

## 論文要旨

### ゲノム・タンパク質情報解析技術の適用による、貯蔵mRNAに結合する mRNA前駆体3'末端開裂複合体の立体構造と機能部位の推定

青砥 早希

真核生物の初期発生では、個体の生涯において、この時期にしか発現しない遺伝子が多く存在する。これらの遺伝子の発現場所と発現時期は、いくつかの機構によって精密に調節されていることが明らかになっている。特に、DNAからmRNAへの転写過程の制御機構が詳細に調べられており、近年ではDNAのメチル化など、エピゲノミックな調節機能に着目した研究が展開されてきた。一方、これらの遺伝子がmRNAからタンパク質へ翻訳される過程でも、多くの制御がはたっていることが近年明らかになってきている。アフリカツメガエルの卵細胞では、減数分裂を担うタンパク質の合成は、一次卵母細胞形成時に転写され蓄積された母系mRNAの翻訳抑制により制御されている。母系mRNAの翻訳抑制については、様々な生物で確認されており、少なくとも動物界でこの機構は保存されていることが明らかになっている。

DNAから転写されたmRNAは、キャッピング、ポリA鎖伸長、スプライシングなどのプロセッシングを受けた後に翻訳される。通常、ポリA鎖の修飾を受けるmRNAは、核内でポリA鎖が伸長し、細胞質に輸送されるとすぐにリボソームによって翻訳される。しかし母系mRNAは、核内でポリA鎖が十分に伸張されることなく細胞質に輸送され、細胞質で長期間蓄積される。翻訳活性時には、細胞質でポリA鎖の伸長が行われる。細胞質に局在する母系mRNAは、ポリAポリメラーゼ(Gld2)やmRNA3'末端切断およびポリアデニル化特異因子(CPSF)、細胞質ポリアデニレーション因子結合タンパク質(CPEB)などのタンパク質群と結合し、mRNA-タンパク質複合体(mRNPs)を形成する。mRNPsの主なはたらきは、母系mRNAの翻訳抑制(貯蔵型mRNPs)と、翻訳開始時の母系mRNAのプロセッシングの完了(翻訳活性型mRNPs)であると考えられている。母系mRNPsの構成因子は、前述したタンパク質以外にも数多く同定されており、これらの分子のはたらきは、その詳細が明らかになってきた。しかし、母系mRNPsがどのようにその機能を発揮するのかを理解するためには、母系mRNAの周りでmRNPs構成因子がどのように相互作用するかを原子分解能で明らかにする必要がある。そのためには、母系mRNPsの複合体構造を決定することが必須だが、実験的な手法として一般的であるNMR測定やX線結晶構造解析を行うには、mRNPsは分子量があまりにも大きく複雑な分子であるために、データ測定と処理が困難である。そこで本研究では、計算科学的な手法を用いて、母系mRNPsの構成因子の1つであるCPSFの三次元構造を予測し、その構造を基に母系mRNAの翻訳制御に関与するCPSF、Gld2、CPEBおよび母系mRNAの相互作用について考察した。

母系mRNPsの構成因子の1つであるCPSFは、それ自体もタンパク質の複合体であり、CPSF160、CPSF100、CPSF73、CPSF30の4つのサブユニットを有する。そこで、CPSF複合体立体構造を予測するにあたって、CPSFの各サブユニットの立体構造を予測し、サブユニットを組みあ

わせた。さらに得られた複合体構造をもとに、RNA結合残基予測および、CPSF複合体と直接相互作用することがわかっているGld2とCPEBの結合残基を予測した。

CPSF73とCPSF100は、共通祖先配列由来のタンパク質であった。共通祖先由来の2つのタンパク質が相互作用する場合、それらのタンパク質はそのアミノ酸組成や立体構造が類似であるため、その相互作用面は相同なドメインで形成される傾向にある。CPSF73とCPSF100は、この2つのタンパク質が共通してもつドメインで相互作用しており、その予測二量体構造には空間対象性が見られた。予測構造全体はU字に似た構造をとっており、CPSF100が、mRNAの認識を行うCPSF160とエンドヌクレアーゼ活性をもつCPSF73をつなぎとめていた。またCPSF160のCPSF100との結合残基は、多くがCPSF160パラログにはないアミノ酸残基で構成されていた。CPSF160パラログはCPSF73パラログやCPSF100パラログとは結合していないため、CPSF160は、アミノ酸残基の挿入によってCPSF160固有の結合部位を獲得したと考えられる。予測されたCPSF複合体構造を用いて、CPEB、Gld2およびmRNAの結合部位を予測した。CPSF160は3つのドメインから構成され、CPEBとGld2はCPSF160の同じドメインと相互作用することが予測された。CPSF160上の両予測相互作用部位が近接していたことは、CPEBとGld2とがCPSFとの相互作用時にお互いも相互作用するという実験結果と符合する。予測RNA結合部位の1つは、CPSF-CPEBの予測結合部位に近接した位置であった。このRNA予測結合部位は、CPSF73の活性部位と約80Å離れていた。このRNA結合部位とCPSF73の活性部位間の距離は、mRNA上のCPSF160認識部位とCPSF73のmRNA開裂部位間の距離と合致した。Gld2はCPSF160とCPSF73に挟まれるように結合し、mRNAとの結合部位および活性部位を外側に向けて、CPSF複合体に埋まり込むように結合していると予想された。これらの予測結果を総合すると、貯蔵mRNPs中ではGld2はmRNAのポリA鎖付与部位より4〜8塩基上流の位置に結合し、CPSF73とCPSF160、CPEBの少なくとも3分子と直接相互作用することでmRNAのポリA鎖付与部位から離れた場所に存在していると予測された。これらの相互作用は、Gld2によるmRNAのポリA鎖伸長を阻害する構造であり、結果的に母系mRNAの翻訳抑制機構の維持に寄与していると考えられる。母系mRNPsの翻訳抑制解除の引き金と考えられているCPEBのリン酸化と、母系mRNAの翻訳活性に必須とされるポリA鎖の伸長の2つの現象をつなぐ分子機構は未知である。本研究で行なった貯蔵mRNPsの相互作用の予測結果から、翻訳抑制機構のメカニズムはCPSFの構造にGld2が埋まるように結合し、さらにCPEBがストッパーとなるようにGld2と結合することで、Gld2がmRNAのポリA鎖付与部位に結合できないような立体構造をとっていることだと予想される。このことはCPEBのリン酸化によりGld2がCPEB、CPSFとの結合を維持できなくなると、Gld2はCPSF複合体から離れmRNAのポリA鎖付与部位を認識できるようになり、翻訳抑制が解除されることを意味する。*Xenopus laevis*の未成熟卵のGld2を抗体により阻害すると、核膜崩壊が促進されること、また核膜崩壊に必須な母系mRNAであるMos mRNAのポリA鎖伸長が阻害されることが示されている。この2つの現象は相反しているようであるが、今回の予測構造に基づけば、Gld2抗体がGld2のCPEB、CPSFとの相互作用による翻訳抑制維持を阻害したことでMos mRNPsの立体構造が変化し、その翻訳が行われたと解釈することができる。

本研究により初期発生において複雑な遺伝子発現を担う母系mRNAの翻訳抑制維持を実現するメカニズムの新たなモデルを示唆することができた。本研究で示した三次元的なサブユニットの機能は、個々の分子機能の解明の進んだ母系mRNPsの翻訳抑制機構研究において、機構の詳細を解明するための新たな指針となる。