

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580370

研究課題名 (和文) mRNA成熟に必須の機能を持つTREXの新規ゲノム安定性維持機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis for the mechanism of genome stability by the TREX complex, which has an essential role for the mRNA maturation in the nucleus.

研究代表者 増田 誠司 (Masuda Seiji)

京都大学・大学院生命科学研究所・准教授

研究者番号：20260614

研究成果の概要 (和文)：

TREX 複合体は、mRNA の成熟に必須の機能を持つ因子である。本研究では、TREX 複合体の構成因子である UAP56 あるいは URH49 の機能についてゲノム安定性の制御の観点から解析した。UAP56 よりも URH49 をノックダウンしたときにゲノム安定性の低下に伴う DNA の断片化が観察された。この表現系は URH49 自身や RNAseH、SF2 および RNPS1 の過剰発現によりレスキューされた。これらの結果から、TREX 複合体は、新生 RNA をゲノム DNA と相互作用しないよう制御している可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

The TREX complex has an essential function in mRNA biogenesis. Here I have studied the function of UAP56 and URH49, which are the component of the TREX complex, in view of the relationship between mRNA biogenesis and genome stability. Fragmentation from chromosome DNA was observed when URH49 was knocked down rather than that UAP56 was. This phenotype was rescued by the forced expression of URH49, RNaseH, SF2 or RNPS1. These results suggest that the TREX complex functions to regulate the interaction of nascent RNA with genomic DNA to prevent the genome instability.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

細胞は、ゲノム DNA を一旦 mRNA に転写し、それを鋳型として蛋白質の生合成を行う。転写された mRNA とゲノム DNA の(-)鎖は相補的であるので、そのままでは新生 RNA とゲノム DNA は、ハイブリッドを形成することができる。ところが

DNA:RNA ハイブリッドは、ゲノムの安定性を低下させる原因となるだけでなく、細胞死やガン化を誘導する非常に危険な分子である。このため細胞は、DNA:RNA ハイブリッドの形成を厳密に制御していることが、変異体を用いた解析により明らかになってきた。しかしその分子メカニズム

は、まだほとんどわかっていない。TREX 複合体は、mRNA の転写伸長と核外輸送(細胞質への輸送)を共役する因子として申請者が見いだした因子である。TREX 複合体は、THO 複合体、UAP56/URH49 および Aly から構成され、酵母からヒトまで保存されている。酵母において TREX 複合体を欠損すると、速やかに mRNA の転写伸長や核外輸送が停止することから、TREX 複合体は mRNA の代謝に必須の機能を持っている。しかも酵母の TREX 複合体を欠損すると、正常な状態ではほとんど起きることのない、転写された mRNA とゲノム DNA(-)鎖が DNA:RNA ハイブリッドを形成する。これが原因となってゲノム DNA の安定性が低下する。さらに SR 蛋白質 SF2 も、欠損するとゲノム安定性が低下する。このように mRNA を転写する際に、TREX 複合体や SF2 などの蛋白質がないと、ゲノムを安定に維持できないことを示す知見が集まったことで、転写とゲノム安定性を連携し調和をとる分子メカニズムの存在がクローズアップされてきた。TREX 複合体を欠損すると、mRNA 代謝異常だけでなくゲノム安定性も低下することを観察している。

申請者は、近年ヒト TREX 複合体の mRNA に対する機能解析を完了し、DNA:RNA ハイブリッドの形成制御を介したゲノム安定性の制御機構と mRNA の共役機構の連携を明らかにしたいと考え、機能解析を進めてきた。その過程で、TREX 複合体の構成因子 UAP56/URH49 や Aly のノックダウンによるゲノム DNA の断片化を観察した。加えて UAP56/URH49 は典型的な RNA ヘリカーゼファミリーの一員であることから、DNA:RNA ハイブリッド形成への関与を検証し、ハイブリッドを解消することを明らかにした。また、TREX 複合体の構成因子 Hpr1 の発現量と、乳ガンの進行度には正の相関関係があるだけでなく、Hpr1 は、がん抑制遺伝子 Rb とも結合することがわかっている。このような知見から、TREX 複合体は、発ガンの進行との関連が疑われている。それゆえ TREX 複合体を介したゲノム安定性の制御メカニズムを解析することは、生命活動の根源に迫る研究課題であるだけでなく、その知見はガンの発症メカニズムの解明にも大いなる貢献をすると考えられている。

2. 研究の目的

本研究は、mRNA が転写される際の DNA:RNA ハイブリッドの形成制御メカニズムを、TREX 複合体を用いて明らかにし、生命活動において根源的な重要性を持つと考えられる分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞の培養

本実験には、主としてヒト由来の HeLa 細胞を

使用した。HeLa 細胞の培養は、DMEM 培地に 10% 牛胎児血清を添加したものを使用し、5%炭酸インキュベーターで培養した。

(2) siRNA による標的 RNA のノックダウン

目的タンパク質の機能を解析するために、ここでは siRNA を用いて特異的なノックダウンを行った。簡単には、20 μ M の siRNA を 5 μ l のリボフェクトアミン 2000 を混合し、20 分間室温で放置した後、最終濃度 20nM となるように細胞に添加した。なお、細胞は前日に 1x10⁵/well となるように 6 well プレートに播種したものを使用した。48 時間後、細胞を回収して、ゲノム DNA ならびに RNAi による標的タンパク質の減少を確認するためにタンパク質を抽出した。

(3) Western 解析

細胞を回収、PBS で洗った後、400 μ l の低張液で 10 分間処理した。Vortex 後、12000rpm x 10 秒間遠心した。これにより細胞膜を破壊し細胞質画分を除去した。その後ペレットを高張液で 20 分間処理し、細胞核内のタンパク質を抽出した。12000rpm x 2 分間遠心することでタンパク質を上澄みに回収した。タンパク質濃度は、Bradford 法により測定した。10%の SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、セミドライ式のトランスブロット装置を用いて PDVF 膜に転写した。5%スキムミルクでブロッキングをした後、抗 UAP56 抗体または抗 URH49 抗体を用いて目的タンパク質の発現を確認した。

(4) アガロース電気泳動

細胞を回収、PBS で洗った後、20 μ l の A 緩衝液に懸濁した。これを等量の 1.2%低融点アガロースと混合し、すぐさまブロックに流し込んだ。ゲルの固化後、400 μ l の A 緩衝液に 1mg/ml のプロテナーゼ K と終濃度 1%となるように SDS を添加し、50 度で 24 時間処理した。これより DNA を抽出した。1%のアガロースゲルのコーム部分にブロックを挿入し 5V/cm で電圧をかけ電気泳動を行った。泳動終了後、分離された染色体 DNA を FASII により観察した。

5) レスキュー実験

siRNA の導入による表現系が、標的タンパク質の減少によるものであることを確認するために、siRNA 耐性を付与した UAP56 あるいは URH49 発現ベクターを導入した。その後 siRNA により内因性の UAP56 あるいは URH49 ノックダウンしたときにレスキューできるかについて DNA の断片化をアガロース電気泳動にて確認した。

4. 研究成果

(1) UAP56 あるいは URH49 をノックダウンするとゲノム安定性が低下する

siRNA に対する特異性を RT-PCR で確認した

ところ、UAP56 の siRNA は UAP56 のみ、URH49 は URH49 のみをそれぞれノックダウンしていた (data not shown)。そこで UAP56 や URH49 のノックダウンによるゲノム安定性を評価した。その結果、UAP56 のノックダウンよりも URH49 のノックダウンを行ったとき、ゲノム断片化が多く観察された (図1)。この時、それぞれのタンパク質が特異的に減少していたことから、その効果は URH49 に特異的であると考えられた。

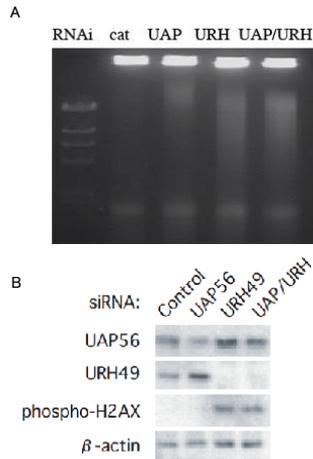


図1. UAP56 あるいは URH49 ノックダウンによりゲノム安定性は低下する
A. アガロース電気泳動の結果 B. ウェスタン解析の結果

(2) URH49 ノックダウンによるゲノム安定性の低下は URH49 の強制発現によりレスキューされる
ついで、siRNA の効果が特異的であるかについてレスキュー実験を行った。siRNA 耐性を持つ URH49 を強制発現したところ、ゲノム断片は消失した (図2)。このことから URH49 をノックダウンするとゲノム安定性が低下することがわかった。

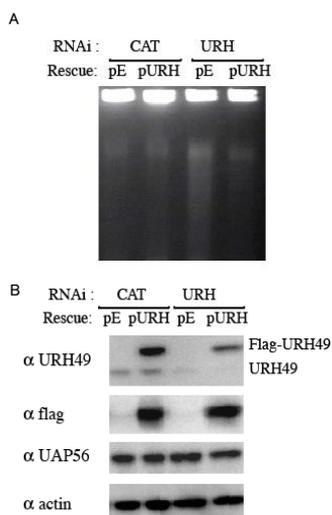


図2. URH49 ノックダウンによるゲノム安定性の低下は URH49 によりレスキューされる
A. アガロース電気泳動の結果 B. ウェスタン解析の結果

(3) URH49 ノックダウンによるゲノム安定性の低下は UAP56 の強制発現ではレスキューされない
今度は、URH49 のノックダウンによるゲノム断片化が UAP56 によってレスキューされるかについて解析した。しかし UAP56 の過剰発現では URH49 のノックダウンによるゲノム断片化の抑制は生じなかった (図3)。このことから UAP56 と URH49 は、少なくともゲノム安定性の制御において異なる機能を持つことがわかった。

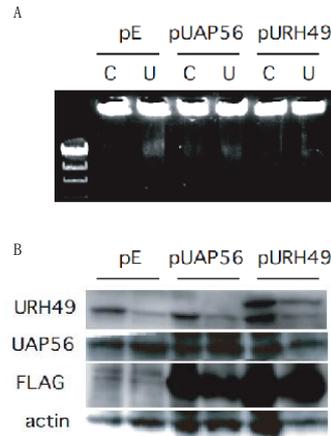


図3. URH49 ノックダウンによるゲノムの不安定化は UAP56 の過剰発現ではレスキューできない
A. アガロース電気泳動の結果 B. ウェスタン解析の結果

(4) URH49 ノックダウンによるゲノム安定性の低下は RNaseH の強制発現によりレスキューされる
URH49 は mRNA のメタボリズムに関与すると考えられている。そこで URH49 ノックダウンによるゲノム安定性の低下が、DNA:RNA ハイブリッド形成によるかを検証した。DNA:RNA ハイブリッドは、RNaseH により特異的に解消される。そこで RNaseH を過剰発現させると URH49 をノックダウンしてもゲノムの断片化は観察されなかった (図4)。したがって URH49 がなくなると DNA:RNA ハイブリッドが形成されたことでゲノム安定性の低下が生じたと考えられた。

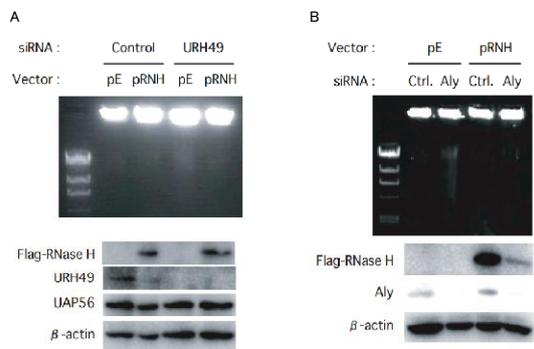


図4. URH49 あるいは Aly ノックダウンによるゲノム不安定化は RNaseH の強制発現によりレスキューされる
A. UAP56 の場合 B. Aly の場合

(5) URH49 ノックダウンによるゲノム安定性の低下は SF2 の強制発現によりレスキューされる
 これまでに SF2 がなくなるとゲノム安定性が低下することが知られている。そこで今回見られた URH49 によるゲノム安定性の低下が SF2 と関連するかについて検証した。その結果、SF2 を過剰発現すると URH49 ノックダウンによるゲノム安定性の低下は見られなかった(図5)。このことから URH49 は SF2 よりも上流に位置する因子であることが推察された。

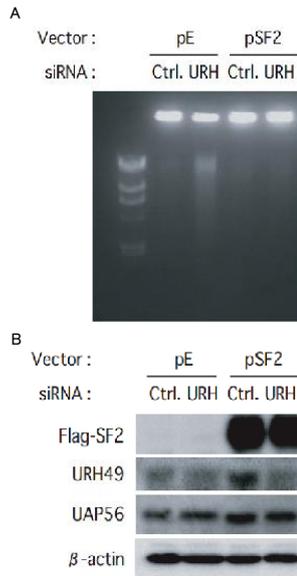


図5. URH49 ノックダウンの表現と SF2 の過剰発現によりレスキューされる
 A. アガロース電気泳動の結果 B. ウェスタン解析の

(6) URH49 ノックダウンによるゲノム安定性の低下は RNPS1 の強制発現によりレスキューされる
 RNPS1 を用いて同様の実験を行った。すると RNPS1 の過剰発現においても URH49 ノックダウンの影響を相殺出来た。このことから RNPS1 や SF2 の過剰発現によるゲノム安定性低下の解除は、新生 RNA 分子に RNA 結合タンパク質が素早く結合することにより新生 RNA 分子がゲノム DNA とハイブリッドを形成しないためではないか

