

「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担う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 Sld2 及び Sld3 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に必須であり CDK のメインターゲットであることを示した。本年度は、Sld2 と Dpb11 の結合した複合体が DNA ポリメラーゼ ϵ と GINS と結合し、我々が提唱する pre-Landing Complex (pre-LC) を形成することを、精製したタンパク質を用いて示した。一方、Sld3 タンパク質は新規の Sld7 タンパク質と強固な複合体を形成していることがわかり、この複合体を用いると、複製時の DNA ヘリカーゼと考えられている CMG 複合体の前駆体様複合体の形成を促進することが分かった。残された期間内に、CMG 複合体形成機構及び pre-LC と CMG 複合体の関係を明らかにしていきたいと考えている。

また本研究では、「核酸合成に関わるたんぱく質複合体の構造と機能解析」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。平成19年度は、RNA 上に mRNA 核外輸送因子を結合させる機構、mRNA の ID エlementとしてのポリAの尾の役割、mRNA 前駆体の核内保持機構、リン酸化・脱リン酸化による RNA 核外輸送の制御機構などのプロジェクトにおいて成果が得られ、いずれも論文報告を行った。

来年度は最終年度なので、研究成果を確実に論文報告して行きたい。

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。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、Sld3 の結合が必須であり、この結合が S 期開始における CDK のメインターゲットあることを示した。本年度は、さらに以下の研究を行った。

1) Sld2 タンパク質と Dpb11 タンパク質相互作用の解析

Sld2 タンパク質は 1 1 個の CDK によるリン酸化部位を持ち、その 1 つである Thr84 のリン酸化が起こると Dpb11 の C 末側に位置するタンデム BRCT (BRCA1 C-Terminal) ドメインと結合し、複製開始に働く。しかし、Dpb11 の C 末の BRCT ドメインが Sld2 との結合のみに働いているかは明らかでなかった。そのため、Dpb11 と Sld2 の融合タンパク質を作成し、機能するか調べた。その結果、両者の全領域を融合させたものでは機能するが、Dpb11 の C 末 BRCT を欠損するものでは例え Sld2 を融合させたものでも機能しないことが分かった。このことは、Dpb11 の C 末が Sld2 以外の因子と結合するか、Dpb11 の C 末と Sld2 の結合が他の因子との結合に必要なことを意味している。

2) Sld3 タンパク質の機能ドメインの解析

Cdc45、Mcm 複合体 (Mcm2-7 より成る)、GINS が強固な CMG 複合体を形成していることが分かり、この CMG 複合体が複製フォークで DNA ヘリカーゼと働いていると考えられるようになった。Sld3 タンパク質は Dpb11 に加えて Cdc45、Mcm、GINS とともに結合するので、CMG 複合体形成に重要な役割を果たすと考えられる。そこで、Sld3 のこれらタンパク質との結合ドメインを調べた。C 末には Dpb11、GINS が、中央部には Cdc45、MCM が、また N 末には新たな因子である Sld7 タンパク質が結合することが分かった。特に、Sld7 と Sld3 は強固な複合体を形成しており、CMG 形成等において効率よく働いていると思われる (後述)。

3) 複製開始複合体の解析

複製開始領域には、pre-Replicative Complex (pre-RC; DNA に結合した Orc、Mcm、Cdc6、Cdt1 から成る) が CDK 活性の低い時期 (M 期後期から G1 期) に形成し、CDK 活性の増加とともに DNA ポリメラーゼを含む複製複合体が結合し、DNA 合成を開始する。我々は、CDK 活性化後のタンパク質複合体の形成に着目して研究を進めている。

細胞内では、複製開始時に Sld2、Dpb11、DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ)、GINS からなる pre-Landing Complex (pre-LC) が CDK 活性に依存して形成する。この pre-LC はクロスリンカーを用いないと検出できないので、精製したタンパク質からの再構成を試み、遂に成功した。この系では、Sld2 を精製した CDK によりリン酸化すると Dpb11 と結合する。Dpb11 は単独でも Pol ϵ と弱く結合するが、Dpb11-Sld2 複合体の方が Pol ϵ との結合能が高い。さ

らに GINS は Pol ϵ と結合し、Dpb11 への結合には Pol ϵ が必要である。従って、Dpb11-Sld2 複合体が形成されると、Pol ϵ 、GINs がこれらに結合することになる。このことは、クロスリンカーを用いて細胞内で得られた結果とよく一致する。今後、この複合体の性質を詳しく調べるとともに、他の因子との結合についても調べる予定である。

一方、CMG 複合体形成を調べるため、Cdc45, Mcm, GINS を種々の条件で混ぜ合わせ複合体形成を調べた。そして、これら因子が複合体を作るためには、Sld3 が必須であること、特に新たに得られた Sld3-Sld7 複合体（上述）を用いると効率のよい複合体形成が観察された。しかし、この複合体は非常に大きな構造体となっており、細胞内で形成される CMG 複合体とは異なり、その前駆体と考えている。CDK や Cdc7 キナーゼによるリン酸化は、構造体に変化を与えるが、その解析は現在進行中である。

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においては、以下のことを実施した。

1) RNA 上に mRNA 核外輸送因子を結合させる機構

mRNA の核外輸送に直接関与する REF/Aly という 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た。さらに UAP56 という RNA ヘリカーゼが、REF/Aly を ATP 依存的に mRNA 上に load する事が示唆されていた。試験管内の系を構築し、この現象をさらに詳細に解析したところ、UAP56 のこの活性には、ATP への結合は必要だがその加水分解は必要なく、UAP56 は RNA の 2 次構造を解きほぐす RNA ヘリカーゼとしてよりも、RNA 上に特定の RNA 結合たんぱく質が結合するのを補助する分子シャペロンとして機能することが示唆された。この結果は、それ自体が RNA 結合活性を持つ REF/Aly が RNA に結合するのを補助する因子が存在するという点で非常に興味深い。さらに、UAP56 の ATP 加水分解に障害を示す変異体たんぱく質を卵母細胞核へ微量注入したところ、mRNA 核外輸送が阻害された。以上の結果は Mol. Cell. Biol. 誌に論文報告した。

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。上記の UAP56-REF/Aly の系が、本当に RNA の長さを感じ取る因子なのかどうかはさらに慎重に実験を重ねる必要がある。

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が分かった。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、この現象は転写とは無関係であり、単純にポリAの尾を持ったものが mRNA 化していることが分かった。さらに詳しく調べるとポリA付加反応が重要なのではなく、適切な長さのポリA配列の存在が重要であることが分かった。ポリA配列

の長さは短すぎると核外輸送は起こるが mRNA 化せず、長すぎると(おそらく RNA の品質管理機構により)核内に保持され核外輸送されなかった。ポリA配列の位置は RNA の 3'端である必要はなく内部でも機能した。ポリAの配列が mRNA の ID エlementとして機能することになる。以上の結果を Nucleic Acids Res.誌に論文報告した。

3) mRNA 前駆体の核内保持機構

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、選択的スプライシングに関与する、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 エlement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 核内保持Element)として機能する事が分かった。

一般に、イントロンが除かれる前の RNA(mRNA 前駆体)はスプライシングが終わるまで核の中に留められていて細胞質に現れることはない。これは、間違ったタンパク質の情報を細胞質に伝えないという RNA の品質管理機構のひとつである。この機構は重要であるにもかかわらずほとんど明らかになっていない。ESE 配列を大量に核内に導入すると mRNA 前駆体の核内保持が競合的に阻害されることから、mRNA 前駆体の核内保持を ESE が補助していることが強く示唆された。

興味深い事に、ESE 配列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保持する活性を持つが、その核内保持活性はスプライシングにより解除される事が示唆された。この解除機構により ESE を持つ mRNA も問題なく核外輸送される。mRNA 前駆体を核内に保持する因子を同定するために、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。以上の結果は、BBRC および PNAS 誌に論文報告した。この結果は、日本経済新聞や京都新聞などの各誌に報道された。

4) リン酸化・脱リン酸化による RNA 核外輸送の制御機構

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った。今回、それらの酵素の実体が、それぞれキナーゼ CK2 とホスファターゼ 2A であることを、生化学的手法と RNAi ノックダウン法などを用いて明らかにした。以上の結果を Mol. Cell. Biol.誌に論文報告した。

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)

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 によるリン酸化された 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)

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

(1) 論文発表(原著論文)

Seiji Tanaka, Yon-SooTak and Hiroyuki Araki

The role of CDK in the initiation step of DNA replication in eukaryotes

Cell Division, 2, 16, 1-6, 2007

Masuyama, K., Taniguchi, I., Okawa, K. and Ohno, M. (2007)

Factors associated with a purine-rich exonic splicing enhancer sequence in *Xenopus* oocyte nucleus. *Biochem. Biophys. Res.* 359,580-585.

Taniguchi, I., Masuyama, K. and Ohno, M. (2007)

Role of purine-rich exonic splicing enhancers in nuclear retention of pre-mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 13684-13689.

Fuke, H. and Ohno, M. (2008)

Role of poly (A) tail as an identity element for mRNA nuclear export. *Nucleic Acids Res.* 36(3), 1037-1049.

Kitao, S., Segref, A., Kast, J., Wilm, M., Mattaj, I. W. and Ohno, M. (2008)

A compartmentalized phosphorylation/dephosphorylation system that regulates U snRNA export from the nucleus. *Mol. Cell.* 28(1), 487–497.

Taniguchi, I. and Ohno, M. (2008)

ATP-dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56. *Mol. Cell. Biol.* 28(2), 601–608.