

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290062

研究課題名(和文) ゲノム情報正常発現を保障するスプライシング未完了RNAの核内繫留機構

研究課題名(英文) Mechanism of the nuclear retention of unspliced RNAs that ensures proper expression of genomic information

研究代表者

坂本 博 (Sakamoto, Hiroshi)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00187048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：NXF-1とCRM1は真核生物に共通するmRNAとsnRNAの核外輸送受容体である。Y14を含むEJCはスプライシング後のエキソン連結部に結合し、さまざまなmRNA代謝経路に関与している。線虫*C. elegans*においてY14を阻害した場合、CRM1及びNXF-1類似因子であるNXF-2依存的にスプライシング未完了RNAが細胞質に漏出する。タグ付きのNXF-2を発現する線虫及び培養細胞を解析した結果、NXF-2が核外輸送因子NXT-1と相互作用するとともに、翻訳開始因子eIF4Eとも相互作用し、結合するmRNAの翻訳を活性化する機能をもつことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：NXF-1 and CRM1 are well conserved among eukaryotes and act as nuclear export receptors for mRNAs and snRNAs, respectively. EJC is a complex formed just upstream of exon-exon junctions after pre-mRNA splicing and has various functions in RNA metabolism. Depletion of Y14, a core component of EJC, in the Nematode *C. elegans*, results in the cytoplasmic leakage of unspliced RNAs, which depends on CRM1 and NXF-2, an NXF-1-like protein. Analysis of *C. elegans* and cultured cells expressing epitope-tagged NXF-2 showed that NXF-2 interacts with both NXT-1, a nuclear export factor, and eIF4E, a translation initiation factor, and functions as a translation activator when tethered on mRNA.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム機能発現 遺伝子発現調節 RNAスプライシング 核外輸送 品質管理 翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

多数のイントロンを含む高等真核生物の遺伝子において、転写後に全てのイントロンがスプライシングによって除去され、成熟した mRNA のみが核から細胞質に輸送されることは、ゲノム情報の正常発現を保證する上できわめて重要である。もし、一部でもイントロンをもったスプライシング未完了 RNA が細胞質に輸送されれば、多くの場合正常なタンパク質は合成されず、生物にとって非常に有害な状況を生じることになる。このような状況が生じないように、スプライシング未完了 RNA を核内に繋留し、スプライシングを完了した mRNA のみを選択的に核外輸送する細胞内システムが存在している。しかしながら、この細胞システムの分子機構については長い間不明のままであった。このシステムを説明する機構として、スプライシング依存的に RNA に核外輸送因子が結合することが近年提唱されているが (Kelly & Corbett, *Traffic*, 2009)、このモデルでは一部のイントロンのみが除去されたスプライシング未完了 RNA も核外輸送されることになり、細胞質にスプライシング未完了 RNA がほとんど存在しないという実際の現象を完全には説明できない。

研究代表者は、線虫 *C. elegans* においてエキソン連結部複合体 (Exon Junction Complex, EJC) の中核因子である Y14 タンパク質を阻害すると、ほとんどの遺伝子においてイントロンを含むスプライシング未完了 RNA が細胞質に漏出することを発見した。従来、個々のイントロンのスプライシング終了後にエキソン結合部の上流に EJC が形成され、核外輸送因子をリクルートすることが知られていたが、この発見は、EJC 中核因子が EJC 前駆体 (pre-EJC) としてスプライシング複合体に直接相互作用し、スプライシング未完了 RNA を核内に繋留するという全く新しい機能をもつことを示している (Shimori et al., *Mol. Cell. Biol.* 2013)。この新機能に基づ

けば、スプライシング途上のイントロンがひとつでも RNA 上に存在した場合、核内で EJC 中核因子によってスプライシング未完了 RNA として認識・繋留されることになり、長い間不明であった「なぜ成熟 mRNA のみを選択的に核外輸送されるのかという問題」をうまく説明できる (図 1)。

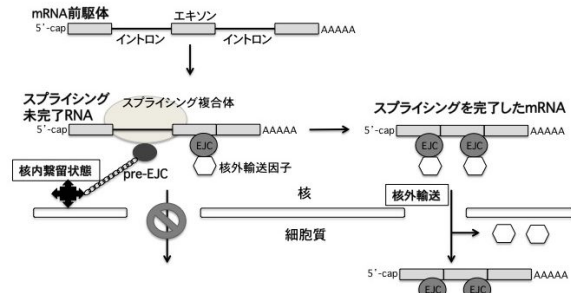


図1. EJC中核因子 (pre-EJC)によるスプライシング未完了RNAの核内繋留

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでの研究から、3種類の EJC 中核因子 (Y14, MAG-1, eIF4AIII) が pre-EJC としてスプライシング未完了 RNA の核内繋留に必要であることを明らかにしている。また、EJC 中核因子が相互作用するスプライシング複合体因子として、U2 snRNP 構成タンパク質 SF3b やイントロン結合タンパク質 IBP160 など数種類を明らかにしている。さらに、線虫において SF3b を阻害すると、Y14 を阻害した時と同様に、スプライシング未完了 RNA の核外漏出が起きる。この事実は、哺乳類細胞や分裂酵母において SF3b を阻害するとスプライシング未完了 RNA が核外漏出するという報告 (Kaida et al., *Nat. Chem. Biol.* 2007; Kotake et al., *Nat. Chem. Biol.* 2007; Lo et al., *BBRC* 2007) と一致する。これらの知見を踏まえると、EJC 中核因子を中心とする pre-EJC がスプライシング複合体中の特定の因子と相互作用している状態が、スプライシング未完了状態として細胞に認識されて核内に繋留されていると考えられる。また、研究代表者は、Y14 を阻害した場合のスプライシング未完了 RNA の細胞質への漏出は、CRM1 と NXF-2 の機能に依存し

ていることも明らかにしている。CRM1 は snRNA の核外輸送受容体であるが、NXF-2 は mRNA 核外輸送受容体である NXF-1 と類似しているが機能未知の因子である。

そこで本研究では、pre-EJC の形成を阻害した場合にスプライシング未完了 RNA の細胞質漏出を引き起こす NXF-2 の機能の詳細を明らかにするとともに、この現象が線虫固有のものであるのか、それとも進化的に保存されたものであるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニック線虫を用いた細胞内動態及び相互作用の解析

mRNA の核外輸送受容体である NXF-1 とその補助因子 NXT-1、また Y14 阻害時のスプライシング未完了 RNA の細胞質漏出に関する CRM1 及び NXF-2 について、エピトープタグ付きで発現するトランスジェニック線虫を複製し、免疫染色法によって細胞内動態を解析するとともに、免疫沈降法によってそれぞれの相互作用を解析する。

(2) 培養細胞を用いた NXF-2 の機能解析

機能未知である NXF-2 を哺乳類培養細胞において発現させ、どのような細胞内動態を示すかを解析するとともに、NXF-2 を人工的に mRNA に繫留させた場合の RNA 安定性や翻訳に対する効果を解析する。

(3) 培養細胞における Y14 阻害効果の解析

哺乳類培養細胞において Y14 を RNAi 法を用いて阻害し、スプライシングにどのような影響を与えるかについてマイクロアレイ法を用いて網羅的に解析する。

4. 研究成果

(1) 線虫においても哺乳類と同様に、通常の状態では NXF-1 が mRNA の核外輸送受容体であり、CRM1 が snRNA の核外輸送受容体であることが明らかになった。核外輸送受容体 NXF-1 が核内に大部分が局在する一方で、核

膜孔複合体との相互作用ドメインを持たない NXF-2 は核に局在するとともに、細胞質において顆粒状の構造体を形成し、NXT-1 もこの顆粒状構造に共局在することを明らかにした。また、NXF-2 と NXT-1 が相互作用することを免疫沈降実験によって明らかにした。NXF-2 を哺乳類培養細胞である HeLa 細胞で発現させたところ、線虫と同様に細胞質に顆粒状構造体を形成し、この構造体には翻訳開始因子 eIF4E が共局在することが明らかになった (図 2)。これらの結果は NXF-2 が RNA の核外輸送に何らかの役割

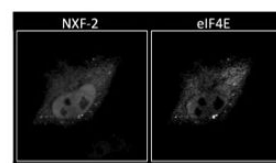


図2. NXF-2と翻訳開始因子eIF4Eの共局在

をもつことや核外輸送後の翻訳制御に関与することを示唆している。そこで、HeLa 細胞において NXF-2 を人工的に mRNA に繫留させるレポーターを用いた発現解析を行ったところ、NXF-2 が RNA の安定性には影響を与えず、翻訳を強く促進する活性を持つことが明らかになった (図 3)。以上のことから、NXF-2 が特定の mRNA を核外輸送し、輸送後の mRNA の翻訳制御に積極的に関与することが示唆された。

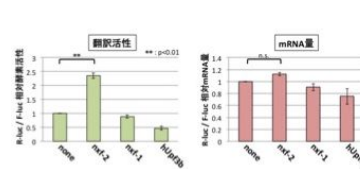


図3. NXF-2はmRNAの翻訳を活性化する

(2) EJC 中核因子である Y14 の機能が進化的に保存されているかどうかの検討を行った。哺乳類培養細胞である HeLa 細胞において Y14 を阻害した場合の RNA を網羅的に配列解析した結果、細胞周期の進行に関係する遺伝子群に存在する比較的短いイントロンのスプライシングが未完了となることが明らかになった (Fukumura et al., *International Journal of Molecular Sciences* 2016)。しかし、これらのスプライシング未完了 RNA が核外漏出しているかどうかについては解析

できなかった。このような短いイントロンを含むレポーターRNAにY14などのEJC中核因子を人為的に結合させる実験から、EJC中核因子が効率的なスプライシングに必要であることが確認できた。以上のことから、EJC中核因子がスプライシングに積極的に関与すると言う点で、線虫とヒトにおいて機能的に保存されていることが示唆された。

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5件)

Kobayashi, M., Tani-Matsuhana, S., Ohkawa, Y., Sakamoto, H., Inoue, K. DND protein functions as a translation repressor during zebrafish embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 484, 235-240, 2017. (DOI:) (査読有り)

Fukumura, K., Wakabayashi, S., Kataoka, N., Sakamoto, H., Suzuki, Y., Nakai, K., Mayeda, A., Inoue, K. The Exon Junction Complex controls the efficient and faithful splicing of a subset of transcripts involved in mitotic cell-cycle progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1153, 2016. (DOI: 10.3390/ijms17081153) (査読有り)

Yamamoto, K., Furukawa, M.T., Fukumura, K., Kawamura, A., Yamada, T., Suzuki, H., Hirose, T., Sakamoto, H., Inoue, K. Control of the heat stress-induced alternative splicing of a subset of genes by hnRNP K. *Genes to Cells*, 21, 1006-1014, 2016. (DOI: 10.1111/gtc.11400) (査読有り)

Miwa, T., Takasaki, T., Inoue, K., Sakamoto, H. Restricted distribution of

mrg-1 mRNA in *C. elegans* primordial germ cells through germ granule-independent regulation. *Genes to Cells*, 20, 932-942, 2015. (DOI: 10.1111/gtc.12285) (査読有り)

Furukawa, M.T., Sakamoto, H., Inoue, K. Interaction and colocalization of HERMES/RBPMS with NonO, PSF, and G3BP1 in neuronal cytoplasmic RNP granules in mouse retinal line cells. *Genes to Cells* 20, 257-266, 2015. (DOI: 10.1111/gtc.12224) (査読有り)

[学会発表](計18件)

吉田篤史、古川真理、坂本博、井上邦夫：神経細胞におけるRNP顆粒の形成機構の解析、第39回日本分子生物学会、2016.11.30-12.2、パシフィコ横浜(神奈川県)

Miwa, T., Takasaki, T., Inoue, K., Sakamoto, H. : Chromodomain protein MRG-1 is required for global repression of Pol II-dependent transcription in the primordial germ cells in *C. elegans*. JSDB Special Symposium: Frontier of Developmental Biology Hosted by JSDB, 2016.6.1-2, 東京大学(東京都)

吉田篤史、古川真理、坂本博、井上邦夫：神経細胞におけるRNP顆粒の形成機構の解析、RNA Frontier Meeting 2015、2015.12.8-10、タカミヤヴィレッジホテル樹林(山形県)

山畑俊哉、坂本博、井上邦夫：ゼブラフィッシュ初期胚でのTob1aによる母性mRNA制御機構の解析、RNA Frontier Meeting 2015、2015.12.8-10、タカミヤヴィレッジホテル樹林(山形県)

山畑俊哉、坂本博、井上邦夫：ゼブラフ

イッシュ初期胚における Tob1a の母性 mRNA 制御機構の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場（兵庫県）

吉田篤史、古川真理、坂本博、井上邦夫：神経細胞における RNP 顆粒の形成機構の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場（兵庫県）

高松陽紀、坂本博、井上邦夫：ゼブラフィッシュ卵母細胞の mRNA 輸送機構の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場（兵庫県）

古川 真理、坂本 博、井上 邦夫：網膜神経節細胞特異的 RNA 結合タンパク質 HERMES は NonO、G3BP1 などとともに神経 RNA 顆粒を形成する、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場（兵庫県）

巳波孝至、井上邦夫、坂本博、高崎輝恒：線虫 *C. elegans* の生殖細胞形成に必須なクロマチン制御因子群の始原生殖細胞への限局機構の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場（兵庫県）

巳波孝至、高崎輝恒、井上邦夫、坂本博：線虫 *C. elegans* の始原生殖細胞成熟過程におけるクロマチン制御機構の研究、関西地区線虫勉強会、2015.10.15、アブローズタワーホテル関西学院大学梅田キャンパス（大阪府）

巳波孝至、高崎輝恒、井上邦夫、坂本博：線虫 *C. elegans* の生殖細胞形成に必須なクロマチン制御因子群の始原生殖細胞への限局機構の解析、第 17 回 RNA 学会年会、2015.7.15-17、ホテルライフオーソ札幌（北海道）

山畑俊哉、坂本博、井上邦夫：ゼブラフィッシュ初期胚における Tob1a の母性 mRNA 制御機構の解析、第 37 回日本分子生物学会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜（神奈川県）

巳波孝至、井上邦夫、坂本博、高崎輝恒：線虫 *C. elegans* におけるクロモドメイン蛋白質 MRG-1 の始原生殖細胞への限局メカニズムの解析、第 37 回日本分子生物学会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜（神奈川県）

相澤理丞、井上邦夫、坂本博：線虫 *C. elegans* における RNA の輸送経路を決めるメカニズムの解析、第 37 回日本分子生物学会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜（神奈川県）

相澤理丞、井上邦夫、坂本博：線虫 *C. elegans* における RNA の輸送経路を決めるメカニズムの解析、関西地区線虫勉強会、2014.10.23、アブローズタワーホテル関西学院大学梅田キャンパス（大阪府）

山畑俊哉、坂本博、井上邦夫：ゼブラフィッシュ初期胚における Tob1a の母性 mRNA 制御機構の解析、RNA Frontier Meeting 2014、2014.9.16-18、ラフォーレ白浜（和歌山県）

Miwa, T., Inoue, K., Sakamoto, H., Takasaki, T.: The mechanism for enrichment of a chromodomain protein MRG-1 into the primordial germ cells in *C. elegans*. *C. elegans Development, Cell Biology and Gene Expression Meeting in Association with The 6th Asia-Pacific C. elegans Meeting*, 2014.7.15-19、奈良県新公会堂（奈良県）

巳波孝至、井上邦夫、坂本博、高崎輝恒：線虫 *C. elegans* におけるクロモドメインタンパク MRG-1 の始原生殖細胞への限局メカニズムの解析、第 47 回日本発生生物学会、2014.5.27-30、ウインク愛知（愛知県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 博 (SAKAMOTO, Hiroshi)
神戸大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：00187048

(2) 研究分担者

井上 邦夫 (INOUE, Kunio)
神戸大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：40252415

鈴木 穰 (SUZUKI, Yutaka)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
教授
研究者番号：40323646

中井 謙太 (NAKAI, Kenta)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：60217643

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

福本 祥一 (FUKUMOTO, Shoichi)
相澤 理丞 (AIZAWA, Risuke)
巳波 孝至 (MIWA, Takashi)
高崎 輝恒 (TAKASAKI, Teruaki)