

領域略称名：RNA 制御学

領域番号：3001

平成25年度科学研究費補助金「新学術領域研究
(研究領域提案型)」に係る事後評価報告書

「多様性と非対称性を獲得する RNA プログラム」

(領域設定期間)

平成20年度～平成24年度

平成25年 6月

領域代表者 (東北大学・薬学研究科・教授・稲田利文)

目 次

1. 研究領域の目的及び概要	3
2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況	5
3. 研究領域の設定目的の達成度	8
4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況	12
5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況	13
6. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）	14
7. 総括班評価者による評価	15
8. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	17
9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）	22
10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度	29

1. 研究領域の目的及び概要（2 ページ程度）

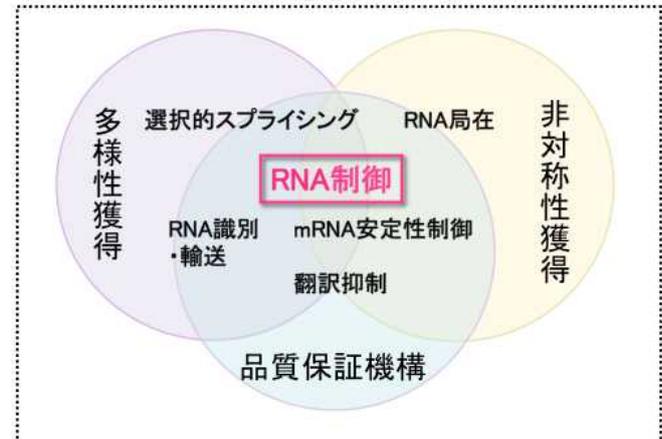
研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時に記述した内容を簡潔に記述してください。どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、研究の学術的背景（応募領域の着想に至った経緯、これまでの研究成果を進展させる場合にはその内容等）を中心に記述してください。

(1)本領域の目的

生物の持つ複雑で巧妙な形態・機能の獲得には、RNA 段階での遺伝子発現制御プログラムが重要な役割を果たす。すなわち、個体発生の過程において「①多様性獲得プログラム」(選択的スプライシング)により、細胞が担う多様な機能の獲得に必要な遺伝子産物自体の多様性が獲得される。また、様々な「②非対称性制御プログラム」(翻訳制御と共役した mRNA 局在、小分子 RNA による翻訳制御や mRNA 安定性制御)により、単一の受精卵から非対称な細胞群が生成される。さらに、「③品質保証プログラム」(mRNA サーベイランス機構等)による厳密な監視により、RNA レベルでの制御の正確性が保証される。

本領域では、複雑で巧妙な生命体構築の基本原則としての遺伝子産物の「非対称性」と「多様性」の獲得機構と、それを支える「品質保証」機構の理解を目的とし、その最も重要な分子基盤である『RNA プログラム』の分子機構の解明を目指す。また、RNA プログラムの知見をもとに、RNA 制御を介したより高次の細胞機能制御機構の理解を目指す。

「非対称性」と「多様性」を獲得するRNAプログラム



細胞運命の決定・細胞機能制御
個体発生・生物の多様性

(2)各 RNA プログラム解析の目的

【多様性獲得プログラム】多細胞生物の比較的少ない遺伝子からタンパク質発現の時間的・空間的多様性を生み出す「多様性獲得プログラム」の最も重要な機構が、mRNA 前駆体の選択的スプライシングである。しかし、ゲノムプロジェクトの進行に伴いゲノムの塩基配列がさまざまな真核生物種で明らかになっているにもかかわらず、我々の知識は生体内の各組織・細胞における mRNA アイソフォームを予測するには至っていない。本領域研究では、選択的スプライシングに関するシス配列・トランス因子の同定とその時空間的な制御機構の解明を目指す。

【非対称性獲得プログラム】個体発生の過程で生じる細胞の極性は、様々な「非対称性制御プログラム」により獲得される。例えば、ショウジョウバエの前後軸の形成や、生殖細胞形成に必須な因子である *nanos* や *oskar* は mRNA の状態で卵内に局在し、時空間的な翻訳制御を受けることによって機能を果たす。これらの mRNA は、タンパク質と細胞質 RNP 顆粒を形成して目的の部位に輸送され、翻訳制御を受ける。類似の細胞質 RNP 顆粒は神経細胞でも観察される。本領域研究では、生殖細胞形成や胚軸形成といった高次生命現象における RNA 局在と翻訳制御との連携の分子基盤を明らかにする。

【品質保証プログラム】生命現象の基盤となる正常な遺伝子発現は、様々な品質保証機構によって保証されている。DNA 上の変異やスプライシングのエラー等により合成される異常 mRNA の品質はリボソームにより感知され、異常な翻訳終結が引き金となって「mRNA 品質保証機構」が作動し、異常 mRNA の分解が促進される。例えば、ナンセンス変異を持った mRNA は、ヒトから酵母まで普遍的に存在するナンセンス依存分解系(NMD)により分解される。最近まで、異常 mRNA の分解のみが異常タンパク質の発現抑制を担うと考えられてきたが、翻訳アレストや異常タンパク質の分解も品質保証機構の上で重要であることが示された。本学術領域では、異常な翻訳によって作動する品質保証機構の全体像の理解を目的として、従来から解析されている異常 mRNA の認識と分解機構に加え、翻訳に共役した異常タンパク質の分解機構を明らかにする。

以上の 3 つの主要プログラムの融合領域として以下のような領域が重要である。上述の細胞質 RNP 顆粒は、mRNA 分解の場として同定された顆粒(P ボディ)との相同性が明らかとなり、RNA 局在・翻訳制御と分解(品質保証)が分かち難く連携していることが明らかになってきた。局在化し損なった RNA が分解されることで RNA が局在化する機構が知られ、miRNA によるポリ(A)鎖の短鎖化機構が必須な役割を果たす。また、ポリ(A)鎖の長さは、翻訳効率と mRNA 安定性の両方に極めて重要な役割を果たすため、これらのポリ(A)鎖の短鎖化機構と翻訳効率制御に焦点を当てた解析を行う。細胞質における mRNA の品質保証機構や局在化には、役割を果たす。また、ポリ(A)鎖の長さは、

翻訳効率と mRNA 安定性の両方に極めて重要な役割を果たすため、これらのポリ(A)鎖の短鎖化機構と翻訳効率制御に焦点を当てた解析を行う。細胞質における mRNA の品質保証機構や局在化には、核内でのプロセッシング反応が大きな役割を果たしている。例えば、RNA の核外輸送を担う因子群は、翻訳効率や mRNA の品質管理などの核外輸送後の RNA の運命決定にも大きく関与する。一方、イントロンを含む mRNA 前駆体などの未成熟 RNA の核内繫留機構や、核内の不良品 RNA を分解する品質保証機構の分子機構は不明である。本領域研究では、RNA の選択的分配制御が品質保証機構や遺伝子発現に果たす役割と分子機構を明らかにする。核内での RNA プロセッシング反応と下流の発現制御機構との連携を明らかにする為には、核内 RNA プロセッシング現象自体の解析が必須である。最近、培養細胞内で核内 RNA を高効率でノックダウンできる系が開発され、核内 RNA の機能探索を効率良く進めることが可能になった。本領域研究では、核内低分子 RNA が制御する RNA プロセッシング現象を同定し、その作用機構を解明する。

以上の様な RNA プログラム(mRNA 安定性や翻訳、mRNA 局在の制御機構)は、様々な細胞機能を制御する。例えば細胞形態は、分化や細胞周期などの細胞増殖のメカニズム、および栄養やストレスといった細胞内外の様々なシグナルに応答した制御をうける。この細胞形態制御において、RNA 局在や翻訳制御を介したシグナル伝達経路が重要な役割を果たす。本領域では、mRNA 結合タンパク質による細胞統御の分子メカニズムの解明を行う。また、ウイルスは宿主細胞の機能を巧みに利用することで増殖する。一方、宿主細胞は RNA センサー分子により外来 RNA を検知し自然免疫系を作動させウイルスに対抗する。最近、RNA センサー分子による内在性 RNA の制御機構も、自然免疫系の作動に重要であることが明らかになってきた。本領域では、代表的な RNA センサーである RIG-I ヘリカーゼファミリー分子群に焦点をあて、内在性の標的 RNA の同定とその制御の生理的意義を解析し、生体防御の全体像を理解することを目的とする。

(3) 学術水準の向上・強化への予想される寄与

遺伝子産物の「非対称性」と「多様性」を獲得する機構と、その基盤となる遺伝子産物の「品質保証」機構の研究について、本領域による各研究者間の研究手法や材料、アイデアの交換を自由に行うことで、当該分野研究の飛躍的な発展が見込まれる。RNA プログラム(mRNA 局在・翻訳・分解制御の連携、品質保証機構)は生命体構築の基本原理であり、その分子機構の解析が RNA 関連の疾病の理解と治療に貢献してきている。実際、ナンセンス変異が原因でおこる遺伝病の治療薬が、ナンセンス変異での翻訳終結を阻害する化合物のスクリーニングにより発見されている。RNA が関連する様々な疾病の治療薬の開発に、本領域での研究が大きく貢献することは間違いないものとする。また、RNA サイレンシングは、最も競争の激しい研究分野の1つであるが、翻訳制御や mRNA 安定性制御の分子機構自体の理解なしにはその進展は不可能であり、本領域研究における解析は RNA サイレンシングの分子機構研究の理解、さらに小分子 RNA が関係する様々な疾病の理解と治療法の確立にも大きく貢献するものとする。

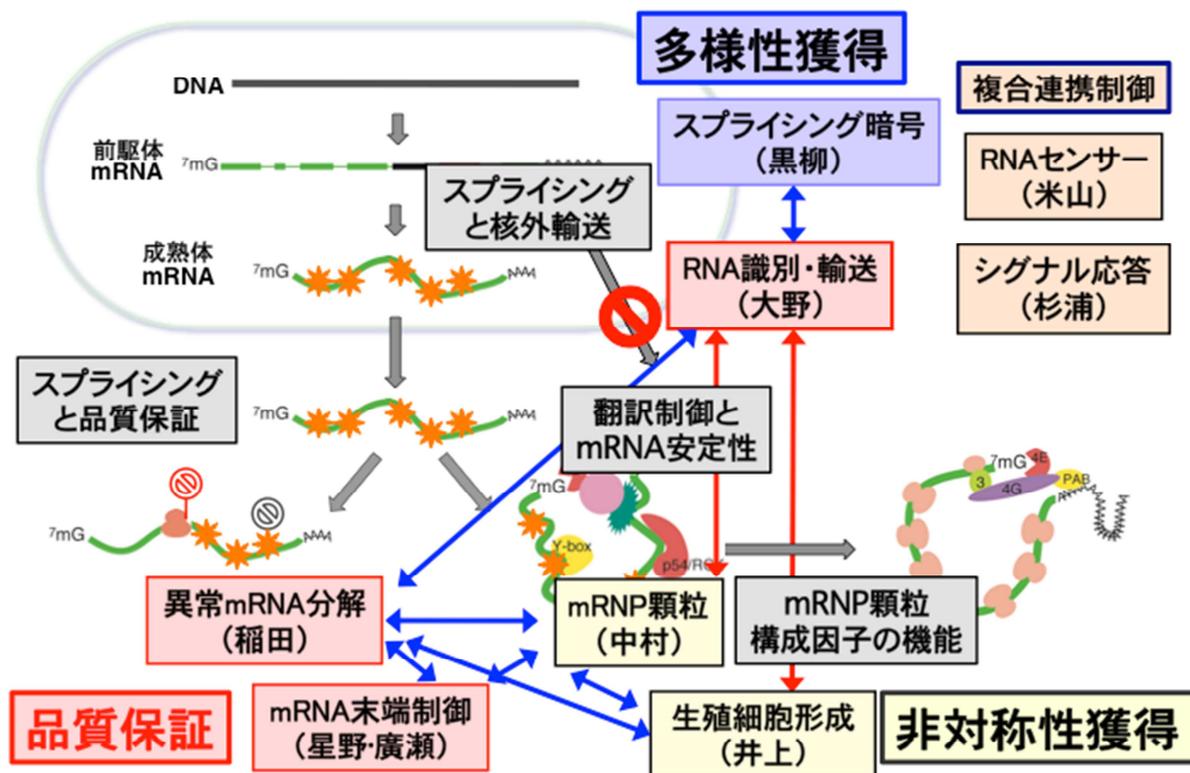
2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況（2 ページ程度）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、どのように研究組織間の連携や計画研究と公募研究の調和を図ってきたか、図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

発生・分化の基本原理としての「非対称性」と遺伝子産物の「多様性」の獲得原理の理解には、RNA レベルでの制御（RNA プログラム）を包括的に解析する必要がある。本領域では、個々の現象の専門家集団が適正な規模で研究を行いながらグループを形成し、手法・材料や情報を共有しながら交流を行った。分子・細胞レベルから遺伝学を用いた高次生命現象解析まで、幅広いアプローチで RNA 研究を展開させ必要に応じて共同研究を進展させた。

多様性獲得プログラムの解明は、黒柳班員（スプライシング暗号解読）と井上・大野班員（新規スプライシング機構）が主に担当した。非対称性獲得プログラムの解明は、中村班員と（生殖細胞の形成における mRNA 顆粒構成因子の機能解明）、井上班員（生殖細胞形成機構）が担当した。また RNA の核外輸送も RNA 非対称獲得機構の1つであり、大野班員（RNA 識別・輸送機構）が担当した。mRNA 品質管理機構は、稲田班員（異常 mRNA 認識・分解機構）が担当し、関連する mRNA 末端制御機構について星野班員と廣瀬班員が担当した。RNA プログラムによって制御される生命現象の解明は、米山班員（自然免疫応答の RNA センサー）と杉浦班員（シグナル応答と RNA 制御）が担当した。下図に計画研究間の共同研究や材料・情報提供等について青線で、原著論文を発表した共同研究について赤線で示す。

各計画研究間の相互連携



また、計画研究では網羅しきれない研究課題を公募研究として採択した結果、計画研究との共同研究や公募研究同士の積極的な共同研究が行われた。支援班で行った質量分析（中村班員）とポリソーム解析（稲田班員）によって、複数の原書論文が発表された。以下に本領域内の連携について示す。

(1) 総括班 支援班活動

①リボソーム解析 担当・稲田班員

杉浦麗子 (計) : Nrd1 など各種 mRNA 結合蛋白質による翻訳制御の解析

吉久 徹 (公) : Rlg1 による Hac1 翻訳制御の解析 (*Mol. Biol. Cell*, 2010)

出芽酵母における小胞体ストレス応答 (UPR) は、*HAC1* mRNA の細胞質スプライシングを鍵反応として制御される。小胞体への異常タンパク質の蓄積は、エンドヌクレアーゼである Ire1p を活性化し、細胞質ポリソーム上に保持された *HAC1* mRNA 前駆体 (*HAC1^u* mRNA) のスプライシングを起動する。生じたエクソンは、tRNA の RNA ライゲース Rlg1p によって連結され、成熟体 mRNA (*HAC1ⁱ* mRNA) となる。ポリソーム上にありながら、*HAC1^u* mRNA は翻訳停止状態にあり、*HAC1ⁱ* mRNA に成熟化してはじめて翻訳が可能となる。この翻訳抑制には *HAC1^u* mRNA の 5' UTR とイントロンの間の塩基対形成が重要であるが、スプライシング後の翻訳再開メカニズムは不明であった。吉久班員は、植物由来の Rlg1p (AtRlg1p) で出芽酵母の Rlg1p を代替した株の解析から、この過程にスプライシング酵素である Rlg1p 自身が関与することを明らかにし、Rlg1p を含む特殊な mRNP を形成することで *HAC1* mRNA は、その翻訳抑制の解除を可能にしていることを示した。

②質量分析 担当・中村班員

稲田利文 (計) : 停滞したリボソームを解消する Dom34/Hbs1 と共同で働く因子の同定

井上邦夫 (計) : スプライシング複合体新規因子候補の同定

大野睦人 (計) : 核外輸送に先立って RNA の長さを測る候補因子の同定 (*Science* 2012)

北島 真 (公) ・大野睦人 (計) : 機能不全リボソーム粒子上で特異的にユビキチン化される蛋白質の解析

杉浦麗子 (計) : 出芽酵母 Pek1 複合体構成因子の網羅的同定

米山光俊 (計) : RLR 及びミトコンドリアの細胞内ダイナミクスに關与する分子の同定

河原行郎 (公) : 新規 RNA 結合蛋白質 TDP-43 と複合体を形成する因子の同定

(2) 共同研究

石井浩二郎 (公) x 谷 時雄 (公) : 分裂酵母 RNA スプライシング変異株における siRNA 生合成等

稲田利文 (計) x 星野真一 (計) : 培養細胞での翻訳アレストにおける RACK1 の機能

井上邦夫 (計) x 大野睦人 (計) : U1 snRNP に依存しないスプライシング機構 (*Nucleic Acids Res.* 2009)

井上邦夫 (計) x 谷 時雄 (公) : 天然化合物による小分子 RNA 生合成阻害効果の検討

大野睦人 (計) x 片岡直行 (公) : イントロン内にコードされる miRNA 生合成経路など (*Nucleic Acids Res.* 2009)

北島 真 (公) x 吉久 徹 (公) : 酵母における tRNA イントロン除去メカニズム

北島 真 (公) x 武藤 裕 (公) : rRNA/mRNA 品質管理に必要なユビキチン機構

杉浦麗子 (計) x 谷 時雄 (公) : ストレス条件下における RNP 動態変化

中村 輝 (計) x 後藤 聡 (公) : 高次生命現象における新規膜輸送関連遺伝子の機能解析 (*PLoS ONE* 2009)

星野真一 (計) x 脇山素明 (公) : RISC 構成因子とポリ A 短縮化を結びつける分子基盤

米山光俊 (計) x 山下暁朗 (公) : ストレス顆粒に局在する RNP の同定

(3) 実験試料・技術の提供や助言など

稲田利文 (計) > 廣瀬哲郎 (計) : RNA 細胞内分布解析のためのショ糖密度勾配遠心の技術的助言

稲田利文 (計) > 吉久 徹 (公) : ポリソーム解析に関する助言、および実験試料の提供

稲田利文 (計) ・吉久 徹 (公) > 入江賢児 (公) : 出芽酵母 mRNA 安定性制御機構解析等に関する助言

大野睦人 (計) > 片平じゅん (公) : TREX 複合体解析のため、キャップ結合蛋白質の抗体供与

片平じゅん (公) > 河原行郎 (公) : RNA 編集の解析のため、神経系腫瘍細胞株 Neuro2a 供与

木俣行雄 (公) > 入江賢児 (公) : 出芽酵母小胞体ストレスに関するプラスミド・抗体の供与

黒柳秀人 (計) > 片岡直行 (公) : 選択的スプライシングの生細胞内レポーターに関する情報提供等

千葉由佳子 (公) > 平山隆志 (公) : 植物 mRNA 分解制御因子の破壊株・遺伝子に関する情報提供

中村輝 (計) > 井上邦夫 (計) : ホヤ生殖顆粒構成因子 Tdrd7 蛋白質の抗体供与

廣瀬哲郎 (計) > 大野睦人 (計) : 核内 RNA ノックダウン法に関する技術指導

星野真一 (計) > 杉浦麗子 (計) : P ボディ構成因子 Dcp1 ノックアウト細胞やプラスミドの供与

以下に研究代表者・分担者・連携研究者と研究課題名について記載する。緑色は総括班メンバーを示す。

計画・公募	氏名	機関・所属	研究課題	年度(平成)
計画・代表	稲田 利文	名古屋大学大学院理学研究科(現:東北大学大学院薬学研究所)	遺伝子発現の正確性を保証するmRNA品質管理機構	20-24
計画・代表	中村 輝	理化学研究所(現:熊本大発生医学研究所)	mRNA局在と翻訳制御における細胞質RNP顆粒動態	20-24
計画・代表	大野 睦人	京都大学ウイルス研究所	核と細胞質間のRNA分配制御	20-24
計画・代表	井上 邦夫	神戸大学大学院理学研究科	mRNA制御システムによる生殖細胞形成機構	20-24
計画	黒柳 秀人	東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所	タンパク質の多様性の鍵となるスプライシング暗号解読	20-24
計画・代表	星野 真一	名古屋大学大学院薬学研究所	mRNA3'末端プロセッシングを標的とした遺伝子発現調節・RNA品質管理機構の解明	20-24
計画・分担	廣瀬 哲郎	(独)産業技術総合研究所	mRNA3'末端プロセッシングを標的とした遺伝子発現調節・RNA品質管理機構の解明	20-22
計画・代表	杉浦 麗子	近畿大学薬学部	mRNA結合タンパク質による細胞統御のメカニズム	20-24
計画・代表	米山 光俊	京都大学ウイルス研究所(現:千葉大学真菌医学研究センター)	ウイルスRNAセンサーによるRNA識別と細胞機能制御	20-24
公募・代表	片岡 直行	東京医科歯科大学難治疾患研究所(現:京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター)	スプライシング異常に起因する「RNA病」の解明と治療	21-24
公募・代表	片平 じゅん	大阪大学大学院生命機能研究科	核内におけるmRNA生合成過程の共役機構の解明	21-24
公募・代表	河原 行郎	大阪大学大学院医学系研究科遺伝子機能制御学	ALSの病態解明に向けたRNA結合蛋白質TDP-43及びFUSの網羅的機能解析	21-24
公募・代表	北畠 真	京都大学ウイルス研究所	機能不全リボソームRNAを選択的に認識する因子の同定	21-24
公募・代表	後藤 聡	慶応大学医学部(現:立教大学理学研究科)	mRNAの局在による膜蛋白質の翻訳後修飾の制御	21-24
公募・代表	谷 時雄	熊本大学大学院自然科学研究科	スプライシング/mRNA核外輸送装置によるクロマチンサイレンシングの多元的制御	21-24
公募・代表	西田 宏記	大阪大学大学院理学研究科	RNAを娘細胞に不均等に分配する二種類のメカニズムの解析	21-24
公募・代表	平山 隆志	岡山大学資源植物科学研究科	植物のミトコンドリアmRNA制御機構の解明	21-24
公募・代表	武藤 裕	理化学研究所横浜研究所	スプライシング制御因子のRNA認識における柔軟性の構造生物学的研究	21-24
公募・代表	吉久 徹	名古屋大学物質科学国際研究センター(現:兵庫県立大生命理学研究科)	細胞質スプライシングをうけるHAC1mRNAは品質管理機構をどう回避するか?	21-24
公募・代表	飯田 哲史	情報システム研究機構国立遺伝学研究所	RNAを介した細胞周期チェックポイント制御機構の解明	21-22
公募・代表	石井 浩二郎	大阪大学大学院生命機能研究科	染色体構築の多様性を生み出すRNAプログラムの解明	21-22
公募・代表	稲垣 幸	岡崎統合バイオサイエンスセンター	PiwiとpiRNAによる生殖幹細胞の非対称性制御	21-22
公募・代表	入江 賢児	筑波大学大学院人間総合科学研究科	RNA結合タンパク質Khd1による時間的・空間的mRNA安定性制御機構	21-22
公募・代表	尾之内 均	北海道大学大学院農学研究院	新生ベプチドによる翻訳アレストと連携したRNA制御機構	21-22
公募・代表	木俣 行雄	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科	ストレスセンサーIre1標的分子など核・サイトゾル蛋白質mRNAの膜局在	21-22
公募・代表	小嶋 徹也	東京大学大学院新領域創成科学研究科	RNA制御による組織の領域化メカニズム	21-22
公募・代表	高木 新	名古屋大学大学院理学研究科	形態形成シグナルによる翻訳制御の研究	21-22
公募・代表	千葉 由佳子	北海道大学創成研究機構	低温ストレス応答におけるRNA制御システム	21-22
公募・代表	Penmetcha	産業技術総合研究所	ウイルスRNAの組織間トラフィックを可能にする多様な変異に関する研究	21-22
公募・代表	松尾 拓哉	名古屋大学遺伝子実験施設	生物時計によるRNA制御機構	21-22
公募・代表	眞部 孝幸	藤田保健衛生大学総合医科学研究科	統合失調症における髄鞘の分化・発達異常と選択的スプライシング因子hnRNPA1	21-22
公募・代表	山下 朗	東京大学大学院理学系研究科	RNA結合タンパク質による減数分裂特異的遺伝子発現パターン形成機構	21-22
公募・代表	脇山 素明	理化学研究所	microRNPIによるmRNAの選択的なたアデニル化と発現制御	21-22
公募・代表	今高 寛晃	兵庫県立大学大学院工学研究科	ウイルスゲノムRNAの品質管理: 翻訳・転写・粒子形成の密接な関わり	23-24
公募・代表	尾林 栄治	島根大学医学部病態生化学	U2AF複合体によるイントロン認識機構の構造生物学的研究	23-24
公募・代表	榊 建二郎	東京女子医科大学医学部	細胞内品質管理ネットワークにおけるmRNA—小胞体間での品質管理連携機構の解明	23-24
公募・代表	柴田 典人	京都大学理学部・再生生物学特別講座	細胞の全能性を制御するRNA機構の解明	23-24
公募・代表	鈴木 勉	東京大学大学院工学系研究科	ベプチルtRNAの脱落と新規翻訳制御機構の提唱	23-24
公募・代表	鈴木 敦	横浜国立大学工学研究院	マウス生殖細胞の雄性分化を制御するRNA分子機構	23-24
公募・代表	鈴木 洋	東京大学医学系研究科 病因・病理専攻分子病理学	低分子RNAの生合成機構の多様性と病態形成での役割に関する研究	23-24
公募・代表	高岡 晃教	北海道大学遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野	ウイルスRNAと宿主RNAによって調節される細胞機能制御のメカニズム	23-24
公募・代表	富田(竹内)野乃	東京大学大学院新領域創成科学研究科	リボソーム依存GTPaseを介した翻訳制御とRNA品質管理の連携機構	23-24
公募・代表	富岡 征大	東京大学大学院理学系研究科	選択的スプライシングを介する神経細胞の個性獲得メカニズムの解析	23-24
公募・代表	前田 明	藤田保健衛生大学総合医科学研究科	mRNAの再スプライシング現象から探る未知のmRNA品質管理機構	23-24
公募・代表	増田 誠司	京都大学大学院生命科学研究所	細胞核mRNA制御プログラムとしてのmRNA輸送体多様化機構の解明	23-24
公募・代表	山下 暁朗	横浜市立大学医学部 分子細胞生物学教室	異常終止コドン認識複合体の構造機能解析	23-24

3. 研究領域の設定目的の達成度（3 ページ程度）

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、どの程度達成できたか、また、応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らしての達成度合いについて、具体的に記載してください。必要に応じ、公募研究を含めた研究項目毎の状況も記述してください。

本領域では、複雑で巧妙な生命体構築の基本原則としての遺伝子産物の「非対称性」と「多様性」の獲得と、それを支える「品質保証」機構の理解を目的とし、その最も重要な分子基盤である『RNA プログラム』の分子機構の解明を目指す。また、RNA プログラムの知見をもとに、RNA 制御を介したより高次の細胞機能制御機構の理解を目指した。3つ RNA プログラムの解析と融合領域課題について、当初の設定目的と領域設定期間内の達成度を記載する。

(1) 多様性獲得プログラム

【設定目的】

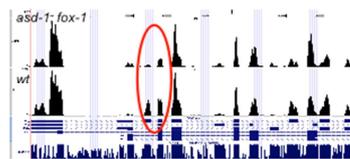
多細胞生物の比較的少ない遺伝子からタンパク質発現の時間的・空間的多様性を生み出す「多様性獲得プログラム」の最も重要な機構が、mRNA 前駆体の選択的スプライシングである。しかし、ゲノムプロジェクトの進行に伴いゲノムの塩基配列がさまざまな真核生物種で明らかになっているにもかかわらず、我々の知識は生体内の各組織・細胞における mRNA アイソフォームを予測するには至っていない。本領域研究では、選択的スプライシングに関するシス配列・トランス因子の同定とその時空間的な制御機構の解明を目指す。

【達成度】

黒柳計画班員は、線虫 *C. elegans* の選択的スプライシング制御因子の変異体を用いて RNA-seq 法によって、制御因子の標的遺伝子とシスエレメントの網羅的探索を行った。得られた候補遺伝子を、選択的スプライシングレポーター作製法を用いて解析した (*Nature Protocols* 2010)。この情報を基盤として、筋肉組織特異的スプライシング因子や神経系特異的スプライシング制御因子による選択的スプライシング制御を新規に見出した (*PLoS Genet.* 2012; *PLoS Genet.* 2013)。また、神経系特異的な CELF ファミリースプライシング制御因子 UNC-75 のシスエレメントを特定して、シスエレメントと標的エクソンの相対的な位置関係により UNC-75 の効果が逆転することを明らかにした (*Nucleic Acids Res.* 2013)。この成果は、「mRNA アイソフォームを予測する」という当初目的のための重要な一歩で、他の組織特異的な制御因子についても同様の解析を進めており、組織特異的選択的スプライシングの制御機構の理解が飛躍的に進んだ。また井上・大野計画班員は、5'スプライス部位の認識に必須な U1 snRNP 非依存の新規スプライシング機構も見出した (*Nucleic Acids Res.* 2009)。

多様性獲得

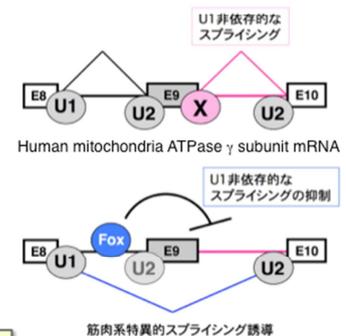
スプライシング暗号の 解読に向けて



RNA-seq法による標的遺伝子とシスエレメントの網羅的探索 (*Nucleic Acids Res* 2013)

選択的スプライシング解析用レポーター系の構築と制御因子の同定
黒柳 *Nature Protocols* (2010); *PLoS Genetics* (2012)

新規スプライシング制御機構の発見



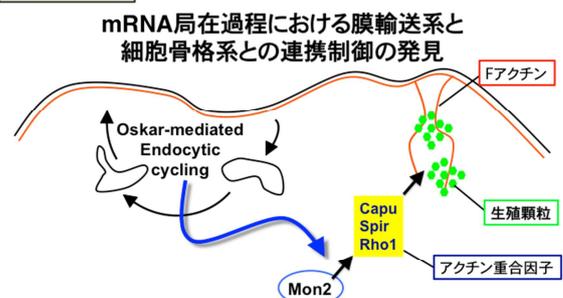
U1非依存的スプライシングの発見
井上・大野 *Nucleic Acids Res* (2009)

(2) 非対称性獲得プログラム

【設定目的】

個体発生の過程で生じる細胞の極性は、様々な「非対称性制御プログラム」により獲得される。例えば、ショウジョウバエの前後軸の形成や、生殖細胞形成に必要な因子である *nanos* や *oskar* は mRNA の状態で卵内に局在し、時空間的な翻訳制御を受けることによって機能を果たす。これらの mRNA は、タンパク質と細胞質 RNP 顆粒を形成して目的の部位に輸送され、翻訳制御を受ける。類似の細胞質 RNP 顆粒は神経細胞でも観察される。本領域研究では、生殖細胞形成や胚軸形成といった 高次生命現象における RNA 局在と翻訳制御との連携の分子基盤を明らかにす

非対称性獲得



生殖質の卵母細胞後極への繫留における細胞極性、RNA局在、エンドソーム経路、アクチン制御因子の連携制御
中村 *Development* (2011a,b); *J. Cell Sci.* (2012)

る。

【達成度】

中村計画班員は、ショウジョウバエ生殖質の動態解析を進め、新たな RNA 制御機構を見出した。mRNA の局在と翻訳制御を行う RNP 複合体の因子である Edc3 の機能解析から、RNP 複合体の構成タンパク質の動的制御の重要性を浮き彫りにした。また、生殖質繫留過程の解析から、膜輸送系とアクチン骨格系の制御を介した RNP の局在維持機構を明らかにした (*Development* 2011)。西田公募班員は、ホヤの胚発生における中内胚葉の分離に必須の転写因子をコードする *Not* mRNA について、核移動と連携した mRNA の非対称分配機構を明らかにした (*Dev. Cell* 2012)。井上計画班員は、生殖細胞・体細胞の分化確立に働く miRNA 制御システムを解析し、RNA 結合蛋白質 DAZL が *tdrd7* mRNA の 3'UTR に結合し、ポリ A 鎖伸長化を促進することによって miRNA による抑制を生殖細胞のみで解除することを発見した (*PLoS ONE* 2009)。

(3) 品質保証プログラム

【設定目的】

生命現象の基盤となる正常な遺伝子発現は、様々な品質管理機構によって保証されている。DNA 上の変異やスプライシングのエラー等により合成される異常 mRNA の品質はリボソームにより感知され、異常な翻訳終結が引き金となって「mRNA 機構」が作動し、異常 mRNA の分解が促進される。例えば、ナンセンス変異を持った mRNA は、ヒトから酵母まで普遍的に存在するナンセンス依存分解系(NMD)により分解される。最近まで、異常 mRNA の分解のみが異常タンパク質の発現抑制を担うと考えられてきたが、翻訳アレストや異常タンパク質の分解も機構の上で重要であることが示された。本学術領域では、異常な翻訳によって作動する機構の全体像の理解を目的として、従来から解析されている異常 mRNA の認識と分解機構に加え、翻訳に共役した異常タンパク質の分解機構を明らかにする。

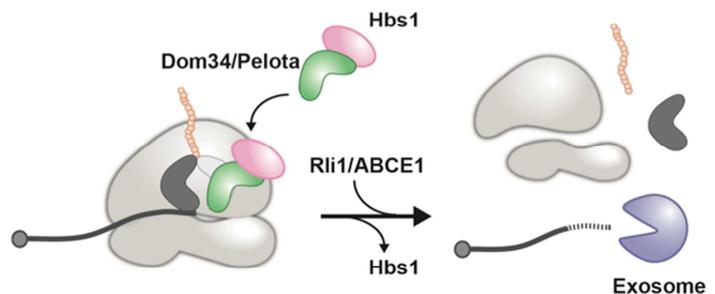
【達成度】

稲田計画班員は、細胞内の主要な異常 mRNA である終止コドンを持たないノンストップ mRNA の機構について解析を行い、①新規翻訳因子複合体 Dom34/Hbs1 複合体の構造を基盤とした終止コドン非依存の翻訳終結反応における機能解明 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)、②連続した塩基性アミノ酸残基による翻訳伸長阻害 (アレスト) における 40S サブユニット結合因子 RACK1 の機能 (*EMBO Rep.* 2010)、③リボソーム結合 E3 ユビキチンライゲース Not4 の翻訳伸長阻害に伴う新生ポリペプチド分解促進における新規機能 (*J. Biol. Chem.* 2009) を見出した。さらに、Dom34/Hbs1 複合体がノンストップ mRNA の末端で停滞したリボソームを解離することでエキソソームによるノンストップ mRNA の迅速な分解を引き起こすことを解明した (*Mol. Cell* 2012)。以上の結果は、細胞内の主要な異常 mRNA であるノンストップ mRNA の品質管理機構の理解に大きく貢献し、国際的にも評価された。また、名古屋大学・遠藤研究室との共同研究により、ミトコンドリアや小胞体の mRNA がノンストップになった場合に、トランスロコンに異常タンパク質が繫留されることを防止する品質管理機構として Dom34/Hbs1 複合体が極めて重要な役割を果たすことを示した (*Cell Rep.* 2012)。また、異常な位置に終止コドンを持つ異常 mRNA の機構について解析を行い、Upf 複合体による短鎖型異常タンパク質の分解促進機能 (*EMBO Rep.* 2009)、等を明らかにし、mRNA 分解にとどまらない品質管理機構の全体像の理解に大きく貢献した。

大野計画班員と北畠公募班員は、機能不全の rRNA の機能不全の機構を解析した。rRNA を持つリボソームは翻訳によって異常と認識され、その rRNA は迅速に分解される (nonfunctional rRNA decay; NRD)。出芽酵母で 25S の NRD に Mms1 と Rtt101 が必要であり、これらを含むユビキチンリガーゼ複合体が、機能不全リボソームをユビキチンすることを発見した (*Genes Dev.* 2009; *EMBO J.* 2012)。以上の研究成果は異常 rRNA の認識と分解機構の理解に非常に大きく貢献した。

品質管理

普遍的な品質管理因子の機能解明



品質管理機構における Dom34:Hbs1 の普遍的な機能
稲田 *EMBO Rep* (2010); *PNAS* (2010); *Mol Cell* (2012)
品質管理機構における異常タンパク質分解の普遍的な機能
稲田 *EMBO Rep* (2009); *JBC* (2009)
Cell Reports (2012)

(4) 核内 RNA プロセッシング反応と下流の発現制御機構との連携

【設定目的】

RNA の核外輸送を担う因子群は、細胞質における mRNA の品質保証機構や局在化などの核外輸送後の RNA の運命決定にも大きく関与する。本領域研究では、RNA の核外輸送を担う因子を同定し、さらに新規核外輸送因子が品質保証機構や遺伝子発現に重要な役割を果たす可能性を検証する。また核内 RNA を高効率でノックダウンできる系を用い、核内低分子 RNA が制御する RNA プロセッシング現象の同定と、その作用機構の解明を目指す。

【達成度】

大野計画班員は、mRNA 核外輸送における RNA 識別機構を解析し、異なる RNA を識別する特徴のひとつとして「RNA の長さ」を同定し、その分子機構を解析した。U snRNA の輸送因子である PHAX (phosphorylated adaptor for RNA export) は、細胞核内では約 200~300 塩基長以下の短い RNA にのみ結合した。この結果から、細胞には RNA の長さを測り輸送経路を決定する機構が存在することが示唆された。様々な生化学的実験から、長い RNA と U snRNA 輸送因子 PHAX の結合を特異的に阻害する活性を、HeLa 細胞の核抽出液に見いだした。核抽出液から阻害活性を生化学的に精製し、hnRNP C1/C2 のヘテロ 4 量体を同定した (*Science* 2012)。長年不明であった核外輸送における RNA の ID の 1 つである長さを識別する機構を初めて明らかにする優れた成果である。また、U snRNA が核内構造体 Cajal body に一旦局在し、核外輸送の必須因子 PHAX と結合して核外輸送されることを発見し、Cajal Body が U snRNA 核外輸送複合体のアッセムブリのサーベイランス因子である可能性を明らかにした (*J. Cell Biol.* 2010)。さらに、高等真核生物における mRNA 前駆体核内保持因子を解析した結果、スプライシングの初期因子である U1 snRNP と U2AF が mRNA 前駆体の核内保持に重要であることを明らかにした。また、U2AF の特に 65-kD サブユニット U2AF⁶⁵ が核内保持に重要であり、その複数のドメインが核内保持活性を持つことを明らかにした。さらに、スプライシングと核外輸送に関与する DEXd-box RNA ヘリカーゼ UAP56 が U2AF⁶⁵ と協調的に mRNA 前駆体の核内保持に働くことも見いだした。片平公募班員は、転写と核外輸送の共役因子である TREX (TRanscription-EXport) 複合体のヒトオルソログ Thoc5 が、Aly とともにコアアダプターとして *Hsp70* mRNA の核外輸送における機能を見いだした (*RNA Biol.* 2009; *EMBO J.* 2009)。

廣瀬計画班員 (最先端若手採択後は総括班連携研究者) は、オリジナルな核内 RNA ノックダウン法を駆使して、パラスペックル構造体の構造構築における MENE β 非コード RNA の機能を明らかにした (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009)。U7 snRNA のノックダウンによってヒストン mRNA の 3' プロセッシングが不全となり、異常なポリ A 付加型 mRNA が蓄積し、細胞周期 S 期の著しい遅延が起こることを観測した (*RNA* 2009)。DNA 合成休止期において U7 snRNA がヒストン mRNA 合成を負に制御する新機能を担っていることを示した。核内構造体の構築原理と生理機能の理解が格段に進んだ。

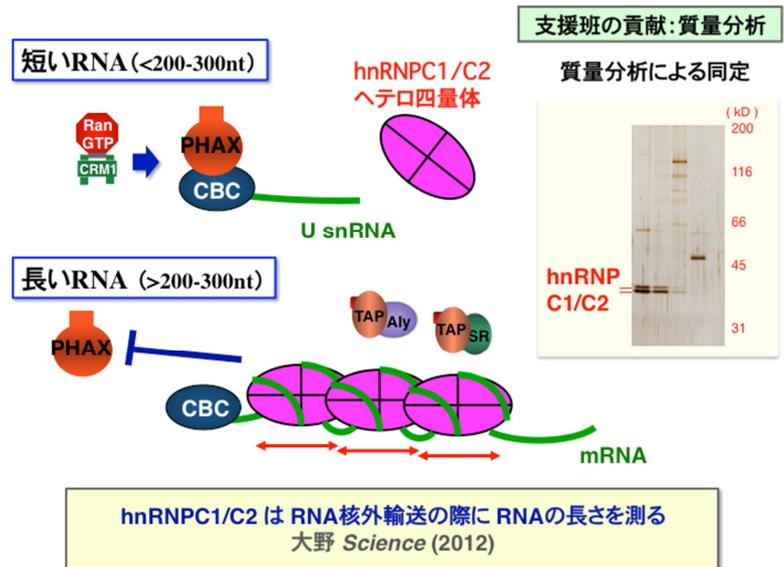
(5) RNA 局在・翻訳制御と RNA 分解の連携機構

【設定目的】

細胞質 RNP 顆粒は、mRNA 分解の場である P ボディとの相同性が明らかとなっており、共通する分子基盤の解明を目指す。

【達成度】

生殖質因子 Pgc の解析から、miRNA 経路の抑制による生殖質 RNA の安定化における動物種を超えた共通性が明らかになった (中村班員)。哺乳類におけるスプライシング後のイントロンの代謝経路を、代謝途上のラリアットイントロン-タンパク質複合体の 2 段階のアフィニティー精製により解析した結果、miRNA の合成とスプライシング反応の関連が明らかとなった (大野計・片岡班員, *Mol. Cell Biol.* 2009)。翻訳終結に依存したポリ A 鎖分解機構の分子基盤を星野計画班員が解析し、ポリ A 鎖結合因子 PABP に対する翻訳終結因子 eRF3 と Tob との競合的相互作用が NMR 解析により明らかになった (*J Biol. Chem.* 2009)。また、グルタミン酸受容体 mRNA



特異的 RNA 結合因子 CPEB3 と Caf1 が、Tob を仲介役として結合して mRNA 分解を制御することを発見した (*Oncogene* 2013)。

(6) 高次生命現象における RNA プログラムの機能解明

【設定目的】

mRNA 安定性や翻訳制御、mRNA 局在などの RNA プログラムは、様々な細胞機能を制御し、高次生命現象に重要な機能を果たす。細胞内外の様々なシグナル応答における RNA 段階での制御機構の役割について解明を行う。また、代表的な外来 RNA を検知し自然免疫系を作用させる RNA センサー RLR に焦点をあて、内在性の標的 RNA の同定とその制御の生理的意義を解析し、生体防御の全体像の理解を目指す。

【達成度】

杉浦計画班員は、MAPK と mRNA 結合タンパク質依存的細胞周期調節メカニズムを解析し、mRNA 結合タンパク質 Nrd1 が細胞周期に重要な働きをするミオシン mRNA との相互作用と安定化を介して、増殖と分化という二つの細胞運命を MAPK によるリン酸化依存的に制御する重要な mRNA 結合蛋白質であることを見出した (*Mol. Biol. Cell* 2009)。また、Nrd1 が RACK ホモログ Cpc2 との相互作用を介して MAPK によるリン酸化依存的にストレス顆粒 (Stress granule: SG) に移行することにより、ストレス応答を調節するというメカニズムを見出した (*PLoS One* 2012)。米山計画班員は、自然免疫誘導因子である RLR ファミリーの生理的な役割を解析し、RLR による RNA 認識の分子機構を明確にするとともに (*J Biol. Chem.* 2009)、RLR がストレス顆粒 (Stress granule: SG) で機能していることを見出した (*PLoS One* 2012)。

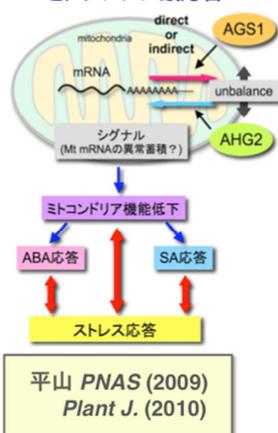
平山公募班員は、植物ミトコンドリア mRNA の polyA 鎖長の調節機構を解析し、アブジジン酸により強く応答する変異株 *ahg2-1* の原因遺伝子は polyA 短鎖化酵素 (PARN) であり、*ahg2-1* 変異の抑制変異は、全て polyA 鎖合成酵素 (PAP) の変異であることを見出した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; *Plant J.* 2010)。PARN と PAP が協調的にミトコンドリア mRNA の polyA 鎖の長さを調節し、アブジジン酸応答に重要な役割を果たすことを明らかにした。 (*Plant Cell Physiol.* 2009)。

山下公募班員は、mRNA 選択的分解による減数分裂特異的な発現機構を解析し、減数分裂特異的な mRNA 内の特異的配列 (DSR) に Mmi1p が結合し、核内 exosome 依存的な mRNA 分解を誘導することを見出した (*EMBO J.* 2010)。核内 exosome、poly(A)ポリメラーゼ、poly(A)結合タンパク質、mRNA 3'末端成熟因子などが、Mmi1p の誘導する mRNA 分解に必須であり、分裂酵母内で Mmi1p と共局在することが示された。

複合連携制御

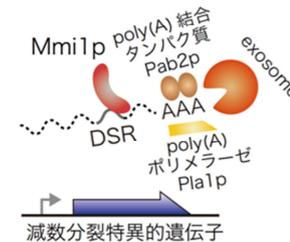
公募研究

植物ミトコンドリアのポリ(A)鎖長制御とアブジジン酸応答



mRNAの選択的除去による減数分裂特異的発現制御

体細胞分裂期



医療への応用

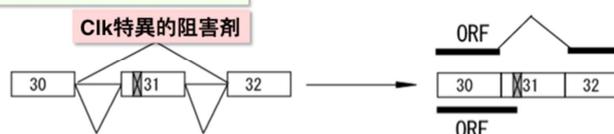
公募研究

筋ジストロフィーの治療薬開発へむけて

・正常なジストロフィン遺伝子



・異常なジストロフィン遺伝子



CIK特異的阻害剤によるエクソンのskippingの促進による活性型タンパク質発現の回復
片岡 *J. Cell Biol* (2011); *Nature Commun.* (2011)

