

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 29 日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550190

研究課題名(和文)機能性リボヌクレオタンパク(RNP)複合体の構築原理の解明

研究課題名(英文)Engineerability of a functional ribonucleoprotein complex

研究代表者

原田 和雄 (Harada, Kazuo)

東京学芸大学・教育学部・教授

研究者番号：00301169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リボヌクレオタンパク質(RNP)複合体の構築原理を理解するため、比較的単純な構造を持つフェージ N アンチターミネーション複合体を用いて、RNA およびタンパク質ドメイン間の相互作用ネットワークやその空間的配置を改変(エンジニアリング)を行なった。このような解析により、RNA 複合体の各ドメイン間の相互作用の協同性や、その空間的な配置の重要性を明らかにした。また、アンチターミネーション複合体における各サブユニットの空間配置に関する知見が得られた。このような知見は、生体メカニズムの理解につながるばかりではなく、新規機能性RNP複合体のデザインやそのバイオテクノロジーへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the molecular basis for ribonucleoprotein (RNP) structure and function, we attempted the engineering of the interactions and the spatial organization of the N antitermination complex. Relatively small changes in the spatial orientation of the RNA site have been shown to result in large changes in antitermination activity. We found that it is possible to partially recover activity lost upon altering the orientation of the core HIV RRE site within the antitermination complex by simultaneously modifying the orientation of RNA elements and N protein domains. We also showed that optimization of the interaction of N protein with NusA and RNA polymerase lead to a partial recovery of antitermination activity. The results show that the spatial orientation of the core interaction within the antitermination complex can be engineered in a rational manner, demonstrating the engineerability of ribonucleoprotein complexes.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：リボヌクレオタンパク質複合体 Nタンパク質 アンチターミネーション

1. 研究開始当初の背景

細胞内には、リボソームやスプライソソームのような分子機械、転写や翻訳制御に関わる分子会合体など、数多くのリボヌクレオタンパク質 (RNP) 複合体が重要な役割を担っている。研究代表者らは RNP 複合体の構築原理を理解するため、RNA 1 分子およびファージλ N タンパク質をはじめとする 6 種類のタンパク質からなる比較的単純な構造を持つアンチターミネーション複合体 (図 1) に注目した。

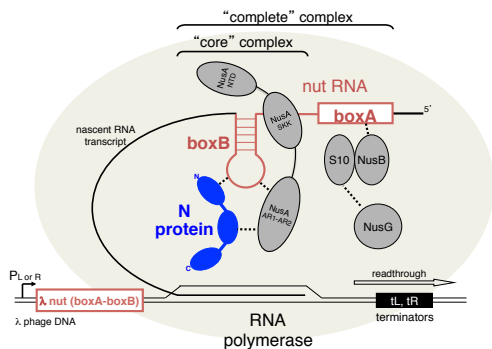


図 1

ファージλの最初期の遺伝子である N タンパク質は、λ nut 由来の boxA-boxB RNA、大腸菌宿主因子 (NusA、NusB、S10、NusG タンパク質)、および RNA ポリメラーゼとともにアンチターミネーション複合体を形成し、これにより RNA ポリメラーゼは下流ターミネーター (tL、tR) をリードスルーし、後期の遺伝子が発現される。N タンパク質はドメイン構造を持ち、λ nut 由来の boxB RNA、宿主因子の NusA、および RNA ポリメラーゼとともに、アンチターミネーションにおいて最低限必要な「コア core」複合体を形成する (図 1、"core" complex)。転写開始点から遠く離れたターミネーターのリードスルーは、さらにλ nut 由来の boxA RNA および宿主因子 NusB、S10、および NusG を含む「完全な complete」複合体 (図 1、"complete" complex) が必要である。

Franklin は N タンパク質によるアンチターミネーションを細胞内で検出するためのレポーター・アッセイを開発し (Franklin, *J. Mol. Biol.*, 1993)、研究代表者は改変/改良を行った (図 2)。N 発現プラスミドから発現された N タンパク質がもう一方のレポーター・プラスミドによりコードされた boxB RNA に結合することにより、アンチターミネーション複合体が形成され、RNA ポリメラーゼが下流のターミネーターをリードスルーし、レポ-

ーター遺伝子 (LacZ など) が発現される。

研究代表者らは、上記の検出系を用いて、アンチターミネーション複合体の改変を行って来た。まず、野生型複合体における boxB RNA と N タンパク質の RNA 結合ドメインを HIV RRE RNA と Rev ペプチドに置換することが可能であることを示した (Harada et al., *Nature*, 1996) (図 3A,B)。しかしながら、RRE-Rev 相互作用の親和性は boxB-N とほぼ

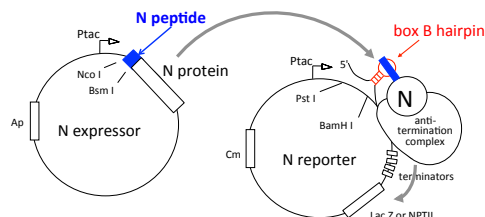


図 2

同等であるにも関わらず、アンチターミネーション活性は 2%程度まで低下した (図 3C)。その原因は、(1)野生型複合体における NusA タンパク質と boxB との相互作用 (図 3A) が失われたため、(2)RRE-Rev の複合体内の空間的配置が最適でないため、複合体全体の安定性が低下したと考えられる。

(1)の可能性に関連して、相互作用ネットワーク改変による複合体の安定性および活性の制御の可能性を示す結果として、RRE-Rev

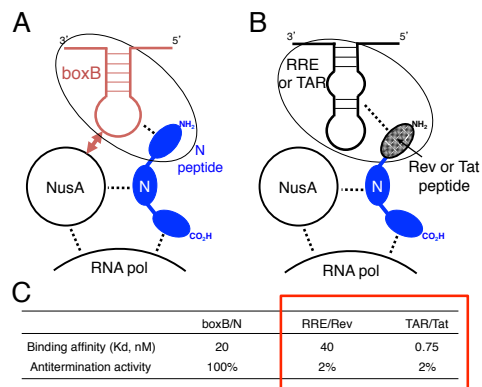


図 3

を中心とする複合体における Rev ペプチドを高親和性 RRE 結合アプタマーである K1 ペプチドに置換することにより、活性を 15%程度まで回復した (Peled-Zehavi et al., *RNA*, 2003) (図 3B,C)。しかしながら、RRE-K1 相互作用の最適化によるさらなる活性の回復は見られなかった (Sugaya et al., *J. Pept. Sci.*, 2008)。

(2)の可能性に関連して、研究代表者らは複合体の各モジュールの空間的配置の変更による複合体の安定性および活性の制御の可能性について解析した (Horiya et al., *Mol. Microbiol.*, 2009)。具体的には、boxB RNA のステムの長さ、boxA と boxB 間の距離、およびN ペプチドと N タンパク質の NusA 結合領域との間の距離を改変した。その結果、boxB RNA のステムの長さ、およびN ペプチドと N タンパク質の NusA 結合領域との間の距離は厳密に重要であることが明らかになった。しかしながら、興味深いことに、boxB と N ペプチドを、他の RNA-ペプチド相互作用に置換することにより、RNA のステムの長さ、およびペプチド・リンカーの長さに対する厳密性は著しく低下した。また、boxB-N、RRE-Rev 等の空間的配置を変化させることにより、活性の上昇が見られる場合があった。

これらの結果は、機能性 RNP としてのアンチターミネーション複合体のエンジニアリング (engineerability) の可能性を示すものである。

2. 研究の目的

本研究では、機能性リボスクレオタンパク質 (RNP) 複合体の構築原理の理解を目的とし、機能性 RNP の一つである λ N タンパク質を中心とするアンチターミネーション複合体をモデル・システムとして用いた解析を行う。これは、研究代表者らが開発した細胞内アンチターミネーション活性検出系を用いて、RNA およびタンパク質ドメイン間の相互作用ネットワークやその空間的配置を改変 (エンジニアリング) することにより行なう。このような解析により、RNA 複合体の各ドメイン間の相互作用の協同性や、その空間的配置の重要性に関する知見が得られる。このような知見は、生体メカニズムの理解につながるばかりではなく、新規機能性 RNP 複合体のデザインやそのバイオテクノロジーへの応用が期待される。

3、4. 研究の方法・成果

(1)「コア」アンチターミネーション複体の相互作用ネットワークのエンジニアリング

アンチターミネーション複合体における boxB RNA と N ペプチドとの相互作用を RRE RNA と Rev あるいは K1 ペプチドとの相互作用に置換することにより、アンチターミネー

ション活性は低下する。そこで、N タンパク質と NusA、および N タンパク質と RNA ポリメラーゼとの相互作用を最適化することにより、活性の回復/制御が可能であるか検討した。

(1-①) N と NusA との相互作用 (図 3B) の最適化

N タンパク質の NusA 結合ドメイン (34-47 番目のアミノ酸) において、NusA との結合に重要なアミノ酸が特定されている (Bonin et al., *PNAS*, 2004)。そこで、本研究では、これらのアミノ酸をランダム化したライブラリーを作製し、RRE-Rev 相互作用依存性のアンチターミネーションにおいてより高い活性を示すクローンの同定を試みた。その結果、コロニーカラーアッセイにおいて、活性が「1+」高いクローンが複数同定できた (Suzuki and Harada, unpublished)。そこで、今後は、これらのクローンが持つアミノ酸置換について、RRE-Rev 以外の相互作用 (RRE-K1、boxB-N など) に依存するアンチターミネーションにおける活性を解析し、コア複体の相互作用ネットワークの協同性や可塑性に関する知見を得る。

(1-②) N と RNA ポリメラーゼ (RNAP) との相互作用 (図 3B) の最適化

N タンパク質の C 末端領域 (73-107 番目のアミノ酸) が RNA ポリメラーゼとの結合に重要であることが報告されている (Mogridge et al., *Mol. Cell*, 1998)。本研究では、まず、RNA ポリメラーゼ (RNAP) との結合に重要なアミノ酸の同定を試みた。まず、N タンパク質の C 末端側からの短縮、および、73 番目以降のアミノ酸を数残基ずつカセット式にスクランブルしたコンストラクトを作製し、そのアンチターミネーション活性を評価することにより、結合に最も重要な領域を絞り込んだ。その結果、RNA ポリメラーゼとの結合に重要なアミノ酸は、89 から 96 番目の残基であること、これらの中でも特に 90 番目と 92 番目の残基が重要であることが分かった。現在は、これらのアミノ酸残基をランダム化したライブラリーを作成し、RRE-Rev 相互作用依存性のアンチターミネーションにおいてより高い活性を示すクローンを同定する。同定したクローンは、(1-①) と同様に RRE-Rev 以外の相互作用について解析する。

(1-③) コア複合体における相互作用ネットワークの解析

(1-①) および (1-②) において同定し

た塩基置換によるアンチターミネーション活性の向上は、それぞれ N-NusA および N-RNAP の相互作用の親和性を強めている可能性の他、その配向 (orientation) が最適化されている可能性、タンパク質機能の活性化によるメカニズムが考えられる。そこで、これらの N タンパク質に対する塩基置換の組み合わせによるアンチターミネーション活性向上の加算性の有無について解析することにより、コア複合体の相互作用ネットワークの協同性や可塑性に関する知見が得られるものと期待される。

(2) 「コア」アンチターミネーション複合体における RNA-ペプチド複合体の空間配置のエンジニアリング

これまでに、boxB RNA のステム領域 (図 3A) を単独で伸長させることにより、アンチターミネーション活性は著しく低下することを見いだした (Horiya et al., *Mol. Microbiol.*, 2009)。これは、boxB が N タンパク質および NusA タンパク質との ternary 複合体 (図 3A) を形成して、boxB のステム領域だけを伸長させた場合、この ternary 複合体が不安定になるためだと考えられる。そこで、これまでに、boxB のステム領域の伸長と同時に、N ペプチドと N タンパク質の NusA 結合領域との間のリンカー (図 3A、peptide linker) の伸長や短縮を行なった。しかし、boxB のステム領域の伸長を回復することは出来なかった。

