

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570139

研究課題名(和文) 核酸-タンパク質複合体構造を基盤としたLINEの転移プロセスの解明

研究課題名(英文) Investigation into the LINE transposition process by structural study of DNA-protein complexes

研究代表者

真板 宣夫(MAITA, Nobuo)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：00404046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：LINEの機能を構造生物学的アプローチにより解明するため、結晶構造解析を目的とする。ORF2pの精製可能で安定なコンストラクトの再考を行ったが、これまでのSart1-ORF2p全長よりも発現量および安定性が改善されるものは見いだせなかった。また、大腸菌を用いた場合、コドン頻度による発現タンパクの不安定化が考慮される為、より天然の環境に近い昆虫細胞を用いた発現系を試行した。Sf9を用いて Sart1全長を発現させたところSart1-ORF1pの発現は確認できたが、ORF2pは殆ど見られず、またORF1pも可溶画分に回収されなかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to reveal the structural basis of the LINE. To obtain the stable protein, I tested four EN-Myb constructs, but none could be expressed or purified better than Sart1-ORF2p. Next, I used Sf9 cells as protein expression system to overcome the codon-usage issue. Although I detected the ORF1p expression, ORF2p was not co-expressed. I tried to purify the ORF1p expressed in Sf9 cells, however, ORF1p was recovered in insoluble fraction and failed to purify.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析 レトロトランスポゾン

### 1. 研究開始当初の背景

LINE の構造解析を行っているグループは我々を含めて2グループあり、彼らは哺乳動物でメジャーなLINE-1に興味を持っている。LINE の研究はその発見の経緯から殆どがゲノム解析の手法によって行われており、機能解析は進んでいない。その理由として LINE の転移を試験管内で再現することが非常に困難であることと、細胞内でも元々転移は非常に稀な現象であることが挙げられる。2004年にジョンス・ホプキンス大学のグループが LINE の DNA 配列を最適化して、培養細胞を用いた高頻度転移系を確立している。2013年には同じグループがこの系を用いて相互作用解析を行った論文が発表された。

LINE はタンパク質の精製も困難なため、構造解析もほとんど進んでいない。2010年までにエンドヌクレアーゼドメイン(EN)の構造が4つ、LINE1-ORF1p の RRM ドメイン(157-317)の構造が報告されている。そのうち EN2つは我々のグループが構造決定している。その後 2011年に独マックス・プランク研究所のグループがほぼ全長の LINE1-ORF1p の結晶構造を発表している。

2010年に ORF2p の EN と RT の間に Myb 様ドメインが高度に保存されていることが報告された。Myb は DNA を強く結合することから、EN だけでなく Myb も DNA の結合に必須であると考えられた。これらのことにこれまでの自身の研究進捗状況を踏まえ、ORF2p 全長の解析はとりあえず保留し、まずは LINE-EN-Myb と DNA 結合状態を解明することにした。

### 2. 研究の目的

LINE-ORF2p の DNA 複合体結晶構造解析を行うため、EN-Myb の安定なコンストラクトの作製を試みる。また、なるべく長い領域の ORF2p の精製を目指して、ORF2p が安定に存在できるような LINE 複合体を丸ごと精製する。そのために昆虫細胞を用いた系を構築し、発現・精製を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) EN-Myb 様ドメインの作製および精製

これまでの自身の結果から EN 単独で DNA との複合体を形成させるのは非常に困難であると思われた。その後 EN と RT との間に Myb 様ドメインが存在し、これが DNA との結合に関与しているというデータが得られたことから、L1, Tras1, R1Bm, Sart1, R2Bm, R7 の EN-Myb のコンストラクトを作製し、大腸菌で発現の可否を調べ、精製を試みる。

#### (2) 昆虫細胞を用いた発現系の構築

カイコ由来の4種類の LINE(Tras1, Sart1, R1, R2)の全長を pFastBac に挿入してバクミドを作り、これを Sf9 に感染させて細胞を回収し発現を確認する。発現がうまくいった物は少量スケールで培養し、精製が可能か検討する。上手く精製が出来るものがあればスケールを増やして精製を行う。

またこれとは別に、創薬等支援技術基盤プラットフォームを利用して ORF2p + 3' UTR のコンストラクト作製と Sf9 での発現の可否の検討を依頼する。

#### (3) 結合パートナータンパク質を用いた共発現系の構築

タンパク質が不安定で精製が困難な場合に、結合タンパク質と共存させることで安定な複合体が形成されることがしばしばみられる。2013年に PCNA が ORF2p 結合することが報告されたことから、PCNA と共発現系を構築して精製を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) EN-Myb 様ドメインの作製および精製

研究協力者の東大藤原晴彦教授からヒト L1, Tras1, R1Bm, Sart1, R2Bm, R7 のクローンを提供して頂き、His タグ及び GST タグをつけた EN-Myb 発現ベクターを構築し、それぞれ大腸菌(Codon Plus)に入れて発現を確認したが、Sart1 以外では殆ど発現しなかった。Tras1 に関しては Myb の長さを変えて 1-476, 1-458, 1-438, 1-428 残基までの4種類のコンストラクトを構築したが、His タグでは全滅、GS タグでも 1-428 以外は発現が見られなかった。そこで GST-Tras1(1-428)の精製を検討したところ、タグを 3C プロテアーゼ切断すると不安定になり分解されてしまうことが判った(図1)。

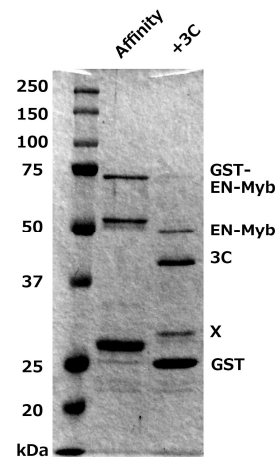


図1 Tras1-EN-Myb のタグ切断  
X は EN-Myb の分解産物。CBB 染色

#### (2) 昆虫細胞を用いた発現系の構築

##### LINE 全長の発現系

多くのコンストラクトで発現が非常に低い理由として、大腸菌の稀コドンが多く含まれていることが考えられる。またコンストラクトの設計が不適切で、タンパク質が分解されやすい位置に停止コドンを入れてしまっていることが考えられる。Tras1 や R1Bm は蚕由来であるので、大腸菌の代わりに昆虫細胞を用いることでコドンの問題が克服できると期待される。実際に藤原教授のグループでは、タンパク質の発現量は低いものの、Sf9 内で転移活性を確認している(Matsumoto et al,

2004 & 2006)

Tras1, R1Bm, Sart1 を pFastBac(N 末に His タグ)へ組み込み, 発現の検討を行った. いずれも非常に長い配列(~5kbp)を入れるため, バクミドの作製には時間がかかってしまった. このうち, Sart1 全長(ORF1p の N 末に His タグ)の場合にのみ ORF1p の発現がウエスタンで確認できた. しかしながら発現量は低く, また CBB 染色では ORF2p は確認できなかった. さらに精製を検討したところ, 可溶画分に ORF1p は回収されなかった(図 2).

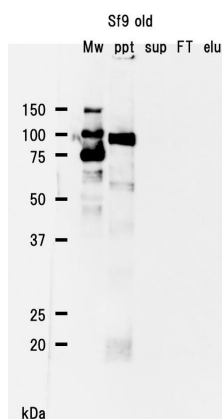


図 2 Sf9 での ORF1p の発現と精製条件検討 ppt:沈殿, sup:上清, FT:ニッケルカラム素通り画分, elu: ニッケルカラム結合画分, Mw:分子量マーカー, 抗 His タグ抗体染色

#### LINE-ORF2p+3' UTR の発現系

これまでの SART1-ORF2p の精製条件検討から ORF2p には RNA が結合しており, RNA を除去すると不安定化して凝集するということが判った. これは ORF2p が C 末の亜鉛フィンガードメイン(Zn)で自身の mRNA と結合するためである. SART1 を用いた研究により, mRNA の 3' UTR がステムループ構造を作り, Zn と特異的に結合することが明らかとなっている(Osanai et al., Mol Cell Biol, 2004). このことから ORF2p は自身の mRNA と 3' UTR 部分で安定な複合体を形成し, 精製も可能になると考えられた. 昆虫細胞を用いれば mRNA がきちんと 3' UTR 部分まで転写させることが期待されるため, 創薬等支援技術基盤プラットフォームを利用して Tras1, R1Bm, Sart1 の ORF2p の N 末端に His タグが付加するようなコンストラクトを作製していただいた. さらに昆虫細胞での発現の可否を免疫染色で調べていただいた(課題受付番号 1116). しかしながら, いずれのコンストラクトでも発現は確認されなかった.

#### (3)結合パートナータンパク質を用いた共発現系の構築

2013 年初めに英ケンブリッジ大のグループがスプライシングに関わる Prp8 の結晶構造を報告した(Galej et al., Nature, 2013). Prp8 は RT, EN, RNaseH ドメインを持ち, ORF2p とほぼ同じドメイン構造を持つことが明ら

かとなった(図 3). 論文によればこの構造には Aar2 と呼ばれる結合タンパク質が含まれており, Aar2 が無いと発現がうまく行かなかった. このため, もし LINE-ORF2p でも結合パートナーが解ればそれと結合させた状態で精製が可能となると期待される.

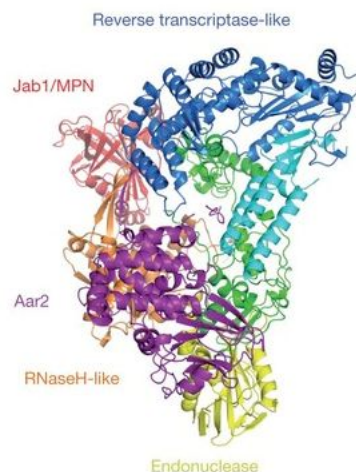


図 3 Prp8 の結晶構造

そうしたところ, 2013 年 11 月に米ジョンス・ホプキンス大のグループが ORF2p と PCNA が直接結合することを報告した(Taylor et al., Cell, 2013). またこの論文では ORF1p と ORF2p は直接結合せず, mRNA を介して結合していることが示された. この為, ORF1p と ORF2p の共発現系での精製よりも ORF2p と PCNA の共発現系の方が成功確率が高いように思われた.

そこで宿主であるカイコ PCNA の配列を大腸菌コドン最適化したものを人工 DNA 合成により構築し, pET28a に組み込んで共発現系を試した. GST-Sumo-Sart1-ORF2p と His-BmPCNA を Rosetta2(DE3)に発現させ, 大腸菌を溶菌し可溶画分を GSH カラムでアフィニティ精製したところ, PCNA が共存していることが確認できた(図 4).

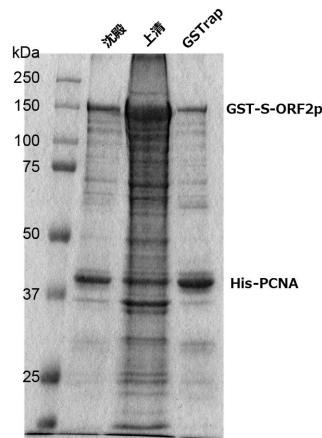


図 4 S1-ORF2p と PCNA の共発現 (CBB 染色)

今後, この系を使ってさらに精製を進める

予定である。

#### (4)総括

本研究に於いて、進捗の遅れが目立った。理由としては確実に上手く行く方法が無く、暗中模索の状況であったことと、昆虫培養細胞系の新規立ち上げに予想以上に手がかかってしまったためである。

しかしながら、ORF2p の結合タンパク質の発見により、長年苦労していた精製にも希望が見えてきた。一方で、海外のグループも同じことを考えていることが予想される為、急いで研究を進める必要がある。

#### 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 8件)

1. Kuroki K, Wang J, Ose T, Yamaguchi M, Tabata S, Maita N, Nakamura S, Kajikawa M, Kogure A, Satoh T, Arase H, Maenaka K (2014). Structural basis for simultaneous recognition of an O-glycan and its attached peptide of mucin family by immune receptor PILR. Proc Natl Acad Sci USA, in press. (査読有) [DOI:10.1073/pnas.1324105111]
2. Saito S, Ohno K, Maita N & Sakuraba H (2014). Structural and clinical implications of amino acid substitutions in  $\alpha$ -L-iduronidase. Mol Genet Metab, 111, 107-112. (査読有) [DOI:10.1016/j.yimgme.2013.10.005]
3. Hirose T, Maita N, Gouda H, Koseki J, Yamamoto T, Sugawara A, Nakano H, Hirono S, Shiomi K, Watanabe T, Taniguchi H, Sharpless KB, Ōmura S, Sunazuka T (2013). Observation of the controlled assembly of preclick components in the in situ click chemistry generation of a chitinase inhibitor. Proc Natl Acad Sci USA, 110, 15892-15897. (査読有) [DOI:10.1073/pnas.1315049110]
4. Maita N, Tsukimura T, Taniguchi T, Saito S, Ohno K, Taniguchi H, Sakuraba H (2013). Human  $\alpha$ -L-iduronidase uses its own N-glycan as a substrate-binding and catalytic module. Proc Natl Acad Sci USA, 110, 14628-14633. (査読有) [DOI:10.1073/pnas.1306939110]
5. Nyirenda J, Matsumoto S, Saitoh T, Maita N, Noda NN, Inagaki F, Kohda D (2013). Crystallographic and NMR evidence for flexibility in oligosaccharyltransferases and its catalytic significance. Structure, 21, 32-41. (査読有) [DOI:10.1016/j.str.2012.10.011]
6. Maita N, Taniguchi H, Sakuraba H (2012). Crystallization, X-ray diffraction analysis and SIRAS phasing of human

$\alpha$ -L-iduronidase. Acta Cryst F, 68, 1363-1366. (査読有)

[DOI:10.1107/S1744309112040432]

7. Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y (2012). Crystallization strategy for the glycoprotein-receptor complex between measles virus hemagglutinin and its cellular receptor SLAM. Prot Pept Lett, 19, 468-473. (査読有) [DOI:10.2174/092986612799789314]
8. Saitoh T, Igura M, Miyazaki Y, Ose T, Maita N, Kohda D (2011). Crystallographic snapshots of Tom20-mitochondrial presequence interactions with disulfide-stabilized peptides. Biochemistry, 50, 5487-5496. (査読有) [DOI:10.1021/bi200470x]

[学会発表](計 4件)

1. 真板宣夫, 月村考宏, 大野一樹, 谷口寿章, 櫻庭均. ヒト  $\alpha$ -L-イズロニダーゼの結晶構造解析, 第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場 (福岡県), 12/Dec/2012.
2. Maita N, Taniguchi H, Sakuraba H. Crystal structure of human  $\alpha$ -L-iduronidase, XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Palacio Municipal de Congresos de Madrid (Madrid, Spain), 24/Aug/2011.
3. Ueji T, Shirakata A, Kondoh S, Nagano K, Maita A, Maita N, Okumura Y, Nikawa T. Crystal structure of Cbl-b TKB domain in complex with Cblin (Cbl-b inhibitor), XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Palacio Municipal de Congresos de Madrid (Madrid, Spain), 24/Aug/2011.
4. Okamura-Ikeda K, Hosaka H, Maita N, Fujiwara K, Yoshizawa AC, Nakagawa A, Taniguchi H. Crystal structure of T-H protein complex of the glycine cleavage system, XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Palacio Municipal de Congresos de Madrid (Madrid, Spain), 25/Aug/2011.

[その他]

ホームページ等

<http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/166156/profile-ja.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

真板 宣夫 (MAITA, NOBUO)

徳島大学疾患酵素学研究センター・准教授  
研究者番号: 00404046