

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370070

研究課題名（和文） 転写・RNA プロセッシング・輸送の機能的連携と統合による遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名（英文） Studies on a mechanism for the coordinated regulation of gene expression by functional linkage among transcription, RNA processing and transport

研究代表者

谷 時雄 (TANI TOKIO)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80197516

研究成果の概要（和文）：遺伝子の転写・pre-mRNA スプライシング・mRNA 核外輸送など、従来は個別に研究されてきた諸反応が、生体内では互いに連携もしくは共役しながら進行していることが近年明らかになりつつある。しかし、その分子機構には未だ謎が多いのが現状である。本研究において、スプライシングやmRNA核外輸送の分裂酵母変異株の原因遺伝子の機能及び相相互作用解析を行い、真核生物における遺伝子発現を統合的に制御する機構の一部を解明した。

研究成果の概要（英文）：Recent emerging evidence suggested that a functional linkage among transcription, pre-mRNA splicing and nuclear mRNA export, which had been analyzed independently, exists in a living cell. However, the molecular mechanism of the linkage still remains unclear. In this study, we analyzed the genes responsible for the fission yeast mutations that cause defective pre-mRNA splicing and nuclear mRNA export, and elucidated a part of the molecular mechanism of coordinated regulation of gene expression in eukaryotic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：スプライシング、転写、mRNA 輸送、分裂酵母、遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の保存と転写の場である核と、タンパク質への翻訳の場である細胞質が核膜によって区画化されていること、また、ほとんどの遺伝子にイントロンが存在することは、真核細胞のみに見られる大きな特徴である。これらの特徴により、mRNA 前駆体からイ

ントロンを取り除くスプライシング反応と、スプライシング反応を経た成熟 mRNA の核から細胞質への輸送は、真核生物の遺伝子発現において必ず必要とされる生命活動の重要過程となっている。

我々は、pre-mRNA スプライシングと mRNA 核外輸送の分子機構を解明するために、遺伝

学的操作が行いやすく、かつ遺伝子の構造やスプライス部位配列の保存性など、多くの点でヒトを含む高等真核生物と類似点の多い、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* をモデル生物に用いて研究を進めてきた。具体的には、分裂酵母の pre-mRNA スプライシングと mRNA 核外輸送の温度感受性変異株を多数分離し、それらの原因遺伝子をクローニングすることを行ってきた。原因遺伝子の機能解析や表現型解析により、スプライシングと核外輸送の分子機構とそれらの連携システムを解明できると考えた。

いくつかの酵母変異株の表現型解析を含めた種々の解析によって、従来はそれぞれが独立した反応と考えられていた遺伝子発現の諸反応、即ち、遺伝子の転写、mRNA 3' 末端形成、スプライシング、mRNA 核外輸送が、細胞内においては密接な連携機構の下に進行している可能性が示唆された。これら諸反応の多くは、独立した反応系として *in vitro* で個々に再現が可能である。しかし、細胞内においては、遺伝子発現の効率や特異性を最大限にするため、遺伝子の転写から輸送までの反応を密接に連携して行う「Gene expression factory」とも称すべき機構が存在していると考えられた。

「Gene expression factory」の存在、即ち、遺伝子の転写機構と転写後のスプライシングや核外輸送との連携システムは、近年大きな注目を浴びている（例えば Maniatis and Reed, Nature 2002）。しかしながら、その分子基盤と制御については、未だ十分に解明されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

遺伝子の転写・pre-mRNA スプライシング・mRNA 核外輸送など、従来は個別に研究されてきた諸反応が、生体内では互いに連携もしくは共役しながら進行していることが近年明らかになりつつある。しかし、その分子機構には未だ謎が多いのが現状である。

本研究では、現在まで精力的に進めてきたスプライシングや mRNA 核外輸送の分裂酵母変異株の原因遺伝子の機能及び相互作用解析を更に進め、細胞内での転写、プロセッシング、mRNA 核外輸送の連携システムについて、お互いの時空間的な相互作用による機能的連携や共役に焦点をあて、遺伝学・生化学・細胞生物学・蛍光イメージングの手法を駆使して詳細に解析し、真核生物における「Gene expression factory」の実態、すなわち遺伝子発現の統合的制御ネットワークの分子基盤とその仕組みを解明することを目的とし

た。

3. 研究の方法

(1) 転写・mRNA 3' 末端形成と mRNA 核外輸送の連携機構に関する解析

分裂酵母 mRNA 核外輸送変異株 *ptr5*, 7, 8, 9 及び 10 について、それぞれの原因遺伝子をクローニングし、それら遺伝子の機能解析を遺伝学や生化学的手法を駆使して行い、転写・mRNA プロセッシングと mRNA 核外輸送機構との関連を解明する。

(2) 転写・mRNA 核外輸送とスプライシングとの連携機構に関する解析

現在までに分離したスプライシング変異株 *prp1*~14 における mRNA 核外輸送阻害を、oligo dT プローブを用いた *in situ* hybridization や遺伝学的手法によって解析し、スプライシングと mRNA 核外輸送の連携について検証する。

(3) 蛍光イメージングによる遺伝子発現プロセスの可視化解析

我々は、GFP タグシステムにより分裂酵母内で RNA を可視化し、局在化 RNA を網羅的にスクリーニングする実験系の確立に成功している。その GFP タグシステムを改良し、レポーター遺伝子の核内位置、転写された mRNA 及び翻訳されたタンパク質のそれぞれを CFP/YFP/Cherry 蛍光タンパク質で可視化する実験系を構築し、遺伝子の転写から翻訳までの発現過程や阻害時の表現型を、生きた野生型酵母内でリアルタイムに可視化解析する。

4. 研究成果

(1) 転写・mRNA 3' 末端形成と mRNA 核外輸送の連携機構に関する解析

① 分裂酵母 mRNA 核外輸送変異株 *ptr7* の原因遺伝子が mRNA の 3' 末形成複合体因子 Clp1 をコードしていることを明らかにし、mRNA の 3' 末形成と mRNA 核外輸送の間には密接な連携機構が存在していることを明らかにした。*ptr7* 変異株では制限温度下で mRNA の 3' 末に付加される poly A 鎖の伸長が観察され、そのことが輸送阻害に関連することが示唆された。

② *ptr7* 変異のサブレッサーを分離し、Ptr7p と機能的に相互作用する因子の同定を行った。その結果、サブレッサーとして、*ysh1* 遺伝子が同定された。また、*ysh1* サブレッサーの変異部位同定を行った。Ysh1p は 3' 末形成複合体を構成

する因子の一つとして知られていることから、Ptr7p と相互作用することで、mRNA 3' 末形成と mRNA の核外輸送を連携している可能性が示唆された。

(2) 転写・mRNA 核外輸送とスプライシングとの連携機構に関する解析

① 分裂酵母スプライシング変異株 *prp1* ~ *prp14* において mRNA の細胞内分布を *in situ* hybridization によって解析した結果、*prp1* と *prp3* では制限温度下で mRNA の核蓄積が検出され、スプライシング反応と mRNA 核外輸送との間の連携機構の存在が示唆された。また、核膜孔複合体因子 Nup85 遺伝子に変異をもつ *ptr5* 変異株と *prp8* などのスプライシング変異の間に、合成致死等の遺伝学的相互作用があることを明らかにした。これらの結果から、核膜孔複合体を介したスプライシングと mRNA 核外輸送の連携機構の存在が初めて示唆された。

② mRNA 核外輸送変異株 *ptr8* において、セントロメアのヘテロクロマチン形成に異常があることを、ChIP 解析や *ura4* レポーター遺伝子を用いたサイレンシングアッセイによって明らかにした。今後の解析により、染色体を不活性な状態に保つヘテロクロマチン形成に、mRNA 核外輸送関連因子が関与する新しい連携機構が明らかになることが期待される。また、mRNA 核外輸送変異 *ptr9* や *ptr10* が、転写と mRNA 核外輸送のカップリングを行う TREX2 の構成因子 Sus1p の過剰発現によって、抑制されることを明らかにした。これらの結果は、Ptr9p と Ptr10p (膜結合蛋白質) が TREX2 複合体を介して mRNA 核外輸送過程に関与している可能性を示唆する。

③ 分裂酵母の機能未知因子 spRNPS1 がスプライソソームの構成成分であること、また spRNPS1 が mRNA 核外輸送に関わる TREX 複合体因子と機能的相互作用を示すことを、遺伝学的解析及び免疫共沈析により明らかにした。spRNPS1 は、分裂酵母においてスプライシング後の成熟 mRNA を mRNA 核外輸送経路にリンクさせる機能を持つことが示唆された。

④ mRNA の核外輸送に関わる核膜結合因子 Ptr10p の変異が、転写伸長と mRNA 核外輸送に関わる Thp2 (TREX 複合体構成因子) の過剰発現によって機能相補されることを明らかにした。Ptr10p は転写と mRNA 核外輸送をリンクする因子の一つである可能性が強く支持された。

(3) 蛍光イメージングによる遺伝子発現プロセスの可視化解析

GFP タグシステムにより分裂酵母内で局在化 RNA を網羅的に可視化する系を構築し、新規な分裂酵母局在化 RNA を多数同定した。更に、レポーター遺伝子の核内位置、転写された mRNA 及び翻訳されたタンパク質のそれぞれを蛍光タンパク質で可視化する実験系構築を試みた。可視化プラスミドの構造を図 1 に示す。CFP-lac repressor と Lac operator repeat 配列により核内における遺伝子の位置を可視化し、U1A-YFP と U1A binding repeat 配列により転写された mRNA を可視化し、タンパク質への翻訳を Cherry タンパク質の蛍

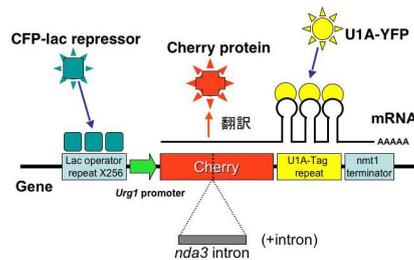


図1 遺伝子発現可視化レポーターの概要

光によって可視化するように設計した。遺伝子位置の可視化以外の部分を研究期間内に構築し、可視化に成功した。

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 10 件)

(1) **A novel ER J-protein DNAJB12 accelerates ER-associated degradation of membrane proteins including CFTR.** Yo-hei Yamamoto, Taiji Kimura, Shuku Momohara, Masato Takeuchi, Tokio Tani, Yukio Kimata, Hiroshi Kadokura and Kenji Kohno.

Cell Structure and Function, 35, 107-116 (2010) 査読あり

(2) **Involvement of the spliceosomal U4 snRNA in heterochromatic gene silencing at fission yeast centromeres.** Madoka Chinen, Misato Morita, Kazuhiro Fukumura and Tokio Tani.

J. Biol. Chem., 285, 5630-5638 (2010) 査読あり

(3) **Critical role of Pcid2 in B cell survival through the regulation of MAD2 expression.** Teruo Nakaya, Kazuhiko Kuwahara, Kazutaka Ohta, Masahiro Kitabatake, Teppei Toda, Naoki Takeda,

Tokio Tani, Eisaku Kondo and Nobuo Sakaguchi. *J. Immunol.*, 185, 5180-5187 (2010) 査読あり

(4) **RAD18 promotes DNA double-strand break**

repair during G1 phase through chromatin retention of 53BP1. Kenji Watanabe, Kuniyoshi Iwabuchi, Jinghua Sun, Yuri Tsuji, Tokio Tani, Kazuaki Tokunaga, Takayasu Date, Mitsumasa Hashimoto, Masaru Yamaizumi and Satoshi Tateishi. *Nucleic Acids Res.*, 37, 2176-2193 (2009). 査読有り

(5) 分裂酵母における構成的スプライシング制御機構の分子遺伝学的解析 原口典子、谷時雄、蛋白質核酸酵素 増刊号「mRNAプログラム」、54(16), 2038-2043 (2009) 査読なし

(6) 酵母の遺伝学的解析から見えてきたmRNA核外輸送の素過程と連携 谷時雄、蛋白質核酸酵素 増刊号「mRNAプログラム」、54(16), 2102-2108 (2009) 査読無し

(7) mRNAのスプライシングと核外輸送のダイナミクス 谷時雄、実験医学、27, 131-138 (2009) 査読なし

(8) Monitoring of mRNA export.

Kazuaki Tokunaga and Tokio Tani.

Current Protocols in Cell Biology, Chapter 22, Unit 22-13, 1-22 (2008). 査読あり

(9) Sl-1 nuclear domains: characterization and dynamics as a function of transcriptional activity.

Akira Inoue, Katsuji Tsugawa, Kazuaki Tokunaga, Kenichi P. Takahashi, Shigehiko Uni, Masatsugu Kimura, Koji Nishio, Naoki Yamamoto, Ken-ichi Honda, Takanori Watanabe, Hideo Yamane and Tokio Tani.

Biology of the Cell, 100, 523-535 (2008) 査読有り

(10) The dynamics of pre-mRNAs and poly(A)⁺ RNA at speckles in living cells revealed by iFRAP studies. Yo Ishihama, Hisashi Tadakuma, Tokio Tani and Takashi Funatsu.

Exp. Cell Res., 314, 748-762 (2008) 査読有り

[学会発表] (計 19 件)

(1) 水谷文哉、RNAi機構を介したセントロメアヘテロクロマチン形成への分裂酵母基本転写因子複合体TFIIH構成因子Ptr8pの関与、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7日、神戸ポートアイランド国際会議場

(2) 松尾陽太、バイオプローブを用いた核スペックルの機能解析、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7日、神戸ポートアイランド国際会議場

(3) 三原由揮、核スペックルへのpoly(A)⁺ RNA局在に影響を与える化合物のスクリーニング、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7日、神戸ポートアイランド国際会議場

(4) 大越慶太、分裂酵母RNA結合タンパク質spRNPS1の機能解析、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7日、神戸ポートアイランド国際会議場

(5) 齋藤希、膜結合タンパク質Ptr10pはTR EX-2複合体を介してmRNA核外輸送に関与する、第12回日本RNAミーティング、2010年7月27日、学術総合センター

(6) Madoka Chinen, Involvement of the splicing machinery in heterochromatic gene silencing at fission yeast centromere, Gordon Research Conference, July 18, 2010, 米国Salve Regina University

(7) Sachiko Hayashi, *EGDI* (β -NAC) mRNA localizes in a novel cytoplasmic structure in *Saccharomyces cerevisiae*, Gordon Research Conference, July 18, 2010, 米国Salve Regina University

(8) 知念まどか、分裂酵母スプライシング変異株が示すセントロメアヘテロクロマチン形成異常、第9回核ダイナミクス研究会、2010年5月27日、ラフォーレ修善寺

(9) 松尾陽太、核内構造体(核スペックル)形成阻害化合物のスクリーニングと転写後遺伝子発現制御機構解析への応用、日本ケミカルバイオロジー学会 2010年5月18日、慶應義塾大学

(10) Sachiko Hayashi, Localization of *EGDI* (β -NAC) mRNAs in a cytoplasmic aggresome-like granule in *S. cerevisiae*, 第19回CDBミーティング、2010年5月10日、理化学研究所

(11) Madoka Chinen, Involvement of the spliceosomal U4 snRNA in heterochromatic gene silencing at fission yeast centromeres, 第19回CDBミーティング、2010年5月10日、理化学研究所

(12) Nozomi Saitoh, Membrane-bound Protein Ptr10p is Involved in the Nuclear mRNA Export Through the TR EX2 Complex in Fission Yeast, 第19回CDBミーティング、2010年5月10日、理化学研究所

(13) 森田京、分裂酵母スプライシング因子Prp14pはRNAiを介したヘテロクロマチン形成に必要なである、第32回日本分子生物学会2009年12月9日、パシフィコ横浜

(14) Madoka Chinen, A mutation in U4 snRNA causes defective centromeric silencing in fission yeast, The 5th fission yeast meeting, 2009年10

- 月26日、National Olympics Memorial Youth Center
- (15) Nobuyoshi Watanabe, Functional analysis of the *ptr5⁻/nup85⁺* gene involved in nuclear mRNA export, The 5th fission yeast meeting, 2009年10月26日、National Olympics Memorial Youth Center
- (16) Tokio Tani, Involvement of the pre-mRNA splicing machinery in the RNAi-mediated heterochromatic silencing in fission yeast, The 5th fission yeast meeting, 2009年10月26日、National Olympics Memorial Youth Center
- (17) 知念まどか、分裂酵母U4snRNA変異株が示すセントロメアヘテロクロマチンの形成異常、第11回RNAミーティング、2009年7月27日、新潟コンベンションセンター
- (18) 森田京、セントロメアヘテロクロマチン形成における分裂酵母スプライシング因子Prp14pの機能解析、第8回核ダイナミクス研究会、2009年6月18日、ラフォーレ修善寺
- (19) 永目尚子、mRNAの3'形成とmRNA核外輸送の連携、第31回日本分子生物学会、2008年12月12日、神戸ポートアイランド国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://aster.sci.kumamoto-u.ac.jp/~biohome/staff/tani/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 時雄 (TANI TOKIO)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80197516