

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570218

研究課題名(和文) 卵母細胞の貯蔵mRNP構成因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of storage mRNP components

研究代表者

松本 健(Matsumoto, Ken)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：60222311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：mRNAの翻訳や安定性の制御の解明には、そのmRNAがどのような蛋白質と複合体(mRNP)になっているかを知ることが重要である。本研究ではこれまでにアフリカツメガエル卵母細胞から同定したmRNP構成蛋白質RAP55/Lsm14とP100/Pat1蛋白質の解析を進めた。RAP55と機能的に関わる蛋白質を探索する目的で、RAP55との共局在、高発現での顆粒形成への影響、RAP55の顆粒からの消失、を指標にしたスクリーニングをおこなった。P100が卵成熟過程で消失する機構を知るためP100の点変異体を作製し、安定性に影響する部位を同定した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate regulatory mechanisms involved in translation and stability of mRNA, it is essential to understand functions of mRNP components. In this work, we further characterized mRNP components RAP55/Lsm14 and P100 that we previously identified. To obtain proteins that functionally interact with RAP55, we performed a screening based on the co-localization with RAP55, effects of the overexpression on the formation of mRNP granules or the disappearance of RAP55 from mRNP granules. In addition, to understand the mechanism with which P100 disappears from oocytes during oocyte maturation, we prepared several point mutants and analyzed their stability.

研究分野：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：翻訳

1. 研究開始当初の背景

細胞内で mRNA は常に蛋白質との複合体 mRNP として存在するので、mRNP を形作る蛋白質が翻訳や mRNA 安定性の制御に深く関わっている。特に動物の卵成熟、初期発生段階では転写が不活発で、卵母細胞の時に転写され貯蔵 mRNP として蓄えられてきた母性 mRNA の翻訳段階での調節が遺伝子発現調節の主要な位置を占める。研究代表者はアフリカツメガエル卵母細胞における母性 mRNA の翻訳抑制に関わる因子の解析を行っている。研究代表者はこれまでに、翻訳抑制因子 FRGY2 と同じ mRNP に含まれる因子として RAP55 蛋白質と P100 蛋白質を同定し、このうち P100 を強制的に高発現すると卵成熟の進行が遅れるという興味深い知見を得た。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでに同定した P100 蛋白質と RAP55 蛋白質の解析を進める。P100 が卵成熟過程に伴って消失するという知見に基づき、P100 が卵成熟進行に関わる mRNA の翻訳を抑制している可能性を追究してその分子機構を明らかにする。また、RAP55 も翻訳抑制因子であり、間期には細胞質 mRNP 顆粒に局在してこれら顆粒の形成に必須である。また、M 期でスピンドルに局在するので、局在化した mRNA の翻訳を制御している可能性を調べる。これら mRNP 構成蛋白質による特定の mRNA の時期、空間特異的翻訳制御機構を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) P100 蛋白質の免疫沈降産物から RNA を調製して、マイクロアレイにより、P100 を含む mRNP を構成する mRNA を網羅的に明らかにする。

(2) 卵成熟過程での P100 消失機構を調べるため、P100 の点変異体を作成して安定性を調べる。

(3) RAP55 にはこれまで解析してきた RAP55A のほかに解析の進んでいない RAP55B が存在する。これまでにヒト HeLa 細胞には A,B ともに mRNA の発現が見られる。ヒト RAP55B の抗体によって、発現や細胞内局在を観察する。

(4) P100、RAP55A (または B)、RNA ヘリカーゼ Xp54/RCK などは卵母細胞内でそれぞ

れ翻訳抑制因子として働くが、蛋白同士で結合して複合体を作っている。複合体を解析することで翻訳抑制因子複合体における P100 や RAP55 の機能を調べる。

4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル卵母細胞抽出液から内在性 P100 を免疫沈降し、P100 と共に免疫沈降される RNA を DNA マイクロアレイによって解析した。P100 に結合すると思われる多くの遺伝子を同定した。上位には Xcat-2, Xwnt-11, SOX3 mRNA などが存在し、卵成熟や細胞周期に関わる mRNA も多く見られた。

(2) P100 の消失時期から、蛋白質の分解による消失と予想し、分解に関わると考えられるアミノ酸の点変異体を複数作成した。これら P100 点変異体をコードする mRNA をカエル卵母細胞にマイクロインジェクションして卵母細胞内で点変異体を高発現させた。卵成熟過程での安定性を調べたところ、いくつかの点変異体が野生株と比較して安定になっていた。これら点変異体を高発現させた卵母細胞を卵成熟ホルモンで刺激して卵成熟過程における効果を検討したところ、いずれの変異体でも卵成熟の遅延が見られた。

(3) 抗ヒト RAP55B 抗体で HeLa 細胞抽出液のウエスタンブロッティングを行うと、発現ベクターの導入で高発現させた RAP55B は検出できたが内在性の蛋白質は検出できなかった。HeLa 細胞には、RAP55B 蛋白質は検出限度以下しか発現していないと考えられる。高発現させた RAP55B は細胞質 mRNP 顆粒に局在し、M 期スピンドルへの局在は観察されなかった。

(4) RAP55 と機能的に関わる蛋白質を探索する目的で、RAP55 との共局在、高発現での顆粒形成への影響、RAP55 の顆粒からの消失、を指標にしたスクリーニングをおこなった。その結果、M 期でスピンドルに局在する因子や複数の新規顆粒局在因子、顆粒形成に関わる因子を同定した。

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9件)

松本 健 (2014) FET タンパク質ファミリーの疾患との関わり、生化学、86、

274-280. 査読無

Huang, L., Kuwahara, I., and Matsumoto, K. (2013) EWS represses cofilin 1 expression by inducing nuclear retention of cofilin 1 mRNA. *Oncogene*, advance online publication, July 8, 2013 査読有

DOI:10.1038/onc.2013.255.

Guo, T. T., Yu, Y.-N., Yip, G. W.-C., Matsumoto, K., and Bay, B.-H. (2013) Silencing the YB-1 gene inhibits cell migration in gastric cancer in vitro. *Anat. Rec.*, **296**, 891-898. 査読有

DOI: 10.1002/ar.22702.

Matsumoto, K., Nakayama, H., Yoshimura, M., Masuda, A., Dohmae, N., Matsumoto, S., and Tsujimoto, M. (2012) PRMT1 is required for RAP55 to localize to processing bodies. *RNA Biol.*, **9**, 610-623. 査読有

DOI: 10.4161/rna.19527.

中村依子、中井雄治、松本 健 (2012) アフリカツメガエル卵母細胞内の翻訳抑制因子 P100 に結合する母性 mRNA の探索、日大口腔科学、**38**、33-36. 査読有

Inoue, I., Matsumoto, K., Yu, Y., and Bay, B.-H. (2012) Surmounting chemoresistance by targeting the Y-Box Binding Protein-1. *Anat. Rec.*, **295**, 215-222. 査読有

DOI: 10.1002/ar.22401.

Huang, L., Nakai, Y., Kuwahara, I., and Matsumoto, K. (2012) PRAS40 is a functionally critical target for EWS repression in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.*, **72**, 1260-1269. 査読有

DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-2254.

Kawaguchi, A., Matsumoto, K., and Nagata, K. (2012) YB-1, Y-box binding protein-1, is a porter to lead influenza virus ribonucleoprotein complexes to microtubules. *J. Virol.*, **86**, 11086-11095. 査読有

DOI: 10.1128/JVI.00453-12

Mok, B. W.-Y., Song, W., Wang, P., Tai, H., Chen, Y.-X., Zheng, M., Wen, X., Lau, S.-Y., Wu, W. L., Matsumoto, K., Yuen, K.-Y., and

Chen, H. (2012) The NS1 protein of influenza A virus interacts with cellular processing bodies (P-bodies) and stress granules through RNA-associated protein 55 (RAP55) during virus infection. *J. Virol.*, **86**, 12695-12707. 査読有

DOI: 10.1128/JVI.00647-12.

〔学会発表〕(計 19件)

松本 健、吉村麻美: YBAP1 による YB-1 の活性調節、日本薬学会第 134 年会、熊本、2014. 3. 28.

黄 琳、中井雄治、桑原いく、松本 健: RNA 結合蛋白質 EWS による mRNA の転写後調節、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013. 3. 29.

Huang, L., and Matsumoto, K.: EWS represses protein expression by inducing nuclear retention of its mRNA targets. The 2nd Meeting of RNA and Biofunctions-Asia Study: RNA Biofunctions and Viruses, Hakata, Fukuoka, 2013. 1. 10.

Huang, L., Kuwahara, I., and Matsumoto, K.: EWS induces the nuclear retention of its target mRNAs and represses their protein expression in Ewing's sarcoma. 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012. 12. 14.

Yu, Y.-N., Inoue, I., Guo, T., Ng, C.-T., Wong, J.-Y., Matsumoto, K., Yip, G. W., and Bay, B.-H.: Y-box binding protein-1 as a molecular target for potentiating chemotherapeutic drugs. The 24th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Dublin, Ireland, 2012. 11. 9.

中村依子、中井雄治、松本 健、城座映明: ツメガエルの卵成熟に關与する mRNP 構成因子 P100 には何が結合するのか、XCIJ-All/MA 研究集会、東京、2012.7. 14.

中村依子、中井雄治、松本 健、城座映明: アフリカツメガエル卵母細胞特異的蛋白質 P100 に結合する卵成熟關与遺伝子、平成 24 年度日本生化学会関東支部例会、前橋、2012.6.23.

Matsumoto, K., Minami, M., Minami, Y., Matsumoto, S.: RAP55 is important for the assembly, size and composition of

cytoplasmic mRNP granules. The 10th Asia Pacific Microscopy Conference, Perth, Australia, 2012. 2. 7.

Huang, L., Nakai, Y., Kuwahara, I., and Matsumoto, K.: Functional repression of an EWS-bound mRNA in Ewing's sarcoma. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011. 12. 14.

Huang, L., Nakai, Y., Kuwahara, I., and Matsumoto, K.: Identification of EWS-bound mRNAs and their functional role in Ewing's sarcoma cells. NTU-JST Joint Meeting on RNA and Biofunctions-Asia Studies, Taipei, Taiwan, 2011. 11. 11.

Takimoto, K., Matsumoto, K., Yamashita, S., Muramatsu, R., Yokoyama, S., and Wakiyama, M.: TNRC6 proteins interact with multiple Argonautes to form large RNP aggregates. RNA 2011: 16th Annual Meeting of the RNA Society in conjunction with 13th Annual Meeting of the RNA Society of Japan, Kyoto, 2011. 6. 15.

Matsumoto, K., and Yoshimura, M.: Regulation of the activities of YB-1 by YBAP1. RNA 2011: 16th Annual Meeting of the RNA Society in conjunction with 13th Annual Meeting of the RNA Society of Japan, Kyoto, 2011. 6. 15.

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/matsumok/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 健 (MATSUMOTO, Ken)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：60222311