

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840029

研究課題名(和文) 前駆体マイクロRNAへのポリウリジル化反応の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for the polyuridylation to pre-microRNA

研究代表者

竹下 大二郎 (Takeshita, Daijiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：80613265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNAは、特定のmRNAと相補的に結合し、mRNAの分解と翻訳抑制を誘導することによって、細胞分化やガン化などに関連する多くの遺伝子の発現制御を担っている。RNA結合タンパク質Lin28は、ウリジル化酵素TUT4をプレマイクロRNAにリクルートし、RNAをポリウリジル化することで分解経路に誘導し生合成を調節する。本研究では、ウリジル化酵素の立体構造を解明し、反応機構を明らかにすることを目的とした。ヒトポリウリジル化酵素の活性部位を結晶化し、現在分解能の向上のため、結晶化条件の精密化と測定条件の最適化を行っている。低分解能のX線回折データを使った分子置換法の解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Binding of a specific miRNA to the target sequence on an mRNA induces the inhibition of its translation. This plays a role for the regulation of gene expression related to cell differentiation and cancer, etc. RNA binding protein LIN28 recruits TUT4 to pre-miRNAs to poly-uridylylate its RNA terminus, which leads to the degradation of the pre-miRNA. The aims of this project are to determine the structure of TUT and its complex and to reveal the reaction mechanism. We crystallized the catalytic domain of TUT. We are trying to improve the X-ray diffraction pattern for the structural determination.

研究分野：構造生物化学

キーワード：X線結晶解析

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は、特定の mRNA と相補的に結合し、mRNA の分解と翻訳抑制を誘導することによって、細胞分化やガン化などに関連する多くの遺伝子の発現制御を担っている。そのため、マイクロ RNA を制御する分子機構を解明することはマイクロ RNA による代謝機構の理解を深めるだけでなく、医薬学の分野においても重要である。

RNA 結合タンパク質 Lin28 は、末端ウリジル化酵素 TUT4 をプレマイクロ RNA にリクルートし、RNA をポリウリジル化することで分解経路に誘導し合成を調節する。本研究では、Lin28・TUT4・プレマイクロ RNA 複合体の立体構造を解明し、Lin28 と TUT4 による共同的な RNA ポリウリジル化機構を明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究では、Lin28 依存的な TUT4 による pre-let-7 への 3'末端ポリウリジル化機構を解明するため、Lin28・TUT4・pre-let-7 複合体の結晶構造を解明し、Lin28 による RNA 末端への TUT4 のリクルート機構およびポリウリジル化の反応機構を解明する。三者複合体の立体構造から、TUT4 が Lin28・pre-let-7 複合体を特異的に認識して結合する分子メカニズムと、pre-let-7 の 3'末端が TUT4 の活性ポケットへ導入される構造基盤が解明できると考えられる。マイクロ RNA を標的とした RNA ポリメラーゼの立体構造解析は、これまで報告されておらず、新規のマイクロ RNA 認識の分子メカニズムや、RNA 合成反応機構が解明できると考えている。

研究期間内では、プレマイクロ RNA をポリウリジル化する反応機構を表す TUT4・Lin28・プレマイクロ RNA 複合体の構造決定を達成することを目標とする。

TUT4 は、分子量が大きく結晶化が困難なことも予測される。良質な結晶を得るため、結晶化に用いるタンパク質の領域を検討し、結晶構造解析を進める。活性を保持した TUT4 全長と Lin28・プレマイクロ RNA の結晶構造解析を第一の目標として研究を進める。また、TUT4 は N 末端領域が Lin28・プレマイクロ RNA の相互作用に重要で、C 末端領域がポリウリジル化反応を担っていることがわかっている。そのため、TUT4 の N 末端領域・Lin28・プレマイクロ RNA 複合体の結晶構造解析、および TUT4 の C 末端領域・プレマイクロ RNA 複合体の結晶構造解析も同時に取り組む。それぞれの立体構造を解明することによって、三者の全構成要素を再構成して立体構造モデルを構築することができると考えている。

## 3. 研究の方法

マイクロ RNA の制御機構であるプレマイクロ RNA のポリウリジル化反応の分子機構を解明するため、Lin28・TUT4・プレマイクロ RNA 複合体の立体構造解析を行う。

(1)まず、Lin28・TUT4・プレマイクロ RNA からなる三者複合体の精製と結晶化を目指す。RNA 結合タンパク質 Lin28 と末端ウリジル化酵素 TUT4 を高純度に大量調製し、pre-let-7 RNA と混合して三者複合体の結晶化を行う。良質な X 線回折能を有する結晶を得るため、Lin28 および TUT4 の最適化領域の検討と RNA 鎖の配列・長さの検討を行い結晶化する。放射光施設において X 線回折データを収集し、SeMet 置換体結晶を利用して位相決定を行う。立体構造を基にして、タンパク質あるいは RNA の変異体を作製し、詳細な生化学的実験を行うことで、TUT4 複合体の形成機構や、プレマイクロ RNA のポリウリジル化の反応機

構を明らかにする。

(2)上記の三者複合体の結晶化は、TUT4の分子量が大きいこと、プレマイクロ RNA が長く不安定であること、などから困難である可能性がある。そのため、TUT の部分領域の精製と結晶化も行う。TUT 中の Lin28 と相互作用する部位、あるいはポリウリジル化反応を触媒する部位は、他のプルダウンアッセイやリコンビナントタンパク質を使った実験から予測されている。ドメインタンパク質の発現系構築と精製・結晶化を進め、X 線回折データの収集を行う。

#### 4. 研究成果

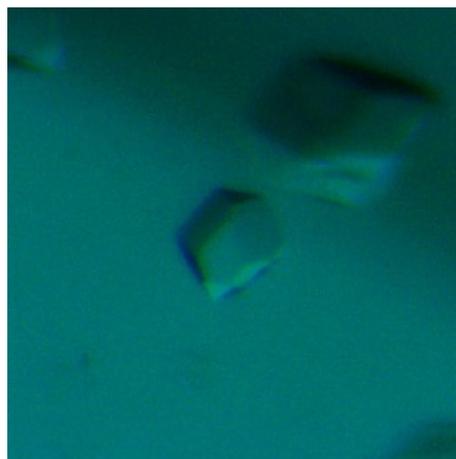
プレマイクロ RNA のポリウリジル化酵素は、ヒトでは TUT4 および TUT7 の二つが見つかっている。共に N 末端から、ジンクフィンガードメイン、ポリメラーゼドメイン、ジンクフィンガードメイン、ポリメラーゼドメイン、タンデムなジンクフィンガードメインで構成されている。TUT4 と TUT7 はそれぞれ 1644 残基、1495 残基であり、非常に分子量が大きなタンパク質である。結晶化に最適な領域を見出すため、N 末端と C 末端領域を削った組み換えタンパク質を調製した。その結果、N 末端のジンクフィンガードメインから C 末端の一つのジンクフィンガードメインを含む領域のタンパク質が、Lin28 依存的なポリウリジル化活性に必要であることがわかった。また、全長のタンパク質調製を試みたところ、TUT7 は TUT4 に比較して、不安定であり、結晶化実験には不向きと考えられたため、TUT4 を中心として三者複合体の調製を行った。

三者複合体の調製のため、以下の試料を調製した。TUT は、TUT4 の N 末端と C 末端領域を削ったタンパク質の発現コンストラクトを調製し、大腸菌で大量発現させた。ニッケルカラム、ヘパリンカラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて、ほぼ単

一バンドになるまで精製を行った。Lin28 についても同様に、N 末端と C 末端領域を削ったタンパク質の発現コンストラクトを調製し、大腸菌で大量発現した。ニッケルカラム、ヘパリンカラム、ゲルろ過カラムによって精製し、RNA が混在しない純度が高いタンパク質を調製した。プレマイクロ RNA としては、合成 RNA と転写した RNA などさまざまな長さ、配列のものを調製した。

TUT・Lin28・プレマイクロ RNA を混合し、ゲルろ過カラムによって複合体を確認した。精製した複合体を用いて結晶化スクリーニングを行ったが、結晶を得ることはできなかった。調製した三者複合体は、揺らぎが大きいなど結晶化には不向きであると推測された。

続いて、TUT の触媒部位に着目し、発現コンストラクトの作製とタンパク質発現精製を行った。その結果、一つのコンストラクトで結晶を得ることができ (写真参照)、現在 5 Å 程度の分解能の X 線回折データを収集している。今後、結晶の改善を行って、構造解析と生化学的解析による反応機構の解明を行う。



TUTの触媒部位の結晶

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 2 件)

Molecular insights into replication initiation by Q $\beta$  replicase using ribosomal protein S1.

Takeshita D, Yamashita S, Tomita K.  
Nucleic Acids Res. 2014;42(16):10809-22.  
doi: 10.1093/nar/gku745. Epub 2014 Aug 13.

Mechanism of RNA polymerization by Q $\beta$  replicase.

Tomita K, Takeshita D.  
Seikagaku. 2014 Jun;86(3):391-4. Review

[学会発表] (計 2 件)

竹下 大二郎、富田 耕造  
Q $\beta$  レプリケースによるゲノム RNA 複製開始の分子基盤  
第 16 回 日本 RNA 学会年会 (2014 7.23-25 名古屋)

Daijiro Takeshita, Kozo Tomita  
Molecular mechanism of replication initiation of Q $\beta$  RNA by Q $\beta$  replicase  
5th tRNA Conference (2014 9.21-25, Kyllini Peloponnese, Greece)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

竹下 大二郎 (TAKESHITA DAIJIRO)  
産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員  
研究者番号：80613265

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：  
80613265