

PRESS RELEASE

理化学研究所
バイオ産業情報化コンソーシアム
東京大学

RNA を見分けてほどく、ヘリカーゼの分子機構

— タンパク質の柔軟な天然変性領域が RNA 識別の鍵 —

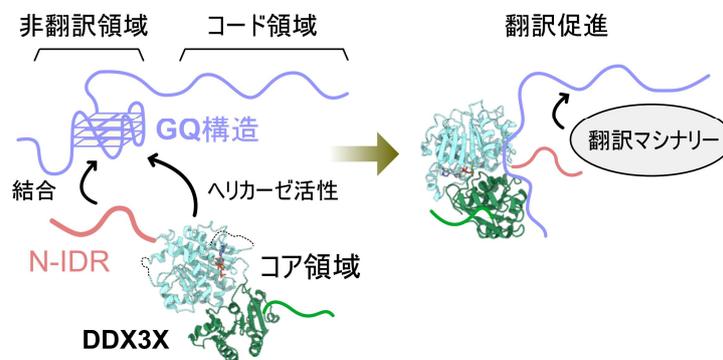
概要

理化学研究所（理研）生命機能科学研究センター生体分子動的構造研究チーム（研究当時）の嶋田一夫チームリーダー（研究当時、現生命医科学研究センター生体分子動的構造研究チームチームディレクター、バイオ産業情報化コンソーシアム（JBIC）特別顧問）、外山侑樹研究員（研究当時、現生命医科学研究センター生体分子動的構造研究チーム客員研究員、東京大学大学院薬学系研究科特任助教）、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室の竹内恒教授の共同研究チームは、メッセンジャーRNA (mRNA)^[1]を認識し、その翻訳制御を担う RNA ヘリカーゼ^[2]の一種 DEAD-Box RNA helicase 3 X-linked (DDX3X)^[2]タンパク質が、特定の mRNA を選択的に見分ける分子機構の一端を明らかにしました。

本研究成果は、DDX3X が関わる疾患の発症機序の解明や、タンパク質と RNA の相互作用を標的とした新たな創薬技術の開発に貢献すると期待されます。

DDX3X は、mRNA の高次構造^[3]をほどく RNA ヘリカーゼ活性を持ち、がんや神経発達症の発症などに関与していることが知られています。今回、共同研究チームは、溶液核磁気共鳴分光法（溶液 NMR 法）^[4]を用いて、DDX3X の天然変性領域（IDR）^[5]が、mRNA 中のグアニン 4 重鎖（GQ）構造^[6]を選択的に認識し、ヘリカーゼ活性を担うコア領域がこの GQ 構造をほどくことを明らかにしました。そして本研究は、DDX3X がこれら二つの領域の協奏的な働きによって mRNA を選択的に認識し、その翻訳を促進する分子機構を提唱しました。

本研究は、科学雑誌『*Nature Communications*』オンライン版（8月28日付：日本時間8月28日）に掲載されました。



DDX3X が mRNA を選択的に認識し、翻訳制御を行う分子機構の模式図

背景

生物は遺伝子をコードする DNA から mRNA への転写、mRNA からタンパク質の翻訳という過程を経ることで、さまざまな機能を持つタンパク質を合成し、生命活動を維持します。そして、これら一連の過程は、環境変化やストレスなど外的刺激に応じて、多様なメカニズムによって制御を受けています。mRNA からタンパク質の翻訳を制御するメカニズムの一つとして、mRNA の非翻訳領域^[1]が複雑に折り畳まれた高次構造を形成し、タンパク質の翻訳速度や翻訳効率を抑制する機構が存在することが知られています。一方、細胞内には、mRNA 非翻訳領域の高次構造をほどくことで翻訳を促進するタンパク質 RNA ヘリカーゼが存在します。この mRNA の非翻訳領域の高次構造形成と RNA ヘリカーゼ活性のバランスにより、多くの重要な遺伝子の発現が精緻に制御を受けています。

