

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15080

研究課題名(和文)クライオ電子顕微鏡によるスプライソソーム活性中心複合体構造変化の可視化と機能解明

研究課題名(英文)cryo-EM analysis of the spliceosomal U5 snRNP biogenesis

研究代表者

滝沢 由政 (Takizawa, Yoshimasa)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：00434291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、pre-mRNAスプライシングを触媒するスプライソソームの活性中心である、U5 RNA-タンパク質複合体(U5 snRNP)の成熟またはリサイクル過程における構造・機能変化を明らかにすることを目的としている。申請者は、分裂酵母の内在性のU5 snRNP前駆体を精製し、ネガティブ染色電子顕微鏡法により複合体を観察することに成功した。続いてクライオ電子顕微鏡解析条件の検討を行ったが、タンパク質粒子の濃度が著しく低く高分解能構造解析に適した試料を得るためには更なる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA-タンパク質複合体(snRNP)であるスプライソソームによるpre-mRNAのスプライシング反応は、真核生物に普遍的な触媒反応である。本研究の中心であるU5 RNA-タンパク質複合体(U5 snRNP)を精製し、成熟過程における構造をネガティブ染色電子顕微鏡法により明らかにした。これにより、真核生物に普遍的なスプライソソームの生合成過程の一端を電子顕微鏡負染色法により観察することができ、クライオ電子顕微鏡解析への足がかりを作ることができた。

研究成果の概要(英文)：The spliceosome is a dynamic macromolecular machine that catalyzes the excision of introns from pre-mRNA to mature mRNA. Although we know the composition of the spliceosome, we still lack a mechanistic understanding of how this dynamic machine assemble and recycle. To elucidate the snRNP biogenesis, I attempted to determine the three-dimensional structure of pre-U5 snRNP, which is known as a catalytic snRNP of the spliceosome, from fission yeast using cryo-electron microscopy. First, I purified the pre-U5 snRNP using a pre-U5 snRNP specific protein, Aar2 by Tandem affinity purification. I then successfully obtained the pre-U5 snRNP containing the Aar2, and observed the oval shape complex of the pre-U5 snRNP by the negative stain EM. I next tried to prepare the sample for cryo-electron microscopy. Unfortunately, I haven't obtained the suitable sample for cryo-EM yet. I need further experiments for cryo-EM to analyze the structure of pre-U5 snRNP.

研究分野：構造生物学

キーワード：スプライソソーム クライオ電子顕微鏡

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

生体内で働く酵素の多くが、タンパク質や核酸が集まった超分子複合体として、決まった立体構造をとることにより、生体を高度に制御している。スプライソソームは、すべての真核生物に保存された超分子複合体の1つであり、pre-mRNAよりイントロンを正確に除去し、エキソンをつなぎ合わせ、成熟した mRNA を生成するスプライシング反応を触媒する RNA-タンパク質複合体 (snRNP) である。驚くべきことに、スプライソソームは、100種類以上もの構成タンパク質と5種類の snRNA が正確に会合、解離を繰り返すことにより機能している。しかし、その巨大さおよび動的な性質が障壁となり、均一な複合体の高濃度精製が難しく、構造生物学的研究が遅れている。そのため、スプライソソームによるスプライシング機構には、未だ不明な部分が多い。近年、Nagai らのグループ<sup>1</sup>および Shi らのグループ<sup>2</sup>は、酵母後期スプライソソームを用い、その高分解能構造をクライオ電子顕微鏡法により示した。しかし、動的なスプライソソームは、その生合成過程やリサイクル過程の三次元構造変化における機能解明には至っていない。

超分子複合体スプライソソームの中でも、スプライシングを触媒する活性中心であり、最も分子量が大きく動的な分子が U5 snRNP である。U5 snRNP は、U5 snRNA と 10 種類以上のタンパク質群で構成される。現在までに、Weber<sup>3</sup> らによる生化学的解析により、その生合成過程で、複合体構造の大きな変化を伴うことが示されている。また、Makarov<sup>4</sup> らにより、スプライシング後、U5 snRNP はスプライソソームより放出され、リサイクルされる過程で、複合体構造が大きく変化することが示唆されている。そのため、スプライソソームを構成する U5 snRNP の生合成過程やリサイクル過程の構造変化の解析が待たれている。

参考文献：1. Nguyen et al. *Nature* (2015), 2. Yan et al. *Science* (2015), 3. Weber et al. *Genes Dev* (2011) 4. Makarov et al. *Science* (2002)

### 2. 研究の目的

U5 snRNP は、そのライフサイクル（前駆、成熟、リサイクル U5 snRNP）において、構成タンパク質が変化し、各段階の役割に応じて大きく形を変えて機能していることは知られているが、その形成およびリサイクルの過程で、RNA とタンパク質をどのように構造変化させ、複合体の会合解離および活性化に関与しているのかは未解明である。本研究では、U5 snRNP の生合成過程を明らかにするため、クライオ電子顕微鏡を用いた三次元再構成により、活性化スプライソソーム形成の分子機序や機能制御のメカニズムを明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) U5 snRNP 前駆体の精製

まず、U5 snRNP 前駆体を分裂酵母より、TAP (Tandem Affinity Purification) タグを用いてアフィニティー精製を行う。分裂酵母の U5 snRNP 前駆体を精製するため、U5 snRNP 前駆体に特異的に結合することが知られている Aar2 タンパク質を TAP タグで標識することにより精製を行う。また、同様に U5 snRNP の中心的タンパク質である Spp42 に TAP タグを導入し精製を試みる。精製後の試料は、SDS-PAGE、タンパク質量分析を行い、U5 snRNP のすべての構成タンパク質が含まれていることを確認する。加えて、密度勾配遠心により、前駆、成熟およびリサイクル U5 snRNP を高純度に分離精製できる最適条件も検討する。

#### (2) ネガティブ染色電子顕微鏡法による U5 snRNP の観察

精製された U5 snRNP を、酢酸ウランで染色することにより、ネガティブ染色電子顕微鏡観察を行う。ネガティブ染色電子顕微鏡法は、ウランで染色することにより、高いコントラストで観察することが可能である。また、クライオ電子顕微鏡試料よりも、容易に作製することが可能なため、試料の条件検討にも有効である。

#### (3) U5 snRNP のクライオ電子顕微鏡構造解析

精製された複合体を、溶液中の分子構造を維持したまま観察するため、液化エタンを用いて氷包埋する。クライオ電子顕微鏡観察は、Thermo Fisher 社 Talos Arctica により行い、単粒子解析に適した試料が得られ次第、大量画像撮影を行う。

#### (4) 高分解能クライオ電子顕微鏡単粒子解析の高度化

本研究は、U5 snRNP 前駆体のクライオ電子顕微鏡構造解析を行うと共に、クライオ電子顕微鏡解析の高度化を行うために、スプライソソームと同様に核内に存在するクロマチンの基本構成単位であるヌクレオソームの構造解析も平行して行うことで、U5 snRNP 前駆体が精製でき次第、迅速に高度化されたクライオ電子顕微鏡解析が行えるように計画した。

### 4. 研究成果

#### (1) U5 snRNP の精製

本研究は、まず、pre-mRNA スプライシングを触媒するスプライソソームの活性中心である、U5 RNA-タンパク質複合体(U5 snRNP)の成熟過程を明らかにするために、U5 snRNP 前駆体の精製を試みた。分裂酵母のU5 snRNP 前駆体を精製するため、U5 snRNP 前駆体に特異的に結合することが知られている aar2 遺伝子を TAP タグが付加される大量発現系ベクターpREP1 にクローニングした。pREP1-aar2 プラスミドを分裂酵母に導入することで、Aar2 タンパク質を TAP タグ融合タンパク質として発現させた。その標的タンパク質を使い、U5 snRNP 前駆体の2段階のアフィニティ精製を行った。1段階目を IgG セファロース、TEV プロテアーゼによる溶出後、2段階目としてカルモジュリンセファロースを用いて精製を行い、U5 snRNP 前駆体の精製を実施した(図1)。アフィニティ精製されたU5 snRNP 前駆体を質量分析法により、構成タンパク質の同定を行った結果、U5 snRNP 前駆体に含まれることが予想される Aar2、Spp42、Cwf10 タンパク質に加え、その他のスプライソソームに参与するタンパク質も同定することができた。加えて、U5 snRNP の中心的構成タンパク質 Spp42 も TAP タグを付加することにより、分裂酵母内在性の複合体の精製も行った。

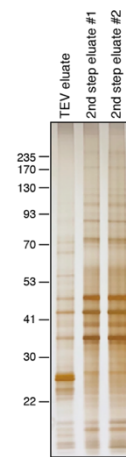


図1. Aar2-TAPにより精製されたU5 snRNP

### (2) ネガティブ染色電子顕微鏡法によるU5 snRNPの観察

Aar2-TAPにより精製されたU5 snRNP 前駆体をクライオ電子顕微鏡構造解析の前段階として、ネガティブ染色電子顕微鏡を用いて、U5 snRNP 前駆体の形状を観察した。ネガティブ染色電子顕微鏡の観察結果、直径約20 nmの粒子を多数観察することに成功した(図2A)。また、Spp42-TAPによる精製で得られて複合体をネガティブ染色電子顕微鏡法により観察し、Aar2-TAPの精製で得られた複合体よりも、大きな分子が観察された(図2B)。

