

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570192

研究課題名(和文)RNA結合タンパク質によるmRNA安定性と翻訳のファインチューニング

研究課題名(英文)Molecular mechanism of regulation of mRNA stability and translation by RNA-binding proteins

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、出芽酵母の出芽部位における局所的な細胞壁合成系において、mRNA安定化因子・翻訳制御因子などのさまざま因子の役割を遺伝学的相互作用を基盤に生化学的・細胞生物学的にも解析し、mRNA局在・安定性制御と局所的翻訳の詳細な制御(ファインチューニング)機構を明らかにすることを目的とした。Khd1がポリA分解酵素Ccr4、Pop2とオーバーラップした機能を持ち、芽の局所的な細胞壁合成と維持の制御に關与すること、Pbp1(ヒトAtaxin-2の酵母オルソログ)がRpl12aおよびRpl12bと相互作用して、Khd1およびCcr4を介した遺伝子発現制御に機能していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we show that PBP1 genetically interacts with CCR4 and KHD1, which encode a cytoplasmic deadenylase and an RNA binding protein, respectively. Ccr4 and Khd1 modulate a signal from Rho1 in the cell wall integrity pathway by regulating the expression of RhoGEF and RhoGAP, and the double deletion of CCR4 and KHD1 confers severe growth defect displaying cell lysis. We found that the pbp1 mutation suppressed the growth defect caused by the ccr4 khd1 mutation. Then we screened novel Pbp1-interacting factors, and found that Pbp1 interacts with ribosomal proteins, Rpl12a and Rpl12b. Similarly to the pbp1 mutation, the rpl12a and rpl12b mutation also suppressed the growth defect caused by the ccr4 khd1 mutation. Our results suggest that Pbp1 is involved in the Ccr4 and Khd1-mediated regulation of cell growth through the association with Rpl12a and Rpl12b.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：RNA 出芽酵母 細胞極性 RNA結合タンパク質 細胞壁 ポリA分解酵素

## 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、mRNA の細胞内局在や mRNA 安定性の制御、および局所的翻訳制御の機構がある。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 局在や安定性制御には、モータータンパク質や拡散による RNA の輸送だけでなく、Stress Granule などの RNA 顆粒にみられるように、特定の場所で RNA が安定化されるという機構もある。これら mRNA 局在・安定性制御と局所的翻訳による制御の機構は、遺伝子発現の時間的・空間的特異性を決める重要な機構であり、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。しかしながら、主に特定のモデル mRNA の解析が先行している一方で、モデル mRNA 以外の個々の mRNA 群についての制御は明らかではなく、またデキャッピングの活性化因子や翻訳抑制因子についてもその作用の分子メカニズムや生理機能の不明なものが多い。

申請者は、出芽酵母においては、RNA 結合タンパク質 Khd1, Puf ファミリーの RNA 結合モチーフをもつ Mpt5, Nuclease ドメインをもつ Mkt1 と Pbp1 の複合体の作用機構と生理機能、動物細胞においては RNA 結合タンパク質 hnRNP K, Stau1 の生理機能などを明らかにし、mRNA 局在・安定性制御と局所的翻訳の解析で成果を挙げた。

本研究では、これまでの成果のうち、とくに出芽酵母の出芽部位における局所的な細胞壁合成系において、mRNA 安定化因子・翻訳制御因子などのさまざま因子の役割を遺伝学的相互作用を基盤に生化学的・細胞生物学的にも解析することで、mRNA 局在・安定性制御と局所的翻訳の詳細な制御(ファインチューニング)機構を明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の(1)から(4)である。

- (1) RNA結合タンパク質Khd1とポリA鎖分解酵素Ccr4によるmRNA安定性と翻訳の調節機構について、細胞壁合成に関わるターゲットmRNA群の詳細な調節機構を明らかにする。ターゲットmRNAごとに異なる調節を、さまざまな周辺因子との遺伝学的相互作用から明らかにする。
- (2) 細胞壁合成に関わるmRNA制御において、遺伝学的相互作用から、ヒトAtaxin2の酵母オルソログPbp1、デキャッピング酵素の周辺で働くDhh1, Pat1, Edc1、翻訳調節因子Caf20などさまざまな因子が関わるのがわかってきた。これらの因子はターゲットmRNAも作用機構も未だ不明であるので、それについて明らかにする。
- (3) シグナル認識粒子サブユニットSec65はKhd1と結合し、細胞壁合成にも関わる。Sec65がmRNA安定性制御と翻訳制御の機構にどのように関わるかを明らかにする。
- (4) 出芽部位の Rho1 を介した局所的な細胞壁合成、出芽の先端成長、細胞壁維持には、Khd1, Puf5, Ccr4, Pop2 などさまざまな mRNA 制御因子が関わる。Rho1 の活性調節における RNA 制御の全体像を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究計画では、出芽酵母を用いて、出芽部位における低分子量Gタンパク質Rho1による細胞壁合成、シグナル伝達、先端成長をRNAレベルで調節する系を用いて解析する。RNA結合タンパク質Khd1, Puf5、ポリA鎖分解酵素Ccr4, Pop2、デキャッピング酵素活性化因子Dhh1などの遺伝子破壊がこの系に異常を示すことから、種々の因子の遺伝学的相互作用を検討する場合、表現型(酵母の増殖、細胞壁の合成能、Rho1からのシグナル伝達経路の活性化)をモニターしやすいからである。

## 4. 研究成果

### (1) Khd1 と Ccr4 による細胞増殖制御

これまでに、出芽酵母の RNA 結合タンパク質である Khd1 とポリ A 分解酵素である Ccr4 が、低分子量 G タンパク質 Rho1 の Guanine nucleotide exchange factor (GEF)をコードする ROM2 mRNA の発現を正に制御し、Ccr4 が単独で Rho1 の

GTPase-activating protein (GAP) をコードする *LRG1* mRNA の発現を負に制御することを見出してきた。Rho1 は出芽酵母の細胞壁合成に関与しており、*khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株では、*ROM2* の発現が低下し、*LRG1* の発現が上昇する結果、Rho1 の活性が低下し細胞壁の合成異常となり、著しい増殖遅延を示す。今回、Ccr4 と同じくポリ A 鎖分解酵素である Pop2 と、デキヤッピング酵素活性化因子である Dhh1 が、*ROM2* mRNA や *LRG1* mRNA の発現に関与し細胞壁合成に機能しているかを解析した。まず、野生型株、*pop2Δ* 株、*dhh1Δ* 株において *ROM2* mRNA と *LRG1* mRNA のノザン解析を行った。その結果、*ROM2* mRNA レベルは差がなかったが、*LRG1* mRNA レベルは、*pop2Δ* 株、*dhh1Δ* 株において野生型株に比べて上昇していた。よって、Pop2 と Dhh1 は *LRG1* mRNA の発現を負に制御していることがわかった。次に、*pop2Δ rom2Δ* 株、*dhh1Δ rom2Δ* 株を作製し、各変異株の増殖を比較した。その結果、*pop2Δ rom2Δ* 株、*dhh1Δ rom2Δ* 株の増殖速度は、それぞれ *pop2Δ* 株、*dhh1Δ* 株に比べて著しく低下した。これは、*pop2Δ rom2Δ* 株、*dhh1Δ rom2Δ* 株で GEF である Rom2 の低下と GAP である Lrg1 の上昇が同時に生じることで Rho1 が不活性化するためと考えられる。よって、Pop2 と Dhh1 は *LRG1* mRNA の発現を負に制御し、その効果が表現型に顕著に現れることが示唆された。次に、*pop2Δ rom2Δ lrg1Δ* 株、*dhh1Δ rom2Δ lrg1Δ* 株を作製し、各変異株の増殖を比較した。その結果、*pop2Δ rom2Δ lrg1Δ* 株、*dhh1Δ rom2Δ lrg1Δ* 株の増殖速度は *rom2Δ lrg1Δ* 株よりも低下した。このことから、Pop2 および Dhh1 は、*LRG1* mRNA 以外の mRNA も制御して細胞増殖に関与していることが示唆された。

## (2) PBP1 による細胞増殖制御

Poly(A)-binding protein (Pab1)-binding protein, Pbp1 (ヒト Ataxin-2の酵母オルソログ)をコードするPBP1の遺伝子欠損が *khd1Δ ccr4Δ* 二重変異株の増殖遅延を抑圧することを見出した。Pbp1はポリA鎖の長さの制御、Stress Granules (SGs)やポリソーム画分に局在することが知られており、RNA代謝や翻訳制御に機能しているのではないかと考えられているが、*pbp1Δ*単独

変異株はその表現型に著しい変化を示さないため、その機能や生理的意義は深く理解されていない。遺伝学的解析から、Pbp1はもう一つのポリA分解酵素であるPan2依存的にKhd1およびCcr4を介した細胞増殖制御に関わる一方で、Pbp1はPan2非依存的にも細胞増殖を制御する可能性を示した。次に、Pan2非依存的なPbp1の機能を調べるためにPbp1と相互作用する因子を探索し、リボソームの大サブユニットを構成するRpl12aおよびRpl12bを同定した。*rpl12aΔ*変異および*rpl12bΔ*変異は*pbp1Δ*変異と同様に、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株の増殖遅延を抑圧した。以上の結果から、Pbp1はRpl12aおよびRpl12bと相互作用して、Khd1およびCcr4を介した遺伝子発現制御に機能していることが示唆された。次に、ポリソーム解析を行ったところ、*khd1Δ ccr4Δ*二重変異株では野生型と比較して翻訳効率が低下傾向にあり、*khd1Δ ccr4Δ pbp1Δ*三重変異株ではその低下が抑圧された。以上の結果から、Pbp1はリボソームと結合して翻訳制御に機能することで、細胞壁合成系を制御していることが示唆された。

## 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)

Yamaguchi Y, Naiki T, Irie K,  
Stau1 regulates Dvl2 expression during myoblast differentiation.  
(Biochem Biophys Res Commun. 2012, 417(1):427-32.) 査読有  
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.133.

Kimura Y, Irie K, Irie K,  
Pbp1 is involved in the Ccr4 and Khd1-mediated regulation of cell growth through the association with ribosomal proteins, Rpl12a and Rpl12b.  
(Eukaryot Cell. 2013 Jun;12(6):864-74.) 査読有  
doi: 10.1128/EC.00370-12.

Takashima O, Tsuruta F, Kigoshi Y, Nakamura S, Kim J, Katoh MC, Fukuda T, Irie K, Chiba T. Brp2 Regulates Temporal Control of NF-κB Localization Mediated by

Inflammatory Response. ( PLoS  
One. 2013;8(3):e58911. doi:  
10.1371/journal.pone.0058911. Epub 2013 Mar  
15. ) 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0058911.

木村雄一、入江賢児 ATXN2 の酵母オル  
ソログ Pbp1 はリボソーム蛋白質と協  
調して増殖を制御する医学のあゆみ  
250 巻 3 号 225-226, 2014 年 7 月

〔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](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