DDX3X は DEAD-Box RNA ヘリカーゼの一種であり、細胞のがん化にも関与する *RAC1* 遺伝子^[7]や *MITF* 遺伝子^[8]など特定の遺伝子の翻訳促進をつかさどるタンパク質です。DDX3X の活性が変調を受ける病因性変異は、髄芽腫（悪性脳腫瘍の一種）などのがんや、知的発達・言語発達の遅れなど神経発達症の要因となること、また DDX3X を介した *MITF* 遺伝子の翻訳調節はがん細胞の増殖、浸潤や転移といった病態の変化に関わることなどが知られています。このため、DDX3X はがんや神経発達症を含む多様な疾病との関連が示唆される重要な創薬標的であると考えられています。従って、DDX3X が、これら特定の遺伝子の mRNA をどのように認識し、その発現調節をつかさどるのかを分子レベルで明らかにすることは、DDX3X の機能不全が関与する疾患に対して新規治療戦略を確立する上で重要です。

これまでに DDX3X によって翻訳制御を受ける遺伝子群、およびそれらの遺伝子発現制御の生理的機能に着目した研究は盛んに行われてきたものの、DDX3X が認識する mRNA には特定の配列モチーフ（共通して見られる特徴的な塩基配列）は見いだされておらず、その選択的な分子認識がいかにして達成されているのかは十分に明らかになっていませんでした。

研究手法と成果

今回、共同研究チームは、ヒト由来 DDX3X タンパク質を対象とし、まずは DDX3X のどの領域が選択的な mRNA 認識に関わっているかを調べました。DDX3X の RNA ヘリカーゼ活性は、複数の α ヘリックス^[9]などで形成されたコア領域が担っています。一方、コア領域の N 末端^[9]と C 末端^[9]側には、特定の立体構造を形成しない天然変性領域 (IDR) が存在します (図 1A)。共同研究チームはこれらの N 末端と C 末端それぞれの IDR の機能に着目し、IDR を含まない DDX3X 変異体タンパク質を作製してヘリカーゼ活性を測定しました。その結果、N 末端側 IDR (N-IDR) を持たない DDX3X 変異体は正常型の DDX3X と比較して活性が 1/6 倍程度にまで低下することが分かりました (図 1B)。このことは、N-IDR が RNA 基質の効率的な取り込みに重要な役割を担っていることを示します。

次に、N-IDR が RNA に対する選択性を有しているのかを評価しました。DDX3X が認識する RNA には特定の配列モチーフが見いだされていないことから、RNA の「配列」ではなく、「高次構造」を認識しているのではないかという仮説に基づき、N-IDR のみにした DDX3X タンパク質断片と、さまざまな高次構造を持つ RNA との相互作用を比較しました。N-IDR は構造的に柔軟な特性を有していることから、X 線結晶構造解析^[10]やクライオ電子顕微鏡構造解析^[11]など、均一な構造を持つタンパク質に対する解析手法を適用するのが困難です。これに対し溶液 NMR 法は、柔軟なタンパク質分子であっても、NMR シグナル^[4]の変化から部位特異的な相互作用の情報を得ることができます。そこで本研究では、溶液 NMR 法を活用することで、IDR による RNA の認識機構を詳細に解析することとしました。

mRNA の非翻訳領域に含まれるとされる代表的な構造として、1 本鎖 RNA、2 本鎖 RNA^[3]、ループ構造^[3]を持つ RNA があります。まずこれらとの相互作用を解析したところ、N-IDR との結合は観測されませんでした (図 1C)。そこで解析対象を広げ、RNA の四つのグアニン同士が積み重なることで形成される特徴的な高次構造である GQ 構造を持つ RNA (GQ RNA) との相互作用を解析したところ、N-IDR は GQ 構造を持つ RNA と強く相互作用することを見いだしました。GQ 構造は、がん遺伝子の非翻訳領域などに含まれ、遺伝子の翻訳を抑制することが知られていることから、DDX3X の N-IDR は mRNA の非翻訳領域に形成される GQ 構造をマーカーとして選択的に認識することが示唆されました。

