

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780091

研究課題名 (和文) miRNA プロセッシング調節機構における RNA ヘリカーゼの作用機序の
解明

研究課題名 (英文) Functional Analysis of RNA helicases in regulation of miRNA processing

研究代表者

藤山 沙理 (Fujiyama Sally)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：50447372

研究成果の概要 (和文)：

本研究では二本鎖 RNA を巻き戻す活性を持つ酵素である RNA ヘリカーゼの作用機序の解明を目的として研究を行う。RNA ヘリカーゼは酵素活性機能ドメインにより、数百種類以上もの推定 RNA ヘリカーゼ候補遺伝子が存在するものの、その機能解析がなされたものは極少数である。そこで本研究ではショウジョウバエの遺伝学とプロテオミクス解析技術を用いた詳細な解析を行うことに、機能未知 RNA ヘリカーゼの生体内機能とその作用機序を明らかにする事を目指す。

研究成果の概要 (英文)：

RNA helicase are enzymes to modulate the structures of double strand RNA and RNA-protein and are classified into families by their functional domains. There are several hundred kinds of putative RNA helicases, however, functions of only a little kind of helicases are elucidated. Thus, in this study I try to clarify the biological functions and reaction mechanisms of the novel RNA helicases by combination of *Drosophila* genetics and proteomic analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
22 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：遺伝子発現・マイクロ RNA・RNA ヘリカーゼ・ショウジョウバエ遺伝学

1. 研究開始当初の背景

RNA ヘリカーゼは二本鎖 RNA を巻き戻す活性をもつ酵素であり、転写、スプライシング、プロセッシング、リボソーム生合成、輸送、翻訳、分解など RNA が含まれるほぼ全ての経路に関与する。細菌からヒトまで広く保存され、数百種類もの推定 RNA ヘリカーゼ候補遺伝子がデータベース上にて同定されているものの、実際の酵素活性や作用機序について調べられたものは極少数である。当研究

室ではこれまで RNA ヘリカーゼ p68, p72 のエストロゲン受容体の転写共役活性化因子としての機能 (Endoh et al., 1999, Mol Cell Biol., Watanabe et al., 2001, EMBO J.) や発生過程に必須な miRNA プロセッシング複合体構成因子としての機能 (Fukuda, Fujiyama et al., 2007, Nat. Cell Biol.) について報告してきた。また、これまでの RNA ヘリカーゼに関する研究は酵母や培養細胞を用いたものであったのに対し、申請者らは世界で初めてノック

アウトマウス (p68, p72 KO マウス) を作出し、特異的な miRNA プロセッシング反応の鍵因子として機能し、高等生物の生存に必須な因子であることを明らかにした (Fukuda, Fujiyama et al, 2007, Nature cell biol.)。しかしながら未だ miRNA の成熟過程の詳細な分子機構や、反応を調節するシグナルなどはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究課題では miRNA のプロセッシング過程における RNA ヘリカーゼの作用機序およびその制御機構に焦点を当てた研究を展開する。

(1) miRNA プロセッシングに關与する新規 RNA ヘリカーゼ分子の網羅的探索

申請者らはこれまで p72 KO マウスでは野生型と比較して、266 種類中 96 種類の miRNA の発現が変動することを見出した。このことから、個々の RNA ヘリカーゼと miRNA 間に基質特異性が存在する可能性が示された。数百種類存在する miRNA の基質特異性の決定には、現在知られている分子種だけでは説明できず、さらなる RNA ヘリカーゼ分子が關与すると推察される。そこで、miRNA プロセッシング調節機構解析の端緒として、miRNA プロセッシングに關わる新規 RNA ヘリカーゼの探索を計画した。

(2) RNA ヘリカーゼ間の遺伝学的相互作用の解析

pri-miRNA のプロセッシング活性を持つ Drosha 複合体には少なくとも 5 種類の RNA ヘリカーゼが含まれる (図 1, Gregory et al., 2004, Nature) が、複合体内における RNA ヘリカーゼの機能的相互作用や役割の違いなどは明らかとなっていない。そこでショウジョウバエを用いて網羅的な遺伝学的相互作用の解析を行い、RNA ヘリカーゼ群の機能的な關連付けを行う。

(3) RNA ヘリカーゼの相互作用分子 (RNA, タンパク質) の同定

申請者はこれまでヒトリボソーム前駆体複合体 (Fujiyama et al., 2002, J Biol Chem)、マウス Drosha 複合体 (Fukuda, Fujiyama et al., 2007, Nature Cell Biol.) など RNA-タンパク質複合体の精製を精力的に行い、これらの複合体に RNA ヘリカーゼが含まれることを報告してきた。しかし RNA ヘリカーゼをベイトとした複合体精製は予想に反してほとんど相互作用因子を取得することが出来ず、文献的な報告も皆無である。また、RNA ヘリカーゼは RNA-タンパク質複合体会合のダイナミクスに關与すると考えられているものの、その具体的な作用機序は分かっていない。本研究課題では、miRNA プロセッシング複合体にお

ける RNA ヘリカーゼの作用機序を明らかにするため、生化学的手法による複合体精製・同定システムをさらに発展させ、未だ報告の無い RNA ヘリカーゼ複合体の精製と構成因子の同定を目指す。申請者らは既に RNA ヘリカーゼを介した miRNA プロセッシング経路の新たな制御シグナルの存在を見出しており (未発表)、複合体解析によりその詳細な制御機構の解明も目指す。

3. 研究の方法

本研究課題では、初年度にショウジョウバエを用いたスクリーニング (1)、RNA ヘリカーゼ間の遺伝学的相互作用の検索 (2)、複合体精製の条件検討 (3)、最終年度に複合体解析 (4-5)、得られた複合体の機能解析 (6) を行い、miRNA プロセッシング経路に關与する新規 RNA ヘリカーゼ群の探索と RNA ヘリカーゼの相互作用解析を軸とした機能解析を目指す。

平成 21 年度

(1) ショウジョウバエ分子遺伝学による新規 RNA ヘリカーゼの探索

新規 miRNA プロセッシング關連 RNA ヘリカーゼの探索は、miRNA プロセッシング複合体 Drosha 複体内で pri-miRNA 切断活性を持つ Drosha 及び Pasha/DGCR8 と、63 種類の DEAD ボックス型 RNA ヘリカーゼ遺伝子との遺伝学的相互作用の検索によって行う。RNA ヘリカーゼ p68, p72 の KO マウスは致死となったことから (Fukuda, Fujiyama et al., 2007, Nature Cell Biol.)、ショウジョウバエでも全身性の過剰発現、および RNAi によるノックダウンは致死となる可能性がある。そこで本研究課題では、各組織特異的な Gal4 ドライバーを用いて組織特異的に過剰発現もしくは RNAi を発現させ、表現型異常の変化を觀察する。

① Drosha 複合体構成因子をベイトとした探索

Drosha 及び Pasha/DGCR8 の RNAi 発現ラインとしては Drosha RNAi の 2 ラインが存在するので、まず始めにこれらと組織特異的 Gal4 ドライバーとの交配により現れる成体の表現型異常を觀察する。具体的には、目、背側、羽への特異的発現を計画している。異常が觀察されたものについては、さらに DEAD ボックス型 RNA ヘリカーゼ遺伝子 63 種類を過剰発現させるための GS 系統や、RNAi 発現ショウジョウバエ、変異ショウジョウバエと交配し、表現型の変化を觀察することにより、遺伝学的相互作用を検索する。

② RNA ヘリカーゼ群をベイトとした探索

1-1 の Drosha RNAi 発現ショウジョウバエにて、表現型異常が觀察されない場合、またより網羅性を高めた探索を行うため、RNA ヘ

リカーゼをベイトとした探索も行う。RNA ヘリカーゼを過剰発現させるための GS 系統、RNAi 発現ショウジョウバエを組織特異的に発現させ、表現型異常を観察する。異常が認められたものについては Droscha RNAi 発現系統もしくは pasha mutant ショウジョウバエと交配させ、表現型の変化を観察し、遺伝学的相互作用を検索する。これまで申請者は Hel25E という RNA ヘリカーゼを背側特異的に過剰発現させると背部形成が乱れることを既に観察済みである。

①②のどちらでも新規因子の探索ができない場合には、Droscha と Pasha をそれぞれ過剰発現させるためのトランスジェニックショウジョウバエを作出し、①②と同様の探索を行う。また、DEAD ボックス型ファミリー以外の RNA ヘリカーゼにまで母集団を広げた探索を行う。

