

新 制
理
908
京大附図

学位申請論文

片岡 直行

キャップ構造と核内キャップ構造認識因子
に関する研究

片岡 直行

目次

論文要旨	3
第一章 序論	5
第一部 メッセンジャーRNA(mRNA)スプライシングと それに関与する因子群	6
第一節 mRNAスプライシング	6
第二節 mRNA前駆体上のスプライシングシグナルーシス配列ー	8
1) スプライス部位配列とブランチ部位配列	
2) キャップ構造とポリ(A)配列	
3) エキソン認識配列	
第三節 mRNAスプライシングに関与する因子ートランス因子ー	13
1) U snRNP	
2) 非snRNPタンパク質因子	
I) SRタンパク質群	
II) hnRNPタンパク質	
III) PRPタンパク質群	
第二部 mRNAスプライシングの反応機構	25
第一節 スプライスソームの構築と反応ースプライシング反応の場合ー	25
第二節 選択的スプライシング (Alternative Splicing)	34
第三節 mRNAの核外輸送 (mRNA export)	38
1) 輸送と酵母の突然変異体	
2) 輸送と核孔複合体	
3) 輸送とスプライシング	
4) 輸送とキャップ構造	
第四節 本研究の背景	42
第二章 材料と方法	43
第三章 結果	49
第一部 <i>in vitro</i> スプライシング反応におけるキャップ構造の スプライシング反応促進効果	49
第一節 単一のイントロンを持つmRNA前駆体の <i>in vitro</i> スプライシング 反応におけるキャップ構造の効果	
第二節 二つのイントロンを持つmRNA前駆体の <i>in vitro</i> スプライシング 反応におけるキャップ構造の効果	

第二部 核内キャップ構造結合タンパク質 (NCBP)	63
第一節 核抽出液の処理とキャップ構造結合活性	
第二節 核内キャップ構造結合タンパク質のcDNAクローニング	
第三節 NCBPの細胞内局在とそのシグナル	
第四節 NCBPと相互作用する因子の同定	
第五節 クローン同士の相互作用	
第四章 考察	94
第一節 キャップ構造によるスプライシング促進効果	94
1) キャップ構造によるスプライスソーム形成の促進	
2) キャップ構造のスプライスソーム形成後の過程への関与	
第二節 核内キャップ構造結合タンパク質 (NCBP)	97
1) NCBPの一次構造と細胞内局在	
2) NCBPと相互作用する因子	
第三節 核内キャップ構造結合複合体	100
第四節 キャップ構造によるスプライシング反応促進機構	101
第五節 キャップ構造によるスプライシング反応促進効果の 限定性	104
第六節 今後の課題	107
1) タンパク質間の相互作用—Two-Hybrid Systemの問題点など—	
2) キャップ構造とmRNAの核外への輸送	
謝辞	110
引用文献	112

論文要旨

真核生物のmRNA前駆体の5'末端には、m⁷GpppNmpNで表わされる、キャップ構造と呼ばれる特異な構造が存在する。このキャップ構造は、mRNA前駆体を安定化させるという役割りの他に、それに最も近いイントロンのスプライシングを促進することが明らかになっていた。そこで、スプライシング反応を三つの過程に分けることのできる*in vitro*スプライシング反応系を用いて、このキャップ構造による促進効果が、スプライシング反応のどの過程に見られるかを解析した。まず、単一のイントロンを持つmRNA前駆体を用いて解析を行ったところ、キャップ構造による促進効果は、スプライシング反応の最も初期の過程であるスプライスソーム形成までにみられることがわかった。次に二つのイントロンを持つmRNA前駆体を用いて同様の実験を行ったところ、キャップ構造による促進効果は、上流側のイントロンにおいてのみみられ、少なくとも第一段階の反応の過程までにみられることが明らかになった。また、このとき、二つのイントロンにおいてスプライスソームは独立に形成されることが示唆され、二つのイントロンを持つmRNA前駆体の場合も、スプライスソーム形成の過程までにみられることが考えられた。

さらに、前述のようなキャップ構造によるスプライシング促進効果を担う因子の候補として、HeLa細胞核抽出液中に分子量80キロダルトンのキャップ構造結合タンパク質を同定し、ほぼhomogeneityにまで精製した。単離したこの核内キャップ構造結合タンパク質 (Nuclear Cap Binding Protein, NCBP) のcDNAから予想されるアミノ酸配列は、酵母 *S.cerevisiae* のGCR3という、解糖系の遺伝子の発現に必須な遺伝子の産物にわずかな相同性がみられた。NCBPIはキャップ構造による促進効果を担う因子の候補であるので、その細胞内局在性を、エピトープタグging法を用いて調べた。その結果、エピトープを付けたNCBPIはHeLa細胞内で核質に存在すること、また、その核局在シグナルは、N末端の70アミノ酸の領域に存在することが明らかになった。さらに、NCBPと相互作用す

る細胞内の因子を同定することがNCBPの機能を知るうえで重要であると考え、酵母 Two-Hybrid Systemを用いたInteraction Cloningを行った。その結果、三つのクローン（#30、37、69）が単離された。#37は分子量約17キログルトンのRNA結合タンパク質をコードしていた。さらに、NCBPと#37を発現させた酵母の細胞抽出液を用いたゲル移動度シフト法から、キャップ構造への結合にはこの二つのタンパク質が必要であることが示された。また、#30はATP結合モチーフを持ったRNA結合タンパク質をコードしており、#69はアルギニンとグルタミン酸が連続する特徴的な配列を持っていた。これらのことから、細胞質の場合と同様に、核内においてもキャップ構造結合複合体が存在し、スプライシングやmRNAの核外輸送などの核内での現象に関与する可能性が考えられた。

第一章 序論

はじめに

生物の根幹を成すものの一つに遺伝物質、すなわち核酸が挙げられる。生物はこの遺伝物質から情報を発現させ、その個体を形作り、生き、子孫に情報を伝えていく。この遺伝情報の発現は、通常セントラルドグマと呼ばれる道筋にしたがって起こる。遺伝物質であるDNAがまずRNAに転写され、そのRNAを鋳型としてタンパク質が合成される。この一連の流れを初めて知ったとき、生物はなんと複雑なことをしているのだろうと思うと同時に、途中の過程にある”運び屋”のRNAに興味を覚えた。遺伝物質の中核として脚光を浴びるDNA。また、直接の働き手であるタンパク質。これらについてはいろいろ知られていたがRNAについてはほとんど教わる機会がなかった。しかし、間にある情報の”運び屋”がなければ、生命は成り立たない。筆者はRNA、それも情報を抱えこんでいるmRNAに興味を持った。そして、その後DNAはまずmRNA前駆体に転写され、キャップ構造とポリ(A)配列の付加、イントロンの除去というプロセッシングを受けてからようやく核外に輸送され、mRNAとして働くことを学んだ。生物はなぜこんな面倒なことをするのだろうか、この複雑な過程を正確に行う機構はどんなものなのか、など、劇的に変化するRNAという分子に対してますます興味が深まった。そこで、RNAのスプライシングおよび輸送について概説することで本研究の位置づけと意義を明確にしたい。

第一部 メッセンジャーRNA (mRNA) スプライシングとそれに関与する因子群

第一節 mRNAスプライシング

真核生物の核にコードされるタンパク質の遺伝子の多くは、イントロンと呼ばれる介在配列によって分断化されている。これらの遺伝子はまずmRNA前駆体として転写される。その後、5'末端には、キャップ構造と呼ばれる、 $m^7GpppNpmN$ で表される特異な構造が付加される。また、3'末端の特定の部位でRNA鎖の切断が起こり、ポリ(A)配列と呼ばれる、アデノシンが通常200塩基程度つながったものが付加される。そして、RNA分子のもっとも劇的な変化として、RNA分子中からイントロンが除去されてエキソン同士が連結されるという変化が起こる。この現象はmRNAスプライシングと呼ばれ、遺伝子の発現には必須な過程である。スプライシング反応は遺伝子の種類によっていくつかに分類できる。まず、トランスファーRNA (tRNA) 前駆体のスプライシングの場合は、HeLa細胞と酵母では若干の反応様式の違いはあるものの、エンドヌクラーゼとリガーゼという二つの酵素によって触媒される反応であることが明らかになっている (総説 Krainer and Maniatis 1988)。また、ミトコンドリアや葉緑体の遺伝子の中には、イントロンを含むものが多い。そしてそのうちのいくつかは、その保存配列や二次構造から、グループIイントロン及びグループIIイントロンと呼ばれている (総説 Cech 1992)。グループIイントロンは、テトラヒメナのリボソームRNA (rRNA) 前駆体のイントロンに見られる保存配列や二次構造を持っている。テトラヒメナのrRNA前駆体のイントロンは、タンパク質因子の関与なしに、イントロン自身の触媒活性によって除去されるセルフスプライシングを行うことが知られているが (Cech 1992)、グループIイントロンのうちのいくつかについても、セルフスプライシングを行うことが報告されている (Cech 1992)。グループIイントロンのセルフスプライシング反応では、まず補助因子であるグアノシンが5'スプライス部位に働きかけて切断し、グアノシン自身はイントロンの5'末端に連結される。次に5'エキソンの3'-OH基が3'スプライス部位に働きかけて切断し、

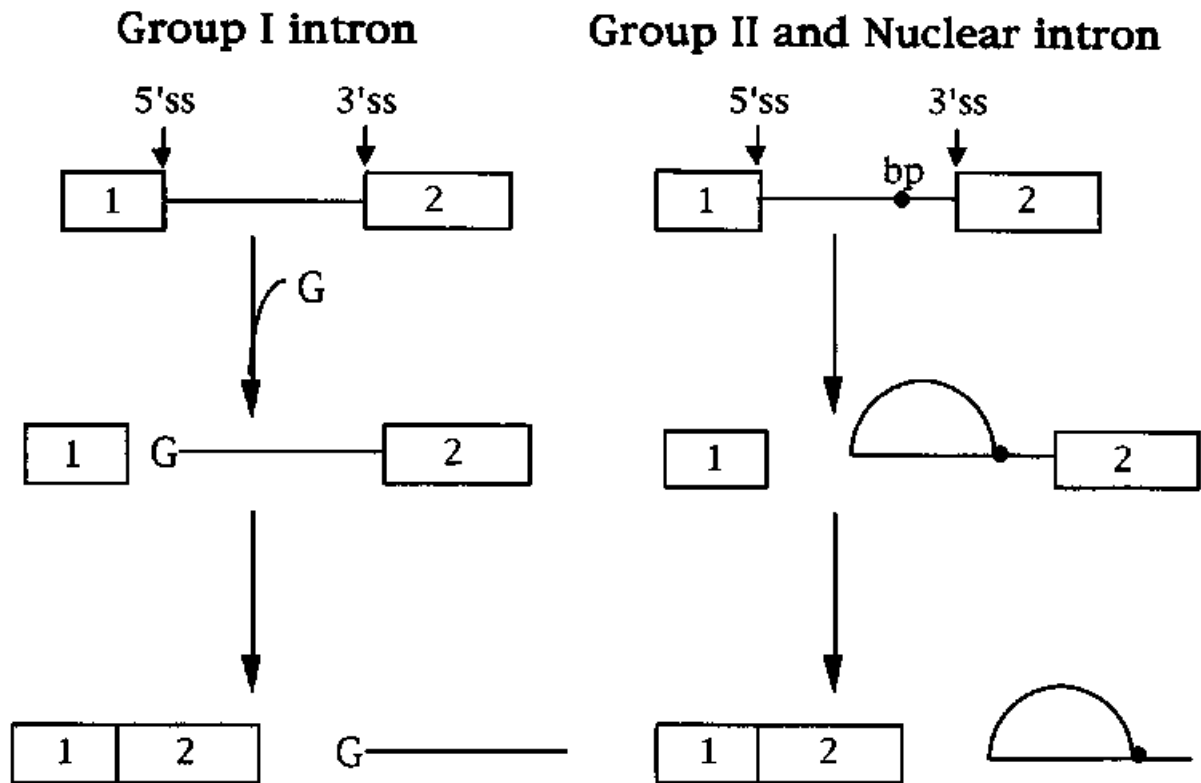


図1 グループIイントロン、グループIIイントロンと核型イントロンのスプライシング様式

各イントロンのスプライシング様式を模式的に示した。エクソンを箱で、イントロンを直線で示した。mRNA前駆体の左側が5'末端である（以後の図も同様）。グループIイントロンでの補助因子グアノシンをGで示した。図中の略号は以下の通りである。5'ss: 5'スプライス部位、3'ss: 3'部位スプライス部位、bp: ブランチ部位

二つのエクソンが連結される（図1）。グループIIイントロンはグループIイントロンとは異なった保存配列と二次構造を持っている（Cech 1992）。そして、グループIIイントロンのいくつかもセルフスプライシングを行うことが知られているがその反応様式はグループIとは異なっている。まず第一段階の反応として、5'スプライス部位が切断され、同時にイントロンの5'末端が、3'スプライス部位の上流に位置するブランチ部位へ2'-5'ホスホジエステル結合で結合する。この反応の結果、5'エクソンRNAと、ラリアット（投げ縄）構造を持つRNA（ラリアット型反応中間体）が産生される。その後第二段階の反応として、3'スプライス部位での切断とエクソン同士の連結が起こり、mRNAとラリアット型イントロンが産生される（図1）。

真核生物の核にコードされているタンパク質遺伝子中に存在するイントロン（以下核型イントロンと呼ぶ）のスプライシング様式は、基本的にはグループIIイントロンの場合と同じ二段階のエステル交換反応である（図1）。しかし、グループIIイントロンのいくつかは他の因子の関与なしにセルフスプライシングを行うことが報告されているのに対し、核型イントロンの場合は、mRNA前駆体の他に、U snRNP（U-rich small nuclear ribonucleoprotein particle）を初めとして多くの因子の関与を必要とする（総説Green 1991、Moore et al. 1992）。そして反応を触媒する因子など、その反応機構は未だ明らかになっていない部分が多い。以後核型イントロンのスプライシングとmRNA輸送について述べていくことにする。

第二節 mRNA前駆体上のスプライシングシグナルーシス配列ー

1) スプライス部位配列とブランチ部位配列

真核生物の遺伝子配列の解析が進むにつれて、エクソンとイントロンの境界にはある保存配列が存在することが明らかになってきた。すなわち、5'スプライス部位には、AG/GTPuAGTという配列が（RNA上ではTではなくUである）、3'スプライス部位には(Py)nNCAG/Gという配列が存在する（図2、Puはプリン残基を、Pyはピリミジン残基

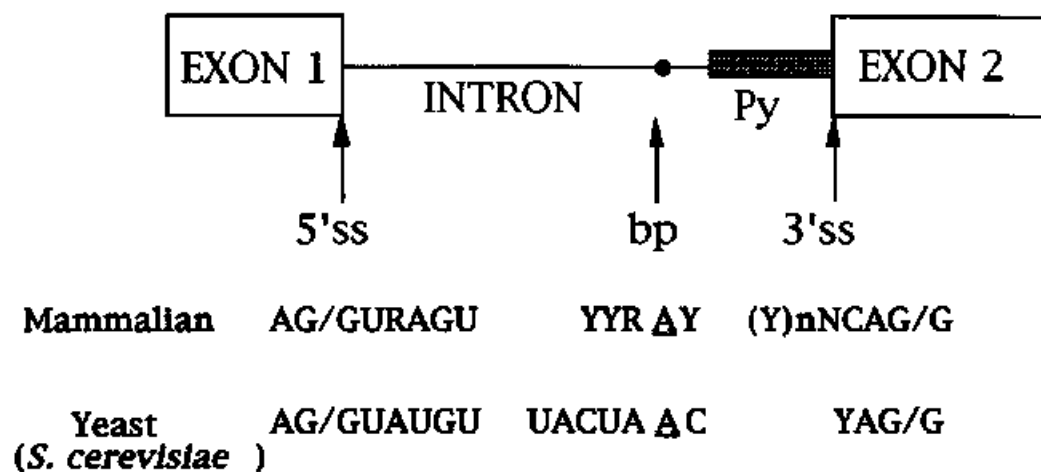


図2 mRNA前駆体上のスプライシングシグナル配列

哺乳動物と出芽酵母における保存配列を示した。図中の略号は以下の通りである。5'ss: 5'スプライス部位、3'ss: 3'部位スプライス部位、bp: ブランチ部位、Py: ピリミジンクラスター、R: プリン、Y: ピリミジン、N: 全塩基

を、また/はエキソンとイントロンの境界を示す)。3'スプライス部位のピリミジン残基の連続はイントロンごとに長さが異なっており、ピリミジンクラスターと呼ばれている。下線を引いたGTとAGはほぼ100%保存されており、GT-AG則と呼ばれている (Breathnach et al. 1978)。哺乳動物においてはこの部分以外はそれほど保存されているわけではないが、この保存配列に近いほどスプライス部位として認識されやすいと考えられる。ヒトの遺伝病である β -サラセミアのいくつかについては、 β -グロビン遺伝子の5'または3'のスプライス部位の配列に点突然変異がおこり、スプライシング以上が起るため正常なタンパク質ができないことによることが報告されている (Fukumaki et al. 1982、Treisman et al. 1983)。このことから、これらの保存配列は実際に生体内でスプライシングシグナルとして働いていることが明らかになった。また変異導入実験やスプライシング因子結合実験から実際にこれらの保存配列がスプライシングに重要であることが示されている (後述)。

*in vitro*スプライシング反応系を用いた解析から、スプライシング反応は前述の通り二段階の反応から成り立つことが明らかになった (図1)。この過程で、イントロンはラリアット構造を形成するが、このホスホジエステル結合を作る部位の配列はブランチ部位と呼ばれており、通常アデノシン残基が用いられる。酵母ではこの配列は厳密に保存されており、UACUAACという保存配列 (UACUAACボックス) となっている。また哺乳動物ではYYRAYというあまり保存されていない配列となっている。酵母ではUACUAACボックスに変異を導入するとスプライシングが起らなくなることが知られている (Langford et al. 1984) のに対し、哺乳動物ではブランチ部位に変異を導入してもその近傍のアデノシンが選ばれてスプライシングが起ることが報告されている (Ruskin et al. 1985、Rautmann and Breathnach 1985)。酵母にはピリミジンクラスターが存在しないことから、酵母と哺乳動物ではブランチ部位を含む3'スプライス部位の認識機構に何らかの違いがあると考えられる。

2) キャップ構造とポリ(A)配列

細胞内のmRNA前駆体の多くは、5'末端にはキャップ構造を、3'末端にはポリ(A)配列を持っている。これら二つの構造もスプライシングに関与しているかどうか解析されてきた。キャップ構造については、mRNA前駆体をエキソヌクレアーゼから保護して安定化させるということが知られていた。この他に、スプライシング反応そのものには必須ではないが、スプライシング反応を3-4倍促進することが報告されていた (Kraimer et al. 1984)。しかし、その効果を安定性と切り離すことができていなかったため、スプライシングに積極的に関与しているかどうかは明らかにされていなかった。それはキャップ構造を持たないmRNA前駆体が速やかに分解を受けるためであるが、通常のも⁷GpppNというキャップ構造の代わりにApppNという偽キャップ構造を付加することにより解決された (Inoue et al. 1989)。すなわち、偽キャップ構造はmRNA前駆体を安定化するものの、キャップ構造としては認識されない。このキャップ構造を用いて、キャップ構造がそれに最も近い、すなわちすぐ下流のイントロンのスプライシングを促進することが *in vitro* 反応系とアフリカツメガエル卵母細胞核への微量注入実験系の両方で明らかにされた (Ohno et al. 1987, Inoue et al. 1989)。

ポリ(A)配列についても、mRNA前駆体の安定化に関与することが考えられていたが、スプライシング反応はポリ(A)配列の有無で差がなかったため、スプライシングには関係がないと結論されていた。しかし、最近、ポリ(A)配列そのものではなく、ポリ(A)配列を付加するシグナル (AAUAAA) が重要だという報告が成された (Niwa and Berget 1991)。この配列がその上流のイントロンのスプライシングを促進する効果を持つことが示されたのである。彼らは、この配列周辺に複合体が形成されることが、最後の3'スプライス部位の決定に関与しているというモデルを提唱しており、そのモデルにおいてキャップ構造も同様に最初の5'スプライス部位の決定に関与していると考えている (Niwa and Berget 1991)。

3) エキソン認識配列

近年、エキソン内部の配列がスプライシングに影響を与える例がいくつか報告され、

Gene(exon)	Sequence
IgM(exonM2) ¹	GGAAGGACAGCAGAGACCAAGAG
ASLV(env3'exon) ²	CTCCAAGAAGAAGCCGCCAGCAACAAGCAAGAAGGA
cTNT(exon5) ³	AAGAGGAAGAATGGCTTGAGGAAGACGACG
hprt(exon3) ⁴	GAGATGTGATGAAGGAGATGGGAGG
BGH(exon5) ⁵	TCTCCTGCTTCCGGAAGGAC

1. Watakabe et al. 1993

4. Steingrimsdottir et al. 1992

2. Fu et al. 1991

5. Hampson et al. 1989

3. Cooper 1992

表1 スプライシングに影響を与えるエクソン配列

エクソン配列中に突然変異が入るとその上流のスプライシングが起こらなくなったり、エクソンが跳ばされたりすることが報告されているものを示した。また、それぞれの参考文献を下に示した。図中の遺伝子の略号は以下のとおりである。IgM: 免疫グロブリン μ 鎖遺伝子、ASLV: ニワトリ白血病ウイルス、cTNT: 心筋トロポニンT、hprt: ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、BGH: ウシ成長ホルモン

そのうちのいくつかは、同定された配列がプリン残基に富んだ配列であることが明らかになっている（表1）。これらのエキソン配列は、エキソン認識に重要であると考えられ、エキソン認識配列（Exon Recognition Sequence、ERS）と呼ばれている（Watakabe et al. 1993）。またこの配列はその上流のイントロンのスプライシングを促進するため、エキソン内スプライシングエンハンサー（Exonic Splicing Enhancer、ESE）とも呼ばれている（Xu et al. 1993）。人工的な合成配列を用いた実験から、プリンに富むというだけでなく、ある繰り返し単位の場合に強くスプライシングを促進することも報告されている（Tanaka et al. 1993）。これらの配列がどの様にしてスプライシングを促進しているのかについては徐々に明らかになりつつある。ウシ成長ホルモンの遺伝子の第五エキソン中にプリンに富む配列があり、この配列がその上流のイントロンのスプライシングが効率よく起こるために必要であることが報告されていたが（Hampson et al. 1989）、*in vitro*において、この配列にスプライシング因子であるSF2/ASF（後述）が結合することがスプライシング促進に必要であることが明らかになった（Sun et al. 1993）。また、Watakabeら（1993）は、免疫グロブリン μ 鎖遺伝子の膜結合型特異的エキソン中のERSがピリミジンクラスターが短く、認識されにくい3'スプライス部位に対して認識されやすくなるように働くことを示し、さらにその機構にはU1 snRNPが関与していることを示した。そして彼らは、3'スプライス部位とERS、さらにすぐ下流の5'スプライス部位が一つのエキシソンの認識（考察参照）に働くというモデルを提唱した。

第三節 mRNAスプライシングに関与する因子—トランス因子—

グループIイントロン及びグループIIイントロンとは異なり、核型イントロンのスプライシングは多くの因子の関与を必要とする（Green 1991、Moore et al. 1992）。スプライシング反応はおもに核抽出液を用いた*in vitro*反応系と酵母の温度感受性突然変異株を利用して解析が行われてきた。ここではその両方から明らかになった知見をもとにスプラ

イシング反応に関与する因子について述べていくことにする。

1) U snRNP

スプライシング反応に必須な因子としてよく解析されているのがU snRNPである。mRNAのスプライシングに関与していることが明らかになっているU snRNPはU1, U2, U5, U4/U6の五種類である (Green 1991)。これは哺乳動物でも酵母でも同じであるが、酵母のU1 snRNPはヒトのそれよりも大きく、より多くの特異的なタンパク質を含んでいることが報告されている (Fabrizio et al. 1994)。U snRNPのうちU4 snRNPとU6 snRNPは通常RNA-RNAの塩基対合によって一つの複合体を形成している (Green 1991)。これらのU snRNPのRNA成分は100-190塩基で、U6 snRNPを除いて、5'末端に $m^{2,2,7}GpppN$ で表されるトリメチルグアノシンキャップ構造を持っている (Green 1991)。また、U6 snRNPは γ -モノメチルキャップ構造という特異なキャップ構造を持っている (Singh and Reddy 1989)。これらのU snRNP中には、互いに坑原性の近い (Sm坑原) 6種類のタンパク質 (B, B', D, E, F, G) が存在している。さらに、U1 snRNPにはA, C, 70Kの三種類が、U2 snRNPにはA', B"の二種類がそれぞれ存在することが報告されている (Green 1991)。しかしそのタンパク質成分の働きに関しては、ほとんど明らかになっていない。U1 snRNPは、その5'末端が5'スプライス部位に相補的であることから、5'スプライス部位の認識に関与することが予想されていた (Lerner et al. 1980)。U1 snRNPに特異的な抗体を反応系に加える実験や (Padgett et al. 1983)、U1 snRNAに相補的な合成DNAとRNase Hを用いて核抽出液中のU1 snRNAを特異的に破壊する実験から (Kramer et al. 1984)、このsnRNPがスプライシング反応に必要であることが示された。また、5'スプライス部位の配列に塩基置換を導入し、スプライシング反応が起こらなくなったmRNA前駆体に対して、変異した5'スプライス部位に相補的になるようにその5'末端を置き換えたU1 snRNPを用いることにより反応性が回復することから (Zhuang et al. 1986)、U1 snRNPがそのRNA成分とmRNA前駆体との塩基対合により、5'スプライス部位に結合していることが明らかになった。他のU snRNPについても、合成DNAを用

いた特異的な破壊実験からスプライシングに必須であることが明らかになっている (Krainer and Maniatis 1985、Black et al. 1985、Berget and Robberson 1986、Black and Steitz 1986)。そのうちU2 snRNPについては、U1 snRNPの場合と同様に、塩基置換を導入する実験から、mRNA前駆体のランチ部位に結合することが示された (Zhuang and Weiner 1989)。ただし、U1 snRNPの5'スプライス部位への結合にはATPは必要なく、低温 (4℃) でも起こることが報告されているが (Black et al. 1985、Bindereif and Green 1987)、U2 snRNPの場合はATPに依存し、補助因子U2AF (後述) が必要であることが報告されている (Ruskin et al. 1988)。

2) 非snRNPタンパク質因子

1) SRタンパク質群

HeLa細胞核抽出液には*in vitro*でスプライシング反応を起こさせる活性があるが、HeLa細胞の細胞質画分 (S100) には、その活性がない。分画時にU snRNPが核からもれ出るため、S100画分にもスプライシングに必要なU snRNPは含まれているにも関わらず活性を持たないことが知られている。そこで、S100画分にスプライシング活性を相補することを指標にして、HeLa細胞核抽出液を生化学的に分画していく実験から、SF2 (Splicing Factor 2) というタンパク質が単離された (Krainer et al. 1990a)。一方他のグループは、SV40のmRNA前駆体のスプライシングのパターンがHeLa細胞と293細胞 (ヒト胎児腎臓由来) で異なることに注目し、HeLa細胞核抽出液に画分を加えてスプライシングパターンが変化することを指標にして293細胞核抽出液から生化学的手法でタンパク質を精製した (Alternative Splicing Factor、ASF) (Ge and Manley 1990)。アミノ酸配列解析の結果、この二つのタンパク質は同一のものであることがわかり (Krainer et al. 1991、Ge et al. 1991)、スプライシングに必須な因子であると同時にスプライス部位の選択にも関与するという面を合わせ持つ興味深いタンパク質となった (Krainer et al. 1990b)。このSF2/ASFのアミノ酸配列上の特徴として、RNA結合ドメインを持っていることの他に、

アルギニン (R) とセリン (S) が連続するRSドメインを持っていること挙げられる (Krainer et al. 1991、Ge et al. 1991)。このドメインは、他にキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) のスプライシング調節因子 *transformer* (*tra*) (Boggs et al. 1987)、*transformer-2* (*tra-2*) (Amrein et al. 1988) にもみられる。このタンパク質の発見の後、RSドメインを持ったスプライシング因子が続々と報告されることになる。まず、*in vitro* 反応系で形成させたスプライソームをマウスに免疫してできた抗体のうち、既知のスプライシング因子に反応するもの以外の抗体で単離されたSC-35 (Fu and Maniatis 1990) や、U2 snRNPのブランチ部位への結合に必須な因子として精製されたU2AF (U2 snRNP Auxiliary Factor) (Zamore and Green 1989)、さらにキイロショウジョウバエのランブラシ染色体上のRNAポリメラーゼIIによる転写が活発に行われている部位を認識する抗体 (mAb104) (Roth et al. 1990) で認識される一群のタンパク質 (SRタンパク質) (Roth et al. 1991、Zahler et al. 1992) 等である。SC-35は抗体を用いて核抽出液から除去する実験から、スプライシングに必須であることが示された (Fu and Maniatis 1990)。また、U2AFはヘテロダイマーで、二つのサブユニット (65kDと35kD) が存在する。このうちU2AFの活性を担っているのは65kDであるが (Zamore and Green 1991)、最近 Two-Hybrid Systemを用いて35kD (Zhang et al. 1992) の役割が報告された (Wu and Maniatis 1993)。すなわちこのタンパク質はU2AF⁶⁵と相互作用すると同時にスプライシング因子であるSF2/ASFやSC-35と相互作用して、5'と3'の両スプライス部位のタンパク質を通した相互作用を司っているというものである。前述のSRタンパク質は20, 30, 40, 55, 75の5種類の分子量のタンパク質からなっているが (表2)、このうち30kDのものについては、SF2/ASFとSC-35の二つのタンパク質が含まれていることが明らかになった (Zahler et al. 1992)。またこれらのタンパク質はどれもすべてRNA結合ドメインとRSドメインを持っており、S100画分のスプライシング活性を相補することができる。実際SF2/ASFとSC-35は*in vitro*において互換可能であることが示された (Fu et al. 1992b)。この他にもRSドメインを持ったスプライシング因子が報告されているが (表2)、スプライシングに必須な因子が多くの種類存在する理由は何だろうか。このことについて

SR Proteins

Human	<i>Drosophila</i>	Mouse
SRp20 ¹	RBP1 ¹⁰ (homologue of SRp20)	X16 ¹⁶ (homologue of SRp20)
SRp30a ¹ = SF2 ² = ASF ³	<i>transformer</i> ¹¹	
SRp30b ¹ = SC35 ⁴ = PR264 ⁵	<i>transformer2</i> ¹²	
SRp40 ¹	<i>Su(W^a)</i> ¹³	
SRp55 ¹	dSRp55 ¹⁴ = B52 ¹⁵ (homologue of SRp55)	
SRp75 ¹		
9G8 ⁶		
p54 ⁷		
U2AF ⁶⁵ ⁸		
U2AF ³⁵ ⁹		

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| 1. Zahler et al. 1992 | 9. Zhang et al. 1992 |
| 2. Krainer et al. 1991 | 10. Kim et al. 1992 |
| 3. Ge et al. 1991 | 11. Boggs et al. 1987 |
| 4. Fu & Maniatis 1992a | 12. Amrein et al. 1988 |
| 5. Vellard et al. 1992 | 13. Chou et al. 1987 |
| 6. Cavaloc et al. 1994 | 14. Mayeda et al. 1992 |
| 7. Chaudhary et al. 1991 | 15. Champlin et al. 1991 |
| 8. Zamore et al. 1992 | 16. Ayane et al. 1991 |

表2 SRタンパク質

これまでに報告されたSRタンパク質を生物種別に示した。また、それぞれの参考文献を下に示した。別々に報告されたが同一のものであることが明らかになったタンパク質については等号で示した。

一つ面白い報告がある。Fu (1993) は、いくつかのSRタンパク質とmRNA前駆体を用いて、個々のSRタンパク質はそれぞれ別のmRNA前駆体を”commit”する、すなわちスプライシング反応に向かうことを運命づけるということを示した。真核生物の多種多様な遺伝子のイントロンに対して”commit”させるために多くの種類のSRタンパク質が必要になる。そのため多種類のSRタンパク質が存在しているというのである。この説は非常に興味深い、異なるSRタンパク質がRNAのどのような違いを認識しているのか、SRタンパク質側にもどのような違いがあるのかなどは未だ解明されていない。一群のSRタンパク質は高濃度のマグネシウム存在下で沈降すること (Zahler et al. 1992) や、あるSRタンパク質の抗体で他のSRタンパク質が共沈すること (Cavaloc et al. 1994) などから、SRタンパク質は会合した状態で存在しているのではないかと考えられている。そしてその会合した中から、そのmRNA前駆体に合ったSRタンパク質が選ばれるというモデルが考えられている。SRタンパク質についてのドメインの解析がSF2/ASFから報告されつつあり、RNA結合ドメインとRSドメインの両方が通常のスプライシングには必要なこと、RSドメインはスプライス部位の選択には必要がないことが明らかになった (Cáceras and Krainer 1993, Zuo and Manley 1993)。また、RSドメインについてはSRタンパク質同士の相互作用の場になっているということが報告されている (Wu and Maniatis 1993, Amrein et al. 1994)。最近、SRタンパク質がどういう機構で働いているのかについていくつかの興味深い示唆が得られている。まず、Crispinoら (1994) は、核抽出液中のU1 snRNPを合成DNAとRNase Hを用いて特異的に破壊してスプライシングを起こらなくしておき、その後この核抽出液中にSRタンパク質を加えるとスプライシングが回復することを示した。またKohtzら (1994) は、SF2/ASFがU170Kタンパク質と特異的に相互作用することを明かにした。またStaknisとReed (1994) は、U1 snRNPを含むスプライシング複合体にはSRタンパク質が存在することを示した。これらのことから、SRタンパク質の一つの働きとして、U1 snRNPの5'スプライス部位への結合を安定化することが考えられた。しかし、どの様にしてスプライス部位の選択に関わるか等まだまだ解明されなければならない点が多い。

II) hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) タンパク質

核内にはRNAポリメラーゼIIで転写された様々な長さのRNAが存在する。これらのRNAは核内不均一RNA (heterogeneous nuclear RNA、hnRNA) と呼ばれている (総説 Dreyfuss et al. 1993)。このhnRNAはRNA単独で存在しているわけではなく、種々のRNA結合タンパク質が結合して存在している。これらのタンパク質をhnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) タンパク質と呼ぶ (Dreyfuss et al. 1993)。このhnRNPタンパク質には、コアタンパク質と呼ばれる、最も多量に存在するA1, A2, B1, B2, C1, C2の6種類のタンパク質を含め、これまでに23種類が同定されている (表3)。これらのタンパク質のうち、スプライシングに関与することが示唆されているのはhnRNPA1, C, Iの3種類である。このうちhnRNP IIはPTB (Polypyrimidine Tract Binding protein) と同一の因子である (Ghetti et al. 1992)。PTBはピリミジンクラスターに結合するタンパク質として単離されたもので、スプライシングへの関与が示唆されていたが (Gil et al. 1991、Patton et al. 1991)、PTB自身ではなく、このPTBと相互作用しているタンパク質であるPSF (PTB-associated Splicing Factor) がスプライシング因子であることが最近示された (Patton et al. 1993)。また、hnRNP Cについては、モノクローナル抗体がスプライシングを阻害したためスプライシングに関与することが示唆された (Choi et al. 1986)。スプライシングにおいて最も脚光を浴びているのはhnRNP A1である。SRタンパク質の一つであるSF2/ASFは、*in vitro*において、3'スプライス部位により近い方の5'スプライス部位を選択させる活性を持つことが報告されていた (Krainer et al. 1990b、Ge and Manley 1990)。この活性と逆の活性、すなわち3'スプライス部位から遠い方の5'スプライス部位を選択させるような活性を持つタンパク質を生化学的に精製したところ、hnRNP A1であった (Mayeda and Krainer 1992)。このタンパク質がどの様にしてスプライス部位選択に影響を与えているのかは明らかにされていない。また、他のhnRNPタンパク質も結合配列が異なっていることや、特異なモチーフが報告されている。たとえばhnRNP EやF, Hはポリ(G)に、K, Jはポリ(C)に、Pはポリ(A)に結合することが知られている (Dreyfuss et al. 1993)。またhnRNP Uはアルギニン (R) - グリシン (G) - グリシ

hnRNP Proteins

Protein	Mr(kDa)	Structural motifs	References
A1	34	2xRBD-Gly	Beyer et al. 1977
A2/B1	36&38	2xRBD-Gly	Beyer et al. 1977
B2	39	—	Dreyfuss et al. 1993
C1/C2	41&43	RBD-AspGlu	Dreyfuss et al. 1984
D	44-48	—	Dreyfuss et al. 1993
E	36-48	RBDs	Swanson et al. 1988
G	43	RBDs	Dreyfuss et al. 1993
F/H	53&56	RBDs	Swanson et al. 1988
I	59	4xRBD	Ghetti et al. 1992
K/J	62&68	KH motif	Siomi et al. 1993
L	68	4xRBD	Ghetti et al. 1992
M	68	4xRBD	Dreyfuss et al. 1993
N	70	—	Dreyfuss et al. 1993
P	72	—	Swanson et al. 1988
Q	76-77	—	Dreyfuss et al. 1993
R	82	—	Dreyfuss et al. 1993
S	105	—	Dreyfuss et al. 1993
T	113	—	Dreyfuss et al. 1993
U	120	RGG box	Dreyfuss et al. 1984

表3 hnRNPタンパク質

これまでに同定されたhnRNPタンパク質を示した。そのcDNAと構造が明らかになっているものについては、モチーフを示した。また、それぞれの参考文献を右に示した。

ン (G) の三つのペプチドの繰り返しを持つRGGボックスを持っており、この領域がRNAへの結合に重要であることが示され、新しいRNA結合ドメインであると考えられた (Kiledjian and Dreyfuss 1992)。hnRNP KはKHモチーフ (K Homology motif) と呼ばれる45アミノ酸の繰り返しを持っており、この領域は酵母のMER1タンパク質や古細菌のリボゾームタンパク質S3など種々の核酸結合タンパク質の間で保存されている (Siomi et al. 1993)。このことから、このモチーフも新しいRNA結合ドメインであると考えられた。実際、hnRNP Kや、脆弱X染色体症候群の原因遺伝子の産物FMR1のこのモチーフに変異を導入するとRNA結合能がなくなることが知られている (Siomi et al. 1994)。このようにhnRNPタンパク質の構造解析が進んできているが、その生物学的な機能については明らかになっていない部分が多い。ポリ(A)配列付加やスプライシング、mRNAの輸送に関与する可能性も十分考えられるため、今後解析が進むことが期待される。

III) PRPタンパク質群

前述のように、スプライシング反応の解析はおもにHeLa細胞核抽出液を用いたin vitro スプライシング反応系を用いて進められてきた。しかし、この方法では因子を同定、精製するには、HeLa細胞核抽出液を分画していくしかないため、時間と労力がかかりすぎる。そこで、もう一つの解析の方法として、遺伝学的な解析が可能な出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の温度感受性突然変異体を用いられてきた。スプライシング異常の起こった突然変異体はPRP (Pre-mRNA Processing) 変異体と呼ばれており、現在までに多数のPRP遺伝子が同定されている (総説Ruby and Abelson 1991)。また、多くの場合、変異体の酵母から調製した細胞抽出液を熱処理するとスプライシング異常が起こることがわかった (Lustig et al. 1986) ので、in vitroでの反応解析も合わせて行われている。PRP変異体は大きく三つのグループに分けられる (表4)。一つめはmRNA前駆体が蓄積する変異体である。多数の変異体がこのグループに属するが大半はスプライソーム (後述、序論第二部) 形成での異常である。二つめのグループは、反応中間体が蓄積するもの、すなわち第二段階の反応に関わる因子の変異である。三つめのグループは、

PRP Proteins

Protein	Mr(kDa)	Splicing Step affected	Protein motifs	References
PRP2	100	1st	DEAH box	Kim et al. 1992
PRP5	96	SP	DEAD box	Lustig et al. 1986
PRP7	-	SP		Ruby & Abelson 1991
PRP8	280	SP		Jackson et al. 1988
PRP9	63	SP	Zn finger	Legrain & Choulika 1990
PRP11	30	SP	Zn finger	Legrain & Choulika 1990
PRP16	120	2nd	DEAH box, Zn finger	Schwer & Guthrie 1991
PRP17/SLU4	52	2nd	Similarity to β -subunit of G protein	Vijayraghavan et al. 1989
PRP18	28	1st		Vijayraghavan & Abelson 1990
PRP19	49	SP		Ruby & Abelson 1991
PRP21	33	SP		Ruby & Abelson 1991
PRP22	130	post 2nd	DEAH box, S1 domain	Company et al. 1991
PRP25	-	SP		Ruby & Abelson 1991
PRP26	48	post 2nd		Chapman & Boeke 1991
PRP27	-	post 2nd		Ruby & Abelson 1991
PRP28	67	SP	DEAD box	Chang et al. 1990
PRP29	-	2nd		Ruby & Abelson 1991
PRP30	-	SP		Ruby & Abelson 1991
PRP38	28	1st		Blanton et al. 1992

表4 PRPタンパク質

これまでに単離されたPRP変異体のうち代表的なものを示した。その遺伝子が単離されたものについては、分子量とモチーフを示した。また、それぞれの参考文献を右に示した。

mRNA前駆体から除去されたイントロンが蓄積する変異体で、スプライシング反応後のイントロンの解離や分解に関与する因子の変異だと考えられる。これらの遺伝子の多くはクローニングされ、Znフィンガー様モチーフ (PRP9、PRP11) などいろいろなモチーフを持つものが報告されているが (表4)、その中でも注目されたのは、既知のATP依存性RNAヘリカーゼに相同性を持つものがあったことである。真核生物のタンパク質合成開始因子eIF-4A (eukaryotic Initiation Factor 4A) は、ATP依存性RNAヘリカーゼであることが示されたが (総説Fuller-Pace 1994)、そのヘリカーゼとしての機能に重要なモチーフがいくつか報告されている (Pause and Sonenberg 1992)。ATP結合モチーフを持っている他に、活性に必要な配列として、DEAD (アスパラギン酸-グルタミン酸-アラニン-アスパラギン酸) モチーフを持ち、DEADボックスタンパク質と呼ばれている (Fuller-Pace 1994)。PRP5, 28の遺伝子産物はともにスプライスソーム形成に関与しているが (Ruby and Abelson 1991)、このDEADボックスタンパク質のセントラルドメインに相同性がある (Wassarman and Steitz 1991)。さらに、PRP2, 16, 22の遺伝子産物もこのセントラルドメインに相同性があったが、DEAD配列がDEAHに変化していた (Ruby and Abelson 1991)。これらのPRP遺伝子の産物は、活性はまだ示されていないが、そのモチーフから考えてRNAヘリカーゼだと思われる。これだけ多種類のヘリカーゼがスプライシング反応にどのように関与するのだろうか。まずその標的を考えてみると、(1) mRNA前駆体内の二次構造 (2) mRNA前駆体とsnRNAとの間の塩基対合 (3) 二種類のsnRNA間の塩基対合 (4) snRNA内の二次構造、が考えられる。前述のPRPタンパク質のうち、DEAD配列を有するPRP5と28は、共にsnRNPの構成タンパク質で (Ruby and Abelson 1991)、スプライスソーム形成に関与することがわかっている。一方DEAHタンパク質であるPRP2, 16, 22はそれぞれ第一段階の反応、第二段階の反応、mRNAのスプライスソームからの解離に必要であることが示されている (Ruby and Abelson 1991)。このことから、DEADタンパク質の標的としては (1)、(2)、(4) が考えられ、DEADタンパク質はmRNA前駆体上の二次構造を解きほぐしてスプライシング因子がmRNA前駆体に働きかけやすくすること、そして例えばU4 snRNPとU6 snRNP間の様な

snRNA間の塩基対合を解消して”アクティブ”なスプライスソームを形成することに関わっていることが予想される。DEAHタンパク質はいずれもスプライスソーム形成後に必要なため、スプライスソーム内在性の因子ではなく一過性に働く因子だと考えられる。そして(1)や(3)を標的とし、反応の進行を助けると考えられる。各ヘリカーゼ様タンパク質の標的を同定することはその機能を知る上で重要な意味を持つと思われる。今後*in vitro*でのヘリカーゼ活性の検定とともに解決されるべき問題である。

PRP遺伝子の多くはクローニングされているため、対応する遺伝子産物をヒトで同定する試みも行われている。ヒトのU5 snRNP中にPRP8タンパク質に対する抗体に反応する220キロダルトンのタンパク質が報告された (Anderson et al. 1989)。また、酵母DEAHヘリカーゼ様タンパク質のセントラルドメイン内モチーフの保存性の高さに注目し、その保存されたアミノ酸配列からプライマーを合成して分裂酵母やヒトの相同遺伝子を単離したという報告もある (Inoue et al. 1992、Ono et al. 1994)。このうちヒトで単離されたHRH1は酵母PRP22の相同遺伝子で、PRP22の温度感受性突然変異体の表現型を相補したため、機能的にも相同遺伝子であると考えられた (Ono et al. 1994)。しかし、酵母とヒトで異なっていたのは、HRH1にはRSドメインが存在したことである。そして*in vitro*においてHRH1はSRタンパク質と相互作用することが示された (Ono et al. 1994)。このように今後HeLa細胞核抽出液を用いた系と酵母の突然変異体の系の両方を組み合わせることで、両者のスプライシングの類似性と相違が明らかになっていくものと期待される。

第二部 mRNAスプライシングの反応機構

第一節 スプライスソームの構築と反応—スプライシング反応の場合—

第一部ではスプライシングに関与する因子を列挙してきた。第二部ではそれらの役者がどの過程でどのように働きながら反応は進行していくのかをこれまでに得られた知見を元に述べて行くことにする。

スプライシング反応は、図3に示すように以下の四つの過程から成り立っている。

- (1) スプライスソーム形成—スプライシング因子のmRNA前駆体上への集合
- (2) 第一段階の反応—5'スプライス部位での切断とラリアット構造の形成
- (3) 第二段階の反応—3'スプライス部位での切断とエキソン同士の連結
- (4) スプライスソームの解離—mRNAのスプライスソームからの分離

反応の後期過程を解析する方法としてin vitroでは次の二つの方法が取られてきた。核抽出液に二価イオンのキレート剤であるEDTAを加えることによってスプライシング反応はスプライスソーム形成の後停止する (Abmayr et al. 1988)。また、核抽出液に穏和な熱処理 (45°C) を施すと第一段階の反応後停止する (Kraimer and Maniatis 1985)。これらの実験系から第一段階の反応にも第二段階の反応にもATPが必要なことや (Moore et al. 1992)、各段階に必要な核抽出液画分が明らかになった (Perkins et al. 1986, Kramer et al. 1987, Kraimer and Maniatis 1985)。またスプライスソームの電子顕微鏡写真を取ることも成功している (Reed et al. 1988)。以下スプライスソーム形成を追いながら因子の会合とスプライシング反応について概観する。

スプライシング反応はスプライスソームと呼ばれる巨大な複合体の中で起こる。この複合体はリボソームに匹敵する大きさで、グリセロール密度勾配遠心法で沈降係数65Sの複合体として観察される (Sawa et al. 1988)。グリセロール密度勾配遠心法の他に、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Konarska and Sharp 1986,1987) やゲル濾過による分画 (Michaud and Reed 1991) などの方法により解析されてきた結果、スプライス

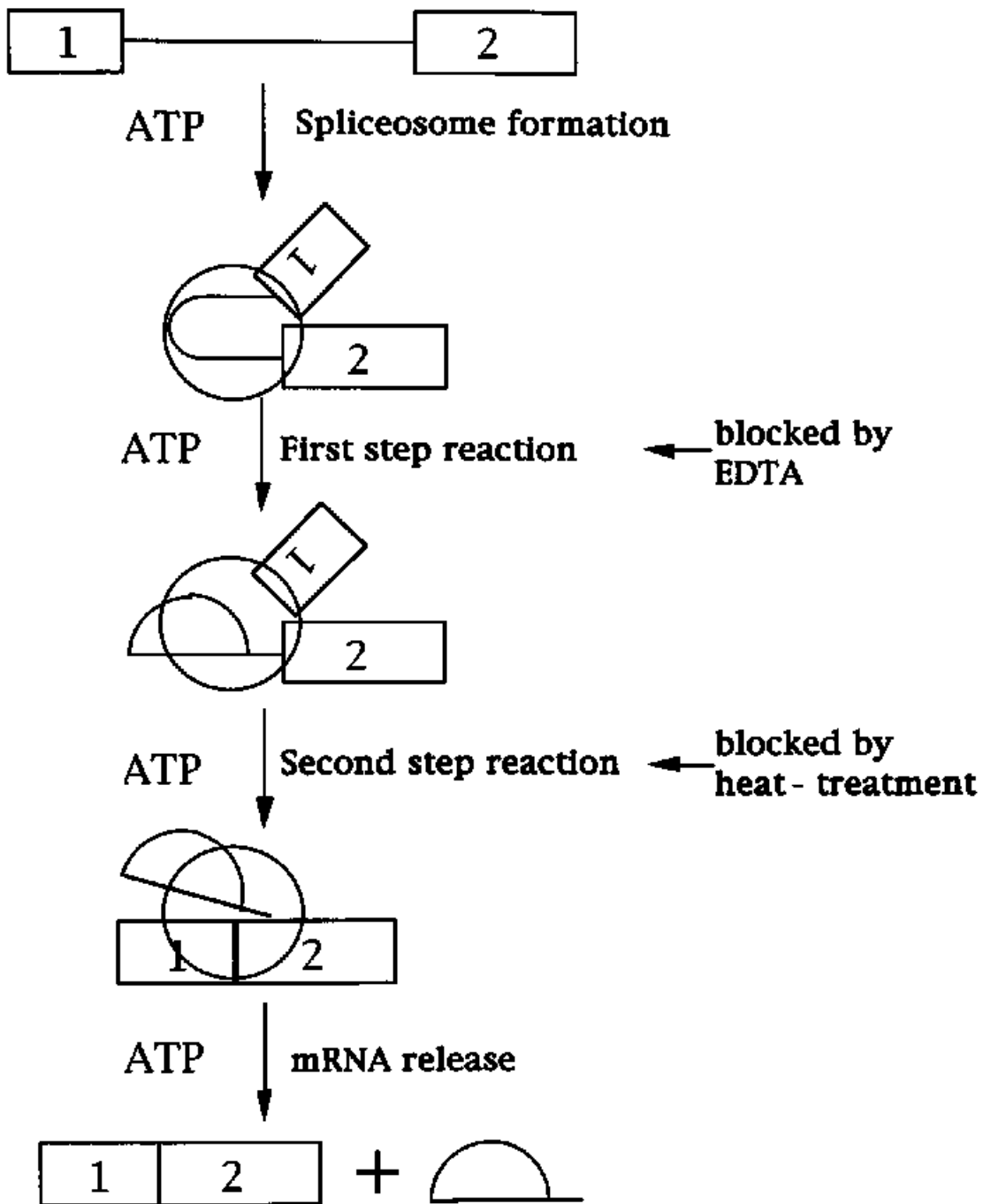


図3 mRNAスプライシング反応の反応過程

mRNAスプライシングの反応過程を模式的に示した。ATPが必要な過程には左にATPと記した。図の右に*in vitro*において、反応を特異的に阻害する操作を示した。

ソームはいくつかの段階を経て形成されることが明らかになった。また、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により複合体を分離した後、mRNA前駆体やU snRNAをプローブとしてノーザンプロットを行うことにより、複合体中のRNA成分が解析された (Konarska and Sharp 1986,1987)。哺乳動物の場合、図4に示すようにH→E→A→B→Cの順に形成される。

<Hコンプレックス>

まず初めにRNAポリメラーゼIIによって転写されたRNAに一群のhnRNPタンパク質が結合する。この複合体 (Hコンプレックス) はどのRNAに対しても非特異的に形成されるが、その構成成分は基質となるRNAによって異なることが報告された (Bennett et al. 1992a)。この複合体の形成がその後の複合体への移行にどのような影響を与えるかは今のところ不明である。hnRNPタンパク質のスプライシングへの関与と併せて今後の課題である。

<Eコンプレックス>

この段階においては、U1 snRNPがATPを必要とせずにmRNA前駆体の5'スプライス部位に結合する。そしてピリミジンクラスターと3'スプライス部位のAGを認識する因子U2AFが同じくATP非依存的に結合する。この複合体の形成がスプライシングを受けることを”運命づける” (commit) ものだと考えられており、酵母ではcommitment complexと呼ばれている (Legrain et al. 1988)。最近、SRタンパク質がこの複合体形成を促進すること、さらにこの複合体にSRタンパク質が含まれることが示された (Staknis and Reed 1994) ことから、SRタンパク質は、U1 snRNPとU2AFと共に5',3'両スプライス部位の認識に関与していると考えられる。そして、SRタンパク質がそのRSドメインを介してU1 snRNP中のUI70Kタンパク質とU2AFとに相互作用し、5'スプライス部位と3'スプライス部位を決定して”commit” すると考えられる。

<Aコンプレックス>

この複合体はその形成にATPを要求する初めての複合体で、Eコンプレックス形成後、U2 snRNPがランチ部位に安定に結合してできる。このときU1 snRNPは解離すること

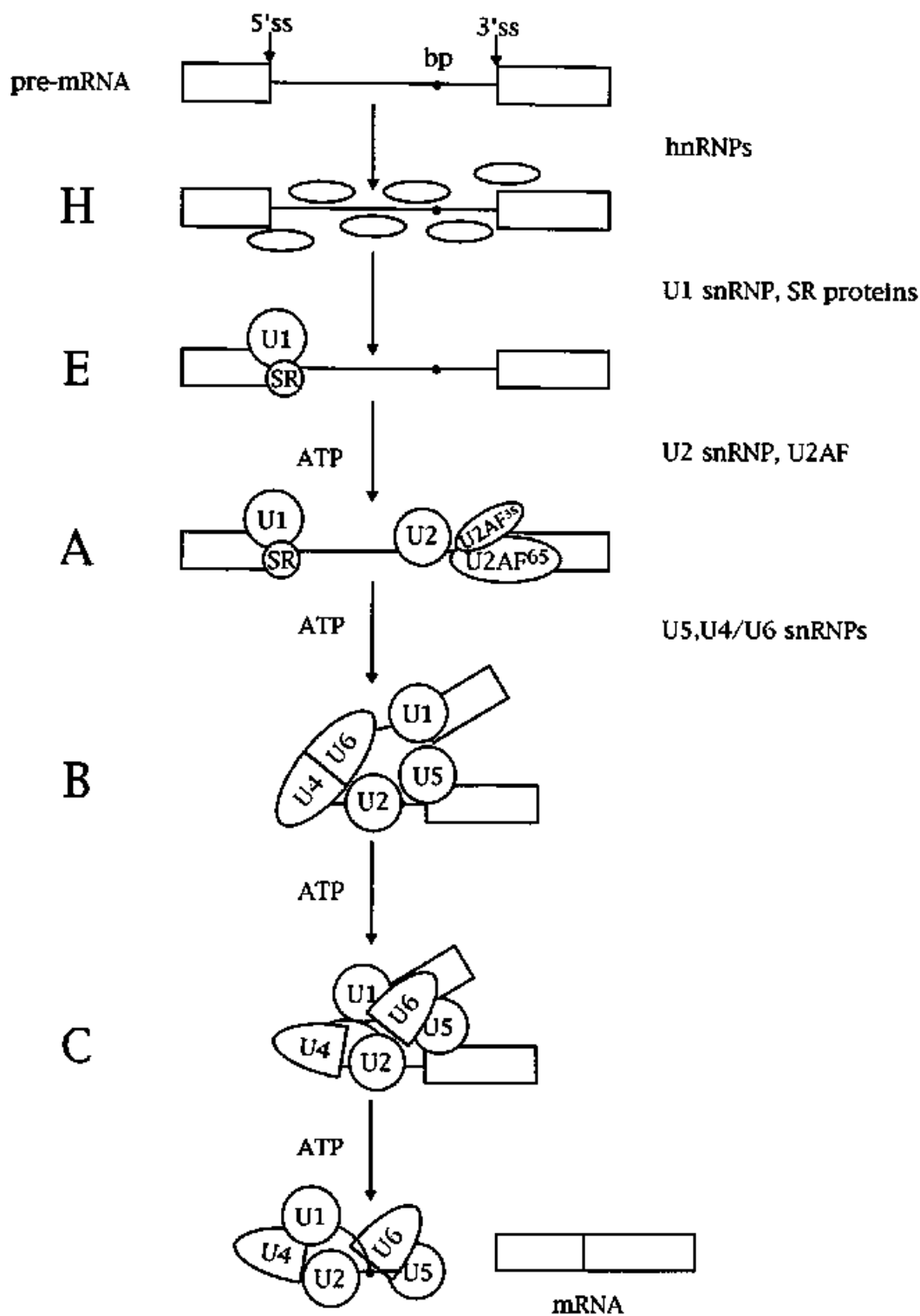


図4 スプライスソームの形成過程

スプライスソームの段階的な形成過程を、U snRNPの会合を中心に示した。U snRNP以外の因子については、U snRNPが会合するのを補助していると考えられるSRタンパク質とU2AFのみを示した。また、新たに加わる因子を図の右に示した。その形成にATPが必要な場合は、図の左にATPと示した。

が最初報告されたが (Grabowski and Sharp 1986)、別の実験系を用いると複合体中に存在していることが報告された (Bindereif and Green 1987、Reed et al. 1988)。U1 snRNPの mRNA前駆体の結合はU2 snRNPの結合よりも弱くなっていると考えられる。スプライソームをゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、二次元電気泳動で分離する実験からスプライソームに含まれるタンパク質が同定されている。これらはSAP (Spliceosome-associated protein) と呼ばれており、そのうち七種類はU2 snRNPの構成タンパク質である (Bennett et al. 1992b、Champion-Arnaud Reed 1994)。このうちSAP49とSAP145はU2 snRNPにもmRNA前駆体にも直接相互作用していることから、このSAP複合体がU2 snRNPをmRNA前駆体のブランチ部位に安定に結合させていることが示唆された (Champion-Arnaud and Reed 1994)。なお、酵母ではPRP5とPRP9がこの複合体形成に関与している (Ruby and Abelson 1991)。

<Bコンプレックス>

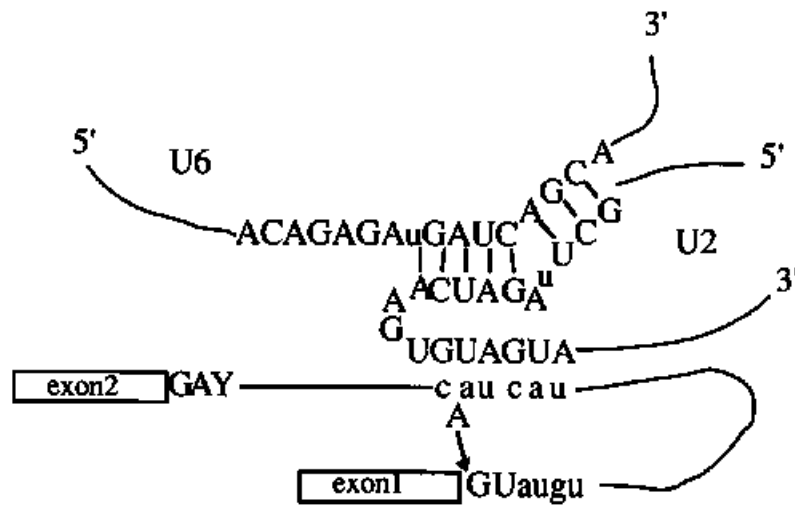
狭義のスプライソームとはこの複合体を指す。また、その場合、Aコンプレックスをスプライソーム前駆体と呼ぶ。この複合体には新たにU5,U4/U6 snRNPが加わる。これら三つのsnRNPは個々にではなく一つの複合体となってスプライソームに入ると考えられる。その理由は、U5 snRNAを破壊した核抽出液ではU4/U6 snRNPのスプライソームへの作用ができないこと (Seraphin et al. 1991)、また、熱処理してスプライシングが起こらなくなった核抽出液に生化学的に精製したU4/U6,U5 snRNP複合体を加えると相補すること (Utans et al. 1992) である。この三つのU snRNPからなる複合体は少なくとも20種類のタンパク質からなり (Behrens et al. 1991)、そのうちの 하나가酵母ではPRP5タンパク質である (Lustig et al. 1986)。前述のように、抗体を使った実験から、哺乳動物においてこの相同遺伝子産物としてp220が同定されている (Anderson et al. 1989)。他に酵母ではこの複合体の形成にPRP2, 4, 6, 28が関与している (Ruby and Abelson 1991)。この複合体の中ではRNAにも変化が起こる。まずU2 snRNAの5'領域がU6 snRNAの3'領域と塩基対合する (図5)。さらにU5 snRNA内のループ構造内の保存された配列が5',3'両スプライス部位と相互作用する (図5)。そしてU4/U6 snRNP複合

体中のRNAの塩基対合がほどけ、U4 snRNPのスプライスソームへの結合が弱まる。そして新たなU2-U6間の塩基対合ができる（図5）。このU2-U6間の塩基対合によって生じる二次構造は、グループIIイントロンの保存された領域との相同性が指摘されており（図6）、触媒に関わる因子の候補としてU6 snRNPを挙げる根拠の一つとなっている。他にもU6 snRNAはU snRNAの中でも生物種を越えてよく保存されていることや、U4/U6の塩基対合は第一段階の反応の直前まで保持されていること、分裂酵母のU6 snRNA中にmRNA型イントロンが存在したこと（Tani and Ohshima 1989）が挙げられる。また、U6 snRNAに点突然変異を導入する実験からも同様の示唆が得られている（Bindereif et al. 1990、Vankan et al. 1990、Fabrizio and Abelson 1990）。また第一段階の反応に先立ってU6 snRNAが5'スプライス部位領域に位置していることがUVクロスリンク法によって示され（Sawa and Shimura 1992、Sawa and Abelson 1992）、U6 snRNAが触媒因子である可能性が強まっている。またB,Cコンプレックスに特異的な因子としてSAP60,90が同定されている（Gozani et al. 1994）。

<Cコンプレックス>

Bコンプレックスで第一段階の反応、すなわち5'スプライス部位でのRNAの切断とラリアット構造の形成が起こった後、スプライスソームはCコンプレックスへと移行する。この複合体中で第二段階の反応が起こるが、この反応には3'スプライス部位領域が重要になる。それについて、反応に先だってスプライスソームに変化が起こることが報告されている。SawaとShimura（1991a）は、固定化したmRNA前駆体と分画したHeLa細胞核抽出液を用いた*in vitro*反応系において、3'スプライス部位領域のRNase Hに対する感受性が第一段階の反応直後と第二段階の反応直前で異なることを示した。これはスプライスソームに一過性に相互作用するものがあることを示唆している。酵母での研究から、この段階に関与する因子としてPRP16,PRP17/SLU4,PRP18,PRP29,SLU7が知られている（Moore et al. 1991）。この中で特徴的なのはSLU7（synthetic lethal U5 mutations）とPRP16である。SLU7の変異体では、ブランチ部位から遠いAGは選ばれにくくなることから、3'スプライス部位の選択に関わる因子と考えられている（Frank and Guthrie 1992）。

A. Nuclear Intron



B. Group II A

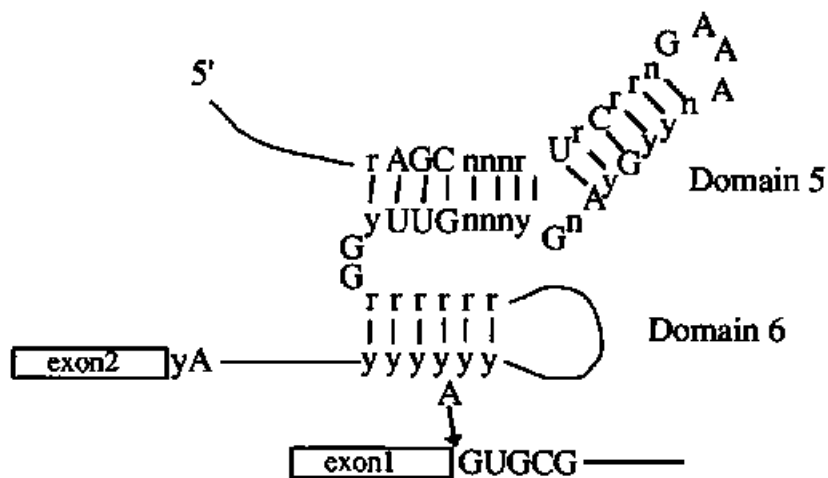


図6 U2-U6 snRNA間の塩基対合とグループIIイントロンの構造の類似性

Mooreらの総説(1992)から引用した。U2-U6間で形成される塩基対合とグループIIイントロン内のドメイン5とドメイン6の二次構造の類似性を示した。

PRP16はDEAH-box RNAヘリカーゼモチーフ（前述）を持つタンパク質で、*in vitro*でATP分解活性を示す（Schwer and Guthrie 1991）。このタンパク質の標的は明らかではないが、ATPを消費してRNAの塩基対合を解きほぐし、3'スプライス部位のAGの認識やスプライスソームの構造変化を引き起こしていると考えられる。PRP17/SLU4またはSLU7と、PRP16またはPRP18の二重変異は致死であることから、この四種類のタンパク質は第二段階の反応またはそのための構造に必要であると考えられる（Frank et al. 1992）。一方、哺乳動物ではHeLa細胞核抽出液を分画して第二段階の反応に必要な分画が取られたが（Sawa and Shimura 1991a、Kraimer and Maniatis 1985）、未だ粗精製の段階である。

＜スプライスソームとmRNAの解離＞

スプライシング反応終了後、スプライスソームとmRNAは解離し（図4）、mRNAは核外へ輸送される。切り出されたイントロンは速やかにブランチ構造が外され（debranching reaction）分解を受ける。mRNAの解離に関わる因子として酵母で単離されたものにPRP22がある（Company et al. 1991）。この突然変異体ではmRNAがスプライスソームから解離せず、その結果スプライスソームの再利用ができなくなりmRNA前駆体とイントロンが核内に蓄積する。このタンパク質もDEAHモチーフを持つRNAヘリカーゼ様タンパク質であった（Company et al. 1991）。mRNAの解離にはATPが必要であることが報告されていることから（Green 1991、Moore et al. 1992、Sawa and Shimura 1991b）、このタンパク質がATPの加水分解のエネルギーを使ってRNAの塩基対合をはずして解離させることが考えられる。最近、単離されたヒトのPRP22タンパク質の相同タンパク質であるHRH1（前述、序論第一部III参照）も同様の働きを持つと思われる。切り出されたイントロンの分解に関しては、PRP26とPRP27が知られている。PRP26タンパク質はブランチ構造を外す活性を持っているが、驚いたことに酵母では必須遺伝子ではない（Chapman and Boeke 1991）。蓄積したラリアット型イントロンがあまり影響を与えない理由は不明である。*in vitro*では、切り出されたイントロンはsnRNPと結合したままの複合体として観察される（Konarska and Sharp 1987）。PRP27タンパク質は、この複合体の解離に関わっていると考えられている（Vijayraghavan et al. 1989）。

第二節 選択的スプライシング (Alternative Splicing)

前節までに述べてきたスプライシングにおいては、複数のイントロンが存在する場合近接するスプライス部位同士が選択され、エキソンが連結されるため、エキソンを飛ばすこと (exon skipping) は起こらない。しかし、高等真核生物においては、そのような例が多数報告されている (Smith et al. 1989)。これらは選択的スプライシングと呼ばれ、図7に示すようにいくつかのパターンが報告されている。エキソンの組合せを変えることにより遺伝子産物の多様性を出すことができるという利点があると考えられるが、その機構についてよく解析が進んでいるものにキイロショウジョウバエにおける遺伝子発現調節がある。第一に、キイロショウジョウバエではその体細胞の性決定が選択的スプライシングによって制御されている (図8)。性決定の遺伝子カスケードの上位に位置している *Sex-lethal* (*Sxl*) 遺伝子の産物には、雌型と雄型が存在するが、雌型産物はその産物自身を安定に供給するために雄に特異的な3'スプライス部位の使用を妨げることで雌様式のスプライシングを起こさせる (Bell et al. 1991、Sakamoto et al. 1992、Horabin and Schedl 1993a; 1993b)。また *Sxl* 雌型産物は遺伝学的にはその下位に位置する *transformer* (*tra*) のスプライシング様式にも影響を与える。*Sxl* 雌型産物は *tra* の非性特異的な3'スプライス部位の使用を妨げることで雌特異的なスプライシングを起こさせ、*tra* 雌型産物を発現させる (Inoue et al. 1990、Varcappel et al. 1993)。これら二つの調節において、*Sxl* 雌型産物はピリミジン配列を含むアクセプター部位に結合していること (Inoue et al. 1990) や U2AF と競合してその結合を妨げること (Varcappel et al. 1993) が報告されている。ただし *Sxl* の雌型産物のスプライシング自己制御においては、アクセプター部位以外にもイントロン中のウラシル残基が連続する領域に結合することが示されており、何らかの調節が存在する可能性はある (Bell et al. 1991、Sakamoto et al. 1992、Horabin and Schedl 1993a; 1993b)。*Sxl* 雌型産物によって誘導された *tra* 雌型タンパク質は、*transformer-2* (*tra-2*) タンパク質関与のもとに下位の遺伝子である *doublesex* (*dsx*) 遺伝子の発現を調節する。*tra* 雌型産物と *tra-2* タンパク質は *dsx* mRNA 前駆体の雌特異的なエ

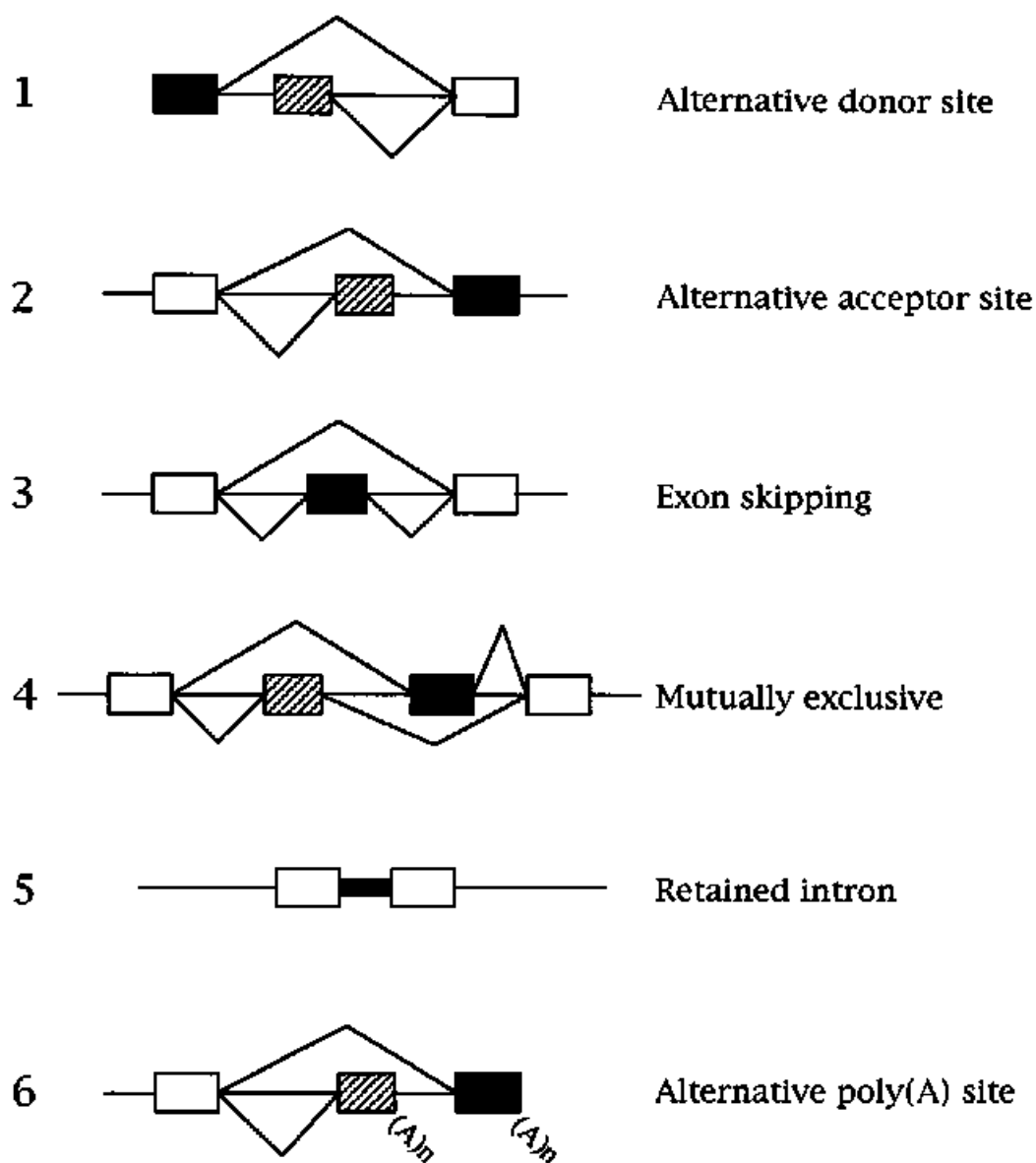


図7 選択的スプライシングの様々なパターン

これまでに報告されている選択的スプライシングのパターンを模式化して示した。色付きの部分が選択的に使用されるエクソンである。なお、5の様式は、イントロンがエクソン配列とみなされて保持されるものである。

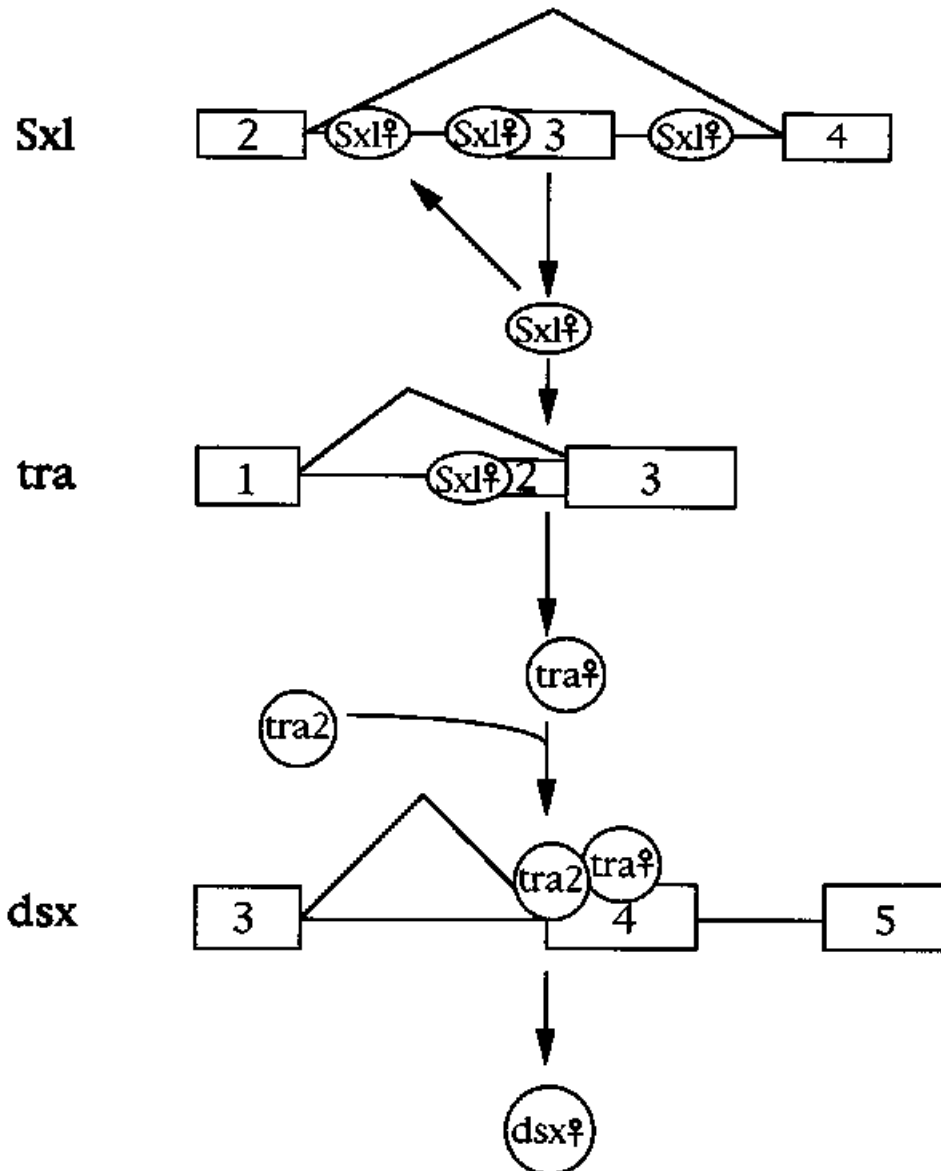


図8 キイロショウジョウバエの体細胞の性決定における選択的スプライシング

キイロショウジョウバエの体細胞の性決定過程において、それに関与する遺伝子の雌特異的スプライシングを示した。Sex-lethalの雌特異的産物はtraのスプライシングを負に制御する他に、自己のスプライシングも負に制御している。一方traの雌特異的産物はtra2産物の関与のもとにdsxの雌特異的スプライシングを正に制御している。

キソン中にある繰り返し配列に結合し、上流にある雌特異的な3'スプライス部位を使用させることで雌型のスプライシングを起こさせる (Hoshijima et al. 1991、Tian and Maniatis 1992)。このスプライシング促進機構について最近示唆が得られている。*tra,tra-2*タンパク質はともにRSドメイン (前述) を有している (Boggs et al. 1990、Amrein et al. 1988)。*in vitro*反応系において、*dsx* mRNA前駆体のエキソン中の繰り返し配列上に形成された複合体をアフィニティ精製したところ、*tra,tra-2*タンパク質の他にSRタンパク質が含まれていた (Tian and Maniatis 1993)。このことから以下のようなモデルが考えられた。*dsx* mRNA前駆体の雌特異的エキソンの上流の3'スプライス部位はピリミジンクラスターの長さが短く、U2AFによって認識されにくい。*tra,tra-2*両タンパク質はエキソン内の繰り返し配列を認識して結合し、そのRSドメインを介した相互作用でSRタンパク質と複合体を形成する。そしてこの複合体中のSRタンパク質がU2AFと相互作用してU2AFを3'スプライス部位近傍に位置させ、この3'スプライス部位のスプライス部位としての認識を強めるというものである。

選択的スプライシングによる他の調節の例として同じくキイロショウジョウバエのP因子第三イントロンの生殖細胞特異的なスプライシングがある (Siebel and Rio 1990)。このイントロンのスプライシングは体細胞では阻害されているが、これはこのイントロンの5'スプライス部位の上流のエキソン中に偽5'スプライス部位配列が存在し、この配列がU1 snRNPの5'スプライス部位への結合を競合阻害すること、この配列によるスプライシング阻害には二種類のタンパク質が必要なことが明らかになっている (Siebel et al. 1992; 1994)。

最近上記のような特異的なトランス因子の存在なしに、基本的なスプライシング因子の組合せで選択的スプライシングを説明しようという試みが成されている。それはSF2/ASFとhnRNP A1の関係が明らかになったことに負うところが大きい。基本的なスプライシングに必須な因子であるSF2/ASFは、*in vitro*において、二つの5'スプライス部位が存在するとき3'スプライス部位に近い方の5'スプライス部位を選択させる (Krainer et al. 1990b、Ge and Manley 1990)。一方hnRNP A1はこの活性と反対の活性を示し、遠い

方の5'スプライス部位を選ばせる (Mayeda and Krainer 1992)。他のSRタンパク質が、各々その活性に差はあるものの5'スプライス部位選択に関与すること (Zahler et al. 1993) や、SRタンパク質群の各タンパク質およびhnRNP A1タンパク質の発現比が組織で異なること (Zahler et al. 1993、Mayeda et al. 1993) が明らかになったため、もともと組織間でスプライス部位の選択に関わる因子のバランスによってスプライス部位選択性に傾向が出るということが考えられた。またdsxの場合のように、mRNA前駆体上の情報として、5'または3'スプライス部配列が保存配列から外れたものになっていてスプライス部位として認識されにくいことがそのバランスに影響することも考えられる。3'スプライス部位選択に関しても、SF2/ASF、SC-35が5'スプライス部位に近い3'スプライス部位を選択させること (Fu et al. 1992) や熱に弱い因子が選択に関わっていること (Kataoka et al. 1993) などが報告されている。最近、培養細胞中でSF2/ASFまたはhnRNP A1を大量発現させてその中でのレポーターmRNA前駆体のスプライシングのパターンを解析する実験から *in vitro* と同様の結果が得られ、生体内でもこの両因子が *in vitro* と同じ活性を持って働いていることが示唆された (Cáceras et al. 1994)。しかしこの実験もいわば“異常な”状態を作り出しているため、本当の意味での *in vivo* での証明は未だなされていない。スプライシング反応の解析は *in vitro* 反応系に負うところが大きいため、簡単ではないが常に *in vitro* と *in vivo* を結ぶことを考えなければならない。

第三節 mRNAの核外輸送 (mRNA export)

1) 輸送と酵母の突然変異体

これまで述べてきたように、RNAポリメラーゼIIによって転写されたmRNA前駆体はプロセッシングを受けた後核外へ輸送される。この過程は遺伝子発現に必須であり、基本的な過程であるにも関わらずほとんど解析が進んでいない。その要因の一つはスプライシングの場合とは異なり、酵母の突然変異体の解析があまり有効でないことにある。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、核内にmRNAが蓄積する温度感受性突然変異体

はいくつか単離されている (Aebi et al. 1990, Kadowaki et al. 1992)。PRP20の変異体は、RNAの転写終結あるいは3'端のプロセシングの異常により核内に通常より長いmRNAが蓄積することが報告された (Forrester et al. 1992)。この遺伝子産物は、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のPIM1遺伝子 (Matsumoto and Beach 1991) や哺乳動物のRCC1遺伝子 (Ohtsubo et al. 1987) という、染色体の凝縮に必要な遺伝子の産物に相同性があった。実際PRP20とRCC1はお互いの変異体を相補するので機能的にも相同遺伝子であると考えられている (Fleischmann et al. 1991)。このようにmRNAの核内への蓄積を指標にしてある変異体とその遺伝子を単離しても、mRNAの輸送だけに関わっているものは単離されておらず、単離されたとしてもその遺伝子産物が輸送に関わる因子本体であることの証明が困難である。また、*in vitro*の再構成系がないことも大きな理由である。

2) 輸送と核孔複合体

電子顕微鏡を用いた解析から、RNAは核孔複合体 (nuclear pore complex、図9) を通って核外に輸送されることが示唆された (Dworetzky and Feldherr 1988)。また核孔複合体に存在するタンパク質に対するモノクローナル抗体がRNAの核外輸送を阻害したこと (Featherstone et al. 1988) から、核孔複合体はタンパク質のみならずRNAの輸送にも重要な役割を成すと考えられる。この核孔複合体は100~200のタンパク質からなると考えられているが、近年このタンパク質の遺伝子がいくつかのグループによって相次いでクローニングされている (Wente et al. 1992, Wente and Blobel 1993, Fabre et al. 1994)。その中の一つに出芽酵母のNUP145がある。この遺伝子産物は*in vitro*でRNA結合活性を示し、この遺伝子の発現を阻害するとmRNAの核外輸送やタンパク質の核内輸送が阻害される (Fabre et al. 1994)。NUP116についても同様の報告がされている (Wente and Blobel 1993) が、これらのタンパク質は核孔での物質の受渡し役を果たしているのかも知れない。

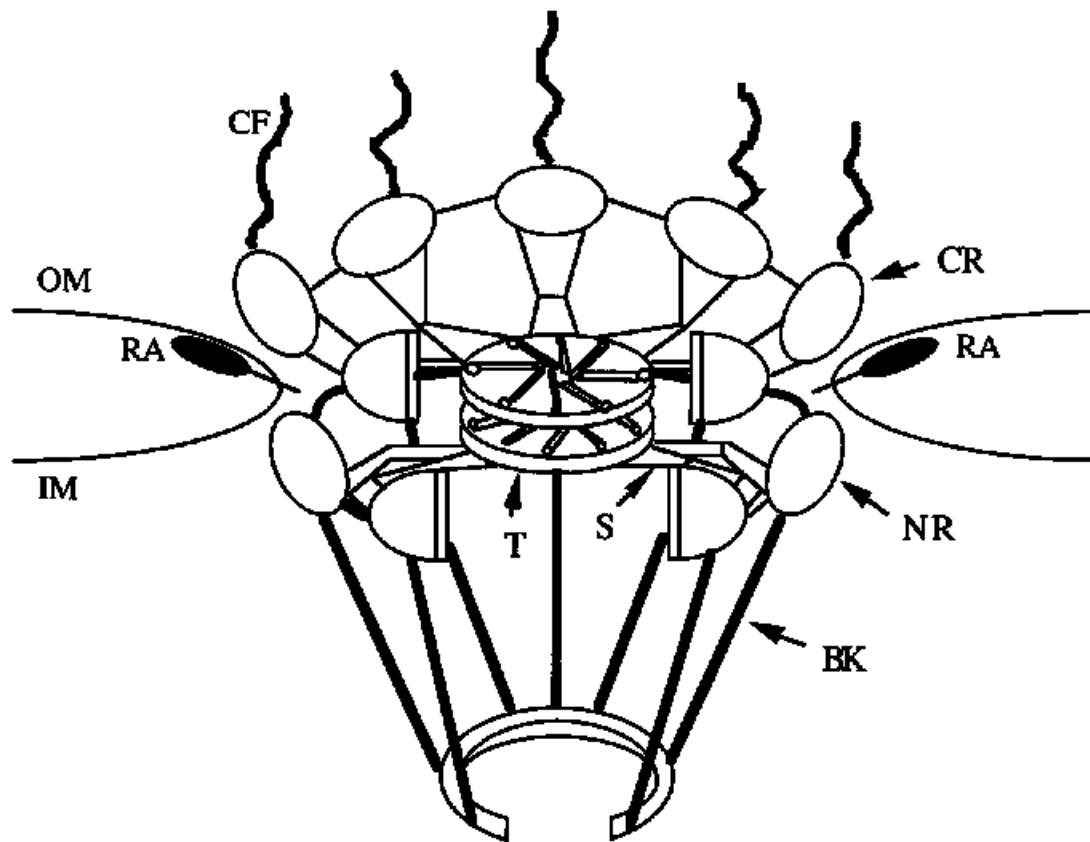


図9 核孔複合体の構造

Forbesの総説(1993)から引用した。核膜上に存在する核孔複合体の構造を模式的に示した。図の上が細胞質側で、下が核質側である。図中の略号は以下のとおりである。OM: 核膜外膜、IM: 核膜内膜、CF: 細胞質フィラメント、CR: 細胞質内リング、RA: ラジアルアーム、NR: 核質内リング、BK: バスケット様構造フィラメント、T: 中央輸送体構造、S: スポーク

3) 輸送とスプライシング

スプライシングに関与している因子で、RNAの運び屋としての可能性が指摘されているのはhnRNPタンパク質である。hnRNP A1タンパク質は、核から細胞質に出てまた核に戻るという”シャトル”をすることが明らかになった (Pinol-Roma and Dreyfuss 1992)。もともとこのタンパク質は、核内に存在しているRNA結合タンパク質であるため、mRNAに結合したまま核外に出て、細胞質でRNAと解離して核に戻るということが考えられた。広い意味ではスプライシング機構も核外輸送に関与しているといえる。mRNA前駆体上にスプライスソームが集合してスプライシング反応に向かわせることと核外へ輸送することは競合するからである。実際スプライスソーム形成を阻害するような変異をmRNA前駆体に導入すると核外輸送が促進されることが報告されている (Legrain and Rosbash 1989、Chang and Sharp 1989、Hamm and Mattaj 1990)。またmRNAはスプライスソームから解離しなければ輸送されないはずである。この点において前述のPRP22タンパク質やその相同産物と考えられるHRH1タンパク質も輸送に関与しているといえる。また、切り出されたイントロン上にスプライスソームは保持されているはずであるので、この”スプライスソームによる保持”モデルはイントロンが核外に輸送されないことを説明するのに都合がよい。つきつめて言えば、スプライス部位が核内にRNAを保持するシグナルということになる。また、インフルエンザウイルスのNS1 (non-structural protein 1) タンパク質はウイルスRNAのスプライシングと核外輸送を阻害することが知られている (Alonso-Caplen et al. 1992、Fortes et al. 1994)。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のRevタンパク質 (Chang and Sharp 1989) と共にその阻害機構の解明が期待される。

4) 輸送とキャップ構造

最近、mRNA前駆体のキャップ構造が、核から細胞質への輸送に関与しているという報告が成されている。アフリカツメガエルの卵母細胞核への微量注入実験から、U snRNA (U6 snRNAを除く) やmRNA前駆体のようなRNAポリメラーゼIIの転写産物に付加されるm⁷GpppNというキャップ構造が必要であるということが示された (Hamm and

Mattaj 1990)。U snRNAについては、転写された後はmRNA前駆体と同じキャップ構造を持っているが、細胞質でさらにメチル化を受けて核内に戻る。この $m^{2,2,7}GpppN$ というトリメチルキャップ構造は、U snRNA上において、Sm（前述）結合部位とともにU snRNPの核内への輸送に関与していることが知られている（Hamm et al. 1990）。U6 snRNAはRNAポリメラーゼIIIで転写され、そのキャップ構造も特異である（Singh and Reddy 1989）。 m^7GpppN というキャップ構造を持たないこのRNAが核外に輸送されないこともキャップ構造がシグナルであることの根拠とされている。そこで、キャップ構造を認識し、RNA核外輸送の過程に関与する因子の候補としてキャップ構造結合タンパク質が精製された（Izaurralde et al. 1992）。しかしまだその輸送への関与は示されていない。核孔複合体タンパク質の解析と併せて、タンパク質因子からのアプローチで輸送機構に迫ることができる可能性もある。

第四節 本研究の背景

我々の研究室において、mRNA前駆体の5'末端に存在するキャップ構造が、スプライシングに積極的に関与し、最も近いイントロンのスプライシングを促進することを*in vitro*（Ohno et al. 1987）及びアフリカツメガエル卵母細胞核への微量注入実験（Inoue et al. 1989）から明らかにしていた。このことにより、キャップ構造はスプライシングに必須ではないものの、新たなスプライシングシグナルともいえた。この当時、スプライシング反応に関わる必須因子や反応機構の解析が驚くべき速さで進んでいた。キャップ構造はスプライシングシグナルといえるがキャップ構造によるスプライシング促進はそれに最も近いイントロンにしか及ばない。筆者はこの点に興味を覚え、この促進機構を、反応の解析とそれに関わる因子の解析の両面から攻めていくことでキャップ構造による促進効果の機構のみならずスプライシング反応の機構解明につながるのではと考え、解析を行った。本論文の結果において、反応の解析からの結果を第一部で、キャップ構造結合タンパク質からの解析を第二部で述べていくことにする。

第二章 材料と方法

1) 酵素及び試薬

標識されたヌクレオチドはAmershamより購入した。また、プロテイナーゼKはMerckから、キャップ構造類似体はPharmaciaから購入した。SP6 RNAポリメラーゼや制限酵素は宝酒造から購入した。その他の試薬類は主に和光純薬と半井化学から購入した。

2) オリゴデオキシヌクレオチド

オリゴデオキシヌクレオチドはDNA合成機 (A380, Applied Biosystem) で合成した後、ゲル濾過カラムであるNAP-10カラム (Pharmacia) を用いて精製した。合成したオリゴデオキシヌクレオチドの配列は、それを用いた後述の各項に明記した。

3) HeLa細胞核抽出液の調製

HeLa細胞は、0.03%グルタミン、5%ウマ血清を含むイーグルMEM培地 (ニッスイ) を用いてスピナーフラスコで培養した。核抽出液の調製は基本的にDignamら (1983) の方法に従った。ただし、塩抽出の際に加えるバッファーCのKCl濃度は0.6Mとし、HeLa細胞 10^9 個あたり1.3ml加えた。また、プロテアーゼ阻害剤として、PMSFの代わりにPAMSF (パラアミノジフェニルメタンスルフォニルフルオリド塩酸塩) を用い、バッファーCとDに最終濃度0.2mMになるように加えた。

4) mRNA前駆体の調製

ニワトリ δ -クリスタリン遺伝子の14番目と15番目のエキソンとその間のイントロンNをSP6ファージのプロモーターの下流に連結したプラスミド、pSP14-15 (Sawa et al. 1988) を制限酵素SmaI (宝酒造) で直鎖化し、*in vitro*転写反応の鋳型とした。また、二つのイントロンを持つmRNA前駆体の調整に用いたプラスミド、pSP14-15 Δ N/14-15 (DN) (Inoue et al. 1989) も同様にして鋳型として用いた。*in vitro*転写反応はSawaら (1988) の方法に従った。キャップ構造を持たないmRNA前駆体を合成する際はm⁷GpppGの代わりにAppppGを用いた。転写反応後、8M尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動によりmRNA前駆体を精製した。

5) *in vitro*スプライシング反応とグリセロール密度勾配遠心法

*in vitro*スプライシング反応は、Sakamotoら (1987) の方法に従い、10 μ lの反応系で行った。反応を第一段階の後停止させる場合は核抽出液を45 $^{\circ}$ Cで10分間処理して用いた。また、グリセロール密度勾配遠心によるスプライソームの分画はSawaら (1988) の方

法を用い、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を最終濃度2.5mMになるように加え、所定の時間保温した後分画した。

6) スプライシング複合体形成の解析

基本的にkonarskaとSharpの方法（1986）に従った。*in vitro*スプライシング反応を5 μ lの系で行った後、ヘパリンを25 μ g加えて水中で10分間保温した。その後4%ポリアクリルアミド（アクリルアミドとビスアクリルアミドの比が80:1）、50mM Tris-glicine（pH8.8）のゲルを用いて電気泳動した。

7) RNAをプローブとするゲル移動度シフト法

プローブRNAの調製と反応はOhnoら（1990）の方法に従った。熱処理したHeLa細胞核抽出液を用いる場合は、45℃で所定の時間熱処理した。またEDTAを加える場合は反応液に同時に加えた。キャップ構造類似体を加える場合は核抽出液とキャップ構造類似体をあらかじめ混合し、20℃で10分間保温してから反応を行った。酵母細胞抽出液は希釈せずに反応に用い、キャリアーとしての酵母RNAの量を2 μ gとした。

8) 核内キャップ構造結合タンパク質（NCBP）の精製とその一次配列の決定

NCBPの精製は基本的にOhnoら（1990）の方法に従った。精製の最終段階であるアフィニティーカラムは以下のようにして調製した。ゲル移動度シフト法に用いたプローブRNAと同じRNAを合成する際、ヌクレオチドの組成を500 μ M ATP,CTP,100 μ M GTP,380 μ M UTP,120 μ M アミノアシル-UTPに変更し、10mlの反応系で合成した。このRNAを8M尿素を含んだ6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、RubyとAbelsonの方法（1988）に従って、NHS-LC-Biotin（Pierce Chemicals）を用いてビオチン化し、ストレプトアヴィジンアガロース（Bethesda Research Laboratory）に結合させた。これらのカラムクロマトグラフィーにより、HeLa細胞 1×10^{11} 個から調製した核抽出液から20 μ gのNCBPを得た。このタンパク質をトリプシンとリジルエンドペプチダーゼで分解し、そのペプチドを逆相カラムクロマトグラフィーで分画した。このうち46種のペプチド分画を気相ペプチドシーケンサー（model470A,Applied Biosystems）で解析しアミノ酸配列を得た。

9) 逆転写ポリメラーゼ伸長反応（Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction）

逆転写反応はGeneAmp RNA-PCRキット（Perkin-Elmer Cetus Instruments）とHeLa細胞由来のポリ(A)⁺RNAを用いて行った。ポリメラーゼ伸長反応はPCR サーマルサイクラー（Perkin-Elmer Cetus Instruments）を用いて以下のように行った。変性（94℃、1分）、アニーリング（46℃、2分）、伸長反応（72℃、5分）を1サイクル

として40サイクル行い、72℃で5分間伸長反応の後4℃で保温した。増幅されたcDNA断片は制限酵素EcoRIで切断した後プラスミドpSP73 (Promega) にクローニングした。ポリメラーゼ伸長反応に用いたプライマーは以下の通りである。

プライマー 1 (5')-GCGAATTCGAYGTNCCNAAAYCCNAA-(3')

プライマー 2 (5')-ATGAATTCTTRAANACYTCRTGAA-(3')

N,R,Yはそれぞれ全塩基、プリン、ピリミジンを表わす。5'端のEcoRI切断部位を下線で示した。

1 0) NCBPの全長cDNAの単離

逆転写ポリメラーゼ伸長反応によって得られたcDNA断片をジゴキシゲニンで標識し、これをプローブとしてλgt10 HeLa細胞cDNAライブラリーをスクリーニングしてNCBPの全長をコードするクローンを得た。DNAの標識及び検出については、Boehringer Mannheim社のキットを用いた。また、λgt10 HeLa細胞cDNAライブラリーは、東京工業大学理工学部の半田宏先生より分与していただいた。

1 2) プラスミド

トランスフェクションに用いたプラスミドは以下のようにして作製した。T7ファージのgene10タンパク質のN末端の12アミノ酸をコードするオリゴデオキシヌクレオチドを合成してアニールした後、NCBPのcDNAの5'末端のBamHI部位に挿入した。この断片を高発現ベクターpEF-BOS (Mizushima and Nagata 1990) のXbaI部位にクローニングした(pEF-BOS/T7NCBP)。また、N末端から70アミノ酸の部分のみを持つプラスミド、pEF-BOS/Bglは、NCBPcDNAの5'末端のEcoRI-BglIII断片を用いた。この部分のみを欠失したプラスミド、pEF-BOS/ΔBglはNCBPcDNAからBamHI-BglIII断片を欠失させて作製した。プラスミドpEF-BOSは京都大学医学部の國定隆弘先生より分与していただいた。オリゴデオキシヌクレオチドの配列は以下の通りである。

センス鎖 (5')-GATCCATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCG-(3')

アンチセンス鎖 (5')-GATCCGACCCATTTGCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCATG-(3')

1 3) ノーザンプロット及びサザンプロット

ノーザンプロットは、以下の手順で行った。1レーンあたり2μgのHeLa細胞由来のポリ(A)⁺RNAを1%ホルムアミドアガロースに電気泳動後 (Sambrook et al. 1989)、Hybond Nメンブレン (Amersham) にプロットした。ハイブリダイゼーションは50%ホルムアミド、5XSSC、1%ブロッキング リエージェント (Boehringer Mannheim)、0.1%N-ラウリルサルコシン、0.02%SDSの組成中で42℃で12時間行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを室温で2XSSC、0.1%SDSの条件で洗い、さらに42℃で0.2XSSC、0.1%SDSの条件で洗ってオートラジオグラムを取った。サザンプロットは、

1レーンあたり2 μ gのHeLa細胞由来のゲノムDNAを制限酵素で切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動を行った。その後の操作はノーザンブロットと同様に行った。

14) 細胞培養とトランスフェクション

HeLa細胞は、牛血清を10%含んだダルベッコ変法培地（ニッスイ）で、37℃、CO₂存在下で培養した。トランスフェクションはリン酸カルシウム法（Sambrook et al. 1989）を用いた。直径60mmの培養皿でHeLa細胞が約2 \times 10⁵ cells/mlになるように培養し、そこに10 μ gのプラスミドDNAを加えた。24時間後に細胞をPBSで洗ってから回収し、蛍光染色やウェスタンブロットに用いた。

15) 細胞の蛍光染色

蛍光染色はおもにHarlowとDane（1988）の方法に従った。ホルムアルデヒド処理によって固定したHeLa細胞に、一次抗体として抗hnRNP C抗体（Choi & Dreyfuss 1984）または抗T7ペプチド抗体（Novagen）をPBSでそれぞれ1000倍に希釈して加え、室温で1時間処理した。PBSでよく洗浄した後、二次抗体としてフルオレセイン標識した抗マウス抗体（DAKO A/S）を300倍に希釈して用いた。その後蛍光顕微鏡（KARL ZEISS, model AXIOPHOTO FL）を用いて蛍光を観察した。

16) ウェスタンブロット

HeLa細胞をLeeとGreen（1990）の方法に従って核画分と細胞質画分に分画し、細胞当りの量が同じになるようにして15%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その後ニトロセルロース膜（Schleicher & Schuell）にうつし、5%スキムミルク（Difco）でブロッキングした。その後一次抗体として抗hnRNP C抗体または抗T7ペプチド抗体（Novagen）をNET-2溶液（10mM Tris-cl pH8.0, 150mM NaCl, 0.2mM EDTA）でそれぞれ1000倍に希釈して加え、室温で1時間処理した。NET-2溶液でよく洗浄した後、二次抗体としてアルカリフォスファターゼを結合させた抗マウス抗体（Amersham）を1000倍に希釈して用いた。その後ECLキット（Amersham）で発光させ、フィルム（Hyperfilm-ECL, Amersham）に感光させた。

18) 酵母Two-Hybrid Systemを用いたInteraction Cloning法

この方法はZervosら（1993）の方法に従っており、それに必要なプラスミドやcDNAライブラリー、酵母は分与していただいた。NCBPのcDNAをLexAとの融合タンパク質発現プラスミド（pEG202）のEcoRI-XhoI部位にクローニングした（pEG-NCBP）。このプラスミドと β -ガラクトシダーゼ遺伝子を持つレポータープラスミド（pSH18-34）と共に酵母EGY48（ura3, his3, trp1, LexAop-leu2）に酢酸リチウム法（Guthrie and Fink 1991）

でトランスフォーメーションした。この酵母にHeLa細胞由来のcDNAライブラリー4 μ gをトランスフォーメーションし、Glucose-His⁻-Ura⁻-Trp⁻のプレート150枚に広げた。この後コロニー同士が重ならないうちにコロニーをかき取り、NCBPのライブラリーとした。このライブラリーのGlucose-His⁻-Ura⁻-Trp⁻プレート上でのタイターを計り、そのタイターからの計算上1.5 \times 10⁷個のコロニーが出る量だけGalactose-His⁻-Ura⁻-Trp⁻-Leu⁻プレートにまいた。30 $^{\circ}$ Cで保温後（以後特に断らないかぎり培養は30 $^{\circ}$ Cで行った）、出てきたコロニーを仮の陽性クローンとした。その後出てきたコロニーをGlucoseとGalactoseのHis⁻-Ura⁻-Trp⁻プレートに広げ、ナイロン膜（BIODYNE, Pall）に移した後液体窒素に浸し、X-gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド）を含んだZバッファー（60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, 39mM β -mercaptoethanol）を浸した濾紙に乗せ、30 $^{\circ}$ Cで保温した。この時Galactoseのプレート上で広げたときのみ青く発色したものを陽性クローンとした。さらにこの陽性クローンをGlucoseとGalactoseのプレートに広げ、Galactose-His⁻-Ura⁻-Trp⁻-Leu⁻プレート上にしか生育しないことを確かめた。

18) cDNAを含むプラスミドの回収

上記の様にして選択した陽性クローンを液体選択培地（Glucose-His⁻-Ura⁻-Trp⁻）で、波長600nmでの吸収が1.0になるまで培養した。その後1.5ml分の培養液から酵母を回収し、酵母DNA抽出用試薬（2% TritonX-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-cl pH8.0, 1mM Na₂EDTA）200 μ lに懸濁し、等量のフェノール クロロフォルムと0.3 μ gのグラスビーズ（Sigma）を加え、2分間ヴォルテックスした。遠心して上清50 μ lを回収し、そのうち1 μ lを大腸菌KC8株（この株はtrpC9830の遺伝子型を持ち、ライブラリープラスミド上の酵母のTRP1遺伝子はこれを相補できる）にトランスフォーメーションした。この大腸菌からプラスミドを回収した後、そのcDNA断片をpSP73（Promega）にクローニングし、塩基配列の解析を行った。

19) 酵母細胞抽出液の調製

酵母を液体選択培地で波長600nmでの吸収が0.8-1.0になるように培養し、その1ml分の培養液から酵母を回収した。この酵母を氷冷したバッファーD（Dignam et al. 1983）に懸濁し、グラスビーズを液面まで加えた。このときバッファーDに1mM DTT, 0.2mM PAMSF, 1mM aprotinin, 1mM Leupeptin, 1mM Peptasratinをタンパク質分解酵素阻害剤として加えた。30秒間のヴォルテックスの後30秒間水中で冷やすことを1セットとし、これを3セット行った。遠心（5000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5分）して上清を回収した後、14000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15分間遠心し、その上清を酵母細胞抽出液とした。

20) β -ガラクトシダーゼ活性の測定

酵母の一晩培養液を液体選択培地で波長600nmでの吸収が0.25になるように希釈し、0.5-1.0になるまで培養した。この培養液1ml分の酵母を集めて600 μ lのZバッファーに懸濁し、そのうちの100 μ lを用いて波長600nmでの吸収を測定した。残りの500 μ lに40mlのクロロホルムと25mlの0.1%SDSを加え、10秒間ヴォルテックスした。その後5分間28 $^{\circ}$ Cで保温し、100 μ lの4mg/ml ONPG溶液（*o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド）を加えることにより反応を開始した。28 $^{\circ}$ Cで保温しながら5分間ごとに溶液の色をチェックし、薄い黄色になったら250 μ lの1M Na₂CO₃を加えて反応を停止させた。このとき反応時間を測定し、記録した。反応停止後上清を回収し、波長420nmでの吸収を測定した。 β -ガラクトシダーゼ活性は以下の計算式により算出した。

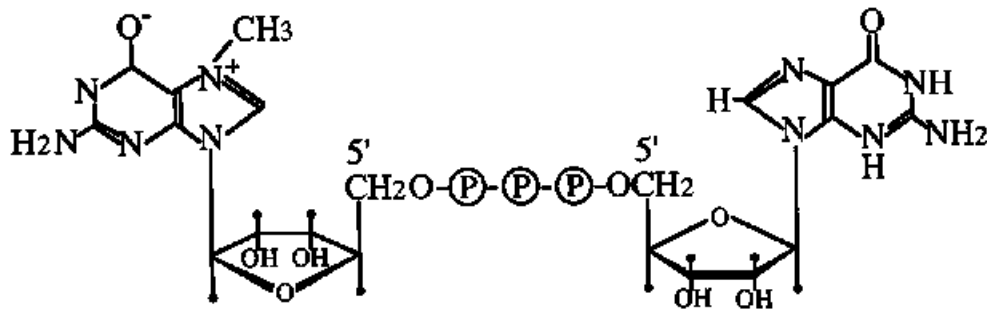
$$\text{OD}_{420} \times 1000 / (\text{OD}_{600} \times \text{反応時間})$$

第三章 結果

第一部 *in vitro*スプライシング反応におけるキャップ構造のスプライシング反応促進効果

序論でも述べた通り、キャップ構造はスプライシング反応に関与していることが示唆されていた (Krainer et al. 1984)。しかし、キャップ構造の及ぼす影響を考える場合、mRNA前駆体を安定化させるという効果を持つため、キャップ構造による影響が二次的なものであるという可能性が付きまとうことになる。そこで、我々の研究室では、キャップ構造の効果をmRNA前駆体の安定性と切り離して考えることのできる系として、二種類のキャップ構造類似体を用いたmRNA前駆体を用いたスプライシング反応系を開発した (Inoue et al. 1989)。すなわち通常のm⁷GpppNを用いてプライミングしたmRNA前駆体の他に、プライマーとしてApppGというジヌクレオチド (図10)を用いることにより安定性はほぼ変わらないmRNA前駆体を合成した (これ以後、このmRNA前駆体をキャップ構造を持たないmRNA前駆体と呼ぶことにする)。キャップ構造を持たないmRNA前駆体は、スプライシング反応中安定であるが、スプライシング効率が通常のキャップ構造を持つものより低いことが観察された (図11B、レーン6)。この結果、キャップ構造はスプライシング反応に積極的に関与し、促進することが示された。また序論でも述べたが、*in vitro*スプライシング反応は、スプライスソーム形成の後及び第一段階の反応後停止させることができる (Krainer and Maniatis 1985)。そこで、2種類の異なるキャップ構造を持つmRNA前駆体と*in vitro*スプライシング反応系を用いて、キャップ構造によるスプライシング反応促進効果がスプライシング反応のどの段階に見られるかを解析することにした。

m^7GpppG



ApppG

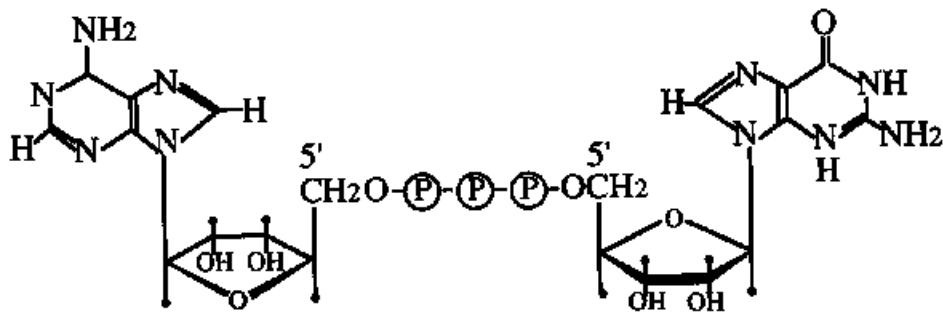


図10 二種類のキャップ構造類似体

*in vitro*転写反応の際にプライマーとして加えた二種類のジヌクレオチドプライマーの構造を示した。

第一節 単一のイントロンを持つmRNA前駆体の*in vitro*スプライシング反応におけるキャップ構造の効果

スプライシング反応を解析する上で最も簡単なモデル系として、二つのエクソンとその間のイントロンを持つmRNA前駆体を用いた*in vitro*スプライシング反応系が一般によく用いられる。我々の研究室では、ニワトリ δ -クリスタリン遺伝子由来のmRNA前駆体を用いている (Sakamoto et al. 1987)。このmRNA前駆体は*in vitro*スプライシング反応系において効率よくスプライシングを受ける (図 1 1 B、レーン 3)。この通常の核抽出液を用いた反応において、キャップ構造はスプライシングを数倍促進した (図 1 1 B、レーン 3 と 6)。前述の通り、*in vitro*スプライシング反応は、熱処理した核抽出液を用いることにより第一段階の反応後停止させることができる (Kraimer et al. 1985)。この系と 2 種類の異なったキャップ構造を持つmRNA前駆体を用いた*in vitro*スプライシング反応を行った。図 1 1 C に示したように、キャップ構造を持つmRNA前駆体では、スプライシング反応の第一段階の反応が効率よく起こり、その産物である 5'エクソンとラリアット反応中間体が観察された (レーン 3、4)。これに対してキャップ構造を持たないmRNA前駆体の場合、第一段階の反応はほとんど起こらず、5'エクソンやラリアット型反応中間体もほとんど観察されない (レーン 6-8)。このことから、キャップ構造によるスプライシング反応促進効果は、第一段階の反応までの過程において見られることが明らかになった。またこのとき、熱処理をしていない通常の核抽出液を用いた場合よりも、キャップ構造の有無によるスプライシング反応効率の違いが大きいことが観察された。

次に、このキャップ構造による促進効果が、さらに初期の過程であるスプライスソーム形成の過程までにみられるかどうかを調べた。*in vitro*スプライシング反応系では、反応系にEDTAを加えることにより、スプライシング反応をスプライスソーム形成の後で停止させることができる (Abmayr et al. 1988)。2種類のmRNA前駆体を用いたスプライシング反応系にEDTAを加え、その後グリセロールの密度勾配遠心法によりスプライ

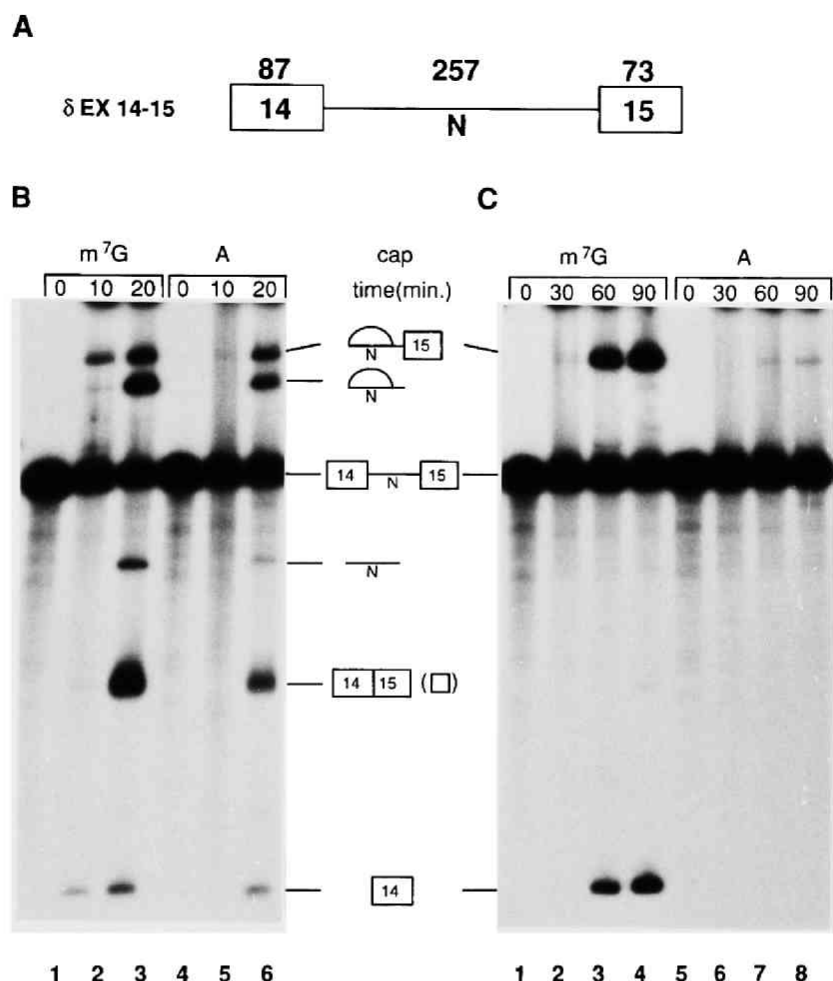


図11 単一のイントロンを持つmRNA前駆体の*in vitro*スプライシング反応におけるキャップ構造の効果

(A) 本節の実験に用いたmRNA前駆体の構造

エクソンを表す箱の中の数字および直線上のアルファベットは、それぞれニワトリ δ -クリスタリン遺伝子の特定のエクソンとイントロンを表す。各エクソン、イントロンの長さを各々の上にヌクレオチド長で示した。

δ EX14-15mRNA前駆体を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ 存在下で合成して反応に用いた。プライマーとしてm⁷GpppGを用いた場合をm⁷Gで、ApppGを用いた場合をAで示した。mRNA前駆体をHeLa細胞核抽出液と混合して30°Cで各レーンに示した時間保温し、RNA産物を8M尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後オートラジオグラムをとった。各RNA産物の構造を模式的に示した。

(B) 通常の*in vitro*スプライシング反応

(C) 熱処理した核抽出液を用いた*in vitro*スプライシング反応

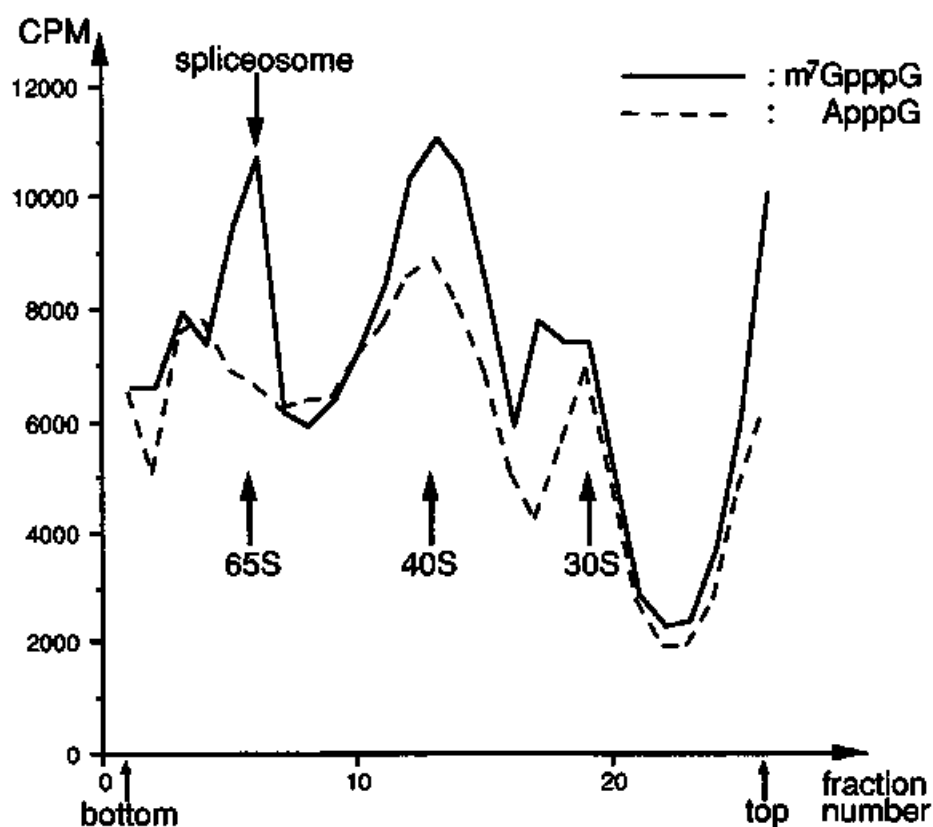


図 1 2 単一のイントロンを持つ mRNA 前駆体のスプライスソーム形成におけるキャップ構造の効果-I

通常の *in vitro* スプライシング反応液に EDTA を加えて 30℃ で 15 分間保温し、グリセロールの密度勾配遠心法を用いて反応液を分画した。その後各画分の放射活性を測定し、プロットした。グラフ中に各ピークの沈降係数を示し、スプライスソームを含むピークを矢印で示した。また、実線はキャップ構造を持つ mRNA 前駆体を用いた場合を表し、破線はキャップ構造を持たない mRNA 前駆体を用いた場合を表す。

スソームを分画し、放射活性を調べることによりスプライスソーム形成を観察した。キャップ構造を持つmRNA前駆体の場合、15分の段階では沈降係数が65S, 45S, 30Sの3つの複合体が観察された(図12)。65Sの画分に核抽出液とATPを新たに加えて保存すると効率よくスプライシング反応が起こったことから(データは示さず)、スプライスソームはこの画分に含まれていると考えられた。また、45Sの複合体にはスプライスソームの前駆体が含まれていると考えられ、30Sの複合体は非特異的な複合体であることが考えられる(Sawa et al. 1988)。30Sの複合体については、キャップ構造を持つmRNA前駆体と持たないmRNA前駆体の両方でみられた。しかし、45Sの複合体の形成はキャップ構造の有無によって少し差が見られ、65Sの複合体はこの段階ではキャップ構造を持つmRNA前駆体でのみ観察された(図12)。以前にスプライスソーム形成はキャップ構造により促進されることが示唆されていたが(Patzelt et al. 1987)、mRNA前駆体の安定性の問題が切り離せなかったため、キャップ構造が積極的に関与しているかどうかは明らかにされていなかった。今回我々の実験系を用いることにより、キャップ構造によるスプライシング反応促進効果は、スプライシング反応の最も初期の過程であるスプライスソーム形成の過程までに見られることがわかった。さらにこのスプライスソーム形成過程を詳しく解析するため、グリセロール密度勾配遠心法と同様にスプライスソームを分離する方法であるRNPゲル電気泳動を用いた(Konarska and Sharp 1986)。この方法は、mRNA前駆体と核抽出液をスプライシング反応条件下で混合し、非変性条件下でポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うものである。この実験系を用いて同様の解析を行った。図13に示すように、キャップ構造を持つmRNA前駆体ではスプライスソームの形成過程の特異的な複合体(complex A, B, C)が観察される(レーン2-6)。一方キャップ構造を持たないmRNA前駆体の場合は、最も初期の複合体であるAは少し弱い形成される。しかし、その後の複合体に移行するのが遅いことが明らかになった(レーン8-12)。このことより、キャップ構造による促進効果は、スプライスソーム形成過程においてもより初期の過程、すなわちcomplex Aの形成の過程かそれ以前にみられることが明らかになった。

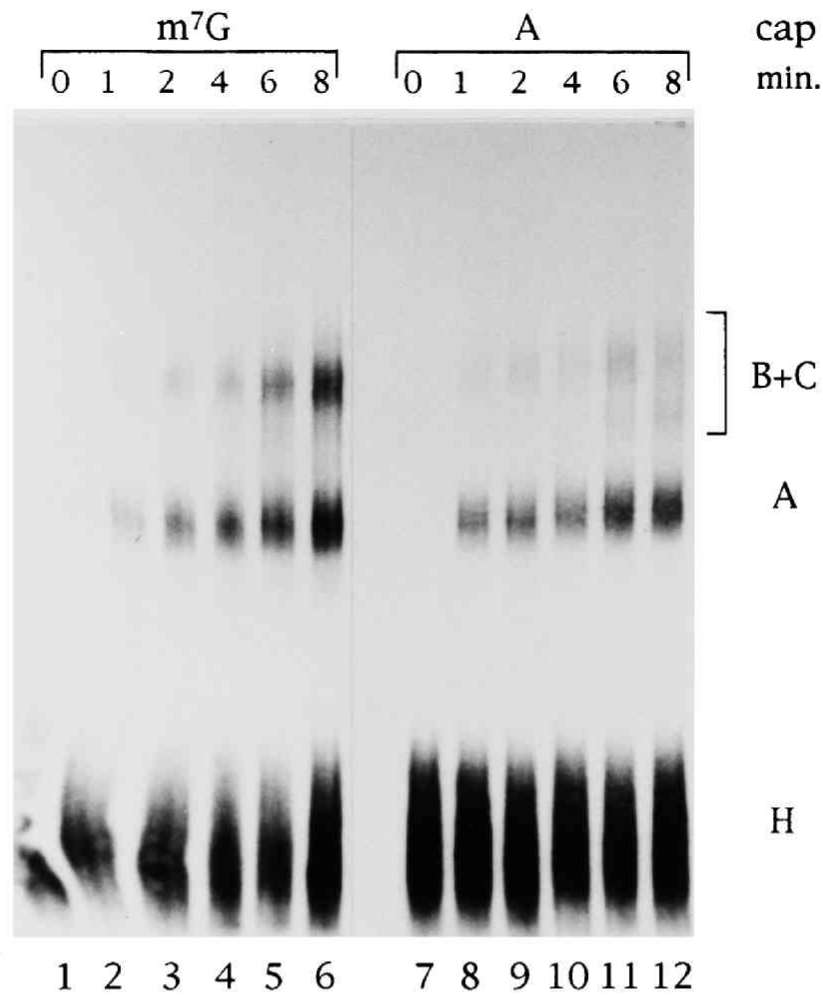


図13 単一のイントロンを持つmRNA前駆体のスプライスソーム形成におけるキャップ構造の効果-II

キャップ構造を持つmRNA前駆体 (m^7G) と持たないもの (A) を用いて通常の *in vitro* スプライシング反応を行なった後、 ψ パリンを加えて氷中に15分静置した。その後4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、スプライスソームの形成を観察した。スプライスソームのH、A、Bの複合体の位置を図の右に示した。

第二節 二つのイントロンを持つmRNA前駆体の*in vitro*スプライシング反応におけるキャップ構造の効果

単一のイントロンを持つmRNA前駆体の場合、キャップ構造によるスプライシング反応促進効果は、スプライシング反応のもっとも初期の過程であるスプライソーム形成までに見られることが明らかになった。キャップ構造によるスプライシング反応促進効果は、二つのイントロンを持つmRNA前駆体の場合、キャップ構造に近いイントロンすなわち上流側のイントロンにのみ見られる (Ohno et al. 1987, Inoue et al. 1989)。そこで、二つのイントロンを持つmRNA前駆体の場合にも同様の結果が得られるかどうかを調べた。この実験に用いたmRNA前駆体は、第一節で用いたmRNA前駆体が二つ重複した形になっている (図 1 4 A, Inoue et al. 1989)。これは二つのイントロンによってスプライシング反応効率が異なってしまふことを防ぐためであるが、イントロンの長さが全く同じであるため反応中間体の解析ができない。そこで、上流側のイントロン中に欠失を導入し、イントロンの長さを変えてある (図 1 4 A, Inoue et al. 1989)。この欠失を導入してもイントロンのスプライシング効率に変化がないことは予め確認してある (Inoue et al. 1989)。このmRNA前駆体を用いて、第一章の実験と同様にしてキャップ構造によるスプライシング反応促進効果がどの段階に見られるかを調べた。まず、何も処理をしていない正常な核抽出液を用いた*in vitro*スプライシング反応を行った。このmRNA前駆体を用いた場合、最終産物にいたる経路として、二通りのスプライシング経路が考えられる。すなわち、上流側のイントロンが先に除去される場合と (図 1 4 B 左側)、下流側のイントロンが先に除去される場合 (図 1 4 B 右側) である。図 1 5 に示すように、キャップ構造を持つmRNA前駆体では、上流側のイントロンが除去された産物 (図中○印) が効率よく産生され、最終産物である三つのエクソンが連結したmRNA (図中□印) がより早く蓄積するのが観察された (レーン 3、4)。しかし、キャップ構造を持たないmRNA前駆体を用いた場合、下流側のイントロンが除去された産物 (図中△印) の産生はキャップ構造を持つmRNA前駆体の場合と変わらないかそれ以上であ

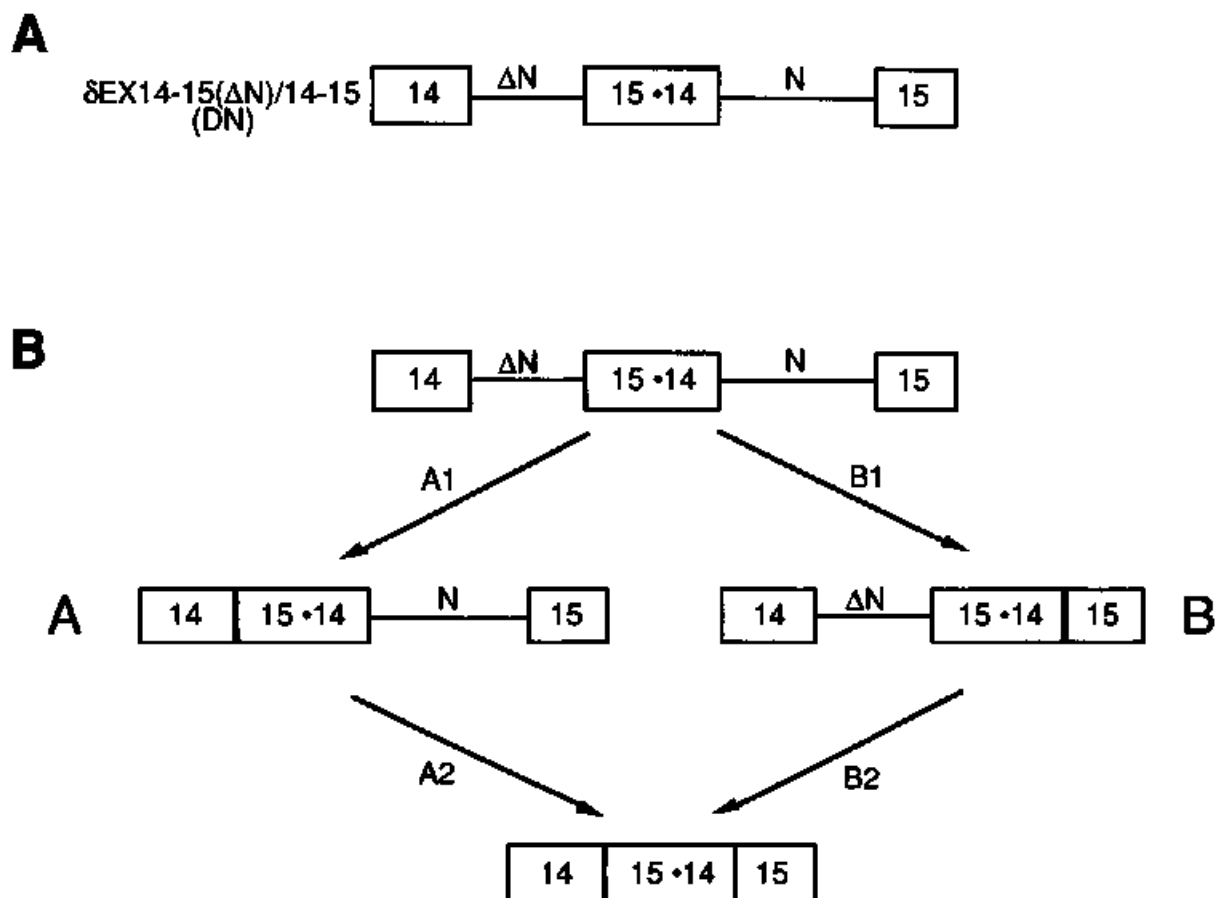


図14 二つのイントロンを持つmRNA前駆体とそのスプライシング経路

(A) 本節の実験に用いたmRNA前駆体の模式図

本節で用いたmRNA前駆体の構造を模式図で図11と同様に示した。上流側のイントロンには欠失を導入してある。

(B) 本節で用いたmRNA前駆体を例にとり、三つのエクソンと二つのイントロンを持つmRNA前駆体からmRNAが産生される経路を模式的に示した。A型のRNA産物を経由する左側の経路は上流側のイントロンが先に除去される経路を示し、B型を経由する右側の経路は下流側のイントロンが先に除去される経路を示す。

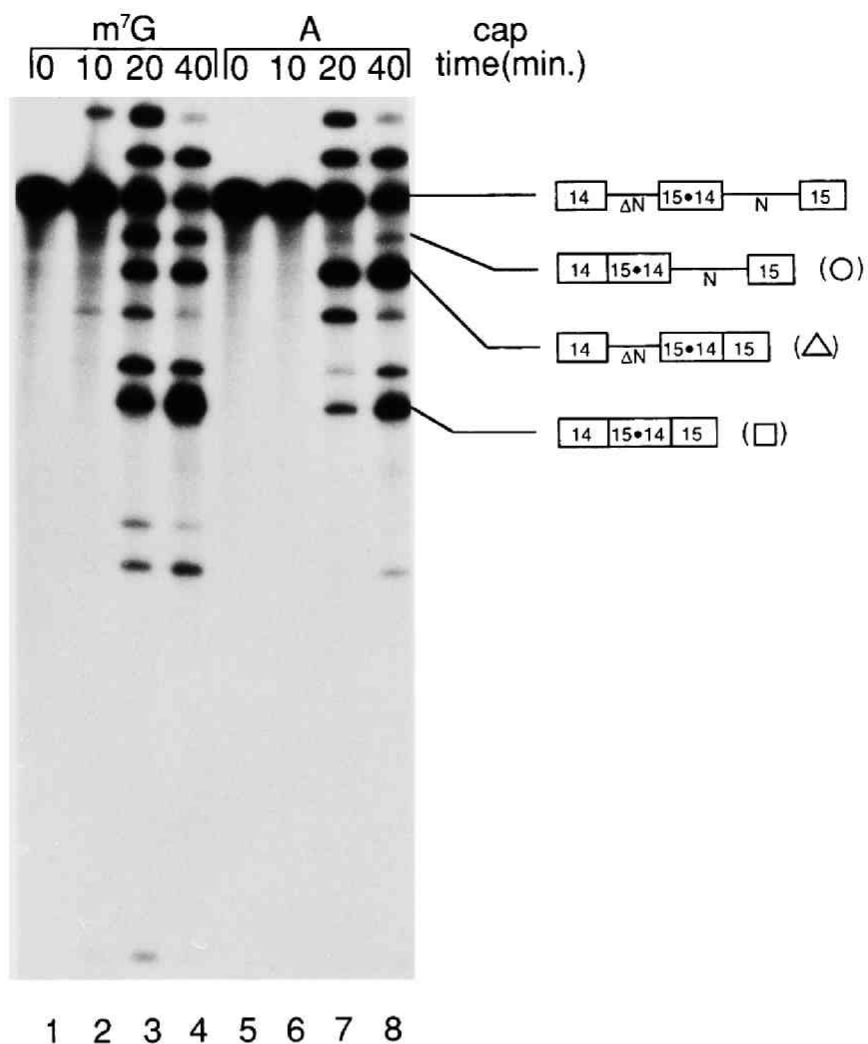


図15 二つのイントロンを持つmRNA前駆体の*in vitro*スプライシング反応におけるキャップ構造の効果-I

δ EX14-15 Δ N/14-15(DN)mRNA前駆体を、 $[\alpha -^{32}\text{P}]$ 存在下でプライマーとして m^7GpppG または ApppG を用いて合成し、反応に用いた。これらのmRNA前駆体を HeLa細胞核抽出液と混合して30℃で各レーンに示した時間保温し、8M尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析後オートラジオグラムをとった。主要なRNA産物の構造を図の右側に模式的に示した。

るにもかかわらず、上流側のイントロンが除去された産物の産生はほとんど見られなかった。さらに、それと同時に、最終産物の蓄積もキャップ構造を持つmRNA前駆体の場合と比べて遅いことが観察された。(レーン7、8)。欠失を下流側のイントロンに導入したmRNA前駆体を用いても同様の結果が得られたことから(データは示さず)、イントロンに導入した欠失によるものではないと考えられる。これらのことより、キャップ構造によるスプライシング反応促進効果は、上流側のイントロンにのみ及ぶことが示された。次に、このキャップ構造による効果が、スプライシング反応の第一段階の反応までにおいて見られるかどうかを調べた。熱処理した核抽出液とこのmRNA前駆体を用いて*in vitro*スプライシング反応を行った場合、やはり二つの経路が考えられる(図16)。上流側のイントロンで第一段階の反応が起こる場合と下流側のイントロンで第一段階の反応が起こる場合である。いずれの場合も、最終産物として5'エクソン(エクソン14)と二種類のラリアット型反応中間体が観察されると期待される(図16)。実際に反応を行ったところ、図17に示すように、キャップ構造を持つmRNA前駆体では、上流側のイントロンで第一段階の反応が起こった産物(図中●印)と下流側のイントロンで反応が起こった産物(図中■印)の両方が観察されたが(レーン3、4)、キャップ構造を持たないmRNA前駆体の場合は下流側のイントロンで反応が起こった産物しか観察されなかった(レーン7、8)。このことから、単一のイントロンを持つmRNA前駆体で見られたのと同様に、キャップ構造による促進効果はスプライシング反応の第一段階の反応までに見られることが明らかになった。また、キャップ構造を持つmRNA前駆体でのみ、図中*印で示した産物が観察された(レーン3、4)。この産物をポリアクリルアミドゲルから回収し、その構造を解析したところ、上流側と下流側の両方のイントロンで第一段階の反応が起こった産物で、キメラエクソン(エクソン15-14)を持つラリアット型反応中間体であることが明らかになった(データは示さず)。前述の通り、これはこの反応系における最終産物であることから、キャップ構造が存在するmRNA前駆体では、上流側のイントロンでの反応が効率よく起こり、その後下流側のイントロンでも反応が起こると考えられる。その根拠は、キャップ構造を持つmRNA前駆体の場合、

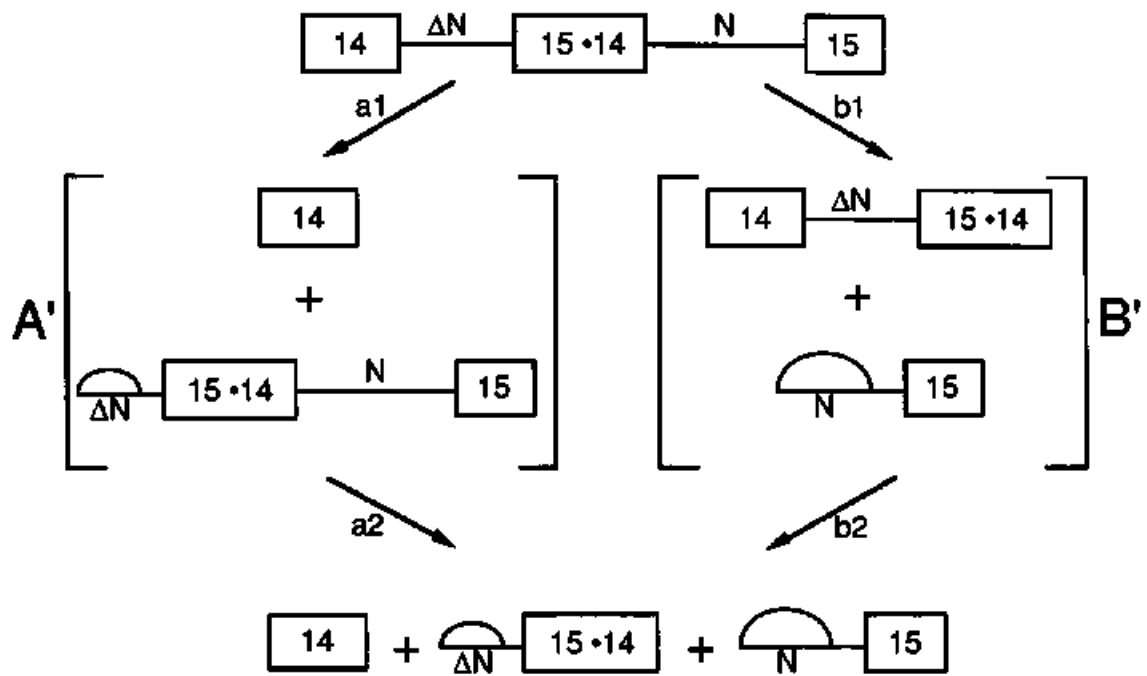


図16 二つのイントロンを持つmRNA前駆体の第一段階の反応経路

本節で用いたmRNA前駆体を例にとり、二つのイントロンを持つmRNA前駆体の第一段階の反応の二通りの経路を図14と同様に示した。

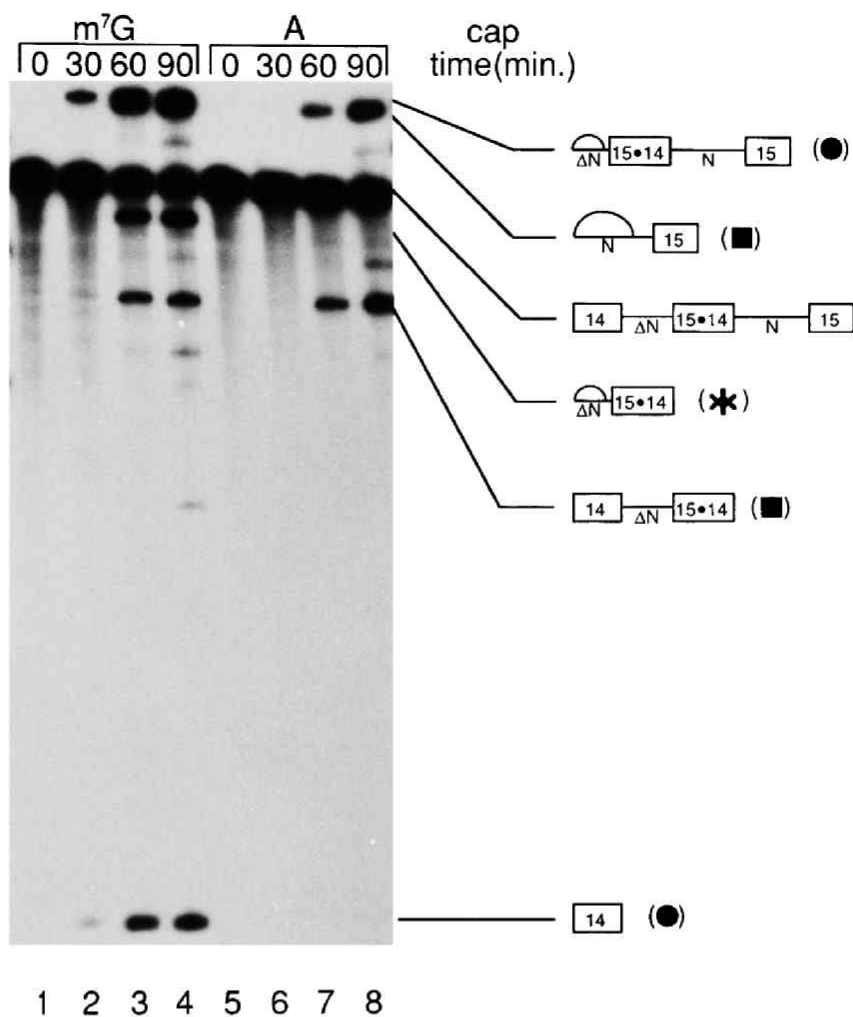


図 1 7 二つのイントロンを持つmRNA前駆体の*in vitro*スプライシング反応におけるキャップ構造の効果-II

δ EX14-15 Δ N/14-15(DN)mRNA前駆体を熱処理したHeLa細胞核抽出液と混合し、30°Cで各レーンに示した時間保温した後、図 1 5と同様の解析を行なった。主要なRNA産物の構造を図の右側に模式的に示した。

上流側で反応が起こった産物（図中●印）が、下流側の産物よりもより早く観察されるということである（レーン2）。また、下流側のイントロンでの反応は、キャップ構造の有無に関係なく同程度に起こることから、キャップ構造による促進効果は上流側のイントロンにのみ及ぶことが明らかになり、さらに、二つのイントロンにおいてスプライスソーム形成は独立に起こることが示唆された。

第二部 核内キャップ構造結合因子

第一節 核抽出液の処理とキャップ構造結合活性

序論でも述べたが、核抽出液をあらかじめキャップ構造類似体で処理すると、キャップ構造によるスプライシング反応促進効果は見られなくなる (Edery and Sonenberg 1985)。また、アフリカツメガエルの卵母細胞核への微量注入実験においても、キャップ構造を持つ competitor RNA を同時に注入すると促進効果が見られなくなる (Inoue et al. 1989)。これらの現象は、キャップ構造による促進効果は、核内に存在するキャップ構造認識因子によって担われていることを強く示唆するものである。そこで筆者らは、RNA をプローブとするゲル移動度シフト法を開発することで、キャップ構造に特異的に結合するタンパク質を HeLa 細胞核抽出液中に同定し、ほぼ homogeneity にまで精製した (Ohno et al. 1990)。さらに、このタンパク質は、既知のスプライシング因子である U2-snRNP と部分的にはあるが会合していることが免疫沈降実験から明らかになり (Ohno et al. 1990)、キャップ構造によるスプライシング反応促進効果を担う因子の候補と考えられた。第一章で行った実験から、熱処理した核抽出液や EDTA を加えた核抽出液でもキャップ構造による促進効果は見られることが明らかになった。そこで、このキャップ構造結合タンパク質が、第一章での実験の条件下でもキャップ構造に結合しているかをゲル移動度シフト法を用いて調べた。

まず、熱処理した核抽出液を用いてゲル移動度シフト法を行った。HeLa 細胞核抽出液を 45°C で様々な時間熱処理し、ゲル移動度シフト法に用いた (材料と方法参照)。熱処理を 10 分間行った核抽出液を *in vitro* スプライシング反応に用いると、スプライシング反応は第一段階の反応の後停止する (図 1 1 C)。この条件の HeLa 細胞核抽出液をゲル移動度シフト法に用いたところ、キャップ構造への結合活性は熱処理していないものと同程度に見られた (図 1 8、レーン 7)。さらに、熱処理の時間を 20 分まで長くしても結合活性は失われなかった (レーン 1 2)。

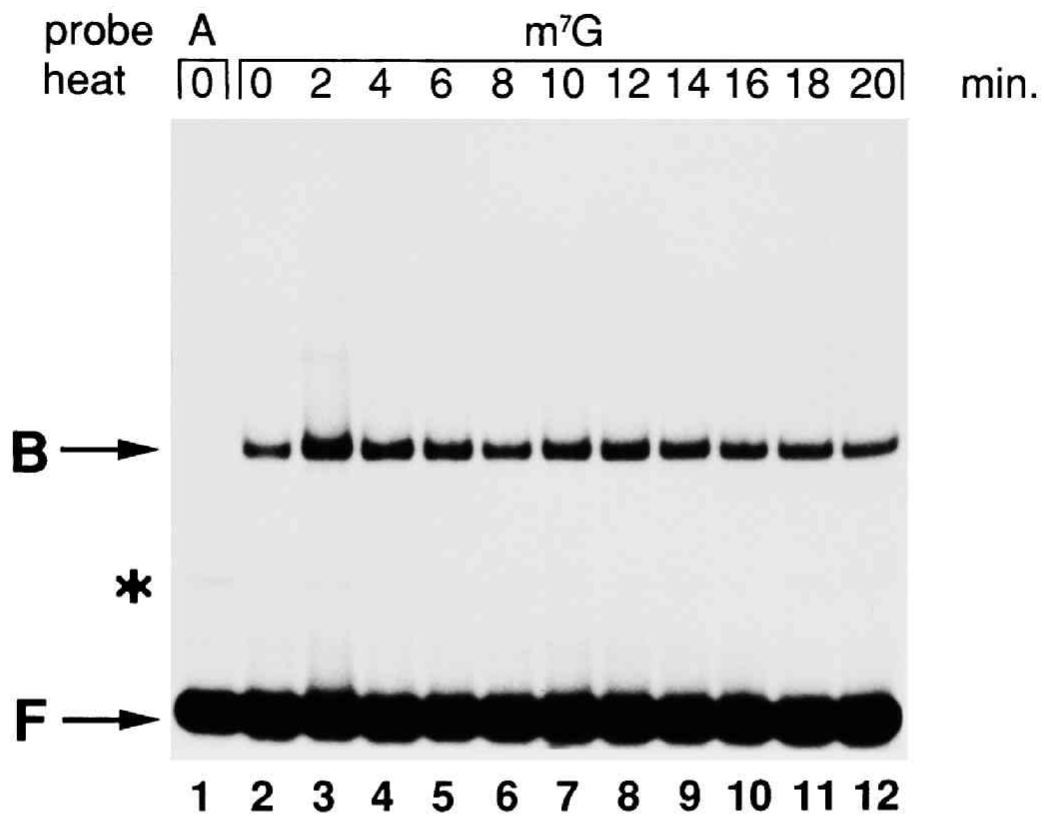


図 1 8 熱処理した核抽出液を用いたゲル移動度シフト法

45°Cで各レーン上に示した時間熱処理したHeLa細胞核抽出液を用いてゲル移動度シフト法を行なった。キャップを持つプローブをm⁷G、持たないプローブをAで表した。図中Bで示したバンドがキャップ構造結合タンパク質によってシフトしたバンドであり、Fで示したバンドがフリーのプローブのバンドである。なお、*で示したバンドはフリーのプローブの二次構造の異なるもののバンドである。

次に、ゲル移動度シフト法の反応液中に様々な濃度のEDTAを加え、キャップ構造結合活性への影響を調べた(図19)。*in vitro*スプライシング反応は、反応液中に2.5mMのEDTAを加えるとスプライスソーム形成の後反応が停止することが知られている(Abmayr et al. 1988)。しかし、この条件下でも、キャップ構造への結合活性は失われなかった(レーン5)。さらに、EDTA濃度を4mMまで上昇させても活性に変化はなかった(レーン7)。また、あらかじめ核抽出液をEDTAで処理してからゲル移動度シフト法を行っても同様の結果が得られた(データは示さず)。

以上の結果から、このキャップ構造結合タンパク質は、熱処理した核抽出液中でもEDTAを加えた核抽出液中でも、キャップ構造に結合していることが明らかになった。このキャップ構造結合タンパク質はスプライシング反応中にmRNA前駆体のキャップ構造に結合していると考えられ、キャップ構造よるスプライシング反応促進に関与していることが示唆された。

第二節 核内キャップ構造結合タンパク質のcDNAのクローニング

前節で述べたように、我々がHeLa細胞核抽出液中に同定し、精製した核内キャップ構造結合タンパク質は、キャップ構造によるスプライシング反応促進効果を担う因子の候補である。そこで、この因子を解析することがキャップ構造によるスプライシング反応促進の機能の解明につながると考え、この因子のcDNA配列の決定を試みた。まず、このタンパク質のアミノ酸配列を決定するため、HeLa細胞核抽出液からこのタンパク質を精製を試みた。精製方法はおもにOhnoら(1990)の方法に従った。アミノ酸配列を決定する場合、標品をできるだけ多くした方がそこから得られる情報は多いと考えられる。そこで、最終段階のカラムクロマトグラフィーであるアフィニティクロマトグラフィーには少し変更を加えた。Ohnoらの方法では、キャップ構造を持ったRNAを*in vitro*で合成し、カラムクロマトグラフィーの担体にシアノジェンブロマイド(CNBr)を用いて結

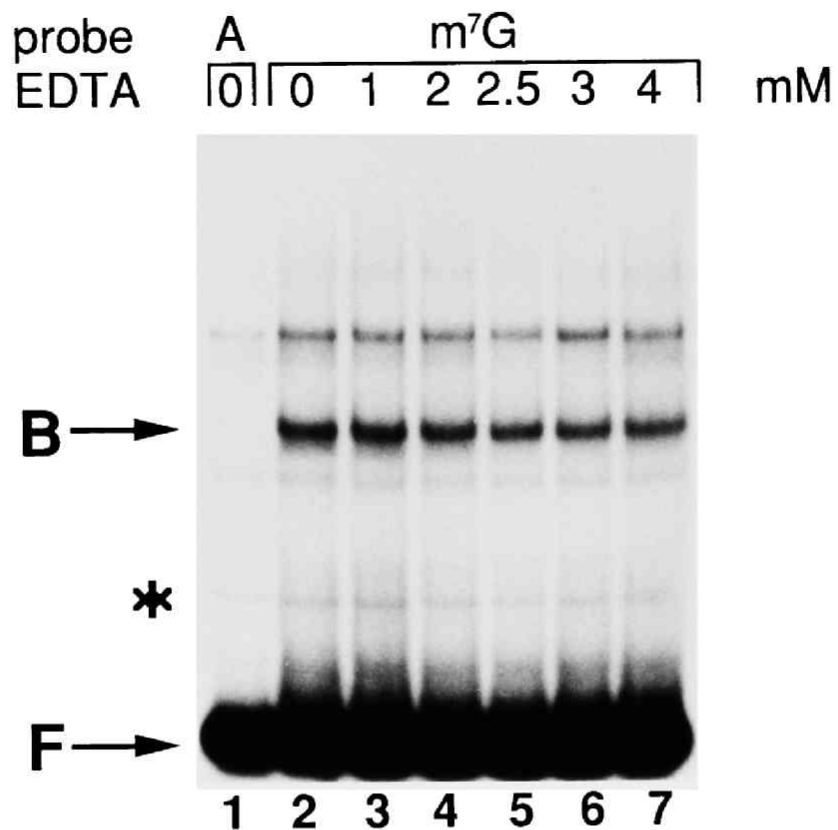


図19 EDTA存在下でのゲル移動度シフト法

各レーン上に示した濃度になるように反応液中にEDTAを加え、ゲル移動度シフト法を行なった。プローブの表記および図中に記号で示すバンドは図18と同様である。

合させることにより作製した (Ohno et al. 1990)。しかし、この方法では、CNBrは劇薬であるため、キャップ構造が影響を受けて構造が変化していることも考えられる。また、RNAのどの部分が担体に結合するかわからないため、キャップ構造のごく近傍が担体に結合する可能性もある。このキャップ構造結合タンパク質は細胞質キャップ構造結合タンパク質eIF-4Eとは異なり、 m^7 GTP-セファロースには結合しないことがわかっていた (データは示さず)。これはこのタンパク質の結合には”スパーサー”部分となるRNAが必要だからと考えられる。そこで、より穏和な条件を用いて、この”スパーサー”部分を確保するカラムクロマトグラフィーを作ることにより、精製効率を上げることができると考えて、アビジン-ビオチン複合体を用いたカラムクロマトグラフィーを作製した (図 20)。 *in vitro*でRNAを合成する際、UTPの一部をアミノアリルUTP (AA-UTP, Sigma) にしておく。AA-UTPはポリメラーゼの基質として取り込まれるため、RNAはそのウラシルの配列のうちいくつかはAA-UTPを持つことになる。そしてこのRNAを RubyとAbelsonの方法 (1988) に従ってNHS-LC-biotin (Pierce Chemicals) でアミノアリルウリジン残基をビオチン化する。そしてこのRNAをストレプトアビジンアガロースに結合させる。この様にして作製されたカラムクロマトグラフィーは、CNBr法に比べて 2-3 倍の結合能があった (データは示さず)。

Ohnoら (1990) の方法とこのアフィニティクロマトグラフィーを用いて、細胞濃度が 1mlあたり 5×10^5 個のHeLa細胞培養液100リットル分の核抽出液から、およそ $20 \mu\text{g}$ の核内キャップ構造結合タンパク質 (Nuclear Cap Binding Protein, NCBP) を精製した (図 21A)。このタンパク質は分子量約80キログルトンで、キャップ構造を持つRNAに効率よく結合した (図 21B)。このNCBPのアミノ酸配列を解析するため、トリプシンとリジルエンドペプチダーゼで分解し、その産物を逆相カラムクロマトグラフィーで分画した。その画分のうち、いくつかについてアミノ酸配列を決定した。そのオリゴペプチドの一覧を表5に示した。これらのアミノ酸配列を元にしてプライマーを合成し、HeLa細胞由来のポリ(A)⁺RNAを用いた逆転写ポリメラーゼ伸長反応 (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction) を行った。数十種の組合せ中、一つの組

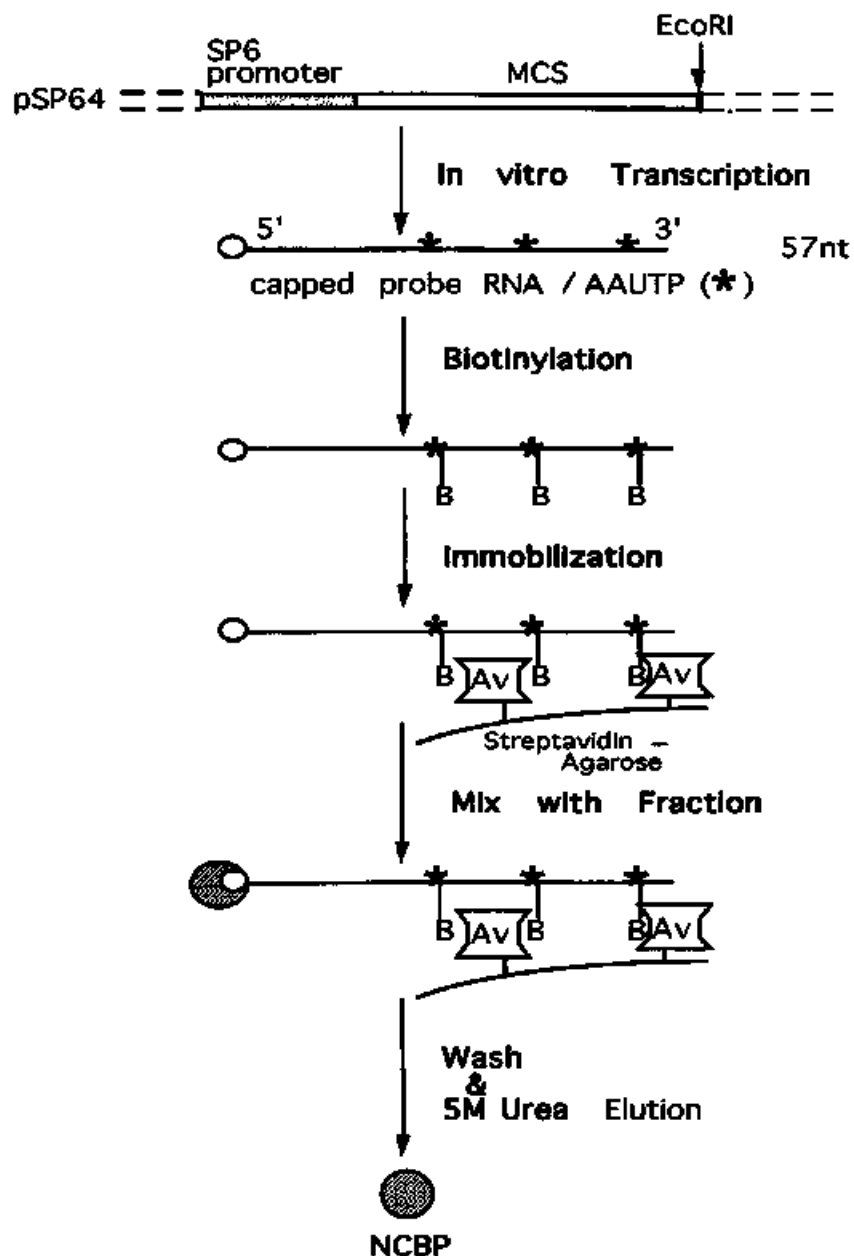


図20 核内キャップ構造結合タンパク質の精製に用いたアフィニティカラム

ゲル移動度シフト法に用いるプローブRNAをアミノアルルUTP存在下で合成し、ビオチン化試薬でビオチン化した(材料と方法参照)。その後ストレプトアビジンアガロースに固定化し、アフィニティカラムとした。このカラムを粗精製画分と混合した後バッファーでよく洗浄し、5M尿素を含むバッファーで溶出した。

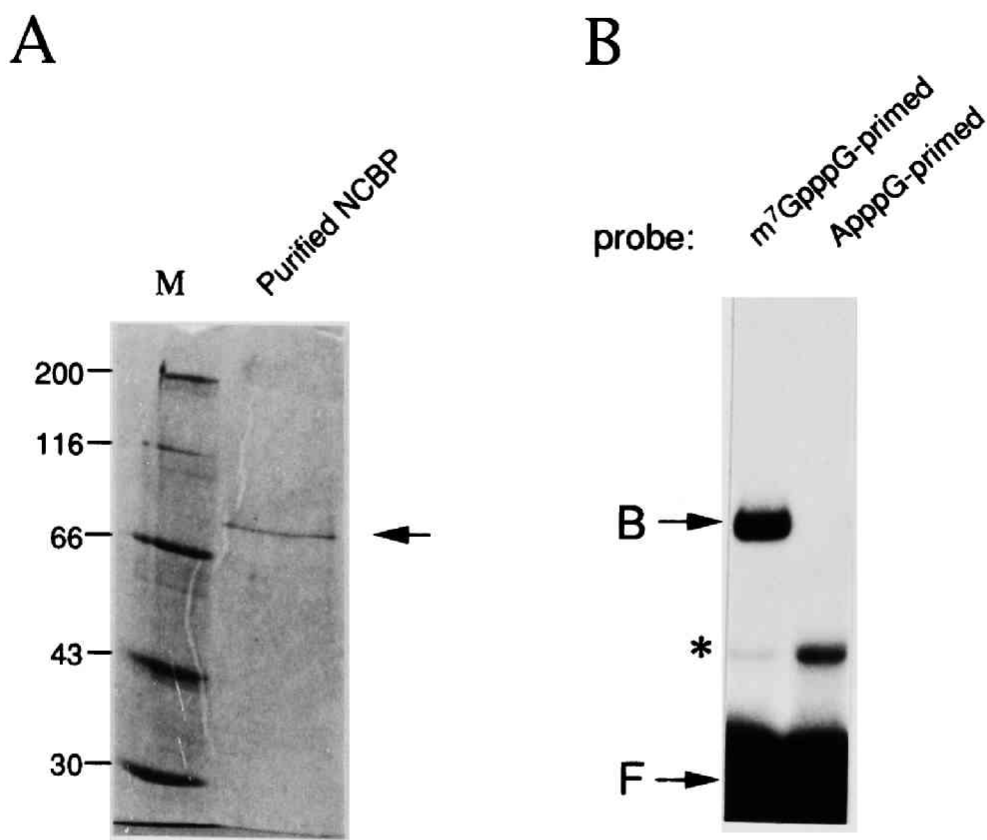


図 2 1 精製したNCBPを用いたSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動とゲル移動度シフト法

(A) 精製したNCBP150ngを用いて10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、クーマシーブリリアントブルーで染色した。マーカーの分子量を左に示した。約80キロダルトンのNCBPのバンドを矢印で示した。

(B) 精製したNCBP10ngを用いたゲル移動度シフト法。図中に記号で示すバンドは図18と同様である。

合せて長さ160塩基対の断片が増幅された（データは示さず）。クローニング後塩基配列を調べると、両端のプライマー配列の他に、アミノ酸配列の解析で明らかになった別のオリゴペプチドがコードされていた。このことから、この断片はNCBPのcDNA断片であることが明らかになった。そこでこの断片をプローブとしてHeLa細胞由来のcDNAライブラリーをスクリーニングし、2.9kbのcDNAクローンを単離した。このcDNAは790アミノ酸、計算上の分子量91734ダルトンのタンパク質をコードしていた。そして、そこから予想されるアミノ酸配列の中には、アミノ酸配列の解析から明らかになったオリゴペプチドのほとんどを含んでいた（図22）。このcDNAはNCBPのコード領域をすべてカバーしていると思われる。その理由として、最初のコドンと思われるメチオニンから上流に同じフレームで停止コドンが存在すること（図22）、また、2.9kbというサイズがノーザンプロット解析（図24）から得られたmRNAサイズとほぼ一致すること（ポリ(A)配列の長さが平均的な長さの200塩基と仮定した場合）が挙げられる。アミノ酸配列の解析から明らかになったものの中で、二つのアミノ酸配列がこのcDNAがコードする中に含まれていなかった。これはNCBPと会合している何らかのタンパク質の標品への混入が考えられた。これについては後で述べることにする。予想されるアミノ酸配列上の特徴としては、N末端に電荷を持ったアミノ酸が連続する領域があること、また、C末端三分の一の領域内にアスパラギン酸が連続する領域が存在することであった（図22）。また、データベースを用いてホモロジー検索をしたところ、NCBPのまん中から後半にかけての領域に、出芽酵母の解糖系の遺伝子の発現に必要な遺伝子であるGCR3（Uemura and Jigami 1992）と相同性があった（図23）。GCR3についても、その機能についての情報がないため、この相同性からNCBPの機能について類推することはできなかった。また、GCR3の突然変異体に対してNCBPのcDNAをトランスフォーメーションしても相補しなかったため（データは示さず）、この二つのタンパク質の相同性が何を意味しているのかは今のところ明らかにされていない。

前述の通り、NCBPのmRNAは、おもに3.1kbのものが発現していた（図24）。他に発現量は少ないが5.4kbのmRNAの発現が見られた（図24）。このmRNAは、HeLa細胞

Peptide	Sequence
LT-10	IEENXH
LT-11	LSYHQK
LT-12-1	DXXQE
LT-12-2	LLPEK
LT-17	FHEVFK
LT-19	DGVLEEQIE(R)
LT-22	TDWDAGFK
LT-24	SDSYVELSQY
LT-25	SFSHSFSALAK
LT-26	IFANTESYLK
LT-27	ANNYNEAVYLVR
LT-28	MFDYTDDPEGPVMP(G)
LT-29	NHPQ
LT-30	DVPNPNQDDDDDEGFS(F)(N)
LT-31	(V)MFEV(W)
LT-33	ATNDE(I)(F)
LT-36	NYNFGGEFVEAMI
LT-38	LFV(W)ELXSTI(R)

表5 精製したNCBPを用いた解析から明らかになったアミノ酸配列

逆相クロマトグラフィーにより分取したペプチド画分のうち（材料と方法参照）、アミノ酸配列が明らかになったものについてその番号と配列を示した。アミノ酸配列は一文字表記で示し、解析できなかったアミノ酸はXで示した。また、（）をつけたアミノ酸はそのアミノ酸である可能性が強いものである。

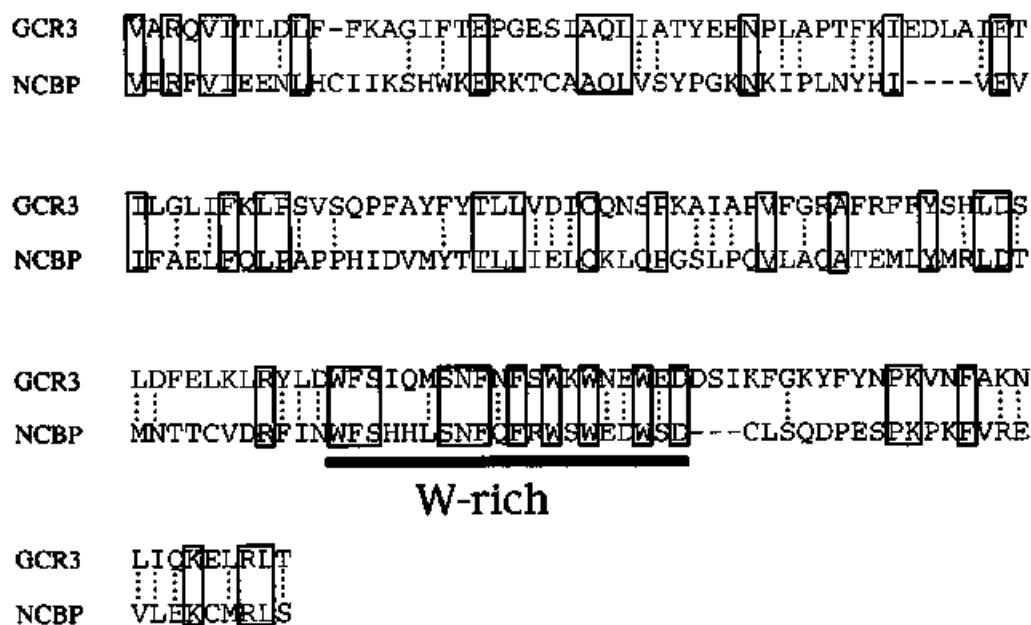


図 2 3 NCBPとGCR3の相同性

NCBPとGCR3の相同性が見られる部分を示し、特に相同性が高い部分に下線を施した。アミノ酸配列は一文字表記とし、同一のアミノ酸は四角で囲んだ。また、類似のアミノ酸を点線で結んだ。

全体から調製したポリ(A)⁺RNAを用いても（図24、Total）、HeLa細胞細胞質画分から調製したポリ(A)⁺RNAを用いても見られたため（図24、Cytoplasmic）、mRNA前駆体の混入ではないと考えられる。NCBPのcDNAから数種類のアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドを合成し、ポリ(A)⁺RNAと混合してRNase Hにより切断した後同様のノーザンブロット解析を行ったところ、この5.4kbのmRNAは3'非翻訳領域が3.1kbのmRNAよりも2.3kb長いことが示された（データは示さず）。また、サザンブロット解析から、NCBPの遺伝子のコピー数は少ないこと、ニワトリにも相同性の高い遺伝子が存在することが示された（図24）。筆者らは、ニワトリの脳細胞の核抽出液やマウスB細胞核抽出液中に、HeLa細胞核抽出液と同様の活性が存在することを観察していることから（データは示さず）、NCBPは生物種において広く保存されていることが示唆される。

第三節 NCBPの細胞内局在とそのシグナル

前述のように、NCBPはmRNAスプライシング反応かmRNAの輸送、あるいはその両方に関与する因子の候補である。そこで、この因子の細胞内局在を調べることは大きな意味があると考え次のような実験を行った。この実験のためには、NCBPを特異的に認識する抗体が必要であるが抗体はこの段階では得られていなかった。そこで、発現タンパク質にエピトープをつけ、このエピトープに対する特異的な抗体を用いて検出するというエピトープタグging法を用いた。このエピトープとして、T7ファージのgene10タンパク質のN末端の12アミノ酸を用いた。NCBPのcDNAの5'末端にこのエピトープをコードするオリゴデオキシヌクレオチドを付け、このcDNAをペプチド伸長因子（Elongation Factor）1- α のプロモーター（Mizushima and Nagata 1990）の下流に連結した（図25）。そしてこのプラスミド、pEF/BOS-T7NCBPをHeLa細胞にリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションした。24時間後に細胞を回収し、核抽出液と細胞質画分を調製した。まず、このエピトープに対する抗体（anti-T7 tag antibody, Novagen）の特異性とタグを付けたNCBPの局在を調べるために、これらの画分を用いたウェスタンブロット解析を行っ

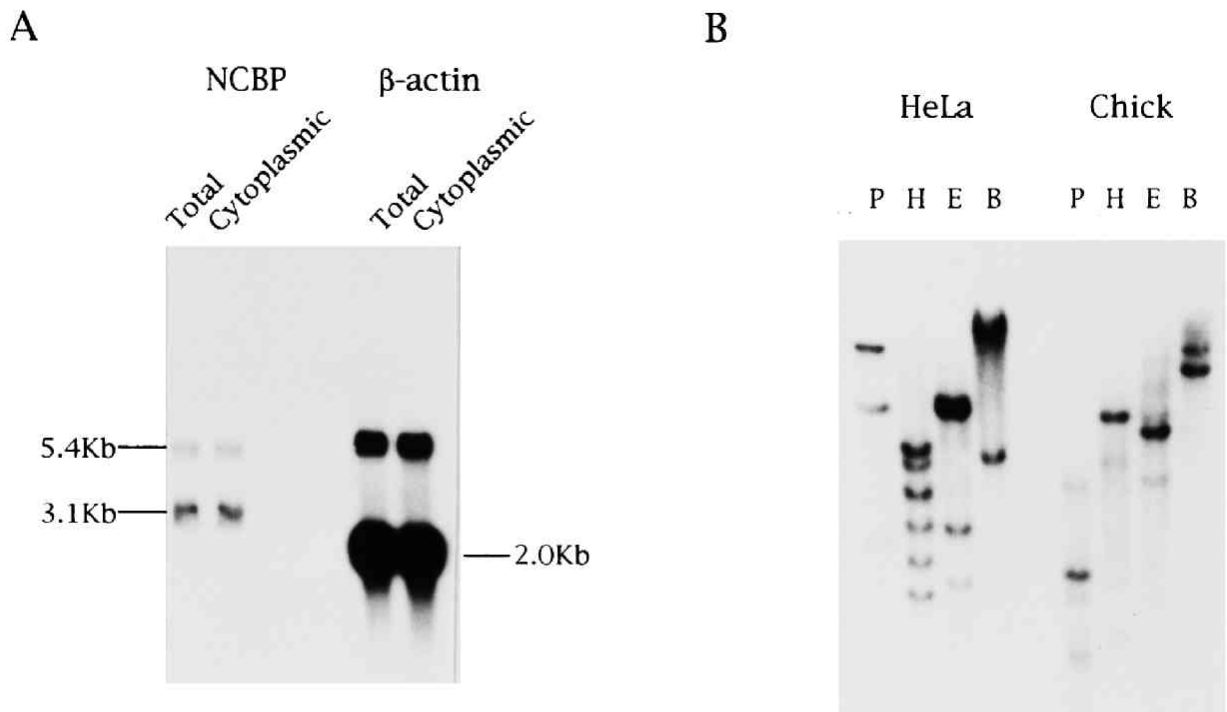


図 2 4 NCBPのcDNAを用いたノーザンブロットとサザンブロット

(A) HeLa細胞全RNA (Total) または細胞質RNA (Cytoplasmic) から調製したポリ(A)⁺RNAを用いたノーザンブロット。対照として β -アクチンのcDNAを用いた。

(B) HeLa細胞 (HeLa) またはニワトリ脳細胞 (Chick) 由来のゲノムDNAを用いたサザンブロット。図中の略号は用いた制限酵素を表しており、それぞれ以下のとおりである。P: Pst I、H: Hind III、E: Eco RI、B: Bam HI

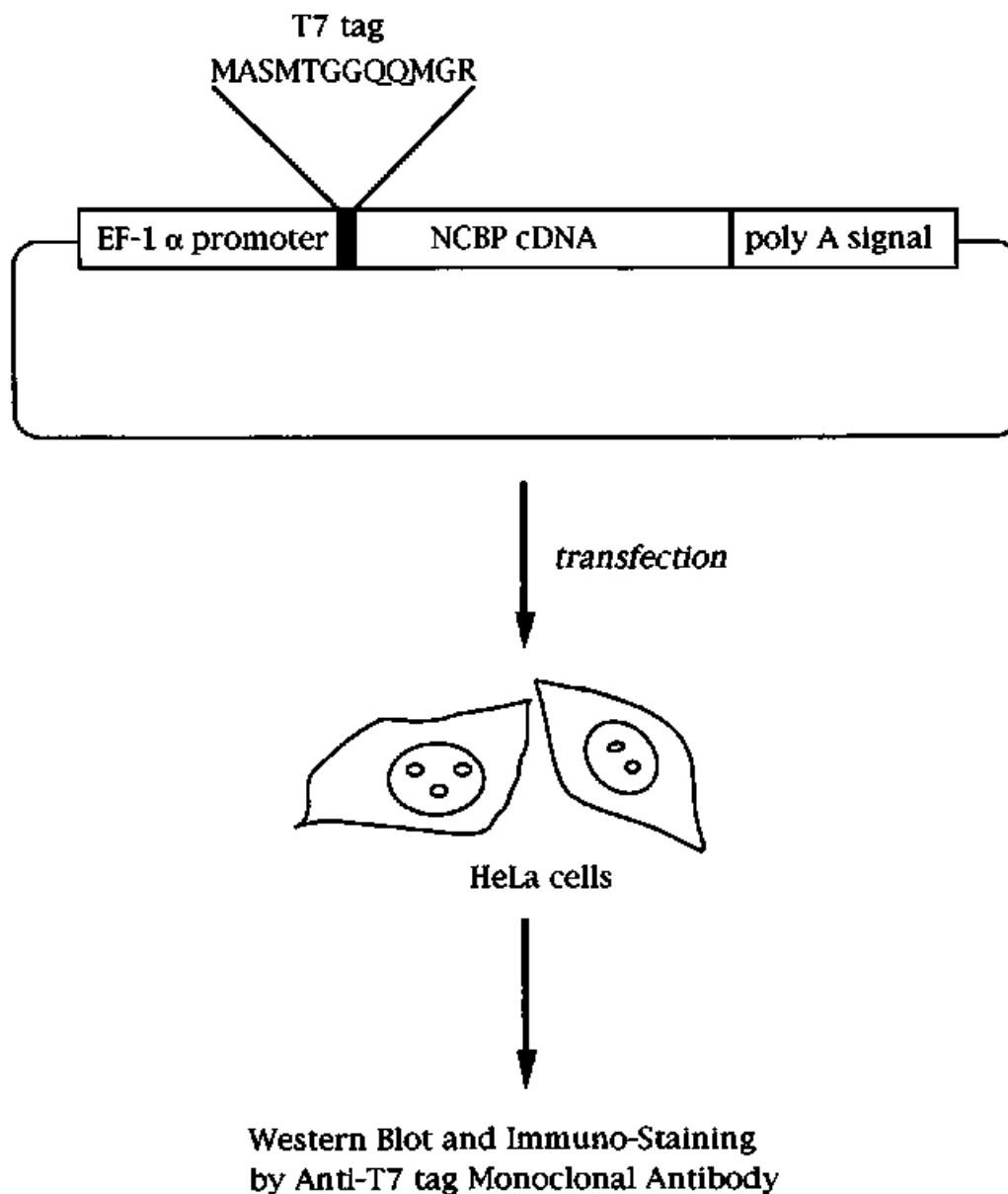


図 2 5 エピトープタグを用いたNCBPの細胞内局在性の解析法

T7ファージのgene10タンパク質のN末端の12アミノ酸をコードするオリゴデオキシヌクレオチドをNCBPのcDNAの5'末端に連結した。そしてその断片をタンパク質伸長因子1- α (Elongation Factor 1- α) のプロモーターの下流に挿入した。このプラスミドをHeLa細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収してウェスタンブロットや蛍光染色に用いた。

た。この抗体は目的のタンパク質を特異的に認識することができ、バックグラウンドは非常に低いことがわかった（図26左）。さらに、NCBPの局在を調べると、核抽出液と細胞質画分の両方に検出された（図26左）。しかし、この時同時に抗hnRNP C抗体（Choi and Dreyfuss 1984）を用いて同様の実験を行ったところ、hnRNP Cタンパク質も両方の画分に存在することが明らかになった（図26右）。hnRNP Cタンパク質は核内に局在することが報告されているため（Choi and Dreyfuss 1984）、この結果は分画操作中に核から細胞質画分にもれたと考えられる。また、エピトープを付けたNCBPの計算上の分子量は80キロダルトンよりも少し大きい（92キロダルトン）が、このウェスタンプロット解析ではSDSゲル電気泳動において精製標品と同じ約80キロダルトンを示した。

次に、この抗体を用いて、トランスフェクションしたNCBPの細胞内での局在を調べた。タグ付きのNCBPをトランスフェクションしたHeLa細胞をこの抗体で染色すると、核小体を除く核、すなわち核質が特異的に染まることが明らかになった（図27）。一方、ベクタープラスミドをトランスフェクションしたHeLa細胞では何のシグナルも観察されなかった（図27）。このNCBPの染色パターンは、核質に存在するタンパク質であるhnRNP Cに対する抗体でHeLa細胞を染色したときのパターンと非常によく似ており（図27）、NCBPが核質内に局在することを強く示唆している。さらに、C末端から様々な長さの欠失を導入したNCBPのcDNAを用いて同様の実験を行い、NCBPの核局在シグナルがどの部分にあるかを調べた。その結果、N末端から70アミノ酸の領域しか持たないNCBPも核内に局在できることが明らかになった（図28A）。また、この70アミノ酸の領域を欠失させたcDNAを用いて実験を行ったところ、このタンパク質は核に移行することができず、細胞質に留まっていることが明らかになった（図28A）。これらのことから、N末端の70アミノ酸領域にNCBPの核局在シグナルが存在することが示された。

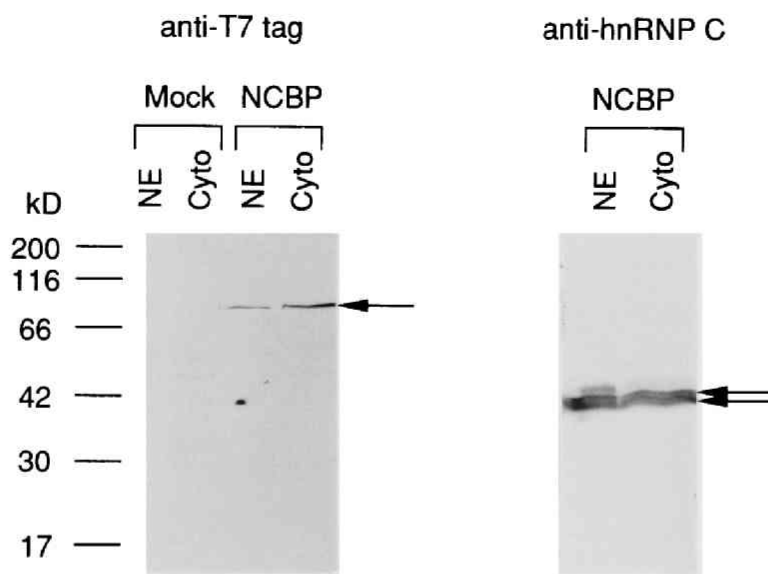


図 2 6 トランスフェクションしたNCBPのcDNAのHeLa細胞内での発現

トランスフェクション後回収したHeLa細胞を核画分と細胞質画分に分画し、15%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。その後エピトープタグに対する抗体を用いたウェスタンブロットで発現を検定した。タグ付きのNCBP由来のバンドを矢印で示した。また、対照として抗hnRNP抗体を用い、そのバンドを二本の矢印で示した。

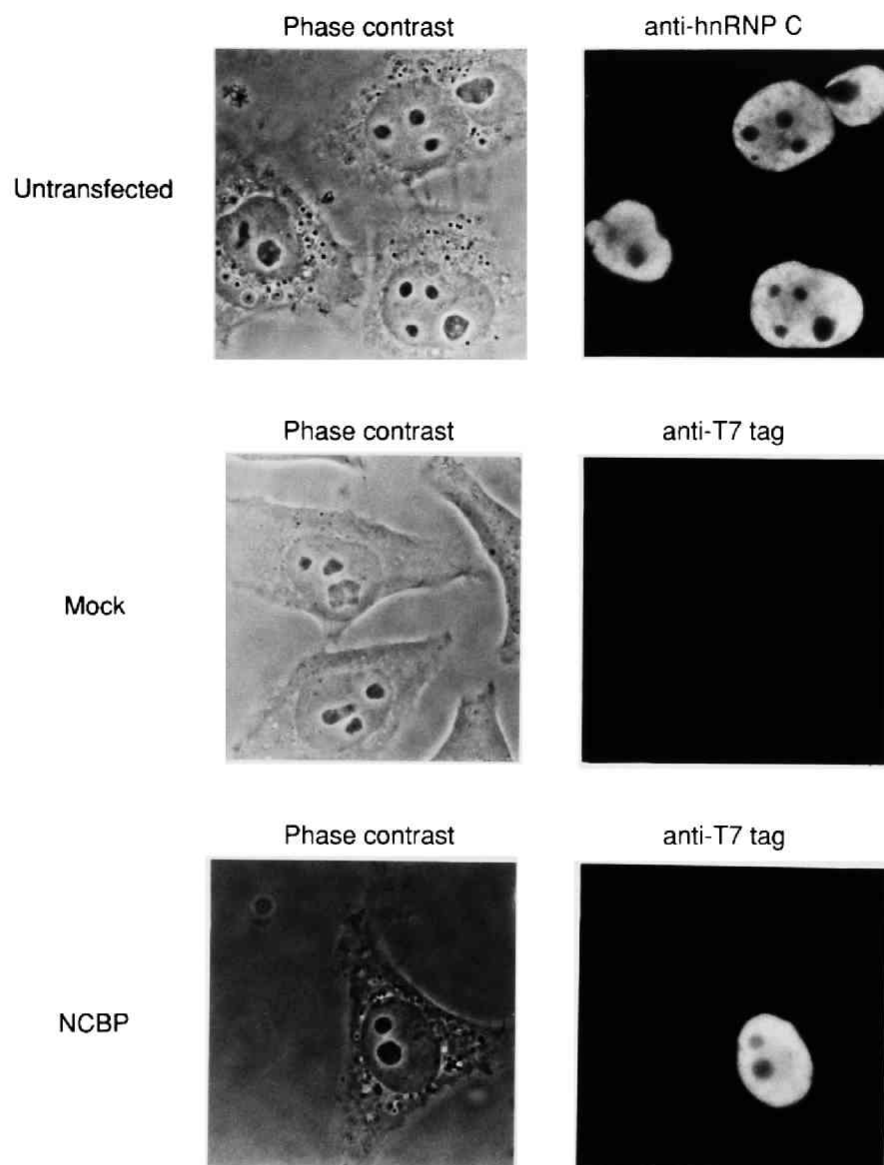


図 2 7 NCBPの細胞内局在性

HeLa細胞にベクターまたはタグをつけたNCBPのcDNAをトランスフェクションし、24時間後に回収してタグに対する抗体で免疫蛍光染色を行なった。左側が位相差の像で、右側が蛍光の像である。対照として、トランスフェクションしていない細胞に対して抗hnRNP C抗体を用いた染色を行なった。

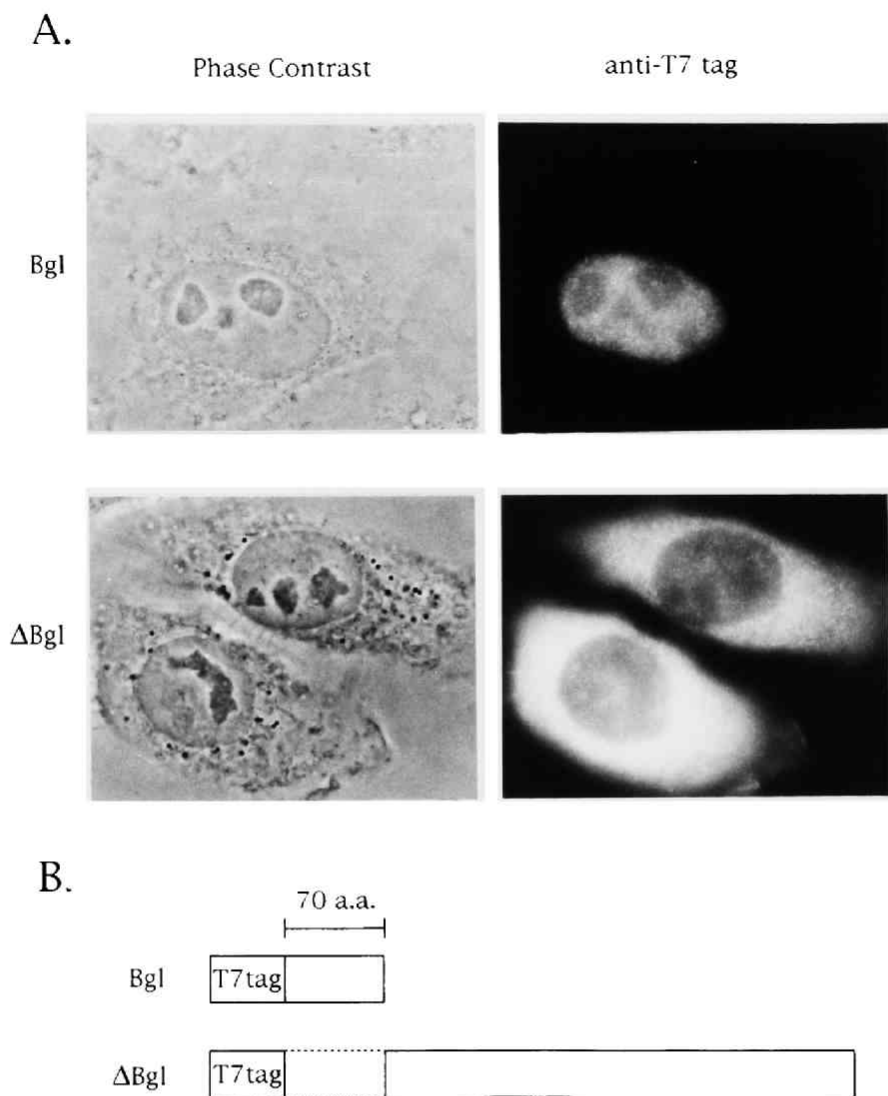


図 2 8 NCBPの核局在シグナル

(A) 図 2 7 と同様の実験をN末端から70アミノ酸の領域のみを持つNCBPのcDNA (Bgl) と、その領域を欠失させたNCBPのcDNA (Δ Bgl) を用いて行なった。

(B) (A) の実験に用いたNCBPのcDNAの模式図。

第四節 NCBPと相互作用する因子の同定

我々が単離したNCBPのcDNAが本当にキャップ構造結合タンパク質のcDNAであることを確かめるには、このcDNAを用いて合成したタンパク質がキャップ構造に結合する活性を持つことを示さなければならない。そこで、大腸菌内での大量発現系を試した。NCBPのcDNAを、マルトース結合タンパク質 (New England Biolabs)、グルタチオン-Sトランスフェラーゼ (Pharmacia) のそれぞれのベクターにつなぎ、大腸菌での大量発現を試みた。しかし、どの場合もタンパク質の分解が激しく、様々な条件や大腸菌株を試したが、全長のNCBPを得ることはできなかった。ただ、NCBPのN末端三分の一の領域や、前述のGCR3と相同性のある領域はマルトース結合タンパク質との融合タンパク質という形で大量発現が可能であったため (データは示さず)、この系を用いて大量発現を行い、ポリクローナル抗体作製のための抗原として用いることにした。このタンパク質を抗原としてウサギを免疫し、ポリクローナル抗体の作製を試みた。通常のプロイソコンプリートアジュバントを用いて免疫を行ったが、このタンパク質は非常に免疫原性が弱く、2カ月間の免疫の後も抗体価の上昇は見られなかった。さらに免疫を継続したところ、HeLa細胞核抽出液を用いたウェスタンブロットにおいて、80キロダルトンのバンドを与える抗血清が得られた (データは示さず)。これらの血清はウェスタンブロット解析ではNCBPに反応したが、ゲル移動度シフト法の反応液中也に加えてもキャップ構造結合活性に影響を与えなかった (データは示さず)。このことから、変性したNCBPを認識する抗体ができてしまい、“ネイティブ”な形のNCBPを認識できないということが考えられた。

NCBPを認識する抗体ができなかったことに加えて大腸菌でのNCBPの全長の大量発現が不可能であったため、ウサギ網状赤血球ライセートを用いた*in vitro*翻訳系でNCBPを合成し、これを用いてゲル移動度シフト法を行うことによりキャップ構造結合活性を決定しようと試みた。*in vitro*翻訳系で合成したNCBPは、SDSゲル電気泳動において約80キロダルトンの産物であった (データは示さず)。これを用いてゲル移動度シフト法を

行ったが、ウサギ網状赤血球ライセート中に内在性のキャップ構造結合活性が存在するため、合成したものと区別できなかつた。そこで、合成した産物を精製し、ゲル移動度シフト法に用いたがキャップ構造結合活性は観察できなかつた（データは示さず）。

前に述べたように、NCBPのアミノ酸配列を決定した際に明らかになったアミノ酸配列の中で、NCBPのcDNAにコードされていないオリゴペプチドが二つ存在した（LT22, 24、表5参照）。このことと組換えタンパク質にキャップ構造結合活性がないことを考え併せて、キャップ構造結合活性には、NCBPの他に別の因子が必要ではないかと考えた。そこで、タンパク質間の相互作用を検定する方法である酵母Two-Hybrid System（Fields and Song 1989）を用いたInteraction Cloning法（Zervos et al. 1993）によるNCBPと相互作用する因子の同定を試みた。Two-Hybrid Systemの概略は以下の通りである（図29）。あるタンパク質Xを転写因子のDNA結合ドメインとの融合タンパク質として出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中で発現させる。このXを”えさ”（bait）と呼ぶ。同時にXとの相互作用を検定したいタンパク質Yを、転写因子の転写活性化ドメインとの融合タンパク質として発現させる。このYを”獲物”（prey）と呼ぶ。転写因子のDNA結合ドメインがあるため、Xはレポーター遺伝子上流に存在するプロモーター領域に位置する。しかし、この状態では転写活性化ドメインがないため、レポーター遺伝子の転写は起こらない（図29A）。このXがYと相互作用すると、その相互作用により転写因子の転写活性化ドメインがプロモーター近傍に位置するため、レポーター遺伝子の転写が起こる（図29A）。このレポーター遺伝子には β -ガラクトシダーゼ遺伝子がよく用いられ、酵母細胞抽出液の β -ガラクトシダーゼ活性を測定することにより、タンパク質XとYの間の相互作用の有無を調べることができる。Interaction Cloning法では、この β -ガラクトシダーゼ活性での検定に加え、ロイシン合成遺伝子もレポーター遺伝子として用い、ロイシンマイナスの培地での生育を指標とする方法を用いる（図29B）。また、”獲物”側のタンパク質はガラクトースプロモーターの下流にあるため、ガラクトースを含む培地で生育させたときのみ発現するようになっている。そこで、 β -ガラクトシダーゼ活性もロイシンマイナスの培地での生育もガラクトースを含む培地で生育させたとき

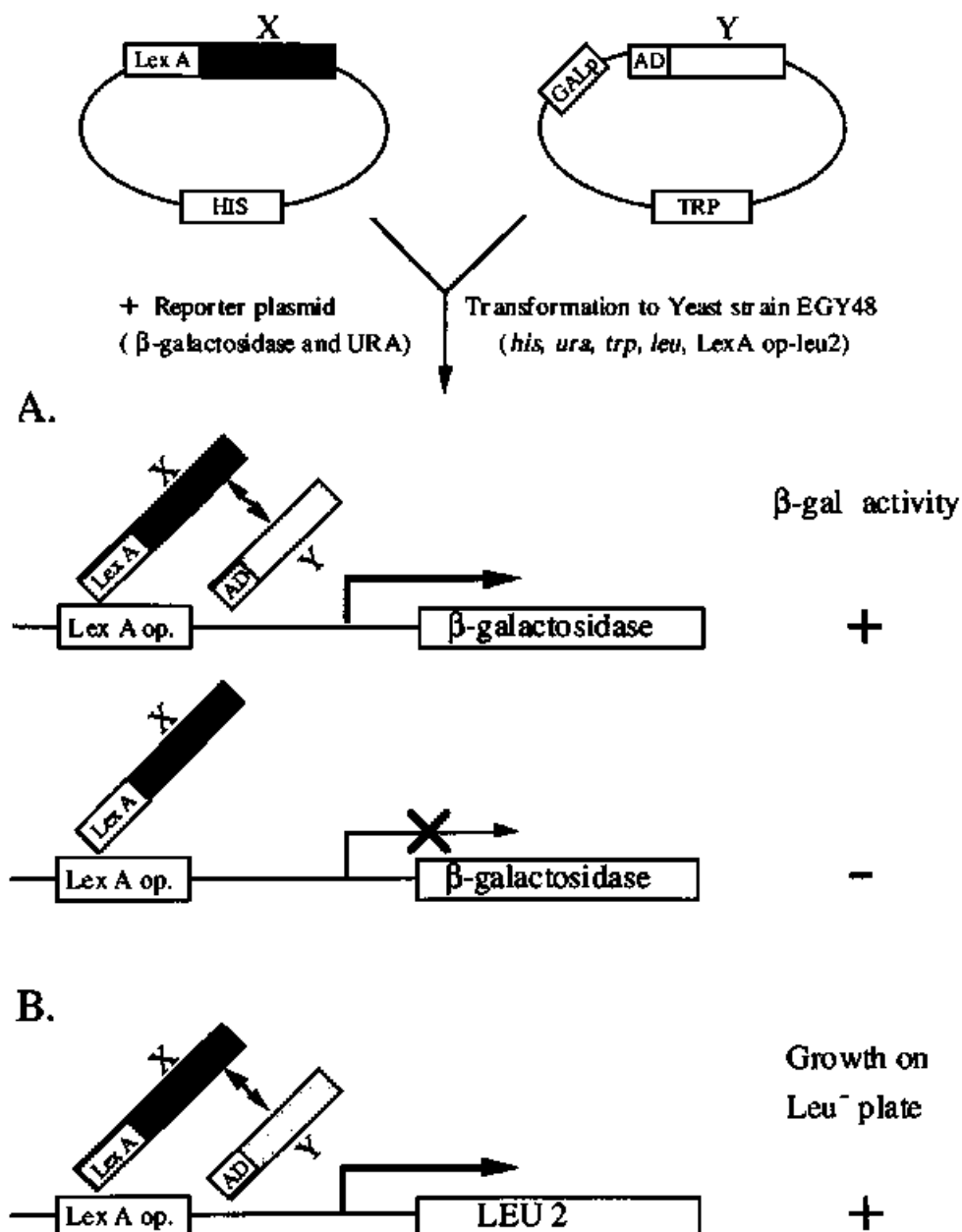


図 2 9 酵母Two-Hybrid Systemを用いたInteraction Cloning法

このシステムにおいて用いるプラスミドと酵母およびその遺伝子型を示した。まずスクリーニングのプロープとなるタンパク質XをDNA結合タンパク質であるLexAとの融合タンパク質として発現する。また、HeLa細胞由来のcDNAライブラリーを転写因子の転写活性化ドメインとの融合タンパク質として発現させる。もしXがあるタンパク質Yと相互作用すると β -ガラクトシダーゼ活性が見られるようになり (A)、さらにロイシンマイナスの培地での生育が可能になる (B)。

のみみられるはずである。あるタンパク質Xと相互作用する因子を同定しようとする場合は、Yの部分をcDNAライブラリーと置き換えてやればよい。すなわち、XをNCBP-YをHeLa細胞から作製したcDNAライブラリーとして酵母にトランスフォーメーションし、選択培地にまいてある一定の細胞数だけ集め、これを”NCBPのライブラリー”とした。そしてこのライブラリーをガラクトースを含むロイシンマイナス培地にまき、生育したものを仮の陽性クローンとした。そしてそれぞれについて β -ガラクトシダーゼ活性を測定し、ガラクトースに依存して β -ガラクトシダーゼ活性が観察されるものを選んだ。そして、このクローンからライブラリープラスミドだけを回収した後、回収したライブラリープラスミドとNCBPを同時に酵母にトランスフォーメーションし、この酵母がガラクトースに依存して、 β -ガラクトシダーゼ活性とロイシンマイナス培地での生育を示すかどうかを検定した。このようにして選択した結果残ったクローンを陽性クローンとした。その結果、三つの陽性クローンを得た(図30)。この陽性クローンのインサートをクローニング後塩基配列を決定した。それぞれをその番号で#30、#37、#69と呼ぶことにする。データベースを用いたホモロジー検索の結果、どのクローンも未報告のものであった。これよりこれらのクローンを個別に見ていくことにする。

(1) クローン#37

このクローンは計算上の分子量約17キログルトンのRNA結合タンパク質をコードしている(図31)。また、予想されるアミノ酸配列の中には、NCBP精製標品からアミノ酸配列決定したときに明らかになったアミノ酸の配列で、NCBPに含まれていなかった二つのアミノ酸配列(LT-22とLT-24、表5参照)が含まれており(図31)、キャップ構造結合活性に関与する因子ではないかと考えられた。そこで、このクローンとNCBPを酵母中で発現させ、この酵母の抽出液を用いたゲル移動度シフト法を行った(図32)。NCBPまたは#37を単独で発現させた酵母の抽出液では、キャップ構造に特異的なバンドは検出されなかった(図32、レーン7-12)。しかし、NCBPと#37の両方を発現させた酵母の抽出液では、キャップ構造に特異的なバンドが見られ、この結合は

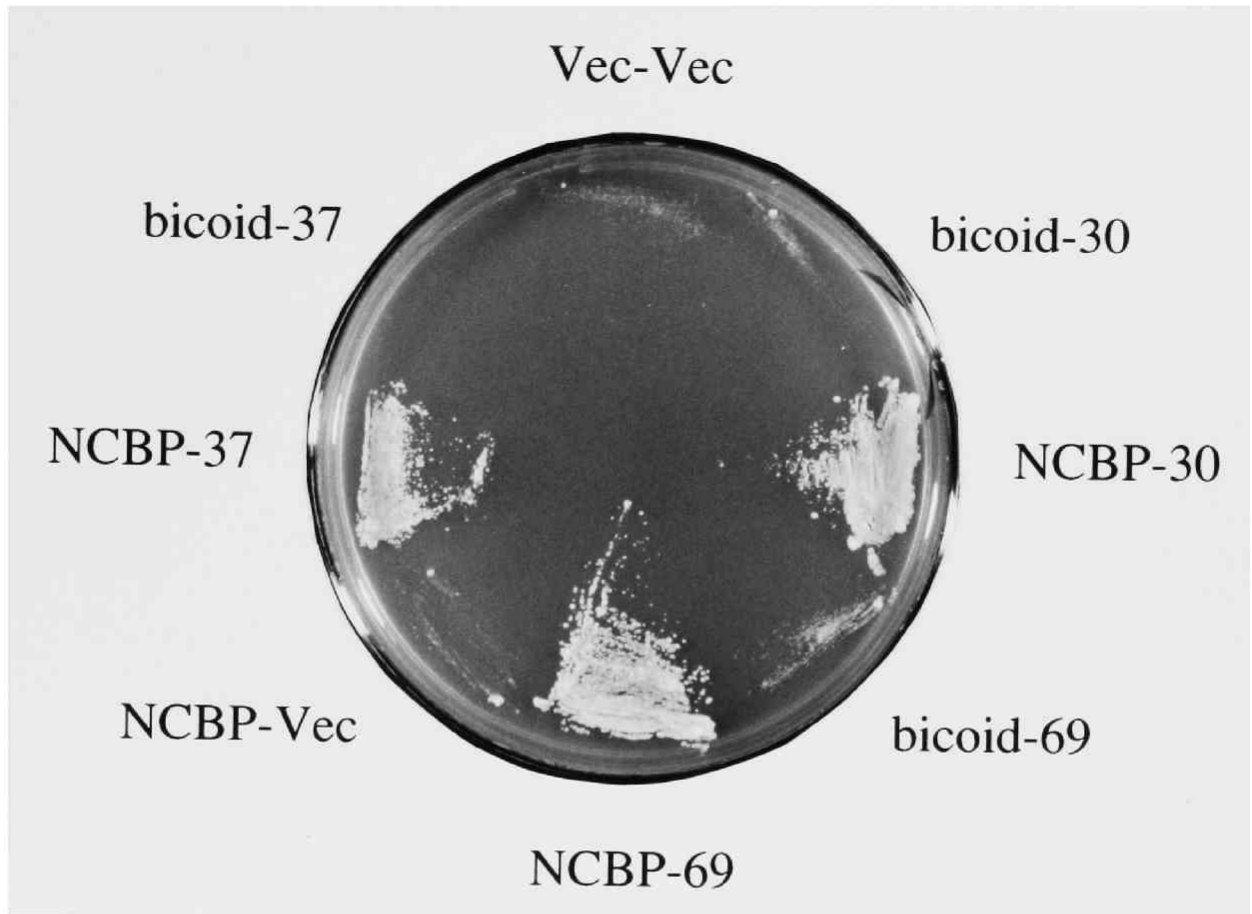


図30 単離したクローンのロイシンマイナス培地上での生育

図29の様な方法で単離したクローンのcDNAをNCBPまたはbicoidのcDNAとともに酵母にトランスフォーメーションし、ロイシンマイナス培地上での生育を検定した。対照として、ベクター同士、NCBPとベクターという組み合わせを行なった。

```

CGGCCGCGGA TCCATTGTGG TCCGCTTCTC TGCACTATGT CGGGTGGCCT CCTGAAGGCG 60
                                     M S G G L L K A
CTGCGCAGCG ACTCCTACGT GGAGCTGAGC CAGTACCGGG ACCAGCACTT CCGGGGTGAC 120
L R S D S Y V E L S Q Y R D Q H F R G D
AATGAAGAAC AAGAAAAATT ACTGAAGAAA AGCTGTACGT TATATGTTGG AAATCTTTCT 180
N E E Q E K L L K K S C T L Y V G N L S
TTTTACACAA CTGAAGAACA AATCTATGAA CTCTTCAGCA AAAGTGGTGA CATAAAGAAA 240
F Y T T E E Q I Y E L F S K S G D I K K
ATCATTATGG GTCTGGATAA AATGAAGAAA ACAGCATGTG GATTCTGTTT TGTGGAATAT 300
I I M G L D K M K K T A C G F C F V E Y
TACTCACGGC CAGATGCGGA AACTCCATG CGGTACATAA ATGGGACGCG TCTGGATGAC 360
Y S R A D A E N S M R Y I N G T R L D D
CGAATCATTC GCACAGACTG GGACGCAGGC TTTAAGGAGG GCAGGCAATA CGGCCGTGGG 420
R I I R T D W D A G F K E G R Q Y G R G
CGATCTGGGG GCCAGGTTTC GGATGAGTAT CGGCAGGACT ACGATGCTGG GAGAGGAGGC 480
R S G G Q V R D E Y R Q D Y D A G R G G
TATGGAAAAC TGGCACAGAA CCAGTGAGTG GTGAGAGCTC TGTCAGTGAC AAACACTCCT 540
Y G K L A Q N Q *
TTGGCCTGTT GAATTTGCTG AAGAACATCA CCTAAAGTCT GCACACGAGC CCATTTTAC CAAGATTGA 610
GTCAGTGTCT TTA CTGAGCT GGAAGCCTCT GAAAGTTATT AAAGGCAGAT CAAAAAAAAA AAAAA 675

```

図31 クローン#37のcDNA配列と予想されるアミノ酸配列

単離されたクローン#37のcDNA配列とそこから予想されるアミノ酸配列を示した。RNA結合ドメインと思われる部分を四角で囲んで表した。また、このクローンは、表5中のアミノ酸配列で、NCBPにコードされていなかったものを含んでいた（図中下線部）。また、停止コドンをも*で表した。

キャップ構造類似体によって阻害された（レーン4-6）。このことから、NCBPと#37は親和性があり、キャップ構造結合活性には少なくともこの二つのタンパク質が必要であることが示された。これが、NCBPの組換えタンパク質がキャップ構造結合活性を示さなかった理由だと考えられる。分子量が約17キログルトンであることを考え合わせると、このタンパク質はEMBLのMattaj博士らのグループが報告しているCBP20という、キャップ構造に特異的にクロスリンクするタンパク質と同一のものであると思われる（Izaurralde et al. 1994）。ノーザンブロットによる解析から、このクローンのmRNAは、2kbと0.8kbの二種類が発現していることがわかった（図35）。cDNAスクリーニングによって単離されたファージクローンの塩基配列の解析から、この大きさの違いは3'非翻訳領域の長さの違いによるものであることが明らかになった（データは示さず）。

（2）クローン#30

このクローンから予想されるアミノ酸配列はRNA結合ドメインを持っており、RNA結合タンパク質だと考えられた（図33）。また、C末端にATP結合モチーフを持っていた。このクローンの全長のmRNAの長さは、ノーザンブロットから約9kbであることがわかった（図35）。現在のところその一次配列はcDNAの3'末端から1kb程度しか決定されていない。残りの塩基配列を決定し、このタンパク質の機能を解析しなければならない。

（3）クローン#69

このクローンのコードするタンパク質は、非常に特徴的な配列を持っていた。すなわち、アルギニンまたはリジンとグルタミン酸のジペプチド（アミノ酸一文字表記でREまたはKE）の繰り返し配列である（図34）。このクローンのmRNAの大きさは3.6kbであった（図35）。このクローンに関してもcDNAの全長が単離されていないので、その解析を進めている。

Extract	EGY48			NCBP-#37			NCBP			#37			Bicoid-#37		
probe	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
m ⁷ GpppG	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

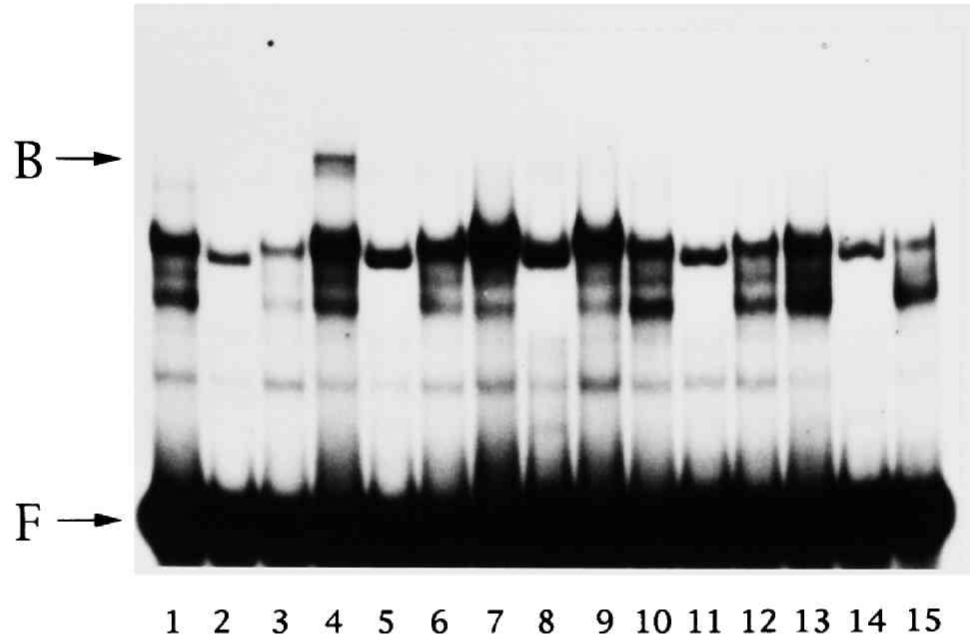


図3 2 酵母細胞抽出液を用いたゲル移動度シフト法

酵母中で、NCBPと#37のcDNAをそれぞれ単独で（図中NCBP、#37）または両方（NCBP-#37）を発現させ、それぞれから細胞抽出液を調製し、キャップ構造を持つプローブと持たないプローブを用いてゲル移動度シフト法を行なった。図中Bで表したバンドが、キャップ構造に特異的に見られるバンドである。また、フリーのプローブはFで表した。対照として、酵母のみ（EGY48）とBicoid（Bicoid-#37）を用いた。

```

CCGTACAAGC CCACAGAGGA GGACGATGAA GAAGAGGACT CAGGGGTCAG CCCCACTTGC 60
P Y K P T E E D D E E E D S G V S P T C
TCTGACCACT GCCCCTACCA GAGCCCACCA ACGAAGGCCA ACCGGCAGCT CTGTTCCC GC 120
S D H C P Y Q S P P T K A N R Q L C S R
AGCCGCTCAA GCTCTGGCTC TTCACCCTGC CACTCCTGGT CACCAGCCAC TCGAAGGAAC 180
S R S S S G S S P C H S W S P A T R R N
TTCAGATGTG AGAGCAGAGG GCCGTGTTCA GACAGAACGC CAAGCATCCG GCACGCCAGG 240
F R C E S R G P C S D R T P S I R H A R
AAGCGGCGGG AAAAGGCCAT TGGGGAAGGC CGCGTGGTGT ACATTCAAAA TCTCTCCAGC 300
K R R E K A I G E G R V V Y I Q N L S S
GACATGAGCT CCCGAGAGCT GAAGAGGCGC TTTGAAGTGT TTGGTGAGAT TGAGGAGTGC 360
D M S S R E L K R R F E V F G E I E E C
GAGGTGCTGA CAAGAAATAG GAGAGGCGAG AAGTACGGCT TCATCACCTA CCGGTGTTCT 420
E V L T R N R R G E K Y G F I T Y R C S
GAGCACGCGG CCCTCTCTTT CACAAAGGGC GCTGCCCTGA GGAAGCGCAA CGAGCCCTCC 480
E H A A L S F T K G A A L R K R N E P S
TTCCAGCTGA GCTACGGAGG GCTCCGGCAC TTCTGCTGGC CCAGATACAC TGACTACGAT 540
F Q L S Y G G L R H F C W P R Y T D Y D
TCCAATTCAG AAGAGGCCCT TCCTGCGTCA GGGAAAAGCA AGTATGAAGC CATGGATTTT 600
S N S E E A L P A S G K S K Y E A M D F
GACAGCTTAC TGAAAGAGGC CCAGCAGAGC CTGCATTTGA TAACAGCCTC GAGGAATACC 660
D S L L K E A Q Q S L H L I T A S R N T
TCAATACCTC AGACAAGGCC CTTC AATAT GTTTAGTTTT CAAAGAAATC AAGTATATGA 720
S I P Q T R P F Q Y V *
GGAGAGCGAGTGAGCGTGAGAGAACACCCGTGAGAGAGACTTGAACTGCTGTCCTTTAAAAAAAAAAAAAAAA 811

```

図33 クローン#30のcDNA配列と予想されるアミノ酸配列

クローン#30のcDNA配列とそこから予想されるアミノ酸配列を示した。RNA結合ドメインと思われる部分を四角で囲んで表し、ATP結合モチーフに下線を施した。また、停止コドンを*で表した。

```

GGCACGAGGC GGTCTAAACG GGATGAAGAA GAACGAGAAC GAGAAAGGAG GGAGAAGGAG   60
G T R R S K R D E E E R E R E R R E K E
AGGGAACGAG AAAGAGAACG GGAGAAGGAG AAGGAGAGAG AACGAGAGAA GCAGAAGCTA   120
R E R E R E R E K E K E R E R E K Q K L
AAAGAGTCAG AAAAAGAGAG AGATTCTGCT AAGGATAAAG AGAAAGGCAA ACATGATGAT   180
K E S E K E R D S A K D K E K G K H D D
GGACGGAAAA AGGAAGCAGA AATTATCAAA CAATTGAAGA TTGAACTCAA GAAGCACAGG   240
G R K K E A E I I K Q L K I E L K K H R
AGAGCCAAAA GGAGATGAAA CTATTGCTGG ATATGTACCG TTCTGCCCCA AAGGAACAGA   300
R A K R R *
GAGACAAAGT TCAGCTGATG GCAGCTGAGA AGAAGTCTAA GGCAGAGTTG GAAGATCTAA GCAAAGACTC   370
AAGGATCTGG AAGATAAAGA GAAGAAAGAG AACAAAGAAA TGGCTGATGA GGATGCTTGA GGAAGATCCG   440
GGCAGTGGAG GAGCAGACAG AATACCTACT TTGGGGGAGT GATATTTT   488

```

図34 クローン#69のcDNA配列と予想されるアミノ酸配列

得られたクローン#69のcDNA配列とそこから予想されるアミノ酸配列を示した。アルギニン (R) またはリジン (K) とグルタミン酸 (E) の繰り返しが多く見られる部分を下線で示した。また、停止コドンを*で表した。

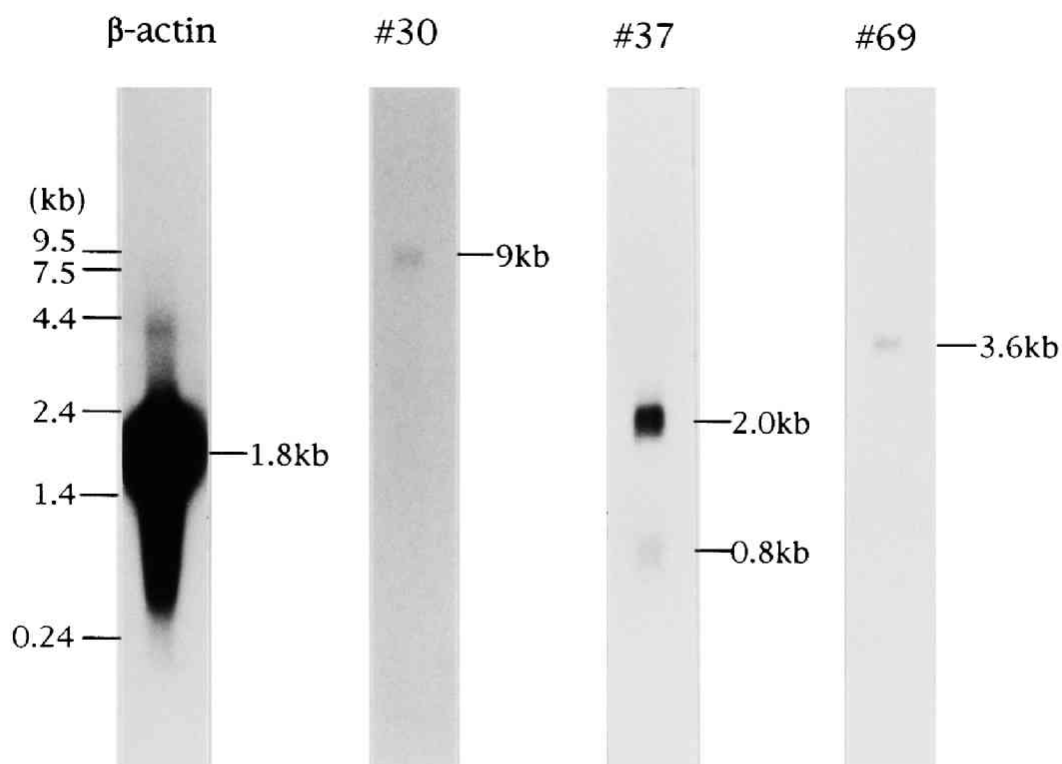


図35 単離したクローンのcDNAを用いたノーザンブロット

単離したクローンのcDNAをプローブとして、HeLa細胞由来のポリ(A)⁺RNAを用いてノーザンブロットを行なった。図の左端にサイズマーカーの位置を示した。また、各々のクローンのサイズをそれぞれのレーンの右に示した。対照として、 β -アクチンのcDNAを用いた。

第五節 クローン同士の相互作用

前節で得られたクローンに関して、NCBPとの相互作用やクローン同士の相互作用を検定するため、回収したcDNAを”えさ”側のベクターであるpEG202 (Zervos et al. 1993) につなぎ、Two-Hybrid Systemを用いて相互作用を検定した。その β -ガラクトシダーゼ活性の結果を表6に示す。このシステムでえさ側の負の対照としてBicoidのcDNAを用いた。これは、EG202を対照とした場合、わずかながら単独での活性化がみられるからである(表6最上段参照)。今後組合せをえさ側-獲物側の順番で呼ぶことにする。強さに差はあるもののNCBP-#30、#37、#69の組合せは活性がみられ、対照であるNCBP-VecやBicoid-#30、#37、#69と比較することにより、NCBPとの特異的な相互作用が確かめられた(表6、baitが^oNCBPの段参照)。このことは”えさ”と”獲物”を入れ換えてもみられたが、#69だけはみられなかった(表6、四角参照)。この理由は明らかではないが、以下のような可能性が考えられる。えさ側のプラスミドではLexAタンパク質との融合タンパク質として発現される。そのことで二次構造が変わり、相互作用に必要なドメインが露出しなくなり相互作用できなくなるということである。

NCBPとの相互作用の他に、#30同士、#69同士の相互作用がみられた(表6)。この結果より、#69に関しては前節で述べた”REドメイン”が^oRSドメイン(序論参照)の様にタンパク質同士の相互作用の場として働くことが考えられた。また、RNA結合ドメインが^oRNA結合ドメインを持つタンパク質同士の相互作用に関わるという報告(Dreyfuss et al. 1993)から、#30はそのRNA結合ドメイン同士での相互作用する可能性が示唆された。

prey bait	Vec.	NCBP	#30	#37	#69
Vec.	17.6	3.45	7.65	9.38	9.03
NCBP	16.4	8.81	<u>727</u>	<u>76.0</u>	<u>41.9</u> $\times 10^2$
#30	23.3	<u>125</u>	<u>72.5</u>	23.7	20.3
#37	6.94	<u>499</u>	3.37	15.2	4.60
#69	1.44	<u>0.67</u>	0.85	0.76	<u>66.1</u>
Bicoid	3.77	ND	0.25	17.0	1.36

表6 単離したクローン間の相互作用の検定

単離したクローンのcDNAとNCBP、BicoidのcDNAを用いた様々なタンパク質間の相互作用の検定を、Two-Hybrid Systemを用いて行なった。表に示した β -ガラクトシダーゼ活性のうち、有意な値だと思われるものについては太字で示し下線を引いた。NDは未検定を表す。表中の四角で囲んだものについては本文参照。

第四章 考察

第一節 キャップ構造によるスプライシング促進効果

1) キャップ構造によるスプライスソーム形成の促進

単一のイントロンを持つmRNA前駆体の場合、そのスプライシング反応促進効果はスプライスソーム形成の過程までにみられることが明らかになった（結果第一節図12参照）。以前にもスプライスソーム形成はキャップ構造に依存しているのではないかという示唆は得られていた（Patzelt et al. 1987）。しかし、対照として用いられた、キャップ構造を持たないmRNA前駆体が非常に不安定で分解を受けやすいことから、キャップ構造がスプライシングを積極的に促進しているのか、単にmRNA前駆体の安定性を増すことによる二次的な効果なのかが明らかにされていなかった。また、何も処理していない核抽出液を用いていたため、反応が進行してしまい、スプライスソーム形成のみを比較できていなかった。今回、ApppGという偽キャップ構造を持つmRNA前駆体をキャップ構造を持たないmRNA前駆体として対照に用いることでキャップ構造のスプライシングに与える効果をmRNA前駆体の安定性と切り離して考えることができた。また、EDTAを加えることで反応がスプライスソーム形成の後停止する系を用いているため、スプライスソームの形成のみを比較できた。その結果キャップ構造によるスプライシング促進効果は、スプライスソーム形成の過程までにみられることが明らかになった。グリセロール密度勾配遠心法と非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた解析から、スプライスソーム形成過程のBコンプレックスの形成に大きな差がみられた（図12、13）。序論でも述べたようにこの複合体は第一段階の反応が起こる場であり、いわゆる”成熟した”スプライスソームである。この複合体の形成において新たに加わる因子を考えると、U5,U4/U6 snRNP複合体がまず挙げられる。そこでキャップ構造はこのsnRNP複合体のAコンプレックスへ加わるのを促進している可能性が考えられる。その機構については、キャップ構造がキャップ構造結合タンパク質を介してsnRNP複合体中のタン

パク質と相互作用するという直接的な促進であるか、キャップ構造結合タンパク質と相互作用するタンパク質がさらにsnRNP複合体中のタンパク質と相互作用するという間接的な促進であるかはわからない。また、Aコンプレックスの形成にも差がみられた(図12)。このことは、キャップ構造がU2 snRNPのmRNA前駆体への結合を促進してAコンプレックスの形成を促進している可能性を示している。その促進の二次効果として、Bコンプレックスの形成が促進されているという可能性もあり、今後検定が必要である。

二つのイントロンを持つmRNA前駆体を用いた場合、キャップ構造によるスプライシング反応促進効果は第一段階の反応の過程までにみられることが明らかになった(図17)。二つのイントロンを持つmRNA前駆体の場合は、単一のイントロンを持つmRNA前駆体の場合に用いたスプライスソーム形成を解析する系が使えない。というのは、どちらか一方のイントロンのみにスプライスソームが形成されたmRNA前駆体は、その沈降係数もゲル電気泳動での移動度も同じで区別できないからである。そこでスプライスソーム形成を比較することはできないが、二つのイントロンにおいてスプライシング反応は独立に起こることとスプライシング反応はスプライスソームで起こることを考え合わせると、二つのイントロンを持つmRNA前駆体の場合においても、キャップ構造によるスプライシング反応促進効果はスプライスソーム形成の過程までにみられることが考えられる。本研究において、スプライスソーム形成はイントロンにおいて独立に起こるという示唆が得られたが、これはChristoforiらの報告(1987)と一致している。ただ彼らはキャップ構造の効果については全く解析していないので、今後彼らと同様の系を用いて解析していく必要がある。

二つのイントロンを持つmRNA前駆体の場合、図14に示したように二通りのスプライシング経路が考えられる。キャップ構造による促進効果は上流側のイントロンにしか及ばない(図15、17)。上流側のイントロンのみでスプライシングがおこった中間産物において、キャップ構造による促進効果は残ったイントロンにも及ぶのだろうか。前述のように、スプライスソームが二つのイントロンにおいて独立に起こるのならば、上流側のイントロンでスプライシングが起こったとき、下流側のイントロンにもスプラ

イスソームはすでに形成されていると考えられる。したがって、キャップ構造による促進効果がスプライスソーム形成過程だけに限られているのなら、下流側のイントロンには及ばないと考えられる。そこで、次にスプライスソーム形成後のキャップ構造による促進効果について考察する。

2) キャップ構造のスプライスソーム形成後の過程への関与

キャップ構造による促進効果がスプライスソーム形成過程までにみられたという結果は、キャップ構造による促進効果がスプライスソーム形成にしか及ばないということの意味するものではない。キャップ構造が第一段階及び第二段階の反応に関与しているかどうかを調べるにはその過程のみを取り出して解析する必要がある。例えば第一段階の反応に関与しているかどうかを調べる場合、まずスプライスソーム形成が終了した mRNA 前駆体を回収する。そしてピロフォスファターゼの様な脱キャップ構造酵素や、RNase H とオリゴデオキシヌクレオチドを用いた mRNA 前駆体の 5' 末端付近での切断などを用いてキャップ構造を特異的に除去する。その後第一段階の反応を行わせ、キャップ構造による促進効果を観察するという方法が考えられる。しかし、キャップ構造付近がタンパク質等で覆われている場合この方法は使えないという方法上の問題がある。それに加え、もし促進効果がみられても、それに関わる因子がスプライスソーム形成時にキャップ構造依存的に取り込まれているという可能性は否定できず、スプライスソーム形成における差と区別がつかなくなるのが考えられ、実際には困難だと思われる。

しかし、熱処理した核抽出液を用いた系における、キャップ構造の有無による第一段階の反応の効率の劇的な差 (図 1 1 C) は非常に興味深い。キャップ構造が無い場合においてなぜ第一段階の反応効率が極端に低下するのだろうか。もともとこの核抽出液を熱処理する系は、第二段階の反応をブロックする系として報告された (Krainer et al. 1985)。その機構は明らかになっていないが、第二段階の反応に必要な熱に弱い因子が失活するためと考えられている。実際はそれだけではなく、第一段階の反応かそれ以前の過程に関わる因子が全てではないが一部失活するのかもしれない。そしてこの因子が

キャップ構造となんらかの相互作用をしていると仮定すると、キャップ構造が存在する場合は、失活せずに残った因子がスプライソームに加わりやすくなるため第一段階の反応が起こることが考えられる。*in vitro*反応系を用いたこれ以上の解析には限界があるため、Two-Hybrid Systemの様な系を用いた因子の側からのアプローチで明らかにされることが望まれる。

第二節 核内キャップ構造結合タンパク質 (NCBP)

1) NCBPの一次構造と細胞内局在

筆者らは、前述のキャップ構造によるスプライシング反応促進効果を担う因子の候補として、HeLa細胞核抽出液から80キロダルトンのタンパク質を精製した (Ohno et al. 1990)。このタンパク質のcDNAを単離し、予想されるアミノ酸配列を解析したところ既知のタンパク質には大きな相同性がなく、既知のタンパク質では酵母*S.cerevisiae*の解糖系の遺伝子の発現に必要な遺伝子の産物GCR3 (Uemura and Jigami 1992) に弱い相同性があった。GCR3タンパク質の機能は未だ明らかにされていないため、この相同性からは機能に関して何の情報も得られなかった。この相同性がみられた領域はトリプトファン残基に富んでおり、そのトリプトファン残基は両方のタンパク質間で保存されていた (図23)。GCR3の突然変異体にNCBPのcDNAをトランスフォーメーションしても相補しなかったため (データは示さず)、機能的相同産物かどうかはわからなかった。しかし、一部の領域において相同性が高いことを考えると、この領域が何らかの機能ドメインであり、例えばRNA結合ドメインのように種を越えて保存されているものであることも考えられる。今後GCR3の突然変異体をさらに詳細に解析することで、NCBPやそれに相互作用する因子の機能の解析が行える可能性もあるため、検討していきたい。

NCBPのアミノ酸配列の中で、唯一モチーフとして考えられたものは、N末端に存在する核移行シグナルである。アミノ酸配列の3～6番目にかけてアルギニン残基が続き、

11 アミノ酸をはさんで電荷の高いアミノ酸が四つ続く構造をしており（図22）、ヌクレオプラズミンにみられる、2部からなる（bipartite）核移行シグナルだと考えられた（Robbins et al. 1991）。実際、このシグナルを含むNCBPはHeLa細胞内では核に移行でき、含まないものは核移行できない（図27、28）。ただし、全長のNCBPの場合、核質が染まり、核小体がほとんど染まらないのに対し（図27）、N末端から70アミノ酸のみを持ったNCBP（Bgl）では核内に局在はするものの、核質と核小体のシグナルの差が弱くなっている（図28）。この理由として次の二つが考えられる。まず一つめは、拡散によるとするものである。BglはN末端から70アミノ酸しかないため、分子量の非常に小さなタンパク質として発現している。そのため、非特異的な拡散によって核小体にもれてしまうことである。二つめの理由は、欠失を導入する際に核質に保持する（あるいは核小体に移行させない）シグナルに欠失を導入してしまったとするものである。二つめの説は魅力的であるがいずれの説も証明はされていない。NCBPの機能ドメインについての情報はほとんどないため、NCBPの様々な部分に欠失を導入していくことにより、この核質保持シグナルの存在も含めて明らかにしていきたい。

2) NCBPと相互作用する因子

タンパク質同士の相互作用を検定する方法であるTwo-Hybrid Systemを用いてNCBPと相互作用する因子を同定した。その結果、次に述べる三種類のクローンが同定された。

(1) クローン#37

このタンパク質はNCBPと相互作用してキャップ構造結合活性を担う因子であると考えられる。実際、NCBPと共発現した酵母細胞抽出液ではキャップ構造に特異的なバンドがみられた（図32）。また、EMBLのグループも、UVクロスリンク法によりキャップ構造に特異的に結合するタンパク質として分子量20キログルトンのタンパク質（CBP20）を同定している（Izzaurre et al. 1994）。NCBPを精製した際に、図21よりも高いパーセントのSDSゲル電気泳動を行い、より高い感度の検出方法を用いてもこのタンパク質は検出できなかった（データは示さず）。この理由として考えられるのは、

#37クローンのタンパク質（以後#37と呼ぶ）はそのRNA結合モチーフでRNAに強く結合していてカラムから溶出されなかったことである。精製の最終段階であるRNAカラムから溶出する際、5M尿素存在下で溶出するが、この溶出条件においてNCBPと#37のタンパク質間相互作用だけが解離し、溶出されたというものである。NCBPの精製標品をSDSゲル電気泳動で解析した際、#37が検出できる濃度のゲルを用いても検出できなかったこと（データは示さず）や、精製標品を用いたアミノ酸配列解析の際に、#37由来のペプチドがNCBP由来のものに比べてモル比において少なかったこと（データは示さず）からもその可能性は十分考えられる。

（2）クローン#30

このタンパク質はRNA結合モチーフを持ち、さらにATP結合モチーフを持っていた。その全塩基配列は未だ決定されていないためその機能は明らかにはなっていない。しかし、RNA結合タンパク質であること、また、スプライシングやmRNA輸送にはATPのエネルギーが必要であることを考えると、このタンパク質がこれらの過程に関与している可能性は高いといえる。このタンパク質のmRNAの長さは約9kbと長い。非翻訳領域が5'側と3'側を合わせて1kb程度、ポリ(A)配列の長さを200塩基と考えると、コーディング領域は約7.8kbとなり、アミノ酸にして約260残基、分子量約280キログルトンのタンパク質となる。今後抗体等を用いて、タンパク質の大きさに関する情報を得る必要がある。スプライシングにおいてこのように分子量の大きなタンパク質は、酵母PRP8の哺乳動物における相同遺伝子産物であるp220が知られている（Anderson et al. 1989）。しかし、PRP8タンパク質はRNA結合ドメインもATP結合モチーフも持っておらず、#30とは異なるものだと考えられる。ごく最近、スプライソーム中に存在するATP結合タンパク質が、クロスリンク法によって何種類か同定された（Zhang and Green 1994）。この中には、分子量が200キログルトン以上あるタンパク質が報告されており、こちらのタンパク質との相同性の検定が待たれる。また、最近報告されつつある核孔のタンパク質群の中にもRNA結合ドメインを持つものもあるため（Fabre et al. 1994）、#30が核孔タンパク質かどうかの解析をしなければならない。

(3) クローン# 69

このタンパク質の持つ繰り返し配列はアルギニンまたはリジンとグルタミン酸（アミノ酸一文字表記でREまたはKE）であり、電荷としてはプラスとマイナスの繰り返しとなっている。この電荷の繰り返しパターンは、スプライシング因子にみられるRSドメインと似ている。RSドメイン中のセリン残基はリン酸化されていることが示唆されており、電荷のパターンはプラスとマイナスの繰り返しとなる。このRSドメインは最近タンパク質同士の相互作用の場として働くことが示唆されているため（Amrein et al. 1994、Kohtz et al. 1994）、# 69のREドメインも同様に相互作用の場として働いている可能性は大きい。実際、# 69タンパク質同士の相互作用が、Two-Hybrid Systemによって検出されている（表6）。今後このタンパク質のアミノ酸配列をさらに解析していくことでその機能に迫りたい。

第三節 核内キャップ構造結合複合体

核内キャップ構造結合タンパク質も細胞質キャップ構造結合タンパク質と同様にキャップ構造結合複合体を形成しているという事実は興味深い。細胞質内キャップ構造結合複合体（eukaryotic Initiation Factor-4F, eIF-4F）の構成成分は、細胞質キャップ構造結合タンパク質であるeIF-4E（分子量24キロダルトン）、ATP依存性RNAヘリカーゼであるeIF-4A（分子量50キロダルトン）、分子量220キロダルトンのタンパク質（p220）、そしてeIF-4B（分子量80キロダルトン）である（総説Sonnenberg 1988）。核内キャップ構造結合複合体は今のところNCBPと# 37の二つである。分子量から考えると、eIF-4BとNCBPはともに80キロダルトンで、eIF-4Eが24キロダルトンに# 37が17キロダルトンとよく似ている。しかし、eIF-4Eが単独でキャップ構造に結合できるのに比べ、NCBPと# 37は両方のタンパク質が存在したときのみキャップ構造に結合できること、また、NCBPのキャップ構造への結合にはATPも二価の陽イオンも必要としないが（Ohno et al. 1990）、eIF-4Bのキャップ構造結合複合体への作用にはATPとMg²⁺が必要で

あること (Sonnenberg 1988) が異なっている。NCBPや# 37とeIF-4Eとの間に大きな相同性がみられないことから考えて、核内と細胞質ではキャップ構造の認識機構が異なっていると思われる。eIF-4Eでは、キャップ構造への結合に必要な配列として、種を越えて保存されているトリプトファン残基が重要であることが知られている (Sonnenberg 1988)。今後NCBPと# 37のドメインを詳しく解析していくことで新しいキャップ構造結合ドメインが同定できると考えられる。

今回同定された他の二種類のタンパク質もこの核内キャップ構造結合複合体に含まれている可能性はある。しかし、# 37ほど強くNCBPと相互作用しているわけではないと考えられる。その理由としては、NCBPを精製した際、最後の精製段階までNCBPと共に溶出されてきたのは# 37だけであることが挙げられる。いずれにせよこの二種類のタンパク質の機能を明らかにすることで、核内キャップ構造結合複合体の構成成分が明らかになることが期待される。

第四節 キャップ構造によるスプライシング反応促進機構

本研究により、キャップ構造によるスプライシング反応促進機構はスプライスソーム形成の過程までにみられることが明らかになった。そしてこの効果を担う因子の候補として、筆者らは核内キャップ構造結合タンパク質を精製した。このタンパク質を含めたキャップ構造によるスプライシング反応促進機構を考えてみたい。

EMBLのMattaj博士らのグループは、最初mRNAの輸送に関与する因子の候補として、キャップ構造に結合するタンパク質を精製していた (Izauralde et al. 1992)。ごく最近このタンパク質 (CBP80) が我々の精製したNCBPと同一のものであることが明らかになり、さらにキャップ構造結合複合体にはCBP20というもう一つのタンパク質が含まれることが明らかになった (Izauralde et al. 1994)。そして、彼らは、CBP80に対する抗体を用いた実験から、核内キャップ構造結合複合体がスプライスソーム形成の促進に関与していることを示した (Izauralde et al. 1994)。いみじくもNCBPがスプライシング

反応促進に関与していることが明らかになったわけである。彼らが同定したCBP20についてはその一次配列は明らかにされていないが、その分子量や性質を考えると我々が同定した#37と同一のものと考えられる。しかし、彼らは二つのタンパク質がキャップ構造への結合に必要であるということをもまだ明らかにしていないため、今後比較していくことが重要だと考えられる。

スプライスソーム形成過程の解析から、キャップ構造はスプライスソーム形成の早い過程で促進効果を示すことが明らかになった(図12、13)。この過程をみると、スプライスソームのAコンプレックス(沈降係数45S)の形成から少し差がみられ、Bコンプレックス(60S)の形成において大きな差がみられた。このこととスプライスソームの骨格であるU snRNPについて考えてみると、U2 snRNPのスプライスソームへの会合とその後のU5,U4/U6 snRNP複合体のスプライスソームへの会合に差があると考えられる。この点においてNCBPが部分的にはあるがU2 snRNPと会合しているというデータ(Ohno et al. 1990)は興味深い。NCBPはU2 snRNPと会合しており、U2 snRNPを近傍に位置させることによりスプライスソームに会合させる速度を促進する。その結果Aコンプレックスの形成を早め、さらにU5,U4/U6snRNP複合体のスプライスソームへの会合の標的となりBコンプレックスの形成を促進するというモデルが考えられる(図36)。このモデルが正しいとした場合、U2 snRNPやU5,U4/U6snRNP複合体中のタンパク質がNCBPと相互作用することが予想されるが、いまのところこれらのタンパク質は本研究で用いたスクリーニング法では単離されていない。そこで考えられる可能性は三つある。まず一つめはスクリーニングしたライブラリーの数が十分ではないことである。しかし、筆者らがスクリーニングで単離した仮の陽性クローンのうち、 β -ガラクトシダーゼ活性で偽の陽性クローンであると判明したものには同じものがいくつか含まれていたことから(データは示さず)、この可能性は薄いと考えられる。もう一つの可能性は、#30または#69のタンパク質のどちらか、あるいは両方がU snRNPの構成成分である可能性である。これに関連したもう一つの可能性は#30または#69のタンパク質がさらにU snRNPと相互作用していることである。この二つの可能性を検定するためには、

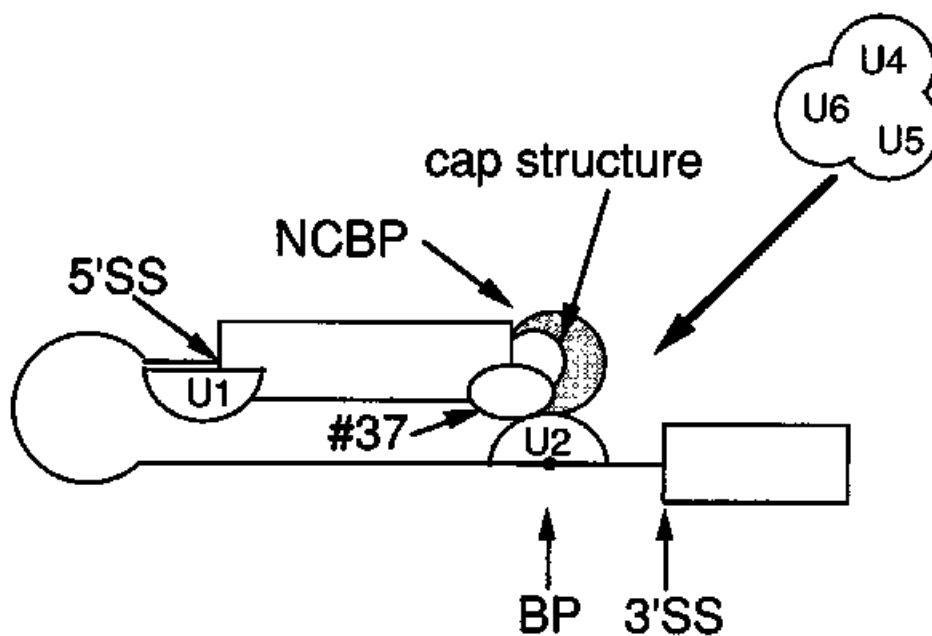


図36 核内キャップ構造結合複合体によるスプライシング促進機構のモデル図

核内キャップ構造結合複合体（NCBPと#37）がスプライスソーム形成に関与し、促進するモデルを示した。図中の記号はそれぞれ以下のことを示す。5'ss: 5'スプライス部位、3'ss: 3'スプライス部位、BP: ブランチ部位

この二つのタンパク質の構造と機能が明らかになる必要がある。今後抗体等を用いた実験やこれらを”えさ”にしたスクリーニングで明らかにしていきたい。

第五節 キャップ構造によるスプライシング反応促進効果の限定性

二つのイントロンを持つmRNA前駆体の場合、キャップ構造による促進効果は上流側、すなわちキャップ構造に最も近いイントロンにのみ見られる（本研究、Ohno et al. 1987、Inoue et al. 1989）。この限定性はどこに起因するのだろうか。これはキャップ構造によるスプライシング反応促進機構と関連することであるが、これについて最近興味深いモデルが提唱されている。それはスプライシングにおいて認識される単位はエキソンだとする、Exon Definition Modelである（Robberson et al. 1990）。このモデル（図37）では、U1, U2 snRNPを含むスプライス部位認識因子はまず3'スプライス部位に集合する。そしてその後U1 snRNPは5'から3'方向にエキソン上をスキャンし、5'スプライス部位を認識する。その結果エキソン両端間で因子を介した相互作用が起こり、安定な複合体が形成される。これによりエキソンが認識され、その後イントロンが決定されるというものである。このモデルの根拠は次の二つである。一つは、イントロンは長さが数十塩基から数十キロ塩基まで様々であるが、エキソンの長さは300塩基以下のものがほとんどであるということである。このことについては、このモデルにおいて提唱しているエキソンスキャンの限界が300塩基だと考えれば説明可能である。また、もう一つの根拠は、エキソンの下流の5'スプライス部位に変異が入るとそのエキソンはとばされるという現象である（Kuo et al. 1991）。このような変異が入った場合、単にエキソン下流のイントロンのスプライシングが起こらなくなると考えられるが、実際はそのエキソンが飛ばされるか、付近の5'スプライス部位偽似配列でスプライシングが起こる。この現象も、このモデルで考えている安定な複合体が形成されない結果このエキソンが認識されないとすれば説明できる。

このモデルはその性質上内部エキソンだけに限られている。Bergetらは、5'と3'端の

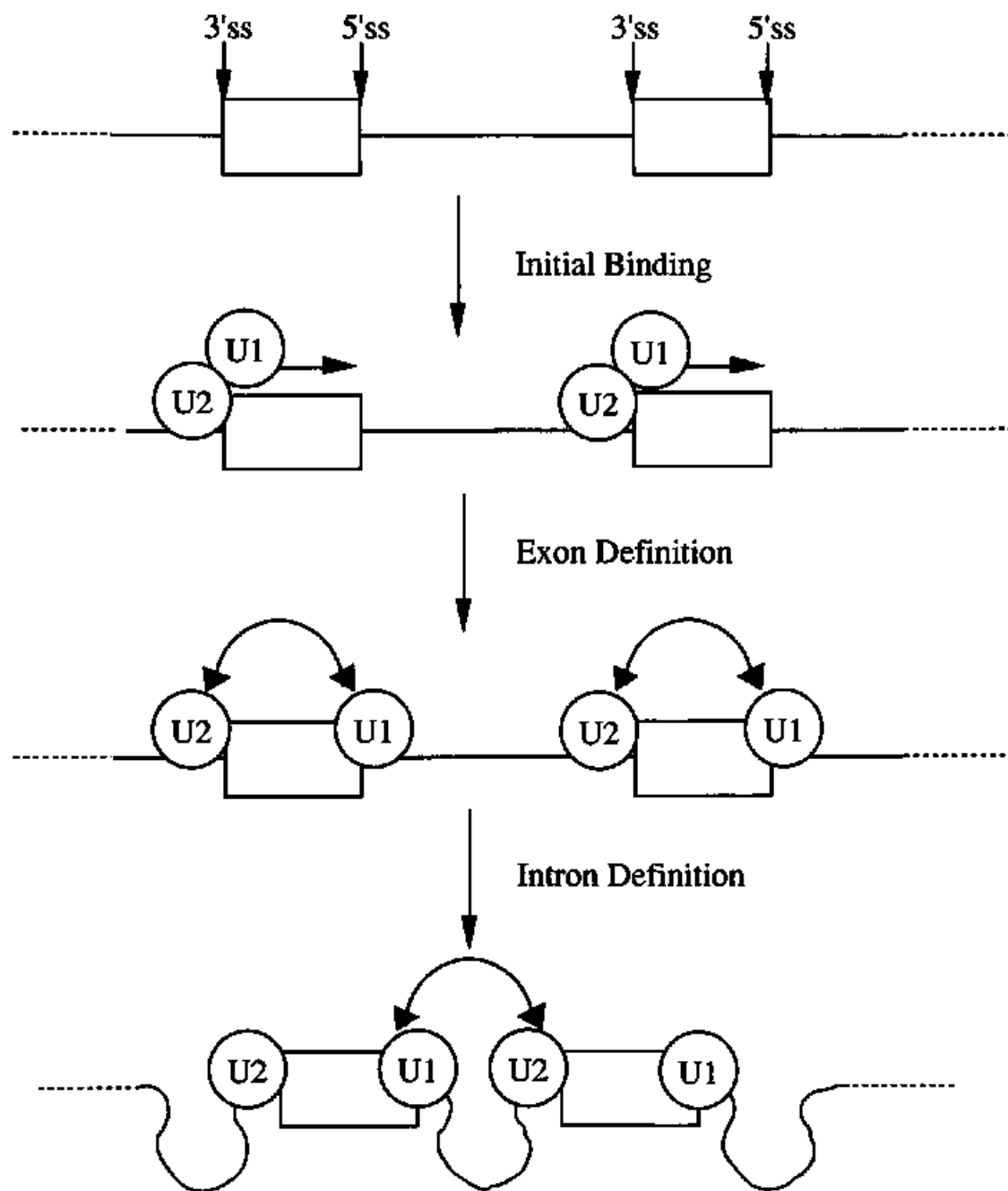


図 3 7 Exon Definition Modelの模式図

Exon Definition Modelを模式的に示した。5'および3'スプライス部位を認識する因子群の代表としてそれぞれU1およびU2 snRNPのみを示した。これらの因子群はまず3'スプライス部位を認識して集合する (Initial Binding)。そして下流側へのスキャニングが起こり、近傍の5'スプライス部位を認識する。この場合、5'と3'の両スプライス部位に集合した因子が安定な複合体を形成し、エクソンが定義される (Exon Definition)。その後エクソンとエクソンの間がイントロンと定義される (Intron Definition)。

エキソンについては、キャップ構造とポリ(A)鎖付加シグナルがそれぞれ3'と5'のスプライス部位の代わりにエキソンの定義に働いていると考えており、ポリ(A)鎖付加シグナルが上流のスプライシングを促進することを示している (Niwa & Berget 1991)。このモデルを用いてキャップ構造による促進効果を考えると、なぜ促進効果がそれに最も近いイントロンにしか及ばないのかが説明しやすい。すなわち、本研究でも示されたキャップ構造結合複合体がキャップ構造に結合し、それが5'スプライス部位のU1 snRNPと相互作用して安定な複合体を形成してエキソンとしての認識を行うとするものである。3'スプライス部位認識因子にはU2 snRNPも含まれる。そこでNCBPがU2 snRNPと部分的にはあるが会合しているというデータ (Ohno et al. 1990) はこのモデルを支持するものといえよう。

しかし、このモデルをキャップ構造の効果の限定性にすべて当てはめてしまうのには問題がある。筆者は、*in vitro*スプライシング反応において、5'エキソンの長さを最大1kbまで長くしてもキャップ構造による促進効果は観察されるという結果を得ている (データは示さず)。もしこのモデルの通りエキソンスキャン機構が存在し、その限界が300塩基程度だとするとこの現象は説明できない。このことから考えて、エキソンスキャン機構は存在しないのかもしれない。筆者は5'及び3'スプライス部位の認識は独立に起こり、それぞれの認識因子の間で相互作用が起こると考える。もしキャップ構造による促進効果が、このモデルどおりエキソン認識を促進することだとすれば、以下のようなことが考えられる。5'エキソン内にイントロンの3'スプライス部位領域の配列を挿入することにより、内部エキソンの場合と同じように、この3'スプライス部位と5'スプライス部位の間がエキソンとして認識される。そしてこのエキソン認識はキャップ構造に依存しないため、キャップ構造による促進効果はみられなくなる。この実験は可能なので、キャップ構造による促進機構を明らかにする上でも検定してみたい。

第六節 今後の課題

前節までの各項でこれから明らかにしていかなければならないことは述べてきたが、最後にいくつか残った課題を述べて、本論分の締めくくりとしたい。

1) タンパク質間の相互作用—Two-Hybrid Systemの問題点など—

本研究において、Two-Hybrid Systemを用いたスクリーニング法によりNCBPと相互作用する因子をいくつか同定した。この方法の場合、単離されたクローンがどのようなものかによってその後の解析方法が変わる。すなわち、単離されたクローンが既知のもので、しかも“えさ”に用いたタンパク質が機能する過程に関与するものであるなら、そのクローンの全長のcDNAを単離する必要もなく解析ができる。しかし、未知のタンパク質が同定された場合、その全長cDNAを単離し、その産物の機能を解析することを考えなければならない。ただ、本研究の場合のように、そのクローンが解析済みのペプチド配列を含んでいたり（#37）、RNA結合タンパク質でさらにATP結合モチーフを持つといった、機能に示唆が得られるようなドメインを持っている場合はまだ解析が容易であると考えられる。また、このライブラリーに関して言えば、オリゴdTプライマーを用いてcDNAの平均長が1kbのライブラリーを調製しているため、すべてのタンパク質がそのC末端部分を発現しており、分子量の大きなタンパク質はそのN末端近くは発現しないということが問題点である。もし、“えさ”のタンパク質と相互作用する因子が実際はそのN末端領域で相互作用する因子だとすると、このライブラリーではこの因子は単離できないことになるからである。例えばランダムプライマーを用いたライブラリーを構築して組み合わせて用いるのも一つの方法であろう。

表6でみられたように、 β -ガラクトシダーゼ活性でみると、各クローン間でNCBPへの相互作用の強さが異なっていた。前述のように、#37のタンパク質はNCBPの精製の際、最後の段階まで安定にNCBPと相互作用していたタンパク質である。しかし、Two-Hybrid Systemの β -ガラクトシダーゼ活性は他の二つのクローンよりも弱い（表6）。

このことは、Two-Hybrid Systemでの相互作用の強さは、実際の相互作用の強さを必ずしも反映していないということを表している。すなわち、ある程度以上の活性が検出できれば、相互作用するということとは言えても、その強弱まではわからないということである。また、タンパク質の酵母内での安定性の問題もあるため、これらのクローンの組換えタンパク質や抗体を用いて *in vitro* での実際の相互作用を調べる必要がある。Two-Hybrid Systemとこれらの方法の両方を用いて確認することによりはじめて相互作用していることが証明できるといえる。

2) キャップ構造とmRNAの核外への輸送

キャップ構造はスプライシング反応を促進することが明らかになったが（本研究、Ohno et al. 1987、Inoue et al. 1989）、キャップ構造はmRNAの核外への輸送においても重要なシグナルとして働いていることが示されている（Hamm and Mattaj 1990b）。前述のように、この輸送という過程はそこで働く因子を含めてほとんど明らかになっていない。核内キャップ構造結合複合体がスプライシングに関与しているという事実は、この複合体が輸送にも関与しているという考えを妨げるものではない。広い意味でいえば、キャップ構造結合複合体はスプライシングを促進していることで輸送を促進しているといえる。と言うのは、イントロンの存在するmRNA前駆体が輸送されるためには、速やかにスプライシングを受ける必要があるからである。

キャップ構造結合複合体が輸送の促進に関与するかどうかを検定する実験として以下のような実験が考えられる。まずレポーター遺伝子として、イントロンを持つものと持たないものを用意し、どちらか一方をベクターのみまたはNCBPと#37の両方のcDNAとともに培養細胞にトランスフェクションする。細胞を回収して核画分と細胞質画分に分離し、それぞれの画分から得られたRNAを用いて逆転写PCRを行ない、レポーター遺伝子からの転写産物の細胞内局在性を調べる。もし、イントロンの有無に関係なく、レポーターmRNAの細胞質への局在が促進された場合、NCBPと#37の二つのタンパク質はmRNAの輸送に関与することが示唆される。この実験は実施可能だと考えられるの

