

研究課題別評価

1 研究課題名: 初期発生における母性 RNA の時空間的制御機構

2 研究者氏名: 中村 輝

3 研究の狙い:

動物の初期胚発生は、しばしば卵内に局在している母性 RNA によって制御されている。このような RNA は、局在した領域でのみ翻訳されることにより細胞内非対称性を作り出す。ショウジョウバエ胚の腹部・生殖細胞形成には、胚後極に形成される生殖質と呼ばれる特殊な細胞質領域が重要である。生殖質の形成は、母性因子 *oskar* によって指揮される。卵形成過程において *oskar* mRNA は、卵母細胞後極に局在した後タンパク質へと翻訳される。そして、そこに腹部形成と生殖細胞形成に関わる様々な母性 RNA・タンパク質が集合して生殖質が形成される。*oskar* の機能を失った突然変異体、あるいは *oskar* mRNA が卵母細胞後極へ局在しない突然変異体から生まれた卵では、生殖細胞も腹部領域も形成されず致死となる。一方、遺伝学的操作により、*oskar* mRNA を前極に局在させた胚においては、前極にも生殖細胞が形成されると共に、腹部を前半部にも持つ双腹胚へと発生する。以上の知見は、*oskar* の活性を後極に限局することが正常な胚発生に必須であることを示している。しかし、*oskar* mRNA の局在だけでは *oskar* の活性を卵母細胞後極に限局するには不十分であり、局在していない mRNA の厳密な翻訳抑制と局在した領域でのみ翻訳抑制を解除する機構が必須である。すなわち、*oskar* mRNA 局在と翻訳制御は互いに連携した制御を受けている。このような過程には、*oskar* mRNA に結合し、RNP 複合体を形成するタンパク質が重要である。しかし、その分子機構については良くわかっていない。

私は、ショウジョウバエ母性 RNP 複合体を構成する主要タンパク質の1つとして RNA 結合タンパク質 Me31B を同定し、Me31B が *oskar* mRNA の輸送過程におけるマスキングに関わっていることを明らかにしてきた。さらに、Me31B 複合体中には、*oskar* mRNA の輸送に関わることが報告されている Exu タンパク質が存在している。以上の知見から Me31B 複合体は、*oskar* をはじめとする母性 RNA の輸送・局在化と翻訳を連携して制御する場として機能していると考えに至った。興味深いことに Me31B のホモログは、多くの動物において母性 RNP 複合体の主要構成タンパク質であることが報告されている。本研究では、機能的にも構成因子の点でも進化的に保存されていることが予想される母性 RNA の時空間的制御機構の解明を目指して、Me31B 複合体を構成する新規タンパク質の単離同定とそれらの分子機能の解析を行った。

4 研究成果:

(1) 母性 RNP 複合体を構成する新規タンパク質の単離・同定

抗 Me31B 抗体を用いた免疫沈降によって Me31B 複合体を精製し、共沈したタンパク質を SDS-PAGE で分離後、質量分析法によって同定を行った。その結果、mRNA の 5'キャップに結合する翻訳開始因子 eIF4E と、機能未知のタンパク質であった Cup を同定した。次に、Cup, eIF4E 両タンパク質に対する特異的抗体を作成し、ショウジョウバエ卵巣を染色した。その結果、Cup, eIF4E は共に Me31B と共局在していることを明らかにした。卵巣ライゼートを用いた免疫沈降実験によって、Me31B は、eIF4E, Cup と RNA 依存的に会合していること、一方、eIF4E-Cup 間の会合は RNase 耐性であることを見いだした。さらに、GST pull-down 法によって eIF4E と Cup とは *in vitro* において直接結合することを明らかにした。

(2) eIF4E-Cup 相互作用の解析

Cup はショウジョウバエ特異的な遺伝子で、他生物における明確なホモログの存在は確認できなかった。しかし、Cup の1次配列を慎重に検討した結果、eIF4G や 4EBP など既知の eIF4E 結合タンパク質に見いだされている eIF4E 結合のコンセンサス配列(YxxxxL ; は疎水性アミノ酸を示す)が存在する事が明らかとなった。そこで、コンセンサス配列中のアミノ酸残基を Ala に置換した Cup タンパク質を作製し、eIF4E との結合能を GST pull-down 法によって検討した。その結果、この配列は、Cup

タンパク質においても eIF4E との結合に重要であることを明らかにした。さらに、哺乳類 eIF4E の X 線構造解析から、YxxxxL 配列と直接相互作用することが判明している eIF4E 上の Trp 残基を Ala に置換した変異 eIF4E は、Cup タンパク質との結合能を失った。以上の結果から、Cup は eIF4G や 4E-BP と同様のモードで eIF4E に結合すると考えられた。このことは逆に、Cup は、eIF4E-eIF4G の結合を競合的に阻害する活性を持っていると考えられた。

(3) Cup は *oskar* mRNA の翻訳抑制に関わる新規因子である。

eIF4E-eIF4G 間の結合は、5'キャップ依存的な翻訳開始に必須であることから、Cup は翻訳抑制因子として機能している可能性が考えられた。*oskar* mRNA の翻訳制御に対する Cup の役割について検討するため、P 因子が *cup* 遺伝子の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) に挿入された系統を用いて新規 *cup* 突然変異体の作成を行った。その結果、eIF4E 結合領域を含む N 末端側約 1/3 の領域が欠失した *cup* 突然変異体 (*cup*²¹²) を単離した。Cup²¹² タンパク質が eIF4E と *in vivo* において会合しないことを卵巣ライゼートに対する免疫沈降法により確認した。次に、*cup*²¹² 卵巣に対して抗 Oskar 抗体による免疫染色した結果、Oskar タンパク質が本来翻訳抑制を受けている卵形成初期から発現していることを見いだした。一方、*cup*²¹² 突然変異体においても *oskar* mRNA は、野性型と同様に卵形成中期以降、卵母細胞後極に局在化した。また、RNA の輸送・局在化に重要な卵母細胞内の微小管極性に関しても異常は認められなかった。以上の結果から、*cup*²¹² 突然変異体は、*oskar* mRNA の翻訳抑制が特異的に異常となっていると考えられた。

(4) Cup は *oskar* 3'UTR 結合タンパク質である Bruno と会合する。

Cup-eIF4E 相互作用による翻訳抑制が、どの様にして *oskar* mRNA に対する特異性を決定しているのかを明らかにする目的で、Cup タンパク質をベイトに用いた酵母 two-hybrid スクリーニングを行った。その結果、RNA 結合タンパク質である Bruno が、Cup 結合タンパク質の候補の 1 つとして単離された。Cup、Bruno の各種欠失変異体を作成し酵母 two-hybrid 法を用いて検討した結果、Cup-Bruno 相互作用には、Cup の eIF4E 結合領域も Bruno の RNA 結合ドメインも必要ないことを明らかにした。さらに、卵巣ライゼートを用いた免疫沈降実験により、Cup-eIF4E 複合体は、RNA 非依存的に Bruno と会合していることを明らかにした。すなわち、Cup は、*in vivo* においても Bruno と会合していると考えられた。Bruno は、*oskar* mRNA の 3'UTR に特異的に結合し、*oskar* mRNA の翻訳抑制に関与することが知られていた因子である。しかし、Bruno がどの様にして *oskar* mRNA の翻訳を特異的に抑制しているのかについては全くわかっていなかった。

今回得られた知見を総合すると、Cup タンパク質は、eIF4E-eIF4G の結合を阻害する活性を持った新規翻訳抑制因子であり、Cup の *oskar* mRNA に対する特異性は、*oskar* mRNA の 3' UTR に結合する Bruno タンパク質との会合により獲得されていると考えられた。興味深いことに、ツメガエル卵母細胞における *cyclinB1* mRNA もまた、5'末端と 3' UTR との相互作用を介した翻訳抑制を受けていることが報告されている。従って、このような翻訳抑制機構は、生物種間を超えて保存された分子機構であると推定される。さらに近年、mRNA の輸送・局在化と翻訳の制御が、卵形成や初期胚発生ばかりでなく、体細胞分化や神経細胞の可塑性にも重要であることがわかってきている。本研究で明らかとなった特定の mRNA 種を認識してその翻訳を特異的に制御する分子機構は、記憶・学習といった未解明の問題に対しても重要なヒントを提供すると期待される。

5 自己評価:

本研究をまとめた論文は、著名雑誌のニュースコーナーやすでに複数のレビューで取り上げられており、インパクトのある知見と評価されていると思われる。論文内容の一部が海外の複数のグループと重複したため論文発表に関して激しい競争となってしまったが、最終的には同時期に発表することができた。さきがけ研究のサポートにより、研究の初期段階で質量分析法によるタンパク質同定が行えたことと、研究総括、領域アドバイザー、研究者の方々とのフォーマル・インフォーマルな場でのディスカッションを通して、論理的なストーリーを組み立てることができたことが大きかったと感謝している。今後も、さきがけ研究を通じて知り合った研究者との交流を継続して、新たな研究手法や個性的なアプローチについて積極的に学んでいきたいと考えている。一方、当初の目標であった mRNA 輸送

と翻訳とを連携して制御する分子機構の解明」については果たすことはできなかった。3年間の個人研究としては大風呂敷を広げすぎた目標であったと感じている。しかし、本研究を通していくつかの新しいアイデアを得ることができたので、それら1つ1つについて今後検証を進めていきたい。

6 研究総括の見解:

個体発生の初期過程での母性 RNA の翻訳制御機構の解明に迫る期待通りの成果を収めた。研究会等で指摘された助言や示唆等を積極的に自己の研究に取り入れ、問題点を着実に克服した。当初の目的の一つである mRNA 輸送と翻訳との連関制御のしくみの解明が今後の発展として大いに期待できると共に、若手研究者としての活躍をも大いに期待させる。

7 主な論文等:

原著論文

1. Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. (2004). *Drosophila* Cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates *oskar* mRNA translation in oogenesis. *Developmental Cell* 6, 69-78.

総説

1. 矢野環, 中村輝(2004). ショウジョウバエ母性 RNA の時空間的制御を支配する RNP 複合体. *実験医学* 22, 2556-2562.
2. 中村 輝, 小林 悟(2002) 母性因子によって制御される生殖系列の形成機構. *生物のボディープラン: バイオサイエンスの新世紀* 第 10 巻(上野直人, 黒岩 厚編), 共立出版 pp134-153.

口頭発表

1. Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. Cup binds to eIF4E and regulates *oskar* mRNA translation in *Drosophila* oogenesis. FASEB Summer Research Conference on Intracellular RNA Sorting, Transport and Localization. Snowmass, Colorado, USA (2003.7.21-26).
2. Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. *Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that associates with Bruno and regulates *oskar* mRNA translation in oogenesis. RNA 2003 Kyoto: The New Frontier of RNA Science, Kyoto International Conference Hall (2003.11.24-27).

そのほか国際学会ポスター発表 2 件, 国内学会口頭発表 4 件, ポスター発表 1 件.

招待講演

1. 関西学院大学理工学部セミナー, 三田, 兵庫 (2003.2.24)
2. 徳島大学ゲノム機能研究センターセミナー, 徳島, 徳島 (2003.3.10)
3. 日本学術振興会 JSPS Colloquium on RNA Biology, Uppsala, Sweden (2004.7.15)
4. 遺伝学研究所バイオリジカルシンポジウムセミナー, 三島, 静岡 (2004.10.7)
5. アリゾナ大学 Department of Molecular and Cellular Biology セミナー, Tucson, Arizona, USA (2004.10.19)