

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成15年度採択研究代表者

荒木 弘之

(情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所細胞遺伝研究系 教授)

「核酸合成に関わるたんぱく質複合体の構造と機能解析」

1. 研究実施の概要

染色体DNA複製は、多くの複製タンパク質の複製開始領域への集合により開始する。この集合は、細胞周期制御に重要な役割をするサイクリン依存性キナーゼ (CDK) により促進される。我々が見つけたSld2複製タンパク質は、CDKによりリン酸化されるとDpb11タンパク質と複合体を形成して、複製開始を促進する。従って、Sld2-Dpb11複合体の形成が、複製開始領域への複製タンパク質群集合を制御する因子の1つであると考えられる。我々は、Sld2-Dpb11複合体形成を分子スイッチとして捉え、この複合体形成の機構と分子スイッチとしての有用性について解析を進めている。本年度は、Sld2の39アミノ酸のストレッチがDpb11C末の一对のBRCTドメインと結合することをin vitroで示した。この39アミノ酸からなるペプチドは、リン酸化の有無に関わらずDpb11に結合するが、39アミノ酸ストレッチに隣接するリン酸化部位を含む20 kDaのペプチドでは、リン酸化によりDpb11との結合が促進される。即ち、結合部位に隣接するリン酸化領域がSld2とDpb11の結合の制御に関与することを意味する。今後はリン酸化によるSld2-Dpb11複合体形成の制御機構及び複製開始領域への複製タンパク質群の集合へのこの複合体の役割を明らかにするとともに、Sld2-Dpb11複合体形成の分子スイッチとしての有用性についても調べる予定である。

また、本研究の一環として、様々なRNAの核外輸送に関与するたんぱく質複合体の同定と機能解析を行う。平成15年度は、RNAの長さがRNAの核外輸送経路を規定する重要な要素であることを示す結果を得た。平成16年度以降は、この結果をさらに詳細に解析すると共に、RNAの長さを認識する仮想的タンパク質因子の同定に挑戦する。平成15年度のもうひとつの成果として、HIV-1によるRNA輸送の制御の際に宿主mRNA輸送因子がRNA上から除かれることを示唆する結果を得た。今後、この結果を様々な角度から確認すると共に、抗エイズ創薬への応用の可能性を探る。

2. 研究実施内容

細胞内で起こる生命現象の多くは、複数のタンパク質が特定の場所に集合 (assembly) し、機能を発揮する反応である。そして、タンパク質の集合の多くは、細胞内の限られた

場所で、限られた時期に起るようには制御されている。これは、その反応をオン・オフする分子スイッチがあるためである。しかし、これらタンパク質の集合がどのように起こり、どのような分子スイッチにより、どのように制御されているかは、生命反応の基礎であるにも関わらず、未知の部分が多い。我々は、出芽酵母を真核生物のモデル系として、染色体のDNA複製開始に必要な新規因子を複数同定し、その作用機構の研究を行ってきた。そして、これら因子の複製開始領域への集合には、Dpb11とSld2の結合が重要であり、この結合にはCDK (Cyclin-dependent kinase)によるリン酸化が必要であることを示した。そこで、Dpb11とSld2の結合を複製開始因子集合の分子スイッチと捉え、この結合機構、結合のCDKによる制御機構、この結合が複製因子の集合を制御する機構の解明を行うことを目的としている。そのため、本年度は以下の研究を行った。

1) Sld2及びDpb11の大腸菌での発現と精製

本年度は、Sld2-Dpb11複合体形成機構をin vitroで詳細に解析するために、Sld2及びDpb11タンパク質の結合領域を完全精製し、安定に供給できる系の構築を行った。それに先立ち、Sld2のDpb11の結合部位を2ハイブリッド法によりリン酸化部位を含む約200アミノ酸の領域に限定した。この内39アミノ酸の領域のみでDpb11との結合は起こるが、リン酸化による制御は受けない。この39アミノ酸からなる結合配列についても、解析の準備を進めている。一方Dpb11はタンパク質間相互作用に働くBRCTドメインを4つ持つが、Sld2とはC末の一对のBRCTを介して結合していることが分かった。そこで、Sld2, Dpb11相互の結合部位をFlagタグとGstにそれぞれ融合し、大腸菌で発現・精製する系を確立した。この方法で精製したタンパク質はin vitroにおいて、Sld2のCDKによるリン酸化に依存して結合する。今後この系を用いて、Sld2-Dpb11結合の詳細について調べる予定である。

2) CDKの精製

Sld2とDpb11の結合はCDKによるリン酸化により制御されているので、両者の結合をin vitroで調べ、その正当性を議論するためには、精製したCDKが必要である。出芽酵母のCDKは、触媒サブユニットのCdc28、Cks1とサイクリンからなっており、CDKに含まれるサイクリンにより基質特異性が変わるものと考えられている。出芽酵母は9種類サイクリンをもつので、それぞれのサイクリンが大腸菌で発現する系を構築した。本年度は、S期に働くサイクリンであるC1b5を含むCDKを大腸菌から精製し、Sld2のリン酸化を行うことを確かめた。このCDKによるリン酸化により上記のSld2-Dpb11結合は、in vitroで制御することが出来る。

3) 複製タンパク質群の集合

Sld2とDpb11の結合が、複数タンパク質の集合を制御するためには、それぞれのタンパク質と集合する他のタンパク質の間に相互作用が必要である。これらの相互作用を調べるため、集合するタンパク質がつくるルーズな複合体の実態を明らかにする必要がある。そのため本年度は、タグを付けたSld2, Dpb11を持つ細胞から、共免疫沈殿法により複合体タンパク質を取得する条件検討を行った。Sld2とDpb11を共沈するための最適条件はほぼ決めることができたので、今後この条件を用いて、他のタンパク質との相互作用を調べて

ゆく予定である。

4) Slid2, Dpb11タンパク質の細胞内局在

細胞内での両タンパク質の挙動を調べるため、まずGFP融合Dpb11タンパク質の細胞内局在を調べたところ核内に局在することは分かったが、シグナルが弱く検討の余地がある。

また、「様々なRNAの核外輸送に関与するたんぱく質複合体の同定と機能解析」研究では、

(研究の目的と方法)

遺伝子発現の諸過程が相互に連携していることが近年次々に明らかになってきた。その一例としてRNA核外輸送と細胞質イベント（RNAの安定性・局在化、翻訳など）の連携が明らかになりつつある。これは、核外輸送の際にRNAに結合したまま細胞質に出現するたんぱく質（複合体）が、細胞質イベントを制御するということであろう。核外輸送されるRNAにも、tRNA、U snRNA、mRNA、rRNAなど様々な種類があり、それぞれのRNAに核外輸送の際に結合するたんぱく質複合体は異なる。であるから、核外輸送の際に異なる種類のRNAに結合するたんぱく質因子群が選別される機構は、そのRNAの細胞質における運命を支配することになるので非常に重要である。本研究では、主として以下に述べる二つの系を用いて、RNAの核外輸送に関与するたんぱく質複合体を同定し、そのたんぱく質複合体が選別される機構を明らかにする。

U snRNAの一種であるU1 RNAに約300塩基長の断片を挿入すると、そのRNAはU snRNAではなくmRNAの経路で核外輸送されるようになることを以前我々は発見した。この結果のひとつの解釈として、RNAが長くなったためRNAに結合するたんぱく質複合体が変更（リモデリング）されたと考えられることができる。平成15年度はこのRNAの長さの問題をアフリカツメガエルの卵母細胞へのマイクロインジェクションの系によりさらに詳細に追求し、RNAの長さが核外輸送経路を規定する重要な要素であることを検証した。

一方HIV-1は、感染の過程で自分自身のRNAを、宿主側のmRNAの経路ではなくウイルス独自の経路で輸送する。この際にも輸送経路が確実に切り替わるように、RNA上に存在するたんぱく質複合体の変更（リモデリング）が起こっていることが予想される。平成15年度はHIV-1感染の際にRNAたんぱく質複合体に起こると予想されるリモデリングをアフリカツメガエル卵母細胞へのマイクロインジェクションを用いたモデル実験系で確認した。

(研究の成果と今後の展望)

U1 RNAの中央部に様々な長さ、様々な塩基配列の断片を挿入し、核外輸送がmRNAの経路に切り替わるかどうかを検定した。その結果、300塩基長以上の長さの断片を挿入されたU1 RNAは挿入断片の塩基配列にかかわらず、mRNAの経路で核外へ輸送されることが分かった。50塩基の挿入であれば輸送経路はU snRNAのままであったが、100塩基や200塩基の挿入であれば中間の輸送表現系を示した。さらに、断片を挿入する位置を、U1 RNAの中央部から5'末端付近あるいは3'末端付近に変更した場合でも、300塩基長の断片を挿入すればやはり輸送経路はmRNA経路に切り替わった。以上の結果は、この輸送経路の変更の原因

はRNAが長くなったためであり、300塩基長以上の長さのRNA領域の存在がmRNA特異的なたんぱく質複合体が結合するための識別信号になっていることを強く示唆する。今後、平成15年度とは逆にmRNAを欠失変異により短小化して行った時にそのRNAの輸送がU snRNAの経路に切り替わるかどうかを調べる。また本研究成果は、細胞にはRNAの長さを識別する機構が存在することを強く示唆しているため、RNAの長さを直接識別するたんぱく質（群）の同定を今後試みる。さらにそれを通じて、RNAの長さの違いが引き起こすたんぱく質複合体の変更（リモデリング）の分子機構を明らかにして行く。

他方、アフリカツメガエル卵母細胞へのマイクロインジェクションを用いたモデル実験系でHIV-1 Revたんぱく質を卵母細胞へ導入したところ、Rev結合配列（RRE）を持つmRNAの核外輸送経路が、宿主のmRNA輸送経路からRevに依存するウイルス特異的な輸送経路に切り替わる事を確認した。また、その際に宿主側のmRNA輸送たんぱく質がRNA上から解離することが示唆された。今後、これらの結果を詳細に解析すると共に、実際のHIV-1感染細胞でも同様のことが起こっていることを検証する。さらに、このリモデリングの分子機構を明らかにすることにより、抗エイズ創薬への応用の可能性を探って行きたい。

3. 研究実施体制

荒木グループ

- ① 研究分担グループ長：荒木 弘之（情報・システム研究機構、国立遺伝学研究所細胞遺伝研究系、教授）
- ② 研究項目：
 1. 複製開始に必要なSlc2-Dpb11複合体形成のリン酸化による制御機構の解析と分子スイッチとしての有用性。
 2. 複製開始領域への複製タンパク質群の集合へのSlc2-Dpb11複合体の役割。
 3. Slc2, Dpb11タンパク質の細胞内局在の解析

大野グループ

- ① 研究分担グループ長：大野 睦人（京都大学ウイルス研究所、教授）
- ② 研究項目：mRNAのIDとしてのRNAの長さの研究、HIV-I RevによるRNA核外輸送複合体のリモデリングの研究。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

- (1) 論文発表
該当無し
- (2) 特許出願
該当無し