

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

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

### 2 研究者氏名:

廣瀬 哲郎

### 3 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、転写後段階でスプライシングなどの複雑な RNA プロセッシングが正確に行われ、さらにプロセッ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。成熟 mRNA のみを効率的に核外輸送するための選択的な成熟 mRNA 認識には、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せているが、その分子メカニズムは未知のままであった。一方、未成熟な前駆体 mRNA や切り出されたイントロン、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(ncRNA)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 がプロセッシングされ成熟化する過程と、それぞれの RNA 種のその後の細胞内の運命の決定機構との関わり合いを規定する分子メカニズムの解明を目標に研究を行った。

### 4 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、C1 と呼ばれるスプライシング中間体を含む段階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 ステージ特異的に、配列非依存的にイントロンのブランチ部位から 33~40 塩基上流の領域に結合する。また用いた4種類のイントロンのすべてで対応部位への結合が検出されたことからジェネラルなスプライシング因子であることが明らかになった。クロスリンクによって可視化した IBP160 の免疫沈降によってこの因子は、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、スプライシングヘリカーゼ hPRP22 など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(snoRNA)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<sup>[1]</sup>。

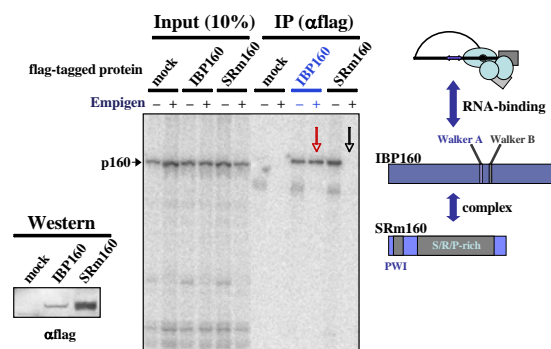


図 1 イントロンの部位特異的 UV クロスリンクにより検出された p160 の免疫沈降による同定 (赤矢印)。同じ移動度の SRm160 は IBP160 と相互作用している。

### 2) 成熟 mRNA の運命決定機構におけるイントロンの役割

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。EJC はこれまでスプライシング反応の完了に連動して成熟エクソンの決まった位置(エクソン境界から 20~24 塩基上流)に会合し、成熟 mRNA を選択的に次のステップへと導くために働くことが分かっているが、EJC がどのようにスプライシングに連動して位置特異的に会合するのかについては未知のままであった。SRm160 がスプライシング中間体の C1 複合体においてイントロン上の IBP160 と結合しているという上記の発見から、その他の EJC 構成因子もスプライシング完了前の段階ですでにスプライシング装置内にリクルートされている可能性が浮上した。10 種類の EJC 構成因子の免疫沈降実験によって、C1 複合体中のイン

トロン結合 IBP160 が TAP を除くすべての EJC 因子と結合していることが明らかになった。このことからスプライシング完了時にエクソン上に会合すると考えられていた 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存在していることが明らかになった。さらに驚くべき事にスプライシング完了時に EJC 会合が不可能な短いエクソンをもつ前駆体 mRNA を用いた場合にも、C1 複合体での EJC 因子は 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 因子の会合には、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。さらに RNAi による IBP160 のノックダウンによって、EJC 依存的な細胞内現象である NMD (ナンセンスコドン依存的な mRNA 分解) が著しく抑えられることが明らかになった。これによって C1 複合体での IBP160 と EJC 因子の結合は、最終的な EJC の機能にリンクしていることが証明された。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。

一方、P120 前駆体 mRNA を用いた *in vitro* スプライシング実験によって、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るスプライシングの結果であってもエクソン上にリクルートされることを明らかにした<sup>[2]</sup>。また 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を検出し、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ことを示す事ができた。

IBP160 はスプライシングが完了後イントロン上に留まり、イントロンのデブランチング前に解離することが明らかになった。上述のように IBP160 はスプライシングの完了した成熟 mRNA をスプライソソームから解離させるために働くヘリカーゼ hPRP22 とも相互作用していることから、IBP160 と相互作用している EJC 因子を解離させてエクソン上に会合させるステップと成熟 mRNA のスプライソソームからの放出がカップルしている可能性が浮上した。

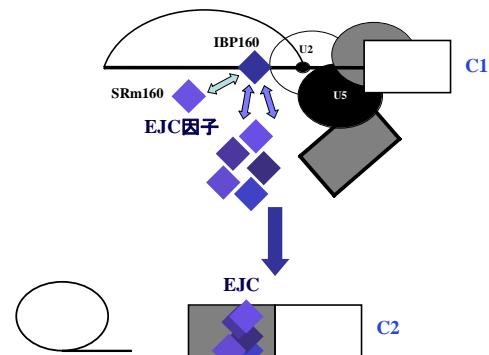


図2 EJC 会合前段階に各構成因子はイントロン上に IBP160 を介してリクルートされる。

### 3) 複数の RNA 核内留置パターンの検出

さがけ研究期間に RNA 研究を取り巻く環境は大きく変化した。トランスクリプトーム解析の結果、膨大な数の蛋白質をコードしないノンコーディング RNA が発見され、その新規機能に注目が集まっている。こうした ncRNA が上記の研究で明らかにしたようなメカニズムによって品質管理を受けて細胞内を輸送されるのかどうかを明らかにする目的で、ヒト完全長 cDNA データベース (H-Inv Release2) に掲載されている ncRNA 様転写物のうち、遺伝子構造、発現に信憑性があり、かつ HeLa 細胞で発現している約 80 個の細胞内局在を解析した。HeLa 細胞を 1) 2 種類の界面活性剤を使って段階的に分画する方法、2) 物理的な破壊後にショ糖密度勾配遠心で分画する方法の 2 つを採用して、細胞質と核、さらに核内のサブ分画を調整し、それぞれの分画に含まれる RNA 中の各 RNA の量をリアルタイム PCR で測定した。その結果、mRNA は大部分が細胞質に局在化しているのに対して、ncRNA は核内の含有量が多く mRNA のように大部分が細胞質に存在しているものは全体の 2% に過ぎなかった。その他の ncRNA は核内と細胞質の両方、ほとんどが核質、核小体、その他の 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多くの ncRNA も存在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。また ncRNA に対する核内留置のメカニズムは複数あり、それによって核内の異なる場所で異なる機能を果たす事に寄与していることが考えられる。

### 5 自己評価:

本研究では、前駆体 mRNA と成熟 mRNA とがどのように選別されて核内留置と核外輸送という

2つの異なる挙動を選択するのかを理解することが目標であった。当初、この選別に重要な役割を果たすと考えられたイントロン結合蛋白質 IBP160 は、既知のスプライシング因子 SRm160 であると考えていたが、本研究の途上で実は SRm160 は別の因子を介して間接的にイントロンに結合しており、直接イントロンに結合している因子は、それまで機能未知であった KIAA0560 というヘリカーゼ様因子であることを同定することができた。当初の計画はこれによって方向を修正する必要に迫られたが、結果的にジェネラルな新規スプライシング因子の機能同定に結びつき、さらにはこの因子が EJC の会合パスウェイの基点となっていることも明らかにすることができた。これによって成熟 mRNA の核外輸送の側面は十分にオリジナリティの高い成果を得る事ができたと考えている。一方で RNA の核内留置に関しては、結局そのメカニズムの解明にまではいたらなかった。その代わりに核内に留置されて機能している数多くの ncRNA を見いだす事ができた。さらにその存在様式は核内の複数部位に局在化しており、核内留置機構が複数存在する可能性が浮上してきた。本研究の開始後、RNA 研究フィールドは世界的に注目の分野の一つに変貌し、ゲノムの中に数多く見つかったノンコーディング RNA の機能に大きな注目が集まっている。本研究で得られた ncRNA の核内留置の発見は、今後の ncRNA の機能解明のために重要な知見となると考えられる。本研究期間で成し遂げられなかった核内留置のメカニズムの研究は、今後の ncRNA 研究と交えて展開していきたいと考えている。

#### 6 研究総括の見解:

本さがけ研究において、核マトリクス結合因子 SRm160 による成熟 mRNA の核外輸送や欠陥 mRNA の核内留め置きによる品質管理の機構解明を目指したところ、同じ分子量で異なる新規因子 IBP160 を見出し、それがイントロンに結合してスプライシング中間体 C1 複合体形成の中心的役割をしていることを明らかにしたことは、高く評価に値する。狙ったとおりに進む研究はたいしたことはなく、思わぬ発見につながり理解を大きく変換させる結果が出る研究が優れた研究といえる。本研究はその範疇に入り、また、Steiz 研での研究の継続からの脱皮となる成果でもある。mRNA の品質管理、ncRNA の品質管理、細胞内輸送が今後の大きな課題と考えられるが、独自の切り口で世界に先駆けた展開を期待する。

#### 7 主な論文等:

##### 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)

他に総説 7 件(国内 7 件)、口頭発表 11 件(国際 2 件、国内 9 件)

特許出願:なし

##### 受賞

(財)病態代謝研究会、最優秀理事賞 (2006 年)

##### 招待講演

1. T. Hirose、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、第 78 回日本生化学会ミニシンポジウム (2005/10/22)
2. T. Hirose Mechanistic insights into the linkage between pre-mRNA splicing and snoRNP biogenesis. 文部省特定領域研究「RNA 情報網」公開シンポジウム (2005/8/8)
3. T.Hirose Strategy for efficient expression of intron-encoded small RNAs.  
International symposium: Strategies for the acquirement of functional diversity of

proteins(東京, 2005/1/20)

4. T.Hirose Novel coupling mechanism between splicing and intron-encoded snoRNP biogenesis.  
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」(東京, 2004/12/4)