

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18510

研究課題名(和文)酸化ストレスにより活性化されるポリA付加酵素の構造機能解析

研究課題名(英文)Structural analysis of the poly A polymerase activated by oxidative stress

研究代表者

山下 征輔 (Yamashita, Seisuke)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任助教

研究者番号：30769576

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)：本研究は、非古典的ヌクレオチド転移酵素による特異的な反応メカニズムの解明を目的として行われた。特にヒトのヌクレオチド転移酵素Star-PAPとTUT4をターゲットとしてX線結晶構造解析および生化学解析に取り組み、Star-PAPについてはU6 snRNAに対する特異的なウリジン付加反応の分子基盤を、TUT4についてはlet-7 miRNAの抑制に必要な複合体形成の分子基盤をそれぞれ明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命の設計図と呼ばれるDNAはそれ自身が部品として働くのではなく、RNAに転写されたのちにさらにタンパクに翻訳されて、あるいはRNAそのものとして機能的な役割を果たす。RNAは転写された後にさらに様々なプロセッシングを受けていることが近年明らかになり、プロセッシングが適切な機能発現や活性制御に不可欠であることがわかってきた。本研究では転写後プロセッシングの一つであるヌクレオチド転移反応を担う酵素を標的とし、その立体構造を明らかにすることで高次生命現象の制御機構の解明につなげることができた。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to reveal the molecular mechanisms of the specific nucleotidyl transfer by non-canonical nucleotidyl transferases. In particular, we focused on the structural and biochemical analyses of human Star-PAP and TUT4, which are the members of human non-canonical nucleotidyl transferases. We clarified the molecular basis for the U6 snRNA specific uridylation by Star-PAP. We also clarified the molecular basis for the complex formation which is necessary for the inhibition of let-7 miRNA.

研究分野：構造生物学

キーワード：ヌクレオチド転移酵素 X線結晶構造解析 TUTase ヌクレオチド付加 RNA修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンサーの普及や細胞からの RNA 回収技術の進展により、RNA の翻訳後修飾が遺伝子の発現に大きな影響を与えていることがわかってきた。3'末端へのヌクレオチド付加はその一つであり、U6 snRNA や mRNA の成熟化、micro RNA の機能抑制あるいは促進など、幅広い分野で重要な役割を果たしている。これらの反応を担う酵素は、ポリ A ポリメラーゼや CCA 付加酵素といった古くから知られた酵素に対して "非古典的ヌクレオチド転移酵素" と呼ばれ、高次生命現象の制御に関わっている。ヒトの非古典的ヌクレオチド転移酵素としては7つが知られていたが、特異的反応機構の詳細や立体構造については不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究は、非古典的なヌクレオチド転移酵素による特異的な反応の分子基盤を明らかにすることを目標として行われた。当初はヒトの非古典的ヌクレオチド転移酵素の一つである Star-PAP を主なターゲットとし、その後、同じくヒトの非古典的ヌクレオチド転移酵素である TUT4 についても結晶構造解析に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究は、主として X 線結晶構造解析の手法による立体構造の解明と、組み替えタンパク質を用いた invitro での生化学実験の手法を用いた。組み替えタンパク質は大腸菌を用いて発現させ、複数段階のカラムクロマトグラフィーにより精製した。X 線回折実験に用いる結晶は調製したタンパク質を沈殿剤と混合することで調製した。作成した結晶を用いて Photon Factory(つくば)にて X 線回折データを収集し、タンパク質の立体構造を決定した。得られた構造情報から分子メカニズムについて仮説を立て、変異体タンパク質や放射性同位体を用いた生化学解析によって実証した。

4. 研究成果

大きく以下の2つの成果が得られた。

(1) U6 snRNA の成熟化を担う Star-PAP の構造・機能解析

Star-PAP はヒトの非古典的ヌクレオチド付加酵素の一つである。酸化ストレスに応答して特定の mRNA の 3'末端にポリ A 鎖を付加することや、U6 snRNA の 3'末端にウリジンを付加することなどが報告されていた。しかし、その立体構造や、個々の反応の分子基盤についてはほとんどわかっていなかった。

