

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06086

研究課題名（和文）スプライシングタンパク質U2AF1によるイントロン認識機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the intron recognition mechanism by U2AF1

研究代表者

尾林 栄治（Obayashi, Eiji）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：50321740

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、U2AF1タンパク質とイントロンRNA複合体の結晶構造解析を行い、U2AF1による3'スプライス部位認識機構を明らかにした。また、変異体S34Yの構造解析にも成功し、アミノ酸変異体による異常な3'スプライス部位認識機構を解明した。本研究成果は、生命活動の基盤となる反応機構を理解する上で非常に重要なものであり、またがんや血液学的悪性疾患患者に多く見られるU2AF1のアミノ酸変異がどのようにスプライシング異常を引き起こすのか、その分子機構が明らかになり、病気の早期診断や新たな治療法開発に向けた研究への応用が期待されるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、近年報告が多い、がんや血液学的悪性疾患の患者に見られるU2AF1タンパク質のアミノ酸変異について、そのRNAスプライシング異常を引き起こす仕組みを明らかにした。この結果は、スプライシング異常により引き起こされる様々な病気の診断・治療法開発に向けた画期的な成果であり、この成果は、『Nature Communications』に掲載された。がんや血液学的悪性疾患は年齢とともに発症率が増加するため、今後の高齢化社会の進展により患者数のさらなる増加が容易に予想される。特に高齢者率が日本一の島根県において対策は急務であり、その意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：The accurate exclusion of introns by RNA splicing is critical for the production of mature mRNA. U2AF1 binds specifically to the 3' splice site, which includes an essential AG dinucleotide. Even a single amino acid mutation of U2AF1 can cause serious disease such as certain cancers or myelodysplastic syndromes. Here, we describe the first crystal structures of wild-type and pathogenic mutant U2AF1 complexed with target RNA, revealing the mechanism of 3' splice site selection, and how aberrant splicing results from clinically important mutations. Unexpected features of this mechanism may assist the future development of new treatments against diseases caused by splicing errors.

研究分野：構造生物化学

キーワード：RNAスプライシング 立体構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

スプライシングは、少ない遺伝子から多様なタンパク質を産み出す高等生物に重要な生命反応である。高等生物のDNAは、タンパク質として翻訳される部分（エキソン）だけでなく翻訳されない部分（イントロン）を含んでいる。イントロンはRNA転写後に取り除かれる。このイントロンの取り除きおよびエキソンのつなぎ合わせがスプライシングと呼ばれる反応である（図1 A）。高等生物では、スプライシングは各々の組織や刺激により制御され、エキソンの組み合わせを変えることができ、これが少ない遺伝子から多様なタンパク質を産み出す原動力となっている。これは選択的スプライシングと呼ばれ、ヒトの90%以上の遺伝子が何らかの選択的スプライシングを受けることが明らかになっている。反面、その制御機構は複雑で、スプライシングの破綻は、細胞死やがんなどの病気に繋がる。そのため、スプライシング機構の解明は、ヒトを含む高等生物の基本的な生命現象を理解する上で非常に重要であるだけでなく、スプライシング異常による疾患であるがんや骨髄異形成症候群、筋ジストロフィーに対する治療薬開発の足がかりになると期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究でターゲットとしているU2AF1は、スプライシング反応において、イントロンの両端のエキソンとの境界のうち3'側の境界（3'スプライス部位、図1 A）を認識するタンパク質であり、高等生物が生きる上で必須のタンパク質である。選択的スプライシングもU2AF1の働きを阻害することで起こる例が多く、また近年、U2AF1におけるアミノ酸変異ががんや骨髄異形成症候群などの病気を引き起こす原因になっているという報告がなされるなど、注目度は高い。そこで本研究では、1、U2AF1を中心とした3'スプライス部位認識機構の解明、2、U2AF1アミノ酸変異体のスプライシングへの影響と病気発症のメカニズム解明、を目的に研究を進めてきた。

## 3. 研究の方法

### a) U2AF1を中心とした3'スプライス部位認識機構の解明

U2AF1によるイントロンRNA認識機構を正確に理解するためには、実際にU2AF1がイントロンRNAを認識・結合している複合体の立体構造解析が必須である。本研究者は、いくつかの長さおよび配列の、3'スプライス部位を含むRNAを使い、そのU2AF1との複合体の結晶化を試みた。その結果、良質な結晶を得ることに成功し、結晶構造解析によるU2AF1-RNA複合体の立体構造を解明した。

### b) U2AF1アミノ酸変異体のスプライシングへの影響と病気発症のメカニズム解明

がんや骨髄異形成症候群患者に最も多く見られるU2AF1変異は、S34F/Yであり、この変異がスプライシング異常を引き起こすことが報告されている。そこで本研究では、この変異体を調製し、3'スプライス部位との相互作用解析を行った。また、この変異体U2AF1と3'スプライス部位との複合体のX線結晶構造解析を行い、その認識様式の違いを明らかにした。

## 4. 研究成果

本研究者は、U2AF1による3'スプライス部位認識機構を明らかにすることを目的に、U2AF1タ

ンパク質と RNA 複合体の結晶構造解析を行い、その立体構造を原子レベルで明らかにした (図 1 B)。その結果、U2AF1 の持つ二つの亜鉛結合モチーフが、3' スプライス部位の持つ塩基配列 (AG) を配列特異的に認識する、その分子機構を解明した (図 2)。AG の A 塩基は、Phe20 とのスタッキング相互作用により強く結合し、亜鉛に配位している Cys27 との水素結合により塩基特異的に認識されていた。AG の G 塩基は、Phe165 とのスタッキング相互作用により強く結合し、こちらも亜鉛に配位している Cys149 や Cys163 との水素結合により塩基特異的に認識されていることがわかった。

また本研究者は、患者の持つアミノ酸変異 S34Y がどのように U2AF1 による塩基認識を狂わせるのかを知るために、変異体 S34Y の構造解析にも成功し、アミノ酸変異体による異常な 3' スプライス部位認識機構を解明した (図 3)。S34Y 変異体は、これまでほとんど注目されていなかった 3' スプライス部位の一つ前の塩基と Tyr34 (Y34) との間でスタッキング相互作用により強く結合するため、変異のない野生型 U2AF1 が認識しなかった AG の前の塩基も誤って強く認識してしまうことが明らかになった。そのため、本来 3' スプライス部位として認識されないはずの部位を S34Y 変異体が認識してしまい、スプライシング異常を引き起こしていることが判明した。

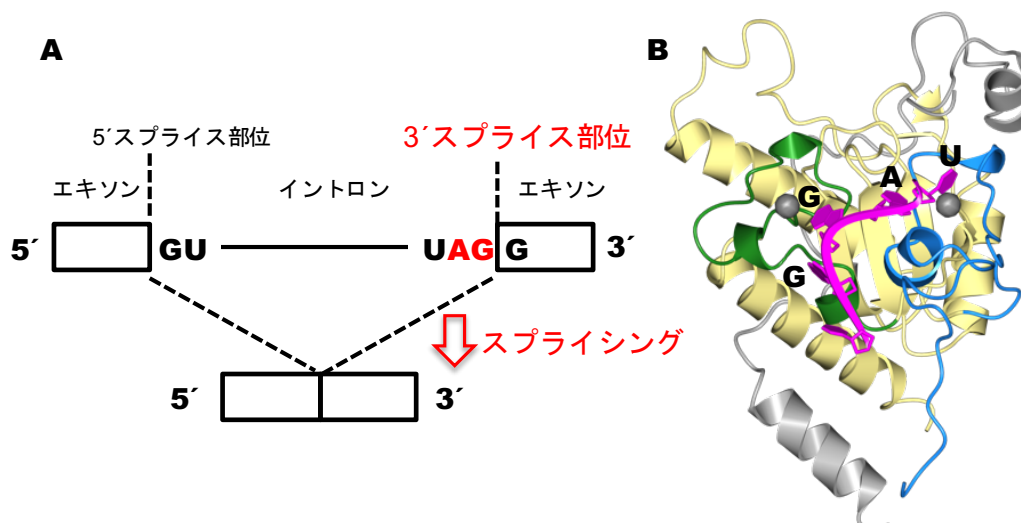


図 1 RNA スプライシングと U2AF1

A; RNA スプライシングと 3' スプライス部位。遺伝子から転写された RNA は、スプライシングによりイントロンが取り除かれ、エクソン同士がつなぎ合わされる。エクソンとイントロンの境界はそれぞれ 5'、3' スプライス部位と呼ばれ、厳密な認識が要求される。U2AF1 は 3' スプライス部位に保存された AG 塩基配列を認識し結合するタンパク質である。

B; 本研究で明らかになった U2AF1 と 3' スプライス部位 RNA との結合型の立体構造。U2AF1 は 3' スプライス部位だけでなく、その隣の塩基の全部で 4 塩基を認識・結合していた。

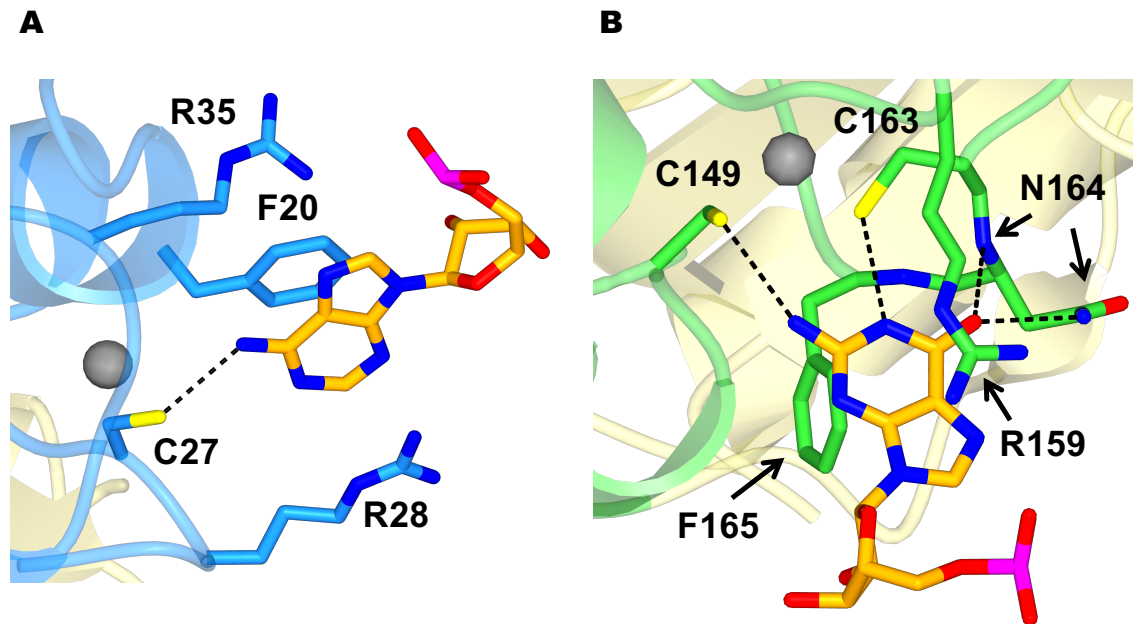


図2 U2AF1による塩基特異的な認識機構

U2AF1と3'スプライス部位のAGのA間(A)、AGのG間(B)の相互作用。黄色の線がRNAを示している。黒丸は亜鉛原子。

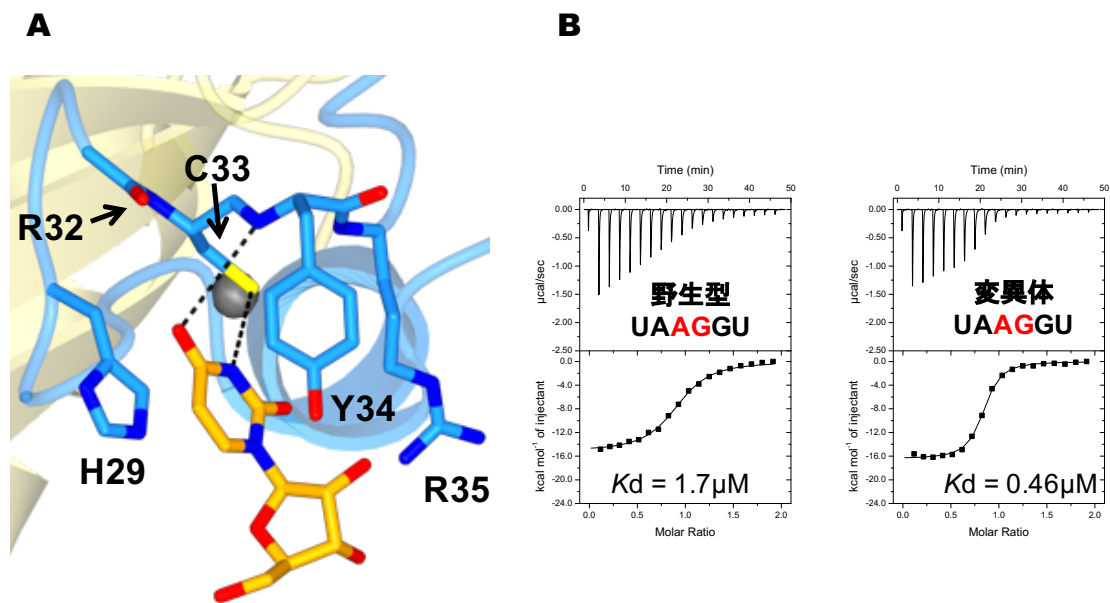


図3 U2AF1変異体による塩基認識機構

A; U2AF1病気患者変異体S34Yによる変異体特異的な塩基認識機構。図2同様、黄色の線がRNAを示している。黒丸は亜鉛原子。

B; 等温滴定熱量計によるU2AF1とRNAの結合能測定。 $K_d$ の数値が小さいほど結合親和性が強い。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nariai Y, Kamino H, Obayashi E, Kato H, Sakashita G, Sugiura T, Migita K, Koga T, Kawakami A, Sakamoto K, Kadomatsu K, Nakakido M, Tsumoto K, Urano T   | 4. 巻<br>663             |
| 2. 論文標題<br>Generation and characterization of antagonistic anti-human interleukin (IL)-18 monoclonal antibodies with high affinity: Two types of monoclonal antibodies against full-length IL-18 and the neoepitope of inflammatory caspase-cleaved active IL-18. | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Arch Biochem Biophys.   | 6. 最初と最後の頁<br>71-82     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.abb.2019.01.001   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Nariai Yuko, Kamino Hiroki, Obayashi Eiji, Kato Hiroaki, Sakashita Gyosuke, Sugiura Tomoko, Migita Kiyoshi, Koga Tomohiro, Kawakami Atsushi, Sakamoto Kazuma, Kadomatsu Kenji, Nakakido Makoto, Tsumoto Kouhei, Urano Takeshi                           | 4. 巻<br>663             |
| 2. 論文標題<br>Generation and characterization of antagonistic anti-human interleukin (IL)-18 monoclonal antibodies with high affinity: Two types of monoclonal antibodies against full-length IL-18 and the neoepitope of inflammatory caspase-cleaved active IL-18  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Archives of Biochemistry and Biophysics   | 6. 最初と最後の頁<br>71 ~ 82   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.abb.2019.01.001   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Nakayama Naomi, Sakashita Gyosuke, Nagata Takashi, Kobayashi Naohiro, Yoshida Hisashi, Park Sam-Yong, Nariai Yuko, Kato Hiroaki, Obayashi Eiji, Nakayama Kentaro, Kyo Satoru, Urano Takeshi   | 4. 巻<br>8               |
| 2. 論文標題<br>Nucleus Accumbens-Associated Protein 1 Binds DNA Directly through the BEN Domain in a Sequence-Specific Manner   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Biomedicines  | 6. 最初と最後の頁<br>608 ~ 608 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/biomedicines8120608   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 浦野 健<br><br>(Urano Takeshi)<br><br>(70293701) | 島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授<br><br><br>(15201) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|