

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18490

研究課題名(和文) スプライシング因子SDE2によるヘテロクロマチン形成機構の解明

研究課題名(英文) Biochemical study of a splicing factor Sde2

研究代表者

大谷 淳二(Otani, Junji)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：10770878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分裂酵母においてヘテロクロマチン形成に必要なmRNAスプライシング因子、Sde2の解析を進めた。Sde2のN末端に進化的に保存されたユビキチン様タンパク質ドメイン(Ubl)は、細胞内でユビキチンと同様に、C末端のGGモチーフにおいて切断を受けていること、Ubl自体はmRNAスプライシングに必要ではないが、C末側断片の新生N末端が重要であることが明らかになった。また、新生N末端はN末端則による蛋白質分解経路の基質となることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Post-translational modification by ubiquitin and several ubiquitin like protein modifiers controls diverse cellular processes. There are many proteins carrying the protein domains structurally similar to ubiquitin without the ability to form covalent linkage. Sde2 was first identified as a factor involved in gene silencing at telomere in *Schizosaccharomyces pombe* and later found to be required for mRNA splicing. In this study, we showed that the evolutionary conserved ubiquitin like domain (Ubl) of Sde2 at its N-terminus is cleaved off in *S. pombe* and also in human cells. We found that the Ubl itself is dispensable but the newly exposed neo N-terminus after removal of the Ubl is important for mRNA splicing.

研究分野：生化学

キーワード：スプライシング ヘテロクロマチン N末端則

1. 研究開始当初の背景

mRNA スプライシングは、ATP 依存性 RNA ヘリカーゼによって駆動される多段階反応であり、多様な生命現象の制御に関わる (Cordin and Beggs, 2013; Cordin et al, 2012)。リン酸化、アセチル化およびユビキチン化のようなスプライシング因子の可逆的な翻訳後修飾は、スプライソソーム複合体の成分間の分子間相互作用を制御して、動的構造変換および再構成を可能にすると考えられている (Agafonov et al, McKay and Johnson, 2010)。

タンパク質のユビキチン化は、mRNA スプライシング (Yau and Rape, 2016) を含む多くの細胞プロセスを調節する翻訳後修飾である。ユビキチン化は、ユビキチンの C 末端と基質のリジン残基の ϵ -アミノ基との間のイソペプチド結合を生じる、E1 ユビキチン活性化酵素、E2 ユビキチン結合酵素および E3 ユビキチンリガーゼによる連続した酵素反応に依存する (Hershko and Ciechanover, 1998)。ユビキチンと基質の間の結合は、ユビキチン化酵素に拮抗する脱ユビキチン化酵素によって切断され、ユビキチン化を介したシグナル伝達を調節する (Reyes-Turcu et al, 2009)。ユビキチン化は、出芽酵母の溶解物で再構成された試験管内 mRNA スプライシング反応にも必要であることが示されている (Bellare et al, 2008)。また、スプライシング因子にはユビキチン様タンパク質ドメインを持つものがいくつも知られている。ユビキチン様タンパク質ドメインは、タンパク質間相互作用などを介してユビキチン化経路とのクロストークに関与する例が知られており、ユビキチン化経路による mRNA スプライシングの制御を示唆していると考えられる (Korneta et al, 2012)。

分裂酵母においてヘテロクロマチン形成に必要な因子として Sde2 (Silencing defect 2) が同定され、その後スプライシングに関わる因子であることが判明した (Bayne et al, 2014; Sugioka-Sugiyama and Sugiyama, 2011)。Sde2 は N 末端に、分裂酵母からヒトまで進化的に保存されているユビキチン様ドメイン (Ubl) を有する。

2. 研究の目的

Sde2 の Ubl は、ユビキチン様タンパク質修飾因子の間で保存されている C 末端のジグリシンモチーフを有する。ユビキチンのジグリシンモチーフは、脱ユビキチン化酵素による前駆タンパク質の切断およびユビキチンと

基質との間の共有結合形成のために必要とされる。本研究では Sde2 の Ubl の機能を解析した。

3. 研究の方法

Sde2 の Ubl は進化的に保存されており、特にジグリシンモチーフ周辺は分裂酵母から人まで高度に保存されている。分裂酵母の Sde2 欠損株ではテロメアおよびセントロメア領域の RNA 転写抑制に異常が出ることが報告されていたことから、本研究ではヘテロクロマチン異常を簡便に検出する実験系を用いて Sde2 の機能における Ubl の役割について検討した。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母において Sde2 の Ubl は切断を受ける

Sde2 の Ubl の役割を調べるために、2 つのグリシン残基をアラニン残基 (GG/AA) で置き換えたジグリシンモチーフ変異株、および Ubl ドメインを欠く 2 つの変異株 Δ Ubl および Δ Ubl+N を構築した (図 1a)。C 末端に FLAG タグを有する野生型 Sde2 タンパク質のサイズは、GG/AA 変異タンパク質よりも約 10kDa 小さく、 Δ Ubl および Δ Ubl+N 変異体と同等の泳動度を示した (図 1b)。この結果は、Sde2 の Ubl がジグリシンモチーフで切断され、GG/AA 変異体が細胞内での切断に耐性であることを示している。

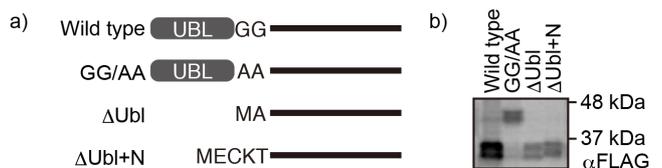


図 1 Sde2 変異体

(2) 切断された Sde2 の C 末側断片が正常なスプライシングに必要な

次に、GG/AA、 Δ Ubl および Δ Ubl+N 変異株の表現型を調べた (図 2)。GG/AA および Δ Ubl+N 変異株は、sde2 欠損株と同様に、ウラシルを欠くプレート上での増殖 (図 2 中央) および高温感受性 (図 2 右) を示し、これら変異体は機能的でないことが明らかになった。興味深いことに、 Δ Ubl 変異株は親株と区別がつかず、 Δ Ubl 自体は Sde2 の機能に必須ではないことが示された。

Δ Ubl+N 変異体は Δ Ubl 変異体と比較して、

わずか数アミノ酸残基の N 末端伸長を有する

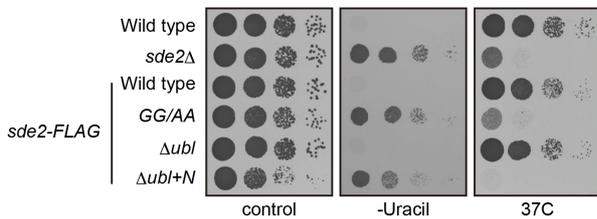


図 2 Sde2 変異株のウラシル欠損条件下での増殖、および高温条件下での増殖

のみであるが、この差により Sde2 の機能は阻害されたことになる。Ubl ドメインを欠くこれらの変異体間の表現型の相違は、切断された Sde2 の C 末側断片の新生 N 末端が正常なスプライシングに重要であることを示している。この結果と一致して、新生 N 末端およびジグリシンモチーフを含む領域のアミノ酸配列は種間で非常に高度に保存されている。

新生 N 末端の Lys85 残基をバリンまたはアスパラギン酸 (K85V または K85D) に置換した Sde2 変異体を sde2 欠損株に導入してもテロメア領域のヘテロクロマチンの異常は抑制できなかったが、野生型および K85R 変異体を導入するとヘテロクロマチンの異常は回復された。

以上の結果から、Sde2 のユビキチン様タンパク質ドメインが、おそらくは脱ユビキチン化酵素の活性により除かれ、新生 N 末端が適切に露出されることが Sde2 の機能に重要であると考えられる。

新生 N 末端の生化学的役割を調べるために、Sde2 とスプライソソームとの間の相互作用を検討した。FLAG タグのついた Sde2 変異体の免疫沈降により、U2, U5, U6 snRNA およびスプライシング因子 Cdc5 が共に精製され、Sde2 の C 末側断片が後期ステップのスプライソソームと物理的に会合することが示された。mRNA スプライシングに異常の出る GG/AA および Ubl+N 変異体も同様に、スプライソソームに結合できるようであった。したがって、Sde2 の C 末側断片の新生 N 末端は、Sde2 とスプライソソームとの間の相互作用に重要ではなかった。

(3) Sde2 の C 末側断片は N 末端側により分解を受ける

Sde2 の C 末側断片の新生 N 末端は、リジン残基であり、N 末端側によると、このタンパ

ク質断片は不安定である。N 末端側を司るユビキチン E3 リガーゼは、UBR ボックスと呼ばれる保存されたタンパク質ドメインを介して、基質の N 末端の塩基性アミノ酸を直接認識することが知られている。分裂酵母では UBR ボックスを有するタンパク質として、ubr1、ubr11 および mlo2 の 3 つが知られている。Sde2-FLAG 株において、これらの遺伝子のそれぞれを欠失させ、N 末端側経路の基質となるかを調べた。対数増殖期における Sde2 のタンパク質レベルは、これらの遺伝子欠損によって影響を受けなかったが、飽和し、静止期にある細胞において、野生型株では Sde2 タンパク質レベルが大幅に低下するのに対して、ubr11 破壊株では対数増殖期に近いレベルを保っていた (図 3)。