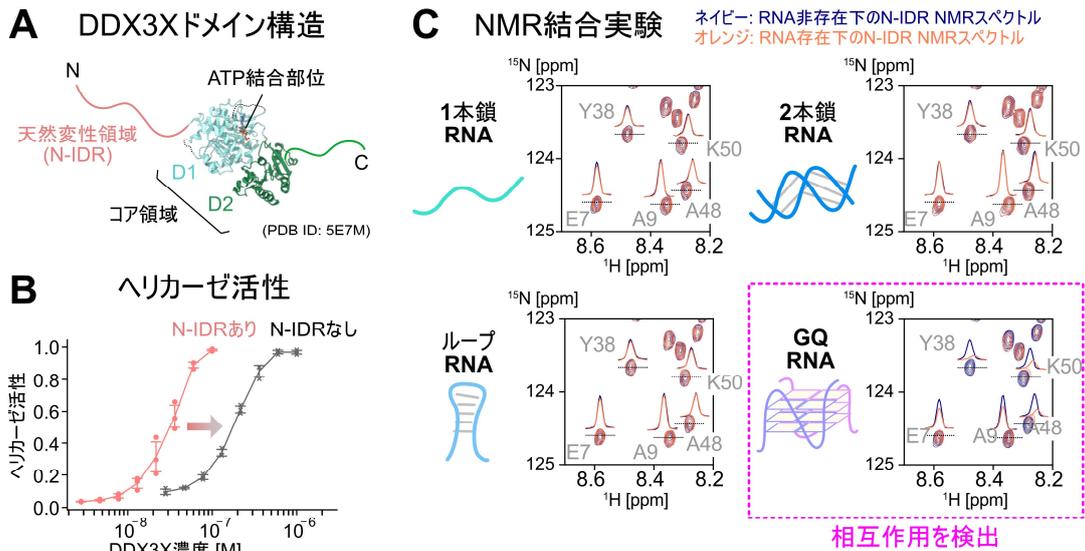


図 1 DDX3X タンパク質の構造とヘリカーゼ活性、および N-IDR と各種 RNA との相互作用

- A. DDX3X ドメイン構造。コア領域の立体構造はデータベース上で公開されているもの (PDB ID: 5E7M) を参照し、N、C 末端の天然変性領域、コア領域を色分けして示した。
- B. mRNA の高次構造モデル基質である 2 本鎖 RNA に対するヘリカーゼ活性の測定結果。N-IDR を含む全長 DDX3X タンパク質を用いた結果を赤、N-IDR を持たない DDX3X 変異体タンパク質の結果を黒でプロットした。
- C. DDX3X の N-IDR の主鎖アミド基の ^{15}N - ^1H NMR シグナルを観測し、1 本鎖 RNA (左上)、2 本鎖 RNA (右上)、ループ RNA (左下)、GQ RNA (右下) を添加した時のスペクトル変化を解析した。各スペクトルに添えられた記号は、観測したアミド基が属するアミノ酸残基 (1 文字記号で記す) がタンパク質中の何番目にあるかを示す (例: Y38→38 番目のチロシン残基)。RNA 添加前のスペクトルをネイビー、添加後のスペクトルをオレンジで重ね合わせて示した。1 本鎖 RNA、2 本鎖 RNA、ループ RNA の三つはいずれも RNA の添加前後のスペクトルがほぼ重なっているのに対し、GQ RNA 添加時には化学シフト値の変化やシグナル強度変化が顕著に観測されたことから、GQ RNA とより強く相互作用していることが分かった。

次に、GQ RNA との相互作用による N-IDR の部位特異的な NMR シグナルの変化を詳細に解析することで、N-IDR による GQ 認識機構を考察しました。解析の結果、N-IDR の配列の中には、正電荷を帯びたアミノ酸 (アルギニン残基) が連なるクラスター領域が複数存在し、これらのクラスター領域が GQ RNA との相互作用を担うこと、その認識には静電的な相互作用、疎水的な相互作用の両方が重要な役割を果たしていることを明らかにしました (図 2A)。

GQ 構造依存的な DDX3X の認識が、実際の遺伝子の mRNA 認識にも関連していることを示すため、DDX3X による翻訳制御を受けることが知られている *RAC1* 遺伝子、*ODC1* 遺伝子^[12]、*MITF* 遺伝子の非翻訳領域について、GQ 構造予測プログラムを用いた配列解析 (図 2B)、および NMR による GQ 構造形成の有無を評価したところ (図 2C)、いずれの遺伝子にも GQ 構造を形成する領域が存在することが分かりました。また、これらの遺伝子の mRNA から GQ 構造形成領域を切り出した RNA フラグメントは、N-IDR と強い親和性で相互作用することも確認できました。これらの結果から、N-IDR は mRNA に含まれる GQ 構造を介して特定遺伝子の mRNA を認識していることが支持されました (図 2D)。

