

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370080

研究課題名(和文) 疾病に関連するスプライシング制御因子の分子論的基盤研究

研究課題名(英文) Structural study of the disease-related splicing regulatory factors

研究代表者

武藤 裕 (MUTO, Yutaka)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：30192769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円、(間接経費) 4,020,000円

研究成果の概要(和文)：スプライシング反応は重要な生体制御機構であるが、そのメカニズムの解明には、現在まで蓄積された遺伝子の一次配列情報だけでは不十分である。そこで本研究では、申請者の研究基盤を生かし、スプライシング部位決定のメカニズムを高次構造のレベルで明らかにすることを目的とした。とくに制御因子の示すRNA認識の厳密性と柔軟性について高次構造のレベルで明らかにすることができた。具体的には、Tra2-bの解析から、RNA分子の二次構造が制御因子の結合に影響を及ぼすことを明らかにした。さらにSUP-12、ASD-1の解析から複数の制御因子の協同性による認識配列の変換についても明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Splicing reactions plays an important role in the regulation of the biological system. For the elucidation of its regulatory mechanism, the DNA sequence information is not enough and the structural information for the related splicing regulatory factors is necessary. First, in the present study, structural basis for the intermolecular coordination between multi splicing factors is investigated. Here we determined solution structure of a ternary complex composed of the RNA recognition motif (RRM) domains from an RBFOX family protein ASD-1 and a SUP-12-RBM24-RBM38 family member SUP-12 for the alternative splicing of the sole FGFR gene egl-15. The two RRM domains cooperatively interact with the RNA by sandwiching a guanine base to form the stable complex. In addition, investigation of the Tra2-b splicing factor and the target RNA revealed that the ternary and secondary structure of the target RNA affect the binding specificity to the corresponding splicing regulatory factors.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：選択的スプライシング 構造生物学 NMR 制御因子

1. 研究開始当初の背景

真核細胞では、スプライシング反応によって pre-mRNA からイントロンが抜け落ち成熟した mRNA が生成する。この反応により、ひとつの遺伝子から状況に応じた多様な蛋白質が作り出される。この現象は選択的スプライシングとよばれ、重要な生体制御システムのひとつである。このシステムの破綻から前頭側頭型痴呆症や筋強直性ジストロフィーなどの重大な疾患が生じることも知られており、スプライシング部位選択メカニズムの解明は重要な課題である。しかし、遺伝子の一次配列情報だけではこの問題の解決には不十分であり、スプライシング反応を原子レベルで理解するための構造生物学的な研究の重要性が強く認識されるようになってきている。スプライソソームに関する構造生物学的な研究は、MRC-LMB の Nagai らが、U1 snRNP の構成成分である U1A と RNA の複合体の構造解析(1)に端を発している。その後、スプライシング反応の基本因子と制御因子との相互作用の解析は、複合体の複雑さからなかなか進行していなかった。申請者は、3'スプライシング部位の決定に重要な U2AF 蛋白質の RNA 結合ドメインの構造決定に成功し(2)、さらに、Nagai らのグループとともに、11 個の構成成分から成る U1 snRNP について、構造解析に十分な品質を持つ複合体の試験管内再構成に成功した(3)。Nagai らはこの再構成系を利用し、2009 年にはじめて U1 snRNP の全体構造の決定に成功した(4)。申請者らは、さらに複雑な U2 snRNP についても再構成系の確立のため、その構成成分である SF3a, SF3b 蛋白質複合体を形成する分子間相互作用のいくつかを、高次構造のレベルで明らかにした(5,6)。このようなスプライシング基本因子の構造解析の進展の他に、制御因子の RNA 認識機構の解明も進められて来た。申請者は、ショウジョウバエの性決定に関与するスプライシング制御因子(Sxl 蛋白質)と RNA 分子との複合体について、制御因子の RNA 認識様式を世界で初めて明らかにしている(7)。このように、申請者はスプライシング制御因子の構造生物学的な研究で申請者は、世界的にも大きな寄与を果たしてきている。

(1) Oubridge C, Ito N, Evans PR, Teo CH, Nagai K. *Nature*. **372**, 432-438 (1994)

(2) Ito T, Muto Y, Green MR, Yokoyama S. *EMBO Journal*. **18**, 4523-4534, (1999)

(3) Muto, Y., Pomeranz Krummel, D. K., Oubridge, C., Hernandez, H, Robinson, C. V., Neuhaus D., and Nagai K.: *J. Mol. Biol.* **341**,

185-198 (2004)

(4) Pomeranz Krummel DA., Oubridge C., Leung AK., Li J., and Nagai K.: *Nature* **458**, 475-479, (2009).

(5) Kuwasako, K., He, F., Inoue, M., Tanaka, A., Sugano, S., Güntert, P., Muto Y., and Yokoyama S. *Structure* (2006) **14**, 1677-1689.

(6) Kuwasako, K., Dohmae, N., Inoue, M., Shirouzu, M., Taguchi, S., Güntert, P., Séraphin, B., Muto Y. and Yokoyama S. *Proteins* (2008) **71**, 1617-1636.

(7) Handa, N., Nureki, O., Kurimoto, K., Kim, I., Sakamoto, H., Shimura, Y., Muto Y., & Yokoyama S. *Nature*, 398, 579-585 (1999)

2. 研究の目的

前述のように、スプライシング反応は重要な生体制御機構であるが、そのメカニズムの解明のためには、関連因子の構造情報が必要である。とくに選択的スプライシングシステムの破綻から前頭側頭型痴呆症や筋強直性ジストロフィーなどの重大な疾患が生じることがわかってきている。そのため、スプライシング部位選択メカニズムの解明は重要な課題であると考えられる。この問題の解答を得るためには、現在まで蓄積された遺伝子の一次配列情報だけでは不十分である。申請者は、スプライシング反応を構造生物学的な視点から解明することを大きな目標にしてきた。そこで本研究では、申請者の研究基盤を生かし、スプライシング部位決定のメカニズムを高次構造のレベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

スプライシングの初期反応では、U1 蛋白質 RNA 複合体(U1 snRNP)、U2AF 蛋白質複合体(U2AF65,35)および U2 snRNP の 3 種類の基本因子が、それぞれ 5'スプライシング部位、3'スプライシング部位および、ブランチ部位に結合しイントロンの位置を決定する。さらに、pre-mRNA 上の特定の塩基配列に結合した制御因子と、これら基本因子との相互作用によってスプライシング部位の選択に変化が起こり、ひとつの遺伝子から状況に応じた多様な蛋白質が作り出される。本研究は、スプライシング異常による疾病発症メカニズムの分子論的基盤を高次構造のレベルで明らかにすることを大きな目標とし、U1 snRNP, U2 snRNP U2AF などの基本因子の構築原理と制御因子による RNA 分子の認識機構について明らかにする。とくに制御因子の制御については、認識に関わる cis-element の存在だけが決定

因子にならない。そこで、構造の違いにより認識様式が変化する Tra2- $\beta$ について解析を行う。また、Tra2- $\beta$ は SF2 や Srp30c と共に働くので、これらのほか制御因子の共存下で、配列特異性がどのように変化するかを、この二つの配列に対する結合の強さで調べることが必要になる。本研究では、これらの制御因子の RNA 結合ドメインの役割についても解析を進める。また、複数の制御因子によってスプライシング部位の決定が行われる場合がある。この代表例として線虫の FGFR 遺伝子の選択的スプライシングを担う ASD-1 と SUP-12 の協同性について構造解析を進める。これらの制御因子は、RNA 認識を行う RRM ドメインをもつが、生体内での RRM ドメインの RNA 認識における役割の違いを考察するため、UGU 配列を認識する制御因子を用いて認識様式の比較を進める。

Tra2- $\beta$ や SF2 は、3'スプライシング部位を決定する基本因子 U2 snRNP, U2AF と相互作用する。U2 snRNP は、SF3a, SF3b と呼ばれる蛋白質複合体をもつが、この SF3a, SF3b 複合体は、U2 snRNP がスプライシング反応の活性中心を形成する上で重要な役割を担っている。そこで、この構成成分のいくつかについて分子間相互作用を高次構造のレベルで明らかにできているが、さらに大きな再構成系に取り組み制御因子と基本因子の相互作用の解明を進める。