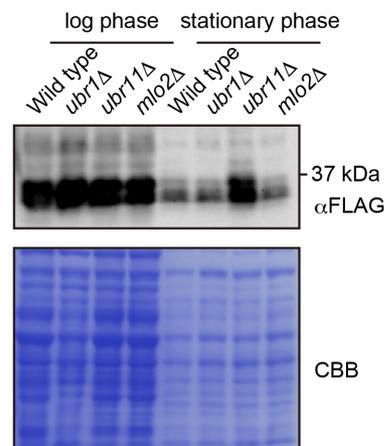


図 3 対数増殖期および静止期における Sde2 タンパク質量

翻訳阻害剤、シクロヘキシミドの存在下で Sde2 タンパク質の分解速度を比較したところ、野生株では、対数増殖期および静止期の両方において、ubr11 欠損株よりも分解が早く、Sde2 が細胞の状態とは無関係に Ubr11 に依存して分解されることがわかった。

Sde2 は N 末端側経路の基質であることがわかったが、ubr11 欠損株ではテロメアおよびセントロメアのヘテロクロマチン形成に異常は見られなかった。この結果は、Sde2 の新生 N 末端が適切な mRNA スプライシングおよび N 末端側経路を介した迅速な分解に独立して必要とされることを示唆している。

(4) N 末端側経路は、窒素飢餓下での Sde2 タンパク質の急速な減少に必要である

Sde2 タンパク質量は、飽和細胞培養において、大幅に減少することが観察された。この

時細胞は栄養枯渇および酸化環境にあると考えられるため、これら環境ストレスによる Sde2 タンパク質量の変化を検討した。グルコース飢餓、窒素源飢餓、酸化ストレスをそれぞれ独立に与えたところ、窒素源飢餓条件において Sde2 タンパク質は迅速に消失し、ubr11 欠損株では減少が遅れることが明らかになった。この条件においても、コアスプライシング因子である Cdc5 のタンパク質量は一定に保たれており、Sde2 タンパク質量が選択的に調節されていることが示唆された。

(5)ubr11 は窒素源枯渇条件下での減数分裂の誘導に必要である

窒素飢餓条件下で、分裂酵母は減数分裂を起こし、接合体および胞子を形成する (Yamamoto, 1996)。そこで、ubr11 欠損株の交配効率を調べた。培養培地を 32 の富栄養培地から 25 の EMM-N に切り替え、48 時間で、野生株の 29.5% が接合体または胞子を形成したのに対して、ubr11 欠損株ではわずか 5.9% だった。減数分裂期に特異的にスプライシングされる crs1 および meu13 の mRNA のスプライシングを調べたところ、やはり ubr11 欠損株ではスプライシングの誘導が野生株に比べて弱かった。窒素源を欠く EMM-N プレート上に細胞をスポットすることで減数分裂を誘導すると、48 時間後に野生株の 65% が接合子または胞子を形成したのに対して、ubr11 欠損株では 4% だった。これらの結果は、窒素飢餓下での減数分裂誘発に、ubr11 が必須であることを示唆する。次に、sde2 遺伝子を共欠失させると、胞子形成の欠陥を回復するかどうかを調べた。EMM-N 固体培地上で 2 日間インキュベートした後、野生株、sde2 欠損株、ubr11 欠損株、sde2 ubr11 二重欠損株および swi6 欠損株は、それぞれ、76, 47, 1.5, 41 および 3.3% の割合で接合体または胞子を形成した (図 4)。これらの結果は、Ubr11 による Sde2 の迅速な分解が窒素飢餓下での減数分裂誘導における重要な段階であることを示唆している。

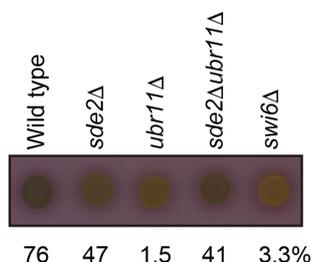


図 4 窒素源枯渇による減数分裂の誘導
分裂酵母を EMM-N プレート上にスポットし、形成した胞子をヨウ素蒸気染色により染色した。下の数字は顕微鏡観察による胞子形成率を示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Hirai Y., Tamura M., Otani J., Ishikawa F.

“NEK6-mediated phosphorylation of human TPP1 regulates telomere length through telomerase recruitment.”

Genes Cells, 21, 874-889, 2016 査読あり

2. Mishima Y., Brueckner L., Takahashi S., Kawakami T., Arita K., Oka S., Otani J., Hojo H., Shirakawa M., Shinohara A., Watanabe M., Suetake I.

“RFTS-dependent negative regulation of Dnmt1 by nucleosome structure and histone tails”

FEBS J., Vol 284, Issue 20, 3455-3469, 2017 査読あり

[学会発表](計 1 件)

大谷淳二、石川冬木

「Sde2 のユビキチン様蛋白質ドメインの切断は機能に必要である」

第 39 回日本分子生物学会年会(2016 年 11 月 30-12 月 1 日、横浜)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大谷 淳二 (OTANI Junji)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10770878