

【領域番号】 3001

【領域略称名】 RNA制御学

【領域代表者（所属）】 稲田利文（東北大学・薬学研究科・教授）

本領域では、複雑で巧妙な生命体構築の基本原則としての遺伝子産物の「非対称性」と「多様性」の獲得と、それを支える「品質保証」機構の理解を目的とし、その最も重要な分子基盤である『RNA プログラム』の分子機構の解明を目指す。また、RNA プログラムの知見をもとに、RNA 制御を介したより高次の細胞機能制御機構の理解を目指した。3つ RNA プログラムの解析と融合領域課題について、当初の設定目的と領域設定期間内の達成度を記載する。

### (1) 多様性獲得プログラム

#### 【設定目的】

多細胞生物の比較的少ない遺伝子からタンパク質発現の時間的・空間的多様性を生み出す「多様性獲得プログラム」の最も重要な機構が、mRNA 前駆体の選択的スプライシングである。しかし、ゲノムプロジェクトの進行に伴いゲノムの塩基配列がさまざまな真核生物種で明らかになっているにもかかわらず、我々の知識は生体内の各組織・細胞における mRNA アイソフォームを予測するには至っていない。本領域研究では、選択的スプライシングに参与するシス配列・トランス因子の同定とその時空間的な制御機構の解明を目指す。

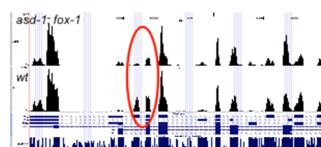
#### 【達成度】

黒柳計画班員は、線虫 *C. elegans* の選択的スプライシング制御因子の変異体を用いて RNA-seq 法によって、制御因子の標的遺伝子とシスエレメントの網羅的探索を行った。得られた候補遺伝子を、選択的スプライシングレポーター作製法を用いて解析した (*Nature Protocols* 2010)。この情報を基盤として、筋肉組織特異的スプライシング因子や神経系特異的スプライシング制御因子による選択的スプライシング制御を新規に見出した (*PLoS Genet.* 2012; *PLoS Genet.* 2013)。また、神経系特異的な CELF ファミリースプライシング制御因子 UNC-75 のシスエレメントを特定して、シスエレメントと標的エクソンの相対的な位置関係により UNC-75 の効果が

逆転することを明らかにした (*Nucleic Acids Res.* 2013)。この成果は、「mRNA アイソフォームを予測する」という当初目的のための重要な一歩で、他の組織特異的な制御因子についても同様の解析を進めており、組織特異的選択的スプライシングの制御機構の理解が飛躍的に進んだ。また井上・大野計画班員は、5'スプライス部位の認識に必須な U1 snRNP 非依存の新規スプライシング機構も見出した (*Nucleic Acids Res.* 2009)。

#### 多様性獲得

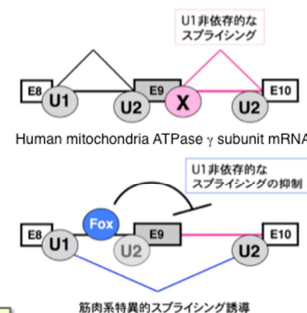
##### スプライシング暗号の 解読に向けて



RNA-seq法による標的遺伝子とシスエレメントの網羅的探索 (*Nucleic Acids Res* 2013)

選択的スプライシング解析用レポーター系の構築と制御因子の同定  
黒柳 *Nature Protocols* (2010);  
*PLoS Genetics* (2012)

##### 新規スプライシング制御機構の発見



U1非依存的なスプライシングの発見  
井上・大野 *Nucleic Acids Res* (2009)

