

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 をはじめとしたスライ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

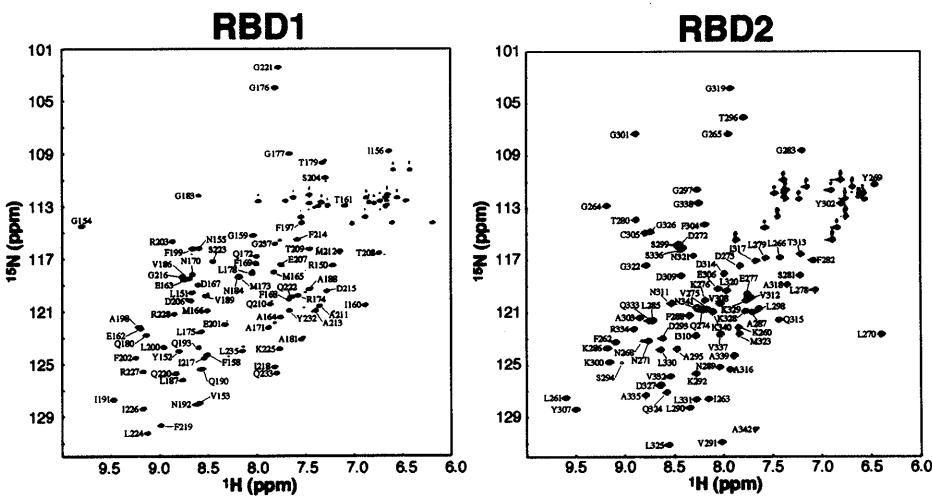


図 1 hU2AF⁶⁵ RBD1 および RBD2 の 2D ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル

れたため、はじめにこれらのドメインの立体構造解析を NMR 法によりおこなった。NMR 法による解析の結果、RBD1 と RBD2 はともに $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ という現在までに知られている他の RBD と同様の二次構造であることが明らかになった(図 1、図 2)。特に RBD2 に関しては、アミノ酸配列から予想されていた二次構造に一致し、立体構造も一般的な RBD と類似していた。一方で RBD1 に関しては、 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ という二次構造を保持しつつも、特異な構造が見いだされた。まず、hU2AF⁶⁵ RBD1 の α_1 ヘリックスは典型的な RBD と比較して C 末端側に 1 ターン長く、13 残基からなる。hU2AF⁶⁵ RBD1 の中で最も特徴的な構造は α_1/β_2 ループであり、12 残基と長く、他の RBD にはない疎水的相互作用が存在する。結果的に β_2 ストランドは A188 から N192 の AVQIN の領域になるが、このことはアミノ酸配列を用いた単純な二次構造予測では予想できなかった。hU2AF⁶⁵ RBD1 の β_3/α_2 ループにも他の RBD と異なる点がある。まず、ループの長さが 5 残基と他の RBD と比較して少し長い。そして V205 の側鎖が特徴的な α_1/β_2 ループの領域と疎水性相互作用をしている。hU2AF⁶⁵ RBD1 の α_2 ヘリックスは 9 アミノ酸残基からなり、通常は 10–11 残基からなる他の RBD の α_2 ヘリックスと比較すると N 末端側が 1/2 ターンだけ短い。

マウスなどのいくつかの真核生物より hU2AF⁶⁵ のホモログがクローニングされている。S. pombe を除いた U2AF に関しては、RBD1 と RBD2 の全領域にわたってアミノ酸配列の相同意が高い。また hU2AF⁶⁵ RBD1 の α_1 から β_3 の領域に関しては RBD としては特異的であったが、この領域においても他種の U2AF との間でアミノ酸配列の保存性が高い。

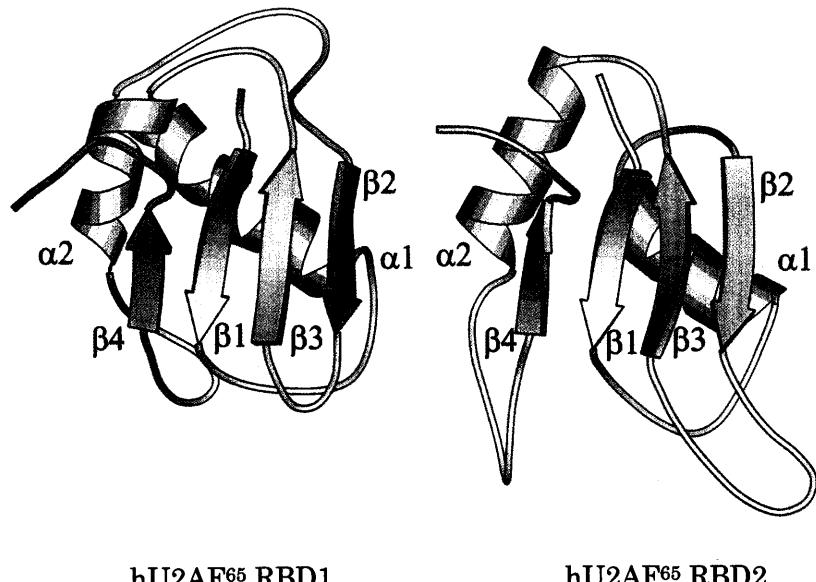


図2 NMR法によって決定された hU2AF⁶⁵ RBD1 および RBD2 の立体構造のリボンモデル

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α1 からβ3 の特異な構造は U2AF の何らかの機能に関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α1/β2 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。部位特異的スピニ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。