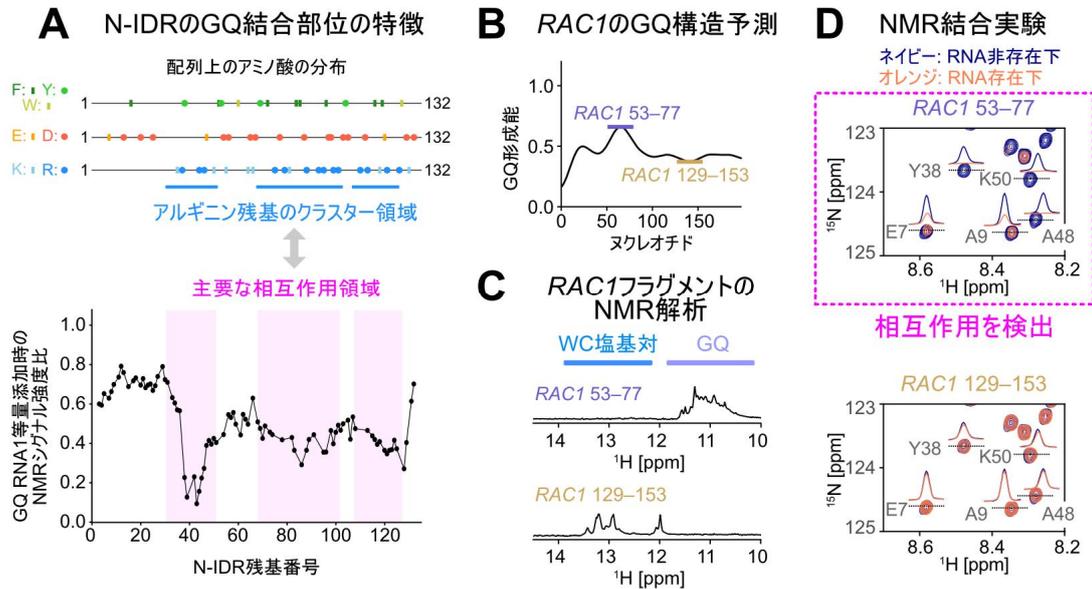


図 2 N-IDR の GQ RNA 認識部位と mRNA 非翻訳領域のフラグメント RNA との相互作用

- A. (上) N 末端の天然変性領域 (N-IDR) を形成する 132 個のアミノ酸残基の配列上にある芳香族アミノ酸 (Y: チロシン、W トリプトファン)、負電荷を帯びたアミノ酸 (E: グルタミン酸、D: アスパラギン酸)、および正電荷を帯びたアミノ酸 (K: リジン、R: アルギニン) の分布を示した。(下) GQ RNA を 1 等量添加したときの、N-IDR 各残基のシグナル強度比のプロット。顕著な強度減少を示した領域から、主要な相互作用領域を同定した。これらの相互作用領域は、配列上でアルギニン残基が集積したクラスター領域と一致することが分かった。
- B. RAC1 遺伝子の mRNA 5' 末端非翻訳領域の配列の GQ 構造予測。構造予測は rG4 detector ソフトウェアによって行い、GQ 構造を形成 (53-77)、もしくは形成しない (129-153) 領域のフラグメントを以後の解析に用いた。
- C. RAC1 の各フラグメントのイミノ領域 (RNA 塩基の NH 部分) の ^1H NMR スペクトル。RAC1 53-77 フラグメントでは GQ 構造に特徴的な化学シフトの領域にシグナルが観測され、GQ 構造を形成していることが確認できた。なお「WC 塩基対」は、相補塩基対で形成された典型的な核酸 2 本鎖構造 (Watson-Crick 型) を示す領域。
- D. RAC1 53-77、もしくは 129-153 フラグメントを用いた N-IDR との NMR 相互作用解析の結果。RNA 添加前のスペクトルをネイビー、添加後のスペクトルをオレンジで重ね合わせて示した。RAC1 53-77 添加時に化学シフト値の変化やシグナル強度変化が顕著に観測されたことから、GQ 構造を形成したフラグメントと相互作用していることが示された。

mRNA の非翻訳領域で GQ 構造が形成されると、その翻訳が抑制されることが知られています。そこで共同研究チームは、DDX3X はヘリカーゼ活性によって GQ 構造をほどこき、翻訳を促進する機能を持つのではないかと考えました。N-IDR とヘリカーゼ活性を担うコア領域の両方を持つ全長 DDX3X を使い、蛍光標識 GQ RNA に対するヘリカーゼ活性を測定したところ、DDX3X は GQ 構造をほどく活性を有していること、その活性効率は N-IDR に大きく依存していることが示されました (図 3A)。以上の結果から、DDX3X は N-IDR による GQ RNA の構造特異的な認識と、GQ RNA をほどくコア領域のヘリカーゼ活性が協奏的に働くことで、特定の mRNA を選択的に認識し、翻訳調節を効率的につかさどることを明らかにしました (図 3B)。

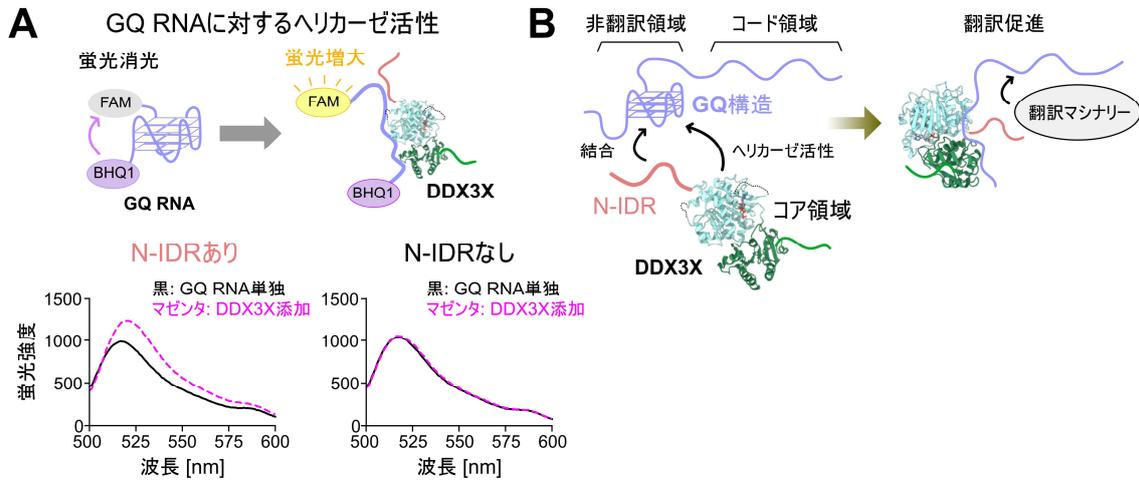


図3 DDX3XのGQ RNAに対するヘリカーゼ活性のアッセイと翻訳制御機構の模式図

A. (上) DDX3XのGQ RNAに対するヘリカーゼ活性の測定の様式図。二つの分子団の距離に応じて蛍光の強さが切り替わる仕組みを応用した。蛍光を発する蛍光団(FAM)と、その蛍光を打ち消す消光団(BHQ1)を付加したGQ RNAに対して、DDX3XがGQ構造をほどくと両者の距離が増大することで蛍光の増大が観測される。(下) N-IDRを含む全長DDX3Xタンパク質を用いた結果を左、N-IDRを持たないDDX3X変異体タンパク質の結果を右に示し、GQ RNA単独状態、DDX3X添加状態の蛍光スペクトルをそれぞれ黒、マゼンタで重ねて示した。変異体タンパク質は、ヘリカーゼ活性を担うコア領域を持っていても蛍光強度の変化が見られなかった。

B. 本研究で得られたDDX3Xの分子機構の様式図。DDX3XのN-IDRがmRNAの非翻訳領域に形成されるGQ構造をマーカーとして選択的に認識し、ヘリカーゼ活性を担うコア領域がGQ構造をほどくことで翻訳を促進する。

今後の期待

本研究では、翻訳を促進する機能を持つRNAヘリカーゼDDX3XのN-IDRに着目し、さまざまな高次構造を有するRNAとの相互作用、およびそのRNA認識の選択性を、溶液NMR法を活用することで解析しました。

本研究から明らかになったDDX3Xの分子機構は、DDX3Xが関与する遺伝子発現制御の分子レベルでの理解を深めるとともに、がんや神経発達症など、DDX3Xを標的とした創薬の基盤となる知見を供します。さらに、本研究で溶液NMR法を用いて明らかとなったIDRによるmRNA認識機構は、従来の「鍵と鍵穴」で例えられるような強固、かつ特異的な分子間相互作用ではなく、タンパク質分子の柔軟な性質を生かした弱く、かつ非特異的な分子間相互作用が集積することで機能する新たな認識様式であることが示されました。

IDRはヒトのプロテオーム(全タンパク質種)の大きな割合(およそ30%以上)を占め、機能的にも重要でありながら、特定の立体構造を示さないため創薬標的として極めて困難と考えられています。本研究の成果はIDRに対する新たな創薬戦略の指針を与えるものであり、特に、溶液NMR法から得られる分子・原子レベルでの知見は、既存の構造解析手法では解析が困難な、柔軟かつ動的なIDR-RNA相互作用に干渉する、新たな作用機序を持つ創薬技術の開発に貢献すると期待されます。

論文情報

<タイトル>

Regulatory role of the N-terminal intrinsically disordered region of the DEAD-box RNA helicase DDX3X in selective RNA recognition

<著者名>

Yuki Toyama, Koh Takeuchi, Ichio Shimada

<雑誌>

Nature Communications

<DOI>

10.1038/s41467-025-62806-7

補足説明

[1] メッセンジャーRNA (mRNA)、非翻訳領域

DNAから転写され、細胞が合成するタンパク質のアミノ酸の並び方の情報を持つRNAをメッセンジャー (mRNA) と呼ぶ。mRNAは、タンパク質をコードする翻訳領域に加えて、5'、3'末端にはそれぞれタンパク質をコードしない非翻訳領域が存在する。一部の遺伝子産物のmRNAの5'末端の非翻訳領域は2本鎖やループ、GQ構造などさまざまな高次構造 ([3]参照) を形成することが知られており、これらの高次構造形成は翻訳マシナリーの結合や機能を阻害することで、翻訳を抑制的に制御する。RNAヘリカーゼ ([2]参照) は、これらの高次構造をほどくことによって、特定の遺伝子の翻訳を促進する。

[2] RNAヘリカーゼ、DEAD-Box RNA helicase 3 X-linked (DDX3X)

RNAヘリカーゼは、RNAのヘリックス (らせん) 構造などの高次構造 ([3]参照) を解消する機能を持つ酵素。DEAD-Box RNAヘリカーゼは、活性部位にアスパラギン酸-グルタミン酸-アラニン-アスパラギン酸 (D-E-A-D) から成る保存された配列モチーフを持つことを特徴とする、RNAの高次構造をATP依存的にほどくRNAヘリカーゼのファミリーであり、ヒトRNAのヘリカーゼにおいて最も大きなファミリーを構成する。DEAD-Box RNA helicase 3 X-linked (DDX3X) はX染色体上にその遺伝子が存在するDEAD-Box RNAヘリカーゼの一種である。

[3] 高次構造、2本鎖RNA、ループ構造

アデノシン (A)、シチジン (C)、グアノシン (G)、ウリジン (U) の4種類のリボヌクレオシドから構成されるRNAが、分子間もしくは分子内で相互作用することで形成される立体構造をRNAの高次構造と呼ぶ。RNAの2本鎖構造は、分子間でAとU、もしくはGとCとの間で相補的な塩基対を組むことで形成される高次構造である。DNAの二重らせん型構造と類似しているが、リボースのコンフォメーション (立体配座) が異なるA型のらせん構造を典型的に形成することを特徴とする。ループ構造はRNAに一般的に見られる高次構造の一つで、同じ分子内でRNA鎖が逆平行に向かい合い塩基対を組むことで形成される。

[4] 溶液核磁気共鳴分光法（溶液 NMR 法）、NMR シグナル

溶液中の化合物や生体分子などを対象に、強い磁場中に置くことで生じる原子核の共鳴現象を観測することで、その化学構造や運動性といった情報を原子レベルで解析できる分光法。磁場の中に置いた試料に電磁波を照射し、そこから放出される電磁波を NMR シグナルとして検出する。NMR は Nuclear Magnetic Resonance の略。

[5] 天然変性領域（IDR）、 α ヘリックス

タンパク質の立体構造は、アミノ酸がつながってできた「ひも」状の構造が、らせん状（ α ヘリックス）や平面状（ β シート）などに折り畳まれて形成される。一方、固有の高次構造を形成しない領域は天然変性領域（IDR）と呼ばれ、ヒトのプロテオームの 30% 以上を占めるといふ試算もある。多くのタンパク質が IDR を有していると考えられているものの、IDR がタンパク質の生理的機能に果たす役割は明らかになっていないケースも多い。IDR は Intrinsically disordered region の略。

