

55. RNA ポリメラーゼ II 転写産物の仕分け機構の進化の研究

大野 睦人

Key words : RNA 核外輸送, RNA の長さ, hnRNP, 進化

京都大学 ウイルス研究所
遺伝子動態調節部門
情報高分子化学研究分野

緒 言

RNA ポリメラーゼ II は mRNA を合成するが、一群の U snRNA (Uridine-rich small nuclear RNA, 主要スプライシング因子の RNA 成分) などの短い RNA も合成する。転写が進み新生 RNA の長さが 200~300 塩基長より長くなると、RNA 結合タンパク質 hnRNP C (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C) の四量体が安定に結合できるようになることで U snRNA の輸送因子の結合が競合的に阻害されその転写産物は mRNA の輸送経路に入る。逆に、RNA の長さがそれより短いまま転写が終了した場合、同四量体が安定に結合できずその転写産物は U snRNA の輸送経路に入る。このように、hnRNP C 四量体が“分子ものさし”となって RNA の長さを測り、RNA をその長さに応じて仕分けしていることを発見した(図 3 左を参照) ¹⁾。通常、RNA の特異的な認識はその特異的な塩基配列や構造を介し行われるので、“RNA の長さ”が認識されるというのは全く新しいパラダイムである。

U snRNA は、多細胞真核生物である後生動物 (*Metazoa*) では上述の様に一旦核外輸送され、細胞質で一連の成熟過程を経た後、核内に再輸入されそこで初めて機能する。これに対して、真核生物の進化を遡ってみると、単細胞真核生物である酵母の U snRNA は核外輸送されることなく核の中で成熟する。この U snRNA の成熟過程の違いが、RNA ポリメラーゼ II の転写産物の仕分け機構に影響を与えている(表 1)。脊椎動物では、長い RNA に特異的に結合する hnRNP C 四量体の結合あるいは非結合によって RNA ポリメラーゼ II の転写産物の長さが測られ、長いものは mRNA として短いものは U snRNA として核外輸送される。しかし、単細胞真核生物である酵母では U snRNA は核外輸送されることなく核の中で成熟するので、mRNA との間の核外輸送に際しての仕分けは重要ではないはずである。実際、出芽酵母の U snRNA のあるもの (U2 snRNA) は非常に長大 (>1 kb) であり、U snRNA の長さを短く保つという進化的選択圧がかかっていないようである。

これらに対して、ショウジョウバエや線虫などの(脊椎動物以外の)後生動物では、U snRNA の成熟のためには RNA の核外輸送が必要であり、脊椎動物と同様に mRNA と U snRNA の間の仕分けが重要であるはずである。しかしながら、執拗な相同性検索にも関わらず、ショウジョウバエや線虫には、hnRNP C の明確なホモログは見当たらない。このことは、これらの生物種では、hnRNP C 以外の因子が RNA ポリメラーゼ II の転写産物の長さを測っていることを示唆する。あるいはこれらの生物種では mRNA と U snRNA の間の仕分けが長さ以外の特徴によって行われている可能性も考えられる。本研究では、ショウジョウバエをモデルにしてこれらの可能性を検討することとした。

表 1. 仕分け機構と生物種

生物種	U snRNAの核外輸送	mRNAの核外輸送	仕分け機構	hnRNP C 相同因子
酵母	×	○	不必要	×
線虫	○	○	必要	×
ショウジョウバエ	○	○	必要	×
脊椎動物	○	○	必要	○

方法、結果および考察

1. ショウジョウバエ由来の CBC (Cap-Binding Complex) と PHAX (Phosphorylated Adaptor for RNA Export) の組換え体タンパク質の調製

mRNA と U snRNA の間の仕分けを行うキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の因子を生化学的に同定するために、以前 HeLa 細胞核抽出液を用いて開発した試験管内の仕分け系と同様の、RNA ポリメラーゼ II 転写産物の仕分けを部分的に再現する試験管内の系を、ショウジョウバエ培養細胞 S2 の細胞破碎液とショウジョウバエの様々な組換え体タンパク質および試験管内転写で調製した様々な RNA を用いて構築することにした。

最初に、系の構築に必要なショウジョウバエの組換え体タンパク質を調製した。まず、ショウジョウバエの cDNA ライブラリーに対して PCR を行うことにより、ショウジョウバエの CBC のサブユニットである CBP80 (dmCBP80) と CBP20 (dmCBP20)、および U snRNA 核外輸送因子である PHAX (dmPHAX) の全長 cDNA を取得した。さらに、それらを his タグあるいは GST タグを持つ大腸菌発現ベクターにクローニングした。

定法に従い大腸菌で組換え体タンパク質を発現させた後、それぞれのタグを指標に粗精製した。さらに、粗精製した dmCBP80 と dmCBP20 を混合し、dmCBC 複合体形成を行わせた後、Q-Sepharose および SP-Sepharose で dmCBC をさらに精製し実験に使用した (図 1 左)。GST-dmPHAX に関しては、GST タグによる粗精製後、Heparin-Sepharose カラムでさらに精製して実験に使用した (図 1 右)。これらの組換え体タンパク質が活性を持っていることは、dmCBC がキャップ構造に結合すること、GST-dmPHAX が dmCBC に結合すること、などで確認した (データは示さない)。

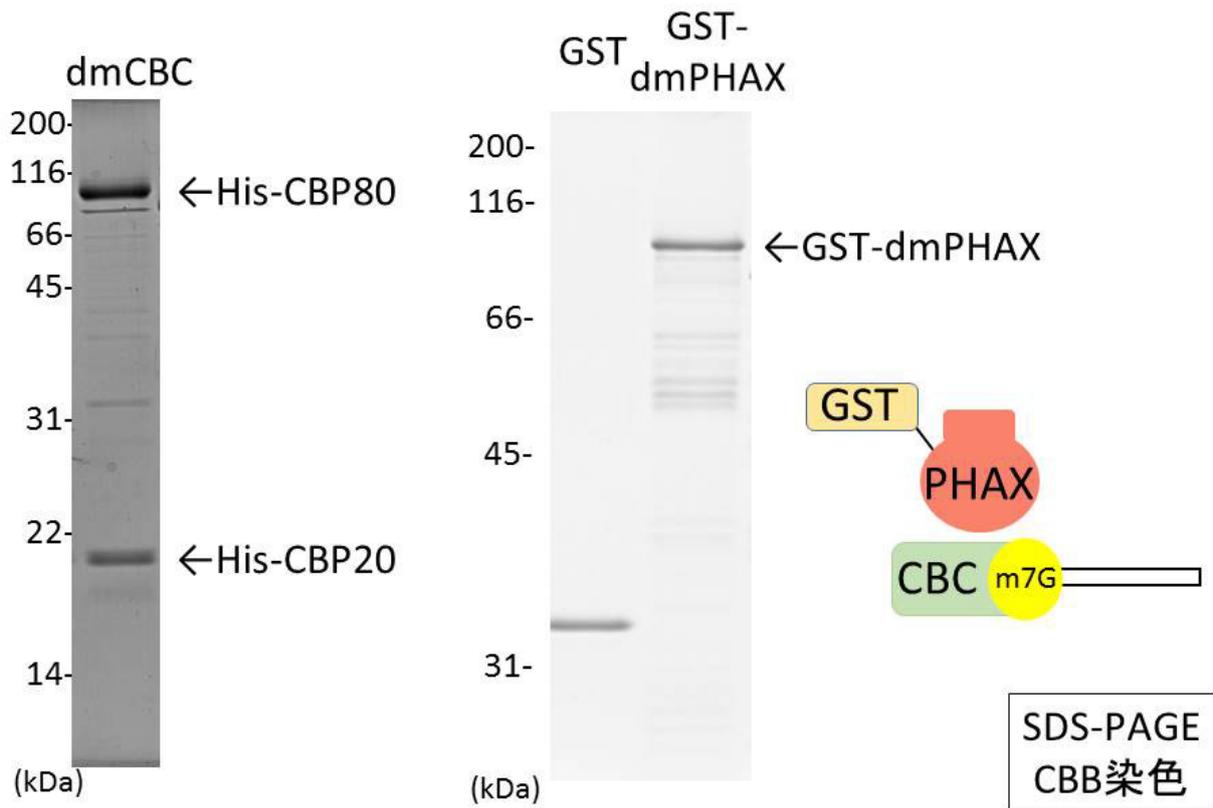


図1. 実験に用いたショウジョウバエ由来のCBCとPHAXの組換え体タンパク質.

実験に用いた His-dmCBP80 と His-dmCBP20 (図左) および GST-dmPHAX (図右) の組換え体タンパク質を SDS ゲル電気泳動後クーマシー染色した. 図右では, 対照として GST タンパク質単独も泳動した. 各図の左側には, 分子量マーカーの泳動位置を示した.

2. ショウジョウバエにおける RNA ポリメラーゼ II 転写産物の仕分けを部分的に再現する試験管内の系の構築

ショウジョウバエでは mRNA と U snRNA の間の仕分けが長さ以外の特徴によって行われている可能性も考えられたが, ショウジョウバエの培養細胞 S2 から細胞破砕液を調製し, 我々が既に確立した, 長い RNA から U snRNA 輸送因子を特異的に除去する活性のアッセイ法¹⁾を用いて, 脊椎動物と同様の活性が同細胞破砕液中に存在するかどうかを検定した. その結果, 長い RNA から U snRNA 輸送因子 PHAX を特異的に除去する活性が同細胞破砕液中に存在することが明らかになった (図2). つまり, ショウジョウバエには, 配列は似ていないが hnRNP C と機能的に似た長さを測る因子 (機能的なホモログ) が存在することが示唆されたのである.

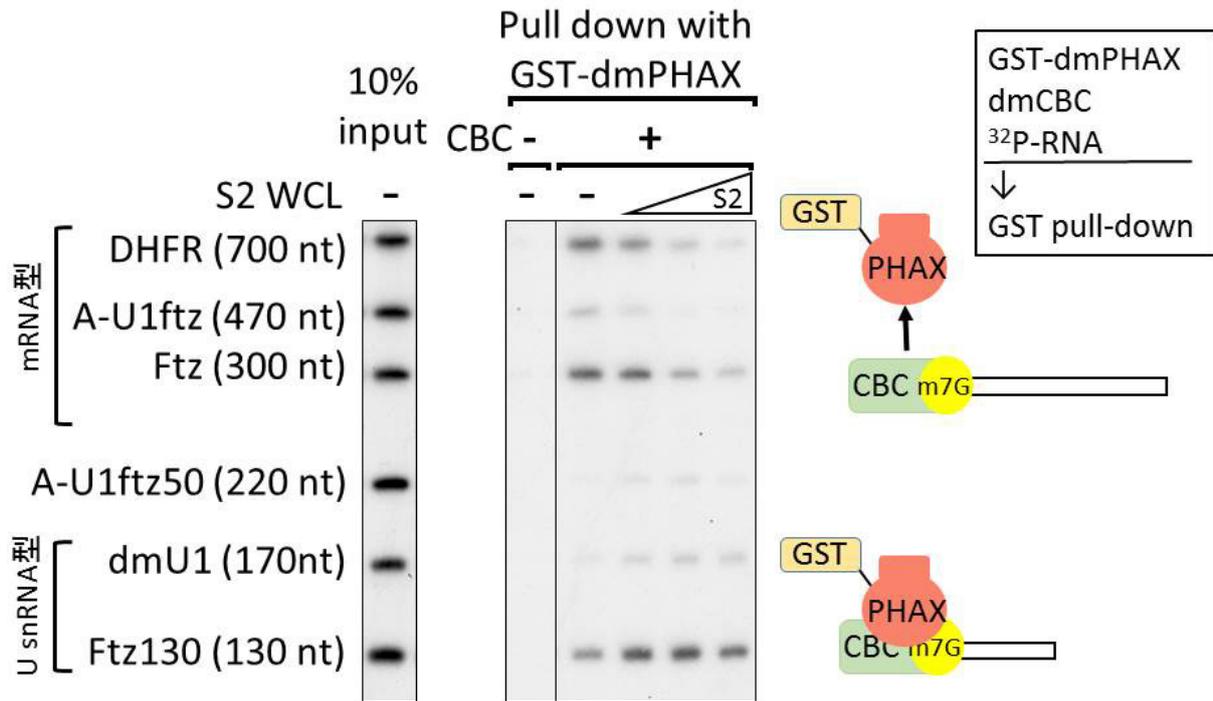


図2. ショウジョウバエにおける RNA ポリメラーゼ II 転写産物の仕分けを部分的に再現する試験管内の系.

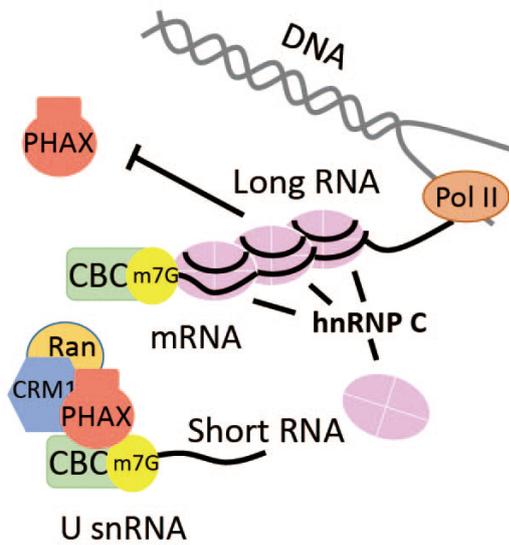
6種類の様々な長さの RNA を試験管内で合成し (図左, A-が付いている2つ以外は m7G キャップが付加されている), それと図1で示した組換え体 dmCBC と GST-dmPHAX を混合し, GST プルダウンを行い, 引き落とされた RNA を電気泳動で解析した (図右). 図右の S2 と記載したレーンでは, ショウジョウバエの培養細胞 S2 から調製した細胞破砕液を加えた. 右に行くほど大量の破砕液を加えた.

3. ショウジョウバエにおける RNA ポリメラーゼ II 転写産物の仕分けのモデル

脊椎動物 (図3左) では, RNA ポリメラーゼ II 型による転写開始直後, 染色体 DNA から新生 RNA の 5'末端が現れ始めると, そこにキャップ構造が付加されさらにキャップ構造結合因子 CBC が結合する. この短い RNA が合成された時点では, この RNA が将来どの程度長くなるのか, つまり mRNA になるのか U snRNA になるのか分からない. 転写がさらに進み, 新生 RNA の長さが 200~300 塩基長より長くなると, C 四量体が少なくとも 1つ安定に結合できるようになり, そのような転写物は mRNA 前駆体であると分類され, 同時に U snRNA 輸送因子である PHAX のその転写物への結合が阻害される. 逆に, RNA の長さが 200~300 塩基長より短いまま転写が終了した場合, C 四量体が安定に結合できず, そのような転写物は U snRNA 前駆体であると分類され, PHAX をはじめ U snRNA 輸送因子群が RNA 上に集合する¹⁾.

ショウジョウバエでは, hnRNP C の明確なホモログは見当たらない. このことから, この生物種では, hnRNP C 以外の因子が RNA ポリメラーゼ II の転写産物の長さを測っているのか, あるいは mRNA と U snRNA の間の仕分けが長さ以外の特徴によって行われているのか不明であった. しかし, 本研究により, 前者の可能性が強く示唆された. しかし, 現時点では, ショウジョウバエでこの活性を司る因子は未知であり, 今後の研究の成果が期待される.

Vertebrates



Drosophila

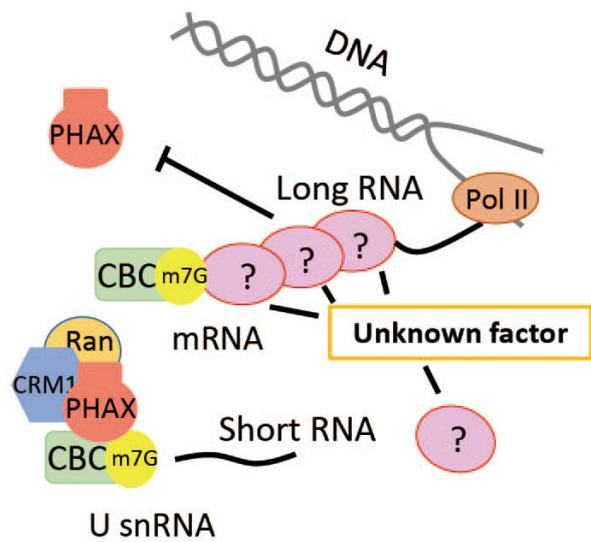


図3. 脊椎動物とショウジョウバエにおける RNA ポリメラーゼ II 転写産物の仕分けのモデル。
図の説明は、本文を参照されたい。

4. 最後に

ショウジョウバエで RNA ポリメラーゼ II 転写産物の仕分けを行う因子は未知であることから、今後、図2の活性を伝統的なカラムクロマトグラフィーを用いて精製し、質量分析により責任因子の候補を同定する計画である。責任因子の候補の組換え体タンパク質を大腸菌で調製し、同アッセイにて活性を確認することにより、真の責任因子を同定することができよう。

また、HeLa 細胞中で hnRNP C を RNAi 法によりノックダウン (KD) すると、U snRNA 輸送因子が mRNA に結合してしまう結果、mRNA の核外輸送が阻害されるという結果を以前得た¹⁾。培養細胞 S2 中の真の責任因子を KD することによって同様の現象が見られるかどうかを検定する計画である。真の責任因子の KD でみられた表現型が、ヒト hnRNP C を S2 細胞で発現した場合に相補されるかどうかを検定する。

さらに、線虫でも同様のアプローチを試み、RNA ポリメラーゼ II 転写産物の仕分けが RNA の長さで行われているかどうかを明らかにし、同仕分け機構の進化の理解を深めたい。

文 献

- 1) McCloskey, A., Taniguchi, I., Shinmyozu, K. & Ohno, M. : HnRNP C tetramer measures RNA length to classify RNA polymerase II transcripts for export. *Science*, **335** : 1643-1646, 2012.