

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440059

研究課題名(和文)細胞質・核RNA品質管理におけるエキソソーム複合体の共通した作用機序

研究課題名(英文)Quality control mechanisms for aberrant mRNA that emerges under stress conditions

研究代表者

細田 直 (Hosoda, Nao)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：40438198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：外因性異常RNAは、mRNA品質管理と類似の機構により速やかに分解されると想定されるが不明な点が多く残されていた。本研究では、外因性異常RNAとして、(1) RNA医薬で脚光を浴びている人工合成mRNA、(2) 1本鎖(+)鎖RNAウイルスである脳心筋炎ウイルス、について解析を行い、Dom34-GTPBPが異常mRNAの識別に、エキソヌクラーゼ複合体およびRNaseL-OASが急速な分解に関わることを見出した。さらに、本研究で明らかとなった人工合成mRNA分解の分子機構に基づき、人工合成mRNAを安定化する方法を探索した。

研究成果の概要(英文)：It remained to be elucidated how the exogenous mRNA was recognized and degraded quickly. Here, we analyzed the mechanisms for quick degradation of in vitro synthesized mRNA and encephalomyocarditis virus RNA. Dom34-GTPBP forms the surveillance complex to eliminate the exogenous mRNAs. Exonuclease complex and RNaseL-OAS function to degrade the mRNAs quickly. Based on these findings, we searched for compounds to stabilize the in vitro synthesized mRNA through drug discovery high-throughput screening.

研究分野：生化学

キーワード：mRNA品質管理 翻訳 mRNA分解 エキソソーム

1. 研究開始当初の背景

高等生物では多様かつ膨大な RNA 分子種が細胞内に発現している。高次の生命活動においてこれらを適切に作動させるためには、異常もしくは不要 RNA を分解することが必須となる。この RNA 品質管理の最終ステップにおいて、3'→5' 方向エキソヌクレアーゼ(エキソソーム)複合体が RNA を分解すると想定されていたが、不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

mRNA 品質管理機構としてリボソーム停止型 mRNA 分解 (No-Go decay; NGD) やリボソームリードスルー型 mRNA 分解 (Non-Stop decay; NSD) などが知られている。これらにおいて、翻訳終結因子類似 Dom34-Hbs1 複合体が異常 RNA を認識し、3'→5' 方向エキソヌクレアーゼ(エキソソーム)複合体により RNA を分解することが申請者を含め複数のグループから報告されていた。本研究では、外因性異常 RNA は、上記分子機構と類似の機構により速やかに分解されると想定し解析を進めた。外因性異常 RNA として、(1) RNA 医薬で脚光を浴びている人工合成 mRNA、(2) 1 本鎖(+)鎖 RNA ウイルスである脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis virus; EMCV)、について解析を行った。さらに、本研究で明らかとなった人工合成 mRNA 分解の分子機構に基づき、人工合成 mRNA を安定化する方法を探索した。

3. 研究の方法

- (1) HeLa 細胞に *in vitro* 合成 mRNA を導入し、導入 mRNA の分解速度を定量した。RNA 合成は T7 RNA ポリメラーゼにより行った。Dom34、Hbs1 等について siRNA によるノックダウンが mRNA 分解に及ぼす影響について検証した。
- (2) EMCV 感染後の HeLa 細胞における EMCV RNA 量の経時変化を定量した。siRNA によるノックダウンがウイルス RNA 量に及ぼす影響について検証した。
- (3) Dom34、Hbs1 等の相互作用を、免疫沈降法により解析した。
- (4) 大腸菌発現系を用い、精製 OAS3 タンパク質を調製した。OAS3 蛋白質のもつ 2-5A 合成活性は、生成副産物であるピロリン酸量をリンモリブデン法により定量することにより評価した。この評価系を用い OAS3 阻害作用をもつ低分子化合物をスクリーニングにより同定した。

