

「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。出芽酵母の Sld2 タンパク質は 11 個の CDK リン酸化モチーフを持ち、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、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 84 番目のスレオニンの CDK によるリン酸化が、Dpb11 C 末の一对の BRCT ドメインと結合に必須であることを示した。さらに、隣接する領域が CDK によるリン酸化されるまで、このリン酸化が抑制されていることを示した。一方、CDK に依存して形成される新たな複合体を同定し、この複合体の形成が Sld2-Dpb11 複合体形成に依存していることを示した。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、核外輸送に先だって核の中で 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が、それ以外の RNA・たんぱく質複合体も視野に入れる。平成17年度は、スプライシング依存的に mRNA 上に形成されるたんぱく質複合体、mRNA 上に mRNA 核外輸送因子を優先的に結合させる機構、HIV-1 RNA 核外輸送機構の3つを中心に研究を進め、一定の成果が得られたが、同時に様々な問題点も明らかになってきた。

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 の結合制御機構の解析

Sld2 タンパク質は 11 個の CDK リン酸化モチーフを持ち、84 番目のスレオニン (Thr84) が Dpb11 への結合に必須であり、このリン酸化が Sld2 上の他の CDK リン酸化により制御されている。本年度は、実際に Thr84 のリン酸化が他の CDK 部位のリン酸化により制御されていることを *in vivo* 及び *in vitro* において示した。

Thr84 のリン酸化が細胞内で他の CDK リン酸化により変化するかを明らかにするため、Thr84 以外の CDK リン酸化モチーフを破壊した変異を用いて Thr84 のリン酸化を調べた。Thr84 以外の 6 個の CDK リン酸化モチーフに変異を導入した (6A) Sld2 を持つ細胞は、ほとんど増殖しないが、Thr84 のリン酸化も起こらなかった。一方、Thr84 をリン酸化型の Asp に変えたものでは、例え残り 10 個のリン酸化モチーフを破壊したものでも、細胞の増殖に欠損を示さない。このことは、Thr84 以外の CDK リン酸化は Thr84 のリン酸化制御のために働いており、Thr84 がリン酸化されれば他のリン酸化は必要ないことを示している。

さらに、Thr84 のリン酸化制御を *in vitro* で詳しく解析した。Thr84 部位を他の CDK リン酸化部位と区別するため、PI3 キナーゼ様タンパク質キナーゼ (PIKK) によるリン酸化部位に変換した。この変異は、野生型の Sld2 と置き換えることが出来るため、酵母細胞内では PIKK キナーゼにリン酸化され機能していることが予想される。この変異を持つ Sld2-P1 タンパク質 (79-263 アミノ酸領域) を精製し、PIKK の一種である DNA 依存性キナーゼ (DNA-PK) と CDK を用いてリン酸化反応を調べた。その結果、Thr84 のリン酸化は、DNA-PK のみでは起こらないが、CDK によりまず Thr84 以外をリン酸化し、DNA-PK を加えるとリン酸化が起こることが分かった。このことは、CDK リン酸化による Thr84 のリン酸化制御を強く支持するものである。

2) 複製開始領域に集合するタンパク質の解析

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により、Pol ϵ と GINS からなる複合体に S 期の開始とともに Sld2, Dpb11 が加わることを示していた。変異株を用いた詳しい解析から、この複合体が GINS-Pol ϵ -Sld2-Dpb11 の様に結合していることが分かった。そして、この複合体は CDK 依存的に出来ること、もう一つの複製開始に必須なキナーゼ DDK には依存しないこと、複製開始には依存しないこと、を明

らかにした。今後、この複合体の更なる詳細な解析を行なって行く予定である。

一方、Sld2 の Thr84 を Asp に変換したものだけでは、CDK 無しで DNA 複製を開始できない。このことは、他の複製因子も CDK によりリン酸化されていることを示している。我々は生化学的手法と遺伝学的手法を駆使して、Sld2 以外の CDK 基質を同定した。今後、CDK による複製タンパク質の開始領域への集合の制御の全体像を明らかに出来るものと期待している。

