

平成 26 年 4 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380059

研究課題名(和文)mRNA輸送体多様化の分子機構解析によるmRNA成熟ネットワーク解明の基盤研究

研究課題名(英文)Basic study on the network of mRNA maturation process by analyzing diversified mRNA exporter.

研究代表者

増田 誠司(Masuda, Seiji)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：20260614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)： mRNAのプロセッシング過程を制御しているのは、種々のmRNA輸送体である。mRNA輸送体は、ヒトでは多様化している。本研究は、mRNA輸送体AREX複合体ならびにその比較対照となるTREX複合体との複合体の形成を明らかにすることを目的とした。

キメラ変異体や点変異体を用いた複合体形成や機能回復実験から、UAP56とURH49の複合体形成能は1アミノ酸の違いで規定されていることを示した。このことは、UAP56とURH49が共通の祖先から機能分化し、その過程で生じた1アミノ酸変異が複合体形成能を変換し、異なる機能をもつに至ったことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Messenger RNA exporter regulates the mRNA processing. In human, mRNA exporter is diversified. Here, I am focusing on the mechanism of the complex formation of TREX and AREX as functional mRNA exporters.

The analysis using chimera mutants and point-mutated proteins, I have shown that TREX and AREX complex formation by UAP56 and URH49 are regulated by single amino acid exchange. This indicates that UAP56 and URH49 were diversified from the common ancestor and obtained the specific function through forming specific complex.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：mRNA 核外輸送 輸送体

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) mRNA 輸送体について

タンパク質をコードする mRNA は、核内で RNA ポリメラーゼ によって合成され、キャッピング、スプライシング、ポリアデニル化という各プロセッシングを受ける。この際、mRNA の細胞質への輸送を促進する因子は、プロセッシング中に mRNA に結合することでプロセッシングと輸送過程の連携をスムーズにしている。このメカニズムを共役といい、各過程を連携するだけでなく、正常にプロセッシングを受けた mRNA のみを細胞質へと輸送する品質管理の機能を併せ持つ。この共役機構に関わる mRNA プロセッシング因子を mRNA 輸送体とよび、その同定と分子メカニズムの解明は、遺伝子発現の制御機構を理解する上で極めて重要な研究課題と認識されてきた。

### (2) 国内外の研究動向と位置付け

mRNA 輸送体は、出芽酵母からヒトまで保存されているものの、相違点も見いだされている。出芽酵母において mRNA 輸送体は各過程で単一であるのに対して、ヒトでは複数個存在している。この理由としてヒトでは複雑な mRNA スプライシングや選択的輸送などに対処するために mRNA 輸送体が多様化したと考えられてきた。

### (3) これまでの研究成果と着想に至った経緯

進化的に保存された RNA ヘリカーゼ UAP56 が mRNA スプライシングと核外輸送 (細胞質への輸送) 過程を共役する mRNA 輸送体の 1 つであることを明らかにしている (Masuda *et al. Nature*, 417, 304-308, 2002)。さらに UAP56 は、THO 複合体ならびに Aly と TREX 複合体を形成することを見いだしている (Masuda *et al. Genes Dev.*, 19, 1512-1517, 2005)。TREX 複合体は、UAP56 のヘリカーゼ活性を通して共役機能を発揮する。ヒトでは UAP56 と 90% 以上の相同性を持つファミリータンパク質 URH49 が存在し、長い間 UAP56 と URH49 は同じ機能を持つと信じられてきた。申請者は、URH49 が UAP56 と異なり、CIP29 と相互作用して全く新規の AREX (Alternative mRNA Export) 複合体を形成していることを発見した (Yamazaki *et al. Mol. Biol. Cell*, 21, 2953-2965, 2010)。加えて AREX 複合体の制御している mRNA 種は、TREX 複合体の制御している mRNA 種とは異なることをマイクロアレイ解析、ならびにノックダウン細胞の生細胞観察により示した。すなわち、UAP56 と URH49 は、共通の先祖から分かれ極めて高い相同性を持つにもかかわらず、異なる複合体を形成し、異なる mRNA の輸送に関わっ

ていることを明らかにした。これは多様化した mRNA 輸送体が、それぞれ独自の mRNA を標的とすることを示した世界で初めての例である。AREX 複合体と TREX 複合体形成の分子機構や機能解析を行うことで、mRNA 輸送体多様化の構築基盤の解明を目指す。

## 2. 研究の目的

細胞核内において mRNA のプロセッシング過程を制御しているのは、種々の mRNA 輸送体である。各過程での mRNA 輸送体は、出芽酵母ではそれぞれ 1 種類であるが、ヒトなどの高等動物では複数に多様化している。最近申請者は、多様化したヒト mRNA 輸送体が、それぞれ独自の mRNA 輸送経路を形成し、特異的な mRNA の輸送を制御していることを明らかにした。本研究は、申請者らが発見した新規 mRNA 輸送体 AREX 複合体について、AREX の全構成因子の同定や機能解析、AREX 複合体ならびにその比較対照となる TREX 複合体との複合体の形成様式の違い、これら複合体と共役する輸送経路などの未解明な問題を解決することを目的とする。