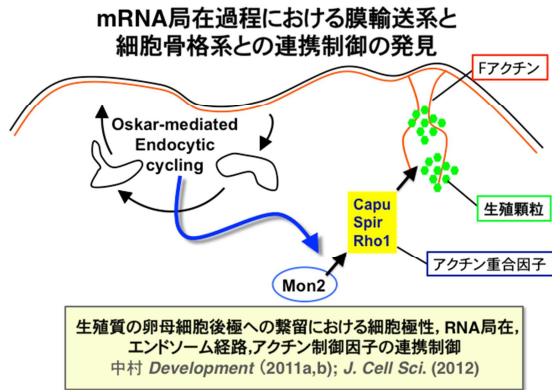
### (2) 非対称性獲得プログラム

#### 【設定目的】

個体発生の過程で生じる細胞の極性は、様々な「非対称性制御プログラム」により獲得される。例えば、ショウジョウバエの前後軸の形成や、生殖細胞形成に必要な因子である *nanos* や *oskar* は mRNA の状態で卵内に局在し、時空間的な翻訳制御を受けることによって機能を果たす。これらの mRNA は、タンパク質と細胞質 RNP 顆粒を形成して目的の部位に輸送され、翻訳制御を受ける。類似の細胞質 RNP 顆粒は神経細胞でも観察される。本領域研究では、生殖細胞形成や胚軸形成といった 高次生命現象における RNA 局在と翻訳制御との連携の分子基盤を明らかにする。

【達成度】

非対称性獲得



中村計画班員は、ショウジョウバエ生殖質の動態解析を進め、新たな RNA 制御機構を見出した。mRNA の局在と翻訳制御を行う RNP 複合体の因子である Edc3 の機能解析から、RNP 複合体の構成タンパク質の動的制御の重要性を浮き彫りにした。また、生殖質繫留過程の解析から、膜輸送系とアクチン骨格系の制御を介した RNP の局在維持機構を明らかにした (*Development* 2011)。西田公募班員は、ホヤの胚発生における中内胚葉の分離に必須の転写因子をコードする Not mRNA について、核移動と連携した mRNA の非対称分配機構を明らかにした (*Dev. Cell* 2012)。井上計画班員は、生殖細胞・体細胞の分化確立に働く miRNA 制御システムを解析し、RNA 結合蛋白質

DAZL が *tldr7* mRNA の 3'UTR に結合し、ポリ A 鎖伸長化を促進することによって miRNA による抑制を生殖細胞のみで解除することを発見した (*PLoS ONE* 2009)。

(3) 品質保証プログラム

【設定目的】

生命現象の基盤となる正常な遺伝子発現は、様々な品質管理機構によって保証されている。DNA 上の変異やスプライシングのエラー等により合成される異常 mRNA の品質はリボソームにより感知され、異常な翻訳終結が引き金となって「mRNA 機構」が作動し、異常 mRNA の分解が促進される。例えば、ナンセンス変異を持った mRNA は、ヒトから酵母まで普遍的に存在するナンセンス依存分解系(NMD)により分解される。最近まで、異常 mRNA の分解のみが異常タンパク質の発現抑制を担うと考えられてきたが、翻訳アレストや異常タンパク質の分解も機構の上で重要であることが示された。本学術領域では、異常な翻訳によって作動する機構の全体像の理解を目的として、従来から解析されている 異常 mRNA の認識と分解機構に加え、翻訳に共役した異常タンパク質の分解機構を明らかにする。

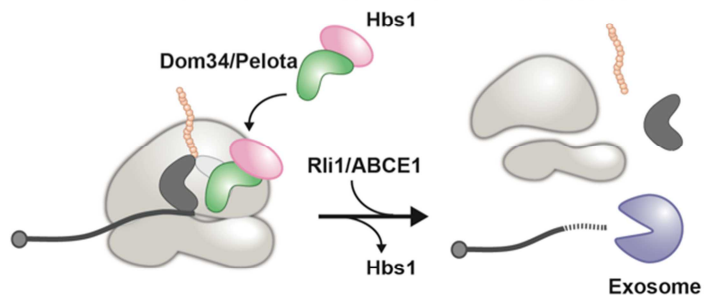
【達成度】

稲田計画班員は、細胞内の主要な異常 mRNA である終止コドンを持たないノンストップ mRNA の機構について解析を行い、①新規翻訳因子複合体 Dom34/Hbs1 複合体の構造を基盤とした終止コドン非依存の翻訳終結反応における機能解明 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)、②連続した塩基性アミノ酸残基による翻訳伸長阻害 (アレスト) における 40S サブユニット結合因子 RACK1 の機能 (*EMBO Rep.* 2010)、③リボソーム結合 E3 ユビキチンライゲース Not4 の翻訳伸長阻害に伴う新生ポリペプチド分解促進における新規機能 (*J. Biol. Chem.* 2009) を見出した。さらに、Dom34/Hbs1 複合体がノンストップ mRNA の末端で停滞したリボソームを解離することでエキソソームによるノンストップ mRNA の迅速な分解を引き起こすことを解明した (*Mol. Cell* 2012)。以上の結果は、細胞内の主要な異常 mRNA であるノンストップ mRNA の品質管理機構の理解に大きく貢献し、国際的にも評価された。また、名古屋大学・遠藤研究室との共同研究により、ミトコンドリアや小胞体の mRNA がノンストップになった場合に、トランスロコンに異常タンパク質が繫留されることを防止する品質管理機構として Dom34/Hbs1 複合体が極めて重要な役割を果たすことを示した (*Cell Rep.* 2012)。また、異常な位置に終止コドンを持つ異常 mRNA の機構について解析を行い、Upf 複合体による短鎖型異常タンパク質の分解促進機能 (*EMBO Rep.* 2009)、等を明らかにし、mRNA 分解にとどまらない品質管理機構の全体像の理解に大きく貢献した。

大野計画班員と北島公募班員は、機能不全の rRNA の機能不全の機構を解析した。rRNA を持つリボソームは翻訳によって異常と認識され、その rRNA は迅速に分解される (nonfunctional rRNA decay; NRD)。出芽酵

品質管理

普遍的な品質管理因子の機能解明



品質管理機構におけるDom34:Hbs1の普遍的な機能  
 稲田 *EMBO Rep* (2010); *PNAS* (2010); *Mol Cell* (2012)  
 品質管理機構における異常タンパク質分解の普遍的な機能  
 稲田 *EMBO Rep* (2009); *JBC* (2009)  
*Cell Reports* (2012)

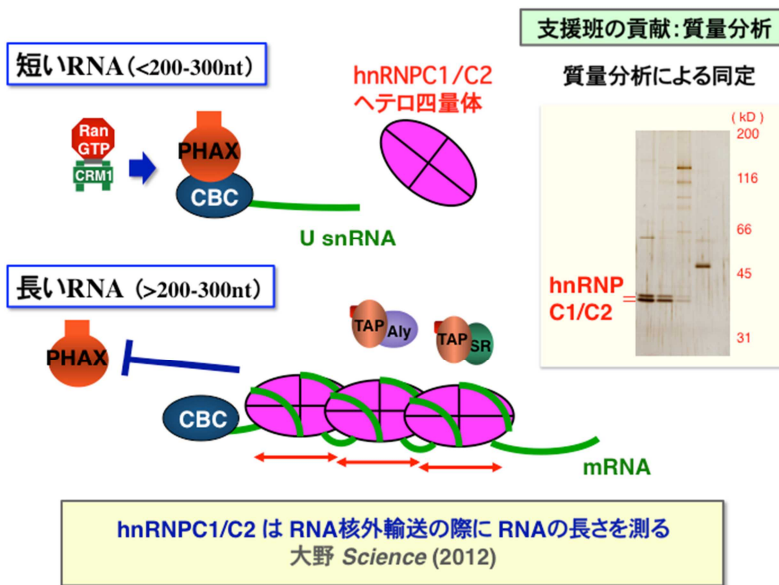
母で 25S の NRD に Mms1 と Rtt101 が必要であり、これらを含むユビキチンリガーゼ複合体が、機能不全リボソームをユビキチンすることを発見した (*Genes Dev.* 2009; *EMBO J.* 2012)。以上の研究成果は異常 rRNA の認識と分解機構の理解に非常に大きく貢献した。

#### (4) 核内 RNA プロセッシング反応と下流の発現制御機構との連携

##### 【設定目的】

RNA の核外輸送を担う因子群は、細胞質における mRNA の品質保証機構や局在化などの核外輸送後の RNA の運命決定にも大きく関与する。本領域研究では、RNA の核外輸送を担う因子を同定し、さらに新規核外輸送因子が品質保証機構や遺伝子発現に重要な役割を果たす可能性を検証する。また核内 RNA を高効率でロックダウンできる系を用い、核内低分子 RNA が制御する RNA プロセッシング現象の同定と、その作用機構の解明を目指す。

##### 【達成度】



大野計画班員は、mRNA 核外輸送における RNA 識別機構を解析し、異なる RNA を識別する特徴のひとつとして「RNA の長さ」を同定し、その分子機構を解析した。U snRNA の輸送因子である PHAX (phosphorylated adaptor for RNA export) は、細胞核内では約 200 ~ 300 塩基長以下の短い RNA にのみ結合した。この結果から、細胞には RNA の長さを測り輸送経路を決定する機構が存在することが示唆された。様々な生化学的実験から、長い RNA と U snRNA 輸送因子 PHAX の結合を特異的に阻害する活性を、HeLa 細胞の核抽出液に見いだした。核抽出液から阻害活性を生化学的に精製し、hnRNP C1/C2 のヘテロ 4 量体を同定した

(*Science* 2012)。長年不明であった核外輸送における RNA の ID の 1 つである長さを識別する機構を初めて明らかにする優れた成果である。また、U snRNA が核内構造体 Cajal body に一旦局在し、核外輸送の必須因子 PHAX と結合して核外輸送されることを発見し、Cajal Body が U snRNA 核外輸送複合体のアッセンブリーのサーベイランス因子である可能性を明らかにした (*J. Cell Biol.* 2010)。さらに、高等真核生物における mRNA 前駆体核内保持因子を解析した結果、スプライシングの初期因子である U1 snRNP と U2AF が mRNA 前駆体の核内保持に重要であることを明らかにした。また、U2AF の特に 65-kD サブユニット U2AF<sup>65</sup> が核内保持に重要であり、その複数のドメインが核内保持活性を持つことを明らかにした。さらに、スプライシングと核外輸送に関与する DExD-box RNA ヘリカーゼ UAP56 が U2AF<sup>65</sup> と協調的に mRNA 前駆体の核内保持に働くことも見いだした。片平公募班員は、転写と核外輸送の共役因子である TREX (TRanscription-EXport) 複合体のヒトオルソログ Thoc5 が、Aly とともにコアダプターとして *Hsp70* mRNA の核外輸送における機能を見いだした (*RNA Biol.* 2009; *EMBO J.* 2009)。

廣瀬計画班員 (最先端若手採扱後は総括班連携研究者) は、オリジナルな核内 RNA ロックダウン法を駆使して、パラスペックル構造体の構造構築における MENε/β 非コード RNA の機能を明らかにした (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009)。U7 snRNA のロックダウンによってヒストン mRNA の 3' プロセッシングが不全となり、異常なポリ A 付加型 mRNA が蓄積し、細胞周期 S 期の著しい遅延が起こることを観測した (*RNA* 2009)。DNA 合成休止期において U7 snRNA がヒストン mRNA 合成を負に制御する新機能を担っていることを示した。核内構造体の構築原理と生理機能の理解が格段に進んだ。

#### (5) RNA 局在・翻訳制御と RNA 分解の連携機構

##### 【設定目的】

細胞質 RNP 顆粒は、mRNA 分解の場である P ボディとの相同性が明らかとなっており、共通する分子基盤の解明を目指す。

【達成度】

生殖質因子 Pgc の解析から、miRNA 経路の抑制による生殖質 RNA の安定化における動物種を超えた共通性が明らかになった (中村班員)。哺乳類におけるスプライシング後のイントロンの代謝経路を、代謝途上のリアットイントロン-タンパク質複合体の2段階のアフィニティー精製により解析した結果、miRNA の合成とスプライシング反応の関連が明らかとなった (大野計・片岡班員、Mol. Cell. Biol. 2009)。翻訳終結に依存したポリ A 鎖分解機構の分子基盤を星野計画班員が解析し、ポリ A 鎖結合因子 PABP に対する翻訳終結因子 eRF3 と Tob との競合的相互作用が NMR 解析により明らかになった (J Biol. Chem. 2009)。また、グルタミン酸受容体 mRNA 特異的 RNA 結合因子 CPEB3 と Caf1 が、Tob を仲介役として結合して mRNA 分解を制御することを発見した (Oncogene 2013)。

(6) 高次生命現象における RNA プログラムの機能解明

【設定目的】

mRNA 安定性や翻訳制御、mRNA 局在などの RNA プログラムは、様々な細胞機能を制御し、高次生命現象に重要な機能を果たす。細胞内外の様々なシグナル応答における RNA 段階での制御機構の役割について解明を行う。また、代表的な外来 RNA を検知し自然免疫系を作用させる RNA センサー RLR に焦点をあて、内在性の標的 RNA の同定とその制御の生理的意義を解析し、生体防御の全体像の理解を目指す。

【達成度】

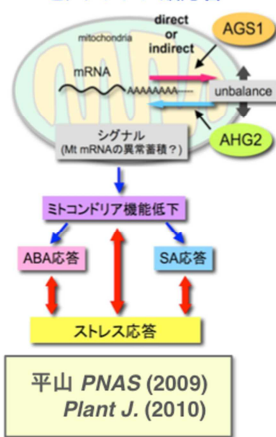
杉浦計画班員は、MAPK と mRNA 結合タンパク質依存的細胞周期調節メカニズムを解析し、mRNA 結合タンパク質 Nrd1 が細胞周期に重要な働きをするミオシン mRNA との相互作用と安定化を介して、増殖と分化という二つの細胞運命を MAPK によるリン酸化依存的に制御する重要な mRNA 結合蛋白質であることを見出した (Mol. Biol. Cell 2009)。また、Nrd1 が RACK ホモログ Cpc2 との相互作用を介して MAPK によるリン酸化依存的にストレス顆粒 (Stress granule: SG) に移行することにより、ストレス応答を調節するというメカニズムを見出した (PLoS One 2012)。米山計画班員は、自然免疫誘導因子である RLR ファミリーの生理的役割を解析し、RLR による RNA 認識の分子機構を明確にするとともに (J Biol. Chem. 2009)、RLR がストレス顆粒 (Stress granule: SG) で機能していることを見出した (PLoS One 2012)。

平山公募班員は、植物ミトコンドリア mRNA の polyA 鎖長の調節機構を解析し、アブシジン酸により強く

複合連携制御

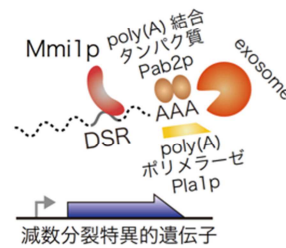
公募研究

植物ミトコンドリアのポリ(A)鎖長制御とアブシジン酸応答



mRNAの選択的除去による減数分裂特異的発現制御

体細胞分裂期



応答する変異株 ahg2-1 の原因遺伝子は polyA 短鎖化酵素 (PARN) であり、ahg2-1 変異の抑制変異は、全て polyA 鎖合成酵素 (PAP) の変異であることを見出した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009; Plant J. 2010)。PARN と PAP が協調的にミトコンドリア mRNA の polyA 鎖の長さを調節し、アブシジン酸応答に重要な役割を果たすことを明らかにした (Plant Cell Physiol. 2009)。山下公募班員は、mRNA 選択的分解による減数分裂特異的な発現機構を解析し、減数分裂特異的な mRNA 内の特異的配列 (DSR) に Mmi1p が結合し、核内 exonome 依存的な mRNA 分解を誘導することを見出した (EMBO J. 2010)。核内 exonome、poly(A)ポリメラーゼ、poly(A)結合タンパク質、mRNA 3'末端成熟因子などが、Mmi1p の誘導する

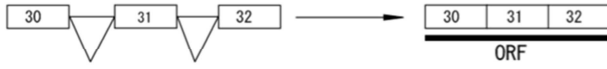
mRNA 分解に必須であり、分裂酵母内で Mmi1p と共局在することが示された。

(7) 疾患治療への応用

片岡班員は、選択的スプライシングの改変による疾患治療につながる研究成果を上げた。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子 Dystrophin のエクソン 3 1 中にナンセンス変異を持っている患者では、このエクソンの skipping が起こることを発見した。このエクソン skipping が hnRNP A1 によるものであること、さらに Cik 特異的阻害剤 TG003 が、患者細胞において変異エクソンの skipping を促進し、部分的ではあるが活性を持った蛋白質の合成を促進することを見出し、治療薬開発へとつながることが示唆された (Nature Commun. 2011)。

### 筋ジストロフィーの治療薬開発へむけて

・正常なジストロフィン遺伝子



・異常なジストロフィン遺伝子



Cik特異的阻害剤によるエクソンのskippingの促進による  
活性型タンパク質発現の回復  
片岡 *J. Cell Biol* (2011); *Nature Commun.* (2011)