

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770134
 研究課題名（和文） RNA プロセッシングおよび細胞周期を制御する新規複合体の機能解析
 研究課題名（英文） The Dynamics of a novel protein complex involved in RNA processing and cell cycle regulation
 研究代表者
 堀内 恵子 (HORIUCHI KEIKO)
 東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教
 研究者番号：00456203

研究成果の概要（和文）：WTAP は、遺伝性腎臓がんの原因遺伝子 WT-1 と結合するタンパク質として同定された核内因子であり、申請者らはノックアウトマウスの解析および RNAi による解析から、WTAP がサイクリン A2 mRNA を安定化し、細胞周期の G2/M 移行に必須であることを見出した。本研究は細胞周期を制御する RNA プロセッシング複合体である WTAP 複合体の同定および組み合わせの変遷を、高親和性抗体を用いた免疫分離プロテオミクスにより系統的に解析し、複合体による細胞周期制御機構を明らかにすることを目的としている。WTAP に対する特異的抗体を 3 種類作成し、免疫分離プロテオミクスにより、virilizer ホモログ、E3 ユビキチンリガーゼ、zinc finger タンパク質、数種の RNA 結合タンパク質を含む複合体を得ることができた。さらに複合体に含まれていた E3 ユビキチンリガーゼに特異的なモノクロナル抗体を作成し、同様に複合体のプロテオミクス解析を行ったところ、WTAP および WTAP 複合体を同定することに成功した。さらに、構成タンパク質の変化を系統的に解析すると、構成タンパク質が細胞周期で変化する傾向が見られており、WTAP のサイクリン A mRNA の安定化に関係している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Wilms' tumor 1-associated protein (WTAP) has been reported to be a ubiquitously expressed nuclear protein and supposed to have a role in pre-mRNA splicing. We have reported that WTAP is involved in the stability of cyclin A2 mRNA thereby regulates the cell cycle and WTAP knockout mice exhibited proliferative failure with death at early embryonic stage. In this study, we have developed a method for the functional analysis of protein-protein interactions for the endogenous proteins, by affinity purification mass spectrometry using magnetic beads and high-affinity antibodies. Using the method, we identified several binding proteins of WTAP, including virilizer homolog, E3 ubiquitin ligase, SR proteins and RNA binding proteins. Furthermore we found the compositional changes of WTAP protein complex in cell cycle, indicating a relation to cell cycle regulation of WTAP protein complex.

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
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：発現制御 プロテオーム マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) mRNA 安定性制御因子 WTAP の発見と G2/M 細胞周期制御

WTAP は、遺伝性腎臓がんの原因遺伝子 WT-1 と結合するタンパク質として同定された核内因子で、核スペckル上でスプライシングファクターと共局在していることが報告されている。またショウジョウバエの WTAP ホモログである *fl(2)d* は、性決定にかかわるスプライシングカスケードを制御し *Sex Lethal*, *virilizer* などと協調的に働くことが知られている。さらに近年のプロテオミクス解析によりスプライシオソーム構成タンパク質として WTAP が同定されてきている。我々は血管内皮細胞を用いて RNAi による WTAP のノックダウンを行い、WTAP の機能を解析したところ、予想外にも細胞周期制御因子であるサイクリン A2 の mRNA が顕著に低下し、G2/M 期移行が阻害されることを見出した。生化学的解析から、WTAP はサイクリン A2 の 3' UTR の 9 塩基配列を介して mRNA を安定化させ、その欠損によりサイクリン A2 mRNA が分解され、G2 アレストとなることを発見した。また WTAP 遺伝子のノックアウトマウスを作成したところ、胎生 6.5 日で死亡し、サイクリン A2 ノックアウトマウスと類似した表現型を示した。

(2) 免疫分離プロテオミクスによる WTAP 複合体の同定

WTAP はサイクリン A2 mRNA の安定化を介して細胞周期を制御していることが明らかになったが、WTAP 複合体の活性がいかんにか制御されるかは不明である。当研究室では、抗体を結合した新規高機能磁気ビーズを用いて、少量の細胞（10cm ディッシュ 4 枚程度の核抽出液）から内在性核内複合体を同定することが可能なプロテオミクス技術を開発した。この技術を用いて WTAP 複合体の同定を試みた結果、WTAP、*virilizer* ホモログ、E3 ユビキチンリガーゼ、プロテインキナーゼ、スプライシングファクターなどの WTAP 複合体構成タンパク質を同定した（未発表）。ショウジョウバエでは WTAP ホモログ *fl(2)d* は、*virilizer* と共同してスプライシングに作用することが知られており、WTAP-Virilizer 複合体が哺乳動物においてもスプライシングに関与している可能性が

ある。

2. 研究の目的

本研究は、細胞周期における WTAP 複合体の動態をプロテオミクスにより明らかにすると共に、WTAP 複合体が制御する標的 RNA をゲノムワイドに解析し、細胞周期に伴う RNA プロセッシングマシーナリーの全貌を解き明かすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) WTAP 複合体の細胞周期における構造変化と役割の解明

チミジンダブルブロックにより細胞周期を同調させた HeLa 細胞を用いて、細胞周期にともなう複合体の構成変化とその修飾についてプロテオミクスにより系統的に解析する。また、WTAP 複合体構成タンパク質それぞれについてモノクロナル抗体を作成し、免疫分離プロテオミクスおよび免疫染色により WTAP と各タンパク質との相互作用を検証する。さらに WTAP 複合体タンパク質について、RNAi によりノックダウンし、細胞増殖速度、細胞周期のプロファイルおよびサイクリン A2 mRNA の安定化など細胞周期への作用を解析する。以上より、修飾変化や構成タンパク質の変化がどのように WTAP 複合体の機能を変化させるか明らかにする。

(2) WTAP 複合体による RNA プロセッシング機能の解明

WTAP 複合体タンパク質の RNAi によるノックダウンおよびアデノウィルスによる過剰発現系を作成し、アレーを用いて WTAP 複合体の標的 mRNA をゲノムワイドに明らかにするとともに、RNA 安定性とスプライシング変化に関する複合体の機能を解明する。

4. 研究成果

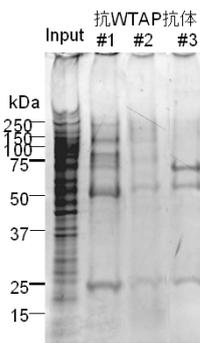
(1) WTAP 複合体の同定

WTAP に対する特異的抗体を 3 種類作成し、磁気ビーズを用いた免疫分離プロテオミクスを行った。その結果 3 種類の抗体で共通して、*virilizer* ホモログ、E3 ユビキチンリガーゼ、zinc finger タンパク質、数種の RNA 結合タンパク質を含む複合体を得ることができた。C 端認識の抗体で得られたプロテインキナーゼは他の 2 種の抗体では同定できなかったため、抗体の結合部位とのクロスや非

特異である可能性が考えられた。今後は、3種の抗体で同定できたタンパク質について、WTAP複合体として着目することにした。

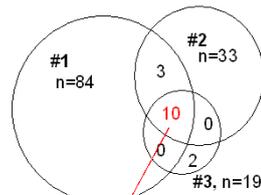
同定タンパク質のペプチド本数を3種の抗体間で比較すると、WTAP複合体には構成タンパク質について数種の組み合わせがあることがわかり、WTAP複合体が機能する際に複合体の組み合わせが重要であることが推察された。

WTAP抗体を用いた免疫沈降



サイプロルビー染色

同定タンパク質の数

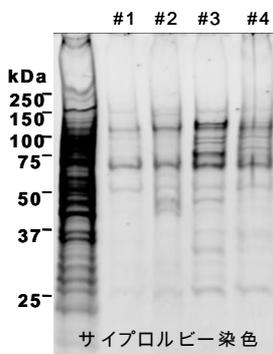


WTAP, Drosophila Virilizerホモログ KIAA0853, RSドメインを持つタンパク質 E3ユビキチンリガーゼ etc.

(2) WTAP複合体タンパク質に対する抗体の作成および複合体解析

WTAP複合体として同定した virilizer ホモログ、E3ユビキチンリガーゼ、SRタンパク質についてそれぞれモノクローナル抗体を作成した。

E3ユビキチンリガーゼ抗体を用いた免疫沈降



サイプロルビー染色

IP-Westernにより、WTAPと結合していることが生化学的に検証できた。さらに、E3ユビキチンリガーゼについては免疫沈降のできるモノクローナル抗体を得ることができた(左図)。免疫分離プロテオミクスにより、E3ユビキチンリガーゼと結合するタンパク質として、WTAPおよびWTAPの複合体解析で得られた virilizer ホモログ、RNA結合タンパク質が同定できた。以上から、本手法が少量の細胞サンプルから、内在性タンパク質複合体を同定するのに有用であることが確認できた。さらに、WTAPの複合体解析では得られなかったタンパク質も多数同定できており、このE3ユビキチンリガーゼがWTAP複合体とは別に、構成タンパク質の異なる複合体も形成していることがわかった。

E3ユビキチンリガーゼおよびSRタンパク質について免疫染色により局在解析をし

たところ、核質と核スペckルに局在し、WTAPと共局在していることがわかった。

(3) WTAP複合体の細胞周期における構造変化と役割の解明

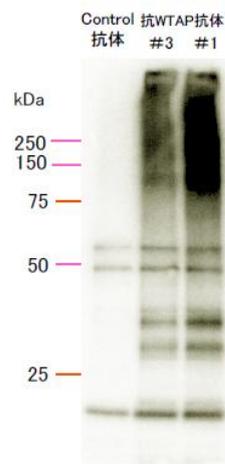
チミジンダブルブロックにより細胞周期を同調させた HeLa 細胞を用いて、細胞周期ごとの複合体解析を行った。その結果、構成タンパク質の変化は見られなかったが、SRタンパク質については細胞周期で量が変化し、M期にかけてWTAPと多く結合している傾向が見られており、WTAPのサイクリンA mRNAの安定化に関係している可能性があると考えられた。構成タンパク質の修飾については、新規にリン酸化修飾、Ub化が明らかになったが、細胞周期での変動についてはまだ明らかとなっていない。M期の各phaseでの検討が必要である。

WTAP複合体であるSRタンパク質についてRNAiを行い、細胞周期に関わる機能解析を行った。RNAiによりSRタンパク質をノックダウンすると、WTAPをRNAiしたときと同様、HUVECにおいて細胞周期のG2/M期の割合が多くなり、G2アレストがおこっていることがわかった。また、RNAiした細胞を用いてマイクロアレイ解析したところ、サイクリンA2, サイクリンB1, CDC20などの細胞周期のG2/M期に関わる遺伝子の発現が顕著に減少することがわかった。以上のことから、WTAPがSRタンパク質と複合体を形成して、細胞周期を制御していると考えられた。

(4) RNAプロセッシングに関するWTAP複合体の機能

高親和性抗体を用いたプロテオミクス解析により、WTAP複合体としてSRタンパク質やRNA recognition motifを持つRNA結合タンパク質が数種同定できた。また、virilizerホモログはショウジョウバエで、WTAPのホモログであるf1(2)dと複合体を形成し、SXLによるオルタナティブスプライシングに関わっている。以上から、WTAP複合体タンパク質には、RNAのスプライシングや代謝などのRNAプロセッシングに関わるタンパク質が高頻度に同定できており、WTAP複合体がRNAプロセッシングに重要な役割を持っていることが確認できた。

WTAP複合体に結合するRNA



SRタンパク質のRNAiでG2アレストがおこり、WTAPのRNAiと類似した遺伝子発現変化を示すことから、WTAP複合体の組

み合わせのうち、SR タンパク質と複合体を形成しているものが、サイクリン A2 などの標的 RNA に作用していると考えられる。RNA プロセッシング因子としての WTAP 複合体の機能をさらに明らかにするためには、ターゲット RNA のゲノムワイドな解析が重要である。そこで、RNA とタンパク質をクロスリンクした後、WTAP の抗体を用いて免疫沈降したところ、WTAP 抗体で特異的に RNA が結合しているのが確認できた(上図)。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

堀内 恵子、‘核内因子 WTAP は cyclin A2 mRNA を安定化し G2/M 期移行を制御する’、第 21 回高遠シンポジウム、(2009/8/27)、長野県伊那市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀内 恵子 (HORIUCHI KEIKO)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：00456203

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：