

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04339

研究課題名(和文) 長鎖ノンコーディングRNA、SRAによる転写制御の構造的基礎

研究課題名(英文) Structural basis of transcriptional repression by SRA, a long non-coding RNA

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：長鎖ノンコーディング(lnc)RNAのひとつであるSRA(steroid hormone receptor RNA activator)は、転写されたRNA分子自身が多く因子と相互作用し、転写を調節する足場分子として機能する。SHARPタンパク質はSRAと直接相互作用し、HDACをリクルートすることで核内受容体による転写を抑制的に制御する。本研究では、SHARPによる転写調節の分子機構の解明を目指し、SHARP・SRA複合体の構造解析、またCLIP等の生化学的手法により解析を行った。SHARPのホモログRBM15や、カウンターパートとしてlncXISTの解析も行った。

研究成果の概要(英文)：SHARP (SMRT/HDAC1-associated repressor protein), a transcriptional co-repressor, which possesses N-terminal RNA recognition motifs (RRMs) and the highly conserved C-terminal domain SPOC domain. The RRM domains of SHARP is known to bind a lnc (long noncoding) RNA, SRA. Meanwhile, SPOC domain binds to SMRT, a component of HDAC (histone deacetylase complex). Previously, we reported that the tertiary structure of the SPOC/phosphorylated SMRT complex and also found that the interaction is phosphorylation dependent. Recently, it has been reported that SHARP binds to the lncRNA XIST RNA which is an essential factor for dosage compensation. In this project, we determined the structure of the RRM1, and performed NMR analyses and RNA binding experiments for RRM2-3-4 and RRM2-3 of SHARP. We also investigated the consensus sequence of SHARP binding using CLIP. We are trying to determine the SHARP/Xist complex, and also started structural study of RBM15, a homolog of SHARP.

研究分野：構造生物化学

キーワード：lncRNA SHARP SRA XIST NMR RBM15

1. 研究開始当初の背景

SRA (steroid hormone receptor RNA activator) は、m-RNA 様の構造をもつ長鎖ノンコーディング(lnc)RNA である。非常に多くの生理的現象に関与していると考えられているが、なかでも分子レベルで研究が進んでいるものは、NR(Nuclear receptor)に関連した転写調節である。通常 SRA はコファクター-SRC-1/2 や TR $\alpha$ 1 等と相互作用することで、NR の転写のアクチベーターとして働く。しかし継続的なステロイドホルモン刺激によって発現する SHARP(SMRT/HDAC associated repressor protein)が SRA に直接結合し、SMRT(silencing mediator of retinoic and thyroid hormone receptors)を介して HDAC(histone deacetylase)をリクルートすることで、SRA による転写活性化がフィードバック的に抑制される(図1)。

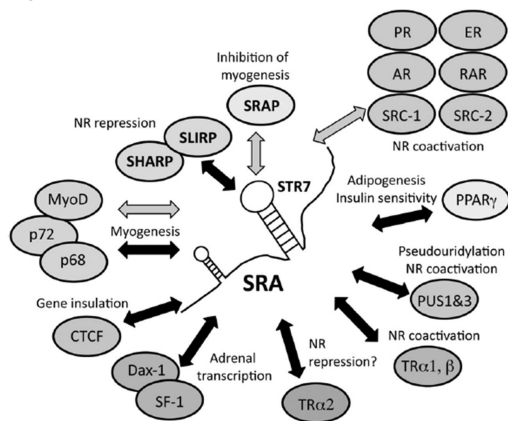


図1 SRA と相互作用する因子群

Colley, S., and Leedman PJ *Biochimie* (2011) 93,1966 Fig. 1 より転載。

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(図2)。この RRM の領域が SRA と直接結合する。また、SRA は約 800 bp からなる lncRNA であるが、SHARP との相互作用には STR7 とよばれる約 40 bp のステムループ部分で十分であることがわかっている。しかしながら、RRM と SRA の相互作用の詳細は、世界的にも報告がなく、未解決のままである。

一方、C 末端の SPOC ドメインは、HDAC 複合体に含まれる SMRT と直接相互作用し、HDAC をリクルートする。申請者らは 2014 年、SPOC ドメインとリン酸化 SMRT の複合体構造を報告し、Casein kinase 2 によるリン酸化が SHARP と SRA による転写制御のスイッチとして機能し得ることを、構造解析とレポーターアッセイに基づいて提唱していた。



図2 SHARP のドメイン構造とその相互作用

2. 研究の目的

長鎖ノンコーディング (lnc) RNA のひとつである SRA (steroid hormone receptor RNA activator) は、転写された RNA 分子自身が多く因子と相互作用し、転写を調節する足場分子として機能する(図1)。SHARP タンパク質は SRA と直接相互作用し、HDAC をリクルートすることで核内受容体による転写を抑制的に制御する。本研究では、SHARP-SRA 複合体の構造解析により、SRA による転写調節の分子機構の解明を目指す。また生化学的手法、リポプロテオミクスにより、SHARP-SRA 複合体形成の細胞内での知見や、その他の因子の関与を調べることで、構造的知見と合わせて SHARP-SRA の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

他のグループも含む、現在までの研究から、SHARP の RRM の標的は SRA の STR7 と考えるのが妥当で、我々もこの複合体の構造解析を行った。しかし、細胞内でのこの複合体形成をとらえた報告は未だない。そこで、標的 RNA を同定する手法である CLIP 法を行った。SHARP-SRA 複合体の立体構造を常磁性を用いた最先端の NMR 手法や SAXS (X 線小角散乱) 用いて行った。In vitro での相互作用解析は、変異体を用いて NMR 等により解析した。生化学的手法により SHARP の標的 RNA の同定を並行して行った。

4. 研究成果

SHARP 全長を哺乳類培養細胞に強制発現させて、ハロタグを用いた沈降実験から複合体を回収し、次世代シーケンサーを用いたターゲットの解析から標的 RNA のシーケンスを解析し、コンセンサス配列の候補を得た。SHARP の 4 つの各 RRM やタンデム領域の発現系を作製し、その調製を行い、RNA との相互作用解析に向けて NMR 法により、182 アミノ酸残基からなる RRM2-3 の主鎖シグナルの帰属を行った(図3)。次に NMR を用いて Xist RNA の最小単位である A-repeat 構造との結合実験を行った。その結果、信号の変化が観測された(図4)。この実験より、SHARP RRM2-4 ドメインと Xist RNA の相互作用を確認した。また、現在までに相互作用解析、立体構造解析の報告のない RRM1 についても、試料調製と NMR による立体構造解析を行った(図5)。

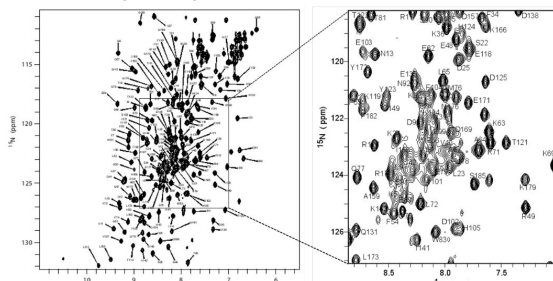
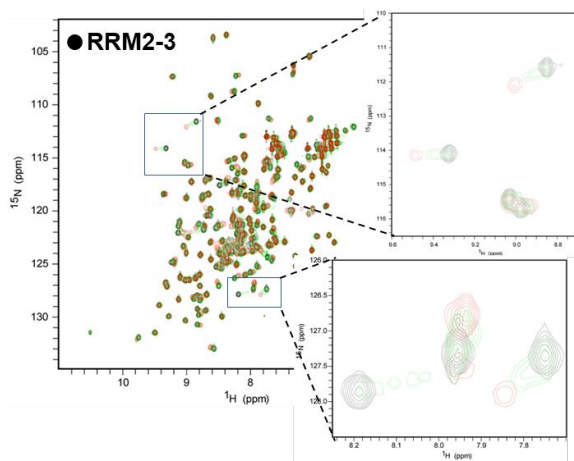


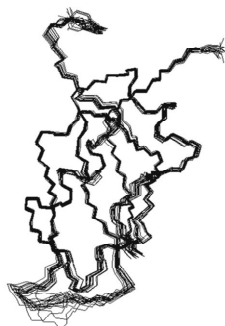
図3 RRM2-3 の NMR スペクトル

SHARP RRM2-RRM3(182 アミノ酸残基)の帰属



**図4 RRM2-3 と A-repeat との相互作用**  
SHARP RRM2-3+RNA の  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル  
(重ね合わせ)  
黒 : RNA free, 緑 : RNA+ 赤 : RNA++

また、SHARP のホモログである RBM15 に関しても同様に、3 つの RRM ドメインやタンデム領域の発現系を作成し、その調製を行った。RBM15 の RRM ドメインは構造未知であり、今後の RNA との複合体の構造解析に向けて RRM1 と RRM2 ドメインの溶液構造を決定した。



**図5 RRM1 の立体構造**  
NMR 構造の 20 個の重ね合わせ)

一方で、溶液 NMR 法を用いた PRE (paramagnetic relaxation enhancement) や PCS (pseudo-contact-shift)、RDC (residual dipolar coupling) の観測による長距離の構造情報の取得からマルチドメインタンパク質の全長構造とドメイン間配向を決定する。Nrd1 の各 RRM ドメインとそれらのタンデム領域の試料を調製し、構造解析や RNA との結合実験を行っている。RRM2 ドメインに関しては多次元 NMR 測定を用いて構造を決定している<sup>6)</sup>。申請者は RRM1-RRM2 と RRM3-RRM4 タンデム領域の構造解析にも取り組んでおり、Nrd1 タンパク質の配向試料を調製し、長距離情報のひとつである RDC の測定を行った。最終的には sortase 等を用いた全長の再構成及び PRE、PCS、RDC などを用いた NMR 解析、SAXS を組み合わせて Nrd1 全長の構造解析を行い、マルチドメインタンパク質の構造解析手法として確立する目的で研究を行った。

全長のスペクトルでの化学シフトは RRM1-2、RRM3-4 それぞれのものとはほぼ一致したことから、RRM1-2、RRM3-4 は互いに独立した構造単位であることが示された。次に Nrd1 全長の全体構造の知見を得るために SAXS (X 線小角散乱) 測定を行った。SAXS 測定の結果、Nrd1 全長は RRM1-2-3-4 が一直線上に伸びたような構造をとっていることが明らかになった。RRM1-2 側鎖の帰属を行い、NOE によるプロトン間距離情報 (< 5 Å) および二面角の情報を用いて構造計算を行ったが、その RRM1-2 の構造はドメイン間の長距離情報の不足により収束していないと考えられた。そのため、NMR 法による長距離情報の取得が可能である RDC (残余双極子相互作用) や常磁性緩和効果を用いた PCS (擬コンタクトシフト)、PRE (常磁性緩和促進) といった測定を試みた。RRM1-2 及び RRM3-4 に関して RDC の測定に成功した。今後その情報を組み込んで再度構造計算を行う。また RRM3-4 に関しては側鎖シグナルの解析中である。

#### 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 4 件)

(1) Matsuda N, Kimura M, Queliconi BB, Kojima W, Mishima M, Takagi K, Koyano F, Yamano K, Mizushima T, Ito Y, Tanaka K, “Parkinson’s disease-related DJ-1 functions in thiol quality control against aldehyde attack *in Vitro*”  
*Scientific Reports* (2017) 7:12816.

