

氏 名	かた 片 岡 直 行
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1641 号
学位授与の日付	平 成 7 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
学位論文題目	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

(主 査)
論文調査委員 教 授 志 村 令 郎 教 授 山 岸 秀 夫 教 授 柳 田 充 弘

論 文 内 容 の 要 旨

申請論文は、mRNA 前駆体の 5' 末端に存在するキャップ構造のスプライシング促進効果とそれに関与すると考えられる核内キャップ構造認識因子の解析に関する論文である。真核生物の mRNA 前駆体の 5' 末端には、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、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スプライソーム形成、第一段階の反応、第二段階の反応の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、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、このときスプライソームの形成は二つのイントロンにおいて独立に見ら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、スプライソーム形成までにキャップ構造による促進効果がみられることが考えられた。

さらに、こ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、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、既知のタンパク質に対して高い相同性はみられなかった。NCBP の細胞内局在性を、エピトープタグging法を用いて調べたところ、NCBP は HeLa 細胞内で核質に局在すること、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 HeLa 細胞内の因子の同定を、酵母 Two-Hybrid System を用いた、タンパク質間の相互作用を指標とす

るクローニング法により行った。その結果、三つのクローン (# 30, 37, 69) が単離された。# 37 は計算上の分子量が約 17 キロダルトンの 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、NCBP と # 37 は、複合体を形成してキャップ構造に結合することが示された。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、ノザンプロットによる解析から分子量 200 キロダルトンを越えると予想される巨大なタンパク質であると考えられた。# 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おり、酵母 Two-Hybrid System を用いた解析から、この配列がタンパク質間の相互作用に関与することが示唆された。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認識因子の複合体が存在し、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。

なお、参考論文 2 編は、核内キャップ構造結合タンパク質の精製に関する論文と、*in vitro* スプライシング反応系を用いた 3' スプライス部位選択の解析に関する論文である。

論文審査の結果の要旨

真核生物の mRNA 前駆体の 5' 末端には、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 前駆体をエキソヌクレアーゼから保護し、安定化させることが知られていた。近年、キャップ構造は細胞内における様々な現象に関与していることが明らかになってきた。まず、細胞質において、キャップ構造はタンパク質の翻訳を促進する。この現象に関与する細胞質内キャップ構造結合タンパク質やその翻訳促進機構については既に明らかにされていた。一方、核内においても、キャップ構造はスプライシングや mRNA の核外輸送に重要な役割を果たすことが報告された。しかし、これらの過程におけるキャップ構造による促進機構やそれに関与する核内キャップ構造結合因子についてはほとんど解析されていなかった。

このような状況下で、申請者は、キャップ構造によるスプライシング促進効果に着目し、その促進機構とそれに関与する核内キャップ構造結合因子についての解析を試みた。まず、*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。単一のイントロンを持つ mRNA 前駆体と二つのイントロンを持つ mRNA 前駆体を用いて実験を行ったところ、キャップ構造による促進効果は、キャップ構造に最も近いイントロンにおいてのみ、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。そして、単一のイントロンを持つ mRNA 前駆体を用いた解析から、この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を促進することによるものと考えられた。このことは、mRNA スプライシング機構の解明において重要な知見を提供するものである。

さらに、申請者はこ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、精製した。そしてこの核内キャップ構造結合タンパク質 (Nuclear Cap Binding Protein, NCBP) の cDNA を単離し、これを用いて NCBP が HeLa 細胞内において核質に局在することを明らかにした。さらに、NCBP と相互作用する HeLa 細胞内の因子の同定を、酵母 Two-Hybrid System を用いた、タンパク質間の相互作用を指

標とするクローニング法により行い、NCBPのキャップ構造への結合に必須なRNA結合タンパク質の存在を明らかにした。また、この他にもNCBPと相互作用する因子が同定され、細胞質の場合と何様に、核内においてもキャップ構造認識因子の複合体が存在することが初めて明らかにされた。このことは、キャップ構造が関与する過程であるmRNAスプライシングやmRNAの核外輸送といった核内での現象を解明する上で極めて重要な発見であり、高く評価される。これらの研究は、申請者の分子生物学に対する卓越した研究能力によってはじめて可能であることは明らかである。

参考論文2編は、核内キャップ構造結合タンパク質の精製に関する論文と、*in vitro* スプライシング反応系を用いた3' スプライス部位選択の解析に関する論文であるが、上記の論文とあわせて申請者の分子生物学に対する深い学識と研究能力を示すものである。よって申請論文は理学博士の学位を授与するに十分な内容をもつと判断される。

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