

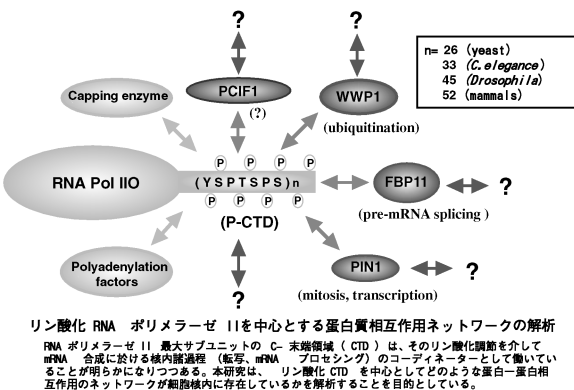
転写とmRNAプロセッシング過程を協調させている核内蛋白質間相互作用ネットワーク

●広瀬 豊

金沢大学がん研究所・細胞情報調節研究分野

〈研究の目的と進め方〉

RNAポリメラーゼII最大サブユニットC-末端領域(CTD)は、リン酸化可能な残基に富む特徴的な7アミノ酸配列(Y-S-P-T-S-P-S)の繰り返しから成り、その繰り返しの数が、生物種のゲノム構造の複雑さに相関して増大する傾向にある興味深い構造をとっている。CTDは、転写中にダイナミックなリン酸化を受けることによって様々なmRNAプロセッシング因子と特異的に相互作用することが近年明らかとなった。真核細胞生物は、細胞周期、外界からのシグナル受容、発生プログラムに従った効率的かつ制御された遺伝子発現を遂行するために、転写とmRNAプロセッシングを協調的に進行させるシステムを必要としており、この協調システムに於いて、CTD及びそのリン酸化が重要な役割を果たしているものと考えられる。本研究は、転写とmRNAプロセッシングの協調機構の分子基盤を明らかにするために、リン酸化CTDを中心とする蛋白質間相互作用ネットワークを解明していくことを目的としている。これまでに、リン酸化CTDをプローブとしたFar-western法を用い、ヒトcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、機能未知の新規核蛋白質PCIF1(Phosphorylated CTD Interacting Factor 1)、細胞周期M期調節ペプチジルイソメラーゼPin1、mRNAスプライシング因子FBP11およびHECTドメインを有する蛋白質ユビキチンリガーゼWWP1の4種類のヒトタンパク質を、リン酸化CTDに結合する候補蛋白質として同定している。本研究において、①同定したこれら候補タンパク質が実際に内在性のリン酸化RNAポリメラーゼIIと結合出来るかを確認するとともに、これらの蛋白質と更に相互作用する因子の検索を、酵母two-hybrid法および生化学的な精製によって行う、②新たなリン酸化CTD結合蛋白質の同定を生化学的な精製によって試みる、といった解析を通じ相互作用ネットワークを明らかにしていく。



〈研究開始時の研究計画〉

〈2000年度-2001年度〉

(1)リン酸化CTD結合蛋白質として新規に同定した核蛋白質PCIF1の、リン酸化CTD結合部位以外の領域と相互作用する新たな蛋白質パートナーを酵母two-hybrid法を用いてcDNAライブラリーからクローニングする。

(2)得られた新たな蛋白質パートナーについて、FLAGタグを付けた蛋白質及びGFPとの融合蛋白質として細胞内で一過性に発現させ、免疫共沈降実験、細胞標識実験によりヒトPCIF1との細胞内会合能を確認する。

(3)細胞内会合が確認された蛋白質パートナーに対して、それらと相互作用する蛋白質の検索をもう一段階行う。得られた蛋白質群に対し、同様に各々のパートナーとの細胞内会合能を確認する。

(4)リン酸化CTD結合蛋白質複合体の精製とその構成蛋白質の同定を以下のような方法を用いて行う。

(i) 組み換えCTDキナーゼP-TEFbを用い、リン酸化GST-CTDを調整する。非リン酸化GST-CTDとリン酸化GST-CTDを各々グルタチオンビーズに結合させた二種類のカラムを作成する。HeLa細胞より調整した核抽出物に対し、GSTのみのカラム、非リン酸化GST-CTDカラム、リン酸化GST-CTDカラムのそれぞれを用いたアフィニティー精製を行い、結合成分を回収する。回収された分画をSDS-PAGE又は2D-gelにより分離し、リン酸化CTDカラム特異的に現れるバンド又はスポットを特定する。同様のアフィニティー精製を、TFII-HまたはMAPキナーゼによってリン酸化したカラムを用いて行う。特定したスポットに対し質量分析による質量タグ法を用いた蛋白質の同定を試みる。

(ii) CTDの7アミノ酸のコンセンサス配列Y-S-P-T-S-P-Sをタンデムに4回繰り返し、N末のアミノ酸をビオチン化した3種類のリン酸化CTDペプチド(1つ目はリン酸化していないもの、2つ目は各繰り返しの2番目のセリンのみがリン酸化したもの、3つ目は各繰り返しの5番目のセリンのみがリン酸化したもの)を合成する。それぞれのペプチドをストレプトアビジンコートした磁気ビーズに結合させたレジンをを用い、HeLa核抽出物に対しアフィニティー精製を行い、部位特異的なリン酸化CTDペプチドに結合する蛋白質複合体の同定を試みる。

〈研究期間の成果〉

(1)ヒトPCIF1タンパク質のリン酸化CTD結合部位以外の領域と相互作用する蛋白質パートナーを、酵母two-hybrid法によってヒトcDNAライブラリーをスクリーニングし候補クローンを得た。

(2)(1)で得られたヒトPCIF1相互作用候補因子について、FLAGタグまたはSタグを付加したタンパク質としてヒト培養細胞内で一過性に発現させ、免疫共沈降実験によってヒトPCIF1と細胞内で会合しているかを検討したが、いずれの候補因子についてもポジティブな結果は得られなかった。

(3)(2)での確認が前提となっているため遂行出来なかった。

(4)組み換え精製CTDキナーゼの調整およびキナーゼ反応の条件を検討した。またHeLa核抽出物を用いてリン酸化したGST-CTDと非リン酸化GST-CTDを各々グルタチオンビーズに結合させた二種類のカラムを作成した。しかし本研究と平行して米国のグループが本研究と同様の

方法による研究結果を報告した(Greenleaf A.L. Cold Spring Harbor meeting Sept. 13-17, (2000), Carty et al. Mol.Cell.Proteomics 1, 598 (2002))。一方リン酸化CTDペプチドの合成が予想以上に困難であることが判明した。これらのため当初の計画を変更し、これまでに同定したタンパク質(および類似タンパク質ファミリー)とリン酸化CTDとの結合能および機能について以下のような詳細な解析を行った。

(5) PCIF1、Pin1、FBP11およびWWP1の4種類のヒトタンパク質は、これらの蛋白質中に共通して存在しているWWドメインを介してリン酸化CTDと特異的に結合する。さらに様々な蛋白質が持つWWドメインを収集し、CTDに対する結合能を検討したところ、リン酸化型又は非リン酸化型のCTDに対する結合能の違いに従ってWWドメインが5種類のグループに分けられることを見いだした。

(6) ヒトPCIF1が、免疫共沈降法、免疫細胞組織化学的解析から内在性リン酸化RNAポリメラーゼと細胞内で会合していることを示した(Fan,H.et al., BBRC,301,378,(2003))。

(7) Pin1ノックアウトマウスMEFを用いた解析などから、ヒトPin1が細胞周期M期におけるRNAポリメラーゼIIの活性を負に制御していることを示唆する結果を米国のグループと共同で得た(Xu,Y-H.et al., Genes&Dev.17,2765 (2003))。

(8) PCIF1、Pin1、転写コアクチベーターYAP、およびFBP11が有するWWドメインと相互作用する細胞因子を検索するため、WWドメインにGSTを融合させたタンパク質を調製し、GST pull-down法によりHeLa細胞の全細胞抽出液よりWWドメイン結合タンパク質の濃縮を行い候補ポリペプチドを検出した。またNocodazoleで24時間処理したHeLa細胞と未処理の細胞の全細胞抽出液を出発材料として、GST pull-down法によって結合タンパク質を部分精製し、銀染色およびウェスタンブロットによって検出をおこなった。抗リン酸化Ser/Thr-Pro基質抗体(MPM2)によってウェスタンブロットを行ったところ、Nocodazoleを処理した細胞特異的に、PCIF1、Pin1のWWドメインによって濃縮されるバンドが検出された。さらに特異抗体を用いたウェスタンブロットを行い、ターゲットタンパク質の候補のいくつかを同定した。

(9) CTD 7アミノ酸配列中、2番目(Ser2)及び5番目(Ser5)のセリン残基が細胞内に於ける主要なリン酸化部位であり、各々のセリンのリン酸化が、各々特異的な細胞機能と相関していることが近年報告されて来ているので、PCIF1及びPin1のWWドメインが、CTD 7アミノ酸配列中Ser2又はSer5どちらか一方のリン酸化を区別して認識出来るかを検討した。PCIF1のWWドメインは、Ser5リン酸化CTDペプチドに対しSer2リン酸化ペプチドに対してよりもより強いアフィニティーを示し、一方Pin1のWWドメインは、両方のリン酸化ペプチドに対しほぼ同等のアフィニティーを示した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

(1) これまでmRNA 5'末端キャッピング酵素やポリ(A)付加因子が直接リン酸化CTDに結合出来ることが報告されているが、より複雑な系であるスプライシング複合体とリン酸化CTDとの相互作用がどのような蛋白質によって仲介されているのかは明らかになっていなかった。またリン酸化を受けたRNAポリメラーゼが選択的にユビキチン化を受けることや、リン酸化RNAポリメラーゼがスプライシング因子群と転写部位以外の場所に共に

局在していることが報告されており、RNAポリメラーゼ「がリン酸化CTDと相互作用する未知の因子を通じ、様々な細胞機能を発揮しているのではないかと予想されている。本研究は、こうした問題を解明するために重要な情報を提供するものと思われる。一方本研究と類似のアプローチによって、米国のグループから本研究で得られたFBP11の酵母オルソログ(Prp40)がリン酸化CTD結合する新規因子として我々に先行して報告された(Morris et al. JBC 275, 39935 (2000))。

(2) CTD 7アミノ酸配列中Ser2およびSer5のリン酸化が、各々特異的な細胞機能と相関していることが近年報告されて来ているので、PCIF1がリン酸化Ser5-CTD配列に特異的に結合することから、Ser5のリン酸化に関連した現象に関わっていることが予想される。このような特異性をもった蛋白質ドメインはこれまでに報告が無く新規のものである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

GST融合リン酸化CTDアフィニティーカラムおよびリン酸化CTDペプチドアフィニティーカラムを用いたリン酸化CTD結合蛋白質複合体の生化学的な精製とその構成蛋白質の同定を期間内に行うことが出来なかった。リン酸化CTDペプチドの合成が予想以上にむずかしくかつ非常に高価であるため独自に準備することが出来なかったこと、および米国のグループが本研究と同様の方法による研究結果(Greenleaf A.L. Cold Spring Harbor meeting Sept. 13-17, (2000), Carty et al. Mol.Cell.Proteomics 1, 598 (2002))を報告したことが主な理由である。

〈今後の課題〉

(1) CTDの7アミノ酸配列をタンデムに4回繰り返した28merのリン酸化ペプチドを海外共同研究者からの供与によって入手したので、今後これを用いて部位特異的なリン酸化を受けたCTDペプチドに結合する蛋白質複合体の精製と同定を試みたい。

(2) PCIF1、Pin1、WWP1およびFBP11のそれぞれのC-末端側にダブルタンデムアフィニティー精製タグを融合させた蛋白質を発現誘導できるヒト安定細胞株をそれぞれ樹立する。これらの細胞の核抽出物よりそれぞれの因子を含む細胞内複合体をダブルタンデムアフィニティークロマトグラフによって精製し、質量分析を利用しそれらの構成成分の同定を試みる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. Fan, H., Sakuraba, K., Komuro, A., Kato, S., Harada, F. and Hirose, Y. " PCIF1, a novel human WW domain-containing protein, interacts with the phosphorylated RNA polymerase II. " Biochem. Biophys. Res. Commun. 301, 378-385 (2003)

2. Xu Y-X., Hirose Y., Zhou X.Z., Lu K.P. and Manley. J.L. "Pin1 modulates the structure and function of human RNA polymerase II." Genes & Dev. 17, 2765-2776 (2003)

3) 特許

1. WWドメインを有するヒト核蛋白質とそれをコードするcDNA 特許第3593482号