

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440083

研究課題名(和文)mRNA核外輸送受容体サブユニットp15のRNA認識機構

研究課題名(英文)RNA recognition by mRNA export receptor subunit p15

研究代表者

片平 じゅん (Jun, Katahira)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30263312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：mRNA核外輸送受容体Tap-p15ヘテロダイマーによる“積み荷” mRNA認識の分子機構解明を試みた。輸送受容体ヘテロダイマーはRRM-LRR-NTF2Lと呼ばれる3つのドメインを介してRNAに結合すること、各ドメインの役割は、細胞由来の内在性mRNAやウイルス由来のconstitutive transport element (CTE) など、輸送するmRNAの種類により異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is elucidation of the molecular mechanism of “cargo” mRNA recognition by the nuclear export receptor Tap-p15 heterodimer. We have shown that three distinct domains of Tap including RRM-LRR-NTF2L heterodimerized with p15 are involved in the cargo mRNA recognition. The results suggest that the Tap-p15 heterodimer recognizes bulk cellular mRNAs and viral constitutive transport element (CTE)-containing mRNA by differentially using these distinct RNA binding domains.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核 - 細胞質間輸送 遺伝子発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

転写の場である核と翻訳の場である細胞質とが核膜により物理的に隔てられている真核細胞では、RNA、タンパク質などの機能分子の核 - 細胞質間における輸送が、遺伝子発現の必須過程であり、細胞の生存、増殖といった基本的な生命活動から、発生、分化、ストレス応答といったより高次の機能に至るまで、多くの生命機能発現のための基盤となる。また、ヒトに病原性を示すある種のウイルスは、宿主の核 - 細胞質間輸送装置を利用して生活環を全うするため、この過程は感染症制御のための標的にもなり得る。したがって、核 - 細胞質間輸送因子群の構造・機能の詳細な解析は、基礎生物学的研究から創薬などの応用研究に至るまで、幅広い分野の研究を推進していく上での知識基盤構築のためにも欠かせない。

## 2. 研究の目的

真核細胞における核 - 細胞質間物質輸送は、核膜に開口した核膜孔複合体を介して行われ、輸送受容体と総称される一連のタンパク質因子が、積み荷の特異的な認識、核膜孔の通過といった輸送の素過程において重要な役割を果たす。核 - 細胞質間を輸送されるタンパク質の多くやマイクロ RNA、転移 RNA、リボソーム RNA など、種々の RNA の核外輸送には、CRM1、exportin-5、exportin-t といったインポーターβタンパク質ファミリーに属する輸送受容体が必要である。それに対し、mRNA の核外輸送には、インポーターβタンパク質ファミリーとは構造的に異なる Tap-p15 ヘテロダイマーと呼ばれる特有の輸送受容体が関与する。Tap-p15 ヘテロダイマーは転写やプロセシングに伴って mRNA に結合する一連のアダプター-mRNA 結合タンパク質とのタンパク質 - タンパク質相互作用により積み荷を特異的に認識する。さらに、“hand-over”と呼

ばれる過程を経て、輸送受容体 Tap-p15 ヘテロダイマーは mRNA に直接結合し、mRNA の核膜孔通過を促進すると考えられている。しかしながら、Tap-p15 ヘテロダイマーによる積み荷 RNA 認識機構は、現状では十分に解明されていない。そこで本研究では、Tap の RRM-LRR-NTF2L ドメインと p15 とで形成される mRNA 核外輸送受容体の最小 RNA 結合ドメインの RNA 結合能を解析するとともに、同ドメインの組み換えタンパク質とモデル RNA 複合体の結晶構造解析を行い、原子レベルでの積み荷 RNA 認識機構の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

アミノ末端側 RNA 結合ドメイン (RRM および LRR ドメイン) およびカルボキシ末端側 RNA 結合ドメイン (NTF2L ドメインおよび p15) からなる RNA 結合最小ドメインの発現・精製方法の至適化を行った。具体的には、high producer 大腸菌クローンの選抜を行うことで大量発現を実現するとともに、発現に適した培地の選択、培養温度、発現誘導の方法、発現誘導時間の至適化を行った。また、Tap 全長の精製プロトコールをもとに、タグ配列を介したアフィニティー精製に加えて、ヘパリンカラムクロマトグラフィー、Mono S イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製を組み合わせて実施し、タンパク質の精製を行った。さらに、アミノ末端側、カルボキシ末端側の RNA 結合ドメインを個別に発現・精製し、実験に供した。

モデル RNA として用いた CTE RNA は、化学合成、および、ファージ T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写により取得した。*in vitro* 転写により得た CTE は、変性ゲル電気泳動により精製し、実験に供した。CTE RNA と RNA 結合ドメインとの結合は、ゲルシフトアッセイにより解析した。また、得ら

れた CTE と RNA 結合最小ドメインとの複合体の再構成を行い、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製の後、構造解析を行った。

ヒト由来タンパク質を発現・精製すると同時に、一般に結晶構造解析に適していると言われている好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* (Ct) 由来の Mex67-Mtr2 に関しても、大腸菌および哺乳動物細胞発現系を構築し、CTE RNA 核外輸送能や CTE RNA 結合能について解析を実施し、結晶構造解析への利用の可否を検討した。

構造解析の過程で明らかになった二量体化に必要なアミノ酸残基 (LRR-NTF2L ドメイン間のリンカー配列) に変異を導入した Tap 変異体発現系を構築した。変異体および野生型タンパク質の mRNA 核外輸送能は、ルシフェラーゼアッセイにより解析した。

カルボキシ末端側 RNA 結合ドメインに点変異を有する Tap 変異体を発現する細胞株は、CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。同細胞株における CTE 核外輸送をルシフェラーゼアッセイで、また、内在性の mRNA の核外輸送をオリゴ dT プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションで解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 輸送受容体の種々のドメインの RNA 結合活性の解析

種々のタンパク質断片のリコンビナントタンパク質を調製し、CTE プローブを用いたゲルシフトアッセイにより RNA 結合活性を解析した。その結果、従来から知られていたアミノ末端側 RNA 結合ドメインに加えて、カルボキシ末端側の NTF2L ドメインにも RNA 結合活性があることが明らかとなった。さらに、複数の点変異体の CTE 結合能をゲルシフトアッセイにより解析し、NTF2L ドメインの CTE への結合に必要な領域を同定した。また、個々の RNA 結合断片とアミノ末端側およびカルボキシ末端側の両 RNA 結合ドメ

インを含んだタンパク質断片の CTE 結合能を解析し、両 RNA 結合ドメインを含んだタンパク質断片が個々のドメイン単独よりも CTE RNA に有意に高い親和性を示すことを見出した。このことから、両 RNA 結合ドメインが CTE を認識する際に協調的に機能していることが推察された。

##### (2) LRR-NTF2L ドメイン間のリンカーを介したヘテロ 4 量体形成

CTE RNA との複合体の結晶構造解析と並行して、タンパク質のみの結晶構造解析を行った。その結果、約 3.6 オングストロームの解像度の構造データが得られた。解析の結果、Tap 2 分子、p15 2 分子からなるヘテロ 4 量体が形成されることが明らかとなった。ヘテロ 4 量体形成には Tap の LRR - NTF2L ドメイン間のリンカー配列が関わっていた。そこで、この領域に変異を導入した Tap 変異体の CTE 結合能、および、CTE 配列を含んだ mRNA 核外輸送能を解析した。その結果、リンカー配列へ変異を導入することにより、CTE RNA への結合親和性の低下と CTE 配列を含んだ mRNA 核外輸送能の低下が認められた。一方、内在性の poly(A)+ RNA の核外輸送は、リンカー領域への変異の導入により影響を受けなかった。このことから、ヘテロ 4 量体は、CTE 核外輸送の際に形成される特有の構造であることが推察された。

##### (3) CTE RNA と最小 RNA 結合ドメイン複合体の結晶構造解析

まず、CTE RNA との複合体の結晶構造解析への利用の可否を判断するため、好熱性真菌由来の CtMex67-Mtr2 の性状解析を行った。その結果、CTE RNA への結合は認められるものの、CTE RNA の核外輸送促進活性を示さないことから、CtMex67-Mtr2 は、CTE との複合体の構造解析には適さないものと判断した。

次に、ヒト Tap-p15 の最小 RNA 結合ドメインと CTE との複合体の結晶生成の条件検討

を行った。1,000 を超える条件のスクリーニングを行い、有望な結晶をいくつか得ることができた。しかしながら、高解像度の構造データ取得には至らなかった。これは主として、RNA 側の構造的な不安定性が原因になっていることが考えられた。今後、全長の CTE 配列を利用すること、RNA 側に構造を安定化するような変異、修飾を導入すること、等により、さらに改善が見られるかどうかを検討していく予定である。

(4) 輸送受容体 Tap-p15 ヘテロダイマーによる積み荷認識機構

CRISPR/Cas9 を用いて NTF2L ドメインの RNA 結合領域に点変異を有する Tap を発現する細胞株を作製し、その性状を解析した。その結果、内在性の mRNA の核外輸送は、NTF2L の RNA 結合ドメインの点変異のみでは影響を受けなかった。しかし、同細胞株において、Aly や Thoc5 といったアダプタータンパク質のノックダウンを行うことにより、内在性 mRNA の核外輸送が阻害されることを見出した。これらの結果から、輸送受容体 Tap-p15 の2つの RNA 結合ドメインの役割は CTE の核外輸送と内在性の mRNA 核外輸送で異なると考えられた。

## 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 4 件)

1. Aibara, S., Katahira, J., Valkov, E. Stewart, M.

The principal mRNA nuclear export factor NXF1:NXT1 forms a symmetric binding platform that facilitates export of retroviral CTE-RNA.

*Nucleic Acids Res.* 43, 1883-1893. (2015)

2. Katahira, J., Dimitrova, L., Imai, Y., Hurt, E. NTF2-like domain of Tap plays a critical role

in cargo mRNA recognition and export.

*Nucleic Acids Res.* 43, 1894-1904. (2015)

3. 片平じゅん

mRNA 核外輸送複合体の形成機構

特集「核 - 細胞質間分子輸送システム：基本分子メカニズムの理解とその応用」

**生化学** 87, 75-81. (2015)

4. Katahira, J.

Nuclear export of messenger RNA.

*Genes (Basel)*, 6, 163-184. (2015)

[学会発表](計 3 件)

1. 片平じゅん、奥崎大介、井上仁美、前原一満、大川恭行

ヒト TREX 複合体構成因子 Thoc5 は CFIm のリクルートメントを介してポリアデニレーション部位選択に關与する

**第 31 回 染色体ワークショップ・第 12 回 核ダイナミクス研究会** 2013 年 11 月 箱根

2. 片平じゅん

輸送受容体 Tap-p15 ヘテロダイマーによる積み荷 RNA 認識機構

**第 36 回日本分子生物学会年会** ワークショップ 2013 年 12 月 神戸

3. 片平じゅん

NTF2L domain of Tap plays a critical role in mRNA recognition and export

**BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)**

2015 年 12 月 神戸

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

片平じゅん (Jun Katahira)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：30263312

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (3)研究協力者

Lyudmila Dimitrova

Ed Hurt

Shintaro Aibara

Murray Stewart

研究者番号：