

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 8日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20112007

研究課題名（和文） 核と細胞質間の RNA 分配制御

研究課題名（英文） Regulation of Nucleo-cytoplasmic Distribution of RNAs

研究代表者 大野 睦人 (Ohno Mutsuhito)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80201979

研究成果の概要（和文）：我々は、hnRNP C の四量体が“分子ものさし”となって RNA の長さを測り、RNA ポリメラーゼ II の転写産物をその長さに応じて mRNA と U snRNA に分類することを明らかにした。また、哺乳類の mRNA 前駆体の核内保持に関わる因子を複数同定した。他に、RNA 核外輸送についてのいくつかの新規知見を得た。

研究成果の概要（英文）：We have shown that the tetramer of hnRNP C measures the length of the RNA polymerase II transcripts, like a molecular ruler, and classifies them into either mRNA or U snRNA according to their lengths. We have also revealed factors involved in the nuclear retention of pre-mRNAs in mammalian cells. Furthermore, we have obtained new insights in the area of RNA export.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	13,300,000	3,990,000	17,290,000
2009年度	18,200,000	3,900,000	22,100,000
2010年度	20,900,000	6,270,000	27,170,000
2011年度	21,000,000	6,300,000	27,300,000
2012年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
総計	90,400,000	25,560,000	115,960,000

研究分野：多様性と非対称性を獲得する RNA プログラム (RNA 制御学)

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：RNA・輸送・核・細胞質・識別

1. 研究開始当初の背景

核外輸送される主要な RNA には、リボソーム RNA (rRNA)、転移 RNA (tRNA)、ウリジンに富む核内低分子 RNA (U snRNA)、伝令 RNA (mRNA) などがあるが、これらの RNA は、それぞれの RNA 種に固有の輸送因子群が核内で結合した後、細胞質へと輸送される。核内でそれぞれの RNA に結合する因子群は、核外輸送を司るだけでなく、核外輸送後のそれぞれの RNA の運命 (局在化、翻訳、安定性など) をも規定することが明らかになってきた。つまり、RNA の種類は核内で既に核外輸送因子群によって識別されていて、その識別がこ

れら様々な RNA の運命全体に影響を与えるのである。

他方、snoRNA や scaRNA など、おそらく核外輸送されずに核内の様々なドメインに輸送される RNA も存在する。さらに、一種の RNA 品質管理機構として、イントロンを含む mRNA 前駆体などの未成熟 RNA は成熟化するまで核の中に留められる。

以上のような RNA の選択的分配制御は遺伝子発現に非常に重要であるが不明な点が多い。つまり、このような RNA の選別は RNA 上のどのような目印を識別して行われ、その識別を行う因子はどのようなものなのかは

分かっていない。

RNA 核外輸送の分子機構の研究は、国外の数ヶ所の大きな研究グループを中心に盛んに行われているが、各研究グループとも特定の種類の RNA (例えば mRNA や rRNA) の核外輸送機構を個別的に研究している。しかし実際の細胞中では、様々な RNA 種が混在した状態で核外輸送が起こっている。この事実に着目すれば、異なる RNA 種が核内でどのように分子識別されているかという機構が重要であることは明らかである。しかし、このような視点から行われた研究は前例がほとんど無く、申請者は極めてユニークな立場にいるといえる。申請者は既に 3 種類の mRNA の ID エlement を同定している。しかし、それらを認識するトランス因子の情報は乏しい。さらに、他にも mRNA の ID エlement が存在する可能性がある。本研究により、mRNA の ID エlement の研究をさらに発展させ、その全貌の理解を目指す。

一方、イントロンが除かれる前の mRNA 前駆体が細胞質に輸送されてしまうと大きな問題が起こる。まず、スプライシングが起こらないため正しいタンパク質が発現できなくなる。また、mRNA 前駆体が翻訳されてしまうとドミナントネガティブ活性のある異常タンパク質が産生されるおそれがある。ところが実際は、mRNA 前駆体はスプライシングが終わるまで核中に留められていて細胞質に現れることはない。この mRNA 前駆体の核内保持の分子機構は、遺伝子発現に重要であるにも関わらず、よく分かっていない。出芽酵母を用いたいくつかの遺伝学的研究があるのみである。脊椎動物では、酵母と比べてその遺伝子が桁違いに多くのイントロンを含んでいることから、酵母よりもさらに周到な機構によって mRNA 前駆体の核内保持を行っていると考えられるが、その機構の研究には全く手がつけられていない。

2. 研究の目的

本研究は、主として以下の 2 つの点に焦点を絞り、RNA 分配制御における識別機構を明らかにすることを目的とする。1) 核外輸送において、mRNA が mRNA として識別される特徴(mRNA の ID エlement)を洗い出す。さらにその特徴を識別する因子群を生化学的に同定する。2) イントロンを含む mRNA 前駆体を成熟するまで核内に保持するシス配列やトランス因子群などを明らかにする。さらに、RNA 成熟と共役してその核内保持活性が解除される機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 核外輸送における mRNA の ID エlement の解析 : mRNA の一部を U snRNA に移植したキメラ RNA を作り、その人工 RNA の核外

輸送が mRNA 型に切り替わるかどうかを調べることで、mRNA の ID エlement を洗い出す。さらにその ID エlement を識別する責任因子群を特異的な結合などを指標にして生化学的に精製する。申請者は既に 3 種類の mRNA の ID エlement を同定しているが、それらを識別する因子の情報は乏しい。また、さらに多くの mRNA ID エlement を同定する。

(2) mRNA 前駆体の核内保機構と成熟化に伴う解除機構 : イントロンやエキソン内の RNA 配列に変異を導入し、mRNA 前駆体が誤って細胞質に漏れ出てしまうことを指標に、mRNA 前駆体の核内保持に関わる RNA 配列を洗い出す。卵母細胞への微量注入系とほ乳類培養細胞へのトランスフェクション系の両方で検定する。スプライシングの基本的な信号配列だけでなく、選択的スプライシングに関与する様々な制御配列も検定する。同定された RNA 配列に結合して核内保持を行う責任因子の候補を生化学的な手法などで同定する。候補因子が実際に mRNA 前駆体の核内保持を行っているかどうかを、抗体による機能阻害実験や因子のノックダウン実験により検定する。また、mRNA 前駆体が成熟化し mRNA となった後は核外輸送される必要があるため、RNA の核内保持活性は RNA の成熟化に伴って解除されなければならない。この解除機構を生化学的手法で解明する。核内保持因子が RNA から解離するか、修飾などにより不活性化されるかなどの可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) RNA の長さを測るメカニズム

上述の通り mRNA を識別する特徴のひとつとして「RNA の長さ」を同定していた。すなわち、強い高次構造を取らない様々な外来配列の挿入により長くなった U snRNA は mRNA の機構で輸送され、逆に、欠失により短鎖化されたイントロンレス mRNA は U snRNA の機構で核外へ輸送されたのである。その際、U snRNA の輸送因子である PHAX (phosphorylated adaptor for RNA export) は短い RNA には結合していたが長い RNA には結合しておらず、長さに応じて RNA に結合する輸送因子が切り替わっていることが分かった。その切り替わりの長さの境目は約 200 ~ 300 塩基長であった。このことは、細胞には RNA の長さを測り輸送経路を決定する機構が存在することを意味しているが、その分子機構については長い間謎であった。

我々は、様々な生化学実験の結果、長い RNA と U snRNA 輸送因子 PHAX の結合を特異的に阻害する活性を、HeLa 細胞の核抽出液に見いだした。この活性の責任因子は、RNA の長さを認識し長い RNA 上から PHAX を取り除いている可能性が考えられた。我々はこの阻

害活性を核抽出液から生化学的に精製し、責任因子として hnRNP C1/C2 のヘテロ 4 量体を同定した。大腸菌で産生したヘテロ 4 量体は、試験管内で 200~300 塩基長以上の長さの RNA と特異的に結合し、その RNA から PHAX を解離させた。さらに HeLa 細胞におけるノックダウン実験などから、細胞内でもこのヘテロ 4 量体が PHAX と mRNA との結合を防いでおり、そうすることで mRNA 上に適正な輸送複合体が形成され mRNA 核外輸送が滞りなく行われるように管理していることを示す結果が得られた。これらの結果に基づいて、次のようなモデルを提唱した (図 1)。RNA ポリメラーゼ II 型による転写開始直後、クロマチンから新生 RNA の 5' 末端が現れ始めると、そこにキャップ構造が付加され、キャップ構造結合因子複合体 CBC が結合する。この時点では、この転写物が mRNA なのか U snRNA なのか輸送機構側にはわからない。転写がさらに進み、新生 RNA の長さが 200~300 塩基長より長くなると、hnRNP C1/C2 のヘテロ 4 量体が安定に結合できるようになり、そのような転写物は mRNA 前駆体であると認定され、U snRNA 輸送因子である PHAX の結合が阻害される。逆に、RNA の長さが 200~300 塩基長より短い場合、hnRNP C1/C2 のヘテロ 4 量体が安定に結合できず、そのような転写物は U snRNA 前駆体であると認定され、PHAX をはじめ U snRNA 輸送因子群が集合できる。

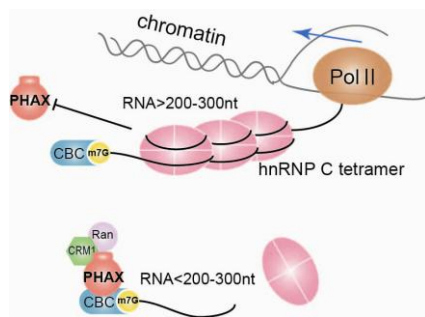


図 1. RNA ポリメラーゼ II 型転写物の長さに応じた分類機構

(2) mRNA 上に輸送因子をロードする分子シャペロン

RNA の長さを検知する因子を探索する過程で偶然、RNA ヘリカーゼ様因子 UAP56 が、mRNA の核外輸送因子であり RNA 結合タンパク質でもある Aly と結合し、Aly の RNA への結合を ATP 依存的に増強することを見いだした。試験管内の系を用いて、この現象をさらに詳細に解析したところ、UAP56 のこの活性には、ATP の結合は必要だがその加水分解は必要なく、UAP56 は RNA の 2 次構造を解きほぐす RNA ヘリカーゼとしてよりも、RNA 上に特定の RNA 結合タンパク質が結合するのを補助する分

子シャペロンとして機能することが強く示唆された。このことは、それ自身が RNA 結合活性を持つ Aly が mRNA に結合するのに UAP56 の補助が必要であるという点で興味深い。

(3) U snRNA 核外輸送複合体形成の監視機構
スプライシングに関与する U snRNP (spliceosomal U snRNP) の成熟過程は複雑である。U snRNA はまず 3' 側に余分な塩基配列を持った前駆体として遺伝子 DNA から転写される。転写された U snRNA 前駆体は多細胞生物ではまず核から細胞質へと輸送される。この核外輸送の際の RNP 形成は前述したように PHAX などの因子群によって行われる。細胞質で核外輸送 RNP は解体し、U snRNA は別のタンパク質因子群と RNP を形成してから核内に再輸送される。この核内再輸送の前に U snRNA 前駆体の 3' 側の余分な配列が除かれる。核内では、U snRNP はまずカハル体 (Cajal bodies) と呼ばれる核内構造体に蓄積する。そこで RNA の修飾や高次の RNP アッセムブリーが起これ、フルに機能を持った spliceosomal U snRNP として成熟すると考えられている。その後、U snRNP は、nuclear speckles と呼ばれる核内斑点部位に局在し、splicing 因子として mRNA 前駆体上にリクルートされるまでそこに貯蔵されると考えられている。以上のように、カハル体は、核内に再輸送された後の U snRNP の成熟化に重要な役割をしている。しかし、カハル体は U snRNA 前駆体の核外輸送以前にも役割を持っていることが示唆されていた。まず、哺乳類などでは U snRNA の転写は、カハル体に隣接して起こることが報告されている。これは活発に転写される U snRNA 遺伝子がカハル体近傍に保持されるからであり、U snRNA 基本転写因子 PTF (proximal sequence element-binding transcription factor) がカハル体に濃縮していることも報告されている。さらに、奇妙なことに U snRNA 核外輸送のメディエーターである PHAX もカハル体に濃縮している。これらのことから、U snRNA 前駆体が核外輸送前に何らかの理由でカハル体に立ち寄る可能性が考えられた。

我々は、この可能性をテストするために、アフリカツメガエル卵母細胞の核に蛍光標識した U snRNA 前駆体を顕微注入し、その局在を観察した。さらに様々な輸送阻害剤を用いて U snRNA 核外輸送複合体のアッセムブリーを様々な段階で阻害することにより、U snRNA 核外輸送複合体のアッセムブリーのステップと RNA の核内での局在場所の関係を調べた。その結果、次のようなシナリオが浮かび上がった。転写された U snRNA 前駆体はまずキャップ構造結合因子複合体 CBC と結合した後カハル体に蓄積し、そこで PHAX に結合することによりカハル体の中でプレ複合体

が形成される。次いでこのプレ複合体がカハル体から核質へと脱出し、核質で核外輸送因子群 CRM1・RanGTP が結合することにより核外輸送複合体が形成される。この核外輸送複合体が核膜孔を通過して細胞質へと輸送される。この一連の実験で明らかになったさらに重要なことは、もし PHAX の RNA への結合が何らかの理由で解消されたり異常であったりすると、その U snRNA はカハル体内に隔離される。換言すれば、カハル体は U snRNP 核外輸送複合体形成の監視を行っているということになる。

(4) U snRNA 核外輸送を制御するリン酸化酵素と脱リン酸化酵素

U snRNA の核外輸送において (少なくとも) 5 種類のタンパク質因子が U snRNA と共に核外輸送複合体を形成し核膜孔を通過することが分かっている。これらの中でも PHAX という RNA 結合タンパク質はリン酸化による活性制御を受け、RNA 核外輸送複合体の形成に中心的な役割を果たす事が分かっている。PHAX は核内でリン酸化され、核外輸送複合体の一部として細胞質に移動し、そこで脱リン酸化を受ける。PHAX のリン酸化は核外輸送複合体の形成に必須であるのに対して、その脱リン酸化は核外輸送複合体の解体を引き起こす。つまり、PHAX はコンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化のサイクルを繰り返し、そのことが、RNA の核外輸送の方向性を規定しているのである。このようなコンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化システムを構築・維持するためには、核に局在化するリン酸化酵素と細胞質に局在化する脱リン酸化酵素の存在が仮定されるが、それらの分子の実体は不明であった。今回、それらの酵素の実体が、それぞれキナーゼ CK2 とホスファターゼ 2A であることを、生化学的手法と RNAi ノックダウン法を用いて明らかにした (図 2)。

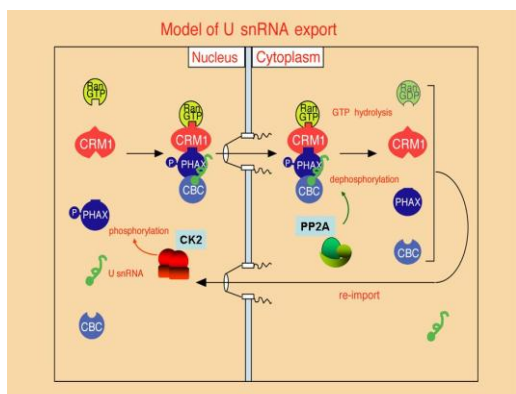


図 2. U snRNA 核外輸送のモデル

(5) 哺乳類細胞の mRNA 前駆体核内保持機構 真核細胞では、核内で転写された mRNA 前

駆体は様々なプロセッシングを受けて成熟し、細胞質側へと輸送される。もし、イントロンを持ったままの未成熟な mRNA 前駆体が核外へ輸送された場合、ドミナントネガティブ活性のある異常タンパク質が産生される可能性がある。そのため、mRNA 前駆体の核外輸送を防ぐ機構が細胞には存在する。スプライシング複合体形成がこの核内保持に関与していると考えられているが、いくつかの関連因子が酵母で同定されているものの、高等真核生物においてはそのような情報はほとんどなかった。

高等真核生物における mRNA 前駆体核内保持因子を探索するため、HeLa 細胞を用いて候補因子のノックダウンや過剰発現と MS2 テザリングアッセイ (タンパク質-RNA 強制結合法) を組み合わせた解析を行った。その結果、スプライシングの初期因子である U1 snRNP と U2AF が mRNA 前駆体の核内保持に重要であることが明らかになった。また、U2AF の特に 65-kD サブユニット U2AF⁶⁵ が核内保持に重要であり、その複数のドメインが核内保持活性を持つことを明らかにした。さらに、スプライシングと核外輸送に関与する DExD-box RNA ヘリカーゼ UAP56 が U2AF⁶⁵ と協調的に mRNA 前駆体の核内保持に働くことも見いだした。

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 23 件)

- ① Kataoka, N., Hagiwara, M. and Ohno, M. hDbr1 is a nucleocytoplasmic shuttling protein with a protein phosphatase-like motif essential for debranching activity. *Sci. Rep.* 査読有. 3-1090. 2013. 1090(オンライン番号). doi: 10.1038/srep01090
- ② Ohno, M. Size matters in RNA export. *RNA Biology.* 査読有. 9(12).2012. 1-5. doi: 10.4161/rna.22569
- ③ Sasaki-Haraguchi N, Shimada MK, Taniguchi I, Ohno M, Mayeda A. Mechanistic insights into human pre-mRNA splicing of human ultra-short introns: potential unusual mechanism identifies G-rich introns. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有. 423(2), 2012. 289-94. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.112

- ④ Fujii, K., Sakata, T., Kitabatake, M. and Ohno, M. 40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay. *The EMBO Journal*. 査読有. 31, 2012. 2579-2589.
doi: 10.1038/emboj.2012.85
- ⑤ McCloskey, A. Taniguchi, I., Shinmyozu, K. and Ohno, M. HnRNP C tetramer measures RNA length to classify RNA polymerase II transcripts for export. *Science* 査読有. 30 March, 2012. 1643-1646.
10.1126/science.1218469
- ⑥ Takemura, R., Takeiwa, T., McCloskey, A., Taniguchi, I. and Ohno, M. Multiple factors in the early splicing complex are involved in the nuclear retention of pre-mRNAs in mammalian cells. *Genes Cells*. 査読有. 16(10). 2011. 1035-49.
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01548.
- ⑦ Kataoka, N., Diem, M. D., Yoshida, M., Hatai, C., Dobashi, I., Dreyfuss, G., Hagiwara, M. and Ohno, M. Specific Y14 domains mediate its nucleocytoplasmic shuttling and association with spliced mRNA. *Sci. Rep.* 査読有. 1, 2011. 92.
DOI: 10.1038/srep00092.
- ⑧ Suzuki, T., Izumi, H. and Ohno, M. Cajal body surveillance of U snRNA export complex assembly. *J. Cell Biol.* 査読有. 190, 2010. 603-612.
doi: 10.1083/jcb.201004109
- ⑨ Fujii, K., Sakata, T., Kitabatake, M. and Ohno, M. A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. *Genes Dev.* 査読有. 23, 2009. 963-74.
doi: 10.1101/gad.1775609
- ⑩ Kataoka, N., Fujita, M. and Ohno, M. Functional association of the microprocessor complex with the spliceosome. *Mol. Cell. Biol.* 査読有. 29, 2009. 3243-54.
doi: 10.1128/MCB.00360-09.
- ⑪ Fukumura, K., Taniguchi, I., Sakamoto, H., Ohno, M. and Inoue, I., U1-independent pre-mRNA splicing contributes to the regulation of alternative Splicing. *Nucleic Acids Res.* 査読有. Vol.37, No.6, 2009, 1907-1914.
doi: 10.1093/nar/gkp050
- ⑫ Yoshimoto, R., Kataoka, N., Okawa, K. and Ohno, M. Isolation and characterization of postsplicing lariat-intron complexes. *Nucleic Acids Res.* 査読有. 37, 2009, 891-902.
doi: 10.1093/nar/gkn1002
- ⑬ Mabuchi, N., Masuyama, K. and Ohno, M. Immunoprecipitation analysis to study RNA-protein interactions in *Xenopus* oocytes. *Methods Mol. Biol.* 査読有. 488, 2008, 257-65.
doi: 10.1007/978-1-60327-475-3_18
- ⑭ Taniguchi, I. and Ohno, M. ATP-dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56. *Mol. Cell. Biol.* 査読有. 28, 2008. 601-8.
PMID:17984224
- ⑮ Kitao, S., Segref, A., Kast, J., Wilm, M., Mattaj, I. W. and Ohno, M. A compartmentalized phosphorylation/dephosphorylation system that regulates U snRNA export from the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* 査読有. 28, 2008. 487-97.
PMID:17967890

[学会発表] (計 54 件)

- ① Ohno, M. : Classical low-throughput analyses on RNA export from the nucleus. 第2回 RNA and Biofunctions-ASIA Study. Jan 10. 2013. Hotel Leoplace Hakata. Japan.
- ② Ohno, M. : Nuclear RNA Binding Protein hnRNP C Measures the Length of RNA Polymerase II Transcripts and Sorts them into two RNA Categories for Nuclear Export. 第19回東アジアシンポジウム. Aug.22-24.2012. Hoam Faculty House. Seoul. South Korea.

- ③ Kitabatake, M : 40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay. The 22nd CDB Meeting. Jun 11-13. 2012. RIKEN Center for Developmental biology. Kobe. Japan.
- ④ Kitabatake, M : 40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay. RNA 2012 Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society. Mar 29-Jun 3. 2012. University of Michigan. Detroit. USA.
- ⑤ McCloskey, A : HnRNP C tetramer measures RNA length to classify RNA polymerase II transcripts for export. The 10th International Student. Mar 5-8. 2012. Shiran Kaikan, Inamori Hall. Kyoto. Japan.
- ⑥ Taniguchi, I : A novel activity of HIV-1 Rev protein to remodel export RNPs in directing virus-specific RNA export. cerevisiae. 2011 RNA meeting. Jun 14-19. 2011. kyoto International Conference Center. kyoto Japan.
- ⑦ Miyata, A : In vivo reversal of a UV-induced lesion on mouse 28S rRNA. 2011 RNA meeting. Jun 14-19. 2011. kyoto International Conference Center. kyoto Japan.
- ⑧ McCloskey, A : HnRNP1/C2 tetramer measures RNA length to ensure the proper nuclear export of messenger RNAs. 2011 RNA meeting. Jun 14-19. 2011. kyoto International Conference Center. kyoto Japan.
- ⑨ Fujii, K : Functional Decay of Nonfunctional 25S rRNA Requires Proteasome Activity. The 9th International Student Seminar. kyoto, Mar 7-9. 2011. Shiran Kaikan, Inamori Hall. kyoto Japan.
- ⑩ McCloskey, A : HnRNP1/C2 tetramer measures RNA length prior to RNA export from the nucleus. 15th annual Meeting of the RNA Society. Jun 22-26, 2010. University of Washington. Seattle USA
- ⑪ Ohno, M : A mechanism to measure RNA length prior to RNA export from the nucleus. 19th CDB Meeting. May 10-12, 2010. RIKEN Center for Developmental biology. kobe Japan.
- ⑫ Kitabatake, M : Selective Degradation of Nonfunctional Ribosomal RNAs Mediated by the Ubiquitin-proteasome System. 19th CDB Meeting. May 10-12, 2010. RIKEN Center for Developmental biology. kobe Japan.
- ⑬ Takeiwa, T : Analysis of cis- and trans-acting Elements for Nuclear Pre-mRNA Retention. The 8th International Student Seminar. Mar 3-6. 2010. kyoto, Shiran Kaikan, Inamori Hall. kyoto Japan.
- ⑭ Fujii, K : Functional Decay of Nonfunctional 25S rRNA Requires Proteasome Activity. The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Sep 13-14. 2009. Shiran Kaikan. Kyoto Japan.
- ⑮ Kitabatake, M : A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. 14th annual Meeting of the RNA Society. May 26-31, 2009. University of Wisconsin campus. USA.
- ⑯ Ohno, M : Regulations of nucleocytoplasmic RNA distribution. NAIST Global COE Symposium on Cell Signaling. Nov 13-14, 2008. Nara Institute of Science and Technology. Nara Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 睦人 (Ohno Mutsuhito)
 京都大学. ウイルス研究所. 教授
 研究者番号 : 80201979

(2) 研究分担者はいない。

(3) 連携研究者はいない。