

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591186

研究課題名(和文)

アレルギー病態におけるRNA結合蛋白ROD1の役割

研究課題名(英文)

Role of ROD1 in the pathogenesis of allergic inflammation

研究代表者

増田 章男 (MASUDA AKIO)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10343203

研究成果の概要(和文)：

RNA結合タンパク ROD1 が GU/GC rich な領域に結合しスプライシングを制御することを見出した。この研究の過程において、生体内での RNA-蛋白結合の解析に非常に有効な CLIP 法の実現に成功し、RNA 結合タンパクの機能解析を詳細に行うことが可能となった。さらに、ROD1 の 4 個の isoform を同定し、これら isoform 間で細胞質-核シャトリング能に違いがあることを見出した。

研究成果の概要(英文)：

We found that ROD1 binds to GU/GC rich regions in introns to regulate splicing. We succeeded to analyze RNA-protein interaction with CLIP method, which is a quite effective method established recently. We identified 4 isoforms of ROD1 and found difference in the ability of nuclear-cytoplasmic shuttling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：ROD1, RNA, RNA 結合タンパク

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、innate immunity におけるマスト細胞の生理的役割の研究を精力的に行い、転写因子 GATA がマスト細胞の活性化制御に極めて重要な働きを持っており、GATA の不活化は I 型アレルギー反応を著明に抑制

することを見出し、報告した (Masuda, et al. J Immunol. 2007)。GATA による I 型アレルギー反応制御は、一部は、シグナル伝達因子である PKC β を介していることを明らかにしたが、その本態はまだ大部分が未解明のままであった。その後、正常マスト細胞と GATA 不

活化マスト細胞の mRNA 発現を比較したところ、GATA 不活化によりマスト細胞内 ROD1 mRNA の発現が減少することを見出した。

ROD1 は、スプライシング因子 PTB の ortholog であり、PTB, nPTB, ROD1 で family を形成する。血球系細胞に高発現が見られ、過剰発現により細胞分化を抑制することが見出されているが、その分子機構は全く未解明であった。ROD1 の機能を明らかにすることにより、アレルギー病態解明に寄与できる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

ROD1 の結合 RNA およびその部位を解析することにより、ROD1 の生理的機能を解明し、アレルギー性炎症における ROD1 の意義を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

in vitro で目的タンパクの RNA 結合配列を同定することができる SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 法により、ROD1 の結合 motif を決定する。

さらに、CLIP (in vivo Cross-Linking and ImmunoPrecipitation) 法により、生体内で ROD1 が直接 RNA に結合している部位を同定し、SELEX 法で得られた motif の正確性を確認するとともに、その結合部位の分布から ROD1 の生理的役割を推察する。

培養細胞に ROD1 を過剰発現し、推察された生理的役割を実証する。

4. 研究成果

(1) SELEX法によるROD1結合モチーフの同定

Mouse および Human ROD1 の GST fusion protein を作成し、SELEX 法により、ROD1 と特異的に結合する RNA 結合配列が G (G/U) (G/C/U) G であることを同定した (図 1)。ROD1 は GU/GC rich 領域への高い結合性があることが判明した。

図1. SELEX法で得られた結合配列。

赤字は、G(G/U)(G/C/U)G motif

1. **GGTGGTGGGTC**GTGGCGCTGAAGATTT
2. **GTGG**GAAATGTCAGGTTTAGGGGGTATT
3. **GTGGGGGGTTG**TGGTGTTCGACACGCTGGTT
4. GCTGGACGAGTGTACAGGTTT**GTTGTT**
5. GCTGGACGAGTGTACAGGTTT**GTTGTT**
6. GCTGGACGAGTGTACAGGTTT**GTTGTT**
7. **GGGGTTGCGGTCG**CC**GTGG**TATGGGGATT
8. GGCCACGCTGCTAAAGGTAA**GGTG**ATT
9. **GCGTGGTTG**TGTAGAAT**GTGGGGGGTTT**
10. GT**AGTGG**GCTT
11. GTTCGT**AGGCGT**AG**GGTTGG**CTATGGTT
12. **GTGCG**GCTCAG**CGGT**CTGCCTGTTTTTT
13. **GTCG**TAG**TTG**TCCCTCTCCCAAACCTTT
14. GCCG**GGCG**GTCCGGG**GTCGTGG**GAGGTT

