

DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY OF BIOCHEMISTRY

In the eukaryotic cells, two types of separation have taken place. First, the genes are separated by introns into multiple exon pieces that should be joined together. Second, the cell itself is separated by the nuclear envelope into two major compartments, the nucleus and the cytoplasm. These two types of separations necessitate specific gene expression mechanisms such as RNA splicing and nuclear transport. Prof. Mutsuhito OHNO's laboratory is studying various aspects of eukaryotic gene expression with great emphasis on "RNA" as a key molecule.

1) Identity elements in mRNA export: K. MASUYAMA, I. TANIGUCHI, H. FUKE and R. IWANO

Different RNA species are exported from the nucleus by distinct mechanisms. Among the different RNA species, major splicesomal U snRNA precursors and mRNAs share some similarities. They are both transcribed by RNA polymerase II, and both initially acquire m7G-cap structure. In addition, in both cases, there are no conserved internal RNA sequences required for nuclear export. Despite these similarities, export of these two RNAs is mediated by different factors. U snRNAs are exported by cooperation of CBC, PHAX, CRM1 and RanGTP, whereas export of mRNAs does not require these factors but depends upon the REF and TAP proteins. Thus there must be distinguishing features of U snRNAs and mRNAs that are recognised by these cellular factors. In this research project, we perform a systematic search for identity elements used in export of mRNAs. To do this, we transplant one by one the features of mRNAs into U1snRNA, and look for elements of mRNA that makes the U1 RNA behave like an mRNA in nuclear export process. We previously found that an mRNA-type intron is such an identity element. We also searched for splicing-independent identity elements and found that RNA length is an important determinant of RNA export pathway (K. MASUYAMA). We are searching for the factors that may recognize the RNA length in RNA export process (I. TANIGUCHI).

Thus identity elements used to distinguish different RNAs have been searched in terms of the properties embedded in the RNA molecules themselves. The concept of RNA identity elements however could be broader than our thoughts so far. We have speculated that export pathway of an RNA might be influenced by which class of RNA polymerase (I, II or III) has been used to transcribe the RNA. In order to test this hypothesis, we prepared a number of artificial gene sets in which promoters were exchanged, so that certain class of RNA, e.g. UsnRNA, is transcribed by each of the three classes of RNA polymerases, and these gene sets were microinjected into the nucleus of *Xenopus laevis* oocytes. (H. FUKE and R. IWANO).

2) A compartmentalized phosphorylation/dephosphorylation system that regulates RNA export from the nucleus: S. KITAO

The trafficking of major spliceosomal U snRNAs between the nucleus and cytoplasm is indispensable for their maturation in metazoa. PHAX (phosphorylated adaptor for RNA export) is the key regulator of U snRNA export complex assembly. PHAX is phosphorylated in the nucleus and exported as a component of the U snRNA export complex to the cytoplasm, where it is dephosphorylated. PHAX phosphorylation is essential for export complex assembly whereas its dephosphorylation causes export complex disassembly. Thus PHAX is subject to a compartmentalized phosphorylation/dephosphorylation cycle that contributes to the directionality of U snRNA transport. This is reminiscent of the RanGTP/GDP cycle during the nucleocytoplasmic trafficking, e.g. the export receptors can interact with cargoes only in the nucleus in the presence of RanGTP and release them in the cytoplasm upon GTP hydrolysis. It is very likely that the activity of PHAX is needed in broader context of biological process. In fact, PHAX has recently been reported to be involved in the intra-nuclear transport of a subset of small nucleolar RNAs. In spite of such importance, neither the essential phosphorylation sites of PHAX nor the kinase/phosphatase that contribute to the compartmentalized system have been clarified. Such knowledge should help to understand the biogenesis of cellular RNA molecules in general. We are in the process of obtaining the results in this direction.

3) Analysis of intron-degradation pathway: R. YOSHIMOTO and N. KATAOKA

In higher eukaryotes, most genes in the nucleus have introns. Genes are first transcribed as pre-mRNAs and become mRNAs by removal of introns. In human, more than 95% region of the pre-mRNAs are the introns that are removed by splicing as a lariat form. Excised introns remain in the nucleus and are subject to degradation after the debranching reaction. Without this degradation process, lariat-form introns will accumulate in the nucleus and remain bound to splicing factors. The intron accumulation prevents splicing factors from the recycling for another round of splicing reaction and may also cause a shortage of the nucleotides that are to be supplied from the degraded introns. Therefore, the intron degradation is thought to be a crucial process for higher eukaryotic cells. However, relatively little is known about this process and only a few factors were identified.

The goal of our research is to elucidate the molecular mechanism of the intron degradation and recycling of splicing factors by isolating intron-degradation complexes. As a candidate to isolate the complexes, we chose two factors that have been suggested to be involved in the intron degradation process. These are hDBR1, a debranching enzyme, which mediates debranching reaction of the lariat introns and hPrp43, an RNA helicase-like protein. The RNA-protein complexes containing

Flag-tagged hDBR1 or hPRP43 will be isolated and analyzed.

4) RNA metabolism in M-phase: H. KIRIU and M. KITABATAKE

In eukaryotes, mRNAs are transcribed from the genome as pre-mRNAs, which usually contain non-protein coding introns. The pre-mRNAs are then processed (5' capping, 3' poly (A) tailing, intron splicing, etc.) in the nucleus to produce mature mRNAs. Only fully processed mature mRNAs are recognized by the nucleocytoplasmic transport machinery and actively transported to the cytoplasm. In the classical view, the protein synthesis occurs in the cytoplasm exclusively. Therefore, the site of translation and the site of mRNA production (transcription and mRNA processing) are physically separated by the nuclear envelope. However, this separation is lost in M-phase when the nuclear envelope is broken down. We are interested in what happens to the nuclear and cytoplasmic RNAs when the nucleus and cytoplasm are mingled in M-phase.

5) Novel RNA quality control mechanisms: A. MIYATA and M. KITABATAKE

How the eukaryotic cells deal with non-functional RNA molecules that have been either mutated or damaged? We are searching for novel RNA quality control mechanisms in both mammalian and yeast cells.

6) mRNA transport in the neurite: K. NINOMIYA and N. KATAOKA

Some specific mRNAs are transported in the neurite, and locally translated in the synapsus. We are studying this process from the point of view that the EJC components should be involved.

7) New functions of RNA binding proteins: S. AKIYAMA, C. HATAI and N. KATAOKA

To elucidate novel cellular functions of PHAX, a UsnRNA export factor and Y14/Magoh heterodimer, cEJC components, we are screening interacting proteins with these factors by the yeast two-hybrid system.

8) Comprehensive expression analysis of human small RNA molecules: A. MCCLOSKEY and M. KITABATAKE

More than 300 miRNAs have been identified in human. We are undertaking a comprehensive

expression analysis of human small RNAs in order to identify the candidates that may regulate cell growth and cell cycle. We also expect that we might be able to identify novel small functional RNAs other than miRNA.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Genetics and Molecular Biology

Laboratory of Biochemistry

- Okuda, J., Toyotome, T., Kataoka, N., Ohno, M., Abe, H., Shimura, Y., Seyedarabi, A., Pickersgill, R., Sasakawa, C.(2005)
Shigella effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF(35) to modulate host immune responses. Biochemical and Biophysical Research Communications. 333(2):531-539.
- Nameki, D., Kodama, E., Ikeuchi, M., Mabuchi, N., Otaka, A., Tamamura, H., Ohno, M., Fujii, N., and Matsuoka, M. (2005)
Mutations conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitors are restricted by gp41 and Rev-responsive element functions. J. Virol. 79, 764-770.
- Ninomiya, K., Ishimoto, T., Taguchi, T. (2005)
Subcellular localization of PMES-2 proteins regulated by their two cytoskeleton-associated domains. Cell Mol Neurobiol. Aug; 25(5):899-911.
- 片岡直行：mRNA スプライシング - 遺伝子発現の中核過程 - 実験医学 23:1890-1895 (2005)
-

Masuyama, K., Taniguchi, I. and Ohno, M. : RNA length defines RNA export pathway. KYOTO UNIVERSITY-NUS INTERNATIONAL SYMPOSIUM Regulation of cell fate and cell function, Singapore, January 27-29, 2005

大野睦人：RNA 核外輸送の多様性とその制御機構．千里ライフサイエンスシンポジウム「RNA 機能研究の最先端」大阪、2005 年 2 月 15 日

秋山 慎太郎、片岡 直行、大野 睦人：mRNA 核外輸送因子 Aly/REF と UsnRNA 核外輸送因子 PHAX との相互作用．特定領域研究「RNA 情報網」第 3 回サテライトミーティング、三重、2005 年 5 月 9-11 日

Fuke, H., Ohno, M. : Effect of Transcription in the Discrimination of Different RNA Species. 10th Annual Meeting of the RNA Society, Banff, Canada, May 24-29, 2005

大野睦人：RNA 核外輸送における多様性と制御．大阪大学フロンティアバイオサイエンスコロキウム生命機能研究科 第 12 回研究交流会、大阪、2005 年 7 月 13 日

Masuyama, K., Taniguchi, I. and Ohno, M. : RNA length defines RNA export pathway. Shirokane International Symposium, Tokyo, Japan, July 22-23, 2005

Kataoka, N., and Ohno, M. : Analysis of hDBR1 protein that is involved in the post-splicing intron

turnover. Eukaryotic mRNA Processing. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, August 24-28, 2005

片岡直行：mRNA プロセッシングと輸送．インビトロジェン シンポジウム 第2回「バイオサイエンスの最先端」神奈川、2005年9月1-3日

大野睦人：Identity elements in mRNA export．国際シンポジウム「細胞核機能の分子スイッチ Ran と細胞周期」兵庫、2005年10月2日

大野睦人：RNA 核外輸送における RNA・たんぱく質複合体のリモデリング．2005 年たんぱく質関連領域合同シンポジウム、大阪、2005年11月15日

Kataoka, N：Analyses of the factors that are involved in the post-splicing recycling pathways.12th East Asia Sympojium-From Molecules to Cells ,Shao Xing, China , November 20-23, 2005

福家浩之, 大野睦人：3'末端形成はmRNA としての目印を RNA 上に付加する．第28回日本分子生物学会、福岡、2005年12月8日

福家浩之, 大野睦人：3'末端形成はmRNA としての目印を RNA 上に付加する．第2回京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都、2005年12月16日

真核細胞では原核細胞と比較して二種類の分断化が昂進している。細胞は核膜により細胞核と細胞質という二つの区画に分断化され、遺伝子はイントロンによって分断化されている。高分子化学研究分野の大野睦人教授の研究室では、以上のような真核生物固有の細胞構造や遺伝子構造に起因する遺伝子発現の分子機構を RNA をキーワードとして研究している。

大野研究室には、2人の助手（片岡・北畠）、3人の博士研究員（増山・北尾・二宮）、3人の博士後期課程大学院生（福家・谷口 D2、芳本 D1）、5人の修士課程大学院生（秋山・霧生・畑井・宮田 M2、マクロースキー M1）、1人の4回生（岩野）が在籍する。

1) 核外輸送における mRNA の ID エLEMENTの探索（増山・谷口・福家・岩野）

真核細胞の核内では様々な種類の RNA 種が合成され、その多くは細胞質へと核外輸送される。核外輸送される主要な RNA には、リボソーム RNA (rRNA)、転移 RNA (tRNA)、ウリジンに富む核内低分子 RNA (U snRNA)、メッセンジャー RNA (mRNA) などが挙げられるが、これらの RNA はそれぞれの RNA 種に固有の輸送因子群によって核内で結合された後、細胞質へと輸送される。興味深い事に、核内でそれぞれの RNA に結合する因子群は、核外輸送を司るだけでなく、核外輸送後のそれぞれの RNA の運命（細胞質における RNA の輸送・局在化、翻訳、RNA の安定性、など）をも規定することが明らかになってきた。つまり、異なる種類の RNA は核内で既に核外輸送因子群によって識別されていて、その識別がこれら様々な RNA の運命全体に影響を与えるのである。我々は、特に mRNA に焦点を絞り、核内で mRNA が mRNA として識別される特徴（mRNA の ID ELEMENT）の全貌を解明し、さらにそれらの ID ELEMENTを識別するトランス因子群を明らかにすることを目指している。

現在までに、1. RNA がイントロンを持ちそれがスプライシングにより除去される事、あるいは、2. 強固な二次構造を取らない約 300 塩基長以上の RNA 領域を持っている事、の2つの特徴が mRNA の ID として機能する事を明らかにしてきた（Ohno et al., Molecular Cell, 2002; Masuyama et al., Genes Dev., 2004）。

上の2の結果は、細胞の中の何らかのたんぱく質因子が、核外輸送の際に RNA の長さを感じている事を強く示唆している。この現象を再現する試験管内の系をつくり、長い RNA 上に mRNA 核外輸送因子を優先的に結合させる機構に迫ろうとしている（谷口）。

核外輸送における RNA のアイデンティティーを決定しているのは、RNA 側の特徴だけ

ではないかも知れない。プロモーター配列が転写される RNA の ID に影響するか否かという問題は興味深い。プロモーター配列は、RNA がどのタイプの RNA ポリメラーゼによって転写されるかを規定し、さらに場合によっては、転写された RNA 上に結合するタンパク質因子をも規定する。mRNA や UsnRNA や rRNA など様々な RNA 遺伝子間で、プロモーター領域をスワップしたようなキメラ遺伝子を作成し、上記の系を用いて、異なるプロモーターから転写された RNA の ID が変化するかどうかを解析している（福家・岩野）。

さらに mRNA の他の ID エlementを探索している。mRNA の特徴となっているような配列を UsnRNA に移植し、RNA 微量注入法を用いて検定する。ポリ A 配列、ESE、IRES などを検定している（増山）。

2) コンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化システム（北尾）

高等真核生物において、mRNA スプライシングの主要因子である一群の核内低分子 RNA（UsnRNA、U1、U2、U4、U5 などの総称）は、核内で合成された後まず細胞質に輸送される。大野らの以前の研究により、この核外輸送において（少なくとも）5 種類の蛋白質因子が UsnRNA と共に核外輸送複合体（export complex）を形成し核膜孔を通過することが分かっている。これらの中でも PHAX（phosphorylated adaptor for RNA export）と名付けられた RNA 結合タンパク質はリン酸化による活性制御を受け、RNA 核外輸送複合体の形成に中心的な役割を果たす事が分かっている。PHAX は核内でリン酸化され、export complex の一部として細胞質に移動し、そこで脱リン酸化を受ける。PHAX のリン酸化は export complex の形成に必須であるのに対して、その脱リン酸化は export complex の解体を引き起こす。つまり、PHAX はコンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化のサイクルを繰り返し、そのことが、RNA の核外輸送の方向性を規定しているのである。この結果は新たな問題を生じることになった。まず、PHAX の重要なリン酸化部位はどこか？また、そのリン酸化がいかにして PHAX の活性を制御するのか？さらに、このようなコンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化システムを構築・維持するためには、核に局在化するリン酸化酵素（キナーゼ）と細胞質に局在化する脱リン酸化酵素（フォスファターゼ）の存在が仮定されるが、それらの分子の実体は何か？本研究では、これらの疑問を明らかにしてゆきたい。

3) イントロンの代謝機構の解明（芳本・片岡）

ヒトの場合、mRNA 初期転写物のうち実に 95 パーセント以上はスプライシングによりイントロンとして切り出される。切り出されたイントロンは核内に留まり、スプライシング因子が除かれた後、ラリアット構造が解消され（debranching）分解されると考えられて

いる。この過程が機能しない場合、ラリアット型イントロンがスプライシング因子を結合したまま核内に蓄積するので、スプライシング因子や、イントロン分解により再利用されるはずのヌクレオチドが、不足するなどの問題が起こると考えられる。このようにイントロンの代謝機構は高等真核生物にとって重要な過程であるが、ほとんど解析されていない。

我々はスプライシング反応後に生じるイントロン・スプライシング因子複合体を解析し、核内で起こるイントロンの代謝機構を分子レベルで解析したいと考えている。そのために、イントロンの debranching に関わる hDBR1 と RNA ヘリカーゼ様因子 hPrp43 を選んだ。タグを付けたこれらのたんぱく質を培養細胞で発現させ、これらのたんぱく質が標的とするイントロン・スプライシング因子複合体の単離・同定を試みている。また、イントロン配列自体に RNA のタグを付け、イントロン・スプライシング因子複合体を直接単離する事も試みている。

4) 細胞分裂期における RNA 動態 (霧生・北畠)

真核生物の遺伝子発現において、mRNA はまず染色体からイントロンを含んだ前駆体 (pre-mRNA) として転写され、核の中でプロセシング (5'キャップ構造の付加、3'ポリ A 構造の付加、イントロンの除去) を受けた後に、能動輸送によって核外へと輸送され、蛋白質合成の鋳型となる。古典的な実験によれば蛋白質合成の場は細胞質に限局されており、mRNA プロセシングが行われる核内と蛋白質合成が行われる細胞質は、核膜によって物理的に分画されていると考えられている。しかしながら、高等動物細胞の分裂前中期においては核膜は崩壊し、核内構造物と細胞質が混じり合う。真核細胞が原核細胞的になるこの時期に RNA に何が起こるかを総合的に解析する。

5) 新規 RNA 品質管理機構の探索 (宮田・北畠)

真核細胞は突然変異や傷害によって機能を持たなくなった RNA 分子をどう処理するのだろうか? まず、手始めに rRNA に着目し、哺乳類培養細胞と出芽酵母を材料に、分子遺伝学と生化学の手法を用いて新規な RNA 品質管理機構を探ろうとしている。

6) 神経細胞における mRNA の神経突起中の輸送機構 (二宮・片岡)

特定の mRNA は神経突起中を輸送されシナプス等で局所的に翻訳される事が分かっているが、その分子機構は不明な点が多い。我々は、この過程における EJC 構成成分の関与という視点から、この現象を研究している。

7) RNA 結合タンパク質の新規細胞機能 (秋山・畑井・片岡)

UsnRNA 核外輸送因子 PHAX (秋山) や EJC 構成成分 Y14・Magoh ヘテロ二量体 (畑井) と相互作用する因子を酵母 2・ハイブリッド法でスクリーニングすることにより、これらの因子の新規な細胞機能についての手掛かりを得る。さらに、相互作用因子に欠失や点突然変異を導入し、相互作用への影響を解析する。

8) ヒト低分子 RNA の発現解析 (マクロスキー・北畠)

現在までに約 300 種類のヒト miRNA が同定されているが、それらの発現パターンを網羅的に解析することにより細胞増殖制御に関わる可能性のあるものを洗い出す。また、miRNA 以外の新規機能性低分子 RNA の同定も試みる。