(2) ショウジョウバエ分子遺伝学による RNA ヘリカーゼ間の遺伝学的相互作用の解析

申請者らのマウス個体を用いた p68, p72 の機能解析結果から、高等生物では複数種類の RNA ヘリカーゼが同一経路において機能し、機能的に相補する可能性が示唆された (Fukuda, Fujiyama et al., 2007, Nature Cell Biol.)。そこで、上述の複数種類の RNA ヘリカーゼ変異ショウジョウバエを交配し同時に発現させることにより、RNA ヘリカーゼ間の生体内における遺伝学的相互作用を検討する。

(3) 生化学的アプローチによる RNA ヘリカーゼ複合体精製の試み

1) にて取得した新規 RNA ヘリカーゼを探索士とした複合体精製を試みるため、既に複合体を形成することを確認し遺伝子をクローニング済みの RNA ヘリカーゼ CG1666 をモデル複合体とした複合体精製条件の検討を行う。具体的には RNA-タンパク質間の相互作用を安定化するため架橋剤の使用などを検討する。

平成 22 年度

(4) miRNA プロセシング活性を持つ新規 RNA ヘリカーゼ複合体構成タンパク質の同定

3) にて検討した条件を元に、スクリーニングにて取得した因子の中で、機能未知でかつ種間で広く保存されているものから優先的に複合体精製を行う。取得した複合体の構成タンパク質群は質量分析計 MALDI-TOF/TOF, nanoLC-MS/MS の 2 種類のシステムを用いた網羅的同定に供する。

(5) RNA ヘリカーゼ複合体に含まれる RNA 分子種の同定

(4) にて取得した複合体に含まれる RNA をマイクロアレイ解析に供することにより、RNA ヘリカーゼの基質同定を目指す。これまで p72 KO マウスを用いた miRNA アレイを行った結果では、変化のあった miRNA 種の配列に共通性は見出せず、基質特異性を明確に出来なかった。今回の結果を、前回の p72 KO マウスの結果と合わせて配列解析を行うことにより、RNA ヘリカーゼの基質特異性を明らかにすることができると期待する。

(6) RNA ヘリカーゼ複合体の機能解析

これまで得られた結果を元に、ショウジョウバエおよびマウス個体内での作用機序に焦点を当てた機能解析を行う。ショウジョウバエでは質量分析計にて同定した複合体構成因子について (2) と同様にして、生体内での遺伝学的相互作用を検索する。また (4) にて取得した複合体の活性を検出するため *in vitro* miRNA プロセシングアッセイも行う。

4. 研究成果

(1) pnr-Gal4 を用いたショウジョウバエ遺伝学による新規 RNA ヘリカーゼの機能探索

ショウジョウバエの背側特異的に遺伝子発現を誘導する pnr-Gal4 を用いて遺伝子を過剰発現もしくはノックダウンした際に表現型異常が認められるものは、クロマチン構造調節やシグナル伝達経路において機能する事が既に報告されている。そこで種々の RNA ヘリカーゼの遺伝子のノックダウン系統および RNA ヘリカーゼ遺伝子に UAS 配列が挿入された GS 系統と本システムを用いて、機能未知 RNA ヘリカーゼ群の中から、クロマチン構造調節候補因子、およびシグナル伝達経路に関与する因子のスクリーニングを行った。その結果、Hel25E および CG1666/Helicase (以下 Hlc と略) という二つの遺伝子の misexpression により重篤な背側形成異常が観察された (図 1)。

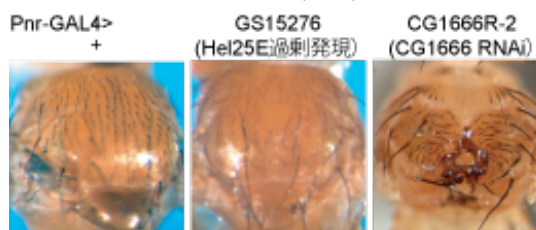


図 1 Hel25E の過剰発現および CG1666 のノックダウンにより背側形成異常が観察された。

Hel25E のヒトホモログ DDX39B/UAP56 (88.9% 相同) はスプライシング装置である spliceosome 複合体での機能 (Shen H. et al., Genes Dev. 2008) や、mRNA export 装置である TREX 複合体における機能 (Cheng H., et al., Cell, 2006) など多数報告がある一方、Hlc

のヒトホモログ DDX56 (54.3%相同) については報告が全く無く機能未知であったことから、本研究では Hlc に焦点をあて研究を行う事とした。

(2) だ腺多糸染色体上での Hlc の局在の検討

染色体上での Hlc の機能の有無、またその特異性の検討するため、Hlc を特異的に認識する抗体を作成し、ショウジョウバエだ腺多糸染色体の免疫染色に供した。

蛍光免疫染色の結果、Hlc はだ腺多糸染色体上での局在が認められ、さらに DAPI との共染色により DAPI 染色の薄い活性化クロマチン構造に選択的に局在する事が分かった (図 2)。さらに Hlc をだ腺特異的にノックダウンすると、多糸染色体のバンドパターンが乱れるなど構造異常が認められたことから、クロマチン構造の調節・維持に関与する可能性が示唆された。

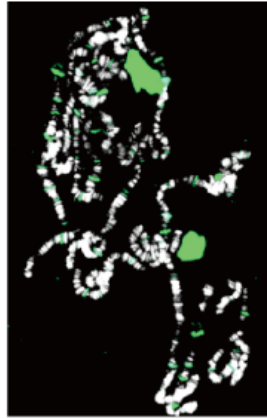


図 2 CG1666 はだ腺多糸染色体上の活性化クロマチン領域に選択的に局在する。緑：CG1666, 白：DAPI

(3) Hlc 相互作用因子取得の試み

さらに Hlc の機能を探るため、FLAG タグ融合 Hlc を安定に発現するショウジョウバエ胚由来 S2 培養細胞を樹立し、Hlc が細胞内で形成する複合体の単離精製および構成因子の同定を行った。Hlc 安定発現細胞株を大量に培養した後、核を単離し、300 mM KCl 存在下で核タンパク質を抽出し、抗 FLAG 抗体 agarose を用いて免疫沈降後、グリセロール密度勾配遠心法による複合体のサイズ分画に供した。得られた複合体は nanoLC-MS/MS 解析に供し、構成因子の同定を行った。その結果、転写因子や核膜構造タンパク質、ATPase など 20 種類以上のタンパク質を同定した。このことから、Hlc が核内においてクロマチン構造や転写の制御に関与する事がさらに強く示唆された。

一方で、Hlc 複合体サイズ解析の結果からの予想よりも同定した構成因子が少なかったことから、細胞内で形成している複合体を単離精製するためには、架橋剤の使用による複合体安定化も必要であると考え、現在継続してその条件を検討している。

(4) Hlc の生体内機能解析

(2) において、blk-Gal4 を用いてショウジョウバエだ腺特異的に Hlc をノックダウンし

た際、外見上は異常が認められず正常に生育するが、3 齢幼虫を解剖し組織を詳細に調べると、だ腺の縮小および fat body と呼ばれる脂肪組織の肥大化が認められた。さらに Lsp2-Gal4 を用いて 3 齢幼虫の fat body 特異的に Hlc をノックダウンした際にも、だ腺の縮小と脂肪組織の肥大化が認められた。

このことは、Hlc はだ腺の増殖・分化を正に制御し、逆に fat body の増殖・分化を抑制的に制御することを示唆している。つまり、ユビキタスに発現する Hlc という RNA ヘリカーゼが、標的組織によって異なる機能を有している可能性が推察され、今後個体の各組織を用いた複合体精製等によって、その作用機序の詳細を明らかにする事は非常に興味深いと考える。

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 11 件)

1) A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. Ishiguro K, Kim J, Fujiyama-Nakamura S, Kato S, Watanabe Y. EMBO Rep., vol. 12, p267-275 (2011) 査読・有

2) Identification of osteoclastic factors in the nuclear envelope of mature, multinucleated osteoclasts. Youn MY, Fujiyama-Nakamura S, Takada I, Imai Y, Kato S. Biosci Biotechnol Biochem., vol. 74, p1956-1959 (2010) 査読・有

3) A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. Sawatsubashi S, Murata T, Lim J, Fujiki R, Ito S, Suzuki E, Tanabe M, Zhao Y, Kimura S, Fujiyama S, Ueda T, Umetsu D, Ito T, Takeyama K, Kato S. Genes Dev., vol. 24, p159-170 (2010) 査読・有

4) Purification and identification of estrogen receptor alpha co-regulators in osteoclasts. Takada I, Tsuji N, Youn MY, Fujiyama S, Okada M, Imai Y, Kondo S, Kitakawa H, Yasuda H, Kato S. Ann NY Acad. Sci., vol. 1192, p201-207 (2010) 査読・有

5) The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes. *Nagy Z, *Riss A, Fujiyama S, Krebs A, Orpinell M, Jansen P, Cohen A, Stunnenberg HG, Kato S, Tora L. (*equally contributed) Cell Mol Life Sci., vol.67, p611-628 (2010) 査読・有