(2) CLIP法の実現

CLIP法は、RNA結合タンパクの生理的機能を明らかにする上で、現在、他に同等なものが見出されないほど、抜群に有効な手法である。2003年にUle et alにより Science誌に発表された本法は、UVクロスリンクされたRNA-タンパク複体の免疫沈降による精製、結合RNAの単離、シーケンサーによる配列解読&ゲノムマッピング、というステップを経て、目的タンパクの生体内での標的RNA結合部位を明らかにする。現在、次世代シーケンサーの進展に伴い、ゲノムワイドな解析が可能となり、この手法により、RNA結合タンパクの新しい機能が次々

と明らかになっている (Nature 460:479, 2009; Genome Res 19:381, 2009; Nat Struct Mol Biol 17:909, 2010; Nat Struct Mol Biol 16:130, 2009; Mol Cell 36:996, 2009; Cell 141:129, 2010)。しかし、技術的な困難さから、非常に有効な手法にも関わらず、現在まで4グループからの報告しかなくない。我々は、国内では他グループに先駆けてこの手法の実現に成功した。本研究テーマであるROD1をはじめ、そのorthologであるPTB、先天性筋ジストロフィー1型 (DM1) の発症に関わるスプライシング因子CUGBP1およびMBNL1、筋萎縮性側索硬化症の発症に関わるRNA結合タンパクFUSおよびTDP-43、RNA decay制御因子HuRなど数々のHITS-CLIP dataを得ることに成功し、これらRNA結合タンパクの新規機能を見出している (CUGBP1/MBNL1については、現在、投稿中)。

(3) CLIP法による生体内ROD1結合RNA部位の同定

CLIP法による解析で、生体内でROD1が結合する、118個のRNA断片配列が得られ、それらをマウスゲノムにマッピングした後、解析を行った。

図2 CLIPにより同定された118個のROD1結合RNAのdistribution

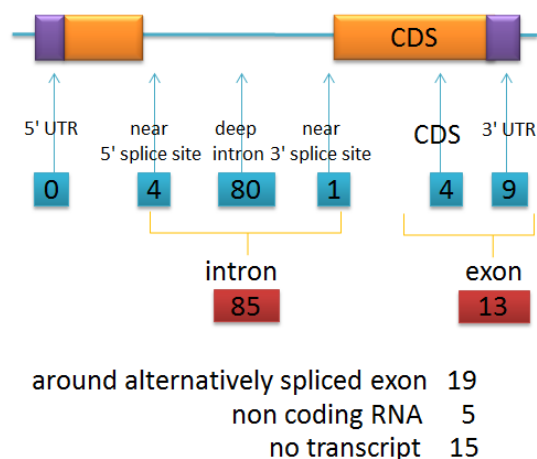


図2に示すように、結合部位は、exon上に4個、deep intron上に80個、splice site近傍 intron上に5個、3' UTR上に13個、マッピング不能配列15個であった。この傾向はorthologであるPTBも同様であり、intronに高率に結合することが明らかとなった。

また、結合部位の多くは、RNA結合タンパクのmRNA上にあり、ROD1はRNA結合タンパクのmRNA代謝に関与することが示唆された。

これら結合配列に対し motif 解析を行うと、ROD1ではGUもしくはGC richな配列が高頻度に出現することが判明し、SELEX法の解析と一致した。また、CU rich配列に結合するPTBとは異なることが明らかとなった。

ROD1とPTBは相同性の非常に高いタンパクである。結合領域はともにイントロン上にあり、PTBがスプライシング因子であることも考慮すると、ROD1もスプライシングを制御すると予想される。我々の解析により、結合配列は異なることが明らかとなり、PTBとは異なるexonのsplicingを制御していることが、推察される。

