

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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590418
 研究課題名（和文）RBM15 による mRNA 核外輸送機構に関する研究

研究課題名（英文）RBM15-mediated mRNA export

研究代表者

浦西 宏明（URANISHI HIROAKI）
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
 研究者番号：40363923

研究成果の概要（和文）：RBM15 はカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）の ORF57 蛋白に結合し、ORF57 による ORF59 遺伝子発現増強に関与することが明らかになった。また RBM15 は C 末端の SPOC 領域を介して mRNA 受容体 NXF1 に直接結合し、mRNA を NXF1 核外輸送経路へと導いていることが明らかになった。RBM15 は NXF1 核外輸送経路の構成蛋白として重要な mRNA 核外輸送蛋白であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We report that RBM15 binds to ORF57 and participates in ORF57-enhanced expression of KSHV ORF59. RBM15 binds to NXF1 via its SPOC domain and promotes mRNA association to the NXF1 export pathway. Thus RBM15 is considered to be a crucial factor for mRNA export as a component of the NXF1 pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 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：基礎医学・ウイルス学

キーワード：RBM15、mRNA 輸送、NXF1

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物の遺伝子発現において、転写された mRNA 前駆体はスプライシング等のプロセスを受けた後、成熟 mRNA となり核外へ輸送される。レトロウイルスやカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）では、ウイルス独自の機構によりスプライシングを受けない状態での mRNA 核外輸送を行っ

ている。

(2) 申請者らは mRNA 核外輸送に関与する細胞蛋白として新たに RBM15 (RNA Binding Motif Protein 15) を同定し、RBM15 がマウス RNA 輸送配列 RTE (RNA Transport Element) に選択的に結合し、細胞の mRNA 輸送受容体 NXF1 による核外輸送経路へと導くことを報告した。

2. 研究の目的

本研究では、スプライシングを受けないウイルス mRNA が宿主細胞の mRNA 核外輸送機構を利用して発現する分子機構を解明する。新たに同定した mRNA 輸送蛋白 RBM15 に着目し、RBM15 が mRNA 核外輸送受容体 NXF1 および mRNA アダプター蛋白と共に mRNA を発現へと導いている分子機構を明らかにする。このようなウイルス遺伝子による独自の mRNA 発現機構を追求することにより、ウイルス遺伝子のみでなく宿主細胞遺伝子発現における mRNA 核外輸送および転写後調節の分子機構を解明するための学問的基盤を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) のウイルス遺伝子発現における RBM15 の役割の解析

① RBM15 を細胞に強発現させることによる KSHV ORF59 蛋白および ORF59mRNA 発現に対する作用を解析する。siRNA を用いて RBM15 をノックダウンすることにより ORF59 発現における内在性 RBM15 の役割を解析する。RBM15 および KSHV ORF57 蛋白の細胞内局在を免疫組織化学的手法により確認する。RBM15 と ORF57 の蛋白間相互作用を共免疫沈降法およびプルダウン法により解析する。

② ORF57 蛋白の mRNA 核外輸送機能について、RNA tethering 法および gag レポーター遺伝子を用いた解析を行う。

(2) RBM15 による RTE-RNA 発現機構の解析

① RBM15 の機能領域の解明

RBM15 蛋白の C 末端に存在する SPOC 領域に着目し、種々の SPOC 領域変異体を作成し、その作用を解析することにより RBM15 による RTE-RNA 発現における機能領域を明らかにする。

② RBM15 相互作用蛋白の解析

RBM15 と mRNA 核外輸送受容体 NXF1 および mRNA アダプター蛋白 RNA export factor (REF) との蛋白間相互作用を共免疫沈降法およびプルダウン法により確認する。

4. 研究成果

(1) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) のウイルス遺伝子発現における RBM15 の役割の解析

① KSHV ではウイルス蛋白 ORF57 がイントロンレス遺伝子 ORF59 の発現を転写後レベルで制御しているが、この転写後調節機構における RBM15 の役割を検討した。RBM15 を細胞に強発現させることにより ORF59 蛋白および mRNA の発現が増強した。また RBM15 をノックダウンすることにより ORF59 の発現が抑制されたことから、ORF59 発現における内在性 RBM15 の重要性が明らかになった。また RBM15 は ORF57 と細胞核内で共在し、共に nuclear speckle 様の染色形態を示した。さらに ORF57 は RBM15 の SPOC 領域を含む C 末端領域に直接結合することが共免疫沈降法およびプルダウン法により確認された。ORF57 は KSHV の主に複製後期でその発現量が増加するが、この時 ORF57 は RBM15 と相互作用することにより細胞質内の ORF59-mRNA を増加させ、ORF59 蛋白の発現を増強することが明らかになった (*J. Virology* 2011)。

② ORF57 蛋白の mRNA 核外輸送機能について解析を行った。RNA tethering 法によるレポーター遺伝子解析では、ORF57 とファージ N peptide の融合蛋白 N-ORF57 発現による CAT 活性の増強はみられなかった。また KSHV ORF59 遺伝子を組み込んだ gag レポーター遺伝子解析では ORF57 は gag 遺伝子の発現を増強しなかった。これらの結果から、

ORF57はORF59、ORF47、ORF56など多くのKSHV遺伝子の発現に転写後レベルで関与しているが、核外輸送機能は有していないことが示唆された (*J. Virology* 2012)。

(2) RBM15によるRTE-RNA発現機構の解析

① RBM15の機能領域の解明

RBM15によるmRNA発現調節機構を解明するために、RBM15の機能領域の解析を行った。RBM15蛋白のC末端に存在するSPOC領域に着目し、その構造を*in silico*にて解析した。その結果に基づいて、分子表面に存在すると予想されるアミノ酸をアラニンに変換した2種類のRBM15変異体 (SPOC1, SPOC2) を作成した。レポーター遺伝子解析では、野生型RBM15はRTE-mRNA依存性のレポーター遺伝子発現を増強したが、SPOC1およびSPOC2ともにレポーター遺伝子発現の増強作用は認められなかった。SPOC1については野生型RBM15と比べて著しく蛋白発現量が低く、このためにレポーター遺伝子発現活性が見られなかった可能性があると考えられた。一方、SPOC2については発現ベクター量を調節することにより野生型とほぼ同レベルのRBM15蛋白発現量が確認され、変異させたSPOC領域内のアミノ酸がRBM15のmRNA発現機能に関与していると考えられた。また、免疫組織化学的解析ではSPOC1およびSPOC2ともに細胞核内に局在し、野生型RBM15と同様の細胞内局在を示した。RBM15の機能領域をさらに詳細に解明するため、種々のRBM15欠損変異体を作成した。レポーター遺伝子を用いて各RBM15変異体によるRTE-mRNA発現作用を解析した。これまで報告したように野生型RBM15は強いRTE-mRNA発現増強作用を示したが、SPOC領域を欠損させた変異体RBM15 Δ SPOCは野生型に比較してレポーター遺伝子発現活性が著しく低下した。このことからSPOC領域

はRBM15によるmRNA発現機能に重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方、RBM15のN末端にあるRNA結合領域 (RRM) を欠損させた変異体 RBM15 530-977ではmRNA発現作用は見られなかったことから、RNA結合領域はRBM15によるmRNA発現活性に必須であることが示唆された。さらにRBM15によるmRNA核外輸送機能におけるSPOC領域の役割をRNA tethering法を用いて解析した。これまで報告したようにRBM15とファージN peptideの融合蛋白 N-RBM15はレポーター遺伝子活性を増強した。SPOC領域とN peptideの融合蛋白 N-RBM15 750-977については、わずかにレポーター遺伝子活性を増強したが、その蛋白発現量はN-RBM15野生型に比較して著しく低いため、レポーター遺伝子活性を比較することは困難であった。

② RBM15相互作用蛋白の解析

これまでRBM15のC末端領域 (530-977)はmRNA受容体NXF1と結合することを報告してきたが、今回NXF1と結合するさらに詳細なRBM15の領域を生化学的に解析した。In vitroで合成したNXF1蛋白はプルダウン法において大腸菌で精製したGST-RBM15 777-977 (SPOC) に結合した。このことからNXF1はSPOC領域を介してRBM15と結合することが明らかになった。またRBM15はmRNAアダプター蛋白であるREFと結合することを以前報告したが、今回REFと結合するさらに詳細なRBM15の領域を検討した。免疫沈降法による解析では、REFはRBM15のN末端領域 (1-530) とC末端領域 (530-977) の双方に結合することが確認された。この結果から、RBM15のN末端領域 (1-530) はmRNA結合機能だけでなく、REFとの蛋白間相互作用にも関与することが示唆された。以上の結果より、RBM15のSPOC領域は

mRNA発現において重要な役割を果たしていることが明らかになった。特にRBM15はC末端のSPOC領域を介してmRNA受容体NXF1と直接結合することにより、mRNAをNXF1核外輸送経路へと導いていることが示唆された。以上によりRBM15によるmRNA核外輸送機構の一部が明らかになった。

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3件)

- 1) Pilkington GR, Majerciak V, Bear J, Uranishi H, Zheng ZM, Felber BK. The Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus ORF57 Is Not a bona fide Export Factor. *J Virol.* Vol. 86, 2012, 13089-94 査読有り
DOI: 10.1128/JVI.00606-12
- 2) Majerciak V, Uranishi H, Kruhlak M, Pilkington GR, Massimelli MJ, Bear J, Pavlakis GN, Felber BK, Zheng ZM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 interacts with cellular RNA export cofactors RBM15 and OTT3 to promote expression of viral ORF59. *J Virol.* Vol. 85, 2011, 1528-40. 査読有り
DOI: 10.1128/JVI.01709-10
- 3) Legiewicz M, Zolotukhin AS, Pilkington GR, Purzycka KJ, Mitchell M, Uranishi H, Bear J, Pavlakis GN, Le Grice SF, Felber BK. The RNA transport element of the murine musD retrotransposon requires long-range intramolecular interactions for function. *J Biol Chem.* Vol. 285, 2010, 42097-104 査読有り
DOI: 10.1074/jbc.M110.182840

[学会発表] (計1件)

浦西宏明, George N. Pavlakis, Barbara K. Felber, 岡本尚 The RNA binding motif protein 15 (RBM15) binds to NXF1 and promotes posttranscriptional regulation of gene expression. 第76回日本生化学会中部支部例会 平成24年5月26日 自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター (愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦西 宏明 (URANISHI HIROAKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 40363923

(2) 研究分担者

岡本 尚 (OKAMOTO TAKASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 40146600