

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 4月22日現在

機関番号：34419

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20112008

研究課題名（和文） mRNA結合タンパク質による細胞統御のメカニズム

研究課題名（英文） Regulatory mechanism of the cell integrity signaling mediated by mRNA-binding proteins

研究代表者

杉浦 麗子 (SUGIURA REIKO)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：90294206

研究成果の概要（和文）：

細胞形態や細胞周期を制御する<細胞統御>シグナルとmRNA結合タンパク質の関わりを、分裂酵母モデル生物を用いて解析を行なった。mRNA結合タンパク質Nrd1を同定し、Nrd1がMyosin mRNAと結合し、安定化することにより、細胞周期調節に関わることを見出した。また、高等生物のERK相同因子Pmk1が、Nrd1を細胞周期依存的にリン酸化制御することにより、細胞運命の調節に関わることを見出した。さらに、Nrd1がリン酸化依存的にストレス顆粒に移行すること、ストレス顆粒形成はストレス応答のみならず、抗がん剤抵抗性を調節するという生理的意義を見出した。

研究成果の概要（英文）：

We identified the mRNA-binding protein Nrd1 and demonstrated that Nrd1 binds to and regulates mRNA stability of the Myosin mRNA. We also showed that Pmk1 MAPK, a homologue of ERK in fission yeast regulates the RNA-binding activity of Nrd1 in a phosphorylation-dependent manner. Moreover, Nrd1 translocated to the stress granules in a MAPK-mediated phosphorylation-dependent manner, thereby regulates stress tolerance in fission yeast.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,500,000	4,650,000	20,150,000
2009年度	15,300,000	4,590,000	19,890,000
2010年度	15,300,000	4,590,000	19,890,000
2011年度	15,300,000	4,590,000	19,890,000
2012年度	15,300,000	4,590,000	19,890,000
総計	76,700,000	23,010,000	99,710,000

研究分野：多様性と非対称性を獲得する RNA プログラム

科研費の分科・細目：

キーワード：MAPキナーゼシグナル、RNA結合タンパク質、RNA顆粒、mRNA安定性、分子遺伝学、分裂酵母モデル生物、細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

杉浦らは、細胞形態や細胞周期を制御する<細胞統御機構>の鍵となるMAPキナーゼやCキナーゼを中心とした細胞内シグナル伝達機構において、mRNA結合タンパク質が、リン酸化による制御を受けつつシグナル伝達に関わる因子

のmRNA安定性制御を行うフィードバック機構を見いだした (*Nature*, 1999; *Nature*, 2003)。

2. 研究の目的

本研究課題では、mRNA結合タンパク質による細胞統御の分子メカニズム、ならびにmRNA結合タンパク質と細胞統御シグナル伝達とのクロス

トーク機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

具体的には、(1) mRNA 結合タンパク質の標的分子の同定と機能解析と(2)シグナル伝達による mRNA 結合タンパク質の制御機構解析を行う。

(1) mRNA 結合タンパク質の標的分子の同定と機能解析: 遺伝学的アプローチにより、mRNA 結合タンパク質の標的分子を同定する。さらに、同定した標的 mRNA と mRNA 結合タンパク質の結合を生化学的手法と高感度分析手法を用いて定量的に解析を行う。さらに、標的 mRNA のノックアウトを行い、表現型を解析することにより、mRNA 結合タンパク質の細胞統御における生理的役割を明らかにする。

(2) シグナル伝達による mRNA 結合タンパク質の制御機構解析: mRNA 結合タンパク質が、MAPキナーゼなどにより、リン酸化制御を受けるメカニズムを解析する。

4. 研究成果

mRNA 安定性や翻訳制御、mRNA 局在は、様々な細胞機能を制御する。例えば細胞形態は、分化や細胞周期などの細胞増殖のメカニズム、および栄養やストレスといった細胞内外の様々なシグナルに応答した制御をうける。この細胞統御において、RNA 局在や翻訳制御に依存したシグナル伝達系が明らかになってきた。

本研究は細胞形態や細胞極性、細胞質分裂を制御する<細胞統御>シグナルと mRNA 結合タンパク質の関わりを、高等生物に近い細胞内シグナル伝達機構を有する分裂酵母モデル生物を用いて解析を行なった。

(1) 細胞周期を制御する mRNA 結合タンパク質 Nrd1 の発見。

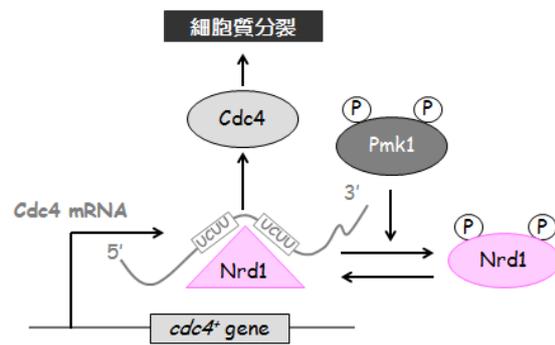
RRM型の mRNA 結合タンパク質を細胞周期調節因子として同定し、Nrd1 の標的 mRNA として、細胞質分裂を制御する Myosin (Cdc4) mRNA を発見した。Nrd1 は Myosin mRNA と結合し、mRNA を安定化することにより、細胞周期調節に関わることを見出した (下図)。

さらに、Nrd1 は Cdc4 mRNA の UCUU リピートに結合することも明らかにした。Nrd1 は高等生物の TIA-1/TIAR と高い相同性を示し、UCUU 配列は、高等生物の TIA-1 の RNA 結合配列としても報告されている。

(2) ERK ホモログ Pmk1 MAPK による Nrd1 のリン酸化制御機構の発見。

高等生物の ERK 相同因子 Pmk1 MAPK が、Nrd1 を細胞周期依存的にリン酸化制御することにより (T40, T126)、Nrd1 の mRNA 結合能力を負に制御することを見出した (下図)。

その結果、Nrd1 は MAPK によるリン酸化依存的に、細胞質分裂と分化という二つの細胞運命の調節に関わることを明らかにした。



(3) リン酸化依存的な Nrd1 のストレス顆粒移行メカニズムの解明

さらに、Nrd1 が MAPK によるリン酸化依存的にストレスに応答し、ストレス顆粒に移行することを明らかにした。興味深いことに、Nrd1 は高等生物のストレス顆粒のマーカである TIA-1/TIAR と同様に、自らがストレス顆粒の起点としてストレス顆粒の形成を誘導すること、起点形成の引き金として、RACK ホモログである Cpc2 と Nrd1 が MAPK によるリン酸化依存的に複合体形成を行うことが重要であることを見出した。

(4) 抗がん剤抵抗性のメカニズムとしてのストレス顆粒の発見。

抗がん剤の一種である Doxorubicin が、特異的にストレス顆粒形成を誘導することを見出した。さらに、ストレス顆粒の構成因子をノックアウトすることで、Doxorubicin に対する感受性が亢進することを見出した。すなわち、ストレス顆粒形成と抗がん剤抵抗性の間に機能的な関連が存在することを明らかにした。

(5) mRNA 結合タンパク質と標的 mRNA 結合の迅速定量的解析手法の開発

アフィニティキャピラリー電気泳動を応用することにより、mRNA 結合タンパク質と核酸の結合を迅速かつ定量的に、放射性同位元素を使用せずに測定できる手法を確立した。

意義・重要性: 上記の研究成果は、高度に保存されたミオシン mRNA の制御が、MAPK と mRNA 結合タンパク質依存的に行われるという、全く新しい細胞周期調節メカニズムを提唱するものである。さらに、MAPK 依存的なストレス顆粒形成はストレス応答のみならず、抗がん剤抵抗性に関わるという生理的意義を見出した。

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 20 件)

- ① Sipl, a Conserved AP-1 Accessory Protein, is Important for Golgi/Endosome Trafficking in Fission Yeast.
Yu Y, Kita A, Udo M, Katayama Y, Shintani M, Park K, Hagihara K, Umeda N, Sugiura R.
PLoS ONE 7(9):e45324.
Doi:10.1371/journal.pone.0045324.
Sep 17, 2012 査読有
- ② Studies on the Roles of Clathrin-Mediated Membrane Trafficking and Zinc Transporter Cis4 in the Transport of GPI-Anchored Proteins in Fission Yeast.
Jaiseng W, Fang Y, Ma Y, Sugiura R, Kuno T.
PLoS ONE 7(7): e41946.
doi:10.1371/journal.pone.0041946.
July 25, 2012 査読有
- ③ The stress granule protein Vgll and poly-A binding protein Pabl are required for doxorubicin resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.
Morita T, Satoh R, Umeda N, Kita A, Sugiura R.
Biochemical and Biophysical Research Communications 2012 Jan 6:417(1):399-403.
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.127.
Dec 8, 2011 査読有
- ④ Role of RNA-Binding Proteins in MAPK Signal Transduction Pathway.
Sugiura R, Satoh R, Ishiwata S, Umeda N, Kita A.
Journal of Signal Transduction 2011 (2011), Article ID 109746, 8 pages
doi:10.1155/2011/109746 査読有
- ⑤ In vitro assay of the interaction between Rnc1 protein and Pmp1 mRNA by affinity capillary electrophoresis with a carboxylated capillary
Taga A, Satoh R, Ishiwata S, Kodama S, Sato A, Suzuki K, Sugiura R.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 53 (5):1332-1337
doi: 10.1016/j.jpba.2010.07.009.
Dec 15, 2010 査読有
- ⑥ MAPKKK-dependent and -independent activation of Styl stress MAPK in fission yeast.
Zhou X, Ma Y, Sugiura R, Kobayashi D, Suzuki M, Deng L, Kuno T.
J. Biol. Chem 285(43):32818-32823.
doi: 10.1074/jbc.M110.135764.
Oct 22, 2010 査読有
- ⑦ The Cell Surface Protein Gene *ecm33* Is a Target of the Two Transcription Factors Atf1 and Mbx1 and Negatively Regulates Pmk1 MAPK Cell Integrity Signaling in Fission Yeast.
Takada H, Nishida A, Domae M, Kita A, Yamano Y, Uchida A, Ishiwata S, Fang Y, Zhou X, Masuko T, Kinoshita M, Kakehi K, Sugiura R.
Mol Biol Cell. 21(4):674-85.
doi:10.1091/mbc.E09-09-0810
Feb 15, 2010 査読有
- ⑧ Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast.
Ma Y, Takeuchi M, Sugiura R, Sio SO, Kuno T.
Genes Cells 14(8):1015-1028.
doi:10.1111/j.1365-2443.2009.01327.x
Aug 2009 査読有
- ⑨ Pleiotropic phenotypes caused by an opal nonsense mutation in an essential gene encoding HMG-CoA reductase in fission yeast
Fang Y, Imagawa K, Zhou X, Kita A, Sugiura R, Jaiseng W, Kuno T.
Genes Cells 14(6):759-771.
doi:
10.1111/j.1365-2443.2009.01308.x.
2009 Jun 査読有
- ⑩ Molecular Genetic Approach to Identify Inhibitors of Signal Transduction Pathways.
Ishiwata S, Kuno T, Takada H, Koike A Sugiura R.
Sourcebook of Models for Biomedical Research, Humana Press Inc.,
2008, 439-443. 査読有
他 10 件
- [学会発表] (計 154 件)
- ① MAPK Signaling and RNA-granules Formation in Fission Yeast.
Reiko Sugiura
The 22nd CDB Meeting RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II June 11 - 13, 2012(Kobe)
- ② 「細胞内シグナル伝達による核酸結合タンパク質の制御機構の解析:アフィニティキャピラリー電気泳動の応用と創薬への展開」
杉浦麗子
第 62 回日本電気泳動学会シンポジウム
2012 年 5 月 11 日 (東京)
- ③ PKC/MAPK 経路と RNAhelicase Ded1 の機能的関連の研究—Pck2 に対する Ded1

