

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～ 2012

課題番号：23657117

研究課題名（和文）RNAi を制御する新規タンパク質結合型翻訳後修飾“Arbration”解明への挑戦

研究課題名（英文）Investigation of Novel protein binding posttranslational modification “Arbration”.

研究代表者

飯田 直子 (IIDA NAOKO)

国立遺伝学研究所・生命情報研究センター・特任研究員

研究者番号：40360557

研究成果の概要（和文）：RNAi 機構において中心的役割を持つ Argonaute タンパク質(Ago) は染色体のヘテロクロマチン構造や細胞機能を制御している。我々は細胞周期制御での Ago の機能を調べるため、分裂酵母を用いて研究を行った。新規 Ago1 複合体形成因子として HECT 型ユビキチン E3 リガーゼ(Ptr1)を同定し、Ago1 と Ptr1 がヘテロクロマチン制御とは異なる機構で細胞周期を制御していることを見いだした。また、Ptr1 と Ago による細胞周期チェックポイント制御機構を明らかにするため、ptr1 変異株の温度感受性を抑圧する変異のスクリーニングを行い、約 40 個の変異体を得た。次世代シーケンサーを用いて効率的に変異点を同定することが出来た。これらの結果から、RNAi 因子と Ptr1 が mTOR 経路を介し細胞周期を制御している可能性を見いだした。

研究成果の概要（英文）：RNAi is a conserved mechanism for gene silencing and heterochromatin formation through Argonaute (Ago)-associated complexes. In this study, I focus on a novel role of Ago in the cell-cycle control in *S. pombe*. Affinity purification of Ago1 revealed novel interaction between Ago1 and Ptr1, an mRNA-export factor. The *ptr1-1* mutant impaired the cell cycle arrest but not the silencing. The phenotypic analysis suggested that Ptr1 regulates cell cycle by a distinct mechanism from the RNAi-heterochromatin pathway. I isolated suppressor mutants of *ptr1-1* and identified a mutation in TOR-associated gene. I identified the causative mutations by high-throughput sequencing and bioinformatics. This result suggested that Ptr1 and TOR-signaling pathway associated with Ago1-related mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子生物学・遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：RNAi, Ago, 細胞周期制御

1. 研究開始当初の背景

生体内の様々な制御機構は、タンパク質の翻訳後修飾により動的な環境応答と恒常性維持を行う。RNA interference(RNAi)機構は、small RNA を介した種間で保存された重要な遺伝子発現抑制機構である。分裂酵母のRNAi 機構では、siRNA を取り込んで標的RNA を認識・分解するAgo1タンパク質が、二つの複合体ARC(Ago1, Arb1, Arb2 複合体)とRITS(Ago1, Tas3, Chp1 複合体)を形成し、ヘテロクロマチン構造形成を制御している。近年Ago1がヘテロクロマチン制御以外に細胞周期チェックポイント制御にも関わっていることが報告されたことから、我々は細胞周期チェックポイント活性時のAgo1複合体形成因子としてHECT型ユビキチンE3リガーゼ(Ptr1)を同定し、Ptr1依存的なタンパク質修飾がRNAiの機能制御に関与している可能性を見出した。Ptr1依存的なタンパク質修飾として、ARC複合体のサブユニットの一つであるArb2が、もう一つのAgo1複合体RITSのサブユニットChp1と共有結合しタンパク質修飾のように挙動することがわかった(以上未発表データ)。Arb2はユビキチン様タンパク質の特徴を持たないが、種間で高度に保存されたタンパク質であることから、Arb2の結合(Arb2化)は哺乳動物まで保存された未知のタンパク質修飾として機能している可能性が高い。そこで本研究では、タンパク質修飾Arb2化の実体とその機能の解明に挑戦した。

2. 研究の目的

本研究では、RNAi因子による新しい制御機構の解明を目的とした。特に、Arb2がChp1と共有結合する様式とその制御機構を明らかにすることにより、新規タンパク質修飾機構の解明を目指した。

これまで知られているタンパク質修飾からはArb2化の結合様式を類推することが困難なため、以下の計画を立てた。

(1)「共有結合がArb2-Chp1間のどのアミノ酸・側鎖を介した結合なのか」を明らかにする。

(2)「Arb2-Chp1結合を制御する因子の単離」Ptr1以外にArb2化に関与する因子が不明であることから、Arb2-Chp1結合を制御する因子の単離によりArb2化制御の分子機構とRNAi機構との関係を明らかにする。

(3)「*in vitro*におけるArb2化タンパク質修飾系の確立」得られた関連因子をもとに、*in vitro*におけるArb2化タンパク質修飾系の確立を行い、詳細なArb2化の分子機構解明を

目指す。

(4)「哺乳類細胞におけるArb2化の探索」もを行いArb2化の保存性を検証する。

3. 研究の方法

本研究は、RNAi機構におけるArb2によるタンパク質修飾(Arb2化)の実体とArb2化によるヘテロクロマチン構造形成と細胞周期チェックポイント制御機構を明らかにするため、遺伝学的・生化学的解析が可能な分裂酵母を用いて解析を行う。まず、(1)

「Arb2-Chp1間の結合様式」について質量分析を駆使して明らかにし、(2)「Arb2-Chp1結合を制御する因子」をArb2-Chp1結合欠損を示す変異体の単離によって行い、Arb2化制御機構を明らかにする。関連因子をもとに、(3)「*in vitro*におけるArb2化タンパク質修飾系の確立」を行い詳細なArb2化の分子機構解明を目指すほか、(4)「哺乳類細胞におけるArb2化の探索」から種間における保存性も検証する。

4. 研究成果

研究計画を遂行するため、まず内在性Arb2を特異的に検出する抗体を作製する必要があったが、Arb2タンパク質の精製が困難でArb2抗体を得ることが出来なかった。そこで、以下の計画を進めた。

(1) Ptr1抗体の作製

(2) *ptr1*変異体の温度感受性増殖に対する抑圧遺伝子の同定。

(1) Ptr1抗体の作製:

我々は、免疫沈降と質量分析により、細胞周期チェックポイント活性時のAgo1複合体形成因子としてHECT型ユビキチンE3リガーゼ(Ptr1)を同定していた(図1 A)。Ptr1タンパク質は9.6 kb(365 kDa)の大きなタンパク質である。約1kbの断片を大腸菌で発現し、可溶性画分精製されたタンパク質を抗原とし、Ptr1抗体を作製することに成功した。

Ptr1抗体を用いた免疫沈降や抗体染色によりAgo1とPtr1が複合体を形成していることを確認出来た(図1 B,C)。また、表現型解析から*ptr1*変異株はRNAi因子の変異株と同様に細胞周期チェックポイント異常を示す事を見いだした(図2)。

遺伝学的にもRNAiとPtr1は細胞周期チェックポイントを制御していることを示し、論文にまとめた(Iida T, Iida N, Tsutsui Y, Yamao F, Kobayashi T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Oct 12;427(1):143-7)。

