

細胞内リボソームタンパク質レベルの  
恒常性制御機構の遺伝学的解析

北村 大樹

# 目次

要旨.....	2
第1章 序論.....	3
第2章 材料と実験手法.....	6
第3章 結果.....	14
第4章 まとめと考察.....	35
参考文献.....	39
謝辞.....	44

## 要旨

細胞内でタンパク質の合成を担うリボソームは、真核生物では約 80 種類のリボソームタンパク質 (Rp) から構成される巨大複合体である。これまでの酵母や細胞培養系での研究から、個々の Rp の細胞内レベルはネガティブフィードバック機構やユビキチン・プロテアソーム系によって、リボソームの生合成に必要な量だけ存在するように制御されていることが知られている。しかしながら、多細胞生物における細胞内 Rp レベルの制御に関する研究は *in vivo* ではほとんどなされておらず、多細胞生物の生体内における制御の実態、また、その生理的意義は不明な点が多い。本研究では、ショウジョウバエの遺伝学的手法を用いて、生体内において細胞内 Rp レベルがどのように制御されているのか解析した。内因性に発現する Rp を EGFP 融合タンパク質として検出できるノックインショウジョウバエの組織中で、Ribosomal protein S20 (RpS20) または Ribosomal protein L5 (RpL5) を異所的に強制発現させると、それぞれ EGFP-RpS20 または EGFP-RpL5 のタンパク質レベルが大きく減少することを見出した。重要なことに、ハウスキーピング遺伝子である *Heat shock protein 83*

(*Hsp83*) の内因性タンパク質レベルは *Hsp83* の異所的な強制発現の影響を受けなかったことから、細胞内の Rp レベルは特異的に制御されていることが示唆された。さらに解析を進め、リボソームに組み込まれなかった余剰な Rp がプロテアソームで分解されることで、細胞内 Rp レベルの恒常性が制御されていることを明らかにした。遊離 Rp はタンパク質品質管理システムによって「オーファンサブユニット」として認識されることで、細胞内から除去されていると考えられる。本研究の成果により、細胞間の Rp レベルの不均衡が誘導する細胞競合の分子機構とその役割の解析に新たな視点と研究アプローチがもたらされ、その解明に大きく貢献することが期待される。

## 第1章 序論

細胞内でのタンパク質の合成は、核内における DNA の mRNA への転写と、核外へ輸送された mRNA の翻訳という過程を経て行われる。リボソームはすべての細胞内でこの翻訳を触媒する必須な巨大複合体であり、真核生物においては約 80 種類のリボソームタンパク質 (Rp) と 4 種類の rRNA で構成されている (Moldave, 1985; Wilson and Doudna Cate, 2012)。翻訳は細胞ひいては個体の生存に必要不可欠な細胞内プロセスであるため、Rp はあらゆる細胞で大量に産生され、増殖中の哺乳類細胞では全タンパク質合成のうち 30% が Rp の合成に費やされている (Warner, 1999; Schwarz *et al.*, 2022)。全ての Rp はリボソームの生合成に等モル量必要であり、Rp レベルの不均衡は、ヒトにおけるダイヤモンド・ブラックファン貧血や 5q-症候群などのリボソーム病、ショウジョウバエにおける *Minute* 表現型のように、生物個体に重篤な症状を引き起こすことが知られている (Narla and Ebert, 2010; Kongsuwan *et al.*, 1985; Marygold *et al.*, 2007)。また、ショウジョウバエでは、Rp 遺伝子の機能欠失変異をヘテロ接合に持つ *Minute* 細胞が野生型細胞に囲まれると、細胞競合と呼ばれる現象によって増殖中の上皮から積極的に排除される (Morata and Ripoll, 1975; Nagata and Igaki, 2018)。

細胞内の Rp レベルがバランスよく維持されるメカニズムは古くから研究されてきたが、中でも最もよく研究されているのは Rp 自身による発現の自己制御である (Nomura *et al.*, 1980; Warner and McIntosh, 2009)。すなわち、Rp が過剰に産生され、リボソームに組み込まれない Rp が細胞内に多量に存在する状況下では、遊離 Rp が自身の発現を負に制御する。このようなリボソーム外ではたらく Rp の機能は Extra-ribosomal Function と呼ばれている。原核生物では、機能が関連する複数の遺伝子がオペロンと呼ばれるユニットにまとめられ単一のプロモーターによって発現調節を受けるが、大腸菌の Rp 遺伝子もオペロンという形で発現を制御されている。通常リボソーム中で rRNA に結合している Rp は、自身をコードする mRNA 上にも直接結合することができ、これに

より自身の翻訳を抑制する。しかしながら mRNA への親和性は rRNA への親和性よりも著しく低いため、あくまで生合成に用いられなかった遊離 Rp が存在する場合のみ、翻訳のネガティブフィードバックを起こすことが可能となっている (Mikhaylina *et al.*, 2021)。一方で、酵母などの研究から、Rp レベルの自己制御はオペロン構造が存在しない真核生物においても保存されていることが示されている (Eng and Warner, 1991; Gabunilas and Chanfreau, 2016; Roy *et al.*, 2020)。興味深いことに、真核生物における Rp レベルの自己制御は、mRNA の分解 (例: RpS28B) (Badis *et al.*, 2004)、選択的スプライシング (例: RpS26) (Ivanov *et al.*, 2005)、翻訳阻害 (例: RpS3) (Kim *et al.*, 2010) などの複数のメカニズムによって達成されている。また、RpL10A の選択的スプライシングレポーターミニ遺伝子や、RpS18 および RpL29 の GFP タグ付きトランスジーンを用いた線虫の研究により、多細胞生物においても細胞内レベルがネガティブフィードバックで制御されている Rp があることが示された (Takei *et al.*, 2016; Noma *et al.*, 2017)。しかし、多細胞生物における Rp 遺伝子発現のネガティブフィードバック機構はいくつかの遺伝子に報告があるのみで、大半の Rp 遺伝子ではまだ確認されていない。

Extra-ribosomal Function による合成段階における Rp レベルの制御がよく知られている一方で、細胞内の Rp レベルは合成後でも制御されている。例えば、培養細胞を RNA ポリメラーゼ阻害剤であるアクチノマイシン D で処理して rRNA の合成を阻害すると、Rp の合成は継続するものの、新たに合成された Rp は不安定で速やかに分解される (Warner, 1977)。また、新しく合成された Rp は速やかに核小体に取り込まれるが、リボソームの生合成にはその一部しか用いられず、余剰 Rp はプロテアソームによって分解される (Lam *et al.*, 2007)。さらに、他の Rp よりも過剰に合成された Rp は、ユビキチン・プロテアソーム系によって分解されることも酵母と細胞培養系で報告されている (Sung *et al.*, 2016a; Sung *et al.*, 2016b)。

このように、細胞内 Rp レベルの恒常性制御に関する多くの報告があるにもかかわらず、それらはほとんどが単細胞生物または細胞培養系におけるもので

ある。多細胞生物の生体内で Rp レベルの恒常性が制御されていることを示す証拠は非常に乏しく、そのような機構が進化の過程でどのように保存されているのかは不明であった。

本研究では、ショウジョウバエの幼虫組織において、内因性に発現するリボソームタンパク質 RpS20 と RpL5 を EGFP 融合タンパク質として可視化することにより、細胞内 Rp レベルの恒常性制御を *in vivo* で観察した。その結果、内因性に発現する EGFP-RpS20 と EGFP-RpL5 タンパク質は、それぞれ RpS20-HA と RpL5-HA タンパク質の異所的な強制発現によって消失することが見出された。そして定量 PCR やポリソームプロファイリングなどの実験によって、この現象は、過剰に合成された外因性 Rp が内因性 Rp との濃度比に従って大多数のリボソームに組み込まれ、リボソームに組み込まれなかった遊離 Rp がプロテアソームによって分解されることで起こっていることが明らかになった。本研究は、多細胞生物の生体内においても Rp レベルの恒常性がプロテアソームによる分解を介して制御されていることを初めて *in vivo* の系で示したものである。

## 第2章 材料と実験手法

### 2.1 使用したショウジョウバエ系統と飼育方法

本研究で用いたショウジョウバエ系統は以下の通りである：*EGFP-RpS20* (KYOTO Drosophila Stock Center、京都、#109696)、*EGFP-RpL5* (KYOTO Drosophila Stock Center、#109768)、*EGFP-Hsp83* (KYOTO Drosophila Stock Center、#109761)、*UAS-RpS20-HA* (FlyORF、チューリッヒ、#F000754)、*UAS-RpL5-HA* (FlyORF、#F001323)、*UAS-RpS3* (Akai *et al.*, 2018)、*UAS-Hsp83* (Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)、ブルーミントン、インディアナ州、#58468)、*UAS-LacZ* (BDSC、#8529)、*UAS-p35* (Hay *et al.*, 1994)、*nub-Gal4* (BDSC、#42699)、*Tub-Gal4* (BDSC、#5138)、*UAS-Rpn1-RNAi* (BDSC、#34348)、*UAS-Rpt2-RNAi* (BDSC、#34795)。すべてのショウジョウバエ系統は、グルコース、コーンミール、乾燥酵母、小麦胚芽、寒天を含む培地上で、25°Cに維持したバイアル内で飼育した。各実験で使用した幼虫の性別は区別しなかった。

## 2.2 Gal4/UAS システム

遺伝子の異所的な強制発現やノックダウンは Gal4/UAS システムを用いて行われた (図 1) (Brand and Perrimon, 1993)。

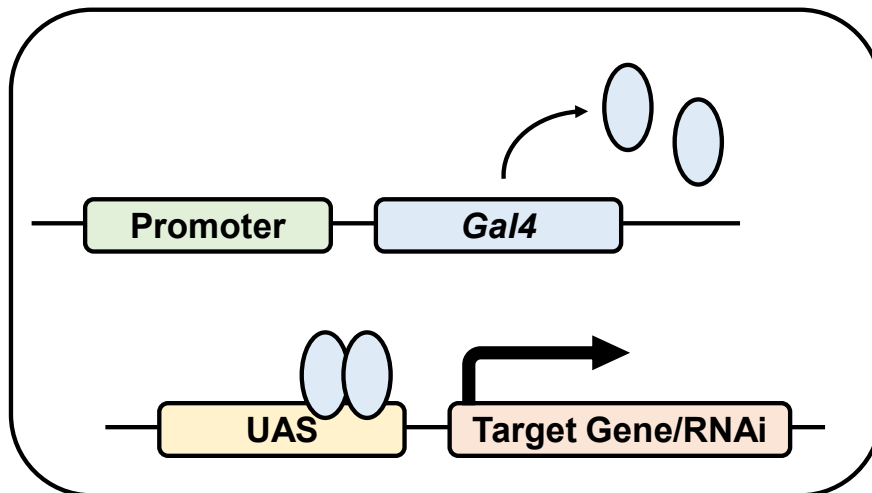


図 1 Gal4/UAS システム

酵母由来の転写因子である *Gal4* を組織・時期特異的なプロモーターによって発現させると、Gal4 タンパク質が UAS (Upstream Activation Sequence) 配列に結合することで、目的遺伝子の異所的な強制発現またはノックダウンが誘導される。

