

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570195

研究課題名（和文） mRNA 核外輸送と転写、翻訳との機能的カップリング

研究課題名（英文） Coupling mRNA nuclear export to transcription and translation

研究代表者

片平じゅん (KATAHIRA JUN)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：30263312

研究成果の概要（和文）：

多細胞生物における転写-核外輸送(Transcription-Export)複合体 (TREX 複合体) を介した遺伝子発現諸過程の共役機構を解明することを目的とし、ストレス下、非ストレス下におけるヒト TREX 複合体の細胞内局在や構造変化について解析した。また、TREX 複合体と相互作用するタンパク質因子群の網羅的な同定を試みた。さらに、TREX 複合体構成因子の翻訳過程における役割を解明するために、標的遺伝子の発現変化について解析を行なった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to better understand the function of the human Transcription-Export (TREX) complex in gene expression. I examined intracellular localization and structural alteration of the TREX complex under normal and stressed conditions. In addition, protein factors associating with the human TREX complex and a novel role of the TREX complex in protein translation were analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011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：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：遺伝子発現制御、mRNA、核-細胞質間輸送

1. 研究開始当初の背景

rRNA、tRNA、mRNA などの様々な RNA は、核内で転写された後、輸送受容体と総称されるそれぞれに固有のタンパク質性因子により機能する場である細胞質へ運搬される。mRNA の核外輸送は、核内低分子量 GTPase Ran や importin- β ファミリータンパク質に直接依

存しないという点で他の RNA 種と比べてユニークであり、出芽酵母の Mex67-Mtr2 および哺乳動物の Tap-p15 と呼ばれる進化的に保存されたタンパク質ヘテロダイマーが、特異的な輸送受容体として機能する。mRNA 輸送受容体は、生体内ではアダプターRNA 結合タンパク質と結合することにより、間接的に積み荷

となる mRNA を識別すると考えられている。また、これまでに主として出芽酵母をモデルとして用いた研究から、アダプター-mRNA 結合タンパク質は、mRNA の核外輸送過程で機能するばかりでなく、転写やポリアデニレーションといった mRNA 生合成過程のさまざまなステップに関わる因子と相互作用することで、各素過程と核外輸送の過程を機能的に共役させることが明らかにされている。さらに、ある種のタンパク質因子は、一連の mRNA 核外輸送過程において、mRNA にリクルートされ、mRNP の構成成分として細胞質へ運搬され、結合した mRNA の細胞質における安定性、局在や翻訳効率にまで影響すると考えられている。しかしながら、多細胞生物における遺伝子発現の各素過程と核外輸送のカップリングの分子機構は、ほとんど明らかにされていない。

TREX 複合体は、酵母からヒトに至るまで進化的に保存されたタンパク質性複合体で、転写伸長因子である THO 複合体にアダプター mRNA 結合タンパク質 Aly (Thoc4) および DEAD-box 型 RNA ヘリケース Uap56 が加わった計 8 種類のタンパク質因子から構成される。出芽酵母では、TREX 複合体が mRNA の転写と核外輸送の過程の機能的な共役において中心的な役割を果たすことが知られており、また、これまでに調べられた限りすべての mRNA の核外輸送が TREX 複合体に依存することが示されている。一方、多細胞真核生物の TREX 複合体が、mRNA 核外輸送過程や転写、翻訳過程においてどのような役割を果たしているのかは、十分に明らかにされていない。研究代表者は、ヒト TREX 複合体の構成因子の一つである Thoc5 の機能解析を行い、Thoc5 が、RNA および輸送受容体 Tap-p15 に結合し、アダプター様の機能を発揮すること、さらに、遺伝子ノックダウンの実験から、哺乳動物細胞においては熱ショック mRNA の核外輸送が、TREX 複合体に依存することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、多細胞真核生物における TREX 複合体に依存した mRNA 核外輸送経路の特性やその生物学的意義を明らかにし、TREX 複合体を介した遺伝子発現諸過程の共役機構を解明することを目的として行なった。

3. 研究の方法

非ストレス下、熱ストレス下におけるヒト TREX 複合体の構造や細胞内での局在の変化を特異抗体を用いた蛍光抗体法や GFP 融合タンパク質発現細胞を用いたヘテロカリオンアッセイにより解析した。また、非ストレス下、熱ストレス下における TREX 複合体とポ

リゾームとの相互作用について解析を行なった。

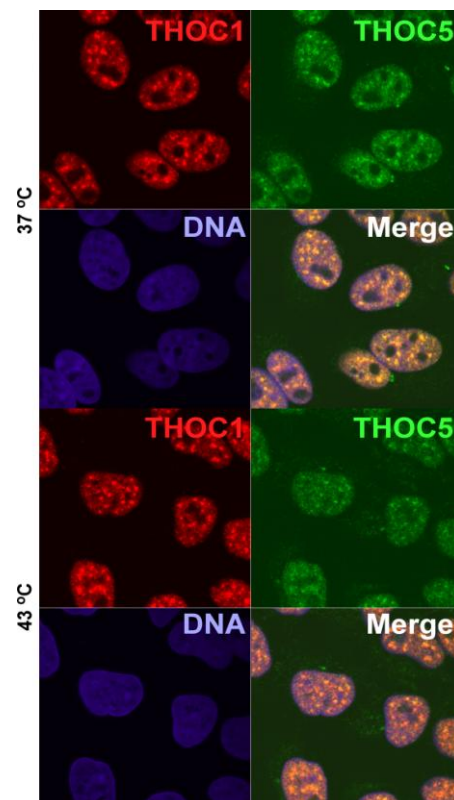
ヒト TREX 複合体に結合する因子を TREX 複合体に対する特異抗体を用いた免疫沈降物のマスマスペクトル解析により網羅的に探索した。また、同定されたいくつかの因子について、それらの発現を RNAi 法によりノックダウンし、TREX 複合体の標的遺伝子として知られている熱ショック遺伝子の発現の変化を解析した。

ヒト TREX 複合体によるタンパク質翻訳制御の可能性を探るため、いくつかの標的遺伝子の発現の変化について、ウエスタンブロッティングによる解析を行なった。

4. 研究成果

(1) ヒト TREX 複合体の細胞内における挙動の解析

非ストレス下、熱ストレス下におけるヒト TREX 複合体構成因子の細胞内局在を観察した。抗体を作成あるいは入手することのできた Thoc1、Thoc2、Thoc4、Thoc5、Thoc6、Thoc7 の細胞内局在を蛍光抗体法により調べたところ、熱ストレスの有無によるはっきりとした局在変化を認めなかった(下図は、TREX 複合体構成因子 Thoc1 および Thoc5 の非ストレス下: 37 °C、および熱ストレス下: 43 °C での細胞内局在を示す)。



さらに、Thoc5 および Thoc1 と GFP との融合タンパク質を安定に発現する細胞株を樹立し、ヘテロカリオンアッセイを行なった。Thoc5 および Thoc1 はいずれも核一細胞質間

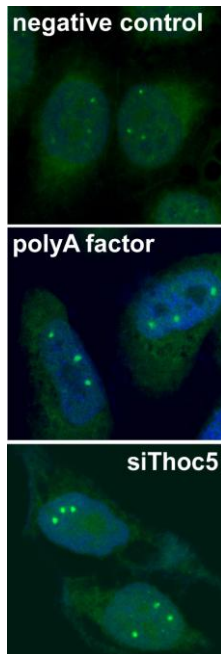
をシャトルする活性を有していたが、この活性は、熱ショック下においてもほとんど変化しなかった。また、細胞抽出液をショ糖密度勾配遠心法により分画し、TREX 複合体のモノソームやポリゾーム画分への局在が、熱ストレスの有無により変化するかどうかを調べたが、ストレスの有無による顕著な局在変化を認めなかった。一方、熱ショック下において、過剰発現した Thoc5-GFP の一部が、核内の界面活性剤不溶性画分に移行することを見出した。

(2) 熱ショックに伴うヒト TREX 複合体の構造変化の解析

熱ショック下におけるヒト TREX 複合体の構造変化を TREX 複合体構成因子に対する抗体を用いた免疫沈降法により解析した。熱ショック前、および熱ショック後の細胞抽出液から抗 Thoc5、抗 Thoc2、抗 Thoc7 抗体を用いて免疫沈降を行ない、共免疫沈降する TREX 複合体構成因子をウエスタンブロッティングにより検出、定量したところ、熱ストレスの有無で、TREX 複合体の構成には大きな変化が見られないことが明らかになった。

(3) ヒト TREX 複合体と相互作用するタンパク質因子の網羅的同定と機能解析

抗 Thoc7 抗体を用いて免疫沈降を行ない、共免疫沈降するタンパク質因子をマスマスペクトル解析により同定した。その結果、スプライシング、ポリアデニレーションといった mRNA プロセッシングに関わる因子群、タンパク質翻訳に関与する因子群等、およそ 60 種の TREX 複合体結合因子の候補を同定することができた。さらに、候補タンパク質に対する特異抗体を用いて、抗 Thoc7、Thoc5、Thoc2



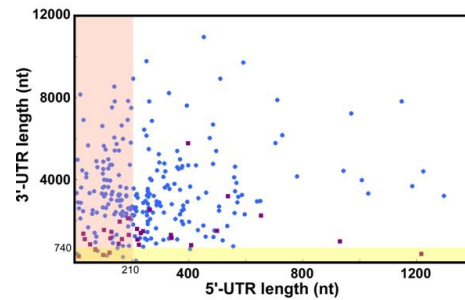
抗体による免疫沈降物に対するウエスタンブロッティングを行なったところ、調べた因子のいずれもが、すべての抗 TREX 抗体の免疫沈降物中に検出された。したがって、これまでに調べたタンパク質因子は、個々の TREX 複合体構成因子と個別に特異的な複合体を形成しているのではないものと推察された。また、同定した結合因子は、ポリアデニレーション、翻訳過程などの遺伝子発現の異なるステップで機能することから、ヒト TREX 複合体も出芽酵母の TREX 複合体と同様に、遺伝子発現

過程の様々なステップに関与していることが予想された。

同定した因子のうち、mRNA ポリアデニレーションに関わるいくつかの因子の発現を RNAi 法により抑制し、TREX 複合体の標的遺伝子である熱ショック遺伝子の発現を解析した。熱ショック mRNA の細胞内局在を *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べると、Thoc5 をノックダウンした時と同様に、mRNA が転写部位近傍に蓄積することを見出した（左下図）。したがって、哺乳動物細胞における TREX 複合体の役割の一つとして、mRNA のポリアデニレーション過程と核外輸送過程とを機能的にリンクさせていることを明らかにすることができた。

(4) ヒト TREX 複合体による翻訳制御機構の解析

TREX 複合体の標的の一つである熱ショック遺伝子は、5'-非翻訳領域の有する IRES (internal ribosome entry site) 様活性によって、ストレス下において、キャップ非依存的に翻訳されると考えられている。研究



代表者らはこれまでに、熱ショック遺伝子以外の TREX 複合体標的遺伝子候補を数百種同定している。標的候補遺伝子の構造を解析したところ、その多くのもので 5'-および 3'-非翻訳領域の長さが、ヒト遺伝子での平均長よりもかなり長いという特徴を有していることを見出した（上図、候補遺伝子の 5'-、3'-非翻訳領域の長さの分布）。一般に mRNA の 5'-および 3'-非翻訳領域にはタンパク質翻訳制御に関わる様々なシグナル配列が含まれることが知られており、また、ヒト TREX 複合体相互作用因子としてタンパク質翻訳に関わる因子群が複数同定できたことから、TREX 複合体が標的遺伝子の翻訳過程において何らかの役割を果たしていることが予想された。そこで、いくつかの標的遺伝子候補の発現パターンを TREX 複合体構成因子の発現をノックダウンした条件下で調べると、タンパク質の翻訳パターンに変化が見られることを見出した。翻訳制御の分子機構については現在さらに解析を行なっている

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4件)

1. Katahira, J. (2012) mRNA export and the TREX complex. *Biochim. Biophys. Acta. - Gene regulatory mechanisms.*, 1891, 507-513. 査読あり
2. Katahira, J. and Yoneda, Y. (2011) Nucleo-cytoplasmic transport of microRNAs and related small RNAs. *Traffic*, 12, 1468-1474. 査読あり
3. Miki, T., Kamikawa, Y., Kurono, S., Kaneko, Y., Katahira, J., Yoneda, Y. (2011) Cell type-dependent gene regulation by Staufen2 in conjunction with Upf1. *BMC Mol. Biol.*, 12, 48. 査読あり
4. Katahira, J. and Yoneda, Y. (2009) Roles of the TREX complex in nuclear export of mRNA. *RNA Biol.* 6. 149-152. 査読あり

[学会発表] (計3件)

1. Roles of the human TREX complex in gene expression. (一般口頭発表) 2009 International meeting on nuclear trafficking, 2009. 8. 24., Banff, Alberta, Canada.
2. Thoc5 およびAly/REF はHSP70 mRNA核外輸送のアダプターとして機能する. (一般口頭発表) 第11回RNAミーティング, 2009. 7. 27., 新潟
3. Adaptor Aly and Co-Adaptor Thoc5 Function in the Tap-p15-Mediated Nuclear Export of HSP70 mRNA (ポスター発表) 第61回細胞生物学会大会 2009. 6. 2, 名古屋

[図書] (計1件)

1. 片平じゅん, 米田悦啓 (2011) mRNAの核外輸送と細胞内局在化機構. **生体の科学**, 62. 69-74. 査読なし

[その他]

ホームページ等

http://www.anat3.med.osaka-u.ac.jp/research/research3_1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片平 じゅん (KATAHIRA JUN)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号: 30263312