## 3. 研究の方法

UAP56 と URH49 の欠失体やキメラ体を作製し、免疫沈降実験、ノックダウンと siRNA 耐性を持つキメラ体発現細胞を用いた機能相補実験による表現型観察等を行った。

### (1) AREX ならびに TREX の複合体形成にかかわる領域の *in vivo* アッセイによる同定

Flag タグを N 末端に付加した URH49 欠失体やキメラ体を、Flpin293TRex 細胞に導入し、安定発現株を取得した。細胞核抽出液を用いて Flag 抗体で免疫沈降した。質 Western で解析し、URH49 が AREX 複合体と、UAP56 が TREX 複合体と相互作用するために必要な領域を決定した。

### (2) AREX ならびに TREX の複合体形成にかかわる領域の機能相補実験による同定

(1) で同定した AREX や TREX 複合体形成を制御する領域に変異を導入し、かつ siRNA 耐性をもつように改変したキメラ分子を Flpin293TRex あるいは FlpinU20S 細胞に発現させる。これらの分子を発現した細胞では、URH49 や UAP56 をノックダウンしたときに現れる mRNA の核内での蓄積をレスキューできるかについて解析する。もし変異体が AREX 複合体と相互作用する場合には、URH49 のノックダウンを機能相補する。一方 TREX 複合体を形成する場合は、UAP56 のノックダウンを機能相補する。

#### 4. 研究成果

まず UAP56 と URH49 において比較的相同性の低い両末端を入れ替えたキメラ変異体を作製して複合体の形成を観察した。すると、いずれも元の複合体形成を示した(図1)。

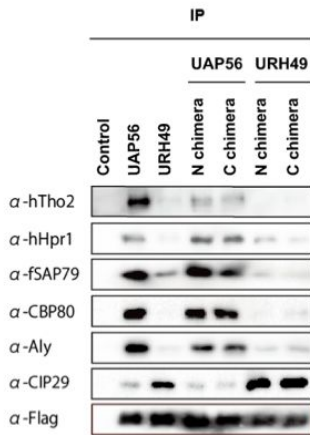


図1 キメラ変異体による複合体形成

そこで UAP56 と URH49 において異なるアミノ酸をそれぞれ入れ替えた点変異体を作製した。これらの変異体について複合体形成能を観察した。すると、URH49C223V 変異体は、URH49の形成する AREX 複合体ではなく、UAP56の形成する TREX 複合体を形成した(図2)。

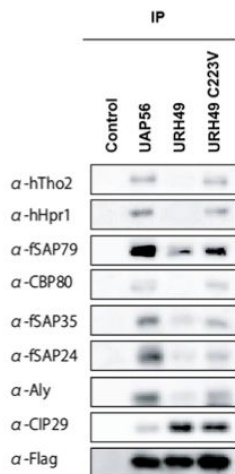


図2 点変異体による複合体形成

次いで点変異体の機能を解析するために、UAP56 をノックダウンしたバックグラウンドで、作製した URH49 点変異体を導入し機能回復するかについて解析した。すると、URH49C223V 変異体は、UAP56 のノックダウンを機能回復した(図3)。一方 URH49 のノックダウンしたバックグラウンドでは機能回復しなかった(図4)。このことから URH49C223V 変異体は、URH49 ではなく UAP56 の機能を持つことを証明した。

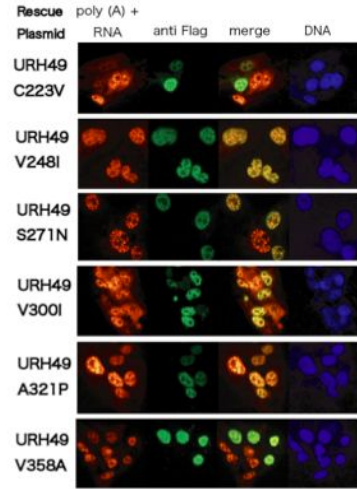


図3 URH49点変異体によるUAP56機能回復実験

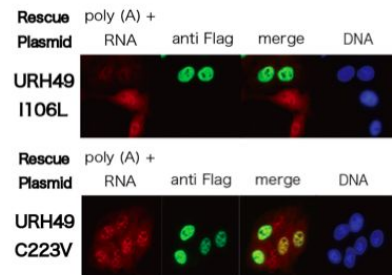


図4 URH49点変異体によるUAP56機能回復実験

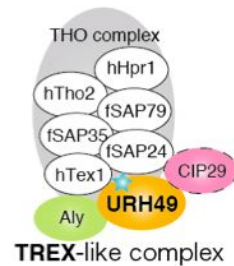


図5 URH49点変異体で形成される複合体

今回の解析で形成された URH49 点変異体の複合体形成をモデルで示している(図5)。これらの解析から、UAP56 と URH49 が共通の祖先から機能分化し、その過程で生じた1アミノ酸変異が複合体形成能を変換し、異なる機能をもつに至ったことを明らかにした。

#### 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) Fujimoto, S., Itsumura, N., Tsuji, T., Anan, Y., Tsuji, N., Ogra, Y., Kimura, T., Miyamae, Y., Masuda, S., Nagao, M. and Kambe T., Cooperative functions of ZnT1, metallothionein and ZnT4 in the cytoplasm are required for full

- activation of TNAP in the early secretory pathway. *PLoS ONE*, **8**, e77445, 2013 (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0077445.
- (2) Ohtera, A., Miyamae, Y., Nakai, N., Kawachi, A., Kawada, K., Han, J., Isoda, H., Neffati, M., Akita, T., Maejima, K., Masuda, S., Kambe, T., Mori, N., Irie, K. and Nagao, M. Identification of 6-octadecynoic acid from a methanol extract of *Marrubium vulgare* L. as a peroxisome proliferator-activated receptor agonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **440**, 204-209, 2013 (査読有) doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.003.
- (3) Akef, A., Zhang, H., Masuda, S. and Palazzo, AF. Trafficking of mRNAs containing ALREX-promoting elements through nuclear speckles. *Nucleus*, **4**, 326-40, 2013 (査読有) doi: 10.4161/nucl.26052
- (4) 松村嘉員、増田誠司 mRNA核外輸送の効率化による動物細胞タンパク質生産バイオサイエンスとインダストリー、**70**, 373-375, 2012 (査読無) <http://www.jba.or.jp/pc/bi/>
- (5) Fujita, K., Okamura, M., Nishimoto, S., Kurihara, T., Momma, K., Miyamae, Y., Kambe, T., Nagao, M., Narita, H. and Masuda, S. Establishment of the monitoring system which detects the inhibition of mRNA processing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1248-1251, 2012 (査読有) [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/76/6/76\\_120226/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/76/6/76_120226/_article)
- (6) 山崎智弘、増田誠司 mRNA輸送体の多様化とその生物学的意義、*化学と生物*, **50**, 9-11, 2012 (査読無) [http://www.jsbba.or.jp/pub/journal\\_kasei/](http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/)
- (7) Aihara, Y., Fujiwara, N., Yamazaki, T., Kambe, T., Nagao, M., Hirose, Y. and Masuda, S. Enhancing recombinant protein production in human cell lines with a constitutive transport element and mRNA export proteins. *J. Biotechnol.* **153**, 86-91, 2011 (査読有) doi:10.1016/j.jbiotec.2011.03.024.
- (1) Fukunaka, A., Kurokawa, Y., Teranishi, F., Sekler, I., Oda, K., Ackland, ML., Faundez, V., Hiromura, M., Masuda, S., Nagao, M., Enomoto, S. and Kambe, T. Tissue nonspecific alkaline phosphatase is activated via a two-step mechanism by zinc transport complexes in the early secretory pathway. *J Biol Chem.* **286**, 16363-16373, 2011 (査読有) doi:10.1074/jbc.M111.227173.
- 〔学会発表〕(計 22 件)
- (1) 増田誠司、動物細胞の核外輸送過程を利用したタンパク質生産法、日本農芸化学会大会、2013
- (2) 増田誠司、mRNA 成熟阻害活性を指標とする抗ガン化合物の探索と産業利用、日本農芸化学会大会、2013
- (3) Fujita K, Minami Y, Masuda S, The identification of regions regulates different complex formations of UAP56 and URH49, which are essential for mRNA export, The 12<sup>th</sup> International Student Seminar, 2014
- (4) 岡村真純、志岐拓哉、増田誠司、胎性致死の遺伝病 LCCS1 にて同定された GLE1 の変異 Fin<sub>major</sub> は mRNA の核外輸送効率を低下させる、第 36 回日本分子生物学会年会、2013
- (5) Okamura M, Shiki T, Masuda S, The GLE1 mutation identified in LCCS1 affects nuclear mRNA export, RiboClub annual meeting, 2013
- (6) 藤田賢一、南裕基、増田誠司、mRNA 核外輸送因子 UAP56 ならびに URH49 における複合体形成差異を決定する領域の同定、第 15 回日本 RNA 学会年会、2013
- (7) 岡村真純、志岐拓哉、宮前友策、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司、家族性遺伝病 LCCS1 の原因遺伝子 hGLE1 の mRNA 輸送における機能解析、日本農芸化学会関西支部 第 478 回講演会、2013
- (8) 藤田賢一、平山瑞希、宮前友策、永尾雅哉、神戸大朋、増田誠司、mRNA 核外輸送因子 UAP56 ならびに URH49 の複合体形成能を支配する領域の同定と機能解析、2012 年度日本農芸化学会関西支部 第 478 回 講演会、2013
- (9) Fujita K, Minami Y, Hirayama M, Masuda S, The identification of regions regulates different complex formations of UAP56 and URH49, which are essential for mRNA export, The 11<sup>th</sup>