で検定してみたい。

NCBPと#37はキャップ構造に非常に安定に結合している (Ohno et al. 1990)。この二つのタンパク質は核内でもmRNA前駆体のキャップ構造に強く結合していると筆者は考える。そして、スプライシング反応が終了した後、mRNAが核外へ輸送されるときには解離しているのだろうか。ここで二つの可能性が考えられる。一つは、結合したまま細胞質に行き、その後解離して核内に戻る、“シャトル”をする可能性である。筆者らの示したNCBPの核内局在性と、Izzarauldeら (1994) が抗体で示した核内局在性からは、この可能性は薄いと考えられるが、hnRNP A1のように、抗体染色では核内局在性を示すが、ヘテロカリオンを用いた実験から、シャトルすることが明らかになった例もあるので (Pinol-Roma and Dreyfuss 1992)、この可能性は否定できない。検定するためにはヒトのNCBPと#37にのみ特異的に反応する抗体が必要となるため、現時点では不可能であるが、試みたい実験である。もう一つの可能性は、mRNAが核から外へ輸送されるときに、核膜のところでキャップ構造から解離するという可能性である。その場合、mRNAが核外へ輸送される際も核孔を通過するといわれているので (Dwartzky and Feldherr 1988)、核孔またはその周辺に存在するタンパク質にmRNAを“受渡す”形になると考えられる。その“受渡す”相手のタンパク質については情報が無いが、本研究で同定された#30、#69もその候補の一つかもしれない。このような因子を同定する側からのアプローチが突破口となって解析が進むことが期待されるので、今回同定したクローンの解析を急いでいる。キャップ構造の効果の解析を通じて、スプライシングと輸送という二つの過程をつないでいきたい。この二つは一続きで密接に関連しており、真核生物の遺伝子発現において必須な過程なのである。

謝辞

課題研究から博士過程修了まで、志村研究室に実に7年間にわたって在籍させていただきました。思い返してみると楽しいことや苦しいことがありましたが、非常に実り多い有意義な期間でした。

なかなか研究が進展しない私を叱咤激励して下さりながら暖かく見守って下さり、指導していただきました志村令郎教授に心より感謝致します。ふだん私たちには温厚に接して下さる先生が、サイエンスとは、という話になると非常に厳しい御顔で話されていたのが印象的でした。サイエンスに従事する者としての心構えや姿勢を教えてくださいましたことは、私のこれからの研究人生において非常に大きな財産となることと思います。志村教授の御指導いただいた”弟子”としての誇りを忘れることなく、研究者として精進していきたいと思えます。

現奈良先端科学技術大学院大学の教授でいらっしゃいます、安田國男教授には、志村研究室に助教授として在籍されている頃から、スプライシングという分野の外から、実験だけでなく結果の考え方まで非常に鋭く有意義なアドバイスをいただきました。深く感謝致します。

また、当時助手でいらっしゃいました、神戸大学理学部助教授の坂本博博士には、実験上の細かいアドバイスだけでなくいろいろなディスカッションをしていただきました。厚く御礼申し上げます。

大野陸人博士には、私がこの研究室に入った当時も、助手として帰ってこられてからも公私にわたり大変お世話になりました。未熟者で大変ご心配をおかけしたことと思えます。ともすれば実験において独善的になりがちな私にいろいろなアドバイスや指導をしていただきました。深く感謝致します。これからはそのお教への通り”闘う研究者”を目指したいと思えます。

井上邦夫博士には実験上のことはもとより、こまごまとした院生の生活上のことまでいろいろ教えていただきました。大変感謝致しております。

同期の星島一幸博士との公私にわたるディスカッションは、彼の卓越した考えにふれることができ、私の大学院生活をめりはりのある楽しいものにしてくれました。感謝致します。

白石英明博士、沢育博士、竹内昌之氏、北村昌陽氏の先輩方、渡我部昭哉博士、松尾勳博士、宮内久美女史、瀬川昌也氏の”同期”の方々、また井上俊介氏、渡我部（樋口）

育子女史、萩野肇氏、尾野雄一氏、香山綾子女史、仁田正弘氏、所祐介氏、村田卓也氏、小野浩一郎氏、伏見大輔氏の後輩の方々という個性的な方々に囲まれて私の院生生活は楽しく充実したものとなりました。皆さんに協力していただけなければ私はここまでやってこれなかったと思います。どうもありがとうございました。

本研究の結果第二部の実験は国立循環器病センター生化学部の寒川賢治部長と当研究室の所祐介氏との共同研究です。明記すると共に心より感謝致します。また、データベースの検索にあたり、京都大学理学部宮田隆教授、隈啓一博士、二河成男氏に大変お世話になりました。感謝致します。

ペンシルバニア大学のGideon Dreyfuss博士には抗hnRNP C抗体を分与していただきました。NCBPのcDNAのスクリーニングに用いたライブラリーは東京工業大学の半田宏博士に、またpEF-BOSは京都大学の國貞隆弘博士に分与していただきました。Interaction Cloning法に用いたプラスミドや酵母はハーバードメディカルスクールのRoger Brent博士に分与していただきました。どうもありがとうございました。

課題研究生として研究室に在籍し、実験を手伝ってくれた阿比留康弘氏、茂田一郎氏に感謝致します。未熟な私による指導に戸惑ったのではないかと思います。

最後に両親に深く感謝致します。中学受験以降、身勝手な私の考えや行動に常に理解と愛情を持って接して下さいました。形には現れないかもしれませんが大きな財産をいただいたと思っています。これからもあなたがたの息子の行動を見守ってやって下さい。あらためて感謝の意を表して本論文を捧げます。

- Abmayr, S. M., Reed, R., and Maniatis, T. (1988). Identification of a functional mammalian spliceosome containing unspliced pre-mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7216-7220.
- Aebi, M., Clark, M.W., Vijayraghavan, U., and Abelson, J. (1990). A yeast mutant, *PRP20*, altered in mRNA metabolism and maintenance of nuclear structure, is defective in a gene homologous to the human gene *RCC1*, which is involved in the control of chromosome condensation. *Mol. Gen. genet.* **224**, 72-80.
- Alonso-Caplen, F. V., Nemeroff, M. E., Qiu, Y. and Krug, R. M. (1992). Nucleocytoplasmic transport: the influenza virus NS1 protein regulates the transport of spliced NS2 mRNA and its precursor NS1 mRNA. *Genes Dev.* **6**, 255-267.
- Amrein, H., Gorman, M., and Nöthiger, R. (1988). The sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell* **55**, 1025-1035.
- Amrein, H., Hedley, M. L., and Maniatis, T. (1994). The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by *transformer2*. *Cell* **76**, 735-746.
- Anderson, G. J., Bach, M., Luhrmann, R., and Beggs, J. D. (1989). Conservation between yeast and man of a protein associated with U5 small nuclear ribonucleoprotein. *Nature* **342** 819-821.
- Ayane, M., Preuss, U., Kohler, G., and Nielsen, P. J. (1991). A differentially expressed murine RNA encoding a protein with similarities to two types of nucleic acid binding motifs. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1273-1278.
- Behrens, S. E., and Luhrmann, R. (1991). Immunoaffinity purification of a [U4/U6.U5] tri-snRNP from human cells. *Genes Dev.* **5**, 1439-1452.
- Bell, L. R., Horabin, J. I., Schedl, P., and Cline, T. W. (1991). Positive autoregulation of *Sex-lethal* by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*. *Cell* **65**, 229-240.
- Bennett, M., Pinol-Roma, S., Staknis, D., Dreyfuss, G., and Reed, R. (1992a). Differential binding of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins to mRNA precursors prior to spliceosome assembly *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3165-3175.
- Bennett, M., Michaud, S., Kingston, J., and Reed, R. (1992b). Protein components specifically associated with prespliceosome and spliceosome complexes. *Genes Dev.* **6**, 1986-2000.
- Berget, S. M. and Roberson, B. L. (1986). U1, U2, and U4/U6 small nuclear ribonucleoproteins are required for *in vitro* splicing but not polyadenylation. *Cell* **46**, 691-696.
- Beyer, A. L., Christensen, M. E., Walker, B. W., and LeSturgeon, W. M. (1977). Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles. *Cell* **11**, 127-138.
- Bindereif, A., and Green, M. R. (1987). An ordered pathway of snRNP binding during mammalian pre-mRNA splicing complex assembly. *EMBO J.* **6**, 2415-2424.
- Bindereif, A., Wolff, T. and Green, M. R. (1990). Discrete domains of human U6 snRNA required for the assembly of U4/U6 snRNP and splicing complexes. *EMBO J.* **9**, 251-255.
- Black, D. L., Chabot, B., and Steitz, J. A. (1985). U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in premessenger RNA splicing. *Cell* **42**, 737-750.
- Black, D. L., and Steitz, J. A. (1986). Pre-mRNA splicing *in vitro* requires interact U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* **46**, 697-704.
- Blanton, S., Srinivasan, A., and Rymond, B. C. (1992). *PRP38* encodes a yeast protein required for pre-mRNA splicing and maintenance of stable U6 small nuclear RNA levels. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3939-3947.
- Boggs, R. T., Gregor, P., Idriss, S., Belote, J. M., and McKeown, M. (1987). Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the *transformer* gene. *Cell* **50**, 739-747.
- Breathnach, R., Benoist, C., O'hare, K., Gannon, F., and Chambon, P (1978). Ovalbumin gene: Evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4853-4857.
- Cavaloc, Y., Popielarz, M., Fuchs, J. P., Gattoni, R., and Stevenin, J. (1994). Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: a novel 35 kDa factor of the serine/arginine protein family. *EMBO J.* **13**, 2639-2649.
- Cech, T. R. (1992). Structure and mechanism of the large catalytic RNAs: Group I and Group II introns and Ribonuclease P. The RNA world. Gesteland, R. and Atkins, J. eds. (Cold Spring Harbor Press., Cold Spring Harbor, New York). 239-269.
- Champion-Arnaud, P., and Reed, R. (1994). The prespliceosome components SAP49 and SAP145 interact in a complex implicated in tethering U2 snRNP to the branch site. *Genes Dev.* **8**, 1974-1983.

- Champlin, D. T., Frasch, M., Saumweber, H., and Lis, J. T. (1991). Characterization of a *Drosophila* protein associated with boundaries of transcriptionally active chromatin. *Genes Dev.* **5**, 1611-1621.
- Chang, D. D., and Sharp, P. A. (1989). Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell* **59**, 789-795.
- Chang, T. H., Arenas, J., and Abelson, J. (1990). Identification of five putative yeast RNA helicase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1571-1575.
- Chaudhary, N., McMahon, C., and Blobel, G. (1991). Primary structure of a human arginine-rich nuclear protein that colocalizes with spliceosome components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8189-8193.
- Chapman, K. B., and Boeke, J. D. (1991). Isolation and characterization of the gene encoding yeast debranching enzyme. *Cell* **65**, 483-492.
- Choi, Y.-D., and Dreyfuss, G. (1984). Monoclonal antibody characterization of the C proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* **99**, 1997-2004.
- Chou, T.-B., Zachar, Z., and Bingham, P. M. (1987). Developmental expression of a regulatory gene is programmed at the level of splicing. *EMBO J.* **6**, 4095-4104.
- Christofori, G., Frendeway, D., and Keller, W. (1987). Two spliceosomes can form simultaneously and independently on synthetic double-intron messenger RNA precursors. *EMBO J.* **6**, 1747-1755.
- Company, M., Arenas, J., and Abelson, J. (1991). Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for the release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature* **349**, 487-493.
- Cooper, T. A. (1992). In vitro splicing of cardiac troponin T precursors. *J. Biol. Chem.* **267**, 5330-5338.
- Crispino, J. D., Blencowe, B. J., and Sharp, P. A. (1994). Complementation by SR proteins of pre-mRNA splicing reactions depleted of U1 snRNP. *Science* **265**, 1866-1869.
- Cáceres, J. F., and Krainer, A. R. (1993). Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. *EMBO J.* **12**, 4715-4726.
- Cáceres, J. F., Stamm, S., Helfman, D. M., and Krainer, A. R. (1994). Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* **265**, 1706-1709.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475-1489.
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Piñol-Roma, S., and Burd, C. (1993). hnRNP Proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 289-321.
- Dreyfuss, G., Choi, Y.-D., and Adam, S. A. (1984). Characterization of heterogeneous nuclear RNA-protein complexes in vivo with monoclonal antibodies. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1104-1114.
- Dwartzky, S. I., and Feldherr, C. M. (1988). Translocation of RNA coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J. Cell Biol.* **106**, 575-584.
- Ederly, I. and Sonenberg, N. (1985). Cap-dependent RNA splicing in a HeLa nuclear extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7590-7594.
- Fabre, E., Bodens, C. W., Wimmer, C., Mattaj, I. W., and Hurt, E.C. (1994). NUP145p is required for nuclear export of mRNA and binds homopolymeric RNA in vitro via a novel conserved motif. *Cell* **78**, 275-289.
- Fabrizio, P., and Abelson, J. (1990). Two domains of yeast U6 small nuclear RNA required for both steps of nuclear precursor messenger RNA splicing. *Science* **250**, 404-409.
- Fabrizio, P., Esser, S., Kastner, B., and Luhrmann, R. (1994). Isolation of *S. cerevisiae* snRNPs: Comparison of U1 and U4/U6.U5 to their human counterparts. *Science* **264**, 261-265.
- Featherstone, C., Darby, M. K., and Gerace, L. (1989). A monoclonal antibody against the nuclear pore complex inhibits nucleocytoplasmic transport of protein and RNA in vivo. *J. Cell Biol.* **107**, 1289-1298.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fleishmann, M., Clark, M. W., Forrester, W., Wickens, M., Nishimoto, T., and Aebi, M. (1991). Analysis of yeast prp20 mutations and functional complementation by the human homologue RCC1, a protein involved in the control of chromosome condensation. *Mol. Gen. Genet.* **227**, 417-423.
- Forbes, D. J. (1992). Structure and function of the nuclear pore complex. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 495-527

- Forets, P., Beloso, A., and Ortin, J. (1994). Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J.* **13**, 704-712.
- Forrester, W., Stutz, F., Rosbash, M., and Wickens, M. (1992). Defects in mRNA 3'-end formation, transcription initiation, and mRNA transport associated with the yeast mutation *prp20*: possible coupling of mRNA processing and chromatin structure. *Genes Dev.* **6**, 1914-1926.
- Frank, D., and Guthrie, C. (1992). An essential splicing factor, *SLU7*, mediates 3' splice site choice in yeast. *Genes Dev.* **6**, 2112-2124.
- Fu, X.-D., and Maniatis, T. (1990). Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized discrete regions in the nucleus. *Nature* **343**, 437-441.
- Fu, X.-D., Kats, R. A., Skalka, A. M., and Maniatis, T. (1991). The role of branchpoint and 3'-exon sequences in the control of balanced splicing of avian retrovirus RNA. *Genes Dev.* **5**, 211-220.
- Fu, X.-D., and Maniatis, T. (1992a). Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science* **256**, 535-538.
- Fu, X.-D., Mayeda, A., Maniatis, T., and Krainer, A. R. (1992b). General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities *in vitro* and both affect alternative 5' and 3' splice site selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11224-11228.
- Fu, X.-D. (1993). Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins. *Nature* **365**, 82-85.
- Fukumaki, Y., Ghosh, P. K., Benz Jr., E. J., Reddy, V. B., Lebowitz, P., Forget, B. G., and Weissman, S. M. (1982). Abnormally spliced messenger RNA in erythroid cells from patients with β^+ -thalassemia and monkey cells expressing a cloned β^+ -thalassemic gene. *Cell* **28**, 585-593.
- Fuller-Pace, F. V. (1994). RNA helicases: modulators of RNA structure. *Trends Cell Biol.* **4**, 271-274.
- Ge, H., and Manley, J. L. (1990). A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA *in vitro*. *Cell* **62**, 25-34.
- Ge, H., Zuo, P., and Manley, J. L. (1991). Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators. *Cell* **66**, 373-382.
- Ghetti, A., Pinol-Roma, S., Michael, W. M., Momadi, C., Dreyfuss, G. (1991). hnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3671-3678.
- Gil, A., Sharp, P., Jamison, S. F., Garcia-blanco, M. A. (1991). Characterization of cDNAs encoding the polypyrimidine tract-binding protein. *Genes Dev.* **5**, 1224-1236.
- Gozani, O., Patton, J. G., and Reed R. (1994). A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *EMBO J.* **13**, 3356-3367.
- Grabowski, P. J., and Sharp, P. A. (1986). Affinity chromatography of splicing complexes: U2, U5, and U4+U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in the spliceosome. *Science* **233**, 1294-1299.
- Green, M. R. (1991). Biochemical Mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 559-599.
- Guthrie, C., and Fink, G. R. (1991). *Methods Enzymol.: A guide for yeast genetics*. (Cold Spring Harbor Press., Cold Spring Harbor, New York).
- Hamm, J., Darzynkiewicz, E., Tahara, S. M., and Mattaj, I. W. (1990a). The trimethylguanosine cap structure of U1 snRNA is a component of a bipartite nuclear targeting signal. *Cell* **62**, 569-577.
- Hamm, J., and Mattaj, I. W. (1990b). Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* **63**, 109-118.
- Hampson, R. K., LaFollette, L., and Rottman, F. M. (1989). Alternative processing of bovine growth hormone mRNA is influenced by downstream exon sequences. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1604-1610.
- Harlow, L., and Lane, D. (1988). *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Horabin, J. I., and Schedl, P. (1993a). Regulated splicing of the *Drosophila Sex-lethal* male exon involves a blockage mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1408-1414.
- Horabin, J. I., and Schedl, P. (1993b). *Sex-lethal* autoregulation requires multiple *cis*-acting elements upstream and downstream of the male exon and appears to depend largely on controlling the use of the male exon 5' splice site. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7734-7746.

- Hoshijima, K., Inoue, K., Higuchi, I., Sakamoto, H., and Shimura, Y. (1991). Control of doublesex alternative splicing by *transformer* and *transformer-2* in *Drosophila*. *Science* **252**, 833-836.
- Inoue, K., Ohno, M., Sakamoto, H., and Shimura, Y. (1989). Effect of the cap structure on pre-mRNA splicing in *Xenopus* oocyte nuclei. *Genes Dev.* **3**, 1472-1479.
- Inoue, K., Hoshijima, K., Sakamoto, H., and Shimura, Y. (1990). Binding of the *Drosophila Sex-lethal* gene product to the alternative splice site of *transformer* primary transcript. *Nature* **344**, 461-463.
- Inoue, S. B., Sakamoto, H., Sawa, H., and Shimura, Y. (1992). Nucleotide sequence of a fission yeast gene encoding the DEAH-box RNA helicase. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5841.
- Izaurrealde, E., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., and Mattaj, I. W. (1992). A nuclear cap binding protein that may mediate nuclear export of RNA polymerase II-transcribed RNAs. *J. Cell Biol.* **118**, 1287-1295.
- Izaurrealde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E., and Mattaj, I. W. (1994). A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* **78**, 657-668.
- Jackson, S. P., Lossky, M., and Beggs, J. D. (1988). Cloning of RNA8 of *Saccharomyces cerevisiae*, detection of the RNA8 protein, and demonstration that it is essential for nuclear pre-mRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1067-1075.
- Kadowaki, T., Zhao, Y., and Tartakoff, A. M. (1992). A conditional yeast mutant deficient in mRNA transport from nucleus to cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2312-2316.
- Kataoka, N., Hashimoto, S., and Shimura, Y. (1993). Heat treatment of nuclear extract alters selection of the 3' splice site in pre-mRNA splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 223-228.
- Kiledjian, M., and Dreyfuss, G. (1992). Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J.* **11**, 2655-2664.
- Kim, S. H., Smith, J., Claude, A., and Lin, R.-J. (1992). The purified yeast pre-mRNA splicing factor PRP2 is an RNA-dependent NTPase. *EMBO J.* **11**, 2319-2326.
- Kim, Y.-J., Zuo, P., Manley, J. L., and Baker, B. S. (1992). The *Drosophila* RNA-binding protein RBP1 is localized to transcriptionally active sites of chromosomes and shows a functional similarity to human splicing factor ASF/SF2.
- Kohtz, J. D., Jamison, S. F., Will, C. L., Zuo, P., Luhrmann, R., Garcia-Blanco, M. A., and Manley, J. L. (1994). Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**, 119-124.
- Konarska, M. M., and Sharp, P. A. (1986). Electrophoretic separation of complexes in the splicing of precursors to mRNAs. *Cell* **46**, 845-855.
- Konarska, M. M., and Sharp, P. A. (1987). Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosomes. *Cell* **49**, 763-774.
- Krainer, A. R., Maniatis, T., Ruskin, B., and Green, M. R. (1984). Normal and mutant human β -globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced *in vitro*. *Cell* **36**, 993-1005.
- Krainer, A. R., and Maniatis, T. (1985). Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell* **42**, 725-736.
- Krainer, A. R., and Maniatis, T. (1988). RNA splicing. In *Frontiers in Molecular Biology: Transcription and Splicing*, B. D. Hames, and D. M. Glover, eds. (Oxford/Washington D.C.: IRL Press) 131-206.
- Krainer, A. R., Conway, G. C., and Kozak, D. (1990a). Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes Dev.* **4**, 1158-1171.
- Krainer, A. R., Conway, G. C., and Kozak, D. (1990b). The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell* **62**, 35-42.
- Krainer, A. R., Mayeda, A., Kozak, D., and Binns, G. (1991). Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and *Drosophila* splicing regulators. *Cell* **66**, 383-394.
- Krämer, A., Keller, W., Appel, B., and Luhrmann, R. (1984). The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* **38**, 299-307.
- Krämer, A., Frick, M., and Keller, W. (1987). Separation of multiple components of HeLa cell nuclear extracts required for pre-messenger RNA splicing. *J. Biol. Chem.* **262**, 17630-17640.

- Kuo, H.-C., Nasim, F. H., and Grabowski, P. J. (1991). Control of alternative splicing by the differential binding of U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Science*, **251**, 1045-1050.
- Langford, C. J., Klinz, F. J., Donath, C., and Gallwitz, D. (1984). Point mutations identify the conserved, intron-contained TACTAAC box as an essential splicing signal sequence in yeast. *Cell* **36**, 645-653.
- Lee, A. W. K. and Green, R. M. (1990). Small-scale preparation of extracts from radiolabeled cells efficient in pre-mRNA splicing. *Methods Enzymol.* **181B**, 20-30
- Legrain, P., Seraphin, B., and Rosbash, M. (1988). Commitment of yeast pre-mRNA to the spliceosome pathway does not require U2 small nuclear ribonucleoprotein. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3755-3760.
- Legrain, P., and Rosbash, M. (1989). Some *cis*- and *trans*- acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* **57**, 573-583.
- Legrain, P., and Choulika, A. (1990). The molecular characterization of PRP6 and PRP9 yeast genes reveals a new cysteine/histidine motif common to several splicing factors.
- Lerner, E. A., Boyle, J. A., Mount, S. M., Wolin, S. C. and Steitz, J. A. Are snRNPs involved in splicing? *Nature* **283**, 220-224.
- Lustig, A. J., Lin, R.-J., Abelson, J. (1986). The yeast RNA gene products are essential for mRNA splicing *in vitro*. *Cell* **47**, 953-963.
- Matsumoto, T., and Beach, D. H. (1991). Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase. *Cell* **66**, 347-360.
- Mayeda, A., and Krainer, A. R. (1992). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* **68**, 365-375.
- Mayeda, A., Zahler, A. M., Krainer, A. R., and Roth, M. B. (1992). Two members of a conserved family of nuclear phosphoproteins are involved in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1301-1304.
- Mayeda, A., Helfman, D. M., and Krainer, A. R. (1993). Modulation of exon skipping and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2993-3001.
- Michaud, S., and Reed, R. (1991). An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway. *Genes Dev.* **5**, 2534-2546.
- Mizushima, S., and Nagata, S. (1990). pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5322.
- Moore, M. J., Query, C. C., and Sharp, P. A. (1992). Splicing of precursors to messenger RNAs by the spliceosome. In *The RNA world*, R. Gesteland, and J. Atkins, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 303-357.
- Niwa, M., and Berget, M. (1991). Mutation of the AAUAAA polyadenylation signal depresses *in vitro* splicing of proximal but not distal introns. *Genes Dev.* **5**, 2086-2095.
- Ohno, M., Sakamoto, H., and Shimura, Y. (1987). Preferential excision of the 5' proximal intron from mRNA precursors with two introns as mediated by the cap structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5187-5191.
- Ohno, M., Kataoka, N., and Shimura, Y. (1990). A nuclear cap binding protein from HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6989-6995.
- Ohtsubo, M., Kai, R., Furuno, N., Sekiguchi, T., Sekiguchi, M., Hayashida, H., Kuma, K., Miyata, T., Fukushige, S., Murotsu, T., Matsubara, K., and Nishimoto, T. (1987). Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (RCC1) involved in the regulation of onset of chromosome condensation. *Genes Dev.* **1**, 585-593.
- Ono, Y., Ohno, M., and Shimura, Y. (1994). Identification of a putative RNA helicase (HRH1), a human homolog of yeast Prp22. *Mol. cell. Biol.* **14**, 7611-7620.
- Padgett, R. A., Mount, S. M., Steitz, J. A., and Sharp, P. A. (1983). Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* **35**, 101-107.
- Patton, J. G., Mayer, S. A., Tempst, P., and Nadal-Ginard, B. (1991). Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* **5**, 1237-1251.
- Patton, J. G., Porro, E. B., Galceran, J., Tempst, P., and Nadal-Ginard, B. (1993). Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev.* **7**, 393-406.
- Patzelt, E., Thalmann, E., Hartmuth, K., Blaas, D., and Kuechler, E. Assembly of pre-mRNA splicing complex is cap dependent. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1387-1397.
- Pause, A. and Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.* **11**, 2643-2654.

- Perkins, K. K., Furneaux, H. M., and Hurwitz, J. (1986). RNA splicing products formed with isolated fractions from HeLa cells are associated with fast-sedimenting complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 887-891.
- Piñol-Roma, S., Dreyfuss, G. (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **355**, 730-732.
- Reed, R., Griffith, J. and Maniatis, T. (1988). Purification and visualization of native spliceosomes. *Cell* **53**, 949-961.
- Routmann, G. and Breathnach, R. (1985). A role for branchpoints in splicing *in vivo*. *Nature* **315**, 430-432.
- Robberson, B. L., Cote, G. J., and Berget, S. M. (1990). Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 84-94.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., and Dingwall, C. (1991). Two independent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence; Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615-623.
- Roth, M. B., Murphy, C., and Gall, J. G. (1990). A monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope stains lampbrush chromosome loops and small granules in the amphibian germinal vesicle. *J. Cell Biol.* **111**, 2217-2223.
- Roth, M. B., Zahler, A. M., and Stolk, J. A. (1991). A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *J. Cell Biol.* **115**, 587-596.
- Ruby, S. W., and Abelson, J. (1988). An early hierarchical role of U1 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *Science* **242**, 1028-1035.
- Ruby, S. W., and Abelson, J. (1991). Pre-mRNA splicing in yeast. *Trends in Genet.* **7**, 79-85.
- Ruskin, B., and Green, M. R. (1985). Role of the 3' splice site consensus sequence in mammalian pre-mRNA splicing. *Nature* **317**, 732-734.
- Ruskin, B., Zamore, P. D., and Green, M. R. (1988). A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. *Cell* **52**, 207-219.
- Sakamoto, H., Ohno, M., Yasuda, K., Mizumoto, K., and Shimura, Y. (1987). *In vitro* splicing of a chicken δ -crystallin pre-mRNA in a mammalian extract. *J. Biochem.* **102**, 1287-1301.
- Sakamoto, H., Inoue, K., Higuchi, I., Ono, Y., and Shimura, Y. (1992). Control of *Drosophila* Sex-lethal pre-mRNA splicing by its own female-specific product. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5533-5540.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Press., Cold Spring Harbor, New York).
- Sawa, H., and Shimura, Y. (1988). Requirement of ATP in the second step of the pre-mRNA splicing reaction. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3157-3164.
- Sawa, H., and Shimura, Y. (1991a). Alterations of RNaseH sensitivity of the 3' splice site region during the *in vitro* splicing reaction. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3953-3958.
- Sawa, H., and Shimura, Y. (1991b). Requirement of protein factors and ATP for the disassembly of the spliceosome after mRNA splicing reaction. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6819-6821.
- Sawa, H., and Shimura, Y. (1992). Association of U6 snRNA with the 5' splice site region of mRNA precursor in the spliceosome. *Genes Dev.* **6**, 244-254.
- Sawa, H., and Abelson, J. (1992). Evidence for a base-pairing interaction between U6 small nuclear RNA and the 5' splice site during the splicing reaction in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11269-11273.
- Schwer, B., and Guthrie, C. (1992). PRP16 is an RNA-dependent ATPase that interacts transiently with the spliceosome. *Nature* **349**, 494-499.
- Seraphin, B., and Rosbash, M. (1989). Identification of functional U1 snRNA-pre-mRNA complexes committed to spliceosome assembly and splicing. *Cell* **59**, 349-358.
- Seraphin, B., Abovich, N., and Rosbash, M. (1991). Genetic depletion indicates a late role for U5 snRNP during *in vitro* spliceosome assembly. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3857-3860.
- Siebel, C. W., and Rio, D. C. (1990). Regulated splicing of the *Drosophila* P transposable element third intron *in vitro*: somatic repression. *Science* **248**, 1200-1207.
- Siebel, C. W., Fresco, L. D., and Rio, D. C. (1992). The mechanism of somatic inhibition of *Drosophila* P-element pre-mRNA splicing: multiprotein complexes at an exon pseudo-5' splice site control U1 snRNP binding. *Genes Dev.* **6**, 1386-1401.
- Siebel, C. W., Kanaar, R., and Rio, D. C. (1994). Regulation of tissue-specific P-element pre-mRNA splicing requires the RNA-binding protein PSI. *Genes Dev.* **8**, 1713-1725.
- Singh, R. and Reddy, R. (1989). γ -monomethyl phosphate: a cap structure in spliceosomal U6 small nuclear RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8280-8283.

- Siomi, H., Matunis, M. J., Michael, W. M. and Dreyfuss, G. (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1193-1198.
- Siomi, H., Choi, M., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L., and Dreyfuss, G. (1994). Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes Fragile X syndrome. *Cell* **77**, 33-39.
- Smith, C. W. J., Patton, J. G., and Nadal-Ginard, B. (1989). Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu. Rev. Genet.* **23**, 527-577.
- Sonenberg, N. (1988). Cap-binding proteins of eukaryotic messenger RNA: Functions in initiation and control of translation. *Progress in nucleic acids research and molecular biology*. (Academic Press) **35**, 173-207.
- Staknis, D. and Reed, R. (1994). SR proteins promote the first specific recognition of pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Mol. cell. Biol.* **14**, 7670-7682.
- Steingrimsdottir, H., Rowley, G., Dorado, G., Cole, J., and Lehmann, A. R. (1992). Mutations which alter splicing in the human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1201-1208.
- Sun, Q., Mayeda, A., Hampson, R. K., Krainer, A. R., and Rottman, F. M. (1993). General splicing factor SF2/ASF promotes alternative splicing by binding to an exonic splicing enhancer. *Genes Dev.* **7**, 2598-2608.
- Swanson, M. S., and Dreyfuss, G. (1988). Classification and purification of proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles by RNA-binding specificities. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2237-2241.
- Tanaka, K., Watakabe, A., and Shimura, Y. (1994). Polypurine sequences within a downstream exon function as a splicing enhancer. *Mol. cell. Biol.* **14**, 1347-1354.
- Tani, T., and Ohshima, Y. (1989). The gene for the U6 small nuclear RNA in fission yeast has an intron. *Nature* **337**, 87-90.
- Tian, M., and Maniatis, T. (1992). Positive control of pre-mRNA splicing in vitro. *Science* **256**, 237-240.
- Tian, M., and Maniatis, T. (1993). A splicing enhancer complex controls alternative splicing of *doublesex* pre-mRNA. *Cell* **74**, 105-114.
- Treisman, R., Orkin, S. H., and Maniatis, T. (1983). Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β -thalassemia genes. *Nature* **302**, 591-596.
- Uemura, H., and Jigami, Y. (1992). *GCR3* encodes an acidic protein that is required for expression of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **174**, 5526-5532.
- Utans, U., Behrens, S. E., Luhrmann, R., Kole, R., and Kramer, A. (1992). A splicing factor that is inactivated during in vivo heat shock is functionally equivalent to the [U4/U6.U5] triple snRNP-specific proteins. *Genes Dev.* **6**, 631-641.
- Valcárcel, J., Singh, R., Zamore, P. D., and Green, M. R. (1993). The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing to *transformer* pre-mRNA. *Nature* **362**, 171-175.
- Vankan, P., McGuigan, C., and Mattaj, I. W. (1990). Domains of U4 and U6 snRNAs required for snRNP assembly and splicing complementation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **9**, 3397-3404.
- Vellard, M., Sureau, A., Soret, J., Martinerie, C., and Perbal, B. (1992). A potential splicing factor is encoded by the opposite strand of the trans-spliced *c-myb* exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2511-2515.
- Vijayraghavan, U., Company, M., and Abelson, J. (1989). Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **3**, 1206-1216.
- Vijayraghavan, U., and Abelson, J. (1990). PRP18, a protein required for the second reaction in pre-mRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 324-332.
- Wassarman and Steitz, J. A. (1991). Alive with DEAD proteins. *Nature* **349**, 463-464.
- Watakabe, A., Tanaka, K., and Shimura, Y. (1993). The role of exon sequences in splice site selection. *Genes Dev.* **7**, 407-418.
- Wente, S. R., Rout, M. P., and Blobel, G. (1992). A new family of yeast nuclear pore complex proteins. *J. Cell. Biol.* **119**, 705-723.
- Wente, S. R., and Blobel, G. (1993). A temperature-sensitive *NUP116* null mutant forms a nuclear pore complex thereby blocking nucleocytoplasmic traffic. *J. Cell. Biol.* **123**, 275-284.
- Wu, J. Y. and Maniatis, T. (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75**, 1061-1070.

- Xu, R., Teng, J., and Cooper, T. A. (1993). The cardiac troponin T alternative exon contains a novel purine-rich positive splicing element. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3660-3674.
- Zahler, A. M., Lane, W. S., Stolk, J. A., and Roth, M. B. (1992). SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.* **6**, 837-847.
- Zahler, A. M., Neugebauer, K. M., Lane, W. S., and Roth, M. B. (1993). Distinct function of SR protein in alternative pre-mRNA splicing. *Science* **260**, 219-222.
- Zamore, P. D., and Green, M. R. (1989). Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9243-9247.
- Zamore, P. D., and Green, M. R. (1991). Biochemical characterization of U2 snRNP auxiliary factor: an essential pre-mRNA splicing factor with a novel intranuclear distribution. *EMBO J.* **10**, 207-214.
- Zamore, P. D., Patton, J. G., and Green, M. R. (1992). Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF. *Nature* **355**, 609-614.
- Zervos, S. A., Gyuris, J., and Brent, R. (1993). Mx1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* **72**, 223-232.
- Zhang, M., Zamore, P. D., Carmo-Fonseca, M., Lamond, A. I., and Green, M. R. (1992). Cloning and intracellular localization of the U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor small subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8769-8773.
- Zhang, M., and Green, M. R. (1994). Identification of ATP binding proteins in the mammalian spliceosome. *Abstracts of papers presented at the 1994 meeting on RNA processing*. Cold Spring Harbor Laboratory, 517.
- Zhuang, Y., and Weiner, A. M. (1986). A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell* **46**, 827-835.
- Zhuang, Y., and Weiner, A. M. (1989). A compensatory base change in human U2 snRNA can suppress a branch site mutation. *Genes Dev.* **3**, 1545-1552.
- Zuo, P., and Manley, J. L. (1993). Functional domains of the human splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.* **12**, 4727-4737.