

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15092

研究課題名(和文) RNA分解酵素Xrn1によるRNA認識機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of RNA recognition mechanism of Xrn1

研究代表者

渡邊 和則 (Watanabe, Kazunori)

岡山大学・ヘルスシステム統合科学研究科・助教

研究者番号：70602027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では熱ストレスによるRNA分解酵素Xrn1, Xrn2(以降Xrn1/2)の活性化機構及びRNA認識機構の解明を試みた。まずXrn1/2によるRNA認識機構を明らかにするために、様々なアフィニティタグを用いたXrn1/2の発現系の構築・精製条件を検討してきた。その結果、十分な純度・収量のXrn1/2を得ることができなかったが、Xrn2の活性を確認することはできた。

Xrn1/2の活性化機構を明らかにするために温熱依存的にXrn1/2に結合・解離するタンパク質の同定を試みた結果、複数のタンパク質の同定に成功した。現在、これらのタンパク質がXrn1/2の活性に関与しているのか検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱ストレス依存的なXrn1/2結合・解離タンパク質を同定することで、Xrn1/2の活性化機構を明らかにできると考えている。今後、Xrn1/2活性化機構を明らかにしていくことで、ストレス応答研究の基礎的な知見として貢献できると考えている。また、がん治療法の1つである温熱療法の基礎的な知見としても貢献できるだけでなく、より効果的な温熱療法開発研究へと普及していくと考えている。

またin vitro解析よりXrn2は開始tRNAを分解できたことから、細胞内で観察されていたXrn2の活性は正しかったことが裏付けされた。そのため、Xrn2の新たな基質としての知見として貢献できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to elucidate the activation mechanism and RNA recognition mechanism of Xrn1 and Xrn2 (Xrn1/2) by heat stress. At first, to elucidate the RNA recognition mechanism of Xrn1/2, we examined the construction and purification condition of Xrn1/2 expression system using various affinity tags. As a result, the yield and purity of Xrn1/2 could not be sufficiently obtained. However, Xrn2 activity could be confirmed in in vitro analysis. In order to clarify the activation mechanism of Xrn1/2, we attempted to determine the proteins that bind to and dissociate from Xrn1/2 in heat-dependent manner. We succeeded in identifying multiple proteins. We are currently investigating whether these proteins are involved in the heat-induced activation of Xrn1/2.

研究分野：生化学

キーワード：Xrn1 Xrn2 熱ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA 発現量制御の生物学的意義

細胞内での RNA の発現量は転写と分解によって緻密に制御されている。例えば、細胞周期の進行に関与している CyclinA の mRNA の発現量が制御されることで、細胞周期の進行が制御されている。またマイクロ RNA (miRNA) も細胞分化時に発現量が変化することで細胞分化が制御されている。このように RNA の発現量を緻密に制御することは細胞周期や細胞分化などの生物学的プロセスにおいて重要である。

RNA の発現量は、細胞が熱や酸化といった環境ストレスに曝された時、大きく変化することが知られている。例えば、熱や酸化ストレスにより mRNA が分解することで翻訳が抑制される。これにより、細胞はストレスに適応でき、生存することができる。このように RNA の発現量制御は細胞がストレスに適応するためにも重要である。

熱ストレスによる開始 tRNA (iMet) の分解

我々は熱ストレスによる新たな翻訳抑制機構を報告している。ヒト培養細胞を熱ストレスに曝すと、tRNA の中でも翻訳開始時にメチオニンをリボソームへと輸送する tRNA である開始 tRNA (iMet) が特異的に分解することで翻訳が抑制されていることを発見した。また、RNA 分解酵素である Xrn1, Xrn2 が iMet を分解することや、細胞内シグナル伝達に関与する mTOR が Xrn2 の活性を制御していることも明らかにしている (Watanabe et al., Nucleic Acids Res. (2013), FEBS Lett. (2014))。さらに、Xrn1, Xrn2 による iMet の認識に関して、以下の知見 (A) と結果 (B), (C) が得られている。

(A) ヒト細胞内には配列が異なった様々な tRNA が存在しているが、一般的に全ての tRNA は L 字型構造を形成している (図 1A)。

(B) iMet は熱ストレスにより分解するが、翻訳伸長中にメチオニンをリボソームへと輸送する伸長 tRNA (eMet) は分解しない (Watanabe et al., Nucleic Acids Res. (2013)) (図 1B)。

(C) iMet と eMet の塩基配列は異なっているが、iMet と eMet の Tm 値は、76.2°C と 76.6°C と同じあることから、熱ストレス下でも iMet と eMet は同じ立体構造を保持していると考えられる (Watanabe et al., Nucleic Acids Res. (2013)) (図 1C)。

