

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18489

研究課題名(和文) U snRNA/snRNPの生合成過程における品質管理機構の探索

研究課題名(英文) Exploration of quality control mechanism during U snRNA / snRNP biogenesis process

研究代表者

石川 英明 (Ishikawa, Hideaki)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80625715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：U1 snRNAの生合成段階で想定される品質管理機構により生じ得るU1-tfsが細胞内の何処で生じ、またそのプロセッシングに関わるタンパクが何であるかを検討した。転写されたRNAを核外に輸送する因子であるPHAXの変異体解析の結果、U1-tfsは転写から核外輸送されるまでの間に生じている可能性が示唆された。また、U1-tfs化するのに必要な3'-5'エキソリボヌクレアーゼの検討の結果、通常のU1 snRNAのトリミングに関わるTOE1がプロセスできなかったU1 snRNA分子種をERI1がプロセスすることによりU1-tfsが生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：U1-tfs, derivatives of U1 snRNA, are generated presumably by quality control mechanisms in the process of U1 snRNA biogenesis and eliminated through P-body dependent RNA degradation. However, the detailed molecular mechanisms involved in the formation of U1-tfs had not been clarified. To elucidate the mechanisms underlying U1-tfs formation, we first examined the cellular compartments where U1-tfs are generated by using the nuclear export defect mutants of PHAX, which is required for the nuclear export of U snRNAs, and revealed that U1-tfs are formed already in the process between transcription and nuclear export in the nucleus. We therefore examined the involvement of nuclear-localized 3'-5' exoribonucleases in the formation of U1-tfs and found that exoribonuclease ERI1 might play a role in the U1-tfs formation by targeting U1 snRNA species which are failed to be processed by TOE1, the responsible enzymes for normal U snRNAs 3' end trimming.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：RNA リボヌクレオプロテオミクス 分子間相互作用 RNA品質管理機構 転写後修飾

1. 研究開始当初の背景

SMN (survival of motor neuron 1 protein) 遺伝子の変異は子供で最も頻度の高い遺伝病の一つである脊髄性筋萎縮症 (SMA) を引き起こす。この遺伝子産物 SMN はスプライシングに関わる U snRNA-タンパク質複合体 (U snRNPs) の生合成に必須なタンパク質で、SMA ではこの U snRNPs の生合成に異常があると考えられている。SMN が関わる U snRNPs の生合成過程の全容はほぼ解明されているが、その生合成過程における品質管理機構は全く不明だったと言っても過言ではない。

研究代表者は、このような状況の中、RNA タンパク質複合体 (RNP 複合体) 構成成分の RNA、タンパク質いずれも質量分析プラットフォームで網羅的に解析 (リボヌクレオプロテオミクス解析) する技術開発に参加し SMN が結合する U snRNPs の生合成中間体を各種単離した。それらを開発された質量分析プラットフォームを用いて解析し、SMN に結合している U1 snRNP 中間体の中に通常の U1 snRNA とは異なる短い U1 snRNA (以下 U1-tfs: truncated forms of U1) が存在することを発見した。U1-tfs は通常の U1 とは異なり、その最初に転写されるアデニン塩基に塩基メチル化を受けており、更にキャップ構造が前駆体型であるモノメチルグアノシンのままであり、通常の U1 が 164 塩基長であるのに対しそれより短い 120 塩基長である。更に、研究代表者は、U1-tfs が通常の生合成経路から外れて細胞質において RNA 分解の場である P-body で分解されている証拠も得、初期 U1 snRNA/snRNP 生合成段階における品質管理機構の存在を提案した。研究代表者が発見した U1-tfs は細胞内における U1 snRNP 複合体の品質管理機構により生じる中間代謝物であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は上記背景に示した新規 U1 snRNA 代謝物である U1-tfs の発見に基づき、U1-tfs 形成に関わる細胞内代謝機構、それに関係する RNP の品質管理機構を明らかにすることを目的とした。

U1-tfs の形成にはその分子的特徴から考えて少なくとも 2 種類以上の酵素が関わっていると考えられる。U1-tfs は通常の U1 より 40 塩基ほど短いことが特徴であり、3' RACE による末端配列の解析から均一な末端ではなくヘテロな配列を有することが分かっている。このことは U1-tfs の末端形成に 3' -5' エキソリボヌクレアーゼが関わっている可能性を示唆している。また、キャップ構造近傍の最初に転写されるアデニン塩基はメチル化されているので、その反応を担う RNA/アデノシンメチルトランスフェラーゼが存在するはずである。

本研究では、U1-tfs を生じる品質管理機構が存在するプロセス・細胞内画分の検討および U1-tfs 形成に関わる 2 種類の酵素のうち、

重点的に 3' -5' エキソリボヌクレアーゼについての検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 初期 U1 snRNA/snRNP 生合成中間体のリボヌクレオプロテオミクス解析

初期 U snRNA/snRNP 生合成過程のリボヌクレオプロテオミクス解析 (相互作用タンパク質および U snRNA の構造解析) を再検討するために、転写段階・転写後プロセシング (Integrator 複合体: INTS11)、キャップ形成 (RNGTT、RNMT、CMTR1、CMTR2)、核外輸送 (CBP20/CBP80 複合体、PHAX)、細胞質プロセシング (Gemin5) の各段階に関わる括弧内に示した各プロセスに特異的に関わる因子をクローニング、HA-TEV-FLAG (HEF) タグ融合タンパクとして発現可能なベクターを構築した後、Flp-In T-REx 293 細胞にベクターをインテグレートし、各タンパクをドキシサイクリンで誘導発現可能な細胞を作製した。

RNP 精製は抗 FLAG 抗体固定化ビーズを用いた Pull-Down 法で行い、RNP 複合体中のタンパク質成分を Western Blot 法 (以下 WB)、RNA 成分を Northern Blot 法 (以下 NB) で主に検出、必要に応じてタンパク、RNA それぞれの質量分析解析を行った。RNP 精製は適宜、細胞分画法と組み合わせて行い細胞質、核質に存在する複合体を区別して精製した。

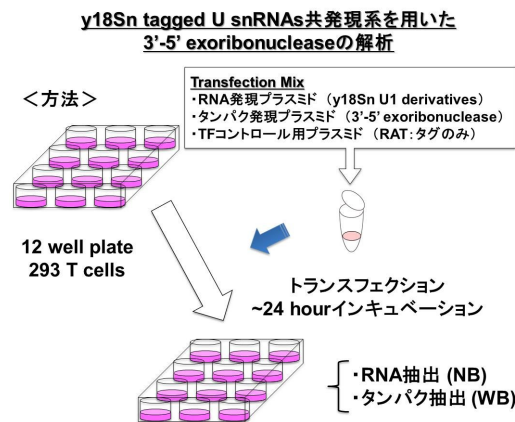
(2) Data Base (DB) を利用した酵素候補の網羅的な探索

UniProt DB を利用し酵素活性の特異性をもとにヒトにおいて発現が確認されている 24 種類の 3' -5' エキソリボヌクレアーゼをリストアップした。当初の予定では候補遺伝子全てを各々ノックダウンし、U1-tfs の量を NB にて検証する予定でいたが低分子干渉 RNA (以下 siRNA) を用いたノックダウン実験におけるオフターゲット効果が懸念されたため、リストアップした遺伝子をクローニング、局在観察、野生型と変異型酵素発現が U1-tfs 量に与える影響の比較を通して一次スクリーニングを行った後、ノックダウン実験を行う方針へと変更した。

リストアップした遺伝子のうち最終的に 15 種類の遺伝子をクローニングし、変異体に関して文献情報があるものについてはそれに従い、情報がないものについては同系タンパクに対する相同性検索などを用いて酵素活性変異体を作製した。

スクリーニングの手法としては y18Sn-U1-SL4-1 と 3' -5' エキソリボヌクレアーゼの共発現アッセイを用いた。y18Sn-U1-SL4-1 は以前の報告 (Nucleic Acids Res. 2014 doi: 10.1093/nar/gkt1271) において使用された U1 変異体であり、Sm サイトを含む配列が残っている場合には、そのまま成熟過程を経て安定して存在するが、Sm サイトを含む配列が削られてしまった場合には U1-tfs 化するという特徴を持つ変異体である。共発現ア

ッセイは 293T 細胞を用いた一過的な発現系を用いた (下図参照)。



局在観察は、全ての 3' -5' エキソリボヌクレアーゼを HEF タグ融合タンパクとして発現可能なベクターとして構築しているため、293T 細胞で一過的に発現させ FLAG 抗体を用いた免疫染色法を用いて行った。

一次スクリーニングにより得られた候補遺伝子のノックダウンによる影響の検討は、293T 細胞に対し、RNAiMAX 試薬を用いて Stealth RNAi™ siRNA (Invitrogen) もしくは Silencer® Select siRNA (Ambion) をトランスフェクションすることにより行い、48 もしくは 72 時間後に回収した細胞から RNA を抽出、NB により U1-tfs への影響を評価する事で行った。

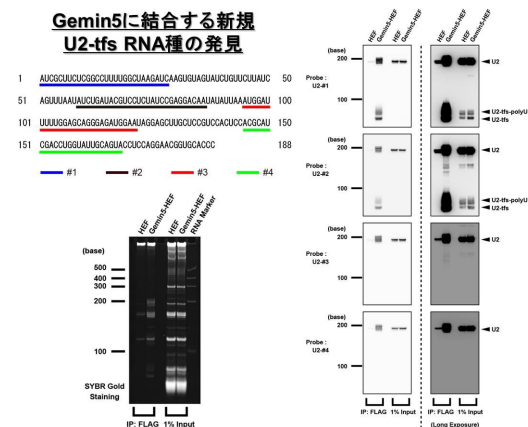
4. 研究成果

(1) 初期 U1 snRNA/snRNP 生合成中間体のリボヌクレオプロテオミクス解析

U2-tfs RNA 種の発見

Gemin5 をベイトとした RNP 精製により得られた複合体を再解析する中で U2 snRNA に関しても U1-tfs と同様に Sm サイトを欠損し、また高感度質量分析解析の結果、最初に転写されるアデニン塩基がメチル化されキャップが前駆体型であるモノメチルグアノシンのままでいる U2 分子種 (U2-tfs) が存在していることが分かった (雑誌論文)。

Gemin5 に結合する新規 U2-tfs RNA 種の発見



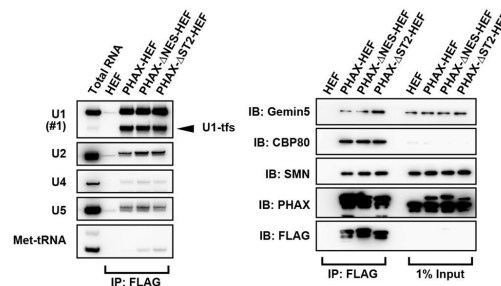
U1-tfs と U2-tfs は構造上の類似性から同じ

代謝経路を經由している可能性が高いと考え、以降、U2-tfs についても酵素探索における指標に用いることとした。

PHAX 核外輸送変異体の検討

PHAX は転写された U snRNA を核から細胞質へと輸送するアダプタータンパクであるが、これまでの解析においては核と細胞質を区別した解析を行っていなかった。PHAX に関しては核外輸送できない変異体の報告 (Mol Cell Biol. 2008 doi: 10.1128/MCB.01189-07) があることから、これに従い変異体を作製し、核と細胞質を区別した複合体精製を行い、U1-tfs の結合を検出した (下図参照)。

PHAX の変異体結合 RNA およびタンパク質

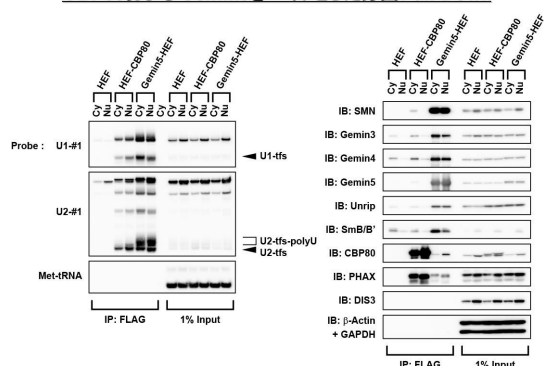


結果、核外輸送シグナルを欠失した PHAX 変異体においても U1-tfs の結合が確認され、このことより転写されてから核外輸送の間に既に U1-tfs が形成されている可能性が示唆された。

細胞分画法を組み合わせた CBP80、Gemin5 の Pull-Down 検討

CBP80/CBP20 複合体および Gemin5 は共に生合成段階の U snRNA のモノメチルグアノシンキャップ構造に結合することが知られているが、核および細胞質の両画分に存在している。これらについては PHAX のように変異体を用いた複合体の区別ができないため、それぞれの画分に存在している複合体を区別して精製するため細胞分画法を組み合わせた Pull-Down 解析を行った (下図参照)。

CBP80 および Gemin5 をベイトとした分画 Pull-Down



細胞分画の確認は Pull-Down に用いた画分

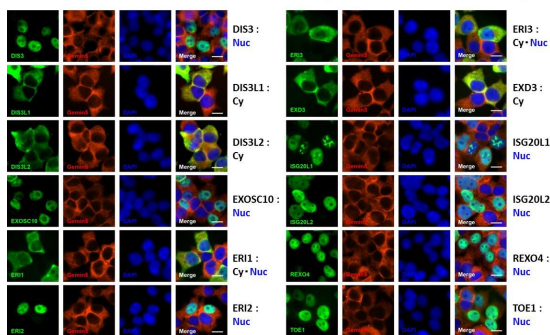
の Input において SmB/B' や DIS3 タンパクが偏在していることにより確認できる。CBP80、Gemin5 共に両画分において U1-tfs、U2-tfs と結合していることから、PHAX の変異体解析の結果と併せて、U1-tfs は核外輸送前には存在しており、その形成に関わる 3' -5' エキソリボヌクレアーゼは少なくとも核内に存在し得る可能性が示唆された。

(2)Data Base(DB)を利用した酵素候補の網羅的な探索

3' -5' エキソリボヌクレアーゼの一過的発現における局在観察。

UniProt DB を元に 24 種類の 3' -5' エキソリボヌクレアーゼをリストアップし、15 種類をクローニング、HEF (FLAG エピトープを含む) タグ融合タンパク発現ベクターを構築し FLAG 抗体による免疫染色、局在観察を行った。内在性 Gemin5 の免疫染色は Gemin5 が主に細胞質に存在しているため細胞質を表す対比染色として用いた。(一部下図参照)。

3'-5' exoribonucleaseの局在観察 (FLAGタグ融合タンパク)

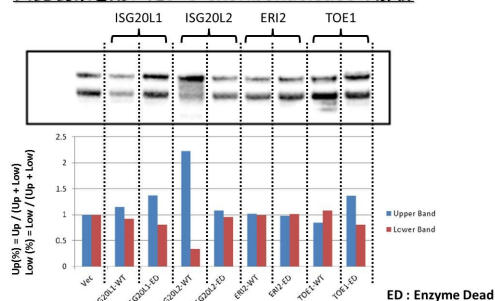


局在観察の結果 10 種類の 3' -5' エキソリボヌクレアーゼが核内局在“可能”であることを示し、前述の結果と併せて U1-tfs 形成に関わるヌクレアーゼの候補とした。

y18Sn-U1- SL4-1/候補 3' -5' エキソリボヌクレアーゼの共発現アッセイによるスクリーニング

局在観察の結果を受けて候補として挙げられた 10 種類の候補を共発現アッセイにより検討した(一部について下図参照)。

共発現系を用いた3'-5' exoribonucleaseの解析



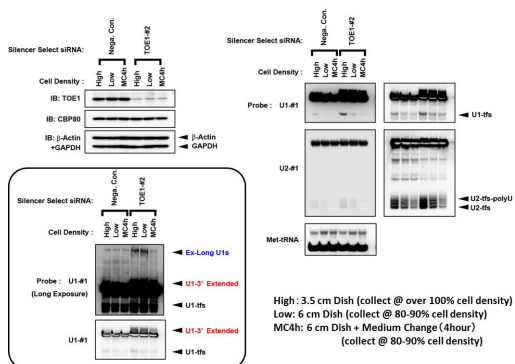
このアッセイにおいて U1-tfs を形成する酵素の発現は y18Sn-U1- SL4-1 により生じ

る 2 つのバンドの比率を変化させ WT の酵素を発現させた場合、U1-tfs である下のバンドがコントロール (Vec: タンパク発現用ベクターが empty vector) に比べて増加し、酵素活性変異体の発現は Sm サイトを残して成熟する上のバンドを増加させるという結果となるはずであり、この条件に見合う 3' -5' エキソリボヌクレアーゼとして TOE1 を U1-tfs 形成酵素の第一候補とし、ノックダウン実験に供することとした。

TOE1 のノックダウンが U1-tfs の存在量に及ぼす影響の検討。

siRNA を用いて TOE1 をノックダウンした時の U1-tfs の存在量を検討した。TOE1 が U1-tfs の形成に関わる酵素であるならば、TOE1 のノックダウンにより U1-tfs 量は減少するはずである。この検討の際、別の予備実験において細胞密度が高いほど U1-tfs の量が増加するということが分かっていたため細胞密度の影響も同時に検証した。更に細胞密度が U1-tfs の存在量が変化する理由を培地中の利用可能な成長因子の量が関係している可能性を考え、培地交換を行ったものについても併せて比較した(下図参照)。

TOE1ノックダウンおよび細胞密度・培地交換がU1-tfs、U2-tfsに及ぼす影響



結果、細胞密度・培地交換の有無に関わらず TOE1 のノックダウンは U1-tfs、U2-tfs の存在量の増加を示した。このことは TOE1 が U1-tfs の形成に関わる直接的な酵素ではないことを示している。本研究を進めている中、TOE1 タンパクは橋小脳形成不全の原因遺伝子として U snRNA/RNP の生合成そのものに関わっていることが報告され (Nat Genet. 2017 doi: 10.1038/ng.3762.) 上記結果と併せると TOE1 が間接的に U1-tfs の形成に関わっている可能性が考えられた。つまり、正常な生合成段階において TOE1 が本来基質としている前駆体 U1 snRNA 種が、何らかの異常により TOE1 によるプロセスができなくなり、別の 3' -5' エキソリボヌクレアーゼにターゲットされることにより U1-tfs が形成されるという可能性である。事実、TOE1 のノックダウンにより付加配列を持った前駆体 U1 snRNA が生じることをノザンプロットングによ

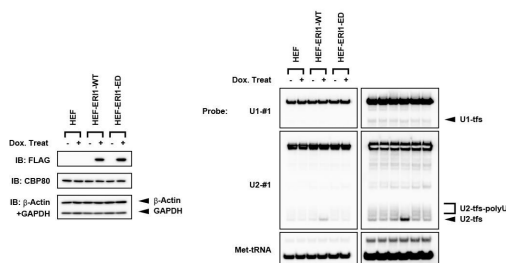
り確認している。これらの RNA については通常の U1 サイズ(164 base)より十数 base 長いものを “U1-3' Extended”、それより長いものを “Ex-Long U1s” と命名した。

ERI1 タンパクが U1-tfs、U2-tfs に及ぼす影響の検討

クローニングした 3' -5' エキソリボヌクレアーゼは HEF タグ融合タンパクとして発現可能な状態であったため、FLAG タグを用いた Pull-Down 解析も同時に行っていた。この実験において ERI1 を発現させた細胞の抽出液中に含まれる U2-tfs の量は常に多いことに気付いた(データ省略)。

このことから、ERI1 は U2-tfs の形成または安定性に関して何らかの影響を与えていると予測し、U1-tfs および U2-tfs 形成酵素の候補として検討をすることとした。検討は ERI1 の野生型と変異体酵素をドキシサイクリンで誘導発現させ、U1-tfs、U2-tfs への影響を NB で検出する事で行った(下図参照)。

ERI1の誘導発現がU1-tfs、U2-tfsに及ぼす影響の検討

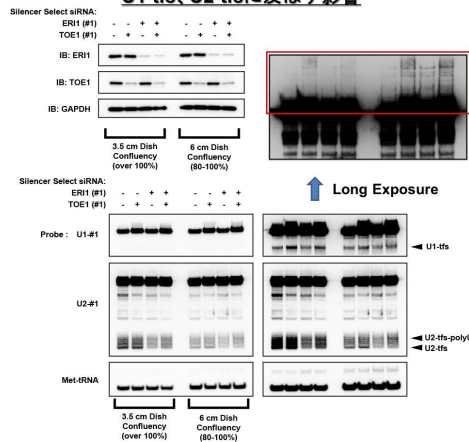


結果 ERI1 の発現は明らかに U2-tfs の量を増加させた。それに対して U1-tfs への明らかな影響は観察されなかった。

ERI1 のノックダウンおよび TOE1 と組み合わせたダブルノックダウンが U1-tfs、U2-tfs に及ぼす影響の検討

ERI1 は少なくとも U2-tfs に影響するとの上記結果を受けて ERI1 のノックダウンおよび TOE1 との関係性をダブルノックダウンにより検証した(下図参照)。

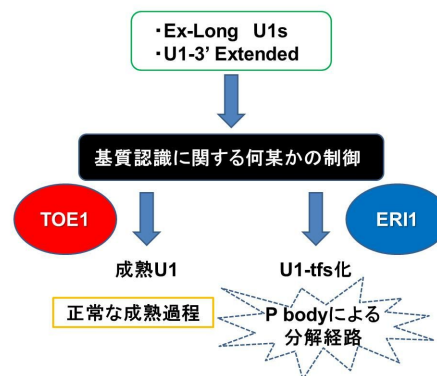
TOE1、ERI1ダブルノックダウンが U1-tfs、U2-tfsに及ぼす影響



結果、TOE1 のノックダウンにより増加する U1-tfs および U2-tfs は ERI1 のノックダウンにより減少すると結果が得られた。このことは ERI1 が U1-tfs、U2-tfs の形成酵素である可能性を示していると考えられる。また ERI1 単独のノックダウンにより Ex-Long U1s とは多少パターンが異なるが伸長した U1 RNA 種が検出された。現段階では仮説でしかないが、この伸長した U1 RNA 種が U1-tfs の前駆体である可能性が考えられる。

上記結果から、U snRNA の生合成段階における品質管理機構は、TOE1、ERI1 を含む複数の 3' -5' エキソリボヌクレアーゼによる基質の競合を元に形成されるネットワークであるとの仮説を立てた(下図参照)。

(仮説) TOE1およびERI1の基質競合によるU snRNA合成量の調節



本仮説を検証するには更なる解析を要する。

ERI1 タンパクが直接 U1-tfs 形成に関わる酵素である可能性については検討の余地を残すところであるが、少なくとも ERI1 タンパクが U snRNA/RNP の生合成に関わることは明らかであると考えられる。

本研究の成果は、U1-tfs の形成に着目することによって、これまでに U snRNA の代謝に関与する事が知られていなかった ERI1 タンパクが生合成段階における U snRNA/RNP 代謝経路に関与することを明らかにしたことにより、細胞内 RNA の代謝に関する基礎生物学的な問題に対して新たな知見を与えるものと考えられる。

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 3 件)

Ishikawa H, Nobe Y, Izumikawa K, Taoka M, Yamauchi Y, Nakayama H, Simpson RJ, Isobe T, Takahash N. (2018) Truncated forms of U2 snRNA (U2-tfs) are shunted toward a novel uridylylation pathway that differs from the degradation pathway for U1-tfs. RNA Biol., 15, 261-268. doi: 10.1080/15476286.2017.1408766. 査読有

Izumikawa K, Nobe Y, Yoshikawa H, Ishikawa H, Miura Y, Nakayama H, Nonaka T, Hasegawa M, Egawa N, Inoue H, Nishikawa K, Yamano K, Simpson RJ, Taoka M, Yamauchi Y, Isobe T, Takahashi N. (2017) TDP-43 stabilises the processing intermediates of mitochondrial transcripts. *Sci Rep.*, 7, 7709, doi: 10.1038/s41598-017-06953-y. 査読有

Ishikawa H, Yoshikawa H, Izumikawa K, Miura Y, Taoka M, Nobe Y, Yamauchi Y, Nakayama H, Simpson RJ, Isobe T, Takahashi N. (2017) Poly(A)-specific ribonuclease regulates the processing of small-subunit rRNAs in human cells. *Nucleic Acids Res.*, 45, 3437-3447, doi: 10.1093/nar/gkw1047. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

石川 英明、泉川 桂一、延 優子、磯辺 俊明、高橋 信弘、U snRNP 生合成過程における品質管理機構、第 19 回日本 RNA 学会年会、2017 年 7 月 19 日、富山国際会議場(富山県富山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 英明 (ISHIKAWA, Hideaki)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・特任助教

研究者番号: 80625715