

氏名	さわ 澤	ひとし 斉
学位の種類	理 学 博 士	
学位記番号	理 博 第 1321 号	
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 23 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当	
研究科・専攻	理学研究科生物物理学専攻	
学位論文題目	<i>in vitro</i> 系を用いた mRNA スプライシング反応機構の研究	

(主 査)
論文調査委員 教授 志村 令郎 教授 高浪 満 教授 柳田 充弘

論 文 内 容 の 要 旨

申請論文は、人工的に合成した mRNA 前駆体と HeLa 細胞の核抽出液を用いた、*in vitro* スプライシング系を用いて mRNA スプライシング反応機構を研究したものである。スプライシング反応は、mRNA 前駆体上に数多くの因子が集合してスプライソームと呼ばれる複合体が形成された後、第一段階、第二段階の二つの反応を経て起こることが知られている。このうち第二段階の反応機構を解明するために、熱処理した核抽出液を用いてスプライシング反応を第一段階で停止させ、その後の第二段階の反応を同調的に行わせて、この反応を特異的に解析する実験系を開発し、第二段階の反応機構を解析した。その結果、第二段階の反応に、スプライソームに加えて、ATP と 2 種のタンパク因子が必要であることを明らかにした。また、mRNA 前駆体をアガロースビーズ上に固定化する実験系を開発し、これらの因子のスプライソームへの作用機序等を解析した。そして、第二段階の反応が次のような二つの過程に分けられることが明らかになった。まず、熱処理した核抽出液の存在下で形成されるスプライソーム（スプライソーム IIa）に 2 種のタンパク因子が作用し、スプライソーム IIb が形成される。そして、第二段階の反応は、スプライソーム IIb から、ATP のみが存在すれば進行する。さらに、スプライシング反応の進行に伴うスプライソームの構造変化を、3' スプライス部位に着目し、この領域に相補的な合成 DNA の存在下での RNaseH に対する感受性を指標にして解析した。その結果、第一段階の反応前のスプライソームでは、3' スプライス部位領域は、RNaseH に対して耐性であるが、第一段階の反応後のスプライソーム IIa では RNaseH に対して感受性となることが明らかになった。さらに、スプライソーム IIb では、3' スプライス部位領域には、おそらく何らかの因子が結合し、RNaseH に対して再び耐性になることがわかった。このことは、スプライシング反応過程で、スプライソームのコンフォメーションが変化していることを示している。

さらに、スプライシング反応に必須の因子である snRNA が、反応中にどのように mRNA 前駆体と相互作用するのかを、UV クロスリンク法を用いて解析した。その結果、mRNA 前駆体と相互作用するこ

とが既に報告されている U1 snRNA と U2 snRNA に加えて、U6 snRNA が mRNA 前駆体に直接アソシエートしていることを発見した。そして、mRNA 前駆体と U6 snRNA の双方について、互いに相互作用する部位を限定することに成功し、U6 snRNA が mRNA 前駆体の 5' スプライス部位の近傍にアソシエートしていることを明らかにした。最近、いくつかの間接的な理由から、U6 snRNA がスプライシング反応を触媒するという仮説が提唱されており、本研究の結果は、この仮説に対して最初の有力な実験的証拠を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

近年、*in vitro* 反応系を用いた研究により、真核生物の mRNA 前駆体のスプライシング反応機構の理解が急速に深められてきた。スプライシング反応には、5 種類の核内低分子 RNA (snRNA)・タンパク質複合体などの数多くの因子が mRNA 前駆体上に集合してスプライスソームと呼ばれる巨大な複合体が形成された後、第一段階、第二段階の二段階の反応を経てイントロンは除去される。これらの過程のうち、スプライスソームが形成される過程については、そこに関与する因子など徐々に解明されつつあるが、スプライスソームが形成された後、要求される因子や、スプライスソーム内でスプライシング反応を触媒する因子などについては、未だ明らかにされていない。

申請者は、人工的な mRNA 前駆体と HeLa 細胞の核抽出液を用いた *in vitro* スプライシング反応系の他に、mRNA 前駆体をアガロースビーズ上に固定化する新たな反応系を開発し、スプライスソーム形成後の反応機構、特に、第二段階の反応機構について詳細に解析した。その結果、第二段階の反応には、少なくとも 2 種類のタンパク因子と ATP が必要であり、タンパク因子と ATP とが経時的かつ連続的にスプライスソームに作用して第二段階の反応が起こることを明らかにした。さらに、スプライシング反応過程で、mRNA 前駆体の 3' スプライス部位領域とスプライスソームの構成因子との相互作用が変化することを発見した。この結果は、スプライスソームが一旦形成された後も、反応過程で数回のコンフォメーションの変化を起こすことを意味しておりスプライスソームが動的な複合体であることを示すものである。

また、スプライスソームを構成する数多くの因子の中でスプライシング反応を触媒する因子の実体が何であるかは、この分野の最大の関心事の一つであるにも拘わらず、これまで全く明らかにされていない。最近、いくつかの間接的な理由から、反応に関与する 5 種類の snRNA のうち U6 snRNA がその有力な候補であることが指摘されている。申請者は、もしも U6 snRNA がスプライシング反応を触媒するのであれば、この snRNA は、mRNA 前駆体上のスプライシング反応が起こる部位に近接し、この部位と直接相互作用するはずであると考え、UV クロスリンク法を用いて解析した。その結果、U6 snRNA がスプライシング反応過程で mRNA 前駆体に直接アソシエートしていることを発見した。さらに、mRNA 前駆体と U6 snRNA が相互作用している塩基配列上の部位について、種々の領域に相補的なオリゴデオキシヌクレオチドによる部分二重鎖形成後、その領域をリボヌクレアーゼ H によって分解する手法を用いて解析した。その結果、U6 snRNA がスプライスソーム内で mRNA 前駆体の 5' スプライス部位に近接していることを明らかにした。この発見は、U6 snRNA がスプライシング反応を触媒するという仮説を支持する最初の実験的事実であり、高く評価される。これらの研究は、申請者の分子生物学に対する深い

知識と卓越した研究能力によってはじめて可能であることは明らかである。よって申請論文は理学博士の学位を授与する十分な内容をもつものと判断される。

なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。