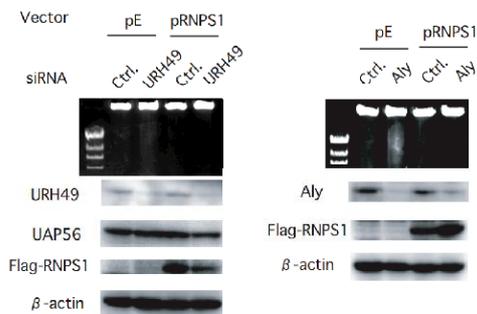


図6. URH49 あるいは Aly ノックダウンによるゲノム不安定化 SF2 の強制発現によりレスキューされる
 A. UAP56 の場合 B. Aly の場合

と考えられた。

以上の研究より、図7に示すモデルを考えている。今後さらなる研究を行うことによりこのモデルを検証していきたい。

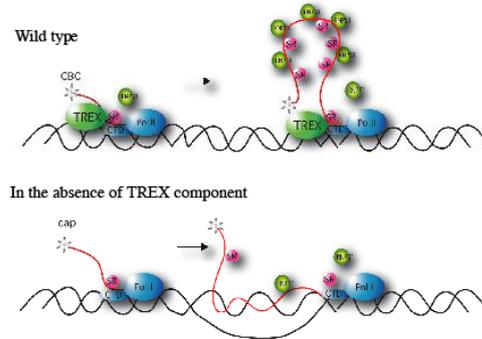


図7. UAP56や URH49 によるゲノム安定性制御のモデル。

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 11 件)

1. Yamazaki, T., Fujiwara, N., Yukinaga, H., Ebisuya, M., Shiki, T., Kurihara, T., Kioka, N., Kambe, K., Nagao, M., Nishida, E. and Masuda, S., The closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, preferentially form distinct mRNA export machineries and coordinately regulate mitotic progression. *Mol. Biol. Cell*, **21**, 2953-2965, 2010、査読有
2. Fujiwara, N., Yoshikawa, M., Yamazaki, T., Kambe, T., Nagao, M. and Masuda, S., A Screening Method Tuned for mRNA Processing Factors in Human Cells by Evaluating the Luciferase Reporter Activity and the Subcellular Distribution of Bulk Poly(A)⁺ RNA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1512-1516, 2010、査読有
3. 福中彩子、山崎智弘、藤原奈央子、増田誠司 mRNA の一生 - mRNA プロセッシング・核外輸送・品質管理ネットワーク 化学と生物、**46**, 90-100, 2008、査読無

[学会発表] (計 10 件)

1. 増田誠司、栗原朋也、神戸大朋、永尾雅哉、山崎智弘、高等真核生物における mRNA プロセッシング因子多様化の生理的意義の解析、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会、合同大会 2010 年 12 月 9 日 神戸

研究者番号：70397561

2. 山崎智弘、藤原奈央子、栗原朋也、幸長弘子、戎家美紀、西田栄介、木岡紀幸、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司、DEAD-box型 RNA ヘリカーゼ UAP56 および URH49 による遺伝子発現制御を介した染色体分配機構における異なる役割、第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 23 日、神戸
3. 藤原奈央子、山崎智弘、福田了士、栗原朋也、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司、RNAヘリカーゼUAP56の性状解析ならびにUAP56と高度に相同性のあるURH49との性状比較、山崎 智弘、増田 誠司、第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 23 日、神戸
4. 藤原 奈央子、神戸 大朋、永尾 雅哉、増田 誠司、ショウジョウバエ S2 細胞を用いた mRNA 核外輸送における TREX および TREX-2 複合体の機能解析、日本農芸化学会 2009 年度大会 2009 年 3 月 28 日、福岡
5. 山崎 智弘、増田 誠司、ヒト TREX 複合体のノックダウンによる染色体分配異常、日本 RNA 学会 第 10 回大会 2008 年 7 月 24 日、札幌

[図書] (計 1 件)

1. 増田誠司 基礎生物学テキストシリーズ「分子生物学」 深見泰夫編、化学同人、3 章 遺伝情報の発現・転写・プロセッシング、4 章 遺伝情報の輸送・翻訳 分担執筆 2011 年 3 月刊行 総 237 ページ

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/bunshioutou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 誠司 (MASUDA SEIJI)

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号：20260614

(2) 研究分担者

門間 敬子 (MOMMA KEIKO)

京都文教大学・人間学部・准教授