

牛島 隆二郎 論文内容の要旨

主 論 文

Nucleolar targeting of proteins by the tandem array of basic amino acid stretches identified in the RNA polymerase I-associated factor PAF49

(RNA ポリメラーゼ I 会合因子 PAF49 で同定された塩基性アミノ酸伸長の縦列配列による蛋白の核小体ターゲティングについて)

(牛島隆二郎、松山俊文、永田泉、山本一男)

(Biochemical and Biophysical Research Communications、 369 巻 4 号 1017-1021, 2008 年)

長崎大学大学院医学研究科 医療科学専攻
(指導教授：永田 泉教授)

緒 言

核小体は rRNA の転写やプロセッシング、リボソームの構築が行われる領域であり、活発な増殖や成長をする細胞では RNA ポリメラーゼ I (Pol I) が繊維状中心部と高密度繊維状部の間で rRNA 前駆体合成を誘導すると考えられている。これは細胞全体の RNA 合成の 50% 近くを占めるものである。精製されたマウス Pol I は 12 のサブユニットと、少なくとも 2 種の会合因子、PAF53 と PAF49 で構成される。このうち PAF49 は選択性因子 (SL1) の 48kDa サブユニットである TAF48 と結合することで rRNA 前駆体合成の誘導に関与していく。また、PAF49 は成長細胞の核小体に蓄積する傾向があるが、成長が停止すると核小体の外側、核質に拡散していく。このような細胞成長に関連した核小体蛋白の移動がいかにして調節されるかは未だ明らかではない。本研究では、段階的欠失や点変異で加工された PAF49 を細胞内に導入し、その動態を観察することにより、PAF49 構成アミノ酸の核小体内移動に関する役割について考察を行った。

対象と方法

PAF49 蛋白・緑色蛍光蛋白発現プラスミドを構築・精製し、これにより形質転換された NIH3T3 細胞の核小体に PAF49 蛋白が優位に蓄積することを蛍光顕微鏡でまず確認した。つぎに、PAF49 遺伝子配列に N 末端から段階的に欠失を加えたもの (欠失長

が短いものから順に $\Delta N1$ 、 $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 、 $\Delta N4$) と C 末端から段階的に欠失を加えたもの (欠失長が長いものから順に $\Delta C1$ 、 $\Delta C2$ 、 $\Delta C3$ 、 $\Delta C4$) を構築したが、その欠失の長さは配列途中に 6 ヶ所で縦列配列する塩基性アミノ酸伸長 (basic amino acid stretch, =BS) の部位に応じて決定された。また、その 6 ヶ所の塩基性アミノ酸伸長の部位 (N 末端側から順に BS1、BS2、BS3、BS4、BS5、BS6) に点変異を加えたものも構築し、これらの変異 PAF49 蛋白を発現するプラスミドを精製したのちに NIH3T3 細胞に各々導入。変異蛋白の細胞内局在の変化を蛍光顕微鏡で観察した。

結 果

PAF49N 末端もしくは C 末端から段階的に欠失を加えられて発現した蛋白のうち、199 番目から 338 番目のアミノ酸配列が保たれた (BS1 から BS4 が正常に維持された) 変異蛋白では核小体内局在がみられたが、その他の変異蛋白では核質や細胞質への拡散を呈していた。また、複数の点変異組み合わせによる発現蛋白においては、3 ヶ所の点変異組み合わせのうち、変異 BS5 を含む蛋白の多くで核質への拡散を認めた。BS1 から BS4 まで 4 ヶ所の点変異を組み合わせたものでも核質への拡散を呈したが、さらに残りの BS5 と BS6 も欠失させると、蛋白は核小体内に全く存在を示さなくなった。逆に、正常 BS5 配列を加えると蛋白の核質内局在が誘導され、更に正常 BS4 配列、正常 BS6 配列と順に加えていくと、局在が核小体内に変化していった。次に、インターフェロン制御因子 3 (IRF-3) 蛋白発現プラスミドに正常 BS456 配列を追加すると、本来核質外に存在している IRF-3 蛋白の核質内・核小体内移動が認められた。

考 察

核小体は、リボソーム合成のみならず細胞分裂の制御や細胞周期の進行、ストレス反応といった細胞活動に対する機能を有すると考えられている。こうした動的イベントの過程で、様々な蛋白の会合や解離がみられる。このうち、例えば、癌抑制遺伝子 p53 の安定性を制御する p14ARF の異種相同遺伝子 p19ARF の N 末端ドメインには塩基性アミノ酸配列が存在し、蛋白の核小体ターゲティングに必須であることが過去の研究で示されている。また、同じく p53 の安定性を制御する HDM2 のマウス相同遺伝子 MDM2 は核小体局在シグナルを有し、MDM2 の塩基性アミノ酸縦列モチーフがチオレドキシシン内活性化ループに導入されると、生成されたキメラ蛋白の核小体内への移動を招く。対照的に、この部位の変異や欠失では MDM2 の核質への再移動を招く。本研究において対象となった PAF49 では、蛋白の核小体内蓄積に関して単一の塩基性アミノ酸伸長のみでは不十分だが、少なくとも 3 ヶ所以上の伸長の存在が必要であることが示唆された。特に、C 末端側の 3 ヶ所の縦列配列 (B456) が追加されることで、細胞質内蛋白の核小体内への強い誘導が示された。核小体機能に関与する普遍的な核小体ターゲティングシグナルは未だ同定されてはいないが、今回のような塩基性アミノ酸伸長の同定と、異型蛋白の核小体内への局在誘導により、細胞内区画での物質移動に考察を加えるための新たな手掛かりが得られたと言える。