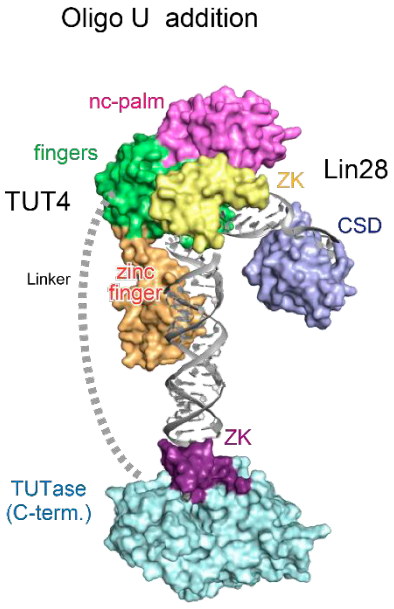
45　マイクロRNA発現コントロールの分子構造基盤	富田　耕造

【目的】マイクロ RNA は相補的な mRNA を抑制して幅広い生命現象を制御している。マイクロ RNA 自身の発現もまた様々なメカニズムによりコントロールされており、その異常はガンなど各種疾患や発生異常の原因となる。let-7 は線虫からヒトまで広く保存されたマイクロ RNA のファミリーであり、特に増殖を促進する遺伝子を標的として様々な生命機能を制御している。すなわち、分化した体細胞では let-7 が過剰な増殖を抑える一方で、幹細胞や一部のガン細胞では let-7 の発現が抑制され細胞増殖が亢進している。let-7 の抑制には RNA 結合タンパク質 Lin28 の前駆体 let-7（pre-let-7）への結合と、続くヌクレオチド転移酵素 TUT4 によるウリジル化が重要な役割を果たしている。TUT4 は Lin28 依存的に pre-let-7 と安定な複合体を形成し、複数のウリジン塩基を pre-let-7 の 3’末端に付加して let-7 の発現を抑制する。一部のガン細胞においては TUT4 と Lin28 による let-7 の発現抑制が増殖能に寄与しており、この経路が抗ガン剤の標的となることが期待されるが、複合体形成の構造基盤は明らかになっていない。本研究は TUT4 による Lin28 依存的な pre-let-7 オリゴウリジル化の分子構造基盤の解明を目的とする。

【方法】ヒト TUT4 の Lin28 結合モジュール（Lin28 Interacting Module、LIM）の X 線結晶構造解析を行った。TUT4_LIM は TUT4 の N 末端側領域に相当し、zinc finger、nc-palm、fingers ドメインからなる。大腸菌で発現させた組換えタンパク質を精製・結晶化し、大型放射光施設 Photon Factory（つくば）で X 線回折データを取得して立体構造を決定した。構造情報から複合体形成のメカニズムについてモデルをたて、各種変異体タンパク質や放射性同位体を用いた *in vitro* での生化学実験によって検証した。

【結果】X 線結晶構造解析により、ヒト TUT4 の Lin28 結合モジュールの立体構造を決定した。また生化学実験とあわせて、TUT4_LIM の zinc finger が pre-let-7 の dsRNA 部分と結合することや、zinc finger から nc-palm、fingers ドメインにわたって保存された塩基性表面で Lin28 : pre-let-7 と相互作用することなどを示した。これらの相互作用が Lin28: pre-let-7 : TUT4 の三者複合体を安定化させることで、TUT4 の C 末端側の触媒ドメインによるオリゴウリジル化が促進されることを明らかにした。

TUT4 による Lin28 依存的な pre-let-7 オリゴウリジル化のモデル



45. マイクロＲＮＡ発現コントロールの分子構造基盤

富田　耕造

東京大学 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻

Key words：マイクロ RNA，TUT4，let-7，Lin28，ヌクレオチド転移酵素

緒　言

マイクロ RNA は相補的な mRNA を抑制して幅広い生命現象を制御している。マイクロ RNA 自身の発現もまた様々なメカニズムによりコントロールされており、その異常はガンなど各種疾患や発生異常の原因となる。let-7 は線虫からヒトまで広く保存されたマイクロ RNA のファミリーであり、特に増殖を促進する遺伝子を標的として様々な生命機能を制御している。すなわち、分化した体細胞では let-7 が過剰な増殖を抑える一方で、幹細胞や一部のガン細胞では let-7 の発現が抑制され細胞増殖が亢進している。

let-7 の発現は 2 種類のウリジル化によって制御される。分化した体細胞においては、3'末端に 1 塩基のオーバーハングを持つ前駆体 let-7（pre-let-7）が、TUT4（およびホモログである TUT7）によってウリジンをひとつ付加されて 2 塩基のオーバーハングを持つようになる（モノウリジル化）。これにより Dicer によるプロセシングが促進され let-7 の発現が向上する。すなわち、体細胞において TUT4 は let-7 を正に制御する。他方、幹細胞や一部のガン細胞では RNA 結合タンパク質である Lin28 が発現しており、pre-let-7 は TUT4、Lin28 と安定な複合体を形成して複数のウリジン付加を受ける（オリゴウリジル化）。オリゴウリジル化は Dicer によるプロセシングを阻害するため let-7 の発現が抑制される。したがって幹細胞や一部のガン細胞では TUT4 は let-7 の抑制因子として働く。一部のガン細胞においては TUT4 と Lin28 による let-7 の発現抑制が増殖能に寄与しており、この経路が抗ガン剤の標的となることが期待されるが、複合体形成の構造基盤は明らかになっていなかった。

本研究では、TUT4 による Lin28 依存的な pre-let-7 オリゴウリジル化の分子構造基盤の解明を目的として、TUT4 の Lin28 結合モジュール（Lin28 Interacting Module：LIM）の X 線結晶構造解析と、立体構造に基づいた生化学解析を行った。その結果、LIM の zinc finger は pre-let-7 の dsRNA 部分と結合することや、zinc finger から palm、fingers ドメインにわたって保存された塩基性表面が Lin28-pre-let7 と相互作用することなどがわかった。これらの相互作用が Lin28:pre-let-7：TUT4 の三者複合体を安定化させ、TUT4 の C 末端側の触媒ドメインによるオリゴウリジル化を促進すると考えられる［1］。

方　法

1.　ヒト TUT4 の X 線結晶構造解析

ヒト TUT4 の Lin28 結合モジュール（Lin28 Interacting Module、LIM）の X 線結晶構造解析を行った。大腸菌で発現させた組換えタンパク質を精製・結晶化し、大型放射光施設 Photon Factory（つくば）で X 線回折データを収集した。分子置換法により初期位相を取得し、モデリング・構造精密化を進めて立体構造を決定した。

2.　組換えタンパク質を用いた生化学実験

構造情報から複合体形成のメカニズムについてモデルをたて、各種変異体タンパク質や放射性同位体を用いた *in vitro* での生化学実験によって検証した。立体構造と生化学実験の結果を合わせて、TUT4 が Lin28 依存的に pre-let-7 と安定な複合体を形成してオリゴウリジル化を行うメカニズムを提唱した。

結果および考察

1. ヒト TUT4 の Lin28 interacting module（LIM）の構造決定

本研究では Lin28 依存的な TUT4 による pre-let-7 オリゴウリジル化のメカニズムを明らかにするために、ヒト TUT4 の LIM の結晶構造解析に取り組んだ。TUT4 は N 末端側の zinc finger（ZF）、2 つのヌクレオチド転移酵素ドメイン（NTD1、NTD2）、C 末端側の 3 つの zinc knuckle（ZK1-3）からなる（図 2a）。NTD はさらに palm と fingers の 2 つのドメインに分けられる。N 末端側の NTD1 は触媒残基の変異のために非活性型であり、C 末端側の NTD2 がウリジン付加活性を担っている。TUT4_LIM は N 末端側の ZF から nc-palm、fingers ドメインまでを含む領域に相当する。結晶化にあたってフレキシブルな領域を除去したコンストラクトを作製し、Lin28 および pre-let-7 との複合体形成能をゲルシフト実験で確認した（図 1b）。このコンストラクトを用いて結晶を作製し、分解能 2.4 オングストロームで X 線回折データを取得して立体構造を決定した（図 1c）。

構造解析の結果、TUT4_LIM の ZF は付加的な領域を持ち、TUT7 の C 末端側の zinc knuckle （ZK）など他のタンパク質の ZF や ZK と比べて大きなドメイン構造をとっていることがわかった（図 1d）。また TUT4_LIM の ZF は fingers ドメインと相互作用しており、互いのドメインの位置や向きが固定されていることもわかった（図 1e）。