[6] グアニン 4 重鎖（GQ）構造

DNA や RNA において、四つのグアニン塩基が同じ平面上で非ワトソン・クリック型塩基対であるフーグスティーン型塩基対を形成し、重なり合うことで形成される特徴的な高次構造。グアニン塩基の中央には、カリウムイオンなどの 1 価の陽イオンが配位することで安定化に寄与する。GQ は G-quadruplex の略。

[7] *RAC1* 遺伝子

RAC1 タンパク質をコードする遺伝子。*RAC1* は細胞増殖や細胞骨格の形成などの機能を担う、低分子量グアニンヌクレオチド結合タンパク質の一種。*RAC1* 遺伝子の変異は、がん化を強く促進することでも知られている。*RAC1* は RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1 の略。

[8] *MITF* 遺伝子

小眼球症関連転写因子タンパク質をコードする遺伝子。*MITF* タンパク質はメラニン合成の調節を担う転写制御因子である。*MITF* の発現量は皮膚がんの一種であるメラノーマ（悪性黒色腫）において、がんの転移能と相関していることが示されており、がんの薬剤耐性とも関連することが知られている。*MITF* は Microphthalmia-associated transcription factor の略。

[9] N 末端、C 末端

タンパク質はアミノ酸残基が直鎖状に連結したポリペプチドで構成されることから、その始まりと終わりがある。タンパク質の始まりとなる 1 番目の残基（またはその主鎖アミノ基）が N 末端、終わりとなる最後の残基（またはその主鎖カルボキシル基）が C 末端と呼ばれる。

[10] X 線結晶構造解析

物質の結晶をつくり、それに X 線を照射して得られる回折データを解析することにより、物質の内部構造を調べる方法。

[11] クライオ電子顕微鏡構造解析

タンパク質などの生体試料を観察するために開発された電子顕微鏡を用いた構造解析法。タンパク質などの試料を含んだ溶液を薄く展開し、液体エタン (-183~-160°C) 中で急速凍結して試料をごく薄い氷の層に閉じ込めた上、液体窒素温度 (-196°C) で電子顕微鏡により観察する。

[12] ODC1 遺伝子

オルニチンデカルボキシラーゼ 1 をコードする遺伝子。生体内におけるポリアミンの生合成に関与する酵素の一種。ODC1 遺伝子をコードする mRNA は長く複雑な非翻訳領域を形成していることが知られている。また、神経芽腫などの一部のがんにおいて ODC1 の発現量が向上していることが報告されている。ODC1 は ornithine decarboxylase 1 の略。

共同研究チーム

理化学研究所 生命機能科学研究センター

生体分子動的構造研究チーム (研究当時)

チームリーダー (研究当時) 嶋田一夫 (シマダ・イチオ)

(現 生命医科学研究センター 生体分子動的構造研究チーム チームディレクター、バイオ産業情報化コンソーシアム (JBIC) 特別顧問、広島大学 副学長) 研究員 (研究当時) 外山侑樹 (トヤマ・ユウキ)

(現 生命医科学研究センター 生体分子動的構造研究チーム 客員研究員、東京大学 大学院薬学系研究科 特任助教)

東京大学 大学院薬学系研究科 生命物理化学教室

教授 竹内 恒 (タケウチ・コウ)

研究支援

本研究は、理化学研究所運営費交付金 (生命機能科学研究) で実施し、日本医療研究開発機構 (AMED) 「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (RNA 標的創薬技術開発)」による助成を受けて行われました。

発表者・機関窓口

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせください。

理化学研究所 生命機能科学研究センター

生体分子動的構造研究チーム (研究当時)

チームリーダー (研究当時) 嶋田一夫 (シマダ・イチオ)

(現 生命医科学研究センター 生体分子動的構造研究チーム チームディレクター、バイオ産業情報化コンソーシアム (JBIC) 特別顧問)

研究員 (研究当時) 外山侑樹 (トヤマ・ユウキ)

(現 生命医科学研究センター 生体分子動的構造研究チーム 客員研究員、東京大学 大学院薬学系研究科 特任助教)

東京大学 大学院薬学系研究科 生命物理化学教室

教授 竹内 恒 (タケウチ・コウ)



<機関窓口>

理化学研究所 広報部 報道担当

Tel: 050-3495-0247

Email: ex-press@ml.riken.jp

バイオ産業情報化コンソーシアム 問い合わせ窓口

URL: <https://www.jbic.or.jp/contact>

東京大学大学院薬学系研究科 庶務チーム

Tel: 03-5841-4702

Email: shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp
