

論文の内容の要旨

論文題目 高等真核細胞における mRNA poly(A)鎖分解制御機構の解析

氏 名 土井 祐介

【序論】

真核生物における遺伝子発現は、核内での mRNA への転写、スプライシング、5'-cap 構造および 3'-poly(A)鎖の付加などを経た後、核から細胞質へと輸送され、タンパク質に翻訳されるというように連続的に進行する。真核細胞では、転写と翻訳の場が核膜によって物理的に遮断されているため、遺伝子発現を調節することを考えた場合、転写レベルでの調節だけではなく転写以降の調節、すなわち翻訳量や mRNA 量の調節も重要であると考えられる。なかでも細胞質における mRNA 量(mRNA の安定性)を制御することは、細胞が必要なタンパク質を必要な量だけ産生する上で理に適っている。通常の mRNA 分解は 3'-poly(A)鎖の分解を引き金としてはじめて行われるが、翻訳中の poly(A)鎖にはポリ(A)結合蛋白質 PABP が結合し、無秩序に分解されることを防いでいる。したがって、mRNA の安定性を制御する上で、PABP は非常に重要な役割を担っていると考えられる。

このような中で、当研究室では先に翻訳終結因子 eRF3 として同定していた GSPT が翻訳終結過程を制御するのみならず、PABP と相互作用し mRNA 分解にも寄与することを出芽酵母を用いた解析により示してきた。また、翻訳終結と共役した形で、poly(A)鎖分解酵素である PAN 複合体および CAF1/CCR4 複合体が

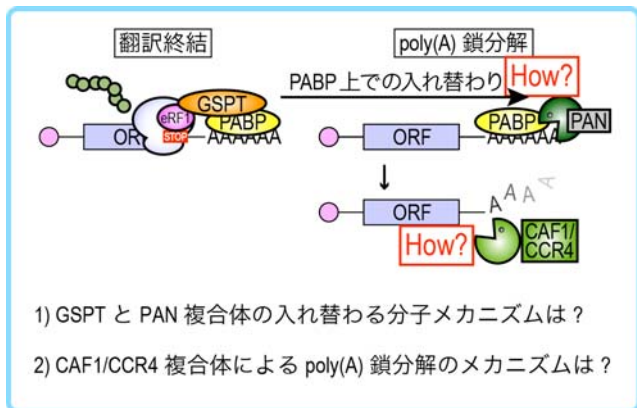


図 1 poly(A)鎖分解に残された未解明な点

poly(A)鎖分解を制御することを明らかにした。さらに poly(A)鎖分解の最も初期段階においては翻訳終結後の GSPT が PABP 上で PAN 複合体と入れ替わり、翻訳終結から poly(A)鎖分解が連続して進行するモデルを提示している。

しかしながら、この入れ替わりがどのように起こるか、また、poly(A)鎖分解の大部分を担うと考えられる CAF1/CCR4 複合体による poly(A)鎖分解のメカニズムに関しては明らかでなく、この点を解明することを目的として研究を行った(図 1)。この際、出芽酵母では生化学的解析が困難であったため、系を高等真核細胞に移して行うこととした。

【結果】

1. PABP 上で GSPT と PAN 複合体とが入れ替わる分子メカニズム

mRNA poly(A)鎖分解の初期における PABP 上での GSPT と PAN 複合体の入れ替わりのメカニズムを解析するにあたり、PABP と両者の結合に着目した。GSPT と PABP との結合に関しては詳細な解析がなされており、PABP の C 末端側領域—なかでも進化上よく保存された約 75 アミノ酸残基からなる PABC ドメイン—を特異的に認識する配列(PABC 結合モチーフ)が GSPT の N 末端側領域に同定されている。一方、PAN 複合体に関しては、PABP との結合サブユニットである Pan3 が PABP の C 末端側と相互作用することおよびこの相互作用は GSPT によって競合されることを見出している。そこで、この入れ替わりは PABC ドメインと PABC 結合モチーフという共通のドメイン間相互作用により制御されるのではないかと考え、Pan3 の一次配列を検索した結果 GSPT の PABC 結合モチーフ様の配列を N 末端側に二つ見出した。実際にこの配列が PABP との結合に必要なかを、配列中に点変異を導入した変異体を用いて検討したところ、二つ目の配列が結合に必要なことが明らかとなった(図 2 A)。さらに、PABP 側の結合ドメインを決定するために、PABC ドメインに点変異を導入した変異体を作製し、Pan3 との結合を免疫沈降により検討した結果、Pan3 は PABC ドメインを介して PABP と結合することを見出した(図 2 B, C)。すなわち Pan3 と PABP は PABC ドメインとその結合モチーフにより相互作用することが明らかとなった。

