

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892033

研究課題名(和文) 転写後制御におけるLARP1のポリAテール最末端認識の意義と分子機構に関する研究

研究課題名(英文) Molecular mechanisms and biological significance of poly(A) terminus recognition by LARP1

研究代表者

青木 一真 (Aoki, Kazuma)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：90362508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題はmRNAの3'末端を形成するポリ(A)鎖の末端を認識するLARP1の基質認識特異性の詳細と、分子機能との関連性を明らかにする事を目的とした。

その結果、LARP1がポリ(A)鎖の3'末端ヌクレオチドの3'-OH基を認識している事、また塩基配列認識の特異性についてはマグネシウムイオン濃度に強い影響を受ける事を明らかにした。分子機能については少なくとも無細胞系において一般的な構造のmRNAの翻訳には顕著な効果を与えないことを示した。併せてLARP1-ポリ(A)鎖を含む複合体の実態を明らかにする為、原子間力顕微鏡を用いたRNA観察法の開発をおこなった。

研究成果の概要(英文)：In previous study, principal investigator identified LARP1 as a protein that specifically recognized the terminus of poly(A) tail. This grant had intended to clarify biological significances of LARP1 and molecular mechanisms of its specific poly(A) terminus recognition.

As the results, it has been revealed that LARP1 strictly recognized the 3'-OH group of the terminal nucleotide and also revealed nucleotide specificity of LARP1 was influenced by magnesium ion concentration. About molecular function, at least in our cell-free translation system, there was slight effect on translation of several mRNAs, which have variety of 3' terminus, by adding LARP1.

Finally I started to develop method using atomic force microscope for analyzing RNA-protein complex containing LARP1.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA 翻訳 複合体 ポリ(A) タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ヒストン遺伝子を除く大部分のタンパク質をコードする mRNA において、その 3'末端は連続したアデノシン残基から構成されるポリ(A)鎖により形成されている。ポリ(A)鎖はポリ(A)結合タンパク質 (PABP) と RNA-タンパク質複合体を形成する事で mRNA の安定化に寄与していると同時に、5'末端領域との相互作用を介した翻訳の促進に重要であることが知られている。このように遺伝子発現制御において非常に重要な役割を果たしているポリ(A)鎖であるが、それ自身の制御については未だ明らかにされていない点が多く残されている。その理由としてはポリ(A)鎖が単一ヌクレオチドから構成されている連続配列である事や、ゲノム上にアノート出来ない等の理由から、既存の手法での解析が困難である場合が多い事等があげられる。

研究代表者は RNA に結合する因子の網羅的プロテオーム解析に携わる中で、厳密な意味でのポリ(A)末端を有する RNA にのみ結合するタンパク質として LARP1 を同定した。LARP1 はショウジョウバエにおいて生殖細胞形成異常を誘導する因子として報告されている他、ヒト培養細胞における包括的翻訳促進因子である事を示唆する報告がなされていた。しかしながら研究代表者が示した LARP1 の RNA 結合特異性が、上記を含む分子機能との関連性については全く明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究においては、ポリ(A)鎖の最末端を特異的に認識するというこれまで知られてこなかった LARP1 の性質に着目し、その基質認識特異性と分子機能の関連を明らかにする事により、ポリ(A)鎖を介した遺伝子発現制御の全貌の解明に貢献する事を目的とした。

また研究代表者は LARP1 の特異的性質がポリ(A)鎖についての新たな解析法の開発への端緒となるのではないかと考えている。そこで応用的発展も視野に入れた LARP1 の RNA 認識特異性とその分子機構の詳細の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) LARP1 及びその変異体の発現系の作成

以後の解析に用いる為、LARP1 の哺乳動物細胞における発現系を準備する。併せてドメイン解析等に供するための変異体の作成をおこなった。

(2) 合成 RNA を用いた LARP1 のプルダウン解析

5'末端にビオチンを付加した 15 から 25 塩基長の RNA を合成し、ストレプトアビジンビーズと結合させた後に、LARP1 もしくはその変異体を発現させた 293 細胞の抽出液と混

合し、プルダウン解析をおこなった。結果について抗 LARP1 抗体、もしくは抗 FLAG ペプチド抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。

(3) 無細胞翻訳系を用いた機能解析

研究代表者の所属研究室において開発されたヒト培養細胞由来の無細胞翻訳系を用いて LARP1 の翻訳に関する効果を解析した。ルシフェラーゼをコードする mRNA をレポーターとして、様々な 3'末端のレポーター mRNA に対して LARP1 の添加の有無の条件下で翻訳反応をおこない、ルシフェラーゼによる化学発光測定により解析をおこなった。

(4) アンチセンスオリゴを利用した特定の RNA-タンパク質複合体の精製法の開発

5'末端にビオチン、もしくはデスチオビオチンを付加したアンチセンス LNA を合成した。LNA は所謂修飾核酸の一種であり、基本的な性質は通常の RNA と共通しているが、その分子間結合は安定で、高い Tm を示す事、また RNA 分解酵素への強い耐性を付与することができる。

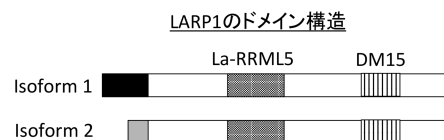
In vitro 転写した RNA と、アンチセンスとなるように設計した LNA をアニーリングさせた後に、ストレプトアビジンビーズへと吸着させた。その後 RNA-LNA-ビーズ複合体を細胞抽出液と混合し、精製した。デスチオビオチンを付加した LNA を用いた場合においては溶出にビオチンを用いた。

精製した RNA の解析については主にウエスタンブロットによりおこなったが、一部については原子間力顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

(1) LARP1 のドメイン構造と RNA 結合性について

LARP1 の RNA 認識特異性の分子機構を解析する為に、そのドメイン構造を理解する事は重要である。そこで LARP1 の変異体を複数作成した。LARP1 が含まれる La-タンパク質ファミリーは保存された La ドメインとそれに並んだ RRM 様ドメイン (RRML5) を持つ。RRM は一般的に RNA 結合ドメインと認識されており、La ドメインについても RNA の末端認識に関与することが報告されている。加えて LARP1 に関しては C 末端側に DM15 と呼ばれる機能未知のドメインが存在している。



全長の LARP1 は 15 塩基長のオリゴ A に結合するが、末端アデノシン残基の 3' をリン

酸化した場合、RNA との結合が確認できなくなった。これはファミリーの中で比較的相同性が高く、研究が進んでいる LARP3 (別名 La) と同様の結果であった。LARP3 に関しては La ドメインが末端認識を担っている事が結晶構造解析等から明らかにされており、LARP1 においても La ドメインが RNA の 3' 末端の認識において中心的な役割を果たしている事が示唆された。

また LARP1 には 2 種類の転写開始部位が存在し、エクソン 1 が異なる 2 つのアイソフォーム (1,2) が存在する。この LARP1 アイソフォームが乳がん組織における予後診断のマーカーとなりうる可能性が報告された為、これら異なるエクソン由来ドメインに関しても解析をおこなったが、こちらに関しては RNA 結合能への顕著な関与は確認できなかった。

そこで次に RNA 結合ドメインの更なる絞り込みをおこなった。これまでの報告から La-RRM ドメインが RNA 結合に重要である事が示唆されていた為、LARP1 においても N 末端、C 末端を欠いた La-RRM ドメインのみの変異体を作成したところ、この変異体はポリ (A) に顕著な結合を示さなかった。La-RRM から DM15 ドメインの直前までの領域を含む変異体に関しては十分な RNA 結合性を示したことから、LARP1 においては RRM の下流領域が RNA 結合能を補完していると考えられる。

(2) LARP1 の RNA 結合特異性に関する解析

LARP1 の RNA 結合能について、LARP3 と同様に RNA の 3' 末端を厳密に識別している事は前段で述べた。そこで次に LARP1 の塩基配列特異性について 25 塩基長の合成ポリ (A) RNA を用いて結合解析をおこなった。その結果、マグネシウムイオン非存在下においてはポリ (A) RNA の 3' 末端に 1-3 塩基のウリジンの付加は、LARP1 と RNA の結合に顕著な影響を及ぼさなかった。一方でマグネシウムイオン存在下においてはウリジンの付加数に応じて結合能の低下を示した。

上記の結果は LARP1 が 9 塩基長のポリ (A) 末端を持つ RNA に結合し、3' 末端へのアデニン以外の塩基の付加によりその結合は著しく阻害された、という研究代表者らによる以前の報告において示した結果と一見すると矛盾するものであった。この解釈として LARP1 が認識するのに十分なポリ A 鎖長がある時には最末端の塩基組成は基質認識に関与していないと考えるのが妥当であるが、その詳細はまだ明らかでない。

以上の事から LARP1 の RNA 認識能に関してはマグネシウムイオンに影響を受けるポリ A 認識と、La ドメインによる 3' 末端認識とポリ (A) 鎖の認識という 2 つの段階が存在している事が強く示唆された。特にマグネシウム非存在下において十分な長さのポリ (A) 末端が存在する場合に末端の塩基配列認識の特異的認識性は低下すると考えられる。ただし

この現象もポリ (A) 配列の後に付加する塩基の鎖長に影響される事が示唆されていることから、LARP1 のポリ (A) 認識に関するドメインの決定や、必要とされるポリ (A) 配列の長さとの関係性については今後の重要な検討課題であると考えられる。

(3) 翻訳における LARP1 の役割について

LARP1 はその主な標的と考えられている 5' TOP mRNA に限らず、ポリ (A) 鎖を持つ RNA と相互作用している事が研究代表者らの過去の研究によって示されている。そこで LARP1 が特別な構造を持たない mRNA の翻訳におよぼす影響について検討をおこなった。293F 細胞由来の無細胞翻訳反応系におけるルシフェラーゼ mRNA をレポーターとして解析をおこなった結果、LARP1 添加による顕著な変化は認められなかった。この結果は長いポリ (A) 鎖を付加した mRNA だけでなく 10-25 塩基程度の短いポリ (A) 鎖を付加した場合でも同様であった。これらの結果から、LARP1 がその機能を発揮する為にはポリ (A) 鎖の認識以外の要因が必要とされる事が示唆された。この要因としては 5' TOP 配列、或いはその他の 3' UTR 上の配列が影響している可能性が考えられる。その他に LARP1 が mTOR の制御下にあるという報告があることから、細胞の栄養状態が関連している可能性も十分に考えられる。これらの点を含めて LARP1 が翻訳に及ぼす役割とポリ (A) 末端認識の意義を明らかにすることが今後の重要な課題である。

(4) ポリ (A) RNA-タンパク質複合体を標的とした構造生物学的解析法の開発

本研究課題において、当初は LARP1 のポリ (A) 末端認識についての分子メカニズムを精査する為、X 線結晶構造解析を視野にいたした準備を進めていた。しかしながら、RNA 結合部位における相同性が高い LARP3 の解析結果、並びに前段までに示した LARP1 に関する生化学的結合試験の結果から、LARP1 においても La-domain が末端認識を担っていると判断するのが妥当であるとの結論に至った。そこでより解析が困難であると予想された、ポリ (A) RNA 上に形成される LARP1 を含む RNA-タンパク質複合体の解析法の開発に着手した。

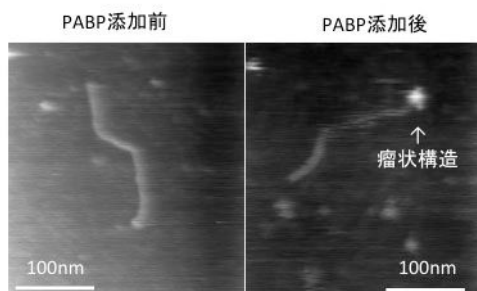
ポリ (A) 鎖の解析はその反復配列としての特徴から均一な複合体を調製する事が難しい事から従来法だけでの解析には限界があった。その為、1 分子 (複合体) を対象とした構造生物学的アプローチが不可欠であると考え、細胞抽出液中で再構成した複合体を精製し、原子間力顕微鏡 (AFM) で観察する方法を試行した。

RNA-タンパク質複合体の精製は RNA に対して強い親和性を示し強固な結合を維持できる事が期待できる LNA とよばれる修飾塩基により合成したアンチセンスオリゴを用いておこなった。また次段で述べる 1 分子解析へ

持ち込む試料の調製という点から、緩やかな条件での複合体を溶出する可能にする為に、アンチセンス LNA の 5' 末端にデスチオピオチンを付加した。このアンチセンスオリゴを用いて実際にポジティブコントロールとして用いた RNA 結合タンパク質を標的配列依存的にプルダウンすることが出来た。一方で内在性の LARP1 に関しては、ウエスタンブロットの感度で検出する事には至っておらず、精製の高効率化が今後の課題となる。

併せて AFM による RNA-タンパク質複合体の 1 分子解析の為に予備実験をおこなった。解析には片側の 3' 末端にのみポリ(A)を付加

図1 AFMによる二本鎖RNA-ポリ(A)-PABP複合体画像



した 700 塩基長程の二本鎖 RNA を用いた。この RNA を AFM において観察したところ、線状構造が確認でき、更に精製した PABP を加えた所、新たに末端に瘤状構造が形成される事が示された。

このような瘤状構造は、PABP を加えた条件下で二本鎖 RNA の片側のみ認められることからポリ(A)-PABP 複合体であると考えられる。

今回示した結果は精製タンパク質と RNA のみで形成された単純な複合体を視覚化したものであるが、最終的な目的である細胞内、あるいは無細胞反応系内で再構成した機能を保持した LARP1 を含む複合体の解析には至っていない。今後の課題として複合体の精製法の開発、改良のみならず、AFM による一分子構造解析の更なる高精度化や、複数のタンパク質を識別する技術の開発が望まれる。

引用文献

LARP1 specifically recognizes the 3' terminus of poly(A) mRNA. Aoki K. et al. FEBS Lett. 2013 Jul 11;587 (14):2173-8

RNA sequencing of cancer reveals novel splicing alterations. Eswaran J. et al. Sci Rep. 2013;3:1689

Proteomic analysis of cap- dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. Tcherkezian J. et al. Genes Dev. 2014 Feb 15;28(4):357-71.

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

研究代表者

青木一真 (AOKI, Kazuma)

理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号: 90362508