

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

研究課題

「核酸合成に関わるたんぱく質複合体の構造と機能解析」

研究終了報告書

研究期間 平成15年10月～平成21年3月

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）

§ 1 研究実施の概要

多くの生命現象では、複数のたんぱく質による複合体の形成とその複合体の構造変換（リモデリング）が重要な機能を担っている。核酸の合成に関わるタンパク質においても同様である。この研究では、（１）染色体 DNA 複製の開始と関与するたんぱく質複合体に焦点をあて、これら複合体の形成の制御機構を分子スイッチとして解明すること、（２）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形成機序を解明し、RNA 輸送を制御する抗エイズ創薬の可能性を探索することを目指した。

（１）染色体 DNA 複製の開始と関与するたんぱく質複合体の形成の制御機構の解明

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。これら因子の複製開始領域への集合には、CDK（Cyclin-dependent kinase）による複製因子のリン酸化が必要であり、その一つが Sld2 の CDK によるリン酸化に伴う Dpb11 への結合である。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、4つの 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なることが知られているが、Dpb11 では N 末、C 末に一对のタンデム BRCT ドメインを持つことになる。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。Sld2 の Dpb11 と結合する領域を限定したところ、2つの CDK リン酸化モチーフを含んだ 28 アミノ酸残基からなる領域であることが分かった。in vitro での結合反応による解析からは、リン酸化モチーフの中にある 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。Sld2 の Thr84 を Ala に置換した変異タンパク質は Dpb11 には結合せず、またこの変異 Sld2 を持つ細胞は増殖することができない。逆にリン酸化型と考えられる Asp に置換したものでは Dpb11 と結合でき、また増殖も可能であった。従って、Thr84 がリン酸化されると Dpb11 と結合し、細胞増殖・DNA 複製に働くと考えられる。一方我々は、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ことを示している。これらの Ser/Thr を Asp に置換したものでは、野生型同様に増殖できる。そこで、Thr84 を Asp に、その他の CDK によるリン酸化部位を Ala に置換した変異 Sld2 を作成したところ、この変異タンパク質は Dpb11 と結合でき、この変異を持つ細胞は正常に増殖することが分かった。このことは、Thr84 がリン酸化されれば他の部位のリン酸化は必要なく、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ていた。また 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に比較して遅れる。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

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 のリン酸化型を細胞に導入しても、CDK なしでは複製は開始しなかった。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要な機構なのである。

では、Dpb11, Sld2, Sld3 の結合はどのように複製を開始させるのであろうか。この疑問に答えるため、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 は活性化するが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染色体 DNA の領域には 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。

(2) 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形成機序の解明と RNA 輸送を制御する抗エイズ創薬の可能性の探索

「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してきた。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てきた。以下に、RNA の核外輸送関連とそれ以外に分けて概要を記述する。

RNA の核外輸送関連

核外輸送される主要な RNA には、リボソーム RNA (rRNA)、転移 RNA (tRNA)、ウリジンに富む核内低分子 RNA (U snRNA)、伝令 RNA (mRNA) などがあるが、これらの RNA は、それぞれの RNA 種に固有の輸送因子群が核内で結合した後、細胞質へと輸送される。核内でそれ

それぞれの RNA に結合する因子群は、核外輸送を司るだけでなく、核外輸送後のそれぞれの RNA の運命(局在化、翻訳、安定性など)をも規定することが明らかになってきた。つまり、RNA の種類は核内で既に核外輸送因子群によって識別されていて、その識別がこれら様々な RNA の運命全体に影響を与えるのである。

他方、snoRNA や scaRNA など、おそらく核外輸送されずに核内の様々なドメインに輸送される RNA も存在する。さらに、一種の RNA 品質管理機構として、イントロンを含む mRNA 前駆体などの未成熟 RNA は成熟化するまで核の中に留められる。

以上のような RNA の選択的分配制御は遺伝子発現に非常に重要であるが不明な点が多い。このような RNA の選別は RNA 上のどのような目印を識別して行われるのか、またその識別を行うたんぱく質因子群はどのようなものなのか？本研究は、関連したいくつかの点に焦点を絞り、細胞内の RNA 分配制御における RNA の識別機構を明らかにすることを目的とする。

1. 核外輸送における mRNA の ID エLEMENTの探索

我々は 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LEMENT) を探索してきた。「イントロンが存在すること」、イントロンがない場合には「強い高次構造をとらない、ある長さ以上の RNA 領域が存在すること」あるいは「適切な長さのポリ A 配列が存在すること」の 3 つの内、どれかの特徴を 1 つでも持つ RNA は、核内で mRNA と認識され、mRNA の輸送因子群が RNA 上に集合することを、現在までに明らかにした。

このイントロン ID 発動の実働分子は、おそらく別グループにより報告された EJC (Exon Junction Complex) と呼ばれるたんぱく質複合体であると考えられた。EJC はスプライシング反応に共役してスプライシングの完了した mRNA 上に特異的に形成され、mRNA の核外輸送因子を RNA 上に呼び込む働きをする。ただし、スプライシング依存的に mRNA 上に特異的に形成され、mRNA の核外輸送因子を RNA 上に呼び込む働きをする、もうひとつのたんぱく質複合体 TREX (TRANSCRIPTION EXPORT) 複合体が最近同定され、mRNA の ID の実体についての情報はやや混乱している。

RNA の長さ ID を認識するたんぱく質に関しても重要なきっかけが得られた。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 REF/A1 γ (以下、REF) は、試験管内で長い 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ことが分かっている RNA ヘリカーゼ様因子 UAP56 が REF とヘテロ二量体を形成し、REF を RNA 上へとロードして行く事が分かった。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。ポリ A 配列 ID の認識には、既知のポリ A 結合たんぱく質が関与していると思われるが、詳細な機構は現時点では不明である。

2. mRNA 前駆体の核内保持機構

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中に留められていて細胞質に現れることはない。この mRNA 前駆体の核内保持の分子機構は、遺伝子発現に重要であるにも関わらず、よく分かっていない。出芽酵母を用いたいくつかの遺伝学的研究があるのみである。脊椎動物では、酵母と比べてその遺伝子が桁違いに多くのイントロンを含んでいることから、酵母よりもさらに周到な機構によって mRNA 前駆体の核内保持を行っていると考えられるが、その機構の研究には全く手がつけられていない。我々は mRNA の ID エlementを探索する過程で、選択的スプライシングに関わるエキソン内の配列(Purine-rich Exonic Splicing Enhancer 以下 ESE)が mRNA 前駆体の核内保持を補助することを偶然発見し、mRNA 前駆体の核内保持機構を解明するという着想に至った。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。

3. リン酸化・脱リン酸化による RNA 核外輸送の制御機構

高等真核生物では、U snRNA は核内で合成された後まず細胞質に輸送される。この核外輸送は、PHAX(phosphorylated adaptor for RNA export)と名付けられた RNA 結合たんぱく質のリン酸化・脱リン酸化により制御される。この制御にかかわる酵素の実体が、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 ノックダウン法を用いて明らかにした。

4. 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

通常は、イントロンを含む mRNA 前駆体は細胞質へ輸送されず、スプライシングにより成熟 mRNA に変換されるまで核内に留まる。エイズウイルス HIV-1 は、自身のゲノムにコードされる Rev 蛋白質を用いて、スプライシングを全くあるいは部分的にしか受けていないウイルス RNA を細胞質に輸送させる。これは、核外輸送シグナル (NES) を持つ Rev がウイルス RNA 上の RRE と呼ばれる RNA 配列に結合することによって、RNA 核外輸送経路を通常の mRNA のそれから、NES 受容体 CRM1 依存性のそれへとスイッチする事によって成し遂げられる。この RNA 核外輸送経路のスイッチングにおいて、ウイルス特異的因子 Rev と宿主側の mRNA 輸送因子群の間の相克がいかんにして解消されるのかについては全く明らかではない。アフリカツメガエルの卵母細胞核への微量注入法を用い、イントロンを含むウイルス RNA を模擬したモデル RNA の核外輸送経路が、Rev によって宿主型からウイルス型へスイッチすることを確認した。さらに、Rev が輸送経路をウイルス型にするだけでなく、宿主側の輸送経路を阻害していることがわかった。この阻害効果の分子機構を現在解析中である。

RNA の核外輸送以外

5. たんぱく質遺伝子のイントロンにコードされる miRNA の発現機構の解明

たんぱく質遺伝子のイントロン中に存在する miRNA 前駆体の切り出しが、その宿主遺伝子のスプライシングとどのように関わっているかについて、HeLa 細胞核抽出液を用いた試験管内スプライシング反応系を用いて詳細に解析した。その結果、イントロン中の

miRNA 前駆体の切り出しは、スプライソソーム上でスプライシングが起こる前に起こり、2つの断片に分割されたホスト pre-mRNA はそのままスプライソソームの中でトランススプライシングを受けることが示唆された。これらの結果から、miRNA 前駆体と mRNA の両方が、1分子の pre-mRNA から生み出される仕組みが細胞内には存在することが示された。

6. 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 EJC 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。この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 mago nashi (Magoh ホモログ) の2つの突然変異を、ヒト Magoh たんぱく質に導入し試験管内スプライシング系を用いて詳細に調べた結果、ショウジョウバエ mago nashi 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。

7. 神経突起中での mRNA たんぱく質複合体のリモデリング

特定の mRNA は神経突起中を輸送されシナプス等で局所的に翻訳される事が分かっているが、その分子機構は不明な点が多い。我々は、神経細胞のモデル細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて、この過程における mRNA たんぱく質複合体 (mRNP) の構成成分の変化という視点から、この現象を研究している。現在までに、神経突起中を輸送中の mRNP と輸送後局所に係留される mRNP はたんぱく質成分が異なることを明らかにしている。

8. スプライシング後のイントロンの代謝機構

スプライシングによりラリアット型に切り出されたイントロンは核内に留まり、スプライシング因子が除かれた後、ラリアット構造が解消され (debranching)、分解されると考えられている。このイントロンの代謝機構については、酵母遺伝学を用いた少数の先行研究があるのみで、十分に理解されているとは言えない。ヒトの遺伝子には酵母と比べてはるかに多くのイントロンが含まれ、mRNA 初期転写物のうち実に 95 パーセント以上がイントロンとして切り出される。また、イントロンの中には snoRNA や miRNA などの重要な非コード RNA 分子がコードされており、スプライシングやイントロンの代謝と共役して産生される可能性が高い。このように、イントロンの代謝機構は高等真核生物にとって非常に重要な過程であると考えられ、高等真核生物ではほとんど解析されていない。我々はスプライシング反応後に生じるヒトのイントロン・スプライシング因子複合体を単離し、核内で起こるイントロンの代謝機構を分子レベルで解析することを試み、その過程の一部を明らかにした。

§ 2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

染色体 DNA 複製の開始と RNA の核外輸送に関するたんぱく質複合体に焦点をあて、これら複合体の形成と構造変換の制御機構を説明：

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。これら因子の複製開始領域への集合には、CDK (Cyclin-dependent kinase) による複製因子のリン酸化が必要であり、その一つが Sld2 の CDK によるリン酸化に伴う Dpb11 への結合である。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 (分子スイッチの機構)、この結合が複製因子の集合を制御する機構 (分子スイッチの使われ方) の解明を目指した。

当初目標である Sld2 と Dpb11 の結合機構の解析は順調に進み、複数のリン酸化が結合に必要な Thr84 のリン酸化を制御するというユニークな結果を生み出した。さらに構造の解析を行おうとしているが、同位体標識したリン酸化ペプチドの取得が難しく、難航している。

複製開始の CDK によるスイッチは Sld2 と Dpb11 だけではないことが分かったので、異なるスイッチを探した。その結果、別のスイッチではなく、Dpb11 がもう一つのタンパク質 Sld3 と CDK のリン酸化に依存して結合することが必須であることが分かった。即ち、当初考えたスイッチは不完全であり、もう一つの部品である Sld3 が加わることにより完全なものとなった。

これらの研究に加え、このスイッチの機構を解明することを目標に、精製したタンパク質を用いて解析することを試みた。そのためには必要なタンパク質の精製が必須であるが、Sld2, Dpb11 とも直ぐに不溶化したりするため、精製は困難を極めた。大腸菌、昆虫細胞、酵母を用いた発現系を構築し、精製法も工夫して、何とか精製できるようになり、in vitro の反応を行えるようになった。そして、タンパク質間の結合様式が分かっている。

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形成機序の解明と RNA 輸送を制御する抗エイズ創薬の可能性の探索：

真核細胞では、ほとんどすべての RNA は核の中で合成された後、細胞質へと核外輸送される。核外輸送される RNA にも tRNA, UsnRNA, mRNA, rRNA など様々な種類が存在する。実際の細胞の中では、これらの種々雑多な RNA が混在した状態で RNA の核外輸送が起こっている。しかし、それぞれの RNA はそれぞれに特異的な輸送因子群によって認識され輸送される。それぞれの種類の RNA の核外輸送の経路が決定する過程で、RNA 上に存在するたんぱく質複合体が一種類に限定されるように RNA・たんぱく質複合体の構造変換(リモデリング)が起こっていることを示唆する予備的な結果を CREST 申請時に得ていた。当初は、U snRNA と mRNA が識別される過程と HIV-1 の RNA の核外輸送の過程でのリモデリングなど、RNA 核外輸送関連のテーマだけを行う予定であったが、5 年間の内に、様々な要因で、それ以外にも多くのテーマを手がけることになった。その間の事情を以下に簡潔に記述したい。

まず、mRNA 前駆体の核内保持機構のテーマについては、4 番目の mRNA ID を探索する過程で偶然遭遇した。RNA の核内保持は RNA の核外輸送と鏡像関係にあるが、ほとんど手の付けられていないテーマである。また、イントロン ID を認識するたんぱく質複合体を研究する過程で、別グループにより同定された EJC に行き当たった。EJC は RNA 核外輸送だけでなく、RNA の細胞質機能をも制御することが明らかになっていたため、EJC に関連したいくつかのテーマも手がけることになった。神経突起中での mRNA たんぱく質複合体のテーマも、EJC の関与を意識したものである。

EJCはスプライシングに依存して形成されることから、スプライシング関連の2つのテーマ「イントロンにコードされる miRNA の発現機構」と「イントロンの代謝機構」につながった。

(2)実施体制

荒木グループ	荒木 弘之	国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授	複数タンパク質の集合を制御する分子スイッチ
大野グループ	大野睦人	京都大学ウイルス研究所	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

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 複数タンパク質の集合を制御する分子スイッチ (国立遺伝学研究所 荒木グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

Dbp11 タンパク質と Sld2 タンパク質のリン酸化に依存した結合機構

Dpb11 タンパク質(764アミノ酸)は、染色体 DNA 複製に必須である DNA ポリメラーゼ ϵ と遺伝学的に相互作用する因子として分離された。その後の解析から、Dpb11 が複製の開始に重要な働きをすることが分かった。Dpb11 は4つの 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なることが知られているが、Dpb11 ではN末、C末に 一対のタンデム BRCTドメインを持つことになる(図 3.1.1.)。

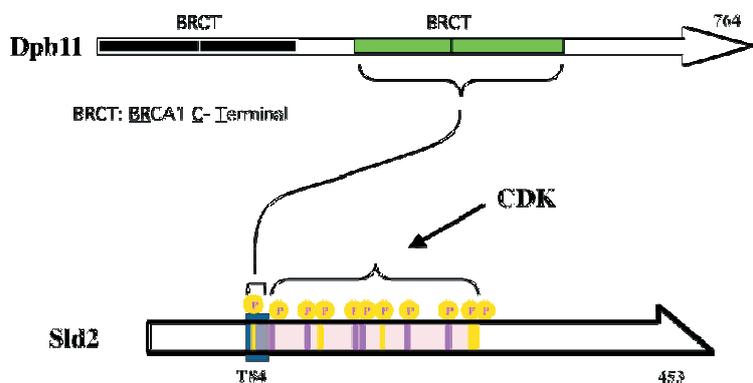


図 3. 1. 1. Dpb11 と Sld2 の構造

Sld2 のリン酸化された Thr84(T84)と Dpb11 の C 末 BRCT タンデムドメインが結合する。Sld2 上赤線は CDK による典型的なリン酸化モチーフを黄線はその他の CDK によるリン酸化モチーフを示す。

Sld2 タンパク質(453アミノ酸)は、Dpb11 と相互作用する因子として遺伝学的手法により分離されたものである。Sld2 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(図 3.1.1.)。

1. 1 Dpb11 との結合に必要な Sld2 の領域

まず、Sld2 のどの領域と Dpb11 が結合するか 2 ハイブリッド法を用いて解析した。その結果、28 アミノ酸残基からなる領域が Dpb11 と結合することが分かった。一方、Sld2 と結合する Dpb11 の領域を調べたところ、C 末側のタンデム BRCT ドメインが結合することが分かった(図 3.1.2.)。

この Sld2 の 28 アミノ酸残基の中には CDK によりリン酸化されるモチーフを 2 カ所 (Thr84, Ser100) 含む。どちらのリン酸化部位が重要であるか調べるため、Thr84, Ser100 の両方又はどちらかにリン酸基を導入した 28 アミノ酸残基のペプチドを合成し、リン酸化 Sld2 の Dpb11 への結合と競合させる実験を行った。その結果、Thr84 がリン酸化されたペプチドを加えると、Sld2 と Dpb11 の結合が抑えられることが分かった (図 3.1.3.)。従って、Thr84 のリン酸化が Dpb11 との結合に必須である。

Sld2 と Dpb11 の結合は、細胞の増殖に必須である。そこで、Thr84 を Ala に置換した Sld2 を持つ細胞を作成したところ、増殖することができなかった。しかし、Thr84 をリン酸化型に近いと考えられる Asp に置換した Sld2 を持つ細胞は、野生型同様に増殖した。これらのことは、Thr84 がリン酸化されると Sld2 は Dpb11 と結合し、この結合が細胞の増殖に必須であることを示している。

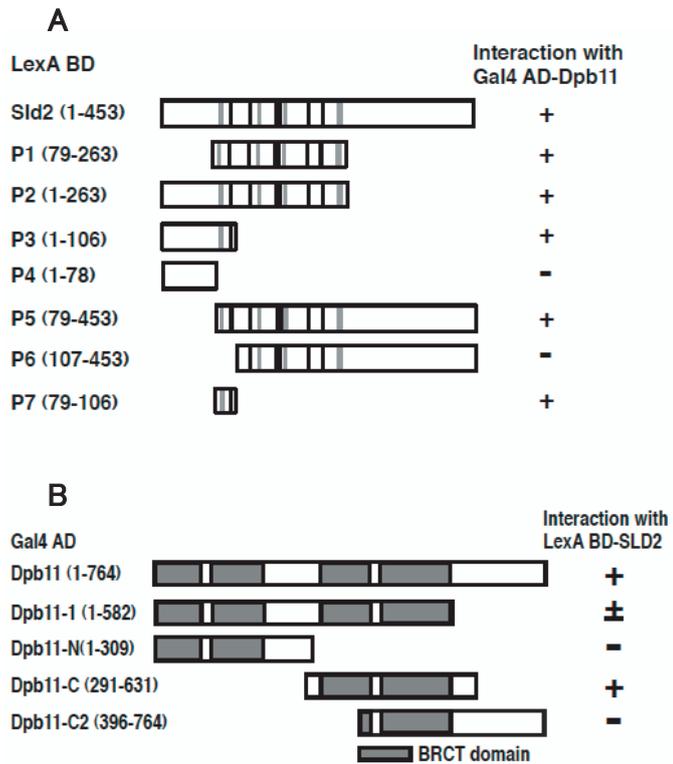


図 3.1.2. Sld2 (A) と Dpb11 (B) の結合領域
2 ハイブリッド法による結合領域の決定。+ は結合を - は非結合をしめす。Sld2 内の縦線は CDK のリン酸化モチーフを示す。



図 3.1.3. Sld2 の Thr84 のリン酸化が Dpb11 との結合に必須
GST-Dpb11 をグルタチオンビーズに結合し、リン酸化 Sld2 断片 (0.1 μM) とペプチドを同時に加え、ビーズに結合した Sld2 量を測定した。赤字の T は Thr84 を、S は Ser100 を示す。

1. 2. Sld2 の Thr84 リン酸化の機構

我々は、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ことを示している。また、これらの Ser/Thr を Asp に置換したものは、野生型同様に増殖できる。さらに、Thr84 を Asp に、その他の CDK によるリン酸化部位を Ala に置換した変異 Sld2 は Dpb11 と結合でき、この変異を持つ細胞は正常に増殖する (図 3.1.4.)。このことは、Thr84 がリン酸化されれば他の部位のリン酸化は必要なく、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。

そこで、リン酸化 Thr84 特異的抗体を作製して、他のリン酸化部位が Ala に置換した変異 Sld2 タンパク質の細胞内での Thr84 リン酸化レベルを調べた。その結果、予想通り野生型と比較して、Thr84 のリン酸化レベルが低下していることが明らかになった (図 3.1.5.)。

次に、Sld2 の CDK によるリン酸化部位を全て持つ Sld2 タンパク質断片を用いて、精製した CDK によるリン酸化反応を行った。いくつかの CDK リン酸化部位特異的抗体によりリン酸化状態を調べたところ、Thr84 のリン酸化が他の部位に遅れて起こる (図 3.1.6.) ことが分かり、細胞内でのリン酸化結果とよく一致する。しかし、全てが CDK によるリン酸化部位で、各部位のリン酸化を分けて解析することができない。

	T84	S100	S128	T168	S172	S208	T241	Interaction	Growth
WT	T	S	S	T	S	S	T	+	+
A84	A	S	S	T	S	S	T	-	-
D84	D	S	S	T	S	S	T	+	+
6A(All-A)	T	A	A	A	A	A	A	-	(-)
A100	T	A	S	T	S	S	T	-	(+)
5A-1	T	S	A	A	A	A	A	-	(+)
A208	T	S	S	T	S	A	T	+	(+)
A241	T	S	S	T	S	S	A	±	(+)
D84-6A	D	A	A	A	A	A	A	+	+
10A	T	A	A	A	A	A	A	ND	-
D84-10A	D	A	A	A	A	A	A	ND	+

図 3.1.4. Sld2 の種々の Ala, Asp 置換変異の Dpb11 との結合能及びその変異を持った細胞の増殖

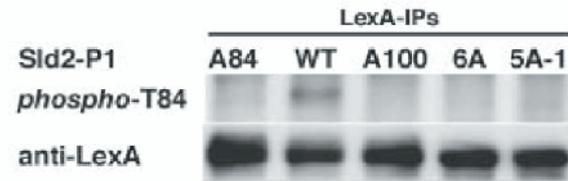


図 3.1.5. Sld2 変異での Thr84 の細胞内に於けるリン酸化

LexA と図 3.1.4. に示す変異 Sld2 タンパク質の融合タンパク質を細胞内で発現し、LexA 抗体で免疫沈降した後に、Thr84 のリン酸化を抗体により調べた。

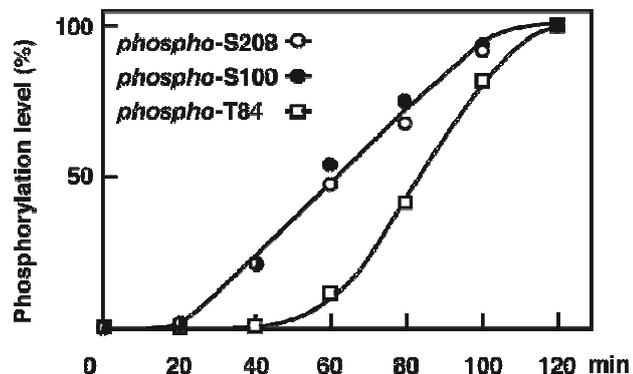


図 3.1.6. Sld2 タンパク質の CDK リン酸化モチーフの in vitro に於けるリン酸化
リン酸化された Ser208, Ser100, Thr84 に対する抗体を用いて、リン酸化レベルを調べた。

そのため、単に Thr84 が CDK の最もリン酸化されにくい場所であるため、遅れてリン酸化されている可能性を排除できない。そこで、Thr84 のリン酸化部位を、CDK によるリン酸化部位 (Ser/Thr-Pro) から PIKK タイプのキナーゼの部位 (Ser/Thr-Gln) に変換することを試みた。Pro85 を Gln に置き換えた変異タンパク質は、PIKK の一種である DNA 依存性キナーゼ (DNA-PK) により Thr84 がリン酸化されることが分かった。しかも、DNA-PK によるリン酸化のためには、前もって CDK により S1d2 をリン酸化しておくことが必要であった (図 3.1.7)。このことは、Thr84 にキナーゼが近づくためには、CDK により Thr84 以外の場所をリン酸化させる必要があることを明確に示しており、また CDK によるリン酸化が S1d2 の構造に影響を与えていることを示唆している。

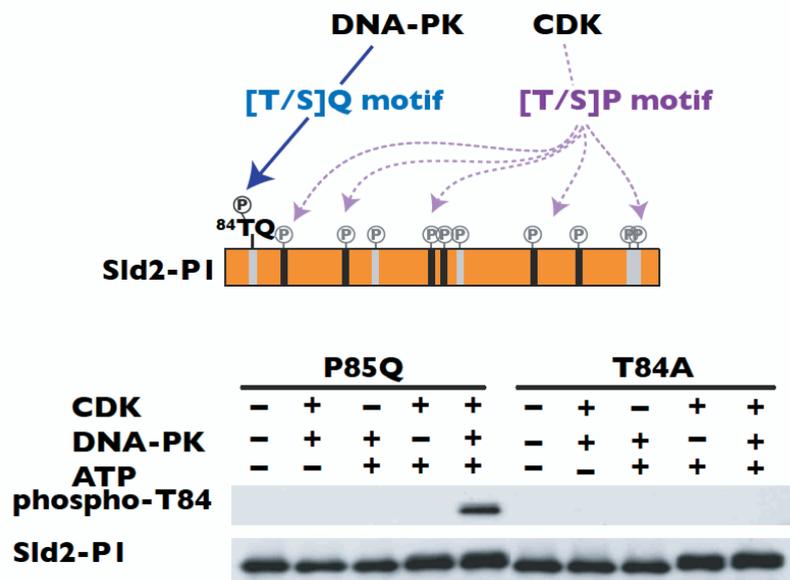


図 3.1.7. DNA-PK による Thr84 のリン酸化
Pro85 を Gln に置換し DNA-PK によりリン酸化できるようにした変異タンパク質 (P85Q) を、CDK 及び DNA-PK によりリン酸化した。

1. 3 S1d2 のリン酸化による構造変化

S1d2 がリン酸化により構造変化するかの糸口をつかむため、まずプロテアーゼによる分解パターンがリン酸化により変化するかどうか調べた。その結果、わずかではあるが変化していることが分かった (図 3.1.8.)。

次に、28 アミノ酸残基からなる Dpb11 に結合するペプチドを用いてリン酸化反応を調べた。このペプチドには、Thr84 と

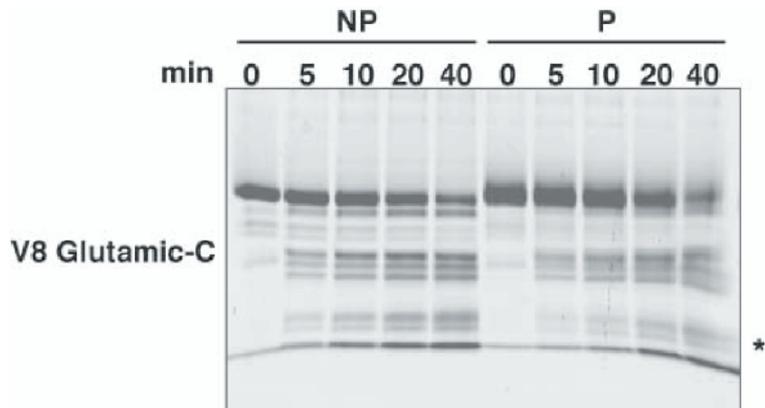


図 3.1.8. V8 プロテアーゼによる S1d2 タンパク質の消化パターン
*の部分のペプチドの出現が、非リン酸化標品 (NP) に比較して、リン酸化したもの (P) では遅い。

Ser100 の CDK によるリン酸化部位が存在する。リン酸化 Thr84, Ser100 特異的抗体を用いてこれらを調べると、まず Ser100 がリン酸化された後に、Thr84 がリン酸化される。さらに、Ser100 を Ala に置換したものでは、Thr84 のリン酸化が起こらない。従って、この短いペプチドの中でも、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が示唆されている。

そこで、このペプチドの NMR による解析を進めている。リン酸化により、構造が固定されるような結果が出ている。

1. 4 Sld2 と Dpb11 のスイッチとしての有用性

Dpb11 と Sld2 の結合は、Sld2 の Thr84 のリン酸化に依存する。しかし、リン酸化のみに依存するのではなく、結合領域のアミノ酸配列にも依存している。このことは結合部位のアミノ酸配列を変えることにより、結合する相手を変えることができることを示唆する。

そこで分裂酵母の Sld2, Dpb11 に相当する

Drc1, Cut5 を用いて、Sld2 の結合相手を変えることを試みた。まず、Sld2 は Dpb11 と結合するが、Cut5 とは結合しないことを確認した。次に、Drc1 の Cut5 結合領域に相当すると思われる部分を Dpb11 の相当する部分と置き換えた。その結果、Sld2 が Cut5 に結合するようになった (図 3.1.9.)。

この結合は、Sld2 中の CDK リン酸化部位によっても制御される可能性があり、Sld2, Dpb11 の結合系が細胞内スイッチとして任意に改変できることを示すものである。

1. 5 結合の一般性

リン酸化されると BRCT ドメインを持つもうひとつのタンパク質に結合するものはいくつか知られている。例えば、CtIP や BACH1 はリン酸化されると BRCA1 に結合する (図 3.1.10)。

これらタンパク質は Sld2 同様に複数の CDK によるリン酸化部位があり、これらリン酸化がターゲットとなるリン酸化部位を制御し

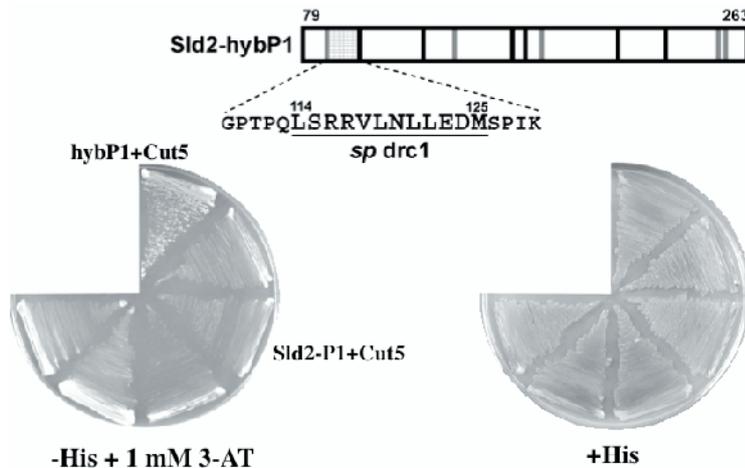


図 3.1.9. Sld2 の結合相手の交換

Sld2 の分裂酵母ホモログである Drc1 の結合部位を用いると Cut5 に結合に結合する。左のプレートに生えていれば、結合することを示す。hybP1 は、Drc1 の結合部位を持つもの。



図 3.1.10. CtIP, BACH1 の CDK によるリン酸化モチーフ
Sld2 同様に多くのリン酸化部位がある。縦線はリン酸化モチーフを示し、青色領域が BRCA1 との結合領域と考えられる。

ている可能性がある。

最近、Sld2 の高等生物ホモログとして解析されている recQL4 の N 末は Sld2 に似ている。また、C 末側にはヘリカーゼのドメインが位置する。特に、N 末側には多くの CDK リン酸化モチーフが存在し、Sld2 と同じような制御が働いている可能性がある。

1.6 結合様式の生物学的意味と将来の展望

Sld2 の複数のリン酸化による制御の生物学的意味を考えるには、真核生物の複製開始の機構を知る必要があるので、まず複製開始機構について概説する。

真核生物の染色体 DNA の複製は、複数の決った場所から開始する。これら開始領域は、DNA 結合タンパク質である Orc (Origin recognition complex: Orc1~6 のサブユニットからなる) 複合体により特定されている。出芽酵母の Orc は塩基配列特異的に DNA に結合するが、ほ乳動物の Orc の結合は塩基配列への依存性が低く、染色体構造に依存した結合をされると考えられている。その結果、出芽酵母では 100 bp 程度の DNA が複製開始領域として特定できるが、ほ乳動物では数 kb から数十 kb の DNA 配列が複製開始領域として働く。Orc は、ほ乳動物では G1 期から、酵母では細胞周期を通じて常に、複製開始領域に結合する。

Orc の結合した開始領域には、複製開始タンパク質が 2 段階に集合する(図 3.1.11)。まず CDK 活性の低い時期(細胞周期の M 期後期から G1 期)に Mcm (Mini-chromosome maintenance: Mcm2~7 のサブユニットからなる) 複合体が Orc の結合した複製開始領域へロードされ、pre-RC (pre-Replicative Complex) を形成する。この過程には、Orc とともに Cdc6 タンパク質と Cdt1 タンパク質が必要である。精製した Mcm タンパク質は 2 本鎖 DNA を 1 本鎖にほどく(アンワイ

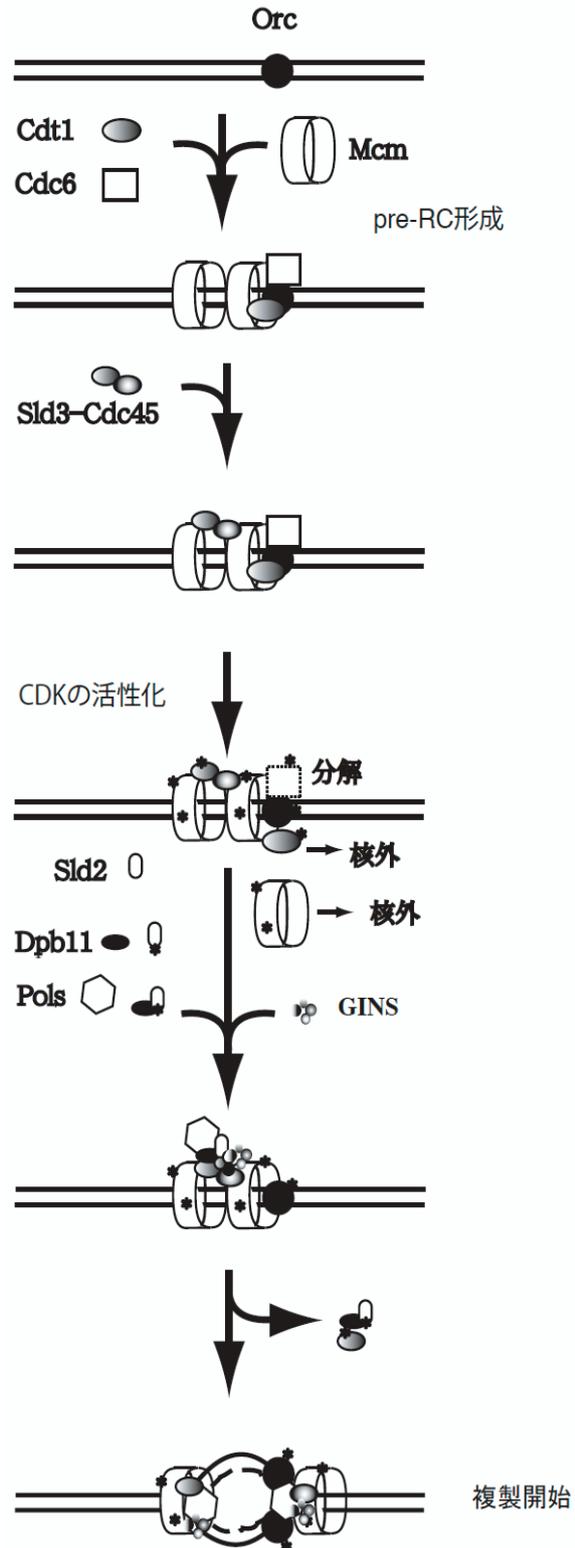


図 3.1.11. 真核生物染色体 DNA の複製開始機構. Pol s: DNA ポリメラーゼ α , δ , ϵ Sld3, Cdc45 は、S 期初期に複製が開始する領域には CDK 活性が低くても結合する。

ンディング)DNA ヘリカーゼ活性を持つので、複製開始時の開始領域や複製フォークでのアンワインディングに働くと考えられる。次に、細胞周期 G1/S 期境界域から CDK 活性が増加すると、pre-RC が形成した複製開始領域へは、DNA ポリメラーゼを含む複製タンパク質群が集合し、複製が開始する。この際、CDK 活性に加えてもう1つのキナーゼ DDK (Dbf4-dependent kinase)も必要である。

複製が開始すると、Mcm 複合体は複製開始領域から複製フォークとともに移動するため、複製開始領域の pre-RC は解消する。一方、活性化した CDK は、一度複製の開始した複製開始領域に再び pre-RC が形成することを抑制する。この再複製抑制機構は生物種によって少し異なるが、最も詳細に分かっている出芽酵母では 1) クロマチンに結合していない Mcm が CDK によりリン酸化されることにより核外へ排出される、2) CDK によりリン酸化された Cdc6 が分解される、3) CDK によりリン酸化された Orc は pre-RC 形成能が抑制される、ためであることが知られている。

Sld2 のリン酸化機構は、2 つの点で複製開始機構に寄与していると考えている。第一には、CDK が活性化した後多くの複製因子が開始領域に集合するが、Dpb11 と Sld2 の結合がこの反応のトリガーとなっていることである。複数のリン酸化によって初めて Thr84 がリン酸化され、Dpb11 と結合する機構は、CDK 活性に Thr84 をリン酸化させる際の閾値をつくり、ある一定以上の CDK 活性になったときに、複数の複製開始領域に一度にタンパク質が集合し開始させる機構を作りうる。第二には、再複製の抑制機構への関与である。CDK 活性化により複製タンパク質が複製開始領域に集合し複製開始した後でも、pre-RC の構成因子 (Mcm, Cdc6, Orc) がリン酸化されていなければ、再複製が起こる。しかし、CDK 活性がある程度以上まで次の反応が起こらないようにしておけば、pre-RC 構成因子がリン酸化されるのに十分な時間がある。Sld2 のリン酸化の機構は、CDK 活性に対して高い閾値を作ることで再複製を抑えているのだと考えることができる(図 3.1.12.)。

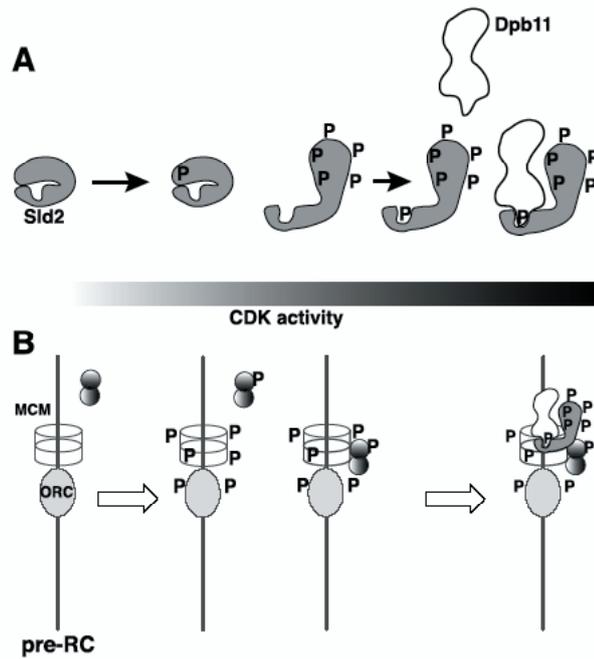


図 3.1.12. Sld2 と Dpb11 の結合様式

A. Sld2 は、CDK により Thr84 以外がまずリン酸化される。このリン酸化により Thr84 のリン酸化(窪んだ部分)が促進され、Dpb11 がこのリン酸化部位を認識して結合する。B. Sld2 の Thr84 のリン酸化には高い CDK 活性が必要である。そのため、Sld2-Dpb11 複合体形成に先立って、他の複製因子のリン酸化が起こる。例えば、複製開始領域に G1 期から結合している pre-RC 複合体の各因子はリン酸化され、複製開始後再度 pre-RC を形成することが確実に阻害される。これは、再複製阻止のために重要であると考えている。

2. CDKにより複製開始を起こす機構

染色体 DNA の複製開始には CDK が必須である。出芽酵母の複製タンパク質で CDK の基質となるものは Sld2 だけしか知られていなかった。しかし、Sld2 と Dpb11 と結合するために必須の Thr84 をリン酸化型の Asp に置換しても、細胞の増殖は野生型と大きな違いはなく、複製開始には CDK 活性が必要であった。このことは Sld2 以外にも複製開始に必要なタンパク質のリン酸化があるものと考えられる。そこで、いくつかの方法で、Sld2 以外の CDK 基質の分離を試みた。

2. 1 遺伝学的手法による解析

複製を開始するために CDK によりリン酸化されることが必須なタンパク質のリン酸化型変異を分離すれば、CDK 活性がなくても複製を開始することが期待される。また、CDK 活性がないなかでは、再複製開始が抑制されない。従って、一回の細胞周期に複数回の染色体複製が起こり、細胞内の DNA 量が異常に増幅され、細胞は死ぬものと考えられる。一方、複製開始に必要な CDK 基質の 1 つは Sld2 であるが、Sld2 のリン酸化型を導入しただけでは、細胞は死なない。そこで、Sld2 の全ての CDK リン酸化モチーフの Ser/Thr を Asp に置換したリン酸化型変異 *SLD2-11D* を持つ細胞に更なる変異が入ることにより致死になるものをスクリーニングした。実際には、複製開始に DDK 活性も必要

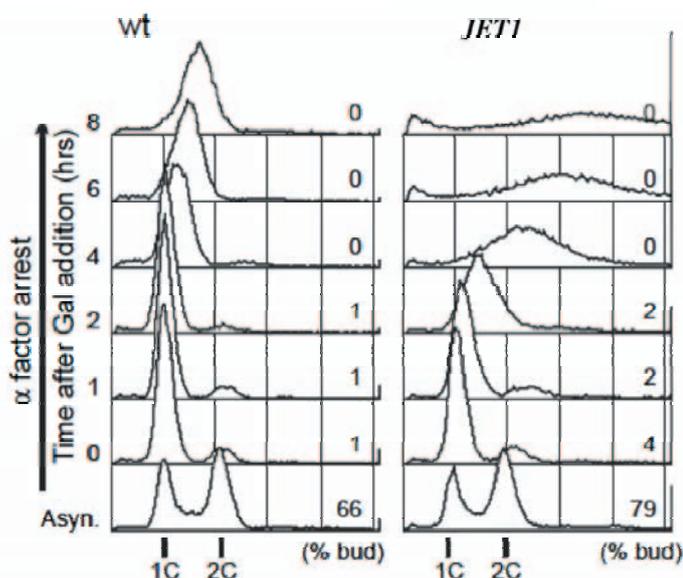


図 3.1.13. *JET1* 変異を持った細胞での DNA 含量の増加細胞を α ファクターで G1 期に停止し、ガラクトース培地に移した。ガラクトース培地では、Sld2 のリン酸化型である *SLD2-11D* の発現が起こる。右の数字は出芽した細胞数の割合 (G1 期の CDK 活性) を示す。

であるから、DDK の制御サブユニットで細胞周期でその量が増減する Dbf4 を恒常的に発現させ、G1 期でも DDK が活性化するようにし、*SLD2-11D* を制御可能なガラクトースプロモーターから発現した。そして、ガラクトース依存的に生育できなくなる変異を得た。これらの変異のなかにはガラクトースを資化できないものも含まれているので、ガラクトースを資化できないものも含まれているので、ガラクトース培地中での細胞の DNA 含量をしらべ、DNA 含量が増加する 優性変異 *JET1* (Jumping CDK essentiality with Sld2-11D) を分離することに成功した。*SLD2-11D* と *JET1* を持つ細胞では、たとえ G1 期に細胞周期を止めても、細胞は DNA 複製を開始する (図 3.1.13)。またここで起こっている DNA 合成を調べたところ、複製開始領域からの半保存的複製であり (図 3.1.14、3.1.15)、通常の複製開始に使われる因子、例えば DDK を必要としている。また、複製

フォークで働くヘリカーゼと考えられている Cdc45-MCM-GINS (CMG) 複合体も、CDK 活性なしで形成されている。このように *JET1* 変異では、CDK 活性がないにも関わらず通常の染色体 DNA の複製が起こっていることが分かった。

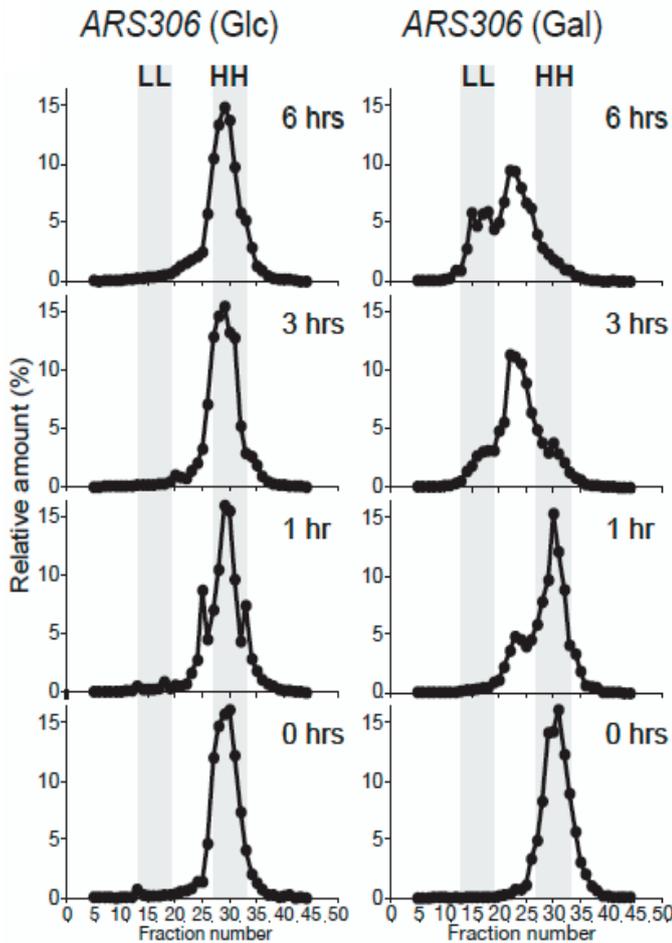


図 3.1.14. *JET1* 変異での半保存的 DNA 合成
細胞を重い同位体で標識した後、G1 期で細胞周期を停止し、ガラクトースを含む通常の培地に移し *SLD2-11D* を発現させた。DNA を抽出し、塩化セシウムの平衡密度勾配遠心法により分画した。そして、複製開始領域 ARS306 の領域の DNA 量を定量 PCR により決定した。まず、一度の複製により中間位置のものが現れ、6 時間後には LL の位置に DNA が現れている。Glc: グルコース培地 (*SLD2-11D* は発現しない) Gal: ガラクトース培地

JET1 変異存在下での染色体 DNA 複製の効率は決して高くない。一つの原因は、G1 期サイクリンを持つ CDK (G1-CDK) による複製タンパク質の転写制御である。α ファクターを用いた G1 期で停止では G1-CDK 活性が低く、複製遺伝子の転写量が低いためタンパク質量も低下している可能性がある。そこで、S 期 CDK のインヒビターである Sic1 の過剰発現で細胞周期を S 期直前で停止させた条件で調べると、複製はより効率よくなった。しかし、依然として野生型に比較するとその効率は低く、他の要因があるものと考えられる。

以上の結果は当初我々が仮定した 2 つの点を証明するものでもある。CDK 活性が再複製開始を抑制することは、CDK 活性があってもリン酸化できない基質を作成することにより証明されていた。しかし変異を導入するため、CDK のリン酸化とは関係なくタンパク質の性質が変わったという説明も可能であった。我々の研究はこの可能性を否定し、間違いなく CDK が再複製開始を抑え、CDK 活性がないと再複製開始が起こることを示している。また我々は一回の細胞周期に複数回の複製開始が起こると細胞が死ぬと仮定し、変異のスクリーニングを行った。実際にそのような変異を手に入れることができたことから、我々の仮定が正しかったと言える。ただし、致死になる正確な要因については今後の研究を待たなければならない。

次に、*JET1* 変異の原因遺伝子を調べたところ *CDC45* 遺伝子であることが分かった。Cdc45 タンパク質には CDK リン酸化モチーフが 4 カ所存在する。そこでこれら

モチーフの Ser/Thr を同時に Ala に置換したが、細胞の増殖に変化はなく、DNA 複製も正常に起こっていることが分かった。従って、*JET1* 変異はリン酸化型となった変異ではなく、CDK 基質となるタンパク質がリン酸化されなくても働くようになった変異であると推測された。

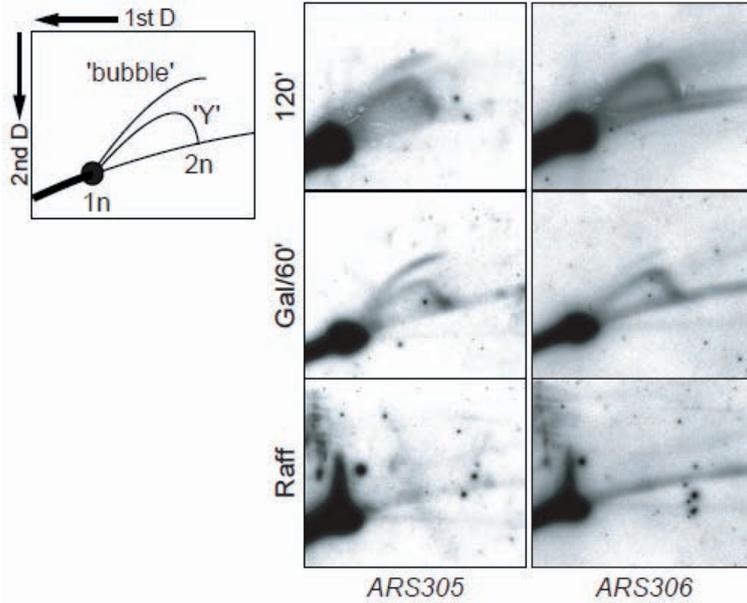


図 3.1.15. *JET1* 変異細胞からの複製開始
2つの複製開始領域 ARS305, ARS306 からの複製開始を調べた。*JET1* 変異を持つ細胞を、*Sic1* による CDK 阻害により S 期直前で停止させ、*SLD2-11D* の発現により複製を開始させた。DNA を抽出した後、2次元のアガロース電気泳動により分画した。”bubble”に対応するシグナルが複製の開始を示す。

2. 2. 分子遺伝学的解析

Sld2 は 11カ所の CDK リン酸化モチーフを持ち、CDK の必須な基質として働く。我々が分離した Sld3 タンパク質も複製開始に必要で、CDK リン酸化モチーフを 12カ所持つ。我々は Sld3 が CDK の基質になる可能性を考え、これらのリン酸化モチーフの変異を作製した。まず全てのリン酸化モチーフの Ser/Thr を Ala に置換した *sld3* 変異を持った細胞は増殖することができなかつた(図 3. 1. 16, 12A)。

そこで様々な Ala 置換変異の組み合わせを作製し調べたところ、Thr600 と Ser622 を同時に Ala に置換した変異を持つ細胞が増殖できないことが分かった(図 3. 1. 16, 2A)。さらに、Thr600 または Ser622 以外の CDK リン酸化モチーフの Ser/Thr を全て Ala に置換した変異を持つ細胞は増殖可能であることが分かった(図 3. 1. 16, 11A-T600, 11A-S622)。このことは、Sld3 の Thr600 または Ser622 が CDK によりリン酸化されることが、細胞増殖に必須であり、Thr600 と Ser622 は重複して働いている可能性を示唆している。さらに、2A, 12A 変異では複製開始に欠損が生じており、複製開始にこのリン酸化が必須である。

そこで、Thr600 と Ser622 のリン酸化特異的抗体を作成し調べたところ、両部位は細胞周期特異的に、CDK 活性に依存してリン酸化されることが分かった(図 3. 1. 17.)。さらに、精製した CDK により精製した Sld3 をリン酸化すると両部位がリン酸化される。これらのことから、Sld3 の Thr600 と Ser622 は CDK により G1/S 境界域よりリン酸化されると結論づけた。

それでは、Sld3 のリン酸化はどこに効いているのであろうか？ 我々は Sld3 の Thr600, Ser622 を含む C 末領域が Dpb11 の N 末に位置するタンデム BRCT ドメインと結合することを 2 ハイブリッド法により見いだした(図 3. 1. 18.)。そして、Thr600 或は Ser622 を Ala に置換すると Dpb11 との結合能は低下し、両者を同時に Ala 置換したものではさらに結合能が

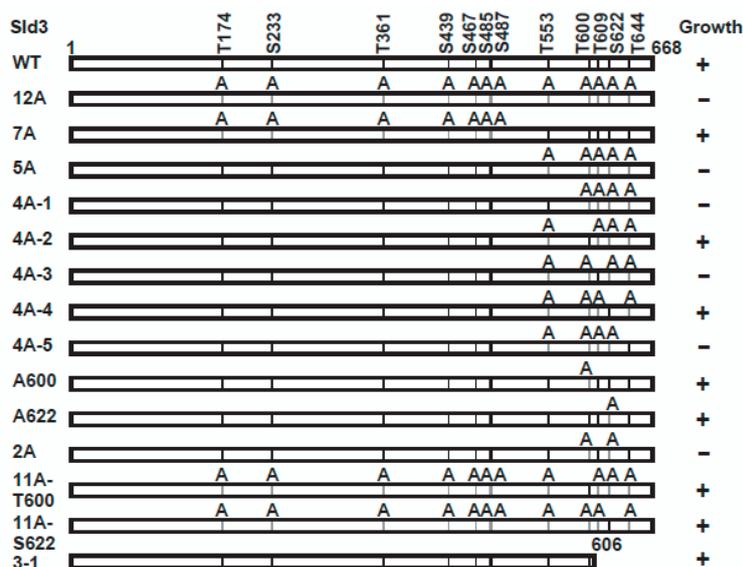


図 3. 1. 16. Sld3 の必須リン酸化部位

Sld3 の CDK リン酸化モチーフ内の Ser/Thr を Ala に置換した。次に、これら変異を持つ細胞が増殖できるかを調べた。3-1 は *sld3-1* 変異タンパク質を示す。*sld3-1* 変異は温度感受性変異で、C 末 62 アミノ酸を欠失している。

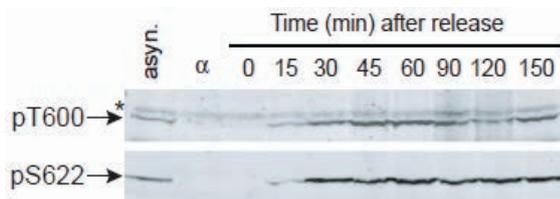


図 3.1.17. Sld3 Thr600, Ser622 の細胞周期に於けるリン酸化

細胞を α フクターで G1 期に停止させ、その後 S 期にリリースした。それぞれのリン酸化は、特異的抗体を用いて検出した。

低下する。さらに Sld3 の C 末断片と、Dpb11 の結合を調べたところ、CDK で事前に Sld3 断片をリン酸化したときのみ Dpb11 と結合する (図 3.1.19.)。従って、CDK が Thr600 と Ser622 をリン酸化すると Dpb11 の N 末と結合し、この結合が細胞の増殖に必須であることが示唆される。Ala 変異では Dpb11 との結合能が低下することにより、細胞の増殖に欠損が生じると考えられる。2つの因子の結合能が低下しているのであれば、どちらかの因子の量を増やせば両者が結合した複合体の量は回復することが期待される。実際に、Dpb11 量を増やすと Sld3 の Ala 変異は増殖ができるようになる。

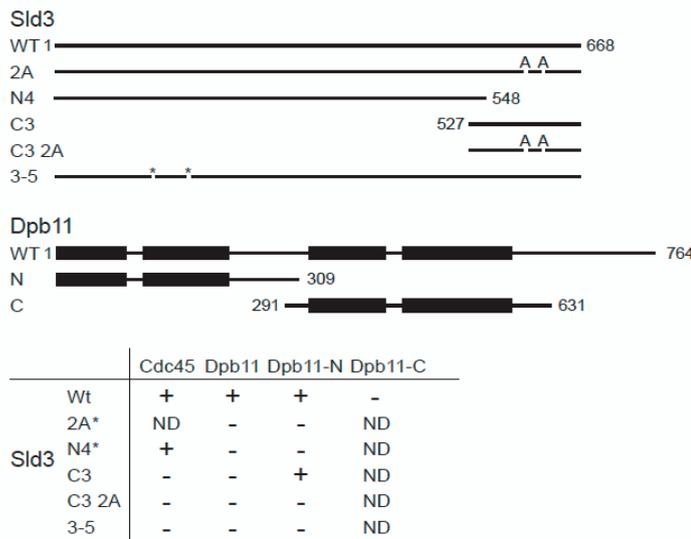


図 3.1.18.. 2ハイブリッド法による Sld3 と Dpb11 の結合

2ハイブリッド法に用いた Sld3 と Dpb11 の構造及び2ハイブリッド法での結合の結果。3-5 は *sld3-5* 温度感受性変異を示す。この変異では Dpb11 と結合しないが、細胞内の Cdc45 量を増やすことにより結合するようになる。ND, Not Determined.

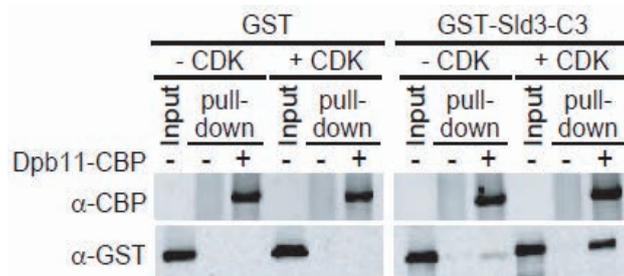


図 3.1.19. Sld3 と Dpb11 の結合

GST-Sld3-C3 (図 3.1.18 の C3 と GST の融合タンパク質) を CDK でリン酸化し、Dpb11-CBP と混合した。抗 CBP 抗体で Dpb11 を沈降させ、Sld3-C3 の共沈降を調べた。

2. 3. 遺伝学的解析と分子遺伝学的解析の融合

Sld3 の Thr600 と Ser622 のリン酸化部位の Ser/Thr を Asp/Glu に置換してリン酸化型として働く変異を作ろうとしたが、どの変異もリン酸化型としては働かず、Thr600 と Ser622 を同時に Asp や Glu に変えた変異を持つものでは、細胞は致死になる。これは過剰な複製が起こっているためではなく、複製が起こらないためである。

一方 *JET1* とこの Sld3 の Ala 変異 (図 3.1.16, 2A, 12A) を組み合わせたところ、Sld3 の Ala 変異を持っている細胞でも増殖できるようになることが分かった。このことは、*JET1* 変異が Dpb11 と Sld3 とのリン酸化依存的結合をバイパスしていることを意味する。実際、Sld3 との結合に欠損を持つ Dpb11 の N 末の変異を *JET1* 変異はサプレスすることができる。*JET1* 変異がどのように Sld3 と Dpb11 の結合をバイパスしているのかは厳密には分からない。我々は *JET1* 変異の有無に関わらず Cdc45 と Sld3 が結合することを示している。また 2 ハイブリッド法による Dpb11 と Sld3-2A との結合は多量の Cdc45 や *JET1* 変異によりわずかではあるが回復する。これらのことから、*JET1* 変異が Sld3 と Dpb11 の結合に影響を与えていると考えている。

2. 4. CDK が

複製を開始させる機構

CDK が活性化すると Sld2 と Sld3 がリン酸化し、Dpb11 の C 末及び N 末に位置する一対のタンデム BRCT ドメインに結合する。この両結合をバイパスすると CDK 活性がなくても複製を開始するため、この 2 つの結合が CDK の複製開始における必要最少限の制御カ所であることが分った。

染色体の DNA の複製開始領域のあるものからはいつも S 期の初期に複製が始まり、またあるものからはいつも S 期後期に複製が始まるというように、複製開始領域にそれぞれ固有のタイミングで複製が開始する。ほ乳動物などでは、発生段階や環境により、複製開始のタイミングが変わることがあるが、出芽酵母の場合には、この開始領域の個性は非常にはっきりとしている。Sld3 と Cdc45 は、S 期初期に複製が開始する領域には、CDK 活性の低い G1 期から結合している。そのため、複製

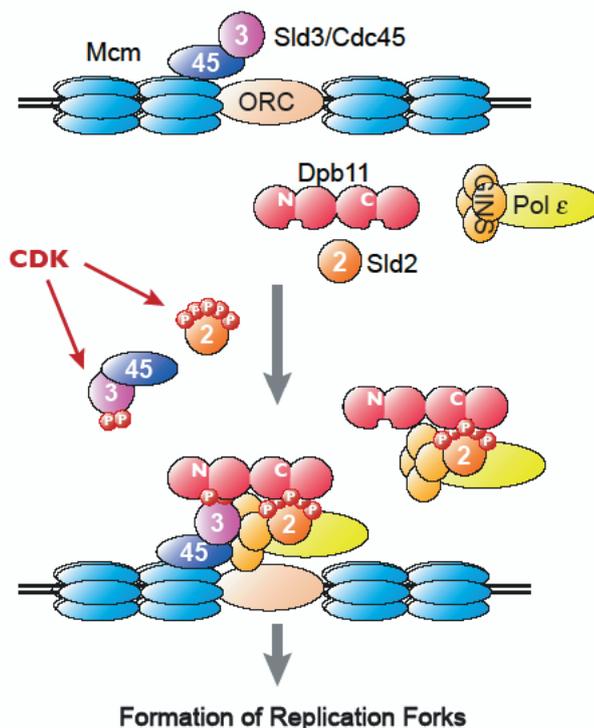


図 3.1.20. CDK 活性に依存した複製開始のモデル
2, 3, 4 5 はそれぞれ Sld2, Sld3, Cdc45 を示す。複製開始領域には、細胞周期を通じて ORC (Origin Recognition Complex) が結合し、CDK 活性の低い M 期後期から G1 期にかけて、DNA ヘリカーゼである Mcm 複合体がロードされる。CDK が G1 後期に活性化すると、DNA ポリメラーゼを含む複製因子が、複製開始領域に集合する。この際、Sld2 と Sld3 のリン酸化とそれに伴う Dpb11 との結合が、複製を開始させる。詳細は本文を参照。

開始領域上で CDK によりリン酸化された Sld3 に Dpb11 が結合することとなり、Dpb11 は Sld2 と Sld3 を結びつけ、Sld2 を複製開始領域に連れてくる役割を負う (図 3.1.20.)。これは単に Sld2 を結合させるだけでなく、Dpb11, Sld2 に結合してくる他の複製因子を呼び込む役目をしていると考えている (後述)。

この Dpb11, Sld2, Sld3 のリン酸化に依存した結合は、複製を開始させるスイッチである。当初考えていた Dpb11-Sld2 のスイッチをより巧妙にしたものだ。我々は解析過程において、このリン酸化によるスイッチを、培地中の糖の種類によりオン、オフすることもできることを示している。即ち、*JET1* 変異により Sld3 と Dpb11 の結合をバイパスさせ、もう一つの結合を Sld2-D のガラクトースプロモーターによりバイパスしている。このことは、このリン酸化によるスイッチを人為的に培地条件を変えることによりオン・オフし、自由に使いこなせることを示している。

3. CDK 活性に依存した複製複合体の生成

Sld2, Sld3 が CDK によりリン酸化され Dpb11 と結合することが、CDK による複製開始のスイッチとなっていることがわかったが、なぜ Sld2, Sld3, Dpb11 の結合が複製を開始させるのかは分からなかった。我々はこの問題を明らかにするため、これら因子を含む複合体を分離・解析した。

3. 1. 細胞内での CDK に依存した複合体形成

複製開始領域には CDK が活性化されると多くのタンパク質が集合してくる (図 3.1.11. 参照)。Sld2, Sld3, Dpb11 は複製開始領域に一過的に結合する。即ち、複製フォークの形成とともに複製開始領域から解離していく。一方複製フォークのコアを作る CMG ヘリカーゼの構成因子 Cdc45, Mcm, GINS のうち GINS が最も遅く複製開始領域に結合し、その結合が Sld3 と Dpb11 に依存することを我々は明らかにしていた。そこで、複製開始領域での短時間できるであろう複製複合体を調べるため、GINS のサブユニットにタグをつけ、共沈降する複製タンパク質を調べた。

まず、GINS のサブユニットの一つ Psf2 に FLAG タグを付け、抗 FLAG 抗体により免疫沈降を行ったところ、S 期に Mcm や Pol ϵ が共沈殿してきたが、Sld2, Sld3, Dpb11 は沈降しなかった。これは複合体が不安定で、複合体構成因子が免疫沈降時に容易に解離してしまうためであろうと考えた。そこで、細胞をホルマリンで固定した後に、免疫沈降を行うことにした。その結果、Sld2, Dpb11 が CDK の活性化とともに GINS と結合することが分かった。そこで、これらの結合が複製開始領域で起こっているのかを調べるため、以下のような実験を計画した。

Cdc6 は複製開始領域に Orc が結合して pre-RC を形成するために、必須のタンパク質である (図 3.1.11. 参照)。我々は Cdc6 の発現をガラクトースプロモーターにより制御し、培地中のガラクトースによりオン、オフできるようにした。この系では、ガラクトースが培地中にないと、細胞は増殖しない。ガラクトース培地中の細胞をノコダゾールで G2/M 境界域で増殖を止め、グルコース培地に置き換えた後ノコダゾールを除き、次に α ファクターにより G1 期で停止させた。この操作により Cdc6 の発現は抑えられ、M 期後期から G1 期にできる pre-RC は形成されない。複製開始領域に結合する複製タンパク質は pre-RC に依存して結合するので、この条件で観察される複合体は複製開始領域に結合せず複合体を形成していることになる。またこのことは同時に、複合体が DNA を介してできているものではないことも意味する。

この手法により、GINS のサブユニット Psf1 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。しかし、Mcm や DNA ポリメラーゼ α は、複製が起こる条件では共沈殿が観察されるが Cdc6 を除いた条件では沈殿せず、これら因子との結合が複製開始領域で起こっていること

が示唆された。さらに、S期CDK活性を阻害する Sic 1 を発現すると Sld2 と Dpb11, Pol ϵ , GINS の共沈殿は観察されなくなることから、複合体の形成が CDK に依存していると結論できる。

GINS, Pol ϵ , Sld2, Dpb11 が同じ複合体に含まれているのか、あるいは GINS と他の3者が個別に結合しているのかを調べるため、いくつかの実験を行った。まず、Pol ϵ , Sld2, Dpb11 にタグを付け、免疫沈降を行った後、他の因子が共沈降してくるか調べたところ、どの場合でも他の3者が共沈殿することが分かった。次に、Pol ϵ のサブユニットと Dpb11 に異なるタグを付けた菌株を作成した。まず、Pol ϵ で免疫沈降を行うと Dpb11, Sld2, GINS が共沈降した。共沈殿したものを抗体ビーズから乖離し、今度は Dpb11 に付けたタグを用いて沈殿させたところ、Pol ϵ , Sld2, GINS が共沈降した。同様の実験を、Pol ϵ と GINS を用いて行ったところ、最終標品中には Pol ϵ , Dpb11, Sld2, GINS が含まれていた。これらの結果は、Dpb11, Sld2, Pol ϵ , GINS が同一の複合体に含まれていることを強く示唆するものである。この複合体が染色体の開始領域上ではなく、おそらく開始領域に結合する前にできることから、我々はこの複合体を pre-Loading Complex (pre-LC) と呼んでいる。

3. 2. 変異株を用いた解析

Dpb11, Sld2, Pol ϵ , GINS が同一の複合体に含まれることが強く示唆されたが、複合体形成の過程は分からなかった。そこで、pre-LC 中の4つの構成因子の変異を用いて、複合体の形成を調べた。

pre-LC が CDK 活性に依存して形成されることを考慮すると、CDK 活性によりその結合が制御されている Sld2 と Dpb11 の結合がこの複合体の形成を制御している可能性がある。そこで、Dpb11 との結合能が低下する *sld2* 変異を用いて複合体形成を調べた。その結果、Pol ϵ と GINS の結合は野生株同様に起こるが、Dpb11 と Pol ϵ , GINS との結合は低下することが分かった。さらに、Pol ϵ , GINS の変異を用いた解析からは、Sld2 の存在下で Dpb11 に GINS が結合するためには Pol ϵ が、また Pol ϵ と Dpb11 との結合は GINS により安定化されることが示唆された。これらのことは、CDK によるリン酸化に依存して Sld2 と Dpb11 が結合すると、Pol ϵ と GINS がこの複合体に結合することを意味している (図 3. 1. 21.)。

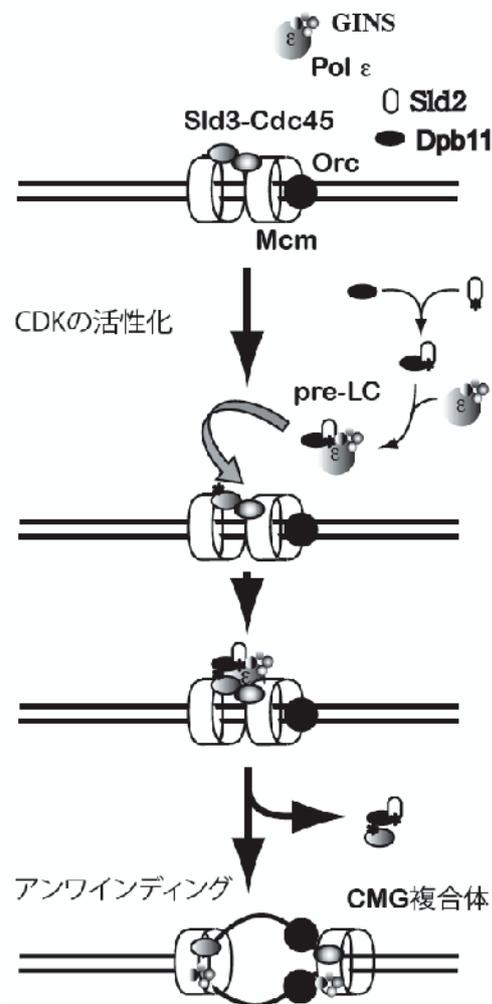


図 3. 1. 21. pre-LC の形成と複製開始への寄与

CDK に依存して pre-LC が形成される。形成された pre-LC は、複製開始領域上の Sld3 と Dpb11 の結合を介して、複製開始領域へロードされる。pre-LC は、Dpb11 と Sld2 の結合に依存して、Pol ϵ と GINS が加わることにより形成される。

1. 3. 3. 精製タンパク質を用いた pre-LC の再構成

細胞を固定した後複合体を検出し、pre-LC 複合体の存在を明らかにしたが、クロスリンカーを使っていることからこの複合体が通常は形成されていない可能性を排除できない。また、Dpb11, Sld2, Pol ϵ , GINS が同一の複合体に含まれていることは分かっていたが、4者のみで複合体を形成できるのかも明らかではなかった。そこでこれらタンパク質を精製し、再構築することを試みた。

それぞれのタンパク質にタグを付け、Dpb11, Sld2, Pol ϵ は酵母から、また GINS は大腸菌から精製した。まず結合の中心となる Dpb11 と Sld2 の結合を解析した。我々がこれまで報告しているものは、Sld2 断片を用いた実験で、Sld2 全長を用いるのは初めてである。Sld2 全長からなるタンパク質は、我々が用いた断片に比較すると容易に沈殿するなど扱いにくい。Dpb11 をビーズに固定化し、大腸菌から精製してきた CDK によりリン酸化した Sld2 を加えると、Sld2 のビーズへの結合が観察される。この Sld2 のビーズへの結合は、Dpb11 と Sld2 のリン酸化に依存した。この反応は、細胞内で観察される CDK に依存した Dpb11 と Sld2 との結合をよく反映している。

次に、Pol ϵ と GINS の結合を調べ、両者は弱く結合していることが分かった。これも細胞内で細胞周期を通じて両者が結合していることとよく一致する。さらに、Dpb11, Sld2, Pol ϵ , GINS を組み合わせて結合を調べた。Dpb11 をビーズに固定し、Pol ϵ , GINS を加えると、Pol ϵ は Dpb11 に弱く結合するが、GINS の結合は観察されなかった。この系に CDK によりリン酸化した Sld2 を加えたところ、Pol ϵ のビーズへの結合は促進された。さらに、Pol ϵ に依存して GINS のビーズへの結合が観察されるようになった。また、GINS を加えることにより、Pol ϵ の結合もわずかながら促進されるようである。一方、Sld2 と Pol ϵ , GINS の結合を調べると、Sld2 は Pol ϵ と結合し、GINS は Pol ϵ 依存的に Sld2 に結合した。

以上の *in vitro* の実験から以下のことが結論される。1) pre-LC は Dpb11, Sld2, Pol ϵ , GINS の 4 者から構成しうる。2) 細胞内でクロスリンカーを用いて観察された複合体が実際に形成されていることを強く示唆する。3) Dpb11, Sld2 の結合により Pol ϵ , GINS がこれらに結合するようになる。

細胞内での解析及び精製タンパク質を用いた解析から、図 3. 1. 21. のようなモデルを現在は考えている。

4. 成果の位置づけや類似研究との比較

Dpb11 と Sld2 の多数のリン酸化を介した結合の研究は、我々のみが行っているユニークなものである。一方、複数のリン酸化部位を介して多くのタンパク質が同一タンパク質に結合している例等は良く知られている。また、酵母の CDK 活性を抑える Sic1 のリン酸化とリン酸化を介して結合するユビキチンリガーゼの間で、複数のリン酸化が閾値を決定付けるという報告がある (Nash et al., Nature 414, 514-521, 2001)。しかし、複数のリン酸化が 1 つのキイとなるリン酸化を制御するとの報告は初めてである。本報告書に記したように、他のタンパク質でも同じような制御がある可能性があり、今後この制御系の重要性が認識されてくることを期待している。

Dpb11, Sld2, Sld3 の結合が CDK による複製開始の制御部位であると言う報告は、染色体 DNA の複製、細胞周期の研究者には高く評価されている。それは、20 年来、多くの研究者が挑みながら成功し得なかったことをなし得たことによる。但し、Cancer UK の J. Diffley 博士のグループも同じ発見をし、同じ雑誌の同じ号に発表している (Zegerman & Diffley, Nature 445, 281-285, 2007)。彼らは *JET1* 変異の代わりに、Sld3-Dpb11 の融合タンパク質を用いて、CDK によるリン酸化に依存した Sld3, Dpb11 の結合をバイパスしている。

pre-LC 複合体の形成に関する研究は、他のグループは全く行っていない。CDK

に依存した複合体の形成は今後の課題となることから、他のグループの注目を浴びているものと思う。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究は、CDK によるタンパク質結合の制御の研究から複数のタンパク質集合の研究へと進展してきた。Sld2, Sld3, Dpb11 の結合は、実はこの三者がコアをなす複数のタンパク質の複合体形成のスイッチとして働いていることが分かった。これが、細胞内での分子スイッチの使われ方なのである。今後さらに多くのタンパク質複合体の形成の解析に結びついていく。例えば、Sld3, Dpb11 の結合を介した複製開始領域上での、より多くの複製複合体の集合の機構について明らかにできるものと考えている。とくに、本報告書で少し触れたが、Cdc45, MCM, GINS からなる CMG 複合体が複製開始領域で形成し、複製フォークでの DNA ヘリカーゼと働くと考えられている。複製開始の重要な反応の 1 つは、複製開始領域に活性なヘリカーゼをロードすることである。我々の予備的な実験からは、Cdc45, MCM, GINS を混合しただけでは、CMG 複合体はできない。これらはお互いに結合すらしないのである。この中に Sld3 を加えると 3 者は Sld3 を介して、お互いに結合するようになる。これは完全な CMG 複合体の形成ではないが、今後の解析から Sld3, Dpb11 を介した CMG 複合体形成過程が明らかになることを期待している。さらに、タンパク結合や複合体形成は細胞内反応のどこでも起こっていることであり、本研究での成果はそれらの反応を理解する上での基盤になるものである。

本研究では、リン酸化を介した分子スイッチの一例を明らかにすることができた。当初、Sld2 と Dpb11 の結合をスイッチとして捉えたが、実際には Dpb11 に Sld2, Sld3 がリン酸化されて結合することが、細胞内での実際のスイッチとして働いていることが分かった。これらをリン酸化のスイッチから、培地中の糖によるスイッチへと変換する事もでき、このスイッチを容易に細胞内で使える。さらに、Sld2 で示したように、結合の特異性を変えれば、結合相手を変えることができる。これは Sld3 でも同様であると考えられるので、結合相手を変えることにより、起こる反応を変えることも将来的にはできるようになるのではないかと考えている。

CDK は細胞周期のメインエンジンであり、細胞増殖を考える上で忘れることのできない因子である。長年分からなかった、CDK による S 期開始の機構が分かったことは、基礎及びその応用の面でも大きな成果である。CDK は、抗がん剤としての格好の材料でもあり、その基質も同様である。現在の我々の知見は出芽酵母のものであるが、ほ乳動物でも同様の機構が働いている可能性があり、がんの基礎研究や抗がん剤開発へと繋がるのが期待される。

3.2 核外輸送における RNA・たんぱく質複合体の構造と機能 (京都大学ウイルス研究所 大野グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

「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してきた。主として、核外輸送に先だつて核の中で 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てきた。

核外輸送における mRNA の ID エLEMENTの探索

核一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。

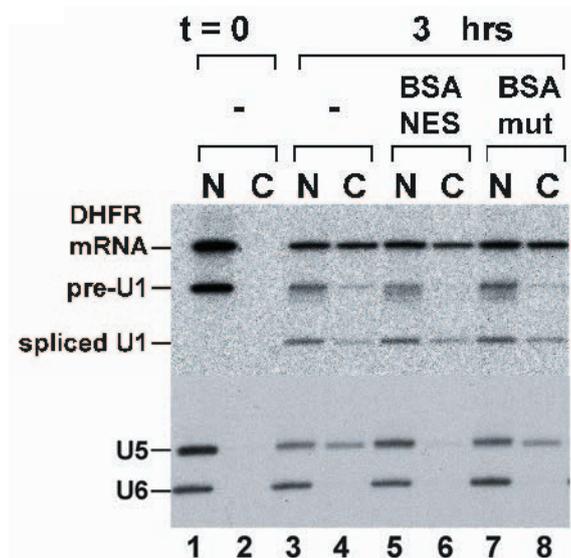
我々は mRNA に焦点を絞り、mRNA がもつ様々な特徴を、別種の RNA である U snRNA に移植したキメラ RNA を作製し、その RNA の核外輸送を調べることで、mRNA を mRNA として識別させている特徴(mRNA の ID エLEMENT)を探索してきた。現在までに 3 種類の mRNA の ID エLEMENTを同定した。さらに、それらの ID エLEMENTを認識するたんぱく質(複合体)を同定することにより、核の中での RNA の識別機構を明らかにすることを目指している。

1. イントロンは mRNA の ID エLEMENTである

U snRNA の1種である U1 RNA に mRNA 由来のイントロンを挿入したキメラ RNA を作成し、アフリカツメガエルの卵母細胞核へ微量注入したところ、正確にスプライシングを受けた。ところがスプライシングされた RNA 上には U snRNA ではなく mRNA の輸送因子群複合体が形成され、mRNA 型の輸送が起こるといった結果を得た。さらに重要なことは、輸送されたこの RNA は本来の U1RNA がたどるべき成熟過程をたどれない(核内に戻れない)ことが分かった。つまり、スプライシングは RNA の核外輸送経路を変更してしまうだけでなく、輸送後の RNA の運命も変更してしまうのである。以上のことから、イントロンが mRNA の ID のひとつであることが明らかになった(Mol Cell, 2002)。この現象の分子の実体は、別グループにより報告された EJC(Exon Junction Complex)と呼ばれるたんぱく質複合体であると考えられた。EJCはスプライシング反応に共役してスプライシングの完了した mRNA 上に特異的に形成され、mRNA の核外輸送因子を RNA 上に呼び込む働きをする。スプライシングを受けた U snRNA 上に EJC が形成され、これが mRNA の ID の実体として機能していると考えら

れる。ただし、スプライシング依存的に mRNA 上に特異的に形成され、mRNA の核外輸送因子を RNA 上に呼び込む働きをする、もうひとつのたんぱく質複合体 TREX (TRanscription EXport) 複合体が最近同定され、mRNA の ID の実体についての情報はやや混乱している。

A



B

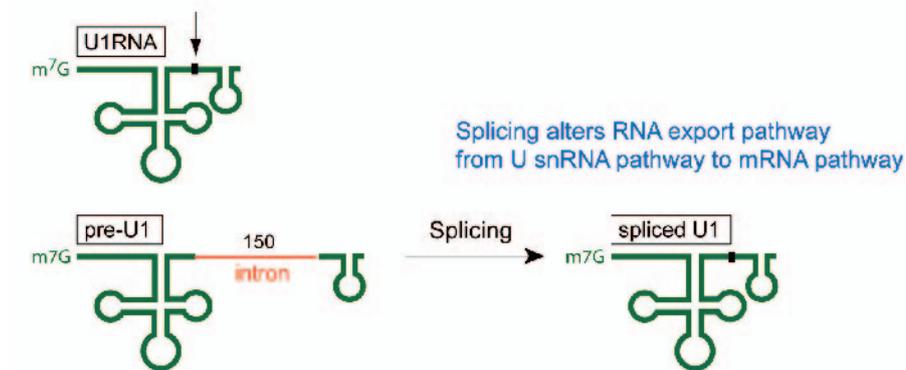


図 3.2.1. イントロンは mRNA の ID エLEMENT である

A. 実験に使用した RNA は、mRNA の代表としてジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の mRNA、U snRNA の代表として U5 RNA、対照として U6 RNA (核外輸送されない特殊な RNA) および イントロンを挿入した U1RNA (pre-U1) である。これら ^{32}P で標識された RNA の混合物をアフリカツメガエル卵母細胞の核に微量注入した。注入直後 (t=0) ではすべての RNA は核画分 N に存在する (レーン 1, 2) が、注入 3 時間後には、DHFR mRNA、U5 RNA などはその一部が細胞質画分 C に輸送されているのに対し、U6 は核画分 N に留まった (レーン 3, 4)。また、pre-U1 はスプライシングを受け (spliced U1)、その spliced U1 もその一部が細胞質へ核外輸送された (レーン 3, 4)。BSA-NES は核外輸送シグナル NES 配列を持つ合成ペプチドを BSA に共有結合させたものであるが、こ

れは NES 核外輸送因子である CRM1 に特異的に結合し、その機能を阻害する。つまり、U snRNA 核外輸送のような CRM1 依存的な核外輸送を特異的に阻害する。BSA-NES を先程の RNA の混合物と一緒に注入すると、mRNA の核外輸送は CRM1 に依存しないので影響を受けなかったが、U snRNA の1種である U5 の核外輸送は完全に阻害された(レーン 5, 6)。これに対して、スプライシングを受けた U1RNA の核外輸送は、通常の U snRNA と違って、CRM1 に依存しなくなったことが分かった(レーン 5, 6)。変異ペプチドを結合させた BSA (BAS-mut) には、上のような阻害効果は無かった(レーン 7, 8)。B. U snRNA の1種である U1 RNA に mRNA 由来のイントロンを挿入したキメラ RNA は正確にスプライシングを受けるが、スプライシングを受けた RNA は、U snRNA ではなく mRNA の機構で輸送される。さらに、輸送後の RNA の運命も異常になってしまう。

2. mRNA の ID エlementとしての「RNA の長さ」

元々遺伝子にイントロンをもたない mRNA も存在することから、イントロンが唯一の ID であるとは考えられない。次に、イントロンに依存しない mRNA 核外輸送の信号を探索した結果、RNA の長さが輸送機構を規定する重要な要素であることが明らかになった (Genes Dev、2004)。様々な長さの断片を挿入することにより U snRNA を長大化し、微量注入系で輸送を調べたところ、300 塩基長以上の長さを挿入すると mRNA として識別・輸送されることが分かった。逆に、イントロンを含まない mRNA を段階的に短小化していったところ、100 塩基程度まで短くなった RNA は mRNA ではなく U snRNA の輸送機構で輸送された。また免疫沈降実験から、RNA の長さに応じて、核の中で RNA に結合するたんぱく質因子の種類が変化する(複合体のリモデリング)ことが示された。これらの結果は RNA の長さが RNA 上に形成される核外輸送複合体の種類を規定し、長い RNA は mRNA として、キャップをもった短い RNA は U snRNA として輸送されることを強く示唆している。この結果をもとに、RNA 上のどのような特徴を識別して特異的な核外輸送因子群複合体が形成されるのかについての統一的なモデルを提唱した (Genes Dev、2004)。

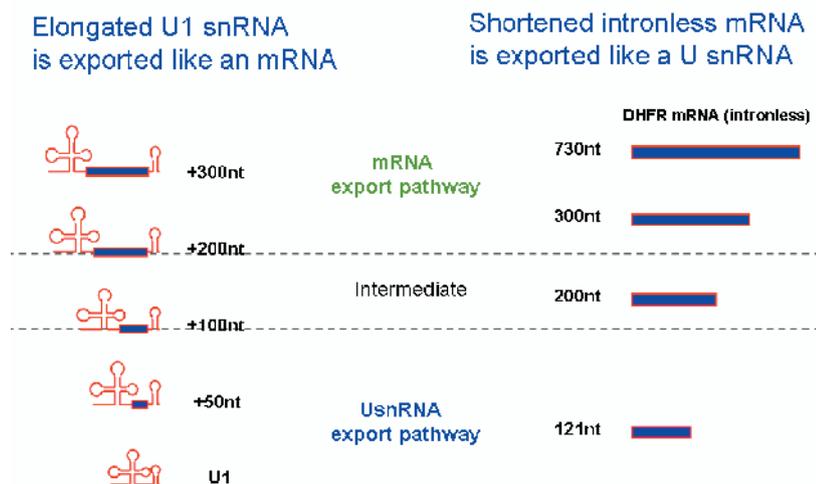


図 3.2.2. RNA の長さは、核外輸送機構を規定する重要な要素である
本文参照。

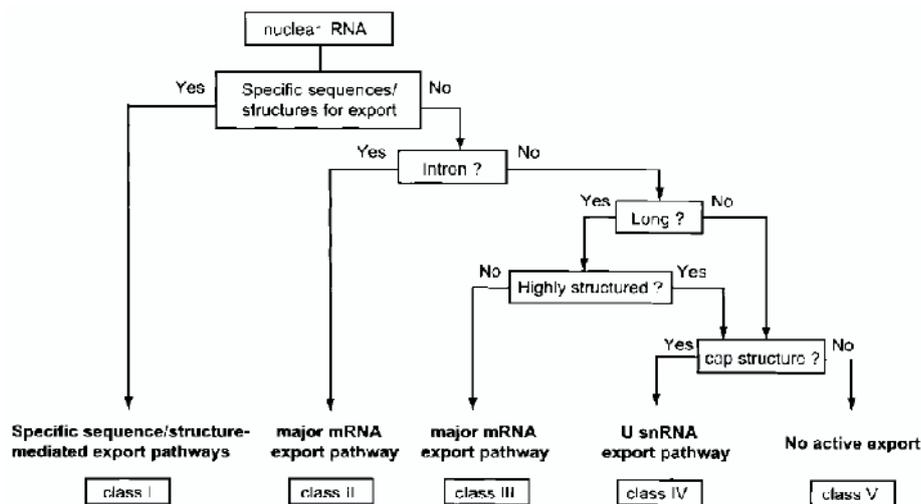


図 3.2.3. RNA 核外輸送のモデル

核内の RNA 転写物は、特異的な構造を取る場合には、その構造を認識する特異的因子に認識され、特異的な輸送経路に入る。tRNA や rRNA など RNA ポリメラーゼ I や III の転写物のほとんど、一部のウイルス RNA はこのクラスに入る(class I)。このような構造を持たない場合、イントロンの有無が重要になる。イントロンがあれば、スプライシングを経て、mRNA の経路に入る(class II)。ここでイントロンと言っているのは、mRNA 型のイントロンのことである。一部の tRNA に存在するイントロンや自己スプライシング型イントロンにはこのような効果はないと考えられる。イントロンがない場合には、RNA の長さが重要になる。RNA が十分長い場合、かつ RNA が強い高次構造を取らない場合は mRNA の経路に入る(class III)。強い高次構造を取る場合には mRNA とは判定されない。RNA が短い場合や、長くても強い高次構造を取る場合には、キャップ構造の有無が重要になる。キャップ構造を持っている場合には、U snRNA の経路に入る(class IV)。キャップ構造を持っていない場合には核外輸送は起こらない(class V)。なお最近、ポリ A 配列の有無も重要であることが明らかになった(後述)ので、このモデルに付け加える必要がある。

3. 核の中で RNA の長さが検知される機構

上の結果は、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。微量注入系と、免疫沈降法や UV クロスリンク法を組み合わせた生化学的方法を用いて、長い RNA (mRNA) に核の中で優先的に結合するたんぱく質因子(群)を同定する事により、RNA の長さを測る因子の候補の同定を試みてきたが(Genes Cells, 2004)、それによって同定された因子が RNA の長さを感じている実体なのか、あるいは、RNA の長さが感知された結果結合してきたものなのか、を決定することは難しい。

最近、RNA の長さを検知する機構は意外と単純かもしれないことを示唆する結果を得た。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 REF/ Aly (以下、REF)は、試験管内で長い 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ことが分かっている 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、UAP56 への ATP の結合は必要だがその加水分解は必要なく、UAP56 は RNA の高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、それ自身が 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(MCB, 2008)。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。

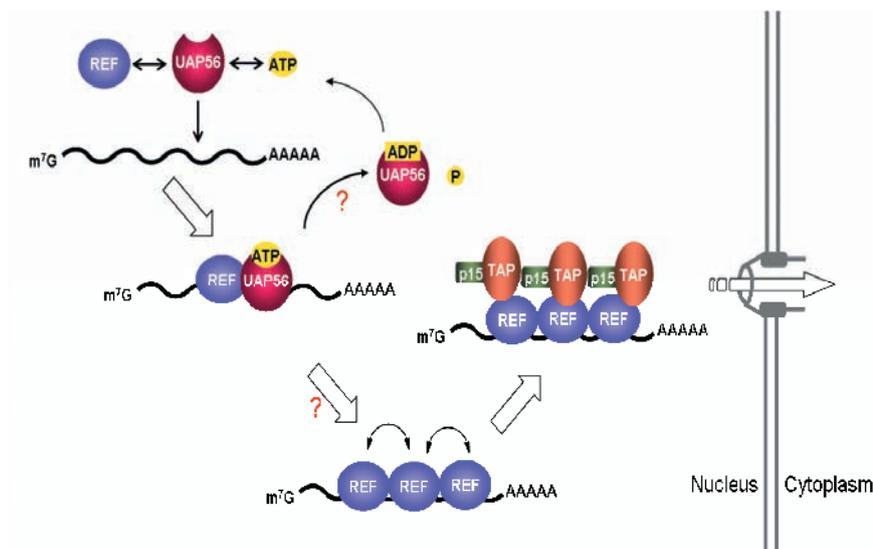


図 3.2.4. UAP56 による intronless mRNA 上への REF のリクルート機構のモデル
 ATP に結合した UAP56 は RNA 結合活性が活性化される。UAP56 は同時に REF に結合できるので、REF を RNA 上へロードする。UAP56 が REF と RNA の両方に結合すると、UAP56 の ATP 加水分解活性が活性化され、ATP が加水分解される。ADP 結合型になった UAP56 は RNA 結合活性を失うので RNA から解離する。解離した UAP56 はおそらく次のリクルートサイクルに参加する。一方、REF はその RNA 結合活性によって RNA 上に結合したままであると考えられる。この UAP56 による ATP 依存的な REF のリクルートが繰り返し行われ、その結果、複数の REF タンパク質が RNA 上に結合する。その RNA が mRNA (長い RNA) である場合、REF の結合は安定であるが、その他の種類の RNA である場合、REF の結合が不安定なので REF は RNA から解離すると考えられる。その後、RNA 上の REF はタンパク質-タンパク質間の相互作用に依存して mRNA 核外輸送受容体 TAP-p15 を mRNA 上にリクルートし、intronless mRNA の核外輸送が行われる。

4. mRNA の ID エlementとしてのポリ A 配列の役割

「イントロン」「RNA の長さ」に加えて、「ポリ A 配列」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、U snRNA や 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、これらの 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 コンストラクトから、同じ配列を持つ RNA を *in vivo* で発現させると、それらの転写物は 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 配列の長さが短すぎると、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 配列が mRNA の ID エLEMENT として機能していることになる(NAR、2008)。この現象には、ポリ A 結合たんぱく質が関与していると思われるが、この mRNA の ID 発動の機構は現時点では不明である。

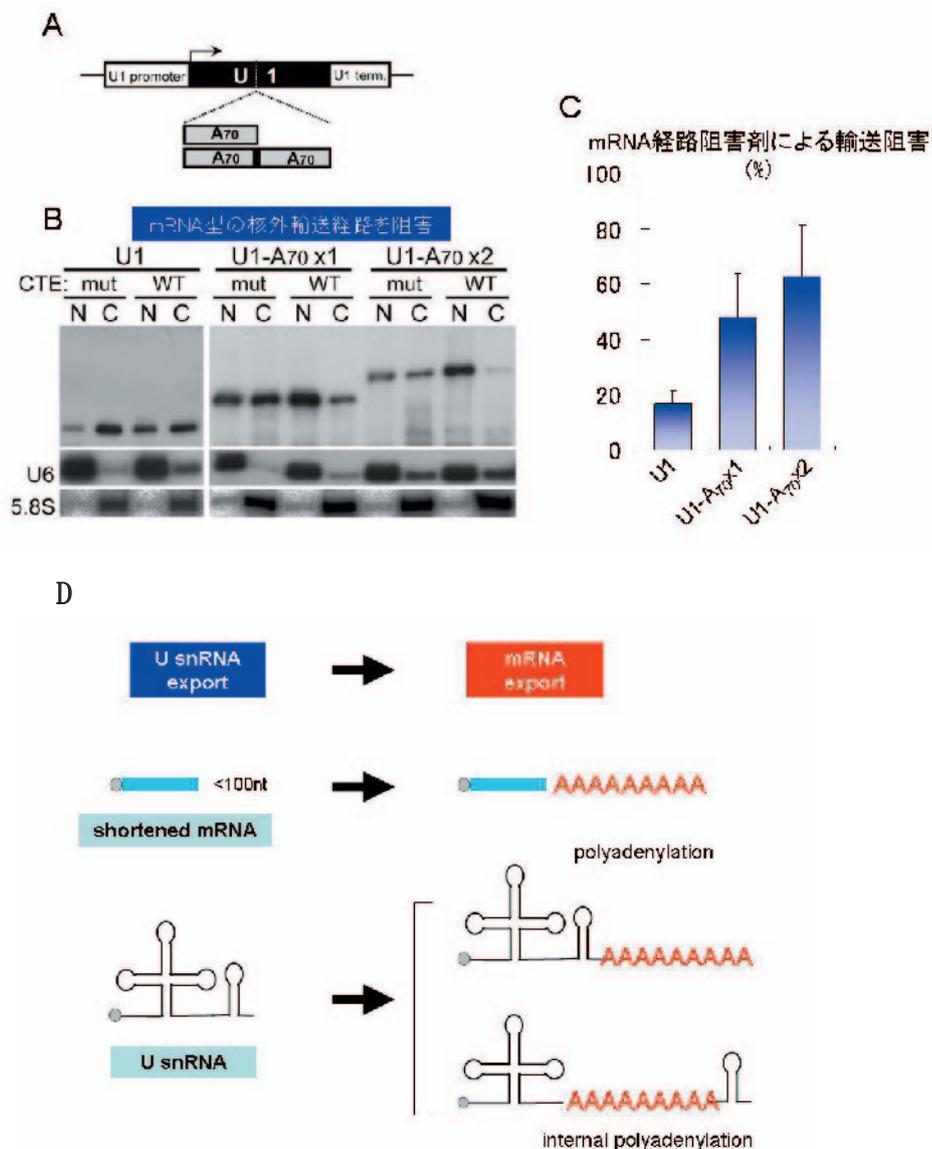


図 3.2.5. mRNA の ID エlementとしてのポリ A 配列

- A. U1 遺伝子内に、70 塩基長のポリ A 配列を 1 コピーあるいは 2 コピー挿入した。
- B. 上記遺伝子をアフリカツメガエル卵母細胞の核に微量注入し、転写産物を Northern blotting により解析した。mRNA 核外輸送経路の特異的阻害剤である CTE の野生型 (WT、活性型) あるいは変異型 (mut、不活性型、対照) を遺伝子と共に微量注入し阻害効果を検定した。
- C. CTE による核外輸送の阻害効果の定量化。ポリ A 配列が長いほど、CTE の阻害効果が強くなり、核外輸送経路が mRNA 型に切り替わっていることが分かる。
- D. 結果の要約。本文参照。

mRNA 前駆体の核内保持機構

上記以外の mRNA の ID エlementを同定する事を目指した。様々な状況証拠から、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た。ESE は、選択的スプライシングを行う遺伝子のエキソン内にしばしば存在する、プリンに富む配列である(図 3.2.6A)。この ESE が mRNA の ID エlementとして機能するかどうかを確かめるため、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。

他方、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(PNAS, 2007)。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。

選択的スプライシングでは、イントロンとエキソンの区別は絶対的なものではない。ある状況ではイントロンであったものが別の状況ではエキソン(mRNA の一部)として核外輸送を受ける。このような制御においては、イントロンを持つ RNA の核内保持活性は柔軟に制御する必要がある。選択的スプライシングに関わるエキソン内の配列が mRNA 前駆体の核内保持を補助するという上の発見は、それと深く関連していると考えられる。RNA の核内保持

のための配列と選択的スプライシングの制御配列は、密接に関連して制御されているはずである。今後、mRNA 前駆体の核内保持に関わる RNA 配列を洗い出していく予定である。5'、3' スプライス部位、ブランチ部位などのスプライシングの基本的な信号だけでなく、選択的スプライシングの制御配列にも着目して行きたい。さらに、それらの配列に結合して核内保持を行う責任因子(群)を同定する計画である。

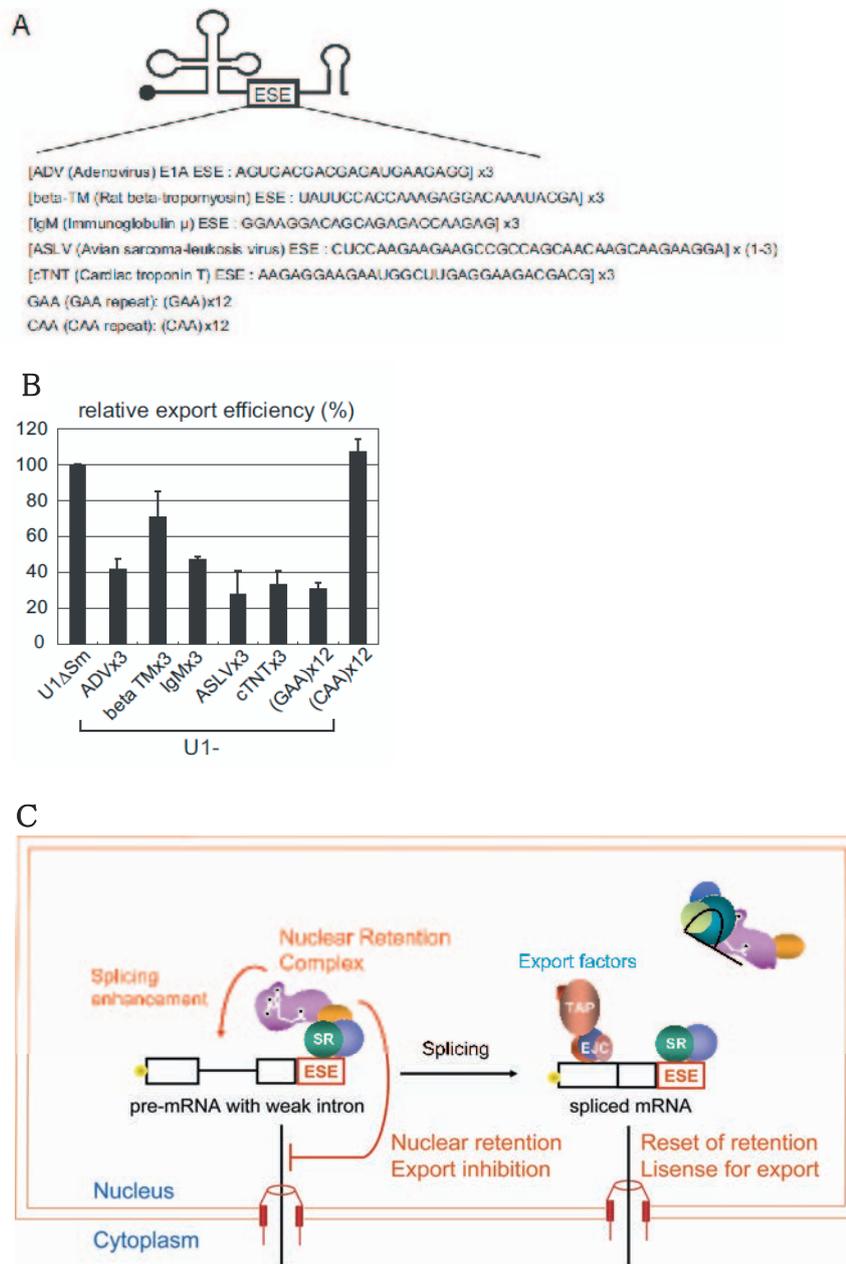


図 3.2.6. mRNA 前駆体の核内保持とスプライシングによる核内保持の解除

A. 様々な遺伝子の ESE 配列を U1 RNA 中に挿入した。強い ESE 活性を發揮する GAA の繰り返し配列、およびその対照として CAA の繰り返し配列も用いた。B. 元の U1 RNA を 100 とした場合の、上記 RNA の核外輸送効率。CAA の繰り返し配列以外は、RNA 核外輸送をシスに阻害する活性があることが分かる。C. 結果の概要、本文参照。

リン酸化・脱リン酸化による RNA 核外輸送の制御機構

高等真核生物では、U snRNA は核内で合成された後まず細胞質に輸送される。この核外輸送において、(少なくとも)5種類のたんぱく質因子がU snRNAと共に核外輸送複合体(export complex)を形成し核膜孔を通過することが分かっている。これらの中でもPHAX(phosphorylated adaptor for RNA export)と名付けられた RNA 結合たんぱく質はリン酸化による活性制御を受け、RNA 核外輸送複合体の形成に中心的な役割を果たす(参考 Cell, 2000)。PHAX は核内でリン酸化され、export complex の一部として細胞質に移動し、そこで脱リン酸化を受ける。PHAX のリン酸化は export complex の形成に必須であるのに対して、その脱リン酸化は export complex の解体を引き起こす。つまり、PHAX はコンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化のサイクルを繰り返し、そのことが、RNA の核外輸送の方向性を規定しているのである(Cell, 2000)。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と細胞質に局在化する脱リン酸化酵素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 ノックダウン法を用いて明らかにした(MCB, 2008)。

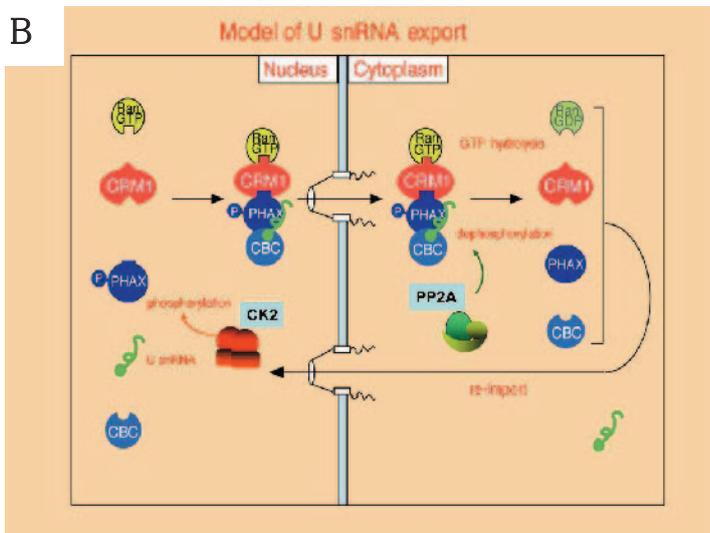
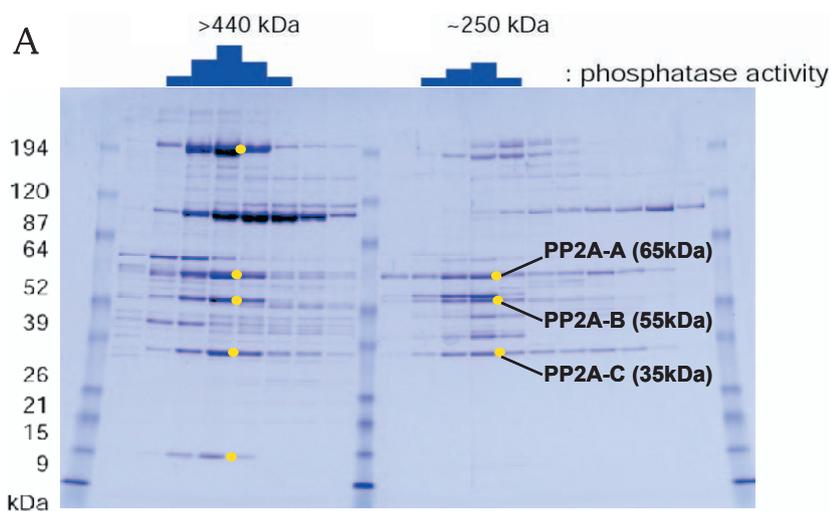


図 3.2.7. PHAX のリン酸化・脱リン酸化による活性制御

- A. PHAX の脱リン酸化酵素の精製。精製途中のゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、約 250kDa と 440kDa 超の二つの画分に活性が分離した。最終精製ステップとして、その両方の画分を、monoQ カラムクロマトグラフィーによりそれぞれ分離し、活性画分周辺を SDS ゲル電気泳動後、ゲルをクーマシー染色した。マス解析により、いずれの活性画分にも、ホスファターゼ 2A (PP2A) の 3 つのサブユニットが活性と連動して存在していた。
- B. U snRNA 核外輸送のモデル。本文参照。

たんぱく質遺伝子のイントロンにコードされる miRNA の発現機構の解明

ヒトゲノムには約 500 もの microRNA(miRNA) 遺伝子が存在し、それらは遺伝子間領域もしくはたんぱく質遺伝子のイントロンまたはエキソンにコードされている。通常 miRNA は、それ自身を含む一次転写物として転写された後 Microprocessor complex と呼ばれるたんぱく質複合体により切り取られて、miRNA 前駆体となる。たんぱく質遺伝子のイントロンにコードされる miRNA 生成系において、イントロン中の miRNA 前駆体の切り出しが、その宿主遺伝子のスプライシングとどのように関わっているかについての詳細は明らかになっていなかった。我々は、HeLa 細胞核抽出液を用いた試験管内スプライシング反応系を用いて、イントロン中の miRNA 前駆体の切り出しと宿主 pre-mRNA のスプライシング反応を詳細に解析した。その結果、イントロン中の miRNA 前駆体の切り出しは、スプライソーム上でスプライシングが起こる前に起こり、2 つの断片に分割された宿主 pre-mRNA はそのままスプライソームの中でトランススプライシングを受けることが示唆された。これらの結果から、miRNA 前駆体の切り出しと宿主 pre-mRNA のスプライシングが一連の反応ステップの中で協調関係にあり、miRNA 前駆体と mRNA の両方が、1 分子の pre-mRNA から生み出される仕組みが細胞内には存在することが示めされた(論文 revise 中)。

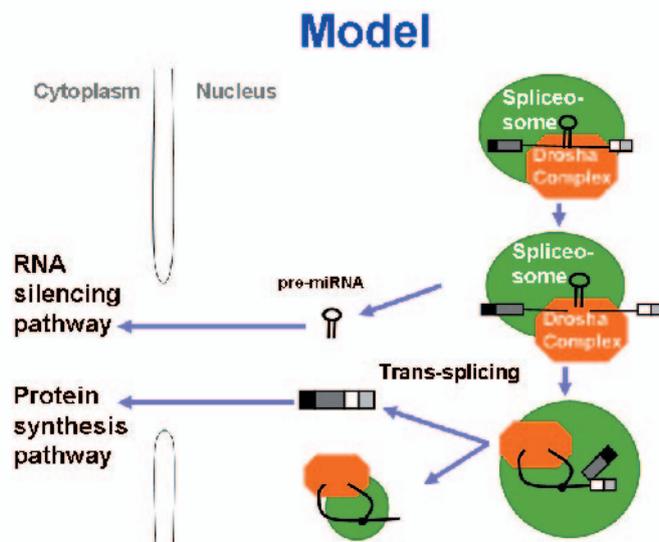


図 3.2.8. イントロンにコードされる miRNA の発現機構
本文参照。

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

RNA 核外輸送機構(輸送経路)は多種類存在し、その選択が RNA の細胞質での機能に影響を与える。例えば HIV-1 RNA の輸送経路を変更するとウイルス粒子の形成に影響を与えることが報告されている。したがって、ある RNA に複数の輸送経路が誘導されうる場合、その適正な機能発現のためには、適切な経路を選択する機構は重要な意味を持つ。この機構の研究には HIV-1 の系が適している。HIV-1 ゲノムは 2 箇所イントロンを持ち、2 番目のイントロン内に RRE (Rev response element) と呼ばれるウイルスタンパク質 Rev の結合配列が存在する。HIV-1 プロウイルスからはスプライシングパターンの違いにより 3 種類の RNA が発現する。それらは、2 箇所のイントロンともスプライシングされた 2kb-RNA、最初のイントロンのみスプライシングされた 4kb-RNA、全くスプライシングされない 9kb-RNA である(図 3.2.9)。

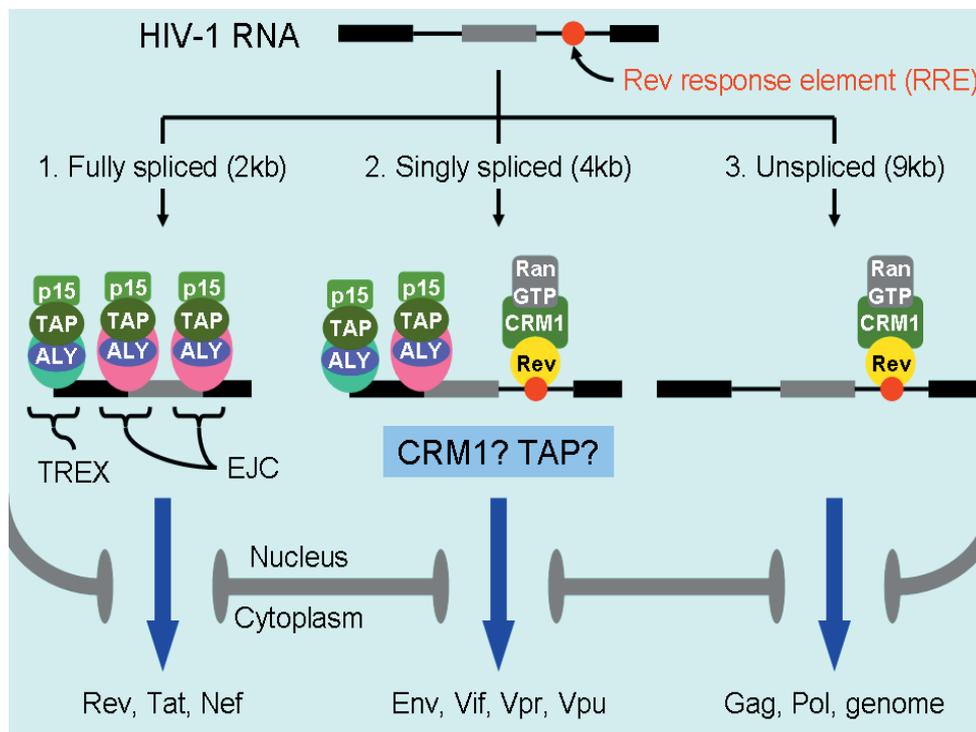


図 3.2.9. 3 種類の HIV-1 RNA の核外輸送経路

本文参照。

2kb-RNA 上には TREX および EJC と呼ばれる複合体がスプライシング依存的にリクルートされ、次いでこれらの複合体に含まれる REF/ALY (図では ALY) が核外輸送因子 TAP をリクルートすると考えられる (TAP 経路)。細胞質へ輸送された 2kb-RNA からは Rev などが合成され、Rev は核内へ搬入される。9kb-RNA の場合は RRE 配列に Rev が結合し、Rev が核外輸送因子 CRM1 をリクルートする (CRM1 経路)。ところが、4kb-RNA はスプライシングされ、かつ RRE 配列を持つため TAP 経路と CRM1 経路が同時に誘導されうる。では 4kb-RNA は両経路で核外へ輸送されるのか、一方の経路が抑制されるのか、もし抑制されるならばその仕組みはどのようなものか? これらの問題を明らかにするため、4kb-RNA を模擬するモデル RNA (図 3.2.10) を用いて、HeLa 細胞核抽出液を用いた試験管内スプ

ライシグ系とアフリカツメガエル卵母細胞への微量注入実験系を用いて解析を行った。

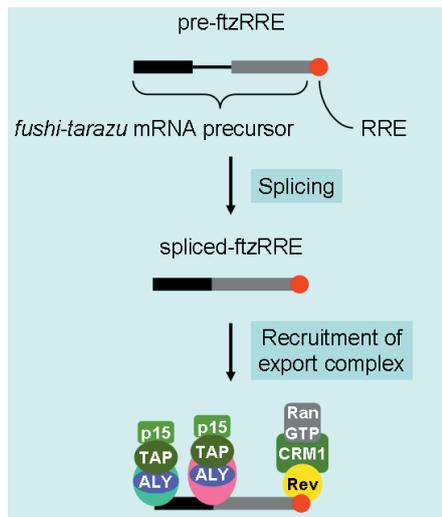


図 3.2.10. HIV-1 4kb-RNA を模擬するモデル RNA

スプライシング効率のよい *fushi-tarazu* 遺伝子の mRNA 前駆体の 3' 端に RRE を付加した RNA を作製した。このモデル RNA はスプライシングされると TREX および EJC がリクルートされ、TAP 経路が誘導される。Rev が存在すると、スプライシングされたモデル RNA には RRE が含まれているため、Rev が結合し、CRM1 経路が誘導される。したがって、モデル RNA は HIV-1 4kb-RNA の核外輸送を再現することができる。

アフリカツメガエル卵母細胞の核内にモデル RNA (pre-ftzRRE) を微量注入すると、pre-ftzRRE は核内でスプライシングされ、スプライシングされた RNA (spliced-ftzRRE) は細胞質へ輸送された。この spliced-ftzRRE の核外輸送は TAP 経路輸送阻害剤によって阻害されたことから、TAP 経路であることがわかった。次に、pre-ftzRRE と共に精製したレコンビナント Rev を同時注入すると、spliced-ftzRRE の核外輸送は TAP 経路阻害剤によってほとんど影響を受けなくなり、CRM1 経路阻害剤によって阻害されるようになった。この結果から、spliced-ftzRRE の核外輸送において Rev は CRM1 経路を誘導するだけでなく TAP 経路の利用を抑制することがわかった。

次に Rev によって TAP 経路が抑制される機構を明らかにするため、RNA および Rev を微量注入した卵母細胞の核画分を用いて GST pull-down および RNA 免疫沈降実験を行った。その結果、Rev は、TAP および REF/ALY と spliced-ftzRRE との結合を阻害することが示唆された。また、HeLa 細胞核抽出液を用いた試験管内スプライシング系においても同様の結果が得られた。したがって Rev は RNA 上から REF/ALY を取り除くことによって、TAP の RNA 上へのリクルートを抑制していると思われる(論文投稿準備中)。

現在、Rev が RNA 上から REF/ALY を取り除く分子機構の解明を試みている。Rev による TAP 経路抑制機構のモデルを提唱したい。

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 EJC 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 8 種類同定されていて、そのうちの 4 種類を含むコア複合体の原子構造も明らかになっている。しかし、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。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 mago nashi (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 mago nashi 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(論文投稿準備中)。

神経突起中での mRNA たんぱく質複合体のリモデリング

真核生物において、核から細胞質へ輸送された直後の mRNA では、まず、最初の翻訳である pioneer-round translation が起こるが、その mRNA の 5' 端のキャップ構造には、核内キャップ構造結合複合体(CBC)が結合している。そしてその際に、mRNA は品質管理機構によるチェックを受け、キャップ構造上で細胞質キャップ構造結合たんぱく質 eIF4E が CBC と置き換わり、その後の安定な翻訳へと移行する。他方、神経細胞では、特定の mRNA が局所輸送や係留、そして翻訳制御を受けることが知られている。しかしながら、これらの mRNA がそれぞれの調節段階でどのような分子機構で制御されているのかについては不明な点が多い。我々は pioneer-round translation に伴う mRNA たんぱく質複合体(mRNP)のリモデリングが、これらの制御と関わっているのではないかと考え、神経細胞のモデル細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて、CBC または eIF4E を含む mRNP の解析を試みた。CBC の構成因子である CBP80 に対する抗体を用いた免疫染色を行ったところ、核内に加えて、神経突起のシャフト中に顆粒状のシグナルが検出された(図 3.2.11)。また、この顆粒中に poly(A) RNA の局在も検出された。一方、eIF4E は細胞体と神経突起の分岐や成長円錐に顆粒状のシグナルとして検出され、その局在は CBP80 とはほとんど一致しなかった。

さらに、翻訳伸長阻害剤である Cycloheximide を添加した場合、CBP80 のシグナルには変化がなかったが、eIF4E の顆粒状のシグナルは消失した。一方、微小管の脱重合剤である Nocodazole を加えると、CBP80 の顆粒状のシグナルは消失したが、eIF4E のシグナルには変化がなかった。

以上のことから、神経突起中の CBC が結合した mRNP は突起中の微小管上を輸送されている mRNP であること、そして eIF4E が結合した mRNP は局所輸送後に係留されている mRNP であることが示唆され、pioneer-round translation に伴う mRNP のリモデリングが、輸送から局在化への移行を担っている可能性が考えられた(論文投稿準備中)。

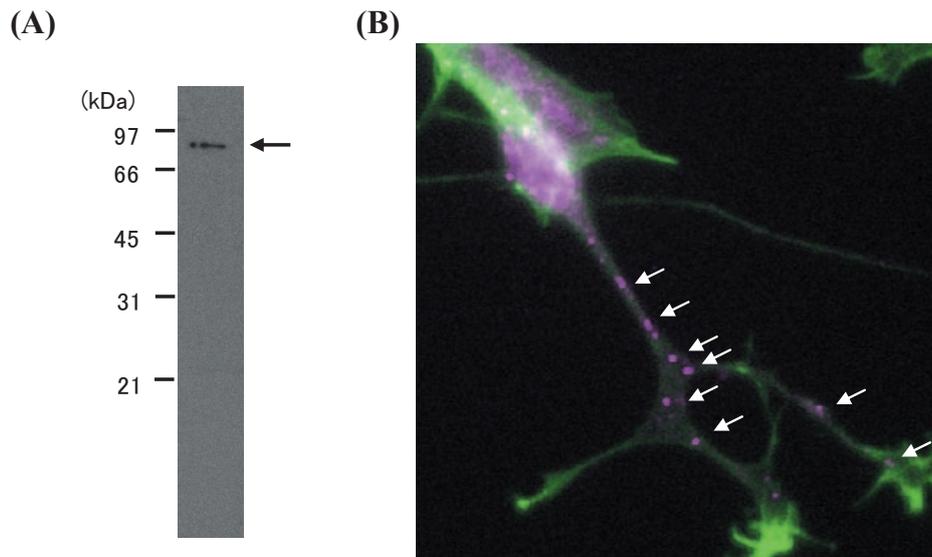


図 3.2.11. 抗 CBP80 抗体を用いた SH-SY5Y 細胞の染色像
 A. SH-SY5Y 細胞全細胞抽液を用いたウェスタンブロット。
 B. SH-SY5Y 細胞の染色像。青が CBP80 を、緑が actin を表す。突起中の CBP80 のシグナルを矢印で示した。

スプライシング後のイントロンの代謝機構

スプライシングによりリアット型に切り出されたイントロンは核内に留まり、スプライシング因子が除かれた後、リアット構造が解消され (debranching)、分解されると考えられている。この過程が機能しない場合、リアット型イントロンがスプライシング因子を結合したまま核内に蓄積するので、スプライシング因子や、イントロン分解により再利用されるはずのヌクレオチドが、不足するなどの問題が起こると考えられる。このようなイントロンの代謝機構については、酵母遺伝学を用いた少数の先行研究があるのみで、十分に理解されているとは言えない。

ヒトの遺伝子には酵母と比べてはるかに多くのイントロンが含まれ、mRNA 初期転写物のうち実に 95 パーセント以上がイントロンとして切り出される。また、イントロンの中には snoRNA や miRNA などの重要な非コード RNA 分子がコードされており、スプライシングやイントロンの代謝と共役して産生される可能性が高い。このように、イントロンの代謝機構は高等真核生物にとって非常に重要な過程であると考えられが、高等真核生物ではほとんど解析されていない。我々はスプライシング反応後に生じるヒトのイントロン・スプライシング因子複合体を単離し、核内で起こるイントロンの代謝機構を分子レベルで解析することを試みた。

RNA に 2 種類のアフィニティータグ(図 3.2.12A)を付けることにより、HeLa 細胞核抽出液を用いた試験管内スプライシング系から、イントロン RNA・たんぱく質複合体の精製に成功した。さらに、グリセロール密度勾配遠心法を組み合わせることにより、イントロン RNA・たんぱく質複合体には少なくとも 2 種類の形態がある事が分かった。すなわち、約 40S の沈降

係数を持つ IL (Intron Large) 複合体と約 20S の沈降係数を持つ IS (Intron Small) 複合体である。IL 複合体には、U2、U5、U6 snRNA と多くのたんぱく質性のスプライシング因子が同定されたが、IS 複合体にはそれらの因子はほとんど見られなかった。詳細な解析の結果、イントロン代謝過程において、IL から IS への複合体解体が行われ、TFIP11 と hPrp43 という因子のヘテロ 2 量体はその複合体解体を行うことが強く示唆された。さらに、イントロンの debranching は IS 複合体に変換されてから起こることも示唆された (NAR in press)。

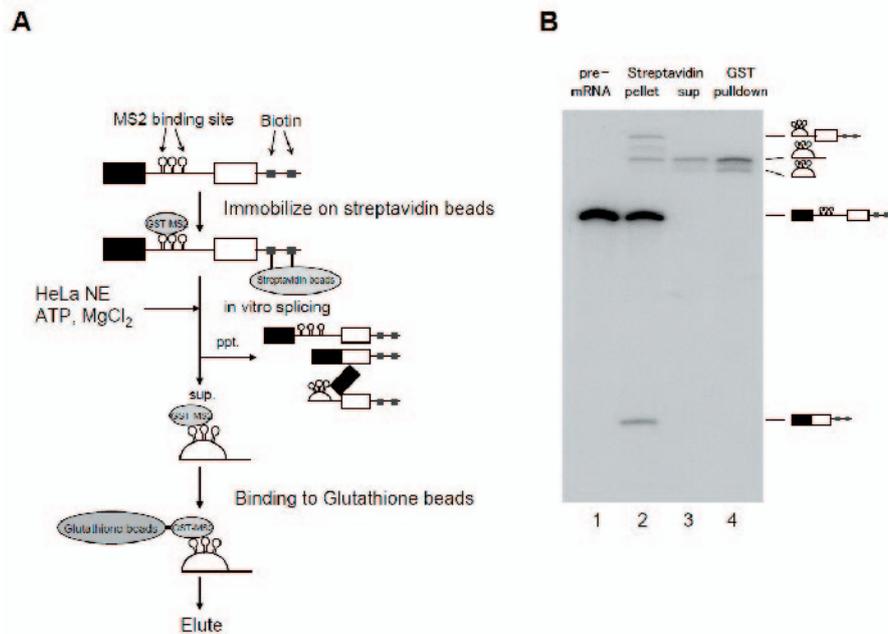


図 3.2.12. ポストスプライシングイントロン複合体の精製

A. イントロンの中に MS2 結合部位を、3' 末端領域にビオチン残基を持つ mRNA 前駆体を用意する。この RNA をストレプトアビジンビーズに固定化した状態で試験管内スプライシング反応を行う。ストレプトアビジンビーズを沈降させると、スプライスソームから解離したイントロンだけが上清に存在する。この上清から、GST-MS2 たんぱく質とグルタチオンビーズを用いて、イントロンを含む複合体をさらに精製する。

B. レーン 1、インプット mRNA 前駆体；レーン 2、試験管内スプライシング反応後、ストレプトアビジンビーズと共に沈降したスプライシング産物；レーン 3、ストレプトアビジンビーズと共に沈降しなかったスプライシング産物；レーン 4、さらに GST-MS2 に結合した RNA。

(2)研究成果の今後期待される効果

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、各研究グループとも特定の種類の RNA (例えば mRNA や rRNA) の核外輸送機構を個別的に研究している。しかし実際の細胞中では、様々な RNA 種が混在した状態で核外輸送が起こっている。この事実に着目すれば、異なる RNA 種が核内でどのように分子識別されているかという機構が重要であることは明らかである。しかし、このよう

な視点から行われた研究は前例がほとんど無く、我々は極めてユニークな立場にいると言える。今後、mRNA の ID エLEMENTの研究をさらに発展させ、その全貌の理解を目指す。mRNA の ID エLEMENTの研究では、mRNA の核外輸送を「mRNA の身分証明」という視点から眺めることにより、様々な種類の RNA が混在する実際の細胞核内の状況下における mRNA の核外輸送機構を明らかにできることが期待される。また、核外輸送だけでなく、mRNA の運命全体を規定する特徴が同定できる可能性がある。

さらに、近年、膨大な数の non-coding RNA(ncRNA)が同定され、その機能解明が期待されている。ncRNA のあるものは、スプライシングを経て産生されポリAの尾を持つなど、mRNA の特徴を持つにも関わらず、核外輸送されずに核内に留まる。この現象は ncRNA の機能と密接に関連していると考えられ、mRNA の ID の研究は、この ncRNA 特有の動態を理解することに新しい洞察を与えることが期待される。

HIV-1 Rev のプロジェクトからは、ウイルスが「RNA の身分証明書を書き換える」事により RNA 輸送を制御し宿主の裏をかく機構が明らかになることが期待される。現在は基礎的な研究の段階に留まっているが、その延長線上に、新しいコンセプトによる抗エイズ薬が生まれることにつながることを期待している。また、mRNA 前駆体の核内保持機構の研究に照らしてみても、HIV-1 などのレトロウイルスは、通常は細胞質に輸送されないような、イントロンを含むウイルス RNA を細胞質に輸送させているが、その際には mRNA 前駆体の核内保持機構を解除しなければならないはずである。mRNA 前駆体の核内保持機構の研究から、この機構の裏をかいて増殖する HIV-1 の巧妙な戦略に対して創薬のヒントを得られる可能性もある。

また、選択的スプライシングでは、イントロンとエキソンの区別は絶対的なものではなく、ある状況ではイントロンであったものが別の状況ではエキソン(mRNA の一部)として核外輸送を受ける。このような制御においては、イントロンを持つ RNA の核内保持活性は柔軟に制御する必要がある。選択的スプライシングに関わるエキソン内の配列が mRNA 前駆体の核内保持を補助するという我々の発見は、それと深く関連していると考えられる。RNA の核内保持のための配列と選択的スプライシングの制御配列は、密接に関連して制御されているはずである。今後の研究が、そのような新たな視点から、新しい制御機構の解明につながることを期待している。

その他のプロジェクトも、世界的に見てもほとんど手を付けられていないようなテーマが多く、完成した暁には、大きな知的財産となるものと期待する。

§4 研究参加者

① 荒木グループ(複数タンパク質の集合を制御する分子スイッチの研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	荒木 弘之	国立遺伝学研究所	教授	総括, 複合体形成制御	H15.10~H21.3
	上村 陽一郎	国立遺伝学研究所	助手	生化学的手法による複合体制御の解析	H15.10~H17.1
	田中 誠司	国立遺伝学研究所	助教	CDKによる複合体制御の解析	H15.10~H21.3
*	田中 尚美	国立遺伝学研究所	特任研究員	CDK複合体の精製とSld2リン酸化の解析	H16.4~H20.3
*	平井 和之	国立遺伝学研究所	特任研究員	タンパク質相互作用の解析	H16.4~H21.3
*	梅森 稔子	国立遺伝学研究所	技術補佐員	タンパク質の精製	H16.4~H21.3
*	蜂屋 景子	国立遺伝学研究所	技術補佐員	事務	H15.12~H21.3
	仁木 宏典	国立遺伝学研究所	教授	細胞内タンパク質の挙動解析	H15.10~H18.3
*	山市 嘉治	国立遺伝学研究所	CREST研究員	出芽酵母Dpb11, Sld2タンパク質の細胞内動態の解析	H16.4~H16.4
*	栗田 憂子	国立遺伝学研究所	研究補助員	GFP標識タンパク質の細胞局在性の観察とその画像解析	H15.12~H17.3

② 大野グループ(RNA・たんぱく質複合体の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	大野睦人	京都大学ウイルス研究所	教授	研究全般と総括	H15.10~H21.3
	片岡直行	同上	助手	イントロン、RNAの長さ、HIV	H15.10~H18.2
	北畠 真	同上	助教	イントロン、RNAの長さ、HIV	H16.4~H21.3
	児玉栄一	京都大学ウイルス研究所(附属エイズ研究施設)	助教	HIV	H16.4~H21.3
	谷口一郎	京都大学ウイルス研究所	助教	RNAの長さ、HIV	H16.4~H21.3
	北尾紗織	同上	研究員	イントロン、RNAの長さ、HIV	H16.11~19.10.31

	二宮賢介	同上	研究員	イントロン、HIV	H17.4~H20.3
*	大石薫子	同上	JST研究補助員	事務・研究補助	H16.1~16.10.31
*	馬淵直人	同上	JST研究員	HIV	H16.4~17.3.31
	増山 郁	同上	研究員	RNAの長さ	H16.4~18.3.31
	秋山慎太郎	京都大学理学研究科研究科	M	イントロン、RNAの長さ	H16.4~18.3.31
	畑井千裕	同上	M	イントロン、RNAの長さ	H16.4~18.3.31
	福家浩之	同上	D	イントロン、RNAの長さ、HIV	H16.4~H20.3
	芳本 玲	同上	D4	イントロン、HIV	H16.4~H21.3
	霧生尚志	同上	D3	イントロン、RNAの長さ	H16.4~H21.3
	宮田淳美	同上	D3	イントロン、RNAの長さ	H16.4~H21.3
	鈴木達也	同上	D3	イントロン、RNAの長さ	H18.4~H21.3
	McCloskey	同上	D2	イントロン、RNAの長さ、HIV	H16.4~H21.3
*	垂紗子	同上	同上	同上	同上
	大角典子	京都大学ウイルス研究所	JST研究補助員	事務・研究補助	H16.10~19.3.31
	竹村玲子	京都大学理学研究科研究科	D2	イントロン、RNAの長さ	H19.4~H21.3
	岩野亮介	同上	M	イントロン、RNAの長さ、HIV	H18.4~H20.3
	藤井耕太郎	同上	D1	イントロン、RNAの長さ、HIV	H18.4~H21.3
	藤田 恵	同上	D1	イントロン	H18.4~H21.3
	秋石和宏	同上	M2	イントロン、RNAの長さ	H19.4~H21.3
	坂田知子	同上	M2	イントロン、RNAの長さ	H19.4~H21.3
	竹岩俊彦	同上	M1	イントロン、RNAの長さ	H20.4~H21.3
	本田典子	京都大学ウイルス研究所	研究補助員	事務・研究補助	H19.4~H21.3

§ 5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
John F.X. Diffley (Cancer Research UK, London Research Institute, Director)	研究の相談と評価	静岡県三島市	10日間

§ 6 成果発表等

6.1 荒木グループ

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 3件)

Yon-Soo Tak, Yoshimi Tanaka, Shizuko Endo, Yoichiro Kamimura, Hiroyuki Araki
A CDK-catalysed regulatory phosphorylation for formation of the DNA replication complex Sld2-Dpb11
The EMBO Journal, Vol.25 No.9, 1987-1996, 2006

Seiji Tanaka, Toshiko Umemori, Kazuyuki Hirai, Sachiko Muramatsu, Yoichiro Kamimura & Hiroyuki Araki
CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast
nature, Vol.445 No.7125, 328-332, 2007

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

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 4件、国際会議 8件)

Yon-Soo Tak, Yoshimi Tanaka, Shizuko Endo, Yoichiro Kamimura, Hiroyuki Araki
A Novel Regulatory Mechanism of CDK-Catalyzed Phosphorylation in Sld2 to Initiate DNA Replication
The 5th International 3R Symposium(淡路), 2005.11.16

Yon-Soo Tak, Yoshimi Tanaka, Sachiko Muramatsu, Shizuko Endo, Seiji Tanaka, Yoichiro Kamimura, Hiroyuki Araki
CDK-dependent Reactions at the Initiation of Chromosomal DNA Replication in Budding Yeast.
第28回日本分子生物学会(福岡), 2005.12.8

Yon-Soo Tak, Yoshimi Tanaka, Sachiko Muramatsu, Shizuko Endo, Seiji Tanaka, Yoichiro Kamimura, Hiroyuki Araki
CDK-DEPENDENT INITIATION OF CHROMOSOME DNA REPLICATION IN BUDDING YEAST
第20回国際生化学・分子生物学会議(京都), 2006.6.23

Hiroyuki Araki
CDK-Mediated Regulation of Chromosomal DNA Replication in Budding Yeast
「染色体サイクル」第一回国際シンポジウム(東京), 2006.6.26

Seiji Tanaka^{1,2,3}, Sachiko Muramatsu¹, Toshiko Umemori^{1,3}, Kazuyuki Hirai^{1,3}, Yoichiro Kamimura¹ and Hiroyuki Araki^{1,2,3}
CDK-Dependent Initiation of Chromosomal DNA Replication in Budding Yeast

eIMBL Workshop on DNA Replication(東京), 2007.4.16

荒木弘之

サイクリン依存性キナーゼによる真核生物染色体 DNA 複製の制御機構
平成 20 年度蛋白質研究所セミナー「染色体機能とその病態」
大阪大学蛋白質研究所(吹田), 2008.3.14

Araki, H., Tanaka, T., Hirai, K., Li, Y., Umemori, T., Yanagisawa, Y., Muramatsu, S.,
Tanaka, S.

CDK-dependent initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast.
Cold Spring Harbor Laboratory「The Cell Cycle」(NY, USA), 2008.5.15

荒木弘之

真核生物染色体 DNA の複製開始機構
日本分子生物学会 第 8 回春季シンポジウム(札幌), 2008.5.27

Hiroiyuki Araki

CDK-dependent regulation of chromosomal DNA replication
FASEB「Yeast Chromosome Structure, Replication & Segregation」(AZ, USA)
2008.6.25

荒木弘之

染色体 DNA の複製機構を探る
第 11 回真核微生物交流会(東広島), 2008.7.4

Araki H., Tanaka T., Hirai K., Tanaka Y., Umemori T., Yanagisawa Y., Sakamoto S.,
Tanaka S.

Molecular Mechanism of the Initiation Step of Chromosomal DNA Replication in
Budding Yeast
XX International Congress of Genetics 2008(Belrin, Germany), 2008.7.13

Hiroiyuki Araki, Kazuyuki Hirai, Yan Li, Tamon Tanaka, Yoshimi Tanaka, Toshiko
Umemori, Yoshimi Yanagisawa, Sachiko Muramatsu, and Seiji Tanaka

CDK-dependent Assembly of Replication Proteins to Initiate Chromosomal DNA
Replication
DNA REPLICATION and GENOME INTEGRITY 2008(CA, USA), 2008.7.19

② 口頭発表 (国内会議 17 件、国際会議 5 件)

上村陽一郎, 高山優子, 荒木弘之

The initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast
第 26 回日本分子生物学会年会(神戸), 2003.12.12

荒木弘之, 卓妍秀, 村松佐知子, 上村陽一郎

Assembly of replication proteins at origins in budding yeast
第 26 回日本分子生物学会年会(神戸), 2003.12.12

卓妍秀, 村松佐知子, 上村陽一郎, 荒木弘之

PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS TO PROMOTE THE INITIATION OF DNA

REPLICATION

2004 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES (USA), 2004.7.13

坂本佐知子, 上村陽一郎, 荒木弘之
染色体DNA複製開始領域への複製タンパク質の集合機構
酵母遺伝学フォーラム第37回研究報告会(松江), 2004.9.9

上村陽一郎, 卓妍秀, 平井和之, 坂本佐知子, 荒木弘之
Formation of the pre-Landing Complex (pre-LC) regulated by CDK activity in budding yeast
第27回日本分子生物学会年会(神戸), 2004.12.9

Tak, Y.-S., Tanaka, Y., Muramatsu, S., Tanaka, S., Kamimura, Y., Araki, H.
CDK-dependent reactions at the initiation of chromosomal DNA replication in budding Yeast.
Eukaryotic DNA Replication (NY, USA), 2005.9.8

田中誠司, 荒木弘之
ISOLATION OF THE MUTANT THAT BYPASSES THE CDK REQUIREMENT IN THE INITIATION OF DNA REPLICATION
日本遺伝学会第77回大会(東京), 2005.9.29

荒木弘之
核酸合成に関わるたんぱく質複合体の構造と機能解析
2005年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム(大阪), 2005.11.15

Yon-Soo Tak, Yoshimi Tanaka, Sachiko Muramatsu, Shizuko Endo, Seiji Tanaka, Yoichiro Kamimura and Hiroyuki Araki
CDK-dependent assembly of replication proteins at origins
The 5th International 3R Symposium(淡路), 2005.11.17

Yon-Soo Tak, Yoshimi Tanaka, Sachiko Muramatsu, Shizuko Endo, Seiji Tanaka, Yoichiro Kamimura, Hiroyuki Araki
CDK-dependent Reactions at the Initiation of Chromosomal DNA Replication in Budding Yeast.
第28回日本分子生物学会年会(福岡), 2005.12.8

田中誠司, 荒木弘之
Isolation and analysis of the mutant that bypasses the CDK requirement in the initiation of DNA replication
酵母遺伝学フォーラム 第39回研究報告会(静岡県三島市), 2006.7.16

Hiroyuki Araki, Seiji Tanaka, Yon-Soo Tak, Yoshimi Tanaka, Sachiko Muramatsu, Shizuko Endo, Toshiko Umemori, Kazuyuki Hirai and Yoichiro Kamimura
CDK-Mediated Regulation of Chromosomal DNA Replication in Budding Yeast
DNA Replication and Genome Integrity(San Diego, CA, USA), 2006.8.10

田中誠司, 梅森稔子, 平井和之, 村松佐知子, 上村陽一郎, 荒木弘之
CDKによる染色体DNA複製開始の制御機構

第 18 回 DNA 複製・分配ワークショップ(静岡県熱海市), 2006.10.31

田中誠司, 梅森稔子, 平井和之, 村松佐知子, 上村陽一郎, 荒木弘之
CDK による染色体 DNA 複製開始の制御機構
日本分子生物学会 2006 フォーラム(名古屋), 2006.12.8

荒木弘之
CDK-dependent initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast
Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (NY, USA), 2007.9.6

平井和之, 坂本佐知子, 荒木弘之
染色体 DNA の複製開始時に形成されるタンパク質複合体の解析
酵母遺伝学フォーラム第 40 回研究報告会(吹田), 2007.9.12

荒木弘之
真核生物染色体 DNA の複製開始機構
日本遺伝学会第 79 回大会(岡山), 2007.9.19

荒木弘之, 平井和之, 李燕, 坂本佐知子, 梅森稔子, 遠藤静子,
田中誠司
真核生物染色体DNA の複製開始機構
第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会(横浜),
2007.12.14

田中誠司
important for the initiation of DNA replication
2007 年度 DNA 組換え・複製合同ワークショップ(静岡県伊豆市), 2008.3.6

Yan Li
In vitro formation of pre-CMG complex in *Saccharomyces cerevisiae*
2007 年度 DNA 組換え・複製合同ワークショップ(静岡県伊豆市), 2008.3.6

田中太門
出芽酵母における適切な染色体 DNA 複製の開始には Sld7-Sld3 複合体が必要
2007 年度 DNA 組換え・複製合同ワークショップ(静岡県伊豆市), 2008.3.6

平井和之, 村松佐知子, 荒木弘之
染色体 DNA の複製開始期に形成されるタンパク質複合体の解析
日本遺伝学会第 80 回大会(名古屋), 2008.9.4

③ ポスター発表 (国内会議 12 件、国際会議 10 件)

田中尚美, 遠藤静子, 荒木弘之
出芽酵母複製タンパク質 Sld2 を用いたサイクリン依存性キナーゼの基質特異性の解析
第 27 回日本分子生物学会年会(神戸), 2004.12.9

梅森稔子, 平井和之, 坂本佐知子, 上村陽一郎, 荒木弘之
出芽酵母複製タンパク質 Sld3 の機能解析

第 27 回日本分子生物学会年会(神戸), 2004.12.9

田中太門, 荒木弘之

出芽酵母DNA複製開始タンパク質Dpb11の多様な細胞周期機能の解析
酵母遺伝学フォーラム第 38 回研究報告会(千葉県柏市), 2005.9.5

梅森稔子, 平井和之, 上村陽一郎, 荒木弘之

出芽酵母複製タンパク質Sld3のCDKによるリン酸化
第 28 回日本分子生物学会年会(福岡), 2005.12.8

Yan Li, Hiroyuki Araki

Dynamical assembly of chromosomal replication initiation proteins in budding yeast
第 20 回国際生化学・分子生物学会議(京都), 2006.6.23

Yoshimi Yanagisawa, Hiroyuki Araki

Molecular dissection of yeast replication protein Sld2
第 20 回国際生化学・分子生物学会議(京都), 2006.6.23

Yonsoo Tak, Yoshimi Tanaka, Shizuko Endo, Yoichiro Kamimura, Hiroyuki Araki

A novel mechanism of CDK-catalyzed multisite phosphorylation for formation of the
DNA replication complex Sld2-Dpb11
第 20 回国際生化学・分子生物学会議(京都), 2006.6.23

Seiji Tanaka, Hiroyuki Araki

ISOLATION AND ANALYSIS OF THE MUTANT THAT BYPASSES THE CDK
REQUIREMENT IN THE INITIATION OF DNA REPLICATION
第 20 回国際生化学・分子生物学会議(京都), 2006.6.23

Kazuyuki Hirai, Sachiko Sakamoto, Yoichiro Kamimura, Hiroyuki Araki

Pre-Landing Complex: a protein complex produced during the assembly of
chromosomal DNA replication machinery in budding yeast
第 20 回国際生化学・分子生物学会議(京都), 2006.6.23

Seiji Tanaka and Hiroyuki Araki

Isolation and analysis of the mutant that bypasses the CDK requirement in the
initiation of DNA replication
FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES (Indian Wells, CA, USA), 2006.6.27

平井和之, 坂本佐知子, 上村陽一郎, 荒木弘之

染色体 DNA の複製開始期に形成されるタンパク質複合体, Pre-Landing Complex の
解析
第 18 回 DNA 複製・分配ワークショップ(静岡県熱海市), 2006.10.30

梅森稔子, 平井和之, 田中誠司, 上村陽一郎, 荒木弘之

出芽酵母複製タンパク質 Sld3 の Cdk によるリン酸化
第 18 回 DNA 複製・分配ワークショップ(静岡県熱海市), 2006.10.30

Kazuyuki Hirai, Sachiko Sakamoto, Yoichiro Kamimura, Hiroyuki Araki

Pre-Landing Complex: a protein complex produced during the assembly of

chromosomal DNA replication machinery in budding yeast
日本分子生物学会 2006 フォーラム(名古屋), 2006.12.7

李 燕、荒木弘之

The requirement of Sld3 for the assembly of replication initiation proteins onto pre-RC
in budding yeast

Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (NY, USA), 2007.9.6

田中誠司、荒木弘之

Cell cycle specific expression of Sld2 is important for the initiation of DNA

Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (NY, USA), 2007.9.7

田中太門、荒木弘之

The Sld7-Sld3 complex important for chromosomal DNA replication

Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (NY, USA), 2007.9.7

田中誠司、荒木弘之

CELL CYCLE SPECIFIC EXPRESSION OF Sld2 IS IMPORTANT FOR THE
INITIATION OF DNA REPLICATION

酵母遺伝学フォーラム第 40 回研究報告会(吹田), 2007.9.12

平井和之、坂本佐知子、荒木弘之

染色体 DNA の複製開始時に形成されるタンパク質複合体の生化学的解析

第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会(横浜),

2007.12.11

田中誠司、荒木弘之(国立遺伝学研究所、総合研究大学院大学、CREST)

CELL CYCLE SPECIFIC EXPRESSION OF Sld2 IS IMPORTANT FOR THE
INITIATION OF DNA REPLICATION

第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会(横浜),

2007.12.11

Yan Li, Hiroyuki Araki

Requirement of Sld3 protein for the formation of pre-CMG and the assembly to
pre-RC

第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会(横浜),

2007.12.11

K Hirai, S Muramatsu; H Araki

Protein assembly at the initiation step of DNA replication in budding yeast

DNA Replication and Recombination (NM, USA), 2008.2.12

Seiji Tanaka and Hiroyuki Araki

Regulation of the replication protein Sld2 and its role in stable genome maintenance

酵母遺伝学フォーラム第 41 回研究報告会(札幌), 2008.9.10

(3)特許出願

①国内出願 (0件)

②海外出願 (0件)

(4)受賞等

①受賞

②新聞報道

静岡新聞(2006.12.14), Nature 発表内容の掲載

科学新聞(2006.12.14), Nature 発表内容の掲載

日刊工業新聞(2006.12.14), Nature 発表内容の掲載

③その他

(5)その他特記事項

① その他の出版物

Walter, J. C. and Araki, H. (2006)

Activation of pre-replication complexes. In DNA Replication and Human Disease (ed. DePamphilis, M. L.)

Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY., pp. 89-104,

田中誠司、荒木弘之(2007)

CDKによる染色体DNAの複製開始制御機構

実験医学 25、614-620

6.2 大野グループ

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 11 件、国際(欧文)誌 12 件)

国内誌

馬淵直人、大野睦人:RNAの核外輸送と品質管理、実験医学・増刊「細胞内輸送研究の最前線」21:1856-1862 (2003)

片岡直行、大野睦人:RNA 輸送、わかる実験医学シリーズ・細胞内輸送がわかる 31-37 (2003)

大野睦人:核外輸送における RNA の身分証明、蛋白質核酸酵素・増刊「RNA の細胞生物学」48: 414-420 (2003)

増山郁、大野睦人:RNA の輸送・局在、ゲノム医学 Vol.4 45-49 (2004)

増山郁、大野睦人:RNA の核外輸送と運命、実験医学増刊号・躍進する RNA 研究 Vol.22 No.17 90-96 (2004)

片岡直行:mRNA スプライシングー遺伝子発現の中核過程ー、実験医学 vol.23, No. 12:1890-1895 (2005)

片岡直行:RNA スプライシング異常と疾患、遺伝子医学 MOOK 4号「RNAと創薬」(2006)

片岡直行:mRNA スプライシング後のイントロン分解、蛋白質核酸酵素(PNE)・11月号増刊「細胞核の世界」2210-12 (2006)

谷口一郎、大野睦人:RNA 核外輸送の多様性、蛋白質核酸酵素・11月号増刊「細胞核の

世界」Vol.51.2189-2196 (2006)

大野睦人:スプライシング前は核内にとどめおく「mRNA品質管理」のしくみ、Medical Bio 1
月号:12-3 (2008)

福家浩之、大野睦人:アフリカツメガエル卵母細胞を用いた RNA 核外輸送の解析、RNA
実験ノート 上巻「RNA の基本的な取り扱いから解析手法まで」:154-9 (2008)

国際誌

Masuyama, K., Taniguchi, I., Kataoka, N. and Ohno, M. (2004)
RNA length defines RNA export pathway.
Genes Dev. 18, 2074-2085.

Masuyama, K., Taniguchi, I., Kataoka, N. and Ohno, M. (2004)
SR proteins preferentially associate with mRNAs in the nucleus and facilitate their export to
the cytoplasm.
Genes to Cells 9, 959-965.

Nameki, D., Kodama, E., Ikeuchi, M., Mabuchi, N., Otaka, A., Tamamura, H., Ohno, M.,
Fujii, N. and Matsuoka, M. (2005)
Mutations conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitors
are restricted by gp41 and Rev-responsive element functions.
J. Virol. 79, 764-770.

Okuda, J., Toyotome, T., Kataoka, N., Ohno, M., Abe, H., Shimura, Y., Seyedarabi, A.,
Pickersgill, R., Sasakawa, C. (2005.)
Shigella effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF(35) to modulate host immune
responses. Biochemical and Biophysical Research Communications, 333(2):531-539.

Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, K., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M.,
Gideon Dreyfuss, G. and Ohno, S. (2006)
Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exonjunction complex
triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay.
Genes & Development 20 355-367.

Dasso, M., Ohno, M., Pines, J. and Stewart, M. (2006)
Meeting report: International Symposium on "Ran and the Cell Cycle", October 2-5, 2005,
Awaji Yumebutai, Japan.
Traffic. 7(4):474-478.

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. Commun. 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.(2007)
Role of poly (A) tail as an identity element for mRNA nuclear export.
Nucleic Acids Res. 36(3), 1037-49.

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 nucleu.
Mol. Cell. Biol. 28(1), 487-97.

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), 601-8.

Yoshimoto, R., Kataoka, N., Okawa, K. and Ohno, M. (2009)
Isolation and characterization of postslicing lariat-intron complexes
Nucleic Acids Res.

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

④ 招待講演 (国内会議 11 件、国際会議 6 件)

国内会議

大野睦人:核外輸送における RNA の身分証明、理化学研究所 井川特別研究室開設 3
周年記念シンポジウム、東京都、2004 年 4 月

大野睦人:RNA 核外輸送の多様性と制御、第 21 回加藤記念公開シンポジウム、東京都、
2004 年 10 月

大野睦人、増山郁:RNA 核外輸送の多様性とその意味、第 27 回日本分子生物学会年
会、神戸市、2004 年 12 月

大野睦人:RNA 核外輸送の多様性とその制御機構、千里ライフサイエンスシンポジウム
「RNA 機能研究の最先端」、豊中市、2005 年 2 月

大野睦人: RNA 核外輸送における多様性と制御、大阪大学大学院フロンティアバイオサ
イエンスコロキウム生命機能研究科 第 12 回研究交流会、吹田市、2005 年 7 月

片岡直行:mRNA プロセッシングと輸送、インビトロジェン シンポジウム 第2回「バイオサイ
エンスの最先端」、東京都、2005 年 9 月

大野睦人:RNA核外輸送におけるRNA・たんぱく質複合体のリモデリング、2005 年た
んぱく質関連領域合同シンポジウム、大阪市、2005 年 11 月 15 日

大野睦人:RNA の核外輸送と核内保持による遺伝子発現制御、「RNA 多様性と細胞運
命」研究会、名古屋市、2008 年 3 月 24 日

大野睦人:RNAの細胞内分配制御、蛋白質研究所セミナー、大阪市、2008 年 7 月 25 日

大野睦人: Nuclear Retention Mechanisms for Pre-mRNAs, BMB2008、神戸市、2008年12月9～12日

谷口一郎、大野睦人: RNA 核外輸送における HIV-1 タンパク質 Rev の新規機能、BMB2008、神戸市、2008年12月9～12日

国際会議

Ohno, M: RNA length defines RNA export pathways. RNA2003 Kyoto “The New Frontier of RNA Science”. Kyoto, Japan. 2003年11月

Kataoka, N: Analysis of the post-splicing recycling pathway in the nucleus. The 5th Colloquium of JSPS Stockholm Center, “RNA Biology”. Uppsala, Sweden. 2004年6月

Ohno, M: Identity elements in mRNA export. 国際シンポジウム in 淡路「細胞核機能の分子スイッチ Ran と細胞周期」. Awaji, Japan. 2005年10月

Kataoka, N: Analyses of the factors that are involved in the post-splicing recycling pathways. 12th East Asia Symposium—From Molecules to Cells. Shao Xing, China. 2005年11月

Fuke, H., Taniguchi, I., Mausyama, K. and Ohno, M: Identity Elements used in mRNA export. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan. 2006年6月

Ohno, M: Regulations of nucleo-cytoplasmic RNA distribution. NAIST Global COE Symposium on Cell Signaling. Nara, Japan. 2008年11月

⑤ 口頭発表 (国内会議 16 件、国際会議 8 件)

国内会議

片岡直行、大野睦人: スプライシング反応後のイントロン分解経路に関わる因子 hDBR1 の解析、第6回 RNA ミーティング、熊本市、2004年8月

馬淵直人、大野睦人: Rev による HIV-1 RNA 核外輸送複合体のリモデリング、第1回 京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都市、2004年12月

秋山慎太郎、片岡直行、大野睦人: mRNA 核外輸送因子 Aly/REF と UsnRNA 核外輸送因子 PHAX との相互作用、特定領域研究「RNA 情報網」第3回サテライトミーティング、伊賀市、2005年5月

福家浩之、大野睦人: 3' 末端形成は mRNA としての目印を RNA 上に付加する、第28回日本分子生物学会、神戸市、2005年12月

福家浩之、大野睦人: 3' 末端形成は mRNA としての目印を RNA 上に付加する、第2回京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都市、2005年12月

片岡直行、芳本玲、大野睦人: スプライシング反応後の核内イントロン代謝、第6回 細

胞核ダイナミクス研究会、熊本市、2006年5月

谷口一郎、大野睦人：RNA helicase 様タンパク質UAP56 はmRNA 輸送因子REF/ALY をATP依存的にmRNA 上にリクルートする、第8回 RNAミーティング、淡路市、2006年7月18-20日

芳本玲、片岡直行、大野睦人：スプライシング反応後のイントロン-タンパク質複合体の精製、特定領域研究「RNA情報網」第4回 サテライトミーティング、裾野市、2006年9月11-13日

二宮賢介、片岡直行、大野睦人：神経突起中に存在するCBCを含むmRNA複合体の解析、特定領域研究「RNA情報網」第4回 サテライトミーティング、裾野市、2006年9月11-13日

北尾紗織、大野睦人：UsnRNA核外輸送因子PHAXのリン酸化・脱リン酸化による活性制御、第3回 京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都市、2006年12月21日

藤田恵、片岡直行、大野睦人：蛋白質遺伝子のイントロンにコードされるmiRNAの発現機構の解明、第9回 RNAミーティング、名古屋市、2007年7月28-31日

北尾紗織、Alexandra Segref, Juergen Kast, Iain W. Mattaj, 大野睦人：UsnRNA核外輸送因子PHAXのリン酸化・脱リン酸化による活性制御、第9回 RNAミーティング、名古屋市、2007年7月28-31日

谷口一郎、増山郁、大野睦人：mRNA前駆体の核内保持機構におけるexonic splicing enhancerの役割、第9回 RNAミーティング、名古屋市、2007年7月28-31日

二宮賢介、片岡直行、大野睦人：神経細胞の神経突起中におけるmRNA蛋白質複合体(mRNP)の解析、第4回 京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都市、2007年12月20日

大野睦人：核外輸送におけるRNA・たんぱく質複合体の構造と機能、CREST「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」平成15年度採択課題終了シンポジウム、東京都、2008年10月

藤井耕太郎、北畠真、大野睦人：機能不全リボソームの品質管理におけるユビキチンの新機能、第7回 京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都、2008年12月22日

国際会議

Mausyama, K., Taniguchi, I. and Ohno, M: RNA length defines RNA export pathways. The 10th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research. Kyoto, Japan. 2003年11月

Mausyama, K., Taniguchi, I. and Ohno, M: RNA length defines RNA export pathway. Kyoto University 21st Century COE Program, The 3rd International Student Semina. Kyoto, Japan. 2004年11月

Taniguchi, I. and Ohno, M: ATP-dependent recruitment of mRNA export factor

REF/Aly onto mRNAs as mediated by RNA helicase-like protein UAP56. The 4th InteRNAtional Student Semina. Kyoto, Japan. 2006 年 3 月

Fuke,H., Taniguchi, I., Mausyama,K., and Ohno, M: Identity Elements used in mRNA export. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan. June 18-23, 2006.

Mabuchi, N., and Ohno, M:HIV-1 REV SUPPRESSES TAP-DEPENDENT EXPORT OF RRE-CONTAINING RNAs: AN INSIGHT INTO HOW SINGLY SPLICED HIV-1 TRANSCRIPT IS EXPORTED. RNA 2006 Izu “Functional RNAs and Regulatory Machinery”. Izu, Japan. December 3-7,2006.

Taniguchi, I., Masuyama, K. and Ohno, M: Role of Purine-rich Exonic Splicing Enhancers in Nuclear Retention of Pre-mRNAs. The 14th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research. Tokyo, Japan. November 12-14, 2007.

Kitabatake, M., Fujii, K., Sakata, T. and Ohno, M: Selective degradation of non-functional ribosomal particles. The 6th International Student Seminar International Symposium. kyoto, Japan. March 6, 2008.

Fuke, H. and Ohno, M: Role of poly(A) tail as an identity element for mRNA nuclear export. The 6th International Student Seminar International Symposium. kyoto, Japan. March 6, 2008.

⑥ ポスター発表（国内会議 15 件、国際会議 29 件）

国内会議

谷口一郎、増山郁、大野睦人：RNA 核外輸送経路を規定する因子群の同定、第6回 RNA ミーティング、熊本市、2004 年 8 月

福家弘之、大野睦人：転写反応は転写後に RNA が識別される過程にどのように関わっているか、第6回 RNA ミーティング、熊本市、2004 年 8 月

片岡直行、大野睦人：イントロンの脱ブランチ酵素 hDBR1 と相互作用する因子の同定、第 8 回 RNA ミーティング、淡路市、2006 年 7 月

片岡直行、Michael D. Diem、畑井千裕、Gideon Dreyfuss、大野睦人：Drosophila で同定された変異を導入した Y14 と Magoh の生化学的解析、第7回 日本分子生物学会、淡路市、2007 年 4 月

二宮賢介、片岡直行、大野睦人：神経細胞の神経突起中におけるキャップ結合蛋白質の解析、第 30 回 日本分子生物学会年会、横浜市、2007 年 12 月

藤井耕太郎、北畠真、大野睦人：出芽酵母における rRNA の品質管理機構、第 30 回 日本分子生物学会年会、横浜市、2007 年 12 月

北尾紗織、Alexandra Segref, Juergen Kast, Iain W. Mattaj, 大野睦人：UsnRNA 核外輸

送因子 PHAX のリン酸化・脱リン酸化によるコンパートメント特異的な活性制御システム、第 30 回 日本分子生物学会年会、横浜市、2007 年 12 月

谷口一郎、馬淵直人、大野睦人： Role of purine-rich exonic splicing enhancers in nuclear retention of pre-mRNAs、第 21 回 内藤コンファレンス、北杜市、2008 年 6 月 26 日

鈴木達也、谷口一郎、大野睦人： U snRNA 核外輸送における PHAX の新しい機能、第 10 回日本 RNA 学会、札幌市、2008 年 7 月

谷口一郎、馬淵直人、大野睦人： 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、CREST「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」平成15年度採択課題終了シンポジウム、東京都、2008 年 10 月

片岡直行、二宮賢介、大野睦人： 神経突起中での mRNA たんぱく質複合体のリモデリングによる輸送から局在への移行、CREST「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」平成15年度採択課題終了シンポジウム、東京都、2008 年 10 月

マクロースキー亜沙子、大野睦人： 核外輸送において UsnRNA と mRNA を識別する機構、第 31 回日本分子生物学会、神戸、2008 年 12 月 9-12 日

竹村玲子、大野睦人： HeLa 細胞における mRNA 前駆体核内係留因子の探索、第 31 回日本分子生物学会、神戸、2008 年 12 月 9-12 日

坂田知子、北島真、大野睦人： 出芽酵母における機能不全リボソーム蛋白質の選択的分解、第 31 回日本分子生物学会、神戸、2008 年 12 月 9-12 日

竹岩俊彦、谷口一郎、大野睦人： mRNA 前駆体の核内繫留に必要なシス配列の探索、第 31 回日本分子生物学会、神戸、2008 年 12 月 9-12 日

国際会議

Taniguchi, I., Mausyama, K. and Ohno, M: Identification of the factors that define RNA export pathway. RNA2003 Kyoto “The New Frontier of RNA Science”. Kyoto, Japan. 2003 年 11 月

Fuke, H. and Ohno, M: Analysis of nuclear export of RNAs transcribed by different classes of RNA polymerases. RNA2003 Kyoto “The New Frontier of RNA Science”. Kyoto, Japan. 2003 年 11 月

Mausyama, K. and Ohno, M: RNA length determines the RNP.composition of exporting RNAs. RNA2003 Kyoto “The New Frontier of RNA Science”. Kyoto, Japan. 2003 年 11 月

Kataoka, N. and Ohno, M: Isolation of the post-splicing intron-protein complex. RNA2003 Kyoto “The New Frontier of RNA Science”. Kyoto, Japan. 2003 年 11 月

Mausyama, K., Taniguchi, I. and Ohno, M: RNA length defines RNA export pathways. The 10th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research. Kyoto, Japan. 2003 年 11 月

Mausyama, K., Taniguchi, I. and Ohno, M: RNA Length defines RNA export pathway. 国際RNA学会(RNA2004). Madison, Wisconsin. 2004年6月

Yoshimoto, R., Kataoka, N. and Ohno, M: Functional analysis of hPrp43, a DExH/D RNA helicase-like protein that functions in intron metabolism. Kyoto University 21st Century COE Program, The 3rd International Student Semina. Kyoto, Japan. 2004年11月

Taniguchi, I., Mausyama, K. and Ohno, M: SR proteins preferentially associate with mRNAs in the nucleus and facilitate their export to the cytoplasm. Kyoto University 21st Century COE Program, The 3rd International Student Semina. Kyoto, Japan. 2004年11月

Fuke, H. and Ohno, M: Possible involvement of transcription in the discrimination of different RNA species. Kyoto University 21st Century COE Program, The 3rd International Student Semina. Kyoto, Japan. 2004年11月

Mausyama, K., Taniguchi, I. and Ohno, M: RNA length defines RNA export pathway. KYOTO UNIVERSITY-NUS INTERNATIONAL SYMPOSIUM Regulation of cell fate and cell function. Singapore. 2005年1月

Fuke, H. and Ohno, M: Effect of Transcription in the Discrimination of Different RNA Species. 10th Annual Meeting of the RNA Society. Banff, Canada. 2005年5月

Mausyama, K., Taniguchi, I. and Ohno, M: RNA length defines RNA export pathway. Sirokane International Symposium. Tokyo, Japan. 2005年7月

Kataoka, N. and Ohno, M: Analysis of hDBR1 protein that is involved in the post-splicing intron turnover. Eukariotic mRNA Processing, Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA. 2005年8月

McCloskey, A., Kitabatake, M. and Ohno, M: A comprehensive analysis of miRNA expression during human cell cycle progression. The 4th International Student Seminar. Kyoto, Japan. 2006年3月

Hatai, C., Kataoka, N. and Ohno, M: Biochemical analysis of magoh protein: a human homolog of Drosophila mago nashi protein. The 4th International Student Seminar. Kyoto, Japan. 2006年3月

Yoshimoto, R., Kataoka, N. and Ohno, M: Isolation of the post-splicing intron complex. The 4th International Student Seminar. Kyoto, Japan. 2006年3月

Kataoka, N. and Ohno, M: Identification of the factors that interact with hDBR1 protein. RNA 2006 Annual Meeting. Seattle, USA. 2006年6月

McCloskey, A., Kitabatake, M. and Ohno, M: A comprehensive analysis of miRNA expression during human cell cycle progression. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan. 2006年6月

Yoshimoto, R., Kataoka, N. and Ohno, M: Isolation of the post-splicing intron complex. 20th IUBMB InterNAtional Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. kyoto, Japan. 2006 年 6 月

Taniguchi, I. and Ohno, M: ATP-dependent recruitment of mRNA export factor REF/Aly onto mRNAs as mediated by RNA helicase-like protein UAP56. 20th IUBMB InterNAtional Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. kyoto, Japan. 2006 年 6 月

Kitao, S. and Ohno, M: Identity Elements used in mRNA export. 20th IUBMB InterNAtional Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. kyoto, Japan. 2006 年 6 月

Kataoka, N., Yoshimoto, R. and Ohno, M: Isolation of the post-splicing intron RNP complex. RNA 2006 Izu “Functional RNAs and Regulatory Machinery”. Izu, Japan. December 6, 2006.

Fuke, H. and Ohno, M: Identity of mRNA in nuclear export is strongly influenced by its 3' end formation. RNA 2006 Izu “Functional RNAs and Regulatory Machinery”. Izu, Japan. December 6, 2006.

Taniguchi, I. and Ohno, M: ATP-dependent recruitment of mRNA export factor REF/ALY to mRNA as mediated by RNA helicase-like protein UAP56. International Symposium Functional Organization of the Nucleus. Awaji, Japan. January 14, 2007.

Kataoka, N., Yoshimoto, R. and Ohno, M: Isolation of the post-splicing intron RNP complex. International Symposium Functional Organization of the Nucleus. Awaji, Japan. January 14, 2007.

Fujita, M., Kataoka, N. and Ohno, M: Production of microRNAs from introns of protein coding genes. The 5th International Student Seminar. Kyoto, Japan. February 28, 2007.

Yoshimoto, R., Kataoka, N., Ohkawa, K. and Ohno, M: Isolation of the post-splicing intron complex. The 5th International Student Seminar. Kyoto, Japan. February 28, 2007.

Taniguchi, I. and Ohno, M: ATP-dependent recruitment of export factor REF to mRNA by RNA helicase-like protein UAP56. The 5th International Student Seminar. Kyoto, Japan. February 28, 2007.

Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T. and Ohno, M: Quality Control of Ribosomal RNAs in *S.cerevisiae*. The 6th International Student Seminar International Symposium. Kyoto, Japan. March 6, 2008.

(3)特許出願

- ①国内出願 (0 件)
- ②海外出願 (0 件)

(4)受賞等

①受賞 なし

②新聞報道

「Role of purine-rich exonic splicing enhancers in nuclear retention of pre-mRNAs」が Proceeding of the National Academy of Sciences USA (PNAS) に掲載され、日本経済新聞・京都新聞の 8 月 14 日版、日刊工業新聞 8 月 15 日版その他に関連記事が紹介された。

③その他 なし

(5)その他特記事項

なし

§ 7 研究期間中の主な活動

荒木グループ

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2006.7.15～ 2006.7.17	酵母遺伝学フォーラム第 39 回研究報告会	静岡県 三島市	214 名	酵母の遺伝学、分子生物学、細胞生物学の普及発展を目的とした報告会
2008.10.27 ～ 2008.10.30	3R Symposium 2008	静岡県 掛川市	約 200 名	3R(DNA 複製、DNA 修復、組換え)の機構解析の進展と共同研究の促進のため

大野グループ

年月日	名称	場所	参加人数	概要
November 24-27, 2003	RNA 2003 KYOTO “The New Frontier of RNA Science”	Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan	約 380 名	京都で RNA 研究の国際シンポジウムを開催。世話人を務めた。

§ 8 結び

荒木グループ

5 年の歳月は早いもので、このプロジェクトももう終わりに向かっている。当初目標である Sld2 と Dpb11 の結合機構の解析は順調に進んだが、これだけではスイッチとしては不十分であった。その後の、Sld3 を含めたリン酸化を介したスイッチの発見は関連分野に衝撃を与える大発見となった。しかし、この研究の真骨頂は精製タンパク質を用いた分子機構の解明であると考えている。最初の 2 年ぐらいは、ひたすらタンパク質の精製であった。現在でも精製法の改良を試みながら研究を続けている。何とも、やっかいなタンパク質の多いことかと思っただが、何とかそれらのタンパク質を用いた研究もまとまりつつある。これも 5 年間に及ぶ CREST の支援のお陰である。短期間の支援ではなし得なかった結果である。大島先生をはじめ、アドバイザーの先生方、また参事、事務の方々に感謝します。

大野グループ

平成 13 年 6 月に現職に着任して、研究室の立ち上げを開始した。ドイツ EMBL からの着任であったため、ゼロマネー・ゼロピープルであり、本当に Starting from Scratch であった。最初の 2 年が研究室の立ち上げのために矢のように過ぎ去り、それなりに学生も増えてきた頃、研究継続のためには大きな研究費を取る必要をヒシヒシと感じるようになった。ちょうどその頃、平成 15 年後半より、幸運にも CREST の援助を受けることができることになった。CREST の援助なくして私の研究室の現状は考えられず、本当に感謝している。

思えば CREST の 5 年間もあっという間だった。特にオリジナリティーを重視する私の研究スタイルとして、他の誰もやっていないような重要な研究をやりたいと常々考えている。そのような理由もあり、研究テーマは当初の計画よりもかなり広がってしまった。しかし、いくつかの重要な成果は上げられたのではないかと自負している。未だ成果の上がないテーマについても今後のための重要な種蒔きができたのではないかと考えている。基礎をきちんとやってから応用をやるべきであると信じてはいるが、CREST 期間中に応用研究まで行き着けなかったのは非常に残念である。今後、何とかして応用研究にもつなげて行かねばと思っている。

CREST はすばらしいシステムであると思う。応用研究を重視するよう見えるが、実は今まで基礎研究を支えてきたのではないか。基盤研究の援助が貧しい現状を鑑みるに、応用研究につながる基礎研究をサポートする CREST の姿勢が非常に貴重である。CREST たんぱく領域を卒業された優秀な先生方が今の CREST は応募できる領域がないとこぞって言われるのは、JST にとって、日本の科学にとって大きな損失ではないか。JST には大変感謝しているが、応用研究と共に基礎研究を引き続きサポートしていただけるよう切願いたします。

最後になりましたが、領域代表の大島泰郎先生をはじめ、アドバイザーの先生方、五十嵐参事をはじめとする領域事務所の方々に、心からの感謝の意を表したいと存じます。ありがとうございました。