

「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・細胞遺伝研究系・微生物遺伝研究部門 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 の上では、多くの複製タンパク質の複製開始領域への集合により複製が開始する。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。これまでに、CDK によりリン酸化された S1d2 タンパク質が 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ことを示して来た。本年度は、S1d2 の Dpb11 との結合能をより詳細に解析するとともに、複製開始に必要な S1d3 タンパク質も CDK によりリン酸化され Dpb11 に結合することを見つけた。さらに、S1d2, S1d3 のリン酸化をバイパスすると、CDK 活性が無くても DNA 複製が開始することを示した。このことは、CDK が S1d2 と S1d3 のリン酸化を介して複製開始を制御することを意味する。一方、細胞内で同定された CDK に依存して形成される新たな複合体に含まれるタンパク質間の相互作用を、精製したタンパク質から調べた。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18年度は、長い RNA 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、などの継続プロジェクトに他に、新規プロジェクトも開始した。一定の成果が得られたが、論文報告が遅れている他、様々な問題点も明らかになった。

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。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。

これまでに DNA 上の複製開始領域に集合する出芽酵母の新規複製因子を複数同定し、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、Sld2 と Dpb11 の結合機構、この結合の 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目指している。そのため、本年度は以下の研究を行った。

1) Sld2 タンパク質と Dpb11 タンパク質結合の解析

Sld2 タンパク質は 11 個の CDK によるリン酸化モチーフを持ち、その1つである Thr84 のリン酸化が起こると Dpb11 と結合する。Thr84 以外のリン酸化は、この Thr84 のリン酸化のために必要である。特に、Thr84 に最も近い Ser100 のリン酸化は重要である。これまでに、Dpb11 に結合する 18 アミノ酸の領域を限定していたが、この領域内のどのアミノ酸残基が重要であるかアミノ酸を2つずつアラニンに置換したペプチドを合成して調べた。その結果、Thr84 以外に Phe95, Asp96 を同時にアラニンに置換したものでは、Dpb11 結合能が大きく低下することが分かった。このアミノ酸置換を持った Sld2 タンパク質は、細胞内で機能していないことも分かった。これらのことは、Dpb11 との結合に必須のリン酸化 Thr84 に加えて 10 アミノ酸残基離れた領域も重要な働きをしていることを示している。

2) 複製開始因子の作る複合体の解析

我々は、CDK の活性化とともに Sld2, Dpb11, Pol ϵ (Pol2, Dpb2, Dpb3, Dpb4 サブユニットよりなる), GINS (Sld5, Psf1, Psf2, Psf3 サブユニットからなる)が細胞内で不安定な複合体を形成することを、クロスリンカーを用いることにより示してきた。しかし、クロスリンカーを用いているため、この複合体が実際に形成されているかには疑問が残る。そこでこれら因子を精製し、因子間の相互作用とともに、実際にこれらが複合体を形成するかを調べた。タグを付けたタンパク質をレジンに結合し、他のタンパク質が共に結合してくるかを調べたところ、4つの因子は互いに全て結合することが分かった。特に、Pol ϵ と GINS は効率良く複合体を形成する。さらに、Dpb11, Sld2 と Pol ϵ 間の結合では、Dpb11, Sld2 単独と Pol ϵ の結合に比べ、Dpb11 と Sld2 を同時に加えた方が Pol ϵ と効率良く結合する結果が得られた。このことは、細胞内で CDK に依存して Sld2-Dpb11 複合体ができ、Pol ϵ と結合することを示唆している(細胞内の結果は、これに合致している)。しかし、この4つの因子が、実際に1つの複合体を形成しているかを示す厳密なデータはなく、現在グリセロール密度勾配法等により確認を行なっている。

3) CDK による複製開始の制御機構の解析

CDK によるリン酸化に依存した Sld2 の Dpb11 への結合は、複製開始に必須である。しかし、Sld2 の Thr84 を Asp に変えたリン酸化型変異でも、複製開始には CDK 活性が必要である。このことは、Sld2 以外にも複製に必須な CDK の基質があることを意味する。そこで新たな基質を捜すため2つのアプローチを行なった。即ち、リン酸化型 Sld2 変異と共存すると常に複製が開始し致死になる変異の分離と、CDK リン酸化部位の変異が致死となる複製因子を捜すことである。前者からは複製因子 Cdc45 の変異が、後者からは Sld3 が得られた。

Sld3 (668アミノ酸)は12個の CDK リン酸化モチーフをもち、モチーフ中の Thr600 と Ser622 のリ

ン酸化が増殖に必須であることが分かった。この両部位は、*in vitro*, *in vivo*ともに CDK によりリン酸化される。さらに、リン酸化されると Dpb11 タンパク質の N 末に存在する一対の BRCT ドメインと結合する。Dpb11 の量を増やすと、リン酸化されていない Sld3 でも結合が起こり、増殖できるようになる。そこで、Dpb11 の量を増やすとともに Sld2 のリン酸化型変異を導入すると、CDK 活性が無くても複製が開始した。このことは、複製開始時に CDK は主として Sld2 と Sld3 をリン酸化し、リン酸化された両者が Dpb11 の2対の BRCT ドメインそれぞれに結合することが必須であることを示す。

一方、Cdc45 の変異タンパク質 Jet1 を持つ細胞でも、Sld2 のリン酸化型変異と組み合わせることにより、CDK に非依存的に複製を開始する。Sld3 は Cdc45 と結合するが、Sld3 と Dpb11 のリン酸化依存的結合は、Cdc45 により促進されることが分かった。さらに、Jet1 では、CDK による Sld3 のリン酸化が起こらなくても、Dpb11 との結合が部分的に回復する。これらのことから、Cdc45 と Sld3 が複合体を作り、CDK が Sld3 をリン酸化すると Dpb11 に結合するというモデルを提唱した。

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。

1) 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 (Masuyama et.al., Genes Dev. 2004) 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。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ているが、本当に REF/Aly が RNA の長さを感じ取る因子なのかどうかはさらに実験を重ねる必要がある。一方、UAP56 と呼ばれる RNA ヘリカーゼ様因子が、REF/Aly を ATP 依存的に RNA 上に load する事が示唆された。平成18年度は、試験管内の系でこの現象をさらに詳細に解析し、UAP56 のこの活性には、ATP は必要だがその加水分解は必要ないことが強く示唆された。UAP56 の野生型たんぱく質あるいは ATP 加水分解に障害を示す突然変異体たんぱく質を卵母細胞核へ微量注入したところ、REF/Aly の RNA への loading 活性においては、試験管内の結果から期待された通りの結果を示したが、mRNA 核外輸送の活性と REF/Aly の RNA への loading 活性は必ずしも関連しなかった。RNA の核外輸送活性は、RNA 上の REF/Aly の量だけで決まらず、さらに複雑な要素により決定されていることが示唆された。

2) mRNA の ID エlementとしてのポリAの尾の役割

「イントロン」「RNA の長さ」に加えて、「ポリAの尾」が RNA 輸送の経路を決定する要因であることを示唆する実験結果を得た。アフリカツメガエルの卵母細胞核へ、50 塩基長まで短くしたイントロンを持たない mRNA を微量注入すると、この RNA は期待通り U snRNA として認識され U snRNA の機構で核外へ輸送された。ところが、mRNA のプロモーターとポリA付加シグナルを持つ DNA コンストラクトを微量注入し、同じ配列を持つ RNA を *in vivo* で転写させると、その転写物は、概ね mRNA として認識され mRNA の機構で核外へ輸送された。詳しく調べてみると、ポリAの尾を持ったものが mRNA 化していることが分かった。ポリA付加反応が重要なのか、あるいはポリAの尾の存在そのものが重要なのかは現在のところ明らかでないが、ポリAの尾(の付加)が mRNA の ID エlementとして機能することになる。

3) エキソン内スプライシング促進配列

さらに、上記以外の mRNA の ID エlementを同定する事を目指した。その一環として、スプライシング活性の弱いイントロンのスプライシングを増強するエキソン内のプリンに富む配列である、エキソン内スプライシング促進配列 (Purine-rich Exonic Splicing Enhancer 以下 ESE) が、mRNA の ID Elementとして機能するのではないかと着想し、アフリカツメガエル卵母細胞への RNA の微量注入系を用いて実験を行った。その結果、予想に反して、ESE は mRNA を始め様々な RNA の核外輸送を遅延させる Element (RNA 核内繫留 Element) として機能する事が分かった。興味深い事に、ESE はスプライシングを経て生成された mRNA の核外輸送は阻害しなかった。つまり、ESE は、イントロンを持った mRNA をスプライシングが完了するまで核内に繫留する活性を持つ事が示唆された。さらに、様々な ESE 配列を用いた競合実験により、共通の核内繫留因子が存在する事が強く示唆された。そこで、アフリカツメガエル卵母細胞核中で ESE に特異的に結合している因子の探索を行ったところ、スプライシング因子である 17S U2snRNP 関連因子が同定された。

4) リン酸化・脱リン酸化による RNA 核外輸送複合体の構築・脱構築機構

UsnRNA 核外輸送複合体 (export complex) の核内での構築・細胞質での脱構築は、大野らによって同定された PHAX という RNA 結合たんぱく質の核内でのリン酸化・細胞質での脱リン酸化によって制御される。このようなコンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化システムを構築・維持するためには、核に局在化するリン酸化酵素 (キナーゼ) と細胞質に局在化する脱リン酸化酵素 (ホスファターゼ) の存在が仮定されるが、それらの分子の実体は不明である。H18 年度は、まず、PHAX の重要なリン酸化部位を明らかにした。セリンやスレオニンのクラスターを含むリン酸化部位候補は 8カ所存在するが、その内、N 末から2番目のクラスターのリン酸化が UsnRNA 核外輸送複合体の構築に必要かつ十分であることを明らかにすることができた。今後、キナーゼ、ホスファターゼの分子の実体を明らかにして行く。

5) 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してしまう。我々は、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。さらに詳しく調べてみると、EJC は全く正常に形成されているが、EJC 以外の RNA 部位に結合した REF が取り除かれていて、それが mRNA 輸送経路の阻害につながっていることが分かってきた。この結果を論文投稿したが、その revise 中に「mRNA 核外輸送のためには EJC ではなくキャップ構造付近の RNA 上にリクルートされる REF が重要である」という論文 (Cell, 127(7):1389-400, 2006) が出版された。Rev が取り除くのはこのキャップ構造付近の REF ではないかとの着想を得て、新たな実験を行っている。

3. 研究実施体制

(1)「荒木」グループ

①研究者名

荒木 弘之(国立遺伝学研究所 教授)

②研究項目

- ・ 生化学的手法による複合体形成機構の解析
- ・ CDK による複合体制御の解析
- ・ CDK によりリン酸化された Sld2 と Dpb11 の結合の解析
- ・ CDK による複製開始制御の機構:Dpb11 とリン酸化 Sld3 の結合
- ・ タンパク質相互作用の遺伝学的解析

(2)「大野睦人」グループ

①研究者名

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. 研究成果の発表等

「荒木」グループ

(1) 論文発表(原著論文)

- 著者名:Yon-Soo Tak, Yoshimi Tanaka, Shizuko Endo, Yoichiro Kamimura, Hiroyuki Araki

発表論文タイトル:A CDK-catalysed regulatory phosphorylation for formation of the DNA replication complex Sld2-Dpb11

掲載誌:The EMBO Journal、Vol.25 No.9、1987-1996, 2006

- 著者名:Seiji Tanaka, Toshiko Umemori, Kazuyuki Hirai, Sachiko Muramatsu, Yoichiro Kamimura & Hiroyuki Araki

発表論文タイトル:CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast

掲載誌:nature、Vol.445 No.7125、328-332, 2007