

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

細胞周期とリボソーム生合成制御の連携システムの解明

### 2. 氏名

藤原 俊伸

### 3. 研究のねらい

DNA から RNA として転写された遺伝情報の発現は、様々な RNA 結合タンパク質による複雑かつ巧妙な転写後遺伝子発現調節機構により制御され、高次生命現象を規定する。そして、転写後遺伝子発現調節のうち、mRNA をはじめとする RNA の適切な部位への輸送および、局所における翻訳の制御は、遺伝子の発現を時空間的に制御する機構として最適である。RNA 結合タンパク質がこのような転写後遺伝子発現の調節における主役として働いている。特に、分化・発生等の高次な細胞機能においては mRNA 上の制御信号、microRNA とともに RNA 結合タンパク質の働きが鍵を握っている。本研究のねらいは、このような RNA 結合タンパク質の働きにより、①真核生物のリボソーム生合成制御と細胞周期とを連携するしくみ、②神経細胞特異的な翻訳制御機構を解明することである。

### 4. 研究成果

#### (1)細胞周期とリボソーム生合成制御との連携機構に関する研究の成果

本研究開始前までに、種を超えて高度に保存されている RNA 結合タンパク質・RBD タンパク質の機能解析を線虫 *C. elegans* をモデル生物として行い、これまで酵母においてのみ報告されていた RBD タンパク質の rRNA 前駆体プロセッシング活性が、多細胞真核生物においても保存されていることを最初に証明し、線虫における rRNA 前駆体のプロセッシング経路の概要も初めて明らかにした。この経路は線虫のデータベース WORM BASE に登録されている。

さらに、線虫の初期発生は、簡略化された細胞周期を持つ卵割期から中期胞胚変移 (MBT) を経て形態形成期へと続く。この MBT に至り初めて細胞周期に G1 及び G2 期が現れ、体細胞型の細胞周期に近づく。そして、本研究者は rRNA 前駆体のプロセッシングは、線虫において MBT に相当する時期まで抑制されていることを発見した。線虫では、rRNA 前駆体は受精直後より新たに転写されることが知られている。このことは、胚発生の初期では rRNA 前駆体の転写とそのプロセッシングが連動しないということの意味する。そこで、タンパク質生産装置であるリボソームの安定供給は細胞の維持や増殖、そして発生・分化に必須であるという概念から「細胞内あるいは細胞外の環境に応答した積極的なリボソーム生合成制御システムが存在する」という仮説を立てた。

この命題を検証するために、哺乳類の培養細胞を用いた実験系の構築を試み、徳島大学との共同研究で、WDR55 という核小体に局在する機能未知であったタンパク質が rRNA 前駆体の切断に必須なタンパク質であり、その機能を阻害することで細胞周期が G1 期で停止することを証明し、仮説が実証された(図1&2)。現在その分子機構を哺乳類の培養細胞を用いて解析している。また、*C. elegans* より初めて U3 snoRNA を同定し、報告している(図3)。さらに、これまで高等真核生物にのみ見いだされていた U8 snoRNA の線虫ホモログを生化学的に同定し、その機能解析を行った。

#### (2)RNA 結合タンパク質による神経細胞特異的な翻訳制御機構に関する研究の成果

Hu タンパク質群は、発生過程の神経系に強く発現している RNA 結合タンパク質である。これまでの本研究者のグループを含む国内外の研究により、神経細胞特異的に発現のみられる 3 種のマウス Hu タンパク質(HuB、HuC、HuD)を、神経成長因子・NGF により神経細胞に分化するラット副腎褐色細胞腫由来細胞(PC12 細胞)に過剰発現させると、NGF 非存在下にも関わらず神経細胞への分化が誘導されることが判明している。さらに、全組織で発現がみられる HuR は分化誘導能を持たないことから、神経細胞特異的に発現がみられる 3 種の神経細胞特異的 Hu タンパク質は

神経分化を正に制御する因子であることが示唆されている。Hu タンパク質は標的 mRNA へ結合してその安定化をはかり、さらには翻訳を促進することで神経系の細胞の運命決定に関与していると考えられており、Hu タンパク質による翻訳制御機構の解明は、神経細胞の分化機構を明らかにする上で必須であるが、その分子機構はこれまで知見が乏しかった。

そこで、Hu が poly(A) に結合すること、そして翻訳が活発に行われている polysome 画分に存在することから、「Hu は翻訳機構に直接関わる」と予測した。さらに、「翻訳制御がこのタンパク質の機能の本質であり神経分化誘導能に必要である」という仮説を立てた。Hu と類似した特徴を持つ因子として PolyA binding protein (PABP) が挙げられる。そこで、Hu の機能を PABP のアナロジーで考え、翻訳開始複合体と相互作用するかどうかを検証した。Cap 構造の認識から開始される翻訳開始複合体の形成は翻訳の律速段階であり、タンパク質合成を正あるいは負に調節するうえでこの過程を制御することは効率がよく、実例も数多くある。そして、HuD の変異タンパク質および cap アナログカラムを用いた生化学実験により、HuD が polyA および eIF4A との結合を介して、翻訳開始複合体と相互作用することを明らかにした(図4)。

次に、HuD が本当に翻訳機構に関与するのかどうかを、培養細胞抽出液を用いて cap-poly(A) mRNA からの翻訳を *in vitro* で再現できる実験系を構築し、検証した。この *in vitro* 翻訳系では既存のウサギ網状赤血球ライセートを用いた翻訳系とは異なり、cap 依存的な翻訳をレポータータンパク質の発現を指標に厳密に定量することができる。microRNA による翻訳制御機構の解析など、今後の拡張性を考え、線虫や組織など培養細胞以外の抽出液を用いた翻訳系もこの系の応用で構築することに成功している。そして、この翻訳系に野生型および様々な変異体 HuD タンパク質を加えることで、HuD が polyA および eIF4A との結合を介して、翻訳開始複合体と相互作用し、翻訳を正に制御することを発見した。次に PC12 細胞および N1E-115 細胞を用いて翻訳活性化能と分化誘導能との関係を検証しました。その結果、HuD の翻訳活性化機能が神経細胞への分化に必須であることが明らかになり、仮説が正しいことが示された。

図1 WDR55とpre-rRNAプロセッシング

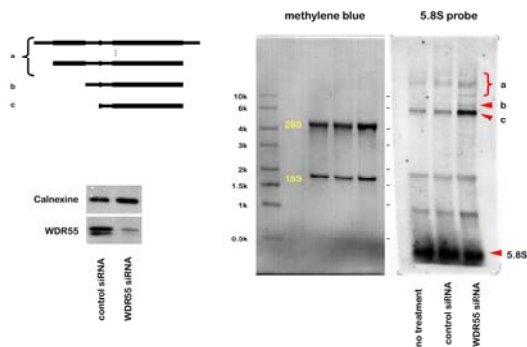


図2 WDR55と細胞周期

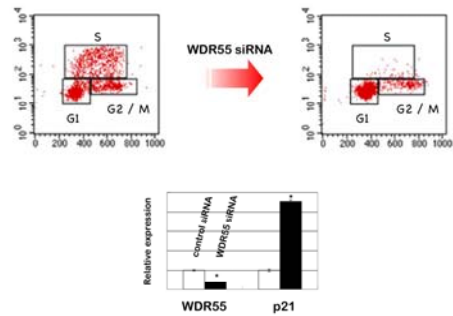


図3 *C. elegans*におけるU3 snoRNA

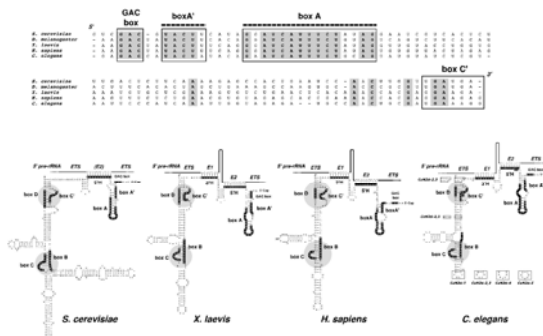
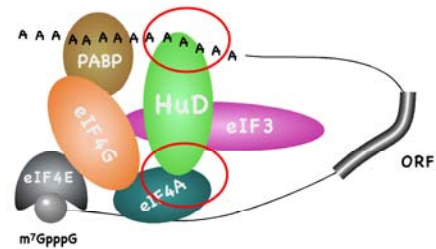


図4 HuDの翻訳開始複合体結合モデル



## 5. 自己評価

RRM 型 RNA 結合モチーフを持つ RNA 結合タンパク質をプローブとし、線虫をモデル生物として用いた研究は困難を極めた。しかしながら、その過程において、線虫を高純度に大量調製する手法を開発し、その結果これまで未同定であった U3 snoRNA を同定することができた。そして、哺乳類の培養細胞を用いた研究により、転写の不具合ではなく rRNA プロセッシングの不具合が P53 を介した細胞周期の停止を引き起こすことを明らかにすることができた。今後、どのような因子がセンサーとして機能しているかを突きとめたい。

一方、同じ RRM 型 RNA 結合モチーフを持つ神経細胞特異的 RNA 結合タンパク質の機能解析を行った結果、本研究者は、HuD が翻訳伸長因子 eIF4A および poly(A)との結合を介して、翻訳開始複体に結合し、cap 依存的翻訳を促進することを発見している。翻訳因子ではない RNA 結合タンパク質による eIF4A を介した翻訳開始促進機構に関する初めての例である。また、HuD による PC12 細胞の分化誘導能は eIF4A の機能に依存することも明らかにした。この結果は、神経分化に必須なタンパク質合成(翻訳)機構の存在を示しており、今後この翻訳機構を応用することにより、ES 細胞や iPS 細胞を人工的に神経細胞へと分化させる手法の開発や、発症・進行のメカニズムが不明で有効な薬がない神経変性疾患治療のための創薬へとつながるものと期待される。

## 6. 研究総括の見解

真核生物のリボソーム生合成制御と細胞周期が連携するしくみ、および神経細胞特異的な翻訳制御機構を、そこに関わる RNA 結合タンパク質を同定し解明することを目的として研究を行ってきた。その結果、前者のメカニズムについては、転写ではなく rRNA プロセッシングの不具合のため細胞周期が G1 期でアレストすることを明らかにした。何がセンサーとなっているかは今後の問題である。後者については、HuD が翻訳伸長因子 eIF4A および poly(A)との結合を介し、翻訳開始複合

体に結合し、cap 依存的翻訳を促進することを発見した。翻訳因子ではない RNA 結合タンパク質による eIF4A を介した翻訳開始促進機構の新たな提唱である。いずれの研究でも、大きな発見に結びついており、今後の発展が望まれる。

## 7. 主な論文等

### A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

#### ①論文

1. Fukao, A., Sasano, Y., Imataka, H., Inoue, K., Sakamoto, H., Sonenberg, N., Thoma, C. and Toshinobu Fujiwara.  
The ELAV protein HuD stimulates cap-dependent translation in a poly(A)- and eIF4A-dependent manner *Molecular Cell* 36. 1007-1017 (2009)
2. Iwanami, N., Higuchi, T., Sasano, Y., Fujiwara, T., Hoa, VQ., Okada, M., Talukder, SR., Kunimatsu, S., Li, J., Saito, F., Bhattacharya, C., Matin, A., Sasaki, T., Shimizu, N., Mitani, H., Himmelbauer, H., Momoi, A., Kondoh, H., Furutani-Seiki, M. and Takahama Y.  
WDR55 is a nucleolar modulator of ribosomal RNA synthesis, cell cycle progression, and teleost organ development. *PLoS Genet.* 4. e1000171 (2008)
3. Sasano, Y., Hokii, Y., Inoue, K., Sakamoto, H., Ushida, C. and Fujiwara, T.  
Distribution of U3 small nucleolar RNA and fibrillarin during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochimie* 90. 898-907 (2008)

### B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

#### ①論文

1. Hayashi, S., Akiyama, S., Tamaru, Y., Takeda, Y., Fujiwara, T., Inoue, K., Kobayashi, A., Maegawa, S., Fukusaki, E. A novel application of metabolomics in vertebrate development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386. 268-272 (2009)
2. Mizutani, T., Osaka, T., Fujiwara, T. and Shahidzzman, M.  
Biochemical selenocysteine synthesis and the phylogenetic study.  
*Yakugaku Zasshi* 128. 989-996 (2008)