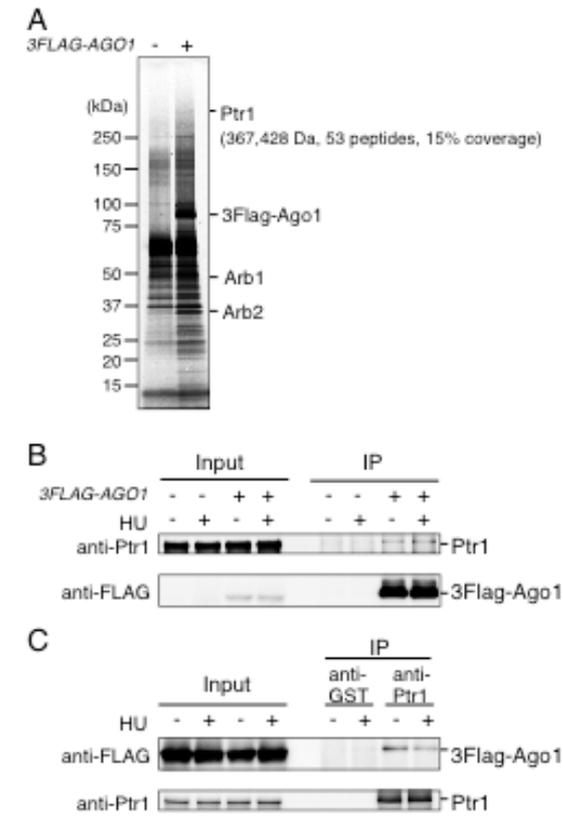


図 1

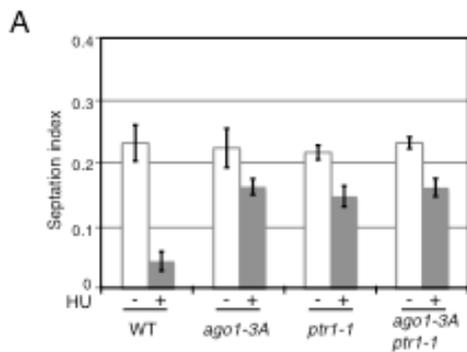


図 2

(2) *ptr1* 変異体の温度感受性増殖に対する抑圧遺伝子の同定：

Ptr1 と *Ago* による細胞周期チェックポイント制御機構を明らかにするため、*ptr1* 変異株の温度感受性を抑圧する変異のスクリーニングを行い、約 40 個の変異体を得た。それら全ての原因遺伝子は次世代シーケンサーを用いたゲノムのリシーケンシングとパイオインフォマティクスにより同定した (図 3)。変異体には変異源により生じた多数の変異がある。戻し交雑を行い、次世代目の野生型個体と変異個体をそれぞれ複数プールしたサンプルを用いることで、原因遺伝子変異を変異株に濃縮し、原因でない変異を分散させた。シーケンシングにより得られた配

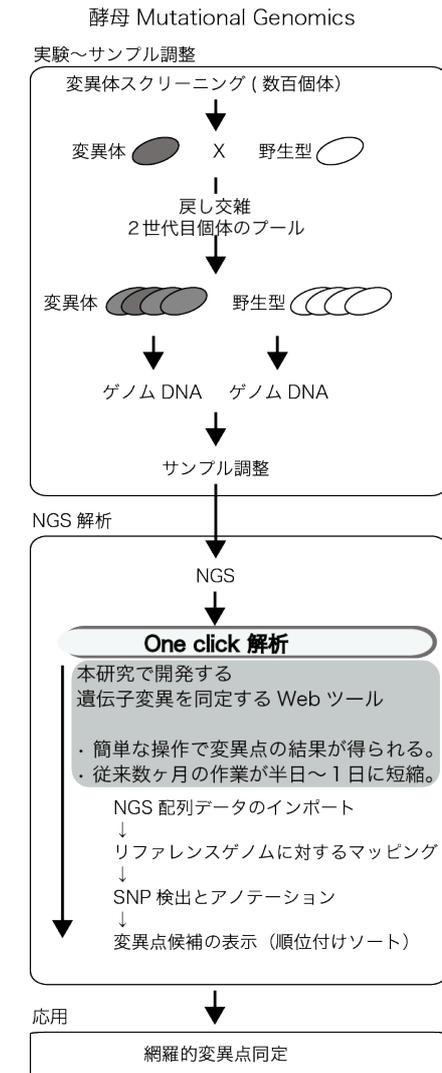


図 3

データをリファレンスゲノムデータに対しマッピングを行い、SNP 検出、野生株との比較とアノテーションを行った。

その結果、*mTOR* 関連遺伝子がいくつか同定された。さらに、この遺伝子変異が *ago1* 変異の表現型も抑圧することを見いだした。この結果は、*RNAi* 因子と *Ptr1* が *mTOR1* 経路を介し細胞周期を制御している可能性を示唆しており、さらに解析を進めている。これらの成果については論文投稿の準備を行っている。

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 1 件)

(1) Iida T, Iida N, Tsutsui Y, Yamao F, Kobayashi T. RNA interference regulates the cell cycle checkpoint through the RNA export factor, *Ptr1*, in fission yeast.

Biochem Biophys Res Commun. 査読あり
427(1), 2012 Oct12; :143-7. doi:
10.1016/j.bbrc.2012.09.027.

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯田 直子 (IIDA NAOKO)
国立遺伝学研究所・生命情報研究センター
・特任研究員
研究者番号：40360557

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

飯田 哲史 (IIDA TETSUSHI)
国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教
研究者番号：60391851