

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16053

研究課題名(和文) ヒトTUT1によるRNAポリウリジル化の分子構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for the RNA poly-uridylylation by human TUT1

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・助教

研究者番号：30769576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：TUT1はU6 snRNAの成熟化を担う酵素であり、U6 snRNAの3'末端にウリジンを付加する活性を持つ。U6 snRNAの3'末端はU6 snRNPの形成やスプライソソームのリサイクルに関わるため、その成熟化は真核生物の遺伝子発現に重要なプロセスである。本研究はTUT1によるU6 snRNA認識機構を原子レベルで明らかにすることを目的とし、ヒトTUT1とU6 snRNA複合体のX線結晶構造解析から立体構造を明らかにした。TUT1は複数のRNA結合ドメインでU6 snRNAの塩基配列や二次構造などの特徴を認識しており、全体として高い親和性と特異性で相互作用していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAはDNAから転写されたのち、さまざまな修飾を受けてその機能を発揮する。TUT1によるU6 snRNAへのポリウリジル化はその一つであり、U6 snRNAが適切に働くために必要なステップである。しかし、TUT1が細胞内の数多くのRNAの中からU6 snRNAだけを基質とするのかについて、詳細なメカニズムはわかっていなかった。本研究ではタンパク質・RNA複合体についてX線結晶構造解析から立体構造を明らかにし、原子レベルでの結合様式を明らかにすることで、なぜTUT1がU6 snRNAに特異的にポリウリジル化するのかを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：TUT1 synthesizes the 3'-oligouridine tail required for the U6 snRNP formation and recycling. To reveal the detailed recognition mechanism of U6 snRNA by TUT1, we solved the X-ray crystal structure of human TUT1(hTUT1)-U6 snRNA complex. hTUT1 utilizes the multiple RNA-binding domains for recognition of the characteristic features of U6 snRNA. With these interactions, TUT1 specifically and efficiently interacts with U6 snRNA.

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 RNA

1. 研究開始当初の背景

U6 snRNA はスプライソソームの触媒活性を担うスプライシングの中心因子である。スプライシングサイクルは様々なスプライソソーム RNA、タンパク質の結合・解離を伴う動的なものであり、その機能を発揮するために U6 snRNA は多くの転写後修飾を受ける。3'-末端のオリゴウリジンテイルはそのような修飾の一つであり、スプライシングタンパク質の結合部位となることで U6 snRNP の形成に必要とされるほか、スプライシング反応終了後のリサイクル過程にも関わる。したがって U6 snRNA 3' 末端の成熟化は真核生物の遺伝子発現に重要なプロセスであるといえる。

U6 snRNA の 3'末端は RNA ポリメラーゼ III に転写されたのち、TUT1(Terminal Uridylyl Transferase 1)によるオリゴウリジンの付加と Usb1 によるトリミングの2段階の成熟化プロセスを経る。本申請課題は U6 snRNA 3' 末端の成熟化を担うヌクレオチド付加酵素 TUT1 を対象とし、U6 snRNA へのオリゴウリジル化の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

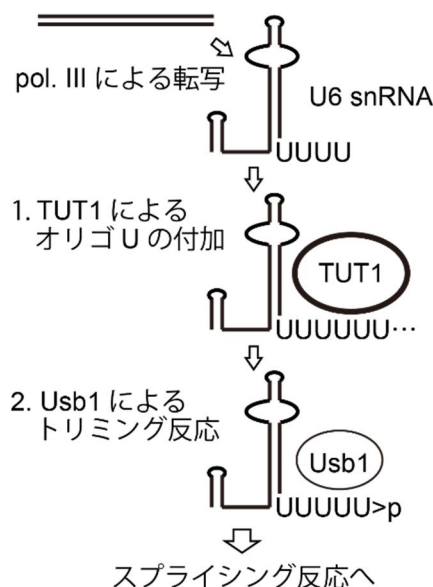


図 1. U6 snRNA の成熟化

TUT1 は U6 snRNA へのウリジル化を担う酵素として同定された後、その立体構造は長い間明らかになっておらず、生化学的な性質についても不明な点が多かった。申請者らは本研究に先立ってヒト TUT1 単体および基質ヌクレオチドとの複合体の結晶構造を決定し、構造情報に基づいて生化学的な解析を行った。その結果から U6 snRNA やヌクレオチドに対する特異的な認識機構の概要が明らかになり、TUT1 の反応機構の理解に大きく貢献してきた (Yamashita *et al*, Nature Communications, 2017)。

TUT1 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 2A, B)。申請者らは機能・構造解析から、

- (1) 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.
  - (2) C 末端側の領域が Kinase Associated-1(KA-1)ドメインに類似した立体構造をとること.
  - (3) KA-1 ドメインが RNA 結合ドメインとして働くこと.
  - (4) TUT1 は KA-1 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.
- などを明らかにしてきた。しかしながら、原子レベルでの詳細な相互作用についてはわかっておらず、その解明が待たれていた。

また、ヒトには TUT1 を含めて類似のドメイン構造を持つ酵素群(Terminal Nucleotidyl Transferase, TENT ファミリー)が 11 個存在し、それぞれに特有の基質に対してヌクレオチドを付加することで高次生命機能を制御している。いくつかの TENT 酵素はガン化やウイルスの増殖に関わっていることが報告されており、その機能の違いや構造的な分子基盤にも関心が高まっている。しかし RNA との複合体構造の報告例は限られており、TUT1-U6 snRNA の複合体構造解析からは TENT ファミリー全般の活性メカニズムへの理解が進むとも期待される。

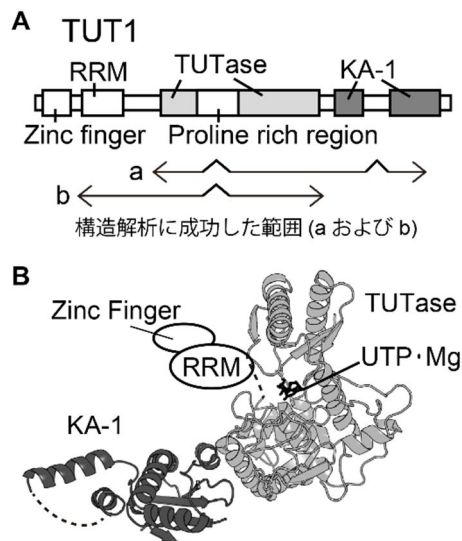
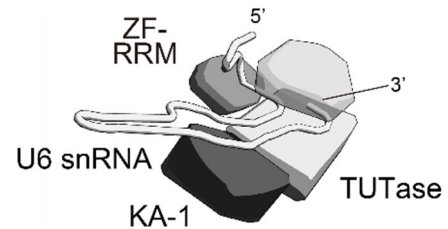


図 2. TUT1 の構造・機能解析。  
(A)TUT1 のドメイン構成。  
(B)TUT1 の立体構造。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、複合体結晶構造解析の手法から TUT1 と U6 snRNA の原子レベルでの相互作用メカニズムを明らかにすることを目的として行われた。これまでの成果によって TUT1 の各ドメインと U6 snRNA の相互作用領域の対応がわかってきていた(図 3)。しかし、それぞれのドメインは、さらに U6 snRNA の特異的認識に特化しているはずである。TUT1 タンパク質のどの残基が、どのような相互作用によって、U6 snRNA のどの塩基配列・二次構造を認識しているのかを明らかにすることで、U6 snRNA の成熟化という、生物学的に重要なプロセスについて深く理解することを目指した。そして、そのためには複合体の立体構造解析が不可欠であると考え、本研究に取り組んだ。



生化学解析に基づいた複合体モデル  
↓ 複合体 X 線結晶構造解析  
原子分解能での結合様式の解明から  
詳細な認識メカニズムを理解する

図 3. TUT1-U6 snRNA のモデルと  
本研究の目的

## 3. 研究の方法

X 線結晶構造解析の手法により、TUT1 と U6 snRNA の複合体構造を明らかにすることを目指した。タンパク質はヒスチジンタグを付加した組み換え体として大腸菌で発現させ、ニッケルアフィニティー精製、ヘパリンカラム精製、およびゲル濾過クロマトグラフィーの 3 段階のカラムクロマトグラフィーによって精製した。RNA は T7 polymerase による試験管内転写により調製し、アクリルアミドゲルからの切り出しによって精製した。両者を混合して複合体試料とし、沈殿剤を加えて結晶化を試みた。得られた結晶を大型放射光施設 Photon Factory (KEK, つくば) に送付してリモート操作により X 線結晶構造解析実験を行い、回折データを収集した。立体構造から相互作用を明らかにし、組み換えタンパク質や試験管内転写した RNA を用いた変異体実験により検証した。

## 4. 研究成果

本研究ではまずヒト TUT1 と U6 snRNA の複合体結晶の作成を目指した。全長のタンパク質と RNA を用いた結晶化スクリーニングでは結晶が得られなかったため、部分的に欠損させたコンストラクトでの結晶化を試みた。タンパク質・RNA とも複数のコンストラクトを作成し、生化学実験により活性を検証するとともに様々な組み合わせで結晶化スクリーニングを行った。ほとんどの初期スクリーニングにおいて結晶が得られなかったものの、特定のタンパク質・RNA コンストラクトの組み合わせで結晶を得ることができた。しかし初期スクリーニングで得られた結晶からはごく弱い回折像しか得られず構造解析には不十分であったため、さらなるコンストラクトの検討や、沈殿剤条件、クライオプロテktan組成、インキュベーション温度、複合体試料と沈殿剤の混合比率などの最適化を行った。最終的に構造解析の可能な回折の得られる結晶の作成に成功し、X 線回折データセットを取得した。位相決定にはヒト TUT1 単体の構造をモデルとした分子置換法を用いた。現在までにほぼモデルビルディング・構造精密化の完了に至っている。

複合体の立体構造中において、TUT1 は複数の RNA 結合ドメインによって U6 snRNA を取り囲むように結合していた。すなわち、複数のドメインの共同的な結合によって全体として高い親和性と特異性で認識している様子を直接的に示すことができた。また、各ドメインはそれぞれ U6 snRNA に特徴的な塩基配列や二次構造に対して結合しており、個々のドメインにおいて U6 snRNA 結合への最適化が進んでいることがわかった。加えて、これまでに明らかになっていなかった TUT1 のドメイン間の相互作用によって TUT1-U6 snRNA 複合体はコンパクトにまとまった構造をとっていることもわかった。これによって RNA の 3'末端が触媒部位付近に固定されることで、効率的にヌクレオチド付加が行われることが示唆される。明らかになった立体構造・相互作用を、組み換えタンパク質や試験管内転写 RNA を用いた変異体実験により検証した。本研究からは、TUT1 によるこれらの成果について、論文発表にむけて投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Aoyama Tomohiko, Yamashita Seisuke, Tomita Kozo	4. 巻 -
2. 論文標題 Mechanistic insights into m6A modification of U6 snRNA by human METTL16	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa227	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Liu Yining, Martinez Anna, Yamashita Seisuke, Tomita Kozo	4. 巻 48
2. 論文標題 Crystal structure of human cytoplasmic tRNAHis-specific 5'-monomethylphosphate capping enzyme	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 1572 ~ 1582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkz1216	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Seisuke Yamashita, Kozo Tomita
2. 発表標題 Crystal structure of the Lin28-interacting module of human terminal uridylyltransferase that regulates let-7 expression
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------