International Student Seminar, 2013

- (10) 藤田賢一、南裕基、平山瑞季、増田誠司、mRNA 輸送因子 UAP56 ならびに URH49 における複合体形成制御領域の同定、第 35 回 日本分子生物学会、2012
- (11) 志岐拓哉、岡村真純、伊藤慶紗、増田誠司、DBP5 の核-細胞質間移行は mRNA 輸送に必須である、第 35 回 日本分子生物学会、2012
- (12) Matsumura Y., Kobayashi A, Masuda S. Establishing a highly efficient protein production system in mammalian cells by manipulating the mRNA export step, JAACT2012, 2012
- (13) Fujiwara N, Okumura K, Fujiwara T, Masuda S. Disturbing the function of the nuclear exosome results in the accumulation of adenylated RNA in human nuclei., the 4th EMBO meeting, 2012
- (14) 藤原奈央子、程開明、永尾雅哉、神戸大朋、宮前友策、増田誠司、ヒト核内エキソソームはアデニン鎖の付加された RNA 基質を分解する、第 14 回日本 RNA 学会年会(第 14 回 RNA ミーティング)、2012
- (15) 藤田賢一、宮前友策、永尾雅哉、神戸大朋、増田誠司、mRNA 輸送因子 UAP56 と URH49 の形成する異なる複合体構築機構の解明、日本農芸化学大会、2012
- (16) 志岐拓哉、宮前友策、永尾雅哉、神戸大朋、増田誠司、mRNA 輸送因子 DBP5 の核-細胞質間輸送と mRNA 輸送の相関性、日本農芸化学大会、2012
- (17) Fujiwara N, Yumitate R, Wu K, Masuda S. PAPD5 adenylates nucleoplasmic substrates of the human Exosome, The 10th International Student Seminar, 2012
- (18) Okamura M, Shiki T, Masuda S. The role of human Gle1 protein in mRNA export, The 10<sup>th</sup> International Student Seminar, 2012
- (19) Fujita K, Kurihara T, Yamazaki T, Masuda S. The molecular mechanism of different complex formation in UAP56 and URH49, which are essential for mRNA export. The 10<sup>th</sup> International Student Seminar, 2012
- (20) 藤原奈央子、弓立涼介、呉攸、増田誠司、

ヒト核内 RNA 品質管理機構におけるポリアデニル化およびエキソヌクラーゼ hRrp6 の関与について、口頭、平成 23 年度 日本農芸化学会 関西・中部支部合同大会、2011

- (21) 藤田賢一、栗原朋也、山崎智弘、増田誠司、mRNA 核外輸送因子 UAP56 と URH49 の形成する複合体の分子基盤解析、平成 23 年度日本農芸化学会 関西・中部支部合同大会、2011
- (22) 藤原奈央子、増田誠司、ヒト核内 RNA 品質管理機構における標的 RNA 分子への A 付加と分解はエキソソームと RNA ヘリカーゼ MTR4 の相互作用を通じて協調される、第 84 回日本生化学会大会、2011

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 岡村真純、平山瑞季、猪瀬春子、増田誠司 効率的な mRNA 核外輸送系を用いたタンパク質生産法「動物細胞の培養を成功させる条件設定集」技術情報協会編、in press
- (2) Fujiwara, N., Shiki, T. and Masuda, S. mRNA biogenesis in the nucleus and its export to the cytoplasm. "Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology", eds by Najman, S., *InTech - Open Access Publisher*, ISBN 978-953-51-0544-2, pp131-152, 2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:「核内から細胞質へのターゲット mRNA の輸送を促進する方法、タンパク質の発現方法および製造方法、ならびに、それに用いるキット」

発明者: 増田誠司

権利者: 増田誠司

種類: 特許出願

番号: 特願 2012-165287

出願年月日: 2012 年 7 月 26 日

国内外の別: 国内

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〕

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/bunsh-ioutou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 誠司 (MASUDA Seiji)  
京都大学大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号：20260614

(2) 研究分担者

奥村 克純 (OKUMURA Katsuzumi)  
三重大学大学院生物資源学研究科・教授  
研究者番号：30177183

(3) 連携研究者

該当なし