

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 核酸合成に関わるたんぱく質複合体の構造と機能解析

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

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 教授)

主たる共同研究者： 大野 睦人(京都大学ウイルス研究所 教授)(平成15年11月～)

3. 研究内容及び成果：

＜荒木G分＞

細胞内での生命現象の多くは、複数のタンパク質が特定の場所に、特定の時期に集合し、機能を発揮する高度に制御された反応である。それは、これらの反応をオン・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。DNA複製開始反応でも、多数の複製因子が開始領域へ集合し、反応を開始する。真核生物ではこの反応に CDK (Cyclin-dependent kinase)が必要であるが、出芽酵母の Sld2 タンパク質は CDK によるリン酸化されると Dpb11 タンパク質と結合し、この集合反応を促進する。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の一つと捉え、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目指した。

Dpb11 タンパク質は、N 末、C 末に一对のタンデム BRCT (BRCA1 C-Terminal)ドメインを持つ。タンデムに配置した BRCT ドメインはリン酸化ペプチドとの結合ドメインとして働く。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、CDK によりリン酸化されると Dpb11 タンパク質に結合する。in vivo 及び精製タンパク質を用いた in vitro の解析から、これらリン酸化モチーフの1つの中にある Thr84 が CDK によりリン酸化されると、Dpb11 の C 末側タンデム BRCTドメインと結合することが分かった。一方、Sld2 の Thr84 を含まない CDK によるリン酸化モチーフ6カ所の Ser/Thr を同時に Ala に置換すると、Dpb11 と結合できず、細胞は増殖できなくなるが、Ser/Thr を Asp に置換したものでは野生型同様に増殖できる。このことは、Thr84 のリン酸化が他の部位のリン酸化により制御されている可能性を示唆している。実際 Thr84 以外の6カ所に Ala 置換を持つ変異では、Thr84 のリン酸化レベルが低下し、in vitro のリン酸化反応でも Thr84 のリン酸化は他の部位のリン酸化より遅れる。さらに、Thr84 の部位を CDK による認識部位から PIKK 型キナーゼの認識部位に変えると、PIKK の一種である DNA-PK による Thr84 のリン酸化は CDK による前処理を必要とした。これらの結果は明確に、Thr84 のリン酸化が他の部位のリン酸化により制御されていることを示している。この制御系は、Sld2 と Dpb11 の結合に高い CDK 活性の閾値を設定する。このことは、複製開始のタイミングを決める上で重要であるとともに、他の複製開始因子をリン酸化して、再複製開始を起こさせない機構に寄与していると考えられる。

Sld2 のリン酸化型変異でも、複製は開始には CDK が必要であった。これは Sld2 以外に CDK のターゲットとなる複製因子が存在するためだと考え、Sld2 以外の CDK ターゲットの探索を行った。その結果、Sld3 タンパク質が CDK にリン酸化されて Dpb11 の N 末のタンデム BRCTドメインに結合することが分かった。この結合には、Sld3 の Thr600 あるいは Ser622 の CDK によるリン酸化が必須であった。Thr600, Ser622 を Ala に同時に置換した変異を持つ細胞は増殖できず、この結合も細胞増殖・DNA 複製に必須であることが示唆された。我々はまた、Sld2 のリン酸化型変異とともに CDK なしで複製を開始する *JET1* 変異を分離した。*JET1* 変異は複製因子の一つ Cdc45 に起こったもので、遺伝学的解析から Sld3 と Dpb11 のリン酸化依存的結合をバイパスしていることが示唆された。従って、Sld3 と Dpb11 の結合を *JET1* でバイパスし、Sld2 と Dpb11 の結

合を Sld2 のリン酸化型変異でバイパスすると、CDK が無くても、複製を開始する。即ち、CDK によりリン酸化された Sld2, Sld3 と Dpb11 の結合が、CDK が制御する複製開始の最少で且つ必須な機構なのである。

Dpb11, Sld2, Sld3 の結合がどのように複製を開始させるのかに答えるため、CDK に依存してできる複合体を調べた。不安定な複合体を検出するため、細胞をクロスリンク処理した後、複製因子の1つである GINS のサブユニットにタグを付け、免疫沈降を行った。その結果、Pol ϵ は G1 期から常に共沈降することが分かった。また、 α ファクターによる G1 期停止を解除し CDK が活性化してくると、Dpb11 と Sld2 が共沈殿することが分かった。この共沈降は、CDK が活性化しても複製を開始しない条件でも観察される。しかし、MCM や DNA ポリメラーゼ α は、複製が起こる条件でなければ共沈殿が観察されない。さらにこれらのタンパク質を精製して混合すると、Sld2 のリン酸化に依存して Dpb11 と結合し、この複合体には Pol ϵ と GINS が結合することが分かった。従って、Sld2 の CDK によるリン酸化は、Sld2-Dpb11 複合体を形成させることにより Pol ϵ と GINS をこの複合体に結合させることにあるようである。Dpb11 と結合する Sld3 は、S 期初期に複製が開始する領域には G1 期から結合しており、この領域上でリン酸化された Sld3 が Dpb11 との結合を介して、Sld2, Pol ϵ , GINS を複製開始領域へ呼び込むものと考えられる。

以上のように、CDK によりリン酸化された Sld2 と Sld3 が Dpb11 に結合することにより、DNA の複製開始を行うという分子スイッチを明らかにすることができた。さらに、そのスイッチがどのように使われているかもおよそ明らかになってきた。Sld2 と Dpb11 の結合は大変巧妙に制御されているが、Sld2 の Dpb11 への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できることも示しており、人口スイッチとして使える可能性も十分にある。

<大野G分>

「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が、それ以外のRNA・たんぱく質複合体も視野に入れる。

核外輸送におけるmRNAのIDエレメントの探索

核—細胞質間の物質輸送は真核細胞の活動に必須な過程である。真核細胞には、mRNA、U snRNA、tRNA、rRNAなど多種類のRNAが存在するが、その大部分は核での転写後に細胞質へ輸送される。異なる種類のRNAはそれぞれに特異的な輸送因子群がRNA上に集合し、特異的なRNA・たんぱく質複合体を形成してから核外へ輸送される。興味深いことに、どの輸送因子群複合体によって輸送されるかが輸送後のRNAの機能・運命に影響を及ぼすことが明らかになってきている。つまり、核の中でRNA上に形成される様々なたんぱく質複合体がそれぞれのRNAの核外輸送機構を決定し、さらにそれぞれのRNAに特異的な細胞質機能を制御するのである。このことは、それぞれのRNAの種類は核の中でたんぱく質(複合体)によって既に識別されていることを意味する。しかし、それぞれのRNAの種類のいかなる特徴が核内で識別されているのか、その識別を行うたんぱく質(複合体)は何か、という点に関しては未知な部分が多い。

本研究ではmRNAに焦点を絞り、mRNAがもつ様々な特徴を、別種のRNAであるU snRNAに移植したキメラRNAを作製し、そのRNAの核外輸送を調べることで、mRNAをmRNAとして識別させている特徴(mRNAのIDエレメント)を探索してきた。現在までに「イントロンの存在」「約300塩基長以上のRNAの長さ」「ポリA配列の存在」の3種類のmRNAのIDエレメントを同定した。今後さらに、それらのIDエレメントを認識するたんぱく質(複合体)を同定することにより、核の中でのRNAの識別機構を明らかにすることを目指す。

核の中でRNAの長さが検知される機構

「約300塩基長以上のRNAの長さ」がmRNAのIDエレメントとして機能するという上述の結果は、細胞の中の何らかのたんぱく質因子が、核外輸送の際に、核の中でRNAの長さを検知している事を強く示唆する。RNAの長さを検知する機構に関して以下のように重要なヒントを得た。mRNAの核外輸送に重要であることが分かっているRNA結合たんぱく質であるAly REF/Aly (以下、REF)は、試験管内で単独で長いRNAに優先的に結合することを見いだした。また、やはりmRNAの核外輸送に重要であるRNAヘリカーゼ様因子UAP56がREFのRNAへの結合を増強することを見いだした。試験管内の系を用いて、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強く示唆された。この結果は、それ自体がRNA結合活性を持つREF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。ただし、UAP56-REFの系が本当にRNAの長さを検知する機構なのかどうかはさらに慎重に実験を重ねる必要がある。

mRNA前駆体の核内保持機構

上記以外のmRNAのIDエレメントを同定する事を目指す過程で、偶然選択的スプライシングの制御配列のひとつであるエキソン内スプライシング促進配列(exonic splicing enhancer: ESE)がmRNAを始め様々なRNAの核外輸送を遅延させるエレメント(RNA核内保持エレメント)として機能する事が分かった。

イントロンが除かれる前のmRNA前駆体が細胞質に輸送されてしまうと大きな問題が起こる。まず、スプライシングが起こらないため正しいタンパク質が発現できなくなる。また、mRNA前駆体が翻訳されてしまうとドミナントネガティブ活性のある異常タンパク質が産生されるおそれがある。ところが実際は、mRNA前駆体はスプライシングが終わるまで核内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の品質管理機構の一種である。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。重要なことは、上記ESE配列を大量に核内に導入すると、ESEを持つRNAだけでなく、通常の(ESEを持たない)mRNA前駆体の核内保持が競合的に阻害され、これらのRNAが細胞質に現れてしまうことである。つまり、通常のmRNA前駆体の核内保持とESEの核内保持は、共通する因子を用いていることが分かったのである。このことから、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配列を持っていても、スプライシングを経て生成されたRNAであれば、核外輸送は阻害されなかった。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わけである。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。

その他

リン酸化・脱リン酸化によるU snRNA核外輸送の制御機構、たんぱく質遺伝子のイントロンにコードされるmiRNAの発現機構、HIV-1 Revたんぱく質によるRNA核外輸送複合体のリモデリング機構などについて重要な知見を得た(詳細は省略)。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

<荒木G分>

論文発表:国内0件、海外3件。 口頭発表:国内24件、海外14件。 ポスター発表:国内14件、海外10件。
特許出願:国内外ともなし。(平成21年1月6日現在)

本研究チームの発表論文数は少ないものの、DNA 複製の制御系に関するNature、EMBO J.の論文など極めて質の高い論文が著名な科学雑誌に掲載されていることを高く評価する。外部発表は十分なされていると認められるが、なお未発表の成果があり、これらを早急に論文にまとめ公表されることを望む。

<大野G分>

論文発表:国内(和文)11件、海外(欧文)12件。 招待講演:国内11件、国際6件。 口頭発表:国内15件、海外8件。 ポスター発表:国内15件、海外:29件。 特許出願:国内外ともなし。

毎年コンスタントに生化学分野で一流と呼ばれる雑誌に論文を発表しており、また多くの国際学会でも報告している。

代表論文 2 編とその要約:

Masuyama, K., Taniguchi, I., Kataoka, N. and Ohno, M. (2004)

RNA length defines RNA export pathway.

Genes Dev. 18, 2074-2085.

(RNA の長さが mRNA の ID エLEMENTとして機能していることを明らかにした。)

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.

(選択的スプライシングの制御配列のひとつが mRNA 前駆体の核内保持に寄与することを明らかにした。)

両グループとも特許出願はないが、このような基礎的な研究に工業所有権は、短期的には期待できない。しかし、今後期待がもてる芽は出ている。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

<荒木G分>

DNA 複製は生命の根幹を成すものである。またこの制御系として、本研究で取り上げた CDK は細胞周期のメインエンジンであり、単に DNA 複製機構の一端を明らかにしただけではなく、細胞周期制御研究にも貢献した。またここで働く分子スイッチが、リン酸化による Sld2, Sld3, Dpb11 タンパク質の結合であることを示し、当初目指していた Sld2, Dpb11 タンパク質の結合による分子スイッチをより完成したものとして報告している。複製開始のスイッチに関し、タンパク質レベルの研究によって機構を明らかにしたことは、この分野の画期的な成果である。研究成果は極めてユニークで、他の追従を許さない。今後、X 線・NMR・電子顕微鏡など共同研究による異分野の解析をすすめて、新たな研究領域を創製することを期待する。

<大野G分>

RNA 核外輸送の分子機構の研究は、国外の数ヶ所の大きな研究グループを中心に盛んに行われているが、そのような競合する状況の中で核外輸送における mRNA の ID ELEMENTが、イントロン、mRNA の長さ、ポリ A 配列であることの解明、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

構の解明など、多くの新規な知見を得た。今後の発展も期待できる。特に、HIV の情報伝達に関しては、HIV の感染制御など実用面でも応用できる。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

両グループとも特になし。

以上