒトまで保存されており、その構築には rRNA が染色体上に多コピーでタンデムに連なることが重要である。また、rRNA の転写やプロセッシングの過程によって、rRNA が局在する場所が異なる(Marc *et al.* 2002)。そのため、挿入された rDNA の長さや配列に因って、核や核小体内部での rRNA の局在する場所に違いが生まれたと考えられる。

核局在クローン及び核&細胞質局在クローン中で、55S、299S、677S、2238S は全て Y' element 領域のアンチセンス鎖を含む断片を有していた。出芽酵母では一般的にすべての染色体の端は X element のみと、X element と Y' element からなる場合の 2 つに分類され、Y' element はすべての染色体の端に 1/2 の割合で存在する繰り返し配列であることから、ゲノム DNA 中に含まれる割合が多い。また、Y' element はタンデムな繰り返し配列からなり(Louis & Haber 1992; Yamada *et al.* 1998; Ghaemmaghami *et al.* 2003)、テロメア配列の隣に存在する X element に続くサブテロメア領域である。減数分裂期やテロメレースに欠陥のある細胞でのみ発現するヘリケースをコードする ORF を含んでいる。機能としては、減数分裂期のテロメアの維持やテロメア配列の失われた細胞でのテロメアの機能的相補などが予想されている(Yamada *et al.* 1998)。得られた Y' element を含むクローンすべてがアンチセンス鎖であり、センス鎖が得られなかったという結果はとても興味深く、Y' element においてはアンチセンス鎖 RNA が核内で機能を持って働いている可能性が考えられる。また、299S、677S では核を囲むように局在が観察されたのに対して、55S では局在が核全体で観察された細胞が多かつ

た。2238S では核を囲むような局在と共に、細胞質でも複数のドットが観察された。この局在の違いの原因は定かではないが、発現させた RNA の配列と関係している可能性がある。55S、677S では、対応するセンス鎖が *YRF1-1* と呼ばれるヘリケースをコードする ORF をコードしている。それに対し、299S、2238S に対応するセンス鎖は、*YRF1-1* とはそれぞれ配列上異なる Y' element 領域内のヘリケースの ORF (299S ; *YJL225c* etc., 2238S ; *YLL066c* etc.) をコードしていた。また、Y' element は特徴的なレトロトランスポゾン配列を欠くため、逆転写活性を持つタンパク質はコードされていないと考えられていたが、近年、レトロトランスポゾン的一种である Ty element との関連性が報告された (Maxwell *et al.* 2004)。Ty element は VLPs (virus-like particles) の中で逆転写され、その後、核へと放出されて宿主のゲノム DNA に挿入される。Ty element の VLPs は細胞質に多数のドットとして観察されるが、この中には Y' RNA も多く含まれていることが分かり、Ty VLPs での Y' RNA 逆転写の可能性が示唆されている (Maxwell *et al.* 2004)。そのため、2238S で観察された細胞質での多数のドット状の局在は Ty VLPs を見ていたのかもしれない。このことは、Ty VLPs での Y' RNA 逆転写における Y' element アンチセンス鎖の持つ機能を示唆する手がかりとなり得ると思われる。

核局在センス鎖クローンとして、ミトコンドリアでの翻訳伸長に関わる G-like protein をコードしている *MEF2* (*Mitochondrial Elongation Factor 2*, 26S)、テロメアのサイレンシングに関わる *ESC1* (*Establishes Silent Chromatin*, 1510S)、ヒストンアセチル化転移酵素 (HAT) 複合体である SAGA と NuA4 のサブユニットをコードしている *TRAI* (*similar to human TR-AP*, 2108S) が得られた。局在の様子は主に核を囲むような局在や、*TRAI* では核の一部 (1~3 カ所) に局在している細胞が多く観察された。核局在クローンは、強制発現させた RNA の長さが長いために、核膜孔付近でトラップされ、核に局在しているように観察された可能性がある。しかし、局在は核の一部にしか観察されなかったクローンについては、mRNA の輸送において、核膜の領域特異性があるとも考えられる。

また、核局在アンチセンス鎖のクローンとして、脂肪酸合成酵素の α サブユニットをコードする *FAS2* (*Fatty Acid Synthetase*, 585S) を同定した。同研究室での同様の RNA 局在スクリーニングにおいても *FAS2* のアンチセンス鎖核局在クローンが複数得られていることから、実際に *FAS2* のアンチセンス鎖が発現し、機能している可能性が考えられる。一方で、核膜付近で核を囲むようなドットが観察された結果より、アンチセンス鎖を強制発現させたために発現させた RNA が核膜孔付近でトラップされてしまった可能性もあるだろう。

Bud-tip&核局在クローンとしては、出芽酵母の出芽の際にアクチンの重合化に関わる Arp2/3 複合体の活性化因子の一つであり、同時にエンドサイトーシス因子でもある *PANI* (Poly(A)-binding protein-dependent poly(A) ribonuclease, 29S)、多くの窒素分解経路における遺伝子活性調節因子として機能する *DAL81* (*Degradation of Allantoin / Uga35*, 1600S) のセンス鎖

を含むクローンが得られた。*PANI* が活性化する Arp2/3 はアクチンのダイナミクス制御に関わっており、主に細胞質で局在が観察されるものの、一部は核（核小体）にも局在することから核内で機能している可能性も示唆されている。また、*bud* への RNA の局在は Pan1p が出芽の際のアクチンの重合化に関わる Arp2/3 複合体の活性化因子の一つであるため、mRNA として *bud* に局在させることでエネルギー効率的にタンパク質を局在化し、速やかなアクチンの重合化を促す役割を果たしている可能性が予想される。一方、*DAL81* は窒素分解経路に関わる遺伝子活性調節因子である。窒素化合物は反応系の構成成分として働き、代謝回転をするために貯蔵されないという特徴があり、細胞が必要とする以上に存在すれば、ほとんどの窒素化合物はエネルギー生産に使用される。そのため、細胞中の存在量は合成と分解の比率で制御されており、平常状態では窒素バランスが保たれるが、成長中の細胞では窒素の取り入れが排出を上回るため、正の窒素バランスとなる。以上のことから、窒素分解経路に関わる遺伝子活性調節因子である *DAL81* は mRNA を核に局在させることで環境の変化などに応じたすばやい対応を行なっているのかもしれない。同研究室の解析により、他にも炭素代謝経路に関わる *CSR2* (*MRG19*) のセンス鎖が *bud-tip&*核局在クローンとして得られており、関連性も考えられる。

細胞質局在クローンとして、出芽酵母の NAC (nascent polypeptide-associated complex) を構成する β サブユニットをコードしている *EGD1* (*Enhancer of Gal4 DNA binding 1*, 302S) のセンス鎖を含むクローンを同定した。NAC は 27 kDa の α サブユニットと 21 kDa の β サブユニットからなり、 α サブユニットは *EGD2* によってコードされている。*EGD1* のヒトのホモログは BTF3 である。NAC は高等真核生物において ribosome-associated factor として新生ポリペプチド鎖に近いところで同定されており、典型シャペロンのように NAC はアミノ酸配列非依存的に、まだ立体構造をとっていないポリペプチド鎖と相互作用する(Rospert *et al.* 2002)。ER へのタンパク質の翻訳過程における SRP (signal recognition particle) との関連性も指摘されている(George *et al.* 1998)。NAC の機能は酵母からヒトに至るまで広く保存されているが、未だ不明な点が多い。この *EGD1* クローンでは、細胞内に核と同等程もある大きな RNA の塊が観察された (Figure 1C)。*GAL1* プロモーター下で強制発現させているために、RNA の凝集した局在が観察された可能性はある。しかし、RNA レベルで細胞を考えるというのは最近ようやく、始まってきたばかりのことであり、まだまだ未知の細胞内構造体が存在していることも考えられた。そこで、*EGD1* mRNA クローンについてさらなる解析を進めることにした。

第三章

EGD1 mRNA細胞質局在へのTag-GFP法の検証 及び局在領域の同定

3-1 材料と方法

3-1-1 使用した株

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

BY4741a : *MATa, his3, leu2, met15, ura3*

Δ *egd1* (Yeast Knock Out Strains : Open Biosystems)

: *MATa, his3, leu2, met15, ura3, \Delta**egd1* :: *kanMX4* (BY4741a background)

3-1-2 使用した培地

【出芽酵母用】

2-1-2に記した。

3-1-3 使用したプラスミド

【EGD2遺伝子コンストラクト】

- EGD2-a (pGAL-U1A-EGD2 1-2)

W303のゲノムDNAを鋳型に、EGD2の-420〜+963塩基（ORFの最初の塩基を+1とする）の領域をPCRにより増幅させた断片を、pGAL-U1A-*Bam* vectorの*Bam*HI-*Xho*Iサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD2-1 : 5'-GGAGGATCCGTTAGACTGCCAGCTTTCC-3'

EGD2-2 : 5'-ATCCTCGAGACGATGCCATGGTACTT-3'

- EGD2-b (pGAL-U1A-EGD2 2-5)

pGAL-U1A-EGD2 1-2のプラスミドを鋳型に、EGD2の-279〜+963塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、pGAL-U1A-Bam vectorのBamHI-XhoIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD2-5 : 5'-GTTGGATCCAAATTTCAATTATTGTGA-3'

EGD2-2 : 5'-ATCCTCGAGACGATGCCATGGTACTT-3'

- EGD2-c (pGAL-U1A-EGD2 2-6)

pGAL-U1A-EGD2 1-2のプラスミドを鋳型に、EGD2の-108〜+963塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、pGAL-U1A-Bam vectorのBamHI-XhoIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD2-6 : 5'-AAGGGATCCATGACAAAAAGTTGAATG-3'

EGD2-2 : 5'-ATCCTCGAGACGATGCCATGGTACTT-3'

- EGD2-d (pGAL-U1A-EGD2 2-7)

pGAL-U1A-EGD2 1-2のプラスミドを鋳型に、EGD2の+1〜+963塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、pGAL-U1A-Bam vectorのBamHI-XhoIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD2-7 : 5'-CAAGGATCCATGTCTGCTATCCCAGAA-3'

EGD2-2 : 5'-ATCCTCGAGACGATGCCATGGTACTT-3'

- EGD2-e (pGAL-U1A-EGD2 2-9)

pGAL-U1A-EGD2 1-2のプラスミドを鋳型に、EGD2の-200〜+963塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、pGAL-U1A-Bam vectorのBamHI-XhoIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD2-9 : 5'-AGGGGATCCGTTTTTTCGGTCATATAG-3'

EGD2-2 : 5'-ATCCTCGAGACGATGCCATGGTACTT-3'

【BTTI遺伝子コンストラクト】

- BTT1-a (pGAL-U1A-BTTI 1-2)

W303のゲノムDNAを鋳型に、BTTIの-305〜+895塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、pGAL-U1A-Bam vectorのBamHI-XhoIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

BTT1-1 : 5'-GAAGGATCCACAAATACGCGAGCCCTT-3'

BTT1-2 : 5'- CCCCTCGAGGTAGAAATAGTACTGGTG-3'

- BTT1-b (pGAL-U1A-BTT1 2-6)

W303のゲノムDNAを鋳型に、*BTT1*の-503〜+892塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、pGAL-U1A-Bam vectorの*Bam*HI-*Xho*Iサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

BTT1-6 : 5'- ACGGGATCCTCACCAATTCAGACCAAC-3'

BTT1-2 : 5'- CCCCTCGAGGTAGAAATAGTACTGGTG-3'

【*GAL1*プロモーター付き*Leu2*マーカー、多コピー型プラスミド】

- YEplac181-GAL1p vector

pU1A-GFPプラスミドから*Sac*I-*Xba*Iサイトで切り出した*GAL1*プロモーターを、YEplac181 vectorの*Sac*I-*Xba*Iサイトに挿入したプラスミドDNAである。

【*EGDI*遺伝子コンストラクト】

- EGD1-a (pGAL-U1A-EGDI 5', 3'UTR)

pGAL-U1A-EGDI *Aat* II前半のプラスミドから*Hind*IIIサイトで切り出した約0.7kbの断片を、pGAL-U1A-EGDI 3'UTRプラスミドの*Hind*IIIサイトに挿入したプラスミドDNAである。

- EGD1-b (pGAL-U1A-EGDI 5'UTR/ pGAL-U1A-EGDI 10-11)

pGAL-U1A-EGDI 5', 3'UTRのプラスミドを鋳型に、*EGDI*の-314〜+474塩基の領域をPCRにより増幅させた断片をpGAL-U1A-Bam vectorの*Bam*HI-*Xho*Iサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD1-10 : 5'- TTCGGATCCAAGGAAGAGCGGT-3'

EGD1-11 : 5'- TTACTIONGAGTTATTCGACGTCAGCATC-3'

- EGD1-c (pGAL-U1A-EGDI *Aat* II後半)

pGAL-U1A-EGDI *Eco*RIのプラスミドを*EGDI*のORF中に存在する*Aat* IIサイトとvector上の*Bam*HIサイトで切断しKlenow処理した断片を、self-ligationしたプラスミドDNAである。

- EGD1-d (pGAL-U1A-EGDI 2-8)

pGAL-U1A-EGDI 5', 3'UTRのプラスミドを鋳型に、EGDIの-204~+844塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、pGAL-U1A-Bam vectorのBamHI-XhoIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD1-8 : 5'- GGAGGATCCTGGAATCATTTAGTACGG-3'

EGD1-2 : 5'-ATGCTCGAGGCCTGTTGTAAGGCTAGAG-3'

- EGD1-e (pGAL-U1A-EGDI 11-12)

pGAL-U1A-EGDI 5', 3'UTRのプラスミドを鋳型に、EGDIの-63~+474塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、pGAL-U1A-Bam vectorのBamHI-XhoIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD1-12 : 5'- AGAGGATCCATATTCTTTCTAGGGAGG-3'

EGD1-11 : 5'- TTACTIONGAGTTATTCGACGTCAGCATC-3'

- EGD1-f (pGAL-U1A-EGDI Aat II 前半)

pGAL-U1A-EGDI EcoRIのプラスミドをEGDIのORF中に存在するAat II サイトとvector上のXhoIサイトで切断しKlenow処理した断片を、self-ligationしたプラスミドDNAである。

- EGD1-g (pGAL-U1A-EGDI 9-10)

pGAL-U1A-EGDI 5', 3'UTRのプラスミドを鋳型に、EGDIの-314~+268塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、pGAL-U1A-Bam vectorのBamHI-XhoIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD1-10 : 5'- TTCGGATCCAAGGAAGAGCGGT-3'

EGD1-9 : 5'- GACCTCGAGATACAGAAGTGTTGTGTTG-3'

- YEplac195-EGDI

W303のゲノムDNAを鋳型に、EGDIの-967~+844塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、YEplac195 vectorのEcoRI-SalIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD1-4 : 5'- TCTGAATTCATTGCTTTGCTTCAGTGG-3'

EGD1-2 : 5'-ATGCTCGAGGCCTGTTGTAAGGCTAGAG-3'

3-1-4 使用した試薬

【DIG化標識プローブ作成】

- EGD1- 1 P~EGD1-6P (100 pM / μ l)

EGD1-1P: 5'- AAGAGCCTGCCTTCTTGTTAAGCTTTCTTCTAGTACCACC -3'

EGD1-2P: 5'- CAGCGTGCAACTTAGCTAATTGACTTTGCAACTTGGTGTC -3'

EGD1-3P: 5'- TGAAGTGCATGACCTTACCGTCGTCCTTGAAAAAGTTGGC -3'

EGD1-4P: 5'- GTAGACCGTAGAATACAGAAGTGTTGTGTTGAGCAGCAAC -3'

EGD1-5P: 5'- TCAGCATCAGCTGGAGCCTTGGCTTCGTGCTTTTCCATTT -3'

EGD1-6P: 5'- GACGTCAGCATCAAAGTTTGACCTTCAACTAACTCTGGA -3'

- DIG (Digoxigen) -11- ddUTP (Boehringer Mannheim, Cat #1093070)
- 4 M LiCl
- DIGオリゴヌクレオチドテイルングキット (Boehringer Mannheim, Cat #1417231)

※DIGオリゴヌクレオチドテイルングキットには以下のものが含まれる。

5×reaction buffer

(1 M potassium cacodylate, 125 mM Tris-HCl pH 6.6, 1.25 mg/ml BSA)

25 mM CoCl₂

Terminal transferase

- EDTA-グリコーゲン溶液

0.5M EDTA 80 μ l

dH₂O 119 μ l

グリコーゲン 1 μ l / total 200 μ l

【マルチウェルプレート作成および*in situ* hybridization】

- 0.2 M Na-phosphate buffer (pH 6.0)

A液 : NaH₂PO₄ · H₂O 13.90 g / 500 ml

B液 : Na₂HPO₄ · 12H₂O 35.85 g / 500 ml

A液とB液を87.7 : 12.3の割合で混合し、pH 6.0の溶液を作製した。

- 固定液 (4% paraformaldehyde-0.1 M Na-phosphate buffer)

4% Paraformaldehyde (Polysciences, Cat #00380)

0.1 M Na-phosphate buffer (pH 6.0)

0.1% 5 N NaOH

paraformaldehydeを全量の1/2のdH₂Oに懸濁し、5 N NaOHを加えて湯せんで溶解した。その後、室温に戻し、全量の1/2の0.2 M Na-phosphate buffer (pH 6.0)を加えて混合した。

- Sorbitol phosphate buffer
 - 1.2 M D-Sorbitol
 - 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 6.0)
- Zymolyase100T溶液

Sorbitol phosphate bufferにZymolyase 100T (生化学工業Cat # 120493)を、終濃度2 mg/mlになるように懸濁した。
- Pre-hybridization buffer (6穴分)

20×SSC	80 μl
50×Denhardt's	40 μl
0.5 mg/ml Bakers yeast tRNA	40 μl
dH ₂ O	240 μl / total 400 μl
- Hybridization buffer (6穴分)

Pre-hybridization buffer	90 μl
5 pmol/μl DIG <i>EGDI</i> -1P~6P probe	各1.5 μl
- PBS-BAG
 - 1% BSA
 - 0.1% アジ化ナトリウム
 - 0.5% cold water fish skin gelatin (Sigma)
- 一次抗体

抗DIG mouse IgGをPBS-BAGで200倍希釈した。
- 二次抗体

FITC-抗mouse IgG抗体(Anti-mouse IgG FITC conjugated, Cappel)を、PBS-BAGで100倍希釈した。
- Mounting medium

グリセロール (蛍光分析用)	8.5 ml
1×PBS	750 μl
p-フェニレンジアミン	10 mg

これらを混合し、遮光しながら攪拌した。その後、pHをチェックしながら、carbonate-bicarbonate bufferを加え、pH 8.0にした。

【RT-PCR】

- ガラスビーズ
- TENST

1 M Tris-HCl	1 ml
0.5 M EDTA	200 μ l
5 M NaCl	2 ml
10% SDS	10 ml
Triton X-100	2 ml

dH₂O を加えて全量 100 ml にした。

- P.C.I. (phenol / CHCl₃ / isoamylalcohol = 25: 24: 1)
- 100% EtOH
- 70% EtOH

【DNase処理】

- DNase
- P.C.I.
- 3M Na-Ace
- 100% EtOH
- 70% EtOH

3-1-5 方法

【DIG 化標識プローブ作成】

1. DIG ヌクレオチドテリングキットに含まれる以下の試薬と、DIG-11-ddUTP および *EGDI* probe (*EGDI*-1P~*EGDI*-6P)を混合した。

5×reaction buffer	4 μ l
25 mM CoCl ₂	4 μ l
<i>EGDI</i> -1P~ <i>EGDI</i> -6P のいずれか (100 pM/ μ l)	1 μ l
1mM DIG-11-ddUTP	1 μ l
Terminal transferase	1 μ l
dH ₂ O	9 μ l / total 20 μ l

2. 37°Cで 20 min 保温した。
3. 氷上に移し、EDTA-グリコーゲン溶液 2 μ l、4 M LiCl 2.5 μ l、-20°Cに冷却した 100% EtOH 75 μ l をそれぞれ加えて、よく混合した。
4. -80°Cに 30 min 静置後、遠心(14,500 rpm, 15 min, 4°C)した。
5. 沈殿をとらないように注意深く上清をとり、70% EtOH 250 μ l を加えた。
6. 遠心 (14,500 rpm, 10 min, 4°C) 後、減圧乾燥機を用いて沈殿を乾燥した。

7. 沈殿は 20 μ l の dH₂O に懸濁し、-20°C で保存した。

【マルチウェルプレート作成および蛍光 *in situ* hybridization】

1. 細胞を 5 ml の液体培地に植え付け、30°C で 12~17 h 振盪培養した。
2. 前培養液 2 ml を、20 ml の新しい液体培地に加え、30°C で対数増殖期まで培養した。
3. 集菌 (3,000 rpm, 2 min) し、固定液 1 ml に懸濁して、室温で固定した (1 h)。
4. 遠心 (5,000 rpm, 30 sec) 後、0.1 M Na-phosphate buffer 1 ml に懸濁した。(×4 回)
5. 遠心 (5,000 rpm, 30 sec) 後、sorbitol phosphate buffer 1ml に 2mg/ml Zymolyase100T 溶液 20 μ l、 β -メルカプトエタノール 2 μ l が入ったものを 300 μ l 加えた。
6. 37°C で、保温して細胞壁を消化した。位相差顕微鏡を用いて、全体の 5~6 割の細胞が消化されるまで行った。細胞壁が消化された細胞は暗く見え、未消化の細胞は明るく光って見えた。
7. 遠心 (5,000 rpm, 1 min, 4°C) 後、氷冷した sorbitol phosphate buffer に懸濁した。作業は、消化が進まないよう、できるだけ氷上で行った。(×3 回)
8. sorbitol phosphate buffer に再懸濁し、50 μ l を poly-L-lysine でコートしたマルチウェルスライドにのせ、室温で 30 min 静置し、細胞をスライドに固着した。
9. 70% EtOH を加え、余分な細胞を除去した後、スライドを 70、90、100% の EtOH に段階的に 5 min ずつ浸し、細胞の脱水処理を行った。
10. 室温でスライドを完全に自然乾燥後、各ウェルに pre-hybridization buffer 50 μ l を加え、室温に静置した (30 min)。
11. アスピレーターで溶液を吸い取り、hybridization buffer 15 μ l を加えた。
12. ウェル中に泡を取り込まないように注意して、カバーガラスをスライドの上に載せた。
13. モイスチャーチャンバーの中に爪楊枝を 2 本敷き、37~42°C で 12~16 h 保温した。
14. スライドからカバーガラスを外しシャーレに入れ、4×SSC 30~40 ml に浸しながら、37~42°C で 10 min 保温した。(×4 回)
15. スライドの裏側をよく拭きとった後、0.1% Triton-X 入り 4×SSC を 80 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で 10 min 放置後、吸引した。(×2 回)
16. 4×SSC を 80 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で 10 min 放置後、吸引した。(×2 回)
17. 各ウェルに 80 μ l ずつ PBS-BAG を加え、室温で 30 min 静置し、吸引した。
18. 各ウェルに一次抗体を 20 μ l ずつ加え、モイスチャーチャンバー内で静置した (1 h)。
19. PBS を 80 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で 10 min 放置後、吸引した。(×3 回)
20. 各ウェルに二次抗体を 20 μ l ずつ加え、遮光しながらモイスチャーチャンバー内で静置した (1 h)。

21. PBS を 80 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で 10 min 放置後、吸引した。(×3 回)
22. 0.1 μ g/ml の DAPI 溶液 30 μ l を加えた後、PBS 80 μ l で 1 回洗った。
23. アスピレーターで PBS を完全に取り除き、プレートを自然乾燥させた。
24. Mounting medium 10 μ l を加え、泡を取り込まないようにカバーガラスをかけた。
25. マニキュアでシールした後、蛍光顕微鏡 (Olympus AX70 fluorescence microscope、Nikon ECLIPSE 80i、Keyence BIOREVO BZ-9000) により、対物レンズ 100 倍で観察した。

【RNA 回収】

(例：BY4741a-pGAL-U1A-GFP+pGAL-U1A-EGDI 5' , 3' UTR 株からの回収)

1. 試験管に分注した SR+LM-medium 5 ml に細胞を懸濁し、30°C で 17 h 前培養した。
2. 前培養液 2 ml を、20 ml の SR+LM-medium に加え、30°C で 2 h 培養した。
3. 2% Galactose 2.4 ml を加え、30°C で 1 h 培養した。
4. 遠心 (2,500 rpm, 5 min, 0°C) し、デカンテーションで上清を捨てた。
5. 残りの上清で沈澱を溶かし、これをエッペンチューブに移した後、再び遠心して集菌した。
6. 沈澱に TENST buffer 200 μ l、ガラスビーズ 0.2 g、P.C.I. 200 μ l を加えた。
7. ボルテックスを 3 min 行なった後、遠心 (14,000 rpm, 10 min, 室温) した。
8. 上層の DNA 層を新しいエッペンチューブに移し、P.C.I. 200 μ l を加えボルテックスした。
9. 遠心 (14,000 rpm, 10 min, 室温) し、DNA 層のみを新しいエッペンチューブに移した。
10. サンプルの 2.5 倍量の 100% EtOH を加え、-80°C に 15 min 静置した。
11. 遠心 (14,500 rpm, 20 min, 0°C) 後、沈澱に 70% EtOH 800 μ l を加えた。
12. 遠心 (14,500 rpm, 10 min, 0°C) 後、真空乾燥した沈澱を dH₂O 30 μ l に溶かし、-80°C で保存した。

【DNase 処理】

1. 吸光光度計を用いてサンプルの RNA 濃度を測定し、500 μ g/ml になるように調整した。
2. 新しいエッペンチューブに以下の試薬を混合した。

RNA	500 μ g/ml
10×DNase buffer	30 μ l
DNase	60 μ l

dH₂O を加えて全量 300 μ l にした。

3. ヒートブロックを用いて 37°C で 2 h 反応させた。
4. P.C.I. 300 μ l を加えて、ボルテックスした。
5. 遠心 (15,000 rpm, 10 min, 室温) 後、上層の DNA 層のみを新しいエッペンチューブに移し

た。

6. サンプルの 1/10 量 3M Na-Ace と 2.5 倍量 100% EtOH を加え、 -80°C に 15 min 静置した。
7. 遠心 (15,000 rpm, 10 min, 4°C) 後、沈殿に 70% EtOH 800 μl を加えた。
8. 遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) 後、沈殿を 10~15 min 真空乾燥した。
9. dH_2O 30 μl に溶かした。
10. 再び吸光光度計を用いてサンプルの RNA 濃度を測定し、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調整した。
11. -80°C で保存した。

【RNA の変性および RT-PCR】

1. 保存していた RNA を取り出し、サーマルサイクラー用のチューブに 10 μl 分注した。
2. サーマルサイクラーで 65°C 、10 min 保温し、RNA を変性させた。
3. 氷上に 1~2 min 置いた後、遠心し、template RNA とした。
4. サーマルサイクラー用のチューブに以下の試薬類を混合した。

MgCl ₂	2 μl
10×RT buffer	1 μl
RNase Free dH_2O	3.75 μl
dNTP mix	1 μl
RNase Inhibitor	0.25 μl
AMV Reverse Transcriptase XL	0.5 μl
20 μM Primer 1	0.5 μl
Template RNA (500 ng)	1 μl / total 10 μl

5. RT 反応

1. 50°C 30 min
2. 99°C 5 min
3. 5°C 5 min

6. RT 後のサンプルを 3 倍希釈した。

7. サーマルサイクラー用のチューブに以下の試薬類を混合した。

RT 後のサンプル (1 倍希釈・3 倍希釈)	2 μl
5×PCR buffer	2 μl
dH_2O	4.95 μl
Ex Taq HS	0.05 μl
2 μM Primer 2	1 μl / total 10 μl

8. PCR 反応

1. 94°C 1 min
2. 94°C 30 sec
3. 50°C 1 min
4. 72°C 1 min ※2~4 は 20 サイクル

9. 5%アクリルアミドゲルで泳動し、EtBr で染色した。

10. UV イルミネーターを用いて写真撮影した。

3-2 結果

3-2-1 蛍光 *in situ* hybridization による *EGD1* mRNA 局在解析

Tag-GFP 法 (Figure 1A) によるスクリーニングにおいて観察された *EGD1* mRNA の細胞質局在が、実際の細胞内での *EGD1* mRNA の局在を反映したものであるかを検証するため、*EGD1* mRNA 特異的プローブを用いた蛍光 *in situ* hybridization を行った。U1A-tag を付加していない *EGD1* を自身のプロモーターにより多コピーで発現させた結果、Tag-GFP 法と同様、核とは異なる細胞質に大きな凝集した RNA の局在を観察できた (Figure 2A)。

3-2-2 *EGD2*、*BTT1* mRNA の局在解析

NAC の α サブユニットをコードしている *EGD2* mRNA について、*EGD2* 遺伝子を含む数種類の断片 (*EGD2*-a、*EGD2*-b、*EGD2*-c、*EGD2*-d、*EGD2*-e) を作成し、RNA の局在を Tag-GFP 法を用いて解析した。その結果、*EGD1* mRNA のような凝集した RNA の細胞質局在は見られなかった (Figure 2B)。

EGD1 と同じく NAC の β サブユニットをコードしている *BTT1* mRNA についても *BTT1* 遺伝子を含む断片 (*BTT1*-a、*BTT1*-b) を作成し、RNA の局在を Tag-GFP 法を用いて調べた。その結果、*BTT1* mRNA についても *EGD1* mRNA のような凝集した細胞質局在は見られなかった (Figure 2C)。

3-2-3 *EGD1* mRNA 局在化 *cis* 配列の同定

EGD1 mRNA の細胞質局在化に必要な領域を同定するため、断片化した *EGD1* 遺伝子断片を作成し、RNA の細胞質局在に対する影響を調べた (Figure 3A)。局在率は 300 個以上の細胞を観察し、そのうち細胞質の凝集した RNA の局在が見られた細胞の割合を計算した。

スクリーニングで得られた断片 302S を用いて、*EGD1* の 3'-UTR を 844 塩基へと短くした断片 *EGD1*-a では 302S 同様、局在率は約 13%であった。また、*EGD1* の 3'-UTR を全く含まない断片 *EGD1*-b でも局在率は約 11%であった。一方、*EGD1* の ORF については ORF 全長(+1~+474 塩基)を含む断片 *EGD1*-b では約 11%の局在であったのに対し、ORF の 3'側を 11 塩基欠いた(+1~+463 塩基)断片 *EGD1*-f では、局在率が約 3%にまで大きく減少した。さらに、ORF の 3'側を 206 塩基短くした(+1~+268 塩基)断片 *EGD1*-g では局在率が 0%になった。

EGD1 の 5' 上流領域については、302S よりも 101 塩基短くした(-204~-1 塩基)断片 *EGD1*-d では、302S に比べ、局在率が約 7%へと減少した。さらに *EGD1* 5' 上流領域を 63 塩基にまで短くした断片 *EGD1*-e、および 5' 上流領域を全く含まない断片 *EGD1*-j では、局在率が 0%になった。従って、局在率の減少は *EGD1* の 5' 上流領域、ORF、3'-UTR のどの領域の欠如でも

認められた。しかし、*EGD1* の 5' 上流領域、ORF の断片化でのみ、局在率が 0% になった。よって、*EGD1* mRNA の局在化には、*EGD1* の 5' 上流領域と ORF 領域の両方が必要であることが示唆された。観察された局在率の減少が RNA の存在量の低下によるものでないことは、U1A-tag 部分に対する特異的プライマーを用いた RT-PCR によって確認した (Figure 3A)。EGD1-a、EGD1-b、EGD1-c、EGD1-d、EGD1-e、EGD1-f、EGD1-g、EGD1-h、EGD1-i においては、バンドの濃さから、RNA の存在量に差がないことが分かった。しかし、EGD1-j においては、テンプレート量を他のサンプルと同様の希釈率で希釈するとバンドが検出されなくなったことから、RNA の分解が起きやすくなっていることが示唆された。さらに、RNA の局在の様子も局在率の減少が確認された断片 (EGD1-a、EGD1-b、EGD1-d、EGD1-f) において顕著な変化は見られなかった (Figure 3B)。

3-2-4 遺伝子欠失バンクを用いた *EGD1* mRNA 局在化 *trans* 因子の探索

出芽酵母のデータベース (<http://www.yeastgenome.org/>) により、*EGD1* と相互作用することが示唆されている遺伝子、及びこれまでに出芽酵母の局在化 RNA の輸送に関与することが報告されている遺伝子の欠損株を中心として網羅的な *EGD1* mRNA 局在化 *trans* 因子の探索を試みた。解析した遺伝子欠損株を Table 2 に示す。その結果、63 個の遺伝子欠損株で Tag-GFP 法を用いた局在解析を行なったが、完全な消失が確認された株は得られなかった。しかし、遺伝子欠損株によっては、野生株と比較しての *EGD1* mRNA の細胞質局在の大きさや形態に変化が観察される株もあった。例えば、 $\Delta sfb1$ 、 $\Delta caf40$ 、 $\Delta caf16$ 、 $\Delta puf4$ 、 $\Delta btt1$ 、 $\Delta gsg1$ 、 $\Delta lsm6$ では *EGD1* mRNA の細胞質局在の大きさが大きくなり、逆に $\Delta ccr4$ 、 $\Delta pby1$ では局在が小さくなっているように感じられた。

3-3 考察

3-3-1 蛍光*in situ* hybridizationによる*EGDI* mRNA局在解析

局在化RNAの網羅的スクリーニングにおいて取得した新規細胞質局在クローン302Sはシーケンス解析の結果、U1A-tag配列直後に5'上流領域(314塩基)を含む*EGDI*遺伝子を含んでいた。Tag-GFP法(Figure 1A)によって観察されたRNAの凝集した細胞質局在が、実際の細胞内での局在を反映したものであるかを*EGDI* mRNA特異的プローブを用いた蛍光*in situ* hybridizationで検証した。その結果、*EGDI*を自身のプロモーターにより多コピーで発現させると、スクリーニング時と同様、核とは異なる細胞質に大きなRNAの局在を示すことが確認できた(Figure 2A)。よって、局在が実際の細胞内でも起きている可能性が示唆された。しかし、vectorのみを発現させた細胞での内在性*EGDI* mRNAの局在解析では、多コピーで発現させた時のような明確なRNAの細胞質局在を確認できなかった(Figure 2A, 図c)。このことから、*EGDI* mRNAの凝集した局在は細胞内での*EGDI* mRNAの発現量に依存していることが示唆された。

3-3-2 *EGD2*、*BTT1* mRNA についての局在解析

NACの α サブユニットをコードしている*EGD2*遺伝子、*EGDI*と同じくNACの β サブユニットをコードしている*BTT1*遺伝子について、それぞれ数種類の断片を作成し、mRNAの局在をTag-GFP法を用いて解析した。その結果、*EGD2*、*BTT1* mRNA共に*EGDI* mRNAのような凝集したRNAの細胞質局在は確認されなかった(Figures 2B and 2C)。従って、*EGDI* mRNAの示す凝集した細胞質局在はNAC mRNA間での共通した現象ではなく、*EGDI* 特異的な現象であることが示唆された。NACは分子シャペロンのように働き、とても早い段階で新生ポリペプチド鎖に結合し、直接または間接的にタンパク質のフォールディングに寄与する。真核生物では、NACの両サブユニットがとても短い新生ポリペプチド鎖とクロスリンクしていることが示されている一方で(Rospert *et al.* 2002)、リボソームとの関わりは β サブユニットによって仲介されていることが知られている(Franke *et al.* 2001)。また、*EGDI*と同じくNACの β サブユニットをコードしている*BTT1*遺伝子は*EGDI*と比較して発現量が1/100程でしかない(Rospert *et al.* 2002)。そのため、*EGDI* mRNAのみが細胞質に局在することは、NAC因子の中でも個々に異なる役割を持つことが理由である可能性もある。今後、さまざまな方面からのNACについての解析が進むことで新たな事実が明らかとなるかもしれない。

3-3-3 *EGDI* mRNA 局在化 *cis* 配列の同定

EGDI mRNA の細胞質局在に必要な領域を同定するために、*EGDI* 遺伝子を断片化し RNA の凝集した局在に対する影響を調べた。その結果、局在率の減少は *EGDI* の 5' 上流領域、ORF、3'-UTR のどの領域の欠如でも認められた (Figure 3A)。しかし、*EGDI* の 5' 上流領域、ORF の断片化でのみ、完全に局在が消失した。よって、*EGDI* mRNA の局在化には、*EGDI* の 5' 上流領域と ORF 領域の両方が必要であることが分かった。通常、RNA の局在化過程は、RNA の輸送過程 (transport) と、輸送された RNA をつなぎとめる過程 (anchoring) からなる。輸送過程において RNA は、多くの場合、3'-UTR に存在する RNA の局在化 *cis* 配列に *trans* 因子が結合することでモータータンパク質と複合体を形成し、微小管やアクチンなどの細胞骨格上を能動的に輸送される (St Johnston 2005)。既知の局在化 RNA のほとんどは 3'-UTR 領域に局在配列が存在し、局在に 5' 上流領域を必要とする例はほとんど知られていない。よって、特異的局在を示す *EGDI* の 5' 上流領域が局在に重要な役割を果たしているというのは興味深く、これまでに知られている方法とは異なる機構で局在している可能性が考えられた。

3-3-4 遺伝子欠失バンクを用いた *EGDI* mRNA 局在化 *trans* 因子の探索

出芽酵母の遺伝子欠失バンクを用いて、データベース (<http://www.yeastgenome.org/>) により *EGDI* と相互作用することが示唆されている遺伝子、及びこれまでに発芽酵母の局在化 RNA の輸送に関与することが報告されている遺伝子や SG 関連因子の欠失株を中心として、網羅的な *EGDI* mRNA 局在化 *trans* 因子の同定を試みた。63 個の遺伝子欠失株で Tag-GFP 法を用いた局在解析を行った結果、調べたいずれの株においても *EGDI* mRNA の細胞質局在は観察された。このことから、*EGDI* mRNA の局在化に関与する必須因子はこれまでに *EGDI* や出芽酵母での mRNA 局在化機構との関連性について報告例のない、新規の因子である可能性が示唆された。しかし、本解析では非必須遺伝子の遺伝子欠失バンクを用いたことから、必須遺伝子での解析は行なっていない。よって、既知の関連因子中の必須遺伝子の中に *EGDI* mRNA の局在化に必須の因子が含まれている可能性も考えられる。また、遺伝子欠失株により、野生株と比較して *EGDI* mRNA の細胞質局在の大きさや形態に変化が観察される株もあった。このことは、これらの因子が *EGDI* mRNA の局在の形成や、維持に関与している可能性が高いことを示唆している。今後は個別の因子について、*EGDI* mRNA との詳しい関係性を解析して行くことが必要だろう。

第四章

EGD1 mRNAと*EGD1*タンパク質局在の解析

4-1 材料と方法

4-1-1 使用した株

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

BY4741a : *MATa*, *his3*, *leu2*, *met15*, *ura3*

4-1-2 使用した培地

【出芽酵母用】

・SD+MH-medium

2%	Glucose
0.67%	Yeast Nitrogen Base
30 mg/l	Histidine
30 mg/l	Methionine

プレートの場合は2% Agar を加えた。

・SG+MH-medium

2%	Galactose
0.67%	Yeast Nitrogen Base
30 mg/l	Histidine
30 mg/l	Methionine

プレートの場合は2% Agar を加えた。

4-1-3 使用したプラスミド

【*GAL1*プロモーター付き*Leu2*マーカー、多コピー型プラスミド】

・YEplac181-*GAL1*p vector

p*GAL*-U1A-GFP プラスミドから *SacI*-*XbaI* サイトで切り出した *GAL1* プロモーターを、YEplac181 vector の *SacI*-*XbaI* サイトに挿入したプラスミド DNA である。

【EGDI遺伝子コンストラクト】

- EGD1-h (pGAL-U1A-EGDI/EGD2キメラ)

pGAL-U1A-EGDI 5', 3'UTRのプラスミドを鋳型にEGDIの-314~-1塩基の領域と+296~+474塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、(pGAL-U1A-EGD2 1-2のプラスミドを鋳型に) EGD2の+1~+295塩基の領域をPCRにより増幅させた断片と共に、pGAL-U1A-Bam vectorのBamHI-XhoIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

[EGD1 -314~-1塩基の領域]

EGD1-10 : 5'- TTCGGATCCAAGGAAGAGCGGT-3'

EGD1-13 : 5'-AATCTGCAGTATGAATTATGAGTCGCG-3'

[EGD1 +296~+474塩基の領域]

EGD1-14 : 5'- AGAGAATTCAAGATTTGTTCCCAGGT-3'

EGD1-11 : 5'- TTACTCGAGTTATTCGACGTCAGCATC-3'

[EGD2 +1~+295塩基の領域]

EGD2-10 : 5'- CAACTGCAGATGTCTGCTATCCCAGAA-3'

EGD2-11 : 5'- ACTGAATTCCGACGTCTTCGTTAGATG-3'

- EGD1-i (pGAL-U1A-Mut_EGD1_{ATG→TTG})

W303のゲノムDNAを鋳型にEGDIの-314~-1塩基の領域と、EGDIのfirsrt ATGをTTGに変えた-12~+474塩基の領域をPCRにより増幅し断片を作成した。次に、その2つの断片を鋳型としてEGDIの-314~+474塩基の領域をPCRにより増幅させ、pGAL-U1A-Bam vectorのBamHI-XhoIサイトに挿入して作成したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

[EGD1の-314~-1塩基の領域]

EGD1-10 : 5'- TTCGGATCCAAGGAAGAGCGGT-3'

Mut_EGD1-2 : 5'- TATGAATTATGAGTCGCG -3'

[EGD1のfirsrt ATGをTTGに変えた-12~+474塩基の領域]

Mut_EGD1-1 : 5'- TCATAATTCATATTGCCAATTGACCA -3'

EGD1-11 : 5'- TTACTCGAGTTATTCGACGTCAGCATC-3'

[EGD1の-314~+474塩基の領域]

EGD1-10 : 5'- TTCGGATCCAAGGAAGAGCGGT-3'

EGD1-11 : 5'- TTACTCGAGTTATTCGACGTCAGCATC-3'

- pYES2-MYC-EGD1

EGD1-b (pGAL-U1A-*EGD1* 10-11) を鋳型に *EGD1* の 5' 上流領域-314~-1 塩基の領域を PCR で作成した断片と、pRS314-GAL1p-MYC-EGD1 のプラスミドから *EcoRI* と *XhoI* で切り出した約 0.8 kb の断片を pYES2 vector の *BamHI-XhoI* サイトに挿入したプラスミド DNA である。PCR による増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD1-10 : 5'- TTCGGATCCAAGGAAGAGCGGT-3'

EGD1-26 : 5'- AATGAATTCTATGAATTATGAGTCGCG-3'

- YCplac33-3MYC-*EGD1*

W303a のゲノム DNA を鋳型に、*EGD1* の -967~-1 塩基の領域を PCR により増幅させた約 1.0 kb 断片と、pRS314-GAL1p-MYC-EGD1 のプラスミドから *EcoRI* と *XhoI* で切り出した約 1.2 kb の断片を、pTS904CU vector の *EcoRI-SalI* サイトに挿入したプラスミド DNA である。PCR による増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD1-4 : 5'- TCTGAATTCATTGCTTTGCTTCAGTGG-3'

EGD1-26 : 5'- AATGAATTCTATGAATTATGAGTCGCG-3'

- YEplac181-GAL1p-*EGD1* 11-12

EGD1-b (pGAL-U1A-*EGD1* 5'UTR) を鋳型に、*EGD1* の -63~+474 塩基の領域を PCR により増幅させた約 0.5 kb 断片を、YEplac181-GAL1p vector の *XbaI-SalI* サイトに挿入したプラスミド DNA である。PCR による増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD1-11 : 5' - TTACTCGAGTTATTCGACGTCAGCATC-3'

EGD1-12_ *XbaI* : 5'- AGATCTAGAATATTCTTTCTAGGGAGG-3'

4-1-4 使用した試薬

【三重染色蛍光 *in situ* hybridization】

- Pre-hybridization buffer (3 穴分)

20×SSC	50 μl
50×Denhardt's	25 μl
0.5 mg/ml Bakers yeast tRNA	25 μl
dH ₂ O	150 μl / total 250 μl

- Hybridization buffer (3 穴分)

Pre-hybridization buffer	80 μl
--------------------------	-------

5 pmol/ μ l DIG *EGDI*-1P~6P probe 各 1.5 μ l

- 一次抗体

抗 DIG mouse IgG を PBS-BAG で 200 倍希釈した。

- 二次抗体

TexasRed-抗 mouse IgG 抗体(Anti mouse IgG TexasRed conjugated, Cappel)を PBS-BAG で 50 倍希釈した。

【Western blotting 用サンプル調製】

- ガラスビーズ

- Lysis buffer

0.3 M mannitol

0.1 M KCl

50 mM Tris-HCl (pH7.5)

1 mM EGTA

- 100 mM PMSF

PMSF (Sigma) 4.4mg

100% EtOH 250 μ l

- BIO-RAD protein assay

【電気泳動および Western blotting 法】

- Western blotting 用 15%アクリルアミドゲル

Lower Gel (2 枚分)

dH ₂ O	3.5 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	3.75 ml
10% SDS	150 μ l
10% APS	75 μ l
TEMED	15 μ l

Upper Gel (2 枚分)

dH ₂ O	4.8 ml
0.5 M Tris (pH6.8)	2 ml
10% SDS	80 μ l
30% Acrylamide/Bis	1040 μ l
10% APS	40 μ l

- アクリルアミドゲル用泳動槽
- 1×SDS buffer (泳動 buffer)
- 1×Sample buffer

2×Sample buffer	500 μl
Lysis buffer	500 μl
- マーカー

Kaleidoscope	10 μl
1×Sample buffer	90 μl
- メンブレン Hybond P (7×9 cm) 1 枚…手袋を着用して取り扱った。
右肩に鉛筆で日付・実験名を記入。メタノールに軽く浸した後、使用するまで 1×western transfer buffer に浸しておいた。
- 濾紙 (厚紙) (7.5×9.5 cm) 8 枚
- 1×western transfer buffer
- 5%スキムミルク
- 1×TBST
- ハイブリバック
- 一次抗体
抗 myc mouse IgG を 1×TBST で 1000 倍希釈した。
- 二次抗体
ELC 抗 mouse 抗体を 1×TBST で 1000 倍希釈した。
- タッパー、ピンセット、へら、手袋
- ELC 検出用 kit

4-1-5 方法

【DIG化標識プローブ作成】および【マルチウェルプレート作成】

3-1-5を参照。

【三重染色蛍光 *in situ* hybridization】

1. 各ウェルに Pre-hybridization buffer 50 μl を加え、室温に 30 min 静置した。
2. アスピレーターで溶液を吸い取り、Hybridization buffer 15 μl を加えた。
3. ウェル中に泡を取り込まないように注意して、カバーガラスをスライドの上に載せた。
4. モイスチャーチャンバーの中に爪楊枝を 2 本敷き、37°C で 12~16 h 保温した。
5. スライドからカバーガラスを外してシャーレに入れ、30~40 ml の 4×SSC 中で、37°C で 10

min 保温した。(×4回)

6. スライドの裏側をよく拭きとった後、0.1% Triton-X 入り 4×SSC を 80 μl ずつ各ウェルに加え、吸引した。
7. 1% BSA-4×SSC で 200 倍希釈したアビジン-FITC を 20 μl ずつ各ウェルに加えた。
8. 遮光して、室温で 30 min 静置した。
9. 4×SSC を 80 μl ずつ各ウェルに加え、室温で 10 min 放置後、吸引した。(×2回)
10. 0.1% Triton-X 入り 4×SSC を 80 μl ずつ各ウェルに加え、室温で 10 min 放置後、吸引した。(×2回)
11. 4×SSC を 80 μl ずつ各ウェルに加え、室温で 10 min 放置後、吸引した。(×2回)
12. 各ウェルに 80 μl ずつ PBS-BAG を加え、室温で 30 min 静置し、吸引した。
13. 各ウェルに一次抗体を 20 μl ずつ加え、遮光したモイスチャーチャンバー内で 1 h 静置した。
14. PBS を 80 μl ずつ各ウェルに加え、室温で 10 min 放置後、吸引した。(×3回)
15. 各ウェルに二次抗体を 20 μl ずつ加え、遮光しながらモイスチャーチャンバー内で 1 h 静置した。
16. PBS を 80 μl ずつ各ウェルに加え、室温で 10 min 放置後、吸引した。(×3回)
17. 0.1 μg/ml の DAPI 溶液 30 μl を加えた後、PBS 80 μl で 1 回洗った。
18. アスピレーターで PBS を完全に取り除き、プレートを自然乾燥させた。
19. Mounting medium 10 μl を加え、泡を取り込まないようにカバーガラスをかけた。
20. マニキュアでシールした後、蛍光顕微鏡 (Olympus AX70 fluorescence microscope、Nikon ECLIPSE 80i、Keyence BIOREVO BZ-9000) により、対物レンズ 100 倍で観察した。

【Western blotting 用サンプル調製】

1. YCplac33-MYC-EGDI と YEplac181-GAL1p-EGDI 11-12 (または YEplac181-GAL1p vector) で形質転換した BY4741a 株を SD+MH-plate にストリークし、30°C で培養した。
2. SG+MH-plate に塗りかえ、30°C で 24 h 培養した。
3. SG+MH-medium 8 ml に、プレートから爪楊枝でかきとった細胞を懸濁し、30°C で一晩前培養した。
4. 前培養液 5 ml を、25 ml の新しい SG+MH-medium に加え、30°C で 4.5 h 培養した。
*以下の作業はできるだけ低温室 (4°C) かつ氷上でおこなった。
5. 集菌 (3,000 rpm, 3 min, 4°C) し、デカンテーションで上清を捨てた。
6. 残りの上清で沈澱を溶かし、これをエッペンチューブに移した後、再び遠心(15,000 rpm, 1 min, 4°C)して集菌した。(−80°Cで保存可能。)

7. 1 mM PMSF 入り Lysis buffer を 100 μ l、ガラスビーズを適量加え、4°Cで 5 min ボルテックスにより細胞を破壊した。
8. 再び 1 mM PMSF 入り Lysis buffer を 100 μ l 加え、4°Cで 5 min ボルテックスした。(顕微鏡で細胞の壊れ具合を確認しながら、細胞が 8 割程度壊れるまで行った。)
9. 遠心 (15,000 rpm, 10 min, 4°C) 後、注意深く上清を回収した。
10. 再び遠心 (15,000 rpm, 10 min, 4°C) 後、上清を回収した。
11. BIO-RAD protein assay を用いて吸光度 595 nm でタンパク濃度を測定し、1~10 mg/ml になるよう濃度調整を行った。
12. Sample buffer を加え、boil した (2 min)。(−20°Cで保存。)

【電気泳動および Western blotting 法】

1. 一度 boil して−20°Cに保存してあるサンプルを再度 boil した (30 sec)。
2. 遠心 (15,000 rpm, 1 min, 室温) 後、上清 20 μ l を 15%アクリルアミドゲルにアプライした。空きレーンにも 1×Sample buffer 20 μ l をアプライし、全てのレーンで 20 μ l になるようにした。
3. 20 mA で泳動した。
4. 泳動終了後、へらで Upper Gel を切り落とし、泳動中に準備しておいた 1×western transfer buffer にゲルを浸した。
5. Transfer で使用する機械の台を 1×western transfer buffer で少しぬらし、1 枚ずつ 1×western transfer buffer に浸した濾紙を、空気が入らないよう注意しながら 4 枚台の上に重ねた。
6. メンブレンを濾紙からはみ出さないよう注意しながら重ねた。
7. さらに、泳動後 1×western transfer buffer に浸しておいたゲルを重ねた。
8. 1×western transfer buffer に浸した濾紙を 1 枚ゆっくりと重ね、空気が入らないよう軽く手で押さえた。
9. 残りの濾紙 3 枚も 1×western transfer buffer に浸したのち、1 枚ずつ重ねた。
10. 余った 1×western transfer buffer を Transfer 中に乾燥しないよう、上からかけた。
11. 500 V、120 mA で Transfer (1.5 h) を行なった。
12. Transfer 終了後、ゆっくりとメンブレンをはずし (マーカーがメンブレンに移っているかを確認)、Transfer の間に用意しておいた 5%スキムミルク入りのタッパーに入れた。
13. 室温で振盪し、ブロッキングした (30 min)。
14. 1×TBST に浸し、5 min、室温で洗いを行った。(×3 回)
15. ハイブリバックにメンブレンを移し、周りをシールした後、一次抗体を加え、4°Cで一晩反応させた。

17. 1×TBST の入ったタッパーに、ハイブリバックから取り出したメンブレンを移し、15 min ×1 回の洗いの後、5 min ×3 回の洗いを行った。
18. ハイブリバックにメンブレンを移し、周りをシールした後、二次抗体を加えた。
19. 室温で 1 h 反応させた。
20. 1×TBST の入ったタッパーに、ハイブリバックから取り出したメンブレンを移し、15 min ×1 回の洗いの後、5 min ×3 回の洗いを行った。
21. LAS1000 でバンドを検出した。

4-2 結果

4-2-1 *EGD1* mRNA 細胞質局在と翻訳

EGD2 mRNA では *EGD1* mRNA のような凝集した細胞質局在は見られなかったことから、*EGD1* mRNA の細胞質局在に必要なことが示唆された 5'上流領域(-314~-1 塩基)と 3'側の ORF 領域(+296~+474 塩基)を *EGD2* ORF (+1~+295 塩基)につなげた *EGD1/EGD2* キメラ遺伝子断片 (*EGD1-h*) で *EGD1* mRNA のような凝集した細胞質局在が観察されるか、Tag-GFP 法を用いて調べた。その結果、*EGD1/EGD2* キメラでは、細胞質への mRNA の集積した局在は観察されなかった (Figure 3A)。さらに、正常な *Egd1p* が翻訳されないよう *EGD1* ORF の first ATG を TTG に変えた断片 (*EGD1-i*) においても、凝集した細胞質への局在が確認できなかった (Figure 3A)。

4-2-2 *EGD1* mRNA 細胞質局在と *Egd1p* の細胞内局在

次に、*EGD1* mRNA の局在と翻訳との関係性が示唆されたため、*Egd1p* の局在についても蛍光 *in situ* hybridization 及び抗体染色の三重染色を用いて調べた。その結果、N 末に myc-tag の付いた *Egd1p* は凝集した *EGD1* mRNA と共局在していた (Figure 4A)。さらに、C 末側に DsRed を付加した *Egd1p* を Tag-RFP 法 (Tag-GFP 法での GFP を RFP に置換した方法) で観察した結果においても、凝集した *Egd1p* と共に *EGD1* mRNA が共局在していることが明らかとなった (Figure 4B)。よって、細胞質で凝集した *EGD1* mRNA は *Egd1p* と RNP 複合体を形成していると考えられた。この過剰発現した *EGD1* mRNA と *Egd1p* が形成する細胞質構造体を *EGD1* 顆粒と名付けることにした。

4-2-3 *EGD1* 顆粒形成に対する *Egd1p* の直接的関与

EGD1 mRNA の局在化には *EGD1* の 5'上流領域と *Egd1p* への翻訳が必要であるため、*Egd1p* 自身が *EGD1* mRNA の 5'上流領域に結合することによって翻訳を抑制し、凝集した局在を生み出しているのではないかと考えた。そこで、*Egd1p* の N 末に myc-tag を付加したプラスミド (YCplac33-MYC-*EGD1*) と共に、多コピーで 5'上流領域を 63 bp 持つ *EGD1* mRNA を発現させた場合における *Egd1p* 量を、抗 myc 抗体を用いて調べた。その結果、63 bp の 5'上流領域を持つ *EGD1* mRNA を過剰発現させた場合には、Vector のみを過剰発現させた場合に比べ、myc-*Egd1p* のバンドが薄くなった (Figure 5)。よって、過剰発現された *Egd1p* が myc-*Egd1p* mRNA の 5'上流領域に結合し、タンパク質への翻訳を抑制した可能性が示唆された。

4-3 考察

4-3-1 *EGDI* mRNA 細胞質局在と翻訳

Tag-GFP 法を用いた *EGDI/EGD2* キメラ遺伝子断片 (*EGDI-h*) や変異型 *EGDI* 遺伝子断片 (*EGDI-i*) についての局在解析の結果、共に RNA の凝集した細胞質への局在が確認できなかった (Figure 3A)。従って、*EGDI* mRNA の局在化には完全な Egd1p への翻訳が必要であることが示唆された。

4-3-2 *EGDI* mRNA 細胞質局在と Egd1p の細胞内局在

蛍光 *in situ* hybridization 及び抗体染色の三重染色による Egd1p の局在解析の結果、myc-tag を N 末側に付加した Egd1p は、凝集した *EGDI* mRNA と共局在していた (Figure 4A)。さらに、C 末側に DsRed を付加した Egd1p を Tag-RFP 法で観察した結果においても、凝集した Egd1p と共に *EGDI* mRNA が共局在していることが明らかとなった (Figure 4B)。このことから、*EGDI* mRNA は Egd1p と共に、発現量依存的な細胞質 RNP 複合体 (*EGDI* 顆粒) を形成し、機能している可能性が示唆された。

4-3-3 *EGDI* 顆粒形成に対する Egd1p の直接的関与

5'上流領域に局在配列を保持する理由の一つとして、精密な翻訳制御ということが予想される。そこで、*EGDI* mRNA の 5'上流領域に Egd1p 自身が結合することにより、翻訳抑制状態となり、局在化のきっかけとなっているのではないかと考えた。そこで myc を付加した Egd1p と共に、多コピーで 63 bp の 5'上流領域を持つ *EGDI* mRNA を発現させることで、myc-Egd1p 量に変化が見られるかを Western Blotting を用いて検証した。その結果、別のプラスミドから *EGDI* mRNA を過剰発現させた場合には、Egd1p が *trans* に *EGDI* mRNA の 5'上流領域に結合することによって、myc-Egd1p の翻訳を Vector のみと比べ抑制する可能性が示唆された (Figure 5C)。

今回の実験では、株によって myc-Egd1p への翻訳抑制効果に差があり、弱い影響しか見られなかった。これは共発現させた 5'上流領域を 63 bp しか持たない *EGDI* mRNA は翻訳効率が悪いために (Figure 13E)、十分な量の Egd1p を産生できなかったためであるかもしれない。そのため、63 bp よりも長い 5'上流領域を持つ *EGDI* mRNA を共発現させることでより効率的な Egd1p の産生を行なった場合には、今回よりも強い myc-Egd1p の発現抑制効果を見ることができると推察される。

また、今後は、5'上流領域のみでなく、3'下流領域への Egd1p 結合活性も調べる必要があると考えている。なぜなら、ORF の 3'側をわずかでも欠く遺伝子断片では細胞質局在

に大きな影響が見られ (Figure 3A, EGD1-f)、また、U1A-tag 配列を ORF の 3'側に付加させると mRNA は凝集した細胞質局在を示さなくなった (data not shown)。従って、何らかの因子が *EGDI* 3'側下流領域に結合することが *EGDI* 顆粒形成に必要であると思われる。Egd1p は顆粒形成に必須の因子であることから、この候補因子の一つである可能性が高い (Figure 5C)。*EGDI* 顆粒形成に対する Egd1p の直接的で具体的な役割を明らかにして行くことは、*EGDI* 顆粒及び類似細胞質凝集体の形成メカニズムの解明に貢献できると期待している。

第五章

EGD1 顆粒と既知の細胞内構造体に関する解析

5-1 材料と方法

5-1-1 使用した株

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

BY4741a : *MATa, his3, leu2, met15, ura3*

DGP2-GFP (yRP2080) : *MAT α , leu2, met15, ura3*

PAT1-GFP (yRP2082) : *MAT α , leu2, met15, ura3*

EDC3-GFP (yRP2211) : *MAT α , leu2, met15, ura3*

DHH1-GFP (yRP2081) : *MAT α , leu2, met15, ura3*

* R. Parkar 博士より分与。

$\Delta dhh1$ (Yeast Knock Out Strains : Open Biosystems)

: *MATa, his3, leu2, met15, ura3, \Delta dhh1 :: kanMX4* (BY4741a background)

$\Delta pat1$ (Yeast Knock Out Strains : Open Biosystems)

: *MATa, his3, leu2, met15, ura3, \Delta pat1 :: kanMX4* (BY4741a background)

$\Delta lsm1$ (Yeast Knock Out Strains : Open Biosystems)

: *MATa, his3, leu2, met15, ura3, \Delta lsm1 :: kanMX4* (BY4741a background)

$\Delta xrn1$ (Yeast Knock Out Strains : Open Biosystems)

: *MATa, his3, leu2, met15, ura3, \Delta xrn1 :: kanMX4* (BY4741a background)

$\Delta ccr4$ (Yeast Knock Out Strains : Open Biosystems)

: *MATa, his3, leu2, met15, ura3, \Delta ccr4 :: kanMX4* (BY4741a background)

$\Delta edc3$ (Yeast Knock Out Strains : Open Biosystems)

: *MATa, his3, leu2, met15, ura3, \Delta edc3 :: kanMX4* (BY4741a background)

$\Delta not3$ (Yeast Knock Out Strains : Open Biosystems)

: *MATa, his3, leu2, met15, ura3, \Delta not3 :: kanMX4* (BY4741a background)

$\Delta pby1$ (Yeast Knock Out Strains : Open Biosystems)

: *MATa, his3, leu2, met15, ura3, Δpby1* :: *kanMX4* (BY4741a background)

5-1-2 使用した培地

【出芽酵母用】

- SD+MH-plate

4-1-2に記した。

- SR+MH-medium

2%	Raffinose
0.67%	Yeast Nitrogen Base
30 mg/l	Histidine
30 mg/l	Methionine

- SD+M-medium

2%	Glucose
0.67%	Yeast Nitrogen Base
30 mg/l	Methionine

プレートの場合は2% Agarを加えた。

- SR+M-medium

2%	Raffinose
0.67%	Yeast Nitrogen Base
30 mg/l	Methionine

5-1-3 使用したプラスミド

【EGDI遺伝子コンストラクト】

- YEplac181-EGDI

YEplac195-EGDI のプラスミドを *EcoRI* と *SphI* サイトで切り出した約 1.6 kb の断片を、YEplac181-GAL1p vector の *EcoRI-SphI* サイトに挿入したプラスミドDNAである。

5-1-4 方法

【P-body 因子株を用いた Tag-RFP 法での観察】

1. pU1A-RFP と EGD1-c が導入された P-body 因子株を SD+MH-plate から爪楊枝で掻き取り、SR+MH-medium 200 μ l に懸濁後、30°C で 12~20 h 培養した。
2. 前培養液 50 μ l を 500 μ l の新しい SR+MH-medium に加え、30°C で 1 h 振盪培養した。
3. 2% Galactose 60 μ l を加え、30°C で 3~4 h 培養した。

4. Hoechst (2 mg/ml) 6 μ l を加え、遠心 (5,000 rpm, 1 min, 室温) した。
5. 上清を除き、残りの上清 (約 10~20 μ l) で沈澱を懸濁した。
6. 懸濁液 1.6 μ l をスライドガラス上に置き、カバーガラスをかけ、マニユキアを用いてシールした。
7. 蛍光顕微鏡 (Nikon ECLIPSE 80i、Keyence BIOREVO BZ-9000) により、対物レンズ 100 倍で観察した。

【Tag-GFP 法での観察】

(例 : pU1A-GFP、pGAL-U1A-Bam、YEplac181-EGD1 で形質転換された BY4741a 株の観察)

1. SR+M-medium 200 μ l をエッペンチューブに分注し、SD+M-plate から爪楊枝でかきとった出芽酵母を懸濁し、30°C で 12~24 h 培養した。
2. 前培養液 50 μ l を 500 μ l の新しい SR+M-medium に加え、30°C で 2 h 振盪培養した。
3. 2% Galactose を 60 μ l 加え、30°C で 1h 培養した。
4. Hoechst (2 mg/ml) 6 μ l を加え、遠心 (5,000 rpm, 1 min, 室温) した。
5. 上清を除き、残りの上清 (約 10~20 μ l) で沈澱を懸濁した。
6. 懸濁液 1.6 μ l をスライドガラス上に置き、カバーガラスをかけ、マニユキアを用いてシールした。
7. 蛍光顕微鏡 (Olympus AX70 fluorescence microscope、Nikon ECLIPSE 80i、Keyence BIOREVO BZ-9000) により、対物レンズ 100 倍で観察した。

*96 穴プレートを用いた方法は 2-1-5 に記した。

5-2 結果

5-2-1 *EGDI* 顆粒と P-body

P-body (Processing body) とは mRNA の代謝に関わる細胞質顆粒であり、Dhh1p、Dcp1p、Dcp2p、Xrn1p、Lsm1-7、Pat1p など mRNA のデキャッピングや分解に関わる多くの因子が共局在している。ストレス条件下では、P-body の数やサイズは増加することも知られている。この P-body と *EGDI* 顆粒との関係性を検証するため、P-body の代表的因子である *Dcp2*、*PAT1*、*EDC3* 及び *DHBI* に GFP が付加された株を用いて、Tag-RFP 法での *EGDI* 顆粒の局在観察を行なった。その結果、通常、細胞質にドット状の局在を示す P-body が、*EGDI* 顆粒存在下では細胞質に大きな塊を形成し、*EGDI* mRNA と共局在することが明らかとなった (Figure 6)。さらに、様々な P-body 因子の遺伝子欠損株での *EGDI* 顆粒の観察を行い、*EGDI* 顆粒と P-body との関係性について詳しく解析した。その結果、いずれの欠失変異株 (*dhh1*、*pat1*、*lsm1*、*xrn1*、*ccr4*、*edc3*、*not3*、*pby1*) においても *EGDI* 顆粒は形成されることが分かった (Figure 7)。

5-2-2 *EGDI* 顆粒とその他の RNA

EGDI 顆粒は *EGDI* mRNA 特異的に形成されるものであるが、その局在場所には *EGDI* mRNA 以外の非特異的な RNA も存在している可能性がある。そこで、その可能性を検証するため、Tag-GFP 法を応用し、細胞質に *EGDI* 顆粒を形成する U1A-tag なしの *EGDI* mRNA を多コピーで発現させ、それと同時に U1A-tag を付加したさまざまな RNA 分子も細胞内で強制発現させることで非特異的な RNA の局在を観察した。その結果、通常は細胞質に凝集した局在を示さない U1A-tag 配列のみを持つ vector RNA (Vector) で 2.4%、EGD2-a および BTT1-a mRNA で 2.1%と 2.6%、変異型 *EGDI* mRNA (*EGDI*-i) および 5' 上流領域を持たない *EGDI* mRNA (*EGDI*-j) では 12%と 8.4%の細胞で *EGDI* mRNA と類似した細胞質凝集局在が観察された (Figure 8)。興味深いことに、*EGDI* 顆粒のような局在を示す割合には RNA の配列によって差があり、*EGDI* mRNA に近い配列を有する程、局在率が高かった。

5-3 考察

5-3-1 *EGDI* 顆粒と P-body

P-body は mRNA の代謝に関わる細胞質顆粒であり、多数の mRNA のデキャッピングや分解に関わる多くの因子が共局在し、細胞内環境により数やサイズが変化する特性がある (Teixeira *et al.* 2005; Parker & Sheth 2007)。この P-body と *EGDI* 顆粒との関係性を検証するため、P-body の代表的因子に GFP が付加された株を用いて、Tag-RFP 法での *EGDI* 顆粒の局在観察を行なった結果、解析した全ての P-body 因子は *EGDI* 顆粒存在下で細胞質に大きな塊を形成し、*EGDI* mRNA と共局在した (Figure 5)。従って、*EGDI* 顆粒と P-body は関連性のある細胞質構造であることが明らかとなった。しかし、様々な P-body 因子遺伝子欠損株での *EGDI* 顆粒の局在観察の結果、いずれの欠失変異株においても *EGDI* 顆粒の形成が確認できた (Figure 7)。特に、P-body 形成に欠損が見られることが報告されている *EDC3* 遺伝子欠損株においても、*EGDI* 顆粒を観察できたことから、P-body と *EGDI* 顆粒は複数の因子を共有しているものの、独立的な細胞質構造体であると考えられた。

5-3-2 *EGDI* 顆粒とその他の RNA

細胞質に *EGDI* 顆粒を形成する U1A-tag なしの *EGDI* mRNA を多コピーで発現し、それと同時に U1A-tag を付加したさまざまな RNA 分子を細胞内で強制発現させることで非特異的な RNA の局在を観察した結果、*EGDI* mRNA 以外の非特異的な RNA も *EGDI* 顆粒に含まれることが分かった (Figure 8)。さらに *EGDI* mRNA に近い配列を有する RNA 分子程、*EGDI* 顆粒に局在する割合が高いことが示唆された。このことから、*EGDI* 顆粒は *EGDI* mRNA 特異的に形成されるが、その後は *trans* にも機能することで、非特異的な RNA 分子も効率よく取り込む構造であると推察された。

第六章

*EGD1*顆粒の性質

6-1 材料と方法

6-1-1 使用した株

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

BY4741a : *MATa, his3, leu2, met15, ura3*

BY4742 α : *MATa, his3, leu2, lys2, ura3*

細胞内小器官マーカータンパク質にRFPが付加された株

BY4742 α background, Table 2 (Huh *et al.* 2003)

6-1-2 使用した培地

【出芽酵母用】

- SC (-his, -ura)-medium

2% Glucose

0.67% Yeast Nitrogen Base

0.75 g/l -His/-Ura DO Supplement

プレートの場合は2% Agarを加えた。

- SR (-his, -ura)-medium

2% Raffinose

0.67% Yeast Nitrogen Base

0.75 g/l -His/-Ura DO Supplement

- SD+LM

- SR+LM

- SD+LMH

- SR+LMH

2% Raffinose

0.67% Yeast Nitrogen Base

30 mg/l Leucine

2-1-2を参照。

30 mg/l Methionine

30 mg/l Histidine

6-1-3 使用したプラスミド

【Sec63-RFP 発現用プラスミド】

・ pKT1380 : YCp-Sec63-mRFP-URE3

* 筑波大学 入江賢児博士より分与。

6-1-4 使用した試薬

【細胞骨格阻害剤】

・ Benomyl

・ Cytochalasin B (Sigma, C 6762)

6-1-5 方法

【微小管重合阻害剤を用いた蛍光 *in situ* hybridization】

1. 細胞を 5 ml の SR+LMH (pH 6.0~6.5) に植え付け、30°C で 12 h 振盪培養した。
2. 前培養液 2 ml を 20 ml の新しい SR+LMH (pH 6.0~6.5) に加え、30°C で 6 h 振盪培養した。
3. Benomyl (1 mg/ml) または DMSO を 360 μ l (終濃度 15 μ g/ml) 加えた。
4. 2% Galactose 2.4 ml 加え、30°C で 2 h 振盪培養した。
5. 集菌 (3,000 rpm, 2 min) し、固定液 1 ml に懸濁して、室温で 50~60 min 固定した。

* 以下の操作は、3-1-5 【マルチウェルプレート作成および蛍光 *in situ* hybridization】 の 4.以降と同様に行なった。

【微小管重合阻害剤を用いた Tag-RFP 法での RNA と P-body の観察】

1. SD+M-plate から爪楊枝でかきとった出芽酵母を SR+M-medium (pH 6.0~6.5) 200 μ l に懸濁し、30°C で 12~20 h 培養した。
2. 前培養液 50 μ l を 500 μ l の新しい SR+M-medium (pH 6.0~6.5) に加え、30°C で 1 h 振盪培養した。
3. Benomyl (1 mg/ml) または DMSO を 9 μ l (終濃度 15 μ g/ml) 加えた。
4. 2% Galactose 60 μ l を加え、30°C で 2.5~3 h 培養した。
5. Hoechst (2 mg/ml) 6 μ l を加え、遠心 (5,000 rpm, 1 min, 室温) した。
6. 上清を除き、残りの上清 (約 10~20 μ l) で沈澱を懸濁した。
7. 懸濁液 1.6 μ l をスライドガラス上に置き、カバーガラスをかけ、マニユキアを用いてシー

ルした。

3. 蛍光顕微鏡 (Nikon ECLIPSE 80i、Keyence BIOREVO BZ-9000) により、対物レンズ 100 倍で観察した。

【Actin 阻害剤を用いた Tag-GFP 法での観察】

1. SD+LM-plateから爪楊枝でかきとった出芽酵母をSR+LM-medium 200 μ lに懸濁し、30°Cで12～20 h培養した。
2. Cytochalasin B (100 μ M) またはDMSO 60 μ l (終濃度 10 μ M) を添加したSR+LM-medium 500 μ lに、前培養液50 μ lを加えた。
3. 26°Cまたは30°Cで2 h培養した。
4. 2% Galactose 66 μ lを加え、30°Cで1 h培養した。
5. Hoechst (2 mg/ml) 6.6 μ lを加え、遠心 (5,000 rpm, 1min, 室温) した。

*以下の操作は、6-1-5【微小管重合阻害剤を用いた Tag-RFP 法での RNA と P-body の観察】の6.以降と同様に行なった。

【細胞内小器官マーカータンパク質にRFPが付加された株を用いたTag-GFP法での観察】

1. SC (-his, -ura) -plate から爪楊枝でかきとった出芽酵母を SR (-his, -ura) -medium 200 μ l に懸濁し、30°Cで12～20 h 培養した。
2. SR (-his, -ura) -medium 500 μ l に前培養液 50 μ l を加えて、30°Cで2 h 培養した。
3. 2% Galactose 60 μ l を加え、30°Cで1 h 培養した。
4. Hoechst (2 mg/ml) 6 μ l を加え、遠心 (5,000 rpm, 1 min, 室温) した。

*以下の操作は、6-1-5【微小管重合阻害剤を用いた Tag-RFP 法での RNA と P-body の観察】の6.以降と同様に行なった。

6-2 結果

6-2-1 *EGDI* 顆粒と細胞骨格

EGDI 顆粒の形成が、無作為的な凝集に因るものか、または細胞骨格系を利用した能動的な機構であるかを判別するため、微小管及びアクチン重合阻害剤で処理した細胞での *EGDI* 顆粒の観察を行った。その結果、微小管の重合を Benomyl により阻害した細胞では mRNA の細胞質局在が消失した (Figure 9A)。一方、アクチンの重合を CytochalasinB で阻害した場合には *EGDI* mRNA の細胞質局在に顕著な変化は見られなかった (Figure 9B)。よって、*EGDI* 顆粒形成が微小管依存的であることが明らかとなった。

さらに、出芽酵母の P-body は Benomyl により微小管重合を阻害すると、形成が促進されることが報告されている (Sweet *et al.* 2007)。そこで、P-body 因子である *DCP2* に GFP が付加された株を用いて、Benomyl 処理による *EGDI* 顆粒と P-body の様子を調べたところ、細胞質に P-body は確認されたものの、*EGDI* 顆粒は観察されなかった (Figure 9C)。従って、*EGDI* 顆粒と P-body は微小管に対する反応性において異なることが分かった。

6-2-2 *EGDI* 顆粒と既知のタンパク質凝集体との関連

タンパク質の品質管理機構の一つとして、異常タンパク質の凝集体形成がある。既知のタンパク質凝集体として、Aggresome や ERAC、IPOD、JUNQ などが報告されている (Johnston *et al.* 1998; Kopito 2000; Kaganovich *et al.* 2008)。*EGDI* 顆粒も *Egd1p* の集積が観察されることから既知のタンパク質凝集体の一つである可能性が考えられる。そこで、Aggresome は SPB と共局在する特徴があり (Kopito 2000)、IPOD と JUNQ は母細胞で形成された後、娘細胞には分与されない特徴がある (Bagola & Sommer 2008; Kaganovich *et al.* 2008)。そのため、その二点に着目し、解析を行なった。まず、SPB のマーカータンパクである *SPC42* に RFP が付加された株を用いて、*EGDI* mRNA との局在観察を行なった結果、*EGDI* mRNA と SPB は共局在しなかった (Figure 10A)。よって、*EGDI* 顆粒と Aggresome は異なる構造であることが示唆された。また、Tag-GFP 法を用いた *EGDI* mRNA の観察により、母細胞の *EGDI* 顆粒の一部が娘細胞に受け継がれる様子が観察された (Figure 10B)。*Egd1p* についても抗体染色を用いた解析により、myc-tag を付加した *Egd1p* が娘細胞へと分与される様子が観察された (data not shown)。従って、IPOD や JUNQ と異なり、*EGDI* 顆粒では細胞分裂の際にその一部が娘細胞へと分配されることが示唆された。

6-2-3 *EGDI* 顆粒と細胞小器官

EGDI 顆粒と他の細胞小器官の様子は明らかとなっていない。そこで、*EGDI* 顆粒

が形成されている時、他の細胞内小器官がどのような局在を示すのか、各細胞小器官のマーカートンパク質に RFP を付加した株 (Table 3, Huh *et al.* 2003)での Tag-GFP 法を用いた解析によって調べた。その結果、Nuclear periphery、Actin、Peroxisome、ER to golgi、Lipid particle、Nuclear nucleous、SPB 及び Endosome は、*EGDI* mRNA が局在している細胞と vector のみを発現させた細胞でそれぞれの分布に顕著な差は観察されなかった (Figure 11A)。よって、*EGDI* 顆粒と Nuclear periphery、Actin、Peroxisome、ER to golgi、Lipid particle、Nuclear nucleous、SPB 及び Endosome は独立的であることが示唆された。また、Chc1 (Late golgi) 及び Cop1 (Early golgi) において、若干ながら *EGDI* mRNA の局在場所に RFP シグナルが集積しているような細胞が観察された (Figure 11B)。しかし、Chc1 と Cop1 の RFP シグナルはとても弱く、バックグラウンドシグナルである可能性も否定出来ず、今後、さらなる検証が必要である。また、ER のマーカートンパク質として *SEC63* に GFP をつなげたプラスミドを用いて、Tag-RFP 法での局在観察を行なった。その結果、*EGDI* 顆粒と Sec63p は共局在していた (Figure 11C)。従って、Sec63p は、通常の ER 上の他に、*EGDI* 顆粒にも集積する可能性がある。

6-3 考察

6-3-1 *EGDI* 顆粒と細胞骨格

EGDI 顆粒の形成における細胞骨格の影響を解析するため、微小管及びアクチン重合阻害剤で処理した細胞での *EGDI* 顆粒の観察を行った。その結果、微小管の重合を Benomyl により阻害した細胞では mRNA の細胞質局在が消失した。一方、アクチンの重合を CytochalasinB で阻害した場合には *EGDI* mRNA の細胞質局在に顕著な変化は見られなかった (Figure 9A and 9B)。このことから、細胞質における *EGDI* 顆粒形成は、無作為的な自己凝集に因るものではなく、微小管依存的であることが明らかとなった。また、P-body 因子である *DCP2* に GFP が付加された株を用いて、Benomyl 処理による *EGDI* 顆粒と P-body の様子を調べたところ、P-body は形成されていたが、*EGDI* 顆粒は観察されなかった (Figure 9C)。従って、*EGDI* 顆粒と P-body は微小管に対する反応性においても異なることが分かり、形成過程における細胞骨格への依存性の面からも異なることが示唆された。

6-3-2 娘細胞への *EGDI* 顆粒の分与

Aggresome などに代表される異常タンパク質の自己凝集による細胞質凝集体の形成も細胞骨格系を利用していることが知られ (Kopito 2000)、特に Aggresome は SPB と共局在する特徴を持つ。*EGDI* 顆粒も *Egd1p* を基盤として起きる現象であることから、Aggresome の一種である可能性が考えられたが、SPB との局在を観察した結果、*EGDI* 顆粒は SPB とは共局在しなかった (Figure 10A)。従って、*EGDI* 顆粒は Aggresome と異なる構造であることが示唆された。また、*EGDI* 顆粒は娘細胞が出芽する際に、娘細胞にも母細胞の *EGDI* 顆粒の一部が受け継がれる様子が Tag-GFP 法を用いた mRNA (Figure 10B) 及び myc-tag を付加した *Egd1p* についての抗体染色により観察された。この結果は、異常タンパク質を母細胞にとどめて置き、娘細胞へは引き継がせない IPOD や JUNQ の性質とは異なり、*EGDI* 顆粒がただの過剰な *Egd1p* を処理するための機構としてではなく、娘細胞へと引き継がせることで、構成成分の一部を効率良く分与する機構としても機能していることを示唆している。

6-3-3 *EGDI* 顆粒と細胞小器官

EGDI 顆粒と他の細胞小器官との関連性を Tag-GFP 法及び Tag-RFP 法を用いた解析によって調べた結果、ER マーカータンパク質 (*Sec63p*) と共局在していることが分かった。また、Golgi 関連タンパク質とも共局在している可能性が示唆された。*EGDI* 顆粒が NAC mRNA の中でも *EGDI* mRNA のみでしか形成されない理由として、*EGDI* のみがりボソームに結合出来るという事実と関連しているかもしれない。即ち、*EGDI* 顆粒は余剰な *Egd1p* の

生成を抑制するための機構であり、翻訳装置であるリボソームと結合した状態での Egd1p も *EGDI* 顆粒へと取り込むことで、全体的な翻訳速度を調節している可能性もある。実際に、予備実験的なデータではあるが、密度勾配遠心を用いた ribosome profiling により、過剰に *EGDI* が発現している細胞では polysome 分画の減少がみられた。今後、詳細にその点を解析することで、翻訳調節における *EGDI* の役割が明らかになればより面白いだろう。

第七章

*EGD1*顆粒の生物学的意義

7-1 材料と方法

7-1-1 使用した株

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

BY4741a : *MATa*, *his3*, *leu2*, *met15*, *ura3*

7-1-2 使用した培地

【出芽酵母用】

- SC (-ura)-plate
 - 2% Glucose
 - 0.67% Yeast Nitrogen Base
 - 0.77 g/l -Ura DO Supplement
 - 2% Agar
- SC (-his, -ura)
 - 6-1-2を参照。
- SD+M
 - 5-1-2を参照。

7-1-3 使用したプラスミド

【*GAL1*プロモーター付き*Leu2*マーカー、多コピー型プラスミド】

- YEplac181-GAL1p vector
 - pGAL-U1A-GFPプラスミドから*SacI-XbaI*サイトで切り出し *GAL1*プロモーターを、YEplac181 vectorの*SacI-XbaI*サイトに挿入したプラスミドDNAである。

【*EGD2*遺伝子コンストラクト】

- EDG2-f (YEplac181-GAL1p-*EGD2* 2-7)

pGAL-U1A-EGD2 2-7のプラスミドから*Bam*HI-*Xho*Iサイトで切り出し、klenow処理した約1kbの断片を、YEplac181-GAL1p vectorのklenow処理した*Xba*Iサイトに挿入したプラスミドDNAである。

- EDG2-f (YEplac181-GAL1p-EGD2 2-9)

pGAL-U1A-EGD2 2-9 のプラスミドから *Bam*HI-*Xho*I サイトで切り出し klenow 処理した約 1.2kb の断片を、YEplac181-GAL1p vector の klenow 処理した *Xba*I サイトに挿入したプラスミド DNA である。

【*TDH3*遺伝子コンストラクト】

- TDH3-a (YEplac181-GAL1p-*TDH3*)

pGAL-U1A-*TDH3*のプラスミドから*Bam*HI-*Xho*Iサイトで切り出しklenow処理した約1.6kbの断片を、YEplac181-GAL1p vectorのklenow処理した*Xba*Iサイトに挿入したプラスミドDNAである。

- TDH3-b (YEplac181-GAL1p-*TDH3*)

W303のゲノムDNAを鋳型に、*TDH3*の-503〜+892塩基の領域をPCRにより増幅させた断片を、YEplac181-GAL1p vectorの*Xba*Iサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

TDH3-8 : 5'- TTTGGATCCAGCTGAAAAAAAAGGTTG -3'

TDH3-9 : 5'- GGCGGTGGAAGATGGAGC -3'

【*EGD1*遺伝子コンストラクト】

- 生育比較用 EGD1-b (pKT10-EGD1 10-11)

EGD1-b (pGAL-U1A-*EGD1* 5'UTR) のプラスミドを *Bam*HI サイトで切り出し、klenow 処理後、*Xho*I で切断して回収した約 0.78 kb の断片を、pKT10 vector の *Eco*RI で切り出し、klenow 処理後、*Xba*I で処理した部位に挿入したプラスミド DNA である。

- 生育比較用 EGD1-e (pKT10-EGD1 11-12)

EGD1-e (pGAL-U1A-*EGD1* 11-12) のプラスミドを *Bam*HI サイトで切り出し、klenow 処理後、*Xho*I で切断して回収した約 0.53 kb の断片を、pKT10 vector の *Eco*RI で切り出し、klenow 処理後、*Xba*I で処理した部位に挿入したプラスミド DNA であ

る。

- myc-tag 付き EGD1-b (pYES2-myc-EGD1-b / pYES2-MYC-EGD1)

EGD1-b (pGAL-U1A-EGD1 10-11) を鋳型にEGD1の5'上流領域-314~-1塩基の領域をPCRで増幅して作成した断片と、pRS314-GAL1p-MYC-EGD1のプラスミドからEcoRIとXhoIで切り出した約0.8 kbの断片を、pYES2 vectorのBamHI-XhoIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD1-10 : 5'- TTCGGATCCAAGGAAGAGCGGT-3'

EGD1-26 : 5'- AATGAATTCTATGAATTATGAGTCGCG-3'

- myc-tag 付き EGD1-e (pYES2-myc-EGD1-e)

pYES2-MYC-EGD1を鋳型に、EGD1の5'上流領域-63~-1塩基とmyc-tagの領域をPCRで増幅し、BamHI処理した約0.21 kbの断片を、pYES2-MYC-EGD1のプラスミドのBamHIサイトに挿入したプラスミドDNAである。PCRによる増幅には以下のプライマーを用いた。

EGD1-12 : 5'- AGAGGATCCATATTCTTTCTAGGGAGG-3'

EGD1-11 : 5'- TTA CT CGAGTTATTCGACGTCAGCATC-3'

7-1-4 使用した試薬

【出芽酵母からの RNA 回収】、【RT-PCR】、【DNase 処理】

3-1-4 を参照。

【Western blotting 用サンプル調製】

0.6M NaOH 以外は 4-1-4 を参照。

【電気泳動および Western blotting 法】

4-1-4 を参照。

7-1-5 方法

【出芽酵母からの RNA 回収】、【RT-PCR】、【DNase 処理】

3-1-5 と同様に行なった。

【Western blotting 用サンプル調製】

4-1-5 と同様に行なった。また、EGD1-b および EGD1-e については NaOH 法 (Matsuo *et al.* 2006) によるサンプル調製を行なった。

【電気泳動および Western blotting 法】

4-1-5 と同様に行なった。

7-2 結果

7-2-1 *EGD1* 顆粒に対する *EGD2* の影響

通常、Egd1p は Egd2p と共に NAC を構成し、細胞内で機能している。NAC はリボソーム付近に存在し、新生ポリペプチド鎖に結合することでシャペロンのような役割を果たすと考えられる構造体である(Wiedmann *et al.* 1994; Rospert *et al.* 2002)。ショウジョウバエやマウスでは β NAC を欠くと胚性致死になり、出芽酵母では高温感受性を示すことが知られている(Rospert *et al.* 2002)。また、出芽酵母の野生型株で α NAC のみを過剰に発現させると生育が遅延するとの報告がある(Reimann *et al.* 1999)。よって、細胞内での α NAC と β NAC の量比の維持は、細胞の機能にとって重要であると考えられている(Rospert *et al.* 2002)。このことから *EGD1* mRNA の局在意義の一つとして、Egd1p と Egd2p の量比調節ということを予想した。そこで *EGD1* mRNA と共に *EGD2* mRNA も過剰に発現させると、細胞質の *EGD1* mRNA の局在率に変化が見られるかどうかを Tag- GFP 法を用いて調べた。その結果、*EGD1* mRNA と共に ORF のみでなく、上流配列(200 塩基)を付加した *EGD2* mRNA を過剰発現させると、vector のみや *TDH1* mRNA を過剰発現させた場合と比較して *EGD1* mRNA の局在率が減少した (Figure 12A)。さらに、この場合における、それぞれの細胞内の *EGD1*、*EGD2* mRNA 量を RT-PCR を用いて調べた。その結果、*EGD1*、*EGD2* 共に RNA 量に顕著な差は見られなかった (Figure 12B)。一方、Egd2p 量は *EGD2* の上流配列を付加した *EGD2* mRNA を発現させた細胞では、コントロール及び *EGD2* ORF のみを含む細胞と比べ、Egd2p 量が多いことが分かった (Figure 12C)。従って、*EGD1* mRNA の細胞質局在は *EGD2* によって、制御されることが示唆された。さらに、Egd1p-DsRed を用いた Egd1p の凝集に対する解析においても、*EGD2* の共発現により、vector などのコントロールと比較して凝集率の低下が確認された (Figure 12D)。

7-2-2 *EGD1* 顆粒の形成不全による細胞への影響

EGD1 顆粒が形成できない場合の細胞への影響を解析するため、恒常的に強く発現している *TDH3* プロモーター下流に二種類の *EGD1* 遺伝子断片を付加したプラスミドを野生型の酵母内で発現させ、生育に対する影響を調べた。その結果、*EGD1* mRNA を細胞質に局在できない株 (*EGD1-e*) では、vector や局在できる株 (*EGD1-b*) と比較して 26、30、33、37°C で生育の阻害が見られた (Figure 13A)。生育の阻害効果は高温になるにつれ、増悪した。また、この時の各々の株における細胞形態を観察した結果、生育に阻害が見られた *EGD1-e* においては細胞が縦長化、肥大化した形態変化が観察された (Figure 13B)。また、*EGD1* 顆粒の形成自体は *cis* 配列を必要とするものの、形成後は *trans* にも機能し得る (Figure 8)。そ

のため、生育阻害の見られる EGD1-e に *EGDI* 顆粒を形成する EGD1-b を導入することで、生育の阻害及び形態異常が相補されるか検証した。その結果、生育の阻害はいずれの温度 (30, 33°C) においても改善されなかったものの (data not shown)、形態の異常は vector のみを導入した株と比較し、改善が見られた (Figure 13C)。さらに、EGD1-b および EGD1-e の N 末側に myc-tag を付加し *GALI* プロモーター下で発現するプラスミドを用い、それぞれの翻訳効率を調べた結果、株に因る差は見られるものの、EGD1-b の方が効率良く Egd1p を産生していることが明らかとなった (Figure 13D)。

7-3 考察

7-3-1 *EGD1* 顆粒に対する *EGD2* の影響

EGD1 mRNA と共に *EGD2* mRNA を過剰発現させた場合における、*EGD1* 顆粒の形成率を調べた結果、*EGD1* mRNA と共に ORF のみでなく、上流配列 (200 塩基) を付加した *EGD2* mRNA (*EGD2-g*) を過剰発現させた場合にのみ、*EGD1* mRNA の局在率の減少が確認された (Figure 12A)。この時、それぞれの細胞内における *EGD1*、*EGD2* mRNA 量に変化は見られず、Egd2p 量のみが *EGD2* の上流配列を付加した細胞で多いことが分かった (Figure 12B, 12C)。従って、*EGD1* 顆粒形成及び維持には *EGD2* による制御が予想される。通常、Egd1p は Egd2p と共に NAC として機能しており、細胞内での α NAC と β NAC の量比の維持は細胞の機能にとって重要であると考えられている (Rospert *et al.* 2002)。このことから、*EGD1* 顆粒形成は細胞内での Egd1p と Egd2p の量比調節機構としての役割を持つことが示唆される。

7-3-2 *EGD1* 顆粒の形成不全による細胞への影響

恒常的に強く発現している *TDH3* プロモーター下流に二種類の *EGD1* 遺伝子断片を付加したプラスミドを野生型の酵母内で発現させ、生育に対する影響を調べた結果、*EGD1* mRNA を細胞質に局在できない株 (*EGD1-e*) では、vector や局在できる株 (*EGD1-b*) と比較して 26、30、33、37°C で生育の阻害が見られ、その阻害効果は高温になるにつれて増悪した (Figure 13A)。また、生育阻害が見られた *EGD1-e* においては、30、33、37°C で細胞形態の縦長化、肥大化した変化が観察された (Figure 13B)。この結果は Egd1p が細胞内に多量に存在した場合に、*EGD1* 顆粒の形成不全は細胞にとって悪影響をもたらす事実を示唆している。また、*EGD1* 顆粒は *trans* にも機能し得るため (Figure 8)、生育阻害の見られる *EGD1-e* に *EGD1* 顆粒を形成する *EGD1-b* を導入することで、生育の阻害及び形態異常に改善が見られるか調べた。その結果、生育の阻害は相補されなかった (data not shown) 一方で、形態異常についてはコントロールと比較して改善効果が見られた (Figure 13C)。これは元々、*EGD1* 顆粒形成率は低く、*trans* に機能する割合はさらに低いことから (Figure 8)、部分的な相補しか出来なかったためだと思われる。さらに、*EGD1-b* および *EGD1-e* の C 末側に myc-tag を付加し、それぞれの翻訳効率を調べた結果、*EGD1-b* の方が効率良く Egd1p を産生していることが明らかとなった (Figure 13D)。よって、Egd1p 量が *EGD1* 顆粒形成には重要であることを強く示唆している。さらには、*EGD1-e* でも最終的には *EGD1-b* と同程度の Egd1p を産生できるはずであるため、翻訳速度自体も *EGD1* 顆粒形成には重要であるのかもしれない。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、大変多くの方々にお世話になりました。Tag-GFP 法のためにプラスミドを提供して頂いた K. Bloom 博士、D.L. Beach 博士、ならびに R.D. Vale 博士、また P-body の解析を行なうにあたり P-body 因子株とプラスミドを分与して下さった R. Parker 博士、T. Lithgow 博士には抗 Egd2p 抗体、E. O'Shea 博士には細胞小器官マーカートンパク質に RFP が付加された株、入江賢児博士には Sec63p に RFP が付加されたプラスミドを頂くことができました。この場をかりて深く感謝致します。

最後になりましたが、多くのご助言、ご指導を下さった谷時雄先生、安東（竹内）知子先生をはじめとする研究指導委員の先生方々にもお世話になりました。ありがとうございました。

参考文献

- Anderson, P. & Kedersha, N. (2009) RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 430-436.
- Andoh, T., Oshiro, Y., Hayashi, S., Takeo, H. & Tani, T. (2006) Visual screening for localized RNAs in yeast revealed novel RNAs at the bud-tip. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 999-1004
- Bagola, K. & Sommer, T. (2008) Protein quality control: on IPODs and other JUNQ. *Curr Biol* **18**, R1019-1021.
- Beach, D.L., Salmon, E.D. & Bloom, K. (1999) Localization and anchoring of mRNA in budding yeast. *Curr Biol* **9**, 569-578.
- Beatrix, B., Sakai, H. & Wiedmann, M. (2000) The α and β subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *J Biol Chem* **275**, 37838-37845.
- Braat, A.K., Yan, N., Arn, E., Harrison, D. & Macdonald, P.M. (2004) Localization-dependent oskar protein accumulation; control after the initiation of translation. *Dev Cell* **7**, 125-131.
- Bregues, M., Teixeira, D. & Parker, R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**, 486-489.
- Buchan, J.R. & Parker, R. (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* **36**, 932-941.
- Deng, J.M. & Behringer, R.R. (1995) An insertional mutation in the *BTF3* transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res* **4**, 264-269.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. & Izaurralde, E. (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 9-22.
- Franke, J., Reimann, B., Hartmann, E., Köhlerl, M. & Wiedmann, B. (2001) Evidence for a nuclear

passage of nascent polypeptide-associated complex subunits in yeast. *J Cell Sci* **114**, 2641-2648.

Freire, M.A. (2005) Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the β subunit of the nascent polypeptide-associated complex. *Gene* **345**, 271-277.

George, R., Beddoe, T., Landl, K. & Lithgow, T. (1998) The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2296-2301.

Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K. & Weissman, J.S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737-741.

Hoshino, S. (2003) [Regulation of mRNA decay in eukaryote]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **48**, 1229-1240.

Hu, G.Z. & Ronne, H. (1994) Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes *in vivo*. *Nucleic Acids Res* **22**, 2740-2743.

Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. & O'Shea, E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-691.

Huyer, G., Longworth, G.L., Mason, D.L., Mallampalli, M.P., McCaffery, J.M., Wright, R.L. & Michaelis, S. (2004) A striking quality control subcompartment in *Saccharomyces cerevisiae*: the endoplasmic reticulum-associated compartment. *Mol Biol Cell* **15**, 908-921.

Inoue, K. (2003) [RNA localization in development]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **48**, 451-458.

Johnston, J.A., Ward, C.L. & Kopito, R.R. (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-1898.

Kaganovich, D., Kopito, R. & Frydman, J. (2008) Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* **454**, 1088-1095.

Kopito, R.R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* **10**,

524-530.

Kubota, H. (2009) Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival. *J Biochem* **146**, 609-616.

Lauring, B., Sakai, H., Kreibich, G. & Wiedmann, M. (1995) Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5411-5415.

Louis, E.J. & Haber, J.E. (1992) The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **131**, 559-574.

Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M. & Jacq, C. (2002) Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep* **3**, 159-164.

Markesich, D.C., Gajewski, K.M., Nazimiec, M.E. & Beckingham, K. (2000) bicaudal encodes the *Drosophila* beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery*. *Development* **127**, 559-572.

Matsuo, Y., Asakawa, K., Toda, T. & Katayama, S. (2006) A rapid method for protein extraction from fission yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 1992-1994.

Maxwell, P.H., Coombes, C., Kenny, A.E., Lawler, J.F., Boeke, J.D. & Curcio, M.J. (2004) Ty1 mobilizes subtelomeric Y' elements in telomerase-negative *Saccharomyces cerevisiae* survivors. *Mol Cell Biol* **24**, 9887-9898.

Moller, I., Beatrix, B., Kreibich, G., Sakai, H., Lauring, B. & Wiedmann, M. (1998) Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex. *FEBS Lett* **441**, 1-5.

Nakamura, A. (2005) [Translational control in cytoplasmic mRNP granules]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **50**, 1970-1978.

Panasenko, O., Landrieux, E., Feuermann, M., Finka, A., Paquet, N. & Collart, M.A. (2006) The yeast Ccr4-Not complex controls ubiquitination of the nascent-associated polypeptide (NAC-EGD) complex. *J Biol Chem* **281**, 31389-31398.

Parker, R. & Sheth, U. (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* **25**, 635-646.

Reimann, B., Bradsher, J., Franke, J., Hartmann, E., Wiedmann, M., Prehn, S. & Wiedmann, B. (1999) Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast* **15**, 397-407.

Reynolds, N.M., Lazazzera, B.A. & Ibba, M. (2010) Cellular mechanisms that control mistranslation. *Nat Rev Microbiol* **8**, 849-856.

Rospert, S., Dubaquié, Y. & Gautschi, M. (2002) Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1632-1639.

Sheth, U. & Parker, R. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805-808.

St Johnston, D. (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 363-375.

Sweet, T.J., Boyer, B., Hu, W., Baker, K.E. & Collier, J. (2007) Microtubule disruption stimulates P-body formation. *RNA* **13**, 493-502.

Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M. & Parker, R. (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* **11**, 371-382.

Tyedmers, J., Mogk, A. & Bukau, B. (2008) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 777-788.

Wegrzyn, R.D. & Deuerling, E. (2005) Molecular guardians for newborn proteins:

ribosome-associated chaperones and their role in protein folding. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2727-2738.

Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T.A. & Wiedmann, M. (1994) A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* **370**, 434-440.

Yamada, M., Hayatsu, N., Matsuura, A. & Ishikawa, F. (1998) Y'-Help1, a DNA helicase encoded by the yeast subtelomeric Y' element, is induced in survivors defective for telomerase. *J Biol Chem* **273**, 33360-33366.

Figure legends

Figure 1. Tag-GFP 法を用いた局在化 RNA の同定

A) 局在化 RNA のスクリーニング方法 (Tag-GFP 法) : 出芽酵母 BY4741a のランダムなゲノム断片を、U1A-tag 付き RNA 発現用プラスミド pGAL-U1A-Bam vector に挿入し、BY4741a の細胞内で強制的に発現させた。それと同時に、この U1A-tag 配列を認識し結合する、U1A タンパク質と GFP の融合タンパク質発現用プラスミド pU1A-GFP も強制的に共発現させた。これらは、RNA 分子上の Tag 配列を介して結合するので、RNA の局在場所で GFP 蛍光が観察される。**B)** スクリーニングによって同定した代表的な核、核&Bud-tip、核&細胞質局在クローン及び **C)** 細胞質局在クローン (302S : *EGD1* mRNA) の局在 : BY4741a (WT) 株に pU1A-GFP 及び 320S、1510S、29S、2238S または 302S を導入し、形質転換した。RNA 局在は Tag-GFP 法により、GFP 蛍光を用いて検出、DNA は Hoechst 33342 で染色した。Merge した図では緑が *EGD1* mRNA、赤が DNA を示している。BF は明視野、Scale bar は 10 μm を示す。

Figure 2. *EGD1* mRNA は細胞質に凝集して局在する

A) 蛍光 *in situ* hybridization による *EGD1* mRNA の局在 : BY4741a (WT, a-d) または $\Delta egd1$ (e-f) 株に多コピー型プラスミド YEplac195-*EGD1* または YEplac195vector を導入し、形質転換した。*EGD1* mRNA は特異的プローブを用いて検出し、DNA は DAPI で染色した。Scale bar は 10 μm を示す。**B)** *EGD2* mRNA の局在 : pU1A-GFP で質転換した BY4741a (WT) 株に *EGD2*-a、*EGD2*-b、*EGD2*-c、*EGD2*-d または *EGD2*-e プラスミドを導入した。**C)** *BTT1* mRNA の局在 : pU1A-GFP で質転換した BY4741a (WT) 株に *BTT1*-a または *BTT1*-b プラスミドを導入した。局在率は 300 個以上の細胞を観察し、細胞質に凝集した RNA の局在を示した細胞の割合を計算した。

Figure 3. *EGD1* mRNA は 5' 上流領域および ORF に局在配列が存在する

A) *EGD1* mRNA 局在化 *cis* 配列の解析 : pU1A-GFP で質転換した BY4741a (WT) 株に *EGD1*-a、*EGD1*-b、*EGD1*-c、*EGD1*-d、*EGD1*-e、*EGD1*-f、*EGD1*-g、*EGD1*-h、*EGD1*-i または *EGD1*-j プラスミドを導入した。Tag-GFP 法を用いて RNA の局在観察を行い、局在率は 300 個以上の細胞を観察し、凝集した RNA の細胞質局在が見られた細胞の割合で計算した。RT-PCR は U1A-tag に結合するプライマーを用いて行った。逆転写反応において Reverse transcriptase を添加したものは (+)、添加していないものは (-) で示した。* は PCR 反応に対する RNA template 量を他のコンストラクトより 8 倍量使用した。**B)** 局在率の減少が見られた株での *EGD1*

mRNA の局在 : DNA は Hoechst 33342 で染色し、Tag-GFP 法で RNA の局在を観察した。Merge した図では緑が *EGDI* mRNA、赤が DNA を示している。Scale bar は 10 μ m を示している。

Figure 4. *EGDI* mRNA は Egd1p と共局在し、*EGDI* 顆粒を形成する

A) *EGDI* mRNA と myc-tag 付き Egd1p の局在 : BY4741a (WT) 株に pYES2-MYC-EGDI または pYES2vector を導入した株を用いて、抗体染色および蛍光 *in situ* hybridization を行なった。DNA は DAPI で染色し、矢印は *EGDI* mRNA および Egd1p の位置を示している。また、Scale bar は 10 μ m を示す。**B)** *EGDI* mRNA と Egd1p-DsRed の局在 : pU1A-GFP で質転換した BY4741a (WT) 株に pGAL-U1A-EGDI-DsRed を導入し、形質転換した。Tag-GFP 法を用いて RNA を観察し、DNA は Hoechst 33342 で染色した。Merge した図では緑が *EGDI* mRNA、赤が Egd1p、青が DNA を示している。Scale bar は 10 μ m を示す。

Figure 5. *EGDI* mRNA 細胞質局在に対する Egd1p の関与

Egd1p 自身が *EGDI* mRNA の 5' 上流領域に結合することにより、翻訳を抑制するかを、抗 myc 抗体を用いた Western blot によって調べた。A) BY4741a 株で YCplac33-MYC-*EGDI* と共に、YEplac181-GAL1p-*EGDI* または YEplac181-GAL1pvector を発現した場合の Egd1p 量を解析した。抗 myc 抗体を用いた western blot 解析には、YEplac181-GAL1p-*EGDI* または YEplac181-GAL1pvector を導入した株の異なる形質転換体 (#1-#3) を用いて行なった。B) には A) で用いたサンプルを泳動した 15% SDS polyacrylamide gel の CBB 染色を示す。C) Egd1p による *EGDI* mRNA の翻訳抑制のモデル図。

Figure 6. *EGDI* 顆粒は P-body 因子と共局在する

DCP2-GFP (yRP2080)、PAT1-GFP (yRP2082)、EDC3-GFP (yRP2211) または DHH1-GFP (yRP2081) 株に pU1A-RFP と EGD1-b を導入した。各々の P-body 因子の GFP シグナルを P-body として示した。*EGDI* mRNA は Tag-RFP 法を用いて検出し、DNA は Hoechst 33342 で染色した。矢頭は *EGDI* 顆粒と共局在している P-body 因子の位置を示し、Scale bars: は 10 μ m を示している。

Figure 7. P-body 因子欠失株での *EGDI* 顆粒の局在

P-body 因子欠失株 ($\Delta dhh1$, $\Delta pat1$, $\Delta lsm1$, $\Delta xrn1$, $\Delta ccr4$, $\Delta edc3$, $\Delta not3$, $\Delta pby1$: Open Biosystems Co.) に pU1A-GFP および EGD1-b を導入した。Tag-GFP 法で *EGDI* mRNA を観察し、DNA は Hoechst 33342 で染色した。 .

Figure 8. *EGD1* 顆粒の RNA 分子

EGD1 顆粒内に含まれる RNA 因子の割合について Tag-GFP 法を用い解析した。多コピー型プラスミドである YEplac181-*EGD1* を持つ BY4741 (WT) 株に、pU1A-GFP と pGAL-U1A-Bam (Vector)、*EGD1-i*、*EGD1-j*、*EGD2-a* または *BTT1-a* を導入した株を使用した。局在率は 300 個以上の細胞を観察し、細胞質に凝集した RNA の局在を示した細胞の割合を計算した。

Figure 9. *EGD1* 顆粒は微小管依存的に形成される

A) BY4741 (WT) 株に YEplac195-*EGD1* (*EGD1*) または YEplac195-vector (Vector) を導入した。細胞は benomyl (15 μ g/ml) を用いて 30°C で 2 h 処理した。*EGD1* mRNA の局在は蛍光 *in situ* hybridization を用いて検出した。DNA は DAPI で染色した。**B)** pU1A-GFP と *EGD1-a* を導入した BY4741 (WT) 株を DMSO または 10 μ M cytochalasin B で処理を行なった。*EGD1* mRNA は Tag-GFP 法を用いて観察した。DNA は Hoechst 33342 で染色した。BF は明視野、Scale bar は 10 μ m を示している。**C)** DCP2-GFP (yRP2080) 株に YCp111-GALp-U1A-DsRed と *EGD1-b* を導入した。細胞は benomyl (15 μ g/ml) または DMSO を用い、30°C で 2.5–3 h 処理した。*EGD1* mRNA は Tag-RFP 法を用いて観察し、DNA は Hoechst 33342 で染色した。

Figure 10. *EGD1* 顆粒は SPB と共局在せず、娘細胞へも分与される。

A) *EGD1* 顆粒は SPB と共局在しない: Spc42-RFP (Huh et al. 2003) 株に pU1A-GFP と *EGD1-a* を導入した。Tag-GFP 法を用いて *EGD1* mRNA を観察し、DNA は Hoechst 33342 で染色した。Merge した図では緑が *EGD1* mRNA、赤が Spc42p、青が DNA を示している。**B)** *EGD1* 顆粒は娘細胞へと分配される: pU1A-GFP と 302S を導入した BY4741 (WT) 株を 2% glucose を添加する前に、galactose で 1 h 培養した。*EGD1* mRNA は Tag-GFP 法を用い、2% glucose で 1h 培養した後に観察した。DNA は Hoechst 33342 で染色した。Merge した図では緑が *EGD1* mRNA、赤が DNA を示している。Scale bar は 10 μ m である。

Figure 11. *EGD1* 顆粒と細胞小器官

A) では、さまざまな細胞小器官マーカータンパク質株 (*Erg6-RFP*、*Pex3-RFP*、*Sac6-RFP*、*Sec13-RFP*、*Erg6-RFP*) に、**B)** では Golgi マーカータンパク質株 (*Chc1-RFP*、*Cop1-RFP*) に pU1A-GFP と *EGD1-a* を導入し、Tag-GFP 法を用いた *EGD1* mRNA の観察を行なった。DNA は Hoechst 33342 で染色した。**C)** BY4741 (WT) 株に pU1A-RFP と *Sec63p-GFP* を導入し、Tag-GFP 法を用いた *EGD1* mRNA の観察を行なった。DNA は Hoechst 33342 で染色した。

Figure 12. *EGD1* 顆粒に対する *EGD2* の影響

A) *EGD1*mRNA 局在に対する *EGD2* mRNA の影響： pU1A-GFP と *EGD1*-a を含む BY4741 (WT) 株に、*EGD2*-f、*EGD2*-g、*TDH3*-a、*TDH3*-b または *YEplac181*-pGAL-vector (Vector) を導入した。局在率は 300 個以上の細胞を Tag-GFP 法を用いて観察し、そのうち *EGD1* mRNA の凝集した細胞質局在が見られた細胞の割合を計算した。観察は独立して 3 回以上行い、平均値を示した。**B)** 特異的プライマーを用いた RT-PCR により、A) で用いた各細胞内における *EGD1* または *EGD2* mRNA の発現量を調べた。逆転写反応において Reverse transcriptase を添加したものは (+)、添加していないものは (-) で示した。**C)** A) で用いた各細胞内における *Egd2p* の発現量を、抗 *Egd2p* 抗体を用いた Western blot で調べた。**D)** Tag-GFP 法を利用して解析した *Egd1p* の局在率：pU1A-GFP と pGAL-U1A-*EGD1*-DsRed を含む BY4741 (WT) 株に *YEplac181*-pGAL (Vector)、*EGD2*-g、*EGD2*-f または *TDH3*-b を導入した。*Egd1p* の局在率は 300 個以上の細胞を観察して算出した。観察は独立して 3 回以上行い、平均値を示した。

Figure 13. *EGD1* 顆粒の消失は生育阻害と細胞形態異常を起こす

A) BY4741 (WT) に pKT10-*EGD1*-b、pKT10-*EGD1*-e または pKT10-vector を導入した株で 30 °C と 33 °C での生育を比較した。**B)** では A) で用いた株の 33 °C における細胞形態を示す。**C)** pKT10-*EGD1*-e を持つ BY4741 (WT) 株に *YEplac181*-*TDH3p*-*EGD1*-b または *YEplac181*-*TDH3p*-vector を導入した。細胞は 33 °C で培養し、900 個以上の細胞の大きさを計測し、平均を示した。長さの単位は μm である。**D)** *EGD1*-b または *EGD1*-e による myc-tag 付き *Egd1p* の翻訳効率：BY4741 (WT) 株に pYES2-myc-*EGD1*-b または pYES2-myc-*EGD1*-e を導入した。抗 myc 抗体を用いた western blot 解析には、*EGD1*-b または *EGD1*-e それぞれ 3 株の異なる形質転換体 (#1-#3) を用いて行なった。**E)** には D) で用いたサンプルを泳動した 15% SDS polyacrylamide gel の CBB 染色を示す。

Figure 14. *EGD1* 顆粒のモデル図

Egd1p と *EGD1* mRNA が細胞内に過剰に存在すると、*Egd1p* と *EGD1* mRNA は微小管を用いて細胞質内に *EGD1* 顆粒を形成する。*EGD1* 顆粒には P-body の因子が含まれる。一方、*EGD1* 顆粒の脱凝集には細胞内における *EGD2* の関与が予想される。