

# 高濃度塩ストレス下における酵母の mRNA 核外輸送機構の解析

井沢 真吾

(京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻)

本研究では、ストレスに応答して変化する mRNA 核外輸送の制御機構の解明に取り組んだ。ヒートショックなどのストレスにさらされると mRNA の多くは核から細胞質への輸送が抑制され、ヒートショックプロテインなどのストレスタンパク質の mRNA 群が優先的に核外輸送され翻訳へと進む。つまり、ストレス耐性の獲得に必要なタンパク質を優先的に合成する一方で、不必要な mRNA は核内にとどめておくことで、より効率的にストレスへの適応を細胞は謀っている訳である。このことは、mRNA の核外輸送段階にも重要なストレス応答機構が存在することを強く示唆している。これまで、転写段階や翻訳段階でのストレス応答機構については数多くの研究が行われてきたが、転写と翻訳を結ぶ途中の段階におけるストレス応答機構についてはごく限られた情報しかない。また、mRNA の核外輸送機構については基本的なメカニズムについても不明な点が多いため、本研究を通じて新たな知見を得ることを目指した。本研究では、高濃度塩ストレスをはじめとする各種ストレス条件下における mRNA 核外輸送の制御機構について、いくつかの興味深い新しい知見を得ることが出来た。

## 1. 高濃度塩ストレス条件下の mRNA 核外輸送

Oligo dT プローブを用いた *in situ* hybridization により bulk poly(A)<sup>+</sup> mRNA の細胞内局在を観察した。高濃度塩ストレス条件下 (0.4M NaCl) に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をさらした場合、直ちに bulk poly(A)<sup>+</sup> mRNA の核外輸送が抑制され核内に蓄積することが確認された。その一方で、塩ストレス誘導性の遺伝子 *ENA1* の mRNA は発現が誘導され核外に輸送されることを、*ENA1* に特異的なプローブを使って確認した。しかしながら、ヒートショックストレスやエタノールストレス条件下では mRNA の核内蓄積が1時間以上に渡って継続するのに対し、高濃度塩ストレス条件下では、5分後には核外輸送が再開されて mRNA の核内蓄積も解消されていた。また、比較的マイルドなストレス条件 (0.1M NaCl, 1時間) で酵母細胞を前処理した後に、0.4M NaCl の高濃度塩ストレスにさらした場合には、mRNA の核内への蓄積は全く観察されなかった。これらの結果から、mRNA 輸送段階自体は高濃度塩ストレスに対し短時間でストレス応答反応を完了すると考えられた。また、*Zygosaccharomyces rouxii* についても同様の検討を行ったが、1.0M NaCl のストレス条件下でも通常通り mRNA が核外へと輸送され、mRNA 核外輸送についても高濃度塩ストレスに対する高い適応能が確認された。現在、転写・翻訳レベルの変化量の情報を基に、高濃度塩ストレス条件下で優先的に核外輸送される

mRNA の同定・分類を行っている。また、*Z. rouxii* の mRNA 輸送因子遺伝子のクローニングを行っている。

## 2. ストレス応答時の mRNA 核外輸送因子の局在変化

ストレス条件下での bulk poly(A)<sup>+</sup> mRNA の核外輸送抑制がどのようなメカニズムで引き起こされるか、ほとんど分かっていない。そこで、ストレスによって引き起こされる輸送因子や輸送経路の変化の可能性を検討した。出芽酵母の mRNA 輸送因子について GFP 融合タンパク質を利用してストレス条件下での細胞内局在を観察した結果、一部の mRNA 輸送因子の細胞内局在がストレスによって変化することを見出した。mRNA 核外輸送因子のひとつ Rat8p は生育に必須な ATP 依存的な RNA helicase であり、mRNA と輸送因子の複合体のリモデリングに関与すると考えられている。Rat8p は主に核膜孔複合体の細胞質側に局在しており、GFP 融合タンパク質による蛍光顕微鏡観察では核膜周囲にリング状に観察される。しかしながら、エタノールストレス条件下では濃度依存的に速やかに核内へ拡散し、活性が低下することを見出した。そのため、Rat8p の局在変化に連動して bulk の poly(A)<sup>+</sup> mRNA の核外輸送が抑制され核内へと蓄積した。さらに、Rat8p の細胞内局在変化は可逆的なものであり、エタノールを含まない培地に移すことにより速やかに正常な局在を回復し、mRNA の核外輸送も再開された。このことから、Rat8p はエタノールストレスに応答して局在を変化させることにより、bulk poly(A)<sup>+</sup> mRNA の核外輸送を制御する、センサーとレギュレーターとしての機能も担うと考えられた。ストレスに応答して核外輸送因子の局在や機能が変化するという報告例はこれまでに無く、mRNA 核外輸送におけるストレス応答機構に関する新たな知見を得ることが出来た。あわせて、ストレス誘導性の mRNA の核外輸送は Rat8p に依存しないことも新たに見出した。また、Rat8p の局在変化は高濃度塩ストレスやヒートショックストレス条件下では観察されず、エタノールストレスに特異的なものであることから、ストレスの種類に応じて mRNA 核外輸送の輸送経路や制御方法が異なることを強く示唆する結果を得た。

## Reference

Shingo Izawa, Reiko Takemura, and Yoshiharu Inoue. Stress Response in Yeast mRNA Export Factors: Reversible Change in the Localization of Rat8p Is Caused by Ethanol Stress but Not by Heat Shock. (submitted)