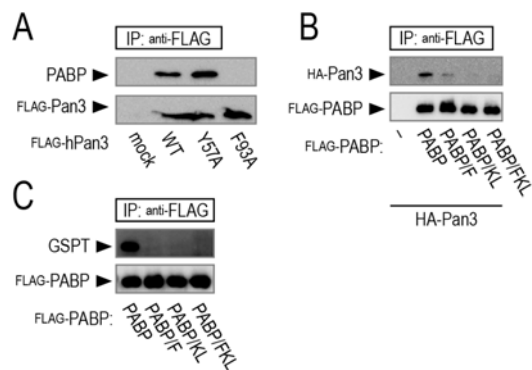


図 2 PABC ドメインを介した Pan3 と PABP の相互作用

以上より、poly(A)鎖分解の初期における PABP 上での GSPT と PAN 複合体の入れ替わりは PABC ドメインと PABC 結合モチーフという共通のドメイン間相互作用によることが強く示唆された。

2. CAF1/CCR4 複合体と PABP との相互作用に介在する因子 Tob の同定

出芽酵母による解析から、CAF1/CCR4 複合体は PABP と相互作用するものの、その結合は直接的なものではなく、何らかの分子が介在することが示唆された。そこで、CAF1/CCR4 複合体と PABP との相互作用に介在する因子を想定し、その探索を行うこととした。

CAF1/CCR4 複合体と PABP との結合に介在する因子もまた PABC 結合モチーフに相当する配列を有するものと考え、CAF1/CCR4 複合体と相互作用することが報告されている分子の中から、PABC 結合モチーフに類似の配列を持つ分子を検索した。その結果、CAF1 の相互作用因子の中から PABC 結合モチーフ様の配列を一分子中に二つ有する分子 Tob1、Tob2 を見出した。

このような方法で見出した Tob1 の cDNA を HeLa 細胞より単離し、PABP との相互作用を免疫沈降法により検討した結果、両者は細胞内で実際に結合することが確認された。また、PABC 結合モチーフ様配列を欠く欠損変異体および配列中に点変異を導入した変異体を作製し PABP との結合を検討したところ、C 末端側の配列が結合に必要であることが明らかとなった(図 3 A)。さらに PABP 側の相互作用部位を明らかにする目的で、PABC ドメインに点変異を入れた変異型 PABP を用いて Tob1 との相互作用を検討した。その結果、Tob1 は変異型 PABP には結合できないことが判明した。以上より Tob と PABP との結合もまた PABC 結合モチーフ-PABC ドメインによることを明らかとした(図 3 B)。

Tob は CAF1 と相互作用する一方で PABP とも結合することが明らかとなった。そこで、三者が同時に結合しうるかどうかを免疫沈降法により検討した結果、CAF1/Tob/PABP は三者複合体をとることが明らかとなった(図 3 C)。その後の解析により、Tob は翻訳中の mRNA 上への分布が認められたことから、PAN 複合体による poly(A)鎖分解と同様、PABP が Tob を介して CAF1/CCR4 複合体の poly(A)鎖分解に寄与することが期待された。

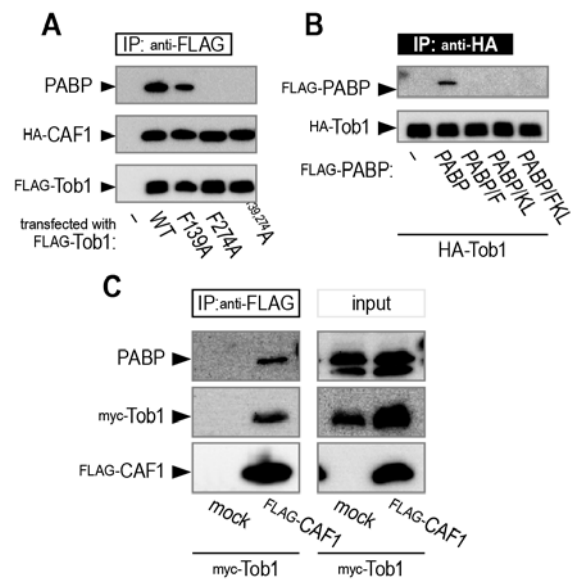


図 3 CAF1/CCR4 複合体と PABP との相互作用に介在する因子 Tob

3. PABP の Tob を介した CAF1/CCR4 複合体の poly(A)鎖分解活性の亢進

CAF1, CCR4 はともにヌクレアーゼドメインを有していたため、どちらが poly(A)鎖分解活性の本体であるか *in vitro* ヌクレアーゼアッセイにより検討することとした。種々の RNase を活性化することで知られている spermidine 存在下、遺伝子導入した培養細胞より精製した CAF1 標品に poly(A) RNA 分解活性を認めたものの、CCR4 は活性を示さなかった(図 4 A)。したがって、高等真核細胞の CAF1/CCR4 複合体においては CAF1 が活性本体であると考え、以降は CAF1 の poly(A)鎖分解活性を CAF1/CCR4 複合体のそれとみなして解析を行った。

CAF1/CCR4 複合体の poly(A)鎖分解活性に対する PABP の寄与を検討するため、遺伝子導入した培養細胞より CAF1 を含む画分を精製し、その poly(A) RNA 分解活性に対する PABP の添加効果を検討することにした。PABP は大腸菌から精製した GST-PABP を用いた。まず、GST-PABP を添加しないときについてである。Spermidine 存在下においては CAF1 さえ存在すれば poly(A) RNA の分解が認められたが、非存在下においては、CAF1

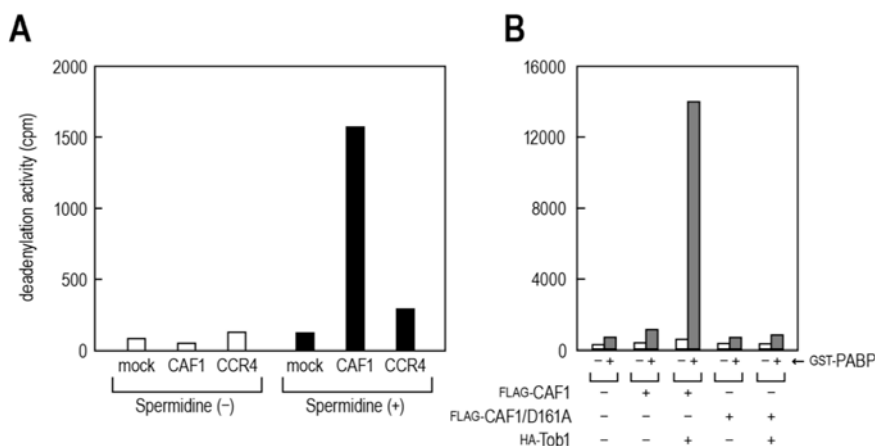


図 4 PABP の Tob を介した CAF1 poly(A)鎖分解活性の亢進

を含む画分においても活性がみられなかった。そこで、spermidine 非存在下において GST-PABP を添加したところ、CAF1 とともに野生型 Tob1 を遺伝子導入した培養細胞から得られた画分にも、poly(A) RNA 分解活性を認められた(図 4 B)。すなわち、PABP は Tob 依存的に CAF1/CCR4 複合体の poly(A)鎖分解活性を亢進することを明らかにした。

4. 細胞内における CAF1/CCR4 複合体の poly(A)鎖分解機構の解析

in vitro で明らかにした PABP による CAF1/CCR4 複合体の poly(A)鎖分解の制御が、細胞内においても保持されているかを検討するため、培養細胞より調製した mRNA の動態をノザンプロットングにより解析することにした。

PABC 結合モチーフに点変異を導入し PABP との結合能を完全に失った変異型 Tob1 を細胞に過剰発現させ poly(A)鎖分解の速さを解析したところ、poly(A)鎖分解が有意に遅くなった(図 5 A)。また、同様に mRNA の蓄積量についても検討したところ、PABP と結合できない Tob1 変異体を過剰発現させた場合に mRNA の異常な蓄積が認められた(図 5 B)。以上の結果より、PABP は細胞内において PABC ドメインを介して poly(A)鎖分解酵素 CAF1/CCR4 複合体を制御し、mRNA の安定性を制御していることを明らかにした。

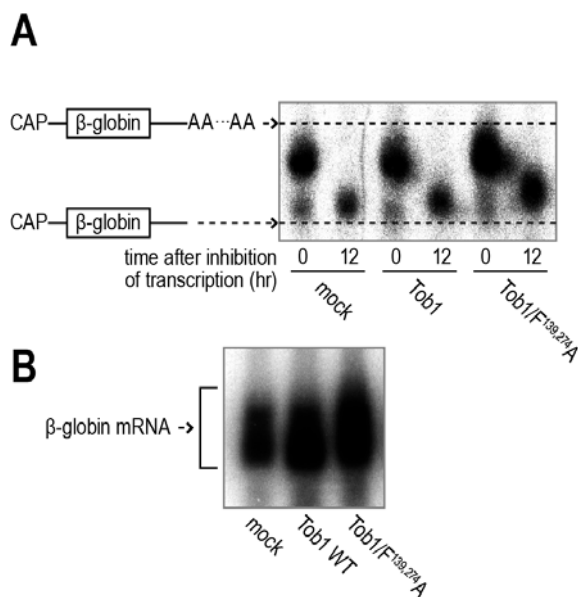


図 5 細胞内における CAF1/CCR4 複合体の poly(A)鎖分解の解析

【まとめと考察】

本研究において、1) poly(A)鎖分解酵素である PAN 複合体および CAF1/CCR4 複合体が PABC ドメインを介して PABP と相互作用すること、2) 高等真核細胞において PABP が Tob を介して CAF1 の poly(A)鎖分解活性を制御し、mRNA の安定性を制御していることを示した。CAF1/CCR4 複合体の poly(A)鎖分解については、*in vitro* における酵素活性につ

いての記述はなされているもののその詳細については明らかになっておらず，PABC ドメインとその結合モチーフによって活性が制御されるという今回の知見はその点において新しい。

以前に我々のグループは，PABP が PAN 複合体の poly(A)鎖分解活性を活性化することや，GSPT の N 末端側領域を欠いた出芽酵母の変異株においては翻訳と共役した poly(A)鎖分解の遅延が見られることを報告している．これらの事象も結合様式を考えると PABC ドメインにより制御されていると推定できることから，本研究の結果と考え合わせ次のようなモデルを想定している(図 6)．翻訳終結因子である GSPT は eRF1 と相互作用することにより翻訳終結反応を促進する一方で，PABC ドメイン上で PAN 複合体と入れ替わり，poly(A)鎖分解が始まる．PAN 複合体は最も初期段階の poly(A)鎖分解を担うと考えられることから，PAN 複合体による poly(A)鎖分解がある程度進むと，今度は Tob を介して CAF1/CCR4 複合体へと入れ替わり，さらに反応が進行する．こうして poly(A)鎖が十分に短くなると，PABP はもはや poly(A)鎖に結合できなくなり，活性化因子を失った CAF1/CCR4 複合体は poly(A)鎖の分解を終え，mRNA 全体の分解へとつながっていく．このように翻訳終結から poly(A)鎖分解への状態シフトがすべて PABC ドメインによって制御されているというモデルである．

PAN 複合体と CAF1/CCR4 複合体の生理的役割の違いについては不明な点が多いが，翻訳終結と poly(A)鎖分解が PABC とその結合モチーフという共通の分子機構で結び付けられたことは大変興味深い．

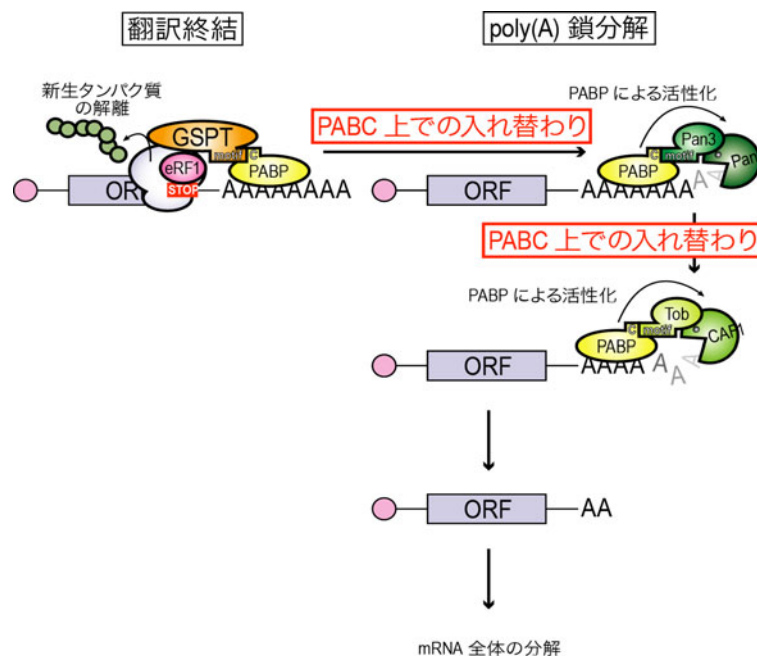


図 6 PABC ドメインを介した翻訳終結から poly(A)鎖分解までの連続した制御モデル