## 2.3 免疫化学染色

ショウジョウバエ 3 齢幼虫をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で解剖後、氷上にて 5 分間、その後室温にて 20 分間 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で固定した。その後、固定したサンプルを PBT (PBS + 0.1% Triton X-100) で 10 分間 × 3 回洗浄し、DNA の標識用に DAPI (Sigma-Aldrich、セントルイス、ミズーリ州、#D9542、1 $\mu$ g/mL) を加えた PBT に浸して 4°C で保存した。ユビキチン抗体による染色では、洗浄したサンプルを PBTn (PBT + 5% donkey serum (Jackson ImmunoResearch、ウェストグローブ、ペンシルベニア州、#017-000-



121)) で 30 分間ブロッキングした後、PBTn で希釈した一次抗体 (anti-multi ubiquitin、MBL、東京、#D058-3、1:500) と一晩 4°C で反応させた。その後、サンプルを洗浄、ブロッキングし、Alexa Fluor 647 標識二次抗体 (Invitrogen、ウォルサム、マサチューセッツ州、#A32728、1:200) と室温で 2 時間反応させた。反応後、サンプルを洗浄し、DAPI (1 $\mu$ g/mL) を含む PBT に浸して 4°C で保存した。サンプルの観察には、SlowFade Gold Antifade Mountant With DAPI (Invitrogen、#S36939) もしくは anti-fade mounting medium (1 $\times$  PBS、50% グリセリン、0.2% 没食子酸 n-プロピル、<https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/protocols>) をマウント剤にしてプレパラートを作製した。共焦点画像は TCS SP8 (Leica-Microsystems、ヴェッツラー) を用いて以下の条件で撮影した。励起波長: 405 nm (DAPI) または 488 nm (EGFP)。フィルター: 410 nm/480 nm (DAPI) または 492 nm/547 nm (EGFP)。レンズ: HC PL APO CS2 20 $\times$ /0.75 DRY。pouch 領域は手動で輪郭を描き、EGFP 強度は Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) で測定した。図中でサンプル数が示されていない遺伝型の翅原基については、10 枚以上を観察した。

## 2.4 幼虫全身の撮影

幼虫全身の画像は Leica M165 FC 実体蛍光顕微鏡を用いて撮影した。

## 2.5 ウェスタンブロット解析

0.7% NaCl 溶液で洗浄したショウジョウバエ 3 齢幼虫 3 匹を BioMasher II (ニッピ、東京) を用いて 100  $\mu$  L の溶解バッファー (15mM HEPES-KOH pH7.6、10mM KCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM EDTA pH8.0、10% グリセリン) (Lo Piccolo *et al.*, 2015) 中ですり潰した後、11,000  $\times$ g で 30 秒間遠心し、上清を 100  $\mu$  L の Sample Buffer Solution (ナカライテスク、京都、#30566-22) に加えて 95°C で 5 分間煮沸した。その後、20  $\mu$  L のサンプルと 5  $\mu$  L の BlueStar Prestained Protein Ladder (日本ジェネティクス、東京、#NE-MWP03) を 10% SDS-PAGE ゲルの各ウェルにロードし電気泳動を行い、PVDF メンブレン (Millipore、バーリン

トン、マサチューセッツ州、#IPVH00010) に転写した。メンブレンを Blocking One (ナカライテスク、#03953-95) で 30 分間ブロッキングし、Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST) で 10 分間×3 回洗浄した後、一次抗体 (mouse anti-GFP、Clontech、マウンテンビュー、カリフォルニア州、#632381、1:1000) と室温で一晩反応させた。一次抗体反応後、メンブレンを TBST で 10 分間×3 回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体 (anti-mouse、Cell Signaling Technology (CST)、ダンバース、マサチューセッツ州、#7076、1:1,000) と室温で 2 時間反応させた。メンブレンを TBST で 10 分間×3 回洗浄後、バンドを Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク、#02230) で可視化し、ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare、シカゴ、イリノイ州) で検出した。その後、WB Stripping Solution (ナカライテスク、#05364-55) で抗体を除去し、一次抗体 (mouse anti-Tubulin、Sigma-Aldrich、#T5168、1:5000) と HRP 標識二次抗体 (anti-mouse) を用いて上記手順を繰り返し、ローディングコントロールのバンドを可視化した。バンド強度は Fiji で測定した。

## 2.6 幼虫からの RNA 単離と RT-qPCR

NucleoSpin RNA XS (Machery-Nagel、デューレン、#740902.50) のメーカープロトコルに従い、各遺伝子型のショウジョウバエの全 RNA を 3 齢幼虫 3 匹から抽出し、13  $\mu$ L の水で溶出した。その後、そのうちの 11  $\mu$ L を使い、SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen、#18090050) を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した。この cDNA をサンプルとし、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡、大阪、#QPS-201) を用いて StepOnePlus system (Thermo Fisher Scientific、ウォルサム、マサチューセッツ州) にて RT-qPCR を行った。内在性コントロールには  *$\alpha$ -Tubulin at 84B* を用いた。

## 2.7 UAS-RpS20[c.3\_4insA]系統の作製

*w<sup>1118</sup>* ショウジョウバエ成虫から TRIzol Reagent (Invitrogen、#15596026) を用いて RNA を抽出した後、RT-PCR により cDNA を合成した。その後、下記のプ

ライマーを用いて *RpS20* の開始コドン直後にアデニンが挿入された DNA フラグメントを増幅した。増幅した DNA フラグメント (EcoRI/BglII 認識配列付加) を pUASTattB ベクターにクローニング後、BestGene Inc. (チノヒルズ、カリフォルニア州) に委託して第三染色体左腕 68E1 に目的の UAS 配列が挿入された系統を作製した。

Forward: AAGAATTCCACCATGAGCTGCTGCACCCAA

Reverse: TGAGATCTTTAGTTGGCGATGGTGACCTCA

## 2.8 ポリソームプロファイリング

20% ショ糖添加 PBS 溶液で洗浄したショウジョウバエ 3 齢幼虫 30 匹を 500  $\mu$ L のポリソーム抽出バッファー (20mM Tris-HCl, pH 7.4, 140 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 1mM DTT, 100  $\mu$ g/mL シクロヘキシミド、800 U/ml RNaseOUT (Invitrogen, #100000840)、2  $\times$  Protease Inhibitor Cocktail (ナカライテスク, #25955-11)) 中ですり潰した後、16,000 rpm、4°C で 15 分間遠心し、シリンジを用いて脂肪を吸わないように注意深く上清を別のチューブに移した。その後、抽出液を GradientStation (Biocomp、フレデリクトン、ニューブランズウィック州) で作製した 10-50% w/w ショ糖密度勾配溶液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 140 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ g/mL シクロヘキシミド) に慎重に載せ、SW41Ti ローターを用いて 37,000 rpm、2.5 時間、4°C で超遠心した (Optima XE-100 Ultracentrifuge、Beckman、ブレア、カリフォルニア州)。遠心後のサンプルは 254nm の吸光度をリアルタイムでモニターしながら、GradientStation とマイクロコレクター AC-5700 (ATTO、東京) を用いて分画しながら回収した。回収後のサンプルは、14% SDS-PAGE ゲルで分離し、PVDF メンブレンに転写した。ウェスタンブロット解析の残りの手順は上に記したものと同一である。メンブレンは一次抗体 (mouse anti-GFP、Clontech、#632381、1:1000 または rat anti-HA、Roche、バーゼル、#ROAHAHA、1:1000) および HRP 結合二次抗体 (anti-mouse、CST、#7076、1:1000 または anti-rat、

CST、 #7077、 1:1000) と反応させ、 Amersham ImageQuant 800 (Cytiva、 東京) を用いて検出した。

## 2.9 統計解析

統計解析はすべて EZR (自治医科大学) を用いて行った (Kanda, 2013)。

## 2.10 RT-qPCR 解析に用いたプライマー

RT-qPCR 解析には以下のプライマーを用いた。

内因性 *EGFP-RpS20*

Forward: ATTACCTCCATCAACATCGAGCCCG

Reverse: AGCACGCCAAACTTTTCGAGGTG

*α-Tubulin at 84B*

Forward: TGTCGCGTGTGAACTTC

Reverse: AGCAGGCGTTTCCAATCTG (Ponton *et al.*, 2011)

全量 *RpS20*

Forward: TGTGGTGAGGGTTCCAAGAC

Reverse: GACGATCTCAGAGGGCGAGT

## 2.11 各実験で使用したショウジョウバエの詳しい遺伝子型

図 3

- (A) +/+; *EGFP-RpS20*/+
- (B) *nub-Gal4*/+; *EGFP-RpS20*, *UAS-RpS20-HA*/+
- (C) *nub-Gal4*/+; *EGFP-RpS20*/*UAS-RpS3*

図 5

- (A) *EGFP-RpL5*/+; +/+
- (B) *nub-Gal4*/*EGFP-RpL5*; *UAS-RpL5-HA*/+
- (C) *nub-Gal4*/*EGFP-RpL5*; *UAS-RpS3*/+
- (D) *nub-Gal4*/*EGFP-RpL5*; *UAS-RpS20-HA*/+

図 7

- (A) *nub-Gal4/+; EGFP-Hsp83/UAS-LacZ*
- (B) *nub-Gal4/+; EGFP-Hsp83/UAS-Hsp83*

図 8

- (A、左) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/TM6B*
- (A、右) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/Tub-Gal4*
- (B、左) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/TM6B*
- (B、右) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/Tub-Gal4*
- (C、左) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/TM6B*
- (C、右) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/Tub-Gal4*

図 9

- (B) *+/+; EGFP-RpS20/+*
- (C) *nub-Gal4/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20[c.3\_4insA]/+*

図 10

- (B、左) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/TM6B*
- (B、右) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/Tub-Gal4*

図 11

- (A) *nub-Gal4/+; RpS20-EGFP/+*
- (B) *nub-Gal4/+; RpS20-EGFP/ UAS-Rpn1-RNAi*

図 12

- (A) *UAS-p35/+; nub-Gal4/+; EGFP-RpS20/+*
- (B) *UAS-p35/+; nub-Gal4/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/+*
- (C) *UAS-p35/+; nub-Gal4/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/UAS-Rpt2-RNAi*
- (D) *UAS-p35/+; nub-Gal4/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/UAS-Rpn1-RNAi*
- (E) *UAS-p35/+; nub-Gal4/EGFP-RpL5; +/+*
- (F) *UAS-p35/+; nub-Gal4/EGFP-RpL5; UAS-RpL5-HA/+*
- (G) *UAS-p35/+; nub-Gal4/EGFP-RpL5; UAS-RpL5-HA/UAS-Rpt2-RNAi*
- (H) *UAS-p35/+; nub-Gal4/EGFP-RpL5; UAS-RpL5-HA/UAS-Rpn1-RNAi*

- (I、1 列目) *UAS-p35/+; nub-Gal4/EGFP-RpL5; +/+*
- (I、2 列目) *UAS-p35/+; nub-Gal4/EGFP-RpL5; UAS-RpL5-HA/+*
- (I、3 列目) *UAS-p35/+; nub-Gal4/EGFP-RpL5; UAS-RpL5-HA/UAS-Rpt2-RNAi*
- (I、4 列目) *UAS-p35/+; nub-Gal4/EGFP-RpL5; UAS-RpL5-HA/UAS-Rpn1-RNAi*
- (J、1 列目) *UAS-p35/+; nub-Gal4/+; EGFP-RpS20/+*
- (J、2 列目) *UAS-p35/+; nub-Gal4/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/+*
- (J、3 列目) *UAS-p35/+; nub-Gal4/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/UAS-Rpt2-RNAi*
- (J、4 列目) *UAS-p35/+; nub-Gal4/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/UAS-Rpn1-RNAi*

図 13

- (B、左) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/TM6B*
- (B、右) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/Tub-Gal4*

図 14

- (A) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-LacZ/Tub-Gal4*
- (B) *+/+; EGFP-RpS20, UAS-RpS20-HA/Tub-Gal4*

## 第3章 結果

### リボソームタンパク質の異所的な強制発現はその内在性タンパク質レベルを低下させる

ショウジョウバエは、生体内での遺伝子の発現を容易に可視化したり操作したりできる優れたモデル生物である。当研究室の中村麻衣博士は、ショウジョウバエの幼虫翅原基における遺伝子発現を観察する過程で、容易に内因性 Rp を観察できる系統として KYOTO Drosophila Stock Center の piggyTrap 系統を見出した。この piggyTrap 系統では、スプライシングアクセプターとスプライシングドナーに挟まれた *EGFP* cDNA を含む piggyTrap トランスポゾンが遺伝子内に挿入されているため、生体内で遺伝子の内因性の発現を *EGFP* 融合タンパク質として検出することが可能である。トランスジェニックショウジョウバエ *PBac{EGFP-IV}RpS20<sup>KM0175</sup>* はこのトランスポゾンを実在性 *RpS20* 遺伝子の第 1 イントロンに含んでおり、内在性の *RpS20* プロモーターから *EGFP* 融合 *RpS20* タンパク質 (*EGFP-RpS20*) が発現する (図 2)。

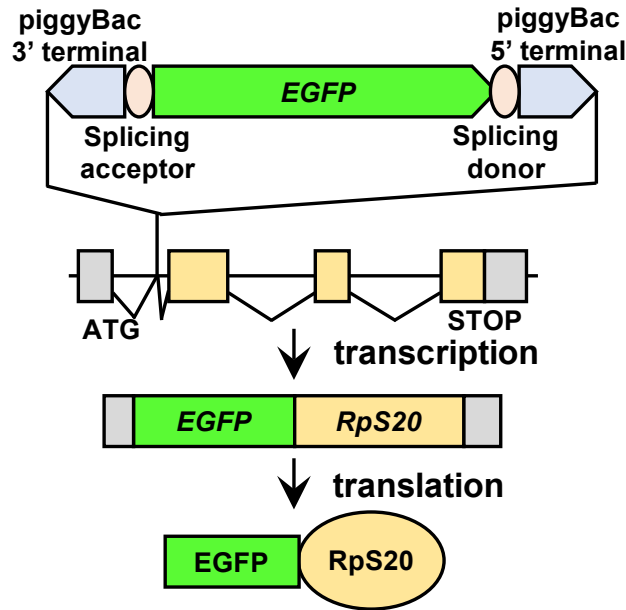


図2 EGFP-RpS20 ノックイン遺伝子の模式図

$PBac\{EGFP-IV\}RpS20^{KM0175}$  は piggyTrap トランスポゾンを用いた内在性  $RpS20$  遺伝子の第1イントロンに組み込み、EGFP-RpS20 が内在性の  $RpS20$  プロモーターから発現する。灰色のボックスは  $RpS20$  UTR、黄色のボックスは  $RpS20$  CDS を示す。

まずこの系統を用いて、異所的に強制発現させた RpS20 が EGFP-RpS20 に及ぼす影響を調べた。具体的には、翅原基の pouch 領域に特異的なドライバーである *nubbin-Gal4* (*nub-Gal4*) を用い、HA タグ融合 RpS20 タンパク質 (RpS20-HA) を Gal4/UAS システム (図1) により強制発現させた。その結果驚くべきことに、通常は翅原基全体で検出される EGFP-RpS20 が pouch 領域でほとんど検出されなくなった (図3A、B) (ここまでが中村博士によって得られた実験結果)。ここで重要なことに、異なるリボソームタンパク質である RpS3 の強制発現は EGFP-RpS20 のレベルに影響を与えなかった (図3C)。この結果から、RpS20 の細胞内レベルはネガティブフィードバックのようなメカニズムで制御されていることが示唆された。



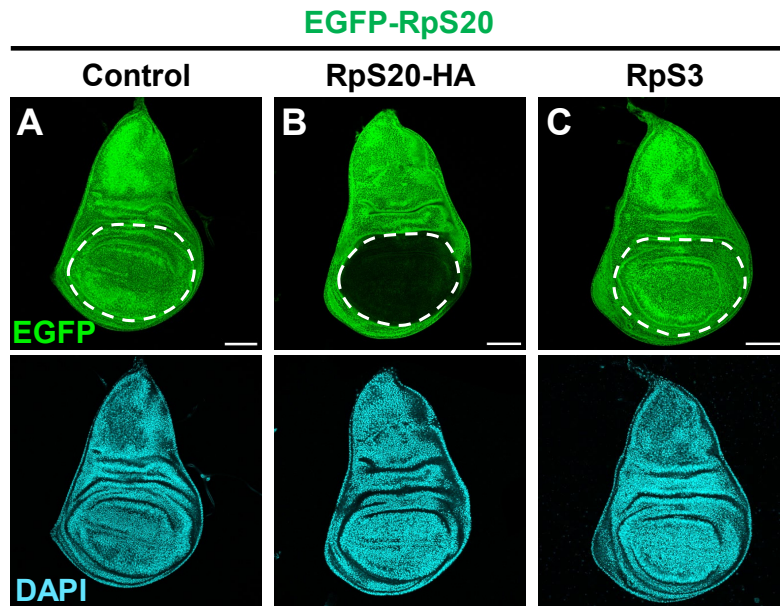


図3 RpS20 の異所的な強制発現によって内在性 RpS20 は大きく減少する  
 (A-C) 内因性に発現した EGFP-RpS20 を持つ翅原基。RpS20-HA (B)、RpS3  
 (C) を *nub-Gal4* を用いて pouch 領域特異的に強制発現させた。*nub* プロモーターが活性化される領域を破線で示す。核は DAPI で染色し、スケールバーは  $100\mu\text{m}$  を示す。

さらに、別のリボソームタンパク質である *RpL5* についても、*RpL5* の異所的な強制発現に対する内因性 *EGFP-RpL5* の細胞内レベルの反応を観察した。トランスジェニックショウジョウバエ *PBac{EGFP-IV}RpL5<sup>KM0163</sup>* も *EGFP-RpS20* と同様に piggyTrap トランスポゾンを含んでおり、内在性の *RpL5* プロモーターから *EGFP* 融合 *RpL5* タンパク質 (*EGFP-RpL5*) が発現する (図 4)。

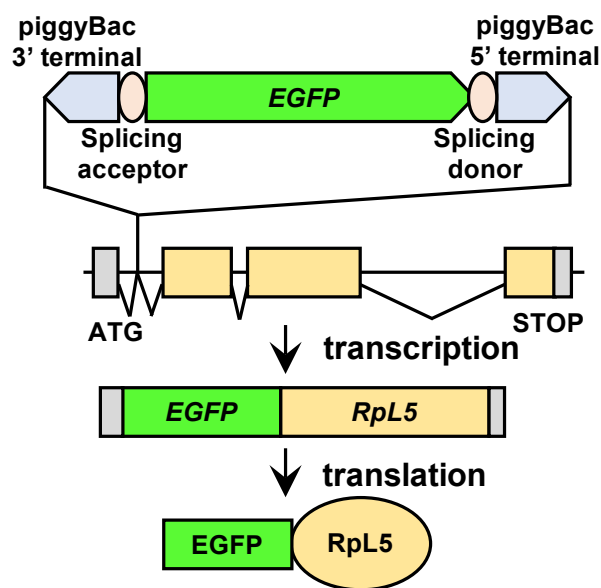


図 4 *EGFP-RpL5* ノックイン遺伝子の模式図

*PBac{EGFP-IV}RpL5<sup>KM0163</sup>* は piggyTrap トランスポゾンを含み、*EGFP-RpL5* が内在性の *RpL5* プロモーターから発現する。灰色のボックスは *RpL5* UTR、黄色のボックスは *RpL5* CDS を示す。

興味深いことに、内因性に発現する EGFP-RpL5 の細胞内レベルも RpL5-HA の異所的な強制発現により大きく低下した一方で、RpS3 の強制発現の影響を受けなかったことから (図 5A-C)、RpL5 も RpS20 同様にその細胞内レベルがネガティブフィードバックのようなメカニズムで制御されていることが示唆された。また、RpS20-HA の強制発現が EGFP-RpL5 のレベルに影響を与えなかったことから、RpS20 の強制発現が自身を含むあらゆる Rp の細胞内レベルを低下させる可能性も否定された (図 5D)。

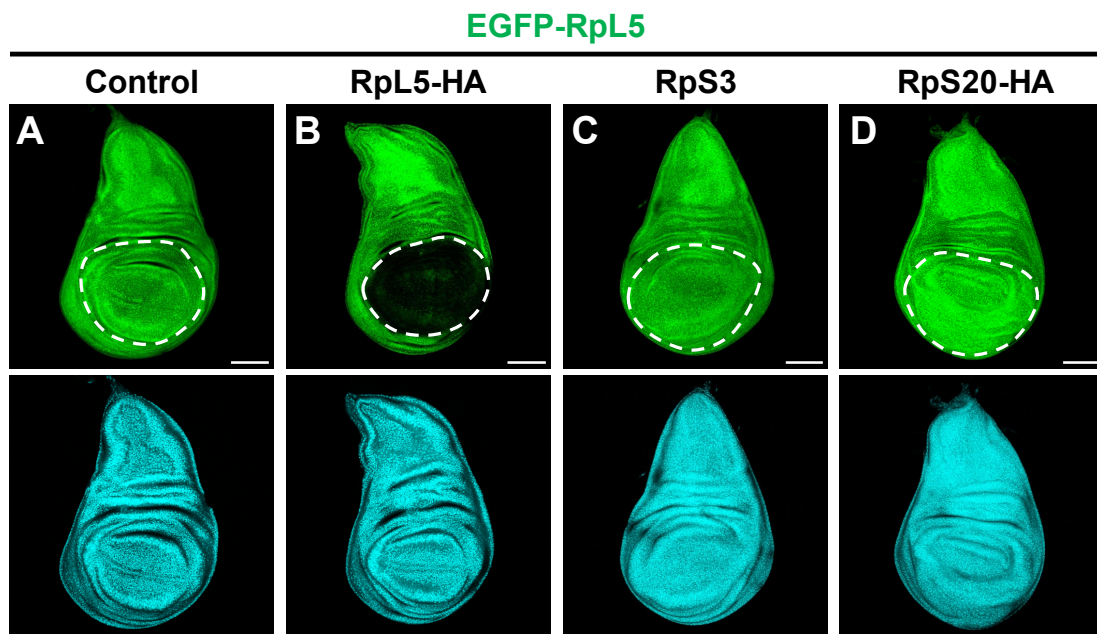


図 5 RpL5 の異所的な強制発現によって内在性 RpL5 は大きく減少する (A-C) 内因性に発現した EGFP-RpL5 を持つ翅原基。RpL5-HA (B)、RpS3 (C)、RpS20-HA (D) を *nub-Gal4* を用いて pouch 領域特異的に強制発現させた。 *nub* プロモーターが活性化される領域を破線で示す。核は DAPI で染色し、スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。

ここで、Rp 遺伝子以外でも、遺伝子の異所的な強制発現によってその内在性タンパク質レベルが減少するか検証した。そのために、ハウスキーピング遺伝子である *Heat shock protein 83* (*Hsp83*) の内在性の発現を EGFP 融合タンパク質で検出し、異所的な発現に対する影響を調べた。トランスジェニックショウジョウバエ *PBac{EGFP-IV}Hsp83<sup>KM0022</sup>* は piggyTrap トランスポゾンを用いて内在性 *Hsp83* 遺伝子の第 1 イントロンに含んでおり、内在性の *Hsp83* プロモーターから EGFP 融合 *Hsp83* タンパク質 (EGFP-*Hsp83*) が発現する (図 6)

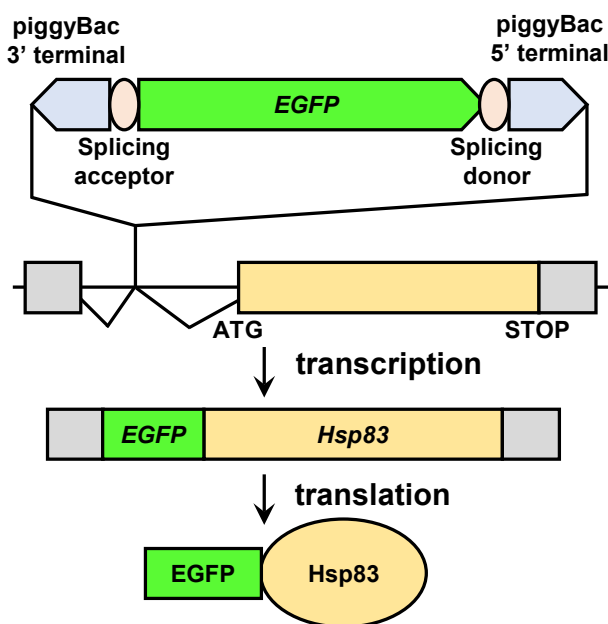


図 6 *EGFP-Hsp83* ノックイン遺伝子の模式図

*PBac{EGFP-IV}Hsp83<sup>KM0022</sup>* は piggyTrap トランスポゾンを用いて内在性 *Hsp83* 遺伝子の第 1 イントロンに含み、EGFP-*Hsp83* が内在性の *Hsp83* プロモーターから発現する。灰色のボックスは *Hsp83* UTR、黄色のボックスは *Hsp83* CDS を示す。

通常、EGFP-Hsp83 は翅原基全体で検出されたが、Hsp83 を pouch 領域で強制発現させても内因性 EGFP-Hsp83 の細胞内レベルは減少しなかった (図 7)。このデータにより、Gal4/UAS システムによる遺伝子の強制発現があらゆる遺伝子のタンパク質レベルを減少させることが否定され、Rp レベルの恒常性がショウジョウバエの細胞内で特異的に制御されていることが示唆された。

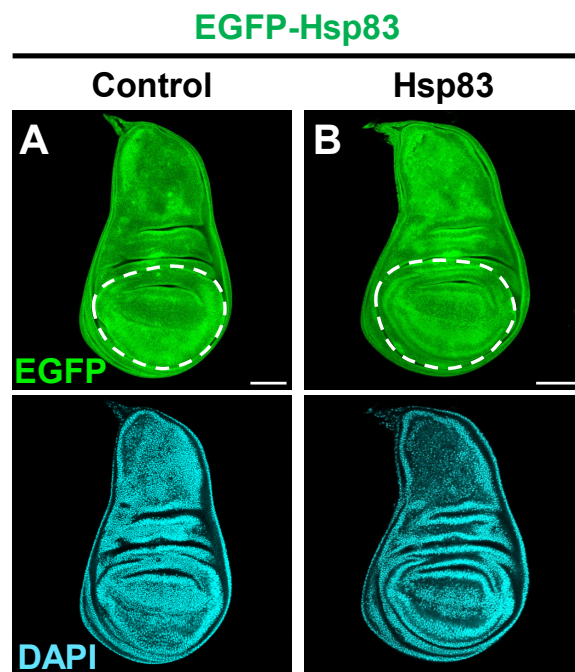


図 7 Hsp83 の異所的な強制発現は内在性 Hsp83 に影響を与えない

(A、B) 内因性に発現した EGFP-Hsp83 を持つ翅原基。(B) では Hsp83 を *nub-Gal4* を用いて pouch 領域特異的に強制発現させた。*nub* プロモーターが活性化される領域を破線で示す。核は DAPI で染色し、スケールバーは  $100\mu\text{m}$  を示す。

## リボソームタンパク質レベルの恒常性制御は組織を問わずに起こる

次に、Rp の異所的な強制発現で起こる内在性 Rp レベルの負の制御が、翅原基以外の組織でも観察される一般的な現象であるかどうかを調べた。注目すべきことに、*Tubulin-Gal4* (*Tub-Gal4*) ドライバーを用いて幼虫の全身で RpS20-HA を強制発現させると、内因性の EGFP-RpS20 が全身で減少した (図 8A)。EGFP-RpS20 タンパク質の減少は、幼虫をすり潰して作製したライセートのウェスタンブロット解析によっても確認された (図 8B。図 8C で定量)。これらのデータは、Rp の異所的な強制発現で起こる内在性 Rp レベルの負の制御が、様々な組織で観察される一般的な現象であることを示唆している。

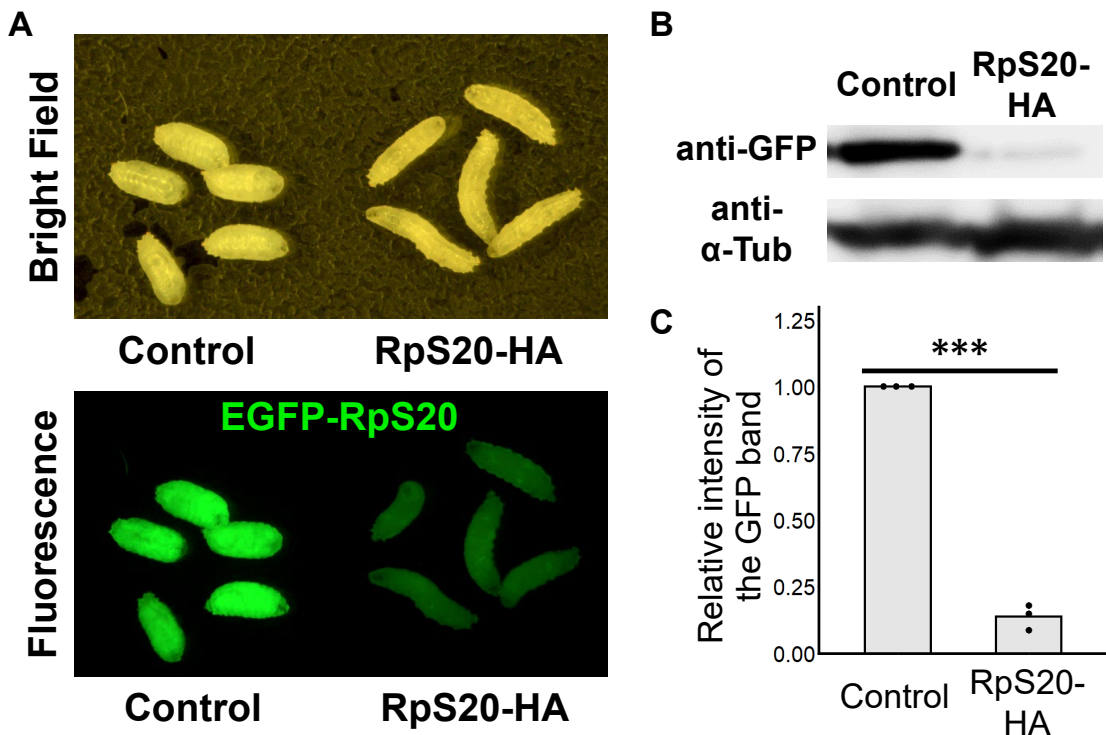


図8 Rpレベルの恒常性制御は組織を問わずに起こる

(A) 内因性に発現した EGFP-RpS20 を持つ 3 齢幼虫を明視野観察（上図）または蛍光下観察（下図）した。右側の幼虫で *Tub-Gal4* を用いて RpS20-HA を全身に強制発現させた。各幼虫の遺伝型を判別するために、コントロールには *Tb* 表現型が現れる balancer *TM6B* を持たせた。

(B、C) 3 齢幼虫から精製したライセートを GFP 抗体および  $\alpha$ -Tub 抗体を用いてウェスタンブロット解析にかけた。コントロールと比較した GFP バンドの相対強度を棒グラフで示す。黒い点は個々の測定値を、灰色の棒グラフは平均値を示す。n = 3; \*\*\*p < 0.001; Welch's t test。

## リボソームタンパク質レベルの恒常性制御は強制発現した mRNA の塩基配列依存的には起こらない

導入遺伝子が相同な配列を持つ内在性遺伝子の発現を抑制する現象としてコサプレッション (co-suppression) が知られている。これはペチュニアで最初に報告された現象で、特定の遺伝子において、過剰発現した mRNA を介してその内在性遺伝子の発現が抑制される (Napoli *et al.*, 1990; Montgomery and Fire, 1998)。そこで、ショウジョウバエの Rp 遺伝子も、強制発現した mRNA を介して塩基配列依存的に発現が抑制されているのか検証した。そのために、野生型 *RpS20* の CDS に塩基を 1 つ挿入した *RpS20[c.3\_4insA]* mRNA (変異型 *RpS20* mRNA) を Gal4/UAS システムで強制発現できる系統を作製した。変異型 *RpS20* mRNA は、開始コドン AUG の直後にアデニンが挿入されているためフレームシフトが起こり、野生型 *RpS20* mRNA とほぼ同じ塩基配列を持つ mRNA が転写されても、機能的なタンパク質は産生されない (図 9A)。この変異型 *RpS20* mRNA を *nub-Gal4* で強制発現させても EGFP-RpS20 は減少しなかった (図 9B、C)。この結果は、Rp レベルの恒常性の制御が co-suppression のように強制発現した mRNA そのものを介して起きているのではなく、強制発現した mRNA から Rp が合成されることで引き起こされていることを示唆している。