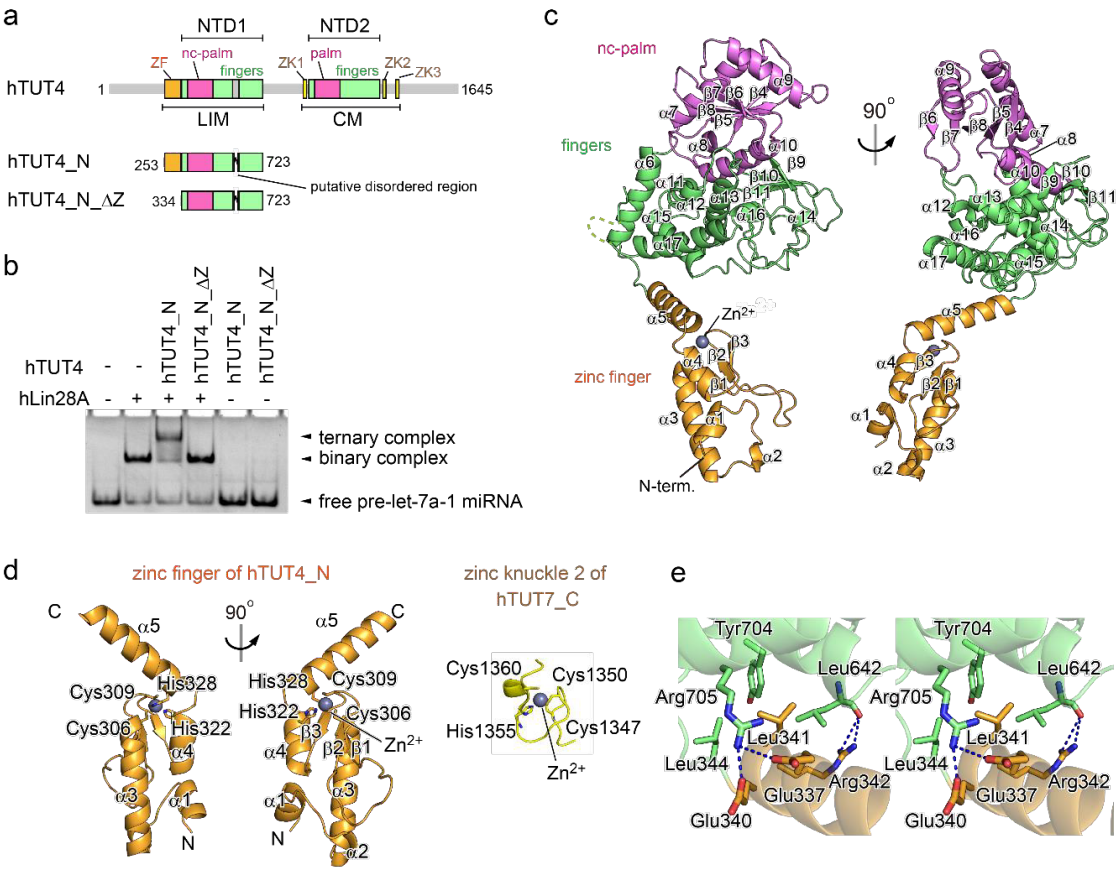


図 1. TUT4 Lin28 結合モジュールの X 線結晶構造解析

a）TUT4 のドメイン構成。

b）結晶化に用いたコンストラクト（TUT4_N）の 3 者複合体形成実験。

c）TUT4_LIM の全体構造。

d）TUT4_LIM の ZF の拡大図と、TUT7（TUT4 ホモログ）C 末端側の zinc knuckle の構造。

e）TUT4_LIM の ZF と fingers ドメインの相互作用（ステレオ図）。

2. TUT4_LIM の立体構造

TUT4_LIM の立体構造をさらに詳細に解析した。TUT4_LIM の ZF を構造比較サーバーDali で解析したところ、ヒト JAZ タンパク質の zinc finger（hJAZ_ZF3）など、2 本鎖 RNA 結合ドメインに結合するものと類似した構造をとっていることがわかった。dsRNA との結合に関与するアミノ酸は TUT4_LIM の ZF においても保存されていることから、同様の相互作用様式で dsRNA に結合すると考えられた（図 2a、b、e）。さらに TUT4_LIM のアミノ酸保存性と電荷分布を調べたところ、ZF の dsRNA 結合面から nc-palm、fingers ドメインにわたって保存された塩基性表面が形成されていることがわかり、pre-let-7：Lin28 との相互作用面として働くことが強く示唆された（図 2c、d）。

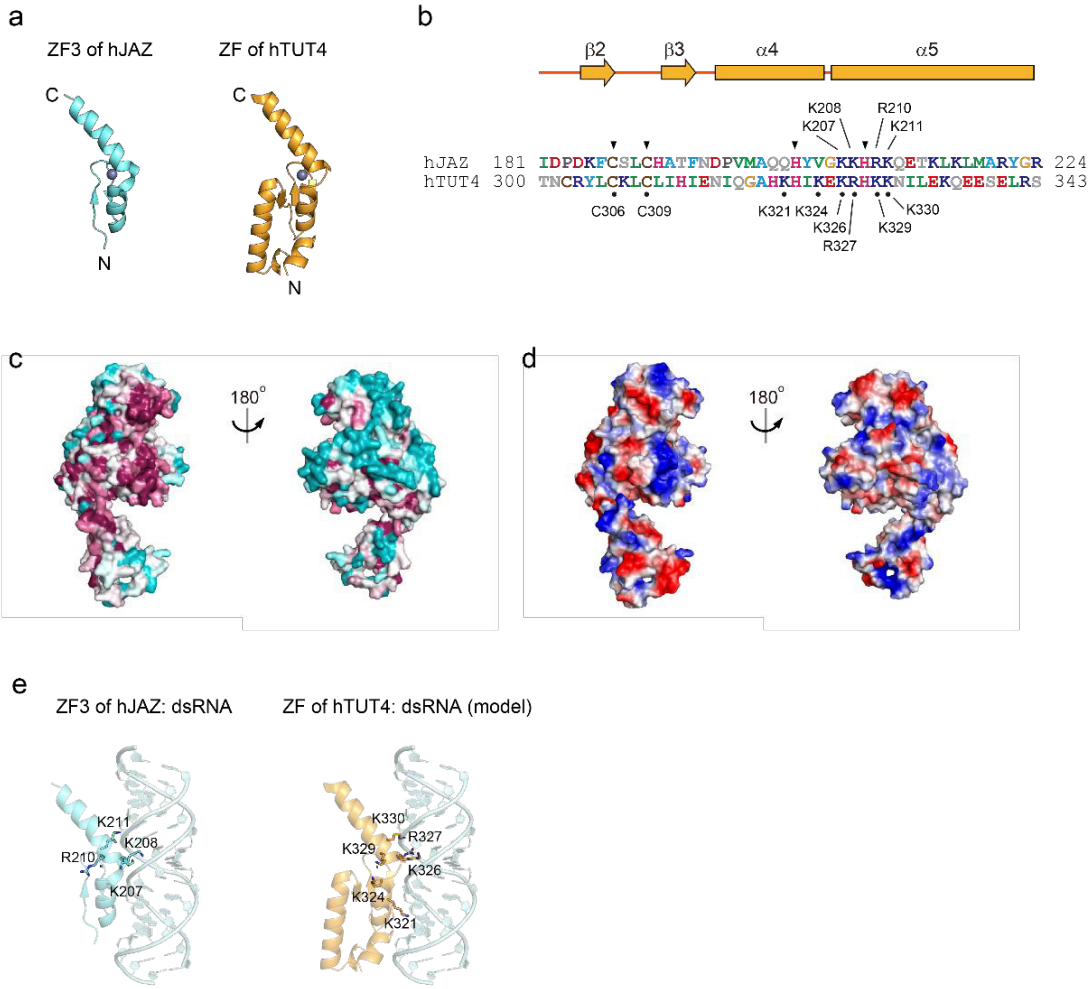


図 2. hTUT1_LIM の立体構造

a）TUT4_LIM の zinc finger と hJAZ の zinc finger の立体構造。

b）TUT4_LIM の zinc finger と hJAZ の zinc finger のアミノ酸配列の比較。

c）TUT4_LIM の保存性解析。生物種間で保存されているアミノ酸を紫、保存されていないアミノ酸をシアンでそれぞれ示した。

d）TUT4_LIM の表面電荷図。正電荷を青、負電荷を赤でそれぞれ示した。

e）hJAZ ZF3：dsRNA の複合体構造（左）と、TUT4_LIM ZF：dsRNA の複合体モデル（右）。

3. 組換えタンパク質を用いた相互作用残基の解析

上記の保存された塩基性表面が実際に相互作用に関わっているかを、アミノ酸の点変異体を用いた生化学実験により検証した（図 3a）。まず、Lin28 の存在下および非存在下で pre-let-7 に対するゲルシフト実験を行った（図 3b）。野生型 TUT4_LIM では Lin28 依存的にシフトバンドが観察されるが、変異体では結合が弱まるか失われた。さらに、C 末端側の触媒ドメインを含むコンストラクトを用いて *in vitro* でのヌクレオチド取り込み活性を調べた。野生型 TUT4 は Lin28 依存的に pre-let-7 をオリゴウリジル化するが、変異体では活性が低下していた（図 3c）。したがって、上記の相互作用面による安定な三者複合体形成がオリゴウリジル化に必要であることがわかった。このほか、テルビウムイオンを用いた RNA プロテクションアッセイを行い、TUT4 は pre-let-7 のステムループ構造のうちのループ部分およびループに近い側の dsRNA 部分と相互作用することも明らかにした。

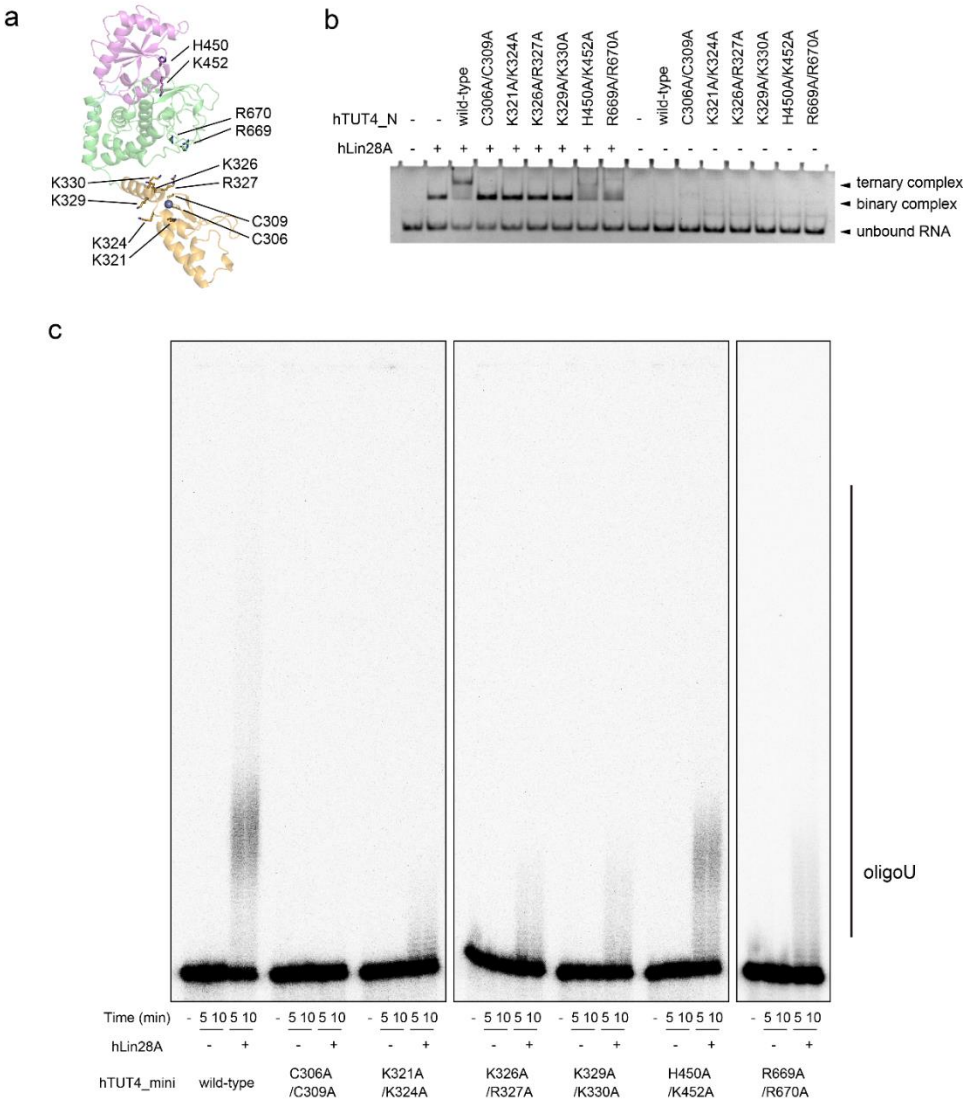


図 3. hTUT1_LIM の変異体解析

a）変異を導入したアミノ酸の位置を TUT4_LIM の立体構造中に示した。

b）TUT4、Lin28、pre-let-7 のゲルシフト実験。野生型の TUT4 は Lin28 依存的に pre-let-7 と 3 者複合体を形成するが、変異体では複合体結合能が低下している。

c）*in vitro* ウリジル化アッセイ。野生型の TUT4 は Lin28 依存的に pre-let-7 をオリゴウリジル化するが、変異体ではウリジン付加活性が低下している。

4. TUT4 による pre-let-7 ウリジル化のモデル

本研究から、TUT4_LIM の立体構造と相互作用の概略が明らかになった。Lin28 の非存在下では TUT4 は pre-let-7 と安定な複合体を形成せず、C 末端側の触媒ドメインが一過的に結合してウリジンを一つだけ付加する（図 4a）。Lin28 存在下においては、TUT4_LIM の zinc finger が dsRNA 部分と、nc-palm および fingers 部分が Lin28 に結合したループ部分とそれぞれ相互作用することで安定な複合体を形成する。これにより C 末端側の触媒ドメインによるオリゴウリジル化が促進される。加えて C 末端側の zinc knuckle が合成されたウリジンテイルと相互作用することで、さらなるウリジル化を促進する（図 4b）。本研究の成果は、マイクロ RNA 発現コントロールの分子構造基盤を提示するとともに、構造情報に基づいた抗ガン剤の設計の有用な指針となることが期待される。

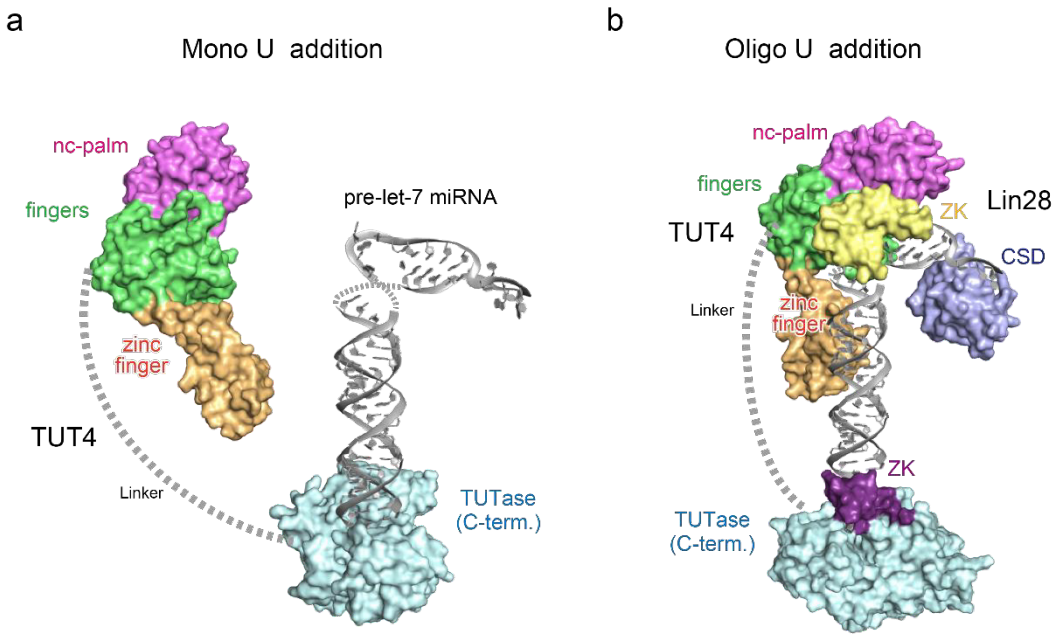


図 4. TUT4 による pre-let-7 のウリジル化
a）Lin28 非存在下でのモノウリジル化のモデル。
b）Lin28 存在下におけるオリゴウリジル化のモデル。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたって X 線回折データは高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory（つくば）の BL17A にて収集しました。ビームラインスタッフの皆様に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Yamashita S, Nagaike T, Tomita K. Crystal structure of the Lin28-interacting module of human terminal uridylyltransferase that regulates let-7 expression. Nat Commun. 2019 Apr 29;10(1):1960. PMID: 31036859 DOI: 10.1038/s41467-019-09966-5.