

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03169

研究課題名(和文) 遺伝子量補正を担う分子複合体の構造基盤を解明する多面的アプローチ

研究課題名(英文) A multidisciplinary approach to establish the structural basis of dosage compensation

研究代表者

三島 正規 (Mishima, Masaki)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70346310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：lncRNAであるXistは、遺伝子量補正において、染色体レベルでのグローバルな転写抑制を行う。この転写抑制の仕組みを理解するため、鍵となる分子間相互作用の構造基盤の確立を目指した。特にXistとSHARPとの複合体の立体構造の解析にフォーカスし、多次元NMR、X線結晶構造解析、生化学的解析、リボプロテオミクスといった多面的な手法を用いて解析を行った。安定同位体標識タンパク質を調製し、RRM23部分の良好なNMRスペクトルを取得し信号の帰属を完了した。またXistのNMR測定では、RNA-repeat間のダイナミクスにより信号が消失する等の困難さが生じたが、部分同位体標識しにより解決した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子量補償は染色体全体まるごとの不活化というスケールの大きな発現抑制であり、それを担う複合体は、多くの因子を含み、転写抑制マシナリー全体の分子レベル、構造レベルでの理解が必要である。またxist遺伝子の他の染色体への移植によってトリソミー等の染色体異常による過剰な発現を抑制できることが、細胞レベルの研究では明らかになっており、Xistのもつ染色体全体を不活化する機能を、タンパク質との複合体形成に基づいた分子(構造)レベルまで落とし込んで理解することは、将来の医学的な展開を視野にいれた基礎研究としても、意義深い。本研究はその第1歩となる研究である。

研究成果の概要(英文)：Xist, an lncRNA, plays a pivotal role in global transcriptional repression at the chromosomal level in dosage compensation. To understand the mechanism of this transcriptional repression, we aimed to establish the structural basis of the key intermolecular interaction. In particular, we focused on the analysis of the three-dimensional structure of the complex of Xist and SHARP, and performed analyses using a multidisciplinary approach such as multidimensional NMR, X-ray crystal structure determination, biochemical analysis, and ribo-proteomics. Stable isotope-labeled proteins were prepared and good NMR spectra of the RRM23 moiety were obtained, and the NMR resonance assignments were established. In the NMR measurements of Xist, there were difficulties such as signal loss due to the dynamics between the two repeats. We overcame the problem by partial isotope labeling

研究分野：構造生物化学

キーワード：遺伝子量補償 SHARP NMR X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の性染色体はメス XX とオス XY であり、メスではオスに対して二倍の X 染色体由来遺伝子をもつ。これらの遺伝子の発現量が二倍となってしまうことを防ぐため、二本ある X 染色体のどちらかの転写が抑制 (X 染色体の不活化) される。このような X 染色体からの遺伝子の発現量がオスとメスで同じになるように調整される現象は、遺伝子量補正と (dosage compensation, 遺伝子量補償とも) 呼ばれ、染色体一本全体がまるごと転写抑制されるドラスティックな現象である。その分子メカニズムの中心となるのが lncRNA である Xist であり、様々な転写抑制因子群がこの足場分子に集積すると考えられていたが、Xist と直接相互作用する因子群や、具体的に転写を抑制する因子群について、詳細は長い間、未知であった。ようやく 2015 年に、SHARP (SMRT/HDAC associated repressor protein) と、そのホモログである RBM15 が Xist に直接結合すること報告された (*Nature* 2015, 521,232, *Cell* 2015,161,404)。一方で申請者は独立に研究を進めて、2014 年に SHARP の C 末端に存在する SPOC ドメインと HDAC (histone deacetylase) の SMRT (silencing mediator of retinoic and thyroid hormone receptors) 複合体構造を決定し、SHARP がその SPOC ドメインによって HDAC をリクルートして転写を抑制する機能をもつことを立体構造解析と、細胞生物学的アッセイにより明らかにしていた (*Structure*. 2014 22, 35)。また、SHARP の Xist 結合部位が N 末端側の RRM2-3 であること、Xist の SHARP との結合部位は、A 領域と呼ばれる領域の一部の繰り返し配列であるタンデム A-repeat であることを同定している。

2. 研究の目的

SHARP/RBM15 と lnc である Xist との複合体の立体構造解析を行い、分子間相互作用の詳細明らかにし、その構造基盤を確立する。

3. 研究の方法

(I) 溶液状態での複合体の構造解析

SHARP/Xist、対象に、これらの再構成複合体試料を用いて、多次元 NMR 法によって NOESY や、スピラベル導入による常磁性緩和効果からの長距離情報 (~20 Å)、残余双極子相互作用から得られるドメイン配向情報から立体構造解析を進める。スピラベルの導入には、部位特異的非天然アミノ酸導入とクリックケミストリーを用いた。システインを変異導入して、そのチオール基に対してスピラベルを行った。また tRNA とアミノアシル tRNA 合成酵素を共発現するベクターを用いたシステムを確立済みであったので、これを用いたスピラベルも行った。4-Propargyloxy-L-phenylalanine は、安価な前駆体 (保護チロシン、propargyl bromide) からグラムオーダーで、研究室にて自前で合成可能な体制を確立した。

NMR 法は結晶化を必要とせず、RRM を複数もつような構造の柔らかな系の解析において極めて有効である。X 線結晶構造解析は、特に複合体における分子認識について決定的な情報量を与えることから、並行して行った。

また、SHARP と相溶性の高い RBM15 タンパク質も Xist に相互作用し、RBM15 では Xist の m6A (アデニン塩基の 6 位のメチル化) を含む領域との相互作用が報告されたことから (*Nature* 2016 537 369)、RBM15 についても種々の発現系を構築し、RRM1-3、RRM1、RRM2、RRM3 の NMR スペクトルの取得に成功した。

(II) RNA 側に着目した解析

Xist のタンデム A-repeat (すなわち、RNA 部分のみ) の NMR 構造解析も進めた。タンデムリピートでは、RNA-repeat 間のダイナミクスにより RNA 由来の信号が消失する、あるいは信号の激しい重複を起こす等の困難さがあり、複合体の解析に先立ち、RNA 側のスペクトル、構造情報を取得しておくことは大変有意義である。分担者の坂本が蓄積してきた RNA の構造解析のノウハウを生かして、RNA に適切な変異を導入し、RNA 側の試料の性質の改善を図った。

(III) リボプロテオミクスによる Xist 複合体の解析

Xist と結合タンパク質複合体の立体構造解析の成否の重要な点の一つは、如何に効率よくかつ正確に、結合する RNA 配列を見出すことができるかにある。そこでリボプロテオミクスにより最適な結合 RNA 配列を同定のため、RNA タンパク質複合体中の RNA、複数のタンパク質を同時に同定できるリボプロテオミクスを用いた。

(IV)生化学的解析

SHARP、RBM15 と Xist 複合体における相互作用の理解のための表面プラズモン共鳴(SPR)による結合実験を意図して、SHARP と RBM15 の変異体を作成した。

4 . 研究成果

SHARP は当初、lncRNA である SRA(steroid hormone receptor RNA activator)に直接結合し、SMRT/NcoR を含む HDAC 複合体をリクルートすることで転写を抑制する因子として発見された。SRA は、m-RNA 様の構造をもつ lncRNA で、継続的なステロイドホルモン刺激によって SHARP が発現して SRA に直接結合し、SMRT を介して HDAC をリクルートすることで、転写が抑制され、ステロイドホルモンに対する応答に寛容が生じる(*Genes Dev.* 2001 15,1140)。ヒト SHARP は、N 末端側に 4 つの RRM ドメインと C 末端側に SPOC ドメインを持つが、三島は、基盤研究 B(H27-H29)において、SHARP タンパク質のカウンターパートとして、SRA を対象に研究を進めるなかで、4 つの RRM のうち、1 つ目の RRM である RRM1 が、SRA との相互作用に重要であることを見出し、RRM1 の立体構造の解析に成功した。

しかし、SHARP が遺伝子量補正という生物学上極めて重要な現象にも直接関与することが明らかになったことから、本研究では、研究対象を Xist との複合体の構造解析に発展、拡張し、新たに、試験管内から細胞での RNA 側の解析にも展開した。現在までに SHARP の RRM2-3 の領域が Xist との相互作用に重要であることを確認しており、これら一連の解析結果を纏めると、SHARP は4つもつ RRM のうち、RRM1 で SRA と結合し、RRM2-3-4 で Xist と結合するというようにドメイン解剖できる。Xist とのみ結合すると考えられる RBM15 が SHARP の RRM234 に対応する RRM123 のみを有していることとも一致する。

また SHARP と標的 RNA を Halo-Tag を用いた免疫沈降により得て、CLIP 法(タンパク質-RNA をクロスリンクさせる方法)を行った。全長 3000 アミノ酸を超える SHARP であるが、RNA 複合体のトラップに成功し、RNA を高速シーケンサーで同定することで複数のコンセンサス配列の候補をすでに得ており、タンデム A-repeat で結合するという試験管内の結果と矛盾していない。

また、種々の発現系を構築し、NMR 解析のための安定同位体標識タンパク質等を調製し、NMR スペクトルを取得した。重要な RRM23 部分に関しても、非常に良好な NMR スペクトルが得られ、各種 3 次元 NMR 測定を行い、NMR 信号の帰属に成功した(図 1)。

また、オリゴ RNA として Xist の A-repeat (シングルリピートとタンデム領域)に関して化学合成した種々のものを検討した。RRM2-3 の信号帰属をもとに、非標識のタンデム A リピートを ^{15}N 標識 RRM2-3 試料に添加すると信号の変化が観測され、両者が結合することが示された(図 2)。

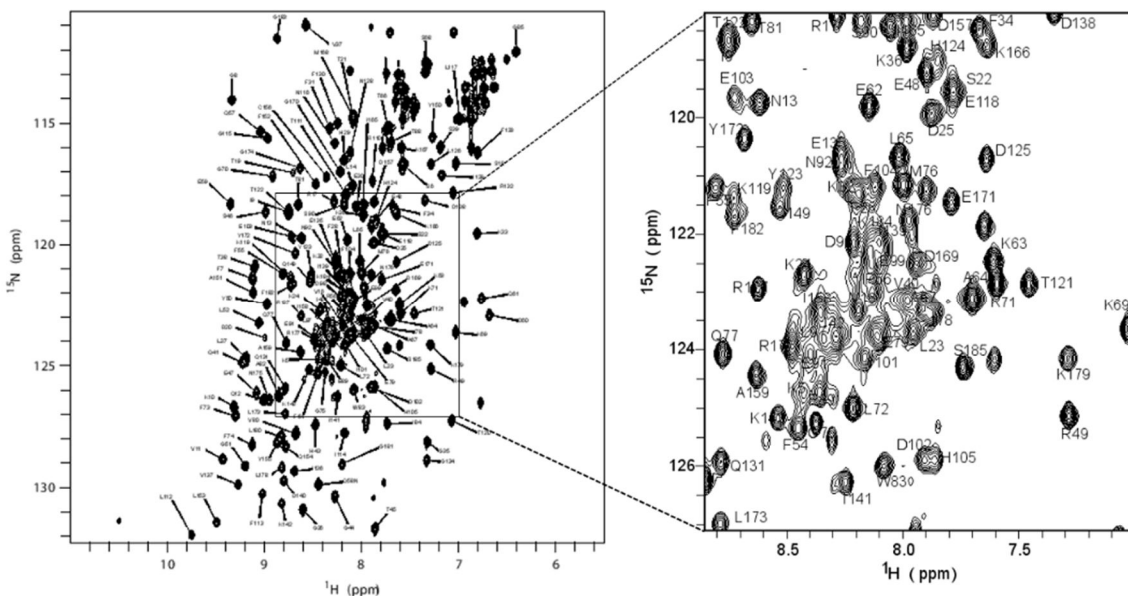
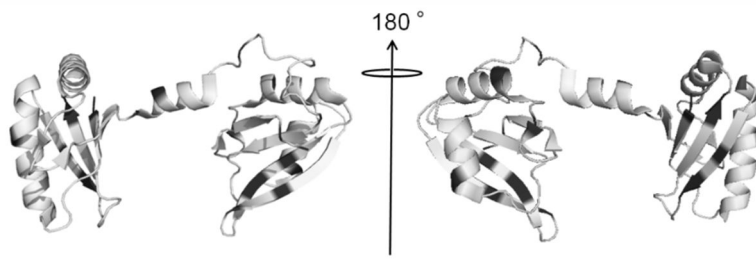


図 1 SHARP RRM 2-3 の 2 次元 NMR スペクトル。信号の分離、線形ともに良好である。主鎖の帰属が完了している。0.2 mM ^{15}N RRM2-RRM3



**図2 AリピートRNA添加時
において影響を受ける信号を
SHARP RRM 2-3のモデル構造
にマップしたもの**

影響を受ける信号に対応する
残基を濃いグレーでマップし
た。RRM2,RRM3とも主にβ-シ
ート上に位置した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murase Kohji, Moriwaki Yoshitaka, Mori Tomoyuki, Liu Xiao, Masaka Chiho, Takada Yoshinobu, Maesaki Ryoko, Mishima Masaki, Fujii Sota, Hirano Yoshinori, Kawabe Zen, Nagata Koji, Terada Tohru, Suzuki Go, Watanabe Masao, Shimizu Kentaro, Hakoshima Toshio, Takayama Seiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Mechanism of self/nonself-discrimination in Brassica self-incompatibility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4916
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18698-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Asuka, Mishima Masaki, Nomura Kotohiro, Inagaki Akiko	4. 巻 40
2. 論文標題 Light-Assisted Catalytic Hydrogenation of Carbon Dioxide at a Low Pressure by a Dinuclear Iridium Polyhydride Complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organometallics	6. 最初と最後の頁 98 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.organomet.0c00684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takatori Kazuhiro, Kuroda Minpei, Mishima Masaki, Matsuo Yukiko, Mimaki Yoshihiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Digipregnosides A?C, three novel rearranged 11,12-secopregnane glycosides, and digipregnosides D and E, 12,20-epoxypregnane glycosides from the seeds of Digitalis purpurea	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 153020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2021.153020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizu Takahiro, Suzuki Takumi, Kido Akihiro, Nagai Kan, Kobayashi Ayaho, Sugiura Reiko, Ito Yutaka, Mishima Masaki	4. 巻 1864
2. 論文標題 Domain selective labeling for NMR studies of multidomain proteins by domain ligation using highly active sortase A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129419 ~ 129419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.129419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木拓巳, 高田夢人, 伊藤隆, 三島正規	4. 巻 51
2. 論文標題 マルチドメインタンパク質のNMRによる構造解析に資する要素技術	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 58-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagae Takayuki, Unno Masashi, Koizumi Taiki, Miyanoiri Yohei, Fujisawa Tomotsumi, Masui Kento, Kamo Takanari, Wada Kei, Eki Toshihiko, Ito Yutaka, Hirose Yuu, Mishima Masaki	4. 巻 118
2. 論文標題 Structural basis of the protochromic green/red photocycle of the chromatic acclimation sensor RcaE	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2024583118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小泉太貴、会津貴大、伊藤隆、広瀬侑、永江峰幸、三島正規
2. 発表標題 シアノバクテリア由来光受容タンパク質GAFドメインの立体構造解析
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木拓巳、会津貴大、伊藤隆、三島正規
2. 発表標題 構造研究のためのタンパク質連結法の開発
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三島正規
2. 発表標題 NMR studies on the protonation state of cyanobacteriochrome
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木拓巳, 田島佳寿, 川原裕之, 伊藤隆, 三島正規
2. 発表標題 Rab32のNMRによる解析
3. 学会等名 第59回NMR討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小泉太貴, 会津貴大, 宮ノ入洋平, 伊藤隆, 広瀬侑, 三島正規
2. 発表標題 光受容タンパク質GAFドメインにおける発色団のプロトン化状態の解析
3. 学会等名 第59回NMR討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊吏輝, プバティ マキシシ ヌーシュ, 末元雄介, 木川隆則, 三島正規, 猪股晃介, 池谷鉄兵, 伊藤隆
2. 発表標題 NMRを用いたアダプター蛋白質Drkの動態解析
3. 学会等名 第59回NMR討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島弘稀, 若松馨, 伊藤隆, 三島正規
2. 発表標題 NDSBの添加によるユビキチン分子内の水素結合への影響
3. 学会等名 第59回NMR討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島弘稀, 小泉太貴, 伊藤隆, 海野昌喜, 三島正規「
2. 発表標題 フェレドキシタンパク質の水素結合の直接観測
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉太貴、会津貴大、伊藤隆、広瀬侑、三島正規
2. 発表標題 シアノバクテリア由来GAFドメインのNMRによる構造解析
3. 学会等名 第58回NMR討論
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木拓巳、高田夢人、伊藤隆、三島正規
2. 発表標題 多様なユビキチン鎖のロバストな合成法とNMRへの応用
3. 学会等名 第58回NMR討論
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉太貴、中島弘稀、伊藤隆、三島正規
2. 発表標題 溶液NMRによる水素結合の直接観測
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木拓巳、会津貴大、伊藤隆、三島正規
2. 発表標題 様々なユビキチン鎖のロバストな合成法
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木拓巳、会津貴大、伊藤隆、三島正規
2. 発表標題 多様なユビキチン鎖のロバストな合成法
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂本 泰一 (Sakamoto Taiichi) (40383369)	千葉工業大学・先進工学部・教授 (32503)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田岡 万悟 (Taoka Masato) (60271160)	東京都立大学・理学研究科・准教授 (22604)	
研究分担者	藤原 俊伸 (Fujiwara Toshinobu) (80362804)	近畿大学・薬学部・教授 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関