

「RNA と生体機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成22年度終了研究課題－

研究総括 野本 明男

1. 研究領域の概要

本研究領域は、RNA 分子の多様な機能を明らかにし RNA の生命体維持に関する基本原理についての理解を深めると同時に、RNA 分子の医療応用等に関して、個人の独創的な発想に基づく革新的な技術シーズの創出を目指している。

具体的には、生命現象を支え制御する RNA の新たな機能を探索する研究、および既知の RNA 機能の活用を目指した研究が対象である。後者の研究には、機能性 RNA のデザインや機能向上を目指す技術、機能性 RNA により細胞機能を制御する技術、1分子レベルで特異的 RNA を検出する技術、RNA を標的組織・細胞に送達するドラッグ・デリバリー・システム技術などに関するものが含まれ、先端医療技術等への機能性 RNA 分子の新たな活用技術の開発へとつながることが期待される研究が対象となる。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記のとおり。

1) 選考は「RNA と生体機能」領域に設けた選考委員 11 名と研究総括で行う。

2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

3) 面接選考においては、申請者の研究の主体性、研究のねらい、研究計画の妥当性、将来性等を中心に審査する。研究構想が本研究領域の趣旨に合っていること、高い独創性と新規性に富むことを重視する。長い歴史を持つ RNA 研究の新展開には、これまでの伝統的研究を大切に生かしつつ、新しい視点を大胆に取り込む姿勢を重視する。

4. 選考の経緯

書類審査は各応募課題につき領域アドバイザー3 名が担当し評価を行い、この評価と研究総括の評価をあわせて書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考会での評価および総合選考により採用者を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	77 名	20 名	9 名

5. 研究実施期間

平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議: 7 回

研究報告会: 1 回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:

研究開始時に研究総括、技術参事、事務参事が研究者とその上司を訪問した。上司にさきがけ研究実施にあたっての協力を依頼した。研究室、研究設備等を確認し、研究環境の説明を受け、研究実施に支障がないことを確認した。事務的な手続きについての説明もおこなった。

さらに、3年目を迎える研究者を技術参事が訪問し、研究の進捗状況についての研究総括からのメッセージを伝えと共に、今後2年間の目標、問題点と課題などを話し合い、結果を研究総括に伝えた。その他、研究者の異動時には研究総括以下のサイトビジットを再度実施した。

7. 評価の手続き

研究者による研究報告書と自己評価を基に、研究総括が領域アドバイザーの協力を得ながら実施した。領域

会議での討議や研究報告会の参加者の意見も参考にした。

(評価の流れ)

平成 22 年 12 月	研究報告会開催
平成 23 年 2 月	研究報告書及び研究課題別評価提出
平成 23 年 3 月	研究総括による評価
平成 23 年 3 月	研究期間終了

8. 評価項目

- (1) 研究計画書の目標と研究課題に対する達成度
- (2) 外部発表(学術論文、口頭発表など)、プレスリリースと特許などから見た研究成果と発信状況
- (3) 学術賞、学会招待講演、新聞記事など外部からの評価状況
- (4) 達成した研究成果の科学、技術、社会への貢献度

9. 研究結果

近年になり、リボザイム、miRNA、RNA の分子擬態、その他多くの機能性 non-coding(nc)RNA の発見により、RNA は蛋白質と同等の機能を持つ分子でもあると認識されるようになってきた。今や RNA は、遺伝情報発現や代謝の制御に働く必須の分子であると同時に、発生、分化、疾患の発症など高次複合形質の動態にも深く関与していることが明らかであるが、その研究は緒についたばかりともいえる。

本研究領域では、生命現象における RNA の新たな機能を探索する研究を対象とすると共に、明らかとなっている機能性 RNA を活用し、医療応用等を含めた RNA テクノロジーに関する研究を対象として幅広い研究課題が採択されている。広範な専門分野の研究者間やアドバイザーとの切磋琢磨および協調した研究推進により著明な進展が各課題にみられた。研究者毎に研究のねらい、結果および評価を以下に述べる。

○奥脇 暢 研究者

細胞核の中には RNA の転写・修飾・切断等を協調的に、効率よく行うための機能的な領域が形成される。リボソームの生合成を行うための機能領域である核小体の構造・機能の制御機構を、RNA-蛋白質複合体研究を通して明らかにすることを目標とした。核小体蛋白質 B23 は、RNA と転写因子(UBF)を介し、核小体クロマチンの構造を制御し、rRNA 遺伝子の転写調節に関与するという新しい分子機構を提唱できたが、B23 が相互作用する RNA の実体解明は今後の問題である。また、核小体構造形成に、UBF を中心とした非常に多くの RNP 集合機構を示し、これまで、ほとんど明らかにされていなかった、核小体の構造形成の分子基盤解明の一步となった。今後、UBF 分子の構造と機能の相関を明らかにする必要がある。まだ闇の中にある研究分野に挑戦し、今後の研究の手がかりを与えたことは賞賛に値し、さらなる研究成果が期待される。

○北畠 真 研究者

真核生物のリボソームがどのような品質管理機構によってその品質を確保しているのか、新しい機構を発見し解明することを目指した。真核生物のリボソームに対して紫外線などによる損傷を与え、ストレスによってダメージを受けたリボソームが細胞の中でどのような運命をたどるかについて詳しく追跡することで、リボソームの不活性化をもたらすような変異 rRNA の運命を研究した。変異 RNA もリボソームに取り込まれリボソームとなつてから、リボソームとして不活性なものは、ユビキチン化され分解されることを解明した。不活性リボソームの品質管理機構の一端を示すものとして評価できる。また、RNA 損傷の修復には、リボソーム分解以外の現象も明らかにしており、さらなる研究の進展が期待される。

○富田 耕造 研究者

鋳型非依存的 RNA 合成酵素(CCA 付加酵素、ポリ A 付加酵素)に注目し、これらの RNA 合成酵素が核酸の鋳型を用いずに特定の配列を付加する分子機構を解明し、核酸の鋳型としての役割が蛋白質へと写し取られた過程の分子進化基盤を探ることを目指した。本研究は、構造生物学、生化学、分子細胞生物学的な研究手法を駆使し、鋳型非依存的 RNA 合成酵素である CCA 付加酵素およびポリ A 付加酵素の反応分子基盤の詳細を明らかにした。CCA 合成の忠実性が RNA と蛋白質の共同的作用で維持される分子機構を明らかにし、ポリ A 合成酵素との構造の比較から基質特異性を決定する分子機構を明らかにした。さらに、Q β ファージ RNA 合成酵素複合体の解析から、翻訳因子の新たな役割も提唱した。これらの結果は、RNA ワールドからの分子機構が現在も働いていることを示し、翻訳因子の進化や起源についての説明ともなっている。非常に詳細な構造生

物学研究の結果から生物学全体に広がる概念を提示した、創造性の高い研究であり、非常に高く評価できると共に今後が大いに期待される。

○西村 健 研究者

センダイウイルスの持続感染変異株を基に、細胞質内で安定に遺伝情報を維持しながら、持続的な遺伝子発現を可能にする「細胞質持続発現型 RNA ベクター」を開発、実用化することを目指した。まず、センダイウイルスの持続感染機構の解析を行った上で、細胞質持続発現型 RNA ベクターの開発を行った。インターフェロン誘導機構の解析結果をベクター構築にフィードバックさせて、転写終結配列を用いた更なるベクターの安定性の向上を実現するなど、ウイルスゲノムの性質を熟知した上での研究であり、そのため、ウイルス RNA の能力を最大限引き出すことに成功している。応用研究として、均質な性質を持つ iPS 細胞作製に成功し、さらに iPS 細胞誘導終了と同時に、その細胞からベクターを排除する技術の開発にも成功しており、より医療応用に近い新規 RNA テクノロジーの創出に結びついており、今後の発展が期待される。

○増富 健吉 研究者

RNA 干渉に必須の2本鎖 RNA を合成する酵素「RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RdRp)」は植物や真核生物などで存在することが報告されていたが、ヒトなどのほ乳動物での存在は確かではなく、長年の謎のひとつとなっていた。本研究は、ヒトにおける RdRp の同定とその生物学的意義の解明を目指した。その成果として、ヒト RdRp はテロメレーズの触媒サブユニットである hTERT であることを示し、RdRp の存在をヒトで証明した。これまで、モデル生物(分裂酵母、線虫など)のみで知られていた siRNA 生成機構をヒトにも適用できるようになった。この意義は非常に大きく、研究領域をさらに広げたといえる。本研究は、さらに RNA が介在するヘテロクロマチン構造の維持におけるヒト RdRp の役割解明を着々と進めており、今後の大きな発展が期待される。

○山下 暁朗 研究者

ヒトの遺伝性疾患および癌における変異のうち約 1/3 は異常な早期終止コドンを生じるが、mRNA 品質管理機構により変異 mRNA が排除される。本研究は、異常な終止コドンをもつ mRNA 品質管理機構の分子メカニズムを基に、異常終止コドン認識過程を阻害し認識複合体を濃縮することにより、変異 mRNA およびその構造を簡易に明らかにする方法の確立を目指した。その結果、このような変異 mRNA を排除する機構、すなわち NMD システムの分子機構を担う分子複合体を同定することに成功した。NMD 研究にとって大きな貢献である。さらに、NMD 研究が、広く細胞機能の制御につながる重要な研究であることも示した。NMD 複合体に含まれる mRNA の種類を解析する方法の構築にも成功し、現在、NMD の生理的意義の解析を行っているが、がんや遺伝性疾患の治療に応用できる可能性もあり、今後の成果が大いに期待される。

○吉川 学 研究者

植物は、ウイルスなどの外来因子やトランスポゾン、高発現している遺伝子などの RNA を“異常”と認識し、それらの発現を抑制するための機構として RNA サイレンシングを持つ。植物は、mRNA などの生命活動に必要な RNA と RNA サイレンシングによって排除すべき“異常”RNA を区別していると考えられる。植物の、転写後調節に機能する RNA サイレンシング及び転写調節に機能する RNA サイレンシングそれぞれの経路の siRNA 生成過程を解析することによって、異常な RNA の認識機構を解明することを目指した。異常 RNA の認識機構解明には至らなかったが、異常 RNA 蓄積・安定化に働くと考えられる分子を絞り込むことができた。これは、植物以外では広く行われている細胞粗抽出液を使った解析に取り組んだ成果である。今後の研究の基盤を構築したものといえる。DNA メチル化に機能する RNA サイレンシング経路に関する研究も今後の進展が期待される。

○吉久 徹 研究者

細胞質に留まると考えられてきた tRNA が、実は核と細胞質の間を行き来しており、こうした細胞内動態の各局面で適切に品質管理を受けることが示唆されている。本研究は tRNA を中心に細胞質の non-coding RNA の一生の様々な段階における細胞内動態を示し、これに伴って細胞の各所でどのように品質管理・分解を受けるかを明らかにすることを主眼に、tRNA の核内輸送システムの解明、これに伴って不安定な tRNA や不要な tRNA のイントロンを処理するシステムの解明を目指した。本研究により tRNA の核内輸送に、Ssa タイプの Hsp70 と Hsp40 型コシャペロンである Ydj1p, Sis1p が関わることを明らかにした。また、細胞質スプライシングで生じるイントロンの分解システムには多数の因子が共同して働く可能性を示し、細胞質の機能性 RNA の品質管理に対するより深い理解に繋がる成果を挙げた。今後は、これまでの結果を踏まえ、これらの過程の全体像を明らかにすることが期待される。

○米山 光俊 研究者

RNA ウイルス感染、すなわち非自己 RNA の細胞内侵入を細胞質内で検知するセンサー分子(RLR)である RIG-I を発見し、ヒトに存在する三種の RLR がどのように自己と非自己の RNA を識別して生体防御系を発動しているのか、そこにはどのような分子機構が働いているのか、さらにどのような生理機能を担っているのかの解明を目指した。RIG-Iによるウイルス由来非自己 RNA の認識機構の分子基盤については世界をリードする成果が得られた。IFN 誘導のみではなく細胞増殖機構に至るまでを視野に入れた広範且つ質の高い研究内容となった。達成された研究成果はウイルスが如何に RLR を介して、細胞の代謝を変化させ、また細胞が如何にウイルス感染に対応して変化しているかを紐解く多くの鍵を与えている。今後の研究の展開方針も含め高く評価できる研究結果であり、今後の成果も期待される。

10. 評価者

研究総括 野本 明男 微生物化学研究所 所長

領域アドバイザー

伊庭 英夫	東京大学 教授
大野 睦人	京都大学 教授
奥野 哲郎	京都大学 教授
堅田 利明	東京大学 教授
坂本 博	神戸大学 教授
塩見 春彦	慶応義塾大学 教授
杉本亜砂子	東北大学 教授
永田 恭介	筑波大学 教授
古市 泰宏	(株) ジーンケア研究所 会長
松藤 千弥	東京慈恵会医科大学 教授
水本 清久	北里大学 名誉教授

(参考)

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	0	41	41
口 頭	90	35	125
その他	29	4	33
合 計	119	80	199

※平成 23 年 3 月 31 日現在

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
3	2	5

(3) 受賞等

富田 耕造

文部科学大臣表彰 科学技術分野(研究部門) 受賞 平成22年4月

日本分子生物学会 第6回 日本分子生物学会三菱化学奨励賞 受賞 平成20年12月

茨城県科学振興財団 第17回つくば奨励賞若手研究者部門 受賞 平成19年9月

増富 健吉

第一回国立がん研究センター医学会賞金賞受賞 平成22年12月

山下 暁朗

科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞受賞 平成23年4月
平成22年度横浜市立大学医学会賞 平成23年4月

西村 健

第10回日本再生医療学会総会ベストポスター賞 平成23年3月

(4)招待講演

国際 2 件

国内 6 件

別紙

「RNA と生体機能」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
奥脇 暢 (兼任)	RNA-タンパク質複合体による 細胞核機能・構造制御 (筑波大学大学院 人間総合科学研究科)	筑波大学大学院 人間総合科学研究科 准教授 (同上 講師)	41
北畠 真 (兼任)	紫外線によって生じる RNA 損傷の 修復機構 (京都大学 ウイルス研究所)	京都大学 ウイルス研究所 助教 (同上)	42
富田 耕造 (兼任)	RNA 末端合成プロセス装置の 分子基盤 (産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門)	産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門グループ長 (同上 生物機能工学研究部門 グループ長)	43
西村 健 (兼任)	細胞質持続発現型 RNA ベクター (筑波大学大学院 人間総合科学研究科)	筑波大学大学院 人間総合科学研究科 助教 (産業技術総合研究所 日本学術振興会 特別研究員)	46
増富 健吉 (兼任)	RNA 依存性 RNA ポリメラーゼと そのクロマチン構造維持機構 (国立がんセンター研究所 がん幹細胞研究分野)	(国立がん研究センター 研究所 がん幹細胞研究分野 分野長 (国立がんセンター 研究所 プロジェクトリーダー)	43
山下 暁朗 (兼任)	RNA 品質管理機構を介した 遺伝子発現制御 (横浜市立大学医学部 微生物学教室)	横浜市立大学医学部 微生物学教室 講師 (同上 大学院医学研究科 COE 特任助教)	50
吉川 学 (兼任)	植物における RNA サイレンシング 経路への導入機構の解明 (農業生物資源研究所 植物科学研究領域)	農業生物資源研究所 植物科学研究領域 主任研究員 (同上)	42
吉久 徹 (兼任)	細胞質の機能 RNA・RNP の 品質管理機構 (名古屋大学 物質科学国際研究センター)	名古屋大学 物質科学国際研究センター 准教授 (同上 助教授)	38
米山 光俊 (兼任)	細胞内ウイルスセンサーによる 非自己 RNA 認識様式の解明 (千葉大学 真菌医学研究センター)	千葉大学 真菌医学研究センター 感染免疫分野 教授 (京都大学 ウイルス研究所 助教授)	46

研 究 報 告 書(公開)

「RNA-タンパク質複合体による細胞核の構造・機能制御」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研 究 者：奥脇 暢

1. 研究のねらい

細胞核の中には RNA の転写・修飾・切断等を協調的に、効率よく行うための機能的な領域が形成される。核小体はリボソームの生合成を行うための機能領域である。本研究では、核小体に局在する RNA-タンパク質複合体の機能解析を通して、RNA 分子の新規機能の解明と、核小体構造形成機構の解明を目指した。本研究の成果から、さらに、細胞核の構造形成にかかわる基本原理を見出すべく研究を進めた。

2. 研究成果

モデルクロマチンを鋳型とした試験管内クロマチン構造変換活性を有する RNA-タンパク質複合体を同定した。核小体タンパク質 NPM1/Nucleophosmin/B23 は、単独でヒストンと相互作用してクロマチン構造形成機能を有しているが、細胞内における機能は不明であった。この因子の最大の特徴は、単独でヒストンシャペロン活性を有するものの、精製画分には RNA を含み、試験管内のモデルクロマチン構造変換活性は、RNA によって著しく促進される点である。また、B23 の細胞内局在の解析から、核小体の構造がダイナミックに変化することに着目して、研究を進めた。本研究では、以下の二つの研究課題に取り組んだ。

- ① B23-RNA 複合体の機能解析
- ② 核小体構造形成の分子基盤の解析

① B23-RNA 複合体の機能解析

B23 の核小体クロマチン制御

B23 は細胞内において核小体に局在することから、ヒストンシャペロンとしてリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子領域のクロマチン構造制御にかかわることが想定された。そこで、最初に B23 の rRNA 遺伝子領域への相互作用を検討した結果、B23 は rRNA 遺伝子の全領域に比較的一様に相互作用することを見出した。また、B23 をノックダウンすると、rRNA 遺伝子領域のヒストン量が増加し、rRNA の転写が抑制された。したがって、B23 は核小体クロマチンの構造を制御することによって、rRNA 遺伝子の転写調節に関与することが示唆された。

B23 の核小体クロマチンへの特異的な相互作用メカニズム

B23 の相互作用のターゲットはヒストンであるにも関わらず、核小体クロマチンにのみ相互作用していた。したがって、何らかのメカニズムによって、B23 は rRNA 遺伝子領域に特異的にリクルートされることが示唆された。研究開始当初より、B23 は細胞内で多くの RNA 分子と相互作用することが明らかになっていた。そこで、B23 の RNA 結合と、クロマチン結合との関連を調べた。その結果、B23 を免疫沈降するとクロマチン由来のヒストンとの相互作用が検出される。一方、RNase 処理した細胞抽出液を用いて B23 の免疫沈降実験を行うと、B23 とクロマチンとの相互作用は検出されなかった。したがって、B23 は RNA との相互作用に依存してクロマチンに相互作用することが想定された。

また、B23 は分裂期に高度にリン酸化され、RNA 結合活性が抑制されることが分かっている。そこで、B23 の分裂期における rRNA 遺伝子との相互作用を検討した結果、B23 は分裂期にクロマチンから離れることが明らかになった。また、分裂期のリン酸化を模倣した B23 変異体は、間期にクロマチンに結合しないことから、B23 は RNA 依存的に rRNA 遺伝子領域へ相互作用することが確かめられた。

分裂期にリン酸化されないタイプの B23 変異体では、分裂期に RNA 結合活性は維持されるものの、rRNA 遺伝子領域への相互作用は減少する傾向がみられた。したがって、RNA 結合活性のみでは、B23 が rRNA 遺伝子領域に特異的にリクルートされる点を説明できない。そこで、rRNA 遺伝子の特異的な転写因子である Upstream Binding Factor (UBF) に着目した。UBF は核小体クロマチンを規定する重要な因子であると考えられている。細胞内の UBF 量を、siRNA を用いて抑制すると、B23 の rRNA 遺伝子領域への相互作用が減少した。また、rRNA 遺伝子領域のヒストン量を調べると、UBF の減少によって、ヒストン量の上昇がみられた。したがって、B23 と RNA の複合体は、UBF を介して rRNA 遺伝子領域にリクルートされ、その領域のヒストン濃度の調節を行っていることが示唆された。

以上の結果から、クロマチン制御因子が特定の遺伝子領域にリクルートされる分子メカニズムとして、RNA と転写因子を必要とするという、新しいメカニズムを提唱した。

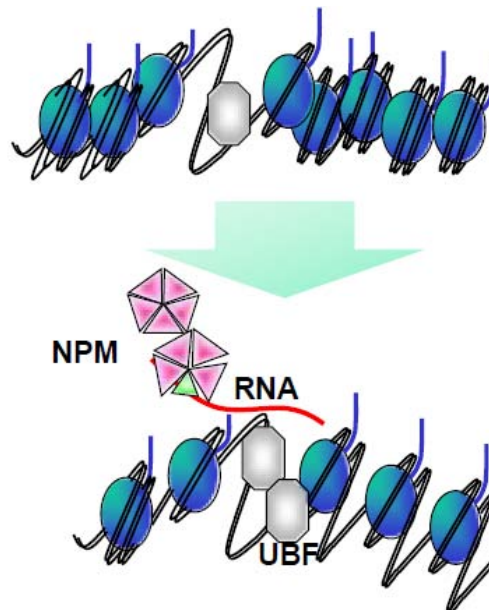


図1. RNAと転写因子UBFに依存したNPMの核小体クロマチンへのターゲティング
NPMはRNAと複合体を形成し、UBFが局在する核小体クロマチンへリクルートされる。NPMは核小体クロマチン上のヒストン量を抑制し、結果として転写の活性化に寄与する。細胞分裂期には、NPMのRNA結合活性が抑制され、NPMは核小体クロマチンから離れる。

② 核小体構造形成の分子基盤に関する研究

核小体は光学顕微鏡でも観察できる非常に大きな細胞核内構造体である。核小体の構造は細胞の分裂とともに消失し、G1 期の初期に再形成される。しかし、核小体の構造がどのように形成され、また維持されるのか、ほとんど明らかになっていない。そこで、初めにどのような分子基盤で、核小体の構造が維持されるのかを検討した。その結果、rRNA の修飾にかかわる Fibrillarin や DKC1、切断にかかわる Nucleolin や B23、リボソームタンパク質 L4 など、多くの核小体 RNP 形成因子が核小体クロマチンに物理的に相互作用していることを見出した。また、クロマチンを形成するヒストン H3 を用いた免疫沈降から、多くの RNP 形成因子がクロマチンと相互作用することが示唆された。同様の実験を RNase 処理した抽出液を用いて行くと、ヒストンと RNP 構成因子との相互作用がみられなくなった。したがって、多くの核小体 RNP 複合体は RNA との相互作用を介して、核小体クロマチンに相互作用し、核小体構造が維持されていることが示唆された。

さらに上述の①の実験と同様に、rRNA 遺伝子の転写因子 UBF を、siRNA を用いて減少させると、多くの RNP 構成因子のクロマチン結合が抑制された。UBF を過剰発現によって核小体以外の場所に局在させると、核小体に局在するはずの DKC1 や Fibrillarin が、過剰発現した UBF と共局在することが明らかになった。したがって、転写因子 UBF は核小体クロマチンの構造を規定し、RNP 複合体をつなぎとめることによって、核小体の構造維持にかかわることが示

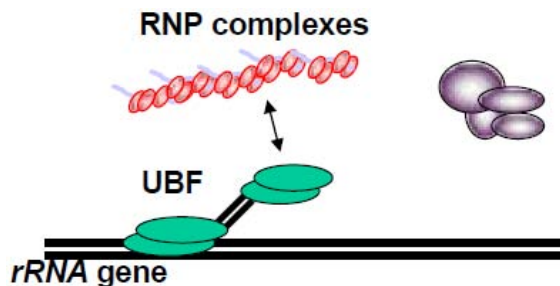


図2. UBFを介した核小体構造形成の分子機構
核小体においてRNP複合体を形成する因子は、UBFが局在する核小体クロマチンへリクルートされる。UBFのHMGドメインがDNAおよびRNAに相互作用することによって、RNP複合体と核小体クロマチンをつなぎとめている。

唆された。UBF は High Mobility Group (HMG)ドメインと呼ばれる核酸結合領域を6個持つことが知られている。試験管内における結合実験より、UBF は DNA と RNA に相互作用する活性がみられ、また GST 融合型の UBF を細胞核抽出液と混合すると、核抽出液中の核小体 RNP 複合体と相互作用することが明らかになった。これらの結果より、UBF は HMG ドメインを介して、DNA に結合しながら、一部の HMG ドメインによって RNP 複合体をリクルートする機能を持つことが示唆された。

これらの結果は、これまでにほとんど明らかにされていなかった、核小体の構造形成の分子基盤を解明する一つの情報を提供するとともに、細胞核の構造形成に対しても手掛かりになる研究成果である。

3. 今後の展開

研究項目① B23-RNA 複合体の機能解析

本研究を進める中で、B23 が RNA との複合体形成を介して核小体クロマチンに相互作用することが明らかになった。しかしながら、B23 と協調的に機能する RNA 分子の実体に関してはいまだに明らかにできていない。現在 B23 と相互作用する候補 RNA 分子を同定し、B23 の RNA 結合特異性に関する実験を進めている。これまでの研究より、B23 のクロマチン構造変換機能において、RNA 分子には二つの機能があるものと想定されている。一つは B23 を核小体クロマチンへリクルートする機能であり、もうひとつは B23 と協調的にクロマチン構造を変換させる機能である。

今後、RNA 分子の実体を解明し、B23 と RNA 分子によるクロマチン構造変換の分子機構を明らかにしていきたい。RNA 分子がクロマチン構造変換の実行因子として機能しているという報告はこれまでになく、新たな RNA 機能としてきわめて重要であると考えている。

研究項目② 核小体構造形成の分子基盤に関する研究

本研究の成果に基づき、UBF が足場となる核小体構造形成機構を提唱した。この研究成果に関しては現在投稿準備中である。ただし、UBF の RNA 結合特異性や、DNA 結合特異性はいまだ不明な点が多く、今後の課題である。さらに細胞分裂期において、核小体の構造は崩壊することが分かっているが、そのメカニズムは不明である。UBF は核小体の構造維持に重要であるという知見をもととして、UBF の分裂期における修飾状態と RNA および DNA 結合活性の関連を調べることで、分裂期における核小体構造崩壊の分子機構に迫りたい。また、UBF は rRNA 遺伝子上のプロモーター領域および rRNA コーディング領域に特に多く局在している。一方で、多くの核小体 RNP は遺伝子間領域にも局在する傾向がみられた。したがって、UBF がすべての RNP 複合体をリクルートするとは考え難く、他の核小体基盤形成因子が想定される。今後は基盤形成因子の実体を明らかにすべく、研究を進めていく。

4. 自己評価

本研究課題では、二つの研究項目に取り組んだ。

- ① B23-RNA 複合体に関しては、当初 B23 と協調的に機能する RNA 分子の機能を解明することが目標であった。RNA の実体解明に至らなかった点は残念であるが、RNA 分子の候補は同定できており、今後できるだけ早くその機能の解明につなげていきたい。また、ヒストンシヤペロンが特定の遺伝子領域を活性化するメカニズムはこれまでにほとんど報告がなく、RNA と転写因子を介した分子機構を提唱できたことはよかったと思う。
- ② 核小体構造形成に関しては、UBF を足場とした RNP 集合機構を提唱することができた。細胞核構造に関する研究は、蛍光タンパク質の利用による分子の動きを基盤とした研究が先行してきた。本研究では、その分子の機能解析を通して、分子レベルのメカニズムの提唱ができた点はよかった。ただし、UBF 機能に関しては未完成な部分が多く、近い将来の課題である。

5. 研究総括の見解

リボソームの生合成が行われる核小体の構造・機能の制御機構を、RNA-蛋白質複合体研究を通して明らかにすることを目標とした。核小体蛋白質 B23 は、RNA と転写因子(UBF)を介し、核小体クロマチンの構造を制御し、rRNA 遺伝子の転写調節に関与するという新しいメカニズムを提唱した。B23 が相互作用する RNA の実体解明は今後の問題である。また、核小体構造形成に、UBF を中心とした非常に多くの RNP 集合機構を示し、これまで、ほとんど明らかにされていなかった、核小体の構造形成の分子基盤解明の一步となった。今後、UBF 分子の構造と機能の相関を明らかにする必要がある。まだ闇の中にある研究分野に挑戦し、今後の研究の手がかりを与えたことは賞賛に値する。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1.	Hisaoka M, Ueshima S, Murano K, Nagata K, and <u>Okuwaki M</u> . Regulation of nucleolar chromatin by B23/nucleophosmin jointly depends upon its RNA binding activity and transcription factor UBF. <i>Mol Cell Biol</i> . 2010 30(20):4952-62
2.	<u>Okuwaki M</u> , Kato K, Nagata K. Functional characterization of human nucleosome assembly protein 1-like proteins as histone chaperones. <i>Genes Cells</i> . 2010 Jan 15(1):13-27
3.	Komaki-Yasuda K, <u>Okuwaki M</u> , Kano S, Nagata K, Kawazu S. 5' sequence- and chromatin modification-dependent gene expression in <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocytic stage. <i>Mol Biochem Parasitol</i> . 2008 162(1):40-51.
4.	Murano K., <u>Okuwaki M.</u> , Hisaoka, M., and Nagata, K. Transcription regulation of rRNA gene by a multi-functional nucleolar protein, B23/nucleophosmin through its histone chaperone activity. <i>Mol Cell Biol</i> . 2008 8(10):3114-26
5.	<u>Okuwaki M.</u> The Structure and Functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidic Protein. <i>J Biochem</i> . 2008 Apr;143(4):441-8.

(2)特許出願

なし

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

- Function of Upstream Binding Factor in the organization of the nucleolus**
Mitsuru Okuwaki Wellcome Trust Scientific Conference, Subnuclear structure and Diseases (2010.7.29 Cambridge, United Kingdom)
- RNA依存的なヒストンシャペロンのクロマチンターゲッティング**
奥脇暢 遺伝情報DECODE冬のワークショップ 2009(2009.1.19-21 新潟湯沢)
- 核小体クロマチンを制御する転写因子 UBF の機能** 奥脇暢 第 82 回日本生化学会大会(2009.10.23 神戸)
- 核小体構造形成に関わる転写因子の役割**
奥脇暢, 永田恭介
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会(2008.12.9-12 神戸)

研 究 報 告 書(公開)

「紫外線によって生じる RNA 損傷の修復機構の研究」

研究期間: 平成19年9月～平成23年3月

研 究 者: 北 畠 真

1. 研究のねらい

真核生物のリボソームは4本のRNAと80個のたんぱく質で構成されています。この巨大な複合体に対してどのような品質管理の機構が存在するのかは、明確ではありませんでした。本研究では真核生物のリボソームに対して紫外線などによる損傷を与え、ストレスによってダメージを受けたリボソームが細胞の中でどのような運命をたどるかについて詳しく追跡することで、真核生物のリボソームがどのような品質管理機構によってその品質を確保しているのか、これまでに知られていない新しい機構を発見し解明することを目指しました。

2. 研究成果

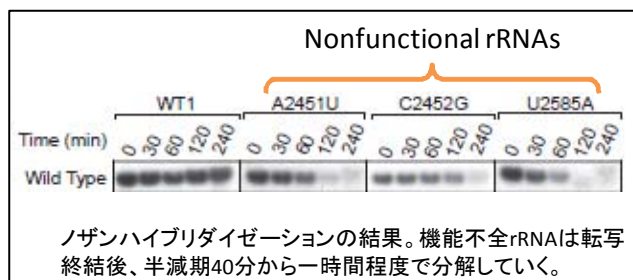
紫外線の照射や塩基置換によってリボソームがダメージを受けた場合、ダメージの内容によっては細胞の中で損傷リボソームが選択的に消失していくという現象を明らかにした。このことは真核生物にはリボソームの異常を認識し、これを取り除くことでリボソームの機能を保っている「品質管理機構」が存在していることを示している。本研究ではこの「品質管理機構」について、損傷の「修復」とみられる現象と、「選択的分解」とみられる現象の2つに焦点を絞り、それぞれの現象の分子機構解明を目標とした。

このうち、「修復」の現象については、新しい知見がみいだされてきているが、公表の段階になく準備中の論文にその詳細を譲りたい。以下には、「選択的分解」現象についてのみ記載した。

(1) 機能不全リボソーム RNA は選択的に分解される

リボソーム RNA (rRNA) の品質管理機構を研究するにあたり、一方の実験系では出芽酵母を材料として選択した。これは出芽酵母には遺伝学的な手法や、さまざまな道具が豊富に存在するために、分子機構の解明に非常に有効であるためである。出芽酵母は紫外線に対して非常に抵抗性を示す(おそらく細胞壁の存在によると思われる)ことが文献的に分かっていたので、この場合には紫外線を照射することを断念し、rRNA の活性中心に点変異を導入することでリボソームを不活性化することを試みた。

RNA ポリメラーゼ I の温度感受性株を用いた実験より、点変異を導入した rRNA のうち3種類について、リボソームの機能が失われることが示された。これらの機能不全 rRNA を発現する細胞で、機能不全 rRNA の転写を停止させ、これらの RNA が細胞内でどの程度安定であるかをノザンハイブリダイゼーションで確認した。すると、機能を持った正常型の rRNA の場合にはほとんど分解が観察されないほど安定であるのと対照的に、

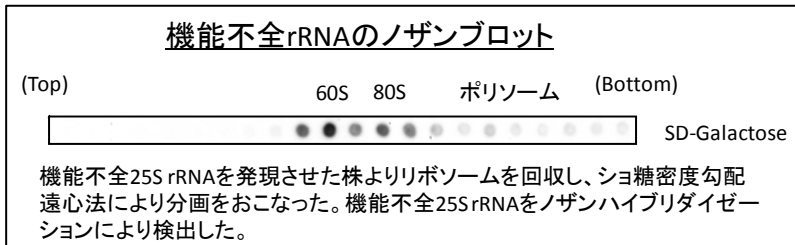


点変異により機能不全となった変異 rRNA の場合には、どの場合も半減期40分から一時間程度の短い時間で分解が起こることが明らかになった(図)。これは真核生物の rRNA に対して何らかの品質管理機構が存在していることを示す結果である。

ある。

(2)機能不全 rRNA はリボソーム粒子中に入ってから分解される

上記の機能不全 rRNA を発現させた酵母からリボソームを調製し、ショ糖密度勾配遠心法とノザンハイブリダイゼーションを組み合わせた方法により、機能不全 rRNA がどの分画に現れるかを検証した。すると機能不全 rRNA の多くは 60S と 80S のピークに現れており、一部は



ポリソーム画分にも含まれていた(図)。このことは機能不全 25S rRNA はいったん 60S 粒子までアッセンブルされてから一度は 80S を形成し、その後分解されることを

示している。つまり細胞は rRNA に正常な機能が備わっているかどうかの判定を、一旦 80S 粒子の形にしてから行っていることを意味している。

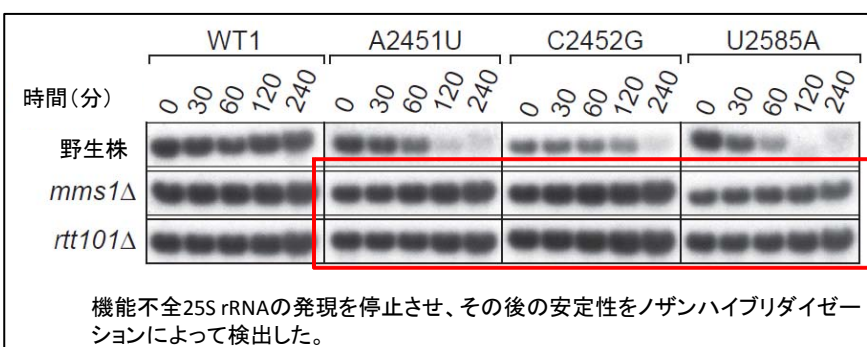
機能不全 rRNA を発現させた酵母を、in situ ハイブリダイゼーションを使って観察すると、機能不全 rRNA は細胞質の画分に主に存在することが明らかになった。このことは上記の観察と一致し、このような点変異を持つ rRNA も 60S 粒子となって核から細胞質へと移行し、80S 粒子を形成しようということを示している。

以上の実験から、細胞はなんらかの形でリボソーム 80S 粒子の機能が正しいかどうかを診断する方法を持っている、ということが結論された。

(3)機能不全リボソームの選択的分解に関与する因子の同定

この現象に関わる因子を同定するために、出芽酵母の遺伝子ノックアウトコレクションを利用した。これは出芽酵母の持つ 6000 個の遺伝子のうち、約 5000 個の非必須遺伝子を順番にノックアウトした変異株のコレクションである。これら 5000 株に対して、機能不全 25S rRNA を発現するプラスミドを順次導入した。

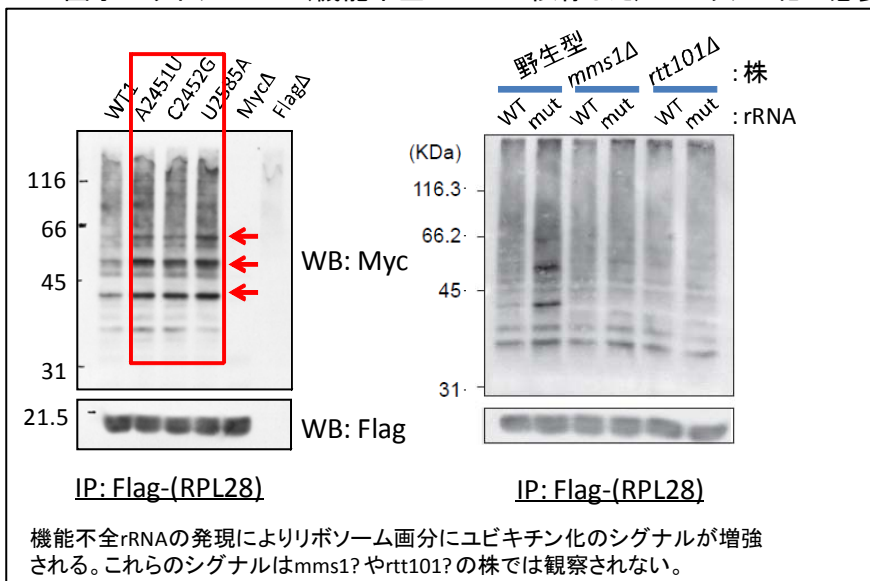
得られた 5000 株を使って、コロニーノザン法を用いて、機能不全 25S rRNA の分解が停止したような株をスクリーニングした。陽性だった株についてはリアルタイム PCR を用いて二次スクリーニングを行った。最終的に、*mms1* Δ 株と *rtt101* Δ 株について、これらの株が機能不全 25S rRNA を分解する能力がほぼ完全に失われていることが明らかになった(図)。これらの株に対して、それぞれ野生型の *Mms1* あるいは *Rtt101* を発現するプラスミドを導入すること



で、機能不全 25S rRNA の分解は完全に復活することから、これら二つの因子がどちらもこのリボソームの品質管理に必要な因子であることが明らかになった。

(4) 分解に先立ち機能不全リボソームが選択的にユビキチン化される

Mms1 と Rtt101 が、これまでにユビキチンリガーゼ複合体の構成因子であることが知られていた因子であることから、これらを含む複合体が機能不全リボソームを、分解に先だってユビキチン化している、という仮説をたてた。このことを検証するために、機能不全 rRNA を発現した細胞からリボソームを精製し、その中に含まれるユビキチン化たんぱくのパターンを、Myc-Ubiquitin の系を用いて解析した。すると予想通り、機能不全 rRNA の発現に依存して、リボソーム画分にユビキチン化が増強して現れることが明らかになった。これらのユビキチン化のシグナルは、mms1 Δ 株や rtt101 Δ 株においては全く観察されなくなることから、これら 2 つの因子がリボソームの(機能不全 rRNA に依存した)ユビキチン化に必要な因子であること



は明らかである(図)。おそらくこれら 2 つ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何らかの方法で検出し、特異的なユビキチン化を行うことで、その中に含まれる機能不全 rRNA の分解を誘導するのだろう。

(5) 機能不全 rRNA が分解されることの厳密な証明

ここまでの実験では、点変異を持った rRNA が分解されること、その時にユビキチン化が誘導されることを示しているが、この変異 rRNA が本当に機能不全かどうかは厳密には示されていない。RNA ポリメラーゼ I の温度感受性株を用いたアッセイで、これらの rRNA が相補活性を持たないことを示していたが、これは直接には機能不全であることを示してはいない。点変異による rRNA の分解が誘導されるために、これらの rRNA は相補活性がないだけなのかもしれない。もともと機能不全のものが細胞の品質管理機構で認識される、ということを示すためには、さらに厳密な実験が必要だった。

mms1 Δ 株においては、点変異を持つ rRNA が安定化する。このことを利用して、これらの点変異を持つ rRNA が分解しない状況を作り、その上で相補活性を回復するかどうかの実験を行った。その結果、「機能不全」として用いてきたどの点変異を含む rRNA の場合でも、分解が停止している場合にも相補活性を回復することはできなかった。これらの観察から、細胞には機能の異常な rRNA を見分けて認識し、そのリボソームをユビキチン化して分解へと導く、品質管理機構が存在するということが最終的に明らかになった。

3. 今後の展開

これまでに、真核生物のリボソームには品質管理機構が存在すること、そのうちの一部にはユビキチン・プロテアソームの機構が関与していることが分かってきた。さらに、リボソームに与える損傷によっては、リボソーム画分に導入されるユビキチン化たんぱく質のパターンが異なるなどの現象が最近になって明らかになっており、リボソームのユビキチン化パターンはその後のリボソームの運命を決める暗号としての意味があることが分かってきている。今後さまざまな損傷を持つリボソームの細胞内での運命を解析し、その品質管理機構を明らか

にすることを計画している。

リボソームの合成過程に関与する因子の欠陥で起こる、さまざまな遺伝病が報告されている。今回明らかになったリボソームの品質管理機構を基礎として、細胞内でリボソームが正しい性能を果たすためにどのような監視がなされ、リボソームの品質が維持されているかを明らかにすることで、さまざまな遺伝病などの治療に道を拓く可能性があるかと期待できる。

4. 自己評価

当初の目標とした、損傷をおったリボソームの品質管理機構について、一部については深く追究することができた。特に出芽酵母を用いた系により、品質管理機構の重要なポイントにユビキチン化が関与していることが明らかになり、さらにそのことを基礎として、細胞内で機能不全リボソームがどのような仕組みで検出されるのかについても少しずつ状況が明らかになりつつある。しかしこれまでに明らかになったことは、紫外線により導入されたリボソーム RNA の損傷の一部のものの運命についてと、点変異を活性中心(ペプチジルトランスフェラーゼセンター)に導入された 25S rRNA のその後の運命に関することのみであり、細胞内で起こりうるさまざまな rRNA 損傷のごく一部分だけを拡大して深く追究したにすぎない。リボソームの品質管理がどのようになされているのか、その全体像については不明な点が多く残された。紫外線のみならず多様なストレスの影響や、ペプチジルトランスフェラーゼ以外の重要な塩基に点変異を導入した場合の効果など、その全体像を明らかにするためには今後さらに、多くの実験がなされる必要があると考えている。

5. 研究総括の見解

リボソームの活性を失わせる変異を持つ rRNA の運命を研究した結果である。このような変異 RNA もリボソームに取り込まれること、リボソームとなってから不活性なものは、ユビキチン化され分解されることを明らかにした。不活性リボソームの品質管理機構を解明したものとして高く評価できる。もう一つの「修復系」については重要な研究成果が得られているものの、論文等公表準備との関係から公表の段階でないと成果が示されていない。早急な論文発表が望まれる。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1	Fujii K, <u>Kitabatake M</u> , Sakata T, Miyata A, Ohno M. "A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs." Genes Dev. 2009 23(8):963-974.
2	Kodama K, Nakayama H, Sakamoto K, Fukuzawa S, Kigawa T, Yabuki T, <u>Kitabatake M</u> , Takio K, Yokoyama S. "Site-specific incorporation of 4-iodo-L-phenylalanine through opal suppression." J Biochem. (2010) 148(2):179-187.
3	Wu J, Bu W, Sheppard K, <u>Kitabatake M</u> , Kwon ST, Soll D, Smith JL "Insights into tRNA-dependent amidotransferase evolution and catalysis from the structure of the Aquifex aeolicus enzyme" J Mol Biol (2009) 391(4):703-716.
4	Fujii K, <u>Kitabatake M</u> , Ohno M. "Proteasome dependent degradation of nonfunctional rRNAs dectated by selective ubiquitination" (2011 年、投稿準備中)

(2)特許出願

なし

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

国際学会口頭発表

1 "Selective degradation of nonfunctional ribosomal RNAs mediated by the

ubiquitin-proteasome system”

Kitabatake M, Fujii K, Sakata T, Miyata A, Ohno M.

The 19th CDB Meeting “RNA Sciences in Cell and Developmental Biology”(Kobe)2010 年 5 月

2 “A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs”

Kitabatake M, Fujii K, Sakata T, Miyata A, Ohno M.

RNA meeting, Madison (Wisconsin, USA) 2009 年 5 月

3 “A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs”

Kitabatake M, Fujii K, Sakata T, Miyata A, Ohno M.

International conference on Ribosome Biogenesis, Regensburg (Germany) 2009 年 8 月

国内学会口頭発表

1. 「機能不全リボソーム RNA の品質管理におけるユビキチンの新しい機能」

北畠真、藤井耕太郎、坂田知子、宮田淳美、大野睦人

日本生化学会年会シンポジウム「多様性と非多様性を獲得する RNA プログラム」

神戸、2009 年 10 月

2. 「機能不全リボソームが分解される仕組み」

北畠真、藤井耕太郎、酒井朗恵、大野睦人

日本 RNA 学会年会 東京、2010 年 7 月

3. 「リボソーム RNA の品質管理におけるユビキチンの役割～DNA 修復との接点～」

北畠真、藤井耕太郎、坂田知子、酒井朗恵、大野睦人

第 39 回日本環境変異原学会年会 筑波、2010 年 11 月

4. 「真核生物における機能不全リボソームの選択的分解」

北畠真、藤井耕太郎、酒井朗恵、坂田知子、大野睦人

日本分子生物学会年会 神戸、2010 年 12 月

研 究 報 告 書(公開)

「RNA末端合成プロセス装置の分子基盤」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研 究 者：富田 耕造

1. 研究のねらい

DNA からRNAへと遺伝情報が転写された後、RNAは多岐にわたるプロセスを経て機能しうるRNAへと成熟化されます。この成熟化プロセスにおいて、多くのRNAの3'末端にはDNA上にコードされていない配列が鋳型非依存的RNA合成酵素によって合成付加されます。このRNA3'末端配列は、RNAの翻訳、分解、品質管理等、遺伝子発現に重要な役割をはたしています。本研究では、鋳型非依存的RNA合成酵素(CCA付加酵素、ポリA付加酵素)に注目し、これらのRNA合成酵素が核酸の鋳型を用いずに特定の配列を付加する分子機構を解明し、核酸の鋳型としての役割が蛋白質へと写し取られた過程の分子進化基盤を探ることを目指します。また、RNAの3'末端領域の配列は、RNAをゲノムとして有する太古生命体においては、自分自身のRNAゲノムの複製、保存のために必要な現在のテロメアとしての機能を有していたという仮説があります。したがって、RNAの末端へ鋳型非依的にRNAを合成付加する酵素は現在のテロメラーゼに相当すると考えることもできます。本研究では、これら仮説に基づき、ゲノムRNAの3'末端領域を認識して、自分自身のゲノムの複製、転写を開始するRNAウイルス由来鋳型依存的RNA合成酵素(Q β レプリカーゼ)にも注目し、このRNA合成酵素のRNA合成の分子メカニズムを解明し、ウイルスRNA合成酵素複合体の進化基盤を探ることをも目指します。

2. 研究成果

鋳型非依存的RNA合成酵素の分子機構

tRNAの3'末端に普遍的に存在するCCA配列(位置:74、75、76)はCCA付加酵素によって核酸の鋳型を用いずに合成、付加されます。CCA付加酵素は二つのクラスに分類され、古細菌型CCA付加酵素はクラスI、真正細菌、真核生物型CCA付加酵素はクラスIIに属します。クラスIとクラスII CCA付加酵素は全く同じ反応を触媒するにも関わらず、そのアミノ酸配列の相同性は低いことが知られています。また、真核生物のポリA付加酵素はクラスIIに、真正細菌のポリA付加酵素はクラスIIに属します。クラスIIに属するCCA付加酵素とポリA付加酵素はそのアミノ酸配列、特にN末端側の25KDa領域の相同性が高く、アミノ酸配列からでは、その酵素活性を予測するのが不可能です。本研究では鋳型非依存的RNA合成酵素に関して、以下の[1]～[3]の研究を行いました。

[1] クラスI CCA付加酵素が正しい配列合成を維持する分子メカニズム

クラスI CCA付加酵素の特異性の切り替えの分子基盤は、これまで研究者らおよびアメリカのグループによって精力的に研究が進められ、その動的な反応分子基盤は明らかにされています。クラスI CCA付加酵素では鋳型がRNAと蛋白質複合体の共同で形成されていることが明らかになりました。具体的にはATPの6位およびCTPの4位のアミノ基がRNAのリン酸骨格と水素結合することによって部分的に認識されていることが明らかになりました。一方で、古くから、CCA付加酵素は間違ったヌクレオチドをRNAに付加した際に、間違ったヌクレオチドを除去する校正機構を有さないことが知られていました。しかし、CCA付加酵素が正しいヌクレオチドを選択する方法以外に、正しい配列(CCA)をもつ tRNA のみを生産する分子基盤は明らかにされていませんでした。

本研究では、クラスI CCA付加酵素とRNAの3'末端(74、75位)に変異を導入した tRNA の二者複合体、さらにその複合体にヌクレオチドを加えた三者複合体、合計十一種類のX線結晶構造解析を行い、さらに変異RNA(計二十種類)を用いた生化学的解析を行うことに

よって、CCA付加酵素が間違っただヌクレオチドを付加したときに、3'末端が間違っただ配列をもったtRNAが生産されないようにする忠実性維持の分子機構を明らかにしました。

クラスI CCA付加酵素はtRNAの74位に間違っただヌクレオチドを付加しても、それを間違いと認識できず、次の75位にCを付加してしまいます。これは、74位にC以外のヌクレオチドが存在しても、酵素は次の75位にCを付加できる活性型へ移行しうることにより起因することが構造的に明らかになりました。しかし、74、75位に間違っただ(C以外の)ヌクレオチドが付加されている場合には、RNAの末端構造がRNA合成が進行するために必要な活性型構造をとることができず、最後の76位へのAの付加反応が進行しないことが構造的に明らかになりました。すなわち、最終反応の際に、74、75位のヌクレオチド組成を酵素が認識していることが最後の76位へAを付加するために必要であることが明らかになりました。したがって、クラスI CCA付加酵素は、正しいヌクレオチドを特異的に選択的する以外に、合成されたRNAの3'末端配列を厳密にモニターし、間違っただ配列をもつRNAが合成できないような通常のDNA/RNA合成酵素とは全く異なっただ”Proofreading”機能を有していることを明らかにしました。なお、本成果はEMBO J (2008)に本研究者を論文責任者として発表を行いました。

[2] クラスII CCA付加酵素がRNA合成伸長、終結を規定する分子メカニズム

これまで、クラスII CCA付加酵素に関して、研究者らおよびアメリカのグループによって精力的に研究が進められてきました。アメリカのグループによって、クラスII CCA付加酵素単体、CTP、ATPの複合体構造が解析され、CTPもATPも同じヌクレオチド結合ポケットで認識され、CTP、ATPともに同じアミノ酸(AspとArg)とワトソン-クリック様水素結合を形成することによって認識が行われていることが示唆されました。また、研究者らによって、クラスIIのA付加酵素とtRNA、ATPアナログの三者複合体の構造が解析され、その結果、ATPはアミノ酸(Asp、Arg)とワトソン-クリック様水素結合を形成して認識されていることが明らかにされました。これらのことから、クラスII CCA付加酵素ではクラスIとは異なり、蛋白質がヌクレオチドの鋳型であると考えられました。しかしながら、クラスII CCA付加酵素の特異性切り替えの分子機構、酵素が付加するヌクレオチドの数を規定し、正しい数のヌクレオチドが付加された後反応を終結する分子機構は明らかにされていませんでした。そこで、A付加酵素と非常にアミノ酸配列の相同性が高く、進化的に近類のCCA酵素に注目し、その構造と機能を、研究者らが解析したA付加酵素と比較することによって、クラスII CCA付加酵素の分子機構を解明することを目指しました。

本研究ではクラスII A付加酵素と近類のCCA付加酵素単体およびCTP、ATPとの複合体のX線結晶構造解析を行い、構造を決定しました。高分解能でのクラスII CCA付加酵素の構造決定、および、A付加酵素とCCA付加酵素の三次元構造比較を元にしたキメラ酵素の生化学的、遺伝学的解析から、クラスII CCA付加酵素内の、付加するヌクレオチドの数、特異性を規定する部位、さらにRNA合成を終結させる部位を明らかにし、クラスII CCA付加酵素の分子機構を提唱しました。

アメリカのグループが報告していたように、ATPもCTPも酵素のヌクレオチド結合部位の同じアミノ酸によって認識されており、蛋白質性の鋳型によってヌクレオチド選択が行われていることが示唆されました。しかし、高分解能での構造解析から、活性触媒ドメイン内の可変ループが伸長してきたRNAの74、75位のCC配列を認識し、その結果、ヌクレオチド結合部位特異性を決定するアミノ酸のコンフォーメーションがATPのみに適したように固定化されて76位にAが付加されて、合成反応が終結することが明らかになりました。また、構造を基にしたA付加酵素とCCA付加酵素のキメラ酵素の遺伝学的、生化学的解析から、付加されるヌクレオチドの数、特異性は、ヌクレオチド結合ドメイン背後のヘリックス間水素結合と活性触媒ドメインとの動的な共同で行われていることが示唆されました。クラスII CCA付加酵素の鋳型は当初、蛋白質であると考えられてきましたが、今回の解析から、正確な分子機構はクラスIとクラスII CCA付加酵素では異なりますが、少なくともクラスII CCA付加酵素による76位へのA付加反応はRNAと蛋白質が共同的に特異性を決定していることが明らかになりました。また、特異性の切り替えは酵素の活性触媒ドメインとヌクレオチド結合ドメインの動的な共同によって行われていることが明らかになりました。なお、本成果はEMBO J (2009)に本研究者を論文責

任者として発表を行いました。

[3]クラスII ポリA付加酵素の基質特異性を規定する分子メカニズム

クラスIIのCCA付加酵素と、ポリA付加酵素はそのアミノ酸配列の相同性が高く、CCA付加酵素においてCTPとATPの認識に関与するアミノ酸(Asp、Arg)もポリA付加酵素では保存されています。しかし、ポリA付加酵素が、CTPを基質としてもちいず、ATPのみを特異的に基質として認識する分子機構は明らかにされていませんでした。そこで、クラスIIのポリA付加酵素の構造を決定し、それをこれまで解析されたCCA付加酵素のそれと比較してCCA付加酵素とポリA付加酵素のヌクレオチド選択の分子基盤の違いを明らかにすることを目指しました。

本研究ではクラスII 真正細菌由来のポリA付加酵素単体およびATPとの複合体のX線結晶構造解析を行い、構造を決定しました。この構造をクラスII CCA付加酵素の構造と比較、および生化学的解析を行うことにより、ポリA付加酵素のヌクレオチド特異性の分子基盤、クラスII酵素群の特異性の違いの分子基盤を明らかにしました。

クラスII ポリA付加酵素の活性触媒ドメイン、ヌクレオチド結合部位の構造はCCA付加酵素のそれと非常に似通っていましたが、ヌクレオチド結合部位内のヌクレオチド認識に関わるアミノ酸(Asp、Arg)の構造が異なっていました。ポリA付加酵素ではこれらのアミノ酸が、活性部位の他のアミノ酸と分子内水素結合を形成し、ヌクレオチド結合部位が固い構造をとっていました。その結果、ヌクレオチド結合ポケットの形と大きさがATPのみに適したものになっており、保存されたふたつのアミノ酸のうちひとつのアミノ酸(Arg)のみがヌクレオチドの塩基認識に用いられていることが明らかになりました。さらに、ポリA付加酵素の、固いヌクレオチド結合ポケット構造の維持は、ヌクレオチド結合ドメインとRNA結合ドメインとの相互作用によることが示唆されました。また、ポリA付加酵素のC末端側領域が、CCA付加酵素とは異なり一定の構造をとりえないRNA結合部位であることを明らかにし、この領域は、ポリA付加酵素があらゆるRNAをプライマーとして用いて、RNAプライマーをRNA合成過程において転移させる機能を有することを明らかにしました。

本研究から、ポリA付加酵素のA付加の特異性とCCA付加酵素のtRNAの76位のA付加の特異性の分子基盤が異なることが明らかになり、ポリA付加酵素では純粋な蛋白質が鋳型となっていることが明らかになりました。なお、本成果はStructure (2011)に本研究者を論文責任者として発表を行いました。

鋳型依存的RNA合成酵素に関する研究

Q β ウイルスは一本鎖の RNA をゲノムとして有するウイルスであり、Q β レプリケースによってそのRNAゲノムの複製・転写を行います。Q β レプリケースは Q β ウイルスゲノム RNA上にコードされているRNA依存的RNA合成酵素(β サブユニット)、宿主由来の翻訳伸長因子EF-Tu、EF-Ts、およびリボソームタンパク質S1から構成されます。Q β レプリケースによるRNA複製・転写活性には β サブユニットと宿主由来の翻訳因子EF-Tu、EF-Tsとが三者複合体を形成することが必要であることが知られています。しかしながら、これらの翻訳因子の、翻訳伸長過程における確立した機能を越えた役割、すなわち、RNA合成における役割は明らかにされていませんでした。本研究では以下の[4]の研究を行いました。

[4]ウイルス由来RNA合成酵素(Q β レプリカーゼ)の複合体形成分子メカニズム

Q β レプリケースのコア複合体(β サブユニット、宿主由来の翻訳伸長因子EF-Tu、EF-Ts)の複合体形成分子機構を解明するために、コア複合体の X 線結晶構造解析を行い、構造を決定しました。この解析から、EF-Tu、EF-Tsは β サブユニットと疎水的相互作用し、その結果、コア複合体の中の β サブユニットの活性触媒コアの構造が維持されていることが明らかになりました。また、生化学的解析から、EF-Tu、EF-Tsと β サブユニットの相互作用は、コア複合体形成に必要であることを示し、EF-Tu、EF-Tsがシャペロン機能を有していることを明らかにしました。鋳型RNA、合成されたRNA、付加されるヌクレオチドのコア複合体活性部位へのモデル構築から、ヌクレオチドおよび鋳型RNAの活性部位へ通じるトンネルを同定しました。また、このモデルから、コア複合体内のEF-Tuが、RNA合成のプロセッシブなRNA伸長反応を促進する“Modulator”としての、翻訳過程での役割を越えた、新たな

機能を有する可能性を提示しました。本成果はPNAS(2010)に本研究者を論文責任者として発表を行いました。

3. 今後の展開

本研究をさらに遂行し、鋳型非依存的なRNA合成酵素の動的な反応分子基盤の詳細を提示すると同時に、これらの解析から鋳型非依存的なRNA合成酵素群の分子機構の全貌を明らかにしていきたいと考えています。また、最近、鋳型非依存的なRNA合成酵素群が多種多様な遺伝子発現、RNAの分解、品質管理、RNAの発現制御に関与していることが報告されてきています。今後、これらの新規な鋳型非依存的なRNA合成酵素の反応分子機構、制御機構をも、構造生物学的、生化学的、分子細胞生物学的手法を相補的に用いて明らかにしていきたいと考えています。さらに、鋳型依存的RNA合成酵素についても、特にウイルス由来のRNA合成酵素複合体による動的な反応分子基盤の全貌を明らかにし、宿主由来の蛋白質のRNA合成における役割を明らかにし、ウイルスゲノムRNAの複製装置の機能構造解析を進めていきたいと考えています。

4. 自己評価

鋳型非依存的RNA合成酵素である CCA 付加酵素の研究から、RNAと蛋白質の共同的なRNA合成忠実性の維持分子機構や、基質特異性を決定する分子機構を明らかにできたと考えています。さらにRNAと蛋白質の共同的な機能発現という点から、これらの鋳型非依存的RNA合成酵素の機能発現様式は、RNA-蛋白質ワールドの分子化石の状態を示したものであると考えます。また、鋳型非依存的RNA合成酵素であるポリA付加酵素の研究から、ポリA付加酵素ではRNAの助けを借りずに蛋白質のみが機能発現に関与していることが明らかになり、進化的にCCA付加酵素からポリA付加酵素が派生してきたという考えを提唱できたと考えています。また、ウイルスRNA合成酵素複合体解析から新たな翻訳因子の役割を提唱でき、太古生命体における翻訳因子はRNA複製補因子であって、現在の翻訳システムはRNA合成システムから、それらの因子を譲り受けたという翻訳因子の進化、起源についての理解が深まったと考えています。これらの一連の研究は研究者らが主体となって、構造解析、生化学的、遺伝学的解析を相補的に用いて、他の研究グループ等と共同研究なしに独自に遂行したものであり、研究目標に向かって確実に研究を遂行できたと考えています。

5. 研究総括の見解

本研究は、構造生物学、生化学、分子細胞生物学的な研究手法を駆使し、鋳型非依存的RNA合成酵素である、CCA付加酵素およびポリA付加酵素の反応の分子基盤の詳細を明らかにしたものである。CCA合成の忠実性がRNAと蛋白質の共同的作用で維持される分子機構を明らかにし、ポリA合成酵素との構造比較から基質特異性を決定する分子機構を解明した。さらに、Q β ファージ RNA合成酵素複合体の解析から、翻訳因子の新たな役割も提唱した。これらの結果は、RNAワールドからの分子機構が現在も働いていることを示し、翻訳因子の進化や起源についての説明ともなっている。非常に、詳細な構造生物学であるが、生物学全体へ波及する影響を持ち、創造性の高い研究である。非常に高く評価できる。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Toh Y, Numata T, Watanabe K, Takeshita D, Nureki O, Tomita K*.

Molecular basis for maintenance of fidelity during the CCA-adding reaction by a CCA-adding enzyme.

EMBO J. 2008 ; 27, 1944-1952.

2. Toh Y, Takeshita D, Numata T, Fukai S, Nureki O, Tomita K*.

Mechanism for the definition of elongation and termination by the class II CCA-adding enzyme.

EMBO J. 2009; 28, 3353–3365.

3. Takeshita D, Tomita K*

Assembly of QB viral RNA polymerase with host translational elongation factors EF-Tu and -Ts.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 ; 107, 15733–15738.

4. Toh Y, Takeshita D, Nagaike T, Numata T, Tomita K*

Mechanism for the alteration of the substrate specificities of template-independent RNA polymerases

Structure, 2011 ; 19 (2), 232–243.

(2)特許出願

なし

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

(招待講演)

- | |
|---|
| 1. 2010年 11月 第39回 日本環境変異原学会年会 (つくば)
「鋳型非依存的RNA合成酵素の性質と、そのRNAサーベイランス機構における役割」 |
| 2. 2008年 12月 第31回日本分子生物学会年会 (神戸)
第6回 日本分子生物学会三菱化学奨励賞 講演
「鋳型非依存的RNA合成酵素の進化・分子機構に関する研究」 |
| 3. 2008年 2月 千里ライフサイエンスセミナー (大阪)
「鋳型なしRNA合成酵素の進化・分子機構」生命機能を支える生体超分子の高次構造と機能」 |

(受賞)

- | |
|--|
| 1. 2010年 文部科学大臣表彰 科学技術分野(研究部門) 受賞
「酵素反応の動的分子機構の構造的な研究」 |
| 2. 2008年 日本分子生物学会 第6回 日本分子生物学会三菱化学奨励賞 受賞
「鋳型非依存的RNA合成酵素の進化・分子機構に関する研究」
(Mechanism and evolution of template-independent RNA polymerases) |
| 3. 2007年 茨城県科学振興財団 第17回つくば奨励賞若手研究者部門 受賞
「鋳型を用いないRNA合成酵素の分子構造基盤研究」 |

(総説、著書)

- | |
|---|
| 1. <u>富田耕造</u> 、沼田倫征
4章 生命現象の理解に迫る構造生物学的研究 4.3 翻訳 担当
「入門 構造生物学」ー放射光X線と中性子で最新の生命現象を読み解くー
高エネルギー加速器研究機構 構造生物学的研究センター 編 2010 共立出版 |
| 2. 渡邊和則、董雪松、 <u>富田耕造</u>
アミノアシル tRNA 蛋白質転移酵素の基質認識、反応触媒の分子機構の解明
<i>生化学</i> , 2009; 81(4): 294–298 日本生化学会 |
| 3. 董雪松、 <u>富田耕造</u>
鋳型非依存的RNA合成酵素, CCA付加酵素のRNA合成忠実性維持の分子基盤
<i>実験医学</i> , 2008; 26(19): :3058–3061羊土社出版 |
| 4. 渡邊和則、 <u>富田耕造</u>
tRNA を使うリボソームによらないペプチド結合形成反応
<i>蛋白質核酸酵素</i> , 2008; 53(9):1152–1157. 共立出版 |

(プレス発表等)

- | |
|---|
| <p>1. プレスリリース「鋳型なしRNA合成において正しい配列を維持するための分子機構を解明
2008年7月8日 (独)産業技術総合研究所発表
2008年7月9日(水)日刊工業新聞、2008年7月9日(水)日経産業新聞、2008年7月18日
(金)科学新聞、に掲載</p> |
| <p>2. 産業技術総合研究所HP「主な研究成果」掲載
真正細菌の鋳型なしRNA合成酵素の反応の分子機構を解明ー新たなRNA合成酵素による機能
性RNA研究へー
2009年10月5日 (独)産業技術総合研究所発表</p> |
| <p>3. プレスリリース「ウイルスRNA合成酵素と宿主翻訳因子との複合体の構造を解明ー新たな抗
RNAウイルス薬開発へ期待ー」
2010年8月24日 (独)産業技術総合研究所と(独)科学技術振興機構との共同発表
2010年8月24日(火)化学工業日報、2010年8月24日(火)日刊工業新聞に掲載</p> |

研究報告書(公開)

「細胞質持続発現型 RNA ベクター」

研究期間:平成19年10月～平成23年3月

研究者: 西村 健

1. 研究のねらい

動物細胞への遺伝子導入技術は、現在のバイオサイエンスの基幹技術である。導入技術により遺伝子発現期間は長短様々であるが、持続的な発現を目的にした際には、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが現在主に用いられている。しかし、これらのベクターは宿主の染色体にベクターゲノムを挿入することによって持続的な発現を実現しているために、宿主の遺伝情報に影響を与えることによるガン化等のリスクが指摘されている。

それに対し RNA ウイルスであるセンダイウイルスは、生活環のすべてが細胞質内であるため、核内の宿主の遺伝情報に全く影響を与えない。また、センダイウイルスの野生株は細胞障害性を有するのに対し、細胞を障害せずに持続感染するセンダイウイルス CI.151 株という変異株が分離されている。

そこで本研究では、このように非常にユニークな性質を有するセンダイウイルスの持続感染変異株を基に、細胞質内で安定に遺伝情報を維持しながら、持続的な遺伝子発現を可能にする「細胞質持続発現型 RNA ベクター」を開発、実用化することを目指した。さらに、miRNA 等の機能性 RNA の機能と、ベクターの RNA ゲノムを融合させることにより、持続的に遺伝子発現をしながら必要に応じてベクターの除去や遺伝子発現調節が可能な持続発現型ベクターへの改良も試みた。また、持続感染とインターフェロン発現誘導の関係の解析等により、RNA ゲノムが細胞質内で安定に維持されるメカニズムを明らかにし、RNA の生体応用の際に常に問題視されるインターフェロン誘導を回避したベクターの作製を試みた。そして、このような研究を総合して、より医療応用に近い新規 RNA テクノロジーの創出を目指した。

2. 研究成果

本研究を開始する前に、既にセンダイウイルス持続感染変異株 CI.151 の全長ゲノム cDNA のクローニングや、その cDNA に外来遺伝子を挿入した組換えウイルスの作製に成功しており、このような全長型 CI.151 ベクターは、細胞を障害すること無く、6 ヶ月以上の長期間、持続的に外来遺伝子を発現することが可能であることを明らかにしていた(K. Nishimura, et al. (2007) *J. Biol. Chem.*)。また、CI.151 株のゲノム上の持続感染関連変異の解析により、ウイルス膜構成タンパク質(M、F、HN 遺伝子)上の変異による感染初期の細胞障害性低下と、ウイルスポリメ

ラーゼタンパク質(L遺伝子)上の変異によるインターフェロン β の誘導減少、といった複数の効果が合わさることによって持続感染が成立しているということも明らかにしていた(K. Nishimura, et al. (2007) *J. Biol. Chem.*)。さらに別の解析により、P 遺伝子上の一つの点変異による細胞障害性低下も持続感染に必要であることも明らかにしていた。

以上の結果を受けて、本研究では、(1)センダイウイルスの持続感染機構の解析、(2)細胞質持続発現型 RNA ベクターの開発、(3)細胞質持続発現型 RNA ベクターの応用、(4)遺伝子発現調節ベクターへの改良、について研究を進めたので、以下、この順で詳細を説明する。

(1)センダイウイルスの持続感染機構の解析

上記の L 遺伝子の変異によるインターフェロンの誘導減少について、より詳細に解析を進めた。

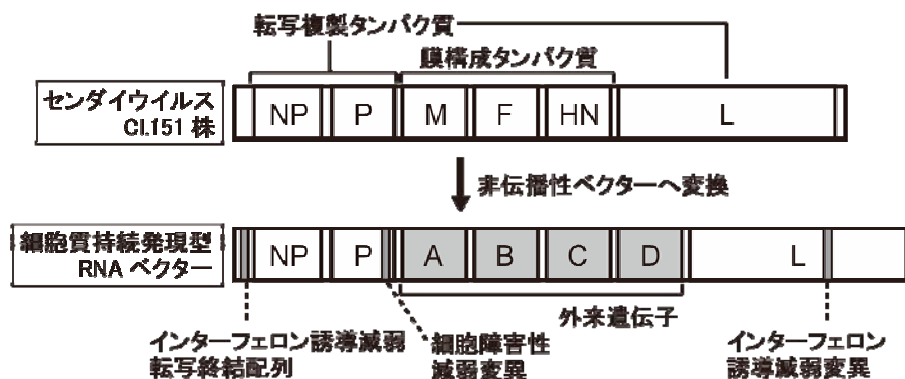
まず、CI.151 株の L 遺伝子上には、親株の Nagoya 株と比較して 4 カ所の点変異が存在していたが、そのうちのたった一つの点変異(1618 番目のロイシンがバリンに変化)のみで、インターフェロン誘導が著しく減少し、それに伴って細胞障害性も減少することを明らかにした。インターフェロン β は、ウイルス RNA が宿主の RIG-I タンパク質に認識されることによって誘導されると言われていることから、次に、インターフェロン誘導源であるウイルス RNA 量を定量した。その結果、L タンパク質上の点変異によって、ウイルスゲノム RNA 量に変化は無いが、アンチゲノム方向の RNA の転写量が、特に感染初期(感染後 8 時間以内)において著しく減少していることを明らかにした。また、アンチゲノム RNA の転写量を減少させるための転写終結配列を、野生株のゲノムに人工的に挿入したところ、この組換えウイルスのインターフェロン誘導能は有意に減少していた。

以上の結果から、センダイウイルス RNA のうちアンチゲノム RNA がインターフェロン誘導源となっており、そのような RNA が感染初期において転写されずにインターフェロン誘導が起きないことが、CI.151 株の持続感染の一因となっていることが明らかになった。また、この RNA の転写量を人工的に減少させることにより、細胞障害性を低下させた組換えウイルスの作製が可能であることを明らかにした。

(2)細胞質持続発現型 RNA ベクターの開発

まず始めに、全長型 CI.151 ベクターのゲノムから、ベクターの転写複製に関わらない遺伝子を外来遺伝子に置き換えることによって欠損させて、持続感染能を維持したまま、自律複製できない非伝播性のベクターにすることが可能であるか検討した。その結果、転写複製に関わらないウイルス膜構成タンパク質の 3 遺伝子すべてを外来遺伝子に置換しても、持続感染能を維持したベクターの構築が可能であることを明らかにした。さらに、上記(1)の持続感染機構

解析で有効性が証明された、インターフェロン誘導減弱のための転写終結配列を挿入することにより、より安定して持続感染するベクターへと進化させ、最終的に図 1 に示されるような構造を持つベクター、「細胞質持続発現型 RNA ベクター」の開発に成功した。



＜図1＞細胞質持続発現型 RNA ベクターの構造

次に、細胞質内で持続感染するという本ベクターの特徴を生かすために、持続感染するベクターを人為的に除去する技術の開発を試みた。ポリメラーゼタンパク質をコードする L 遺伝子に対する siRNA でベクター感染細胞を処理したところ、約一週間後にはベクターからの外来遺伝子の発現が検出されなくなり、ベクターゲノムが宿主細胞から除去されたことが明らかになった。以上の結果から、siRNA 処理等でウイルスポリメラーゼの活性を抑制することにより、人為的に持続感染しているベクターを除去できることが明らかになった。

(3)細胞質持続発現型 RNA ベクターの応用

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、体細胞に複数の遺伝子を導入することによって誘導されてくる多能性幹細胞であり、再生医療の分野等への応用が期待されている。しかし従来の誘導方法では、4 つの遺伝子を別々に搭載したレトロウイルスベクターを多重感染させる方法が主に用いられており、染色体挿入により残存するベクター由来の誘導遺伝子の再活性化によるガン化等のリスクや、4 遺伝子の発現バランスの違いによる性質のばらつき、等の問題点が指摘されている。それに対し、細胞質持続発現型 RNA ベクターは「染色体挿入無く」「複数の遺伝子を」「持続的に発現し」「人為的除去が可能」であるという特徴を持っていることから、これらの特長を生かした iPS 細胞誘導への応用を試みた。

Oct4、Sox2、Klf4、c-myc の 4 遺伝子を搭載した細胞質持続発現型 RNA ベクターを作製して iPS 細胞を誘導し、その後 siRNA 処理によってベクターの除去を行ったところ、従来の方法よりも約 100 倍効率良く誘導が可能で、最終的にはベクターゲノムが完全に除去された、誘導前の細胞と遺伝情報が全く同一な iPS 細胞を樹立することに成功した。また、4 遺伝子を一定の発現バランスで同時に発現させることから、得られる iPS 細胞のクローン間の性質のばらつき

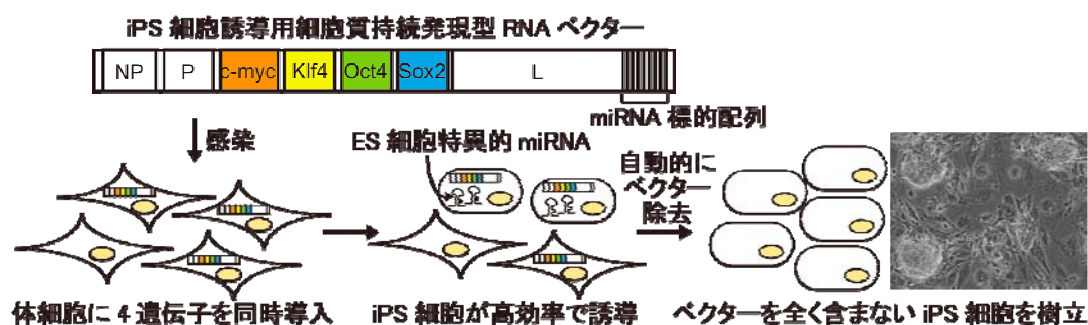
が非常に小さく、均一な性質の iPS 細胞が誘導されていることも明らかになった。さらにベクターへの 4 遺伝子の搭載順を変えることによって発現バランスを変えたところ、より誘導効率を上昇させることができた。以上の結果から、細胞質持続発現型 RNA ベクターを用いた iPS 細胞誘導方法は、安全性、効率、再現性の面から非常に有用性が高い方法であることを明らかにした。

また、iPS 細胞誘導以外にも細胞質持続発現型 RNA ベクターの応用研究は進行中であり、染色体挿入無く持続感染する性質を利用した遺伝子治療への応用や、タンパク質を高発現する性質を利用したタンパク質製剤の大量産生への応用等も共同研究で行われている。

(4) 遺伝子発現調節ベクターへの改良

細胞質持続発現型 RNA ベクターの利便性をより高めるために、ベクターからの遺伝子発現を調節するシステムの構築を試みた。

ES 細胞特異的に発現する miRNA の標的配列を、外来遺伝子の 3' -UTR に挿入したベクターを構築したところ、ES 細胞に感染させた場合のみ、ベクターからの外来遺伝子の発現が減少した。このように組織特異的 miRNA の機能を利用して、ベクターからの遺伝子発現を抑制することが可能であることから、同様に、L 遺伝子の 3' -UTR に ES 細胞特異的 miRNA の標的配列を挿入した iPS 細胞誘導用ベクターを構築し、このベクターを用いて繊維芽細胞からの iPS 細胞誘導を試みた。その結果、iPS 細胞が誘導されると ES 細胞特異的 miRNA が発現してくることにより L タンパク質の発現が減少するため、siRNA 処理をしない場合でも、ベクターゲノムが自動的に除去された iPS 細胞が誘導されてきた。以上のように、自動除去型の iPS 細胞誘導用細胞質持続発現型 RNA ベクターを用いることにより、一度ベクターを感染させて植え継ぎをするのみで、効率良く、簡便に iPS 細胞を樹立できるという系の構築に成功し(図2)、現在これらを利用して多くの共同研究先において様々な細胞から iPS 細胞が樹立されている。



＜図2＞細胞質持続発現型 RNA ベクターを用いた、安全かつ簡便な iPS 細胞誘導方法

4. 今後の展開

細胞質持続発現型 RNA ベクターの有用性はこれまでの研究によって証明されてきたので、今後はまずベクターの汎用性を高めるために、誰でも簡便に構築できる形に改良する必要があると思われる。具体的には、ファージ DNA にクローニングされているベクター-cDNA をプラスミドにクローニングできるようにして、市販のキット等で簡便に遺伝子操作を行うことが可能になるようにする必要があり、また、外来遺伝子を挿入する際に、使用する制限酵素や塩基数等に制約が多いことから、よりシンプルに外来遺伝子を挿入できるように改変する必要がある。これらの改良によって、ベクターの汎用性を高め、多くの特長を持つ細胞質持続発現型 RNA ベクターを、より幅広い研究者に、様々な分野で応用してもらえようようにしたい。

iPS 細胞誘導方法の開発としては、より誘導効率を上げるために、ベクターに搭載する誘導遺伝子の追加や、搭載順の変換による最適な発現バランスの探索を行う必要があると思われる。このような改良を重ねることにより、iPS 細胞誘導のスタンダードベクターとなることを目指したい。

さらに、細胞質持続発現型 RNA ベクターは効率良く均一な iPS 細胞を誘導できることから、iPS 細胞誘導機構の解析にも有用であると考えられる。特に、発現バランスを変えるのみで誘導効率が大きく異なる現象が観察されているので、このような違いが何に起因しているかを解析することによって、iPS 細胞誘導に関わる因子の同定や、メカニズムの解明を行いたい。

5. 自己評価

本研究の応用研究としての側面である細胞質持続発現型 RNA ベクターの開発と応用に関しては、従来の遺伝子導入方法には無い、多くの特長を兼ね揃えているベクターの開発に成功し、iPS 細胞誘導への応用という道筋をつけることができ、さらに miRNA 標的配列を利用した発現調節系も確立できたので評価できている。また、基礎研究としての側面である持続感染機構の解析についても、詳細な解析はインターフェロン誘導に関する部分のみであり不十分であるが、インターフェロン誘導機構の解析結果をベクター構築にフィードバックさせて、転写終結配列を用いた更なるベクターの安定性の向上を実現できたことは評価できている。

しかし、世界標準の iPS 細胞誘導用ベクターとなるにはまだ知名度が低く、その原因として論文発表が遅れていることがあるのは反省点である。iPS 細胞誘導についてのみならず、本研究で得られた成果を早く論文にまとめて発表することによって知名度を高め、様々な研究者に様々な応用分野で利用してもらえようようにしたい。

6. 研究総括の見解

本研究は、細胞質で増殖する RNA ウイルスであるセンダイウイルスの持続感染変異株を使用したベクターの構築とその利用を目指して行われた。ウイルスゲノムの性質を熟知した上での研究であり、そのため、ウイルス RNA の能力を最大限引き出すことに成功している。応用研究として、均質な性質を持つ iPS 細胞作成に成功し、さらに iPS 細胞誘導終了と同時に、その細胞からベクターを排除する技術の開発にも成功しており、高く評価できる研究結果である。

7. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. K. Nishimura, M. Sano, M. Ohtaka, B. Furuta, Y. Umemura, Y. Nakajima, Y. Ikehara, T. Kobayashi, H. Segawa, S. Takayasu, H. Sato, K. Motomura, E. Uchida, T. Kanayasu-Toyoda, M. Asashima, H. Nakauchi, T. Yamaguchi, M. Nakanishi: Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector: a Unique Gene Delivery/Expression System Ideal for Cell Reprogramming. *J. Biol. Chem.*, Vol. 286: 4760–4771, 2011.

(2)特許出願

研究期間累計件数:2 件

1. 発明者:中西真人、西村健、大高真奈美、佐野将之

発明の名称:多能性幹細胞作製用ベクター材料及びこれを用いた多能性幹細胞作製方法

出願人:産業技術総合研究所

出願日:2009/5/18

(非公開希望 1 件)

(3)その他

<主な学会発表>

1. 西村健、大高真奈美、高安聡子、小林俊寛、小沼泰子、伊藤弓弦、大津真、中内啓光、浅島誠、中西真人:iPS細胞樹立に最適な形に進化させた持続発現型RNAベクターの開発、第 10 回日本再生医療学会総会、2011
2. 大高真奈美、西村健、高安聡子、小沼泰子、中島由郎、伊藤弓弦、玉置也剛、青木仁美、池原譲、國貞隆弘、浅島誠、中西真人:持続発現型RNAベクターを用いた簡便かつ高効率なヒトiPS細胞樹立方法の確立、第 10 回日本再生医療学会総会、2011

3. 西村健、大高真奈美、佐野将之、梅村洋子、中西真人：細胞質持続発現型RNAベクターの開発、第 12 回日本RNA学会年会、2010
4. K. Nishimura, M. Ohtaka, H. Segawa, B. Furuta, R. Uchida, T. Kanayasu-Toyoda, T. Yamaguchi, M. Nakanishi: DEVELOPMENT OF NOVEL CYTOPLASMIC RNA VECTOR CAPABLE OF STABLE GENE EXPRESSION WITHOUT CHROMOSOMAL INTEGRATION、International Society of Stem Cell Research 7th Annual Meeting、2009
5. 西村健、中西真人：センダイウイルス感染によるインターフェロン誘導と持続感染機構の解析、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、2008

<著作物>

1. 中西真人、西村健、大高真奈美、佐野将之、酒井菜絵子：細胞質で持続的に遺伝子を発現できる新規ベクターの開発と先端医療への応用、iPS細胞の産業的応用技術、シーエムシー出版、51-60 頁、2009
2. 中西真人、西村健、大高真奈美、佐野将之：安全なiPS細胞作製に向けた新型センダイウイルスベクターの開発、幹細胞の分化誘導と応用、(株)エヌ・ティー・エス、108-118 頁、2009

<受賞>

第 10 回日本再生医療学会総会ベストポスター賞 平成 23 年 3 月 2 日

研 究 報 告 書(公開)

「RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとそのクロマチン構造維持機構」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

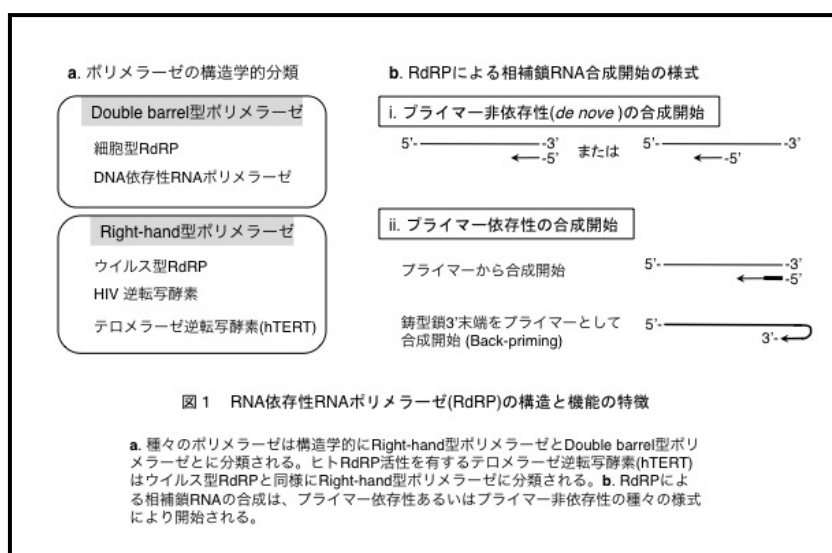
研 究 者：増富 健吉

1. 研究のねらい

RNA 干渉は、2 本鎖 RNA が特定の遺伝子の発現を抑制する現象で、ウイルス感染に対する防御機構など生体内のさまざまな局面で重要な役割を担っている。1990 年代に、植物で 2 本鎖 RNA を合成する酵素「RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RdRp)」が発見されて以来、真核生物などでも存在することが報告されていたが、ヒトなどのほ乳動物での存在は確かではなく、分子生物学における長年の謎のひとつとなっていた。RdRp は、RNA により介在されるゲノム構造維持機構の中でその根幹を担う重要な酵素と認識されてきたが、哺乳動物においても RdRp と機能的な相同性を有する分子の存在は予想こそされているが、依然としてその立証はされていなかった。本研究では、ヒトにおける RdRp の同定とその生物学的意義の解明を目指した。

2. 研究成果

RNA サイレンシングは 20 塩基から 30 塩基長の小さな RNA に介在される遺伝子発現制御機構である。1998 年に線虫で RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) が発見されて以来、small interfering RNA (siRNA)、microRNA (miRNA) など RNA サイレンシングに関与する種々の RNA が報告され、それぞれの生体内での発現や機能、技術応用に関する研究が精力的に進められている。RNA サイレンシングに関与する小さな RNA の代表的な合成経路には、長鎖 2 本鎖 RNA やヘアピン型 RNA からの切断による合成があり、ヒトでも RNaseIII 型酵素である Dicer が miRNA の前駆体であるヘアピン型の pre-miRNA を切断することが知られている。植物や分裂酵母、アカパンカビ、線虫などのモデル生物では 1 本鎖 RNA を鋳型に 2 本鎖 RNA を合成する酵素である RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase; RdRP) の存在が知られており、細胞内での長鎖 2 本鎖 RNA の合成および長鎖 2 本鎖 RNA の切断による内在性 siRNA の合成経路が存在する。しかしながら、ヒトを始めとする哺乳類の RdRp はこれまでその存在が立証されていなかった。今回、ヒトにおける RdRp の存在を証明し、RdRp による内在性 siRNA の合成経路の一部を明らかにした。



現在までに知られているRdRpは構造的類似性に基づいてウイルス型RdRpと細胞型RdRpの2つの型に分類される(図1a)。ポリオウイルス、インフルエンザウイルス、C型肝炎ウイルス(HCV)などのRNAウイルスが持つウイルス型RdRpは、レトロウイルスのRNA依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素)とともにpalm and fingers structure(手

のひらと指の構造)を有するRight-hand型ポリメラーゼに分類される。後述のヒトRdRPもRight-hand型ポリメラーゼに属している。一方、植物、分裂酵母、アカパンカビ、線虫などのモデル生物が持つ細胞型RdRPはDouble barrel型ポリメラーゼに分類され、これら2つの型のRdRPは異なる祖先から進化したものと考えられている。RdRPが相補鎖RNAを合成する方法には、プライマー要求性に基づいて2つのタイプがある²⁾(図1b)。一つはプライマーを必要としない方法で、プライマー非依存性(*de novo*)の合成開始と言われる。モデル生物の細胞型RdRPによる内在性siRNA(とりわけ2次性siRNA)の合成には、この方法を用いる例が報告されている²⁾⁻⁴⁾。一方、プライマーを必要とする方法はプライマー依存性の合成開始と言われる。Right-hand型ポリメラーゼに属するウイルスやヒトのRdRPは、プライマー依存性の相補鎖合成が可能である⁵⁾。この例として、インフルエンザウイルスは宿主mRNAから切断された5'キャップ構造を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして自己のゲノムを転写する。また、HCVやデングウイルス、西ナイル熱ウイルスのRdRPでは、鋳型RNA 3'末端の折り返し構造を利用した合成開始機構が知られており(Back-priming法)、合成されたRNAは長いヘアピン構造となる。

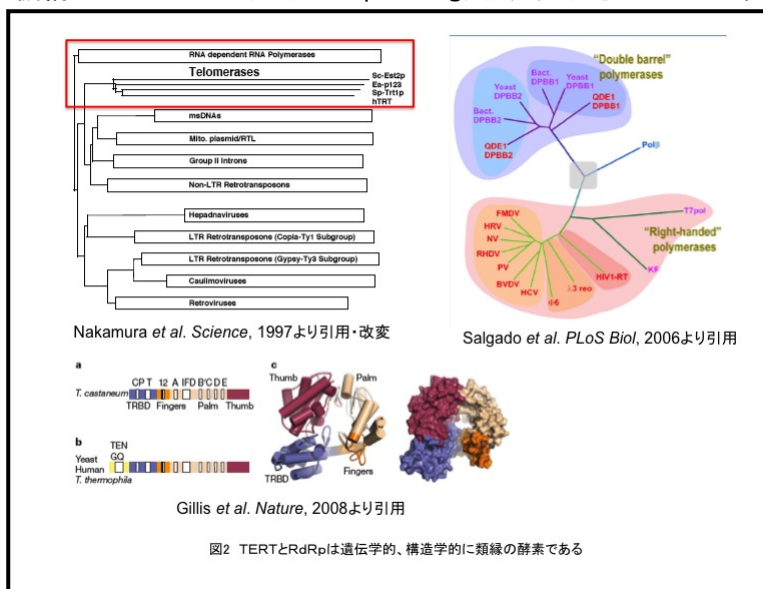


図2 TERTとRdRpは遺伝学的、構造学的に類縁の酵素である

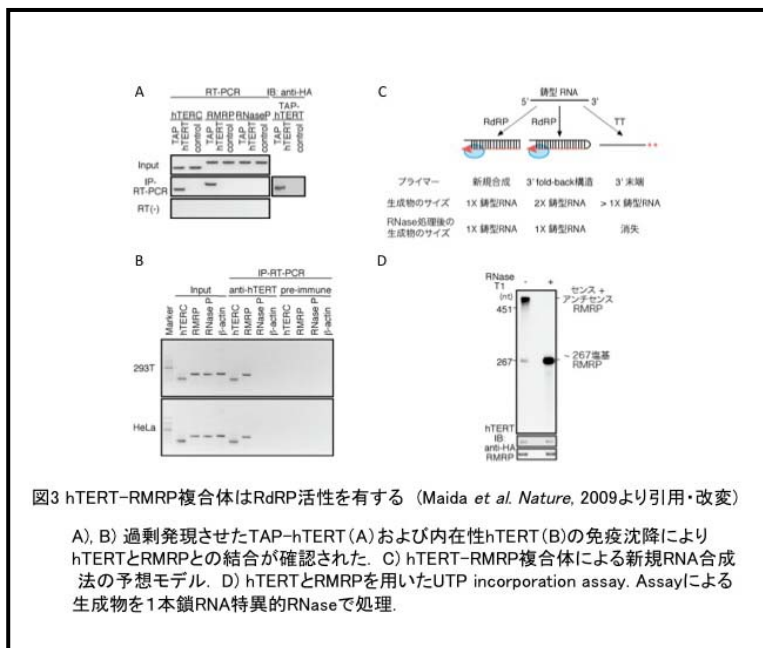
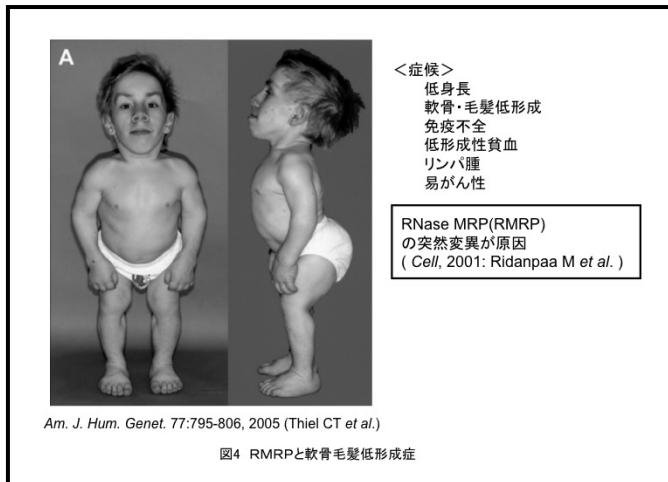


図3 hTERT-RMRP複合体はRdRP活性を有する (Maida et al. Nature, 2009より引用・改変)

A), B) 過剰発現させたTAP-hTERT (A) および内在性hTERT (B) の免疫沈降によりhTERTとRMRPとの結合が確認された。C) hTERT-RMRP複合体による新規RNA合成法の予想モデル。D) hTERTとRMRPを用いたUTP incorporation assay. Assayによる生成物を1本鎖RNA特異的RNaseで処理。

テロメア逆転写酵素であるテロメラーゼの活性は、テロメラーゼの触媒サブユニットであるhTERT (human telomerase reverse transcriptase) と、テロメラーゼの構成RNAであるhTERC (human telomerase RNA component) により保証される。hTERTの本態はhTERCの塩基配列を鋳型として染色体末端にテロメアDNAを付加するテロメア特異的RNA依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素)として広く知られているが、TERTは遺伝系統学的にウイルスのRdRPと近縁にあり、構造学的にもウイルスのRdRPと同じRight-hand型ポリメラーゼに分類される(図2)。我々はTERTがTERC以外のRNAとともにテロメラーゼとは異なるポリメラーゼ活性を示すのではないかと考え、TERTに結合する新規RNAの探索を行った。TAP(tandem affinity peptide) purificationによりTAP-hTERTを過剰発現させたHeLa-S3細胞からhTERT結合RNAを回

収し解析したところ、hTERTと結合する新規RNAとしてRMRP (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease) を同定した (図 3A)。また、内在性に発現するhTERTの免疫沈降により、HeLa細胞および 293T細胞内でのhTERTとRMRPとの物理的相互作用を確認した (図 3B)。RMRPは 267 塩基のnon-coding RNAであり、著明な



低身長を呈し種々の症候を発症する軟骨毛髪低形成の原因遺伝子として知られている (図 4)。まず、hTERTとRMRPによるRdRP活性の有無に関して以下の検討を行った。hTERTとRMRP、或いはhTERTとhTERCを用いて *in vitro* UTP incorporation assayを行ったところ、hTERT-RMRP特異的に³²P-UTPを取り込んだ長短2本のバンドが認められ、hTERT-RMRP複合体による新規RNA鎖の合成が示唆された (図 3D)。なお、hTERTのポリメラーゼ活性に必要な2価金属結合モチーフに変

異を入れたドミナントネガティブ型hTERTでは³²P-UTPの取り込みは認められなかった。これまでに報告されてきたRNA依存性RNAポリメラーゼを有するウイルスでの詳細な検討をヒントに、hTERT-RMRP複合体によるRNA鎖の合成方法として、①RdRP活性による *de novo* の相補鎖RNA合成、②RdRP活性による鋳型RNAの3' fold-back構造を利用した相補鎖RNA合成、③terminal transferase活性による鋳型RNA 3' 端への塩基付加の3つのモードが考えられた (図 3C)。UTP incorporation assayで認められる長いバンドはRMRPの約2倍 (約 530 塩基) の長さを有し、1本鎖RNAの特異的切断によって約 267 塩基に集積し (図 3D)、且つ、2本鎖RNAの特異的切断では消失することが分かった。これらの結果は、この約 530 塩基のRNAが、約 267 塩基で折り返す長いヘアピン構造を有することを示唆している。さらにUTP incorporation assay産物に対するNorthern blottingにより、このRNAにはRMRPのセンス配列並びにアンチセンス配列がともに含まれることが示唆された。以上の結果はすなわちhTERT-RMRP複合体による約 530 塩基の産物が、RMRPを鋳型としてhTERTのポリメラーゼ活性によりRMRP (センス鎖) 3' 端からのback-primingにより相補鎖が合成されたヘアピン型のRNA産物であることを示すものであった。一方、UTP incorporation assayに見られる短い約 267 塩基の産物は2本鎖RNAを特異的に切断するRNase IIIに耐性であったことから、すでに報告のあるhTERTのterminal transferase活性産物であることが考えられた。

hTERTが *in vitro* でRdRP活性を示すことが証明されたが、細胞内でも同様にRdRPとして機能することが立証されれば哺乳類での能動的な内在性siRNA合成経路の存在を示す重要な根拠となる。そこで培養細胞から抽出したtotal RNAを用いて、UTP incorporation assayで認められる約 530 塩基のヘアピン型RNA (センス+アンチセンス型RMRP) と同様のRNAをNorthern blottingにより検索したところ、hTERTとRMRPをともに発現するHeLa細胞、293T細胞およびMCF7細胞内にセンス+アンチセンス型RMRPの存在が確認された (図 5A)。また、細胞内におけるRMRPアンチセンス鎖の発現はhTERT依存性であり、細胞内でもhTERTがRdRPとしてback-primingによるRMRPの相補鎖合成に関与していることが示唆された。

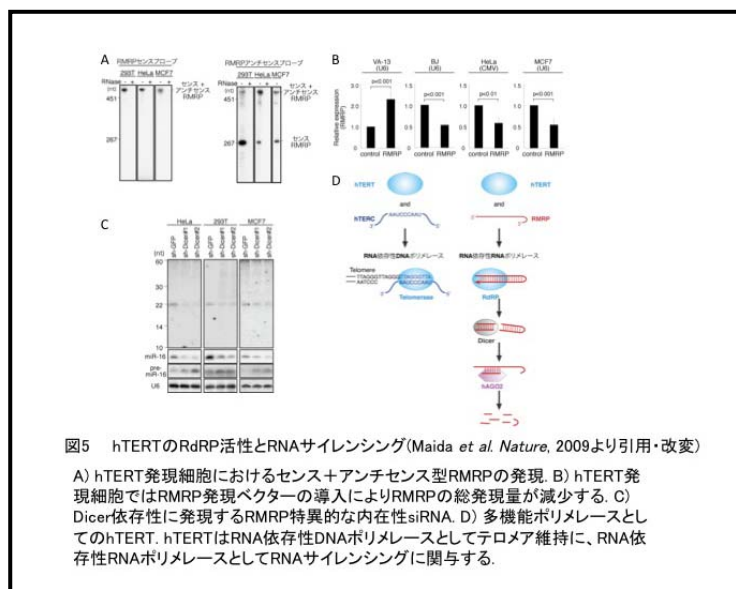


図5 hTERTのRdRp活性とRNAサイレンシング(Maida et al. Nature, 2009より引用・改変)

A) hTERT発現細胞におけるセンス+アンチセンス型RMRPの発現。B) hTERT発現細胞ではRMRP発現ベクターの導入によりRMRPの総発現量が減少する。C) Dicer依存性に発現するRMRP特異的な内在性siRNA。D) 多機能ポリメラーゼとしてのhTERT。hTERTはRNA依存性DNAポリメラーゼとしてテロメア維持に、RNA依存性RNAポリメラーゼとしてRNAサイレンシングに関与する。

センス+アンチセンス型 RMRP の細胞内での機能を考える上で、我々は興味深い現象を見出した。RMRP の過剰発現を試みたところ、hTERT を発現している細胞株では、導入したウイルス由来の RMRP の細胞内過剰発現が確認されるにも関わらず RMRP の総量が減少したのである(図 5B)。一方で、hTERT を過剰発現させると内在性の RMRP 発現量は減少し、逆に hTERT の発現を抑制すると RMRP 発現量は増加した。これらの現象は、hTERT 依存性に

RMRP の発現量を転写後に抑制する機構が細胞内に存在することを示唆するものと考えられた。モデル生物の検討で RNA 依存性 RNA ポリメラーゼは siRNA の合成に重要な役割を担うことが知られていたことより、われわれは hTERT により合成されたセンス+アンチセンス型 RMRP は Dicer による切断を受けて RNA サイレncing に関与している可能性があると考え、RMRP に特異的な短い RNA の有無を Northern blotting により検討した。種々のプローブを用いた検討の結果、hTERT を発現する細胞株において、RMRP の 21 塩基から 40 塩基の部位に設定したプローブによりセンス鎖・アンチセンス鎖がともに検出される 22 塩基の RNA の存在が確認された。これらの RNA は 5' -monophosphate および 2' , 3' -hydroxyl group の構造を有し、Dicer 依存性に合成されることから、Dicer による能動的切断産物であると考えられた(図 5C)。さらに AGO タンパクの免疫沈降により、この短い RNA が hAGO2 に取り込まれていることが示唆された。以上より、hTERT が RdRp 活性によってヘアピン型の長い 2 本鎖 RNA を合成し、長い 2 本鎖 RNA から Dicer による切断を受けて形成された内在性 siRNA を介して遺伝子の転写後抑制に関与する、という新しいモデルを報告した(図 5D)。

3. 今後の展開

本研究成果は下記の点において重要な展望を示すもので、将来の RNA 干渉を応用したがんをはじめとする疾患治療に向けた研究に貢献することが期待される。

1. 幹細胞機能維持に重要な役割を果たす分子である RMRP の幹細胞生物学への技術応用
2. 従来から発がんの分子メカニズムに深く関わることが知られていた TERT の新たな機能を標的としたがん治療法の確立およびがん性幹細胞を標的とした治療法への応用

4. 自己評価

ヒトの RdRp の存在を立証するという目標は達成された。RNA により介在されるヘテロクロマチン構造維持における RdRp の役割に關しての解析は引き続いての研究が必要と考えられるが、その機能に関わる分子群の同定まで(非公開の研究成果)は到達できたためほぼ当初の計画は完了したと判断できる。

5. 研究総括の見解

RNA 依存 RNA ポリメラーゼ(RdRp)の存在を、ヒトで証明した意義は非常に大きい。この研究では、ヒト RdRp はテロメラーゼの触媒サブユニットである hTERT であることを示した。これ

まで、モデル生物(分裂酵母、線虫など)のみで知られていた、siRNA 生成機構をヒトにも適用できるようになった。本研究では、さらに、RNA が介在するヘテロクロマチン構造の維持におけるヒト RdRP の役割を明らかにするための解析が着々と進んでおり、今後のさらに大きな発展も期待できる。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Ando Y, Maida Y, Morinaga A, Burroughs AM, Kimura R, Chiba J, Suzuki H, <u>Masutomi K</u> , Hayashizaki, Y Two-step cleavage of hairpin RNA with 5' overhangs by human DICER <i>BMC Molecular Biology</i> , in press online Feb. 9, 2011
2. Maida Y, <u>Masutomi K</u> RNA-dependent RNA polymerase in RNA silencing <i>Biological Chemistry</i> , in press online Feb. 7, 2011
3. Maida Y, Yasukawa M, Furuuchi M, Lassmann T, Possemato R, Okamoto N, Kasim V, Hayashizaki Y, Hahn WC, <u>Masutomi K</u> An RNA dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA <i>Nature</i> 2009; 461: 230-235

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1 件

発 明 者: 増富 健吉 他

発明の名称: A mammalian RNA dependent RNA polymerase

出 願 人: ヒューマンサイエンス振興財団 他

出 願 日: 2008/8/12 US61/188743

2009/7/6 PCT 出願

2011/2/14 米国内移行

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

主要な学会発表

1. Masutomi K

“A mammalian RNA dependent RNA polymerase formed by hTERT and the RNA component of RNase MRP”

Joint Colloquium: “Current approaches and future perspectives on the human genome, transcriptome and proteome”

Nobel Forum, Karolinska Institute, Stockholm

Jan 19, 2010 (招待講演)

2. Masutomi K

“A Mammalian RNA Dependent RNA Polymerase Formed by hTERT and the RNA Component of RNase MRP”

2010 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology “Telomere Biology and DNA Repair”

RAVC Royal Pine Resort Ashmore, Queensland, Australia

October 9-14, 2009 (口頭発表)

3. Masutomi K

“A mammalian RNA dependent RNA polymerase (RdRP) formed by hTERT and the

RNA component of RNase MRP”

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Telomere and Telomerase”

April 28–May 2, 2009 (口頭発表)

4. Masutomi K, Hahn WC.

“Telomerases: Chemistry, Biology and Clinical Applications”

Chapter 8: Off-telomerase function of telomerase

John Wiley & Sons, in press.

受賞

第一回国立がん研究センター医学会賞金賞受賞 平成22年12月10日

研 究 報 告 書(公開)

「RNA 品質管理機構を介した遺伝子発現制御」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研 究 者：山下 暁朗

1. 研究のねらい

ヒトの遺伝性疾患および癌における変異のうち約 1/3 は異常な早期終止コドンを生じますが、mRNA 品質管理機構により変異 mRNA が排除されます。本研究では、異常な終止コドンを有する mRNA 品質管理機構の分子メカニズムを基に、異常終止コドン認識過程を阻害し、認識複合体を濃縮することにより、変異 mRNA およびその構造を簡易に明らかにする方法の確立を目指します。この技術は、癌および遺伝性疾患の診断、治療の基盤技術となることが期待されます。

2. 研究成果

1) 異常終止コドン識別機構に関する研究成果

正常なタンパク質が発現し機能するために、生体にはゲノム情報の伝達、発現の過程で様々な品質管理機構が備わっている。そのシステムの一つが nonsense-mediated mRNA decay (NMD) である。このシステムは、本来の終止コドンよりも 5' 側上流の位置に存在する異常な早期終止コドン (premature termination codon : PTC) を有する mRNA (ナンセンス mRNA) を積極的に分解、排除する mRNA 監視機構である。PTC は、ナンセンス変異、塩基挿入や欠損によるフレームシフト変異、スプライシング部位の変異による異常スプライシングに起因して生じ、遺伝性疾患やガンでは全変異の約三分の一に PTC が認められる。生体は、NMD により異常な構造を持つタンパク質断片の蓄積を免れている。ナンセンス mRNA は、多くの場合正常な mRNA とは 1 塩基の違いしかなく、細胞がどのようにしてこれを見分けているのかについては長い間謎であった。動物細胞では、スプライシングを受けた mRNA が NMD の基質となり、終止コドンと最後のエキソン連結部位が NMD のシス配列として機能する。エキソン連結部位に結合するタンパク質複合体 Exon-junction complex (EJC) が PTC を識別する“ダウストリームマーカー”として機能する。一方で、異常終止コドンを識別する分子複合体の実態は解明されておらず、本研究からは、その生化学的な同定を目指し解析を行った。

本研究における解析により動物細胞では、初期翻訳時にリボソームが終止コドンに遭

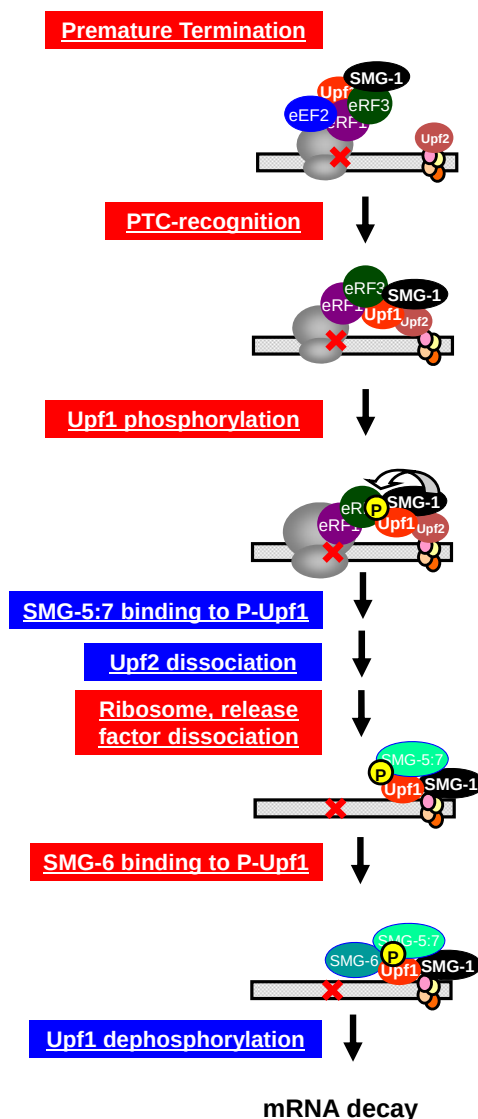


図1:NMD の分子機構

遇すると、NMD 制御因子 (SMG-1、Upf1) と翻訳終結因子 (eRF1、eRF3) からなる SURF (SMG-1:Upf1:eRF1:eRF3) 複合体がリボソーム上で形成されることを明らかにした。さらに、リボソーム:SURF 複合体よりも 3'側に“ダウンストリームマーカ―”EJC が存在した場合、リボソーム:SURF 複合体と EJC が Upf2:Upf3 を介して結合し、Decay inducing complex (DECID: リボソーム:SURF:EJC 複合体) が mRNA 上で形成され、PTC が認識されることを解明した。この結果は、異常終止コドンを見分けている分子複合体を初めて生化学的に同定したものである(図1)。分子複合体の生化学的同定は、NMD 制御因子の不活性化により、連続したタンパク質複合体のリモデリングにより担われる異常終止コドンの識別から mRNA を分解する過程を停止することによりもたらされた。同様の方法を用い、終止コドン識別後、mRNA 分解にいたる過程についても解析を行い、SMG-1 による Upf1 リン酸化依存的に SMG-5:SMG-7 複合体がリクルートされること、SMG-5 依存的にリボソームが解離すること、SMG-5:SMG-7 複合体とは異なる Upf1 リン酸化部位に SMG-6 がリクルートされることを明らかにした(図1)。

さらに、新たに高精度細胞内タンパク質複合体精製法を樹立し、新規の SMG-1 結合タンパク質の同定をおこなった。その結果、AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) ファミリーに属する2つのタンパク質 RuvB-like (RUVBL1、RUVBL2、新規分子である SMG-10、RNA polymerase 構成因子である RPB5 を同定した(図2)。これらの分子の NMD への関与について解析したところ、いずれの機能阻害も SMG-1 による Upf1 のリン酸化を抑制し、NMD を強く抑制することが明らかとなった。さらに RUVBL1 の機能阻害により、PTC の mRNA 認識を成立させる DECID 複合体の形成が抑制されることを見いだした。また、予想を超えた発見として、RUVBL1、RUVBL2 が PIKK ファミリー全体を制御していることを見いだした(図2)。SMG-1 を含む PIKK ファミリー分子群は、ゲノム安定性や正確な遺伝子発現を保障する役割を担っており、PIKK の適切な制御は生物学的、また医学的見地から極めて重要である。この成果は、NMD にとどまらず、PIKK の関わるさまざまな細胞ストレス応答制御の理解の基盤となるとともに、ガンや遺伝性疾患の治療へ向けた医学応用研究への発展も期待される。

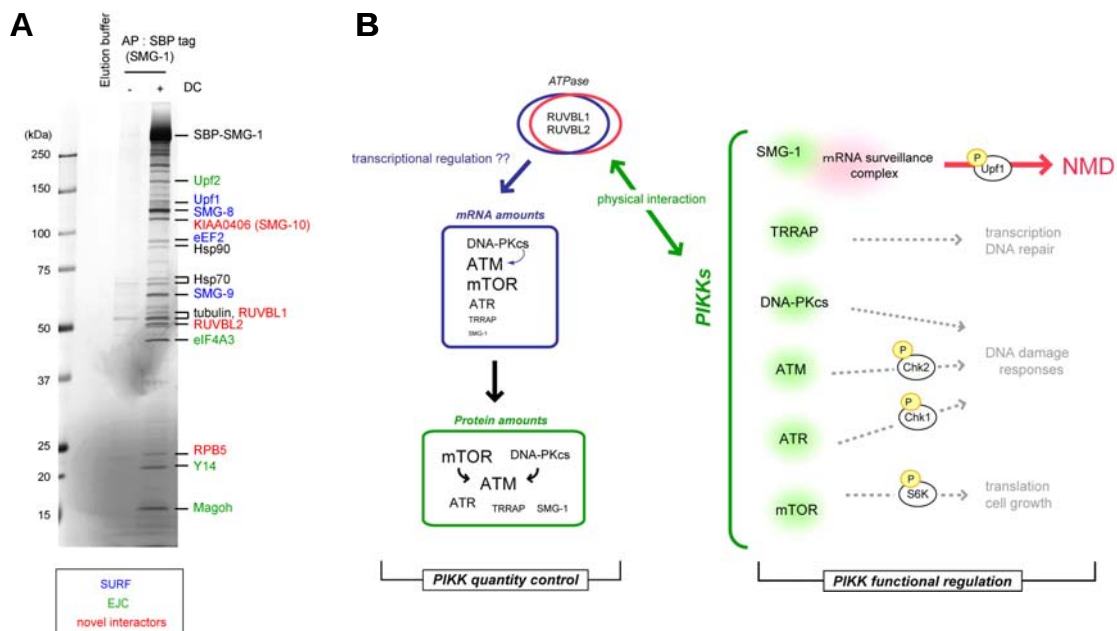


図2:SMG-1 新規結合タンパク質 RUVBL1/2 は PIKK を統御する。

A:新たに樹立した方法による SMG-1 結合タンパク質の精製

B:RUVBL1/2 による PIKK 制御機構(模式図)

2) SMG-1 の活性制御機構に関する研究成果

NMDにおいてSMG-1によるUpf1のリン酸化はナンセンス mRNAの分解を決定づける律速反応である。しかしどのようにしてSMG-1の活性が制御されているのかは明らかになっていなかった。SMG-1制御機構を明らかにするために、細胞内在性のSMG-1を免疫沈降法により精製し、SMG-8、SMG-9を同定した。SMG-1、SMG-8、SMG-9はタンパク質リン酸化酵素複合体(SMG1C: SMG-1 complex)を形成しており、触媒活性を有するSMG-1とその活性を制御するSMG-8、SMG-9により構成されることを明らかにした。SMG-8は、通常SMG-9とともにSMG-1と安定な複合体を形成しSMG-1の酵素活性を抑制しており、NMDにおいてはSMG-1:SMG-8:SMG-9複合体を、SMG-1活性化の場であるEJCヘリクルートすることでSMG-1の活性化に寄与するSMG-1の活性制御因子であることを解明した。SMG-9はN末端側に天然変性タンパク質領域を、C末端側にNTPase様領域を有するタンパク質で、細胞内でホモ二量体としても存在しており、SMG1C形成に必須の役割を果たすことを明らかにした。

さらに、動物細胞からタンパク質複合体を大量調整する方法を独自に樹立し、クライオ電子顕微鏡法による構造解析を共同研究により行った。具体的には、SMG-1:SMG-8:SMG-9複合体、SMG-1:SMG-9複合体、SMG-1単体を行ったが、SMG-1:SMG-9複合体、SMG-1単体については、細胞内在性のSMG-8、SMG-9の混入が問題となった。そのため、1)内在性タンパク質のsiRNAによる発現抑制、2)特異抗体を用いた精製後のSMG-8、SMG-9の除去という新たな方法を考案し、高精度の複合体取得を行い、クライオ電子顕微鏡法単独使用においては高解像度の立体構造取得に成功した(図3)。3つの分子複合体の比較と生化学的解析によりSMG-8が、SMG-1:SMG-9複合体の構造を大きく変えることにより、SMG-1の酵素活性を抑制していることを解明した。

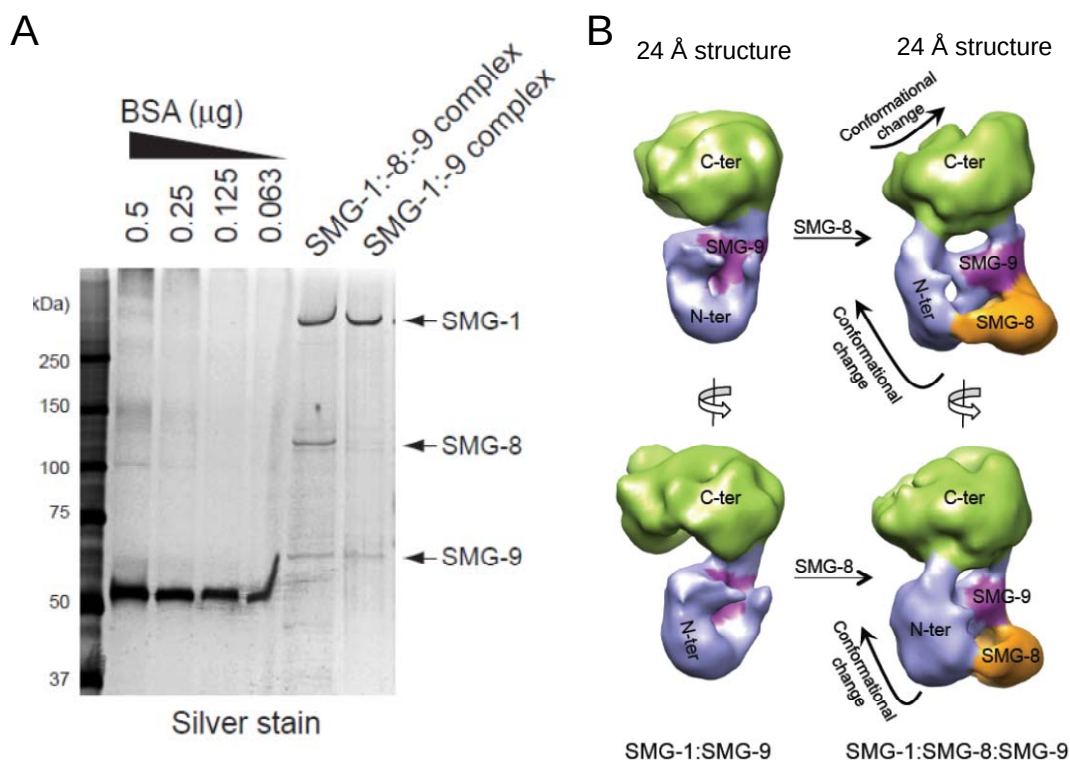


図3: SMG-1 複合体の精製とその構造。

A: SMG-1:SMG-8:SMG-9 複合体、SMG-1:SMG-9 複体の精製

B: SMG-1:SMG-8:SMG-9 複合体、SMG-1:SMG-9 複体の立体構造

3) RNA 品質管理機構による遺伝子発現制御に関する研究成果

本研究において解明した、mRNA 品質管理機構の分子メカニズムにより、PTC 認識複合体および、PTC 認識後の複合体が明らかとなった。この、PTC 認識複合体を NMD を阻害することで蓄積させ、そこに含まれる mRNA を次世代シーケンサー (Illumina GAIIx) により解析するという PTC-mRNA Trap 法を考案した。研究の結果、複数の遺伝子について PTC を生じる変異が同定されている大腸がん由来 HCT116 細胞を用いて、異常終止コドン認識複合体を SMG-1 ノックダウンにより蓄積させ、そこに含まれる mRNA を解析することで NMD により直接制御される mRNA を同定可能なことを見いだした。解析の結果、NMD 制御因子群の多くが NMD により発現調節を受けるフィードバック制御がなされていることが明らかとなった。

一方で、異常終止コドン認識複合体には、微量の mRNA しか含まれておらず、定法では定量的な解析が難しいことも明らかとなった。このため、シーケンスライブラリー作成法の改善を行い、0.5ng 以下の RNA から library を作成することに成功した。



図4: PTC-mRNA Trap 法。

3. 今後の展開

本研究では、目標に向けて研究を進めるに当たり、既存の方法を改良し、今後の研究にも使用可能な、様々な、新たな実験プロトコルを樹立した。これらを用いて(1)PTC 認識複合体の全体構造解析、(2)PTC 認識機構の解明に基づいた NMD 制御剤の開発、(3)NMD 制御剤を用いた遺伝性疾患治療、(4)PTC-Trap 法を発展させ、変異 mRNA 同定法を確立、(5)NMD が直接制御する mRNA 産物の解析による、がん細胞・幹細胞における NMD の生理機能の解明といった新しいテーマに向けて挑戦していきたい。

4. 自己評価

異常終止コドンを識別する分子複合体を生化学的に同定するという目的と、NMD の分子機構解析に対しては、本研究により大きな進展を達成できたと考えている。また、RNA 監視機構による遺伝子発現制御を介した生理的意義を解明するという目的に対しても、次世代シーケンサーを用いて異常終止コドン認識複合体に含まれる mRNA を網羅的に解析する方法を樹立できた。さらに、生理的意義に関してもモデル動物を用いた解析により一定の成果を上げることができ、当初目標にかなり近づくことができたと考えている。一方で、RNA 監視機構の“制御遺伝子群”と“生理機能”を融合させるという目標については研究期間内には一部しか達成できていない。現在精力的に解析を行っているが、今後も解析を続け、RNA 監視機構による遺伝子発現制御の全体像を明らかにしていきたいと考えている。

5. 研究総括の見解

変異 mRNA の中の多くのものは、異常な終止コドンが生じている。このような変異 mRNA を排除する機構、すなわち NMD システムの分子機構を担う分子複合体を同定することに成功した。NMD 研究にとって大きな貢献である。さらに、NMD 研究が、広く細胞機能の制御につながる重要な研究であることも示した。NMD 複合体に含まれる mRNA の種類を解析する方法の構築にも成功し、現在、NMD の生理的意義の解析を行っているが、がんや遺伝性疾患の治療に応用できる可能性があり、今後の成果に大きな期待が寄せられる。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Arias-Palomo E, <u>Yamashita A (co-first author)</u> , Fernández IS, Núñez-Ramírez R, Bamba Y, Izumi N, Ohno S, Llorca S: Nonsense-Mediated mRNA Decay SMG-1 kinase is regulated by large-scale conformational changes controlled by SMG-8. <i>Genes and Development</i> . 25(2):153-164. 2011.
2. Usuki F, <u>Yamashita A</u> , Fujimura M: Post-transcriptional Defects of Antioxidant Selenoenzymes Cause Oxidative Stress under Methylmercury Exposure. <i>J. Biol. Chem.</i> 2011 286: 6641-6649.
3. Fernández1 SI, <u>Yamashita A (co-first author)</u> , Arias-Palomo E, Bamba Y, Bartolomé RA, Canales MA, Teixidó J, Ohno S, Llorca O: Characterization of SMG-9, an essential component of the nonsense-mediated mRNA decay SMG1C complex. <i>Nucleic Acids Research</i> . 39(1):347-358. 2011. (Epub 2010 Sep 3)
4. Izumi N, <u>Yamashita A (corresponding author)</u> , Iwamatsu A, Kurata R, Nakamura H, Saari B, Hirano H, Anderson P, Ohno S: AAA+ family ATPases, RUVBL1 and RUVBL2, coordinate PIKK family and play critical roles in Nonsense-mediated mRNA decay. <i>Science Signaling (Science姉妹誌)</i> . 3: ra27. 2010.
5. <u>Yamashita A (corresponding author)</u> , Ohno S. Analysis of Nonsense-mediated mRNA decay by the monitoring of mRNA half lives in mammalian cells. <i>CSH protocol</i> . (2):pdb.prot5386. 2010.
6. Yamashita A (corresponding author), Izumi N, Kashima I, Ohnishi T, Saari B, Katsuhata Y, Muramatsu R, Morita T, Iwamatsu A, Kurata R, Hachiya T, Hirano H, Anderson P, Ohno S. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. <i>Genes and Development</i> . 23(9): 1091-1105. 2009.

(2)特許出願

なし

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

著作物

1. 山下暁朗, 臼杵扶佐子. mRNA surveillance の分子機構と生命現象、疾患との関わり. 実験医学. 2010, 28(10): 1606-1613、羊土社
2. 臼杵扶佐子, 山下暁朗. NMD と疾患. 細胞工学. 2010, 29(2):155-160、秀潤社
3. 山下暁朗, 臼杵扶佐子. mRNA 品質管理システムと疾患. タンパク質核酸酵素. 2009, 54(16):2219-2225、共立出版

受賞

平成 23 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞受賞 平成 23 年 4 月 20 日
平成 22 年度横浜市立大学医学会賞受賞 平成 23 年 4 月 16 日

招待講演

1. 山下暁朗: mRNA サーベイランス機構による変異 mRNA 排除と疾患, 日本環境変異原学会第 39 回大会, 筑波, 2010. 11.

シンポジウム

1. 山下 暁朗、Ernesto Arias-Palomo、Israel S. Fernández、番場由美、星野耕二、上村博司、Oscar Llorca、大野茂男: mRNA 品質管理機構制御因子 SMG-1 の構造と生理機能, BMB2010-第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010. 12.
2. Yamashita A, Izumi N, Okada-Katsuhata Y, Kutsuzawa K, Muramatsu R, Saari B, Iwamatsu A, Hirano H, Hirahara F, Anderson A, Ohno S: THE REMODELING OF MRNA SURVEILLANCE COMPLEX DURING NONSENSE-MEDIATED MRNA DECAY. 2009 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic mRNA Processing, New York, 2009. 8.
3. Yamashita A, Izumi N, Kashima I, Katsuhata Y, Muramatsu R, Ohno S: TRANSLATION TERMINATION COMPLEX DURING NONSENSE- MEDIATED MRNA DECAY. 2008 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Translational Control, New York, 2008. 9.
4. 山下暁朗, 泉奈津子, 鹿島勲, 森田智子, 村松玲子: 翻訳依存的な mRNA 監視複合体形成および再構成が Upf1 リン酸化を誘導する, BMB2007-第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007. 12.

研 究 報 告 書(公開)

「植物における RNA サイレンシング経路への導入機構の解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：吉川 学

1. 研究のねらい

植物は、ウイルスなどの外来因子やトランスポゾン、高発現している遺伝子などの RNA を“異常”と認識し、それらの発現を抑制するための機構として、RNA サイレンシングを持つ。この機構によって抑制される RNA は mRNA と同様に、CAP 構造やポリ A 鎖を持つものや両方を持たないものに加え、それぞれの塩基配列も様々である。すなわち植物は、mRNA などの生命活動に必要な RNA と、RNA サイレンシングによって排除すべき“異常”RNA を区別していると考えられる。本研究では、植物の転写後調節に機能する RNA サイレンシング及び転写調節に機能する RNA サイレンシングそれぞれの small interfering RNA (siRNA) 生成過程を解析することによって異常な RNA の認識機構を解明し、人為的な遺伝子発現制御や弱毒ウイルスのデザインに向けての基盤の構築を目指す。

2. 研究成果

転写後調節に関わる siRNA の生成

trans-acting siRNA (tasiRNA) の生成に関わる Arogonaute1 (AGO1) や Suppressor of gene silencing3 (SGS3)、RNA-dependent RNA polymerase6 (RDR6)、Dicer-like4 (DCL4) などが RNA サイレンシングを介した転写後調節や植物ウイルスの抵抗性に非常に重要であることが示されている。このことから、tasiRNA の生成機構の解明は、本研究の目的とする植物の異常な RNA の認識機構の解明につながると考え研究を進めた。さきがけ研究以前に得た研究結果から、tasiRNA は、タンパク質をコードしない CAP 構造と polyA 鎖を持つ前駆体 RNA (TAS) が、miR173 など特定の miRNA によって切断されることが引き金となって生じることがわかっている。特に、 *rdr6* 変異体では、miR173 によって切断された TAS RNA の 5'側断片と 3'側断片が蓄積していることから、この状態を CAP 構造と polyA 鎖を持つ mRNA と同様の RNA が、miR173 によって切断され、異常な RNA になったため、RNA サイレンシング経路に導入されると考えた。さらにこの蓄積状態が、 *sgs3* 、 *rdr6* 二重変異体では見られず、 *sgs3* 変異体と同様のパターンを示すことから、SGS3 が異常 RNA の安定化に機能し、RNA サイレンシング経路へ引き込むという仮説を立て、研究を行った。

まず、TAS RNA の 5'側断片と 3'側断片の状態を解析するために、tasiRNA 生成に働く遺伝子の変異体から細胞粗抽出液を調製し、密度勾配超遠心を行い、分画した画分から RNA を抽出し、TAS RNA に対するノーザン解析を行った。その結果、TAS 及び 5'断片、3'断片が、高分子量のリボヌクレオ複合体(RNP)を形成し、この複合体が tasiRNA 生成中間体をヌクレアーゼによる分解を受けにくい状態に保っていることがわかった。次に、 *rdr6* で安定化されている TAS RNA の安定化に SGS3 が関わっているという仮説をたて、SGS3 に FLAG タグを付加した形質転換体を作製、植物粗抽出液を調製し、密度勾配超遠心した後分画したサンプルを用いて SGS3 のアフィニティー精製を行い、共精製される RNA の解析を行った。その結果、SGS3 に TAS RNA が結合していることが明らかになった。

DNA メチル化を誘導する RNA サイレンシング経路に関する解析

RDR6 が転写後調節に働くのに対して、RDR2 は植物特異的な RNA ポリメラーゼである PolIV などと共にトランスポゾンや繰り返し配列などから 24 塩基長の siRNA 生成し、ゲノムの該当領域にメチル化を誘導する機能を持つ。そこで DNA メチル化と RDR2 による RNA サイレンシング経路の共通性を調べるマーカー遺伝子を見つけるために、この経路に関わる変異体を使った他の研究グループによって行われたアレイ解析を参考にして、それらの変異体につ

いて、いくつかのトランスポゾンの発現解析を行った。その結果、シロイヌナズナのデータベース上でDNA型トランスポゾンとアノテーションされたゲノム領域がいずれの変異体でも上昇していることが、わかった。

3. 今後の展開

これまでの植物に関するRNA研究は、遺伝学的アプローチまたは、精製した組換えタンパク質を使った *in vitro* の生化学解析が主流で、植物以外では広く行われている細胞粗抽出液を使った解析はあまり行われていない。これは、植物細胞中のヌクレアーゼやプロテアーゼを含む液胞により、細胞粗抽出液の利用が困難であることが主な理由である。そのため、遺伝学的にRNAプロセシング変異体が単離されてもそれらの利用があまり進んでいない。しかし、本研究で密度勾配超遠心によるRNP解析方法を確立できたので、今後は、RNAサイレンシング以外のRNAプロセシング変異体解析にも利用して、多様な機能を持つ植物RNAの研究に広がっていきたい。

4. 自己評価

本研究においても、研究開始当初は、解析対象とするタンパク質やRNAの扱いが難しく、研究の進捗状況は良くなかった。しかし、領域会議などで有用な多くのアドバイスを得たこともあって進展し、ここまで研究を発展させることができたものと思う。さきがけ申請時に目標としていた植物の異常RNAの認識機構の解明まで至らなかったのは残念であるが、本研究で解析対象を絞り込むことができたので、今後さらに解析を進め、植物の異常RNA認識機構の解明につなげたいと思う。

一方、研究範囲を広げるためにDNAメチル化に機能するRNAサイレンシング経路に関する研究を計画したが、さきがけ研究に採択されて以降、海外のグループによって、その研究領域が大幅に進められてしまい、ほとんど手をつけることができなかった。しかし、本研究で見出したDNA型トランスポゾンのマーカー遺伝子は、非常に興味深いパターンを示すことから、今後も解析を進めていきたい。

5. 研究総括の見解

植物の、転写後調節に機能するRNAサイレンシング及び転写調節に機能するRNAサイレンシングそれぞれの経路のsiRNA生成過程を解析することによって、異常なRNAの認識機構を解明することを目指した研究である。異常なRNAの認識機構解明には至らなかったが、異常なRNAの蓄積・安定化に働くと考えられる分子を絞り込むことができた。これは、植物以外では広く行われている細胞粗抽出液を使った解析に取り組んだ成果であり、今後の研究進展の基盤を築いた成果である。DNAメチル化に機能するRNAサイレンシング経路に関する研究も今後の進展に期待したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1.	Numa H, Kim JM, Matsui A, Kurihara Y, Morosawa T, Ishida J, Mochizuki Y, Kimura H, Shinozaki K, Toyoda T, Seki M, <u>Yoshikawa M</u> , Habu Y Transduction of RNA-directed DNA methylation signals to repressive histone marks in <i>Arabidopsis thaliana</i> . EMBO J 29:352-62 (2010)
2.	Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, Jaudal MC, Matsumoto-Yokoyama E, Mitsuhashi I, Meshi T, Ishikawa M <i>In Vitro</i> Assembly of Plant RNA-induced Silencing Complexes Facilitated by Molecular Chaperone HSP90. Molecular Cell 39:282-91 (2010)

(2)特許出願
なし

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

① 国内招待講演

1.吉川学

trans-acting siRNA 前駆体 TAS のプロセッシング

日本植物学会第 74 回大会 (2010.9.10、名古屋)

② 学会発表

1.井木太一郎, 吉川学, 石川雅之

植物 RISC 形成における HSP90 の役割

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010.2、神戸)

2.Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, Mitsuhara I, Meshi T, Ishikawa M

In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complex

EMBO Workshop 2010: Genomic approaches to interactions between plant viruses, their hosts and their vectors

3.井木太一郎,吉川学,ジャウダル モーレン,横山英子,錦織雅樹,光原一朗,飯哲夫,石川雅之

植物における RNA-induced silencing complex の無細胞形成系の確立

第 51 回日本植物生理学会年会 (2010.3.19、熊本)

4.土生芳樹, 沼寿隆, 金鍾明, 栗原志夫, 松井章裕, 篠崎一雄, 関原明, 吉川学

シロイヌナズナのサイレンシング因子 Morpheus'Molecule 1(MOM1)による内在性領域不活性化機構の解析

日本遺伝学会第 81 回大会 (2009.9.16、松本)

研 究 報 告 書(公開)

「細胞質の機能 RNA・RNP の品質管理機構」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：吉久 徹

1. 研究のねらい

細胞内には、rRNA、tRNA や miRNA など、多様な機能をもった non-coding RNA が存在する。また、多くの機能性 RNA はタンパク質との複合体(RNP)として機能単位を形成する。こうした RNA の誕生から死までは、厳密に制御されなくてはならない。我々は近年、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、古典的 non-coding RNA の一つ tRNA のスプライシングが核内ではなく細胞質で起こること、そして、それまで細胞質に留まって働くとされてきた tRNA が核と細胞質間を往復しつつ機能していることを明らかにし、tRNA の一生におけるそれまでの細胞内動態像を大きく書き換えた。一方、tRNA は生合成時に加え、こうした細胞内動態の各局面で適切に品質管理を受けることが示唆されている。本課題では、tRNA を中心に細胞質の non-coding RNA の一生の様々な段階における細胞内動態のメカニズムと、品質管理の仕組みを明らかにすることをねらう。

本研究では、翻訳関連のタンパク質因子と相互作用しつつ、単独の分子としても存在する tRNA、細胞質スプライシングで切り出された後に速やかに分解される tRNA 等のイントロンといった安定性、存在状態の異なる種類の RNA を取り上げた。そして、それらが一生の間にどのような細胞内動態を示し、これに伴って細胞の各所でどのように品質管理・分解を受けるかを明らかにすることを主眼に、tRNA の核内輸送システムおよび不安定な tRNA や不要な tRNA のイントロンを処理するシステムの解明を目指した。同時に、こうした細胞内動態解析に必要なとされるあらたな低分子 RNA の検出・可視化技術に関しても取り組んだ。

2. 研究成果

§ 1 tRNA 核内輸送システムの解析

tRNA の核-細胞質間ダイナミクスに関わる因子を同定し、その tRNA の品質管理への関与を明らかにする目的で、酵母サイトゾルに存在する新規 tRNA 結合タンパク質を同定し、さらにその中から tRNA 核内輸送関連因子を抽出する作業の中で、サイトゾルの主要な Hsp70 の一つである Ssa2p を同定した。Hsp70 は、アンフォールドしたタンパク質に結合、ATP 依存にこれを解離することによって、そのようなタンパク質の凝集を防ぎ、フォルディングやオルガネラ膜の膜透過を助ける分子シャペロンである。

出芽酵母には Ssa サブファミリーに属する Hsp70 として Ssa1p～Ssa4p の 4 種類が存在し、このうち恒常的に発現している Ssa1p と Ssa2p はアミノ酸配列の相同性も高く、機能的には大きな差が無いと予想されていた。そこで、これら SSA 遺伝子欠失変異の tRNA の細胞内局在に対する影響を Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法で解析した。核内輸送への影響は、アミノ酸等の栄養源飢餓下で見られる tRNA の核内輸送亢進が低減するという表現形で解析できる。FISH 解析により、アミノ酸飢餓条件下で見られる tRNA の核内輸送の亢進が、野生型に比べ、*ssa1Δ* 株と *ssa2Δ* 株、特に後者では顕著に低下することを見出し、酵母では、主に Ssa2p がこの条件下 tRNA の核内輸送に関わることが示された。

米国の Anita Hopper らのグループは、この経路に関わる因子として importin β ファミリーに属する Mtr10p を同定していた。我々の明らかにした Ssa2p が Mtr10p と同じ経路で機能するのか、並行した経路で機能するのかを検討するため、染色体上の *MTR10* 遺伝子のプロモーターを抑制可能な *GAL7* プロモーターに置き換えた knockdown (KD) 株を構築し、*SSA2* 単独欠失株、*mtr10-KD* 株、*ssa2Δ mtr10-KD* 二重変異株の栄養飢餓条件下での tRNA の挙動を解析した。その結果、二重変異株では明らかに他の単独変異株より強い tRNA の蓄積障害を示し、Ssa2p が Mtr10p と並行した経路の因子であることが示唆された。

前述のようにtRNAの核内輸送を担う因子として、Mtr10pに加えて、新たに、Ssa2pが同定されたが、これらの因子が直接tRNAを結合してtRNAの輸送担体として機能しているかに関しては、直接の証拠は得られていなかった。そこで、我々はSsa1pおよびSsa2pの組換えタンパク質がtRNAの結合能を有するかをラベル転位アッセイで検討し、Ssa2pそしてSsa1pがtRNAと直接結合することを明らかにした。この結合はATPに感受性である一方、Hsp70の本来の基質である変性タンパク質とは競合しなかった。Ssa2pをはじめとするHsp70ファミリーのタンパク質は、一次構造上、N末端から、ヌクレオチド結合領域(NBD)、基質結合領域(SBD)、C末端可変領域(CVD)からなるが、上記の結果は、tRNAがSBDではなくNBDで認識される可能性を示唆している。

実際に、ドメイン毎にGST融合タンパク質として単離し、ラベル転位アッセイを行ったところ、Ssa1pおよびSsa2pのNBDのみでtRNAと直接結合することが明らかとなった。Ssaタンパク質のATPase活性はYdj1pやSis1pといったDnaJ/Hsp40タイプのコシャペロンで活性化されることが知られているが、この活性化を受けにくくなるLys⁶⁹Gln変異あるいはGly¹⁹⁹Asp変異をもつSsa2p-NBDのうち、後者のみでtRNAの結合能が下がることがわかった。以上のことから、Ssa2pによるtRNAの認識は、Ssa2pのNBD、とくに、ATP認識溝が関わることを示された。

このように、コシャペロンの影響を左右するSsaタンパク質上のアミノ酸残基がtRNAの結合にも関わっていたことから、サイトゾルのDnaJ/Hsp40タイプのコシャペロンが*in vivo*でtRNAの核内輸送に関わるかを検討した。前述のYdj1pの欠失変異、および、Sis1pの温度感受性変異を栄養飢餓条件に曝した際のtRNAの細胞内局在をFISH法で解析したところ、tRNAの核内蓄積がほとんど見られなかった。これらのことから、tRNAの核内への輸送には、SsaタイプのHsp70に加え、そのHsp40型コシャペロンであるYdj1p、Sis1pも関わることを明らかとなった。

§2 tRNAの細胞内動態と品質管理との関係

異常もしくは不良tRNAの品質管理には、核内の複数のRNA分解システムが関わることを報告されている。特に、成熟化途上のtRNAについては核内の3'-5' exonuclease複合体であるexosomeが、既に成熟化の終了したtRNAに関してはRat1pやRex1pといったやはり核内にあるexonucleaseの関与が知られている。そこで、異常tRNAとtRNAの輸送システムとの間の関係について遺伝学的な解析を行った。

まず我々は、tRNA-Met_{initiator}のA⁵⁸位のメチル化不全によりこのtRNAが不安定化するCCGの高次構造形成異常を引き起こす塩基置換変異los1Δ)と合成生育阻害を示すことを見出した。実際、*trm6-504 LOS1-KD*株を構築してLos1pの発現を抑えるとtRNA-Met_{initiator}の量がlos1Δ二重変異を抑圧せず、生合成初期の品質管理をエスケープできたA⁵⁸未修飾tRNA-Met_{initiator}は、核内に再度入っても先の品質管理システムに認識されない可能性が示唆された。

§3 tRNAイントロンの分解システムの解析

出芽酵母においては、イントロンを含む前駆体tRNAは細胞質に運ばれてからスプライシングを受ける。スプライシング部位はミトコンドリア外膜のサイトゾル表面に存在するtRNA splicing endonuclease複合体によって切断され、エクソン同士がtRNA ligaseによって結合さ

れると安定な成熟体 tRNA 分子へと導かれるが、切り出されたイントロンは速やかに分解される。そこで、この効率的なイントロン分解を担う因子の同定を目指した。

現在、酵母のゲノム上には RNA 分解に関わると考えられるタンパク質をコードする遺伝子として 65 の遺伝子がデータベース上に登録されている。我々は、これらの遺伝子の欠失株または KD 株中で tRNA のイントロンが蓄積するかを網羅的にノザンプロットングで解析したが、tRNA のイントロンが蓄積する株は見出せなかった。しかし、次に述べるように、tRNA のイントロン自身ではないが、同様に細胞質スプライシングを受ける mRNA より切り出されるイントロンの挙動に関して偶然得られた情報から、tRNA のイントロンの分解に関わる RNA 分解系を推定するきっかけを得ることができた。

小胞体ストレス応答の鍵転写因子である Hac1p は、イントロンを含んだ前駆体 mRNA (*HAC1^p* mRNA) の状態で細胞質に運ばれ、小胞体ストレスがあるときのみスプライシングと共役してタンパク質が合成される。通常、*HAC1^p* mRNA はポリソーム上で休眠状態にあり、この翻訳停止には *HAC1^p* mRNA の 5' UTR とイントロンとの間の相補対形成が関わることで、翻訳再開にはスプライシングが必要であり、そのスプライシングは tRNA ligase が関わるということがわかってきた。しかし、その翻訳再開機構の詳細や、切り出されたイントロンの速やかな分解機構は明らかでなかった。

本研究は、出芽酵母の tRNA ligase 遺伝子 (*RLG1*) を他の生物種の *RLG1* で代替する実験を行う中で、シロイヌナズナ由来の *RLG1* (*AtRLG1*) で代替すると、小胞体ストレス下における *HAC1^p* mRNA のスプライシングは正常に起こるが、その翻訳再開ができなくなることを見出した。詳細な解析の結果、この株では *HAC1* のイントロンが蓄積していること、*HAC1* イントロンはポリソームから遊離せず、切断後も *HAC1* 成熟体 mRNA の翻訳抑制状態を保つことが示された。おもしろいことに、*AtRLG1* 発現株では、蓄積したイントロンは環化しており、これが分解を妨げている原因の一つであった。これらのことから、tRNA ligase は *HAC1* イントロンの分解機構への引き渡しに関わることが示唆され、このイントロンの分解は主として exonuclease が担うことが明らかとなった。

この結果は、tRNA のイントロンが同様に Rlg1p 依存に分解系に引き渡され、exonucleolytic に分解されることを示唆している。事実、我々は、*AtRLG1* 株では tRNA のイントロンが蓄積しており、少なくとも、最も長い tRNA イントロンである tRNA-Ile_{UAU} のイントロンはこの株中で環化していることを見出した。また、出芽酵母自身の *RLG1* 遺伝子の温度感受性変異を多数取得したところ、allele によって tRNA イントロンの蓄積するものが見られ、tRNA ligase の特定の領域がイントロン分解に関与することが示唆された。

さらに、細胞質のメジャーな exonuclease に着目して解析を進めたところ、各々単独の欠失では tRNA のイントロンの蓄積を示さなかったサイトゾルの 3'-5' exonuclease 複合体 exosome の機能欠損変異 *ski2* と 5'-3' exonuclease の変異 *xrn1* の二重変異 (*ski2Δ xrn1-KD*) では、tRNA イントロンの蓄積が見られることがわかった。

以上のことから、現在、スプライシングで切り出された tRNA のイントロンは、5'-3'、3'-5' 両方の exonuclease によって分解されるものの、そうした分解系への橋渡しにはスプライシング酵素である Rlg1p が関与するといったモデルを考えている。ただし、tRNA イントロンの分解に関しては、*ski2Δ xrn1-KD* 二重変異の効果は必ずしも大きくなく、他の exonuclease が関与する可能性が十分あり、さらに検討を続けている。

§ 4 Malachite Green aptamer の RNA 検出・可視化タグとしての検討

tRNA の前駆体やイントロンのような低分子 RNA の検出法としては、一般に相補的なオリゴヌクレオチドを利用したハイブリダイゼーション法が用いられるが、タンパク質における GFP のように、より簡便、かつ、できれば生細胞中でも使うことのできる検出法が望まれている。部位特異的な分子不活性化手段として開発された Malachite Green (MG)/malachite green aptamer 複合体は、その元となる MG および MG aptamer が非蛍光であるにも関わらず、蛍光を発することが知られていた。そこで、このシステムが生体内で発現する RNA に適応可能か検討した。

まず、酵母tRNA-Ile_{UAU}のイントロンが長いことを利用し、その一部をMG aptamerと入れ替えた変異tRNA遺伝子を構築した。*in vitro*で転写した変異tRNA-Ile_{UAU}前駆体は、urea-PAGE・MG染色後に蛍光スキャナーを用いて特異的に検出できることがわかった。この遺伝子を酵母に導入し、生細胞をMG存在下で培養、tRNA前駆体の可視化が可能かを検討したが、残念ながら他のDNAやRNAなどの核酸への弱いintercalation活性によって生じるとされるバックグラウンドのため、特異的可視化には至らなかった。

他方、先のゲル電気泳動と蛍光スキャナーによる検出法を用いると、全 RNA 画分を泳動しても当該の変異 tRNA 前駆体の特異的に検出されること、また、イントロンの切り出しに異常を来す *sen2* 変異株やイントロンの蓄積が見られる *AtRLG1* 発現株より調整した RNA 画分では、MG aptamer を融合した tRNA の前駆体やイントロンが予想通り蓄積しており、本 aptamer が生体内での RNA の成熟化過程を容易に解析するためのタグとしては利用可能であることがわかった。

3. 今後の展開

本研究で、tRNA の細胞内動態に関して新たな因子(Ssa2p)を発見し、また、核-細胞質間の特定のtRNA輸送活性がtRNAの品質管理に影響を及ぼするという事を明らかにすることができたが、まだ、その詳細な分子機構に関しては不明な点が多い。特に Ssa2p と tRNA がどのような様式で結合しているかに関しては、構造生物学的な解析が必要である。他方、核-細胞質間輸送において、新規に合成された tRNA と細胞質から輸送され再び核外へ輸送される tRNA がどのように仕分けられているのか、細胞質において tRNA の異常を直接見分けている分子は何で、どのような tRNA の性質が〈正常〉と〈異常〉の識別点となっているのかなど、明らかにするべき点は残っており、今後明らかにしていきたい。

また、細胞質スプライシングで切り出されるイントロンの分解系が、endonuclease 活性をそれほど必要とせず、複数の exonuclease に依存していることを明らかにすることが出来たが、その分解が全て細胞質で行われているのか、核に逆輸送されて分解されるようなプールは無いのか、といった点での疑問には、現在進めている網羅的な多重 RNase 欠損変異の解析で答えていく必要があるだろう。

さらに、本研究で tRNA 前駆体の特異的に検出するためのタグとしての MG aptamer の有効性は明らかとなったが、生細胞中での可視化には不向きであることがわかった。今後は、有機化学の専門家と協力することで、MG の誘導体の中で通常の核酸二重鎖に intercalation することなく、それを特異的に結合する aptamer 中では蛍光を発するコンフォーメーションを取り得るような化合物の合成と、それに対応した aptamer の開発を通じて生細胞中での可視化タグの実現に向けて取り組む必要がある。

4. 自己評価

現時点で、tRNA の核内輸送に関する研究については、所期の成果は得られたものと思われる。細胞質スプライシングで生じるイントロンの分解システムについては、tRNA のイントロンの分解システムの一部を明らかにすることはできたものの、多数の因子が共同して働く可能性が示され、その全体像に迫るためには前述のようにシステマティックな多重変異解析を進めていく必要がある。新規な RNA の可視化技術の開発に関しては、結果としては可視化にはいたらなかったが、特定の RNA を簡便に検出する手法として応用可能な技術であることを実証し得た点は、一定の評価ができると思われる。本研究で実験事実としては明らかになったが、現在、論文を投稿中または執筆中のものがある。今後速やかに論文が発表されるように努めると共に、その成果をもとに、さらに細胞質の機能性 RNA の品質管理へのより深い理解につなげていくべきと考える。

5. 研究総括の見解

細胞質に留まると考えられてきた tRNA が、実は核と細胞質の間を行き来しており、こうした細胞内動態の各局面で適切に品質管理を受けることが示唆されている。本研究では、tRNA を中心に細胞質 non-coding RNA の細胞内動態メカニズムと品質管理の仕組みの解明を目指した。tRNA の核内輸送に、Ssa タイプの Hsp70 と Hsp40 型コシャペロンである Ydj1p, Sis1p が関わることを明らかにし、また、細胞質スプライシングで生じるイントロンの分解システムには多数の因子が共同して働く可能性を示した。細胞質の機能性 RNA の品質管理に対するより深い理解に繋がる成果である。今後は、これまでの結果を踏まえ、これらの過程の全体像を明らかにすることが望まれる。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Mori, T., Ogasawara, C., Inada, T., Englert, M., Beier, H., Takezawa, M., Endo, T., and <u>Yoshihisa, T.</u> Dual Functions of Yeast tRNA Ligase in the Unfolded Protein Response: Unconventional Cytoplasmic Splicing of HAC1 Pre-mRNA Is Not Sufficient to Release Translational Attenuation. <i>Mol. Biol. Cell</i> , 21 , 3722–3734 (2010)
2. Yamamoto, H., Fukui, K., Takahashi, H., Kitamura, S., Shiota, H., Terao, K., Uchida, M., Esaki, M., Nishikawa, S., <u>Yoshihisa, T.</u> , Yamano, Y., and Endo, T. Roles of TOM70 in import of presequence-containing mitochondrial proteins. <i>J. Biol. Chem.</i> , 284 , 31635–31646 (2009)

(2) 特許出願

なし

(3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. Endo, T., Yamano, K., and <u>Yoshihisa, T.</u> Mitochondria matrix reloaded with RNA. <i>Cell</i> , 142 , 362–363 (2010)
2. <u>吉久 徹</u> : tRNA の「ダイナミクス」、蛋白質核酸酵素増刊号 vol. 54, 「mRNA プログラム-多様性と非対称性の獲得戦略」(稲田利文, 大野睦人編), pp. 2121–2126, 共立出版 (2009)
3. <u>吉久 徹</u> : RNA の取扱い方-電気泳動, pp. 47–53, RNA 実験ノート(稲田利文, 塩見春彦編), 羊土社 (2008)
4. <u>吉久 徹</u> : RNA の解析-whole mount <i>in situ</i> hybridization 3) 酵母, pp. 89–95, RNA 実験ノート(稲田利文, 塩見春彦編), 羊土社 (2008)
5. <u>Yoshihisa, T.</u> , Mori, T., Ogasawara, C., Takezawa, M., Englert, M., Beier, H., Inada, T. and Endo, T. Translational regulation of <i>HAC1</i> mRNA, of which translational stall is essential for its unconventional cytoplasmic splicing in budding yeast. The 19th CDM Meeting: RNA Sciences in Cell and Developmental Biology. 神戸 (2010 年 5 月 10 日～12 日)

研 究 報 告 書(公開)

「細胞内ウイルスセンサーによる非自己 RNA 認識様式の解明」

研究期間: 平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研 究 者: 米山 光俊

1. 研究のねらい

ヒトを含めた高等脊椎動物の生体機能維持における RNA 分子の役割を理解する上で、ウイルス由来非自己 RNA と宿主免疫系との関係を明らかにすることは、非常に重要なテーマであると考えられる。それは、RNA 機能の多様性を明らかにするだけでなく、今なお大きな社会問題になっているウイルス感染症対策を考える上でも必要不可欠である。本研究者はこれまで、細胞がいかにしてウイルス感染を検知し、それに対する生体防御機構を働かせているのかについて解析を続けてきた。2004 年には、ウイルス感染すなわち非自己 RNA の侵入を細胞質内で検知するセンサー分子として、retinoic acid inducible gene I (RIG-I)-like receptor (RLR)を世界に先駆けて同定し、それらの抗ウイルス生体防御における必須な役割を明らかにした。本研究では、ヒトゲノムに存在する三種の RLR が、どのように自己と非自己の RNA を識別して生体防御系を発動しているのか、そこにはどのような分子機構が働いているのか、さらにどのような生理機能を担っているのかについての基礎研究を通じて、RNA と RLR との相互作用に基づいた新たな抗ウイルス薬剤の開発を目指した検討を行うことを目的とする。

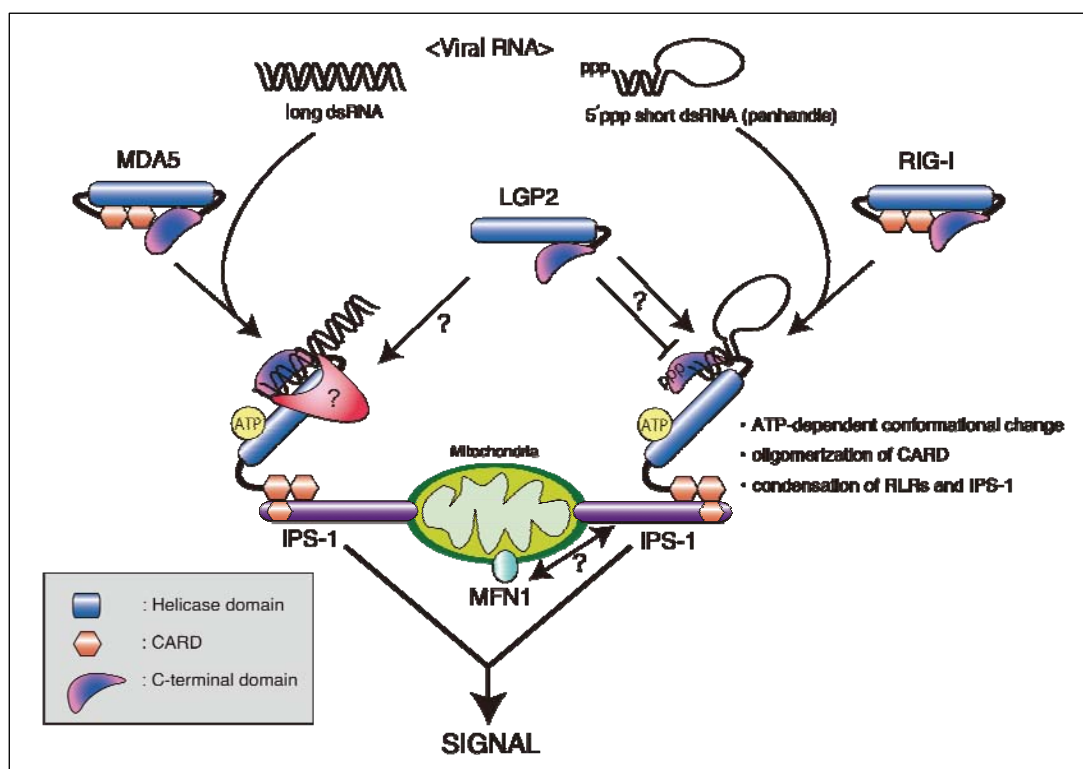
2. 研究成果

(1) RLRによる外来性RNA認識の分子機構および認識ドメインの同定とその構造解析

これまでに、ヒトゲノムには三種の RLR が存在し、それぞれが異なったウイルス RNA を認識して機能していることを報告してきた(*Nat. Immunol.*, 2004; *J. Immunol.*, 2005; *Immunity*, 2005; *Nature*, 2006)。そのうち、RIG-I と MDA5 (melanoma differentiation associated gene 5) はいずれも N 末端に caspase recruitment domain (CARD)を持ち、抗ウイルス自然免疫における正のシグナル因子として、特に抗ウイルスサイトカインである I 型インターフェロン(IFN)遺伝子の発現誘導に必須な役割を担っている。本研究の開始時点で、RIG-I と MDA5 によって認識される基質 RNA の構造として、それぞれ 5' 末端に三リン酸を持つ一本鎖 RNA (ssRNA)と長鎖二本鎖 RNA(dsRNA)が明らかにされていたが、本研究では特に RIG-I について、バキュロウイルスシステムを用いて調整したリコンビナント RIG-I タンパク質を用いた生化学的な解析を行うことにより、RIG-I による基質 RNA 認識の分子機構をさらに詳細に検討した。その結果、RIG-I は、RNA の 5' 三リン酸構造に強い親和性を持つものの、一リン酸のみを持つ短鎖 dsRNA も基質として認識し得ることを明らかにした。その後、複数のグループによって、RIG-I が最も好む基質は 5' 三リン酸短鎖 dsRNA (パンハンドル構造、図)であることが報告された。一方で、RLR はいずれも RNA ヘリカーゼドメインを持つ分子群であり、すでにヘリカーゼドメインへの ATP 結合がシグナル伝達に必須であることを明らかにしていたことから(*Nat. Immunol.*, 2004; *J. Immunol.*, 2005)、この RIG-I のヘリカーゼドメインの意義について、種々の構造の RNA 分子を基質として用いた生化学的な検討を行った。その結果、3' 側に一本鎖領域を持つような特殊な構造の dsRNA が RIG-I のヘリカーゼ活性によってほどかれる得ることが明らかになった。しかし興味深いことに、このほどかれるような dsRNA は RIG-I を活性化することができず、むしろほどかれない dsRNA が RIG-I を介してシグナルを誘導できたことから、RIG-I のヘリカーゼ活性はそのウイルスセンサーとしての機能には必要ではないことが示された。この知見は、RIG-I が基質 RNA と比較的安定な複合体を形成することで、ATP 依存的に分子内構造変化を起こすことでシグナルを伝達することを強く示唆している(図:論文1)。

これらの知見をもとに、さらに RIG-I が基質 RNA を認識するドメインを詳細に検討した。その結果、RIG-I の C 末端の約130アミノ酸からなる領域 (C-terminal domain: CTD) が RNA 認識に関与することが明らかになった。さらにその領域の三次元立体構造を解明し(北海道大学・稲垣冬彦教授らとの共同研究)、CTD が既知の dsRNA 認識ドメインとは異なった構造をとっており、その塩基性アミノ酸に富んだ溝状構造へ dsRNA が入りこむことによって、基質 RNA を認識していることを明らかにした(論文1)。

さらに、三種の RLR の CTD の構造解析を行った結果、いずれの CTD も非常に類似した構造をとっていることが示された。しかし、MDA5 の CTD は、RIG-I やもうひとつの RLR である LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) の CTD に比較して開いた構造を取っており、dsRNA との認識が困難であることが予想された。実際、生化学的な解析および培養細胞を用いた *in vitro* の解析から、MDA5 単独では生理的な基質である長鎖 dsRNA に対して非常に弱い親和性しか持たないことが示された。このことは、MDA5 によるウイルス RNA 認識には、未知の分子機構(他の分子の介在など)が関与していることを示唆している(論文2)。



(2) RLRを介したシグナルの生理機能解析

RIG-Iを介したシグナルは、外来性 RNA を認識し活性化された RIG-I の N 末端に存在する CARD が多量体形成をすることによって誘導されることが予想されていた。これを検証するために、薬剤を使って CARD を強制的に多量体形成させる実験系を構築した。この実験系を培養細胞に導入した結果、人為的な RIG-I CARD の多量体形成により、ウイルス感染非依存的に、RIG-I の下流で機能する転写因子 IRF-3 の活性化および内在性 IFN 遺伝子の発現誘導が観察され、CARD の多量体形成のみによって抗ウイルスシグナルが誘導され得ることが明らかになった。さらに DNA マイクロアレイを用いた解析から、通常のウイルス感染によって誘導される遺伝子群が、この実験系によっても同様に誘導されたことから、ウイルス感染の場合と等価のシグナルが伝達されていることが確認された。これまでに、多くのウイルスが RLR の機能を阻害するタンパク質を持つことが報告されているが、この実験系を用いることにより、それら抑制的に働くウイルスタンパク質の影響を排除した環境での RLR シグナルの生理機能を解析することが可能になった(論文投稿準備中)。

(3) ヒトRLR遺伝子多型とその機能解析

RIG-I と MDA5 の生理機能を検討することを目的として、ヒトゲノムに存在する遺伝子多型に注目した検討を行った。特にタンパク質のアミノ酸置換を起こす遺伝子多型を公開データベースから抽出し、それらの発現コンストラクトを作製し、RIG-IあるいはMDA5 遺伝子破壊マウス由来の胎児繊維芽細胞へ導入することにより、それら変異体のウイルス感染に対する応答を評価した。その結果、RIG-I では 183 番目のセリン残基がイソロイシンへ置換した変異体が、IFN 誘導シグナル能を著しく欠損していることが明らかになった。このアミノ酸は N 末の CARD 内に存在することから、CARD と下流シグナル分子との相互作用に異常があることが予想された。一方 MDA5 では、673 番目に翻訳停止コドンが入った短い変異体と、923 番目のイソロイシンがバリンに置換した変異体の2つが、同様にシグナル伝達能を失っていることが明らかになった。前者は C 末側を大きく欠損している変異体であり、RNA 結合能を失っていることが確認された。一方後者は、RIG-I の RNA 結合ドメインである CTD に相当する領域内への変異であったが、基質 RNA との結合能は野生型と同様であったことから、何らかの未知の分子機構によってシグナル伝達能が失われていることが示唆された。興味深いことに、他のグループによる統計的な解析から、これら MDA5 に見られる遺伝子多型が、I 型糖尿病発症の抵抗性に関与することが報告され、MDA5 の機能と自己免疫疾患発症との関連が強く示唆された(論文3)。

(4) ウイルス感染に応答したRLRの細胞内局在変化の解析

RIG-I によるウイルス RNA 検知が細胞内でどのように行われているのかを検討する目的で、RIG-I の CTD 近傍を認識する抗 RIG-I 抗体を新たに作製した上で、RIG-I の細胞内局在についての解析を行った。その結果、種々のウイルス感染によって、RIG-I が細胞質内で凝集体を形成して機能することが明らかになった。中でも興味深いのは、インフルエンザウイルス(IAV)感染の場合、この凝集体形成は IFN 系を強力に阻害することが知られるウイルスタンパク質 NS1(non-structural protein 1)の発現によって負に制御されており、NS1 欠失 IAV(Δ NS1)では凝集体が形成されるものの、野生型 IAV ではその形成が見られなかったことから、NS1 タンパク質によるこの凝集体形成の抑制が、IAV NS1 による抗 IFN 作用機序のひとつであることが示唆された(図:論文投稿中)。

(5) ウイルス感染によるミトコンドリアダイナミクスを介したシグナル制御機構の解析

RLR を介したシグナルは、ミトコンドリア外膜上に局在するアダプター分子 IPS-1 (IFN-promoter stimulator 1)を介して伝達されることが報告されている。その機能を明らかにするために、培養細胞に IPS-1 を強制発現させ、その細胞内局在変化を検討した。その結果、ウイルス感染に応答して、IPS-1 が核周辺の一部のミトコンドリア上に集積することが明らかになった。さらに、この IPS-1 に富むミトコンドリアは、(4)で明らかにした RIG-I の凝集体の周囲に集まっていることも観察された。逆に核から離れたミトコンドリアでは IPS-1 の発現が減弱していたことから、ウイルス感染刺激によってミトコンドリア上で何らかの IPS-1 分別の分子機構が働き、効率よくシグナル伝達を行うメカニズムが存在することが示唆された。さらに、ここに関与する分子として、同じくミトコンドリア上に発現してその融合の制御に関与することが知られている MFN1(mitofusin1)を同定し、その機能解析を行った。MFN1 の発現抑制実験では、ウイルス感染に応答した IPS-1 のミトコンドリア上での分配が抑制され、同時に IFN の誘導も顕著に低下していたことから、MFN1 がこの現象に重要な役割を担っていることが示唆された(図:論文5)。

3. 今後の展開

本研究によって、RIG-I によるウイルス由来非自己 RNA の認識機構の分子基盤については一定の成果が得られた。しかし、MDA5 がどのように長鎖 dsRNA を認識しているのか、共

同研究によって明らかになった LGP2 のウイルスセンサーとしての機能(論文4)がどのような RNA 認識機構によって発揮されているのか、基質 RNA を認識した RIG-I および MDA5 がどのように ATP 依存的に活性化状態へ移行するのかなど、未だ不明な点が多く残されている。今後はそれらを明らかにすることにより、総合的に RLR による非自己 RNA 検知機構を理解し、ウイルス感染症に対する治療あるいは予防薬開発へとつなげる知見を蓄積してゆく必要がある。一方で、研究期間後半で発見した RLR が形成する凝集体形成とそこへ集積するミトコンドリア上への IPS-1 の分配などについても、さらに詳細に解析することにより、より空間的かつ普遍的なウイルス検知の分子機構が明らかになることが期待されることから、これらの現象について分子レベルで明らかにすることを目指したい。また、新たに開発したウイルス感染なしに RLR シグナルを誘導する実験系を、培養細胞だけでなくマウス個体などに導入することにより、RLR を介したシグナルの生理機能をさらに明らかにすることが可能であると考えている。

4. 自己評価

当初の研究計画では、RLR を標的とした抗ウイルス薬剤の開発へつなげることを最終目標としていたが、RIG-I によるウイルス由来非自己 RNA の認識機構の分子基盤については一定の成果が得られたものの、実際に薬剤開発へとつなげるには不十分と言わざるを得ない。また、本研究で行った生化学的な解析は、主にリコンビナントタンパク質や合成 RNA を用いた人為的な *in vitro* モデル系によって得られた成果であり、実際にウイルス感染細胞内で複雑な RNA-タンパク質複合体がどのように検知されているのかといった、より生理的なレベルの解析にまで及んでおらず、反省すべき点であると考えている。そのような解析は、RLR によるウイルス検知の普遍的な分子機構を明らかにし、本研究の目標を達成するためには必須であり、より計画的な研究遂行が必要であったであろう。一方で、本領域の RNA 研究を専門とするアドバイザーおよび研究員との交流を通じて、研究計画に一定の進展があったことは非常に有意義であり、今後の研究に活かしていきたいと考えている。研究途上の成果については、早急に解析を進め、論文として発表していく予定である。

5. 研究総括の見解

RNA ウイルス感染、すなわち非自己 RNA の細胞内への侵入を検知する細胞質内 RNA センサー分子(RLR)である RIG-I を発見し、そのファミリー分子である MDA5 や LGP2 をも対象とした RNA の認識機構、およびそのシグナル伝達機構の研究である。IFN 誘導機構に留まらず、細胞増殖機構に至るまでを視野に入れた広範且つ質の高い研究結果である。達成された研究成果はウイルスが如何に RLR を介して、細胞の代謝を変化させるか、また細胞はいかにウイルス感染に対応して応答しているかを紐解くための多くの鍵を与えている。今後の研究の展開方針も含め、高く評価できる研究結果である。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Takahashi K, Yoneyama M (equal contribution), Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, Gale M Jr, Inagaki F, Fujita T: Non-self RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. <i>Mol. Cell</i> , 29, 428-440, 2008
2. Takahashi K, Kumeta H, Tsuduki N, Narita R, Hirai R, Yoneyama M, Horiuchi M, Ogura K, Fujita T, Inagaki F: Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domain: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. <i>J. Biol. Chem.</i> , 284, 17465-74, 2009
3. Shigemoto T, Kageyama M, Hirai R, Zheng J, Yoneyama M, Fujita T: Identification of loss of

	function mutations in human genes encoding RIG-I and MDA5: implications for resistance to type I diabetes. J. Biol. Chem., 284, 13348–54, 2009
	4. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, <u>Yoneyama M</u> , Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O: LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 107, 1512–7, 2010
	5. Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, <u>Yoneyama M</u> , Fujita T: Virus-Infection or 5' ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. PLoS Pathog., 6, e1001012, 2010

(2)特許出願

なし

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. Yoneyama M: Non-self RNA sensing mechanism of RIG-I-like RNA helicases, The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 10, 2008, Awaji (招待講演)
2. 米山光俊: RIG-IファミリーによるウイルスRNA認識機構, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月21–24日, 神戸(招待講演)
3. Yoneyama M, Fujita T: RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. Immunol. Rev., 227, 54–65, 2009 (総説)
4. Yoneyama M, Fujita T: Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. Rev. Med. Virol., 20, 4–22, 2010 (総説)