

令和元年6月20日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06982

研究課題名(和文) がん発症に関わるスプライシング因子SF3b1の構造生物学的研究

研究課題名(英文) Structural study of human spliceosomal protein SF3b1

研究代表者

桑迫 香奈子 (Kuwasaki, Kanako)

武蔵野大学・薬学部・講師

研究者番号：10568736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞ではスプライシング因子SF3b1の特定のリジン残基に変異が生じているが、SF3b1の本来の機能、変異によるスプライシングへの影響およびがん化との関連は未知である。本研究は構造生物学的な手法によりSF3b1の機能を解明することを目的とした。立体構造解析に向けてSF3b1の調製を試みたが、収量が少なく実験は進まなかった。そこで、SF3b1と共に機能し、がん細胞での変異が報告されているスプライシング因子に着目したところ、特定のスプライシング因子と相互作用したため、複合体形成部位の立体構造を解析している。また、SELEX法を用いてブランチ部位に結合するスプライシング因子の特異性の解明も試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験では、SF3b1と共に機能し、がん細胞での変異が報告されている特定のスプライシング因子が別のスプライシング因子と相互作用することが判明したため、これらの複合体形成部位の立体構造解析を進めている。これらの相互作用メカニズムの解明は、がん化とスプライシング因子の変異との関係を明らかにするのに非常に役立つと考えられる。また、ブランチ部位に結合するスプライシング因子について、RNA配列の特異性の解明を試みており、ヒトにおける保存性の低いブランチ部位配列を認識するメカニズムに関して、新たな知見が得られると考える。

研究成果の概要(英文)：Mutations in some specific lysine residues in a spliceosomal protein SF3b1 have often been found in several types of cancer cells. However, it remains unknown not only what part SF3b1 plays in the splicing reaction, but also how the mutations in SF3b affect the process of splicing reaction and contribute to malignant transformation. To elucidate the function of SF3b1 in the process by structural analysis, we attempted to prepare the recombinant SF3b1 protein by overproduction in *E. coli*, but the yield of the protein was very low. Next, we examined the interactions between spliceosomal proteins by NMR titration experiments, showing that a spliceosomal protein in which some mutations had been reported in cancer cells makes interactions with another spliceosomal protein. Thus, we tried to determine the core structure of the complex composed of the two proteins by NMR. Furthermore, we performed SELEX to elucidate the specificity of the spliceosomal protein that binds to the branch point.

研究分野：構造生物学

キーワード：スプライシング がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞では、通常とは異なったパターンで mRNA スプライシングが起こっていることが以前から知られていた。様々ながん細胞のゲノム解析の結果、スプライシング因子 SF3b1 の特定のリジン残基に集中的に変異が生じており、また、最も変異の頻度が高いことが判明した (Garraway et al. Cell 2013)。したがって、(1)SF3b1 の変異、(2)スプライシングの異常、(3)がん発症の3つの要素が強く関連すると考えられている。

SF3b1 は、mRNA 前駆体上のブランチ部位と結合して活性中心を形成する U2 snRNP の構成因子である。紫外線架橋実験によって、SF3b1 はブランチ部位の両側に結合し、ブランチ部位には別の構成因子が結合することが示されていた (Will et al. EMBO J. 2001)。SF3b1 には、C 末端側にタンパク質間相互作用に関わる HEAT ドメインが存在するが、申請者は、そのドメインではなく、SF3b1 のアミノ酸残基 379-424 番目の領域 (これ以降 SF3b1(379-424)と表記) がブランチ部位に結合する構成因子と結合して、その構成因子の構造を安定化することを見出し、これら複合体の溶液構造を明らかにすることに成功した (Kuwasako et al. Proteins 2008)。ブランチ部位配列との相互作用は、溶液中での比較的弱い相互作用 (K_d が mM ~ μ M 程度) を検出できる NMR 法を用いたところ、ブランチ部位に結合する構成因子は $K_d = \sim 100 \mu$ M 程度の結合を示したが、SF3b1(379-424)は結合しなかった。がん細胞における SF3b1 の変異は HEAT ドメイン上の特定のリジン残基に集中しており、これらを含む領域が RNA との相互作用に関与すると考えられる点を踏まえると、検出された結合がブランチ部位に結合する構成因子のみであったのは妥当であると考えられた。

しかし、SF3b1 と RNA との相互作用メカニズムや、がん細胞で変異が生じている SF3b1 のリジン残基が実際どのようにスプライシングに影響し、がん化と関わっているのかは未知である。

2. 研究の目的

本研究は、主に構造生物学的手法によって、SF3b1 の本来の機能、SF3b1 のがん細胞で変異が生じているリジン残基の役割とその変異がスプライシングに与える影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 立体構造解析

SF3b1 の機能発現に重要と考えられる領域 (がん細胞で集中的に変異が生じているリジン残基を含む) と、ブランチ部位に結合する構成因子の複合体を調製し、ブランチ部位配列をもつ RNA 断片との相互作用を NMR 法によって解析する。その結果に基づいて、タンパク質と RNA 断片の適切なコンストラクトを用いて、X 線回折法によって3者複合体の立体構造解析を行う。

(2) 最適結合配列の探索

SF3b1 の機能発現に重要と考えられる領域 (がん細胞で集中的に変異が生じているリジン残基を含む) と、ブランチ部位に結合する構成因子の複合体を調製し、SELEX 法によって最適結合配列を探索する。

4. 研究成果

(1) 立体構造解析

大腸菌を宿主とした遺伝子組み換えによる SF3b1 タンパク質の調製は、コンストラクト、タグや宿主大腸菌の種類、Buffer 組成等を検討したが、進まなかった。その他にも、SF3b1 が U2 snRNP の構成因子であることから、単体ではなく、SF3b1 と相互作用する U2 snRNP のタンパク質構成因子と複合体になるように共発現させることや、無細胞タンパク質合成系を利用するなどの工夫を行ったが、SF3b1 の調製は進まなかった。そこで、U2 snRNP の構成タンパク質、U2 snRNP とともに機能するタンパク質にも範囲を広げ、これらの発現系の構築と NMR 法による相互作用解析 (滴定実験) を行った。その結果、SF3b1 と共に機能し、がん細胞での変異が報告されているタンパク質について、約 40 アミノ酸残基からなるペプチド領域がタンパク質間相互作用を示した (図1)。その相互作用相手は SF3b1 ではな

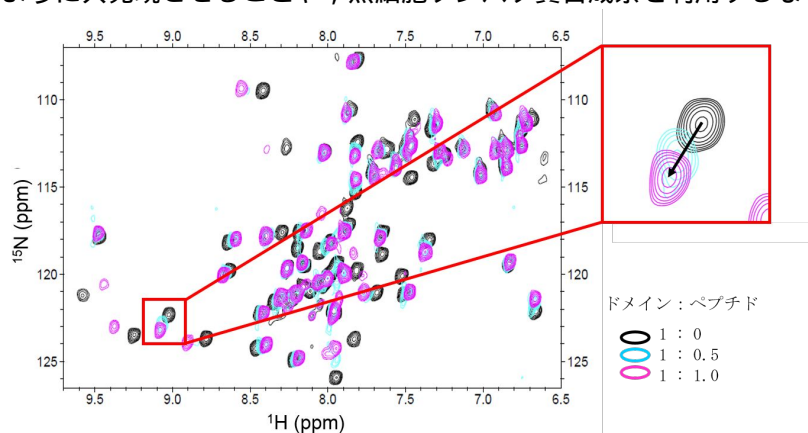


図1 NMR法による相互作用解析 (滴定実験)

¹⁵N標識したスプライシング因子の特定のドメインに対し、SF3b1と共に機能し、がん細胞での変異が報告されているスプライシング因子の特定の約40アミノ酸残基からなる非標識のペプチドを滴定しながら2D [¹H, ¹⁵N]-HSQCスペクトルを測定し、主鎖アミノド基由来のクロスピークの化学シフト値の変化を調べた。相互作用に関わるアミノ酸残基由来のクロスピークは変化する (拡大図)。

ったものの、スプライシング因子上のドメインであると特定できた。これらの相互作用は、SF3b1の機能に影響を与える可能性があることや、がんとスプライシング因子の変異との関係の解明に役立つと考えられるため、現在、複合体形成部位の安定同位体標識した試料を調製し、立体構造解析を行っている。

遺伝子組み換えによる SF3b1 タンパク質の調製が進まなかったことから、野生型 SF3b1 と SF3b1 の変異体を発現している培養細胞を用いて、スプライシングパターンの違いを 2 次元電気泳動法と質量分析法によって明らかにしようと考えた。現在、実験を進めているところである。

(2) 最適結合配列の探索

上記の で示した通り、SF3b1 の調製が非常に難しいため、SF3b1(379-424)とブランチ部位に結合するタンパク質構成因子の複合体を用いて、SELEX 法により強く結合する配列を明らかにしようとした。ブランチ部位配列 (YUNAY) の前後に 15 塩基長のランダムな配列を付加した RNA ライブラリーと 40 塩基長のランダムな配列の RNA ライブラリーを用いたところ、いずれからも優位に結合が強い配列が得られた。現在、これらの得られた RNA 配列について、詳細な定量的な相互作用解析を進めている。また、3 者複合体の相互作用・立体構造解析も進めており、最近、3 者複合体の結晶化スクリーニングによって微結晶が観察できた (図 2)。

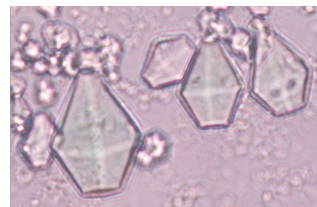


図2 結晶化スクリーニングによって得られた微結晶

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kuwasako K, Nameki N, Tsuda K, Takahashi M, Sato A, Tochio N, Inoue M, Terada T, Kigawa T, Kobayashi N, Shirouzu M, Ito T, Sakamoto T, Wakamatsu K, Guntert P, Takahashi S, Yokoyama S, Muto Y. , Solution structure of the first RNA recognition motif domain of human spliceosomal protein SF3b49 and its mode of interaction with a SF3b145 fragment. , Protein Sci. , 査読有, 26, 2017, 280-291
doi:10.1002/pro.3080. Epub 2016 Nov 27.

Yoshida H, Park SY, Oda T, Akiyoshi T, Sato M, Shirouzu M, Tsuda K, Kuwasako K, Unzai S, Muto Y, Urano T, Obayashi E. , A novel 3' splice site recognition by the two zinc fingers in the U2AF small subunit. , Genes Dev. , 査読有, 29, 1649-1660
doi: 10.1101/gad.267104.115. Epub 2015 Jul 27.

Suzuki M, Sasabe J, Miyoshi Y, Kuwasako K, Muto Y, Hamase K, Matsuoka M, Imanishi N, Aiso S. , Glycolytic flux controls D-serine synthesis through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in astrocytes. , Proc Natl Acad Sci U S A. , 査読有, 112, E2217-2224
doi: 10.1073/pnas.1416117112. Epub 2015 Apr 13.

〔学会発表〕(計 6 件)

佐藤謙太郎, 柳澤拓也, 瀧澤将行, 天野亮, 武藤裕, 桑迫香奈子, 坂本 泰一, スプライシング因子の複合体に結合する aptamer の特性解析, 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年

佐藤謙太郎, 柳澤拓也, 瀧澤将行, 天野亮, 武藤裕, 桑迫香奈子, 坂本泰一, スプライシング因子の複合体に結合する aptamer の結合能の解析, 平成 30 年度日本生化学会関東支部例会, 2018 年

柳澤拓也, 桑迫香奈子, 天野亮, 瀧澤将行, 武藤裕, 坂本泰一, Selection of RNA sequences that bind to a complex of splicing factors. , 第 40 回 日本分子生物学会年会 2017 年

柳澤拓也, 桑迫香奈子, 徳田正明, 天野亮, 武藤裕, 坂本泰一, スプライシング因子の複合体に対する aptamer の取得と解析, 平成 29 年度 日本生化学会関東支部例会 2017 年

Takuya Yanagisawa, Kanako Kuwasako, Ryo Amano, Yutaka Muto, Taiichi Sakamoto, In vitro selection of RNA aptamers to a splicing factor. , 18th Annual Meeting (21st Annual Meeting of the RNA Society) 2016

Kanako Kuwasako, Kengo Tsuda, Mari Takahashi, Atsuko Sato, Naoya Tochio, Makoto Inoue, Takaho Terada, Takanori Kigawa, Naohiro Kobayashi, Mikako Shirouzu, Takuhiro Ito, Taiichi Sakamoto, Nobukazu Nameki, Kaori Wakamatsu, Peter Guntert, Seizo Takahashi, Shigeyuki Yokoyama, Yutaka Muto, Solution structures of the two RNA recognition motif (RRM) domains of the human spliceosomal protein SF3b49. , 18th Annual Meeting (21st Annual Meeting of the RNA Society) 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.musashino-u.ac.jp/research/laboratory/pharmacy/lab/bukka.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：坂本 泰一

ローマ字氏名：SAKAMOTO, Taiichi

所属研究機関名：千葉工業大学

部局名：先進工学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 40383369

研究分担者氏名：吉村 明

ローマ字氏名：YOSHIMURA, Akari

所属研究機関名：東北医科薬科大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 70302164