Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第１５３４号
学位記番号	第３１０号
氏名	山岸　良多
授与年月日	平成 27 年 3 月 31 日
学位論文の題名	mRNA ポリ A 鎖長の調節を介した遺伝子発現制御機構の解析
論文審査担当者	主査：　今川 正良 副査：　星野 真一，服部 光治，藤原 利伸

学位論文内容要旨

mRNA ポリ A 鎖長の調節を介した遺伝子発現制御機構の解析

山岸良多

【序論】

mRNA の 3'末端に存在するポリ(A)鎖は、転写後の遺伝子発現制御において重要な役割を果たしている。ポリ(A)鎖はポリ(A)鎖結合タンパク質 PABP と共に、5'末端に存在するキャップ構造と相互作用して mRNA を環状化させ、翻訳終結後のリボソームを開始位置へ物理的に近づけることで、リボソームのリサイクリングを助け、翻訳を効率化させている。また、mRNA の分解は翻訳終結後、ポリ(A)鎖の短縮化が開始段階として起こり、その後ポリ(A)鎖が 10 残基程まで短縮された mRNA は脱キャップ酵素やエキソソームなどにより急速に mRNA 本体が分解される。このようにポリ(A)鎖の短縮化は mRNA 分解の律速段階ともなっており、ポリ(A)鎖は mRNA の安定性の制御においてもその役割を果たしている。以上のようにポリ(A)鎖は mRNA の翻訳や安定性といった転写後調節において重要な役割を担っている。近年、このポリ A 鎖長の調節を介した遺伝子発現制御機構の解析が進められ、その分子機構が次第に明らかにされている。当研究室においてはこれまでに、配列特異的 RNA 結合タンパク質 CPEB 及び CPEB3 がポリ(A)鎖分解酵素 Caf1 を mRNA 上へリクルートし、ポリ(A)鎖の短縮化を促進させることで癌遺伝子 c-myc やグルタミン酸受容体 GluR2 の遺伝子発現を負に制御していることを発見しその分子機構を報告している。また、この他にもポリ(A)鎖の短縮化を介した負の発現制御の例は数多く報告されている。一方、ポリ(A)鎖長の調節にはポリ(A)鎖分解の他に、転写後に新たにポリ(A)鎖を付加するポリ(A)鎖伸長による調節も報告されている。しかし、その報告は発生の初期過程や神経に限られ、それ以外の体細胞においては未だ十分には解析されていない。そこで本研究では、ポリ(A)鎖伸長とポリ A 鎖分解抑制の二つに焦点を絞り、その調節を介した遺伝子発現制御について解析を行った。

細胞内では、様々な環境ストレス下においてグローバルにポリ(A)鎖の安定化が起こることが報告されている。しかし、その分子機構及び生理的意義については明らかにされていなかった。当研究室では、これまでにポリ A 鎖分解が翻訳終結と共役して起こること、ポリ A 鎖分解には、翻訳終結因子 eRF3 と二つのポリ A 鎖分解酵素複合体 Pan2-Pan3、及び Tob-Caf1-Ccr4 が中心的な役割を果たしていることを明らかしている。そこで、これら因子に着目し、ストレス時のポリ(A)鎖安定化の分子機構を解明し

た。

また、ポリ(A)鎖の伸長は発生の初期過程において遺伝子発現を正に制御する機構として報告されているが、体細胞におけるポリ A 鎖伸長の存在およびそのメカニズムについては不明な点が多く解析が進んでいなかった。本研究では、STAR ファミリーに属する RNA 結合蛋白質 QKI がポリ A 鎖伸長を引き起こす因子であることを新たに見出し、QKI によるポリ(A)鎖伸長を介した遺伝子発現制御機構を解明した。

【本論】

1.ストレス時の mRNA ポリ(A)鎖安定化の分子機構

mRNA 分解のメカニズムが解明されているβグロビンをレポーターとし、代表的な酸化ストレスである arsenite を用いてストレス時のポリ(A)鎖動態を解析した。ここでは、テトラサイクリンの添加、除去によって転写の誘導、停止を行う Tet-on システムにより、レポーターmRNA の一過的な転写誘導を行い、転写を停止させるのと同時に arsenite を添加し、その後のポリ(A)鎖の経時変化を観察した。その結果、arsenite 処理によりレポーターmRNA のポリ(A)鎖分解の抑制が観察された。そこで、ストレス時にポリ(A)鎖安定化を引き起こすための標的となる因子の探索を行うため、ストレス時のポリ (A)鎖分解関連因子の挙動を解析したところ、Tob と Pan3 が特異的に分解消失することが明らかになった。この Tob 及び Pan3 はともに PABP とポリ(A)鎖分解酵素との結合を仲介することでポリ(A)鎖分解を促進する因子であることから、これら因子の消失がストレス時のポリ(A)鎖の安定化を引き起こすことが強く示唆された。siRNA を用いたノックダウンにより Tob 及び Pan3 を消失させた際のポリ(A)鎖の分解過程を観察した結果、特に Tob ノックダウンにより、ストレス時と同程度のポリ A 鎖安定化が再現され、また Pan3 ノックダウンにおいてもポリ(A)鎖分解の初期過程において分解の抑制が認められた。以上の結果から、ストレス時のポリ A 鎖の安定化は Tob 及び Pan3 の消失に起因することが示された。

2. QKI によるポリ(A)鎖伸長を介した遺伝子発現の転写後調節機構

QKI は STAR ファミリーに属する RNA 結合タンパク質であり、これまでに mRNA の輸送やスプライシングの制御等の機能が報告されている。また、QKI は選択的スプライシングにより C 末端領域に特異的な配列を有する 3 種のアイソフォーム QKI-5、6、7 がほ乳類細胞内で発現していることが知られている。本研究ではまず、QKI が mRNA 代謝に与える影響を解析するため、MS2 結合配列を有するレポーター遺伝子と MS2 タンパク質との融合タンパク質 MS-QKI を用いて QKI をレポーターmRNA の 3'UTR へ繋留させた際の影響を観察した。その結果、QKI-6 を繋留した mRNA はコントロール

である GST と殆ど差がみられなかったのに対し、QKI-5 繋留ではレポーターmRNA が完全に消失した。一方、QKI-7 繋留では mRNA の分子サイズが増加していることが認められた。このサンプルをオリゴ dT と共に RNase H で処理し、ポリ(A)鎖を除去したところ、コントロールと差がみられなくなった。これにより分子量の増加はポリ(A)鎖長の増加によるものであることが分かり、QKI-7 は繋留された mRNA のポリ(A)鎖長を増加させることが明らかとなった。

細胞内でポリ(A)鎖長の増加する原因としては、まず、ポリ(A)鎖分解が抑制されたことによるものである可能性が考えられた。そこで、細胞内の主要なポリ(A)鎖分解酵素である Caf1 と Pan2 の酵素活性変異体を過剰発現させ、細胞内のポリ(A)鎖分解を完全に阻害した際の QKI-7 繋留の効果を解析した。ポリ(A)鎖は Caf1 及び Pan2 の変異体過剰発現により分解が阻害されポリ A 鎖長が増大するが、QKI-7 繋留により更にその長さが増加していることが認められた。これにより、QKI-7 によるポリ(A)鎖長の増加はポリ(A)鎖分解の阻害に起因するものではなく、ポリ(A)鎖を伸長したことによるものであることが明らかになった。

QKI-7 がポリ(A)鎖伸長を引き起こすには、ポリ(A)ポリメラーゼと相互作用する必要が考えられた。そこで主要な細胞質ポリ(A)ポリメラーゼの一つである PAPD4 との相互作用を免疫沈降法により解析した。その結果、QKI-7 と PAPD4 との相互作用が認められ、また、その結合は 3 種の QKI アイソフォーム間でもポリ(A)鎖を伸長させる QKI-7 がもっとも特異的なものであった。PAPD4 が QKI-7 によるポリ(A)鎖伸長において機能していることを検証するため、siRNA を用いて QKI-7 によるポリ(A)鎖伸長に対する PAPD4 ノックダウンの影響を観察した結果、コントロールである GST には影響がみられなかったのに対し、PAPD4 ノックダウンによって QKI-7 によるポリ(A)鎖伸長の抑制が認められた。これにより、QKI-7 は PAPD4 と相互作用することで、ポリ(A)鎖伸長を引き起こすことが明らかになった。

RNA 結合タンパク質である QKI は、これまでの研究によって複数の標的遺伝子が報告されており、いずれも QKI response element (QRE)と呼ばれる認識配列を介して標的遺伝子と結合することでその制御を行っている。その一つである hnRNPA1 は 3'UTR 上に QRE を持ち、QKI によりその発現が制御されている。そこで、hnRNPA1 の 3'UTR を挿入したレポーター遺伝子を作製し、QKI がこのレポーターmRNA においても繋留実験の場合と同様なポリ(A)鎖長の制御を行うか検証を行った。siRNA によって QKI 及び PAPD4 をノックダウンした細胞に hnRNPA1 の 3'UTR を含むレポーター遺伝子あるいはそこから QRE を除いたレポーター遺伝子を導入し、パルスチェイス法によりポリ(A)鎖への影響を解析した。その結果、hnRNPA1 の 3'UTR を含むレポーターmRNA

のポリ(A)鎖分解が QKI 及び PAPD4 のノックダウンにより促進した。一方、QRE を除いたレポーターmRNA ではノックダウンによる影響はみられなかった。これにより、QKI 及び PAPD4 は QRE 依存的に QKI の標的遺伝子のポリ(A)鎖長の制御を行っていることが明らかになった。

【結論】

本研究では mRNA ポリ A 鎖の安定化と伸長という mRNA ポリ A 鎖長を増大させる 2 つの制御系について解析しその分子機構を解明した。

1.ストレス時のポリ(A)鎖安定化の分子機構

細胞内におけるストレス時のグローバルな mRNA ポリ(A)鎖安定化の機構はこれまで明らかにされていなかったが、本研究によりポリ(A)鎖分解酵素と mRNA を仲介する Tob と Pan3 がストレス時に特異的に分解消失し、ポリ(A)鎖分解酵素が mRNA へリクルートされなくなることに起因することを明らかにした。

2. QKI によるポリ(A)鎖伸長を介した遺伝子発現の転写後調節機構

これまで神経細胞以外の体細胞において細胞質ポリ(A)鎖伸長の分子機構については報告されていなかった。本研究では新たに配列特異的 RNA 結合タンパク質 QKI が、QRE を持つ標的遺伝子のポリ(A)鎖を伸長させることで遺伝子発現を正に制御していることを明らかにした。QKI はポリ(A)ポリメラーゼである PAPD4 を mRNA 上にリクルートすることでポリ A 鎖伸長を促進する。QKI はスプライシング制御因子である hnRNPA1 mRNA のポリ A 鎖伸長によりグリア細胞分化に関わる遺伝子発現を正に制御することで、グリア細胞の分化を促進するものと想定され、統合失調症の原因因子として注目される QKI の欠損が疾患発症を引き起こすメカニズム解明に繋がることが期待される。

【基礎となる報文】

1. Ryota Yamagishi, Nao Hosoda and Shin-ichi Hoshino
Arsenite inhibits mRNA deadnylation through proteolytic degradation.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 455, 323-331 (2014)

2. Ryota Yamagishi, Takeshi Tsusaka, Hiroko Mitsunaga, Takaharu Maehata and Shin-ichi Hoshino
The STAR protein QKI-7 recruits PAPD4 to regulate polyadenylation of its target mRNA.
Manuscript in press