

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23719

研究課題名（和文）DROSHAとDGCR8によるPri-miRNA切断機構の解明

研究課題名（英文）Revealing the mechanism of pri-miRNA cleavage by DROSHA and DGCR8

研究代表者

小林 幹（Kobayashi, Kan）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・特任助教

研究者番号：00844606

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究ではpri-miRNAをin vitro転写によって調製することと人由来DROSHAとDGCR8をHEK細胞で発現しアフィニティータグによって精製することに成功した。しかしクライオ電子顕微鏡での観察に十分な量のDROSHA-DGCR8複合体を得ることはできなかった。一方LRPPRC-SLIRP-mRNA複合体に関しては十分量のサンプルを得ることができたので、クライオ電子顕微鏡で観察を行い、データを取得した。しかしデータ処理の結果、高分解能の像を得ることはできなかった。これはサンプル構造のフレキシビリティが高いためと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でLRPPRC-SLIRP-mRNA複合体の調製に成功したことは、今後の構造機能解析によってそれがmRNAに結合して安定化する機構を解明する助けとなると考えられる。LRPPRCはアミノ酸変異によってLeigh Syndrome French Canadian variantと呼ばれる神経変性疾患を引き起こすことが知られている。この疾患ではミトコンドリアのmRNA量が減少することが知られているため、この疾患はLRPPRCがSLIRPとともにmRNAに結合してそれを安定化することができなくなったことによる可能性がある。そのため本研究の成果は医学的にも重要である。

研究成果の概要（英文）：In this study, the pri-miRNA was successfully prepared by in vitro transcription, and Homo sapiens DROSHA and DGCR8 were expressed in HEK cell and their complex were purified by the affinity tag. However, the product yield of DROSHA-DGCR8 was not enough for cryo-EM analysis.

On the other hand, LRPPRC-SLIRP-mRNA was prepared and its data of cryo-EM were collected. However, the high resolution images were not obtained by data processing. It could be because of the high conformational flexibility of it.

研究分野：構造生物学

キーワード：DROSHA DGCR8 pri-miRNA LRPPRC SLIRP mRNA

1. 研究開始当初の背景

Micro RNA (miRNA)とは 21-25 ヌクレオチド長の一方鎖 RNA であり、Argonaute タンパク質と RISC (RNA-induced silencing complex)を形成し、miRNA を通じて配列特異的に mRNA に結合することで標的 mRNA の分解や翻訳抑制を引き起こす (Wahid et al., BBA Mol. Cell Res. 2010)。miRNA は RNA polymerase II によって stem loop 構造を持つ pri-miRNA として合成された後に DROSHA と Dicer による段階的な切断反応を経て成熟する (Wahid et al., BBA Mol. Cell Res. 2010)。研究開始当初、Argonaute や Dicer に関してはそれぞれの基質 RNA との複合体構造が既に報告されていたが (Nakanishi et al., Nature 2012, Liu et al., Cell 2018)、DROSHA に関してはその基質である pri-miRNA との複合体構造が報告されておらず、それが pri-miRNA を切断する機構は解明されていなかった。DROSHA は RNAase III domain を 2 つもつリボヌクレアーゼであり、DGCR8 と複合体を形成することで pri-miRNA を特異的に認識し、そのステムループ構造の根本の部分切断する (Lee et al., Nature 2003, Han et al., Genes Dev. 2004)。DGCR8 はその C 端領域のアルファヘリックスを通じて DROSHA と結合することが解明されているが (Nguyen et al., Cell 2015, Kwon et al., Cell 2016)、2 つの二本鎖 RNA 結合ドメイン (dsRBD1, dsRBD2)が DROSHA 上で pri-miRNA を特異的に認識する機構もわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では DROSHA-DGCR8-pri-miRNA 複合体の構造をクライオ電子顕微鏡による単粒子解析によって高分解能で決定することで DROSHA と DGCR8 が協調して pri-miRNA を認識し切断する機構の解明を目指した。特に、DROSHA と結合した DGCR8 が dsRBD1, dsRBD2 を用いてどのように pri-miRNA を捕まえつつ DROSHA の 2 つの RNAase III domain が pri-miRNA のステムループの根本部分を切断するのかを解明する。

3. 研究の方法

先行研究に基づき、精製のためのアフィニティータグを融合させた DROSHA と DGCR8 を HEK 細胞で共発現させることで複合体の調製を行う (Nguyen et al., Cell 2015)。また、後に pri-miRNA と結合させた際にそれを切断することを防ぐために、DROSHA の RNAase III domain 中に存在する活性残基のグルタミン酸には変異を導入した。アフィニティータグは、最初は FLAG タグや His タグを用いて Anti-FLAG レジンや Ni-NTA カラムによる精製を行う。また、GFP を融合させたコンストラクトを発現させ、その後それを GFP 抗体がカップリングされたレジンに吸着させ、さらに GFP とタンパク質部分の間に挿入された Tev プロテアーゼ切断配列で切断することによる精製も試す。そして精製されたサンプルを in vitro 転写とゲル精製によって調製した pri-miRNA と混合しさらにゲル濾過クロマトグラフィーにかけることで DROSHA-DGCR8-pri-miRNA 複合体を調整する。調製されたサンプルを用いて Vitrobot によってクライオ電子顕微鏡グリッドを作製し、それを用いてクライオ電子顕微鏡によるデータ測定を行い、そのデータから単粒子解析によって DROSHA-DGCR8-pri-miRNA 複合体の構造を高分解能で決定する。

4. 研究成果

Pri-miRNA は in vitro 転写とゲル精製によって高純度のサンプルを十分量得ることができた。一方 DROSHA と DGCR8 を HEK 細胞で共発現させることには成功したが、十分量の複合体サンプルを得ることはできなかった。それぞれのタンパク質に融合させたアフィニティータグとして FLAG, His, GFP などを試してみたが、収量を改善させることはできなかった。そしてその間に中国と米国の研究グループによってクライオ電子顕微鏡による DROSHA-DGCR8-pri-miRNA 複合体の構造が報告され、DROSHA と DGCR8 が協調して pri-miRNA を認識し切断する機構が解明されてしまった (Jin et al., Mol. Cell 2020, Partin et al., Mol. Cell 2020)。そこで申請者は同じ mRNA metabolism の領域でテーマを探し、人のミトコンドリア由来 LRPPRC-SLIRP-mRNA 複合体のクライオ電子顕微鏡による構造決定を始めた。LRPPRC と SLIRP はミトコンドリア内で mRNA と結合してそれを PNPase による分解から保護するとともにポリアダニル化を促進することでミトコンドリア内の mRNA を安定化し、翻訳を制御する (Chujo et al., Nucleic Acids Res., 2012)。LRPPRC と SLIRP はそれぞれ大腸菌を用いて発現させた後に精製を行った。LRPPRC には His タグを融合させており、Ni-NTA カラム、HiTrap Heparin カ

ラム、ゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。SLIRP には GST タグを融合させており、グルタチオンセファロースカラムやゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。そして精製タンパク質と poly U RNA を混合した後にゲル濾過クロマトグラフィーによって LRPPRC-SLIRP-mRNA 複合体を調製した。そして Vitrobot によってクライオ電子顕微鏡グリッドを作製した後にクライオ電子顕微鏡 Talos Arctica G2 を用いてデータ測定を行い、プログラム RELION (Scheres, J. Struct. Biol., 2012) を用いてデータ処理を行った。そして 2D classification まで行ったが、粒子の構造的フレキシビリティが高いせいか高分解能の 2D class average を得ることができなかった。今後は粒子構造を安定化し、コンホメーションを均一化する必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------