

特集：タンパク質修飾がもたらす遺伝子発現調節

RNA ポリメラーゼ II-CTD リン酸化による 遺伝子発現過程の協調機構

広 瀬 豊

RNA ポリメラーゼ II (Pol II) は、細胞周期、細胞外シグナル、発生・分化のプログラムに応じて多様な遺伝子の転写を行っている。Pol II 最大サブユニットカルボキシル末端領域には、YSPTSPS の 7 アミノ酸の繰り返しからなる「CTD」とよばれる特徴的な領域が存在し、転写の開始から伸長・終結に至る過程でダイナミックなリン酸化制御を受ける。近年の研究からリン酸化 CTD は、様々な RNA プロセシング因子やヒストン修飾因子の足場として機能し、転写と RNA プロセシングやヒストン修飾を共役させていることが明らかとなった。本稿では、Pol II による転写過程が、CTD リン酸化や構造変換調節を介して、いかに巧みにクロマチン修飾や mRNA プロセシングといった過程と連携しているかを紹介したい。

はじめに

真核細胞生物において、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) は、全てのタンパク質遺伝子と多くの非コード RNA 遺伝子など非常に多様な遺伝子を転写している。一方 Pol I と Pol III は、リボソーム RNA 遺伝子や低分子 RNA 遺伝子などの限られた種類の遺伝子を転写している。Pol II は、Pol I や Pol III と構造的にもサブユニット構成においても著しい共通性を有しているが、その最大サブユニット (Rpb1) のカルボキシル末端に、「CTD (C-terminal domain)」とよばれる Pol II のみに存在する特徴的なドメインを有している。CTD は、リン酸化修飾可能な 5 アミノ酸と二つのプロリンから構成される 7 アミノ酸配列 YSPTSPS のタンデムな繰り返しから成る。CTD は、転写開始・伸長・終結の各段階でダイナミックなリン酸化を受け、ヒストン

修飾因子や RNA プロセシング因子の足場として機能している。本稿では、CTD の構造とリン酸化調節の観点から、転写過程がいかにダイナミックにヒストン修飾や mRNA プロセシング・mRNA 核外輸送と連携・共役しているかを概説する。

1. CTD の構造

Pol II は、12 サブユニット (Rpb1~Rpb12) からなる分子量約 550 kDa の DNA 依存 RNA 合成酵素である¹⁾。その最大サブユニット Rpb1 と 2 番目に大きいサブユニット Rpb2 は、大腸菌 RNA ポリメラーゼの β' および β サブユニットとそれぞれ相同性を有している¹⁾。CTD は前述のように、原核生物の RNA ポリメラーゼや真核生物の他の Pol I や Pol III には対応する領域がない特徴的なドメインで、7 アミノ酸配列 Tyr¹-Ser²-Pro³-Thr⁴-Ser⁵-Pro⁶-Ser⁷ を一単位とする繰り返しから成っている²⁾ (図 1)。出芽酵母 Pol II の X 線結晶構造解析によると、Rpb1 と Rpb2 の間に正の表面電荷を持つ割れ目 (クレフト) が存在し (図 1)、その間に鋳型 DNA を挟み込む¹⁾。クレフト内で合成され、DNA-RNA 対からはがされた RNA はやがて Pol II 表面の出口へと押し出される¹⁾。RNA の出口は CTD とつながったリンカー領域の近くに位置しており、CTD に結合して

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・遺伝情報制御学研究室 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

Phosphorylation of the RNA polymerase II CTD coordinates gene expression processes

Yutaka Hirose (Laboratory of Gene Regulation, Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan)

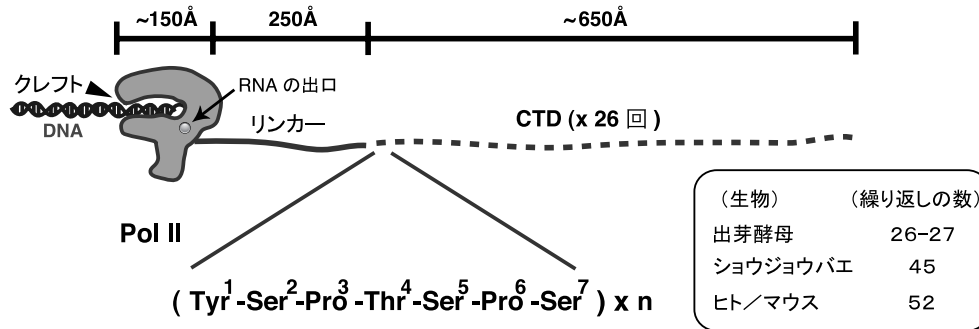


図1 RNAポリメラーゼII最大サブユニットCTDの構造

出芽酵母RNAポリメラーゼII複合体(Pol II)および伸び切った状態をとったと仮定した場合の最大サブユニットのリンカー領域およびCTD(実線および破線でそれぞれ表した)の相対的な長さを上に示した。クレフトを矢頭で、またRNAの出口を矢印で示した。CTDコンセンサス7アミノ酸配列と、生物ごとの繰り返しの数を囲みの中に示した。

いるRNAプロセッシング因子がRNA前駆体を修飾・加工するためには都合のよい配置をとっている。リンカーおよびCTDは、長く伸びた構造をとると仮定すると、リンカーはおよそ250オングストローム、CTDは約650オングストロームであり約150オングストロームのPol II本体の数倍に及ぶ²⁾(図1)。CTDは非常に柔軟であり、安定な構造をとらないために全長構造はこれまで解析されていない。しかし他のタンパク質との結合によって安定化され、結合パートナーに応じた多様な構造をとりうると考えられている²⁾。

CTDの7アミノ酸配列の繰り返しの回数は8~52回と生物種によって異なり、ネズミマラリア原虫8回³⁾、出芽酵母26~27回、シヨウジョウバエ45回、哺乳類では52回であり、生物種のゲノム構造の複雑さに相関するかのようによく増大する傾向にある⁴⁾。CTDは、リピートの回数は違うものの、その配列が進化的によく保存されていることから重要な機能を有すると考えられる。実際CTDは、細胞の生存にとって必須であることが示されている。出芽酵母においては、8-10リピートまで削ると温度感受性になり⁵⁾、7リピート以下では生存できない⁶⁾。マウス培養細胞においては52回リピートのうち約30リピート以上が生存に必要である⁷⁾。またマウス個体においては、31-39番目のリピートを欠いたRpb1遺伝子ホモ接合マウスは、出生前致死率が高く、出生したマウスは野生型に比べ成育不全を示すことが報告され、CTDが哺乳類発生過程における成長の調節に関わっている可能性も示唆されている⁸⁾。

ヒトおよびマウスのCTDにおいては、52リピート中30リピートの7アミノ酸配列内いくつかのアミノ酸置換が見られる。1番目のチロシン(Tyr1)と6番目のプロリン(Pro6)は不変で、3番目のプロリン(Pro3)と5番目のセリン(Ser5)は1箇所のみ置換されている。一方7番目セリンは高頻度に他のアミノ酸に置換されており、特にC末端側に存在するリピートではリジンに置換される頻度

が高くなる(C末端側17リピート中8箇所)⁴⁾。なぜリジンであるのかの理由はわかっていないが、CTD配列内の特定のリジンがユビキチン化されることが最近報告されている⁹⁾。ヒトとマウスでは、52リピート中わずか1アミノ酸しか変わらず、非コンセンサスアミノ酸も含めよく保存されている。したがってCTD配列中の非コンセンサスアミノ酸にも何らかの重要な機能がある可能性が考えられる。

2. CTDリン酸化調節

CTDは、転写サイクル中にダイナミックにリン酸化・脱リン酸化されることが知られている¹⁰⁾。まずPol IIによる転写サイクルについて簡単に説明する。

(1) 転写サイクル

Pol IIによる転写反応は、基本的に次のようないくつかの段階に分けることができ、転写サイクルと呼ばれている⁴⁾。①開始前複合体の形成：転写活性化因子の調節DNA配列への結合が、転写コアクチベーターや基本転写因子のプロモーター上への集合を促進し、さらにPol IIコア複合体がリクルートされて不活性な転写開始前複合体を形成する。②開始：転写開始点近傍のDNAがほどかれ、ATP依存的に転写開始前複合体に構造変換が起こって活性化され、最初のホスホジエステル結合が形成する。③プロモーターエスケープと一時停止：Pol IIは、プロモーターに結合した因子群から離脱して、RNAが約20-50塩基ほど合成した後一時的に停止する。④伸長：Pol IIは一時停止状態から解放されて安定な転写伸長複合体として定期的にRNAを合成していく。⑤終結：Pol IIは転写を終え、合成したRNAを解放し、DNA鋳型から解離する。⑥リサイクル：転写を終結したPol IIは、再度開始反応に使われていく。③の過程は「プロモーター近傍での休止(promoter proximal pausing)」と呼ばれ、発生やストレス応答などに関わる多くの遺伝子上で観察され、転写伸長段階での遺伝子発現制御機構として近年注目されている¹¹⁾。

(2) 転写における CTD リン酸化調節

生化学的に精製された Pol II は、Rpb1 が SDS-PAGE 上で異なる移動度を示す二つのアイソフォームとして存在することが知られていた。それらは非リン酸化型（または低リン酸化型）の CTD を持つアイソフォーム (Pol IIA) と、高度にリン酸化された CTD を持つリン酸化型アイソフォーム (Pol IIO) である¹²。生化学的な解析によって、転写開始前複合体には非リン酸化フォームである Pol IIA が優先的に取り込まれ、転写伸長中はリン酸化型の Pol IIO であることが示されていた¹²。その後7アミノ酸配列の2番目 (Ser2) または5番目 (Ser5) のセリンのリン酸化をそれぞれ特異的に認識できるモノクローナル抗体が利用されるようになり、CTD は転写の際に主に Ser2 と Ser5 がリン酸化されることがわかった¹⁰。さらにこれらの抗体を用いたクロマチン免疫沈降解析 (ChIP 解析) によって、典型的な出芽酵母のタンパク質遺伝子上に存在する Pol II のリン酸化状態が解析された¹³。それによると、Ser5 のリン酸化はプロモーター近傍で高く、3'末端側に行くに従って低下する。一方 Ser2 のリン酸化はプロモーターから3'末端側に向かって徐々に昂進する分布パターンを示す¹³ (図2)。ChIP に使用するリン酸化 Ser5 特異抗体の CTD へのアフィニティーが、Ser2 の新たなリン酸化によって弱まった結果、遺伝子の3'末端側で低下しているように観察される可能性も考えられるが、新規に開発された抗体を使っても同様の結果となった¹⁴。したがって Ser5 のリン酸化は転写初期段階のプロモーター近傍における Pol II を特徴づけ、Ser2 のリン酸化は遺伝子の内部または3'末端側を転写伸長中の Pol II を特徴づけるものとして現在考えられている。また高等真核生物においても、タンパク質遺伝子を転写する Pol II-CTD のリン酸化状態の変化

は、基本的には出芽酵母と同様な傾向があることが示されている¹⁰。しかし、CTD リン酸化状態の変化パターンは、遺伝子ごとや発現レベルごとにある程度多様性が存在し、すべての場合にこの一般則が成り立つわけではないようである¹⁵。またある種の誘導性遺伝子の発現制御においては、Pol II は Ser5 のみがリン酸化される場合でも遺伝子を転写できるが、Ser2 がリン酸化されないと、翻訳可能な機能的な mRNA の合成を行えないことが最近報告されている¹⁵。転写を終結した Pol II の CTD は、次の転写サイクルのために脱リン酸化される (図2, 図4)。

最近7番目のセリン (Ser7) のリン酸化を特異的に認識する抗体が作られ、Ser7 も細胞内でリン酸化されていることが判明した¹⁶。Ser7 のリン酸化は、ヒト U2 snRNA (small nuclear RNA) 遺伝子発現において、インテグレーター (Integrator) 複合体の Pol II へのリクルートを介して、転写とカップルした3'末端プロセシングに関与していることが示唆されている¹⁷。またヒト細胞において、Ser7 のリン酸化は、タンパク質遺伝子上でも観察されている¹⁶。当初 Ser7 のリン酸化はタンパク質遺伝子の3'末端側で亢進すると報告された。しかし最近の報告によると、Ser7 のリン酸化パターンは、Ser5 のリン酸化パターンと類似して遺伝子プロモーター近傍で最大となる場合と、遺伝子中央部で最大となる場合もあり、遺伝子ごとに異なるようだ^{18,19}。これまでのところ、タンパク質遺伝子発現における Ser7 リン酸化の機能は明らかではない。さらに最近の報告によると、出芽酵母においても Ser7 がリン酸化されていることが判明し、タンパク質遺伝子上では Ser5 のリン酸化パターンと類似している^{14,20}。

(3) CTD リン酸化調節因子

CTD は、上記のように転写サイクルにあわせダイナ

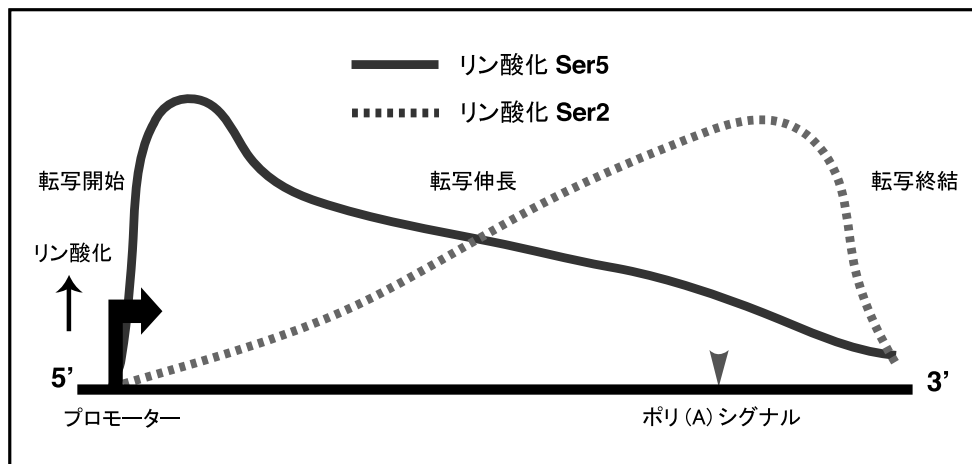


図2 CTD の2番目 (Ser2) および5番目 (Ser5) のセリンのリン酸化状態の変化
典型的なタンパク質遺伝子上 (5'側が左, 3'側が右) における, Ser2 (破線) および Ser5 (実線) のリン酸化状態の変化の概略. 縦軸はそれぞれのセリンのリン酸化度を表している. またプロモーターおよびポリ(A)シグナルの位置を示した.

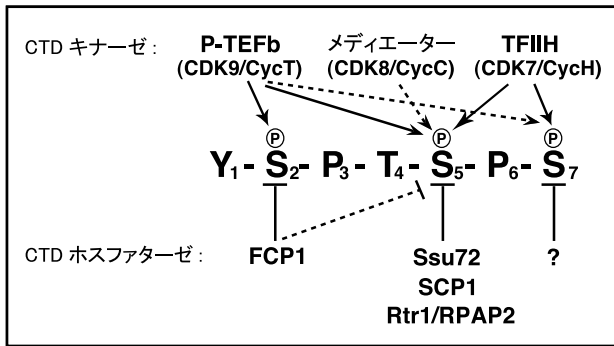


図3 CTD キナーゼおよび CTD ホスファターゼ
転写制御に関わる多細胞生物の CTD キナーゼ (上段) および CTD ホスファターゼ (下段) を示した。詳細は本文参照。破線は、*in vitro* でのみ示された結果に基づいた特異性であることを表している。

ミックにリン酸化・脱リン酸化されるが、それらの制御は直接的には様々なキナーゼやホスファターゼによって行われる^{10,21}。図3には、転写制御に関わる CTD キナーゼおよび CTD ホスファターゼをまとめて示した。以下にそれらについて簡単に概説する。

CTD キナーゼ

転写に関わる CTD キナーゼは、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) ファミリーのメンバーである、CDK7 (Kin28), CDK8 (Srb10), および CDK9 (Bur1 または Ctk1) が知られている (かっこ内は出芽酵母における名称)。CDK7 は基本転写因子 TFIIF の構成成分で、Cyclin H と共同して働き、転写開始段階で CTD の Ser5 をリン酸化する^{10,21}。また CDK8 は Cyclin C とペアで、転写活性化因子からの活性化シグナルを Pol II へ伝達することを仲介する転写「メディエーター複合体」の構成因子である²¹。CDK8 は、試験管内では Ser5 を特異的にリン酸化するが²²、TFIIF をリン酸化することによってそのキナーゼ活性を調節することから²³、*in vivo* において CTD 配列中のどのアミノ酸を直接リン酸化するかは明確にはなっていない。また最近 CDK8 は、β-カテニンの転写活性を調節するヒト大腸がんにおけるがん遺伝子産物であることが判明した^{24,25}。CDK9 は Cyclin T と複合体をつくり、転写伸長因子 P-TEFb (positive transcription elongation factor b) として知られ、転写伸長において Pol II の Ser2 をリン酸化する²⁶。また近年、Ser7 のリン酸化を行うキナーゼとして TFIIF が同定された^{14,19,20}。Ser7 のリン酸化パターンが Ser5 のリン酸化パターンと類似していることの裏付けとなる。しかし7番目のセリンは、プロリンの直前には位置していないのでプロリン依存性のキナーゼである CDK7 によってリン酸化されるのは変則的である。さらに CDK9 は、*in vivo* で Ser2 だけではなく Ser5 のリン酸化にも寄与することや、*in vitro* において Ser5 と Ser7 をリン酸化でき

ることが報告されている¹⁹。今後これら3種類の CTD キナーゼ (または新たな未同定の CTD キナーゼ) が、転写過程において CTD に対してどのような順序で働き、またお互いにリン酸化しあうことで他の CTD キナーゼの活性を如何に制御しているかを解析することが重要となるであろう²⁷。

CTD ホスファターゼ

CTD に対する特異的なホスファターゼは、FCP1 (TFIIF-dependent CTD phosphatase 1), SCP1 (small CTD phosphatase 1), Ssu72 (suppressor of *sua7* gene 2) の3種類がこれまでに報告されている^{2,21}。FCP1 は、基本転写因子 TFIIF に依存した CTD 脱リン酸化酵素で、CTD ホスファターゼとしてはじめて同定されたタンパク質である^{28,29}。活性ドメインとして DXDX (T/V) モチーフを持ち、また BRCT (breast cancer protein related C-terminal) ドメインを有する²⁹。FCP1 は、試験管内解析において Ser2 と Ser5 の両方に対して脱リン酸化活性を示すが³⁰、出芽酵母における *in vivo* の解析から主にリン酸化 Ser2 を脱リン酸化していると考えられている³¹。FCP1 は、転写終了後の Pol II を脱リン酸化し、転写前複合体を形成する非リン酸化型 Pol II の再生過程で働いていると考えられている³²。SCP1 は高等真核生物に特異的で、FCP1 と同様に DXDX (T/V) モチーフを持った比較的小さなタンパク質で、良く似た3~4種類のメンバーからなるファミリーを形成している。SCP1 は、リン酸化 Ser2 よりもリン酸化 Ser5 に対してより高い脱リン酸化活性を示すことが報告されている³³。Ssu72 は、出芽酵母において基本転写因子 TFIIF の相互作用因子として同定され³⁴、その後 mRNA の3'プロセシング因子の構成成分であることが明らかとなった Ser5 に特異的な CTD ホスファターゼである³⁵⁻³⁷。出芽酵母において Ssu72 は、Pol II によって転写される snRNA や snoRNA (small nucleolar RNA) の3'末端形成に必要であることが示されている^{38,39}。さらに最近になって、出芽酵母 Rtr1 (regulator of transcription 1) が、Ser5 特異的な CTD ホスファターゼとして新たに報告された。Rtr1 は、以前からヒト細胞より精製されていた Pol II 結合因子 RPAP2 (RNA polymerase associated protein 2) の出芽酵母オルソログである⁴⁰。出芽酵母において Rtr1 は、転写がプロモーター領域から3'側に進む際に、CTD のリン酸化パターンがリン酸化 Ser5 型からリン酸化 Ser2 型に変わって行く移行過程で働いていると考えられている⁴⁰。

3. リン酸化 CTD を介した転写とヒストン修飾および mRNA プロセシングの共役

CTD は1980年代半ばに発見されて以来、Pol II の転写活性制御における機能検索が主になされてきた^{4,12}。しかし1997年になって、CTD を欠失した Pol II によって転写

された mRNA 前駆体のキャッピング、スプライシング、ポリアデニレーションのすべての RNA プロセシング過程が阻害されることが報告され、CTD は転写と mRNA プロセシングの共役（カップリング）にとって重要な役割を持つことが示唆された^{41,42}。さらに様々な mRNA プロセシング因子がリン酸化 CTD に直接結合できることが次々に報告され、転写と mRNA プロセシングの共役には CTD のリン酸化が重要であると考えられるようになった^{17,21}。またリン酸化 CTD は、ヒストン修飾因子の結合ドメインともなっていることが示され、転写とヒストン修飾の共役にも重要であることが明らかとなった⁴³。CTD は、転写サイクルの各過程に応じて異なるパターンでリン酸化され、各段階で必要とされるヒストン修飾因子や RNA プロセシング因子をリクルートしている。リン酸化 CTD と様々な因子の相互作用が如何に転写とヒストン修飾や mRNA プロセシング過程を共役させているかを以下に詳しく解説したい。

(1) ヒストンメチル化

出芽酵母において、ヒストン H3 N 末端側 4 番目のリジン (H3K4) のトリメチル化は、ヒストンメチル基転移酵素複合体 (Set1 複合体) によって触媒され、ヒストン H3 の 36 番目のリジン (H3K36) のメチル化は Set2 複合体によって行われる⁴⁴。Set1 複合体は Pol II 結合能を持つ転写伸長因子 Paf1 複合体を介して、Ser5 がリン酸化されたプロモーター近傍の Pol II にリクルートされる⁴⁴。一方 Set2 複合体は、Ser2 がリン酸化された CTD に直接結合することによって、遺伝子の内部領域から 3' 領域にかけてリクルートされる^{44,45}。Set2 複合体中の Set2 タンパク質は、SRI ドメインを介して Ser2 と Ser5 の両方がリン酸化された CTD に高いアフィニティーで結合する^{45,46}。多細胞生物においても、タンパク質遺伝子におけるヒストン H3 の K4 と K36 のメチル化パターンは、基本的には出芽酵母と同様の分布を示す⁴³。近年、ヒストン H3K4 トリメチル化酵素複合体 Set1d1A のサブユニットであるヒト Wdr82 タンパク質が、Ser5 リン酸化 CTD に特異的に直接結合することが示された⁴⁷。ある種のヒト Set1 複合体は直接リン酸化 CTD に結合できるようである。このように転写サイクルに応じた CTD のリン酸化パターンの変化は、転写とヒストン修飾を協調させる上で重要な働きを持っている (図 4)。

(2) 5'キャッピング

Pol II によって転写された新生 RNA が、およそ 25-30 塩基に達すると、その 5' 末端に 5'キャッピング反応によって 7-メチルグアノシンキャップ構造 (m⁷GpppN) が付加される。ヒトにおいては、RNA 5' トリホスファターゼ活性と RNA グアニル酸転移活性の両方を持つ HCE (human capping enzyme) と RNA 7-メチル基転移活性を有する MT

(RNA 7-methyltransferase) の 2 種類の酵素が 5'キャッピングを行う⁴²。これらの 5'キャッピング酵素は、基本転写因子 TFIIF によって Ser5 がリン酸化された CTD と直接結合することにより転写初期段階の Pol II 複合体にリクルートされる^{10,21}。また 5'キャッピング酵素の酵素活性は、Ser5 がリン酸化された CTD によって活性化される⁴⁸ (図 4)。一旦 5'キャップ構造が付加されると、核内キャップ結合複合体 CBC (cap binding complex) が 5'キャップに結合する。CBC は mRNA 核外輸送、mRNA の安定性や翻訳開始に重要な役割を持つ⁴⁹ (図 4)。

近年多細胞生物において、転写伸長初期段階の Pol II の一時停止は、5'キャッピングのための時間を作り出すことによって、5'キャップを持った mRNA 前駆体のみの転写伸長を継続させる「チェックポイント」として働いているというモデルが提唱されている⁵⁰。「チェックポイント」には、プロモーター近傍で Pol II の転写伸長の一時停止を引き起こすことが知られている転写伸長因子 DSIF (DRB sensitivity-inducing factor) と転写伸長抑制因子 NELF (negative elongation factor) が関与していると考えられている⁵¹。5'キャッピング酵素はリン酸化 CTD だけではなく DSIF にも直接結合できるため、5'キャッピング酵素はこの一時停止複合体に特異的にリクルートされる。さらに 5'キャッピング酵素は DSIF によって活性化されることが報告されている (図 4, ①キャッピング)⁵⁰。ヒト培養細胞を用いた最近の ChIP 解析によると、HCE と MT は、予想されたように遺伝子のプロモーター付近で一時停止している Pol II および DSIF と共局在していた。しかし驚いたことに、ヒト HCE と MT は、出芽酵母とは異なり遺伝子の 5'末端側だけではなく遺伝子全体にわたって Pol II や DSIF と同様の分布パターンを示した⁵²。興味深いことに、ポリ(A)シグナル下流に Pol II、DSIF および 5'キャッピング酵素の分布ピークが観察される (図 2)。多細胞生物では 5'キャッピング酵素が、転写伸長や終結またはポリアデニレーションにおいても何らかの役割を果たしているのかもしれない⁵²。

(3) mRNA スプライシング

mRNA スプライシングは、5 種類の snRNA と 100 種類を超すタンパク質成分からなるスプライセオソームと呼ばれる巨大な複合体によって、イントロンの 5'側と 3'側の境界が正確に認識されて切り出される過程である⁵³。すでに述べたように、CTD を欠いた Pol II によって転写された mRNA 前駆体のスプライシングが、他の mRNA プロセシング過程と独立して阻害されることから、転写と mRNA スプライシングのカップリングには CTD が重要な役割を果たしていると予想された⁴¹。また細胞を CTD キナーゼ阻害剤で処理すると、転写とカップルしたスプライシングが阻害されることから、カップリングには CTD の正常な

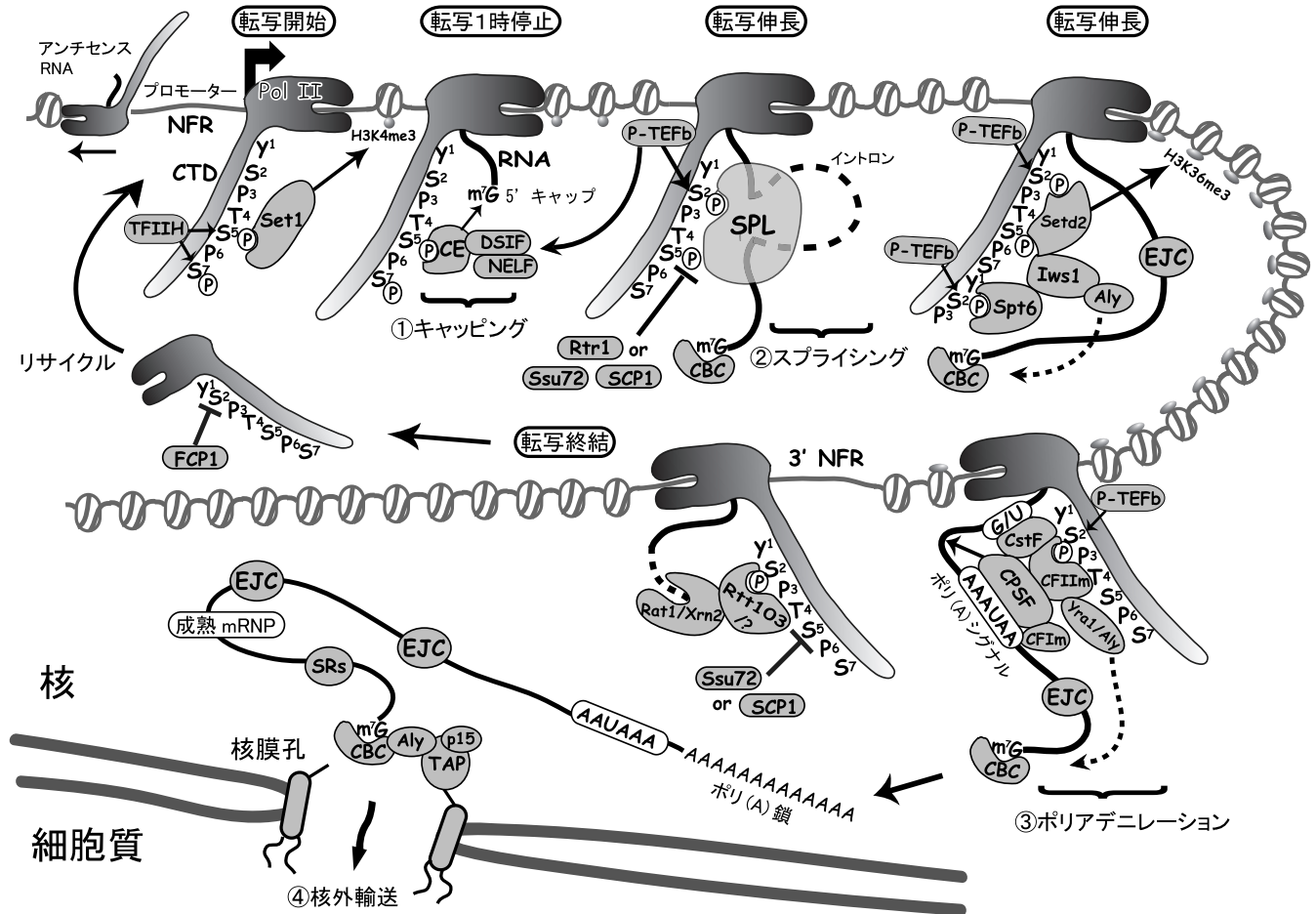


図4 転写サイクルにおける CTD リン酸化の変化とヒストン修飾および mRNA プロセシングの共役

転写サイクルにおける CTD7 アミノ酸配列 Y¹S²P³T⁴S⁵P⁶S⁷ 中の3箇所のセリンのリン酸化 (円で囲んだP) の変化と、ヒストン修飾因子と mRNA プロセシング因子のリン酸化 CTD への結合のダイナミズムを示した。転写サイクルの各過程は楕円で囲んだ文字で、mRNA プロセシングの各過程は数字①~④で示した。またプロモーター近傍のヌクレオソームのない領域 (NFR) で起きる Pol II による両方向性の転写とそれによって産生する短いアンチセンス RNA を図示した。主に哺乳類における因子名を示したが、間にスラッシュが入っているものは、左側が出芽酵母, 右側がヒトの因子名を表している。またここでは本文中にはない略号として以下のものを用いた。CE: 5'キャッピング酵素, SPL: スプライシング複合体, NFR: ヌクレオソームのない領域, G/U: U/GU に富んだポリアデニレーション制御配列。詳細は本文参照。

リン酸化が重要であると考えられる⁵⁴⁾。いくつかの mRNA スプライシング関連因子がリン酸化 CTD に特異的に結合することが報告されていることから、これらの因子がリン酸化 CTD に結合し、転写と mRNA スプライシングをカップルさせているのではないかと考えられているが^{510,17)}、その分子メカニズムの詳細ははまだ不明である。しかし最近になって、転写とカップルした mRNA スプライシングの試験管内反応系を使った解析によって、そのメカニズム解明に進展があった。Pol II によって転写された mRNA 前駆体は、CTD を持たない T7RNA ポリメラーゼで転写させた新生 RNA と比べ、迅速に RNA 上にスプライセオソームが形成されるため、RNA の分解や非特異的な RNA-タンパク質複合体の形成が阻害され、より効率的なスプライシングが起こることが示された^{55,56)}。その後の解析から、ス

プライシング反応の最も早い段階で mRNA 前駆体を認識する U1 snRNP (U1 snRNA とタンパク質の複合体) とセリン-アルギニンに富んだスプライシング因子である SR タンパク質群の両者が、Pol II と特異的に相互作用することが示された⁵⁷⁾。CTD がカップリングに必要であることから、これらの因子が CTD と直接相互作用することが予想されているが、実際のタンパク質が CTD に直接結合し機能的に重要であるのかはまだよくわかっていない。

CTD のリン酸化制御は、選択的スプライシングにとっても重要である。異なる組のエクソンを選択的につなぎ合わせ多様な成熟 mRNA を生成させる選択的スプライシングは、一つの遺伝子から何種類ものタンパク質を作り出すことを可能にする機構である⁵⁸⁾。選択的スプライシングは、様々な RNA 制御配列とそれに結合するタンパク質因

子群によって調節されていることが明らかとなってきている。興味深いことに、転写されるRNA配列が同じであるにもかかわらず、転写を駆動するプロモーターを変えることによって選択的スプライシングのパターンが影響を受けることがわかった⁵⁸。プロモーターの違いがPol IIの転写伸長速度を変化させ、そのために選択的スプライシングに影響を及ぼしているというモデル(速度論モデル)が提唱されている⁵⁸。実際、転写伸長能が低下したPol II変異体を使った実験において、このモデルを支持する結果が得られている⁵⁹。また最近になって、ATP依存クロマチンリモデリング複合体SWI/SNFの成分であるヒトBrm(Brama)が、遺伝子の選択的エクソン部分でPol II伸長の一時停止を誘発することによって選択的スプライシングを調節していることが報告された⁶⁰。興味深いことに、このエクソン部分ではBrmに依存してSer5のリン酸化が異所的に亢進していた⁶⁰。また別のグループによる解析では、CTDのリン酸化を阻害する薬剤の処理によって選択的スプライシングに影響が見いだされている⁵⁸。したがってCTDのリン酸化パターンが、Pol IIの転写伸長速度に影響を与えるか、または制御因子のCTDへのリクルートに影響を与えることを介して、mRNAスプライシングパターンを制御している可能性が考えられる。

(4) 核内ポリアダニレーション

真核生物 mRNA 前駆体の核内ポリアダニレーションは、ポリ(A)シグナル配列によって指定される位置でRNA鎖の切断が起こり(哺乳類ではAAUAAA配列の下流10~35塩基、かつU/GUに富んだ配列の上流14~70塩基の位置)、それに共役して切断された上流側のRNAの3'末端に長いアデニン鎖(哺乳類では約200個のA)が付加される反応である。下流側の切断産物は不安定で速やかに分解される⁴²。哺乳類においては、核内ポリアダニレーション反応には、生化学的に分離可能な6種類の因子が必要であり、それらはCPSF(cleavage and polyadenylation specificity factor)、CstF(cleavage stimulation factor)、CFIm(cleavage factor I mammalian)、CFIIm(cleavage factor II mammalian)、PAP(poly(A) polymerase)およびSymplekinである⁶¹(図4)。CPSFおよびCstFが、AAUAAA配列およびU/GUリッチ配列をそれぞれ認識し、CPSFの73 kDaのサブユニットがRNAを切断する。

既に紹介したように、CTDを欠失したPol IIによって転写されたmRNA前駆体のポリアダニレーションおよび転写終結は、他のmRNAプロセッシング同様に阻害される⁴¹。また転写とカップルしない試験管内反応において、精製したPol IIや組換えCTDが3'切断反応を活性化すること⁶²、ポリアダニレーション因子の構成成分タンパク質のいくつかは直接リン酸化CTDに結合できることが報告されており^{10,17}、ポリアダニレーション過程はCTDの機能

と深く関わっていることが報告されている。Ser2のリン酸化は、遺伝子の3'末端方向に転写が進むにつれて昂進する傾向にあることをすでに述べたが、ポリアダニレーション因子の一つPcf11は、CID(CTD-interacting domain)を介してSer2がリン酸化されたCTDに選択的に結合する⁶³。ハエ培養細胞においてP-TEFb(Ser2をリン酸化するキナーゼ)を特異的に阻害したり、出芽酵母においてSer2キナーゼ遺伝子を破壊したりすると、ポリアダニレーション過程に異常が見いだされる^{64,65}。これらのことは、ポリアダニレーション装置を遺伝子の3'末端付近にリクルートし、効率的なポリアダニレーションを可能にすることが、CTDキナーゼによるSer2リン酸化の重要な役割であることを示している。

CTDとポリアダニレーションは、Pol IIの転写終結過程において重要な働きを持っている。ポリ(A)シグナル配列に変異があるとPol IIの転写終結が阻害されるので、ポリ(A)シグナルは転写終結の「標識」として機能していると考えられる⁴²。またポリアダニレーション装置の中のCTD結合能を有するいくつかの構成成分に変異があっても転写終結が異常となる⁶⁶。このことはすでに述べたCTDを欠いたPol IIの転写終結能が低下することと話が合う⁴¹。遺伝子の3'末端付近でポリ(A)シグナル配列をPol IIが転写し終わると、CTDに結合していたポリアダニレーション因子群が、RNA上のポリ(A)制御配列を認識してRNA前駆体に受け渡される等の何らかの事象によってPol IIに構造変化が起きると考えられる。その結果Pol IIの転写伸長能が変化し転写終結に向かうというモデル(アロステリックモデル)が転写終結モデルとして提唱されている⁴²。一方5'末端がモノリン酸であることを要求する5'-3'エキソヌクレアーゼ(出芽酵母ではRat1、ヒトではXrn2)の阻害によって、Pol IIの転写終結が阻害されることが報告された^{67,68}(図4)。Rat1/Xrn2はポリアダニレーション因子による切断によって生成した下流のRNA(5'末端はモノリン酸)を消化してPol IIに追いつき、何らかの機構でPol IIをDNAから解離させるという機構が考えられている。この機構は、アロステリックモデルに対するもうひとつの転写終結モデルとして以前から提唱されていた「魚雷モデル(torpedo model)」を支持するものである。しかし、アロステリックモデルと魚雷モデルは二者択一ではなく両立し得るモデルである。またRat1は、CIDドメインを持ちリン酸化Ser2 CTDに特異的に結合する酵母Rtt103によってPol IIにリクルートされている⁶⁷。したがってここでもCTDのリン酸化パターンの変化が転写とmRNAプロセッシングを連携させるために重要になっている。

(5) mRNA核外輸送

mRNA核外輸送は、mRNAが核外輸送アダプター因子によって認識された後、アダプター因子がmRNA核外輸

送受容体をリクルートし、この受容体の仲介で mRNA が核膜孔複合体を通過していく過程である (図4)⁶⁹⁾。ヒト mRNA 核外輸送アダプター因子として RNA 結合タンパク質 Aly (出芽酵母では Yra1) が、輸送受容体としては TAP-p15 (出芽酵母では Mex67-Mtr2) 二量体などが知られている (図4)。出芽酵母においては、輸送アダプター因子は TREX (transcription/export) と呼ばれる複合体として転写とカップルして遺伝子上にリクルートされる⁶⁶⁾。一方脊椎動物においては、TREX は Aly の CBC への特異的結合によって mRNA へリクルートされ、スプライシング反応とカップルして起こると考えられている⁶⁶⁾。しかし最近の解析から、ヒトにおいても Aly が転写伸長中の Pol II に特異的にリクルートされる機構があることが報告された⁶⁹⁾。ヒト転写伸長因子 Spt6 (suppressor of Ty 6) は、SH2 (src homology 2) ドメインを介してリン酸化 Ser2 CTD に特異的に結合することによって転写伸長中の Pol II にリクルートされる。さらに Spt6 が結合パートナーである Iws1 (interacts with Spt6 1) を介して Aly をリクルートするようだ⁶⁹⁾ (図4)。さらに最近になって、出芽酵母 Yra1 がポリアデニレーション因子 Pcf11 (リン酸化 Ser2 結合タンパク質) と特異的に結合することによって遺伝子上にリクルートされていることが示された。この相互作用はヒト Pcf11 と Aly の間でも保存されている⁷⁰⁾。したがって脊椎動物においても、酵母とはメカニズムは異なるが、mRNA 核外輸送因子が転写とカップルして mRNA 上にリクルートされているものと考えられる。またこの場合も Ser2 のリン酸化が重要であることを示している。

mRNA 前駆体は、合成されて転写伸長中の Pol II 複合体から外に出てきて以降、常に様々なタンパク質と複合体 (mRNP) を形成していく。mRNP は mRNA プロセッシングを受けながらその構成をダイナミックに変化させ成熟していく。スプライシングを受けたことの証として mRNA 上に結合する EJC (exon junction complex) や SR タンパク質などが mRNP の成分として知られている⁶⁶⁾ (図4)。mRNP の形成不全は、ポリ(A)鎖を持つ RNA の核内蓄積や mRNA の転写部位での係留状態を引き起こすことが報告されている⁶⁶⁾。したがって正しく形成された mRNP のみを選択的に核外に輸送するような品質管理機構が細胞核内に存在していると考えられている。最近、スプライシングやポリアデニレーションには影響がない程度に CTD リピートを部分的に欠いたヒト Pol II によって転写された mRNA 前駆体が、転写部位に係留されたままになることが報告された⁷¹⁾。したがって mRNP の品質管理に関与する因子もリン酸化 CTD をターゲットにしている可能性が考えられている。

4. CTD コードとリン酸化 CTD の構造変換制御

CTD7 アミノ酸配列中には、転写中にリン酸化される3箇所のセリンが存在するため、コンセンサス配列1リピートあたりの異なるリン酸化パターンは、非リン酸化状態を含め図5に示すように8通り考えられる。また7アミノ酸配列には2箇所にプロリン残基が存在する。プロリンのペプチド結合はシスとトランスの2通りの配位をとりうるため、1リピートあたりの異性化パターンは4通り考えられ

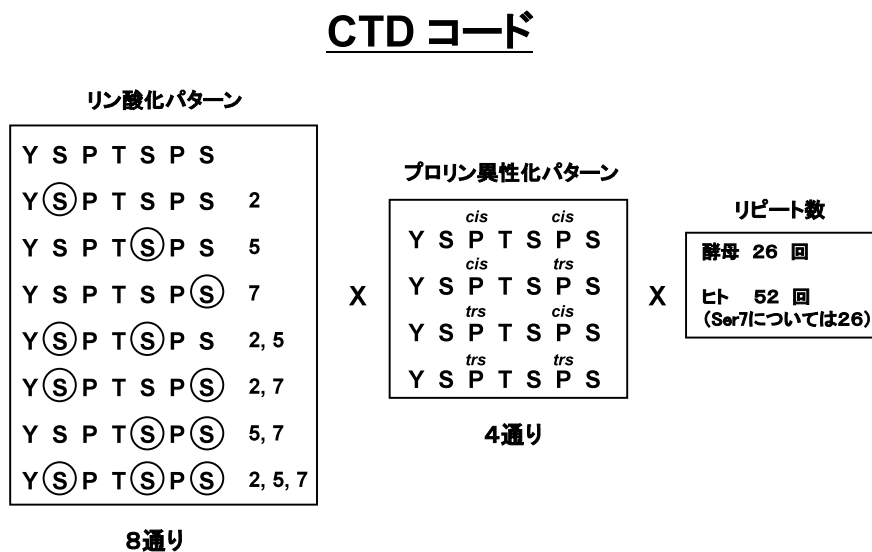


図5 CTD コード仮説

CTD コンセンサス7アミノ酸配列1リピートあたり、異なるリン酸化パターンは図に示すように非リン酸化状態を含め8通り、また2箇所のプロリンはシス (*cis*) とトランス (*trs*) の2通りの配位をとりうるため異性化パターンは4通り考えられる。したがって原理的には1リピートあたり計32通りの異なる状態でCTDは存在できる。

る(図5)。したがって原理的には1リピートあたり計32通りの異なる状態でCTDは存在できることになる。しかもヒトやマウスではこのリピートが52回タンデムに繰り返されているため、全長のCTDは非常に多くの異なる状態をとりうるようになる。このようなCTDの状態のひとつひとつは「CTDコード」と呼ばれている⁷²⁾(図5)。実際にはこれらすべての異なるパターンを生物が認識し分けているとは考えにくい、CTDが非常に多様な状態をとりうることは明らかであろう。この多様性に応じ、様々なタンパク質がCTDに結合しているものと推測される。

これまでに数種類のCTD結合タンパク質について、CTDペプチドとの共結晶構造が解析されている。CTDは非常に柔軟で、それ自体では安定した構造をとらないが、特定タンパク質の結合に応じて安定な構造をとることができる²⁾。解析された共結晶構造においては、結合しているCTDペプチドのプロリンはすべてトランス型をとっていることが示された²⁾。CTDリピート中のプロリン結合のシス型からトランス型への異性化が、CTDの構造変換を調節し、新たなCTD結合タンパク質のリクルートとそれらの機能調節をしている可能性が考えられる。この観点から、プロリン異性化酵素であるPin1がリン酸化CTDに結合できることは非常に興味深い¹⁰⁾。Pin1の出芽酵母オルソログである*Ess1*は、mRNA前駆体のポリアデニレーションまたは転写終結過程における異常を指標にした変異体スクリーニングによって得られた遺伝子である⁷³⁾ことから、Pin1もmRNA前駆体のポリアデニレーションや転写終結過程に関与している可能性が考えられる。最近の報告によると、*Ess1*変異体は、CTDホスファターゼ*Ssu72*遺伝子の変異体と同様に、Pol IIによって転写されるsnoRNAなどの非コードRNAの転写終結が異常になる⁷⁴⁾。*Ess1*がリン酸化Ser5に結合し、プロリンの異性化によって*Ssu72*による脱リン酸化を促進するというモデルが提唱されている⁷⁴⁾。一方ヒト細胞における最近の研究によると、Pin1はPol IIの転写活性をその初期段階で負に調節しているようである⁷⁵⁾。また近年筆者らは、Pin1のリン酸化CTD結合ドメインとよく似たドメインを持つヒトタンパク質PCIF1(phosphorylated CTD-interacting factor 1)を新規のリン酸化CTD結合因子として同定した⁷⁶⁾。PCIF1は、Pol IIの転写能を抑制するなど、Pin1と類似の機能を持っているが^{77,78)}、転写と共役したmRNAプロセッシングを制御しているかは不明である。

おわりに

CTDはPol IIのみが持つ特徴的なドメインで、転写サイクル中に多くのセリン残基(ヒトでは百数十箇所)がダイナミックなリン酸化・脱リン酸化を受け、多様な核タンパク質の足場となっている。リン酸化CTDを認識するタ

ンパク質の多くは、多くの場合RNA結合活性を有し、Pol IIから転写されて出てくる新生RNAを非常に早い段階で捕捉し加工することができる。CTDは成熟型RNAの生産ラインとして、RNAの加工・修飾・品質管理を行う場であるといえる。

これまでに述べたようにCTDコードは非常に複雑であるが、実際にはもっと複雑である可能性がある。CTDのセリン以外のチロシンやスレオニンがリン酸化されている可能性やリン酸化以外の修飾がされている場合も考えられる。さらに非コンセンサスアミノ酸(とりわけ7番目のリジン)も進化的に保存されているので、それらのアミノ酸についても特異的な翻訳後修飾の例が今後見つかる可能性が考えられるからである。真核生物ゲノムは進化の過程でそのサイズを増大させながらより複雑化していったと考えられるが、Pol IIはより長いCTDを持つことで、より多様な因子群と相互作用できるようになり、ゲノム情報をより複雑な形で処理できるように進化したのではないだろうか? また一方でPol IIは、CTDを介して様々な因子と相互作用できるようになった結果、自身の転写活性がより多様な形で制御されるようになったと考えられる。

最近のゲノムワイドな網羅的発現解析から、真核生物においては、これまで必要ではないと思われてきた遺伝子間領域も含め大半のゲノム領域がRNAに転写されていることが明らかとなっている^{79,80)}。現在このゲノムの広範囲な転写の多くは、主にPol IIの仕事だと予想されている^{79,80)}。ゲノムの大部分をカバーする多様なRNAの存在は、新たな機能性RNAの発見として期待される一方、Pol IIがゲノム上の必要な部分(またはゲノム上の誤り)を見つけ出すために、広範囲な領域をスキッピングしている結果であるとも考えられる。このような「とりあえず」転写されたRNAの大部分は分解されるが⁷⁹⁾、あるRNAを偶然有用な情報として「採用」することがその生物にとって有利に働いたとすると、「とりあえず」あちらこちらを転写していることが生物進化の原動力になっている可能性も考えられる。Pol IIのCTDは、有用なRNAの「採用」頻度を上げることにも貢献したのかもしれない。

文 献

- 1) Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A., & Kornberg, R. D. (2001) *Science*, 292, 1876-1882.
- 2) Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., & Cramer, P. (2005) *Genes Dev.*, 19, 1401-1415.
- 3) Kishore, S.P., Perkins, S.L., Templeton, T.J., & Deitsch, K.W. (2009) *J. Mol. Evol.*, 68, 706-714.
- 4) Corden, J.L. (1990) *Trends Biochem. Sci.*, 15, 383-387.
- 5) Liao, S.M., Taylor, I.C., Kingston, R.E., & Young, R.A. (1991) *Genes Dev.*, 5, 2431-2440.
- 6) West, M.L. & Corden, J.L. (1995) *Genetics*, 140, 1223-1233.

- 7) Meininghaus, M., Chapman, R.D., Horndasch, M., & Eick, D. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 24375–24382.
- 8) Litingtung, Y., Lawler, A.M., Sebald, S.M., Lee, E., Gearhart, J.D., Westphal, H., & Corden, J.L. (1999) *Mol. Gen. Genet.*, **261**, 100–105.
- 9) Li, H., Zhang, Z., Wang, B., Zhang, J., Zhao, Y., & Jin, Y. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 5296–5305.
- 10) Phatnani, H.P. & Greenleaf, A.L. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 2922–2936.
- 11) Margaritis, T. & Holstege, F.C. (2008) *Cell*, **133**, 581–584.
- 12) Dahmus, M.E. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 19009–19012.
- 13) Komarnitsky, P., Cho, E.J., & Buratowski, S. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 2452–2460.
- 14) Kim, M., Suh, H., Cho, E.J., & Buratowski, S. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 26421–26426.
- 15) Brookes, E. & Pombo, A. (2009) *EMBO Rep.*, **10**, 1213–1219.
- 16) Chapman, R.D., Heidemann, M., Albert, T.K., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E., & Eick, D. (2007) *Science*, **318**, 1780–1782.
- 17) Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R.D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D., & Murphy, S. (2007) *Science*, **318**, 1777–1779.
- 18) Boeing, S., Rigault, C., Heidemann, M., Eick, D., & Meisterernst, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, **285**, 188–196.
- 19) Glover-Cutter, K., Laroche, S., Erickson, B., Zhang, C., Shokat, K., Fisher, R.P., & Bentley, D.L. (2009) *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 5455–5464.
- 20) Akhtar, M.S., Heidemann, M., Tietjen, J.R., Zhang, D.W., Chapman, R.D., Eick, D., & Ansari, A.Z. (2009) *Mol. Cell.*, **34**, 387–393.
- 21) Hirose, Y. & Ohkuma, Y. (2007) *J. Biochem.*, **141**, 601–608.
- 22) Rickert, P., Corden, J.L., & Lees, E. (1999) *Oncogene*, **18**, 1093–1102.
- 23) Akoulitchev, S., Chuikov, S., & Reinberg, D. (2000) *Nature*, **407**, 102–106.
- 24) Firestein, R., Bass, A.J., Kim, S.Y., Dunn, I.F., Silver, S.J., Guney, I., Freed, E., Ligon, A.H., Vena, N., Ogino, S., Chheda, M.G., Tamayo, P., Finn, S., Shrestha, Y., Boehm, J.S., Jain, S., Bojarski, E., Mermel, C., Barretina, J., Chan, J.A., Baselga, J., Taberero, J., Root, D.E., Fuchs, C.S., Loda, M., Shivdasani, R.A., Meyerson, M., & Hahn, W.C. (2008) *Nature*, **455**, 547–551.
- 25) Morris, E.J., Ji, J.Y., Yang, F., Di Stefano, L., Herr, A., Moon, N.S., Kwon, E.J., Haigis, K.M., Naar, A.M., & Dyson, N.J. (2008) *Nature*, **455**, 552–556.
- 26) Peterlin, B.M. & Price, D.H. (2006) *Mol. Cell*, **23**, 297–305.
- 27) Buratowski, S. (2009) *Mol. Cell*, **36**, 541–546.
- 28) Chambers, R.S. & Kane, C.M. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 24498–24504.
- 29) Archambault, J., Chambers, R.S., Kobor, M.S., Ho, Y., Cartier, M., Bolotin, D., Andrews, B., Kane, C.M., & Greenblatt, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 14300–14305.
- 30) Lin, P.S., Dubois, M.F., & Dahmus, M.E. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 45949–45956.
- 31) Cho, E.J., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J., & Buratowski, S. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 3319–3329.
- 32) Cho, H., Kim, T.K., Mancebo, H., Lane, W.S., Flores, O., & Reinberg, D. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 1540–1552.
- 33) Yeo, M., Lin, P.S., Dahmus, M.E., & Gill, G.N. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 26078–26085.
- 34) Sun, Z.W. & Hampsey, M. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1557–1566.
- 35) He, X., Khan, A.U., Cheng, H., Pappas, D.L., Jr., Hampsey, M., & Moore, C.L. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 1030–1042.
- 36) Nedeau, E., He, X., Kim, M., Pootoolal, J., Zhong, G., Canadian, V., Hughes, T., Buratowski, S., Moore, C.L., & Greenblatt, J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 33000–33010.
- 37) Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C., & Hampsey, M. (2004) *Mol. Cell*, **14**, 387–394.
- 38) Ganem, C., Devaux, F., Torchet, C., Jacq, C., Quevillon-Cheruel, S., Labesse, G., Facca, C., & Faye, G. (2003) *EMBO J.*, **22**, 1588–1598.
- 39) Steinmetz, E.J. & Brow, D.A. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 6339–6349.
- 40) Mosley, A.L., Pattenden, S.G., Carey, M., Venkatesh, S., Gilmore, J.M., Florens, L., Workman, J.L., & Washburn, M.P. (2009) *Mol. Cell*, **34**, 168–178.
- 41) McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M., & Bentley, D. L. (1997) *Nature*, **385**, 357–361.
- 42) Hirose, Y. & Manley, J.L. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 1415–1429.
- 43) Sims, R.J., 3rd, Belotserkovskaya, R., & Reinberg, D. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 2437–2468.
- 44) Hampsey, M. & Reinberg, D. (2003) *Cell*, **113**, 429–432.
- 45) Kizer, K.O., Phatnani, H.P., Shibata, Y., Hall, H., Greenleaf, A. L., & Strahl, B.D. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 3305–3316.
- 46) Li, M., Phatnani, H.P., Guan, Z., Sage, H., Greenleaf, A.L., & Zhou, P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 17636–17641.
- 47) Lee, J.H. & Skalnik, D.G. (2008) *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 609–618.
- 48) Ho, C.K. & Shuman, S. (1999) *Mol. Cell*, **3**, 405–411.
- 49) Kohler, A. & Hurt, E. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **8**, 761–773.
- 50) Mandal, S.S., Chu, C., Wada, T., Handa, H., Shatkin, A.J., & Reinberg, D. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 7572–7577.
- 51) Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., & Handa, H. (1999) *Cell*, **97**, 41–51.
- 52) Glover-Cutter, K., Kim, S., Espinosa, J., & Bentley, D.L. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 71–78.
- 53) Wahl, M.C., Will, C.L., & Luhrmann, R. (2009) *Cell*, **136**, 701–718.
- 54) Bird, G., Zorio, D.A., & Bentley, D.L. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 8963–8969.
- 55) Das, R., Dufu, K., Romney, B., Feldt, M., Elenko, M., & Reed, R. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 1100–1109.
- 56) Hicks, M.J., Yang, C.R., Kotlajich, M.V., & Hertel, K.J. (2006) *PLoS Biol.*, **4**, e147.
- 57) Das, R., Yu, J., Zhang, Z., Gygi, M.P., Krainer, A.R., Gygi, S. P., & Reed, R. (2007) *Mol. Cell*, **26**, 867–881.
- 58) Kornblihtt, A.R., de la Mata, M., Fededa, J.P., Munoz, M.J., & Noguez, G. (2004) *RNA*, **10**, 1489–1498.
- 59) de la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., & Kornblihtt, A.R. (2003) *Mol. Cell*, **12**, 525–532.
- 60) Batsche, E., Yaniv, M., & Muchardt, C. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 22–29.
- 61) Mandel, C.R., Bai, Y., & Tong, L. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 1099–1122.
- 62) Hirose, Y. & Manley, J.L. (1998) *Nature*, **395**, 93–96.
- 63) Licatalosi, D.D., Geiger, G., Minet, M., Schroeder, S., Cilli, K., McNeil, J.B., & Bentley, D.L. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 1101–

- 1111.
- 64) Ni, Z., Schwartz, B.E., Werner, J., Suarez, J.R., & Lis, J.T. (2004) *Mol. Cell*, **13**, 55-65.
- 65) Ahn, S.H., Kim, M., & Buratowski, S. (2004) *Mol. Cell*, **13**, 67-76.
- 66) Moore, M.J. & Proudfoot, N.J. (2009) *Cell*, **136**, 688-700.
- 67) Kim, M., Krogan, N.J., Vasiljeva, L., Rando, O.J., Nedeia, E., Greenblatt, J.F., & Buratowski, S. (2004) *Nature*, **432**, 517-522.
- 68) West, S., Gromak, N., & Proudfoot, N.J. (2004) *Nature*, **432**, 522-525.
- 69) Yoh, S.M., Lucas, J.S., & Jones, K.A. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 3422-3434.
- 70) Johnson, S.A., Cubberley, G., & Bentley, D.L. (2009) *Mol. Cell*, **33**, 215-226.
- 71) Custodio, N., Vivo, M., Antoniou, M., & Carmo-Fonseca, M. (2007) *J. Cell Biol.*, **179**, 199-207.
- 72) Buratowski, S. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 679-680.
- 73) Hani, J., Schelbert, B., Bernhardt, A., Domdey, H., Fischer, G., Wiebauer, K., & Rahfeld, J.U. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 108-116.
- 74) Singh, N., Ma, Z., Gemmill, T., Wu, X., Defiglio, H., Rossetini, A., Rabeler, C., Beane, O., Morse, R.H., Palumbo, M.J., & Hanes, S.D. (2009) *Mol. Cell*, **36**, 255-266.
- 75) Xu, Y.X. & Manley, J.L. (2007) *Genes Dev. U*, **21**, 2950-2962.
- 76) Fan, H., Sakuraba, K., Komuro, A., Kato, S., Harada, F., & Hirose, Y. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 378-385.
- 77) Hirose, Y., Iwamoto, Y., Sakuraba, K., Yunokuchi, I., Harada, F., & Ohkuma, Y. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 449-455.
- 78) Yunokuchi, I., Fan, H., Iwamoto, Y., Araki, C., Yuda, M., Umemura, H., Harada, F., Ohkuma, Y., & Hirose, Y. (2009) *Genes Cells*, **14**, 1105-1118.
- 79) Houseley, J. & Tollervey, D. (2009) *Cell*, **136**, 763-776.
- 80) Berretta, J. & Morillon, A. (2009) *EMBO Rep.*, **10**, 973-982.
-