



Title	Alternative Splicing of Staufen2 Creates the Nuclear Export Signal for CRM1(Exportin 1)
Author(s)	三木, 貴司
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46301">https://hdl.handle.net/11094/46301</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	三 木 貴 司
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20058 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Alternative Splicing of Staufen2 Creates the Nuclear Export Signal for CRM1 (Exportin 1) (Staufen2 の選択的スプライシングは CRM1 (Exportin 1) に対する核外移行シグナルを生成する)
論文審査委員	(主査) 教授 米田 悦啓  (副査) 教授 遠山 正彌 教授 内山 安男

### 論文内容の要旨

#### [ 目的 ]

神経細胞における樹状突起への mRNA 局在化は、神経活動に応じて時間的・空間的に制御された蛋白質合成を可能にしている。樹状突起への mRNA 輸送担体として、RNA granule と呼ばれる RNA-蛋白質複合体がある。種々の mRNA、RNA 結合蛋白質、リボソーム、翻訳因子、モーター蛋白質などが RNA granule を構成していることが報告されているが、それらの構成因子がいかなる過程を経て RNA granule に組み入るのか、つまり RNA granule の形成メカニズムは全く不明である。

Staufen2 (Stau2) は RNA granule 構成因子の 1 つである RNA 結合蛋白質であり、樹状突起への mRNA 輸送に寄与している。しかし、Stau2 により樹状突起に輸送される mRNA が、核内で転写により作られた後、どの段階で Stau2 と複合体を形成し、RNA granule に組み込まれるのかは不明である。1 つのモデルとして、Stau2 が核内で mRNA と結合した後、核外輸送され、細胞質で RNA granule に組み込まれるという可能性が考えられる。このモデルの前提として、Stau2 は細胞質と核の間をシャトルしている必要がある。本研究では、Stau2 が核-細胞質間をシャトルしているかどうかを確かめ、さらにそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

#### [ 方法ならびに成績 ]

Stau2 は分子内に 4 つの二本鎖 RNA 結合ドメイン (RBD) を有する蛋白質であり、主に細胞質に局在する。Stau2 の細胞内局在に寄与するドメインを決定するため、様々な deletion mutant を作製し、GFP 融合蛋白質として HeLa 細胞に発現させ、それらの局在を蛍光顕微鏡観察した。その結果、RBD3 と RBD4 の間のドメインが Stau2 の核内移行を、RBD3 が Stau2 の核外移行を担っていることが示された。これにより、Stau2 が核-細胞質間をシャトルしていることが明らかとなった。

選択的スプライシングにより生成される Stau2 の 4 つの isoform の 1 つ Stau2<sup>62</sup> の RBD3 に point mutation を導入し (Stau2<sup>62</sup>RBD3\*) RNA 結合活性を失わせると、Stau2<sup>62</sup>RBD3\* は核に集積した。野生型 Stau2<sup>62</sup> を発現させた HeLa 細胞を、蛋白質核外輸送因子 CRM1 の阻害剤 leptomycin B (LMB) で処理しても Stau2<sup>62</sup> は核に集積しな

かったことから、RBD3 に依存した Stau2<sup>62</sup> の核外輸送は CRM1 以外の核外輸送因子に担われていることが示唆された。一方、別の isoform である Stau2<sup>59</sup> の RBD3 に point mutation を導入したところ、Stau2<sup>59</sup>RBD3\* は核に集積せず細胞質に局在した。Stau2<sup>59</sup>RBD3\* を発現させた HeLa 細胞を LMB で処理すると、Stau2<sup>59</sup>RBD3\* は核に集積した。野生型 Stau2<sup>59</sup> は LMB 処理により核集積しなかった。さらに RNAi による CRM1 のノックダウンでも同様の結果が確かめられた。これらの結果から、Stau2<sup>59</sup> には 2 つの核外輸送経路、つまり RBD3 を介した経路と CRM1 に依存した経路が存在することが示された。

Stau2<sup>62</sup> と Stau2<sup>59</sup> の構造は N 末のみが異なるため、Stau2<sup>59</sup> の N 末端に CRM1 により認識される核外移行シグナル (NES) が存在することが予想された。Stau2<sup>62</sup> と Stau2<sup>59</sup> の N 末端を GFP 融合蛋白質として HeLa 細胞に発現させたところ、Stau2<sup>59</sup> の N 末端のみが細胞質に局在し、さらにこれは LMB 処理により阻害された。CRM1 により認識される NES の多くはロイシンなどの疎水性アミノ酸を多く含んだ 10 残基前後の配列である。Stau2<sup>59</sup> の N 末端付近の配列 INQMFSVQLSL はこの特徴に合致した。そこで INQMFSVQLSL を GFP 融合蛋白質として HeLa 細胞に発現させたところ、GFP-INQMFSVQLSL は細胞質に局在し、さらにこれは LMB 処理により阻害された。この結果から、配列 INQMFSVQLSL が Stau2<sup>59</sup> の CRM1 に対する NES として同定された。

以上より、HeLa 細胞において Stau2 は核-細胞質間をシャトルしており、Stau2<sup>62</sup> は RBD3 を介して、Stau2<sup>59</sup> は RBD3 を介する経路と CRM1 に依存した経路の 2 つの経路で核外輸送されることが示された。さらに、初代培養ラット神経細胞においても Stau2 が同様の挙動を示すことが確認された。

#### [ 総括 ]

本研究では、神経細胞における樹状突起への mRNA 輸送担体 RNA granule の構成因子である RNA 結合蛋白質 Stau2 の細胞内挙動が解析された。その結果、Stau2 が核-細胞質間をシャトルしていることが示された。現時点では Stau2 が核内で mRNA と結合しているかどうかは不明であるが、この結果から、Stau2 が核内で mRNA と結合した後、核外輸送され、RNA granule に組み込まれる可能性が示唆された。また、本研究において Stau2 の isoform 間の機能差が初めて明らかとなった。つまり、Stau2<sup>62</sup> が RBD3 を介して核外輸送されているのに対し、Stau2<sup>59</sup> は RBD3 を介した経路と CRM1 による経路の 2 つの経路で核外輸送されることが示された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究において、申請者は神経細胞における樹状突起への mRNA 輸送担体 RNA granule の構成因子 Stau2 (Stau2) に着目し、Stau2 の核-細胞質間挙動を解析した。申請者は Stau2 deletion mutant の細胞内局在解析により、Stau2 の核内移行ドメインおよび核外移行ドメインを同定し、Stau2 が核-細胞質間をシャトルしていることを見出した。さらに、isoform の一つ Stau2<sup>62</sup> が二本鎖 RNA 結合ドメイン 3 (RBD3) を介して核外輸送されているのに対し、Stau2<sup>59</sup> には RBD3 を介した経路に加え、N 末端に存在する核外移行シグナルを介した CRM1 による核外輸送経路が存在することを見出した。これは、Stau2 が核内で多様な RNA と結合し、RNA granule に輸送している可能性を示唆する重要な発見であり、RNA granule の形成機構および神経細胞における mRNA 輸送機構の解明につながる事が期待される。このような理由から、申請者は学位の授与に値すると考えられる。