

氏 名	むとう さやか 武 藤 清 佳
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 5 2 2 号
学位授与の日付	平成 21 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	チョウ目昆虫における TIA-1 相同性 RNA 結合タンパク質の機能解析
審 査 委 員	(主査)教授 森 肇 教授 遠藤泰久 教授 山口政光 准教授 小谷英治

論文内容の要旨

本研究では、哺乳類 TIA-1 相同性の RNA 結合タンパク質である BmTRN-1 および SfTRN-1 をチョウ目昆虫であるカイコガおよびヨトウガから見出し、その機能に関する以下の解析を行った。

本論文は以下の 5 つの章から構成されている。

第 1 章では、哺乳類細胞の TIA-1 に類似した転写産物調節の役割を持つ昆虫種の相同性 RNA 結合タンパク質の役割を明らかにすることの重要性について述べた。特に、TRN-1 ファミリーの役割を調べることにより、昆虫の転写産物調節機構の理解に貢献できることが考えられる。

第 2 章では、チョウ目昆虫における TRN-1 のクローニングについて言及した。遺伝子クローニングの結果、カイコガ細胞では、44.1kDa と 42.5kDa の二つのアイソフォームが同一の遺伝子からオルタナティブスプライシングにより生じることが示された。また、ヨトウガ細胞から単離した BmTRN-1 相同性遺伝子に関する検討から、SfTRN-1 タンパク質には TIA-1 ファミリータンパク質に見られる RNA 認識領域の繰り返し構造とカルボキシル末端側の auxiliary ドメインが保存されていることが明らかとなった。

第 3 章では、TRN-1 タンパク質が及ぼす外来タンパク質生産への影響について述べた。ヨトウガ細胞に SfTRN-1 遺伝子のノックダウン処理を行った場合、外来タンパク質生産量とその転写産物量の増加が認められた。また、GFP を融合させた SfTRN-1 および BmTRN-1 にはポリ U - RNA に対する結合活性が保持されており、これらのタンパク質を過剰に発現させた細胞では外来タンパク質生産量の低下が示された。こうした結果から、SfTRN-1 および BmTRN-1 は、転写産物の非翻訳領域と結合して安定性を失わせることで、タンパク質生産を制御していることが示唆された。

第 4 章では、昆虫細胞における TRN-1 タンパク質の細胞内分布を調べた。GFP 融合タンパク

質による解析から、BmTRN-1 の二つのアイソフォームと、SfTRN-1 はともに核・細胞質の双方に存在していることが明らかとなった。特に SfTRN-1 は核よりも細胞質に多く分布していた。ドメインを欠失させた変異体タンパク質を用いた解析から、BmTRN-1 では RRM3 サブドメイン、SfTRN-1 では RRM1 と RRM3 サブドメインが核への蓄積に関与していた。また両者とも RRM2 サブドメインは核外輸送に関与することが示唆された。昆虫 TRN-1 と哺乳類 TIA-1 では、RRM2 と RRM3 サブドメインの役割が大きく異なっていた。SfTRN-1 の auxiliary ドメインの後半部が核外輸送に関与することが示されたが、BmTRN-1 には同様の性質が認められなかった。このことから、auxiliary ドメインは昆虫種間で異なる役割を持つことが考えられた。さらに、BmTRN-1 を強く発現する細胞にバキュロウイルスを感染させたところ、BmTRN-1 の二つのアイソフォームはいずれも核に強く分布するようになった。この時、ウイルス由来の外郭タンパク質の生産量が低いレベルに抑えられていたことから、昆虫 TRN-1 は核においてウイルス由来転写産物の識別やその働きの抑制に関与することが考えられた。

第 5 章の総合考察では、以上の結果を基に昆虫 TRN-1 の転写産物調節機構における役割を論じた。さらに TRN-1 の人工的利用によるチョウ目昆虫のタンパク質生産における機能性向上に関する展望について述べた。

論文審査の結果の要旨

カイコガやヨトウガを含めた有用チョウ目昆虫の個体および細胞は、外来有用タンパク質生産のためのウイルスベクター用宿主として頻繁に用いられている。微生物系と比較して適切な翻訳後修飾が期待される一方で、チョウ目昆虫の系では転写産物の安定性制御や翻訳制御などの機構解明が立ち遅れていた。そこで当該申請者は、RNA 結合タンパク質である TIA-1 の相同性タンパク質 (TRN-1) に注目し、その転写産物の調節に関与した機能の解析や、細胞内分布の解析を行った。TIA-1 は哺乳類の細胞核において、転写産物のスプライシング調節に関わるほか、細胞質では外部環境ストレスが誘導する翻訳サイレンシングに関わる役割を持つことが知られていたが、チョウ目昆虫では、本研究においてはじめて TIA-1 相同性物質の役割が明らかになった。

カイコガおよびヨトウガ由来細胞における遺伝子発現のノックダウンや過剰発現による解析から、TRN-1 タンパク質には転写産物を認識・排除して、タンパク質生産量を低下させる働きがあることが確認された。またタグとの融合タンパク質を用いた細胞内分布の検討から、TRN-1 タンパク質は細胞核 細胞質の間をシャトリングする性質があり、核外輸送や核内蓄積に関わる特徴的なドメインの役割が哺乳類 TIA-1 のものとは大きく異なることが明らかになった。さらに、バキュロウイルスに感染したカイコ細胞を用いた検討から、TRN-1 はこのウイルスのタンパク質生産を抑制することに加え、ウイルス感染の際に核に留まることがわかった。したがって昆虫の TRN-1 には、宿主のものとは異なる経路で成熟化するウイルス転写産物を核内で認識し、排除する機能があることを見出した。

こうした結果から、本研究の知見は昆虫の転写産物の調節に関する TRN-1 の役割の重要性を示すに留まらず、将来にわたりタンパク質生産量に優れた昆虫個体の開発にもつながるものであり、学位を授与するに値するものである。申請者はすでにこれらの研究成果を以下の論文にまとめた。

発表論文（印刷中也含む）

- 1 . Muto, S., Matsumoto, E., Tanabe, T., Mori, H. and Kotani., E., 2009. Functional analysis of the gene of BmTRN-1, an RNA-binding protein homologous to mammalian TIA-1 from the silkworm, *Bombyx mori*, by its overexpression and subcellular distribution study during the baculovirus infection process. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* **78** (印刷中)

- 2 . Muto, S., Tanabe, T., Matsumoto, E., Mori, H. and Kotani., E., 2009. Molecular Characterization of a TIA-1-like RNA-binding protein in cells derived from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (印刷中)