

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2004～2008
 課題番号：16084206
 研究課題名（和文）核スペckルの機能と分子構築：mRNA のスプライシングと核外輸送における役割
 研究課題名（英文） Functions and molecular architecture of the nuclear speckles: roles in the pre-mRNA splicing and nuclear mRNA export
 研究代表者
 谷 時雄（TANI TOKIO）
 熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
 研究者番号：80197516

研究成果の概要：

核スペckルは mRNA 前駆体のスプライシングや mRNA 核外輸送など、遺伝子発現と密接な関連をもつ核内構造体である。本研究では、核スペckルの機能と形成機構を明らかにするため、mRNA 核外輸送の新規可視化解析系構築、及び核スペckルの形成阻害化合物のスクリーニングと解析などを進め、新規核内構造体 TIDR の発見、核スペckルの形成と機能に影響を与える 10 種類の低分子化合物の同定など多くの研究成果を得た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	14,900,000	0	14,900,000
2005 年度	12,400,000	0	12,400,000
2006 年度	12,400,000	0	12,400,000
2007 年度	12,400,000	0	12,400,000
2008 年度	12,400,000	0	12,400,000
総計	64,500,000	0	64,500,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：

キーワード：核スペckル，mRNA，選択的スプライシング，低分子化合物，蛍光イメージング，放線菌

1. 研究開始当初の背景

真核生物において、遺伝情報の保存と転写の場である核とタンパク質合成の場である細胞質は、脂質二重膜からなる核膜によって空間的に分離されている。真核生物の遺伝子発現において、核内で遺伝子から転写合成された mRNA 前駆体のスプライシング反応や成熟 mRNA の核から細胞質への輸送過程は、個々に独立した反応ではなく、複雑かつ精密なネットワーク機構によって制御されている。この一連のネットワーク機構において重要な機能を担っている核内構造体が核スペ

ckルである。核スペckルは、多数の転写因子やスプライシング因子などが含まれていること、DNA から転写された mRNA 前駆体が一時的に局在することなどから、遺伝子発現の連携や効率化を行っていると考えられている。しかし、真核生物の遺伝子発現に密接に関わっているにもかかわらず、膜のない核スペckルへ mRNA が集積する機構やその詳細な遺伝子発現における機能については、ほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、mRNA 前駆体スプライシングと mRNA 核外輸送における核スペックルの役割と形成機序を明らかにすることで、核内構造体の遺伝子発現における機能を解明することを目的とする。そのため、(1) mRNA 核外輸送の可視化解析系を確立し、核スペックルの mRNA 核外輸送における機能を明らかにする、(2) 核スペックル形成阻害化合物をスクリーニングし、それらをバイオプローブに用いて、核スペックルの形成機構、及び選択的スプライシングや mRNA 核外輸送における核スペックルの機能を解明することを行う。

3. 研究の方法

(1) mRNA が核から細胞質へと、核膜孔を通過して輸送される様子をリアルタイムで観察できれば、酵母の mRNA 核外輸送変異株を用いた分子遺伝学的手法による解析だけでは得ることの困難な、時間的・空間的な mRNA 核外輸送制御に関する多くの情報が得られることが期待される。そこで、mRNA を蛍光標識することによって生きた細胞内で可視化し、その輸送プロセスを解析する新たな蛍光イメージング系を開発した。開発した新規 mRNA 可視化系を、mRNA 輸送と核スペックルの関連を解明する実験に用いた。

(2) 核スペックルの機能と形成機構を解明するため、様々な生理活性化合物を分泌する放線菌の培養上清サンプルから、核スペックル形成阻害化合物の分離と解析を行った。スクリーニングには、核スペックルに分布するスプライシング因子 SF2 に対する抗体染色と同じく核スペックルに多量に局在する poly(A)⁺ RNA (mRNA と poly A 配列をもつ non-coding RNA が含まれる) に対する oligo dT probe を用いた *in situ* hybridization 法を用いた。

4. 研究成果

(1) 新規 mRNA 核外輸送可視化系の確立と解析

イントロンを一つ含む mRNA 前駆体 (fushitarazu もしくは -グロビン mRNA 前駆体を使用) を *in vitro* で転写合成し、Cy3 で蛍光標識した。その後、FITC 標識デキストラン (分子量 70 kDa) と混合して、HeLa 細胞の核にマイクロインジェクションした。FITC 標識デキストラン (核膜孔を通過できない大きさ) は、Cy3 標識 mRNA がきちんと核へマイクロインジェクションされたことを確認するマーカーとして使用した。

蛍光標識 mRNA 前駆体を核にマイクロインジェクションすると、15 分以内にスプライシング因子が分布する核スペックルに局在し、その後、細胞質へと輸送されることが可視化

された。また、これらのインジェクションした蛍光標識 mRNA 前駆体は、スプライシングされた後にエネルギー依存的反応により細胞質へ輸送されることが示された。蛍光イメージングによって核内での RNA 動態を解析した報告は過去にいくつかあるが、本実験系のように mRNA が細胞質まで輸送される様子を可視化できたのは初めてである。

核にマイクロインジェクションした蛍光標識 mRNA の核外輸送は、翻訳阻害剤シクロイミドやタンパク質核外輸送の阻害剤レプトマイシン B 処理によってほとんど影響を受けなかった。この結果は、新規なタンパク質合成が mRNA 核外輸送に必要でなく、また、蛍光標識 mRNA の核外輸送は CRM1 輸送受容体に依存していないことを示唆する。一方、アクチノマイシン D, DRB, α -アマンチンなどの転写阻害剤で細胞を処理すると、導入した蛍光標識 mRNA の核から細胞質への移行が強く阻害され、核内における遺伝子の転写状態が、転写後の mRNA 輸送に影響を与えることが示された。興味深いことに、転写阻害剤の添加によって核外輸送を阻害した場合、細胞質に移行しなかった蛍光標識 mRNA は、核内の数カ所に顆粒状に集積することが示された。蛍光標識 mRNA が蓄積する部位は、SC35 などのスプライシング因子が存在する核スペックルに隣接した特異的な部位であった。核スペックルに隣接した核内構造体としては、Fox らが同定したパラスペックルが知られているが、パラスペックル因子 PSP1 はそれらの RNA 集積部位と共局在せず、我々が見出した核内構造体は今までに知られていない全く新規な核内構造体であることが判明した。我々はこの新規核内構造体を TIDR (Transcriptional inactivation dependent RNA domain) と命名し、現在更なる機能解析を進めている。

蛍光イメージングによって明らかにされた今回の結果は、mRNA の核から細胞質への輸送プロセスに対して、核内におけるクロマチンの転写状態、即ちクロマチンの高次構造 (アーキテクチャー) の変化が重要な影響を与えることを示しており大変興味深い。

(2) 核スペックル形成阻害化合物の分離と解析

2016 種類の放線菌培養上清サンプルから SF2 抗体染色スクリーニングによって 15 種類、*in situ* hybridization によるスクリーニングによって 24 種類の核スペックル形成阻害候補上清を分離した。

それらの候補上清のうち、核スペックルの肥大化を誘発する 1871-62a と 1870-14a、及び核スペックルの分散化を引き起こす 1885-42a と 1891-1a について、それぞれの培養上清サンプルに含まれる活性化合物の精

製と同定を行った。その結果, 1871-62a, 1870-14a, 1885-42a, 1891-1a に含まれる活性化合物は, それぞれ staurosporine, toyocamycin, cosmomycin C/D, tuberucidine であることが明らかとなった。Staurosporine は protein kinase C 阻害剤として, cosmomycin C/D は DNA に結合して転写を抑制する化合物として知られていることから, 核スペckルの形成に SF2 を含むスプライシング因子群のリン酸化と遺伝子の転写活性が重要な役割を果たしていることが推測された。

また, 興味深いことに, 核スペckルの肥大化を引き起こす staurosporine と toyocamycin は, Clk 遺伝子のエキソスキッピング型選択的スプライシングを抑制し, 核スペckルの分散化を誘発する tuberucidine は, 同じ選択的スプライシングを逆に促進することが示された。toyocamycin と tuberucidine は, 共に類似した構造をもつデアザアデノシンであるが, 核スペckルの肥大化と分散化, エキソスキッピング型選択的スプライシングの抑制と促進という全く正反対の表現型を HeLa 細胞において誘発するので, これら化合物の作用機構に大変興味を持たれる。

本研究で得られた核スペckルの形成阻害化合物は, 核スペckルの機能解析のみならず, 選択的スプライシングの制御機構解明に用いるバイオロジカルプローブとして大変有用である。また, 将来的には, 選択的スプライシングや mRNA 核外輸送の制御など, 今までにない新規な作用機構に基づく抗癌剤や抗ウイルス剤開発のシーズになると考えられる。

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 19 件)

Kazuaki Tokunaga and Tokio Tani, Monitoring of mRNA export, *Current Protocols in Cell Biology*. Chapter 22:Unit 22.13, 1-20 (2008), 査読有り

Akira Inoue, Katsuji Tsugawa, Kazuaki Tokunaga, Kenichi P. Takahashi, Shigehiko Uni, Masatsugu Kimura, Koji Nishio, Naoki Yamamoto, Ken-ichi Honda, Takanori Watanabe, Hideo Yamane and Tokio Tani, S1-1 nuclear domains: characterization and dynamics as a function of transcriptional activity. *Biol. Cell*, 100, 523-535 (2008), 査読有り

Yo Ishihama, Hisashi Tadakuma, Tokio Tani and Takashi Funatsu, The dynamics of pre-mRNAs and poly (A)⁺ RNA at speckles in

living cells revealed by iFRAP studies.

Exp. Cell Res., 314, 748-762 (2008), 査読有り

Taro Mannen, Tomoko Andoh and Tokio Tani, Dss1 associating with the proteasome functions in selective nuclear mRNA export in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365, 664-671 (2007), 査読有り

Chor-Wai Yo, Daisuke Kaida, Shinichi Nsihimura, Akihisa Matsuyama, Yoko Yashiroda, Hiroshi Taoka, Ken Ishigami, Sidenori Watanabe, Hidenori Nakajima, Tokio Tani, Sueharu Horinouchi and Minoru Yoshida, Inhibition of splicing and nuclear retention of pre-mRNA by spliceostatin A in fission yeast.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 364 573-577 (2007), 査読有り

Daisuke Kaida, Hajime Motoyoshi, Etsu Tashiro, Takayuki Nojima, Masatoshi Hagiwara, Ken Ishigami, Hidenori Watanabe, Takeshi Kitahara, Tatsuhiko Yoshida, Hidenori Nakajima, Tokio Tani, Sueharu Horinouchi and Minoru Yoshida, Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nature Chem. Biol.*, 3, 576-583 (2007), 査読有り

Noriko Haraguchi, Tomoko Andoh, David Frendewey and Tokio Tani, Mutations in the SF1-U2AF59-U2AF23 complex cause exon skipping in *Schizosaccharomyces pombe*.

J. Biol. Chem., 282, 2221-2228 (2007), 査読有り

Fumitaka Mizuki, Takeshi. Namiki, Hiroshi Sato, Hiromi Furukawa, Tadao Matsusaka, Yasumi Ohshima, Ryoko Ishibashi,

Tomoko Andoh and Tokio Tani, Participation of XPB/Ptr8p, a component of TFIIH, in nucleocytoplasmic transport of mRNA in fission yeast. *Genes to Cells*, 12, 35-47 (2007), 査読有り

水城史貴, 萬年太郎, 谷時雄, 酵母研究におけるアイソトープの活用, 「RI を使用した実験法」, 細胞工学, 26, 92-97 (2007), 査読無し

Tomoko Andoh, Yukiko Oshiro, Sachiko Hayashi, Hideki Takeo and Tokio Tani, Visual screening for localized RNAs in yeast revealed novel RNAs at the bud-tip. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 999-1004 (2006), 査読有り

Hisashi Tadakuma, Yo Ishihama, Toshiharu Shibuya, Tokio Tani and Takashi Funatsu, Imaging of single mRNA molecules movement within a living cell

nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 344, 772-779 (2006), 査読有り

Kazuaki Tokunaga, Toshiharu Shibuya, Yo Ishihama, Hisashi Tadakuma, Miyuki Ide, Minoru Yoshida, Takashi Funatsu, Yasumi Ohshima and Tokio Tani, Nucleocytoplasmic transport of fluorescent mRNA in living mammalian cells: Nuclear mRNA export is coupled to ongoing gene transcription. *Genes to Cells*, 11, 305-317 (2006), 査読有り

谷時雄, mRNA核外輸送の蛍光イメージングと核内構造, 蛋白質核酸酵素「細胞核の世界」, 51, 2197-2199 (2006), 査読無し
船津高志, 谷時雄, mRNA核内運動の1分子イメージング, *ファルマシア*, 42, 803-806 (2006), 査読無し

谷時雄, 安東知子, RNA 蛍光イメージングで拓く細胞核研究のフロンティア, *Pharma Vision News*, 7, 23-29 (2006), 査読無し

Yo Ishihama, Hisashi Tadakuma, Tokio Tani and Takashi Funatsu, Single molecule imaging of mRNA splicing. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 49, 209-210 (2005), 査読無し

Jun-ichi Yoshida and Tokio Tani, Hsp16p is required for thermotolerance in nuclear mRNA export in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Structure and Function*, 29, 125-138 (2005), 査読有り

Tomoko Andoh, Abul Kalam Azad, Asako Shigematsu, Yasumi Ohshima and Tokio Tani, The fission yeast *ptr1* gene involved in nuclear mRNA export encodes a putative ubiquitin ligase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317, 1138-1143 (2004), 査読有り

Takashi Ideue, Abul Kalam Azad, Jun-ichi Yoshida, Tadao Matsusaka, Mitsuhiro Yanagida, Yasumi Ohshima and Tokio Tani, The nucleolus is involved in mRNA export from the nucleus in fission yeast. *J. Cell Sci.*, 117, 2887-2895 (2004), 査読有り

谷時雄, 安東知子, イーストトラフィック: mRNA 細胞内輸送のしくみと制御, *実験医学*, 22, 2447-2453 (2004), 査読無し

[学会発表](計14件)

Kaya Shigaki, Kazuaki Tokunaga, Takashi Eto, Yutaka Kido, Masayuki Igarashi and Tokio Tani, Screening for natural compounds that affect formation of nuclear speckle. 第60回日本細胞生物学会, 2008年6月29日~7月1日, パシフィコ横浜

豊田修吉, 東祐子, 徳永和明, 松尾陽太, 志柿花矢, 五十嵐雅之, 谷時雄, Poly(A)⁺RNA

の細胞内動態に影響を与える化合物のスクリーニング, 第10回RNAミーティング, 2008年7月23日~25日, 札幌市

poly(A)⁺RNAの核スペckル局在化を阻害する天然化合物のスクリーニング, 松尾陽太, 東祐子, 志柿花矢, 豊田修吉, 徳永和明, 五十嵐雅之, 谷時雄, 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学学会合同大会, 2008年12月9日~12日, 神戸

志柿花矢, 豊田修吉, 江藤俊志, 松尾陽太, 三原由揮, 徳永和明, 五十嵐雅之, 谷時雄, 核スペckルの形成とRNAダイナミクス, 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学学会合同大会, 2008年12月9日~12日, 神戸

江藤俊志, 志柿花矢, 三原由揮, 徳永和明, 五十嵐雅之, 谷時雄, スプライシング因子SF2の核スペckル局在化阻害化合物のスクリーニング, 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学学会合同大会, 2008年12月9日~12日, 神戸

Yo Ishihama, Hisashi Tadakuma, Tokio Tani, Takashi Funatsu, The dynamics of pre-mRNAs at speckles in living cells revealed by iFRAP studies, 第40回日本発生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会(JSDB-JSCB 2007 合同大会), 2007年5月28日~30日, 福岡

徳永和明, 志柿花矢, 城戸裕, 五十嵐雅之, 安東知子, 谷時雄, 核スペckル形成阻害化合物のスクリーニング, 第30回日本分子生物学会, 2007年12月11日~15日, 横浜

谷時雄, 核から細胞質へのmRNA輸送: 転写と輸送のクロストーク, リエゾンラボ研究会, 2006年4月19日, 熊本

谷時雄, 核から細胞質へのmRNA輸送: 分子機構の解明と疾患, 17th フォーラム・イン・ドージン, 2006年11月17日, 熊本

Fumitaka Mizuki, Ryoko Ishibashi, Kiriko Matsushita, Mayako Miyabe, Nobuyoshi Watanabe, Tomoko Andoh and Tokio Tani, NUCLEAR EXPORT OF mRNA IN FISSION YEAST, Functional organization of the nucleus, 2006年1月9日~11日, 淡路夢舞台

井上晃, 西尾康二, 高橋研一, 津川克治, 山元直樹, 八谷和孝, 山根英雄, 木村政継, 徳永和明, 谷時雄, S1-1 nuclear body とその機能, 第28回日本分子生物学会年会, 2005年12月7日~10日, 福岡

徳永和明, 渋谷利治, 井手深雪, 谷時雄, 蛍光イメージングによるmRNA核外輸送機構の解析: mRNAの核から細胞質への輸送と転写のカップリング, 核ダイナミクス研究会, 2004年5月21日~22日, 倉敷

徳永和明, 渋谷利治, 井手深雪, 安東知子, 谷時雄, 転写不活化に伴う新規核内構造体

TIDR への mRNA 蓄積：mRNA の核外輸送と転写反応のカップリング，第 6 回 RNA ミーティング，2004 年 8 月 4 日～6 日，熊本

徳永和明，井手深雪，谷時雄，遺伝子の転写と mRNA 核外輸送の連携：転写不活性化により mRNA は核内ドメイン TIDR に蓄積する，第 27 回日本分子生物学会，2004 年 12 月 8 日～11 日，神戸

〔図書〕(計 3 件)

水城史貴，谷時雄，スプライシングと mRNA 核外輸送，「酵母のすべて」，シュプリンガーフェアラーク東京，130-137 (2007)

谷時雄，スプライシング，生物物理学ハンドブック，朝倉書店，122-125 (2007)

水城史貴，萬年太郎，谷時雄，酵母研究-in vivo バルス標識による RNA の細胞内動態解析法-，細胞工学別冊「RI の逆襲」，秀潤社，121-126 (2007)

〔その他〕

ホームページ等

<http://aster.sci.kumamoto-u.ac.jp/~biohome/staff/tani/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 時雄 (TANI TOKIO)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：80197516

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：