

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18480

研究課題名(和文) 神経特異的RNA結合蛋白質HuDが担う部位特異的翻訳制御機構の解析

研究課題名(英文) The regulation of local translation by neuronal RNA binding protein HuD

研究代表者

深尾 亜喜良 (FUKAO, Akira)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：50733979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞では外部からのシグナルに即座に应答するためにmRNAの転写後レベルでの制御が必須である。そして、シグナルに应答しmRNA翻訳のスイッチとなるのがRNA結合蛋白質である。本研究では、神経特異的RNA結合蛋白質HuDが標的mRNAと共に適切な場まで輸送されている間のmRNA翻訳OFF状態を維持する機構について当研究室独自の生化学的手法を用いて解析を行った。HuDとの相互作用が知られている既知因子(KIF3A、IMP1、SMN)についてin vitro翻訳系を用いてmRNAの翻訳に対する効果を評価した。その結果、SMNがHuDとの結合依存的にHuDの翻訳活性化能を阻害することを明らかにした。

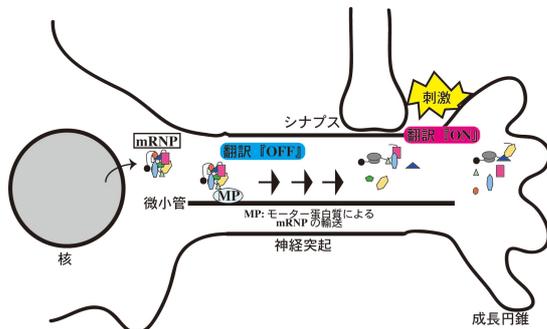
研究成果の概要(英文)：In neurons, the post-transcriptional regulation of gene expression is essential for the immediate response to external signals. Then, RNA binding protein is a switch for mRNA translation in response to signal. In this study, we analyzed molecular mechanism of maintaining the mRNA translation "OFF" state while the neuron specific RNA binding protein HuD is transported to the appropriate "place" together with the target mRNA, using the unique biochemical technique of our laboratory. For the known factors (KIF3A, IMP1, SMN) whose interactions with HuD, the effect on translation of mRNA was evaluated using an in vitro translation system. As a result, it was revealed that SMN inhibits the translational activation ability of HuD depending on the binding ability of SMN with HuD.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳制御 RNA結合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

高等真核生物における遺伝子発現制御は非常に多岐にわたっており、単純な mRNA の転写量および翻訳量調節のみでは説明できない生命現象が数多く存在する。なかでも発生や分化においては、ある特定の遺伝子が特定の時期・場所に適正量供給されることが必須であり、このような遺伝子発現制御に対して mRNA の転写調節だけでは遺伝子発現の『場』まで規定することは非常に困難である。そのため、神経細胞のように特殊な形態をとる細胞においては転写後の mRNA レベルでの制御が必要不可欠である。具体的には異所的な遺伝子発現を防ぐために、転写が起こる『場(核)』から翻訳が起こる『場(シナプス・成長円錐など)』まで mRNA が輸送される間 mRNA の安定性を保持し、厳密に翻訳が抑制さ



れている必要がある(図)。この時、mRNA の翻訳スイッチとして機能している因子が RNA 結合蛋白質である。神経特異的に発現している RNA 結合蛋白質として Hu 蛋白質群がよく知られている。哺乳類において Hu 蛋白質は全組織で発現する HuR と、神経特異的に発現する HuB、HuC、HuD の 4 種類確認されており、神経特異的 Hu 蛋白質は神経前駆細胞で発現を開始し、成熟ニューロンにおいても持続的に発現が見られる。これまでの国内外の研究により、神経特異的 Hu 蛋白質を神経成長因子 (NGF) により神経細胞に分化するラット副腎褐色細胞腫由来細胞 (PC12 細胞) に過剰発現させると、NGF 非存在下にも関わらず神経細胞への分化が誘導されることが判明している。さらに、全組織で発現する HuR には分化誘導能がないことから、神経特異的 Hu 蛋白質は神経分化を正に制御する因子であることが示唆されている。しかしながら、これまでの Hu 蛋白質に関する研究は標的 mRNA の安定性の向上および標的 mRNA の探索が中心であり、どのような遺伝情報発現の素過程に関与することで分化を誘導するのかについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで神経特異的 Hu 蛋白質 HuD に関する研究を進めて来た。そして哺乳類培養細胞を用いて mRNA の cap 依存的翻訳を厳密に評価できる無細胞 *in vitro* 翻訳系の構築に成功し、HuD が mRNA の cap 依存的翻訳を活性化する機能をもつことを明らかにした。また、HuD が mRNA の poly(A) 配列お

よび翻訳開始因子 eIF4A との直接結合を介して翻訳開始複合体と相互作用することが翻訳活性化機能に必須であり、HuD による翻訳活性化機能が神経分化誘導に必須であることを PC12 細胞を用いて証明した (Fukao et al., 2009 *Molecular Cell*)。さらに、HuD とシグナル伝達経路との相関について着目し、神経特異的 Hu 蛋白質による分化誘導には Akt 経路が関わっていることを突き止めた。また、HuD はリン酸化型 Akt とのみ特異的に結合し、この結合が神経分化誘導に必須であることを明らかにした (Fujiwara et al., 2011 *Nucleic Acids Research*)。これらの発表論文から現在、HuD はリン酸化型 Akt を翻訳開始複合体へリクルートすることで標的 mRNA の翻訳を活性化しているという仮説を立てている。

以上のように研究代表者はこれまで RNA 結合蛋白質 HuD が適切な『場』において標的 mRNA の翻訳を『ON』にする側面について明らかにしてきた。しかしながら、前述したように局所的な翻訳制御が必要な場面において RNA 結合蛋白質は翻訳のスイッチとして機能する可能性が示唆されている。そこで本研究では、神経特異的 RNA 結合蛋白質 HuD が標的 mRNA と共に適切な『場』まで輸送されている間の mRNA 翻訳『OFF』状態を維持する機構について解析する。

3. 研究の方法

本研究では HuD との相互作用が明らかになっている既知の因子において HuD の翻訳活性化機能に対する影響を確認することから始める。これまでの国内外の報告により、HuD の翻訳活性化機能に影響を与える可能性のある候補因子として KIF3A、IMP1、SMN を挙げており、各因子について HuD による mRNA の翻訳制御に対する影響について評価する。具体的には、当研究室の無細胞 *in vitro* 翻訳システムに大腸菌大量培養系により精製したりコンビナント蛋白質を加える解析を行う。しかしながら哺乳類を材料とした研究を行う場合、大腸菌では起こらない蛋白質修飾が必要な場合があり、正確な結果が得られない可能性が考えられる。そのため同時に、候補因子を過剰発現させた哺乳類培養細胞抽出液を用いた *in vitro* 翻訳解析も行う。そして、候補因子の中より HuD の翻訳活性化機能を阻害する因子が確認された場合は以下に記す解析を行うことにより、阻害の分子機構を明らかにする。

①候補因子と HuD の相互作用部位を特定し、その変異によって HuD の翻訳活性阻害機能が欠如することを確認する。

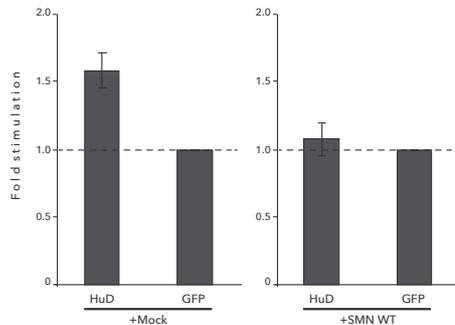
②ショ糖密度勾配遠心を用いることで、翻訳反応のどの段階を阻害しているのかを明らかにする。

③mRNA pull-down により、HuD を含む翻訳開始複合体にどのような変化が生じているかを解析する。

4. 研究成果

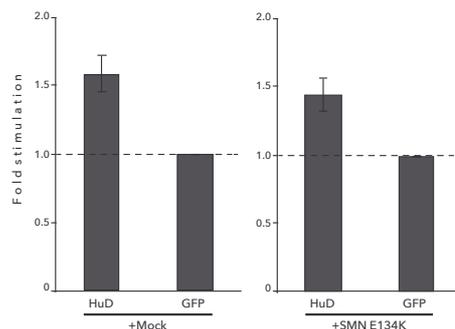
(1) HuD との相互作用が明らかになっている既知の因子 (KIF3A, IMP1, SMN) について、各因子を培養細胞に過剰発現させ、免疫沈降法によって相互作用様式の確認を行った。その結果、これまでの報告通り各因子と HuD との細胞内での相互作用が検出できた。また、KIF3A については RNA 結合能を欠失させた HuD の変異体との相互作用も確認されたため、KIF3A と HuD が直接結合している可能性が示唆された。SMN については、HuD との結合部位として同定されている Tudor ドメインに変異を導入することによって、HuD と相互作用しない SMN 変異体を作成した。

(2) HuD との相互作用が確認された各因子について、過剰発現させた細胞抽出液を調製し、*in vitro* 翻訳システムを用いて HuD の翻訳活性化機能への各因子の影響を解析した。その結果、脊髄性筋萎縮症 (SMA) の原因遺伝子として知られる SMN が HuD の翻訳活性化機能を阻害することが明らかになった (図 1)。



(図 1: SMN による HuD の翻訳活性化阻害)

また、HuD との結合能を欠失させた SMN 変異体 (SMN E134K) は HuD の翻訳活性化機能を阻害しなかった (図 2)。



(図 2: SMN 変異体は HuD の翻訳活性化機能を阻害しない)

これらのことから、SMN は HuD との結合を介して HuD の有する翻訳活性化機能を阻害するという可能性が示唆された。また、主として核局在を示す SMN が HuD との共発現により細胞質へ移行することが明らかとなった。これは、これまで不明であった SMN の細胞質における機能を知る上で非常に重要な結果である。

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 6 件)

① Yamaguchi T., Suzuki T., Sato T., Takahashi A., Watanabe H., Kadowaki A., Natsui M., Inagaki H., Arakawa S., Nakaoka S., Koizumi Y., Seki S., Adachi S., **Fukao A.**, Fujiwara T., Natsume T., Kimura A., Komatsu M., Shimizu S., Ito H., Suzuki Y., Penninger Josef M., Yamamoto T., Imai Y., Kuba K., The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function, *Science Signaling*, 査読有り, Vol. 11, Issue 516, ean3638, 2018 DOI: 10.1126/scisignal.aan3638

② **Akira Fukao** and Toshinobu Fujiwara, The coupled- and uncoupled mechanisms by which trans-acting factors regulate mRNA stability and translation, *The Journal of Biochemistry*, 査読有り, 161(4), pp. 309-314, 2017 DOI: 10.1093/jb/mvw086.

③ Ryosuke Satoh, Yasuhiro Matsumura, Akitomo Tanaka, Makoto Takada, Yuna Ito, Kanako Hagihara, Masahiro Inari, Ayako Kita, **Akira Fukao**, Toshinobu Fujiwara, Shinya Hirai, Tokio Tani and Reiko Sugiura, Spatial regulation of the KH domain RNA-binding protein Rncl mediated by a Crml-independent nuclear export system in *Schizosaccharomyces pombe*, *Molecular Microbiology*, 査読有り, 104(3), pp. 428-448, 2017 DOI: 10.1111/mmi.13636.

④ Mino T, Murakawa Y, **Fukao A**, Vandenberg A, Wessels HH, Ori D, Uehata T, Tartey S, Akira S, Suzuki Y, Vinuesa CG, Ohler U, Standley DM, Landthaler M, Fujiwara T, Takeuchi O, Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms, *Cell*, 査読有り, 161(5), pp. 1058-1073, 2015 DOI: 10.1016/j.cell.2015.04.029.

⑤ **Fukao A**, Aoyama T, Fujiwara T, The molecular mechanism of translational control via the communication between the microRNA pathway and RNA-binding proteins, *RNA biology*, 査読有り, 12(9), pp. 922-926, 2015 DOI: 10.1080/15476286.2015.1073436.

⑥ **深尾亜喜良**, 藤原俊伸、ヒトにおける microRNA がタンパク質合成を制御する機構

の解明、月刊臨床免疫・アレルギー科（科学評論社）、査読無し、第 64 巻第 3 号、pp. 307-312、2015

〔学会発表〕（計 43 件）

① 深尾 亜喜良 他 7 名、*in vitro* 翻訳システムを用いた miRNA による翻訳制御分子機構の解析、第 19 回日本 RNA 学会年会、2017

② 深尾 亜喜良 他 2 名、ARE 結合蛋白質 ZFP36L1 による脱アデニル化非依存的な翻訳抑制機構の解析、ConBio2017(2017 年度生命科学系学会合同年次大会)、2017

③ 深尾 亜喜良 他 3 名、The coupling mechanism between translation and mRNA degradation mediated by RNA-binding protein HuD、第 39 回日本分子生物学会年会、2016

④ Akira Fukao 他 1 名、The coupling mechanism between translation and mRNA degradation mediated by RNA-binding protein HuD、12th International Congress on Protein Phosphatase (ICPP12)、2016

⑤ Akira Fukao 他 2 名、The coupling mechanism between translation and mRNA degradation mediated by RNA-binding protein HuD、Translational Control、2016

⑥ Akira Fukao 他 2 名、The coupling mechanism between translation and mRNA degradation mediated by RNA-binding protein HuD、RNA2016、2016

〔図書〕（計 1 件）

① 深尾 亜喜良、藤原俊伸、学研メディカル秀潤社、細胞工学 第 34 巻第 8 号、2015、pp. 767-771

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深尾 亜喜良 (FUKAO, Akira)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：5 0 7 3 3 9 7 9