

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06053

研究課題名(和文) ポリA鎖を介したmRNAレベルの遺伝子発現制御と栄養源シグナルによる調節

研究課題名(英文) Regulation of gene expression at mRNA level via poly A tail and its modulation by nutrient source signals

研究代表者

入江 賢児 (IRIE, KENJI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90232628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Ccr4-Not複合体は、ポリA鎖の長さを調節するだけでなく、定常状態における翻訳抑制にも関与する。Ccr4-Not複合体のサブユニットPop2のリン酸化を見出し、Pho85キナーゼによるPop2のS39のリン酸化が、グルコース感知システムの一部であることを示唆する結果を得た。また、crr4変異株、pop2変異株の中では、標的mRNA群のポリA鎖が長くなり、そこにPab1とPbp1が多く結合することにより、標的mRNAからの過剰な翻訳が起こり、増殖遅延・温度感受性増殖・遺伝子発現の異常などが引き起こされることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリA鎖はmRNAの翻訳効率とmRNA分解に重要な役割を果たしているが、生体内におけるポリA鎖の役割については不明な点が多い。ポリA鎖を短縮させるCcr4-Not複合体とPan2-Pan3複合体の活性がどのように調節されているかも明らかではない。本研究では、これらの不明な点にアプローチする。本研究の対象は、出芽酵母であるが、Ccr4、Pop2、Dhh1、Pbp1、Puf5など本研究の対象とする分子は進化上も保存されており、ポリA鎖の長さや翻訳効率・mRNA安定性の関係の進化上普遍的な分子機構の解明につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：The Ccr4-Not complex not only regulates the length of the poly A tail, but is also involved in translational repression in the steady state. We found that the phosphorylation of S39 of Pop2 by Pho85 kinase is part of the glucose sensing system. In addition, among the crr4 and pop2 mutants, the poly A tails of the target mRNAs become longer, and Pab1 and Pbp1 bind to the longer poly A tails, resulting in excessive translation from the target mRNAs. These excessive translation confers to growth retardation, temperature-sensitive proliferation and abnormal gene expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：酵母 Ccr4-Not複合体 12442;リA鎖 遺伝子発現制御 mRNA Pbp1

1. 研究開始当初の背景

真核生物の mRNA には 5'端にキャップ構造、3'端にポリ A 鎖が付加される。5'端のキャップ構造と 3'端のポリ A 鎖は、一般的に mRNA の安定性と翻訳効率に働くと考えられている。5'端のキャップ構造には翻訳開始因子 eIF4E が、3'端のポリ A 鎖にはポリ A 鎖結合タンパク質(PABP1 /Pab1)が結合し、eIF4E と PABP1 が eIF4G を介して相互作用することにより、mRNA がループ構造を形成し、翻訳効率を促進する。mRNA の分解経路においては、まず mRNA のポリ A 鎖が Ccr4-Not 複合体と Pan2-Pan3 複合体によって分解された後、5'-3'および 3'-5'の2つの経路によって分解される。5'-3'の分解経路では、5'端のキャップ構造がデキャンピング酵素 Dcp1-Dcp2 によって除去された後、5'-3'エクソヌクレアーゼ Xrn1 によって mRNA が分解される。3'-5'の分解経路ではポリ A 鎖が短縮された mRNA が 3'側からエクソソームによって分解される。このように、ポリ A 鎖は mRNA の翻訳効率と mRNA 分解に重要な役割を果たしているが、生体内におけるポリ A 鎖の役割については不明な点が多い。例えば、単純に mRNA のポリ A 鎖が長ければ、安定な mRNA で翻訳効率が高い、というわけでもなく、ポリ A 鎖が短いのに効率よく翻訳されている遺伝子も存在する。最近、ポリ A 鎖の長さが翻訳効率に影響するのは胚発生の初期だけであり、それ以降では影響を及ぼさないという結果も報告されており (Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. Nature. 2014 Apr 3;508(7494):66-71.)、ポリ A 鎖の長さと翻訳効率・mRNA 安定性の関係には不明な点が多い。また、ポリ A 鎖を短縮させるデアデニラーゼである Ccr4-Not 複合体と Pan2-Pan3 複合体の活性が栄養源など外部からのシグナルにどのように調節されているかも明らかではない。

2. 研究の目的

研究代表者は、出芽酵母を用いて、Ccr4-Not 複合体、Pab1 結合タンパク質 Pbp1、デキャンピング酵素の活性化因子 Dhh1, Scd6、RNA 結合タンパク質 Khd1, Puf5 の作用機構と生理機能を明らかにし、mRNA 局在・安定性制御と局所的翻訳の解析で成果を挙げてきた。本研究では、これまでの成果を元に、とくに Ccr4 と Pbp1 に焦点をあて、酵母の対数増殖期と定常状態におけるポリ A 鎖の長さと翻訳効率・mRNA 安定性の関係、Ccr4-Not 複合体によるポリ A 鎖の長さと翻訳の調節機構、栄養源からのシグナルによる Ccr4-Not 複合体の活性調節機構について明らかにし、mRNA のポリ A 鎖の長さを介した mRNA レベルでの遺伝子発現制御機構と栄養源シグナルとの関係を解明する。

本研究は、これまでの研究代表者の独自の知見を基盤に本研究を立案している点が独創的であり、出芽酵母の強力な遺伝学的・生化学的・細胞生物学的解析より、少ない予算で、早期にかつ確実に上述した目標に到達することが可能であると考えている。本研究の対象は、出芽酵母であるが、Ccr4 (ヒト Ccr4)、Pop2 (ヒト Dhh1)、Dhh1 (ヒト p54)、Pbp1 (ヒト Ataxin2)、Puf5 (ヒト Puf)など本研究の対象とする分子は進化上も保存されており、ポリ A 鎖の長さと翻訳効率・mRNA 安定性の関係の進化上普遍的な分子機構の解明につながると考えている。

3. 研究の方法

本研究計画では、出芽酵母を用いて、出芽部位における低分子量 G タンパク質 Rho1 による細胞壁合成、シグナル伝達、先端成長を RNA レベルで調節する系を用いて解析する。RNA 結合タンパク質 Khd1, Puf5、Ccr4-Not 複合体、デキャンピング酵素活性化因子 Dhh1 などのターゲット遺伝子が Rho1 の GTPase activating protein をコードする *LRG1* であり、*CCR4*、*DH11* などの遺伝子破壊がこの系に異常を示すことから、種々の因子の遺伝学的相互作用を検討する場合、表現型 (酵母の増殖、細胞壁の合成能、Rho1 からのシグナル伝達経路の活性化) をモニターしやすく、かつ、タンパク質・RNA のイメージング可能だからである。

4. 研究成果

(1) RNA タンパク質 Puf5 の作用機構

PUF ファミリー RNA タンパク質 Puf5 は、酵母の細胞壁合成経路の調節に関与している。Puf5 は、Rho1 small GTPase の GTPase 活性化タンパク質をコードする *LRG1* mRNA の発現を負に調節する。今年度、Puf5 と Ccr4-Not 複合体のサブユニットである Ccr4、Pop2、脱キ

ヤップ活性化因子 Dhh1、他の PUF ファミリー RNA タンパク質との相互作用を解析した。puf5 変異体の増殖低下は、LRG1 欠失により部分的に抑制された。puf5 変異体の増殖低下は ccr4 変異により増強された。Lrg1 タンパク質レベルは、単独変異体よりも ccr4 puf5 二重変異体において上昇していた。LRG1 mRNA のポリ (A) テール長は、ccr4 変異体においてより長かったが、puf5 変異体においては長くなかった。したがって、Puf5 は mRNA 不安定化のために Ccr4-Not デアデニラーゼ複合体を動員するが、Puf5 は Ccr4 とは無関係に LRG1 発現を調節することがわかった。また、puf6 突然変異は ccr4 puf5 二重変異によって引き起こされる増殖不全を抑制した。リボソームサブユニットをコードする RPL43a, RPL43b の喪失もまた、ccr4 puf5 二重変異によって引き起こされる増殖不全を抑制した。今回の結果は、Puf5 がデアデニラーゼ非依存的に LRG1 発現を調節することによって、CWI 経路で機能すること、および Puf6 が Rpl43 との会合を介して Ccr4 および Puf5 を介した細胞増殖の調節に関与することを示唆する。

(2) Ccr4-Not 複合体のサブユニット Pop2 のリン酸化

Ccr4-Not 複合体は、ポリ A 鎖の長さを調節するだけでなく、定常状態における翻訳抑制にも関与するが、この Ccr4-Not 複合体の機能が酵母の栄養状態によってどのように調節されるかについて解析した。Ccr4-Not 複合体のサブユニット Pop2 のリン酸化を見出した。以前の研究で、Pop2 がグルコース制限にตอบสนองして Yak1 キナーゼによって 97 番目のトレオニンがリン酸化されることを示されていた。しかしながら、Pop2 のリン酸化の生理学的な重要性は不明であった。今回、グルコース存在下で、Pop2 の 39 番目のセリン (S39) がリン酸化されることを見出した。S39 の脱リン酸化はグルコース枯渇後急速に起こり、グルコースの添加により回復する。S39 のリン酸化は、Pho 85 キナーゼに依存していた。Pop2 が Rho1 の GAP をコードする LRG1 mRNA を調節することによって細胞壁合成経路に関与することを示していた。しかし、Pop2 の S39 のリン酸化は LRG1 mRNA を調節には関与しなかった。一方、Pop2 の S39 のリン酸化は、HSP12, HSP26 の発現制御に関与していた。これらの結果は、Pho85 キナーゼによる Pop2 の S39 のリン酸化が、グルコース感知システムの一部であることを示唆している。

(3) ccr4 変異株における Pbp1 の働き

Ccr4-Not 複合体は、ポリ A 鎖の長さを調節するだけでなく、定常状態における翻訳抑制にも関与するが、この Ccr4-Not 複合体の機能が酵母の栄養状態によってどのように調節されるかについて解析した。Ccr4-Not 複合体のサブユニット Ccr4 および Pop2 の遺伝子ノックアウトの表現型である増殖遅延・温度感受性増殖・遺伝子発現の異常に、ポリ A 鎖結合タンパク質 (Pab1) の結合タンパク質である Pbp1 が関与することを見出した。ccr4 変異株、pop2 変異株の増殖遅延・遺伝子発現の異常は pbp1 変異により回復した。逆に、これらの表現型は Pbp1 の過剰発現によって増悪した。ccr4 変異株、pop2 変異株の中では、標的 mRNA 群のポリ A 鎖が長くなり、そこに Pab1 と Pbp1 が多く結合することにより、標的 mRNA からの過剰な翻訳が起こり、増殖遅延・温度感受性増殖・遺伝子発現の異常などが引き起こされることが示唆された。

また、翻訳開始因子 eIF4E 結合タンパク質 Eap1 が Ccr4-Not 複合体と増殖制御および遺伝子発現調節において重複した機能を持つこと、Pbp1 が培地の栄養源を非発酵性炭素源にした時の増殖・遺伝子発現制御に重要な役割をもつことを見出した。Eap1 と Pbp1 は、栄養源シグナルによる遺伝子発現調節に機能すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Lien PTK, Viet NTM, Mizuno T, Suda Y, Irie K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Pop2 Phosphorylation at S39 Contributes to the Glucose Repression of Stress Response Genes, HSP12 and HSP26	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0215064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0215064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Viet NTM, Duy DL, Saito K, Irie K, Suda Y, Mizuno T, Irie K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Regulation of LRG1 expression by RNA-binding protein Puf5 in the budding yeast cell wall integrity pathway.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 988-997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mizuno T, Nakamura M, Irie K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Induction of Ptp2 and Cmp2 protein phosphatases is crucial for the adaptive response to ER stress in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31413-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Higuchi Y, Fujii S, Valderrama AL, Irie K, Suda Y, Mizuno T, Irie K.	4. 巻 85
2. 論文標題 The eIF4E-binding protein Eap1 has similar but independent roles in cell growth and gene expression with the cytoplasmic deadenylase Ccr4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 1452-1459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Valderrama AL, Fujii S, Duy DL, Irie K, Mizuno T, Suda Y, Irie K.	4. 巻 26
2. 論文標題 Pbp1 mediates the aberrant expression of genes involved in growth defect of ccr4 and pop2 mutants in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 381-398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tuong Vi DT, Fujii S, Valderrama AL, Ito A, Matsuura E, Nishihata A, Irie K, Suda Y, Mizuno T, Irie K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Pbp1, the yeast ortholog of human Ataxin-2, functions in the cell growth on non-fermentable carbon sources.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0251456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0251456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>筑波大学・医学医療系・分子細胞生物学研究室ホームページ http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/molcellbiol/index.html 筑波大学・医学医療系・分子細胞生物学研究室・facebookページ https://www.facebook.com/IrieLab</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------