

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15807

研究課題名（和文）mRNA輸送因子UAP56とURH49による選択的mRNA輸送基盤の統合的解析

研究課題名（英文）Integrated analysis of selective mRNA export by mRNA export factors, UAP56 and URH49

研究代表者

藤田 賢一（fujita, ken-ichi）

藤田医科大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：70816884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトの遺伝子発現において選択的mRNA核外輸送は、高次な遺伝子発現制御の一翼を担う。ヒトにおいて高い相同性を持つUAP56とURH49は、異なる複合体を形成して選択的mRNA輸送に働く。しかし相同性の高い両者が異なる複合体を形成し、mRNAを選択的に輸送する機構は不明である。申請者はUAP56とURH49、ならびに複合体形成に重要な領域を入れ替えた変異体の構造解析を行い、UAP56とURH49の構造差異が複合体形成差異に重要であることを見出した。加えてUAP56とURH49が異なる部位のスプライシングに機能することで、選択的にmRNAを輸送することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細胞分化、多分化能維持、ゲノム安定性、ウイルスRNA制御、多発性硬化症の発症において、UAP56とURH49による選択的mRNA輸送の関与が報告されている。よって本研究のUAP56とURH49によるmRNA核外輸送機構の解明は、様々な生命現象や病気の理解に大きく貢献するだけでなく、その制御に向けた基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：For the expression of protein, genome information is transcribed to pre-mRNA in the nucleus. Pre-mRNA undergoes processing to be matured mRNA. Then mRNA is exported to the cytoplasm for protein translation. In human, closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, form distinct TREX and AREX complexes, respectively. Either TREX or AREX promotes selective mRNA export of a particular set of mRNAs. However, the underlying mechanism of mRNA recognitions in association with the distinct complexes remains poorly understood. We have analyzed the structures of UAP56 and URH49, as well as mutants in which regions important for complex formation were replaced, and found that the structural difference between UAP56 and URH49 is important for the difference in complex formation. In addition, we demonstrate that mRNA export regulated by UAP56 and URH49 were achieved during splicing step.

研究分野：分子生物学

キーワード：選択的mRNA輸送 結晶構造解析 トランスクリプトーム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物において核内で転写された前駆体 mRNA は、様々な mRNA プロセッシング過程を受けて成熟 mRNA となり翻訳の場である細胞質へと輸送される。mRNA の核外輸送機構は進化的によく保存されている。加えてヒトなどの高等生物では、mRNA 輸送因子は多様化し、複雑な遺伝子発現制御を支えている。酵母からヒトまで進化的に保存されている UAP56 は TREX (Transcription/Export) 複合体を形成して核外輸送に働く mRNA 輸送因子であり、mRNA 核外輸送全般に働くと考えられてきた。しかし申請者の研究室において、ヒト等の哺乳類では UAP56 に加えて、URH49 という非常に相同性の高いパラログが存在することに着目して研究を行った。その結果、URH49 は TREX 複合体と異なる AREX (Alternative mRNA Export) 複合体を形成すること、UAP56 と URH49 は異なる mRNA 群を輸送することを明らかにした (*Mol Biol Cell* 21, 2953-2965, 2010.)。申請者はその後、新規 AREX 複合体構成因子を同定し、URH49 と共に mRNA 輸送に働くことを見出した。UAP56 と TREX 複合体構成因子は恒常的に発現する一方で、URH49 と AREX 複合体構成因子は細胞増殖に応じて発現し、細胞増殖に関わる mRNA 輸送に働く。このように進化の過程で多様化した UAP56 と URH49 は独自の mRNA 輸送経路を獲得することで、ヒトにおいて遺伝子発現制御をより高次に制御すると考えられる。

2. 研究の目的

申請者の研究とは別に、UAP56 と URH49 による選択的 mRNA 輸送を介した、様々な生命現象の制御が報告されている。しかし両者の違いを決定づける分子機構は未解明である。この課題解決のため、申請者はこれまでに、UAP56 と URH49 が異なる複合体を形成するための責任領域と、複合体構成因子の違いが mRNA 選択性を決定することを明らかにした。これに加えて

(1) 複合体形成制御領域の違いによって、なぜ異なる複合体を形成するのか

(2) 多種多様な mRNA 分子種のどのような RNA 配列を識別するのか

を知ること、UAP56 と URH49 による選択的 mRNA 輸送の分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) UAP56 と URH49 ならびに複合体形成が入れ替わったキメラ変異体の結晶構造を解析し、立体構造による複合体形成の制御機構を分子レベルで解明する。

(2) これまでに、標的タンパク質の結合 RNA 配列を高精度に解析できる PAR-CLIP 解析と次世代シーケンサー解析により、UAP56 と URH49 の結合 RNA 配列について網羅的同定を行った。この結合 RNA 配列情報から、インフォマティクス解析によって両者の選択的 mRNA 輸送に重要なコンセンサ配列を探索し、標的 mRNA の輸送への影響を解析する。最後に UAP56 と URH49 の mRNA 認識における複合体構成因子の重要性を解析する。

4. 研究成果

(1) 構造解析による UAP56 と URH49 の複合体制御機構の解明

これまでの UAP56 と URH49 の結晶構造解析から、各ドメイン構造は相似であるが、両ドメインを結ぶリンカーの構造と各ドメイン配置の違いが観察された。過去に同定した両者の複合体形成制御領域の違いが、上記の UAP56 と URH49 の立体構造差異を規定するか検証するために、結晶構造解析よりも容易にタンパク質の立体構造を解析できるタンパク質の限定分解法を導入した。この結果、結晶構造と同様に UAP56 と URH49 における構造差異を観察した。続いて複合体形成制御領域を置換した変異体の解析を行い、複合体形成制御領域を UAP56 型に置換した URH49 変異体は UAP56 型の立体構造を、URH49 型に置換した UAP56 変異体は URH49 型の立体構造をとることを見出した。

(2) UAP56 と URH49 による選択的 mRNA 認識機構の解明

これまでに標的タンパク質の結合 RNA 配列を高精度に同定できる PAR-CLIP 解析により UAP56 と

URH49 の結合 RNA 配列の情報を得ている。当初は UAP56 と URH49 が選択的に輸送する mRNA 群において、両者の結合パターンが遺伝子全体で大きく異なることを期待していたが、情報解析の結果、遺伝子レベルでは大きな結合パターンの違いは見出せなかった。そこで UAP56 と URH49 がそれぞれ異なるスプライシング部位の制御に働くのではないかと仮説をたてた。これを検証すべく、UAP56 と URH49 のノックダウン細胞におけるスプライシング異常を次世代シーケンスによって解析し、UAP56 と URH49 がゲノムワイドに異なる領域のスプライシング制御に働くことを見出した。UAP56 と URH49 がスプライシングの段階から機能することでそれぞれが輸送する mRNA を認識し、輸送することを明らかにした。UAP56 と URH49 と相互作用する複合体構成因子も両者のスプライシング制御に必要であったことから、複合体形成を介した UAP56 と URH49 の mRNA 認識における重要な手掛りを得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujita Ken-ichi, Ishizuka Takaki, Mitsukawa Mizuki, Kurata Masashi, Masuda Seiji	4. 巻 21
2. 論文標題 Regulating Divergent Transcriptomes through mRNA Splicing and Its Modulation Using Various Small Compounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2026 ~ 2026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21062026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Ken-ichi, Yamazaki Tomohiro, Harada Kotaro, Seno Shigeto, Matsuda Hideo, Masuda Seiji	4. 巻 1863
2. 論文標題 URH49 exports mRNA by remodeling complex formation and mediating the NXF1-dependent pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms	6. 最初と最後の頁 194480 ~ 194480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagr.2020.194480	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田 賢一、池田宥哉、吉岡英恵、増田誠司
2. 発表標題 UAP56とURH49によるスプライシング制御を介した選択的mRNA輸送機構の解明
3. 学会等名 RNA学会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 藤田 賢一、池田宥哉、吉岡英恵、瀬尾茂人、増田誠司
2. 発表標題 UAP56とURH49によるスプライシング制御を介した選択的mRNA輸送機構の解明
3. 学会等名 分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 藤田 賢一、池田宥哉、吉岡英恵、瀬尾茂人、増田誠司
2. 発表標題 UAP56とURH49によるスプライシング制御を介した選択的mRNA輸送機構の解明
3. 学会等名 京都生体質量分析研究会シンポジウム
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Ken-ichi Fujita, Yuya Ikeda, Hanae Yoshioka, Shigeto Seno, Yukio Kawahara, Bunzo Mikami, Masaki Kojima, Akila Mayeda, Seiji Masuda.
2. 発表標題 Closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, form distinct TREX and AREX complexes that promote specific pre-mRNA splicing followed by selective mRNA export
3. 学会等名 分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関