Star-PAP は触媒活性ドメイン (TUTase ドメイン) 以外に、N 末端側にジンクフィンガーと RNA 認識モチーフ (RRM) といった RNA 結合ドメインを、C 末端側に保存された領域を持つ (図 1A, B)。全長での結晶が得られなかったため、フレキシブルな構造をとっていると予想される領域の除去などコンストラクトを検討し、ほぼ全長を含む形での構造解析に成功した。単体での構造解析に加えて、ソーキング法により基質ヌクレオチド (UTP と ATP) との複合体構造の解明にも成功した。特に U6 snRNA へのウリジン付加反応について試験管内での再構成実験に良好な結果が得られたため、U6 snRNA に対するウリジン付加活性について詳細な解析を行い、以下のことを明らかにした。

UTP は活性ポケット内の保存されたヒスチジン残基との水素結合によって特異的に認識されること

C 末端側の領域が Kinase Associated-1 ドメイン (KA-1) に類似した立体構造をとること

KA-1 ドメインが RNA 結合ドメインとして働くこと

TUT1 は KA1 ドメインとジンクフィンガー、RRM を共同的に利用することで、U6 snRNA の全体構造を認識して特異的に反応を行うこと (図 1C)

これらの内容を論文にまとめ、Nature Communications 誌に発表した (Yamashita et. al., Nat. Commun. 2017)。

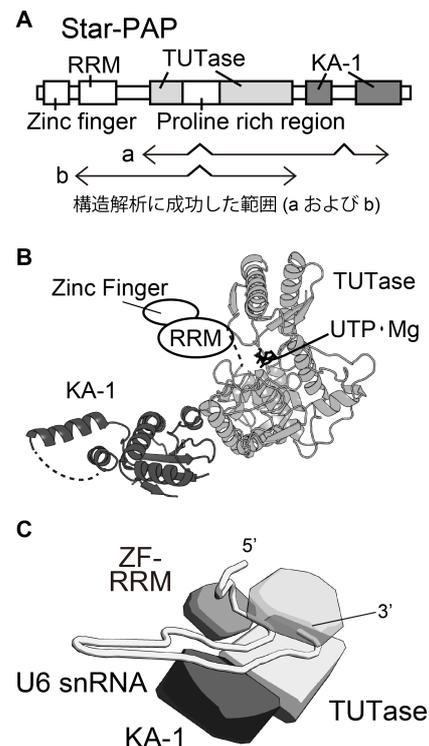


図 1. Star-PAP の構造解析 (A) Star-PAP のドメイン構成. (B) Star-PAP の立体構造 (C) U6 snRNA との複合体モデル

(2) let-7 micro RNA を制御する TUT4 の構造・機能解析

TUT1 の解析と並行して、同じくヒトの非古典的ヌクレオチド転移酵素である TUT4 の結晶構造解析にも取り組んできた。TUT4 は RNA 結合タンパク質 Lin28 に依存して let-7 miRNA にオリゴウリジンを付加する活性を持つ。これにより let-7 の成熟化が阻害され発現が抑制される(図 2A)。let-7 は主として増殖に関わる因子を抑制しており、TUT4 によるヌクレオチド付加を通じた let-7 活性の阻害は、幹細胞の増殖能の維持や細胞のガン化に関わっている。

TUT4 は大きく分けて N 末端側領域と C 末端側領域に分けられる。TUT4 の N 末端側領域は LIM(Lin28-interacting module)と呼ばれ、Lin28・let-7 miRNA との相互作用部位として働く(図 2B)。一方で C 末端側領域はウリジン付加の触媒活性を担っている。

申請者らは LIM の構造解析に取り組み、単体の立体構造の解明に成功した(図 2C)。生化学解析とあわせて以下のことを明らかにしている。

LIM の TUTase 類似領域(nc-TUTase)は C 末端側の触媒ドメインと類似した構造をとること

ジンクフィンガーは nc-TUTase ドメインと相互作用して固定されていること

LIM の nc-TUTase が Lin28 と結合した let-7 のループ部分と、ジンクフィンガーがおそらく let-7 の 2 本鎖 RNA 部

分とそれぞれ相互作用する。これにより、TUT4 は Lin28 依存性かつ特異的にオリゴウリジル化反応を行うこと(図 2D)。

これらの内容を論文にまとめ、Nature Communications 誌に発表した(Yamashita et. al., Nat. Commun. 2019)。

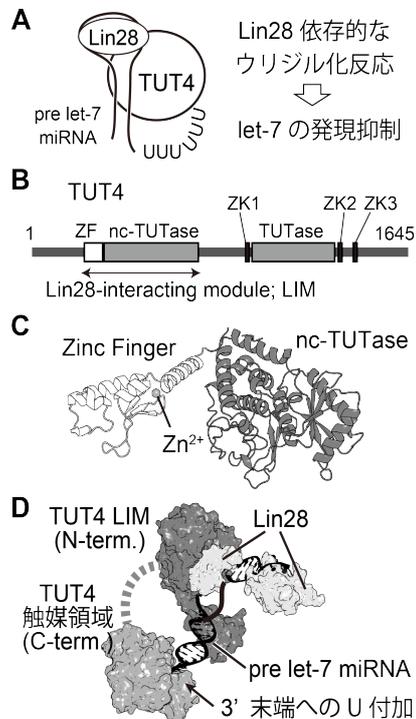


図 2. TUT4 N 末端領域の構造解析(A)TUT4 による let-7 抑制の概略図。(B)TUT4 のドメイン構成。(C)LIM の立体構造。(D)Lin28, let-7 RNA との 3 者複合体モデル

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

(1)**Yamashita S**, Nagaike T, Tomita K

Crystal structure of the Lin28-interacting module of human terminal uridylyltransferase that regulates let-7 expression

Nature communications vol. 10, 1960, 2019

(査読有り、筆頭)

(2)Yashiro Y, **Yamashita S**, Tomita K

Crystal Structure of the Enterohemorrhagic Escherichia coli AtaT-AtaR Toxin-Antitoxin Complex.

Structure vol. 27, pp. 476-484, 2019

(査読有り)

(3)Taniguchi T, Miyauchi K, Sakaguchi Y, **Yamashita S**, Soma A, Tomita K, Suzuki T

Acetate-dependent tRNA acetylation required for decoding fidelity in protein synthesis.

Nature chemical biology vol. 14, pp. 1010-1020, 2018

(査読有り)

(4)**Yamashita S**, Takagi Y, Nagaike T, Tomita K

Crystal structures of U6 snRNA-specific terminal uridylyltransferase.

Nature communications vol. 8, 15788, 2017

(査読有り、筆頭)

(5)Martinez A, **Yamashita S**, Nagaike T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Tomita K Human

BCDIN3D monomethylates cytoplasmic histidine transfer RNA.

Nucleic acids research vol. 45, pp. 5423-5436, 2017

(査読有り)

〔学会発表〕(計2件)

(1)山下 征輔, 永池 崇, 富田 耕造

ヒト TUT4 による Lin28 依存的な let-7 miRNA 抑制の分子構造基盤
第41回日本分子生物学会年会 (2018年11/28~30, パシフィコ横浜)

(2)Seisuke Yamashita & Kozo Tomita

Mechanism of 3' -matured tRNA discrimination from 3' -immature tRNA by class-II
CCA-adding enzyme
26th tRNA Conference (2016 6. 4-8, Jeju, Korea)

〔図書〕(計1件)

(1)富田 耕造, 山下 征輔

「ノンコーディング RNA-RNA 分子の全体像を俯瞰する」
一章 古典的 ncRNA、tRNA の機能

〔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

・所属研究室

<http://www.park.itc.u-tokyo.ac.jp/rnabiology/>

・Research Map

<https://researchmap.jp/yamashita-seisuke/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。