

(様式 1-1)

提出日：2023 年 5 月 11 日

2022 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名 (下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。)

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：西野達哉

所属機関名・部局名・職名：東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・教授

(3) 研究課題名 (申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。)

植物 RNA サイレンシング機構に関与するタンパク質複合体の構造解析

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：中川 敦史 (研究室名：超分子構造解析学)

(5) 研究成果の概要 (公開)

***背景および目的、方法と結果、について、公開して差し支えない範囲で 1 ページ以内で記載。**

高等植物において、RNA サイレンシングは形態形成、環境応答、防御機構などの生命現象に広く関わる。サイレンシング RNA 増幅機構は 22 塩基小分子 RNA と ARGONAUTE1(AGO1)を含む RISC 複合体に切断された RNA から新たに siRNA を生成する経路である。RNA サイレンシングは小分子 RNA が配列特異的な標的 RNA の抑制に役割を果たす。この植物の小分子 RNA は、miRNA と siRNA に分かれている。Trans-acting siRNA(tasiRNA)は、シロイヌナズナの栄養成長期の相転換に異常を示す変異体の解析から見出した植物に特異的な内在性 siRNA の一種である。tasiRNA は、TAS2RNA を標的とする 22 塩基 miRNA と AGO1 に切断されて生成が始まる。この過程において、SDE5、SGS3、RDR6、DCL4 が生成経路に関わる遺伝子として同定されている。これらの分子のうち RDR6 や DCL4 はそれぞれ RNA 依存的 RNA ポリメラーゼおよび RNA ヘリカーゼとして作用することが知られている。一方、SDE5 や SGS3 は RNA に結合して作用することは知られているが、具体的にどのような構造で、どのように作用するか不明である。私達はこの謎を解明する目的で SDE5 と SGS3 の構造機能解析を行っている。

今年度は昨年度に引き続き、SGS3 と SDE5 の組換え蛋白質の発現と構造機能解析を行った。SGS3 と SDE5 にはコイルドコイル領域や天然変性領域が複数存在するため、全長の蛋白質は不安定で、精製中に大部分が分解されてしまった。この分解を避けるため MBP や GST、ヒスタグといったタグを適切な位置に配置して精製を行った。その結果、発現量が低く不安定な蛋白質でも機能解析に必要な組換え蛋白質を調整することに成功した。

一方、構造解析では保存されたドメインの発現精製を行い、大量発現に成功した。結晶化ロボット Mosquito を使用して結晶化を試みたところ、微小な結晶がいくつかの条件で得られた。これらの結晶は放射光で測定するには十分な大きさではなかったため、今後は結晶化条件を最適化し、立体構造解析を目指す予定である。また、構造情報をもとに機能解析も行う予定である。