

細胞質で mRNA と結合している蛋白質の解析

Functional analysis of cytoplasmic mRNP proteins.

研究代表者 理化学研究所 細胞生化学研究室 研究員 松本 健

Laboratory of Cellular Biochemistry, RIKEN

Ken MATSUMOTO

A large body of evidence has revealed that RNA binding proteins are involved in many aspects of gene expression. In the cytoplasm of eukaryotic cells mRNA is associated with mRNA binding proteins to form cytoplasmic mRNP (messenger ribonucleoprotein particles). In this study we analyzed the functions of mRNP proteins and tried to isolate novel mRNA binding proteins localized in the cytoplasm. We found that in frog *Xenopus laevis* oocytes FRGY2 and a novel 20 kDa RNA binding protein are cytoplasmic major RNA binding proteins.

1. 研究目的

遺伝子発現の制御機構の解明は今日の生物学における主要な課題の一つである。真核細胞では、転写によって合成された RNA が、核内でのプロセッシングを経たのち細胞質に運ばれて蛋白質へと翻訳される。mRNA は、細胞内ではつねに特定の蛋白質との複合体として存在すると考えられ、核内で mRNA およびその前駆体と結合する蛋白質については解析が進められている。一方、細胞質で mRNA をパッケージしている蛋白質はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、細胞質から mRNA-蛋白質複合体(mRNP)を精製し、構成蛋白質の構造と機能を明らかにすることを目的とした。

本研究で単離、同定を目指している蛋白質の機能としては、mRNA の核外輸送に働いたり、mRNA をパッケージングすることによって RNA を

分解から守り、コンパクトな構造にまとめることのほか、翻訳装置と共同あるいは拮抗することによって蛋白質合成に関与することが考えられる。申請者はこれまで、アフリカツメガエルの卵母細胞の細胞質で RNA と結合して翻訳を抑制する Y-ボックス蛋白質について研究してきた。卵母細胞では受精後の発生に備えて多くの mRNA が細胞質に貯蔵されており、mRNA に結合する蛋白質を豊富に含んでいる。しかし、mRNA が細胞質に輸送されたのちに結合し、RNA のパッケージングにかかわると考えられる蛋白質としては Y ボックス蛋白質が知られているのみである。ヒトの細胞の核内で(pre-)mRNA に結合している蛋白質が約 20 種類ほど存在することから考えて、細胞質での RNA 結合蛋白質も Y ボックス蛋白質以外にも少なくともいくつか存在すると考えられ、これらが、転写後の

遺伝子発現制御に重要な働きをしていることは十分予想される。本研究により、これまで研究の遅れていた新たな遺伝子発現制御段階を明らかにできると考えられる。そこで、本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞を材料に用いて、すでに mRNP の主要 RNA 結合蛋白質として知られる Y ボックス蛋白質 FRGY2 の解析をすすめるとともに、新たな RNA 結合因子の単離解析を目指した。

2. 研究結果

2.1 FRGY2-RNA 複合体の形成

卵母細胞では転写は活発であるが、合成された mRNA は細胞質に運ばれた後、その多くがメッセンジャーリボ核酸蛋白質複合体（貯蔵 mRNP）として蓄えられている（mRNA マスキングとよばれる）。貯蔵 mRNP には特定の mRNA を翻訳させずに安定に保存するという機能がある。そこで、卵母細胞の貯蔵 mRNP 構成因子である FRGY2 と mRNA とを試験管内で混合し、複合体を形成させる条件を検討した。大腸菌内で大量発現させた組替え体 FRGY2 を精製し、³²P で標識した特定の mRNA と混合したのち、非変性条件下でポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なうと、FRGY2 の量を増やすにしたがって RNA の移動度が小さくなり、RNA-蛋白質複合体の形成が確認された。次に mRNA あるいはこの FRGY2-mRNA 複合体を、広く用いられているウサギ網状赤血球ライセートの無

細胞蛋白質合成系に加えたところ、裸の mRNA からはコードする蛋白質の合成が見られたが、複合体では蛋白質合成は見られなかった。この結果は、mRNA が一種類の RNA 結合蛋白質 FRGY2 と複合体を作ることにより蛋白質合成が阻害されることを示し、今回試験管内で再構成した FRGY2-mRNA 複合体が卵母細胞での貯蔵 mRNP の機能を持つことを示唆している。

mRNP の機能として翻訳抑制のほかに RNA を RNA 分解酵素による分解から守ること、長い mRNA をコンパクトに細胞内に収めること、が考えられる。そこで次に FRGY2 との複合体形成により mRNA の RNA 分解酵素感受性が変化するかどうか検討した。その結果、裸の mRNA に比べて FRGY2 と複合体をつくった mRNA は RNA 分解酵素感受性が 5-10 倍下がりがり、分解されにくくなっていることがわかった。複合体形成により mRNA がコンパクトな構造になっているかどうかは、現在検討している。

2.2 新規 RNA 結合因子の単離

卵母細胞からオリゴ dT セルロースを用いて mRNA に結合する蛋白質の単離を試みた。溶出画分に豊富に含まれる 20kD 蛋白質の cDNA クローニングを行ったところ、グリシンに富む領域をもつ RNA 結合蛋白質であった。抗体を作製してウエスタンブロットティングを行った結果、この蛋白質は卵母細胞では主として細胞質

に存在することがわかった。カエルでの組織分布を見ると、卵巣のほか、精巣と脳に多量に存在し、肝臓と腎臓にも検出された。大腸菌で作製したこの蛋白質の組換え体の RNA 結合活性をフィルター結合法によってしらべたところ、N 末の RNA 結合モチーフのみならず、C 末側の glycine-rich 領域も単独で RNA に結合した。

細胞に放射標識した mRNA をマイクロインジェクションし、その細胞ライセートを UV 照射すると、細胞内で mRNA に結合した蛋白質を検出することができる。この方法で、カエル卵母細胞の主要な mRNA 結合蛋白質を検出すると、約 60 kD と約 25 kD の蛋白質がみられた。免疫沈降の結果これまでに、60 kD 蛋白質は、上述の FRGY2 蛋白質であることがわかってきた。

今回新たに同定した上述の 20 kD 蛋白質の抗体を用いると、25 kD の RNA 結合蛋白質が免疫沈降された。つまり、20 kD 蛋白質は、卵母細胞の細胞質における主要な mRNA 結合蛋白質であることがわかった (UV 照射後に分子量が大きくなるのは、RNA 断片がクロスリンクしているためと考えられる)。FRGY2 は卵母細胞において翻訳されていない mRNA に豊富に結合して mRNP を形成していると考えられている。そこで、FRGY2 と 20 kD 蛋白質が同一の mRNA に結合するかどうかをゲルシフト法によって調べた。その結果、FRGY2 がある程度以上存在して RNA と複合体を

作っていると、20 kD 蛋白質はその RNA に結合できないことがわかった。

20 kD の RNA 結合蛋白質の細胞質での存在状態を見るため、卵母細胞ライセートを分画した。この蛋白質は 100,000 x g 沈殿画分に見いだされ、シヨ糖密度勾配遠心法ではリボソームと同じ 80 S 画分に存在していた。高塩や RNase 処理で 100,000 x g 上清画分に移行することから、この蛋白質は細胞内ではリボソームと結合して翻訳調節にかかわっている可能性が考えられる。

3. 研究成果

試験管内で、貯蔵 mRNP の機能を持つ RNA-蛋白質複合体を再構成することができた。卵母細胞に大量に発現している RNA 結合蛋白質を同定、クローニングし、その機能の解明に向けた検討を行なった。

4. 今後の課題

再構成した FRGY2-mRNA 複合体の構造を明らかにし、これとの比較を通じて細胞内の mRNP の構造、構成因子を明らかにしたい。

5. 発表論文

1. Matsumoto, K., Nagata, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Kikuchi, A., and Tsujimoto, M. (1999) Sperm chromatin decondensation by template activating factor-I through direct interaction with basic proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 6940-6952.

2. Matsumoto, K., Nagata, K., Okuwaki, M., and Tsujimoto, M. (1999) Histone- and chromatin-binding activity of template activating factor-I. *FEBS Lett.*, 463, 285-288.
3. Matsumoto, K., Aoki, K., Dohmae, N., Takio, K., and Tsujimoto, M.
投稿準備中