

機関番号：22604

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770120

研究課題名 (和文) 機能性 RNA、ステロイドホルモン RNA アクティベーターを抑制する因子構造解析

研究課題名 (英文) Structural studies of the regulatory factor of a functional RNA, steroid hormone RNA activator.

研究代表者

三島 正規 (MISHIMA MASAKI)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：70346310

研究成果の概要 (和文)：本研究では SHARP による転写抑制の分子レベルでの機構を考察するため、SPOC ドメインと SMRT 複合体の立体構造解析とその相互作用解析を行った。大量発現系により調製した SHARP の SPOC ドメインと化学合成による SMRT ペプチドを用いて複合体試料を調製し、多次元 NMR 法により、立体構造を決定した。その結果、SPOC ドメインは塩基性に富んだ分子表面でリン酸化された SMRT の C 末端を分子認識して結合していることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：For the purpose of understanding the mechanism of transcriptional repression, we have determined three dimensional structure of the complex of SHARP-SPOC domain/SMRT peptide using heteronuclear NMR. As a result, we have established that the molecular recognition of its complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：立体構造解析、生体高分子、タンパク質、発現制御、NMR 分子、蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

転写を抑制する補因子 SHARP(SMRT/HDAC associated repressor protein)は、C 末端にある SPOC ドメインにおいて SMRT(silencing mediator of retinoic and thyroid hormone receptors: HDAC と直接結合する補抑制因子)と直接結合して HDAC(histone deacetylase)をリクルートし、

転写を抑制する。また SHARP は RRM ドメインによって mRNA 様 nc(ノンコーディング)RNA である SRA (steroid hormone RNA activator) に直接結合して、SRA の転写活性化を抑制することが知られていた。

## 2. 研究の目的

SPOC ドメインと(図1)SMRT 複合体の構造決定を行い、転写抑制に重要な HDAC リクルート機構の構造的知見を得る。



図1 SHARP のドメイン構成

## 3. 研究の方法

### (1)SPOC と SMRT ペプチドの結合実験

SHARP の SPOC ドメインと SMRT の C 末端との複合体 (SPOC/SMRT) の立体構造決定を行うため、大腸菌を用いた発現系を作製し  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識した SPOC ドメインを大量発現させ、化学合成した SMRT ペプチド(アミノ酸残基 2492-2517)との結合実験を NMR 法により行った。また、両者間の解離定数を調べるため表面プラズモン法 (SPR) や等温滴定型熱量計 (ITC) 用いた結合実験を行った。

### (2)SPOC/SMRT 複合体の立体構造決定

SPOC/SMRT 複合体には、SMRT の S2514、S2516 にリン酸化修飾を施した SMRT 合成ペプチド (以降 pSMRT と記述) を用いた。各種多次元 NMR 測定 (HNCACB, CBCA(CO)NH, HN(CA)CO, HNCO, C(CO)NH, H(CCO)NH, 4D HC(CO)NH, HCCH-TOCSY,  $^{13}\text{C}$ -CT-HSQC (for 15%  $^{13}\text{C}$  labeled sample),  $^{13}\text{C}$  separated NOESY,  $^{15}\text{N}$  separated NOESY,  $\omega$ 2- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  filtered NOESY & TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC) を行い SPOC/SMRT 複合体の立体構造を決定した。

### (3)キメラタンパク質のデザイン・作製・調製

pSMRT の分子認識様式を決定する上で、同位体標識された pSMRT ペプチドを用いれば多次元 NMR 法でより精度の高い情報が得られる。しかし、対象とする SMRT 領域は 25 残基と短いため単独では発現が困難であった。そこで、SMRT に対して同位体標識とリン酸化修飾を効率よく行える方法として SMRT とキナーゼのキメラタンパク質をデザインし、発現・精製を行った。キメラタンパク質からの SMRT の精製は困難であると考えられたため、キメラタンパク質を用いて SPOC との結合実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1)SPOC と SMRT ペプチドの結合実験

当初、NMR 法を用いて ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) 標識した SPOC と化学合成した SMRT ペプチド(アミノ酸残基 2492-2517)の結合実験を行ったが、期待される強い結合を示すスペクトル変化は見られなかった。そこで相互作用を定量的に解析するため SPR(表面プラズモン共鳴)法により解離定数を求めたところ、結果は  $10^{-4}$  M であり決して強い結合をしているとはいえない値であった。再度アミノ酸配列を調べたところ SMRT の S2514 及び S2516 がそれぞれ Caseine kinase2(CK2)、Caseine kinase1(CK1)によってリン酸化修飾を受ける可能性が高いことがわかった。

そこで、これらの残基にリン酸化修飾を施した SMRT 合成ペプチドを用い SPOC との解離定数を SPR 法により求めた結果、S2516 のリン酸化により約 100 倍、S2514、S2516 のリン酸化で約 1000 倍、相互作用が強くなることが分かった。また、ITC 測定でもリン酸化なしのペプチドでは結合がほとんど観測されなかったのに対し、リン酸化ペプチドでは  $10^{-7}$  M であり SPR と同様の値を得た。NMR 法を用いた結合実験からも修飾のない SMRT ではピークシフトが fast exchange であるのに対し、pSMRT では slow exchange であることから pSMRT の結合力の強さが確認できた。

### (2)SPOC/pSMRT 複合体の構造決定・分子認識機構

大腸菌の大量発現系により調製した SHARP の SPOC ドメインと化学合成による SMRT ペプチドを用いて複合体試料を調製し、多次元 NMR 法により構造情報の解析を行い、立体構造を決定した (図2)。

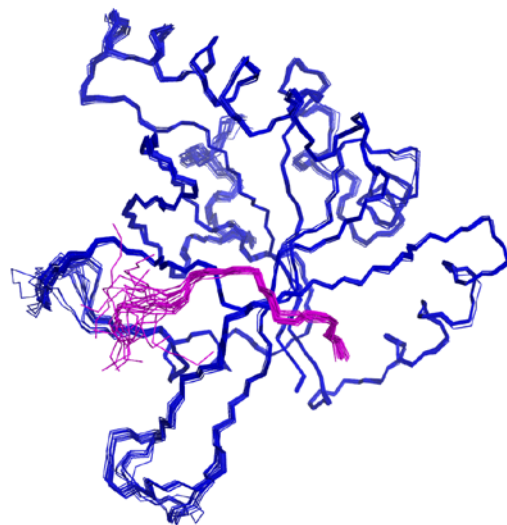


図2 NMR により決定した複合体構造

SPOC 単独、及び化学合成した pSMRT ペプチドと複合体を形成させた状態のそれぞれについてタンパク質主鎖の帰属に必要な各種多次元 NMR 測定を行い、そのスペクトルの比較から SPOC における複合体形成に重要なアミノ酸残基を決定した。特に R3552 とその周辺に化学シフト変化が観測された。R3552、R3554 は複合体形成により 1H 軸に関して大きく低磁場へのシフトが確認されており水素結合が予想されていたが、実際に決低した複合体の構造からその結合を確認した。

各種測定データをもとに決定した構造によると、SMRT の Y2510 の芳香環は SPOC の M3553, I3611 間と疎水的相互作用を形成していた。また、SMRT の L2513 は SPOC の Y3515, I3549, Y3602 の三残基によって形成される疎水性ポケットの中に入りこむかたちで位置している。SMRT の E2511 の側鎖と SPOC の R3552, R3554 間、また pS2514 のリン酸基と SPOC の R3552 の側鎖と水素結合を形成していた(図3)。

