核マトリクス結合蛋白質による RNP 再構築と分配機構の解明

廣瀬　哲郎

研究のねらい

ヒトをはじめとした哺乳類の遺伝子は、数多くの長大なイントロンによって分断されている。そのため遺伝子が発現するためには、転写後段階で複雑な RNA プロセシングが正確に行われ、さらにプロセシングが完了した成熟 mRNA のみが選択的に細胞質に輸送され翻訳される必要がある。こうした成熟 mRNA のみを核外輸送するための RNA 識別機構には、その前段階の RNA スプライシング機構が重要な役割を果たしていることが知られているが、それに至る分子メカニズムは理解されていない。一方、前駆体 mRNA やイントロンさらには一部の蛋白質をコードしていないノンコーディング RNA には積極的に RNA を核内に留め置く機構が働いており、このとき核マトリクスと呼ばれる核内構造体が重要な役割を果たしている事が示唆されている。そこで本研究では、細胞核で生み出された RNA がプロセシングされて成熟化する過程と、その後の RNA の細胞内の挙動の決定機構とをリンクする分子メカニズムの解明を目標に研究を行った。

研究成果

1) RNA の細胞内挙動を司る新規因子の同定

RNAスプライシングの進行過程で、反応中間体を含むC1 複合体中で特異的にイントロンに結合する 160kDaの蛋白質(IBP160)を部位特異的なUVクロスリンク法によって検出することに成功した。IBP160 は、C1 ステージに特異的にブランチ部位から 33～40 塩基上流のイントロン領域に配列に依らず位置特異的に結合するジェネラルなスプライシング因子であることを明らかにした。さらに免疫沈降によってIBP160 は、これまで機能未知であったKIAA0560 というRNAヘリカーゼ様因子であることを同定した。さらにIBP160 はC1 複合体中で核マトリクス結合因子のSRm160 と相互作用しており、イントロン内にコードされている機能性低分子RNAへの蛋白質会合をスプライシング依存的に行う仲介因子であることも明らかにした[1]。

2) 成熟 mRNA の細胞内挙動決定機構におけるイントロンの役割

イントロン上にIBP160 と結合している核マトリクス結合因子SRm160 は、成熟mRNAの核外輸送や品質管理に中心的な役割を果たすエクソン境界複合体(EJC)の構成因子である。そこでSRm160 を含む他のEJC因子も、スプライシング完了前のC1 複合体段階ですでにmRNA周辺にリクルートされている可能性が浮上した。10 種類のEJC因子の免疫沈降実験によって、イントロン結合IBP160 はTAPを除くすべてのEJC因子とC1 複合体中で結合していることが示された。このことから本来スプライシグ完了時にエクソン上に結合するEJCが、その前段階ではイントロン結合因子と共にスプライシング装置内に取り込まれていることが明らかになった。さらに驚くべき事にEJC結合ができないほど短いエクソンをもつ前駆体mRNAを用いた場合にも、C1 複合体でEJCはIBP160 と共にスプライシング装置に取り込まれていることが検出されたことから、この段階でのEJC因子の結合には、最終的に会合するエクソン配列は必要ないことが明らかになった。この発見からEJC会合が何故スプライシング（イントロンの除去）に依存して行われるのかについて部分的に答えが出せたといえる。またEJCは第二のスプライソソームであるU12 スプライソソームによってもリクルートされることを明らかにした[2]。さらにU12 スプライソソームによるスプライシング過程でもIBP160 がイントロンに結合することが検出され

た。これによってIBP160 を介したEJC因子のリクルート経路は二種類のスプライソソーム間で共通であると考えられる。

3) 複数の RNA 核内留置パターンの検出

ヒトの完全長 cDNA データベースに含まれている蛋白質をコードしないノンコーディングRNA(ncRNA)の約８０個の細胞内局在を解析した結果、mRNA と同様にほとんどが細胞質に局在化しているものは、全体の２％に過ぎず、その他の ncRNA は核内と細胞質にほぼ等量、核質、核小体の全体で４つのパターンで局在していることが明らかになった。このうち、前駆体 mRNA が局在化している核マトリクス分画には、多くのものが局在化していることが明らかになった。 このことから核内留置のメカニズムは、RNA プロセシングが不完全な前駆体 mRNA のみに適用されるのではなく、多数の ncRNA の局在決定にも重要な役割を果たしている事が明らかになった。

今後の展開

核内で合成された RNA がプロセシング後にどのような細胞内挙動をとるのかについては、核外輸送と核内留置の少なくとも２つのメカニズムが存在する。mRNA の成熟化に伴う選択的な核外輸送については、EJC が中心的な役割を果たしていることが明らかになっていたが、本研究によって EJC が成熟 mRNA 上にスプライシングに依存して会合する分子機構において、イントロンが重要な働きをしていることが明らかになった。今後はこの前段階からスプライシング完了に呼応して EJC がエクソン上へ会合するためのメカニズムを解明することによって EJC 会合の分子機構の全貌を明らかにする必要がある。EJC を搭載した成熟 mRNA がスプライソソームから放出される段階には、ATP 依存的な RNA ヘリカーゼ hPRP22 が関わっている事が知られており、本研究でも hPRP22 がイントロン上の IBP160 と結合している事が分かっている。このことから hPRP22 による成熟エクソンの放出過程は、EJC の会合およびイントロン上の IBP160 からの解離と密にカップルしていることが考えられる。目下 hPRP22 のドミナントネガティブ変異体を作成して、EJC-IBP160 複合体の解離、エクソン上への EJC 会合をモニターするシステムを整備しているところである。

一方核内に留置される ncRNA の局在パターンから核内留置機構には複数のメカニズムが存在する可能性が浮上した。例えば核内マトリクスのような構造に結合しているもの、あるいは核小体に移行して留置されるもの、あるいは核内の可溶性画分に存在しつつも核外輸送を免れているものなどが挙げられる。今後はそれぞれの核内 ncRNA の局在に必要なエレメントを同定する事によって、それに関わる因子と留置メカニズムを解明し、さらには機能未知の ncRNA の機能解明に結びつけていくことが重要である。

研究成果リスト

(1) 原著論文

1. Hirose, T., Ideue, T., Nagai, M., Hagiwara, M., Shu, M-D., Steitz, J.A. A spliceosomal intron binding protein, IBP160, links position-dependent assembly of intron-encoded box C/D snoRNP to pre-mRNA splicing. Mol. Cell. 23, 673-684. (2006)
2. Hirose, T., Shu, M-D., Steitz, J. A. Splicing of U12-type introns deposits an exon junction complex competent to induce nonsense-mediated mRNA decay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 17976-17981 (2004)

原著論文総数： 2 篇

（2）その他の成果

著作物

1. 佐々木保典、廣瀬哲郎 snoRNAの生合成と機能に関する新知見、蛋白質　核酸　酵素　増刊「RNAと生命」　印刷中
2. 井手上賢、廣瀬哲郎　RNAプロセシングを監視する核内RNA品質管理機構、蛋白質　核酸　酵素　増刊「細胞核の世界」　51, 2205-2209 (2006)
3. 廣瀬哲郎、塩見美喜子　機能性RNAの基本的な特徴と機能、ゲノム医学　6, 97-101 (2006)
4. 廣瀬哲郎　RNAプロセシングの進行を規定するRNPリモデリング、実験医学 23, 1896-1901 (2005)
5. 廣瀬哲郎　RNAの転写後修飾に必要なsnoRNAのユニークな生合成機構、実験医学増刊号「RNA研究の新展開」22, 71-76 (2004)
6. 廣瀬哲郎　イントロンから生み出されるsnoRNAの発現戦略と新たな機能、ゲノム医学　4, 29-34 (2004)
7. 廣瀬哲郎　イントロンを介した遺伝子発現の協調機構、蛋白質　核酸　酵素 49, 1288-1295 (2004)

学会発表

1. 廣瀬哲郎：ヒトの non-codingRNA 様転写物と mRNA との細胞内挙動の違いについて日本分子学会 2006 フォーラムシンポジウム　(2006/12/8)
2. 廣瀬哲郎：イントロンとエクソンのスプライシング後運命決定機構（招待講演）第 78 回日本生化学会ミニシンポジウム　(2005/10/22)
3. 廣瀬哲郎：X160, is a general intron-binding protein that recruits factors involved in late stages of splicing and post-splicing events. Cold Spring Harbor Meeting : Eukaryotic mRNA processing (2005/8/25)
4. 廣瀬哲郎：Mechanistic insights into the linkage between pre-mRNA splicing and snoRNP biogenesis.（招待講演）文部省特定領域研究「RNA 情報網」公開シンポジウム (2005/8/8)
5. 廣瀬哲郎：Strategy for efficient expression of intron-encoded small RNAs.（招待講演）International symposium: Strategies for the acquirement of functional diversity of proteins. (2005/1/20)
6. 廣瀬哲郎：Novel coupling mechanism between splicing and intron-encoded snoRNP biogenesis.（招待講演）国際シンポジウム「選択的スプライシングによる多様性の創造」(2004/12/4)

受賞記録

廣瀬哲郎　（財）病態代謝研究会最優秀理事賞　(2006/12/15)

特許出願

研究期間累積件数：0 件