

平成 2 4 年 5 月 2 8 日現在

研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2009～2011
課題番号：21370077
研究課題名（和文）RNA局在と局所的翻訳制御を介した細胞極性の形成と細胞の運命決定機構
研究課題名（英文）Molecular mechanism of cell polarity establishment and cell-face determination by RNA localization and local translation
研究代表者
入江 賢児（IRIE KENJI）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：90232628

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまでの RNA 局在・RNA 安定性・局所的翻訳制御、細胞間接着による細胞極性の形成機構の研究の経験と独自の成果をもとに、RNA 局在・RNA 安定性・局所的翻訳制御を介した細胞極性の形成と細胞の運命決定の機構を明らかにすることを目的とした。出芽酵母を用いた研究では、Khd1 がポリ A 分解酵素 Ccr4, Caf1 とオーバーラップした機能をもち、芽の局所的な細胞壁合成と維持の制御に関与することを明らかにした。また、動物細胞の筋分化過程において、Stau1 は Dvl2 mRNA の転写後段階で発現制御を通して、筋分化の調節を行っていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Post-transcriptional regulation of gene expression has a significant role in various cellular processes such as cell growth, cell differentiation, adaptation to stress, and cell death. In our study, we are focusing on understanding the molecular mechanism and the physiological function of the post-transcriptional regulation by RNA-binding proteins using yeast and mammalian cells. We have revealed that RNA-binding protein Khd1 and cytoplasmic deadenylase Ccr4 modulate a signal from Rho1 in the yeast cell wall integrity pathway by regulating the expression of RhoGEF and RhoGAP. We have also revealed that RNA-binding protein Stau1 coordinates myogenesis through the regulation of Dvl2 mRNA encoding a central mediator of Wnt pathway.

交付額

	(金額単位：円)		
	直接経費	間接経費	合 計
2 0 0 9 年度	5, 800, 000	1, 740, 000	7, 540, 000
2 0 1 0 年度	4, 300, 000	1, 290, 000	5, 590, 000
2 0 1 1 年度	4, 300, 000	1, 290, 000	5, 590, 000
年度			
年度			
総 計	14, 400, 000	4, 320, 000	18, 720, 000

研究分野：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：細胞極性、細胞運命、mRNA、RNA 結合タンパク質、Stau1、出芽酵母、筋分化、細胞壁合成

1. 研究開始当初の背景
多細胞生物の発生や分化の過程では、さ
- まざまなタンパク質が、細胞内において時間的・空間的に不均等に合成または局在さ

れ、これが各細胞の運命決定・特異的な機能発現に重要な役割を果たしている。タンパク質の不均等な分配を導く方法として、RNAの細胞内局在と局所的な翻訳機構がある。RNA局在は、細胞骨格の不均等な配置などの細胞極性に依存しており、また逆にRNA局在によるタンパク質の不均等な配置が細胞極性の形成と維持に必要である。RNA局在と細胞の極性形成は密接に関連しており、RNA局在と細胞の極性形成の生化学的な分子機構の解明は、個体の発生や維持の制御機構を理解する上でも大変重要である。RNA局在と局所的翻訳の機構は、細胞の非対称分裂・運命決定、卵形成過程、細胞運動、シナプス形成などさまざまな生命現象において見出され、酵母、線虫、ショウジョウバエ、アフリカツメガエルなどのモデル生物において、その詳細な分子機構が精力的に研究されている(St Johnston D. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 6(5):363-75. Review)。これらモデル生物での解析に比較して、動物細胞ではRNA局在や局所的な翻訳などのRNAの時空間的制御の分子機構、およびRNA局在・局所的翻訳に基づく機能発現調節機構に関する知見は乏しい。すなわち、神経幹細胞からの分化におけるRNA結合タンパク質の機能解析や、神経の樹上突起におけるmRNA局在とキネシンモーターの関与の解析などの解析が報告されているが、神経細胞以外の上皮細胞、筋細胞、線維芽細胞についてはRNA局在の解析例が少なく、Rob Singer (米国)らの線維芽細胞における β -アクチンmRNAの局在解析が突出して進んでいるだけである。最近Macaraらが線維芽細胞の突起に濃縮する一群のmRNAの局在を発表しており(Nature, 2008)、神経以外の細胞においてもRNA局在の重要性が示唆されている。RNA局在や局所的な翻訳は細胞極性と密接な関係にあるが、RNAの空間的制御と細胞極性の分子的関連も明らかではない。申請者は、これまでにモデル生物である出芽酵母を用いた解析から、RNAを可視化する技術や翻訳の検出系を開発・駆使して、RNA局在、RNA安定性・局所的翻訳制御の系を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでのRNA局在・RNA安定性・局所的翻訳制御、細胞間接着による細胞極性の形成機構の研究の経験と独自の成果をもとに、RNA局在・RNA安定性・局所的翻訳制御を介した細胞極性の形成と細胞の運命決定の機構を明らかにすることを目的としている。

(1) RNA局在・RNA安定性・局所的翻訳制御の分子機構

出芽酵母の非対称分裂は細胞運命決定因子Ash1をコードするmRNAの局在により決定する。申請者は、これまでにmRNAのin vivo イメージング技術を開発し、輸送中のmRNAの翻訳阻害および局所的な翻訳制御に関与するRNA結合タンパク質Khd1, Mpt5、翻訳制御因子Mkt1/Pbp1複合体を明らかにしている(Tadauchi et al., 2001; Irie et al., 2002; Tadauchi et al., 2004)。また、ASH1以外のmRNAの局在とその安定性制御機構を解析している(Hasegawa et al., 2008)。輸送中のmRNAの翻訳阻害および局所的な翻訳制御、RNAの局所的安定性制御の分子機構を解明する。また、動物細胞においてはKhd1のヒトオルソログhnRNP KによるStress granuleへの局在機構、ストレス時におけるRNAの安定性および翻訳の制御機構を解明する。

(2) RNA結合タンパク質Stau1による筋分化の制御機構とRNA局在制御

哺乳類Stau1は、神経細胞において樹状突起へと輸送されるRNA Granuleに含まれ、mRNAの局在化に関与している。神経以外の細胞にもStau1は発現しているが、その機能は不明であった。申請者は、RNA結合タンパク質Stau1が筋芽細胞株C2C12においても発現し、筋分化に対して抑制的に機能することを明らかにした(Yamaguchi et al., 2008)。筋の分化過程は、Myf5、MRF4、MyoD \rightarrow Myogenin から構成される転写因子のカスケードにより調節されているが、私共の結果は、筋分化の調節は転写因子のカスケードだけでなく、RNA結合タンパク質Stau1を介したRNA局在を含む転写後調節によっても調節されることを示した。Stau1がどのようなRNAの局在化、翻訳制御を介した筋分化の制御機構を解明する。また、Stau1が線維芽細胞の運動先端に局在するという知見も得ており、RNA局在制御と細胞運動の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) RNA 局在、RNA 安定性、局所的翻訳制御の分子機構

単細胞真核生物である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) にも RNA 局在と局所的翻訳の系は存在する (図4)。この系は、RNA (ASH1 mRNA) 上の Zipcode、ZBP(RNA 結合タンパク質 She2)、RNA 輸送のミオシンモーター (Myo4)、巨大な RNP 複合体の形成 (Locosome; ASH1 mRNA-She2-She3-Myo4)、翻訳制御因子 (Khd1, Puf6)、極性化された細胞骨格 (アクチンケーブル)、RNA を留めておくアンカーリング機構 (分子機構は不明) の存在など、多細胞生物の系と多くの共通点が見られる。

申請者は、これまでに mRNA の in vivo イメージング技術を開発し、輸送中の mRNA の翻訳阻害および局所的な翻訳制御に関与する RNA 結合タンパク質 Khd1, Mpt5、翻訳制御因子 Mkt1/Pbp1 複合体を同定している。しかしながら、Locosome の形成と解離の機序、輸送中の RNA の翻訳抑制とその解除の時空間制御機構、RNA のアンカーリング機構などは未だに不明である。また、研究代表の入江は、タンパク質の局所的な局在には、RNA 輸送と局所的翻訳制御に加え、RNA の局所的安定性制御が必要であること (Hasegawa et al., 2008)、その局所的 mRNA 安定性制御にシグナル認識粒子 (Signal recognition particle: SRP) と RNA 結合タンパク質 Khd1 が関わることを明らかにしている。酵母および他生物の系においても複数種の RNA が輸送されることが報告されているが、その場合の RNA 選別と制御の多様性についても不明である。これらの未解決の問題点を解決する。

(2) RNA 結合タンパク質 Stau1 による筋分化の制御機構と RNA 局在制御

Stau1 は、ショウジョウバエの Staufén の哺乳類オルソログである。Staufén は、mRNA の局在化を介して、胚の前後軸決定、神経細胞の分化に関与している RNA 結合タンパク質である。哺乳類 Stau1 は、神経細胞において樹状突起へと輸送される mRNA 小胞に含まれることから、mRNA の局在化に関与していると考えられている。神経以外にも Stau1 の遺伝子発現は認められるが、Stau1 の機能解

析は進んでおらず、課題が多く残されていた。申請者は、筋芽細胞株 C2C12 において、Stau1 が筋芽細胞において筋分化に対して抑制的に機能することを明らかにした。筋の分化過程は、Myf5、MRF4、MyoD → Myogenin から構成される転写因子のカスケードにより調節されているが、私共の結果は、筋分化の調節は転写因子のカスケードだけでなく、RNA 結合タンパク質 Stau1 を介した RNA 局在を含む転写後調節も重要であることを示した。Stau1 による筋分化の制御機構を解析する。また、Stau1 が線維芽細胞の運動先端に局在するという知見も得ており、RNA 局在制御と細胞運動の関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) RNA 局在、RNA 安定性、局所的翻訳制御の分子機構

現在までに、RNA 結合タンパク質 Khd1 による mRNA の安定性と翻訳制御の分子機構とその生理的意義について研究をすすめている。出芽酵母の RNA 結合タンパク質である Khd1 は、ヒトの RNA 結合タンパク質である hnRNP K の酵母オルソログである。Khd1 は *HO* 遺伝子のリプレッサータンパク質をコードする *ASH1* mRNA の翻訳抑制や、膜タンパク質をコードする *MTL1* mRNA の安定性制御に関与する。Khd1 は *ASH1* mRNA や *MTL1* mRNA を含む数百種以上の mRNA 群と相互作用することが報告されているが、*ASH1* mRNA と *MTL1* mRNA 以外の標的 mRNA に対する Khd1p の作用は不明であった。また、*khd1Δ* 単独変異株の増殖速度は野生型株と同程度であり、Khd1p が多種類の標的 mRNA と相互作用する生理的意義も不明であった。Khd1 がポリ A 分解酵素 Ccr4, Caf1 とオーバーラップした機能を持ち、出芽酵母の芽の局所的な細胞壁合成と維持の制御に関与することを明らかにした。

(2) RNA 結合タンパク質 Stau1 による筋分化の制御機構と RNA 局在制御

これまでに、ショウジョウバエ Staufén の哺乳類オルソログである Stau1 の筋分化過程における機能解析を行い、これまでに Stau1 が筋分化に対して抑制的に機能することを見出した。しかしながら、その詳細な機構については明らかになっていなかった。幾つかの報告から、Stau1 が Wnt シグナル伝達

経路の構成因子であるDishevelled (Dvl) の mRNA と相互作用すること、さらにWntシグナルが筋分化制御に関与していることが示されており、そこから「Stau1はDvl mRNAの転写後制御を介して筋分化を調節している」という仮説を立て検証をすすめた。その結果、Stau1はDvl2 mRNAの転写後段階で発現制御を通して、筋分化の調節を行っていることを明らかにした。

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5件)

① Yamaguchi Y, Naiki T, Irie K.

Stau1 regulates Dvl2 expression during myoblast differentiation.

(Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 6;417(1):427-32.) 査読有

② Ito W, Li X, Irie K, Mizuno T, Irie K.

RNA-binding protein Khd1 and Ccr4 deadenylase play overlapping roles in the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.

(Eukaryot Cell. 2011 Oct;10(10):1340-7.) 査読有

③ Mauchi N, Ohtake Y, Irie K.

Stability control of MTL1 mRNA by the RNA-binding protein Khd1p in yeast.

(Cell Struct Funct. 2010;35(2):95-105.) 査読有

④ 入江賢児 RNA 局在、蛋白質核酸酵素、2009 Dec;54(16 Suppl):2133-9. レビュー

⑤ Fukuda, T., Naiki, T., Saito, M., Irie, K. hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP levels during stress conditions.

(Genes Cells, 14 巻 2 号: 113-128, 2009) 査読有

〔その他〕

ホームページ

研究代表者の研究室のホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/public/basic-med/molcellbiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 賢児 (IRIE KENJI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90232628

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

内木 隆寛 (NAIKI TAKAHIRO)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70420081