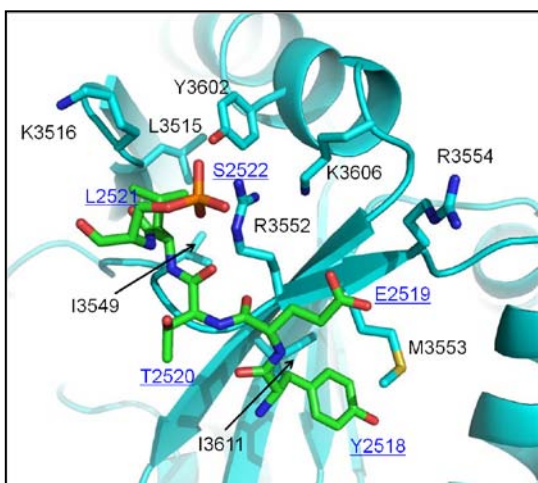


図3 SPOC ドメインによる SMRT ペプチドの分子認識

(3)キメラタンパク質のデザイン・作製・調製

化学合成した pSMRT のプロトンのみ情報だけでは構造解析に十分な情報が得られなかった。そこで、<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N 標識を施した pSMRT 合成ペプチド(2510-2517)を用いて測定を行ったところ有用な情報を得ることができ、構造解析の曖昧さを改善することができた。

pSMRT の分子認識様式を決定する上で、同位体標識された pSMRT ペプチドの必要性を感じたため、再度 pSMRT 発現系の作成に取り組んだが、SMRT 単独での発現を確認することはできなかった。原因としては対象とした領域が 25 残基と短く、発現しても分解されてしまう

可能性が考えられた。そこで、SMRT に対して同位体標識とリン酸化修飾を効率よく行う手法としてキメラタンパク質の発現・共発現に取り組んだ。

キメラタンパク質は N 末端側より His-tag、CK2、GS リンカー、HRV-3C 認識部位、SMRT(2493-2516)の順にタンデムに連結させたものをデザインし、その発現を確認することができた。

このキメラタンパク質を用いて SPOC との結合実験を行った。15N 標識した SPOC 試料に等量のキメラタンパク質を加え、その後 HRV-3C によりキメラタンパク質から SMRT を切断し、そのスペクトルの変化を追った。SPOC に等量のキメラタンパク質を加えたところシグナルが消失し、SPOC とキメラタンパク質の結合が確認された。そこに切断酵素を加え pSMRT を切断するとブロードニングしていたシグナルが復活し、さらにピークが複合体型スペクトルに変化していた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

(1)三神すずか、伊藤 隆、三島 正規  
転写抑制コファクター SHARP/SMRT 複合体の構造解析  
第 33 回日本分子生物学会年会  
2010 年 12 月 7~10 日 神戸

(2)三神すずか、伊藤 隆、三島 正規  
転写抑制コファクター SHARP/SMRT 複合体の試料調製及び構造解析  
第 49 回 NMR 討論会  
2010 年 11 月 15~17 日 船堀

(3)三神すずか、伊藤 隆、三島 正規  
多次元 NMR 法による転写抑制因子 SHARP/SMRT 複合体の立体構造解析  
第10回日本蛋白質科学会年会  
2010年6月16~18日 札幌

(4) 三神すずか、伊藤 隆、三島正規  
溶液 NMR 法による転写抑制因子 SHARP/SMRT 複合体の立体構造解析」  
第 32 回日本生物学会年会  
2009 年 12 月 9~12 日 横浜

(5)三神すずか、伊藤 隆、三島 正規  
溶液 NMR による転写抑制因子 SHARP/SMRT 複合体の立体構造及び機能解析  
第 48 回 NMR 討論会  
2009 年 11 月 10~12 日 福岡

(6)三神すずか、伊藤隆、三島 正規  
溶液 NMR による転写抑制因子 SHARP/SMRT 複  
合体の構造及び機能解析  
第 9 回日本蛋白質科学会年会  
2009 年 5 月 20～22 日 熊本

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.comp.tmu.ac.jp/osbc2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三島 正規 (MISHIMA MASAKI)  
首都大学東京・理工学研究科・准教授  
研究者番号： 70346310