

機関番号：22701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570111

研究課題名 (和文) 分化制御の鍵をにぎる翻訳抑制複合体の構築原理

研究課題名 (英文) Molecular basis for the formation of translational repression complex that regulates stem cell differentiation

研究代表者

永田 崇 (NAGATA TAKASHI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・助教

研究者番号：10415250

研究成果の概要 (和文)：

神経幹細胞に強く発現する Musashi1(Msi1)は、幹細胞の全能性維持や腫瘍化に関係している。Msi1 のはたらきは標的遺伝子の発現を翻訳段階で抑制することである。まず、Msi1 による RNA の認識機構を原子分解能で明らかにした。得られた最小標的配列及び結合様式の知見は、新たな標的遺伝子を探すための重要なヒントとなる。また、翻訳開始因子の一つポリ A 結合タンパク質(PABP)が、ポリ A 鎖結合面とは異なる面で Msi1 と結合することが示された。翻訳抑制複合体の構造解析に向けたモデリングプロトコールも整備した。

研究成果の概要 (英文)：

Musashi1 (Msi1) is a neural protein that suppresses translation of target mRNAs and contributes in maintenance of cell stemness and tumorigenesis. We have determined the RNA recognition mechanism by Msi1. Minimal RNA sequence for Msi1, and the binding mechanism of Msi1 that we have elucidated would provide important clues to discover new target genes for Msi1. Meanwhile, we have determined the structure of PABP and identified its Msi1 binding sites. Finally, we have prepared a protocol for building protein and nucleic acid complex models that would support the structural analysis of translational repression complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：Musashi, 翻訳抑制, 幹細胞, 分化制御, RNA 結合タンパク質, NMR, RBD, 溶液構造

## 1. 研究開始当初の背景

Musashi1 (Msi1) は神経幹細胞に強く発現する RNA 結合タンパク質であり、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (3'-UTR) に結合し、その翻訳を抑制する。Msi1 の標的の一つとして、Notch の阻害タンパク質 Numb が発見されている。Notch シグナル伝達の阻害は幹細胞の分化を促進させる。Msi1 は、*numb* mRNA の発現を翻

訳レベルで抑制することで、Notch シグナル伝達を亢進させ、神経系等の幹細胞の全能性を維持する役割がある。

通常 mRNA の翻訳は、5' 末端のキャップ複合体の構成因子 eIF4G と、3' 末端のポリ (A) に結合した PABP との相互作用により、開始・促進される。Msi1 は、*numb* mRNA の 3'-UTR において直接 PABP に結合し、eIF4G と PABP

の結合を阻害することにより、翻訳を抑制している。

申請者は当初、Msi1 の有する二つの RNA 結合ドメイン (RBD: RBD1, RBD2) について各々大量調製方法を確立し、溶液中での立体構造、分子運動を解析するとともに、RNA 結合部位の同定に成功していた。これらの成果を進展させ、Msi1 が中心となる *numb* mRNA の翻訳抑制の分子機構を解明できれば、神経系幹細胞・前駆細胞の維持・自己複製の理解のみならず、これまで不可能とされてきた脳や神経の再生医療へつながると考えた。

## 2. 研究の目的

Msi1 による *numb* mRNA 3'-UTR の認識機構及び Msi1 と PABP1 の相互作用様式を明らかにすることで、これらの分子が形成する翻訳抑制複合体の構築原理を明らかにする。そして、翻訳抑制が如何にして達成されるのかを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) Msi1 RBD1-2 単独及び RNA との複合体の構造解析

① Msi1 の二つの RBD を含む領域 (RBD1-2) の大量発現系を構築した。② 標的 RNA 配列を含む *numb10* [r(UAGGUAGUAG)] と *numb15* [r(UAGGUAGUAGUUUA)] を合成した。③ RBD1-2 の NMR 構造解析を行った。④ RBD1-2 と *numb15* の NMR 結合解析を行った。⑤ RBD1-2 単独及び RBD1-2:*numb15* 複合体について、NMR 法を駆使し、遠距離情報が得られる RDC (残余双極子カップリング) と PRE (常磁性緩和促進) を観測した。⑥ 二つの RBD の位置関係を調べるため SAXS (X 線小角散乱) を測定した。

(2) Msi1 の RBD1 及び RBD2 が認識する最小標的配列の同定

① *numb15* を 6 塩基単位で分けた配列を持つ 6 つのオリゴ RNA を合成した。② 各々を RBD1 または RBD2 に加える滴定実験を行い、NMR 法によりシグナル変化を追跡した。

(3) Msi1 RBD1:r(GUAGU) 複合体の立体構造解析

① [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N] 標識化 Msi1 RBD1:r(GUAGU) 複合体を形成させた。② 各種 NMR 三重共鳴実験、NOE 実験、フィルター実験を行った。③ 立体構造を決定した。

(4) Msi1 PABP 結合領域の発現系の構築

各種可溶性タグに Msi1 PABP 結合領域を連結し、大腸菌により発現させた。

(5) PABP RBD1 の立体構造解析

① [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N] 標識化 PABP1 RBD1 について各種 NMR 三重共鳴実験、NOE 実験を行った。② 立体構造を決定した。

(6) PABP RBD1 の Msi1 結合部位の同定

① PABP1 RBD1 に対して Msi1 PABP 結合領域を滴定し、NMR によりシグナルの変化を追跡した。② 結合部位を PABP1 RBD1 の立体構造上にマッピングした。

## 4. 研究成果

(1) Msi1 RBD1-2 単独及び RNA との複合体の構造解析

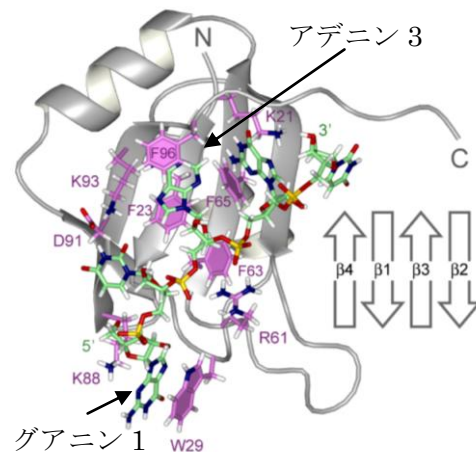
安定同位体標識化 Msi1 RBD1-2 の大量調製方法を確立した。引き続き、*numb10* と *numb15* を用いて NMR 滴定実験を行った。RBD1-2 とこれらの RNA との混合比が 1:1~1:2 において形成される複合体は、良好なスペクトルを与えることがわかった。しかし SAXS の結果は、RBD1-2 の量に比べて RNA の量が等量を超えると多量化することを示した。一方、PRE 及び RDC の結果は、RBD1-2:RNA=1:1 複合体において、RBD1 と RBD2 の相対位置が比較的フレキシブルであることを示した。さらに RBD1-2 は、*numb10* または *numb15* の複数の個所に結合することがわかった。

(2) Msi1 の RBD1 及び RBD2 が認識する最小標的配列の同定

(1) の結果を受けて、各 RBD が結合する最小標的配列を実験的に探索した。まず、RBD1 と RBD2 を各々単独で調製し、*numb15* を 6 塩基単位で分けた配列を持つ 6 つの RNA を合成した。そして、全ての組合せについて NMR 滴定実験を行なった。その結果、RBD1 については r(GGUAGU)、r(GUAGUU) が、RBD2 については r(UAGGUA)、r(GGUAGU)、r(GUAGUU) が強く結合し、いずれも NMR 時間スケールで遅い交換であることがわかった。さらなる解析を行い、RBD1 が r(GUAGU) と強く結合することを見出した。

(3) Msi1 RBD1:r(GUAGU) 複合体の立体構造解析

引き続き、Msi1 RBD1:r(GUAGU) 複合体の溶液構造を決定した。



得られた構造により、RBD1 は r(GUAG) を特異

的に認識していることがわかった。Msi1 に特徴的であり、重要な認識機構として、ループ中のトリプトファンが一番目のグアニンをスタッキングし、二つのフェニルアラニンが三番目のアデニンをサンドイッチすることを明らかにした（上の図を参照）。

さらに、以上の RBD1 による RNA 認識機構の知見と、RBD2 の RNA 結合部位及び RBD1 と RBD2 のアミノ酸残基の比較により、RBD2 が r(UAG) を特異的に認識していることを見出した。

近年、Msi1 のホモログである Msi2 が癌や白血病に関わっていることが報告された。そこで、今回得られた Msi1 の RNA 認識機構を元に、Msi2 の RNA 認識機構について考察した。その結果、Msi1 と Msi2 とは同じ標的を似た機構により認識していることが示唆された。Msi1 と Msi2 とは、RBD 以外の領域のアミノ酸残基の保存性が低い。したがって Msi1 と Msi2 のはたらきの違いは、RBD 以外の領域におけるタンパク質-タンパク質間相互作用や翻訳後修飾などの機能の違いに起因することが示唆される。今後は、RBD 以外の領域にも注目して生化学及び構造生物学の研究を進める必要がある。(1)-(3)の成果については、雑誌論文の項目(9)と、さらに1報投稿を準備している。

#### (4) Msi1 PABP 結合領域の発現系の構築

Msi1 RBD2 の C 末側に続く PABP 結合領域 (Msi1C) の発現系を構築した。各種可溶性タグを試した結果、Ni<sup>2+</sup>に結合し可溶化能が高い HAT タグ及び GB1 をタンデムにつないだ N 末タグが有効であることがわかった。この様にして、HAT-GB1-Msi1C の調製に成功した。

#### (5) PABP RBD1 の立体構造解析

PABP RBD1 の溶液構造を決定した。既に報告されている PABP RBD1-2:poly(A) の結晶構造と基本的には同じであることがわかった。

#### (6) PABP RBD1 の Msi1 結合部位の同定

[<sup>15</sup>N] 標識化 PABP RBD1 に対して HAT-GB1-Msi1C を滴定した結果、PABP RBD1 のポリ A 鎖結合面とは異なる面に Msi1C が結合することが示された。(1)-(6)の成果は、国際学会 (1 件)、国内学会 (7 件) において発表した。

#### (7) その他の成果

①転写因子 GT-1 がリン酸化を受けて転写を活性化する機構を解明した(雑誌論文 2)。この研究で用いた NMR 実験情報に基づいたタンパク質と核酸の複合体モデリングのプロトコールは、Msi1、RNA、PABP 三者複合体の立体構造解析に用いることが出来る。

②ヒトシチジン脱アミノ化酵素 APOBEC 3G の立体構造を決定し、基質 DNA 結合部位を同定

し、さらに酵素活性を実時間で追跡することに成功した(雑誌論文 3, 5, 10)。

③各種 RNA 結合タンパク質の立体構造を決定し、結合様式を明らかにした(雑誌論文 1, 6, 7)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

#### 全て査読有り

(1) Nagata, T., Yokohama, S. 他 (12 人中 2 番目、永田は 1 番目の著者と同じ貢献) (2011)

*Protein Sci.*, **20**, 118-130. "Structures of the first and second double-stranded RNA-binding domains of human TAR RNA-binding protein"

(2) Nagata, T., Katahira, M. 他 (9 人中 1 番目) (2010) *Proteins*, **78**, 3033-3047. "Solution structures of the trihelix DNA-binding domains of the wild-type and a phosphomimetic mutant of Arabidopsis GT-1: mechanism for an increase in DNA-binding affinity through phosphorylation."

(3) Nagata, T., Katahira, M. 他 (10 人中 2 番目) (2009) *EMBO J.*, **28**, 440-451. "Structure, interaction, and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G"

(4) Nagata, T., Hiroaki, H. 他 (9 人中 3 番目) (2009) *Biophys J.*, **97**, 2034-2043. "Unusual thermal disassembly of the SPF domain oligomer from *Pyrococcus horikoshii*"

(5) Nagata, T., Katahira, M. 他 (10 人中 2 番目) (2009) *Nucleic Acids Symp Ser.*, **53**, 87-88. "Structure and real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G which is involved in anti-HIV activity"

(6) Nagata, T., Yokohama, S. 他 (13 人中 1 番目) (2008) *Nucleic Acids Res.* **36**, 4754-4767. "The RRM domain of poly(A)-specific ribonuclease has a noncanonical binding site for mRNA cap analog recognition"

(7) Nagata, T., Katahira, M. 他 (13 人中 1 番目) (2008) *Nucleic Acids Res.* **36**, 6816-6824.

"Elucidation of the mode of interaction in the UPl-telomerase RNA-telomeric DNA ternary complex which serves to recruit telomerase to telomeric DNA and to enhance the telomerase activity"

(8) Tsuji, T., Nagata, T., Yanagawa, H. (2008) *J. Biochem.* **144**, 513-521. "N- and C-terminal Fragments of a Globular Protein Constructed by Elongation of Modules as a Units Associated for Functional Complementation"

- (9) Nagata, T., Katahira, M. 他 (10 人中 9 番目) (2008) *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 193-194. "Structural analysis of Musashi-RNA complex on the basis of long-range structural information"
- (10) Nagata, T., Katahira, M. 他 (8 人中 2 番目) (2008) *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 183-184. "NMR assignments and the identification of the secondary structure of the anti-retroviral cytidine deaminase"

[学会発表] (計 40 件)

国内学会 28 件及び国際学会 12 件。以下国際学会のみ記載。

- (1) Nagata, T. (2010. 11. 10) *The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010*, "A mechanism for an increase in DNA-binding affinity of the trihelix DNA-binding domain via its phosphorylation" 横浜
- (2) Furukawa, A. (2010. 11. 25) *Korea-Japan Bilateral NMR Symposium*, "The real-time monitoring of the enzymatic reaction of an anti-HIV factor APOBEC3G" 韓国、ソウル
- (3) Furukawa, A. (2010. 9. 30) *The 10th KIAS Conference on Protein Structure and Function*, "Real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G possessing anti-HIV activity, and the structure and interaction of the RNA aptamer against prion protein" 韓国、ソウル
- (4) Katahira, M. (2010. 8. 23) *XXIV International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, "Real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G possessing anti-HIV activity, and the structure and interaction of the RNA aptamer against prion protein" オーストラリア、ケアンズ
- (5) Furukawa, A. (2010. 8. 25) *XXIV International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, "The real-time monitoring of the enzymatic reaction of an anti-HIV factor APOBEC3G" オーストラリア、ケアンズ
- (6) Furukawa, A. (2010. 8. 27) *International Symposium of Korean Society of Biochemistry and Molecular Biology -Structural Biology and Drug Discovery-*, "Real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G possessing anti-HIV activity, and the structure of the RNA aptamer against prion protein" 韓国、チェジュ島
- (7) Katahira, M. (2009. 10. 25) *The 3rd Asia-Pacific NMR Symposium*, "Real-time

monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G possessing anti-HIV activity, and the structure of the RNA aptamer against prion" 韓国、済州島

(8) Furukawa, A. (2009. 10. 25) *The 3rd Asia-Pacific NMR Symposium*, "Structure and real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G which is involved in anti-HIV activity" 韓国、済州島

(9) Katahira, M. (2008. 8. 26) *XXIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, "Structures and interactions of 4'-thiodNA and RNA/DNA-binding proteins" 米国、サンディエゴ

(10) Nagata, T. (2008. 8. 28) *XXIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, "Structural Studies of the RRM:mRNA 5' cap complex" 米国、サンディエゴ

(11) Ohyama, T. (2008. 8. 26) *XXIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, "Structural analysis of Musashi-RNA complex with paramagnetic effects" 米国、サンディエゴ

(12) Katahira, M. (2008. 4. 25) *Korea-Japan Symposium on Biological NMR*, "Structure determination of a multi-domain protein by the use of PRE and RDC, and the unexpected A-form structure of 4'-thiodNA exhibiting nuclease-resistance" 韓国、ソウル

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 「Hsp70 を有効成分として含有する HIV-1 感染症治療剤」

発明者: 高久洋、杉山隆一、片平正人、永田 崇、古川亜矢子

権利者: 千葉工業大学

種類: 国際特許

番号: 特許 2009-072932、特願 2010-067254、特開 2010-248179

出願年月日: 2010 年 3 月 24 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 崇 (NAGATA TAKASHI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・助教

研究者番号: 10415250

(2) 研究分担者

片平 正人 (KATAHIRA MASATO)  
京都大学・エネルギー理工学研究所・教授  
研究者番号：70211844

(3) 連携研究者

該当なし