(2) Kobayashi A, Kanaba T, Satoh R, Ito Y, Sugiura R, Mishima M “Chemical shift assignments of the first and second RRM of Nrd1, a fission yeast MAPK-target RNA binding protein”  
*Biomol NMR Assign.* (2017) 11:123-126

(3) Hikone Y, Hirai G, Mishima M, Inomata K, Ikeya T, Arai S, Shirakawa M, Sodeoka M, Ito Y “A new carbamidemethyl-linked lanthanoid chelating tag for PCS NMR spectroscopy of proteins in living HeLa cells”  
*J. Biomol. NMR* (2016) 66:99-110

(4) 三島 正規, 小林 彩保, 金場 哲平 “転写抑制補因子の複合体形成における CK2 によるリン酸化の分子スイッチとしての役割”  
*生化学* (2015) Vol. 87, 258-261

〔学会発表〕(計 12件)

(1) 三島 正規

「NMR meets Neutron on the cutting edge」  
2017年度 第2回 水和ナノ構造研究会  
2017年

(2) 永井敢、小林彩保、伊藤隆、三島正規  
「溶液 NMR を用いた lncRNA 結合タンパク質 SHARP の構造解析」  
第 56 回 NMR 討論会 2017 年

(3) 永井敢、小林彩保、伊藤隆、三島正規  
「溶液 NMR 法を用いた RNA 結合性タンパク質 SHARP の構造解析」  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年

(4) Masaki Mishima

“Structural analysis of flexible multi-domain proteins.”  
2017 Taiwan-Japan biomedical symposium on magnetic resonance 2017 年

(5) 永井 敢、小林 彩保、伊藤 隆、三島 正規

「Structural analysis of a multi-domain protein using long-range distance information derived by solution NMR」  
第 54 回日本生物物理学会  
2017 年

(6) 小林彩保、永井敢、佐藤亮介、伊藤隆、杉浦麗子、三島正規 NMR と SAXS による RNA 結合性マルチドメインタンパク質 Nrd1 の構造解析  
第 55 回 NMR 討論会  
2016 年

(7) Ayaho Kobayashi, Kan Nagai, Akihiro Kido, Yutaka Ito, Masaki Mishima  
“Structural Analysis of Flexible Multi-Domain Proteins” The XXVIIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems  
2016 年

(8) Ayaho Kobayashi, Kan Nagai, Ryosuke Satoh, Toshinobu Fujiwara, Yutaka Ito, Reiko Sugiura, Masaki Mishima  
“Structural study of the an RNA-binding protein Nrd1 by combination approach using NMR and SAXS”  
2016 年

(9) 永井 敢、小林 彩保、伊藤 隆、三島 正規  
「lncRNA 結合タンパク質 SHARP の構造解析 日本蛋白質科学会」  
2016 年

(10) 永井 敢、小林 彩保、伊藤 隆、三島 正

規

「lncRNA 結合タンパク質 SHARP の構造解析」  
第 54 回 NMR 討論会  
2015 年

(11) 小林 彩保、佐藤 亮介、藤原 俊伸、伊藤隆、杉浦 麗子、三島 正規  
「RNA 結合性マルチドメインタンパク質 Nrd1 の溶液状態における構造解析」  
第 15 回日本蛋白質科学会年会  
2015 年

(12) 前崎 綾子、佐藤 亮介、田岡 万悟、金場哲平、朝野 維起、藤田 千春、藤原 俊伸、伊藤 隆、磯辺 俊明、箱嶋 敏雄、前仲 勝実、三島 正規  
「カイコ幼虫を用いた活性型 PKB の発現と精製」第 15 回日本蛋白質科学会年会  
2015 年

〔図書〕(計 2 件)

(1) 編著：橋本 健朗 分担：藤野 竜也、三島 正規  
「現代を生きるための化学」2018 年  
放送大学教育振興会 (11, 12, 13, 14, 15 章を担当)

(2) 編著：橋本 健朗、分担：西長 亨、佐藤 総一、廣田 耕志、三島 正規  
「化学結合論：分子の構造と機能」2017 年  
放送大学教育振興会 (13, 14, 15 章を担当)

## 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

(2) 研究分担者

田岡 万悟 (TAOKA, Masato)  
首都大学東京・理工学研究科・准教授  
研究者番号：60271160

(3) 研究分担者

藤原 俊伸 (Fujiwara, Toshinobu)  
近畿大学・薬学部・教授  
研究者番号：80362804

(4) 研究分担者

河原 行郎 (KAWAHARA, Yukio)  
大阪大学、医学系研究科、教授  
研究者番号：80542563