

2021 年度 森喜朗記念研究振興基金 成果報告書
慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科 修士課程 2 年
先端生命科学 (BI)
西村 光平

グアニン四重鎖構造結合タンパク質の配列特異性の同定

研究目的

特定の繰り返し配列によって生じる RNA の小さな立体構造が、細胞内タンパク質との強い相互作用を持ち重大な遺伝病を引き起こすことが知られている。神経側索型筋萎縮症 (ALS) 及び前頭側頭型認知症 (FTD) は数百から数千回もリピートされる (GGGGCC)_n 超反復配列がノンコーディングレギオン C9orf72 に現れることが原因で引き起こされる疾患である。C9orf72 に現れた繰り返し配列は G-quadruplex (和訳: グアニン四重鎖, 省略: G4) と呼ばれる極めて結合能力の高い二次構造を持った RNA を生成し、神経細胞の核内でヌクレオリン (NCL などのタンパク質と結合して細胞内にゲル化したり凝集性ポリペプチドを形成したりすることで神経細胞を壊死させる。G4 の立体構造の安定性には環境のイオン濃度が非常に重要な役割を示すことが知られている。しかしながら G4 結合タンパク質のこれまでの研究では一本鎖 DNA を利用した *in vitro* の実験がほとんどであった。本研究では酵母の核内での RNA-タンパク質結合を実験できる Yeast Three Hybrid (Y3H) と呼ばれる *in vivo* の実験手法に加えて、一本鎖 RNA を用いたゲルシフトアッセイ、プルダウンアッセイといった *in vitro* 実験によって NCL などの G4 結合タンパク質の好む G4 配列の検証を行い、ALS や FTD のようなリピート配列による遺伝病のメカニズムの解明に向けて新たな知見を得る。

研究計画

① *in vivo* の実験方法: 酵母を用いた Yeast Three Hybrid (Y3H)

Yeast Tree Hybrid (Y3H) は RNA とタンパク質の結合を酵母の細胞内で確かめることのできる技術である。今回使用した YBZ-1 酵母株は RNA との結合を媒介する RNA/DNA 結合タンパク質 (MS2-LexA) を発現する遺伝子の予め組み込まれた酵母である。その MS2-LexA 融合タンパク質が HIS 合成遺伝子のプロモーター領域に結合し、RNA 上の MS2 ステムループ構造を付加した RNA と結合する。この RNA を、検討の対象となる RNA-X と呼ぶ。更に、RNA-X と結合するかどうかを検討したいタンパク質は、HIS 合成遺伝子を活性化するアクティベーションドメイン (AD) と融合した状態で発現させる。このたんぱく質を、Protein-Y と呼ぶ。導入した RNA 配列とタンパク質が細胞内で結合すれば、タンパク質に付与されたアクティベーションドメインがプロモーター下流にある HIS 合成遺伝子を活性化し、酵母はヒスチジン抜き制限培地で生存できる。RNA への MS2 ループ構造の付与と、タンパク質への HIS3 アクティベーションドメインの導入はそれぞれ、RNA ポリメラーゼ III プロモーターを含む pIII/MS2-2 プラスミドと RNA ポリメラーゼ II プロモーターを含

む pGAD プラスミドに導入したい配列を挿入することで行える (図 1) (Hook et al., 2005)

②in vitro の実験方法:ゲルシフトアッセイ

RNA の G4 構造は一価及び二価のイオンの濃度依存的に形成されることが知られている. 本実験では, (GGGGCC)_n リピート配列がどのような条件で G4 を形成し, NCL タンパク質に結合するかをゲルシフトアッセイで検証する. ゲルシフトアッセイでは, RNA G4 と G4 を形成しない RNA のサイズによる分離, または NCL タンパク質が結合したものとそうでないもののサイズによる分離を行うことが可能であるため, RNA G4 と NCL タンパク質が結合する条件を同定するのにふさわしい実験である. また, RNA G4 の配列は, T7 RNA ポリメラーゼプロモーター付きの DNA 合成オリゴとして発注し, in vitro でアニーリングさせて, in vitro 転写を行うことで合成する予定である.

③in vitro 実験方法:プルダウンアッセイ

(GGGGCC)_n 以外にも G4 構造を形成する RNA 配列は多く存在することが先行研究で示唆されているものの, NCL タンパク質が好む G4 形成配列についての網羅的検証が行われていない. NCL が結合可能な RNA G4, またはその中でも比較的効率良く結合する配列を同定するためには, プルダウンアッセイを行う. プルダウンアッセイでは, His タグ付きのヒト NCL タンパク質とランダムな RNA 配列を混合し, マグネットビーズに結合した His 抗体で NCL タンパク質とそれに結合した RNA を精製する. そのために上記のリコンビナント His タグ NCL タンパク質と, GC 含量の高い配列を適度にランダム合成し, NCL と混合して His 抗体でプルダウンする. His 抗体と結合した RNA をシーケンスして網羅的に解析することで, NCL が結合しやすい配列を同定する.

研究成果

①in vivo の実験方法:酵母を用いた Yeast Three Hybrid (Y3H)

YBZ-1 株, YBZ-2 株を YPAD 培地で培養し, YPAD 上でコロニーを混合し, 30°C 4 時間培養した後, YPAD 寒天培地にストリークし, 36 コロニーから *MAT* locus のコロニー PCR を行った. その結果二倍体になっているコロニーが 5 つ見られた. 2 倍体の割合は約 14%であった(図 1). YBZ-1 と YBZ-2 は接合が可能である.

次に実験のさらなる効率化を図るために液体培地を用いた接合の条件検討を行った. YBZ-1 株に pIII A/MS2-2 mock, pGAD424, pIII mut-HP, YBZ-2 株に pIII A/MS2-2 mock, pGAD424, pACT-HBP を挿入した. Mating における最適な YPAD 培養時間を求めるため, プラスミドを導入した YBZ-1 株, YBZ-2 株をそれぞれ 3 サンプルずつ YPAD で培養し, 7h, 13h, 19h, 24h, 48h, 72h に OD600 を測定した. 同時に, 細胞ペレットを採取して -80°C で保存した. YBZ-1 株, YBZ-2 株の各タイムポイントにおいて OD600 を測定した. その結果 YBZ-1 株は YBZ-2 株に比べて増殖スピードが早く, 48 h で増殖限界に達することが示唆された. YBZ-2 株は 24 h, 48 h の時点で YBZ-1 株と比べて細胞数が約半分であった(図 2).

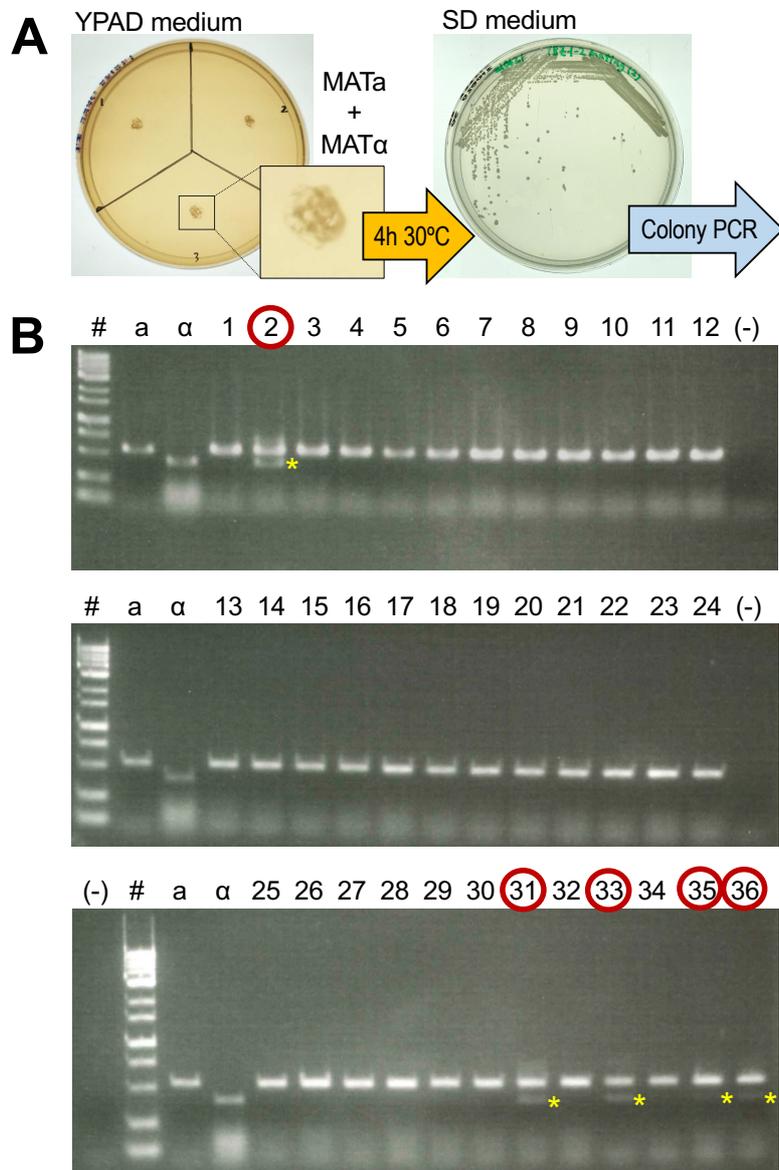


図1 コロニーPCR

aはMATaのコントロール, αはMATαのコントロール株から得られた結果である. 1~36はコロニーの番号を示す. 2つのバンドが同時に示されているもの(2, 31, 33, 35, 36)が二倍体である.

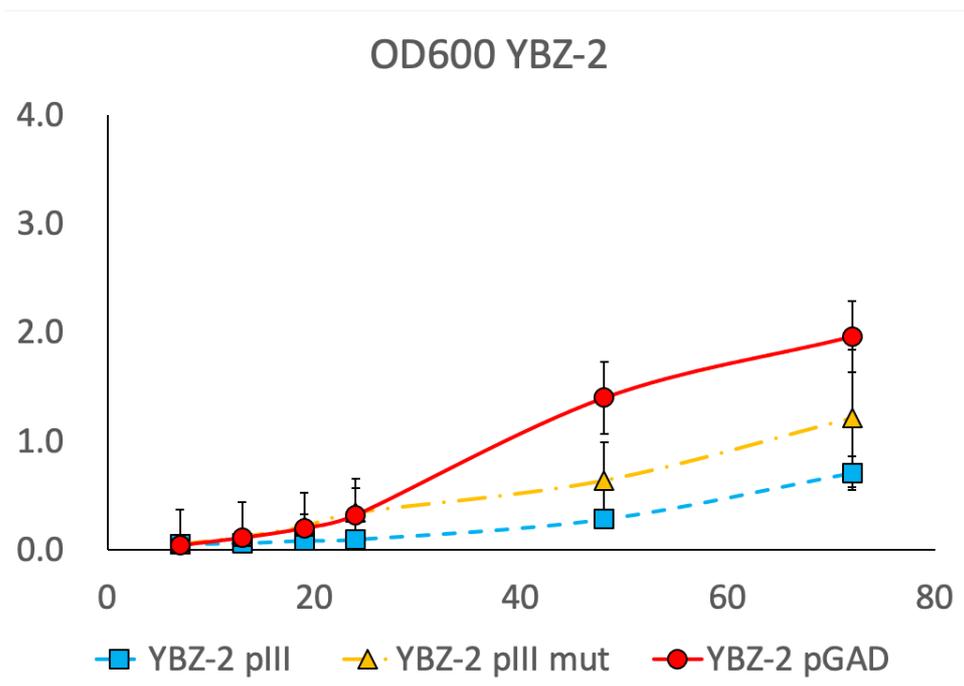
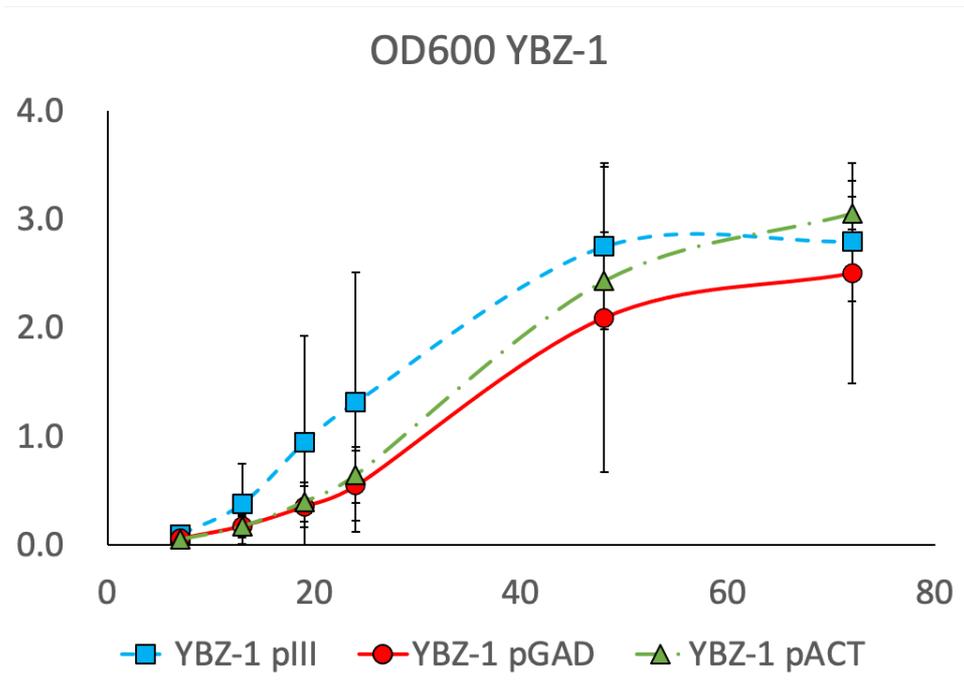


図2 YBZ-1株, YBZ-2株のYPAD培養タイムコース

YBZ-1株にpIII/MS2-2 mock, pGAD424, pIII mut-HP, YBZ-2株にpIII/MS2-2 mock, pGAD424, pACT-HBPを挿入したサンプルをYPADで培養し, 7h, 13h, 19h, 24h, 48h, 72hにOD600を測定した.

②③in vitro の実験方法;ゲルシフトアッセイ&プルダウンアッセイ

ランダム合成した配列と実際の細胞内で合成される配列の比較対象として発生のモデル生物であるアフリカツメガエルの胚を用い、発生過程において発現する RNA-G4 の大規模スクリーニングを行う。本年度は主にアフリカツメガエルの生育環境の構築と文献調査を行い、両生類においても保存されている G-quadruplex 結合タンパク質 (G4BP) として FMRP と HNRNP A1 の 2 つのタンパク質が、G-quadruplex (G4) 特異的に結合し、かつアフリカツメガエルにおいて保存されていることから今後の実験の対象として適当であると判断した。Human fragile X mental retardation protein ヒト脆弱 X 精神遅滞タンパク質(FMRP)は RGG ドメインを持つタンパク質の一つである。FMRP に存在する RGG は RNA-G4 に高い親和性で強力に結合する。また、FMRP に含まれる RGG ドメインがヒト脆弱 X 精神遅滞症候群の病理学的原因である可能性が示唆されている。HNRNP A1 は RNA recognition motif (RRM) ドメインを持つタンパク質の一つである。RRM ドメインは 1 本鎖グアニンリピートに高い親和性を持つが、特に HNRNPA1 はループの塩基を認識することでテロメアの RNA-G4 ループに結合することが知られている。FMRP と HNRNP の 2 つのタンパク質についてプルダウンアッセイによるタンパク質 RNA 結合実験を行えるように、タンパク質の発注及びカスタムオリゴの設計を行った。

今後の展望

①in vivo の実験方法;酵母を用いた Yeast Three Hybrid (Y3H)

qPCR を用いて YPAD 培養条件下でのタイムコースにおけるプラスミド配列のコピー数を測定し、最適な YPAD 培養時間を求める。その後至適条件による液体培地での Y3H を行い、G4 配列と G4BP の結合を実験する。

②③in vitro の実験方法;ゲルシフトアッセイ&プルダウンアッセイ

精製タンパク質が手に入らなかった FMRP の ORF をカスタムオリゴで設計し cDNA に組み込む。His タグ付き FMRP を E.coli によって発現させ、精製する。(GGGGCC)_n リピート配列とアフリカツメガエル胚から抽出した total RNA と NCL, FMRP, HNRNPA1 の結合をプルダウンアッセイ、ゲルシフトアッセイによって実験する。

謝辞

森喜朗記念研究振興基金より提供いただいた研究費は His タグ付き NCL タンパク質と His タグ付き HNRNP A1 タンパク質の発注及びアフリカツメガエル育成用品を購入するための予算として利用いたしました。ご支援いただき感謝いたします。