6) CDP/Cut is an Osteoblastic Co-activator of the

Vitamin D receptor (VDR). Ochiai E, Kitagawa K, Takada I, Fujiyama S, Sawatsubashi S, Kim MS, Mezaki Y, Tshushima Y, Takagi K, Azuma Y, Takeyama K, Yamaoka K, Kato S, Kamimura T, J. Bone. Mineral Research, vol. 25, p1157-1166 (2010) 査読・有

7) Double PHD fingers protein DPF2 recognizes acetylated histones and suppresses the function of ERRA through HDAC. Matsuyama R, Takada I, Yokoyama A, Fujiyama-Nakamura S, Tsuji N, Kitagawa H, Fujiki R, Kim MS, Kouzu-Fujita M, Yano T, Kato S, J. Biol. Chem., vol. 285, p18166-18176 (2010) 査読・有

8) Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. Yamagata K, Fujiyama S, Ito S, Ueda T, Murata T, Naitou M, Takeyama K, Minami Y, O'Malley BW, Kato S, Mol. Cell, vol. 36, p340-347 (2009) 査読・有

9) DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression. Kim MS, Kondo T, Takada I, Youn MY, Yamamoto Y, Takahashi S, Matsumoto T, Fujiyama S, Shirode Y, Yamaoka I, Kitagawa H, Takeyama K, Shibuya H, Ohtake F, Kato S, Nature, vol. 461, p1007-1012 (2009) 査読・有

10) BTB Protein, dKHL18/CG3571, serves as an adaptor subunit for a dCul3 ubiquitin ligase complex. Fujiyama-Nakamura S, Ito S, Sawatsubashi S, Yamauchi Y, Suzuki E, Tanabe M, Kimura S, Murata T, Isobe T, Takeyama K, Kato S, Genes Cells, vol. 14, p965 -973 (2009) 査読・有

11) Parvulin (Par14), a peptidyl prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA-processing factor evolved in the metazoan lineage. *Fujiyama-Nakamura S, *Yoshikawa H, Homma K, Hayano T, Tsujimura-Takahashi T, Izumikawa K, Ishikawa H, Miyazawa N, Yanagida M, Miura Y, Shinkawa T, Yamauchi Y, Isobe T, Takahashi N (*equally contributed), Mol. Cell. Proteomics, vol. 8, p1552-1565 (2009) 査読・有

[学会発表] (計3件)

1) 核内巨大分子量複合体を介したクロマチン構造調節機構の解明
藤山 (中村) 沙理
転写研究会 若手シンポジウム, 東京, 2011年2月18日

2) Identification and characterization of a D12 mega size complex

Sally Fujiyama-Nakamura, Saya Ito, Shun Sawatsubashi, Eriko Suzuki, Masahiko Tanabe, Shuhei Kimura, Takashi Ueda, Takuya Murata, Ken-ichi Takeyama, Shigeaki Kato
14th International Congress of Endocrinology, 京都 2010年3月30日

3) 遺伝学的アプローチとプロテオミクスを連携した新規活性化クロマチン構造調節因子 D12 の複合体解析

中村 沙理, 伊藤 紗弥, 沢津橋 俊, 鈴木 絵里子, 田辺 真彦, 木村 周平, 上田 崇, 村田 拓哉, 松川 紘之, 林 珍仙, 武山 健一, 加藤 茂明

日本農芸化学学会 2010 年度大会 東京, 2010年3月28日

[図書] (計4件)

1) 「質量分析計を用いたタンパク質複合体解析」

藤山 (中村) 沙理, 加藤 茂明
新遺伝子工学ハンドブック (羊土社) p243-247 (2010)

2) Repression of pri-miRNA processing through ERalpha

Fujiyama-Nakamura S., Yamagata K., Kato S., Editor ; Grosshans H.,
Regulation of MicroRNAs, (Landes Bioscience), p43-55 (2010)

3) 「プロテオミクス」「遺伝子ノックダウン」

藤山 (中村) 沙理 著, 加藤 茂明 編
現代栄養学を理解するための分子生物学入門 (光生館) p195-201 (2010)

4) LC-MS/MS

藤山 沙理, 加藤 茂明 著, 日本がん分子標的治療学会 編,
がん分子標的治療研究 実践マニュアル (金芳堂) p178-183 (2009)

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/bnsikato/index.htm>
1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤山 沙理 (Fujiyama Sally)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号: 50447372

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：