

平成21年 5月 23日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2007～2008

課題番号：19790207

研究課題名（和文） ウイルス感染経路における非翻訳 RNA 結合タンパク質の役割

研究課題名（英文） Role of non-coding RNA binding proteins in viral infection

研究代表者

坂本 修士 (SAKAMOTO SHUJI)

高知大学・教育研究部自然科学系・助教

研究者番号：80397546

研究成果の概要：

- 二本鎖 RNA 結合蛋白質である Nuclear Factor 90 (NF90)は、核酸のミニヘリックス構造と親和性が高い。本研究で我々は、NF90 がミニヘリックス構造を有する前駆体 miRNA に結合し、そのプロセッシングを阻害することで、miRNA の産生に対し抑制的に機能することを見出した。また、NF90 は細胞増殖を促進する機能を有することが明らかとなった。現在、NF90 による細胞増殖促進機能が miRNA の低下によるものかを解析中である。
- NF90 の発現低下はアデノウイルスの増殖を促進する可能性が見出された。現在、異なる測定方法を用い、この現象を再検討している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：非翻訳 RNA, 細胞増殖, ウイルス感染

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノムプロジェクトが終了し、ヒトの遺伝子数が2万2千個程度であることが明らかとなった。この遺伝子はゲノム全体の僅か2%を占めるに過ぎず、残りの98%はジャンクであると想定されていた。しかし近年、全ゲノムの約70%はRNAに転写されており、これらのRNAのほとんどが蛋白質に翻訳されない非翻訳RNAであることがわかってきた。従ってこの非翻訳RNAの生体内における役割を解明することは、ポストゲノム時代の重要課題

の1つとなっている。非翻訳RNAの中でも21～23塩基からなるマイクロRNA(miRNA)やsmall interfering RNA (siRNA)は相補的、一部相補的なmessenger RNA (mRNA)に対して分解能、翻訳抑制能(RNA干渉能)を有し、その機能を通じ癌やウイルス感染に関与していることが示唆されている。しかしながら、そのメカニズムに関しては不明な点が多く残されている。

(2) Nuclear Factor 90 (NF90)は二本鎖RNA

結合蛋白質であり、Nuclear Factor 45 (NF45) とヘテロダイマーを形成し、細胞核に局在する。その機能に関しては、遺伝子発現や mRNA の安定化等が報告されているが未だ不明な点が多く残されている。我々は以前 MHC Class II 遺伝子の発現調節領域に存在するパリンドローム構造に結合する因子としてこの蛋白質を単離した。また他のグループからはアデノウイルス (Ad) 由来の非翻訳 RNA である VARNA に結合する因子として報告された。この DNA パリンドロームや VARNA は共通してミニヘリックス構造を有しており、興味深い事に miRNA の前駆体も同様の構造を有する。そこで我々は miRNA 前駆体→miRNA の過程における NF90 の関与の有無について解析した。

(3) Ad 由来の VARNA から産生される小分子 RNA (svaRNA) は、Ad 感染に対し促進的に機能する。上記したように NF90 は VARNA と結合することが知られている。そこで我々は Ad 感染における NF90 の関与の有無について検討した。

2. 研究の目的

(1) miRNA 生合成経路で特に核内のイベントに対する NF90 の関与の有無を詳細に検討する。

(2) Ad 感染における NF90 の関与の有無を検討する

3. 研究の方法

(1) miRNA 生合成は、以下の様にして行われる。まず核内で miRNA 遺伝子より初期転写産物 (primary-miRNA: pri-miRNA) が RNA ポリメラーゼ II により転写され、その後 Drosha-DGCR8 により pri-miRNA はプロセッシングを受け、precursor-miRNA (pre-miRNA) に変換される。pre-miRNA は Exportin-5 により核外に輸送され、細胞質にて Dicer によりヘアピン構造が切断され、二本鎖 miRNA となる。二本鎖 miRNA は一本鎖化された後 RISC 複合体に取り込まれ、RISC を相補的、一部相補的な mRNA へガイドし、機能を発揮する (図 1)。上記したように NF90 は NF45 とヘテロダイマ

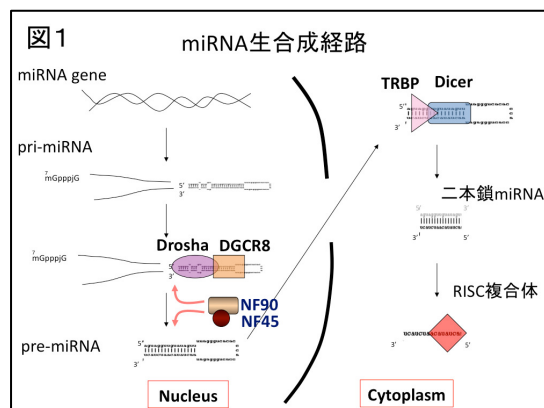


図1 miRNA生合成経路

ーを形成し核に局在する。そこで、pri-miRNA から pre-miRNA の変換におけるこれらの蛋白質の関与の有無を検討するために、In vitro pri-miRNA プロセッシングアッセイを行った。

(2) 我々は既に不死化ヒト腎細胞株 293T 細胞で NF90-NF45 が高発現すると、pri-miRNA が著しく蓄積することを見出している。そこでこの NF90-NF45 による pri-miRNA の蓄積が転写活性化によるものか、否かを検討するために、RNA ポリメラーゼ II の阻害剤 α -amanitin を用いて解析を行った。具体的には、293T 細胞に NF90-NF45 を高発現させた後、 α -amanitin を加え、時間経時的に細胞を回収し、pri-miRNA 量を RT-qPCR 法により測定した。

(3) これまでに、高発現した Drosha と NF90-NF45 が相互作用することが報告されている。そこで、NF90-NF45 の高発現による pri-miRNA の蓄積が、高発現した Drosha に影響されるかを検討するために、293T 細胞に NF90, NF45, Drosha の発現プラスミドを遺伝子導入し、RT-qPCR 法により pri-miRNA 量を測定した。

(4) pri-miRNA のプロセッシングに必須な Drosha-DGCR8 と NF90-NF45 との相関関係を調べることを目的とし、両蛋白質同士の相互作用の有無を検討した。方法は、免疫沈降法及び Blue Native Gel 解析を用いた。

(5) pri-miRNA へ NF90-NF45 が直接結合するか否かを明らかにするために、In vivo pri-miRNA binding assay 及び NF90, NF45, DGCR8 の組換え蛋白質を用いた RNA ゲルシフトアッセイを行った。

(6) NF90-NF45 の高発現により pri-miRNA が蓄積することは既に見出している。そこで、NF90 をノックダウンした際の pri-miRNA や成熟型 miRNA の発現量の変動を RT-qPCR 法を用い解析した。

(7) NF90 の生理的意義を明らかにすることを目的として、293 細胞において NF90 をノックダウンした際の細胞増殖速度を測定した。測定法としては MTS アッセイ法を用いた。

(8) Ad 感染における NF90 の関与の有無を明らかにするために 293 細胞で NF90 をノックダウンした後、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ Ad を感染させ、ルシフェラーゼ活性を指標にウイルスの増殖効率を測定した。

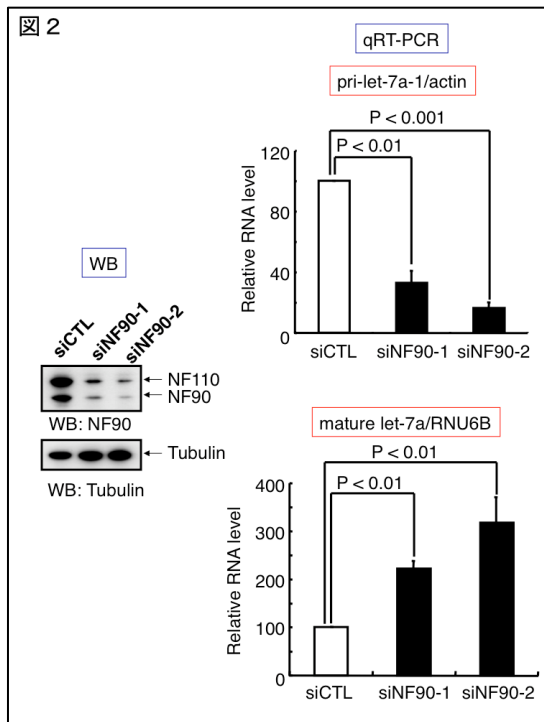
4. 研究成果

(1) In vitro pri-miRNA プロセッシングア

ッセイの結果、NF90-NF45 の高発現により pri-miRNA のプロセッシングが顕著に抑制されることがわかった。また、 α -amanitin を用いた解析により、NF90-NF45 の高発現により蓄積する pri-miRNA は、転写活性化ではないことが明らかとなった。さらに、NF90-NF45 と共に、pri-miRNA のプロセッシングに必須な Drosha を高発現させても、NF90-NF45 による pri-miRNA の蓄積は影響されなかった。これらの解析結果より、NF90-NF45 の高発現による pri-miRNA の蓄積は、pri-miRNA プロセッシングの阻害によるものであることが示唆された。

(2) 免疫沈降法及び Blue Native Gel 解析を行った結果、NF90-NF45 が高発現しても内在性の Drosha-DGCR8 とは相互作用しないことが示唆された。一方、In vivo pri-miRNA binding assay や NF90, NF45, DGCR8 の組換え蛋白質を用いた RNA ゲルシフトの結果、NF90-NF45 は pri-miRNA に結合することがわかった。またその結合においては結合活性の高いものと低いものがあることがわかった。NF90-NF45 と高い結合活性を示す pri-miRNA のひとつが、細胞増殖抑制効果を有する miRNA である let-7 の前駆体であることが明らかとなった。

Drosha-DGCR8 複合体において pri-miRNA との結合に関与しているのは DGCR8 である。そこで、NF90-NF45 と DGCR8 の pri-miRNA に対する競合実験を pri-let-7 をプローブにした RNA ゲルシフトを用いて行った結果、NF90-NF45 が DGCR8 より pri-let-7 に対し高い結合活性を有することが明らかとなった。

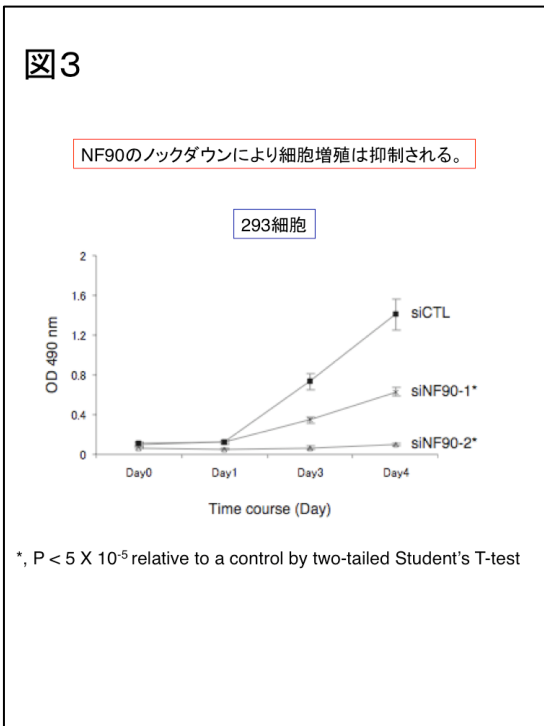


これらの結果より、NF90-NF45 による pri-miRNA の蓄積は、pri-miRNA に結合した NF90-NF45 が Drosha-DGCR8 の接近を阻害するためではないかと想定された。

(3) 293 細胞において NF90 をノックダウンした後、pri-miRNA 及び miRNA の発現を測定した結果、期待したように pri-let-7 の低下及び成熟型 let-7 の増加が確認された(図2)。しかしながら、NF90-NF45 と親和性の低い pri-miRNA やそのプロセッシングから産生される成熟型 miRNA の発現には有意な変動は確認できなかった。この結果と pri-miRNA 結合解析の結果を付せて考えると、NF90-NF45 による pri-miRNA のプロセッシングの阻害は、これらの蛋白質と高い結合活性を有する pri-miRNA において顕著に見られる現象ではないかと想定された。

let-7 は細胞増殖抑制能を有することが知られている。そこで、293 細胞で NF90 をノックダウンし、細胞増殖速度を測定した結果、NF90 の減少により、細胞増殖が著しく抑制されることがわかった(図3)。

これらの解析結果により、NF90-NF45 発現増加 → let-7 低下 → 細胞増殖促進 というモデルが提唱できた。



(4) Ad 感染における NF90 の関与を検討するために、NF90 をノックダウンした 293 細胞にルシフェラーゼ (luc) を組み込んだ Ad を感染させ、luc 活性を指標に Ad 増殖効率を解析した。その結果、NF90 のノックダウンにより顕著な Ad 増殖率の上昇が確認された。しかしながら、他のグループにより NF90 ノックダ

ウンは著しい luc 活性の上昇を引き起こすことが報告された。従って現在、luc 活性を使用しない Ad 増殖効率の測定法を用いて、Ad 増殖における NF90 ノックダウンの影響を再検討している。

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 2 件)

1. **Sakamoto S.**, Aoki K, Higuchi T, Todaka H, Morisawa K, Tamaki N, Hatano E, Fukushima A, Taniguchi T, Agata Y. The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. **Molecular and Cellular Biology**. 査読有り, (In Press) 2009.
2. Agata Y, Tamaki N, **Sakamoto S.** Ikawa T, Masuda K, Kawamoto H, Murre C. Regulation of T Cell Receptor β gene Rearrangements and Allelic Exclusion by the Helix-Loop-Helix Protein, E47. **Immunity**. 査読有り, 27: :871-884. 2007.

[学会発表] (計 5 件)

1. **Sakamoto S.** miRNA 生合成における NF90 family-NF45 の役割及び肝細胞癌における発現解析. 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会. 2008.12.9-11. 神戸ポートアイランド (神戸).
2. Morisawa K. マウス樹状細胞 DC2.4 における IL-27p28 遺伝子の抑制および活性化機構. 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会. 2008.12.9-11. 神戸ポートアイランド (神戸).
3. **Sakamoto S.** 肝細胞癌における二本鎖 RNA 結合蛋白質 NF90 family-NF45 の発現及びその役割. 第 49 回日本生化学会・中国・四国支部例会. 2008.5.16-17. アルファあなぶきホール (香川).
4. **Sakamoto S.** Primary miRNAs are accumulated by co-expression of NF90 and its binding partner, NF45. 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会. 2007.12.11. パシフィコ横浜 (横浜).
5. **Sakamoto S.** マイクロ RNA 生合成経路における二本鎖 RNA 結合タンパク質 Nuclear Factor 90 (NF90) の役割. 第 48 回日本生化学会・中国・四国支部例会. 2007.5.20. 高知市文化プラザかるぽーと (高知).

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 修士 (SAKAMOTO SHUJI)

高知大学・教育研究部自然科学系・助教

研究者番号: 80397546

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし