

論文の内容の要旨

論文題目:

GC-rich 配列を介した UPF1 依存的 mRNA 分解メカニズムの解明

氏名: 今町 直登

【序】

生命の遺伝情報は、DNA から RNA に転写され、タンパク質に翻訳される。この一連の遺伝情報の伝達をセントラルドグマと呼んでいる。しかし、遺伝子発現の制御という観点からすると、セントラルドグマの概念は物質（RNA やタンパク質）の生成段階にしか着目していない。そのため、物質の分解段階、つまりは RNA やタンパク質が分解される過程については、いわばセントラルドグマから外れた影の存在であり、セントラルドグマを提案したクリックらの時代では重要視されていなかったメカニズムである。しかし、遺伝子発現の量的制御を考えたときに、例えば、RNA の発現量は RNA の転写レベルと分解レベルのバランスによって制御されていることから、RNA やタンパク質の生成段階だけでなく、分解段階に着目することも生理機能の制御、ひいては生命を理解する上で重要な要素であるといえる。選択的に特定の RNA 集団を認識して分解するために、RNA ヘリカーゼや RNA 結合タンパク質、microRNA が、それらの標的 mRNA の特徴的な構造や配列を認識して、RNA 分解を誘導していることが知られている。

RNA 分解は、異常な mRNA を排除する「RNA 品質管理機構」とも密接に関係している。RNA の品質管理機構として最もよく知られているのが、ナンセンス変異依存 mRNA 分解（NMD）である。UPF1 はこの NMD 経路における中心的な因子として同定された ATP 依存的な RNA ヘリカーゼである。UPF1 のノックアウトマウスは胎生致死となり、その原因は UPF1 を介した RNA 分解が破綻することにより、mRNA の分解が正常に行われなくなることで個体が死に至ると考えられている。

近年、UPF1 は正常な mRNA の分解にも関わっていることが明らかとなってきている。正常 mRNA の分解において、UPF1 は標的 RNA の 3' 非翻訳領域（UTR）を認識すると考えられている。しかしながら、UPF1 が認識する 3' UTR 中の RNA 配列は不明であった。そこで私は UPF1 の標的 mRNA を網羅的に同定し、標的 mRNA に対して配列解析を行うことにより UPF1 の認識配列の同定を試みた。さらに、UPF1 による RNA 分解メカニズムについても解析を行った。

【結果】

1. UPF1 標的 mRNA の同定

当研究室で開発された、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドな RNA 分解速度測定法である BRIC-seq (5-BRomo-uridine Immunoprecipitation Chase)法を利用し、UPF1 をノックダウンした HeLa 細胞において、半減期が2倍以上延長する619種類のmRNAを同定した。また、HeLa 細胞から UPF1 を免疫沈降するとき共沈降する RNA を次世代シーケンサーで網羅的に同定した結果、2426 種類の UPF1 相互作用 mRNA を同定した。BRIC-seq 及び RIP-seq の結果の複合解析 (図 1-A)の結果から、UPF1 ノックダウンにより RNA の半減期が2倍以上延長し、かつ UPF1 との物理的な相互作用が確認された RNA 群として、246 遺伝子を UPF1 標的 RNA として同定した (図 1-B)。これらを UPF1 標的 mRNA とした。

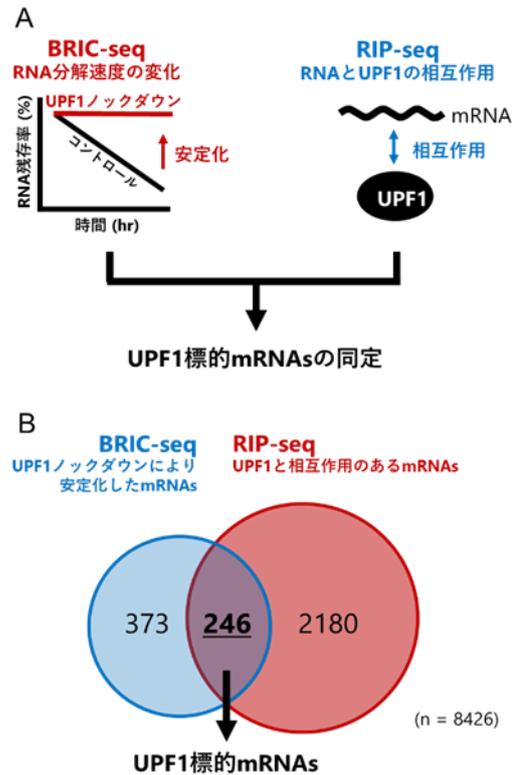


図1. UPF1標的mRNAの同定

2. UPF1 標的 mRNA に対する基質認識配列の解析

UPF1 のリン酸化は UPF1 を介した RNA 分解において重要なステップである。リン酸化 UPF1 (pUPF1) は RNA 分解因子と相互作用し、mRNA の分解を誘導することから、pUPF1 と結合している mRNA は分解標的となっていると考えられる。そこで、NCBI GEO データベースに収載されているリン酸化 UPF1 の網羅的な RNA フットプリントデータ (リン酸化 UPF1 が結合する RNA 配列を網羅的に同定したデータ) を利用し、246 種の UPF1 標的 mRNA の 3'UTR 中の pUPF1 の結合サイトを調べた。その結果、リン酸化 UPF1 が GC-rich な配列に結合する傾向があるとわかった (図 2-A)。さらに、配列モチーフ検索ソフトの MEME を用いて pUPF1 の結合する配列に対してモチーフ検索を行うと、CUG を中心とした GC-rich な配列が結合モチーフとして予測された (図 2-B)。

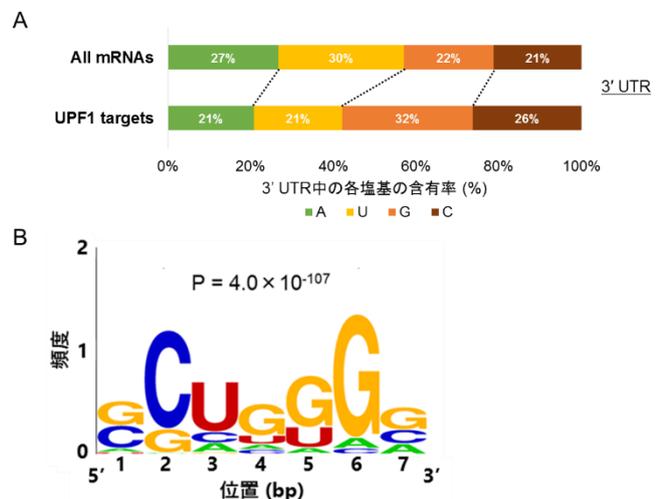


図2. mRNA上でのUPF1結合配列の予測

さらに、予測された GC-rich なモチーフ配列以外に UPF1 標的 mRNA の 3'UTR 中にどのような配列的な特徴が含まれているか解析を行った。その結果、UPF1 標的 mRNA の 3'UTR の GC 含有率が、他の mRNA と比較して 8-12% 高いことがわかった。このことから、UPF1 標的 mRNA の 3'UTR 中の GC 含有率が高いことも、UPF1 を介した RNA 分解の基質認識に関わる重要な特徴の 1 つであると考えられる。

一方で、3'UTR 中の GC 含有率が高いにも関わらず、UPF1 の標的とならない mRNA も一定数存在する。そのため、GC 含有率以外にも UPF1 標的 mRNA であるかどうかを決める要素があると考えた。そこで、mRNA の 3'UTR 中のモノヌクレオチドおよびジヌクレオチドの含有率に着目して解析を行った。まず、mRNA の 3'UTR の GC 含有率が 55% (UPF1 標的 mRNA の GC 含有率の中央値) 以上である mRNA 群を抽出し、UPF1 標的 mRNA 群とその他の mRNA 群に分類分けした。それぞれの RNA 群における 3'UTR 中でのモノヌクレオチドおよびジヌクレオチドの含有率を調べた結果、グアニン (G) の含有率と GA もしくは AG のジヌクレオチドの含有率が UPF1 標的 mRNA では高いことがわかった。一方で、シトシン (C) の含有率と CC のジヌクレオチドの含有率が UPF1 標的 mRNA では低いことがわかった。以上の結果から、3'UTR 中での GC 含有率の高さに加えて、グアニン (G) の含有率と GA・AG のジヌクレオチドの含有率が高いことが、UPF1 を介した RNA 分解の基質認識に関わる重要な特徴であると考えられる。

3. GC-rich なモチーフ配列は UPF1 依存的な RNA 分解を誘導する

次に、誘導性転写プロモーター (Tet-off システム) を利用したレポーターアッセイにより、UPF1 の標的 RNA がモチーフ配列を介して UPF1 依存的な分解を受けているか検証した。まず、レポーター遺伝子の ORF の下流に UPF1 の標的遺伝子として同定された GADD45B の GC-rich なモチーフ配列を持つ 3'UTR 配列を組み込んだ発現ベクターと、モチーフ配列を欠いた 3'UTR を組み込んだ発現ベクターをそれぞれ作成した (図 3-A)。HeLa 細胞中で GC-rich なモチーフ配列を持つ 3'UTR 配列を持つレポーター mRNA は速やかに分解された。UPF1 をノックダウンすることで、上記のレポーター mRNA の不安定化はキャンセルされた (図 3-B)。このことから、UPF1 標的 mRNA の 3'UTR を介して UPF1 依存的な mRNA 分解が起こっていることが確認された。さらに、pUPF1 のモチーフ配列を欠いた 3'UTR 配列を組み込んだレポーター RNA では RNA の不安定化が部分的に抑制された (図 3-C)。以上の結果から、3'UTR 中に存在する GC-rich なモチーフ配列が UPF1 依存的な RNA 分解を誘導していることが示唆された。

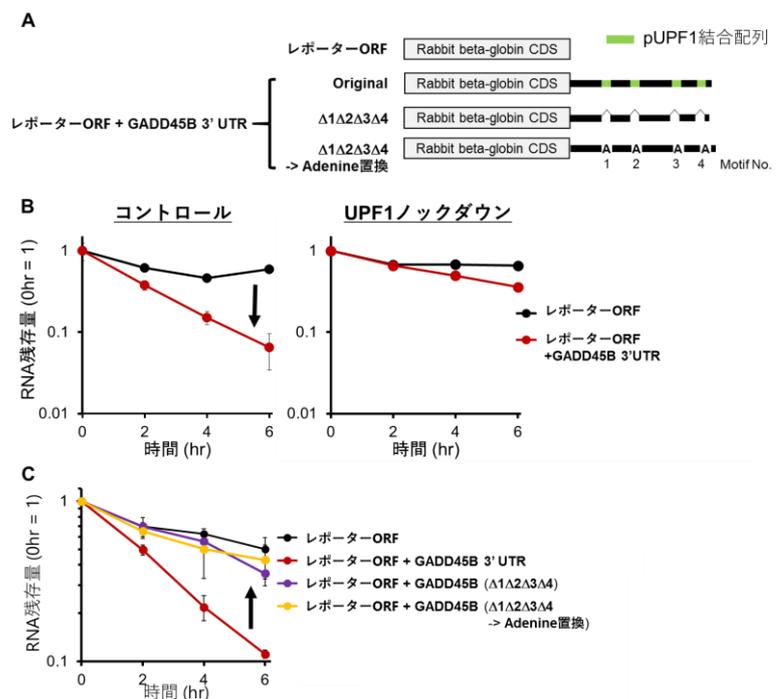


図3. UPF1結合配列を介したRNA分解の誘導

4. GC-rich なモチーフ配列を持つ RNA からの UPF1 の解離が遅い

近年の研究により、少なくとも NMD 経路においては、標的でない mRNA からの UPF1 タンパク質の解離が速いことが、UPF1 による基質認識に重要であると示唆されている (Lee et al. 2015)。そこで私は、UPF1 標的 mRNA が選択的に分解されるメカニズムとして、標的 RNA からの UPF1 タンパク質の解離の違いに着目した。つまりは、標的 RNA 上で UPF1 の解離が遅くなることで、RNA 上に UPF1 が滞留しているのではないかと仮説を立てた。もしこの仮説が正しければ、GC-rich なモチーフ配列からの UPF1 タンパク質の解離が遅くなるはずであると考へた。まず、32P 標識した GADD45B の 3'UTR 配列について、元の GADD45B の RNA 配列 (WT) と GC-rich な配列をアデニンに置換した RNA 配列 (MUT) の 2 種類を用意した。それぞれの RNA を UPF1 タンパク質と *In vitro* で結合させ、その後、非標識 RNA と ATP を加えたときに、標識 RNA からの UPF1 の解離のされやすさを調べた。ゲルシフトアッセイの結果、それぞれの RNA (WT と MUT) はいずれも UPF1 タンパク質と結合していることを確認した (図 4、レーン 3 と 4)。一方で、非標識 RNA を加えた後、MUT の RNA からの UPF1 タンパク質の解離は、WT の RNA と比較して速いことがわかった (図 4、レーン 5 と 6)。また、ATP をさらに添加した条件下では、MUT の RNA からの UPF1 タンパク質の解離の程度が大きくなることがわかった (図 4、レーン 7 と 8)。RNA ヘリケースである UPF1 の RNA 上の運動には ATP が要求されるという考えに合致する結果と解釈した。以上の結果から、UPF1 は GC-rich な配列をアデニンに置換した RNA と比較して、GC-rich なモチーフ配列を含む RNA 上から解離しにくいことが示唆された。

【考察】

UPF1 の ATPase 活性は UPF1 が RNA から解離するときに必要とされ、ポリ G やポリ GC 配列上では *in vitro* で UPF1 の ATPase 活性が弱まることが知られている。これらの知見と本研究の結果を合わせて考えると、次のようなモデルが考えられる。UPF1 の標的 RNA の 3'UTR 中に含まれる GC-rich な領域では、UPF1 の ATPase 活性が低下し、UPF1 が RNA 上に滞留する。この RNA 上での滞留により UPF1 がリン酸化される時間を与え、結果として、RNA 分解が誘導される。一方で、UPF1 の標的でない RNA では UPF1 の ATPase 活性により速やかに RNA 上から解離するため、RNA 分解が誘導されないと考えられる。

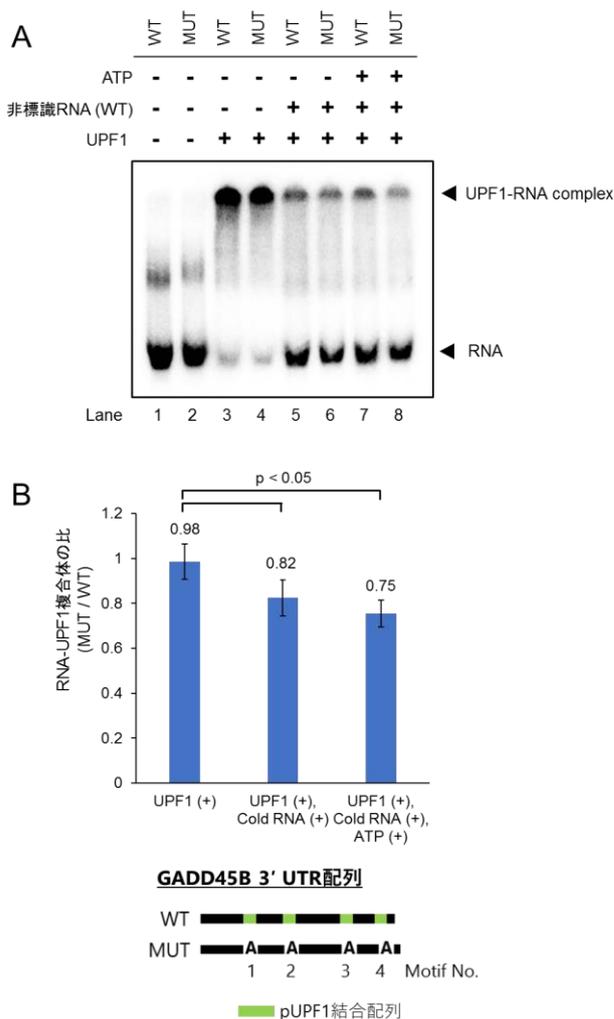


図4. UPF1結合配列を持つRNAからのUPF1の解離