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、以下のことを実施した。

(i) mRNA 上にスプライシング依存的に形成されるたんぱく質複合体の解析

EJC はスプライシング反応に共役してスプライシングを完了した mRNA 上に特異的に形成され、RNA の核外輸送や細胞質機能に関与することが示されている。EJC の構成たんぱく質は現在までのところ約8種類同定されているが、構成成分の全貌、および EJC に結合しその機能を仲介するたんぱく質因子などについてはまだまだ不明の点が多い。EJC の構成成分である Y14/Magoh ヘテロ二量体は RNA が核外輸送された後も RNA に結合していて輸送だけでなく様々な細胞質機能を司ることが示唆されている。平成17年度は、Y14/Magoh ヘテロ二量体と相互作用する新規たんぱく質因子を酵母2-ハイブリッド法を改良した3-ハイブリッド法などを用いてスクリーニングしたが、同定された因子はすべて、既知のものであった。他方、Y14/Magoh ヘテロ二量体は、ショウジョウバエ卵母細胞における特定の mRNA の細胞質中での輸送に関与する事により、卵母細胞の前後軸形成に働くことが分かっている。その過程に問題が起こることが知られているショウジョウバエ *magonashi* (Magoh ホモログ) の2つの突然変異を、ヒトたんぱく質に導入した。HeLa 細胞核抽出液を用いた試験管内スプライシング系などを用いて、それらの変異 Magoh たんぱく質 (G18R、I90T) の挙動を詳細に調べた結果、I90T 変異体は Y14 とのヘテロ二量体形成の親和性が低下している事、G18R は Y14 との親和性には問題なかったが、スプライシング反応を介した mRNA への会合の効率が低下している事が分かった。これらの結果から、ショウジョウバエ *magonashi* 変異体の表現系は、EJC の形成不良が原因であることが示唆された。

(ii) 長い RNA 上に mRNA 核外輸送因子を優先的に結合させる機構

以前の結果は、細胞の中の何らかのたんぱく質因子が、核外輸送の際に RNA の長さを感じている事を強く示唆していたので、まず、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て同定するというアプローチを取った(昨年度)。しかし、同定されたたんぱく質が、RNA の長さに関知する因子そのものなのか、あるいは、RNA の長さに関知された結果として結合したもののなのか、という点について区別することが困難であった。平成17年度においては、mRNA の核外輸送に直接関与する REF/Aly と呼ばれる RNA 結合たんぱく質の組換え体たんぱく質を用いて、試験管内における RNA 結合活性を調べた結果、REF/Aly が長い RNA (=mRNA) に優先的に結合する性質を持っている事を示唆する結果を得た。この結果は、RNA の長さを感じ取る機構は意外

と単純かも知れないことを予感させるが、試験管内の結果であるだけに今後さらに慎重に検証していきたい。また、この試験管内の系に、やはり mRNA の核外輸送に関与する UAP56 と呼ばれる RNA ヘリカーゼ様因子の組換え体たんぱく質を加えたところ、この因子が REF/Aly の RNA への結合を ATP 依存的に促進することが分かった。今後、これらの現象をさらに詳細に解析し、長い RNA 上に mRNA 核外輸送因子を優先的に結合させる機構に迫りたい。

(iii) HIV-1 RNA 核外輸送機構の研究

エイズウイルス HIV-1 の RNA 上には、RRE と呼ばれる特異的な RNA 配列が存在し、ウイルスにコードされる Rev たんぱく質や複数の宿主側因子を含むたんぱく質複合体が RRE に結合することにより、この 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。アフリカツメガエル卵母細胞を用いたモデル実験系で、Rev が RRE を持つ mRNA 上から宿主側 mRNA 輸送因子である REF を特異的に取り除いてしまうという結果を得た。このモデル実験系に関しては、論文報告可能な高品質なデータの取得がほぼ完了しつつある。次いで、この現象が実際のエイズウイルス感染細胞でも起こっていることを検証しようと試みたが、P3 実験施設中での実験技術的制約に加えて、研究員が個人的な理由で離脱してしまったため、現在までに明確な結論を得る事ができていない。

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（国立遺伝学研究所、教授）

②研究項目：

- ・研究の総括と複合体形成制御
- ・生化学的手法による複合体制御の解析
- ・CDK による複合体制御の解析
- ・CDK 複合体の精製と Sld2 リン酸化の解析
- ・タンパク質相互作用の解析
- ・細胞内タンパク質の挙動解析
- ・出芽酵母 Dpb11, Sld2 タンパク質の細胞内動態の解析

「大野睦人」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

「荒木」グループ

- Yon-Soo Tak, Yoshimi Tanaka, Shizuko Endo, Yoichiro Kamimura, Hiroyuki Araki (National Institute of Genetics) : A CDK-catalysed regulatory phosphorylation for formation of the DNA replication complex Sld2-Dpb11, EMBO J., (印刷中)