(4) ROD1 isoform 間の機能の相違の発見

Human ROD1 に存在する 4 個の isoform を同定し、その機能を明らかにした。

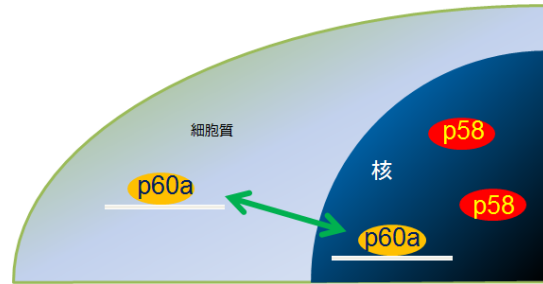
Western blot による解析により、ROD1 には 60kDa (p60) および 58kDa (p58) の 2 種類の isoform が存在することを見出した。該当する mRNA を見出すため、EST database の検討を行い、Human の *ROD1* には、異なる 2 つの exon1 (1a と 1b) および exon2 の alternative splicing の組み合わせにより、1a, 1a+2, 1b, 1b+2 の 4 種類の variant が存在することが判明した。さらに発現ベクターによる検討を行い、1a および 1b+2 からは p58 が、1a+2 および 1b からは、p60 が産生されることを明らかとした。

p58 は、N 末側の 17 アミノ酸が欠失している。この部位には、ROD1 の ortholog である PTB において核-細胞質間シャトリングに必須とされる配列が保存されているため、p58 と p60 の核-細胞質間のシャトリング能力を検討した。

ROD1 各 isoform と GFP の fusion protein 発現ベクターを作成し、核-細胞質間シャトリング能を解析する heterokaryon assay を行った。結果、1a+2 由来の p60 のみが、高いシャトリング能力を示し、他の isoform ではシャトリング能力を欠落していることが明らかとなった。

ROD1 は、isoform ごとに細胞質-核シャトリング能力に違いがあり、この機能差により様々な RNA 代謝を調節している可能性が示唆された。

図 3 ROD1 isoform の機能の違い



ROD1 は、細胞分化に抑制的に働くことが知られており、特に血球系細胞で発現が高い。我々の研究により、mRNA 上の GU/GC rich 配列への結合を通して、RNA 代謝に関与しうることが判明した。それらの機能を通じ、血球細胞の分化や機能発現を調節し、アレルギー病態に関与しうることが示唆された。

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 8 件)

1. Chiba N, Kakimoto K, Masuda A, Matsuguchi T. Biochem Biophys Res Commun. 2010 402:1-6 (2010) 査読有
2. Ohno K, Ito M, Masuda A. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi. 29(4):145-151(2009) 査読無
3. Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Masuda A, Suzuki Y, Maesawa S, Kajita Y, Hirayama M, Ohsawa I, Ohta S, Ohno K. Neuroscience Letters 453:

81-85(2009) 査読有

4. Bian Y, Masuda A, Matsuura T, Ito M, Okushin K, Engel AG, Ohno K. Hum Mol Genet, 18: 1229-1237(2009) 査読有
5. Matsuguchi T, Chiba N, Bandow K, Kakimoto K, Masuda A, Ohnishi T. J Bone Miner Res. 24(3):398-410(2009) 査読有
6. Masuda A, Shen X-M, Ito M, Matsuura T, Engel AG, Ohno K. Hum Mol Genet. 17: 4022-4035(2008) 査読有
7. Ito M, Masuda A, Jinno S, Katagiri T, Krejci E, Ohno K. Chem Biol Interact. 175: 346-348(2008) 査読有
8. Gao K, Masuda A, Matsuura T, Ohno K. Nucleic Acids Research 36: 2257-2267(2008) 査読有

[学会発表] (計1件)

増田章男, Henriette Skovgaard Andersen, Thomas Koed Doktor, Brage Storstein Andresen, 大野欽司 HITS-CLIP 法により同定したスプライシング因子 CUGBP1 および MBNL1 の標的 RNA 配列の機能解析 第12回日本RNA学会年会 2010年7月27日 一橋記念講堂(東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田章男 (MASUDA AKIO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10343203

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号: