

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007~2008

課題番号：19770151

研究課題名 (和文)

NMD における mRNP 複合体動態の解析

研究課題名 (英文)

Analysis of mRNP remodeling during NMD

研究代表者

山下 暁朗

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：20405020

研究成果の概要：

本研究により、動物細胞内からの高精度 mRNP 複合体精製システムを新たに構築することに成功した。具体的には、mRNP 精製のためのタグである BoxB 配列を挿入した beta-globin 遺伝子由来の mRNA (翻訳型 mRNA) とその 5'非翻訳領域に翻訳開始を阻害する強固なステムループを形成する配列を挿入した遺伝子由来の mRNA (非翻訳型 mRNA) を mRNP 精製アフィニティータグを用いて精製した。mRNP 精製アフィニティータグとして、BoxB 結合ペプチドであるバクテリオファージ N タンパク質 (N ペプチド) に Streptavidin binding peptide (SBP) と GST と Flag epitope tag を融合した物を使用した。この解析により、動物細胞内で翻訳中のリボソームが結合した mRNP (リボソーム、翻訳伸張因子を含む、スプライシング依存的 mRNA 結合タンパク質複合体である EJC を含まない) と翻訳されていない mRNP (EJC をふくむ、リボソーム翻訳伸張因子を含まない) の構成因子が大きく異なることを生化学的に明らかとした。この結果は、動物細胞内で翻訳依存的に mRNP の大きな再構成が起こるということを初めて示した物である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：遺伝子発現転写後制御

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：①遺伝情報複製、②転写装置、③再編、④制御

1. 研究開始当初の背景

ヒトの遺伝性疾患およびガンにおける変異のうち約 1/3 は本来の終止コドンよりも 5' 上流の位置に終止コドン (PTC: Premature

termination codon) を生じる。NMD は PTC を有する mRNA (PTC-mRNA) を積極的に分解することにより、PTC-mRNA 由来の異常蛋白質の産生を防ぐことにより、遺伝子変異から生体を

守る防御機構である（総説：Yamashita ら 2005）。一方で、PTC-mRNA 由来の C 末端欠損蛋白質が機能を保持している場合は NMD の阻害は変異遺伝子の機能回復につながることを Ullrich 病をモデルとして明らかとし、NMD の操作が疾患治療に使えることを初めて示した（Usuki ら *Annals of Neurology* 2004, Usuki ら *Molecular therapy* 2006）。複数の遺伝子の変異の蓄積によって誘導されるガン化において変異の蓄積は細胞の生存に対し負の作用を引き起こす可能性が高いが、NMD により変異遺伝子由来の異常な RNA が排除されるため、恒常性が維持されていると考えられているが、研究は全く進んでいない。

これまでに行った解析により、それまで全く分かっていなかった細胞が PTC を認識する分子装置の実態とそのメカニズムを明らかとすることに成功した（総説：Yamashita ら 2005）。終止コード認識時に、翻訳終結因子 eRF1, eRF3 と NMD 制御分子である SMG-1, Upf1 が SURF (SMG-1:Upf1:eRF1:eRF3 複合体)を形成し、その 3' 側に EJC (Exon-junction complex)が存在した場合に、SURF が EJC と複合体を形成し、それが引き金となりスプライシングを受けた mRNA 上で SMG-1 が Upf1 をリン酸化するという一連の生化学的反応がまさに PTC の認識機構であることを解明した（Yamashita ら *Genes&Development* 2001, Kashima ら *Genes&Development* 2006）。また、リン酸化された Upf1 が NMD 制御因子 SMG-5, SMG-7 と特異的に結合し、PP2A により脱リン酸化されることも NMD に必須であることを明らかにしている（Ohnishi ら *Molecular Cell* 2003）。一方で、NMD によって分解される mRNA とそれに結合する蛋白質複合体 (mRNP) がいつどのようなタイミングで形成されるのか、また、細胞内のどこで mRNA が分解されるのかはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、ナンセンス変異を有する mRNA からの異常タンパク質の発現を防ぐ防御機構—NMD (nonsense-mediated mRNA decay) により分解される mRNA の細胞内局在をその mRNA-Protein (mRNP) 複合体を培養細胞からの分離精製を通じて明らかとすると同時に mRNA を可視化することにより解析することを目的とする。mRNP 複合体を細胞からより簡便、迅速で低コストに精製、分析する方法の確立とその細胞内局在の可視化は、NMD のみならず遺伝子発現の転写後制御全体の解明にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

a) mRNP複合体精製システムの開発

mRNP 複合体精製は mRNA にアフィニティータグを結合させ精製することにより行う。アフィニティータグの結合のため、既知の mRNA

結合タンパク質結合配列を含むレポーター mRNA にバクテリオファージ N タンパク質 (N ペプチド) 結合配列である、BoxB 配列を複数コピー挿入したものを作成する。同時に、BoxB 配列に結合する N ペプチドに SBP (ストレプトアビジン結合ペプチド) および GST の二種のタンパク質精製に使われるアフィニティータグを付与した mRNP 複合体精製タグを設計し、これに、細胞内局在をモニターするための核移行シグナルを持つ GFP を融合させた、動物細胞発現ベクターを作成する。アフィニティータグを組み合わせた二段階の精製を行うことにより精製度を飛躍的に高めることができる。

b) 誘導発現システムを用いた転写後の mRNA 動態と mRNP 複合体の解析

遺伝子発現は、転写、スプライシングなどによる mRNA 前駆体の成熟、mRNA 輸送、翻訳制御、mRNA 分解といった様々な制御を受けている。転写後の mRNA 局在を解析するためには、ごく短時間の転写による、均一な mRNA を分析する必要がある。また、レポーターの発現量を一定以下に押さえることが、より生理的な条件下での mRNA 局在の実態をつかむ上で重要である。具体的には、a) において作成検証したレポーターを Tet システム (テトラサイクリンによる誘導発現系) に導入することにより、短時間の一過的発現を行い、転写後のスプライシング、核細胞質輸送、翻訳装置、mRNA 分解装置への mRNA の移行、などの mRNA 動態を経時的に解析する。

c) mRNP 複合体精製システムの検討

新たに樹立を目指す mRNA をターゲットにした mRNP 複合体の精製を試み、レポーター mRNA の精製をノーザンブロット法により解析する。さらに、既知の mRNP 複合体構成因子の存在をウェスタンブロット法により解析する。また銀染色により、全体の精製度を評価する。

4. 研究成果

a) mRNP複合体精製、可視化システムの開発

mRNP 複合体精製のため 5 つの BoxB 配列を beta-globin の 3' UTR に持つレポーターを作成した。さらに、BoxB 配列に結合する N ペプチドに SBP (ストレプトアビジン結合ペプチド)、Flag epitope および GST の 3 種のタンパク質精製に使われるアフィニティータグを付与した mRNP 複合体精製タグを作成した。さらに、ストレプトアビジンカラムもしくはグルタチオンセファロースカラムにより mRNP を精製出来ることを既知の mRNP 複合体構成因子の存在をウェスタンブロット法により解析し確認した。また、mRNA の局在を確認するため精製タグに mCherry-NLS を組み込

んだ。

mRNP 精製レポーターの ORF に翻訳をモニターするための myc epitope tag と、mRNP 構成タンパク質の mRNA 上の位置を解析するための antisense oligo・RNaseH による機知の特異部位による RNA 切断配列を挿入した。さらに、BoxB 配列に結合する N ペプチドに 3 種のタンパク質精製に使われるアフィニティータグを付与した mRNP 複合体精製タグの N ペプチドに boxB 配列とのアフィニティーが 160 倍になる 2 アミノ酸の変異を導入した。

b) 誘導発現システムを用いた転写後の mRNA 動態と mRNP 複合体の解析

遺伝子発現は、転写、スプライシングなどによる mRNA 前駆体の成熟、mRNA 輸送、翻訳制御、mRNA 分解といった様々な制御を受けている。転写後の mRNA 局在を解析するためには、ごく短時間の転写による、均一な mRNA を分析する必要がある。また、レポーターの発現量を一定以下に押さえることが、より生理的な条件下での mRNA 局在の実態をつかむ上で重要である。そこで、a) で作製検証したレポーターを Tet システム (テトラサイクリンによる誘導発現系) に導入し、短時間の一過的発現を可能とするベクターを作成した。さらに、invitrogen 社の FLP-In system による安定発現株の作製に用いる FRT をベクター中に組み込んだ。これを用いて、1 コピーの FRT サイトを持つ培養細胞樹立に向け、GFP 融合型プラスミドシジン耐性遺伝子を有する FRT サイト導入用レンチウイルスベクターを作成し、1 コピーの FRT サイトを有する HeLa TetOff, HeLa TetOff-Advanced, HeLa TetOn-Advanced 細胞の樹立を進めている。樹立後、a) の精製システムを安定発現する細胞の樹立を進めている。

今後、mRNP 精製レポーターを発現する安定細胞株を樹立し解析を進める。

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 4 件)

Yamashita A (Corresponding Author), Izumi N, Kashima I, Ohnishi T, Saari B, Katsuhata Y, Muramatsu R, Morita T, Iwamatsu A, Kurata R, Hachiya T, Hirano H, Anderson P, Ohno S: SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 23(9): 2009. in press
Chen CY, Yamashita Y, Chang TC, Yamashita A, Zhu W, Zhong Z, Shyu AB: Versatile

applications of transcriptional pulsing to study mRNA turnover in mammalian cells. *RNA.* (10):1775-86. 2007.

Ezzeddine N, Chang TC, Zhu W, Yamashita A, Chen CY, Zhong Z, Yamashita Y, Zheng D, Shyu AB: Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* 27(22): 7791-7801. 2007.

Morita T, Yamashita A, Kashima I, Ogata K, Ishiura S, Ohno S. Distant N- and C-terminal domains are required for intrinsic kinase activity of SMG-1, a critical component of nonsense-mediated mRNA decay. *J Biol Chem.* 16:282(11): 7799-808. 2007

[学会発表] (計 5 件)

Yamashita A, Izumi N, Kashima I, Katsuhata Y, Muramatsu R, Ohno S. TRANSLATION TERMINATION COMPLEX DURING NONSENSE-MEDIATED MRNA DECAy. Cold spring harbor laboratory meeting 2008 Translational control, New York, 2008, 9.

Yamashita A, Kashima I, Izumi N, Katsuhata Y, Muramatsu R, Ohno S: The formation of SMG-1:Upf1:eRF1:eRF3 complex (SURF) on ribosomes precedes translation dependent Upf1 phosphorylation during nonsense-mediated mRNA decay
THE 21st NAITO CONFERENCE "Nuclear Dynamics and RNA [I], Yamanashi, 2008, 6. 26

山下暁朗, 泉奈津子, 鹿島勲, 森田智子, 村松玲子, 大野茂男. 翻訳依存的な mRNA 監視複合体形成および再構成が Upf1 リン酸化を誘導する. BMB2007-第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007, 12.

Yamashita A, Izumi N, Kashima I, Ohnishi T, Anderson P, Ohno S: The SMG-1:SMG-8:p60 Complex Regulated Phosphorylation Of Upf1 Is Required For The Dissociation Of eRFs From mRNA Surveillance Complex During Nonsense-mediated mRNA decay.
第 9 回日本 RNA 学会年会, 名古屋国際会議場 2007, 7, 31

Yamashita A, Kashima I, Izumi N, Ohnishi T, Anderson P, Ohno S. The SMG-1:SMG-8:p60

Complex Regulated Phosphorylation Of Upf1
Is Required For The Dissociation Of eRFs
From mRNA Surveillance Complex During
Nonsense-mediated mRNA decay. 第 12 回国
際 RNA 学会年会, Wisconsin, 2007, 6.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 暁朗

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし