

「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

(大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 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。Slc2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、この複合体の形成が複製開始領域への複製タンパク質群の集合に必要である。我々は、Slc2-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、Slc2のアミノ酸の20アミノ酸のストレッチが、CDKによるリン酸化に依存して、Dpb11 C末の一对のBRCTドメインと結合することを明らかにした。さらに、このリン酸化は20アミノ酸ストレッチに隣接する領域がCDKによるリン酸化されることにより制御を受けていることを見いだした。即ち、まずSlc2のDpb11とは直接結合しない領域がCDKによりリン酸化され、このリン酸化により結合領域のリン酸化が促進されるのである。この機構は、複合体形成を厳密に制御するとともに、複合体形成のためのCDK活性の閾値を作り出す働きがあると考えられる。一方、複製開始領域へ複製タンパク質の集合過程を調べるため、細胞をクロスリンクした後にタンパク質複合体を調べる方法を確立し、解析を進めている。今後、*in vivo*での集合機構の解析と精製タンパク質を用いた相互作用解析を併用して、集合機構の全容を明らかにする予定である。

また本研究の一環として、細胞中でRNA上に形成されるたんぱく質複合体の構造と機能を解析する。主として、核外輸送に先だてて核の中でRNA上に形成されるたんぱく質複合体の同定と機能解析を行う。平成16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のひとつであることを明らかにし、論文報告を行った。また、RNAの長さを感じ取る仮想的タンパク質因子の同定の試みも開始した。平成17年度以降は、RNAの長さを感じ取る仮想的タンパク質因子の同定をさらに推し進めるとともに、mRNAスプライシング依存的にRNA上に形成されるたんぱく質複合体の構造と機能の解析も行う。さらに、HIV-1によるRNA輸送の制御を模擬したモデル実験系を用いて、この制御の分子機構の詳細を解析する。

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とDpb11の結合領域の限定と結合制御機構の解析

Sld2タンパク質のDpb11タンパク質への結合領域を、合成ペプチドとDpb11との結合及び合成ペプチドによる競争阻害反応から20アミノ酸残基よりなる領域に限定した。この20アミノ酸残基から成る領域には、CDKによるリン酸化部位が1つ存在し、この部位がリン酸化されることによりDpb11との結合能が増加する。

Sld2のこの領域外のリン酸化もDpb11との結合に重要であることを示していたが、*in vitro*での精製したCDKを用いた解析から、まず20アミノ酸領域外のリン酸化部位がリン酸化され、次にこの領域がリン酸化されることが分かった。また、20アミノ酸領域外のリン酸化部位に変異を導入すると、20アミノ酸領域のリン酸化が抑制される。このことは、20アミノ酸領域のリン酸化を他のリン酸化が制御するという興味深い機構の存在を示唆している。これらの結合反応を定量化する試みを行なったが、Dpb11タンパク質が非特異的にレジンやセンサーチップに結合し、 K_D を求めることは出来なかった。

前年度精製した種々のサイクリンからなるCDKによりSld2をリン酸化したところ、S期サイクリンであるC1b5を持つCDKは効率良くSld2をリン酸化するが、M期サイクリンであるC1b2を持つCDKではリン酸化効率が低いことを見いだした。従って、Sld2はS期特異的に効率良くリン酸化されるようになっていることになる。

リン酸化によりSld2タンパク質の構造が変わるのかを知るため、トリプシン及びV8ペプチターゼにより消化を行なった。その結果、リン酸化によりSld2の消化パターンが変化することが分かり、リン酸化により構造が変化しているものと思われる。

Sld2のDpb11との結合部位とよく似た配列を分裂酵母のDrc1に見いだすことが出来る。Drc1もCDKによるリン酸化に依存して、Dpb11と似たCut5に結合する。Sld2のDpb11結合配列とDrc1の対応する領域を置換すると、弱いながらもSld2が本来結合するDpb11ではなくCut5に結合するようになることが2ハイブリッド法により確かめられた。このことは、リン酸化による制御を保ちながら、結合部位を改変することによりパートナーを変えること

が出来ることを意味し、細胞内の分子スイッチ創作が、この系を用いて出来ることを示している。

2) 複製開始領域に集合するタンパク質のin vivo及びin vitroにおける解析

複製開始領域に集合するタンパク質を解析するため、GINS複製タンパク質複合体の1つのサブユニットにタグを付け、免疫沈降を行なったが、Sld2とDpb11を複合体中に得ることは出来なかった。そこで、ホルムアルデヒドで固定した後、免疫沈降を行い共沈するタンパク質を解析する手法を開発した。この方法により、Pol ϵ とGINSからなる複合体にCDK活性の増加とともにSld2, Dpb11が加わることが分かり、現在詳細な解析を行なっている。一方、Pol ϵ , GINSの精製標品を得、現在はDpb11, Sld2の精製を行なっているため、in vivoの結果をin vitroで再現し、詳細な分子機構の解析に展開する予定である。

また、「細胞中でRNA上に形成されるたんぱく質複合体の構造と機能を解析する」研究関連では、以下のことを実施する。

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と明らかになってきている。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）の連携があげられる。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る。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。本研究は、核外輸送に先だって様々なRNA上に核の中で形成され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ことを目的とする。

昨年度は、U snRNAのひとつである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。平成16年度は、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た。イントロンを持たない様々なmRNAを欠失により100塩基長程度以下の長さに短小化すると、短くなったmRNAは、U snRNAの経路で核外へ輸送されることが分かった。300塩基程度以上の長さであればmRNAのままであるが、200塩基程度であれば中間の表現系を示す事を確認した。さらに、RNAの長さに応じて、核の中でRNAに結合する因子が変化することを、免疫沈降法やin vivo UVクロスリンク法を用いて明らかにした。以上の結果は、この輸送経路の変更は、まさにRNAの長さの変化に起因するものであり、RNAの長さに応じて核の中でRNA結合するたんぱく質群の種類が変化することを示している。

またこの研究結果が、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たため、RNAの長さを感知するかも知れないたんぱく質（群）の同定を開始した。最

初に取ったアプローチは、核の中でRNAの長さに応じてRNAに直接結合するたんぱく質（群）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法とUVクロスリンク法を組み合わせ、網羅的に同定するというやり方であった。その結果、SRたんぱく質と呼ばれる一群の核内RNA結合性たんぱく質が、核の中でmRNAとして認定される長いRNAに優先的に結合するが、U snRNAとして認定される短いRNAにはあまり結合しないということが分かった。特に20kDのSRたんぱく質（SRp20）は長いRNAに完全に特異的であった。さらに、SRたんぱく質群を認識する単クローン抗体が、長いRNA（mRNA）の核外輸送を特異的に阻害することを明らかにした。

以上は重要な成果ではあるが、RNA結合たんぱく質の種類によっては、RNAに効率よくクロスリンクできないという問題点が明らかになり、この解析が網羅的とはいえないことが強く示唆された。さらに、このSRたんぱく質の長いRNAへの結合が、RNAの長さを感じ取る過程そのものなのか、あるいは、RNAの長さが感知された結果としてSRたんぱく質が結合したのか、という点については明らかにすることが困難であった。今後、以上のような問題点の解決を目指し、RNAの長さを直接識別するたんぱく質（群）の同定を、マイクロインジェクションの系と試験管内の系を組み合わせることによって、さらに試みる。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きたい。

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昨年度すでに確認している。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、このリモデリングの分子機構の詳細を明らかにして行きたい。また一時中断していたが、来年度より、mRNA型イントロンのスプライシングに依存してRNA上に特異的に形成されるたんぱく質複合体の構造と機能の研究を行いたい。

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

（大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所、教授）

② 研究項目：

1) Sld2とDpb11の結合領域の限定と結合制御機構の解析

2) 複製開始領域に集合するタンパク質のin vivo及びin vitroにおける解析

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：細胞中でRNA上に形成されるたんぱく質複合体の構造と機能の解析。

主として、核外輸送に先だって核の中でRNA上に形成されるたんぱく質複合体を研究する。

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文(原著論文)発表

- Kaoru Masuyama, Ichiro Taniguchi, Naoyuki Kataoka and Mutsuhito Ohno : RNA length defines RNA export pathway. *Genes and Development* (2004) Sep 1; 18(17):2074-85.
- Kaoru Masuyama, Ichiro Taniguchi, Naoyuki Kataoka and Mutsuhito Ohno : SR proteins preferentially associate with mRNAs in the nucleus and facilitate their export to the cytoplasm. *Genes to Cells* (2004) Oct; 9(10):959-65
- Nameki, D., Kodama, E., Ikeuchi, M., Mabuchi, N., Otaka, A., Tamamura, H., **Ohno, M.**, Fujii, N., and Matsuoka, M. : Mutations conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitors are restricted by gp41 and Rev-responsive element functions. *J. Virol.* (2005) Jan 79, 764-770.