本研究では、boxB と NusA タンパク質の相互作用が関与しない RRE-Rev、RRE-K1、および BIV TAR-Tat を中心とする複合体の場合について (図 3B)、同様の空間配置の最適化を試みた。すなわち、RRE のステム領域の伸長/短縮に対する、ペプチド・リンカーの伸長/短縮の影響について解析したところ、ペプチド・リンカー長により、ステム長の伸長による活性低下を部分的に相補できることを明らかにした。

一方、RRE-Rev、および BIV TAR-Tat を中心とする複合体の場合について、RRE、および BIV TAR のペプチド結合領域の位置を動かすことなく、その配向を180度反転させた RRE*、および TAR* とした場合も活性が著しく低下した。このことから、アンチターミネーション複合体における RNA-ペプチドの配向 (ペプチドの C 末端の位置) が重要であると考えられた。そこで、RRE*-Rev におけるペプチドの配向を RRE-Rev における配向に近づけるようス

テムを伸長・短縮したところ、活性の回復が見られた。

これらのことにより、「コア」複合体の空間配置のエンジニアリングにより、アンチターミネーション活性の調節が可能であることが示された。

(3) アンチターミネーション複合体形成における boxA 配列の役割の解析

これまでに boxA において重要な塩基を網羅的に解析し、boxB-N の場合と比較して、RRE-Rev や RRE-K1 の場合、boxA に対する依存性が大きいことを見いだした (Ohtsuki and Harada, unpublished results)。これは、コア複合体の安定性の低下をアンチターミネーション複合体における相互作用ネットワークの適応性/可塑性により相補されたものと考えられる。そこで、本研究では、「完全な」アンチターミネーション複合体における相互作用ネットワークの適応性/可塑性について検証するため、nut 領域からターミネーターまでの距離を短縮/伸長させた時の boxA 変異体への影響について、boxB-N およびその他の相互作用の場合について比較した。一方、*in vitro* では boxA 非依存的なアンチターミネーションが見られることから、boxA 非依存的な細胞内アンチターミネーションでの複合体の構築を目的とした。さらに、アンチターミネーション複合体のいくつかの構成成分からなる部分構造が明らかになっていることから、複合体における boxA の配向を明らかにすることの4点を目的とした。その結果、RRE/RRE 結合ペプチドにおいて、ターミネーターまでの距離を短縮したことにより boxA への依存性が低下することが明らかにされた。しかし、これは距離に依存したものではなく、nut 領域からターミネーター間に存在する phoA 遺伝子の SD 配列などの影響であることが示された。また、boxA への依存性が低いと示唆されていた boxB/N および hp II/U1A においては、nut 領域からターミネーターまでの距離を短縮したことによる活性の変化はなかったことから、アンチターミネーション複合体におけるコア RNA-ペプチド相互作用の違いは boxA に対する依存性を変化させるということが改めて示唆された。また、アンチターミネーション複合体モデルに従い、boxA の配置を改変したところ、ある程度の活性が維持されたことから、アンチターミネーション複合体モデルが実際の細胞内でのアンチターミネーシ

ヨン複合体の構造に近いものであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① Kazuo Harada (2012) Engineerability of a functional ribonucleoprotein complex, The 2nd Asia Chemical Biology Conference, Okinawa, Japan, July 7th, 2012.
- ② Naoki Yagisawa, Yu Tsuchiya, Misa Mizuguchi, Shengnan Zheng and Kazuo Harada (2012) Engineering the spatial orientation of a core RNA-peptide interaction within a functional ribonucleoprotein complex, 243rd American Chemical Society Meeting, San Diego, USA, March 28th, 2012.
- ③ Naoki Yagisawa, Misa Mizuguchi, Yoshimasa Takeda and Kazuo Harada (2011) Engineering the spatial orientation of a core RNA-peptide interaction within a functional ribonucleoprotein complex, RNA Meeting 2011, Kyoto, Japan, June 16th, 2011.

〔図書〕（計 1 件）

- ①医学のあゆみ「RNA医学・医療 ～あらたな診断・治療を拓く」
原田和雄
医歯薬出版株式会社 , pp. 586-591 (2011)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 和雄 (HARADA, Kazuo)
東京学芸大学・教育学部・教授
研究者番号：00301169