

みにれびゅう

## 真核生物 mRNA 3'末端プロセシング研究の新展開

杉本(永池) 崇

### 1. はじめに

遺伝子の情報が発現する際、DNA に書き込まれた遺伝情報は、転写反応により RNA に写し取られる。中でもタンパク質をコードする遺伝情報はメッセンジャー RNA (mRNA) に転写され、翻訳反応を経てタンパク質となる。真核生物では、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) による転写反応で前駆体 mRNA (pre-mRNA) が合成されると、5'末端キャッピング、スプライシング、3'末端プロセシングなどさまざまなプロセシング反応により成熟 mRNA となる。

転写反応や各々のプロセシング反応はそれぞれ試験管内で独立した反応として解析できるため、長らく個別に扱われてきた。ところが1990年代後半以降、転写反応とプロセシング反応が結びついており、転写伸長中にプロセシング反応が起きることが酵母や動物細胞を用いた研究から明らかになった<sup>1)</sup>。転写とプロセシングのこうした共役は細胞内における迅速で効率的な mRNA 合成を可能にしていると考えられる。

本ミニレビューでは真核生物における mRNA プロセシングの最近の研究動向について、主に筆者が研究を行ってきた3'末端プロセシングについて転写との共役という視点から紹介したい。

### 2. 真核生物における mRNA 3'末端プロセシング

真核生物における mRNA 3'末端プロセシングはポリ A シグナル (哺乳動物では AAUAAA など) 依存的な切断反応と切断箇所におけるポリ A 付加反応からなる (図 1)。この過程はエンドヌクレアーゼを含有する CPSF (切断・ポリ A 付加因子) やポリ A 付加酵素である PAP (ポリ A

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 RNA プロセシンググループ (〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 第六事業所 6-13)

**An expanding network links transcription and mRNA 3' processing**

**Takashi Nagaike** (RNA processing group, Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan)

ポリメラーゼ) に加えて、少なくとも 20 種以上の因子が関わるきわめて複雑な反応である<sup>2)</sup>。

筆者のアメリカ留学時代の恩師であるコロンビア大学の James Manley 博士は、mRNA 3'末端プロセシングの分子機構を生化学的手法や遺伝学的手法を用いて 30 年間にわたって解析し、世界をリードしてきた。筆者が Manley lab で取り組んだのは、転写と共役した 3'末端プロセシング (transcription-coupled polyadenylation: TCP) の分子機構を試験管内アッセイで解析することであった。

### 3. 転写と共役した 3'末端プロセシングのメカニズム

3'末端プロセシングを転写と結びつける重要な因子の一つは Pol II の C 末端領域 (C-terminal domain: CTD) である。CTD はヘプタペプチド (コンセンサス配列: YSPTSPS) の繰り返し配列からなるドメインであり、細胞内でも試験管内でも 3'末端プロセシングを促進することが知られている<sup>3,4)</sup>。

また、Pol II だけでなく、他の転写関連因子も TCP を制御することがわかってきている。Pol II による転写では、基本転写因子 TFIID (transcription factor IID) などによりプロモーターに転写開始前複合体が形成され反応がスタートする。Tora や Manley らはヒト培養細胞から精製した TFIID に転写因子だけでなく CPSF が含まれていることを見いだした。また CPSF が TFIID によりプロモーターにリクルートされること、転写開始後には Pol II に受け渡されることを示した<sup>5)</sup>。一方、Jensen らによると 3'末端プロセシングが起きると次のラウンドの転写開始を促進することから<sup>6)</sup>、転写開始段階と 3'末端プロセシングは双方向で影響を及ぼし合っていると考えられる。

転写開始後に pre-mRNA が合成・伸長していく転写伸長段階では、P-TEFb というキナーゼにより Pol II CTD がリン酸化される。リン酸化された CTD は 3'末端プロセシング因子を転写伸長中の pre-mRNA にリクルートし TCP を促進する<sup>7,8)</sup>。

筆者は、このように転写関連因子が関わる TCP の機構を詳細に解析するため、試験管内 TCP アッセイを構築した。このアッセイで使用される DNA 鋳型には Pol II プロモーターおよびその下流にポリ A シグナルが含まれてい

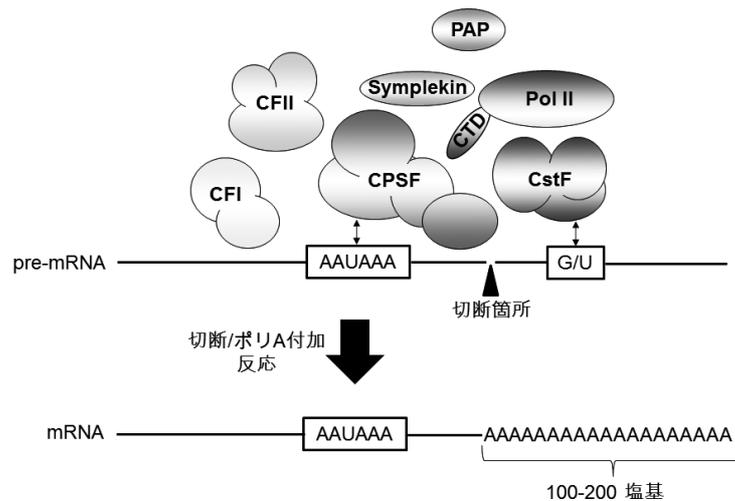


図1 前駆体 Mrna (pre-mRNA) の3'末端プロセッシング反応

pre-mRNA はポリ A シグナル (AAUAAA) 依存的に切断された後、切断箇所にポリ A 配列が付加される。切断反応を触媒するエンドヌクレアーゼを含む複合体 CPSF (切断・ポリ A 付加因子) がポリ A シグナルに結合し、CstF (切断刺激因子) は下流の G/U に富んだ領域に結合する。その他にも切断因子 CFI や CFII, Pol II, ポリ A 付加酵素 (PAP) など数多くの因子が反応に必要である。

る。この DNA 鋳型に核抽出液を加えて TCP 反応を行い、合成された mRNA を変性ゲル電気泳動により解析した。このアッセイ系を用いて筆者らが得た知見を以下に紹介する。

がん研究で知られるハーバード大学の Meyerson のグループはがん抑制因子 *parafibromin* を含む転写伸長因子 PAF1 複合体をヒト培養細胞から精製すると、3'末端プロセッシング因子 (CPSF, CstF および Symplekin) が共精製されることを見いだした。そこで、我々は Meyerson らと共同で PAF1 複合体が 3'末端プロセッシング反応で果たす役割の有無やその分子機構について解析するため、PAF1 複合体を免疫除去した核抽出液を調製し、試験管内 TCP を行った。その結果、転写よりも 3'末端プロセッシングの効率が著しく低下することを明らかにした<sup>9)</sup>。これは PAF1 複合体が TCP に必要であることを示唆していた。

また、試験管内 TCP アッセイにより、転写アクチベーターが 3'末端プロセッシングを誘導することを明らかにした。図 2A に示したように、転写アクチベーター非存在下では、pre-mRNA が合成されるが (図 2A レーン 1)、3'末端プロセッシングはほとんど観察されない (図 2A レーン 3)。それに対して、転写アクチベーター存在下では pre-mRNA の合成が活性化されるだけでなく (図 2A レーン 2)、3'末端プロセッシング反応が非常に強く誘導された (図 2A レーン 4)。さらに、3'末端プロセッシングの誘導には PAF1 複合体が必要であること、転写アクチベーターが PAF1 複合体と直接相互作用しプロモーターにリクルートしてくることを明らかにした<sup>10)</sup>。PAF1 複合体は転写開始後に 3'末端プ

ロセッシング因子を転写伸長複合体に取り込み、TCP を可能にしていると考えられる (図 2B, C)。

さらに我々は、CTD 脱リン酸化酵素である Ssu72 のヒトホモログ (hSsu72) が転写と共役したときだけ 3'末端プロセッシングを促進することを明らかにした<sup>11)</sup>。このように、試験管内 TCP アッセイにより従来の pre-mRNA を基質にしたアッセイでは得られない新たな知見を得ることができた。細胞内における転写と 3'末端プロセッシングのつながりを考えれば、試験管内アッセイも転写と共役した反応系を用いるのは理に適っているように思われる。

#### 4. 転写-3'末端プロセッシング間ネットワークのさらなる拡がり

選択的ポリ A 付加反応 (alternative polyadenylation : APA) は、一つの pre-mRNA に複数のポリ A シグナルが存在する場合に、それらの使い分けで複数の mRNA が生成する現象であるが、ポリ A シグナルの位置により、タンパク質の配列が変わる場合と変わらない場合がある。近年、ヒト遺伝子の 50% 以上において APA が起きていることがわかり、APA は遺伝子発現における一般的な制御機構として注目を集めるようになった<sup>12)</sup>。最近の研究よりがん細胞など増殖速度の速い細胞では上流側のポリ A シグナルが、増殖速度の遅い細胞では下流側のポリ A シグナルが用いられる傾向が明らかになっている。たとえば 3'UTR にポリ A シグナルが複数ある遺伝子を例にとると、がん細胞では上流のポリ A シグナルにより 3'末端プロセ

シングが起き、3'UTRの長さが短くなる。その結果、miRNAなど抑制因子が3'UTRに結合できず、翻訳が活性化する。興味深いことにTianらは転写活性の強弱がAPAを制御することを明らかにしている<sup>13)</sup>。ポリAシグナルを複数持つmRNAの多くは、上流側のポリAシグナルが下流側に比べて弱いという特徴があり、転写活性が低いときは下流の強いポリAシグナルが用いられ翻訳が抑制される。一方、転写アクチベーターにより転写活性が高いときには、TCPにより上流の弱いポリAシグナルにお

ける3'末端プロセシングが可能になり翻訳が活性化すると考えられる(図3)。

また、転写と3'末端プロセシングのネットワークはおそらくクロマチン修飾を含めた話に拡げる必要がある。なぜならば、上述のPAF1複合体はヒストンH3のリシンK4、K36およびK79のメチル化に必要である。また、精製したPAF1複合体には3'末端プロセシング因子に加えてH3K4メチル化酵素も含まれている<sup>9)</sup>。したがってPAF1複合体によるヒストンのメチル化が転写だけでなくTCPを

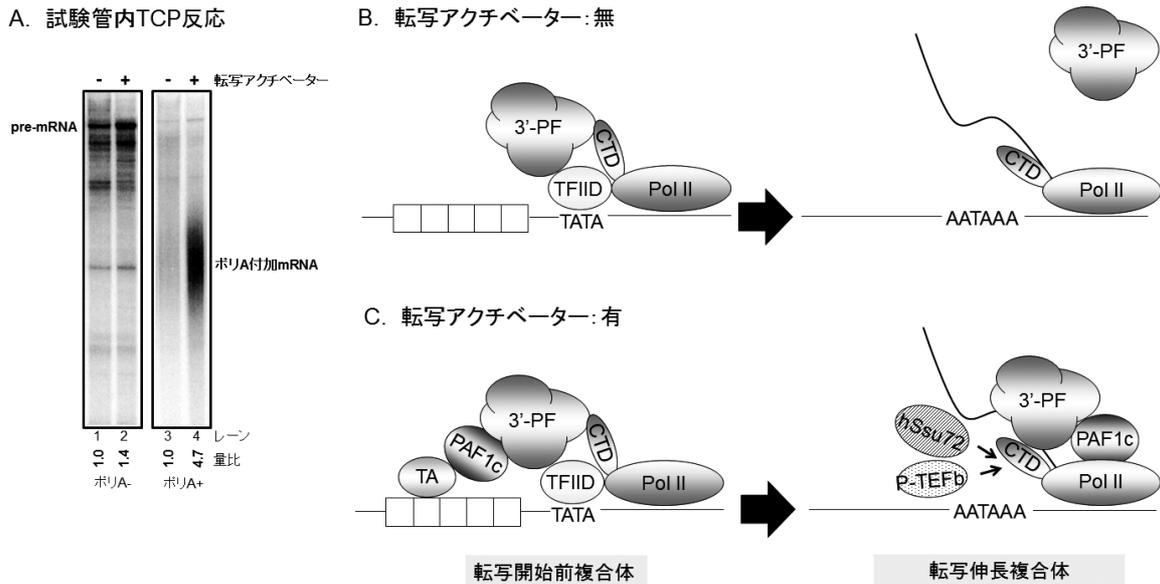


図2 TCP反応と反応モデル

(A) 試験管内TCP反応を行い、電気泳動により解析した。転写アクチベーターにより3'末端プロセシング反応が強く誘導された。(B) 転写アクチベーター(TA)非存在下ではPAF1複合体がプロモーターにリクルートされない。そのため3'末端プロセシング因子(3'-PF)は転写伸長複合体に取り込まれずTCPの効率は悪い。(C) 転写アクチベーター存在下ではPAF1複合体がプロモーターにリクルートされる。その結果、3'末端プロセシング因子はPAF1複合体とともに転写伸長複合体に取り込まれTCPが起きる。キナーゼP-TEFbやホスファターゼhSsu72はCTDのリン酸化およびTCPを制御する。

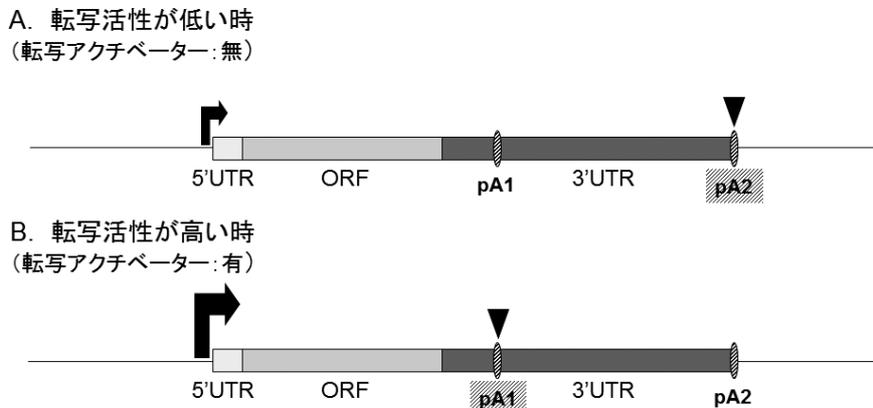


図3 転写活性による選択的ポリA付加反応の制御

(A) 転写活性が低いと3'末端プロセシングは転写との共役効率が悪く下流の強いポリAシグナルによる3'末端プロセシングが起きる。(B) 転写活性が高いときは、TCPにより上流の弱いポリAシグナルによる3'末端プロセシングが起きる。

制御する可能性がある。Tianらは転写活性が高いときのAPAではポリAシグナル近傍におけるH3K4およびH3K36のメチル化が増大することを示している<sup>13)</sup>。また、クロマチンの修飾が実際に転写だけでなくmRNAプロセシングの効率にも影響することが明らかになりつつある<sup>14)</sup>。このようにヒストンコードと呼ばれるエピジェネティクスの視点で研究を行うことは転写だけでなくmRNAプロセシングにおいても大事になってきた。

## 5. おわりに

以上述べてきたように、真核生物のmRNA合成研究は「転写」と「プロセシング」のように分類するだけでなく、これらの共役によりmRNAが合成されるという捉え方により近年大きく展開してきた。また、両者のネットワークの中にはPAF1複合体のようなヒト疾患関連因子も存在することがわかってきた。このような因子に着目した研究はmRNA 3'末端プロセシングの分子機構に関する新たな知見が得られるだけでなく、ヒト疾患の発症機構の解明や新たな治療法の開発へとつなげていくことが可能になると考えており、さらに研究を進めたい。

1) Hirose, Y. & Manley, J.L. (2000) *Genes Dev.*, 14, 1415–1429.

- 2) Shi, Y., Di Giammartino, D.C., Taylor, D., Sarkeshik, A., Rice, W.J., Yates, J.R., 3rd, Frank, J., & Manley, J.L. (2009) *Mol. Cell.*, 33, 365–376.
- 3) McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M., & Bentley, D. L. (1997) *Nature*, 385, 357–361.
- 4) Hirose, Y. & Manley, J.L. (1998) *Nature*, 395, 93–96.
- 5) Dantonel, J.C., Murthy, K.G., Manley, J.L., & Tora, L. (1997) *Nature*, 389, 399–402.
- 6) Mapendano, C.K., Lykke-Andersen, S., Kjems, J., Bertrand, E., & Jensen, T.H. (2010) *Mol. Cell.*, 40, 410–422.
- 7) Ni, Z., Schwartz, B.E., Werner, J., Suarez, J.-R., & Lis, J.T. (2004) *Mol. Cell.*, 13, 55–65.
- 8) Ahn, S.H., Kim, M., & Buratowski, S. (2004) *Mol. Cell.*, 13, 67–76.
- 9) Rozenblatt-Rosen, O., Nagaike, T., Francis, J.M., Kaneko, S., Glatt, K.A., Hughes, C.M., LaFramboise, T., Manley, J.L., & Meyerson, M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 755–760.
- 10) Nagaike, T., Logan, C., Hotta, I., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M., & Manley, J.L. (2011) *Mol. Cell.*, 41, 409–418.
- 11) Xiang, K., Nagaike, T., Xiang, S., Kilic, T., Beh, M.M., Manley, J.L., & Tong, L. (2010) *Nature*, 467, 729–733.
- 12) Di Giammartino, D.C., Nishida, K., & Manley, J.L. (2011) *Mol. Cell.*, 43, 853–866.
- 13) Ji, Z., Luo, W., Li, W., Hoque, M., Pan, Z., Zhao, Y., & Tian, B. (2011) *Mol. Syst. Biol.*, 7, 534.
- 14) Sims, R.J. 3rd, Millhouse, S., Chen, C.F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L., & Reinberg, D. (2007) *Mol. Cell.*, 28, 665–676.

## 著者寸描

●**杉本 (永池) 崇** (すぎもと (ながいけ) たかし)

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門研究員、博士 (生命科学)。

■**略歴** 1976年栃木県に生る。2000年東京大学工学部化学生命工学科卒業。05年同大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻修了 (指導教官: 上田卓也教授)。博士 (生命科学)。05~10年コロンビア大学にて博士研究員 (Supervisor: Dr. James Manley)。10年産総研バイオメディカル研究部門特別研究員。12年から現職。

■**研究テーマと抱負** ヒトRNAの3'末端プロセシングの研究。ヒト疾患の発症メカニズム解明など医科学の発展にもつながるようなRNA研究をしたい。

■**趣味** スポーツ観戦 (テニス, ベースボール, サッカーなどいろいろ)。