

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25251004

研究課題名(和文)細胞によるRNAポリメラーゼ 転写産物のソーティング機構

研究課題名(英文)Sorting mechanism for RNA polymerase II transcripts

研究代表者

大野 睦人(OHNO, Mutsuhito)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：80201979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：hnRNP Cの4量体の発現低下した細胞中では、U snRNA輸送因子が結合してしまったような異常mRNAの核外輸送が停止されることが分かっている。このようなmRNA複合体の異常を感知して発現を止める新規核内mRNA監視機構を明らかにする。4量体の活性と拮抗するPHAXに着目して解析したところ、U snRNAの核外輸送因子というかなり特殊な機能を持つと思われていたPHAXの発現低下が、ゲノムの不安定化を引き起こすことが明らかになった。この原因として、DNA損傷応答に重要なヒストンH2AXの発現が低下していることが分かり、PHAXのDNA損傷応答における重要性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It is known that mRNAs, aberrantly bound by U snRNA export factors due to low expression of hnRNP C, are not exported to the cytoplasm. We are interested in studying such a novel mechanism that monitors the integrity of nuclear mRNPs. Here we show that knock-down of PHAX, which has an antagonizing activity against hnRNP C, induced genome instability. We further show that PHAX somehow controls the expression of histone H2AX, which is a key player for DNA lesion responses.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNAポリメラーゼ RNA核外輸送 mRNA U snRNA hnRNP

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物では、ほとんどの RNA は核の中で合成されるが、その後の行き先は RNA 毎に決まっている。多くの RNA は核から細胞質へと輸送されるが、そのような RNA の主要なものとしては、リボソーム RNA (rRNA)、tRNA、ウリジンに富む核内低分子 RNA (U snRNA)、mRNA、マイクロ RNA (miRNA) 前駆体などがあげられる。これらの RNA は、それぞれの RNA 種に固有の輸送因子群が核内で結合した後、細胞質へと輸送される。核内でそれぞれの RNA に結合する因子群は、核外輸送を司るだけでなく、核外輸送後のそれぞれの RNA の運命 (局在化、翻訳、安定性など) をも規定することが明らかになってきた。

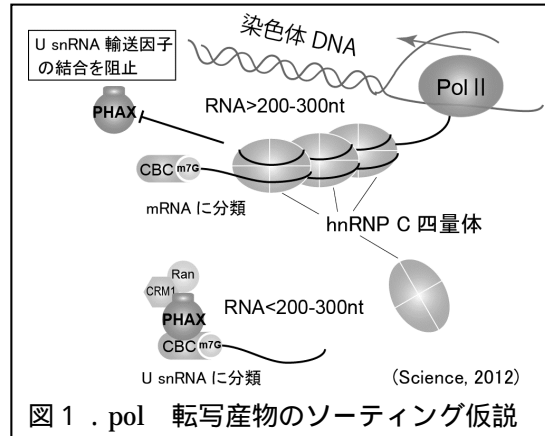
このことは、それぞれの RNA の種類が既に核の中で識別されていることを意味する。しかし、それぞれの RNA の種類のいかなる特徴が核内で識別されているのか、その識別を行う因子は何か、という点に関しては未知な部分が多かった。我々は特に mRNA に焦点を絞り、mRNA がもつ様々な特徴を、低分子 RNA である U snRNA に移植したキメラ RNA を作製し、その RNA の核外輸送を調べることで、mRNA を mRNA として識別させている特徴を探索してきた。

そのような mRNA を識別する特徴のひとつとして「RNA の長さ」を同定した (Mol. Cell, 2001; Genes Dev., 2004)。すなわち、強い高次構造を取らない様々な外来配列の挿入により長くされた U snRNA は mRNA の機構で輸送され、逆に、欠失により短鎖化されたイントロンレス mRNA は U snRNA の機構で核外へ輸送されたのである。その際、U snRNA の輸送因子である PHAX (phosphorylated adaptor for RNA export) は短い RNA には結合していたが長い RNA には結合しておらず、長さに応じて RNA に結合する輸送因子が切り替わっていることが分かった。その切り替わりの長さの境目は約 200~300 塩基長であった。このことは、細胞には RNA の長さを測り輸送経路を決定する機構が存在することを意味していたが、その分子機構については長い間謎であった。

我々は、様々な生化学的実験の結果、長い RNA と U snRNA 輸送因子 PHAX の結合を特異的に阻害する活性を、HeLa 細胞の核抽出液に見いだした。この活性の責任因子は、RNA の長さを認識し長い RNA 上から PHAX を取り除いている可能性が考えられた。我々はこの阻害活性を核抽出液から生化学的に精製し、責任因子として hnRNP C1/C2 のヘテロ 4 量体 (以下、4 量体) を同定した。大腸菌で産生した 4 量体は、試験管内で 200~300 塩基長以上の長さの RNA と特異的に結合し、その RNA から PHAX を解離させた。

さらに HeLa 細胞におけるノックダウン実験などから、細胞内でもこの 4 量体が PHAX と mRNA との結合を防いでおり、そうすることで mRNA 上に適正な輸送複合体が形成され mRNA 核外輸送が滞りなく行われるように管理していることを示す結果が得られた。

これらの結果にもとづき、細胞が RNA を長さに応じて分類する分子機構について、つぎのようなモデルを提唱した (図 1)。pol による転写開始の直後、染色体 DNA から新生 RNA の 5' 末端が現われはじめると、そこにキャップ構造が付加されさらにキャップ構造結合タンパク質複合体が結合する。この短い RNA が合成された時点ではこの RNA が将来どの程度まで長くなるのか、つまり、mRNA になるのか U snRNA になるのかはわからない。転写がさらに進み新生 RNA の長さが 200~300 塩基長より長くなると、4 量体が少なくともひとつ安定に結合できるようになり、そのような転写産物は mRNA 前駆体であると分類され同時に U snRNA の輸送タンパク質である PHAX の結合が阻害される。逆に、RNA の長さが 200~300 塩基長より短いまま転写が終了した場合、4 量体は安定に結合できず、そのような転写産物は U snRNA 前駆体であると分類され PHAX をはじめとした U snRNA の輸送タンパク質が RNA に呼び込まれる (Science, 2012)。



以上の結果は、多くの新しい疑問を提示することにもなった。pol の転写産物がソーティングされるメカニズムの全容を理解することを目指し、それらの新しい疑問の数々に挑む。

## 2. 研究の目的

hnRNP C の 4 量体がどのようにして 200~300 塩基長を認識できるのかを構造生物学的手法で明らかにする。また、4 量体は核内で RNA から解離して輸送因子などと置き換わると考えられるので、その解離・置換のダイナミックなメカニズムを明らかにする。また、4 量体をノックダウンした細胞中では、U snRNA 輸送因子が mRNA に結合してしま

うという異常な事態が起こり、このような異常 mRNA の核外輸送が停止されることが分かっている。このような mRNA 複合体の異常を感知して発現を止める新規核内 mRNA 監視機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

pol の転写産物がソーティングされるメカニズムの全容を理解するために以下のような複数の視点から接近する。

1. hnRNP C の 4 量体がどのようにして 200-300 塩基長を認識できるのかを構造生物学的手法で明らかにする。

2. 4 量体は核内で RNA から解離して輸送因子などと置き換わると考えられるので、その解離・置換のダイナミックなメカニズムを明らかにする。

3. 4 量体をロックダウンした細胞中では、U snRNA 輸送因子が mRNA に結合してしまうという異常な事態が起こり、このような異常 mRNA の核外輸送が停止されることが分かっている。このような mRNA 複合体の異常を感知して発現を止める新規核内 mRNA 監視機構を明らかにする。

### 4. 研究成果

1. hnRNP C の 4 量体が 200~300 塩基長を認識する様式を構造生物学的手法で明らかにする。hnRNP C のどのドメインが RNA の長さを認識しているのかの情報がタンパク質の結晶化を高効率化するためには重要である。hnRNP C は RNA 結合を担う RRM と BASIC の 2 つのドメインと、多量体形成に必要な ZIPPER や ACIDIC ドメインを持つ。hnRNP C の変異体解析により、RNA 分類には BASIC ドメインと ZIPPER ドメインが必要であることがわかった。BASIC ドメインは阻害活性における hnRNP C の RNA 結合に大きく寄与し、ZIPPER ドメインは RNA 結合活性を強化する。また、ZIPPER ドメインは RNA の長さの分類に寄与することが示唆された。この結果は論文投稿する準備中である。タンパク質の結晶化は本研究期間中には果たせなかったが、最小必須ドメインの情報が分かったので、今後引き続き取り組んでいきたい。

2. 4 量体の核内での解離・置換のダイナミックなメカニズムを明らかにする。HeLa 細胞核抽出液中に、4 量体を RNA から解離させる ATP 加水分解依存的な活性が存在することが分かっている。責任因子の生化学的精製・同定のためには試験管内の系を高効率化することが必須である。本研究期間中に様々な系を試したが、十分な高効率化を実現するには至らなかった。

3. 4 量体をロックダウンした細胞中では、

U snRNA 輸送因子が結合してしまったような異常 mRNA の核外輸送が停止されることが分かっている。このような mRNA 複合体の異常を感知して発現を止める新規核内 mRNA 監視機構を明らかにする。

H27 年度までは 4 量体を中心に研究していたが、H28 年度に 4 量体の活性と拮抗する PHAX のロックダウンの表現型を解析したところ、U snRNA の核外輸送因子というかなり特殊な機能を持つと思われていた PHAX の発現低下が、グローバルな転写の低下やゲノムの不安定化を引き起こすことが示唆され、PHAX 側からのアプローチの重要性が明らかになった。

そこで最終年度である H29 年度は、PHAX のロックダウンの表現型を中心に解析した。U snRNA の核外輸送因子という特殊な機能を持つと思われていた PHAX の発現低下が、ゲノムの不安定化を引き起こすことが明らかになった。この原因として、DNA 損傷応答に重要なヒストン H2AX の発現が低下していることが分かり、PHAX の H2AX の発現における重要性が明らかになった。この結果は論文投稿する準備中であり、高インパクトの成果となることが期待される。

### 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 11件)

と 以外はすべて査読有

Tomioka M, Shimobayashi M, Kitabatake M, Ohno M, Kozutsumi Y, Oka S, Takematsu H. Ribosomal protein uS7/Rps5 serine-223 in protein kinase-mediated phosphorylation and ribosomal small subunit maturation. *Sci Rep.* 2018 Jan 19;8(1):1244. doi: 10.1038/s41598-018-19652-z.

Wang DO, Ninomiya K, Mori C, Koyam A, Haan M, Kitabatake M, Hagiwara M, Chida K, Takahashi SI, Ohno M, Kataoka N. Transport Granules Bound with Nuclear Cap Binding Protein and Exon Junction Complex Are Associated with Microtubules and Spatially Separated from eIF4E Granules and P Bodies in Human Neuronal Processes. *Front Mol. Biosci.* Dec 22;4:93, 2017. doi: 10.3389/fmolb.2017.00093.

Ninomiya K, Ohno M, Kataoka N. Dendritic transport element of human arc mRNA confers RNA degradation activity in a translation-dependent manner. *Genes Cells.* 21(11), 1263-1269, 2016. doi: 10.1111/gtc.12439.

Takeiwa T, Taniguchi I, Ohno M.

Exportin-5 mediates nuclear export of SRP RNA in vertebrates.

Genes Cells. 20(4) 281-291, 2015 Feb 4. doi: 10.1111/gtc.12218.

Masaki S, Yoshimoto R, Kaida D, Hata A, Satoh T, Ohno M, Kataoka N.

Identification of the specific interactors of the human lariar RNA debranching enzyme 1 protein.

Int. J. Mol. Sci. 2015 Feb 9;16(2):3705-21. doi: 10.3390/ijms16023705.

谷口一郎、大野睦人。適正なRNA核外輸送複合体形成の保証機構。生化学 第87巻 第1号 68-74, 2015. 査読無し

Sakata T, Fujii K, Ohno M, Kitabatake M.

Crt10 directs the cullin-E3 ligase Rtt101 to nonfunctional 25S rRNA decay.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015 Jan 30;457(1):90-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.072. Epub 2014 Dec 19.

Taniguchi I, Mabuchi N, Ohno M.

HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. Nucleic Acids Res. 2014 Jun;42(10):6645-58. doi: 10.1093/nar/gku304. Epub 2014 Apr 20.

Taniguchi, I., McCloskey, A., Ohno, M. Analysis of RNA localization and export in Xenopus oocytes and mammalian cells. Methods Cell Biol 122, 395-413, 2014. 査読無し

Izumi, H., McCloskey, A., Shinmyozu, K., Ohno, M.

p54nrb/ NonO and PSF promote U snRNA nuclear export by accelerating its export complex assembly.

Nucleic Acids Res. 42(6):3998-4007, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1365

Yoshimoto R., Okawa, K., Yoshida, M., Ohno, M., Kataoka, N. Identification of a novel component C2ORF3 in the lariar-intron complex: Lack of C2ORF3 interferes with pre-mRNA splicing via intron turnover pathway. Genes Cells Jan 19(1), 78-8, 2014.

[学会発表](計 18件)

芳本 玲、谷口 一郎、大野 睦人、前田 明 環状RNA(circRNA)の核外輸送機構の解明 第40回日本分子生物学会年会、神戸、2017年12月6-9日

竹岩俊彦、大野睦人：mRNA様 long noncoding RNA の核局在化機構の解析、RNA フロンティアミーティング2017、大津、2017年11月8-10日

Taniguchi I, Ohno M. Identification of RNA helicase used in U snRNA export 第19回日本RNA学会年会、富山、2017年7月19-21日

Dantsuji S, Taniguchi I, Ohno M. Systematic analysis of hnRNP C domains in sorting RNA polymerase II transcripts 第19回日本RNA学会年会、富山、2017年7月19-21日

Kitabatake, M., Sakata, T. and Ohno, M. Selective ubiquitination and degradation of defective 60S particles. RNA2016 satellite-symposium. Kyoto, Jun 27, 2016.

Kitabatake, M., Sakata, T. and Ohno, M. A bridge that links an E3 ubiquitin ligase complex and nonfunctional 60S ribosomal particles. 18th RNA meeting. Kyoto, Jun 28-Jul 2, 2016.

Takeiwa, T, and Ohno, M. Exportin-5 mediates nuclear export of SRP RNA in vertebrates. 18th RNA meeting. Kyoto, Jun 28-Jul 2, 2016.

北畠真・坂田知子・大野睦人：真核生物リボソームの品質管理に関わる新たな因子、第4回RIBOSOME MEETING、高槻、2016年9月17-18日

Ohno, M. Nuclear export versus nuclear retention of RNA. IVR retreat. Otsu, Shiga, Dec21-22, 2016.

Dantsuji, S., Taniguchi, I. and Ohno, M. Systematic analysis of hnRNP C domains in sorting RNA polymerase II transcripts. 15th International Student Seminar. Kyoto, Feb 23-24, 2017.

北畠真・坂田知子・大野睦人：真核生物リボソームの合成時における品質管理、第18回Tokyo RNA Club, 東京、2016年1月14日

Taniguchi, I. and Ohno, M. HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. East Asia Joint Symposium 2015. Okinawa. 11-14 Nov. 2015

Ohno M. A cellular mechanism that sorts RNA transcripts according to their lengths. The 10th International Symposium for the Inter-institutional Network

(ISIIN) .Sapporo. 23-24 July. 2015

北畠真、坂田知子、藤井耕太郎、大野睦人：  
真核生物 60S リボソームの品質管理とスト  
レス応答経路との関わり、第 3 回  
RIBOSOME MEETING、宮崎市、2015 年  
3 月 17・18 日

Taniguchi, I., Mabuchi, N. and Ohno, M : HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment .16th RNA meeting . Nagoya, 23-25 July, 2014.

Takeiwa, T, and Ohno, M : Role of exportin-5 in nuclear export of SRP RNA. 16th RNA meeting . Nagoya, 23-25 July, 2014.

Suzuki, K., Taniguchi, I., Ohno, M : Analysis of RNA sorting system for nuclear export in Drosophila . 16th RNA meeting . Nagoya, 23-25 July, 2014.

北畠真、坂田知子、大野睦人：真核生物リ  
ボソームの品質管理。「RNA と生体機能」第  
3 回懇談会、伊東市、2014 年 10 月 25-26 日

〔図書〕(計 1 件)

竹岩俊彦、谷口一郎、大野睦人  
ノンコーディング RNA (本、廣瀬哲郎・泊幸  
秀 編 化学同人)「ncRNA の生合成経路 (21  
章)」pp.223-232 (2016)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<<http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/research/lab30/>>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大野 睦人 (OHNO, Mutsuhito)  
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・  
教授  
研究者番号：8 0 2 0 1 9 7 9

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

谷口 一郎 (TANIGUCHI, Ichiro)  
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・  
助教

研究者番号：0 0 4 6 7 4 3 2

### (4)研究協力者

( )