

所属 (主指導教 官)	バイオサイエンス研究科 分子生物学専攻 分子発生生物学講座 (小笠原 直毅 教授)		
氏名	鈴木 仁	提出	平成14年 1月 8日
題目	ゼブラフィッシュ Bruno/CELF 型 RNA 結合性タンパク質の機能解析		
要旨 生物の発生・分化の過程には、様々な遺伝子の発現制御機構が重要である。転写後制御機構は、転写制御機構と同様に遺伝子発現制御に重要な役割を果たす。中でも、選択的スプライシングは、ヒトゲノムのうち 50～60%もの遺伝子で起こり、1つの遺伝子から複数の翻訳産物として発現する。選択的スプライシングを含め転写後制御には、無数の RNA 結合性タンパク質が鍵となる働きをする。 このような RNA 結合性タンパク質の1つとして、Bruno/CELF (Bruno/CUGBP1- and Etr-3-like factor) 型タンパク質に注目した。Bruno/CELF 型タンパク質は、N 末側に連続的な2つの RNA recognition motif (RRM1-2) と C 末側に3番目の RRM (RRM3) を有す。ショウジョウバエの卵母細胞において、Bruno は胚の前後軸や生殖細胞の形成に関与する oskar mRNA や背腹軸形成に関与する gurken mRNA の3 非翻訳領域 (3 UTR) の BRE (Bruno response element) に結合し、翻訳の抑制制御を行っている。また、アフリカツメガエルの相同タンパク質である EDEN-BP は、c-mos mRNA の3 UTR の EDEN (embryo deadenylation element) に結合し、ポリ A 鎖の短縮化を介して翻訳の抑制制御に関与する。一方、ヒト CUGBP1/Bruno1-2 は、cTnT (cardiac troponin T) pre-mRNA のイントロンにある CUG 反復配列に結合し、筋肉型のスプライシングを促進することが報告されている。 これまでに我々は、ゼブラフィッシュにおいて3つの Bruno/CELF 型の遺伝子、brul (bruno-like)、etr-3 (elav type ribonucleoprotein-3)、etr-1 を同定している。これらの RNA 結合性タンパク質の標的 RNA 配列を同定するために、SELEX 法と UV クロスリンク法を行った。その結果、Brul が URE (uridine and purine repeat element) 配列に特異的に結合することが明らかとなった。一方、CUG 反復配列に対する Brul の結合は、全く検出されなかった。また、BRE 配列と EDEN 配列は、URE 配列を含む。欠損型 Brul の解析により、N 末側の RRM1-2 と C 末側の RRM3 のそれぞれが、URE 配列との特異的結合活性を有することが明らかとなった。Etr-3 および Etr-1 もまた URE 配列に特異的に結合した。これらの結果は、URE 配列が Bruno/CELF 型 RNA 結合性タンパク質の直接的な結合配列であることを示す。			

Bruno/CELF 型 RNA 結合性タンパク質の機能を解明するため、様々な遺伝子のイントロンや UTR などに機能性の URE 配列を探した。その中で、我々は、URE 配列がラット α -actinin ミニ遺伝子のイントロン領域に存在することを見出した。 α -actinin 遺伝子は、筋肉型と非筋肉型のエキソンを有し、排他的な選択的スプライシングにより 2 種の mRNA として発現する。URE 配列は、非筋肉型エキソン近傍の BPS 配列 (branch point sequence) に重なって存在する。 α -actinin ミニ遺伝子とともに Brul を細胞に共導入し、in vivo splicing 解析を行った。その結果、Brul に依存して筋肉型 α -actinin mRNA 量が増加した。URE 配列に変異を導入すると、Brul による筋肉型 mRNA の増加は検出されなくなった。Brul は、URE 配列との結合を介して、 α -actinin 遺伝子の筋肉型のスプライシングを促進することが明らかとなった。また、Etr-3 についても、Brul と同様な効果が見られた。一方、Etr-1 では、筋肉型 mRNA が減少し、筋肉型及び非筋肉型エキソンの両方を欠く mRNA 量が増加した。しかし、この Etr-1 の効果は α -actinin ミニ遺伝子の URE 配列に依存しないことが明らかとなった。これらのことから、Bruno/CELF 型タンパク質が選択的スプライシング制御に重要な役割を担っていることが示された。

一方、ショウジョウバエ Bruno による翻訳の抑制制御は、卵母細胞の形成過程での機能である。また、ツメガエルの EDEN-BP による翻訳の抑制制御は、受精直後に起こる。ゼブラフィッシュ Bruno/CELF 型タンパク質の卵母細胞や胚発生初期における役割を類推するために、発現解析を行った。その結果、brul mRNA および etr-1 mRNA が母性的に発現していることが明らかとなった。多くの母性 mRNA と同様に etr-1 mRNA は、1-cell 期胚の動物極側に形成される胚盤に存在した。これに対して、brul mRNA は卵母細胞から植物極側に局在した。そして、brul mRNA は、1-cell 期から 2-cell 期の間に、胚盤に向かって卵黄間隙を移動することが明らかになった。2-cell 期や 4-cell 期の brul mRNA は、胚盤の全域に存在するとともに、特に、卵割面の両端部に局在した。ゼブラフィッシュの受精卵の植物極側および 2-cell 期や 4-cell 期の卵割面の両端部には、それぞれ背側誘導因子および始原生殖細胞形成に必要な因子が局在化している。brul mRNA は、胚の軸形成や生殖細胞形成に関与する可能性が考えられる。また、卵母細胞において、Brul タンパク質が核および細胞皮質の限局した領域に存在することが明らかとなった。細胞質の外層に存在する Brul タンパク質に関しては、mRNA の局在化、安定性または翻訳制御などの細胞質での転写後制御を担うことが示唆される。

以上の結果から、Bruno/CELF 型タンパク質は、標的 mRNA 特異的な選択的スプライシングを制御することが明らかとなった。また、Brul タンパク質は、細胞質における転写後制御にも関与することが示唆される。さらに、Brul は、多機能的な RNA 制御を介して、初期胚発生の胚軸形成や生殖細胞形成に関与する可能性が考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 鈴木 仁

RNA 情報発現制御は、脊椎動物の発生分化過程に重要な役割を果たす。とりわけ、選択的スプライシングは、単一の遺伝子から複数種の蛋白質を生成する非常に重要な制御過程である。ヒトゲノムにおいては、約半数の遺伝子で選択的スプライシングが起こるものと推定されている。しかしながら、選択的スプライシング制御機構は不明な点が多い。本研究では、Bruno/CELF 型 RNA 結合性蛋白質に着目し、ゼブラフィッシュ Brul (bruno-like) 蛋白質について、SELEX 法と UV クロスリンク法をもちいて標的 RNA 配列の同定を行い、URE (uridine and purine repeat element) 配列に特異的に結合することを示した。そして、選択的スプライシングを行う遺伝子を検索し、ラット α -actinin 遺伝子のイントロン領域に URE 配列が存在することを見出した。 α -actinin 遺伝子は、筋肉型と非筋肉型のエクソンを有し、排他的な選択的スプライシングにより 2 種の mRNA を生成する。そこで、培養細胞へのトランスフェクション実験を行い、Brul 蛋白質が URE 配列を介して筋肉型スプライシングを誘導することを明らかにした。同様の解析を他のゼブラフィッシュ Bruno/CELF 型蛋白質 Etr-1 と Etr-3 についても行い、Etr-3 が Brul と同じく URE 配列依存的に筋肉型スプライシングを誘導すること、Etr-1 は筋肉型エクソンも非筋肉型エクソンも含まない mRNA の生成を誘導することを示した。これらの結果から、Bruno/CELF 型蛋白質は選択的スプライシング制御活性を有するが、その働きは蛋白質によって異なっていることが明らかとなった。また、ゼブラフィッシュ brul 遺伝子の母性 mRNA が卵母細胞や受精卵において局在化していることを見だし、母性因子としての役割についても考察を行った。

以上のように、本論文は脊椎動物において組織特異的スプライシングを制御する RNA 結合性蛋白質を同定したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。