

論文の内容の要旨

Cell-Biological Studies on RNA Granules in

Mammalian Cells

(哺乳細胞における RNA 顆粒の細胞生物学的研究)

氏名 藤村 健

【背景】 遺伝子発現の最終段階に位置する翻訳過程においては、きわめて柔軟かつ迅速な制御が可能となっている。これは mRNA が多様な RNA 結合タンパク質と mRNP complex と呼ばれる複合体を成して存在し全体として時間的/空間的に調節されるためであり、こうした制御機構は環境応答、細胞分化といった高次生命機能発現の基盤になると考えられる。このプロセスに深く関わるのが mRNP より形成される顆粒構造体 (RNA 顆粒) である。

これまで複数種の RNA 顆粒が同定されているが、なかでもほとんどの生物/細胞種で保存されているのが Stress Granule (SG) および Processing Body (P-body) と呼ばれる構造体である。SG はウイルス感染を含むさまざまな細胞ストレスに応じて速やかに形成され、mRNA を封入してタンパク質合成の停止を促し、状況に応じて翻訳を再開させる保管庫ともいうべき役割を果たす。一方、P-body は平常の生理条件下にある細胞にも存在し、SG と同じような保管庫的な機能を持つと同時に細胞質 mRNA の分解や翻訳抑制を担う“場”として発見された。最近では small RNA による RNA サイレncing への関与も示唆されている。また、免疫応答、シナプス活性化や細胞分化などに伴う翻訳制御へのかかわりなど、個体レベルでの重要性も報告されている。

このように、翻訳制御における普遍的な重要性が示唆される SG と P-body であるが、生化学的な単離が困難なことから全構成因子すら判明していない。私はまず SG に注目し、その主要コンポーネントである TIA-1 (T-cell Internal Antigen -1) というタンパク質に結合する因子を yeast two-hybrid 法で探索することで新規 SG 構成因子を同定しようとした。

【結果と考察】 上記のスクリーニングの結果、CUG-BP1 (CUG-Binding Protein 1)及びPCBP2 (Poly-C Binding Protein 2)という RNA 結合タンパク質を TIA-1 との結合因子および新規 SG コンポーネントとして同定した。以下、この二つの因子をプローブとしてそれぞれの SG への局在化メカニズムを検討し、さらにおもに顕微鏡観察にもとづいた SG、P-body の研究を進めた。

< 1 > CUG-BP1 を指標とした SG 形成機構の研究

CUG-BP1 は元々 CUG triplet repeat に結合するタンパク質として同定され、現在では選択的スプライシングや翻訳の開始段階、また mRNA の分解にも関わりとされる極めて多機能な因子である。Yeast two-hybrid 法および免疫沈降法により TIA-1 との結合を確認したのち、免疫染色や GFP 融合タンパク質の発現により細胞内局在を検討したところ、CUG-BP1 は平常状態においてはおもに核内に局在するが、さまざまな細胞ストレスにより SG にも局在するようになることがわかった。CUG-BP1 は 3 つの RNA recognition motif (RRM) という RNA 結合ドメインを持つが、欠失変異体の局在を調べたところ、N 末端から 2 番目と 3 番目の RRM の間に位置する、これまであまり重要とはされていなかった Linker domain という部位が核から細胞質への移行を通じた SG への局在化に不可欠であることが示された。免疫沈降実験から Linker domain は TIA-1 との結合にも必要であることがわかっており、これより CUG-BP1 は Linker domain を通じて TIA-1 (またおそらくそれ以外の因子とも) 相互作用し、適切な mRNP complex に含まれることで細胞内動態、ひいてはその多機能性を制御しているのだろうと考えられる。

ついで、CUG-BP1 やその他に SG への局在が報告されている因子をプローブとして SG の形成メカニズムを解析しようと試みた。具体的には、これらのタンパク質の局在を経時的に観察することでどのように SG がかたちづくられ、多様な因子が一堂に会するのかわかろうとした。この結果、SG 形成は二段階からなることが判明した。第一段階では、翻訳開始因子 eIF2 α のリン酸化に伴い、翻訳の停止した mRNA、またそうした mRNA 同士の凝集を促すタンパク質の局所的な集積が細胞質内で起こり、SG の前駆体となる凝集体が形成される。ついで第二段階においてはそのような SG 前駆体が微小管依存的に融合して大型化し、細胞辺縁部から核近傍に移動しつつ秩序立った空間配置をとる。この形成過程においては dynein のモーター活性は必要とはされず、また微小管も SG 形成が完了したのちの構造体維持には不要である。興味深いことに、通常は核内に局在する CUG-BP1 や HuR などのタンパク質は、この第二段階で初めて効率よく核から SG に移行し、この過程もまた微小管に依存する。以上より、SG 形成は微小管に依存しない過程と依存する過程から成り立ち、特に後者において SG の mobilization および全構成因子の recruitment を通じて効果的な mRNA の集積が可能となることがわかった

< 2 > PCBP2 を指標とした P-body の多様性の研究

PCBP2 は3つの KH domain という RNA 結合モチーフを持ち、翻訳開始段階の促進や mRNA の安定化などを通じて翻訳を活性化する因子として知られている。その局在をタグを付与した融合タンパク質の発現および特異的な抗体を用いた免疫染色により検討したところ、平常状態において PCBP2 は核、細胞質双方に局在し、ストレスに曝された場合 SG のみならず P-body にも集積していることが判明した。PCBP2 の両構造体への局在化には異なる KH domain が利用される。siRNA により PCBP2 を knockdown しても両者に影響はないものの、ライブイメージングから PCBP2 は SG、P-body および細胞質間を活発に行き来していることがわかった。これは、PCBP2 が mRNP remodeling を伴うストレス応答に関与していることを示唆する。

さて、平常の生理条件にある細胞においても PCBP2 はやはり P-body に局在する。興味深いことに PCBP2 は全ての P-body には局在せず、3次元再構築した免疫染色像において定量したところ約40%のP-bodyにおいてのみ明確な局在がみられた。PCBP2は大型の、翻訳抑制された mRNA を多く含む P-body に局在する傾向があり、前述の siRNA の実験結果とあわせて考えれば P-body 形成の後半段階で recruit されるものと思われる。ただし、大型の P-body であれば必ず局在するわけではなく、翻訳阻害剤 puromycin により P-body の大型化を促しても PCBP2 を含む P-body の割合は60%程度に増加するにとどまった。また、FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching)実験から PCBP2 の P-body への局在はダイナミックなプロセスであり、特定の P-body 内にとどまっているのではないことが示された。以上の結果は、おそらく P-body 形成の初期段階で生じた P-body の不均一性を PCBP2 の局在が反映していることを示唆する。PCBP2 がポリソームとも相互作用し、mRNA の安定化や翻訳の促進をもたらす因子であることを考えれば、PCBP2 を含む P-body は、内部に封入された特定 mRNA の翻訳を再開させる働きを持つことが考えられる。また、前後して PCBP1 という PCBP2 と80%以上の相同性をもつ RNA 結合タンパク質も同様に選択的な P-body への局在を示すことを見出した。両者がほとんど同じ RNA と結合することを考えれば、上記の P-body の不均一性は封入されている RNA の種類により生じている可能性が高いと思われる。

そこでマイクロアレイにより、PCBP2 により制御される可能性のある mRNA を探索した。HEK293T 細胞において PCBP2 の knockdown により発現が大きく変動する mRNA を調べたところ、2倍以上の発現変動を示す転写産物が合計400近く得られ、複数の biological pathway が PCBP2 により制御される可能性が示唆された。以上を考慮すると、PCBP2 の選択的な P-body への局在、さらにはそれをもたらす P-body の不均一性が特定の細胞機能の調節に関わっているのかもしれない。