

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770180

研究課題名（和文） 哺乳類ミトコンドリアの機能発現を保證する RNA 結合タンパク質の解析

研究課題名（英文） Role of RNA-binding proteins in mitochondrial function

研究代表者

内木 隆寛 (NAIKI TAKAHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：70420081

研究成果の概要（和文）：RNA 結合タンパク質による転写後制御は、様々な生命現象において重要な役割を持つ。本研究では、RNA 結合タンパク質 hnRNP がストレス存在下において Stress Granule に局在し、ATP レベルの維持に関与することを見いだした。さらに、機能未知の RNA 結合タンパク質 RBM42 が、ストレス時の ATP レベルの調節に関与することを明らかにした。また、hnRNP と RBM42 が mRNA 制御を介して細胞増殖において必須の役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：RNA-binding proteins coordinate protein expression through post-transcriptional regulations. We demonstrated that hnRNP localizes in Stress Granules and has a role for the regulation of ATP level during stress condition through RNA regulation. Furthermore, we revealed that RBM42, an hnRNP binding protein, functions in the regulation of ATP synthesis. We also obtained evidences that hnRNP and RBM42 coordinate cell proliferation by regulating novel target mRNAs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：RNA 結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

転写調節による遺伝子発現制御に加え、mRNA の安定性制御や翻訳制御といった転写

後調節機構が様々な生命現象において重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。熱、浸透圧、薬剤などのストレスにさら

されると、細胞内では、翻訳は一時的に中断され、mRNA は Stress Granule とよばれる構造に集まる。Stress Granule にはさまざまな RNA 結合タンパク質が局在しており、翻訳が中断された mRNA は、RNA 結合タンパク質により分解から護られていることが示唆されている。

hnRNPK は、KH ドメインをもつ RNA 結合タンパク質であり、c-Myc の翻訳促進を介して癌細胞の増殖に関与することが報告されていた。我々は、hnRNPK がストレス存在下において Stress Granule に局在すること、また、hnRNPK と結合する因子として同定した機能未知の RNA 結合タンパク質 RBM42 もストレス存在下において Stress Granule に局在することを見いだしたが、ストレス応答における hnRNPK や RBM42 の役割は不明であった。

ミトコンドリアは、細胞の ATP 産生を担う細胞内小器官である。ミトコンドリア内で ATP 産生に関わるタンパク質には、ミトコンドリアゲノムに遺伝情報がコードされ、ミトコンドリア内で翻訳されるタンパク質に加え、細胞の核内に遺伝情報がコードされており、ミトコンドリア外で翻訳された後にミトコンドリア内に輸送されるタンパク質もある。本研究では、hnRNPK がミトコンドリア結合リボソームとともに精製されることに着目し、hnRNPK のミトコンドリアの ATP 産生への関与を検証することから研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、ストレス応答における hnRNPK の役割を mRNA 制御の観点から解明することとした。さらに、hnRNPK と結合する機能未知の RNA 結合タンパク質 RBM42 についても、hnRNPK との機能的関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

哺乳類培養細胞をアルセナイト（ヒ素）で処理すると通常時翻訳されている mRNA は翻訳が中断され、1 時間程度で Stress Granule が形成される。また、アルセナイトを除去すると、Stress Granule は数時間で消失し、翻訳は回復する。本研究では、siRNA により hnRNPK、および、RBM42 をノックダウンした細胞を用いて、通常時、アルセナイト存在下、および、アルセナイト除去後のストレスから回復する際の hnRNPK と RBM42 の機能を ATP レベルの調節、細胞増殖の制御の観点から解析した。

4. 研究成果

(1) hnRNPK のストレス応答における機能

哺乳類培養細胞をアルセナイトで処理すると細胞内の ATP レベルは著しく低下する。ストレスを除去すると ATP レベルは速やかに回復する（図 1、Control）。hnRNPK ノックダウン細胞にアルセナイトストレスを与えた場合には、ATP レベルの落ち込みには差はないものの、ストレス除去後の ATP レベルの回復が著しく遅れた（図 1、hnRNPK）。

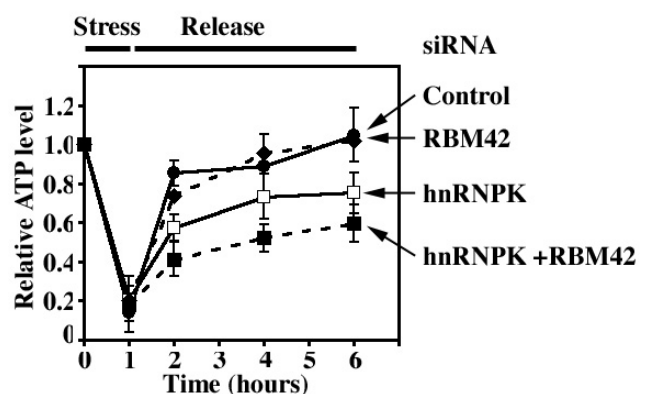


図 1. ストレス存在下 (Stress)、ストレスからの回復期 (Release) における細胞内 ATP レベルの変化

hnRNPK の RNA 結合ドメインである KH ドメインに変異を導入した hnRNPK は、hnRNPK ノックダウン細胞のストレスから回復の欠陥を相補できなかった。従って、hnRNPK は RNA 制御を介して ATP レベルの調節に関与することが示唆される。ストレス存在下において hnRNPK は Stress Granule に局在することから、hnRNPK は ATP の産生に関与する因子の mRNA に結合して分解から保護し、ストレスから回復する際の速やかな ATP レベルの回復に寄与しているのかもしれない。

(2) RBM42 のストレス応答における機能

我々は、hnRNPK と RNA を介して結合する因子として RBM42 を同定し、hnRNPK と同様に RBM42 が Stress Granule に局在することを明らかにした。アルセナイト存在下、ストレスからの回復期における RBM42 ノックダウン細胞の ATP レベルについて検討したが、欠陥はみられなかった (図 1、RBM42)。しかし、RBM42 と hnRNPK のダブルノックダウン細胞は、hnRNPK ノックダウン細胞よりもさらに ATP レベルの回復の遅れがさらに顕著になった (図 1、hnRNPK + RBM42)。これらの結果は、ATP レベルの回復には、hnRNPK が主要な役割を果たすが、hnRNPK の機能がない場合には、RBM42 が補う可能性を示唆する。

(3) 細胞増殖における hnRNPK の機能

ストレスのない通常時において、hnRNPK の ATP 産生への関与について検討したが、hnRNPK ノックダウン細胞において明確な ATP レベルの低下は見られなかった。しかし、hnRNPK ノックダウン細胞は、顕著に細胞増殖が低下した (図 2)。これまでの報告から、癌細胞では hnRNPK の過剰発現が癌遺伝子 c-Myc の翻訳を促進して細胞増殖を亢進させることが報告されていた。正常細胞において

細胞内在性の hnRNPK が c-Myc の発現制御を介して細胞増殖に関与する可能性を検討したが、hnRNPK ノックダウン細胞において c-Myc のタンパク質の低下はみられなかった。さらに、hnRNPK の RNA 結合能は細胞増殖に必要であったことから、hnRNPK は、未知のターゲット mRNA の制御を介して細胞増殖を制御すると考えられる。

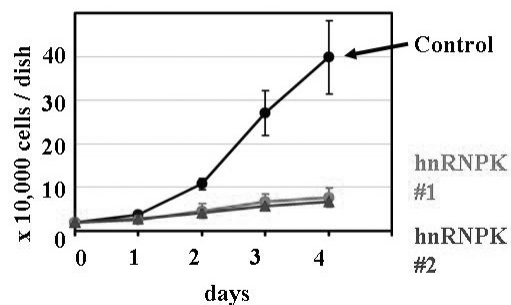


図 2. hnRNPK ノックダウン細胞 (hnRNPK #1、#2) の細胞増殖

(4) 細胞増殖における RBM42 の機能

RBM42 ノックダウン細胞の細胞増殖を検討した結果、hnRNPK ノックダウン細胞と同程度まで細胞増殖が低下した (図 3)。RBM42 の RNA 結合ドメインである RRM は、細胞増殖に必要であったことから、RBM42 は mRNA 制御を介して細胞増殖を制御すると考えられる。

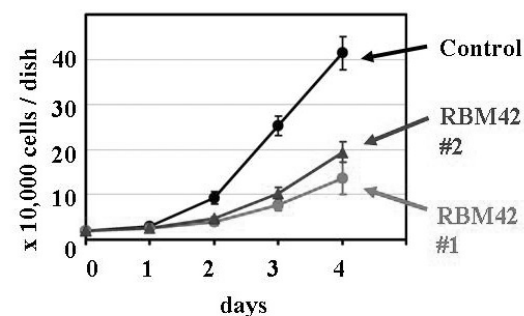


図 3. RBM42 ノックダウン細胞 (RBM42 #1、#2) の細胞増殖

(5) 今後の展望

RBM42 と hnRNPK は核内に局在しているが hnRNPK は、シグナルに応答して細胞質に移行することが報告されている。RBM42 も細胞質へ移行して hnRNPK とともに細胞増殖に必要な因子の mRNA に結合して mRNA 安定化や翻訳制御に関与するのかもしれない (図4)。

本研究の解析から、機能未知であった RBM42 が ATP レベルの調節と細胞増殖に関与するという新たな知見が得られた。今後、hnRNPK や RBM42 がどのような遺伝子の mRNA の制御をしているのかという点を明らかにし、分子機序を解明することが課題である。

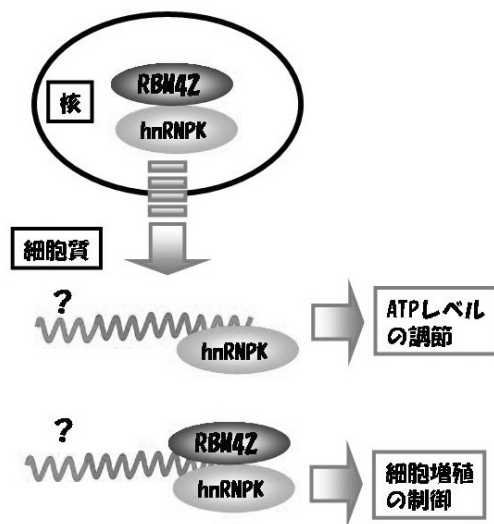


図4. hnRNPK と RBM42 の作用モデル

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内木隆寛 (NAIKI TAKAHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：70420081