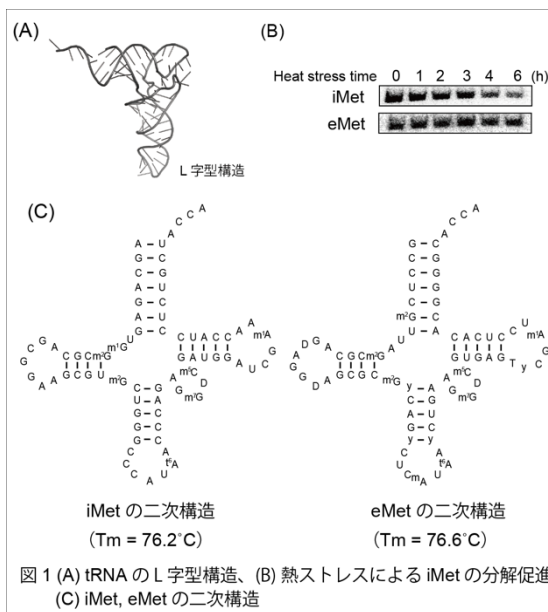


図 1 (A) tRNA の L 字型構造、(B) 熱ストレスによる iMet の分解促進 (C) iMet, eMet の二次構造

以上より、Xrn1, Xrn2 は iMet の立体構造ではなく塩基配列を認識し、分解していると考えられている。

Xrn1 に関する課題

Xrn1 は RNA 発現制御を行う酵素として古くから研究が進められている。これまでの研究により、Xrn1 はキャップ構造がなくなった mRNA であればすべて分解してしまうため、基質特異性がないと考えられていた。しかし、近年 Xrn1 は数多く存在している miRNA の中でも miR-382 を特異的に分解していることが報告されている (Bail et al. RNA (2010))。さらに申請者ら

の研究結果より、Xrn1 は iMet のみを分解することがわかっている。これらの結果は、Xrn1 には基質特異性があることを示している。しかしながら、Xrn1 がどのようにして iMet や miR-382 などの特定の RNA を認識し、分解しているのか明らかになっていない。さらに熱ストレスにより Xrn1 がどのようにして活性化して iMet を分解しているのかも明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究ではヒト由来 Xrn1 による RNA 認識機構を明らかにすることを目的とした。また、熱ストレスによる Xrn1 の活性化には熱ストレスによる翻訳後修飾もしくは、熱ストレス依存的な Xrn1 への結合・解離するタンパク質が関与している可能性が高い。そこで、Xrn1 の活性化機構を明らかにするために、Xrn1 の翻訳後修飾及び熱ストレス依存的な Xrn1 結合・解離タンパク質の同定を介して Xrn1 活性化機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

熱ストレスによる Xrn1 の翻訳後修飾解析及び、in vitro 解析による Xrn1 の修飾部位の同定・基質認識機構を明らかにするために、様々なアフィニティタグを融合した Xrn1 の発現系の構築、精製法を検討した。また、Xrn1 だけでなく、Xrn1 とともに XRN ファミリーを形成しており、iMet の分解を行う Xrn2 の発現系の構築、精製法を検討した。

熱ストレス依存的に Xrn1, Xrn2 に結合・解離するタンパク質をプルダウン法及び質量分析を用いて同定を試みた。

4. 研究成果

Xrn1, Xrn2 発現系の構築及び精製法の検討

Xrn1 の発現・精製は後述するが困難であった。そのため、基質特異性があり、XRN ファミリーである Xrn2 の発現・精製も試みた。

Xrn1, Xrn2 を発現・精製するために N 末端にアフィニティタグである Halotag を融合した Halotag-Xrn1, Halotag-Xrn2 (まとめて Halotag-Xrn1/2 と記載) を構築し、発現確認を行った

(図2)。その結果、内在性の Xrn1, Xrn2 に対して 5 倍程度発現していることを確認することができた。次に、活性化した Xrn1, Xrn2 を得るためには細胞を一度熱ストレスに曝す必要がある。そこで、Halotag-Xrn1/2 を過剰発現させた細胞を熱ストレスに曝したのち、Xrn1, Xrn2 の精製を試みた。その結果、純度が低く、少量の Xrn1, Xrn2 を得ることしかできなかった。これは Halotag が熱ストレスにより変性してしまうため純度及び収量の低下が起こることが明らかになった。また in vitro 解析により、部分精製した Xrn1 による iMet 分解活性は確認することができなかったが、部分精製した Xrn2 による iMet 分解活性は確認することができた。細胞を用いた実験において、iMet の分解は Xrn2 により主に行われていることが明らかになっている。つまり iMet の分解において、Xrn2 は Xrn1 よりも分解活性が高いことが示唆されている。そのため、部分精製した Xrn2 では活性を確認することができたが、量が少なく活性が低い Xrn1 では活性を確認することができなかったと考えている。

Xrn1/2 の発現を改善するために、Halotag よりも小さい Flagtag を融合した Flagtag-Xrn1/2

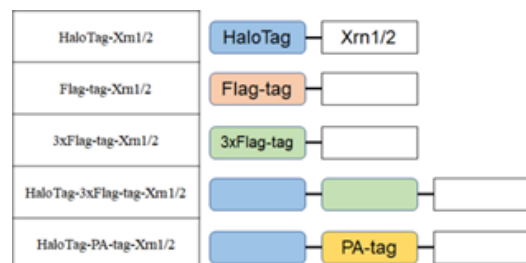


図2 本研究で作成した Xrn1, Xrn2 発現ベクター

を構築し、発現確認を行ったが、Flagtag では発現を確認することができなかった。これは Halotag が低発現タンパク質の発現を改善することから、Halotag が存在することで Xrn1, Xrn2 が発現していたと考えられる。

Flagtag による精製では、Flagtag の前後にスペーサー配列がないと精製効率が低下するが、PAtag は前後にスペーサー配列がなくとも精製効率は低下しないことが報告されている。そこで Halotag の C 末部位に Flagtag もしくは PAtag を融合した Halotag-Flagtag-Xrn1/2, Halotag-PAtag-Xrn1/2 を構築し、発現確認を行った。その結果、Halotag-Flagtag-Xrn1/2, Halotag-PAtag-Xrn1/2 とともに Xrn1 及び Xrn2 の N 末領域で切断されていた。そのため、現在、Xrn1/2 の C 末端に Flagtag もしくは PAtag を融合した Halotag-Xrn1/2-Flagtag (もしくは PAtag)の構築を試みている。

Xrn1, Xrn2 の翻訳後修飾の解析及び熱ストレス依存的な Xrn1/2 結合・解離タンパク質の同定

上述したように Xrn1 及び Xrn2 の精製量が少量で、純度も低かったため、質量分析で Xrn1, Xrn2 の翻訳後修飾を同定することは困難であった。そこで、温熱依存的に Xrn1/2 に結合・解離するタンパク質の同定を試みた。まず Halotag-Xrn1/2 を過剰発現させた細胞、及び過剰発現後熱ストレスに曝した細胞それぞれからプルダウン法を用いて Xrn1/2 に結合したタンパク質を抽出した。その後、質量分析を用いて通常培養及び熱ストレス後に Xrn1/2 に結合したタンパク質を同定した。同定後、熱ストレス後でのみ結合していたタンパク質を熱ストレス依存的な Xrn1/2 結合タンパク質とし、通常培養時には結合しているが熱ストレス後に結合が確認できないタンパク質を熱ストレス依存的な Xrn1/2 解離タンパク質とした。結果、熱ストレス依存的な Xrn1 結合タンパク質を 5 種類、Xrn1 解離タンパク質を 1 種類同定した。また、熱ストレス依存的な Xrn2 結合タンパク質を 6 種類同定した。Xrn1 解離タンパク質は同定することができなかった。現在、これらの結合・解離タンパク質が iMet の分解に寄与しているのか、Xrn1/2 の活性化に関与しているのか検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyoshi Yuichi, Kadono Maho, Okazaki Shigetoshi, Nishimura Ayano, Kitamatsu Mizuki, Watanabe Kazunori, Ohtsuki Takashi	4. 巻 31
2. 論文標題 Endosomal Escape of Peptide-Photosensitizer Conjugates Is Affected by Amino Acid Sequences near the Photosensitizer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 916 ~ 922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.0c00046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Soe Tet Htut, Nanjo Tomotaka, Watanabe Kazunori, Ohtsuki Takashi	4. 巻 95
2. 論文標題 Relation of Photochemical Internalization to Heat, pH and Ca ²⁺ Ions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 1395 ~ 1402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/php.13146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyoshi Yuichi, Ohtsuki Takashi, Kashida Hiromu, Asanuma Hiroyuki, Watanabe Kazunori	4. 巻 14
2. 論文標題 In-stem molecular beacon targeted to a 5'-region of tRNA inclusive of the D arm that detects mature tRNA with high sensitivity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0211505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shiraga Kaori, Soe Tet Htut, Matsumoto Sho, Watanabe Kazunori, Ohtsuki Takashi	4. 巻 29
2. 論文標題 Red and Near-Infrared Light-Directed Cytosolic Delivery of Two Different RNAs Using Photosensitive RNA Carriers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 3174 ~ 3179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.8b00487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡邊和則、大槻高史	4. 巻 6月号
2. 論文標題 創薬を支える光技術-光とRNAを用いた遺伝子発現制御法-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 光アライアンス	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuichi Miyoshi, Kazunori Watanabe	4. 巻 34
2. 論文標題 Formation Mechanism and Cellular Functions of Nuclear Stress Bodies Induced by Heat Stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thermal medicine	6. 最初と最後の頁 23-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3191/thermalmed.34.23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Kazunori, Yamaji Ryuhei, Ohtsuki Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 MicroRNA-664a-5p promotes neuronal differentiation of SH-SY5Y cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 225 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12559	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inaba Yuki, Watanabe Kazunori, Kitamatsu Mizuki, Nakata Eiji, Harada Atsushi, Ohtsuki Takashi	4. 巻 25
2. 論文標題 Ultrasound-dependent cytoplasmic internalization of a peptide-sonosensitizer conjugate	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 4212 ~ 4217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2017.06.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jin Li, Chengzhen Xu, Naotaka Shimada, Yuichi Miyoshi, Kazunori Watanabe, Wang Cong and Takashi Ohtsuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Detection of small, highly structured RNAs by molecular beacons	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anal. Methods	6. 最初と最後の頁 2971-2976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7AY00341B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 渡邊和則、井上歩実、岡田真実、山本理紗子、大槻高史
2. 発表標題 mTOR複合体を介した核内ストレス顆粒形成機構の解明
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊和則、井上歩実、大槻高史
2. 発表標題 温熱によるSatellite III RNAの発現上昇はmTOR複合体により制御されている
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊和則、井上歩実、岡田真実、山本理紗子、大槻高史
2. 発表標題 mTOR複合体制御による核内ストレス顆粒形成機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩城 香菜子、大槻高史、渡邊和則
2. 発表標題 温熱によるXrn1/2活性化機構の解明
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西雄也、渡邊和則、大槻高史
2. 発表標題 ヒトRNA分解酵素Xrn1, Xrn2の基質認識機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊和則、縄稚朋子、大槻高史
2. 発表標題 Pre-miR-664aによるアポトーシスの誘導
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三好祐一、渡邊和則、櫻田啓、浅沼浩之、大槻高史
2. 発表標題 molecular beaconによる高度に構造をとる短鎖RNAの検出
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上歩実、岡田真実、山本理紗子、大槻高史、渡邊和則
2. 発表標題 mTOR複合体を介した温熱による核内ストレス構造体形成機構の解明
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊和則、梅本裕介、長房すずか、高橋昭久、井尻憲一、大槻高史
2. 発表標題 温熱による開始tRNA分解を介した翻訳抑制と細胞周期との関係性
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊和則、梅本裕介、長房すずか、高橋昭久、井尻憲一、大槻高史
2. 発表標題 細胞周期依存的な開始tRNA分解を介した温熱による翻訳抑制機構
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Ohtsuki, Tet Htut Soe, Kazunori Watanabe
2. 発表標題 Mechanism and Application of photoinduced cytosolic dispersion of RNA (PCDR) method
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊和則、井上歩実、岡田真実、山本理紗子、大槻高史
2. 発表標題 温熱により形成される核内ストレス顆粒形成機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 縄稚朋子、渡邊和則、大槻高史
2. 発表標題 pre-miR-664aによる光依存的なアポトーシス誘導法の開発
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊和則、山路隆平、大槻高史
2. 発表標題 MiR-664a-5pは神経分化誘導に重要である
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊和則、岡田真実、井上歩実、山本理紗子、大槻高史
2. 発表標題 mTORを介した温熱による核内ストレス構造体形成機構
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 縄稚朋子、渡邊和則、大槻高史
2. 発表標題 Pre-miR-664aを用いた光依存的な細胞死の誘導
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井上歩実、渡邊和則、岡田真実、山本理紗子、大槻高史
2. 発表標題 mTORを介した核内ストレス構造体の熱ストレス下における形成機構
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Ohtsuki, S. Miki, Y. Inaba, S. Kobayashi, T. Haraguchi, E. Nakata, A. Harada, K. Hirakawa, S. Okazaki, M. Kitamatsu, K. Watanabe
2. 発表標題 Photochemical and sonochemical internalization of CPP-cargo-sensitizer conjugates
3. 学会等名 Pacific Rim Nano Medicine Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----