

平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 研究成果報告書

平成21年6月30日

公立大学法人横浜市立大学
理事長 様

平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 (W20011) で行った研究成果等は下記のとおりです。

記

1 研究者情報	研究代表者氏名 (所属・職位)	永田 崇 (国際総合科学研究科生体超分子科学専攻・助教)			
2 事業情報	新規・継続の分け				
	研究費の区分	若手人材育成推進費 (自然科学)			
	研究課題名	生殖細胞・神経幹細胞において遺伝子発現を制御する翻訳調節機構の構造生物学			
	研究実施期間	平成20年7月1日 ~ 平成21年3月31日			
	研究ユニットの構成 ※研究代表者も含む ※研究計画書と相違のないようにご注意ください。	所属名・企業名等 横浜市立大学国際総合科学研究科生体超分子科学専攻	役職名 助教	氏名 永田 崇	役割 NMR法による構造・相互作用・分子運動の解析、及び全体の統括
3 研究概要					
<p>生殖細胞は全ての体細胞と生殖細胞を再び生み出す能力を持っている。また、神経幹細胞は自己複製能及び多分化能を有している。これらの細胞が正常に維持・分化するのは、遺伝子発現が時空間的に、精密かつ正確に制御されるからである。したがって、これらの細胞における遺伝子発現の制御機構を解明することは、再生医療への道を切り開くと考えられる。</p> <p>近年、生殖細胞や神経幹細胞において、遺伝子発現の翻訳レベルでの調節が大きな役割を果たしていることが明らかにされた。これまでの卵成熟過程の研究から、翻訳調節と mRNA の 3' 末端に存在する poly(A) 鎖の長さがリンクしていることがわかっている。翻訳調節の分子機構を分子・原子レベルの分解能で解明できれば、卵成熟の過程のみならず、神経幹細胞の維持・分化の過程及び初期胚細胞周期の過程の理解につながり、さらに、これらを制御するための低分子化合物の開発に結びつく。そこで本研究では、最近発見された poly(A) 鎖の長さを制御するタンパク質を中心に、mRNA の 3' 非翻訳領域に結合して翻訳を調節するタンパク質の立体構造及び相互作用様式を明らかにすることを目指した。</p>					
4 研究成果					
<p>※研究成果については、2,000字程度で記入して下さい。(絵、図入りも可)</p> <p>※地域貢献促進費の方は課題提案者に提出する報告書(必須)をご提出頂きますので、この欄は記載しないで結構です。その他の方は別紙を用意せず、この枠の中に記入するようにして下さい。(枚数は問いません)</p>					

生殖細胞や神経幹細胞において、遺伝子発現を翻訳レベルで調節するいくつかのタンパク質複合体が知られている。本研究では、mRNA の 3'非翻訳領域に形成される二つの複合体に着目した。一つは、生殖細胞において poly(A)鎖を短縮化することで翻訳を抑制する PARN と、逆に poly(A)鎖を伸長することで抑制を解除する Gld2 が含まれる PARN 複合体である。PARN と Gld2 が、直接もしくは CPEB1 を介して結合すると翻訳が抑制される。もう一つは、神経幹細胞において *numb* mRNA の 3'非翻訳領域と PABP に同時に結合する Musashi-1 の複合体である。Musashi-1 は、PABP と翻訳開始因子 eIF4G との結合を阻害することで翻訳を抑制する。

PARN 複合体を構成する因子のうち、PARN、Gld2、CPEB1 について大腸菌による発現プラスミドを構築した。PARN は mouse と human、Gld2 と CPEB1 は mouse の遺伝子（これらは筑波大学の馬場先生からいただいた）をサブクローニングし、ヒスチジンタグあるいは GST タグとの融合タンパク質として発現できる系を構築した。mouse PARN と CPEB1 は全長での発現が見られたが、前者はおよそ半分が可溶性画分に得られ、後者は全量が不溶性画分に得られた。CPEB1 及び発現が見られなかった human PARN と Gld2 について、可溶化と発現量を増やすことで知られる GB1 との融合タンパク質とする計画を立てた。そこで、GB1 (Scripps 研究所の Wright 教授からいただいた) の N 末端側に Ni カラムに対する親和性が高く、さらに従来のヒスチジンタグよりも溶解度が高いとされる HAT タグを配置した融合タンパク質の発現プラスミドを構築した。このプラスミドには、二つのタンパク質の共発現が可能ないように、二つ目の SD 配列及びクローニング部位が導入されている。現在、このプラスミドに CPEB1、human PARN、Gld2 を導入しているところである。

今後、大量に調製する用途の立った mouse PARN については、相互作用、立体構造、酵素活性の解析を行う予定である。それに先立って、NMR により酵素反応をモニターする実験系を構築した。試料としては、APOBEC-3G というシチジン脱アミノ酵素の C 末端酵素ドメイン (A3G_C) を用いた。このタンパク質は、HIV ウィルスが感染した際、逆転写により合成されたウィルスゲノム (-) 鎖 DNA 上のシチジンをウラシルに置換 (C→U 置換) する。これにより、HIV ウィルスのゲノムに変異が導入されウィルスが感染性を失うため、大変注目されている。今回、A3G_C による C→U 置換を NMR によりリアルタイムでモニターする系を構築した[研究成果(2), (4)]。この方法を mouse PARN にも発展・応用する予定である。

Musashi-1 複合体については、PABP 結合部位を含む C 末端領域を GST タグまたは上述の HAT-GB1 タグとの融合タンパク質として発現させるプラスミドを構築した。発現確認をしたところ、GST-Musashi_C は精製過程で分解されることがわかった。一方、HAT-GB1-Musashi_C はおよそ 8 対 2 の割合で不溶性画分に多く得られることがわかった。現在は HAT-GB1-Musashi_C を用い、可溶性画分と不溶性画分を別々に精製することとし、後者についてはリフォールディングの条件検討を行っている。一方、Musashi-1 の C 末端領域に結合する PABP の N 末端 RNA 結合ドメイン (RBD) については、大腸菌による大量調製方法を確立したので、 $[^{15}\text{N}]$, $[^{13}\text{C}]$ 安定同位体標識を施し、NMR の他核多次元法により測定・解析し、ほぼ溶液構造を確定した。今後は、 $[^{15}\text{N}]$ PABP と Musashi-1_C を用い NMR 化学シフトパートナーベクション実験を行い、PABP 上の Musashi-1_C 結合表面を同定する。さらに、HAT-GB1-Musashi_C と PABP の共発現系も構築し、複合体として可溶性画分に得ることに挑戦する。

上述のタンパク質が調製できたら複合体の立体構造解析を行うが、その際、従来の NOE ベースの短距離情報 (6Å以内) のみならず、遠距離情報が得られると有利である。そこで、タンパク質に安定ラジカルを導入し、その常磁性中心からの距離を観測する手法、常磁性緩和促進法 (30Å以内の距離情報を得られる) を整備した。ここでは、Musashi-1 が有する二つの RNA 結合ドメイン (RBD) のうち片側に安定ラジカルを導入し、RNA が結合した際にもう一つの RBD にある個々のアミノ酸残基までの距離を測った。ここで得られた遠距離情報のみで、RNA 結合状態での二つの RBD の配向を推定することが出来た[研究成果(3)]。

5 研究成果の活用（予定）

例) 平成 22 年度 科学研究費補助金（基盤 S）に申請予定

例) 第〇会 〇〇学会に論文発表予定

例) 研究成果が横浜市〇〇事業に活用され、当該事業の PR イベントが開催された際に広報チラシ等に「横浜市立大学 研究戦略プロジェクト事業」との関連を記載した。

- ・ 研究戦略プロジェクトで構築または整備したタンパク質発現系や NMR 測定手法を使って、平成 22 年度科学研究費補助金へ応募する予定。
- ・ 以下の論文を発表した。
 - (1) Nagata, T., Takada, Y., Ono, A., Nagata, K., Konishi, Y., Nukina, T., Ono, M., Matsugami, A., Furukawa, A., Fujimoto, N., Fukuda, H., Nakagama, H. and Katahira, M. (2008) *Nucleic Acids Res.* 36, 6816-6824. “Elucidation of the mode of interaction in the UPI-telomerase RNA-telomeric DNA ternary complex which serves to recruit telomerase to telomeric DNA and to enhance the telomerase activity”
 - (2) Furukawa, A., Nagata, T., Habu, Y., Sugiyama, R., Hayashi, F., Yokoyama, S., Takaku, H. and Katahira, M. (2008) *Nucleic Acids Symp. Ser. No. 52*, 183-184. “NMR assignments and the identification of the secondary structure of the anti-retroviral cytidine deaminase”
 - (3) Ohyama, T., Furukawa, A., Mashima, T., Sugiyama, T., Ohgara, S., Yamazaki, T., Imai, T., Okano, H., Nagata, T. and Katahira, M. (2008) *Nucleic Acids Symp. Ser. No. 52*, 193-194. “Structural analysis of Musashi-RNA complex on the basis of long-range structural information”
 - (4) Furukawa, A., Nagata, T., Matsugami, A., Habu, Y., Sugiyama, S., Hayashi, F., Kobayashi, N., Yokoyama, S., Takaku, H. and Katahira, M. (2009) *EMBO J.* 28, 440-451. “Structure, interaction, and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G”

※ページ数は増えても構いません。

以上