

令和元年6月26日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18512

研究課題名(和文) ヒト翻訳制御因子のRNAによる活性化機構の構造基盤

研究課題名(英文) Structural analysis of human translation factors regulated by RNA

研究代表者

竹下 大二郎 (Takeshita, Daijiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：80613265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：様々なストレスをヒト細胞は感知して、応答反応を發揮している。ウイルスが細胞に感染すると、タンパク質合成を調節して生体の恒常性を保っている。翻訳因子リン酸化酵素は、ウイルスが細胞内で感染した際に生産される二本鎖のRNAを特異的に認識して活性化し、翻訳開始因子をリン酸化し、ウイルスの増殖は妨げている。

本研究では、翻訳因子リン酸化酵素とウイルスRNA複合体の立体構造を解明することを目指して、タンパク質発現と精製、RNA調製、および複合体調製を行った。RNAタンパク質複合体の調製には成功しており、様々な条件下で結晶化実験を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染は、最初に自然免疫機構によって感知され、応答反応を誘導する。本研究で対象とする翻訳因子リン酸化酵素は、ウイルスRNAを感知して翻訳因子をリン酸化してタンパク質合成を抑制する。この反応によって、ウイルス増殖は妨げられている。しかし、翻訳因子リン酸化酵素によるウイルスRNAの認識機構と活性化機構は不明であり、本研究の構造解析と生化学的解析によって明らかにする。本研究が達成されれば、ヒト体内の自然免疫におけるウイルス反応が原子レベルの分解能で明らかとなり、抗ウイルス剤として利用可能な化合物の創出にも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Various stresses induce many responses to maintain homeostasis of human cell. Infection of viruses leads reduction of protein production. Protein kinase of translation initiation factor specifically binds viral RNAs and phosphorylates translation initiation factor, that suppresses virus propagation.

In this study, we aim to solve the complex structure of viral RNA and protein kinase by X-ray crystallography. We have succeeded the production and purification of protein kinase and the preparation of viral RNAs. The complex formation was observed by a gel filtration chromatography. The trials of the crystallization of RNA-protein complex are under way.

研究分野：構造生物化学

キーワード：タンパク質合成 立体構造解析 RNA

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

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物で広く保存されているタンパク質、翻訳因子リン酸化酵素は、自然免疫で働く主要なタンパク質であり、抗ウイルス作用をもつ。翻訳因子リン酸化酵素は、ウイルス由来の RNA によって活性化し、翻訳開始因子 eIF2 をリン酸化することでタンパク質合成を負に制御する。翻訳因子リン酸化酵素はこの機能によって、ウイルス増殖を抑える。一方でウイルスは、自身の感染と増殖のため翻訳因子リン酸化酵素機能を抑制する分子を備えている。現在までのところ、翻訳因子リン酸化酵素がウイルス由来 RNA を認識して活性化する分子機構、および、ウイルス因子が翻訳因子リン酸化酵素を阻害する分子機構は解明されていない。

本研究では、X 線結晶構造解析、および生化学的解析、生物物理学的解析手法を用いて、翻訳因子リン酸化酵素が RNA によって活性化する分子機構、およびウイルス因子が翻訳因子リン酸化酵素を不活性化する分子機構を明らかにする。

## 2. 研究の目的

翻訳因子リン酸化酵素は抗ウイルス機構で働く RNA 依存性のタンパク質リン酸化酵素であり、ウイルス由来の RNA を特異的に認識して活性化する。また、ウイルス因子であるタンパク質・ペプチドは、リン酸化酵素と直接相互作用して、その活性を阻害する。リン酸化酵素とウイルス因子は、それぞれ宿主の免疫機構の発現とウイルスの感染増殖において鍵となる重要な機能を担っているが、その分子機構は不明である。本研究課題では、「翻訳因子リン酸化酵素がウイルス由来の RNA を特異的に認識して活性化する仕組み」と「ウイルス因子が翻訳因子リン酸化酵素を認識して不活性化する仕組み」がどのような分子機構で機能発現しているかを明らかにすることを目的として、その分子機構を明示することを目標とする。この問いに答えるため、X 線結晶構造解析の手法、生化学的手法、生物物理学的的手法を組み合わせ実施して、タンパク質分子および RNA 分子の作動原理を原子レベルで解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究の目的は、リン酸化酵素・RNA 複合体、リン酸化酵素・ウイルス因子複合体の X 線結晶構造解析を達成し、構造情報を基にした生化学的解析を行って、翻訳因子リン酸化酵素の分子機能の構造基盤を解明することである。本研究を実施して(I)翻訳因子リン酸化酵素による RNA 認識と活性化の構造基盤、および(II)ウイルス因子によるリン酸化酵素の不活性化の構造基盤を明らかにする。

X 線結晶構造解析に向けた、さまざまなタンパク質の調製を進める必要がある。翻訳因子リン酸化酵素は、自己リン酸化していることが示唆されているため、不活性化タンパク質を含む変異タンパク質をさまざまコンストラクト作製し調製して、結晶化条件の探索を進める。また、翻訳因子リン酸化酵素の阻害性タンパク質も調製して、高純度なタンパク質を得ている。タンパク質結晶が得られ、X 線構造解析を達成することを第一の目標とする。結晶構造から構築される反応モデルが、生体内の状態と合致するか確認するため、生化学的解析を行う。構造情報から分子機構に重要な領域に変異を導入し、活性を測定することで、機能に重要な領域を特定する。得られた構造情報および生化学データを照合し、解析することによって、リン酸化酵素の機能発現メカニズムとウイルス分子阻害メカニズムの詳細を解明する。

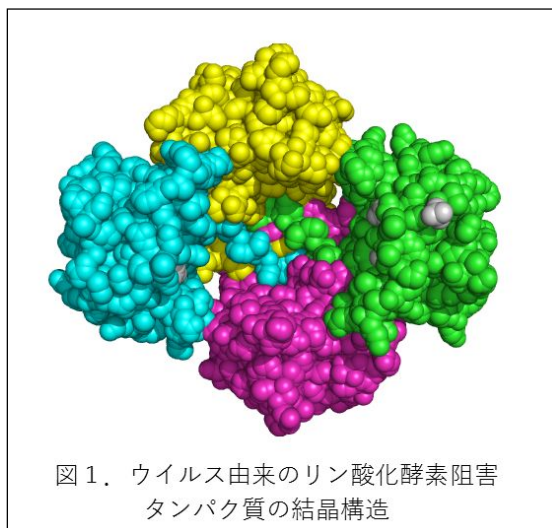
複合体構造解析を目指すことを第一の目標とするが、単体の構造解析も実施する。翻訳因子リン酸化酵素の阻害タンパク質の一つが、結晶化に成功しており、セレノメチオニン置換体結晶を利用した位相決定に成功した。新規的な四量体を形成していることが示され、現在生化学的解析を実施中である。リン酸化酵素の阻害能に重要なタンパク質部位を立体構造上にプロットして、動作機構の解明に繋げる予定である。

## 4. 研究成果

上記のとおり、ウイルス性のリン酸化酵素阻害タンパク質の X 線結晶構造解析に成功している。ネイティブ結晶の X 線回折データの収集、およびセレノメチオニン置換結晶の X 線回折データの収集は、高エネルギー加速器研究機構のビームライン BL-17A、BL-5A、BL-1A などで実施した。2.6 程度の分解能で、X 線回折データを収集することができ、構造決定を行った。

今後は、リン酸化酵素の阻害能について、変異タンパク質を調製して解析する予定であり、データがまとまり次第、投稿論文にまとめる。本タンパク質は、リン酸化酵素自体に類似した配列

を保有しているため、どのような分子機構で阻害しているか、大変興味深い。これまで、複合体結晶を得ることに成功していないため、現時点では単体の立体構造を利用した考察しか可能となっていない。しかし、立体構造と生化学的データを統合して考察することで、阻害メカニズムを明らかとして、細胞生物学や免疫学におけるカギとなるような知見を創出することをめざす。関連する研究テーマで、科研費を取得しているため、継続して研究を推進して当該分野で先駆的な研究成果を創出することを目指す。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Crystal Structures of Csm2 and Csm3 in the Type III-A CRISPR-Cas Effector Complex.

Takeshita D, Sato M, Inanaga H, Numata T.

J Mol Biol. 2019 Feb 15;431(4):748-763.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。