

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 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659015

研究課題名（和文） P-bodyの構造とARE-mRNAの動態を制御する
新規シグナル伝達機構研究課題名（英文） A novel signal transduction pathway which regulates the structure
of P-body and the dynamics of ARE-mRNAs

研究代表者

堅田 利明（KATADA TOSHIAKI）

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：10088859

研究成果の概要（和文）：

mRNA と種々の RNA 分解酵素からなる細胞質中の凝集体 Processing body (P-body) は、mRNA の分解や一時的な翻訳抑制の場を形成していると考えられるが、その形成機構や詳細な機能は不明な点が多い。本挑戦的萌芽研究では、微小管の重合阻害が P-body の形成を促進するという知見に基づいて解析を進め、細胞骨格系を制御する低分子量 G 蛋白質の Rho ファミリーが Rock を介して P-body の動態・機能制御に介入することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Processing bodies (P-bodies) contain a common set of conserved RNA-processing enzymes, and mRNAs with AU-rich elements (AREs) are delivered to P-bodies for translational silencing. It is unclear how small GTPases are involved in the P-body regulation and the ARE-mRNA metabolism. We found here that overexpression of the RhoA-subfamily GTPases alters the P-body dynamics in HeLa cells. Interestingly, both RhoA activation and glucose depletion inhibit the mRNA accumulation and degradation. These findings indicate that RhoA participates in the stress-induced rearrangement of P-bodies and the release of nucleated ARE-mRNAs for their stabilization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	300,000	3,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・細胞生物学

キーワード：シグナル伝達・G蛋白質・P-body・mRNA 動態

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

細胞は恒常性を維持するために外界からの様々な刺激に応じて適切に遺伝子発現を制御しており、転写過程及び翻訳過程を通じて厳密に制御されている。近年、核・細胞質中に様々な RNA-蛋白質凝集体が存在し、RNA 代謝を空間的に制御することで、それぞれが効率的な反応を行なっていることが明らかになってきた。また、RNA 凝集体はガン化や老化をはじめとした様々な疾患と関連することが明らかになりつつあり、その役割が注目されている。

RNA 凝集体の中で、Processing body (P-body) は mRNA と蛋白質からなる細胞質中の凝集体である。P-body に局在する mRNA としては、翻訳抑制や分解を受ける mRNA に加え、遺伝子発現の抑制を行う miRNA や siRNA が知られている。また蛋白質としては脱アデニル化酵素、脱キャップ酵素や 5'-3'方向のエキソヌクレアーゼなどの RNA 分解酵素、RNAi 経路において働く RISC 構成因子 Ago2 などが含まれていることが明らかになってきた。したがって、P-body は mRNA 分解や一時的な翻訳抑制の場をこれらの構成因子によって形成していると考えられているが、その形成機構および詳細な機能は不明である。

2. 研究の目的

本挑戦的萌芽研究は、P-body の動的構造変動と AU-rich なシスエレメントをもつ ARE-mRNA の局在変化とを共役させる新規シグナル伝達機構に焦点を当てている。ストレス刺激に応答した mRNA の翻訳抑制や分解を担う細胞内凝集体 P-body の動態変動と、細胞内環境に応じて mRNA 量が調節される ARE-mRNA の制御機構とを共役させるマシナリーとして、低分子量G蛋白質 Rho ファミリーの介在を様々な解析手法を用いて実証し、その制御に関わる分子基盤の解明を目指した。これまでに P-body の構造変化にG蛋白質の介在を指摘した報告は全くなく、本研究課題は極めて新規性が高い挑戦的萌芽研究に相応しいものと考えられる。

3. 研究の方法

P-body の形成と消失については、siRNA やプラスミドを過剰発現した培養細胞を用いた。手法としては、免疫染色法、ウェスタンブロット法を用いて解析した。また ARE-mRNA の一つである β -globin-ARE mRNA の分解については、ノザンブロット法を用いることにより機能解析を進めた。

4. 研究成果

(1) RhoA の活性化により P-body の形成が促進する

P-body の形成に低分子量G蛋白質が関与する可能性を検討するため、各種 Rho ファミリー分子を過剰発現し、P-body 構成因子である rck/p54 抗体による染色により P-body の形態を観察した。RhoA の過剰発現により P-body が小型化し、かつ P-body の数が増加することを見出した。またこの表現型に対する RhoA のグアニンヌクレオチドフォームの検討を行った結果、野生型および GTP 結合型 RhoA のみが P-body の小型化および数の増加を引き起こすことが明らかとなった。

(2) RhoA 発現細胞では ARE-mRNA の P-body への局在化、及び、その速やかな分解が抑制される

AU-rich element (ARE) はサイトカイン等、一過的に発現する mRNA に存在し、この配列を有する mRNA は速やかに分解することが知られている。ARE-mRNA は P-body へと局在化することから、RhoA を過剰発現した際の ARE-mRNA の動態を観察した。その結果、ARE mRNA の一つである β -globin-ARE は RhoA の発現とともに P-body への局在化が抑制され、さらに β -globin mRNA の分解速度は RhoA の発現に伴って顕著に抑制された。したがって、RhoA を介したシグナル伝達経路により ARE-mRNA の P-body への局在化および分解が制御されている可能性が示唆された (図 1)。

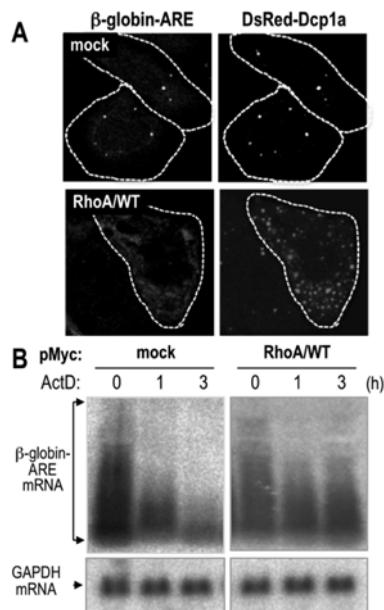


図 1. RhoA 発現で P-body は減少し (A)、 β -globin ARE mRNA の分解は遅延する (B)。

(3) グルコース飢餓時に RhoA が活性化し、P-body の形成が促進する

グルコース飢餓条件下の細胞をタイムラプス観察したところ、グルコース飢餓により新規の P-body が形成され、その結果 P-body の総数が増加する現象を見出した。また、この際 β -globin-ARE mRNA の P-body への局在化は抑制され、その分解も遅延していた。次にこの現象に対する RhoA の関与について検討したところ、RhoA は飢餓開始より二時間をピークに活性化した一方で、P-body の数は飢餓直後から徐々に増加することが認められた。また Rhotekin の Rho 結合ドメインを細胞に発現し、RhoA の下流のシグナル伝達を抑制した状態でグルコース飢餓を行ったところ、グルコース飢餓による P-body の増加が抑制された。以上の結果から、グルコース飢餓時に RhoA を介したシグナル経路により P-body の形成が促進し、ARE-mRNA の局在や分解が制御されることが示唆された。

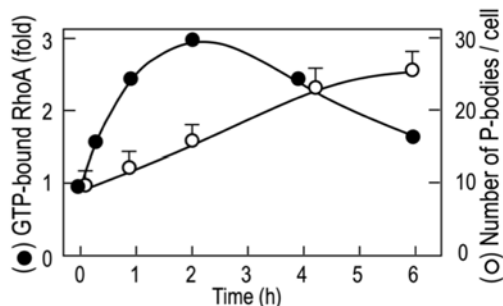


図2 グルコース飢餓時に RhoA が活性化し、P-body が増加する

(4) RhoA 発現及びグルコース飢餓により Tristetrapolin の蛋白量が減少する

ARE-mRNA の分解には、ARE-mRNA 結合蛋白質 Tristetrapolin (TTP) が ARE-mRNA を P-body へと局在化させることが重要であることが知られている。そこで、FLAG-TTP を発現した細胞に、RhoA 過剰発現及びグルコース飢餓などの処理を行い、その際の TTP 蛋白質量を検討した。その結果、RhoA の発現、グルコース飢餓ともに TTP の蛋白量が減少することを見出した。したがって、これらの処理による ARE-mRNA 分解の抑制は、TTP の蛋白質量が減少することによって ARE-mRNA が P-body に局在化できないために生じている可能性が考えられた。

(5) RhoA による P-body の形成制御は Rho エフェクター ROCK1 を介する

RhoA のエフェクターはこれまでに数多く同定されていることから、RhoA が P-body の形成を制御する際のエフェクターの同定を試みた。それぞれのエフェクターに対して

親和性を特異的に低下させる RhoA 各種変異体を作成し、これを培養細胞に発現させた際の P-body 形成能を評価した。その結果、セリン・スレオニンキナーゼ ROCK1 との相互作用を低下する変異体を発現した細胞においては、RhoA 発現により引き起こされる P-body の小型化が抑制された。また ROCK1 を発現抑制した細胞においては P-body が消失したことから、P-body の形成には ROCK1 を介した RhoA シグナル経路が重要であることが示された。

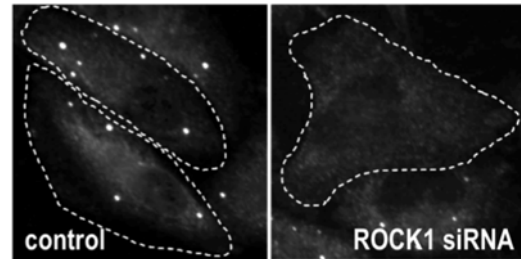


図3 ROCK1 の発現抑制により、P-body が消失する

(6) まとめ

本挑戦的萌芽による研究の結果、低分子量 G 蛋白質である RhoA が、ストレス下での P-body ダイナミクスを変化させることで、ARE-mRNA の局在と mRNA 分解を制御していることが示された。

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 13 件)

【以下の掲載英文論文は、すべて査読あり】

1. Kajiho H, Fukushima S, Kontani K, Katada T. RINL, guanine nucleotide exchange factor Rab5-subfamily, is involved in the EphA8-degradation pathway with odin. *PLoS One*. 7(1): e30575 (2012)
2. Hata S, Hirayama J, Kajiho H, Nakagawa K, Hata Y, Katada T, Furutani-Seiki M, Nishina H. A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to SN2 alkylating agents. *J. Biol. Chem.* in press (2012)
3. Yamasaki T, Kawasaki H, Arakawa S, Shimizu K, Shimizu S, Reiner O, Okano H, Nishina S, Azuma N, Penninger JM, Katada T, Nishina H. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 31:

- 16872–16883 (2011)
4. Kajiho H, Sakurai, K, Minoda T, Yoshikawa M, Nakagawa S, Fukushima S, Kontani K, Katada T. Characterization of RIN3 as a guanine-nucleotide exchange factor for the Rab5-subfamily GTPase Rab31. *J. Biol. Chem.* **286**: 24364–24373 (2011)
 5. Saito K, Yamashiro K, Ichikawa Y, Erlmann P, Kontani K, Malhotra V, Katada T. cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell.* **22**: 2301–2308 (2011)
 6. Takahashi S, Ebihara A, Kajiho H, Kontani K, Nishina H, Katada T. RASSF7 negatively regulates pro-apoptotic JNK signaling by inhibiting the activity of phosphorylated-MKK7. *Cell Death Differ.* **18**: 645–655 (2011)
 7. Takahashi S, Sakurai K, Ebihara A, Kajiho H, Saito K, Kontani K, Nishina H, Katada T. RhoA activation participates in rearrangement of processing bodies and release of nucleated AU-rich mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **39**: 3446–3457 (2011)
 8. Nakae I, Fujino T, Kobayashi T, Sasaki A, Kikko Y, Fukuyama M, Gengyo-Ando K, Mitani S, Kontani K, Katada T. The Arf-like GTPase Arl8 mediates delivery of endocytosed macromolecules to lysosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **21**: 2434–2442 (2010)
 9. Cevik S, Hori Y, Kaplan OI, Kida K, Toivenon T, Foley-Fisher C, Cottell D, Katada T, Kontani K, Blacque OE. Joubert syndrome Arl13b functions at ciliary membranes and stabilizes protein transport in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **188**: 953–969 (2010)
 10. Ruan L, Osawa M, Hosoda N, Imai S, Machiyama A, Katada T, Hoshino S, Shimada I. Quantitative characterization of Tob interactions provides the thermodynamic basis for translation termination-coupled deadenylase regulation. *J. Biol. Chem.* **285**: 27624–27631 (2010)
 11. Klassen MP, Wu YE, Maeder CI, Nakae I, Cueva JG, Lehrman EK, Tada M, Gengyo-Ando K, Wang GJ, Goodman M, Mitani S, Kontani K, Katada T, Shen K. An Arf-like small G protein, ARL-8, promotes the axonal transport of presynaptic cargoes by suppressing vesicle aggregation. *Neuron* **66**: 710–723 (2010)

【以下の掲載和文総説は、すべて査読なし】

12. 堅田 利明：Gタンパク質研究の動向；細胞 (The Cell) **42** (3)：90-91 (2010)
13. 春日 秀文、福山 征光、紺谷 圈二、堅田 利明：アミノ酸シグナル伝達に介在するGタンパク質 Rag；細胞 (The Cell) **42** (3)：108-111 (2010)

[学会発表] (計 6 件)

1. 堅田 利明；分子スイッチとしてのGTP結合蛋白質 (特別講演) [日本薬学会第132年会；2012年2月7日/札幌]
2. 堅田 利明；百日咳毒素の作用機構からG蛋白質を見出した背景. (フォーラム講演) [第84回日本生化学会大会；2011年9月22日/京都]
3. 堅田 利明；細胞のシグナル伝達系に介在するG蛋白質 (特別講演) [第77回日本生化学会東北支部例会；2011年7月23日/仙台]
4. 梶保 博昭、池田 誠一、福島 慎一、堅田 利明；低分子量G蛋白質 Rab5GEF RINファミリーによる小胞輸送の機構解析 (口頭発表) [第1回GPCM；2010年3月26日/東京]
5. 堅田 利明；細胞のシグナル伝達系に介在するGTP結合性制御蛋白質 (G蛋白質) (特別講義) [大阪大学・医学部；2010年5月14日/吹田]
6. 堅田 利明；細胞のシグナル伝達系に介在するGタンパク質：Giの発見から、Gタンパク質が果たす役割の拡大に向けて (特別講義) [東京医科歯科大学；2010年10月8日/東京]

[図書] (計 4 件)

1. 堅田 利明、金保 安則：John W. Pelly 生化学 (インテグレートッドシリーズ1) 共訳 東京化学同人 (2010)
2. 堅田 利明：細胞内情報伝達；スタンダード薬学シリーズ4 生物系薬学 II. 細胞をミクロに理解する 第2版 (日本薬学会 編) pp. 349–370 東京化学同人 (2010)
3. 堅田 利明：分子細胞生物学 第6版 (翻訳分担；15、16章) 東京化学同人 (2010)
4. 堅田 利明：ストライヤー基礎生化学 第1版 (翻訳分担；12、15、16章) 東京化学同人 (2010)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]
研究室ホームページ
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堅田 利明 (KATADA TOSHIAKI)
東京大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号： 10088859

(2) 研究分担者

梶保 博昭 (KAJIHO HIROAKI)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号： 70401221