A

**Wild-type *RpS20* transgene**

1											363
AUG	GCU	GCU	GCA	CCC	AAG	GAU	AUU	GAG	...	AAC	UAA
Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Lys	Asp	Ile	Lys		Asn	*
1	2	3	4	5	6	7	8	9		120	

**Mutant *RpS20* transgene**

1											364
AUG	AGC	UGC	UGC	ACC	CAA	GGA	UAU	UGA	...	AAC	UAA
Met	Ser	Cys	Cys	Thr	Gln	Gly	Tyr	*			
1	2	3	4	5	6	7	8				

**EGFP-RpS20**

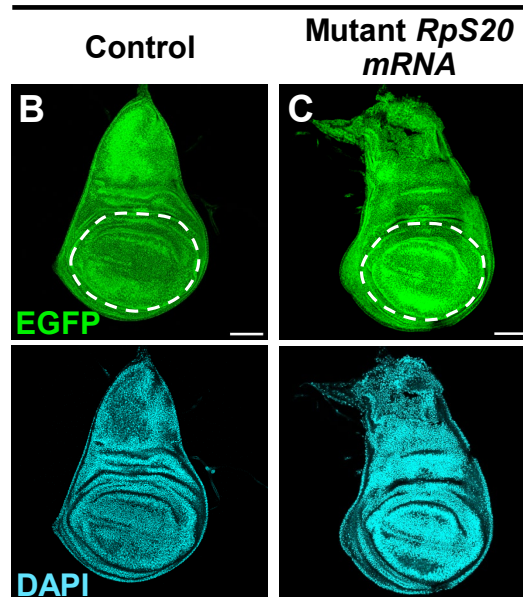


図9 *Rp* レベルの恒常性制御は強制発現した mRNA の塩基配列依存的には起こらない

(A) 変異型 *RpS20* mRNA は、野生型 CDS とほぼ同じ配列であるにもかかわらず、わずか 8 アミノ酸残基からなるタンパク質にしか翻訳されない。

(B、C) 内因性に発現した EGFP-RpS20 を持つ翅原基。変異型 *RpS20* mRNA (C) を *nub-Gal4* を用いて pouch 領域特異的に強制発現させた。*nub* プロモーターが活性化される領域を破線で示す。核は DAPI で染色し、スケールバーは 100 μm を示す。

## リボソームタンパク質レベルの恒常性制御は mRNA の減少を伴わない

遺伝子発現の負の調節は mRNA の減少（例：転写の抑制、mRNA の分解）またはタンパク質の減少（例：翻訳の抑制、タンパク質の分解）によって達成される。そこでまず、Rp の異所的な強制発現によって内在性 Rp の mRNA が減少するかを調べた。具体的には、強制発現した *RpS20-HA* mRNA が *RpS20* の UTR を持たないことを利用し、*RpS20* の 3' UTR に相補的なプライマーを含むプライマーセットを設計した（図 10A）。そして、*EGFP-RpS20* mRNA を特異的に増幅するが *RpS20-HA* mRNA は増幅しないこのプライマーセットを用いて RT-qPCR を行い、内因性の *EGFP-RpS20* mRNA レベルを定量した。その結果、*Tub-Gal4* を使って *RpS20-HA* を強制発現させても *EGFP-RpS20* mRNA のレベルは減少しなかったことから（図 10B）、Rp レベルの制御は mRNA の減少ではなくタンパク質の減少によってなされていることが示唆された。

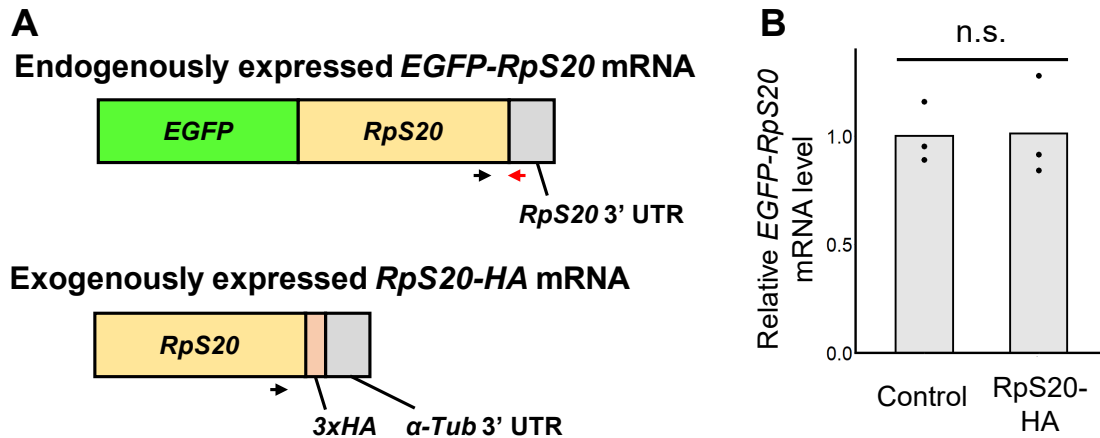


図 10 Rp レベルの恒常性制御はタンパク質レベルで起こる

(A) 内因性に発現する *EGFP-RpS20* mRNA のみを検出するための PCR 戦略。矢印は使用したプライマーを示す。

Forward (黒) : ATTACCTCCATCAACATCGAGCCCCG

Reverse (赤) : AGCACGCCAAACTTTTCGAGGTG

(B) 3 齢幼虫から抽出した全 mRNA を RT-qPCR にかけた。コントロールと比較した *RpS20* の相対 mRNA レベルを棒グラフで示す。黒い点は個々の測定値を、灰色の棒グラフは平均値を示す。n = 3; Welch's t test。

## リボソームタンパク質の異所的な強制発現はプロテアソーム分解によって内在性リボソームタンパク質レベルを減少させる

転写後調節によるタンパク質の減少は、主に翻訳の抑制もしくはタンパク質の分解促進で達成される。そこで、Rp を異所的に強制発現させた時に観察される内因性 Rp の減少が、プロテアソームによる分解で引き起こされるか検証した。そのためにまず、プロテアソーム構成因子のノックダウンでプロテアソーム活性が阻害されるか検討した。ポリユビキチン鎖が付加されたタンパク質はプロテアソームによって分解されるため、プロテアソームの活性阻害はポリユビキチン化タンパク質の細胞内での蓄積で判断できる。pouch 領域でプロテアソーム構成因子 *Regulatory particle non-ATPase 1 (Rpn1)* をノックダウンするとユビキチン化タンパク質が蓄積したことから (図 11)、プロテアソーム構成因子のノックダウンによってプロテアソーム活性を阻害できることが確認された。重要なことに、プロテアソーム構成因子である *Regulatory particle triple-A ATPase 2 (Rpt2)* または *Rpn1* をノックダウンしてプロテアソーム活性を阻害すると、RpS20-HA を強制発現させた場合の EGFP-RpS20 レベル (図 12A-D。図 12I で定量) と、RpL5-HA 強制発現させた場合の EGFP-RpL5 レベル (図 12E-H。図 12J で定量) の減少はともに抑制された。これらの結果は、Rp の異所的な強制発現がプロテアソームによる分解で内在性 Rp レベルの減少を引き起こすことを示唆している。

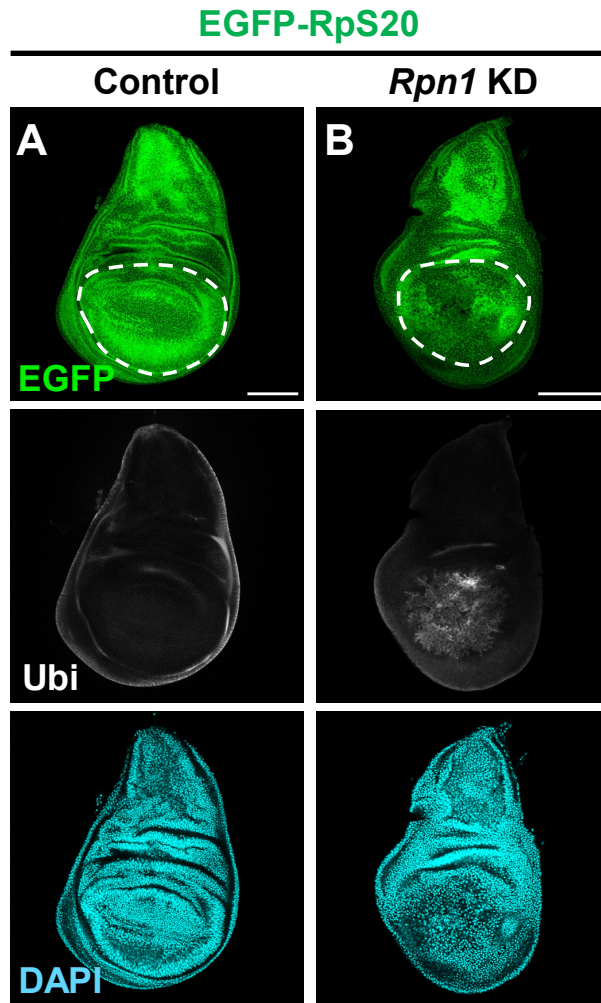
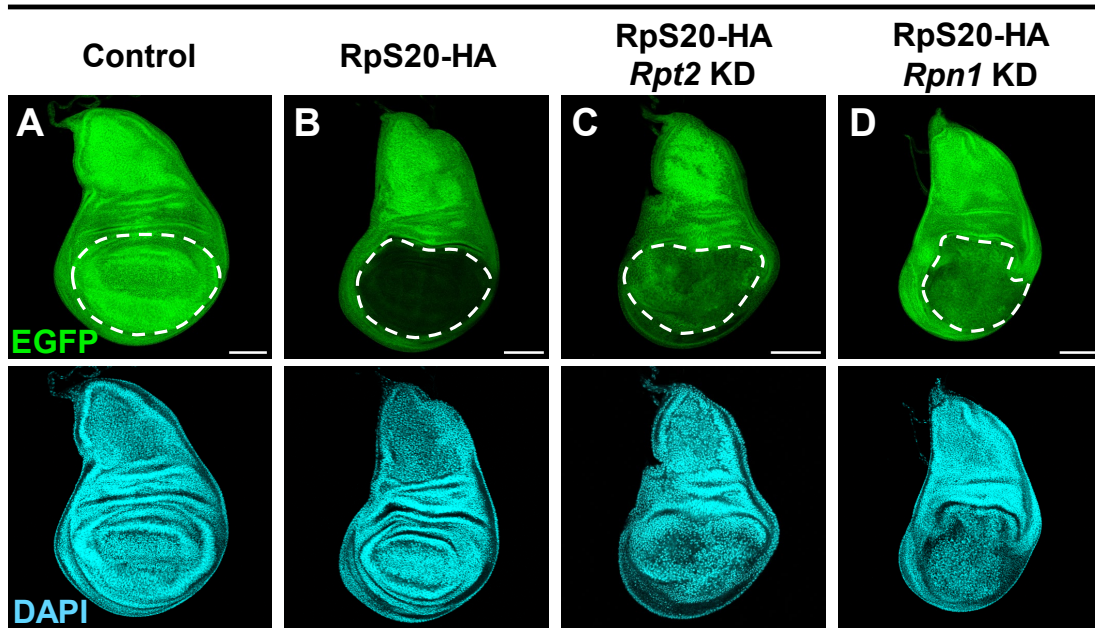


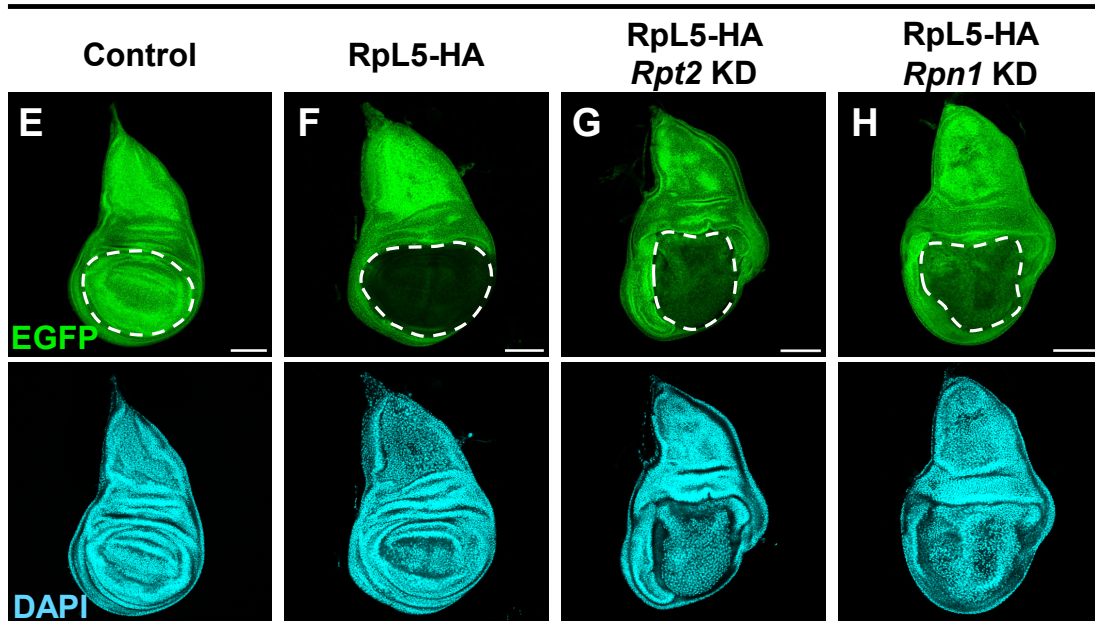
図 11 プロテアソーム構成因子のノックダウンは  
プロテアソーム活性を阻害する

(A、B) 内因性に発現した EGFP-RpS20 を持つ翅原基をユビキチン抗体で染色した。(B) では *nub-Gal4* を用いて pouch 領域特異的に *Rpn1* をノックダウンした。*nub* プロモーターが活性化される領域を破線で示す。核は DAPI で染色し、スケールバーは 100  $\mu$  m を示す。

EGFP-RpS20



EGFP-RpL5



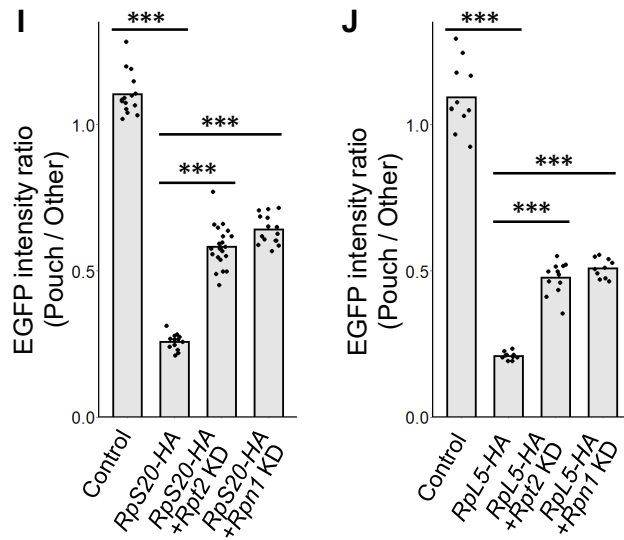


図 12 Rp の異所的な強制発現はプロテアソームによる分解で  
内在性 Rp レベルを減少させる

(A-D) 内因性に発現した EGFP-RpS20 を持つ翅原基。 *nub-Gal4* を用いて pouch 領域で RpS20-HA を強制発現し (B)、さらに *Rpt2* (C) または *Rpn1* (D) を同時にノックダウンした。 *nub* プロモーターが活性化される領域を破線で示す。核は DAPI で染色し、スケールバーは 100  $\mu$  m を示す。

(E-H) 内因性に発現した EGFP-RpL5 を持つ翅原基。 *nub-Gal4* を用いて pouch 領域で RpL5-HA を強制発現し (F)、さらに *Rpt2* (G) または *Rpn1* (H) を同時にノックダウンした。 *nub* プロモーターが活性化される領域を破線で示す。核は DAPI で染色し、スケールバーは 100  $\mu$  m を示す。

(I, J) EGFP-RpS20 (A-D。 I で定量) と EGFP-RpL5 (E-H。 J で定量) を持つ翅原基における、pouch 領域の EGFP 強度と他の領域の EGFP 強度の比率の定量を棒グラフで示す。黒い点は個々の測定値を示し、灰色の棒グラフは平均値を示す。\*\*\* $p < 0.001$ ; Steel-Dwass test。

## リボソームに組み込まれなかった遊離リボソームタンパク質はプロテアソームによって分解される

細胞内の RpS20 タンパク質として EGFP-RpS20 しか存在しない場合、すべてのリボソーム中には EGFP-RpS20 が取り込まれるが、RpS20-HA が Gal4/UAS システムによって強制発現された場合、EGFP-RpS20 と RpS20-HA のリボソームに取り込まれる効率が同等と仮定すると、リボソームには EGFP-RpS20 と RpS20-HA がその濃度比に従って取り込まれると予測される。そして細胞内には遊離状態になったタンパク質が生じるが、これがプロテアソームで分解されるという仮説を立て、最後にこの検証を行った。これまでのデータにおいて、RpS20-HA の強制発現によって EGFP-RpS20 は大きく減少していることから、まず、本当に Gal4/UAS システムによって、内因性の RpS20 より多量のタンパク質が発現するのか確認した。Rp の異所的な強制発現によって内因性 Rp タンパク質がプロテアソームによって分解されてしまうことから、タンパク質レベルでの比較が不可能であるため、RT-qPCR を行って mRNA レベルで比較した。具体的には、EGFP-RpS20 mRNA と RpS20-HA mRNA を合計した全 RpS20 mRNA が、Tub-Gal4 で RpS20 を強制発現させた際にどの程度増加するのかを確認した。全 RpS20 mRNA を検出するために、本実験では RpS20 のコーディング領域 (CDS) 内の領域を増幅するプライマーセットを用いた (図 13A)。その結果、Tub-Gal4 で RpS20 を強制発現させた系統では全 RpS20 mRNA 量が約 5.5 倍になったことから、Tub-Gal4 によって EGFP-RpS20 mRNA の約 4.5 倍の RpS20-HA mRNA が発現することが判明した (図 13B)。1:4.5 の割合で存在する EGFP-RpS20 mRNA と RpS20-HA mRNA が同じ効率で翻訳されると仮定した場合、細胞内で EGFP-RpS20 と RpS20-HA は 1:4.5 の割合で合成される。その場合、リボソームに組み込まれて分解を受けない EGFP-RpS20 は全 RpS20 の  $1/(1+4.5) \approx 18\%$  と予測できるが、これはウェスタンブロット解析のデータと大きく矛盾しない (図 8C)。



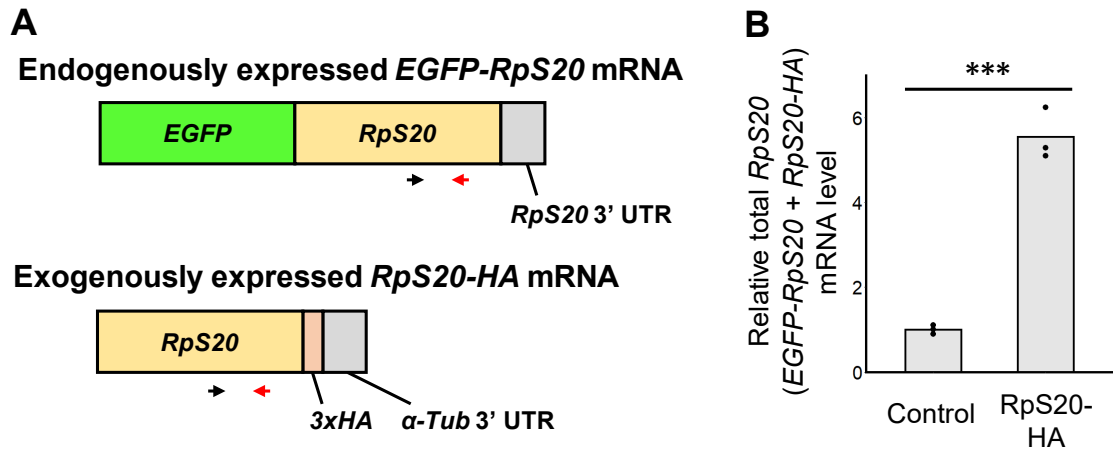


図 13 *Tub-Gal4* によって内在性 Rp より多量の Rp が発現する

(A) 内因性に発現する *EGFP-RpS20* mRNA と異所的に発現する *RpS20-HA* mRNA の両方を検出するための PCR 戦略。矢印は使用したプライマーを示す。

Forward (黒) : TGTGGTGAGGGTTCCAAGAC

Reverse (赤) : GACGATCTCAGAGGGCGAGT

(B) 3 齢幼虫から抽出した全 mRNA を RT-qPCR にかけた。コントロールと比較した *RpS20* の相対 mRNA レベルを棒グラフで示す。黒い点は個々の測定値を、灰色の棒グラフは平均値を示す。n = 3; \*\*\*p < 0.001; Welch's t test。

最後に、ポリソームプロファイリングとウェスタンブロット解析を行い、外因性 RpS20-HA を強制発現させた状態での EGFP-RpS20 と RpS20-HA の状態を調べた。リボソーム小サブユニットの構成因子である EGFP-RpS20 タンパク質は、通常は大部分が 80S リボソーム (図 14A、画分 6) に存在し、40S 小サブユニット (図 14A、画分 3) にはごく一部が存在し、遊離 EGFP-RpS20 (図 14A、画分 1) はほとんど存在しなかった (図 14A)。このとき RpS20-HA を強制発現させると、40S 小サブユニット (図 14B、画分 3) および 80S リボソーム (図 14B、画分 6) の EGFP-RpS20 の量が著しく減少し、RpS20-HA がコントロールにおける EGFP-RpS20 と似た分布で 40S 小サブユニットおよび 80S リボソーム中に取り込まれた (図 14B)。興味深いことに、RpS20-HA を強制発現させた状態では、細胞内に遊離 RpS20-HA が検出された (図 14B、画分 1)。このことは、ユビキチン・プロテアソーム系が過剰に合成された RpS20-HA によって過負荷になり、遊離 RpS20-HA を分解しきれないことを示唆している。

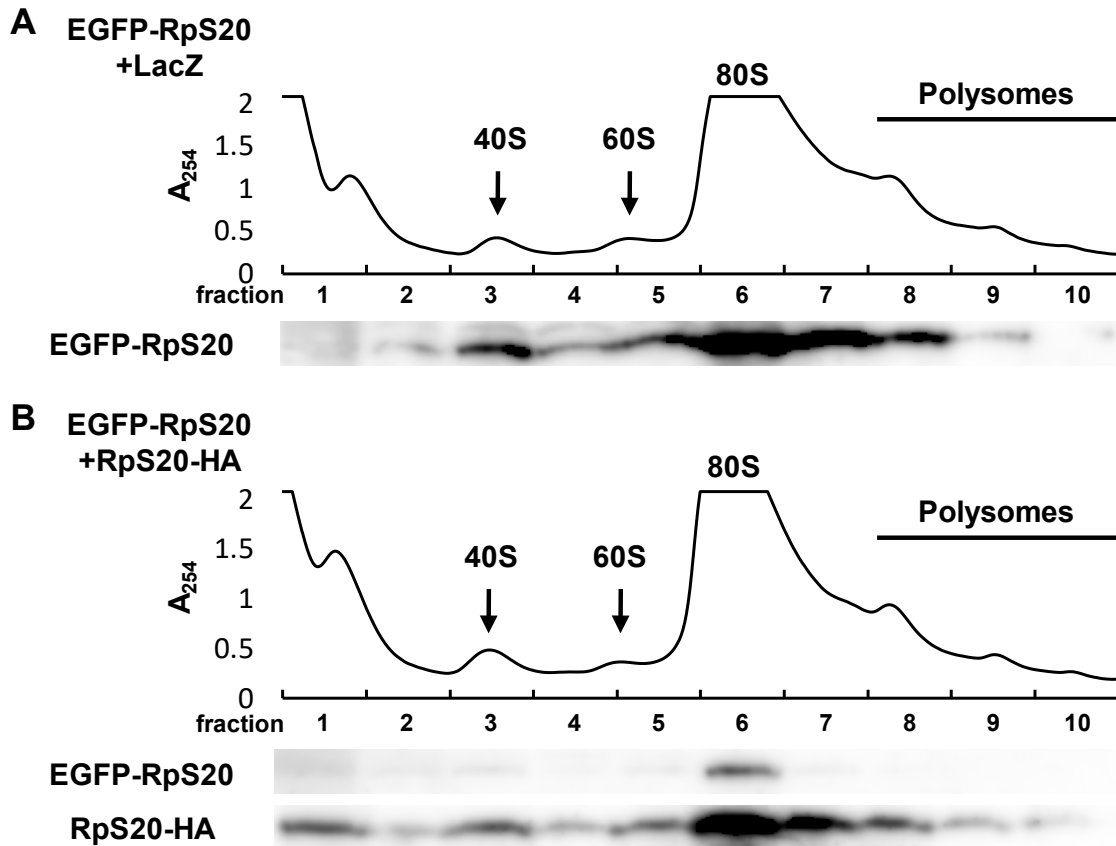


図 14 リボソーム中の内在性 Rp は異所的に発現した Rp で置換される (A および B) 3 齢幼虫からの抽出物のポリソームプロファイルとウェスタンブロット解析。グラフは 254nm の吸光度を示し、40S 小サブユニット、60S 大サブユニット、80S モノソーム、ポリソームの分布を矢印で示す。分画した抽出物を GFP 抗体と HA 抗体を用いたウェスタンブロット解析にかけた。

## 第4章 まとめと考察

本研究では、まずショウジョウバエ生体内における内因性 Rp を EGFP 融合タンパク質として検出できる系統を用い、Rp を異所的に強制発現させた場合の内因性 Rp レベルの反応を可視化する実験系を確立した。この系では、不死化培養細胞では不可能な、多細胞生物の正常細胞における細胞内 Rp レベルの恒常性制御を *in vivo* で調べることが可能である。この系を用いた遺伝学的解析により、異所的に強制発現させた RpS20 が内在性の RpS20 を、異所的に強制発現させた RpL5 が内在性の RpL5 のタンパク質レベルをそれぞれ減少させることが明らかになった (図 3、5)。そしてそのメカニズムは、細胞内でとある Rp が他の Rp より過剰に合成されると、リボソームに組み込まれない遊離 Rp が生まれ、それらがプロテアソームによって分解されるというものである (図 15)。重要なことに、ハウスキーピング遺伝子である Hsp83 では、そのような負の制御は起こらなかった (図 6)。このことは、細胞内の Rp の量が特異的に制御されていることを示唆している。

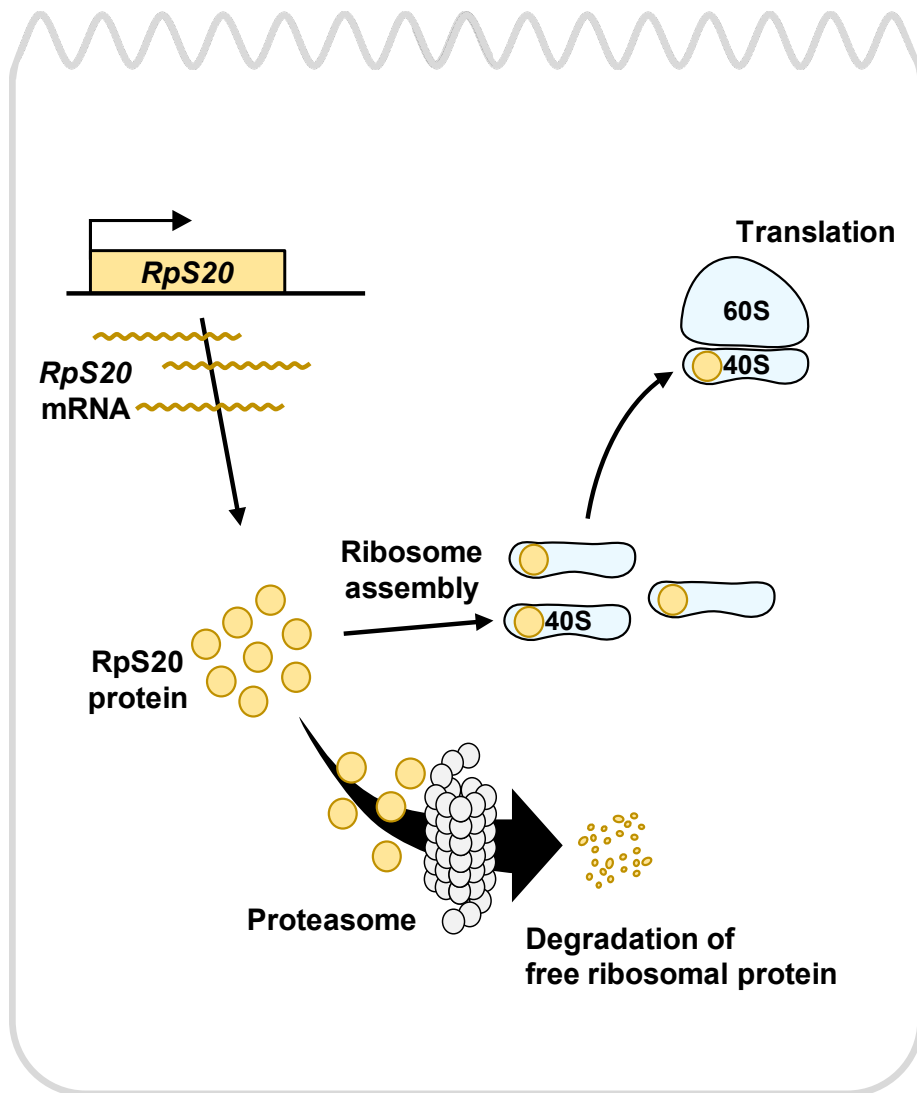


図 15 ショウジョウバエにおけるプロテアソーム分解による細胞内  
Rp レベルの恒常性制御モデル

他の Rp と等モル量の RpS20 タンパク質がリボソームの生合成に使用され、リボソームに組み込まれなかった遊離 RpS20 はプロテアソーム分解によって速やかに分解される。

過剰に合成された Rp が細胞内で速やかに分解される現象自体は半世紀ほど前に酵母で報告されていた (Gorenstein and Warner, 1977) が、その根本的なメカニズムは最近まで不明であった。真核細胞には、ミスフォールディングしたタンパク質を分解してタンパク質毒性ストレスを防ぐためのタンパク質品質管理 (PQC) システムが存在するが (Chen *et al.*, 2011)、最近の研究で、リボソームや核膜孔複合体などの複合体に取り込まれなかった構成因子タンパク質 (オーファンサブユニット) も PQC システムの対象となることが示された (Juszkiewicz and Hegde, 2018; Kong *et al.*, 2021)。rRNA が欠乏したり Rp 遺伝子の複製が挿入されたりなど、何らかの理由で細胞内に過剰な Rp が存在すると、HECT E3 酵素 Tom1 (酵母) や HUWE1 (哺乳類) がそれらを核内でユビキチン化してプロテアソーム分解に導く ERISQ (excess ribosomal protein quality control) と呼ばれる現象が起こる (Sung *et al.*, 2016a; Sung *et al.*, 2016b)。また別の研究グループにより、オーファンサブユニットの細胞質での分解に関与する E2/E3 ハイブリッド酵素 UBE2O が、Rp を標的とすることも *in vitro* アッセイで示された (Yanagitani *et al.*, 2021)。新規に合成された Rp はまず核内輸送を担うインポーチンに結合して核内に輸送されるが、UBE2O は核内に輸送されなかった Rp が暴露する並列した塩基性と疎水性のパッチを直接認識し、細胞質でユビキチン化する。余剰な Rp を分解するメカニズムが核内と細胞質の複数の場に備わっていることは、全ての Rp を等モル量に維持することが細胞にとって極めて重要であることを示唆している。

では、細胞内に過剰に存在する Rp を分解することの生理的意義は何だろうか。一般的に、巨大タンパク質複合体の構成因子は他のタンパク質との相互作用部位として疎水性パッチを有するが、複合体に組み込まれることでその領域を外界に晒すことはない。しかし遊離 Rp は細胞内で疎水性パッチを外界に晒しているため、それらが多量に存在すると凝集して細胞毒性ストレスを引き起こすことが考えられる。実際に、プロテアソーム阻害剤で処理した酵母では新たに合成された Rp が不溶性の凝集体を形成するという報告がある (Sung *et al.*, 2016a)。さらに、ショウジョウバエの RpS3 のヘテロ接合変異体では、プロテ

アソーム阻害剤であるボルテゾミブの投与によって細胞死が増加する (Baumgartner *et al.*, 2021)。RpS3 遺伝子の機能欠失変異をヘテロ接合に持つ細胞では、その他のスモールサブユニットタンパク質が機能的な RpS3 タンパク質と比較して過剰に合成され、遊離状態で存在する。それらは通常はプロテアソームによって分解されるが、プロテアソーム活性を阻害すると細胞内で凝集して強いタンパク質毒性ストレスがかかるようになり、細胞死が起こると考えられる。したがって、PQC システムによる過剰な Rp の分解はタンパク質毒性ストレスを予防している可能性が高い。また、Rp が持つ Extra-ribosomal Function の誤作動を防ぐ意義もあるかもしれない。Extra-ribosomal Function には、自身の合成量を調節する機能の他にも、細胞内シグナルなどに直接関与するものもある (Warner and McIntosh, 2009)。例えば RpS3 は DNA エンドヌクレアーゼとしての機能や NF $\kappa$ B への結合能を持っており (Wilson *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 2007)、また、哺乳類では核小体ストレスのエフェクター分子として複数の Rp が p53-MDM2 経路の制御に関与することが知られている (Deisenroth *et al.*, 2016)。余剰な Rp の分解によって、それらが適切な場面以外で機能してしまうことを防いでいるかもしれない。

動物の組織や個体レベルにおける過剰な Rp を分解する意義や、そのシステムが破綻した際に起こる現象にはまだ不明な部分が多い。興味深いことにショウジョウバエでは、Rp 遺伝子の機能欠失変異をヘテロ接合に持つ *Minute* 細胞が隣接する野生型細胞に積極的に排除される細胞競合がよく研究されてきたが、その生理的役割はまだほとんど解明されていない。本研究のデータから、Rp レベルの恒常性制御が破綻した細胞や Rp レベルの不均衡を解消しようとして PQC システムが過負荷になっている細胞が、細胞競合によって排除されているという仮説が立てられた。今後、Rp レベルの恒常性制御のメカニズムやその役割についてさらに研究が進むことで、細胞競合がどのように組織や動物の恒常性に寄与しているのかについての理解が大きく進展することが期待される。

## 参考文献

- Akai, N., Igaki, T., and Ohsawa, S. 2018. Wingless signaling regulates winner/loser status in *Minute* cell competition. *Genes Cells*, **23**: 234-240.
- Badis, G., Saveanu, C., Fromont-Racine, M., and Jacquier, A. 2004. Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol. Cell*, **15**: 5-15.
- Baumgartner, M.E., Dinan, M.P., Langton, P.F., Kucinski, I., and Piddini, E. 2021. Proteotoxic stress is a driver of the loser status and cell competition. *Nat. Cell Biol.*, **23**: 136–146.
- Brand, A.H. and Perrimon, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**: 401-415.
- Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T., and Frydman, J. 2011. Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**: a004374.
- Deisenroth, C., Franklin, D.A., and Zhang, Y. 2016. The Evolution of the Ribosomal Protein-MDM2-p53 Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**.
- Eng, F.J. and Warner, J.R. 1991. Structural basis for the regulation of splicing of a yeast messenger RNA. *Cell*, **65**: 797-804.
- Gabunilas, J. and Chanfreau, G. 2016. Splicing-Mediated Autoregulation Modulates Rpl22p Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.*, **12**: e1005999.
- Gorenstein, C. and Warner, J.R. 1977. Synthesis and turnover of ribosomal proteins in the absence of 60S subunit assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **157**: 327-332.
- Hay, B.A., Wolff, T., and Rubin, G.M. 1994. Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development*, **120**: 2121-2129.
- Ivanov, A.V., Malygin, A.A., and Karpova, G.G. 2005. Human ribosomal protein S26 suppresses the splicing of its pre-mRNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **1727**: 134-140.



- Juszkiewicz, S. and Hegde, R.S. 2018. Quality Control of Orphaned Proteins. *Mol. Cell*, **71**: 443-457.
- Kanda, Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.*, **48**: 452-458.
- Kim, H.D., Kim, T.S., Joo, Y.J., Shin, H.S., Kim, S.H., Jang, C.Y., Lee, C.E., and Kim, J. 2010. RpS3 translation is repressed by interaction with its own mRNA. *J. Cell. Biochem.*, **110**: 294-303.
- Kong, K.E., Coelho, J.P.L., Feige, M.J., and Khmelinskii, A. 2021. Quality control of mislocalized and orphan proteins. *Exp. Cell Res.*, **403**: 112617.
- Kongsuwan, K., Yu, Q., Vincent, A., Frisardi, M.C., Rosbash, M., Lengyel, J.A., and Merriam, J. 1985. A *Drosophila* Minute gene encodes a ribosomal protein. *Nature*, **317**: 555-558.
- Lam, Y.W., Lamond, A.I., Mann, M., and Andersen, J.S. 2007. Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr. Biol.*, **17**: 749-760.
- Lo Piccolo, L., Bonaccorso, R., and Onorati, M.C. 2015. Nuclear and Cytoplasmic Soluble Proteins Extraction from a Small Quantity of *Drosophila*'s Whole Larvae and Tissues. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**: 12360-12367.
- Marygold, S.J., Roote, J., Reuter, G., Lambertsson, A., Ashburner, M., Millburn, G.H., Harrison, P.M., Yu, Z., Kenmochi, N., Kaufman, T.C., Leever, S.J., and Cook, K.R. 2007. The ribosomal protein genes and *Minute* loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol.*, **8**: R216.
- Mikhaylina, A.O., Nikonova, E.Y., Kostareva, O.S., and Tishchenko, S.V. 2021. [Regulation of Ribosomal Protein Synthesis in Prokaryotes]. *Mol. Biol. (Mosk.)*, **55**: 20-41.
- Moldave, K. 1985. Eukaryotic protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**: 1109-1149.
- Montgomery, M.K. and Fire, A. 1998. Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. *Trends Genet.*, **14**: 255-258.

- Morata, G. and Ripoll, P. 1975. Minutes: mutants of drosophila autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.*, **42**: 211-221.
- Nagata, R. and Igaki, T. 2018. Cell competition: Emerging mechanisms to eliminate neighbors. *Dev. Growth Differ.*, **60**: 522-530.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**: 279-289.
- Narla, A. and Ebert, B.L. 2010. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*, **115**: 3196-3205.
- Noma, K., Goncharov, A., Ellisman, M.H., and Jin, Y. 2017. Microtubule-dependent ribosome localization in *C. elegans* neurons. *Elife*, **6**: e26376.
- Nomura, M., Yates, J.L., Dean, D., and Post, L.E. 1980. Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *Escherichia coli*: structural homology of ribosomal RNA and ribosomal protein mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**: 7084-7088.
- Ponton, F., Chapuis, M.P., Pernice, M., Sword, G.A., and Simpson, S.J. 2011. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, **57**: 840-850.
- Roy, B., Granas, D., Bragg, F., Jr., Cher, J.A.Y., White, M.A., and Stormo, G.D. 2020. Autoregulation of yeast ribosomal proteins discovered by efficient search for feedback regulation. *Commun Biol*, **3**: 761.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, **9**: 676-682.
- Schwarz, J.D., Lukassen, S., Bhandare, P., Eing, L., Snaebjornsson, M.T., Garcia, Y.C., Kisker, J.P., Schulze, A., and Wolf, E. 2022. The glycolytic enzyme ALDOA and

- the exon junction complex protein RBM8A are regulators of ribosomal biogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**: 954358.
- Sung, M.K., Porras-Yakushi, T.R., Reitsma, J.M., Huber, F.M., Sweredoski, M.J., Hoelz, A., Hess, S., and Deshaies, R.J. 2016a. A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *Elife*, **5**: e19105.
- Sung, M.K., Reitsma, J.M., Sweredoski, M.J., Hess, S., and Deshaies, R.J. 2016b. Ribosomal proteins produced in excess are degraded by the ubiquitin-proteasome system. *Mol. Biol. Cell*, **27**: 2642-2652.
- Takei, S., Togo-Ohno, M., Suzuki, Y., and Kuroyanagi, H. 2016. Evolutionarily conserved autoregulation of alternative pre-mRNA splicing by ribosomal protein L10a. *Nucleic Acids Res.*, **44**: 5585-5596.
- Wan, F., Anderson, D.E., Barnitz, R.A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L., Hegde, V., Lam, L.T., Staudt, L.M., Levens, D., Deutsch, W.A., and Lenardo, M.J. 2007. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell*, **131**: 927-939.
- Warner, J.R. 1977. In the absence of ribosomal RNA synthesis, the ribosomal proteins of HeLa cells are synthesized normally and degraded rapidly. *J. Mol. Biol.*, **115**: 315-333.
- Warner, J.R. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.*, **24**: 437-440.
- Warner, J.R. and McIntosh, K.B. 2009. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol. Cell*, **34**: 3-11.
- Wilson, D.M., 3rd, Deutsch, W.A., and Kelley, M.R. 1994. Drosophila ribosomal protein S3 contains an activity that cleaves DNA at apurinic/aprimidinic sites. *J. Biol. Chem.*, **269**: 25359-25364.
- Wilson, D.N. and Doudna Cate, J.H. 2012. The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**: a011536.

Yanagitani, K., Juskiewicz, S., and Hegde, R.S. 2017. UBE2O is a quality control factor for orphans of multiprotein complexes. *Science*, **357**: 472-475.

## 謝辞

本研究は、京都大学大学院生命科学研究科システム機能学分野において、井垣達史教授のご指導の下で行われました。学部の卒業研究で配属されてから8年間、本テーマを含む複数のテーマで様々な実験を行えたのはかけがえのない経験です。また、井垣教授には研究の進め方だけでなく、口頭発表や文書作成のノウハウのご指導を含め、最後までサポートをしていただきました。心より感謝申し上げます。

谷口喜一郎特定講師、中村麻衣博士にはショウジョウバエ研究の基礎手技やデータの解析等ご指導いただきました。また、菅田浩司准教授には、システム機能学分野に赴任される以前から実験等のアドバイスを、榎本将人助教、山銅ゆかり氏には、分子生物学的な実験のご指導をはじめ、多くの協力、助言を頂きました。名古屋大学大学院理学研究科の大澤志津江教授、システム機能学分野の卒業生を含むメンバーの皆様には、日々のディスカッション等でサポートを頂きました。深くお礼申し上げます。

京都大学大学院薬学研究科ナノバイオ医薬創成科学講座の米原伸教授には実験機器の使用をご快諾いただき、米原グループの皆様には使い方のご指導までしていただきました。さらに、重井医学研究所の松山誠博士には分子生物学的な実験のアドバイスを、京都大学大学院薬学研究科システムバイオロジー分野の三宅崇仁助教にはポリソームプロファイリングのご指導を頂きました。所属組織を超えてお力添えを頂き、深謝いたします。

最後に、家族や友人にはこれまで私を支えてくださったこと、感謝に堪えません。本当にありがとうございました。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Daiki Kitamura, Kiichiro Taniguchi, Mai Nakamura, Tatsushi Igaki

*In vivo* evidence for homeostatic regulation of ribosomal protein levels in *Drosophila*

Cell Structure and Function, 49: 11-20, 2024