

論文内容の要旨

論文題目

Biochemical and biophysical analysis of MBNL1-associating proteins

RNA 結合タンパク質 MBNL1 (Muscleblind-like1) の相互作用分子の生化学的・生理学的解析

氏名 大西 隼

Muscleblind は、*Drosophila* において光受容体の分化に必須の遺伝子として同定された遺伝子であり、筋分化においても重要な役割を担うことが分かっている。また、近年 pre-mRNA の選択的スプライシング調節因子としての機能が盛んに研究されている。Muscleblind の重要性を理解するための好例として、ヒトの遺伝病である筋強直性ジストロフィー (DM) が挙げられる。一般的な遺伝病のようにタンパク質のコード領域における変異ではなく、DM の原因となる変異は、非翻訳領域のリピート配列 (CUG)_n の異常伸長である。ヒト MBNL1 (Muscleblind-like 1) は、(CUG)_n RNA に結合するタンパク質として同定された。細胞の核内に形成される(CUG)_n リピート foci に捕捉されることによる MBNL1 の機能低下が、DM 発症の主因の一つであると考えられている。これまでのところ MBNL1 の機能としては、スプライシング調節以外にはほとんど報告がなく、相互作用タンパク質の網羅的なスクリーニングの前例もない。

第 1 章では、MBNL1 の機能に関して新たな知見を得ることを目的とし、GST-Pull down assay による相互作用タンパク質のスクリーニングをおこなった。GST/His タグ融合型 MBNL1 を *E.coli* に発現させ、2 段階のアフィニティークロマトグラフィーで精製し Bait とした。これに、マウスの骨格筋、あるいは心筋のホモジネートを混合し反応させたところ、MBNL1 の結合タンパク質候補として約 20 本の特異的なバンドが再現性よく検出された。これらのうち質量分析法(MALDI-TOF/TOF) によって同定されたのは、YB-1 (Y-box binding protein), DDX1 (DEAD-box RNA helicase), Phenylalaninyl-tRNA synthetase α and β subunits, Amylo-1,6-glucosidase, Ribosomal protein S3, Ribosomal protein L7a の7つのタンパク質であった。この中で、スプライシング調節に関わることや、翻訳調節における機能も知られている。

YB-1 に着目し、以降の研究を進めた。

培養細胞に MBNL1 と YB-1 の両タンパク質を強制発現させ、免疫沈降法によって両者の相互作用を確認したところ、特異的な相互作用が確認された。この相互作用は RNaseA の添加によって消失したことから、両者の結合には RNA が介在していることが明らかとなった。続いて、MBNL1 と YB-1 の機能的な相互作用を検討するため、選択的スプライシングアッセイを行った。スプライシングアッセイのレポーター minigene として、スプライシングのモデル系として頻用されている E1A (adenovirus early-region 1A) と、既知の MBNL1 のターゲットである alpha-actinin と clcn1 の三つを用いた。それぞれの minigene とともに、MBNL1 または YB-1 を培養細胞に共発現させたところ、E1A と alpha-actinin の選択的スプライシングが、MBNL1 と YB-1 によって協調的に制御されることが示唆された。

MBNL1 と YB-1 の発現プラスミドを培養細胞に形質導入し、局在を観察したところ、興味深いことに、核内よりもむしろ細胞質の「顆粒状構造体」において MBNL1 と YB-1 の共局在が顕著であった。これを MBNL1 の、スプライシング調節機能以外の細胞質における新規機能を示唆する局在であると考え、第2章では MBNL1 の局在をより詳細に解析することとした。

近年、真核細胞の細胞質における RNA 代謝関連の顆粒状構造体として、Processing bodies (P-bodies) と Stress granules (SGs) が研究の対象となっている。P-bodies は mRNA 分解の場であり、DCP (decapping enzyme) や XRN (exonuclease) など、RNA 分解に関わるタンパク質が局在する。一方、Stress granules (SGs) は、酸化ストレス条件下などに形成される凝集体であり、主要構成タンパク質である TIA1 や、リボソームタンパク質などが局在する。SGs は mRNA の一時的な翻訳抑制、また再翻訳か分解かを決定する mRNA の選別の場であると考えられている。

私は、MBNL1 のポリクローナル抗体を作成し、免疫染色法によって各種培養細胞における MBNL1 の細胞内局在を解析した。MBNL1 はストレスに応答して細胞質に顆粒状構造体を形成することがわかった。MBNL1 が、SGs のマーカーである TIA1 と顆粒状構造体において顕著に共局在したことから、MBNL1 が SGs に局在することが明らかとなったと言える。また YB-1 も同様に SGs に局在した。これらに関しては、過剰発現系でも一貫した結果が得られた。

MBNL1 の欠失変異体による局在解析を行ったところでは Zinc finger motifs が細胞質における顆粒形成においては必要充分であることが明らかとなった。また、各変異体の RNA への結合性と顆粒形成性の間には、相関する傾向がみられた。これは、SGs において MBNL1 が RNA と相互作用することを支持する結果である。

次に P-bodies との共通点と差異点を明らかにしようと試みた。P-bodies のマーカー

タンパク質のひとつである DCP2 を過剰発現させ、ストレス条件下で MBNL1 と共染色したところ、MBNL1 が形成する granules は P-bodies とは区別されることが判明した。さらに、COS-7 において通常時に観察される MBNL1 の細かい顆粒の局在を詳細に観察したところ、その一部は P-bodies と共局在するが、その他は共局在しなかった。これらのことから、通常時に MBNL1 のいずれかの isoform が mRNA 分解に関与をする可能性と、また P-bodies とは異なる機能をもつ顆粒を形成している可能性が考えられた。

さらに SGs の形成過程と、ストレス解除後に SGs が消失していく過程を、MBNL1 と TIA1 を共染色し経時的に観察した。その結果、MBNL1 は TIA1 よりも SGs に局在すること、ストレス解除後の回復期には MBNL1 は TIA1 よりも早く SGs から離散し、核内に戻ることが示唆された。このような SGs 局在タンパク質間における移行速度の差異の発見は新規のものであり、SGs の動態そのものの理解にとっても重要な知見を与えうると考えられる。

本研究では、MBNL1 のスプライシング機能に YB-1 が協調的に作用することが明らかとなった。さらに、MBNL1 のストレス応答に関して新たな知見を得ることができた。