#### 4. 研究成果

複数の制御因子の協同性による認識の変化：Fibroblast Growth Factor レセプター (FGFR) の選択的スプライシングに参与する、ASD-1 と SUP-12 のふたつの制御因子が、協同して特定の RNA 配列を認識するメカニズムを明らかにした。SUP-12 は、単独では、UG を基本とする配列に結合するが、配列特異性がそれほど高くない。FGFR の exon5 の上流にある SUP-12 の結合部位の 5'領域には ASD-1 の結合部位が存在する。構造解析の結果、ASD-1 が存在すると SUP-12 は、協同的に G を認識することが明らかになった (Fig. 1)。すなわち、SUP-12 が単独で RNA に結合する場合、ASD-1/SUP-12/RNA の複合体とは異なる配列特異性を示す。この ASD-1 と SUP-12 の協同性は、ASD-1 と SUP-12 の接触面に変異を導入すると ASD-1 の RNA 結合能には変化を及ぼさず、SUP-12 の RNA 結合を阻害することができることから確認された。

RNA 分子の二次構造が制御因子の結合

におよぼす影響：Tra2- $\beta$ の RNA 認識様式を高次構造のレベルで明らかにした。Tra2- $\beta$ は、一本鎖の AGAA 配列を認識するとともに、RNA がステム-ループ構造をもつと CAA 配列も同程度の強さで結合する。そこで、この異なった配列に対する認識様式を構造解析によって明らかにした。これによるとステム-ループ構造を RNA がとる場合、Tra2- $\beta$ のループ構造が RNA のステム部分と相互作用することで、その構造を安定化し G から C への変換があっても強固な RNA 認識を保っていることが明らかになった。このように、単に *cis*-element の存在だけでなく、*cis*-element の存在する RNA 構造も制御因子の RNA の結合に重要な役割を果たしていることが明らかになった (成果論文(8))。

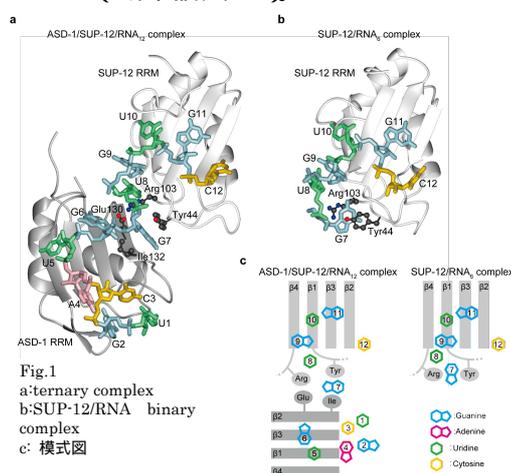


Fig.1  
a:ternary complex  
b: SUP-12/RNA binary complex  
c: 模式図

RNA 分子に結合した SF3b 蛋白質複合体を模倣した再構成系を作るためには、ブランチ部位に結合する p14 とともに U2 snRNA と相互作用を行う SF3b49 についても構造情報が必要になる。SF3b49 は、SF3b145 と相互作用するとともに、U2 snRNA とも相互作用していると考えられている。SF3b49 と U2 snRNA との相互作用領域を同定するため、SF3b49 の二つの RNA 結合ドメインを用い RNA との相互作用を調べるとともに、SF3b145 との相互作用を解析した。これによると SF3b49 RRM1 の部分に SF3b145 との相互作用領域が存在し、SF3b49 のヘリックス面と相互作用していることが NMR 法によって明らかになった。このような相互作用情報を組み合わせて SF3b の再構成を目指していきたいと考えている。

#### 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)

[雑誌論文](計 8 件)

(1) Shodai A, Morimura T, Ido A, Uchida T, Ayaki T, Takahashi R, Kitazawa S, Suzuki S,

Shirouzu M, Kigawa T, Muto Y, Yokoyama S, Takahashi R, Kitahara R, Ito H, Fujiwara N, Urushitani M. Aberrant assembly of RNA recognition motif 1 links to pathogenic conversion of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *J Biol Chem.* (2013) **288**, 14886-905. (以下すべて査読あり)

(2) He F, Tsuda K, Takahashi M, Kuwasako K, Terada T, Shirouzu M, Watanabe S, Kigawa T, Kobayashi N, Güntert P, Yokoyama S, Muto Y\*. Structural insight into the interaction of ADP-ribose with the PARP WWE domains. *FEBS Lett.* (2012) **586**, 3858-3864

(3) Nagata T, Tsuda K, Kobayashi N, Shirouzu M, Kigawa T, Güntert P, Yokoyama S, Muto Y. Solution structures of the double-stranded RNA-binding domains from RNA helicase A. *Proteins.* (2012) **80**, 1699-706.

(4) Nagata T, Tsuda K, Kobayashi N, Güntert P, Yokoyama S, Muto Y. (1)H, (13)C, and (15)N resonance assignments of the dsRBDs of mouse RNA helicase A. *Biomol NMR Assign.* (2012) DOI: 10.1007/s12104-012-9380-3

(5) He, F., Makoto Inoue, M., Kigawa, T., Takahashi, M., Kuwasako, K., Tsuda, K., Kobayashi, N., Terada, T., Shirouzu, M., Güntert, P., Yokoyama, S. and Muto, Y. Solution Structure of the Splicing Factor Motif (SFM) of the human Prp18 protein *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* (2012) **80**, 968-974.

(6) WIREs RNA (Wiley On line library) "Structural insight into RNA recognition motifs: Versatile molecular Lego building blocks for biological systems" Yutaka Muto and Shigeyuki Yokoyama (2012) **3**, 229-246.

(7) Yamashita, S., Nagata, T., Kawazoe, M., Takemoto, C., Kigawa, T., Güntert, P., Kobayashi, N., Terada, T., Shirouzu, M., Wakiyama, M., Muto, Y., and Yokoyama S. Structures of the first and second double-stranded RNA-binding domains of human TAR RNA-binding protein *Protein Science* (2011) **20**, 118-130.

(8) Tsuda, K., Someya T., Kuwasako K., Takahashi M., He F., Unzai S., Inoue M., Harada T., Watanabe S., Terada T., Kobayashi N., Shirouzu M., Kigawa T., Tanaka A., Sugano S., Güntert P., Yokoyama S. and Muto Y. Structural basis for the dual RNA-recognition modes of human Tra2- $\beta$  RRM *Nucleic Acids Res.* (2011) **39**, 1538-1553.

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 36 回分子生物学会年会(神戸国際会議場ポートピアホール 12 月) 行木-桑迫 香奈子 佐藤敦子 津田健吾 高橋真梨 井上真 寺田貴帆 木川 隆則 白水美香子 行木信一 若松馨 高橋征三 横山茂之 武藤 裕 RNA recognition mode of the RNA recognition motif (RRM) of the human spliceosomal protein

(2) 第 35 回日本分子生物学会年会(福岡国際会議場・マリメッセ福岡 12 月) Fuhu He, 津田健吾、高橋真梨、桑迫香奈子、寺田貴帆、白水美香子、渡部暁、木川隆則、小林直宏、PeterGüntert、横山茂之、武藤 裕 PARP11 WWE ドメインによる ADP-リボース認識機構の解明

(3) 第 34 回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜 12 月) 桑迫香奈子、佐藤敦子、井上真、寺田貴帆、白水美香子、木川隆則、高橋征三、横山茂之、武藤 裕 mRNA 前駆体スプライシングに関わるタンパク質の RRM ドメインによる RNA 認識

(4) 第 34 回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜 12 月) 津田健吾、何発虎、白水美香子、寺田貴帆、井上真、木川隆則、横山茂之、武藤 裕 脊髄性筋萎縮症に関わるスプライシング因子の機能解析

(5) 第 34 回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜 12 月) 高橋真梨、染谷龍彦、坂本泰一、平川真未、桑迫香奈子、津田健吾、何発虎、渡部暁、原田拓志、井上真、寺田貴帆、白水美香子、木川隆則、河合剛太、横山茂之、武藤 裕 二つの CCHC-タイプの Zinc Finger ドメインをもつタンパク質の RNA 認識機構

(6) Tsuda K, Someya T, Kuwasako K, Takahashi M, He F, Unzai S, Inoue M, Harada T, Watanabe S, Terada T, Kobayashi N, Shirouzu M, Kigawa T, Tanaka A, Sugano S, Güntert P, Yokoyama S and Muto Y Structural Basis for the Dual RNA-recognition Modes of human Tra2- $\beta$  RRM The 16<sup>th</sup> Annual Meeting of the RNA Society (Kyoto International Conference Center, Kyoto (6/17))

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.musashino-u.ac.jp/facilities/pharmacy/bukka.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 裕 (Muto Yutaka)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号: 30192769

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし