

論文の内容の要旨

論文題目 ヒトU2AF⁶⁵タンパク質のRNA結合ドメインに関する構造生物学的研究

氏名 伊藤拓宏

真核生物において、pre-mRNA からイントロンを切り出してエキソンのみがつながった mature mRNA を作り出すスプライシングは、正確な遺伝子の発現やその発現の調節に重要な役割を果たしている。human U2 small nuclear ribonucleoprotein particle auxiliary factor (hU2AF) はヒト由来のスプライシングに必須なタンパク質のひとつである。hU2AF はイントロン中の 3'スプライス部位の近傍に存在するピリミジンに富む配列 (polypyrimidine tract 以下 PPT と略す) に結合する。それによりスプライシング反応の 3'スプライス部位が決定し、U2 snRNP をはじめとしたスプライソソームの構成分子が集まり、スプライシング反応が進行すると考えられている。hU2AF は大小二つのサブユニットからなるタンパク質であり、前述した PPT への結合活性は大サブユニットである hU2AF⁶⁵ が担っている。hU2AF⁶⁵ は 475 アミノ酸残基からなるタンパク質であり、RNA 結合ドメイン (RNA binding domain, 以下 RBD と略す) を 3 つタンデムに有する。hU2AF⁶⁵ の PPT への結合活性はこれらのドメインに由来する。

hU2AF⁶⁵ の RBD1 および RBD2 のドメインは PPT を認識しうる最小単位であると考えら

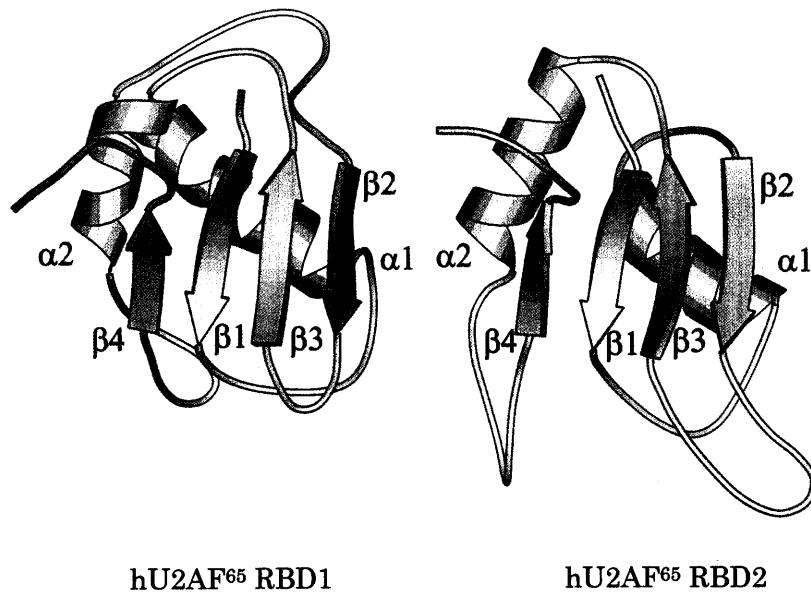


図 2 NMR 法によって決定された hU2AF⁶⁵ RBD1 および RBD2 の立体構造のリボンモデル

よってヒト以外の他種の U2AF においても RBD1 と RBD2 はヒトと同様の立体構造であり、hU2AF⁶⁵ RBD1 の $\alpha 1$ から $\beta 3$ の特異な構造は U2AF の何らかの機能に参与していることが予想される。

次に RNA を混合していく chemical shift perturbation 実験を hU2AF⁶⁵ RBD1 および RBD2 についておこなった。RNA の配列には、U₅C₃U₅ と ACUCU₄CACAUAG, A₁₅ を用いた。RNA を加えたときの RBD1 および RBD2 の化学シフトの変化は、U₅C₃U₅ や ACUCU₄CACAUAG の場合の方が A₁₅ の場合と比較して非常に大きかった。よって RBD1 と RBD2 はドメイン 1 つの状態でも配列特異性をもつことが明らかになった。また RBD と RNA との結合の交換速度は NMR の時間スケールで速い交換速度であった。NMR スペクトルの変化より得られた解離定数より、RBD1 よりも RBD2 のほうが標的 RNA への結合が強いことが明らかになった。U₅C₃U₅ を混合した場合と ACUCU₄CACAUAG を混合した場合を比較すると、化学シフトの変化のパターンはほとんど同様であった。RBD1 と RBD2 とともに、標的 RNA の添加にしたがって、 α リックス側よりも β シート側の化学シフトが大きく変化したが、RBD1 と RBD2 とを比較すると β シート側の化学シフトの変化に一部違いが見られた。hU2AF⁶⁵ RBD1 に特異的であった $\alpha 1/\beta 2$ ループ周辺の領域は他種の U2AF でもアミノ酸配列が保存されていたが、RNA 結合活性には関与していないことがこの実験

により明らかになった。一連のスプライシング反応において RNA 結合ではなく、タンパク質-タンパク質相互作用のような何らかの他のステップにこの領域が寄与している可能性がある。

次に、hU2AF⁶⁵の複数の RBD による PPT の認識機構を解析した。解析のためのタンパク質には hU2AF⁶⁵ RBD1-RBD2 を、PPT の配列には U₄C₂U₄G を用いることを NMR 法により決定した。まず非結合状態の hU2AF⁶⁵ RBD1-RBD2 の化学シフトの帰属をおこなったところ、ドメインの領域の化学シフトは、ひとつのドメインのみを解析したときの化学シフトにほぼ等しかった。2 つのドメインがつながった状態でも、ドメイン部分の立体構造が 1 つのドメインのみで解析したときの構造に等しいことを示している。ドメインをつなぐリンカー領域については、二次構造を特徴付ける NOE が観測されないことや、¹H-¹⁵N NOE 値が 0 に近い非常に小さい値であることから、フレキシブルな構造であることが明らかになった。次に U₄C₂U₄G および A₁₁ を加えていく chemical shift perturbation 実験をおこなった。U₄C₂U₄G の場合、RBD1 と RBD2 のドメイン部分と各ドメインの C 末端側の領域における化学シフトの変化は、それぞれのドメインを用いた chemical shift perturbation 実験に合致する結果が得られた。また、ひとつの RBD の場合と比較して RBD1-RBD2 の場合には結合状態と非結合状態との交換の時間スケールがより遅く、結合はより強いことが明らかになった。ドメインをつなぐリンカー部分の C 末端側の領域に関しては、化学シフトがほとんど変化せず、PPT との結合状態での¹H-¹⁵N NOE 値は非結合状態と比較してほとんど変化しなかったため、PPT との結合に従う構造変化はほとんどないことが示唆された。2 つの RBD と標的 RNA の複合体の立体構造が明らかにされている Sxl タンパク質や poly-A 結合タンパク質、nucleolin の場合には、標的 RNA への結合に伴ってリンカー領域がヘリカルな構造をとり、2 つの RBD が共同的により強固に RNA と結合する機構が知られている。しかしながら、hU2AF⁶⁵ RBD1-RBD2 にはそのような機構は存在せず、これらのタンパク質とは異なる様式で PPT を認識していると考えられる。部位特異的スピンラベル法による実験結果からは、hU2AF⁶⁵ の RBD2 が PPT の 5'末端側を、RBD1 が 3'末端側を認識していることが示唆された。このような標的 RNA の認識様式は前述の Sxl タンパク質や poly-A 結合タンパク質、nucleolin の場合と共通している。NMR 法より得られた情報から、hU2AF⁶⁵ RBD1-RBD2 による PPT の認識様式のモデルを構築した。