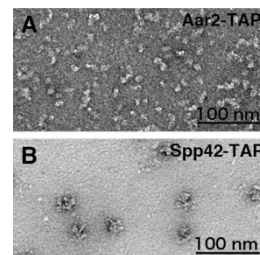


図2. A. Aar2-TAP, B. Spp42-TAPにより精製されたU5 snRNPのネガティブ染色電子顕微鏡像

### (3) U5 snRNPのクライオ電子顕微鏡構造解析

続いて得られた分裂酵母U5 snRNP 前駆体をクライオ電子顕微鏡により観察を行った。しかし、今回検討した複合体調製法では、著しく濃度低く粒子を観察することができなかつたため、更なる検証が必要であることが分かった。

Spp42-TAPは、クライオ電子顕微鏡を用い、粒子を観察することができた(図3)。ただ均一性と濃度が著しく低いため、こちらも更なる試料作製条件の検証が必要であることが分かった。

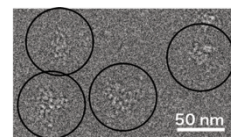


図3. クライオ電子顕微鏡によるSpp42-TAPにより精製された複合体の観察

### (4) 高分解能クライオ電子顕微鏡単粒子解析の高度化

高分解能クライオ電子顕微鏡単粒子解析の高度化を行うために、クロマチンの基本構成単位であるヌクレオソームを使い三次元構造解析を行った。ヌクレオソームは試験管内再構成により、精製された試料を用いて、クライオ電子顕微鏡用グリッドを急速凍結法により作製した。クライオ電子顕微鏡により、大量画像撮影を行った。得られた画像を用いて単粒子解析を行い、~4Åの高分解能で三次元構造を得ることに成功した(論文1, 2)。また、均一性の低い高次クロマチン基本構造の単粒子解析も行った(論文3)。この立体構造解析の過程で得られた知見は、U5 snRNP 前駆体のクライオ電子顕微鏡構造解析への応用が可能である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3件)

- ① Kobayashi W, Takizawa Y, Aihara M, Negishi L, Ishii H, Kurumizaka H; Structural and biochemical analyses of the nuclear pore complex component ELYS interacting with the nucleosome, *Commun Biol*, 査読有, May, 163, 2019, doi: 10.1038/s42003-019-0385-7.
- ② Takizawa Y\*, Tanaka H\*, Machida S, Koyama M, Maehara K, Ohkawa Y, Wade W, Wolf W, Kurumizaka H, Cryo-EM structure of the nucleosome containing the *ALB1* enhancer DNA sequence, *Open Biol*, 査読有, Mar, 8, 2018, pii: 170255, doi: 10.1098/rsob.170255. (\*Co-first author: contributed equally to this work)
- ③ Machida S\*, Takizawa Y\*, Ishimaru M, Sekine S, Nakayama J, Wolf M, Kurumizaka H; Structural basis of heterochromatin formation by human heterochromatin protein 1. *Molecular Cell*, 査読有, Feb, 69, 385-397, 2018, doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.011. (\*Co-first author: contributed equally to this work)

[学会発表] (計 7件)

- ① Takizawa Y, Challenges for the chromatin structure determination by single particle cryo-EM, Cryo-Electron Microscopy Course at OIST, 2019年2月, 沖縄.
- ② Takizawa Y, Dynamic chromatin conformation of heterochromatin revealed by cryo-EM,

Advanced Genome Science International Symposium “Frontiers of Genome Science”, 2019年1月, 東京.

③ Takizawa Y, Ho C, Kobayashi W, Tachiwana H, Wolf M, Kurumizaka H, Structure of higher-order chromatin containing CENP-A nucleosome, 第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月, 横浜

④ Takizawa Y, Machida S, Ishimaru M, Sekine S, Sugita Y, Nakayama J, Wolf M, Kurumizaka H; Cryo-EM structure of heterochromatin unit by human HP1, 11<sup>th</sup> Kuo Symposium on 3D-EM of Macromolecules and Cells, 2018年8月, Hangzhou, China.

⑤ Takizawa Y, Machida S, Ishimaru M, Sekine S, Sugita Y, Nakayama J, Kurumizaka H, Wolf M, Architecture of the heterochromatin unit revealed by cryo-EM, Biophysical Society 62th Annual Meeting, 2018年2月, SanFrancisco, USA.

⑥ Takizawa Y, Cryo-EM structure of heterochromatin unit by HP1, 生理研研究会 EM ワークショップ, 2017年11月, 岡崎.

⑦ Takizawa Y, Machida S, Ishimaru M, Sekine S, Nakayama J, Kurumizaka H, Wolf M, Cryo-EM structure of heterochromatin unit by human HP1, 第17回日本蛋白質科学会年会, 2017年6月.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

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: メラニー オオイ

ローマ字氏名: Melanie D. Ohi

研究協力者氏名: マティアス ウォルフ

ローマ字氏名: Matthias Wolf

研究協力者氏名: 胡桃坂 仁志

ローマ字氏名: KURUMIZAKA, Hitoshi

※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。