の影響の研究
成瀬一、土井章、喜多綾子、比嘉真理、
梅田奈苗、杉浦麗子
第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会
2011 年 10 月 22 日 (神戸)

- ④ A Powerful Genetic Strategy to Screen for Inhibitors of MAP kinase Signalling
Reiko Sugiura
THE SIXTH INTERNATIONAL FISSION YEAST MEETING, pombe2011
25-30 June, 2011, Boston
- ⑤ Molecular genetic approach to identify regulators of MAPK signaling.
Reiko Sugiura
IMC9 THE BIOLOGY OF FUNGI
1-6 August 2010 (Edinburgh, UK)
- ⑥ RNA を介する MAP キナーゼシグナルの新たな制御機構と創薬への展望
杉浦麗子
日本薬学会第 130 年会
2010 年 3 月 28 日～30 日 (岡山)
- ⑦ RNA-BINDING PROTEINS AS REGULATORS OF MAPK SIGNALING.
Reiko Sugiura
The 5th International Fission Yeast Meeting (Pombe 2009)
October 26-31, 2009, Tokyo, Japan
- ⑧ MAP キナーゼシグナル伝達による mRNA 結合タンパク質の制御
杉浦麗子
第 82 回日本生化学会大会
2009 年 10 月 21 日～24 日 (神戸)
- ⑨ Molecular Genetic Analysis of the Calcineurin-mediated Signaling Pathways
Reiko Sugiura
8th International Conference on Protein Phosphatases, Maebashi
12-14 Nov. 2008
- ⑩ RNA 結合タンパク質 Nrd1 による細胞運命スイッチングの制御機構
佐藤亮介、森田貴大、高田宏文、萩原加奈子、土井章、喜多綾子、石渡俊二、杉浦麗子
酵母遺伝学フォーラム第 41 回研究報告会 2008 年 9 月 10 日～12 日 (北海道)
他 144 件

[図書] (計 3 件)

- ① 杉浦麗子 岩波書店 岩波生物学辞典 第 5 版 2013 年 2192 頁
- ② 杉浦麗子、石渡俊二 編者 永井恒司、園部尚 じほう 医薬品の開発と生産 レギュラトリーサイエンスの基礎 2010 年 p173-178
- ③ 杉浦麗子 編著 京都廣川書店 Welcome to

ゲノムワールド ゲノム創薬科学最前線
2009 264 頁

[産業財産権]
○出願状況 (計 15 件)

名称: mRNA 発現を指標にした MAP キナーゼシグナリングのリアルタイム測定法の開発と抗がん剤探索法
発明者: 杉浦麗子、高田宏文、石渡俊二、喜多綾子
権利者: 学校法人近畿大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-162093
出願年月日: 2010 年 7 月 16 日
国内外の別: 国内

名称: キャピラリー電気泳動による核酸-タンパク質の結合解析法
発明者: 杉浦麗子、多賀淳、石渡俊二、佐藤亮介
権利者: 学校法人近畿大学
種類: 特許
番号: 特願 2009-207005
出願年月日: 2009 年 9 月 8 日
国内外の別: 国内
他 13 件
○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.phar.kindai.ac.jp/genome/>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
杉浦 麗子 (SUGIURA REIKO)
近畿大学・薬学部・教授
研究者番号: 90294206
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし