

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06944

研究課題名(和文) RNA制御系によるmRNA安定性と翻訳の時空間ファインチューニング

研究課題名(英文) Spatiotemporal fine tuning 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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ポリA分解酵素Ccr4によるLRG1発現機構を調べた結果、対数増殖期でのLrg1タンパク質レベルは、野生型株とccr4変異株で大きな変化がなかった。定常状態では、野生型株よりccr4変異株でLrg1タンパク質レベルが高かった。ccr4 pbp1二重変異株では低下した。LRG1 mRNAのpolyA鎖の長さは、野生型株よりもccr4変異株で長く、ccr4 pbp1二重変異株ではccr4変異株よりも短くなっていた。以上の結果から、Ccr4とPbp1は、LRG1 mRNAのpolyA鎖の長さを調節することにより、定常状態でのLrg1タンパク質レベルを調節していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Ccr4 is a major cytoplasmic deadenylase involved in mRNA poly(A) tail shortening in *Saccharomyces cerevisiae*. In the log-phase ccr4 mutant cells, LRG1 poly(A) tail was longer and LRG1 mRNA level was higher than those in the log-phase wild-type (WT) cells. Unexpectedly, Lrg1 protein level in the ccr4 mutant cells was comparable with that in WT. In the stationary-phase ccr4 mutant cells, LRG1 poly(A) tail length was still longer and LRG1 mRNA level was still higher than those in WT cells. In contrast to the log phase, Lrg1 protein level in the stationary-phase ccr4 mutant cells was maintained much higher than that in the stationary-phase WT cells. Loss of PBP1 reduced the LRG1 poly(A) tail length as well as LRG1 mRNA and protein levels in the stationary-phase ccr4 mutant cells. Our results suggest that Ccr4 regulates not only LRG1 mRNA level through poly(A) shortening but also the translation of LRG1 mRNA, and that Pbp1 is involved in the Ccr4-mediated regulation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：RNA 出芽酵母 ポリA分解酵素 細胞壁 RNA結合タンパク質

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、Puf5 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てきた。

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タンパク質合成系において、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 mRNA とタンパク質の高精細イメージングを組み合わせることで、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ことがわかってきた。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(図1)。

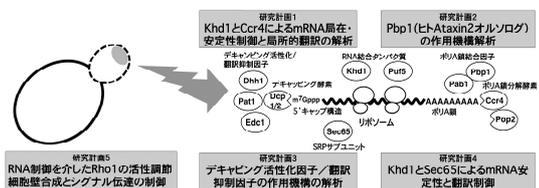


図1. 出芽部位における低分子量 G タンパク質 Rho1 による細胞壁合成、シグナル伝達、先端成長を RNA レベルで調節する系

#### 4. 研究成果

(1) Ccr4 と Pbp1 によるポリ A の長さの制御  
出芽酵母のポリ A 分解酵素である Ccr4 は、低分子量 G タンパク質 Rho1 の GTPase-activating protein (GAP) をコードする *LRG1* mRNA の発現を負に制御する。Rho1 は細胞壁合成に関与しており、*ccr4Δ* 二重変異株では、*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増殖遅延を示す。*ccr4Δ* 変異株の増殖遅延は、*LRG1* 遺伝子の欠損で抑圧される。また、*ccr4Δ* 変異株の増殖遅延は、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* の遺伝子欠損によっても抑圧される。しかしながら、*PBP1* 遺伝子欠損による *ccr4Δ* 変異抑圧の分子機構は不明であった。今回、Ccr4 による *LRG1* 発現機構を調べた結果、対数増殖期での Lrg1 タンパク質レベルは、野生型株と *ccr4Δ* 変異株で大きな変化がなかった。定常状態になると、野生型株では Lrg1 タンパク質レベルが大きく低下したのに対し、*ccr4Δ* 変異株では定常状態でも Lrg1 タンパク質は発現したままであった (図 2)。

#### 14 Short summary 1

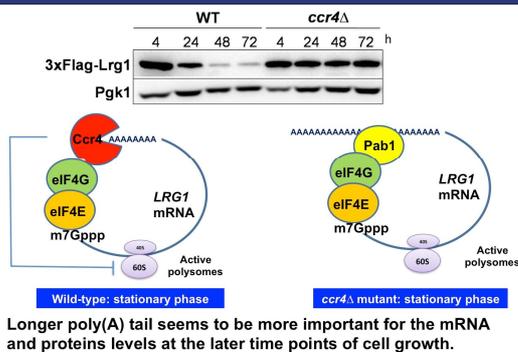


図 2 . Ccr4 は *LRG1* mRNA の polyA 鎖の長さを調節することにより、定常状態の Lrg1 タンパク質の発現レベルを調節する。

*ccr4Δ pbp1Δ* 二重変異株では定常状態で Lrg1 タンパク質レベルが低下した。*LRG1* mRNA の polyA 鎖の長さは、野生型株よりも *ccr4Δ* 変異株で長く、*ccr4Δ pbp1Δ* 二重変異株では *ccr4Δ* 変異株よりも短くなっていた。以上の結果から、Ccr4 と Pbp1 は、*LRG1* mRNA の polyA 鎖の長さを調節することにより、定常状態の Lrg1 タンパク質の発現レベルを調節していることが明らかとなった。また、通常、野生株の定常状態で起き

る全体的な翻訳抑制が、定常状態の *ccr4Δ* 変異体では起こらないことも示し、Ccr4 が翻訳制御にも関わることを示しました。

さらに、*pbp1Δ* 変異がもう一つのデアデニラーゼ Pan2 活性依存的に、*LRG1* mRNA のポリ (A) 尾部を短縮し、定常状態の *ccr4Δ* 変異細胞の *LRG1* mRNA およびタンパク質レベルを低下させることを示した。この結果は、Pbp1 がデアデニラーゼ Pan2 活性を制御することを示す *in vivo* での初めてのデータであり、またこの結果は Pbp1 が *LRG1* mRNA など特定の mRNA の翻訳制御に関与することを示唆する結果である (図 3)。

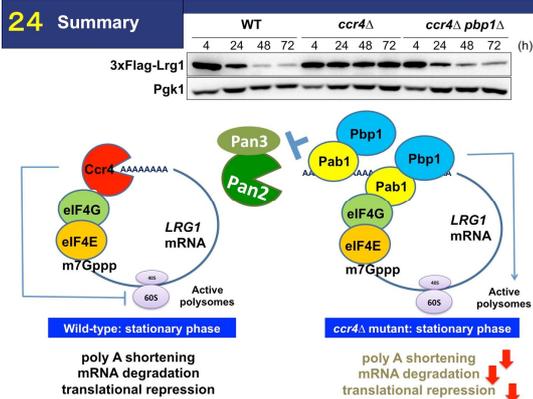


図 3 . Ccr4 と Pbp1 は、*LRG1* mRNA の polyA 鎖の長さを調節することにより、定常状態の Lrg1 タンパク質の発現レベルを調節する。

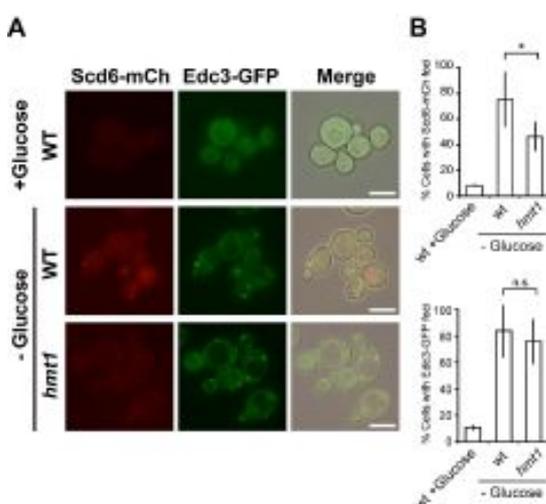
#### (2) ポリ A 分解酵素 Pop2

もう一つのポリ A 分解酵素である Pop2 について解析し、*pop2Δ* 変異株も、*ccr4Δ* 変異株と同様に、定常状態の Lrg1 タンパク質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増殖遅延を示すことを示した。また、*pop2Δ* 変異株の増殖遅延も *PBP1* の遺伝子欠損により抑圧された。この時、*pop2Δ pbp1Δ* 二重変異株では定常状態で Lrg1 タンパク質レベルが低下した。以上の結果から、Ccr4 と Pbp1 に加えて、Pop2 も *LRG1* mRNA の polyA 鎖の長さを調節することにより、Lrg1 タンパク質の発現レベルを調節していることが明らかとなった。

#### (3) RNA 結合タンパク質 Scd6 の局在制御

RNA 結合タンパク質 Scd6 は、ストレス条件下で P ボディと呼ばれる顆粒状の構造に局在し、mRNA キャップ構造の除去機構

を活性化し RNA 分解や翻訳制御に機能する。しかしながら、Scd6 の細胞内における詳細な機能は明らかになってなかった。今回、Scd6 がアルギニンメチル化酵素 Hmt1 と結合すること、Scd6 内の RGG ドメインのアルギニン残基が Hmt1 依存的にジメチル化されることを明らかにした。これらアルギニン残基への変異導入は Scd6 の P ボディ局在不全を示すことを見出し、Scd6 の P ボディ局在が Hmt1 により制御されることを示唆した(図 4)。さらに、Scd6 が RNA 分解や翻訳制御に機能する Dhh1 と協調して P ボディ形成に寄与することも明らかにした。以上の結果は、P ボディ形成における新たな制御機構の存在を示唆し



た結果である。

図 4 . Scd6 の P ボディ局在は Hmt1 のメチル化により制御される

## 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 8 件)

Suda Y, Tachikawa H, Inoue I, Kurita T, Saito C, Kurokawa K, Nakano A, Irie K. Activation of Rab GTPase Sec4 by its GEF Sec2 is required for prospore membrane formation during sporulation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (FEMS Yeast Res. 2018 Feb 1;18(1).) 査読有 doi: 10.1093/femsyr/fox095. PMID: 29293994

Kimura Y, Irie K, Mizuno T.

Expression control of the AMPK regulatory subunit and its functional significance in yeast ER stress response.

(Sci Rep. 2017 Apr 21;7:46713.) 査読有 doi: 10.1038/srep46713.

Duy DL, Suda Y, Irie K.

Cytoplasmic deadenylase Ccr4 is required for translational repression of LRG1 mRNA in the stationary phase.

(PLoS One. 2017 Feb 23;12(2):e0172476.) 査読有、doi: 10.1371/journal.pone.0172476.

Ito Y, Kitagawa T, Yamanishi M, Katahira S, Izawa S, Irie K, Furutani-Seiki M, Matsuyama T.

Enhancement of protein production via the strong DIT1 terminator and two RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*.

(Sci Rep. 2016 Nov 15;6:36997.) 査読有 doi: 10.1038/srep36997.

Lien PT, Izumikawa K, Muroi K, Irie K, Suda Y, Irie K.

Analysis of the Physiological Activities of Scd6 through Its Interaction with Hmt1. (PLoS One. 2016 11(10):e0164773.) 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0164773.

Li X, Ohmori T, Irie K, Kimura Y, Suda Y, Mizuno T, Irie K. Different Regulations of ROM2 and LRG1 Expression by Ccr4, Pop2, and Dhh1 in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Integrity Pathway.

(mSphere. 2016 Sep 28;1(5).) 査読有 pii: e00250-16. PMID: 27704052

Wang YW, Hong TW, Tai YL, Wang YJ, Tsai SH, Lien PT, Chou TH, Lai JY, Chu R, Ding ST, Irie K, Li TK, Tzean SS, Shen TL. Evaluation of an Epitypified *Ophiocordyceps formosana* (*Cordyceps* s.l.) for Its Pharmacological Potential. (Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:189891.) 査読有 doi: 10.1155/2015/189891.

Mizuno T, Masuda Y, Irie K.

The *Saccharomyces cerevisiae* AMPK, Snf1, Negatively Regulates the Hog1 MAPK Pathway in ER Stress Response.

(PLoS Genet. 2015 11(9):e1005491.) 査読有

doi: 10.1371/journal.pgen.1005491.

〔その他〕

ホームページ等

<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

### (3)連携研究者

須田 恭之 (SUDA YASUYUKI)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：10553844