

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14630

研究課題名（和文）細胞質ポリ(A)鎖伸長因子CPEBによる多様な遺伝子発現調節の分子基盤

研究課題名（英文）CPEB-mediated post-transcriptional regulation of gene expression

研究代表者

尾上 耕一 (Ogami, Koichi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・助教

研究者番号：70796523

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）：本研究は、RNA結合タンパク質CPEBを介した負と正の両方向の遺伝子発現の調節に関わる分子メカニズムを、それぞれ癌遺伝子c-mycおよびリボヌクレオチド還元酵素RNR2のmRNAを対象に解明することを目的に実施した。CPEBによる負の制御では、CPEBによるc-myc mRNA分解の促進に関わる特徴的なRNA配列構成を初めて決定した。CPEBによる正の制御では、ポリA鎖の分解が優勢となるDNA傷害時において、RNR2 mRNAではCPEBとポリAポリメラーゼPAPD7の利用される分子メカニズムによって、選択的にポリA鎖が伸長されることを示唆する結果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写後における遺伝子の発現制御は、mRNAの量や翻訳量を決定する重要な過程である。CPEBは、mRNAの3'末端に付加されるポリA鎖の制御によってmRNAの運命を決定する。CPEBは標的遺伝子ごとにポリA鎖短縮化によるmRNA分解促進と伸長による翻訳活性化を使い分けられていると考えられるが、CPEBが標的mRNAのどのような情報を読み取って制御の方向を決定しているかなど、CPEBによる遺伝子発現に関わる分子メカニズムには不明な点が多い。本研究は、CPEBによる多様なmRNA制御に、どのような仕組みが関わるのかを完全に理解するために重要な基盤的な知見を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：The RNA-binding protein CPEB regulates gene expression both positively and negatively. Currently, c-myc mRNA is the only known target that is promptly degraded by a mechanism involving CPEB. In this study, we identified an RNA code comprising of the consensus and non-consensus CPE sequences that guides CPEB to degrade c-myc mRNA. We also worked on CPEB's role during DNA damage responses, and found that CPEB and its binding poly(A) polymerase PAPD7 are essential for the increase of RNR2 protein after doxorubicin or UV treatment of U2OS cells. While many of the constitutively expressed mRNAs are deadenylated in response to the DNA damages, poly(A) tails of RNR2 mRNA are elongated. Our results suggesting that CPEB-PAPD7 discriminates RNR2 mRNA from the others to induce translation during DNA damage response.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA結合タンパク質 mRNA分解 翻訳

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞質における mRNA の安定性や翻訳活性の調節は、産生されるタンパク質の量に速やかに影響を及ぼす重要な制御過程である。細胞質ポリ A 鎖伸長因子 CPEB は、アフリカツメガエルの卵母細胞において、標的 mRNA の 3'末端非翻訳領域 (3'UTR) に結合してポリ A 鎖の伸長反応を制御することで、特定の mRNA の翻訳活性を卵成熟過程の時期特異的に調節する因子として同定された。ヒトを含む哺乳動物では、CPEB が生殖細胞だけでなく体細胞にも発現しており、卵母細胞の場合と同様に、標的遺伝子特異的にポリ A 鎖伸長と翻訳活性化を制御していると考えられている。研究代表者も独自に、CPEB が DNA 傷害時におけるリボヌクレオチド還元酵素 RNR2 のタンパク質産生の誘導に必須であることを明らかにしている。上述のような正の遺伝子発現制御への役割がよく知られる一方で、研究代表者は、CPEB が癌遺伝子 c-myc の mRNA のポリ A 鎖短縮化を加速させ、c-myc mRNA 分解を促進することを報告した (Ogami et al., *Oncogene* 2014)。これは CPEB がポリ A 鎖分解を介して遺伝子発現を負に制御する初めての例であり、CPEB は標的遺伝子ごとにポリ A 鎖・遺伝子発現の制御の方向、すなわち、短縮化による mRNA 分解促進と伸長による翻訳活性化を使い分けていることを示す発見である。しかしながら、CPEB が標的 mRNA のどのような情報を読み取って制御の方向を決定しているかは明らかになっていない。また、DNA 傷害時における細胞質における CPEB による RNR2 の正の遺伝子発現に関しても、不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

本研究においては、CPEB による多様な遺伝子発現調節に関わる分子基盤の解明を目的として、c-myc mRNA の特異的な分解制御を決定づける RNA 配列コードの同定、DNA 傷害時における RNR2 mRNA の翻訳活性化メカニズムについて解析した。

### 3. 研究の方法

#### c-myc mRNA の特異的な分解制御を決定づける RNA 配列コードの同定

c-myc mRNA の 3'末端には、機能性のポリ A 付加シグナル(pA1, pA2)が 2 つ存在し、5'側のポリ A 付加シグナル(pA1)を境に、上流と下流にそれぞれ CPEB 結合のコンセンサス配列(CPE) 1 つとそれに類似した非コンセンサス配列(ncCPE) 2 つが存在する(図 1)。c-myc 3'UTR の全長、終止コドンから pA1 まで、pA1 から pA2 までの領域をそれぞれ付加したレポーター mRNA 発現プラスミドを作成し、どの領域が細胞内での CPEB による mRNA 分解に関与するかノーザンブロットングにより解析した。さらに、CPE, ncCPE に種々の組み合わせで点変異や欠損変異を導入し、どのエレメントが分解に必要な役割を果たすかを調べた。これらの実験では、CPEB の発現がウェスタンブロットングで確認できない HeLa 細胞を利用し、CPEB を外来性に発現させた時の gain-of-function 効果を調べた。また、CPEB と c-myc 3'UTR との結合、特にこれまで報告のない ncCPE との結合性について、ゲルシフトアッセイにより解析した。

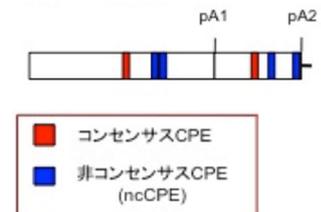


図 1. c-myc 3'UTR の構造

#### DNA 傷害時における RNR2 mRNA の翻訳活性化メカニズム

本研究では、内在性 CPEB タンパク質の十分な発現が確認できており、p53 が野生型であるなど、正常なストレス応答が期待できる U2OS 細胞を利用した。DNA 傷害は、抗がん剤ドキシソルピシン処理、あるいは 50~75J/m<sup>2</sup> の UV 処理により与えた。CPEB は非正準ポリ A ポリメラーゼ PAPD4, PAPD5 と結合することが過去に報告されており、また、研究代表者等が過去に活性化型アイソフォームの同定に成功した PAPD7 (Ogami et al., *BBRC* 2013)とも相互作用することを独自に明らかにしている。これらのうち、どのポリ A ポリメラーゼが DNA 傷害時の RNR2 発現誘導に関与するか、siRNA を用いたノックダウン実験により調べた。さらに、DNA 傷害時の RNR2 mRNA のポリ A 鎖長の変化を、PCR を利用したポリ A 鎖長測定法である RL-PAT 法、あるいはノーザンブロットングにより解析した。

### 4. 研究成果

#### c-myc mRNA の特異的な分解制御を決定づける RNA 配列コードの同定

c-myc 3'UTR を、pA1 を境に前半部分と後半部分に分け、それらを含む mRNA に対する CPEB 過剰発現の影響を HeLa 細胞において解析したところ、前半領域、後半領域ともに c-myc 3'UTR の全長とほぼ同等の分解促進作用を示した。後半領域は前半領域と比べ、長さが短く他の RNA 結合タンパク質の結合配列エレメントも少なかったため、以後の詳細な解析には後半領域を用いた。後半領域の CPE と ncCPE に、点変異・欠損変異を様々な組み合わせで導入し、同様に CPEB 発現による分解への影響を調べた。その結果、CPE 配列の変異や欠損は分解を弱くしか抑制せず、2 つある ncCPE のどちらか一方の変異・欠損ではそれと比べやや強い抑制が見られた。ncCPE を両方とも変異あるいは欠損させると、CPEB による mRNA 分解は完全に抑制された。よって、c-myc mRNA の分解には ncCPE が必須であることが判明した。前半領域を用いた解析でも同様に、ncCPE の分解への必要性が確認された。さらに、ゲルシフトアッセイによる CPEB との結合解析の結果、CPEB は CPE に対し高い親和性を示す一方で (解離定数

Kd=212nM)、2つのncCPEのどちらに対してもほとんど結合性を示さなかった (Kd, >800nM)。ところが、CPEとncCPEのどちらか、あるいは両方が共存したRNAプローブで同様の解析を行ったところ、単独の場合ではほとんど見られなかった2分子目のCPEBの結合によるさらなるバンドのシフトが観察された。この2分子目のCPEB結合はおよそ150nMほどからみられ、300~400nMの間で1分子結合したRNAとほぼ1:1の結合量となった。一方、ncCPE2つのみをもつRNAでは、Kd値も>800nM以上とほとんど結合性が見られず、2分子結合も観察されなかった。これらの結果から、CPEに結合したCPEBによりncCPEへの2分子目のCPEB結合が促進されることが明らかとなった。さらに、ヒト体細胞においてCPEBの標的mRNAとしてすでに同定されているp53やc-junの3'UTRを付加したレポーターmRNAに対するCPEB発現の影響と結合性についても解析した。これらの3'UTRはCPEを含むがncCPEを持たず、CPEBによってmRNA分解が促進されることはなかった。一方、これら3'UTRに対するCPEBの結合はKdが150nM未満と、c-mycの場合と比べ比較的強いことが判明した。よって、CPEBによるmRNA分解には、CPEB結合の強さは関係なく、本来ではそれ自体親和性の低いncCPEへの結合が関係していることが明らかとなった。CPEBによるmRNA分解は、現在までのところc-myc mRNA以外には報告がない。CPEBによる分解の標的となるmRNAの候補を見つけるため、CPEBを過剰発現した細胞とコントロールの細胞との間のmRNA発現変動を調べたRNA-seqデータの分析に着手した。その結果、CPEB発現時に発現減少するmRNAを複数見出し、直接CPEBにより分解される標的を同定するための候補を得ることに成功した。これらのmRNAから、CPEBの直接の結合標的となるものに絞り込み、c-myc mRNAの場合と同様に、CPEとncCPEから成るRNAコードが利用されているかさらなる詳細な解析が必要である。

#### DNA傷害時におけるRNR2 mRNAの翻訳活性化メカニズム

U2OS細胞にドキソルピシンあるいはUVでDNA傷害を加えると、少なくとも処理後8時間までにおいて、RNR2タンパク質の経時的かつCPEB依存的な発現上昇が観察される。CPEBの結合パートナーであるポリAポリメラーゼPAPD4, PAPD5, PAPD7をそれぞれノックダウンした条件下で同様の実験を行ったところ、PAPD7のノックダウン時においてのみ、RNR2発現の誘導が抑制された。さらに、RNR2 mRNAのポリA鎖長の変化を解析したところ、DNA傷害ストレスを加えて最初の2時間では、ポリA鎖が徐々に伸長していく様子が観察され、その後再びポリA鎖は穏やかに短縮化されていくことが明らかとなった。一方で、リボソームタンパク質など構成的に発現している遺伝子のmRNAや、 $\beta$ -globinのレポーターmRNAでは、ポリA鎖の伸長は起こらず、むしろ短縮化が加速されていることが判明した。以上から、DNA傷害ストレス時には、ポリA鎖の分解および遺伝子発現の抑制が優勢となるが、RNR2 mRNAではCPEBとPAPD7の利用される分子メカニズムによって選択的にポリA鎖が伸長され、翻訳が上昇されることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nogimori Takuto, Furutachi Kazuya, Ogami Koichi, Hosoda Nao, Hoshino Shin-ichi	4. 巻 511
2. 論文標題 A novel method for stabilizing microRNA mimics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 422 ~ 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.075	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 Richard Patricia, Ogami Koichi, Chen Yaqiong, Feng Shuang, Moresco James J., Yates John R., Manley James L.	4. 巻 15
2. 論文標題 NRDE-2, the human homolog of fission yeast Nrl1, prevents DNA damage accumulation in human cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 RNA Biology	6. 最初と最後の頁 868 ~ 876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1080/15476286.2018.1467180	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 Wakiyama Motoaki, Ogami Koichi, Iwaoka Ryo, Aoki Kazuma, Hoshino Shin-ichi	4. 巻 23
2. 論文標題 MicroRNP-mediated translational activation of nonadenylated mRNAs in a mammalian cell-free system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 332 ~ 344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1111/gtc.12580	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 Ogami Koichi, Chen Yaqiong, Manley James	4. 巻 4
2. 論文標題 RNA Surveillance by the Nuclear RNA Exosome: Mechanisms and Significance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Non-Coding RNA	6. 最初と最後の頁 8 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.3390/ncrna4010008	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 Nogimori Takuto, Ogami Koichi, Oishi Yuka, Goda Ryoya, Hosoda Nao, Kitamura Yoshiaki, Kitade Yukio, Hoshino Shin-ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 ABCE1 Acts as a Positive Regulator of Exogenous RNA Decay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 174 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12020174	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 Peter Brown, RELISH Consortium, Yaoqi Zhou	4. 巻 2019
2. 論文標題 Large expert-curated database for benchmarking document similarity detection in biomedical literature search	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Database	6. 最初と最後の頁 baz085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/database/baz085	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 Aoki Hiromasa, Yamashita Misaki, Hashita Tadahiro, Ogami Koichi, Hoshino Shinichi, Iwao Takahiro, Matsunaga Tamihide	4. 巻 6
2. 論文標題 Efficient differentiation and purification of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells and expansion with the use of inhibitors of ROCK, TGF- $\beta$ , and GSK3 $\beta$	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e03493 ~ e03493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e03493	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 Hojo Hiroaki, Yashiro Yuka, Noda Yuta, Ogami Koichi, Yamagishi Ryota, Okada Shunpei, Hoshino Shin-ichi, Suzuki Tsutomu	4. 巻 295
2. 論文標題 The RNA-binding protein QKI-7 recruits the poly(A) polymerase GLD-2 for 3' adenylation and selective stabilization of microRNA-122	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 390 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011617	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂元健太郎、尾上耕一、細田直、山岸良多、星野真一
2. 発表標題 アミノ酸飢餓シグナルに呼応したLarp1によるmRNA代謝調節
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック 日本薬学会東海支部 合同学術大会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野間崇秀、尾上耕一、細田直、山岸良多、星野真一
2. 発表標題 新規RNA結合タンパク質Larp4Bによる標的mRNA代謝調節
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック 日本薬学会東海支部 合同学術大会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石結香、尾上耕一、星野真一
2. 発表標題 RNA結合タンパク質Larp1はTOP mRNAのポリA鎖伸長を介し遺伝子発現を制御する
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾上耕一、大石結香、坂元健太郎、野木森拓人、星野真一
2. 発表標題 LARP1はTOP mRNAのポリA鎖伸長を介してアミノ酸飢餓回復時の翻訳活性化を可能にする
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島朋香、尾上耕一、志水良亮、星野真一
2. 発表標題 RNA 結合タンパク質 LARP4 はミトコンドリア構成因子の mRNA を標的とする
3. 学会等名 第65回薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口奈津美、尾上耕一、細田直、星野真一
2. 発表標題 インターロイキンエンハンサー結合因子3(ILF3)は標的mRNAのポリA鎖を制御する
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野木森拓人、古舘和也、尾上耕一、細田直、星野真一
2. 発表標題 miRNA 医薬の新規安定化技術の開発
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----