

令和元年6月6日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18680

研究課題名(和文) DNA/RNAミスマッチ認識蛋白質を用いた高精度逆転写による相同miRNAの識別

研究課題名(英文) Specific detection of miRNA by mismatch-binding protein-mediated reverse transcription

研究代表者

福井 健二 (Fukui, Kenji)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：00466038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：miRNAの中には数塩基の違いしか持たない相同miRNA群からなるファミリーが存在する。その中には癌遺伝子の活性を制御するものがあり、その発現プロファイルの解析は癌診断や治療戦略の策定に重要である。本研究では、ミスマッチ認識タンパク質を利用した高精度の逆転写反応によって相同miRNAを識別する簡易な手法の確立を目的とした。高度好熱菌由来の機能未知タンパク質群の中から、DNA/RNAハイブリッドから成る不対合塩基を認識できるタンパク質を同定した。それらが、誤対合したプライマーからの逆転写反応を特異的に抑制することを明らかにし、高精度逆転写反応に利用可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の基礎研究、診断や治療戦略策定手順の改善は国民の福祉に関する大きな課題である。各種癌組織で特異的な発現パターンを示す相同miRNAの正確な解析は上記の課題にとって今後益々必要になると予想される。本研究では、ミスマッチ認識タンパク質を利用することで、相同miRNA発現パターンの簡便な解析方法の構築を目指した。まず、複数のミスマッチ認識タンパク質を新たに同定する事に成功した。さらに、これらのタンパク質が逆転写反応の高精度化に有効であることを示した。今後、この手法をさらに発展させることが出来れば癌に関する基礎研究や診断手法の前進に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Homologous miRNAs have only a few base differences to each other. Some of them control the expression of oncogenes; therefore, analyses of their expression profiles are important for cancer diagnosis and therapeutic strategies. In this study, we aimed to establish a simple method to identify expression patterns of homologous miRNAs by highly accurate reverse transcription using mismatch recognition proteins. From the group of functionally unknown proteins derived from extremely-thermophilic bacterium, we identified proteins capable of recognizing unpaired bases consisting of DNA / RNA hybrids. It was revealed that those proteins specifically suppress reverse transcription from mispaired primers and showed that they could be used for high-precision reverse transcription.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：ミスマッチ タンパク質 逆転写 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

miRNA は 20-25 塩基からなるノンコーディング RNA で、mRNA に相補的に結合することで多様な遺伝子の発現を調節している。中でも、細胞増殖に関わる miRNA は、各種がん細胞のマーカーとなるため大きな注目を集めている。miRNA を検出する技術の中で代表的なものは逆転写定量 PCR に基づく手法で、特別なプライマーを用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した後、定量 PCR を行うというものである。

miRNA の中には、数塩基の違いしか持たない相同 miRNA 群からなるファミリーが多数存在する。例えば、ヒト let-7 ファミリー miRNA は、8 種類以上のホモログの存在が知られている。これらは Ras や HMGA2 といった癌遺伝子の活性を抑制しており(Johnson *et al.* (2005) *Cell* **120**, 635-47)、乳がん、肺がん、胃がん、肝がん組織での特徴的な発現プロファイル変動が確認されている。このように相同 miRNA の発現プロファイルの解析はがんの診断、治療戦略の選択や基礎研究に重要である。

2. 研究の目的

これまでに、好熱性細菌由来の耐熱性 DNA ミスマッチ認識タンパク質 MutS を用いることで、PCR における非特異的増幅を抑制する技術を確立した (Fukui *et al.* (2013) *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6436-53)。これは、鋳型鎖とプライマーの誤対合により生じたミスマッチ塩基に MutS が強く結合し、ポリメラーゼの接近を阻害するためである。このミスマッチ認識タンパク質を利用することで逆転写反応の特異性を向上させ、相同 miRNA の識別が可能な簡便な技術を確立する。

3. 研究の方法

高度好熱菌や超好熱菌由来のミスマッチ認識タンパク質の大量発現系を構築し、精製法を確立した。これらのタンパク質の詳細な機能解析を行い、各種ミスマッチ塩基対に対する親和性を確認した。さらにそれらのタンパク質を用いて DNA を鋳型にした PCR 反応や RNA を鋳型にした逆転写反応への影響を調べた。また、これまでに同定されていたミスマッチ認識タンパク質以外の未知のミスマッチ認識タンパク質の同定を目指し、核酸結合ドメインを有する機能未知タンパク質群 (好熱性真正細菌由来 MutS2、好熱性古細菌由来 MutS1 や MutS5、ウイルス由来 MutS7、その他の機能未知タンパク質) についても同様の解析を行った。この過程で得られたミスマッチ認識タンパク質を用いて、miRNA 検出の逆転写反応の高精度化を試みた。具体的には、let-7 miRNA (全 8 種類) のうち 1 種を鋳型として選び、8 種に対応したプライマーを用いて逆転写反応を行った。この反応に MutS2 または BsbP を加えることで、正しい鋳型とプライマーの組み合わせでのみ逆転写が行われる条件を探索した。

4. 研究成果

高度好熱菌および超好熱菌由来 MutS は DNA/DNA から成るミスマッチは認識できるが、DNA/RNA から成るミスマッチを認識できなかった。そのため、DNA を鋳型にした PCR では機能するが、RNA を鋳型にした逆転写反応では非特異的増幅抑制効果は示さなかった。そこで、好熱性細菌由来タンパク質の中からスクリーニングによって DNA/RNA から成る幅広いミスマッチを認識するタンパク質を 2 種類同定した。ひとつは、過去に相同組換え中間体である分岐 DNA 構造を認識するタンパク質として同定されていた MutS2、もうひとつは、機能未知タンパク質 BsbP である。両者ともに、数塩基の突出ループ部位を含む 2 本鎖 DNA 構造を特異的に認識した。このような構造は、プライマーが鋳型鎖と誤対合した際に生じる構造であり、これらのタンパク質が PCR におけるノイズの低減に役立つ可能性を示す結果であった。実際に、両タンパク質を PCR 反応液に加えることで、非特異的増幅を抑制する効果が得られることを確かめた (図 1)。

さらに、MutS2 および BsbP は、MutS と異なり、DNA/RNA から成るループ構造を認識することが出来、逆転写反応への応用が期待できた。ループ構造を生じるように設計したプライマーからの逆転写を特異的に阻害することが確かめられた。次に、8 種類の let-7 miRNA を鋳型として、それぞれに対応したプライマーを用いて逆転写反応を行い、MutS2 および BsbP の効果を調べた。この際、正しくない組み合わせの場合に、6 塩基以上のループ構造が生じるようにプライマーを設計する必要があることが分かった。そのため、MutS2 および BsbP では、8 種全てを識別することが困難であり、1 塩基のミスマッチでも認識できる DNA/RNA 結合タンパク質が必要であった。

そこで、BsbP または MutS2 タンパク質の改変を目指し、両タンパク質の X 線結晶構造解析を行った。両者ともに良好な結晶が得られ、大型放射光施設 SPring-8 の放射光を用いて、X 線回折像の測定に成功した。

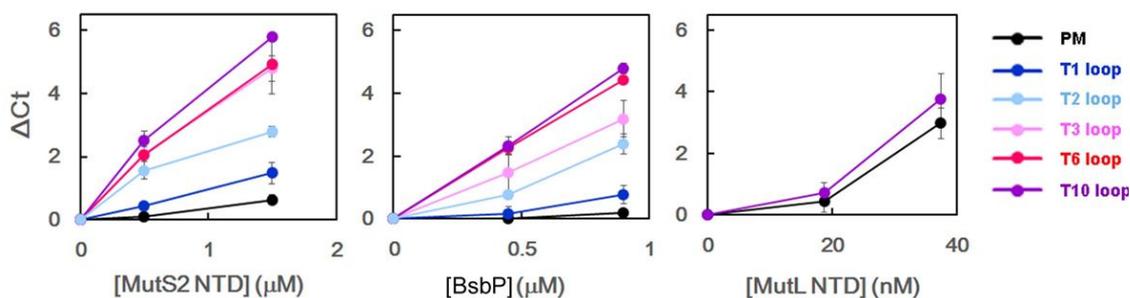


図 1: 逆転写反応における MutS2 および BsbP の効果。鋳型 RNA に対してミスマッチを生じないプライマー (PM) または 1、2、3、6、および 10 塩基の T がループ状に突出するように設計したプライマー (それぞれ T1、T2、T3、T6、および T10) を用いた逆転写反応を各濃度の MutS2 N-terminal domain (NTD) または BsbP 存在下で行った。逆転写後の DNA を鋳型に qPCR を行い、Ct を計算した。それぞれ、MutS2 NTD や BsbP を加えなかった際を基準とし、Ct 値の増加をグラフに表した。つまり、Ct 値が増えるほど、抑制がかかったことを示している。ネガティブコントロールとして、ミスマッチ認識能の無い MutL NTD を用いた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Ai Minobe, Kenji Fukui, Hitomi Yonezu, Koki Ohshita, Saki Mizobuchi, Takashi Morisawa, Yuichi Hakumai, Takato Yano, Makoto Ashiuchi, Taisuke Wakamatsu. Biochemical Characterization of mismatch-binding protein MutS1 and nicking endonuclease MutL from a euryarchaeon *Methanosaeta thermophila*. DNA Repair, 査読有, 75, 2019, 29-38.

Koki Ohshita, Kenji Fukui, Mizuki Sato, Takashi Morisawa, Yuichi Hakumai, Yuki Morono, Fumio Inagaki, Takato Yano, Makoto Ashiuchi, Taisuke Wakamatsu. Archaeal MutS5 tightly binds to Holliday junction similarly to eukaryotic MutSγ. The FEBS Journal, 査読有, 284, 2017, 3470-3483.

〔学会発表〕(計 4 件)

美濃部亜衣、福井健二、米津ひとみ、大下紘貴、溝淵早紀、森澤高至、白米優一、矢野貴人、芦内誠、若松泰介、*Methanosaeta thermophila* 由来ミスマッチ結合タンパク質 MutS1 及びニッキングエンドヌクレアーゼ MutL の生化学的機能解析、第 19 回極限環境生物学会年会、2018

大下紘貴、福井健二、佐藤瑞希、森澤高至、白米優一、諸野祐樹、稲垣史生、矢野貴人、芦内誠、若松泰介、アーキア由来機能未知 MutS ホモログ MutS5 の DNA 結合特異性解析、日本農芸化学会 2017 年度中四国支部大会、2017

大下紘貴、福井健二、佐藤瑞希、森澤高至、白米優一、諸野祐樹、稲垣史生、矢野貴人、芦内誠、若松泰介、MutS5 は Holliday junction DNA など分岐鎖 DNA と強く結合する、第 17 回日本蛋白質科学会年会、2017

大下紘貴、福井健二、北村萌、佐藤瑞希、森澤高至、白米優一、矢野貴人、芦内誠、若松泰介、工業利用に向けた推定上新規 DNA ミスマッチ修復タンパク質の機能解析、日本農芸化学会 2016 年度中四国支部大会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。