4. 研究成果

(1) 人工合成 mRNA 分解

外因性異常 RNA も翻訳依存的に分解することを見出しており、まず NGD および NSD において機能する Dom34-Hbs1 複合体がこの分解に関与

するかどうか検証した。siRNA により Dom34 もしくは Hbs1 をノックダウンした HeLa 細胞に *in vitro* 合成 mRNA を導入し、その分解過程について検証した。Dom34 ノックダウンでは顕著な分解抑制が認められるものの、意外なことに Hbs1 ノックダウンではほとんど認められなかった。翻訳終結因子 eRF3 類似タンパク質は Hbs1 に加えて GTPBP1/2 も知られている。GTPBP1/2 ノックダウンでは顕著な分解抑制が認められた。さらに、免疫沈降法により GTPBP1/2 は Dom34 およびエキソソーム複合体と相互作用することを見出した。以上の結果から、細胞内から外因性異常 RNA を排除する機構は、Dom34-GTPBP1/2 複合体を介した新しい品質管理機構であると想定された。抗ウイルス作用において、2-5A 合成酵素 OAS および 2-5A により活性化されるエンドヌクレアーゼ RNaseL は、ウイルス RNA の分解に機能する。外因性異常 RNA の排除にこの OAS-RNaseL 経路が関与しているかどうか検証した。OAS および RNaseL のノックダウンにより *in vitro* 合成 mRNA の顕著な分解抑制が認められた。さらに、免疫沈降法により Dom34 は RNaseL と相互作用することを見出した。以上の結果から、異常 mRNA は Dom34-GTPBP1/2 によって識別され、Dom34 により OAS により活性化された RNaseL がおよびエキソソーム複合体がリクルートされ、異常 mRNA は急速に分解されることが示唆された。

(2) ウイルス RNA を排除する機構

細胞はウイルス感染時インターフェロン (IFN) 誘導カスケードを活性化させる。IFN 処理した HeLa 細胞において、EMCV 感染後期における細胞内 EMCV RNA 量は Dom34 ノックダウンにより上昇した。さらに、HeLa 細胞に *in vitro* 合成した EMCV RNA を導入しその分解過程について検証したところ、Dom34 ノックダウンにより顕著な分解抑制が観察された。EMCV RNA においても外因性異常 RNA、NSD、NGD と類似の機構で分解されることが示唆された。ウイルス感染時において RNaseL が活性化することが知られている。RNaseL ノックダウンによっても顕著な分解抑制が観察された。以上の結果から、ウイルス RNA は、Dom34 および RNaseL が関与する人工合成 mRNA と類似の機構で速やかに除去されると想定された。

(3) 人工合成 mRNA を安定化する方法の探索

人工合成 mRNA を細胞内において安定化する技術の開発を進めた。(2)の解析において、人工合成 mRNA が OAS-RNaseL 経路を介して分解されることをノックダウン解析により見出している。特に、OAS3 のノックダウンにより合成 mRNA 安定化に加え、蛋白質の発現量も劇的に増大した。そこで OAS3 を標的とする阻害剤の開発を目的として、OAS3 の酵素活性を測定する系を確立した。化合物ライブラリー用いスクリーニングを行い、OAS3 阻害剤作用をもつ化合物を複数同定した。これらにより人工合成

mRNA の発現効率を改善することで、様々な遺伝子治療への応用が可能になると期待できる。

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. Ryota Yamagishi, Nao Hosoda, Shin-ichi Hoshino

Arsenite inhibits mRNA deadenylation through proteolytic degradation of Tob and Pan3
Biochem. Biophys. Res. Commun. **455**: 323-331 (2014)

2. Yoshifumi Hashimoto, Naomichi Kumagai, Nao Hosoda, and Shin-ichi Hoshino

The processed isoform of the translation termination factor eRF3 localizes to the nucleus to interact with the ARF tumor suppressor
Biochem. Biophys. Res. Commun. **445**: 639-644 (2014)

[学会発表] (計 17 件)

1. 稲垣佑都、細田 直、星野真一

脊髄小脳変性症の原因因子 Ataxin-2 は標的 mRNA のポリ A 鎖を安定化する
日本薬学会東海支部大会;2016年7月9日/名古屋

2. 堀田昂志、山岸良多、細田 直、星野真一

脊髄小脳変性症の原因因子 Ataxin-2 によるストレス顆粒形成のメカニズム
日本薬学会東海支部大会;2016年7月9日/名古屋

3. 自然免疫制御システム OAS-RNaseL による外来性 RNA 分解制御

永井貴広、野木森拓人、細田 直、星野真一
日本薬学会東海支部大会;2016年7月9日/名古屋

4. 細胞内における人工合成mRNAの安定化および発現効率化

野木森拓人、永井貴広、細田 直、星野真一
第39回日本分子生物学会年会;2016年11月30日~12月2日/横浜

5. 細田 直

人工キメラ遺伝子 ZFN 安定発現系の構築
厚生労働科研費B型肝炎創薬実用化等研究事業班会議;2015年12月/東京

6. Takuto Nogimori, Kyutatsu Nishiura, Sho Kawashima, Nao Hosoda, Shin-ichi Hoshino

DOM34-GTPBP2-RNASEL MEDIATES EXOGENOUS MRNA DECAY

CSHL Meeting on mRNA processing, 2015 Aug, Cold Spring Harbor, NY

7. 野木森 拓人、西浦 久達、川島 生、細田 直、星野 真一

外来性 mRNA は品質管理類似の分解機構により除去される

第17回日本 RNA 学会年会;2015年7月/札幌

幌

8. 川島 生、野木森 拓人、西浦 久達、堀田昂志、細田 直、今高 寛晃、星野 真一

mRNA 品質管理因子 Dom34 による抗ウイルス防御

第17回日本 RNA 学会年会;2015年7月/札幌

9. 川島 生、野木森 拓人、西浦 久達、堀田昂志、細田 直、星野 真一

mRNA 分解制御因子による抗ウイルス防御

日本薬学会東海支部大会;2015年7月/名古屋

10. 田中 杏莉、細田 直、星野 真一

酵母 Ataxin-2 オーソログ Pbp1 は mRNA 分解において機能する

日本薬学会東海支部大会;2015年7月/名古屋

11. Makoto Fukushima, Eri Wakita, Nao Hosoda, Shin-ichi Hoshino

Control of mRNA deadenylation by apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1)

Zing Nucleic Acid Conference, 2014 Dec, Cancun, Mexico

12. 野木森 拓人、西浦 久達、川島 生、細田 直、星野 真一

B 型肝炎の治療を目指した人工合成 mRNA の安定化・高効率発現系の確立

第16回日本 RNA 学会年会;2014年7月/名古屋

13. 稲垣 佑都、成瀬 貴文、細田 直、星野 真一

脊髄小脳変性症の原因遺伝子 Ataxin-2 は mRNA デキャッピングを促進する

第16回日本 RNA 学会年会;2014年7月/名古屋

14. 福島 真、脇田 恵里、細田 直、星野 真一

ストレスキナーゼ Ask1 による mRNA ポリ A 鎖分解の制御

第16回日本 RNA 学会年会;2014年7月/名古屋

15. 西浦 久達、野木森 拓人、川島 生、細田 直、星野 真一

eRF3 ファミリーに属する G タンパク質 GTPBP1 の機能解析

第16回日本 RNA 学会年会;2014年7月/名古屋

16. 山岸 良多、杉山 遥、富田 一範、成瀬 貴文、細田 直、星野 真一

ストレス時の mRNA 安定化とストレス顆粒形成の分子機構

第16回日本 RNA 学会年会;2014年7月/名古屋

17. 細田 直

CPEB による mRNA ポリ A 鎖分解制御における Tob の役割

第2回 CCR4-NOT 研究会;2014年6月/沖縄・恩納村

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称:人工合成 mRNA を細胞内において安定化させる方法

発明者:星野真一、細田直、野木森拓人

権利者:名古屋市立大学

種類:特許

番号:特願2014-98133

出願年月日:2014年5月9日

国内外の別:国内

名称:人工合成 mRNA の翻訳効率化方法

発明者:星野真一、細田直、野木森拓人

権利者:名古屋市立大学

種類:特許

番号:特願2014-107562

出願年月日:2014年5月23日

国内外の別:国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/syk/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 直 (HOSODA NAO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号:40438198

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし