

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号	14301
研究種目	挑戦的萌芽研究
研究期間	2011～2012
課題番号	23658289
研究課題名（和文）	次世代シーケンサによる細胞核 mRNA 動態解析基盤と品質管理因子の作用機序の解析
研究課題名（英文）	Analysis of the molecular basis for mRNA dynamics in the nucleus using next generation sequencer and the function for the factor(s) of quality control.
研究代表者	増田 誠司 (MASUDA SEIJI) 京都大学・大学院生命科学研究科・准教授 研究者番号：20260614

研究成果の概要（和文）：

mRNAの細胞核での品質管理については未解明の部分が多く残されている。本研究は、核内における mRNA品質管理に関わる因子の作用機序を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いた細胞核 mRNA動態の網羅的解析を行う。加えてコンベンショナルな方法によりその重要性を提示する。

エキソソームの構成因子の一つ RRP45 と MTR4 をそれぞれノックダウンしたヒト細胞からその内容を次世代シーケンサーによって網羅的に解析した。読まれた全シーケンスをゲノム上にマッピングし、転写物の存在比の変化をコントロール細胞由来の解析結果と比較した。RRP45 と MTR4 によって顕著に発現の上昇する遺伝子を特定した。

次いでコンベンショナルな方法によるヒト TRAMP (PAPD5-ZCCHC7-MTR4) 複合体の同定と局在の解析を行った。エキソソームや MTR4 は、核質に局在していることを観察した。また PAPD5、ZCCHC7 は、いずれも核内に局在することを確認した。さらにヒト TRAMP 複合体の候補因子が細胞内で相互作用していることを免疫沈降実験により確認した。

研究成果の概要（英文）：

The mRNA quality control in the nucleus remains largely unknown. Here, to analyze the molecular function of mRNA quality control factors in the nucleus, whole transcriptome analysis of the mRNA dynamics in the nucleus was exploited. And the importance of the mRNA quality control was also investigated using the conventional biochemical and molecular biology methods.

The whole transcriptome was analyzed from the cells treated with siRNA of RRP45, a core component of exosome, or MTR4, a subcomponent of exosome. Whole reads were mapped on the human genome and the changes of the number of reads mapped on the specific region were compared between siRNA treated- and control cells. The genes whose expressions were markedly increased were selected by the treatment of siRNA of RRP45 or MTR4.

Next, the identification and localization of human TRAMP (PAPD5-ZCCHC7-MTR4) complex were analyzed using conventional methods like immunoprecipitation and immunostaining. Exosome and MTR4 were localized in the nucleolus. PAPD5 and ZCCHC7 were localized in the nucleus. The candidate molecules of human TRAMP complex were associated in the nuclear extract.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：mRNA、次世代シーケンサ、品質管理因子

1. 研究開始当初の背景

タンパク質をコードする mRNA は、細胞核内で RNA ポリメラーゼ II によって合成され、キャッピング、スプライシング、ポリアダニル化といったプロセッシングを受ける。細胞核内で mRNA は、品質管理機構によってチェックされプロセッシングを完了した mRNA のみが細胞質へと輸送されてタンパク質翻訳の鋳型となる。mRNA は、細胞質でも最初のタンパク質翻訳の際に再度品質管理のチェックを受ける。その理由は、mRNA の不備により機能不全のタンパク質を合成することを防止することにある。事実、ヒトの遺伝病の約 20% は mRNA の品質管理が働かなくなるために生じる。このことから mRNA の品質管理に関わる因子の同定とその作用機序の理解は、mRNA 成熟ネットワークを理解する上で極めて重要な研究課題と認識されてきた。

mRNA の品質管理のうち細胞質での品質管理機構は、この 5 年間で急速に進行した。一方細胞核での品質管理機構は、まだよくわかっていない。

報告者は、これまで mRNA の核内における mRNA プロセッシングと細胞質への輸送を共役する TREX や AREX 複合体の機能解析を通して mRNA 成熟ネットワークの解明を進めてきた (Masuda *et al. Nature*, 417, 304-308, 2002., Masuda *et al. Genes Dev.*, 19, 1512-1517, 2005., Yamazaki *et al. Mol. Biol. Cell*, 21, 2953-2965, 2010)。その過程で、mRNA プロセッシング因子をノックダウンすると細胞核内に mRNA が蓄積する現象を数多く観察してきた。加えて次世代シーケンサを用いた予備的解析から、細胞核内に蓄積された mRNA の中身はノックダウンした mRNA プロセッシング因子によって全く異なっていることを見いだした。この観察から報告者は、次世代シーケンサを用いて細胞核に蓄積した mRNA あるいはその前駆体 mRNA の網羅的解析を行い、解析する mRNA の有力候補を複数選定したあと従来法により作用機序を解析する方法論を採用した。

2. 研究の目的

タンパク質の分解が主としてプロテアソームによって行われているように、mRNA の分解 (品質管理) は主としてエキソソームが担当している。エキソソームは、10 個ほどのサブユニットからなる RNA 分解酵素である。細胞質での mRNA の品質管理は、DECID と呼ばれる複合体がエキソソームを mRNA 上にリクルートし、分解に導くことがわかってきた。しかし mRNA の様々なプロセッシングが行われる細胞核での品質管理については未解明の部分が多く残されている。本研究は、核内における mRNA 品質管理に関わる因子の作用機序を明らかにするために、次世代シーケンサを用いた細胞核 mRNA 動態の網羅的解析を行う。加えてコンベンショナルな方法によりその重要性を提示する。これらの解析により核内の mRNA 品質管理の分子機構を解明する基盤を構築する。

3. 研究の方法

(3-1) 次世代シーケンサーによる核内に蓄積した mRNA 種の同定

エキソソームの構成因子の一つ RRP45 (RRP45 をノックダウンするとエキソソーム全体がノックダウンされる) と MTR4 をそれぞれノックダウンしたヒト細胞から核を単離し、細胞核 RNA を抽出する。ノックダウンの確認は、特異抗体を用いた Western 解析により行う。mRNA をオリゴ dT を用いて精製し、その内容を次世代シーケンサーによって網羅的に解析する。読まれた全シーケンスをゲノム上にマッピングする。各領域由来の転写物の存在比の変化をコントロール細胞由来の解析結果と比較する。プロファイルに大きな変化 (増加) がある場合、その因子は RNA 品質管理において重要な役割を持つと判断する。上記 2 因子のノックダウン時に大きな変化を見せた mRNA を標的分子候補として複数抽出する。

(3-2) RNA 品質管理における作用点の情報抽出

(3-1) で標的分子の候補となった個々の mRNA について 2 因子それぞれのノックダウン時にどのようなプロセッシング過程にある分子が増加したか解析する。細胞質 mRNA の

みを対象とする従来の解析と異なり、通常では解析されることのない核内の未成熟 mRNA を解析するための独自プログラムを必要とする。そのためこの分野に造詣の深い三重大学生物資源学研究所の奥村研究室と連携して行う。

(3-3) PAPD5、ZCCHC7 の細胞内局在の観察
エキソソームや MTR4 は、核質に局在していることを観察している。PAPD5、ZCCHC7 の細胞内局在を蛍光免疫染色で観察する。

(3-4) ヒト TRAMP(PAPD5-ZCCHC7-MTR4) 複合体の同定

これまでの解析から同定した因子が真のヒト TRAMP 複合体であるかについて、免疫沈降法により検証する。それぞれの抗体を用いて Western 解析により検証する。さらに抗 PAPD5 抗体・抗 ZCCHC7 抗体・抗 MTR4 抗体を用いて免疫沈降し、他の 2 つの因子が共沈することを Western で解析する。エキソソームとの相互作用も同様に評価する。また Flag などのタグをつけた MTR4 を発現する細胞株を取得し、他の 2 因子を検出する。最後に他の 2 つの因子にタグをつけた場合も同様の結果が得られることを示す。

(3-5) ヒト TRAMP(PAPD5-ZCCHC7-MTR4) 複合体の活性測定

核内の mRNA 品質管理をうける mRNA は、短いポリ A の付加を TRAMP 複合体によって受ける。これら 3 者を大腸菌で発現し精製した標品、³²P で標識したオリゴ A と ATP を用いてポリ A の付加活性を観察する。

4. 研究成果

(4-1) 次世代シーケンサーによる核内に蓄積した mRNA 種の同定

エキソソームによって分解される核内 mRNA ターゲットを同定するためにエキソソームのコアサブユニット構成因子 RRP45 や MTR4 をノックダウンした細胞から核内の RNA を抽出し、次世代シーケンサーで解析した。その結果 mRNA だけでなく様々な non-coding RNA やノイズ RNA の安定化がみられることを見いだした。表 1 に次世代シーケンサーで解析した結果について、対照群と比較したものを示した。MTR4 あるいは RRP45 をノックダウンすると有意に差が認め

られた。このことから、次世代シーケンサーによる解析は成功したと判断した。

表 1 RNA 品質管理因子ノックダウンによる RNA 種の相関

実験 1	実験 2	コントロール	MTR4	RRP45
コントロール		0.976	0.876 *	0.890 *
MTR4(TRAMP 複合体)		n.d.	0.985	n.d.
RRP45 (エキソソーム)		n.d.	0.956	0.978

*: p < 0.01

次いで、顕著な差の認められる遺伝子をピックアップした。その結果を図 1 に示した。

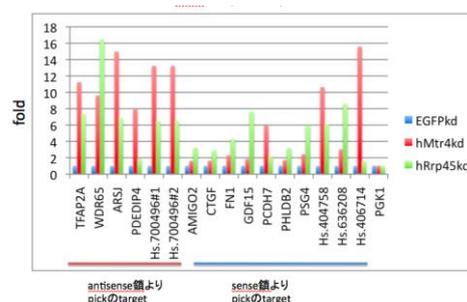


図 1 MTR4 あるいは RRP45 で顕著に差の認められる遺伝子

この解析が妥当であるかについて検証するために、リアルタイム PCR を行った。その結果を図 2 に示した。次世代シーケンサーでの解析結果と同様の結果が得られた。この解析から、MTR4 や RRP45 の標的となる遺伝子の同定に成功した。

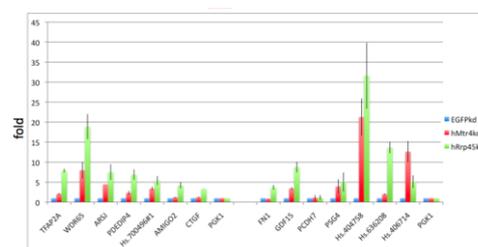


図 2 リアルタイム PCR による解析

(4-2) PAPD5、ZCCHC7 の細胞内局在の観察

Flag でタグを入れた PAPD5、ZCCHC7 を細胞に発現させた。抗体を用いて局在を観察した結果、いずれも核内に存在した。

(4-3) 核内 RNA 分解複合体の同定と物理的相互作用の解析

RRP45 や MTR4 をノックダウンすると、核内に短いオリゴ A 鎖 (mRNA に付加される長いポリ A に対して短いという意味) の付加された転写物が蓄積した。同様に、A 付加された RNA の核内への蓄積は、核内のエキソソームに特異的な補因子である MTR4 をノックダウンした際にも観察

された (図3)。一方、細胞質側エキソソームに特異的な補因子のノックダウン時

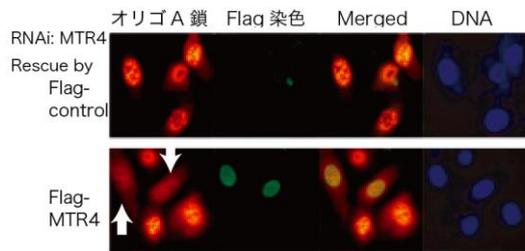


図3 RNA 分解に関わる MTR4 による RNA 動態解析例

MTR4 のノックダウンとレスキュー実験を示している。MTR4 をノックダウンすると、核にオリゴ A 鎖をもつ RNA が蓄積する。野生型のレスキュー MTR4 を発現した細胞 (矢印) はオリゴ A 鎖をもつ RNA 蓄積が減少する。

には観察されないことから、核内エキソソームの機能阻害に特異的な表現型であるといえる。この結果から、出芽酵母でみられるオリゴ A 鎖付与によるエキソソームの基質分解の促進は、ヒトにおいてもある程度相同の機構が存在すると予測した。そこで、核内エキソソーム特異的阻害で見られる表現型を指標にして、基質の認識および A 鎖付加を担う因子として PAPD5 と ZCCHC7 をそれぞれ同定した。PAPD5 または ZCCHC7 との同時ノックダウンによって核内エキソソームの機能阻害時に観察される A 鎖付与された RNA の核蓄積は大幅に緩和された。PAPD5 の RNA 3' 末端への A 付与活性を *in vitro* で評価したところ、通常の mRNA にポリ A 鎖を付与するポリ A ポリメラーゼに比べて付与する A の長さは短く、出芽酵母で報告されている TRAMP による基質 RNA への A 付加を想起させるものだった。

次いで、ヒトエキソソームのコアサブユニットやヒト核内エキソソームの補因子を特異的に認識する抗体を作成した。この抗体と純度の高いヒト細胞由来核抽出物を用いることで、核内のエキソソームを細胞質エキソソームと生化学的に分離して解析することに成功した。これらを用いた免疫沈降によってエキソソームと相互作用する因子を探索した結果、いくつかの核特異的因子を同定した。また、前述の PAPD5 および ZCCHC7 と核内エキソソームとの相互作用を検出した。さらに、ノックダウンとそれぞれの因子に対する特異的抗体を用いた免疫沈降を組み合わせて各因子間の物理的相互作用様式を解析し、MTR4、RRP6、MPP6、C1D は、PAPD5 と

ZCCHC7 からなる A 鎖付加活性とエキソソームの持つ RNA 分解活性を物理的に結びつけるアダプターとして機能していることを見出した。

RRP6 と MPP6 あるいは C1D と MPP6 を同時にノックダウン (ヌクレアーゼ活性を持ったエキソソームが A 鎖付加活性と物理的に接触できない場合) すると、エキソソームのコアサブユニットノックダウン時に見られたのと同様に A 付加された RNA の核蓄積が観察されるようになり、生化学的手法で解析した複合体の形成様式が裏付けられた。これらのことから、これら核内で RNA 分解を担う複合体を RNA 分解複合体と命名した。

以上の解析により、核内 RNA 品質管理に関与する因子の同定と物理的相互作用を行った。また基質となる RNA 種の同定に成功した。

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 7 件)

(1) 松村 嘉員、増田 誠司 mRNA 核外輸送の効率化による動物細胞タンパク質生産バイオサイエンスとインダストリー、70, 373-375, 2012 (査読無)
<http://www.jba.or.jp/pc/bi/>

(2) Fujita, K-I., Okamura, M., Nishimoto, S., Kurihara, T., Momma, K., Miyamae, Y., Kambe, T., Nagao, M., Narita, H. and Masuda, S. Establishment of the monitoring system which detects the inhibition of mRNA processing. Biosci. Biotechnol. Biochem., 76, 1248-1251, 2012 (査読有)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/76/6/76_120226/_article

(3) 山崎智弘、増田誠司 mRNA 輸送体の多様化とその生物学的意義、化学と生物、50, 9-11, 2012 (査読無)
http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/

(4) Aihara, Y., Fujiwara, N., Yamazaki, T., Kambe, T., Nagao, M., Hirose, Y., Masuda, S. Enhancing recombinant protein production in human cell lines with a constitutive transport element and mRNA export proteins. J. Biotechnol. 153, 86-91, 2011 (査読有)
doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.03.024.

(5) Abe, S., Sasaki, R. and Masuda, S. An extra

high dose of erythropoietin fails to support the proliferation of erythropoietin dependent cell lines. *Cytotechnology*, 63, 101-109, 2011 (査読有)
doi: 10.1007/s10616-011-9345-x.

(6) Yasuda, Y., Maeda, Y., Hara, S., Tanaka, M., Koike, E., Watanabe, Y., Masuda, S., Yamasaki, H., Konishi, H., Horiuchi, Y. and Hoshiai, H. Constitutively active soluble form of erythropoietin receptor suppresses growth and angiogenesis of xenografts of transfected cancer cell lines. *J. Cancer Therapy* 2, 40-53, 2011 (査読有)
<http://www.scirp.org/journal/jct/>

(7) Fukunaka, A., Kurokawa, Y., Teranishi, F., Sekler, I., Oda, K., Ackland, M.L., Faundez, V., Hiromura, M., Masuda, S., Nagao, M., Enomoto, S. and Kambe, T. Tissue nonspecific alkaline phosphatase is activated via a two-step mechanism by zinc transport complexes in the early secretory pathway. *J Biol Chem.* 286, 16363-16373, 2011 (査読有)
doi: 10.1074/jbc.M111.227173.

[学会発表] (計 11 件)

(1) 藤田賢一、南裕基、平山瑞季、増田誠司、mRNA 輸送因子 UAP56 ならびに URH49 における複合体形成制御領域の同定、第 35 回日本分子生物学会、2012

(2) 志岐拓哉、岡村真純、伊藤慶紗、増田誠司、DBP5 の核-細胞質間移行は mRNA 輸送に必須である、第 35 回日本分子生物学会、2012

(3) N. Fujiwara, K. Okumura, T. Fujiwara, S. Masuda, Disturbing the function of the nuclear exosome results in the accumulation of adenylated RNA in human nuclei., the 4th EMBO meeting、2012

(4) 藤原奈央子、程開明、永尾雅哉、神戸大朋、宮前友策、増田誠司、ヒト核内エキソソームはアデニン鎖の付加された RNA 基質を分解する、第 14 回日本 RNA 学会年会 (第 14 回 RNA ミーティング)、2012

(5) 藤田賢一、宮前友策、永尾雅哉、神戸大朋、増田誠司、mRNA 輸送因子 UAP56 と URH49 の形成する異なる複合体構築機構の解明、日本農芸化学大会、2012

(6) 志岐拓哉、宮前友策、永尾雅哉、神戸大朋、増田誠司、mRNA 輸送因子 DBP5 の核-細胞質間輸送と mRNA 輸送の相関性、日本農

芸化学大会、2012

(7) 藤原奈央子、弓立涼介、吳攸、増田誠司、ヒト核内 RNA 品質管理機構におけるポリアデニル化およびエキソヌクレアーゼ hRrp6 の関与について、口頭、平成 23 年度日本農芸化学会 関西・中部支部合同大会、2011

(8) 藤田賢一、栗原朋也、山崎智弘、増田誠司、mRNA 核外輸送因子 UAP56 と URH49 の形成する複合体の分子基盤解析、平成 23 年度日本農芸化学会 関西・中部支部合同大会、2011

(9) 志岐拓哉、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司、mRNA 輸送と mRNA 輸送必須因子 DBP5 の核内移行との関係性、日本農芸化学 2011 年度大会、2011

(10) 増田誠司、mRNA 輸送体の多様化と機能分担 (シンポジウム、遺伝子動態解析技術の進歩と発現制御)、日本農芸化学大会、2011

(11) 藤原奈央子、増田誠司、ヒト核内 RNA 品質管理機構における標的 RNA 分子への A 付加と分解はエキソソームと RNA ヘリカーゼ MTR4 の相互作用を通じて協調される、第 84 回日本生化学会大会、2011

[図書] (計 2 件)

(1) Fujiwara, N., Shiki, T., Masuda, S. mRNA biogenesis in the nucleus and its export to the cytoplasm. "Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology", eds by Najman, S., InTech - Open Access Publisher, ISBN 978-953-51-0544-2, pp131-152, 2012.

(2) 増田誠司(分担執筆) 化学同人 基礎生物学テキストシリーズ「分子生物学」 深見泰夫編、3 章 遺伝情報の発現・転写・プロセッシング、4 章 遺伝情報の輸送・翻訳 2011 年 3 月刊行

[その他]

http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/bunsh_ioutou/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 誠司 (MASUDA SEIJI)

京都大学・大学院生命科学研究所・准教授
研究者番号：20260614

(2) 研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

奥村 克純 (OKUMURA KATSUZUMI)
三重大学・大学院生物資源学研究科・教授
研究者番号：30177183