(7) 疾患治療への応用

片岡班員は、選択的スプライシングの改変による疾患治療につながる研究成果を上げた。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子 Dystrophin のエクソン 31 中にナンセンス変異を持っている患者では、このエクソンの skipping が起こることを発見した。このエクソン skipping が hnRNP A1 によるものであること、さらに Cik 特異的阻害剤 TG003 が、患者細胞において変異エクソンの skipping を促進し、部分的ではあるが活性を持った蛋白質の合成を促進することを見出し、治療薬開発へとつながることが示唆された (*Nature Commun.* 2011)。

4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況（1ページ程度）

研究推進時に問題が生じた場合には、その問題点とそれを解決するために講じた対応策等について具体的に記述してください。また、組織変更を行った場合は、変更による効果についても記述してください。

【総括班の支援体制】

問題点: 領域発足後、平成22年度までに支援班として、①ポリソーム解析(名大)、②質量分析(理研 CDB)を行い、班員の研究に貢献した。一方で、標的 RNA の結合タンパク質の網羅的解析などの需要も多くなっており、領域として早急に対応する必要にせまられた。網羅的解析では、実験手法に由来する擬陽性を排斥する工夫が必須であった。

対応策: 計画研究分担者の廣瀬班員は、核内 RNA を特異的に機能破壊する実験系の開発や標的 RNA の結合タンパク質の網羅的解析など、汎用性の高い優れた実験系をもち、具体的な成果も挙げている。これらの手法に関する優れた知識と経験を持つ廣瀬班員を平成23年度から総括班に加え、班員の要望に答える事で、領域全体の研究の支援体制を充実させた。

効果: 複数の班員への実験条件に関するアドバイスを含み、支援を行うことができた。

【公募研究】

問題点: 平成21-22年度の公募研究で優れた成果が出ており、領域へ大きく貢献した。一方で、平成23-24年度公募研究については、応募を行う領域が32領域と通常の数となり、班員の確保が大きな問題であった。また重複制限を考慮すると、より優れた研究課題の推進には、1件あたりの研究費を十分確保する必要があった。

対応策: 平成23-24年度公募研究の研究費の配分を変更し、800万円5件と400万円15件とすることで、全体の採択件数を確保しながら、領域への貢献度の高い優れた公募研究の参加を促した。

効果: 平成23-24年度公募研究でも優れた研究課題が採択され、領域の研究全体が活性化された。

【領域内の連携】

問題点: 領域開始以降に多くの共同研究が開始されたが、中間評価時点で論文発表などの具体的な研究成果に至っているものは比較的少数であった。

対応策: さらに班員の研究の質を高め、良質の論文発表をサポートしていくために、支援班体制を強化させた。また、さらに班員同士の交流を深め、研究内容についても相互理解を進めるため、班会議を充実させ、発表や討論の時間を十分に用意した。

効果: 共同研究による論文も多数発表されるとともに、領域全体でも100報を超える原著論文が発表できた。

5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況（1ページ程度）

研究領域内での若手研究者育成の取組及び参画した若手研究者の研究終了後の動向等を記述してください。

研究領域内での若手研究者育成を目的として、以下の取組を行った。

【若手主体のミーティングへの支援】

院生やポスドクなどの若手研究者が主体の RNA フロンティアミーティングへの支援を毎年行った。若手研究者が交流し、互いに意見交換を行う貴重な場となった。

【班会議や国際ミーティング参加支援】

院生やポスドクなどの若手研究者の成果発表の機会を増やすために、班会議で若手研究者の発表枠を3時間確保した。また領域主催の国際ミーティングへの参加を支援した。

領域における若手研究者支援の成果と動向について以下に記載する。

【受賞】

黒柳秀人(計画班員)が平成21年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞を受賞。

【プロモーション】

本領域に参画した若手研究者が研究期間内に多数プロモーションされた。

- 井上邦夫（神戸大准教授→神戸大教授）
- 稲田利文（名古屋大准教授→東北大教授）
- 米山光俊（京都大准教授→千葉大教授）
- 中村 輝（理研チームリーダー→熊本大教授）
- 今高寛晃（理研研究員→兵庫大教授）
- 吉久 徹（名古屋大准教授→兵庫大教授）
- 片岡直行（京都大助教→京都大特定准教授）
- 鈴木 敦（横国大テニユアトラック助教→横国大准教授）
- 後藤 聡（慶應大特任講師→立教大教授）
- 河原行郎（大阪大テニユアトラック 特定准教授→准教授）

6. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）（1 ページ程度）

領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について総括班研究課題の活動状況と併せて記述してください。

【設備の有効活用（大型機器の購入使用状況）】 支援班活動に用いた機器は、領域開始前に購入済み（ポリソーム解析用の超遠心器とフラクショネーター等）もしくは機関所有（質量分析器）であったため、本領域で新規購入しなかった。各計画研究で購入した機器については、主として研究代表者の研究課題遂行のために用いたが、領域内での機器使用も多数あり、有効に利用された。

【消耗品】 支援班の活動としての、質量分析とポリソーム解析のための消耗品について支出した。CDB の質量分析に必要な経費として、消耗品（溶媒、ヘリウムガス、逆相カラム等）を支出した。ポリソーム解析に必要な消耗品として、遠心チューブ、RNase フリー試薬等を支出した。

【旅費】

国内旅費：班会議・公開シンポジウムの旅費や国内研究者の招聘費用を支出した。総括班会議における評価者（研究協力者）ための旅費も、国内旅費として支出した。総括班会議は、全体会議と同時に行い、総括班員の所属大学等で開催することで会場費等の経費を節約した。また RNA フロンティアミーティングの参加発表者について、希望者には遠隔地からの参加旅費の支援を行い、国内研究者の招聘費用として支出した。

外国旅費：本新学術領と CDB ならびに非コード RNA との共催で、「RNA Science in Cell and Developmental Biology」を平成 22、24 年度に開催した。外国人研究者の招聘費用を外国旅費として支出した。

【謝金】 資料整理等の補助員の雇用のため年間約 100 万円を支出した。領域のホームページの維持管理のための謝金も支出した。

7. 総括班評価者による評価（2ページ程度）

総括班評価者による評価体制や研究領域に対する評価コメントを記述してください。

評価者から大変貴重な助言をいただくことで、領域運営を改善し、領域内の連携や若手研究者を活性化すること可能となった。領域期間内に評価者からいただいたご意見を、年度毎に以下に記載する。

平成20年度:平成21年2月24日に、評価委員に出席戴いた総括班会議を行い、領域発足までの経緯をご説明した。

平成21年度:平成22年1月8日に、評価委員に出席戴いた総括班会議を行い、助言を戴いた。具体的には、ホームページの更新による情報の発信に加えて、メールなどによるきめ細かい情報を班員・評価者や関連する研究者に伝達する方法もあるとのご意見を戴いた。ご意見に従い、ホームページの更新頻度を上げ、メールによる情報伝達も行っている。また、研究面では1細胞からのRNAの抽出と解析といった最先端の技術の積極的な利用や、細胞内RNAの直接的検出方法の開発の重要性について意見を戴いた。領域の運営としては、支援班による領域内班員への支援も有効であり、若手中心の研究が着実に成果を挙げつつあるとの評価を戴いた。

平成22年度5月10-12日に、本新学術領域と理研CDBならびに非コードRNA領域との共催で、開催した国際シンポジウム「RNA Science in Cell and Developmental Biology」については、参加戴いた評価者から特に高い評価を受けた。本領域のみでなく非コードRNA領域や、これらの領域以外の関連するRNA研究者が参加し、爆発的に発展しているRNA関連研究に関する国内外の優れた研究者が一同に会する機会となった。特に、invited speakerを中堅のPIを中心にし、若手研究者への支援を充実させたことで、活発な議論が行われたことが高く評価された。また、海外招聘者からも「Cold Spring Harbor Laboratory Meetingよりもエキサイティングである」との感想をいただいた。ミーティングにおける議論の活発さと日本のRNA研究のレベルについて高く評価されたと考えられる。平成24年度6月11-13日にも、「RNA Science in Cell and Developmental BiologyII」を理研CDBならびに非コードRNA領域と共催し、前回以上に活発なミーティングとなり、国内外から高い評価を得た。

平成22年度:平成23年1月8日に、評価委員に出席戴いた総括班会議を行い、助言を戴いた。領域全体としては、研究成果が得られつつあるが、中間評価に向けて着実に研究成果を原著論文として発表する点を努力するべきとのコメントをいただいた。

平成23年度:平成24年1月8日に、評価委員に出席戴いた総括班会議を行い、助言を戴いた。公募研究も新規参加の課題が多数あり、領域の目的により合致した課題が採択されているとのコメントをいただいた。東日本大震災の影響で、研究停止を余儀なくされた班員も複数あったが、研究の進捗状況に目立った遅れはないとの評価をいただいた。

平成24年度:平成25年1月8日に、評価委員に出席戴いた総括班会議を行い、最終年度として各研課題の研究成果発表に対して、大変優れた研究成果をあげているとの評価をいただいた。期間内に若手のプロモーションも進み、世界的な研究成果も得られ、領域全体としてRNA分野に多大な貢献をしたとの評価をいただいた。

以下に、評価委員の領域全体に対する評価を記載する。

【阿形清和評価委員】

本研究領域は、RNAに関する制御について、最近流行のnon-coding RNA研究に迎合することなく、mRNAやrRNAの制御について、①「非対称性制御」②「多様性獲得」③「品質保証」の3本の柱に沿って、日本らしい精度の高い研究を積み上げているのが特徴である。3本の柱それぞれに満遍なく精度の高い研究が積み上げられ、分子生物学の一流誌に実績が積み上げられていることは高く評価してよい。「はでさ」はないが、日本のRNA研究の新たなコアグループとして国際的なステータスを築きあげている。新学術領域研究が新しい学問領域を開拓する推進力になっている一方で、日本の特徴の出た研究グループの構築にも貢献していることは、今後の新学術領域研究の在り方を考える上で一石を投じたグループ研究成果として捉えている。

【山本正幸評価委員】

本新学術領域研究「多様性と非対称性を獲得するRNAプログラム」は、推進の中心である総括班をはじめとして比較的若い研究者により構成され、班会議における大学院生の活躍など、全体として活気にあふれる運営がなされて来た。5年の研究期間に世界をリードする研究成果を生み出しており、また支援活動、共同研究の実もあがっていて、この領域の今後の発展のための堅固な礎を築いたと評価する。

【塩見春彦評価委員】

本領域の目的は、RNA 段階での遺伝子発現プログラム（“RNA プログラム”）を、「多様性獲得プログラム」（選択的スプライシング）、「非対称性制御プログラム」（翻訳制御と共役した mRNA 局在、小分子 RNA による翻訳制御や mRNA 安定性制御）、そして「品質保証プログラム」（mRNA サーベイランス機構等）という 3 つの研究分野に分解し、それぞれの分子機構を解析し統合することで理解し、さらに、そのような RNA プログラムを介したより高次の細胞機能制御機構の理解を目指すというものであった。

この目標に向けて順調に研究が進展し、期待どおりの成果が達成された。生物の持つ複雑で巧妙な形態・機能の獲得の分子機構を、RNA プログラムという視点から解き明かそうという遺伝子発現制御の進化の根幹に光をあてる夢のある研究である。研究成果もこの間、全体で 100 報以上の論文を発表し、さらに、共同研究を含む職員間の様々な交流が積極的に行われ、新しい研究分野の開拓が試みられた。

一方で、大野らによる「RNA の長さを測るメカニズム」についてのモデル以外に、新しいモデルや新しいコンセプト、新しい仮説を提唱するインパクトの高い仕事／論文が少ないことも事実であり、期待以上の成果が達成されたとは思えず、従来の RNA 研究の延長であったという印象を受ける。また英文総説によって自らの主張を世界に向けて展開するということや、ウェブサイトを活用して積極的に成果を発信するという点にも消極的であった。

8. 主な研究成果（発明及び特許を含む）[研究項目毎または計画研究毎に整理する]

（3 ページ程度）

新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（発明及び特許を含む）について、図表などを用いて研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。

【計画研究】

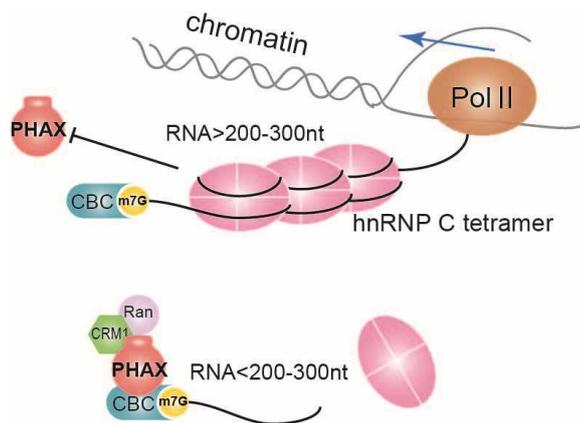
研究課題：核と細胞質間の RNA 分配制御

研究代表者：大野 陸人（京都大学ウイルス研究所 教授）

大野計画班員は、mRNA 核外輸送における RNA 識別機構を解析し、異なる RNA を識別する特徴のひとつとして「RNA の長さ」を同定し、その分子機構を解析した。

1) RNA の長さを測るメカニズム

hnRNP C の四量体が“分子ものさし”となって RNA の長さを測り、RNA ポリメラーゼ II の転写産物をその長さに応じて mRNA と U snRNA に分類することを明らかにした (*Science* 2012)。本研究を元に RNA の長さを測るメカニズムについてモデルを提唱した（右図）。RNA ポリメラーゼ II による転写開始直後、クロマチンから新生 RNA の 5'末端が現れ始めると、そこにキャップ構造が付加され、キャップ構造結合因子複合体 CBC が結合する。この時点では、この転写物が mRNA なのか U snRNA なのか輸送機構側にはわからない。転写がさらに進み、新生 RNA の長さが 200 ~ 300 塩基長より長くなると、hnRNP C1/C2 のヘテロ 4 量体が安定に結合できるようになり、そのような転写産物は mRNA 前駆体であると認定され、U snRNA 輸送因子である PHAX の結合が阻害される。



2) U snRNA 核外輸送を制御するリン酸化酵素と脱リン酸化酵素

U snRNA の核外輸送において（少なくとも）5 種類のタンパク質因子が U snRNA と共に核外輸送複合体を形成し核膜孔を通過する。RNA 結合タンパク質 PHAX はコンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化のサイクルを繰り返し、そのことが、RNA の核外輸送の方向性を規定している。このようなコンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化システムの分子の実体は不明であったが、それぞれキナーゼ CK2 とホスファターゼ 2A であることを、生化学的手法と RNAi ノックダウン法を用いて明らかにした (*Mol. Cell Biol.* 2008)。

研究課題：タンパク質の多様性の鍵となるスプライシング暗号解読

研究代表者：黒柳秀人（東京医科歯科大学難治疾患研究所 准教授）

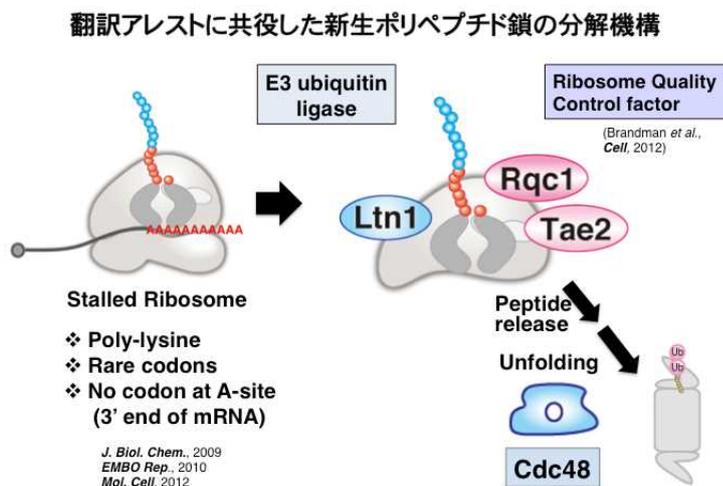
線虫 *C. elegans* の選択的スプライシングについて、①蛍光スプライシングレポーターを作製して選択性パターンを解明し、変異体を単離して制御因子を同定する、②変異体線虫を利用して、生体における標的遺伝子を網羅的に探索する、③標的遺伝子の塩基配列を基に選択的スプライシングを制御するシスエレメントの配列を予測する、④選択的スプライシングレポーターを作製して、組織特異性や制御因子とシスエレメントの関係を実験的に検証しスプライシング制御の規則性を明らかにする、ことを目的として研究を進めた。

液胞型 ATPase の V_0 複合体 a サブユニットをコードする *unc-32* 遺伝子の 2 組の相互排他的エクソン (4a/4b/4c と 7a/7b) が組織特異的に制御されることを明らかにし、エクソン 7a が神経系特異的に選択されるための制御因子として、RFXO ファミリースプライシング制御因子 ASD-1, FOX-1 と神経系特異的な CELF ファミリー RNA 結合タンパク質 UNC-75 を同定した (*PLoS Genetics* 2013)。野生型および *unc-75* 変異体背景の線虫株の同調した L1 幼虫のトランスクリプトーム解析を行い、UNC-75 の標的として合計 24 の選択的スプライシング事象を同定した。そして、生物情報学的解析とレポーター作製により、上流イントロンの (G/U)UGUUGUG が選択的エクソンの抑制に、下流イントロンの同配列が選択的エクソンのスプライシング促進に必要な UNC-75 による神経系特異的スプライシング制御のシスエレメントであることを同定した (*Nucleic Acids Res.* 2013)。また、線虫の 2 種類のコフィリンをコードする *unc-60* 遺伝子の筋組織特異的な選択的プロセッシングの制御因子として ASD-2 と SUP-12 を同定し、それぞれのシスエレメントも同定して、筋組織における *unc-60* mRNA 前駆体の運命決定機構を明らかにした (*PLoS Genetics* 2012)。また、これらの過程でさまざまな遺伝子から効率的にレポーター・ミニ遺伝子を作製し制御因子やシスエレメントを同定する具体的で詳細な方法論を確立した (*Nature Protocols* 2010)。

研究課題：遺伝子発現の正確性を保証する mRNA 品質管理機構
研究代表者：稲田利文（東北大学大学院薬学研究科 教授）

生命現象の基盤となる遺伝子発現の正確性は、細胞の保持する様々な品質管理機構によって保証されている。これまでに、終止コドンを持たないノンストップ mRNA の品質保証機構を解析し、真核生物の mRNA の普遍的な修飾であるポリ(A)鎖が品質管理に重要な役割を果たす事を見いだした。本研究では、「非対称性」と「多様性」の獲得機構を支える遺伝子発現の品質保証プログラムの全体像を理解することを目的とした。

1) 異常タンパク質の分解機構 ①ナンセンス変異 mRNA 由来異常タンパク質：ナンセンス変異を持つ異常 mRNA の分解に必須な Upf 複合体が、短鎖型異常タンパク質の分解を促進することを明らかにした (*EMBO Rep.* 2009)。②翻訳アレストに伴うタンパク質分解：連続した塩基性アミノ残基により普遍的に翻訳アレストが引き起こされ、新生ポリペプチド鎖がプロテアソームにより迅速に分解されることを見いだした (*J. Biol. Chem* 2009; *Genes Cells* 2009)。この分解系には、Ltn1 と Not4 の2つの E3 ユビキチンライゲースが作用し、Rqc1 や Tae2 等の新規因子が異常ペプチド鎖を持つ 60S サブユニットに結合することが示唆された (*Cell* 2012; Weisman 研との共同研究)。基質認識を含め分子機構はほとんど不明である。この異常タンパク質の分解は品質管理機構として重要であるのみならず、翻訳に共役した新生ポリペプチド鎖のユビキチン化という点でも新しい分子機構であり、世界的にも独自の系である。



2) 翻訳異常の認識機構

①連続した塩基性アミノ酸配列による翻訳アレストの分子機構ポリ(A)鎖の翻訳による翻訳伸長の阻害が明らかになったため、翻訳伸長阻害（アレスト）を引き起こすアミノ酸配列の特異性を決定した結果、連続した塩基性アミノ酸残基による翻訳伸長阻害（アレスト）が明らかとなった (*EMBO Rep.* 2010)。出芽酵母を用いた遺伝学的解析により、新生ポリペプチド鎖に依存した翻訳アレストに必須な因子として RACK1 を同定した (*EMBO Rep.* 2010)。RACK1 が結合したリボソームのみが、特異的なアミノ酸配列を認識し翻訳伸長活性を制御することを明らかにした。②品質管理機構(NSD)における Dom34/Hbs1 複合体の機能の発見：ノンストップ mRNA の迅速な分解(NSD)には、ノンストップ mRNA の3'末端で停滞したリボソームが mRNA から解離することが必須であるが、その分子機構は不明であった。本研究により、この終止コドン非依存の翻訳終結反応に翻訳終結因子 eRF1/eRF3 複合体と相同性を持つ Dom34/Hbs1 複合体が必須であることを見いだした(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)。さらに、Dom34/Hbs1 複合体が、ノンストップ mRNA を迅速に分解する品質管理機構 (NSD) に必須であることを見いだした (*Mol. Cell* 2012, on the cover)。Dom34/Hbs1 複合体は、翻訳終結因子 eRF1/eRF3 複合体と相同性を持ち、翻訳伸長阻害（アレスト）に依存した品質管理機構 (NGD) と、リボソームが翻訳活性を失った場合にリボソーマル RNA が迅速に分解される機構 (NRD) のいずれにも関与する品質管理因子である。本研究によって、NSD における Dom34/Hbs1 複合体の機能が明らかになり、「停滞したリボソーム」という共通した異常翻訳を認識し、3つの品質管理機構 (NGD/NRD/NSD) を作動させる Dom34/Hbs1 複合体の機能が初めて明らかになった。

3) ポリ(A)結合因子 Pab1p による mRNA 安定化機構

キャップ構造に直接結合し mRNA を安定化する可能性が示唆された (*J. Biol. Chem.* 2010)。

研究課題：RNA 3'末端プロセッシングを標的とした遺伝子発現調節・RNA 品質管理

研究代表者：星野真一（名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授）

研究分担者：廣瀬哲郎（産総研・バイオメディシナル情報研究センター・研究チーム長）

真核生物 mRNA の3'末端ポリ A 鎖は、翻訳の活性化および mRNA 安定性制御の2つの局面において遺伝子発現に大きく寄与する。研究代表者の星野班員は、このポリ A 鎖の分解が翻訳終結と共役しておこることを見出し、その分子機構を解明した。本研究では、我々が独自に解明したポリ A 鎖分解の分子機構に基づいて、特にそのポリ A 鎖分解を標的とする RNA 代謝調節に焦点をあてその調節機構の解明をめざして研究を行った。①mRNA3'非翻訳領域のシス因子 (URE, CPE)によるポリ A 鎖分解調節を介した遺伝子発現制御 (*EMBO J.* 2011; *Oncogene* 2013)、②ストレスによるグローバルな mRNA ポリ A 鎖安定化とストレス顆粒形成、およびアポトーシス時の翻訳抑制のメカニズム

(Apoptosis 2012)、③非標準的ポリ A 鎖付加酵素による mRNA ポリ A 鎖伸長を介した遺伝子発現制御(BBRC 2012)、④ノンストップ型異常 mRNA を分解する RNA 品質管理を高等真核生物で解析し、酵母と同様に Dom34:Hbs1 複合体が mRNA 分解に寄与することを明らかにした。(J. Biol. Chem. 2013)。

研究分担者の廣瀬班員は、核内遺伝子発現制御における RNA 因子の新機能を明らかにするため、まずオリジナルな核内 RNA ノックダウン法を駆使して、パラスペックル構造体の構造構築における MEN ϵ/β 非コード RNA の機能を明らかにした(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009)。さらに U7 snRNA の機能阻害によって、ポリ A 付加ヒストン mRNA の異常蓄積と細胞周期の遅延が検出された(RNA 2009)。その後 U7 snRNA が、DNA 合成をアレストさせ細胞周期同調した細胞で、ヒストン遺伝子の転写を負に制御している新機能を発見した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012)。引き続き U7 snRNP の新規構成因子として hnRNP UL1 を同定し、この因子が、U7 snRNP の新規機能であるヒストン遺伝子転写抑制能を担う因子であることを証明した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012)。これによって、U7 snRNP は、ヒストン合成を細胞周期ステージ特異的に厳密に制御するために、mRNA プロセッシングの促進と転写の抑制という 2 つの相反する機能を担うことが明らかになった。

研究課題：mRNA 制御システムによる生殖細胞形成機構

研究代表者：井上邦夫 (神戸大学大学院理学研究科生物学専攻 教授)

多細胞動物において、次世代を生む生殖細胞の形成・分化過程には、RNA レベルでの遺伝子発現制御が中心的な役割を担うことが示唆されている。本研究では、小型淡水魚を用い、mRNA-蛋白質複合体 (mRNP) の局在化による生殖顆粒の形成機構や、生殖顆粒を構成する mRNP の生理機能の解明、非局在 mRNA の分解・翻訳抑制装置や、その解除に働く生殖細胞特異的な分子基盤を解明した。ゼブラフィッシュ胚では、生殖質に局在化する *nanos1* や *tdrd7* の母性 mRNA が体細胞に取り込まれると、miR-430 によって翻訳抑制や mRNA 分解促進制御を受ける(Curr Biol 2006)。これに対して miR-430 は生殖細胞にも発現しているが、RNA 結合蛋白質 DAZL が *tdrd7* mRNA の 3'UTR に結合し、ポリ A 鎖伸長化を促進することによって miR-430 による抑制を解除していることを見出した。さらに、*dazl* mRNA も体細胞における miR-430 による抑制を受け、DAZL 蛋白質によってポリ A 鎖伸長化を介して生殖細胞特異的に発現活性化されることがわかった(PLoS ONE 2009)。また、メダカ miR-430 の同定・機能解析を行った結果、miR-430 が胚発生初期の母性プログラムの消去や、生殖細胞・体細胞の分化確立に関与している可能性が強く示唆された(Gene 2010)。さらに、ゼブラフィッシュ初期胚において、miRNA による mRNA 翻訳抑制機構を明らかにした(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012)。

研究課題：mRNA 局在と翻訳制御における細胞質 RNP 顆粒動態

研究代表者：中村 輝 (熊本大学発生医学研究所 教授)

細胞の極性は、しばしば mRNA の細胞質内局在と、RNA 局在と連携した翻訳制御によって確立される。局在 RNA は細胞質 RNP 複合体を形成して輸送・局在する。卵巣、神経細胞、体細胞で観察される細胞質 RNP (各々、母性 RNP, 神経 RNA 顆粒, P ボディと呼ばれる)は、構成タンパク質の上でも、分子機能の上でも相同性を持つ。本研究ではショウジョウバエ生殖質の動態解析を進め、新たな RNA 制御機構を見出した。

1) P ボディ構成因子のショウジョウバエ卵形成過程における機能の解析

ショウジョウバエ母性 RNP 複合体の新規構成タンパク質として同定した Edc3, Pat1 ホモログについて、突然変異体を作成しその分子機能解析を進めた。その結果、Pat1 は細胞の生存に必須であると推定された。一方、*edc3* 遺伝子領域の欠失変異体は部分致死を示した。このようなエスケイパーの卵巣においては生殖質形成因子をコードする *oskar* mRNA の局在異常と Oskar タンパク質の異所的な発現が観察された。Edc3 は輸送過程における *oskar* RNP のリモデリング因子として RNA 輸送と翻訳制御に関与していると予想された(J. Cell Sci. 2012)。

2) 生殖質形成に関わる新規因子の分子機能解析

生きたまま生殖質を可視化することの出来る GFP-Vasa 系統を利用した突然変異体スクリーニングにより得られた 66 系統の解析を進めた結果、(a)生殖質の後極皮相への繫留には、エンドソーム経路が関わっていることを明らかにした(Tanaka and Nakamura (2008) Development で既報)。さらに、(b)アクチン重合因子(actin nucleator)である Cappuccino, Spire 及びそれらの活性を制御する GTPase である Rho1 が、生殖質因子の繫留に必要であること、(c)エンドソーム経路の下流で、出芽酵母エンドソーム・ゴルジ蛋白質である Mon2 のホモログ(CG8683)が生殖質因子の繫留に機能していること、(d)エンドソーム-Mon2 経路の下流で Cappuccino, Spire が関わっていること、(e) Mon2 は Cappuccino, Spire と複合体を形成することを見いだした。細胞極性確立や mRNA 局在過程における膜輸送系と細胞骨格系との連携制御における新規因子の同定と分子間相互作用の一端を明らかにした点で非常に重要な成果である(Development 2011)。

研究課題: mRNA 結合タンパク質による細胞統御のメカニズム

研究代表者: 杉浦 麗子 (近畿大学薬学部 分子医療・ゲノム創薬学研究室 教授)

細胞形態や細胞周期を制御する<細胞統御>シグナルと mRNA 結合タンパク質の関わりを、分裂酵母モデル生物を用いて解析を行なった。Myosin 変異体と機能的に関わる因子として mRNA 結合タンパク質 Nrd1 を同定し、Nrd1 が Myosin mRNA と結合し、安定化することにより、細胞周期調節と分化に関わることを見出した。また、高等生物の ERK 相同因子 Pmk1 が、Nrd1 を細胞周期依存的にリン酸化制御することにより、細胞運命の調節に関わることを見出した (*Mol. Biol. Cell.* 2010)。さらに、Nrd1 が各種のストレスにตอบสนองして MAPK によるリン酸化依存的にストレス顆粒に移行すること、さらに RAK ホモログである Cpc2 との物理的相互作用を介して、ストレス顆粒形成を促進することを見出した (*PLoS ONE* 2012)。また、ストレス顆粒形成はストレス応答のみならず、抗がん剤抵抗性を調節するという生理的意義を見出した (*BBRC* 2012)。高度に保存されたミオシン mRNA の制御が、MAPK と mRNA 結合タンパク質依存的に行われるという、全く新しい細胞周期調節メカニズムを提唱するものである。さらに、MAPK 依存的なストレス顆粒形成はストレス応答のみならず、抗がん剤抵抗性に関わるという生理的意義が明らかとなった。

研究課題: ウイルス RNA センサーによる RNA 識別と細胞機能制御

研究代表者: 米山 光俊 (千葉大真菌医学研究センター感染免疫分野 教授)

高等脊椎動物細胞では、ウイルスなどの外来性 RNA の侵入を特異的に検知するシステムを持っており、核へシグナルを伝達することで種々のサイトカイン産生を誘導し、速やかなウイルス排除を行っている。本研究では、この外来性 RNA に対する細胞内センサー分子である RIG-I-like receptor (RLR) に注目し、その RNA 識別の分子機構について解析を行うと共に、RLR 分子のウイルス検知以外の細胞機能にアプローチする目的で、内在性 RNA との相互作用という観点からの細胞機能制御について研究を行った。RIG-I 分子の生化学的解析から、RNA 認識に関与するドメインとして、C-terminal domain (CTD) を同定し、その三次元立体構造並びに RNA 認識に必須なアミノ酸残基を明らかにした。さらに 3 種の RLR ファミリー分子の CTD の機能と構造を明らかにし (*J. Biol. Chem.* 2009)、ファミリー分子間での基質特異性とそれに関わる分子内ドメインが大きく異なることを明らかにした。さらに、RLR の細胞内局在の解析から、RLR がストレス顆粒に局在して機能していることを明らかにし、ストレス応答時の内在性 mRNA の機能制御と外来性 RNA 検知による生体防御が密接に関連していることが示唆された (*PLoS ONE* 2012)。

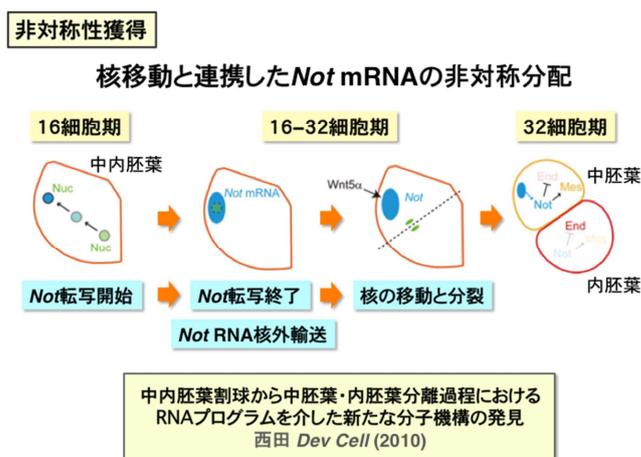
【公募研究】(代表的な業績のみを記載)

研究課題: RNA を娘細胞に不均等に分配する二種類のメカニズムの解析

研究代表者: 西田宏記 (大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻 教授)

単一の受精卵から様々なタイプの細胞を作り出すために、胚は非対称分裂を繰り返す。この非対称性をもたらす機構として、親細胞内で細胞分裂が始まるまでに何らかの因子が偏っており、その因子が二つの娘細胞に不均等に分配されることが重要である。本研究では細胞分裂時における非対称性制御プログラムの解析を目的とした。脊索動物のホヤの胚を用い中内胚葉細胞が分裂する際に、中胚葉になる娘細胞にのみ Wnt シグナル依存的に *Not* 遺伝子の mRNA を分配することで内胚葉と中胚葉の運命を分離していることを明らかにしていた。この *Not* mRNA の非対称な分配は内胚葉と中胚葉の分岐に必須であり、*Not* の極性を持った移動には Wnt5 のシグナリングが必要である。

Not mRNA を中内胚葉細胞の将来中胚葉細胞になる領域に局在させる機構を詳細に調べた。その結果、(1) 細胞の核が *Not* mRNA をザイゴティックに転写しつつ将来の中胚葉側に移動し、(2) 細胞周期の M 期に mRNA が核内から中胚葉細胞になる側の細胞質に放出され、(3) mRNA を将来の中胚葉細胞に取り込まれる側の細胞表層に残したまま、染色体と分裂装置が細胞の中央に戻ることを見出した (*Dev. Cell* 2010; 図)。



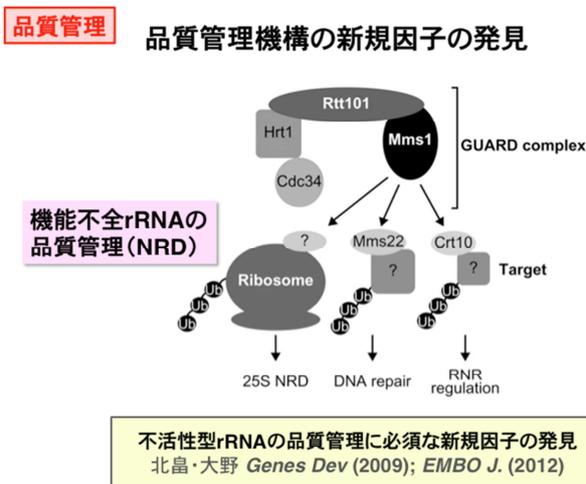
研究課題: スプライシング/mRNA 核外輸送装置によるクロマチンサイレンシングの多元的制御

分裂酵母において、セントロメアから転写される non-coding RNA 由来の siRNA によるセントロメアのヘテロクロマチン形成（セントロメアサイレンシング）に、pre-mRNA スプライシング装置と mRNA 核外輸送装置の構成因子が関与することを最近見だし、それらの因子が関与するヘテロクロマチン形成の制御機構について解明した。その結果、分裂酵母のスプライシングに関する温度感受性変異株 *prp* の解析から、スプライシング反応に必要な核内低分子 RNA の一つである U4 snRNA の変異が、セントロメアにおけるヘテロクロマチン形成の異常を引き起こすこと、セントロメア領域から転写される non-coding RNA に mRNA 型イントロンが存在することを明らかにした (*J. Biol. Chem.* 2010)。また、スプライシング因子 Prp14p (RNA ヘリケース) の変異株 *prp14* においても、セントロメアヘテロクロマチン形成に異常が引き起こされていること、また、*prp14* 変異株では siRNA にプロセシングされる前のセントロメア non-coding RNA が蓄積していることを見いだした。興味深いことに、Prp14p は核全体の分布に加えて、SPB 近傍に強くドット状に集積しており、non-coding RNA の二本鎖化に関与する Cid12p と結合していることを明らかにした。以上の結果から、スプライシング因子の一部がセントロメア領域から転写された non-coding RNA に存在する mRNA 型イントロンへ結合し、その複合体がセントロメアヘテロクロマチン形成に関わる RDRC の non-coding RNA 上への結合の足場となっている可能性を示唆した。

研究課題：機能不全リボソーム RNA を選択的に認識する因子の同定

研究代表者：北島真（京都大学ウイルス研究所 助教）

機能不全の rRNA がリボソーム粒子に取り込まれると、機能のないリボソーム粒子ができてしまい、この rRNA は分解される (nonfunctional rRNA decay; NRD)。出芽酵母で 25S NRD に関与する因子を探索した結果、機能不全 rRNA の分解に先立って、Mms1 と Rtt101 という因子を含むユビキチンリガーゼ複合体が、機能不全リボソーム粒子にユビキチンの印を付けることが分かった。この複合体は、rRNA の品質管理だけではなく DNA 修復など、核酸の品質管理に広く使われているため「Guard 複合体」(Genotoxic stress related Ubiquitin ligase associated with RNA and DNA damage) と命名した (*Genes Dev.* 2009; *EMBO J.* 2012; 右図)。



9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5 ページ程度）

新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。論文の場合、計画研究・公募研究毎に順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に*印を付してください。また、一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。

【原書論文】

RNA 制御学領域の研究期間内に計画班で約 100 報、公募班員で 130 報あまりの原著論文を発表した。全て査読有である。（廣瀬班員は、最先端若手研究課題採択に伴い計画研究分担から総括班連携研究者に変更）

計画研究

1. Kataoka, N. Hagiwara, M. and *Ohno, M. (2013) hDbr1 is a nucleocytoplasmic shuttling protein with a protein phosphatase-like motif essential for debranching activity. *Sci. Rep.* 3, 1090. doi: 10.1038/srep01090
2. Takamatsu S, Onoguchi K, Onomoto K, Narita R, Takahashi K, Ishidate F, Fujiwara TK, Yoneyama M, Kato H, *Fujita T. (2013) Functional characterization of domains of IPS-1 using an inducible oligomerization system. *PLoS ONE* 8, e53578 doi: 10.1371/journal.pone.0053578
3. *Kuroyanagi H, Watanabe Y, Hagiwara M. (2013) CELF family RNA-binding protein UNC-75 regulates two sets of mutually exclusive exons of the *unc-32* gene in neuron-specific manners in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics* 9: e1003337.
4. Shiimori, M., Inoue, K., and Sakamoto, H. (2013) A specific set of exon junction complex subunits is required for the nuclear retention of unspliced RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* 33, 444-456.
5. *Kuroyanagi H, Watanabe Y, Suzuki Y, Hagiwara M. (2013) Position-dependent and neuron-specific splicing regulation by the CELF family RNA-binding protein UNC-75 in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* 41, 4015-4025.
6. Saito, S., Hosoda, N., *Hoshino, S. (2013) Hbs1-Dom34 functions in non-stop mRNA decay (NSD) in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 288, 17832-17843.
7. Ogami, K., Hosoda, N., Funakoshi, N., *Hoshino, S. (2013) Anti proliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. *Oncogene*
8. Ogami, K., Cho, R., *Hoshino, S. (2013) Molecular cloning and characterization of a novel isoform of the non-canonical poly(A) polymerase PAPD7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 432, 135-140.
9. Pradhan, S. J., Nesler, K. R., Rosen, S. F., Kato, Y., Nakamura, A., Ramaswami, M. and *Barbee, S. A. (2012) The conserved P body component HPat/Pat1 negatively regulates synaptic terminal growth at the larval *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Cell Sci.* 125, 6105-6116.
10. Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino S., Inoue, E., Kashima, I. and *Inada, T. (2012) Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality Control Systems by Dissociation of Stalled Ribosome at 3' End of Aberrant mRNA. *Mol. Cell* 26, 518-529. doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.013.
11. Brandman, O., Ornstein, JS., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C, Li, G.W., Zhou, S., King, D., Shen, P.S, Weibezahn, J., Dunn, J.G, Rouskin, S., Inada, T., Frost, A., *Weissman, JS. (2012) A ribosome-bound quality control complex triggers nascent peptides and signals translation stress. *Cell* 151, 1042-1054. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.044.
12. Izawa, T. Tsuboi, T. Kuroha, K. Inada, T. Nishikawa, SI. *Endo, T. (2012) Roles of Dom34:Hbs1 in Nonstop Protein Clearance from Translocators for Normal Organelle Protein Influx. *Cell Rep.* 2, 447-453. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.010.
13. Naganuma, T., Nakagawa, S., Tanigawa, A., Sasaki, YF., Goshima, N., *Hirose, T. (2012) Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *EMBO J.* 31, 4020-4034.
14. Nakagawa S, Ip JY, Shioi G, Tripathi V, Zong X, *Hirose, T., Prasanth KV. (2012) Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice. *RNA* 18, 1487-1499.
15. Ideue, T., Adachi, S., Naganuma, T., Tanigawa, A., Natsume, T., *Hirose, T. (2012) U7 small nuclear ribonucleoprotein represses histone gene transcription in cell cycle-arrested cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 5693-5698.
16. *Ohno, M. (2012) Size matters in RNA export. *RNA Biology.* 9, 1-5. doi: 10.4161/rna.22569
17. Fujii, K., Sakata, T., Kitabatake, M. and *Ohno, M. (2012) 40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay. *EMBO J.* 31, 2579-2589. doi: 10.1038/emboj.2012.85
18. McCloskey, A. Taniguchi, I., Shinmyozu, K., and *Ohno, M. (2012) HnRNP C tetramer measures RNA length to classify RNA polymerase II transcripts for export. *Science* 1643-1646. doi: 10.1126/science.1218469.
19. Mishima, Y., Fukao, A., Kishimoto, T., Sakamoto, H., Fujiwara, T., and *Inoue, K. (2012) Translational inhibition by deadenylation-independent mechanisms is central to microRNA-mediated silencing in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 1104-1109
20. Fujiwara, T., Fukao, A., Sasano, Y., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Imataka, A., Inoue, K., Endo, S., Sonenberg, N. Thoma, C., and *Sakamoto, H. (2012) Functional and direct interaction between the RNA binding protein HuD and active Akt1. *Nucleic Acids Res.* 40, 1944-1953.

21. Onomoto K, Jogi M, Yoo J-S, Narita R, Morimoto S, Takemura A, Sambhara S, Kawaguchi A, Osari S, Nagata K, Matsumiya T, Namiki H, *Yoneyama M, *Fujita T. (2012) Critical Role of an Antiviral Stress Granule Containing RIG-I and PKR in Viral Detection and Innate Immunity. *PLoS ONE* 7, e430331. doi: 10.1371/journal.pone.0043031
22. Jaiseng W, Fang Y, Ma Y, Sugiura R, *Kuno T. (2012) Studies on the Roles of Clathrin-Mediated Membrane Trafficking and Zinc Transporter Cis4 in the Transport of GPI-Anchored Proteins in Fission Yeast. *PLoS ONE* 7, e41946. doi:10.1371/journal.pone.0041946.
23. Ohno G, Ono K, Togo M, Watanabe Y, Ono S, Hagiwara M, *Kuroyanagi H. (2012) Muscle-Specific Splicing Factors ASD-2 and SUP-12 Cooperatively Switch Alternative Pre-mRNA Processing Patterns of the ADF/Cofilin Gene in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics* 8, e1002991.
24. Yu Y, Kita A, Udo M, Katayama Y, Shintani M, Park K, Hagihara K, Umeda N, *Sugiura R. (2012) Sip1, a Conserved AP-1 Accessory Protein, is Important for Golgi/Endosome Trafficking in Fission Yeast. *PLoS ONE* 7, e45324. doi:10.1371/journal.pone.0045324.
25. Hashimoto, Y., Hosoda, N., Datta, P., Alnemri, ES., *Hoshino, S. (2012) Translation termination factor eRF3 is targeted for caspase-mediated proteolytic cleavage and degradation during DNA damage-induced apoptosis. *Apoptosis* 17, 1287-1299.
26. *Hoshino, S. (2012) Mechanism of the initiation of mRNA decay: role of eRF3 family G proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 743-757.
27. Osawa, M., Hosoda, N., Nakanishi, T., Uchida, N., Kimura, T., Imai, S., Machiyama, A., Katada, T., Hoshino, S, *Shimada, I. (2012) Biological role of the two overlapping poly(A)-binding protein interacting motifs 2 (PAM2) of eukaryotic releasing factor eRF3 in mRNA decay. *RNA* 18, 1957-1967.
28. Kataoka, N., Diem, M. D., Yoshida, M., Hatai, C., Dobashi, I., Dreyfuss, G., Hagiwara, M. and *Ohno, M. (2011) Specific Y14 domains mediate its nucleo- cytoplasmic shuttling and association with spliced mRNA. *Sci. Rep.* 1, 92. doi: 10.1038/srep00092.
29. Ouda R, Onomoto K, Takahasi K, Edwards MR, Kato H, Yoneyama M, *Fujita T. (2011) Retinoic Acid-inducible Gene I-inducible miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Down-regulation of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. *J. Biol. Chem.* 286, 26210-26219. doi:10.1074/jbc.M111.229856
30. Nakagawa, S., Naganuma, T., Shioi, *Hirose, T. (2011) Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J. Cell Biol.* 193, 31-39.
31. *Shirae-Kurabayashi, M, Matsuda, K and *Nakamura, A. (2011) Ci-Pem-1 localizes to the nucleus and represses somatic gene transcription in the germline of *Ciona intestinalis* embryos. *Development* 138, 2871-2881.
32. Tanaka, T, Kato, Y., Hanyu-Nakamura, K., Matsuda, K. and *Nakamura, A. (2011) *Drosophila* Mon2 couples Oskar-induced endocytosis with actin remodeling for cortical anchorage of the germ plasm. *Development* 138, 2523-2532.
33. Hosoda, N., Funakoshi, Y., Hirasawa, M., Yamagishi, R., Asano, Y., Miyagawa, R., Ogami, K., Tsujimoto, M., *Hoshino, S. (2011) Anti-proliferative protein Tob negatively regulates CPEB3 target by recruiting Caf1 deadenylase. *EMBO J.* 30, 1311-1323.
34. Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y. Shirahige, K. and *Inada, T. (2010) RACK1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep.* 11, 956-961. doi: 10.1038/embor.2010.169.
35. Kobayashi, K. Kikuno, I. Kuroha, K. Saito, K. Ito, K. *Ishitani, R, Inada, T and *Nureki, O. (2010) Structural Basis for mRNA Surveillance by Archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 17575-17579. doi: 10.1073/pnas.1009598107.
36. Tsuboi, T. and *Inada, T. (2010) Tethering of poly(A) binding protein interferes with non-translated mRNA decay from 5' end in yeast. *J. Biol. Chem.* 285, 33589-33601. doi: 10.1074/jbc.M110.117150.
37. Suzuki, T., Izumi, H. and *Ohno, M. (2010) Cajal body surveillance of U snRNA export complex assembly. *J. Cell Biol.* 190, 603-612. doi: 10.1083/jcb.201004109
38. Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M, Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., *Akira, S, Takeuchi, O. (2010) LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 1512-7. doi:10.1073/pnas.0912986107
39. Onoguchi, K., Onomoto, K., Takamatsu, S., Jogi, M., Takemura, A., Morimoto, S., Julkunen, I., Namiki, H., Yoneyama, M, *Fujita, T. (2010) Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. *PLoS Pathog.* 6, e1001012. doi:10.1371/journal.ppat.1001012
40. Zhou X, Ma Y, Sugiura, R, Kobayashi D, Suzuki M, Deng L, *Kuno T. (2010) MAPKKK-dependent and -independent activation of Sty1 stress MAPK in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 285, 32818-32823. doi: 10.1074/jbc.M110.135764.
41. Takada H, Nishida A, Domae M, Kita A, Yamano Y, Uchida A, Ishiwata S, Fang Y, Zhou X, Masuko T, Kinoshita M, Kakehi K, *Sugiura, R. (2010) The Cell Surface Protein Gene *ecm33⁺* Is a Target of the Two Transcription Factors Atf1 and Mbx1 and Negatively Regulates Pmk1 MAPK Cell Integrity Signaling in Fission Yeast. *Mol. Biol. Cell* 21, 674-85. doi:10.1091/mbc.E09-09-0810.
42. *Kuroyanagi H, Ohno G, Sakane H, Maruoka H, Hagiwara M. (2010) Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation *in vivo* using fluorescence reporters in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Nature Protocols.* 5, 1495-1517.

43. Aoki, K., Harashima, A., Sano, M., Yokoi, T., Nakamura, S., Kibata, M. *Hirose, T. (2010) Thymus-specific noncoding RNA, Thy-ncR1, is a cytoplasmic riboregulator that facilitates hUPF1-dependent degradation of MFAP4 mRNA in specific T-cell leukemia cells. *BMC Mol. Biol.* 11, 99.
44. Ruan, L., Osawa, M., Hosoda, N., Imai, S., Machiyama, A., Katada, T., Hoshino, S. and *Shimada I. (2010) Quantitative characterization of TOB interactions provides the thermodynamic basis for translation termination-coupled deadenylase regulation. *J. Biol. Chem.* 285, 27624-27631.
45. Kuroha, K., Tatematsu, T. and *Inada, T. (2009) Upf1p stimulates proteasome-mediated degradation of the product derived from the specific nonsense-containing mRNA. *EMBO Rep.* 10, 1265-1271 doi: 10.1038/embor.2009.200.
46. Dimitrova, L., Kuroha, K., Tatematsu, T. and *Inada, T. (2009) Nascent peptide-dependent translation arrest leads to not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 284, 10343-10352. doi: 10.1074/jbc.M808840200.
47. Kuroha, K., Horiguchi, N., Aiba, H. and *Inada, T. (2009) Analysis of nonstop mRNA translation in the absence of tmRNA in *E. coli*. *Genes Cells* 14, 739-749. doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01304.
48. Fujii, K., Sakata, T., Kitabatake, M. and *Ohno, M. (2009) A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. *Genes Dev.* 23, 963-74. doi: 10.1101/gad.1775609
49. *Kataoka, N., Fujita, M. and *Ohno, M. (2009) Functional association of the microprocessor complex with the spliceosome. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3243-54. doi: 10.1128/MCB.00360-09.
50. Fukumura, K., Taniguchi, I., Sakamoto, H., Ohno, M. and *Inoue, K. (2009) U1-independent pre-mRNA splicing contributes to the regulation of alternative Splicing. *Nucleic Acids Res.* 37, 1907-1914. doi: 10.1093/nar/gkp050
51. Yoshimoto, R., Kataoka, N., Okawa, K. and *Ohno, M. (2009) Isolation and characterization of postslicing lariat-intron complexes. *Nucleic Acids Res.* 37, 891-902. doi: 10.1093/nar/gkn1002
52. Takeda, Y., Mishima, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., and *Inoue, K. (2009) DAZL relieves miRNA-mediated repression of germline mRNAs by controlling poly(A) tail length in zebrafish. *PLoS ONE* 4, e7513.
53. Fukao, A., Sasano, Y., Imataka, H., Inoue, K., Sakamoto, H., Sonenberg, N., *Thoma, C. and *Fujiwara, T. (2009) The ELAV protein HuD stimulates cap-dependent translation in a poly(A)- and eIF4A-dependent manner. *Mol. Cell* 36, 1007-1017.
54. Hayashida, Y., Nishibu, T., Inoue, K. and *Kurokawa, T. (2009) A useful approach to total analysis of RISC-associated RNA. *BMC Research Notes* 2, 169.
55. Fukumura, K., Taniguchi, I., Sakamoto, H., Ohno, M., and *Inoue, K. (2009) U1-independent pre-mRNA splicing contributes to the regulation of alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 37, 1907-1914.
56. Shigemoto T, Kageyama M, Hirai R, Zheng J, Yoneyama, M., *Fujita T. (2009) Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and MDA5: implications for resistance to type I diabetes. *J. Biol. Chem.* 284, 13348-54. doi:10.1074/jbc.M809449200.
57. Kikuchi, K., Fukuda, M., Ito, T., Inoue, M., Yokoi, T., Chiku, S., Mitsuyama, T., Asai, K., *Hirose, T., Aizawa, Y. (2009) Transcripts of unknown function in multiple-signaling pathways involved in human stem cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* 37, 4987-5000.
58. Ideue, T., Hino, K., Kitao, S., Yokoi, T., *Hirose, T. (2009) Efficient oligonucleotide-mediated degradation of nuclear noncoding RNAs in mammalian cultured cells. *RNA* 15, 1578-1587.
59. Sasaki, Y.T., Ideue, T., Sano, M., Mitsuyama, T., *Hirose, T. (2009) MENε/β noncoding RNAs are structural integrator of the nuclear body, paraspeckle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 2525-2530.
60. Taniguchi, I. and *Ohno, M. (2008) ATP- dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56. *Mol. Cell. Biol.* 28, 601-8. PMID:17984224
61. Kitao, S., Segref, A., Kast, J., Wilm, M., Mattaj, I, W. and *Ohno, M. (2008) A compartmentalized phosphorylation/ dephosphorylation system that regulates U snRNA export from the nucleu. *Mol. Cell. Biol.* 28, 487-97.
62. Takahashi, S., Araki Y., Ohya Y., Sakuno T., Hoshino, S., Kontani, K., Nishina H., and *Katada, T. (2008) Upf1 potentially serves as a RING-related E3 ubiquitin ligase via its association with Upf3 in yeast. *RNA* 14, 1-9.

公募研究

1. Miyauchi, K., Kimura, S. and *Suzuki, T. (2013) A cyclic form of N⁶-threonylcarbamoyladenine as a widely distributed tRNA hypermodification *Nature Chem. Biol.* 9, 105-11.
2. Taniguchi, T., Miyauchi, K., Nakane, D., Miyata, M., Muto, A., Nishimura, S. and *Suzuki, T. (2013) Decoding system for the AUA codon by tRNA^{Ile} with the UAU anticodon in *Mycoplasma mobile*. *Nucleic Acids Res.* 41, 2621-31.
3. O. Nureki, R. Ishitani, T. Yoshihisa, M. Sato, N. Dohmae, D. Mangroo, D. Becker, K. Nozawa, F. Arisaka, S. Kanamaru, and S. Bruno (2013) Crystal structure of Cex1p reveals the mechanism of tRNA trafficking between nucleus and cytoplasm. *Nucleic Acids Res.* 41, 3901-14.
4. Kobayashi, T., Yukigai, J., Ueda, K., Machida, K., Masutani, M., Nishino, Y., Miyazawa, A. and *Imataka, H. (2013). Purification and visualization of encephalomyocarditisvirus synthesized by an in vitro protein expression system derived from mammalian cell extract. *Biotech. Letters* 35, 309-14. doi: 10.1007/s10529-012-1086-1

5. Masutani, M., Machida, K., Kobayashi, T., Yokoyama, S., and *Imataka, H. (2013). Reconstitution of eukaryotic translation initiation factor 3 by co-expression of the subunits in a human cell-derived in vitro protein synthesis system. *Protein Expression and Purification* 87, 5-10. PUBMED 23063735
6. Chujo, T. and *Suzuki, T. (2012) Trmt61B is a methyltransferase responsible for 1-methyladenosine at position 58 of human mitochondrial tRNAs *RNA*, 22, 2269-2276
7. Chujo, T., Ohira, T., Sakaguchi, Y., Goshima, N., Nomura, N., Nagao, A. and *Suzuki, T. (2012) LRPPRC/SLIRP suppresses PNPase-mediated mRNA decay and promotes polyadenylation in human mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 40, 8033-8047.
8. Kimura, S., Ikeuchi, Y., Kitahara, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T. and *Suzuki, T. (2012) Base methylations in the double-stranded RNA by a fused methyltransferase bearing unwinding activity. *Nucleic Acids Res.* 40, 4071-4085.
9. Nagata T, Tsuda K, Kobayashi N, Shirouzu M, Kigawa T, Güntert P, Yokoyama S, *Muto, Y. (2012) Solution structures of the double-stranded RNA-binding domains from RNA helicase A. *Proteins.* 80, 1699-1706.
10. He, F., Makoto Inoue, M., Kigawa, T., Takahashi, M., Kuwasako, K., Tsuda, K., Kobayashi, N., Terada, T., Shirouzu, M., Güntert, P., Yokoyama, S. and *Muto, Y. (2012) Solution Structure of the Splicing Factor Motif (SFM) of the human Prp18 protein. *PROTEINS* 80, 968-974.
11. Satoh, R., Tanaka, A., Kita, Y., Morita, T., Matumura, Y., Umeda, N., Hayashi, S., Tani, T., Shinmyozu K. and *Sugiura, R. (2012) Role of the RNA-binding protein Nrd1 in stress granule formation and its implication in the stress response in fission yeast. *PLoS ONE* 7, e29683.
12. Chinen, M. and *Tani, T. (2012) Diverse functions of nuclear non-coding RNAs in eukaryotic gene expression. *Frontiers in Bioscience*, 17, 1402-1417
13. Suzuki, A., Saba, R., Miyoshi, K., Morita, Y., *Saga, Y. (2012) Interaction between NANOS2 and the CCR4-NOT deadenylation complex is essential for male germ cell development in mouse. *PLoS ONE* 7, e33558.
14. Sasaki, K., Suzuki, A., Kagatsume, S, Ono, M., Matsuzawa, K., Taguchi, Y., *Kurihara, Y. (2012) A cetylation of Prpp K150 regulates the subcellular localization.. *Gene*: 2012 491, 13-9.
15. Sakaki, K., Yoshina, S, Shen, X, Han, J, DeSantis, MR, Xiong, M, Mitani, S, *Kaufman, RJ. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(21):8079-84. doi: 10.1073/pnas.1110589109. Epub 2012 May 4. PMID: 22562797.
16. Yamamoto-Hino, M., Abe, M., Shibano, T., Setoguchi, Y., Awano, W., Ueda, R., Okano, H. and *Goto, S. (2012) Cisterna-specific localization of glycosylation-related proteins to the Golgi apparatus. *Cell Struct. Funct.* 37, 55-63 doi: [dx.doi.org/10.1247/csf.11037](https://doi.org/10.1247/csf.11037)
17. Yano, H., Yamamoto-Hino, M., Awano, W., Aoki-Kinoshita, K.F., Tsuda-Sakurai, K., Okano, H. and *Goto, S. (2012) Identification of proteasome components required for apical localization of Chaoptin using functional genomics. *J. Neurogenet.* 26, 53-63 doi: 10.3109/01677063.2012.661497
18. Kametaka, S., Kametaka, A., Yonekura, S., Haruta, M., Takenoshita, S., Goto, S. and *Waguri, S. (2012) AP-1 clathrin adaptor and CG8538/Aftiphilin are involved in Notch signaling during eye development in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.* 125, 634-648 doi: 10.1242/jcs.090167
19. Mori, S., Kajita, T., Endo, T. and *Yoshihisa, T. (2012) The intron of tRNA-TrpCCA is dispensable for growth and translation of *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 17, 1760-1769.
20. Yamamoto, H., Fukui, K., Takahashi, H., Kitamura, S., Shiota, T., Terao, K., Uchida, M., Esaki, M., Nishikawa, S., Yoshihisa, T., Yamano, K. and *Endo T. (2012) Roles of TOM70 in import of presequence-containing mitochondrial proteins. *J. Biol. Chem.* 284, 31635-31646.
21. Kobayashi, T., Nakamura, Y., Mikami, S., Masutani, M., Machida, K., *Imataka, H. (2012). Synthesis of encephalomyocarditis virus in a cell-free system: from DNA to RNA virus in one tube. *Biotech. Letters* 34, 67-73. PUBMED 21952914
22. Machida, K., Masutani, M., Kobayashi, T., Mikami, S., Nishino, Y., Miyazawa, A., and *Imataka, H. (2012). Reconstitution of the human chaperonin CCT by co-expression of the eight distinct subunits in mammalian cells. *Protein Expression and Purification* 82, 61-69. PUBMED 22133715
23. Watanabe, N., Ikeda, T., Mizuki, F. and *Tani, T. (2012) Characterization of the *ptr5⁺* gene involved in nuclear mRNA export in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 1197-1204.
24. Murayama, M., Hayashi, S., Nishimura, N., Ishide, M., Kobayashi, K., Yagi, Y., Asami, T., Nakamura, T., Shinozaki, K., *Hirayama, T. (2012) Isolation of Arabidopsis ahg11 a weak ABA hypersensitive mutant defective in nad4 RNA editing. *J. Exp. Bot.* 63, 5301-5310
25. Okamoto, M., Tsuboi, Y., Goda, H., Yoshizumi, T., Shimada, Y., *Hirayama, T. (2012) Multiple hormone treatment revealed novel cooperative relationships between abscisic acid and biotic stress hormones in cultured cells. *Plant Biotech.* 29: 19-34.
26. Kressler, D., Bange, G., Ogawa, Y., Stjepanovic, G., Bradatsch, B., Pratte, D., Amlacher, S., Strauß, D., Yoneda, Y., Katahira, J., Sinning, I., *Hurt, Ed. (2012) Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly. *Science* 338, 666-671.
27. *Kawahara, Y., Mieda-Sato, A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 3347-3352.
28. *Kawahara, Y. (2012). Quantification of adenosine-to-inosine editing of microRNAs using a conventional method. *Nature*

Protocols 7, 1426-1437.

29. Yamashita, S., Nagata, T., Kawazoe, M., Takemoto, C., Kigawa, T., Güntert, P., Kobayashi, N., Terada, T., Shirouzu, M., Wakiyama, M., *Muto Y. and Yokoyama S. (2011) Structures of the first and second double-stranded RNA-binding domains of human TAR RNA-binding protein. *Protein Science* 20, 118-130.
30. Tsuda, K., Someya T., Kuwasako K., Takahashi M., He F., Unzai S., Inoue M., Harada T., Watanabe S., Terada T., Kobayashi N., Shirouzu M., Kigawa T., Tanaka A., Sugano S., Güntert P., Yokoyama S. and *Muto Y. (2011) Structural basis for the dual RNA-recognition modes of human Tra2- β RRM *Nucleic Acids Res.* 39, 1538-1553.
31. Kobayashi, T., Machida, K., Mikami, S., Masutani, M., and *Imataka, H. (2011). Cell-free RNA replication systems based on a human cell extracts-derived *in vitro* translation system with the encephalomyocarditisvirus RNA. *J. Biochemistry* 150, 423-430. PUBMED 21622667
32. *Shibata, N., Hayashi, T., Fukumura, R., Fujii, J., Kudome-Takamatsu, T., Nishimura, O., Sano, S., Fuyan, S., Suzuki, N., Araki, R., Abe, M. and *Agata, K. (2011) Comprehensive gene expression analyses in pluripotent stem cells of a planarian, *Dugesia japonica*. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 93-102.
33. Sakurai, T., Lee, Hayoung., Kahima, M., Saito, Y., Hayashi, T., Kudome-Takamatu, T., Nishimura, O., Agata, K., and *Shibata, N. (2011) Involvement of a planarian P2X homolog in regulation of asexual reproduction mediated by pluripotent stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 341, 429-443.
34. Tasaki, J., Shibata, N., Nishimura, O., Itomi, K., Tabata, Y., Son, F., Suzuki, N., Araki, R., Abe, M., Agata, K. and *Umesono, Y. (2011) ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development* 138, 2417-27.
35. Tasaki, J., Shibata, N., Sakurai, T., Agata, K., *Umesono, Y. (2011) Role of c-Jun N-terminal kinase activation in blastema formation during planarian regeneration. *Dev. Growth Differ.* 53, 389-400.
36. Oda, S., Tomioka, M., and *Iino, Y. (2011). Neuronal plasticity regulated by the insulin-like signaling pathway underlies salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurophysiol.* 106, 301-308. PUBMED 21525368
37. Miki, T., Kamikawa, Y., Kurono, S., Kaneko, Y., Katahira, J., *Yoneda, Y. (2011) Cell type-dependent gene regulation by *Staufen2* in conjunction with *Upf1*. *BMC Mol. Biol.* 12, 48.
38. Yamamoto-Hino, M., Kanie, Y., Awano, W., Aoki-Kinoshita, K.F., Yano, H., Nishihara, S., Okano, H., Ueda, R., Kanie, O. and *Goto, S. (2010) Identification of genes required for neural-specific glycosylation using functional genomics. *PLoS Genetics* 6, e1001254 doi: 10.1371/journal.pgen.1001254
39. Mukai, A., Yamamoto-Hino, M., Awano, W., Watanabe, W., Komada, M. and *Goto, S. (2010) Balanced ubiquitylation and deubiquitylation of Frizzled regulate cellular responsiveness to Wingless/Wnt. *EMBO J.* 29, 2114-2125 doi: 10.1038/emboj.2010.100
40. Midorikawa, R., Yamamoto-Hino, M., Awano, W., Hinohara, Y., Ueda, R. and *Goto, S. (2010) Autophagy-dependent rhodopsin degradation prevents retinal degeneration in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 30, 10703-10719 doi: 10.1523/JNEUROSCI.2061-10.2010
41. Mori T, Ogasawara C, Inada, T., Englert M, Beier H, Takezawa M, Endo T, *Yoshihisa T. (2010) Dual functions of yeast tRNA ligase in the unfolded protein response: unconventional cytoplasmic splicing of HAC1 pre-mRNA is not sufficient to release translational attenuation. *Mol. Biol. Cell* 21, 3722-3734. doi: 10.1091/mbc.E10-08-0693.
42. Abe, M., Setoguchi, Y., Tanaka, T., Awano, W., Takahashi, K., Ueda, R., Nakamura, A. and *Goto, S. (2009) Membrane protein location-dependent regulation by PI3K (III) and Rabenosyn-5 in *Drosophila* wing cells. *PLoS ONE*, 4, e7306
43. Nojima, T., Oshiro-Ideue, T., Nakanoya, H., Kawamura, H., Morimoto, T., Kawaguchi, Y., Kataoka, N. and Hagiwara, M. (2009) Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* 37, 6515-6527
44. *Kataoka, N.#, Fujita, M.# and *Ohno, M. (2009). Functional association of the Microprocessor complex with spliceosome (#Equally contributed first authors.) *Mol. Cell. Biol.* 29: 3243-3254

【英文総説】

1. *Inada, T. (2013) Quality control systems for aberrant mRNAs induced by aberrant translation elongation and termination. *Biochim Biophys Acta.* doi:pii: S1874-9399(13)00026-6. 10.1016/j.bbaggm.2013.02.004.
2. Kato, Y. and *Nakamura, A. (2012). Roles of cytoplasmic RNP granules in intracellular RNA localization and translational control in the *Drosophila* oocyte. *Develop. Growth Differ.* 54, 19-31.
3. *Tanaka, T. and *Nakamura, A. (2011). Oskar-induced endocytic activation and actin remodeling for anchorage of the *Drosophila* germ plasm. *BioArchitecture* 1, 122-126.
4. Onoguchi, K., Yoneyama, M., *Fujita, T. (2011) Retinoic Acid-inducible gene-I-like receptors. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 27-31.
5. *Sugiura, R., Satoh, R., Ishiwata, S., Umeda, N., Kita, A. Role of RNA-Binding Proteins in MAPK Signal Transduction Pathway. *J. Sig. Trans.* Volume 2011 (2011), Article ID 109746, doi:10.1155/2011/109746
6. *Nakamura, A., Shirae-Kurabayashi, M. and Hanyu-Nakamura, K. (2010). Repression of early zygotic transcription in the germline. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 709-714.
7. (2010) Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev. Med. Virol.* 20, 4-22.

8. Fukumura, K. and *Inoue, K. (2009) Role and mechanism of U1-independent pre-mRNA splicing in the regulation of alternative splicing. *RNA Biol.* 6, 395-398.
9. Yoneyama, M., *Fujita, T. (2009) RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol. Rev.* 227, 54-65.
10. *Nakamura, A. and *Seydoux, G. (2008). Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. *Development* 135, 3817-3827.

【シンポジウム】

本領域と理研 CDB ならびに非コード RNA 領域との共催で、国際シンポジウム「RNA Science in Cell and Developmental Biology」を2回開催し（平成20年度と22年度）、RNA 関連研究に関する国内外の優れた研究者が一同に会する機会となった。invited speaker を中堅の PI を中心にし、若手研究者への支援を充実させたことで、活発な議論が行われた。ミーティングにおける議論の活発さと日本の RNA 研究のレベルについて、内外の研究者に高く評価された。国内でも日本分子生物学会や日本生化学会におけるシンポジウムやワークショップにおいて、本領域の成果発表を行った。以下に本領域が主体となって開催したシンポジウムとワークショップについて記載する。

2009年

- 第82回日本生化学会シンポジウム「多様性と非対称性を獲得する RNA プログラム」
企画者 大野班員、稲田班員
- 第32回日本分子生物学会 ワークショップ「多様性を生む RNA プログラム」企画者 井上班員、稲田班員

2010年

- The 19th CDB Meeting. May 10-12, 2010. RIKEN Center for Developmental biology. Kobe Japan. 中村輝班員が中心となってプログラム企画等を行った。国内外の参加者から高い評価を得た。
- BMB2010 日本生化学会日本分子生物学会合同年会 ワークショップ「翻訳の分子基盤から RNA 品質管理機構の理解へ」
企画者 大野班員、稲田班員



2011年

- 第34回日本分子生物学会・ワークショップ「Frontiers in nucleic acid technology : From understanding to control of biological function」
企画者 稲田班員、鈴木公募班員

2012年

- The 22nd CDB meeting on “RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II” 2012. 6. 11-13. Kobe, Japan.
- 第35回日本分子生物学会 ワークショップ「RNA 制御の細胞生物学」企画者
企画者 井上班員、中村班員
- 第35回日本分子生物学会 ワークショップ「mRNA factory の基本原理の解明から発症メカニズムの理解へ」
企画者 大野班員、稲田班員

【啓蒙関係】

本領域の計画班員が中心となり、RNA プログラムに関連する国内研究を網羅した、蛋白質核酸酵素増刊号『多様性と非対称性を獲得する RNA プログラム』を2009年に出版した。2010年と2013年にも本領域の班員が主要な編者となった RNA 関連研究の増刊号を出版した。



【マスコミ発表等】

杉浦麗子 (FTY720 の標的分子として tof1 を同定し、薬事日報)

廣瀬哲郎 (オリジナルな核内 RNA ノックダウン法 *PNAS* 2009 について日経産業新聞、化学工業日報などで報道)

木俣行雄 (XBP1 α タンパク質による膜へのアンカリング *Mol. Cell* 2009 について奈良新聞、奈良日日新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞、毎日新聞、日刊工業新聞(同、農業新聞、化学工業新聞、科学新聞、朝日新聞朝刊などで報道)

平山隆志 (polyA 鎖長調節による個体のホルモン応答の調節 *PNAS* 2009 日刊工業新聞、農業新聞、化学工業新聞、科学新聞、朝日新聞朝刊などで報道)

大野睦人 (RNA 転写産物の長さによる分類機構 *Science* 2012 について京都新聞などで報道)

稲田利文 (新規翻訳因子による異常 mRNA の認識と分解機構の解明 *Mol. Cell* 2012 について河北新報で報道)

【図書】(計15件)

1. 泊幸秀、稲田利文、廣瀬哲郎、塩見春彦編(2013)実験医学増刊号『生命分子を統合する RNA』

2. 泊幸秀、稲田利文、大野睦人、塩見春彦編(2010) 実験医学増刊号「拡大・進展を続ける RNA 研究の最先端」(羊土社).
3. 稲田利文、井上邦夫、中村輝、大野睦人編(2009)「概論: 遺伝子発現制御の中核をなす RNA プログラム」**蛋白質核酸酵素増刊号『多様性と非対称性を獲得する RNA プログラム』**

【産業財産権】

○出願状況 (計 5 件)

名称: mRNA 発現を指標にした MAP キナーゼシグナリングのリアルタイム測定法の開発と抗がん剤探索法

発明者: 杉浦麗子、高田宏文、石渡俊二、喜多綾子

権利者: 学校法人近畿大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-162093

出願年月日: 2010 年 7 月 16 日

国内外の別: 国内

【ホームページ】

URL (<http://www.org.kobe-u.ac.jp/rna/>) において、各研究の概要や論文の内容の説明文などを掲載し、広く国民に成果を発信した。

【一般向けのアウトリーチ活動】

高校での出前授業 平成 22 年 愛知県淑徳高等学校、平成 24 年 宮城県立青陵中等教育学校 (稲田班員)

10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度（1 ページ程度）

研究領域の研究成果が、当該学問分野や関連分野に与えたインパクトや波及効果などについて記述してください。

遺伝子産物の「非対称性」と「多様性」を獲得する機構と、その基盤となる遺伝子産物の「品質保証」機構の研究について、本領域による各研究者間の研究手法や材料、アイデアの交換を自由に行った結果、当該分野研究の飛躍的な発展があり、関連学問分野に対し大きく貢献したと考える。

多様性獲得プログラムについては重要な制御因子による選択的スプライシングの制御機構の理解が飛躍的に進んだ（黒柳班員）。非対称性獲得プログラムについては、mRNAの局在と翻訳制御を行うRNP複合体の因子であるEdc3の機能解析から、RNP複合体の構成タンパク質の動的制御の重要性が浮き彫りとなった（中村班員）。また、生殖質繫留過程の解析から、膜輸送系とアクチン骨格系の制御を介したRNPの局在維持機構を明らかにした（中村班員）。ホヤの胚発生における中内胚葉の分離に必須なNotのmRNAについて、核移動と連携したmRNAの非対称分配機構を明らかにした（西田班員）。品質保証プログラムについては、異常mRNAの認識機構のみならず異常タンパク質の特異的分解機構を明らかにし、mRNA分解にとどまらない品質管理機構の全体像の理解に大きく貢献した（稲田班員）。特に、細胞内の主要な異常mRNAであるノンストップmRNAの品質管理機構の理解に大きく貢献した。また、ユビキチンリガーゼ複合体が、機能不全リボソームをユビキチンすることを発見し、異常rRNAの認識と分解機構の理解に非常に大きく貢献した（北島班員）。RNAの核外輸送を担う因子群は、細胞質におけるmRNAの品質保証機構や局在化などの核外輸送後のRNAの運命決定にも大きく関与する。長年不明であった核外輸送におけるRNAのIDの1つである長さを識別する機構を初めて明らかにした（大野班員）。オリジナルな核内RNAノックダウン法を駆使して、パラスペックル構造体の構造構築におけるMEN ϵ / β 非コードRNAの機能が解明された結果、核内構造体の構築原理と生理機能の理解が格段に進んだ（廣瀬班員）。

RNA局在・翻訳制御とRNA分解の連携機構については、生殖質因子Pgcの解析から、miRNA経路の抑制による生殖質RNAの安定化における動物種を超えた共通性が明らかになった（中村班員）。哺乳類におけるスプライシング後のイントロンの代謝経路を解析した結果、miRNAの合成とスプライシング反応の関連が明らかとなった（大野班員・片岡班員）。また、翻訳終結に依存したポリA鎖分解機構の分子基盤解析から、ポリA鎖結合因子PABPに対する翻訳終結因子eRF3とTobとの競合的相互作用が明らかになった（星野班員）。

高次生命現象におけるRNAプログラムの機能解明については、自然免疫応答因子であるRLRファミリーの生理的な役割を解析し、自己免疫疾患誘導への関与を明らかにした（米山班員）。polyA短鎖化酵素（PARN）とpolyA鎖合成酵素PAPが協調的にミトコンドリアmRNAのpolyA鎖の長さを調節し、アブシジン酸応答に重要な役割を果たすことを明らかにした（平山班員）。選択的分解による減数分裂特異的な発現機構の理解も大きく進んだ（山下班員）。

RNAプログラム(mRNA局在・翻訳・分解制御の連携、品質保証機構)は生命体構築の基本原則であり、その分子機構の解析がRNA関連の疾病の理解と治療に貢献してきている。スプライシング因子のリン酸化酵素Clkの特異的阻害剤が、筋ジストロフィー患者由来の細胞において変異エクソンのskippingを促進し、部分的ではあるが活性を持った蛋白質の合成を促進することを見出した（片岡班員）。スプライシングの基礎研究が治療薬開発へとつながることが示唆され、RNAが関連する様々な疾病の治療薬の開発に本領域での研究が大きく貢献することは間違いないものとする。ナンセンス変異が原因でおこる遺伝病の治療薬についても、本領域での置換を基盤にしたスクリーニング系の構築につながっている（稲田班員）。また、RNAサイレンシングは、最も競争の激しい研究分野の1つであるが、翻訳制御やmRNA安定性制御の分子機構自体の理解なしにはその進展は不可能である。近年のmiRNAによるサイレンシングの分子機構の解析から、普遍的なpolyA短鎖化酵素CCR4-NOTの極めて重要な役割が明らかになりつつあり、本領域研究での解析からCCR4-NOTの新規機能の理解も進みつつある。従って、本領域の成果は、小分子RNAが関係する様々な疾病の理解と治療法の確立にも大きく貢献するものとする。