

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19199

研究課題名(和文)トリプレットリピート病の鍵を握るRNA凝集体の直接観察と検出法の開発

研究課題名(英文)Visualization and detection of the key ribonucleoprotein aggregates of DM1

研究代表者

森井 孝 (Morii, Takashi)

京都大学・エネルギー理工学研究所・教授

研究者番号：90222348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：筋強直性ジストロフィー1型の患者では、DMPK遺伝子の3'側非翻訳領域に存在するCTGリピート配列の繰り返し数が百から数千と異常に増加する。この遺伝子から合成されるmRNAの異常伸長したCUGリピート配列に、タンパク質MBNL1が結合して、核内で凝集体を形成する。本研究では、細胞外で構築したCUGリピートRNAの集積場を用いて、CUGリピート配列の繰り返し数に応じたRNA集合体を構築し、その構造を解析した。このRNA集合体を用いることで、CUGリピート配列RNAとMBNL1タンパク質との凝集体形成の分子機構を解析するとともに、凝集体に結合する分子を探索することが可能になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋強直性ジストロフィー1型を理解するうえでの重要な鍵は、『なぜ、正常な繰り返し数のCUGリピート配列mRNAにMBNL1が結合しても凝集体は形成されないが、繰り返し数が増加したCUGリピート配列mRNAでは凝集体が形成されるのか?』であるが、MBNL1とmRNAが形成する凝集体の構造および物性は未だに不明である。RNA-タンパク質の凝集現象は、アルツハイマー病に関連するアミロイドなどのタンパク質凝集体に比べて化学的知見が乏しく、未開拓な学術領域である。本研究成果によって提供されるRNA集合体を用いることによって詳細な凝集体の解析が可能になると共に、創薬研究が推進される。

研究成果の概要(英文)：Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) is a trinucleotide repeat expansion disease caused by CTG repeat expansion in the 3'-UTR of DMPK gene. The mRNA derived from DMPK gene with hundreds and thousands of CUG repeats forms toxic foci with RNA-binding proteins such as MBNL1. This research constructed an in vitro model of expanded CUG repeat by using given numbers of CUG repeats. The RNA assembly was constructed on a DNA nanoscaffold by placing RNA with 10, 20 or 28 repeats of CUG in close proximity. The resulting RNA assembly with four or 36 CUG-repeat RNAs was characterized by means of agarose gel electrophoresis and AFM imaging.

研究分野：生物機能化学

キーワード：トリプレットリピート病 RNA凝集体 DNAナノ構造体 高速AFM 核酸関連化学

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

## 1. 研究開始当初の背景

ハンチントン病や筋強直性ジストロフィーなどの遺伝性神経疾患は、特定の遺伝子中の CTG などの 3 塩基の繰り返し配列 (トリプレットリピート) の繰り返し回数がある程度以上に多くなると発症する。これらのトリプレットリピート病と総称される疾患では、疾患遺伝子中のリピートの長さが親から子孫への遺伝に伴って増加する。トリプレットリピートの反復回数が増える要因は謎に包まれている。

筋強直性ジストロフィー 1 型 (DM1) の患者では、筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ (DMPK) 遺伝子の 3' 側非翻訳領域に存在する CTG リピート配列の繰り返し数が百から数千と異常に増加する。この遺伝子から合成される mRNA の異常伸長した CUG リピート配列に、スプライシング因子であるタンパク質 MBNL1 が結合して、核内で凝集体を形成し、細胞のスプライシング機能に異常が生じて発病する機構が提唱され、これまでの変異タンパク質が原因となる疾患とは異なる「RNA 病」として注目されている。

この疾患 DM1 を理解するうえでの重要な鍵は、『なぜ、正常な繰り返し数の CUG リピート配列 mRNA に MBNL1 が結合しても凝集体は形成されないが、繰り返し数が増加した CUG リピート配列 mRNA では凝集体が形成されるのか?』であるが、MBNL1 と mRNA が形成する凝集体の構造および物性は未だに不明である。さらに、RNA-タンパク質の凝集現象は、アルツハイマー病に関連するアミロイドなどのタンパク質凝集体に比べて化学的知見が乏しく、未開拓な学術領域である。

RNP の凝集体形成が疾患の特徴となる「RNA 病」には、『なぜ正常な繰り返し数の CUG リピート配列は MBNL1 タンパク質と凝集体を形成せずに、繰り返し数が増加した CUG リピート配列では凝集体が生じるのか』という謎がある。これまでに、この RNA-タンパク質 (RNP) 凝集体は電子顕微鏡による観察により、繰り返し数 136 の CUG リピート RNA において、25 nm 程度の直径を持つリング形状の構造体が観測されている (Nucleic Acid Res. 2007, 35, 5474)。リピート数が 20 以下の配列では MBNL1 と CUG リピートとの強い相互作用は認められていない (EMBO J. 2000, 19, 4439)。MBNL1-CUG リピート複合体 RNP 凝集体の形成過程を、蛍光タンパク質を利用した FRAP 法により速度論的に解析した (J. Cell. Sci. 2011, 124, 1703) が、生体内では凝集体それぞれが異なる凝集特性を示し、凝集体形成の機構は未だ不明である。これを明らかにするためには、正常な繰り返し数の CUG リピート RNA が形成するタンパク質との複合体 RNP と異常に伸張した CUG リピート RNA とが形成する RNP の構造・物性を「細胞外」で詳細に解析することが突破口となる。CUG リピート数や MBNL1 タンパク質の濃度など、凝集体形成に関与する要因を系統的に変化させて、RNP 凝集体形成機構を化学量論に解析することが重要である。

しかしながら、百～数千の CUG 繰り返し数を持つ RNA を合成し、それらと MBNL1 タンパク質が不規則に形成する凝集体の構造を解明することは困難である。そこで、申請者がこれまでに培った、RNA-タンパク質複合体の作製技術と、DNA ナノ構造体を利用してタンパク質を一分子ずつナノメートルの精度で配置する技術 (Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 2421; Chem. Commun. 2015, 51, 1016; J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3012 など) を応用して、「数千の繰り返し数を持つ CUG リピート配列 RNA に相当する RNA の空間配置を DNA ナノ構造体上で再現する」ことを考えた。

アミロイド やタウなどの病因タンパク質が凝集体を形成する機構に関する知見は多くの研究報告がある。しかしながら、「RNA 病」で注目を集め始めた RNA とタンパク質の凝集体に関する研究は、これまでに報告例が乏しく未開拓な分野である。百～数千の繰り返し数を持つ

CUG リピート配列 RNA とタンパク質との凝集体を系統的に作製して解析することは、従来の生物化学手法では難しい。そこで、本研究では、新しい RNA とタンパク質の凝集体の解析法を提唱する。DNA ナノ構造体には、RNA を分子の数、距離を制御して一分子ずつ配置することができる。この方法を応用して、「RNA の分子数 (= CUG リピート RNA の繰り返し回数)」と、「RNA の空間配置 (= CUG リピート RNA の高次構造)」を制御して、「数千の繰り返し数を持つ CUG リピート配列 RNA に相当する RNA の空間配置を細胞外で再現」する。この集積化した CUG リピート配列 RNA と MBNL1 タンパク質との複合体・凝集体を、高速 AFM 測定によって経時的に解析することにより、その形成機構解明と物性解析に挑戦する。

## 2. 研究の目的

本研究では、CUG リピート配列 RNA の化学特性と MBNL1 タンパク質との凝集体形成の分子機構と凝集体の化学特性を明らかにする。CUG リピート RNA の集積場を用いることによって CUG リピート RNA と MBNL1 が形成する凝集体に特異的に結合し、凝集体を分解する分子を探索する実験系を提供する。

## 3. 研究の方法

異常に増加した CUG リピート配列 RNA の空間配置を細胞外で再現し、MBNL1 との相互作用を解析する。そのために、正常な繰り返し数の CUG リピート RNA を、RNA 鎖の数および間隔をナノメートル精度で制御して DNA ナノ構造体で作製した鋳型に配置し、数千の繰り返し数に相当する CUG リピート RNA の集積場を構築する。細胞外で構築した CUG リピート RNA の集積場を用いて、CUG リピート配列の繰り返し数に応じて、RNA 構造体の性質がどのように変化するかを解析する。さらに、CUG リピート配列の繰り返し数に応じて、どのような MBNL1 タンパク質との RNP 複合体が形成されるかが解析できる。

## 4. 研究成果

DMPK 遺伝子で正常な CTG の繰り返しとみなされる 30 回 CUG 配列が繰り返した RNA [(CUG)<sub>30</sub>RNA] を基本単位として合成する。30 回から 1000 回以上の CUG リピートを細胞外で再現するため、DNA ナノ構造体上に CUG<sub>30</sub>RNA を配置した。まず、数千の CTG リピート配列が形成する構造を再現するために、30 回の CUG 繰り返し配列を有する RNA を、数ナノメートルの間隔で配置した。RNA 分子の数、距離を制御して一分子ずつ配置する。この配置を実現するために、DNA ナノ構造体によって「足場」を設計した。一辺 60 nm の空孔を持つ DNA ナノ構造体(杉山ら、J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 1592 など)を DNA オリガミ法によって作製し、アガロースゲル電気泳動と高速 AFM によって構造を確認した。

DNA ナノ構造体上で核酸構造を解析できるかを検証するために、DNA ナノ構造体の空孔に DNA カテナンを導入し、アガロース電気泳動と高速 AFM によってカテナン構造を確認した。

さまざまな繰り返し数に相当する CUG リピート RNA を集積させ、それらの形状・性質および、それらと MBNL1 タンパク質との結合によって精製する RNP 凝集体構造および動的な凝集体形成過程を観察するために、60 nm x 90 nm の平面 DNA ナノ構造体を作製し、アガロースゲル電気泳動と高速 AFM によって構造を確認した。平面 DNA ナノ構造体には、4 nm もしくは 5 nm の間隔で CUG リピート RNA を導入するタグを 4 箇所もしくは 36 箇所導入した。

平面 DNA ナノ構造体に導入するため、10、20、28 回の CUG 繰り返し配列を有する CUG リピート RNA を作製した。これらの CUG リピート RNA を平面 DNA ナノ構造体に導入し、高速 AFM によ

て構造を解析した結果、10回のCUG繰り返し配列を4箇所導入すると1.0 nm、36箇所では3.2 nmの高さのRNA集合体が観察された。20回のCUG繰り返し配列を4箇所導入すると1.6 nm、36箇所では3.5 nmの高さのRNA集合体が観察された。

RNAと結合実験に用いるMBNL1タンパク質を作製した。C末端にHisタグを導入する際に、MBNL1のC末端との間にThrombin切断サイトを挿入し、精製後にタグを除去できるようにした。

これら、の結果から、一辺60 nmの空孔を持つDNAナノ構造体は、DNAトポロジー構造の形成とその可視化を可能にする事が明らかになった。また、空孔内に橋渡しした一本鎖DNAとともに、空孔周辺部に一本鎖DNAを導入することにより、30回のCUG繰り返し配列を有するRNAを多数配置出来る可能性が実証できた。

#### 【今後の展開】

本研究で構築した、CUGリピートRNAの繰り返し数・RNAの分子数・空間配置を制御したCUGリピートRNA集積場を用いて、それぞれのRNA集積状態でMBNL1タンパク質が形成する複合体の大きさ・形状を、高速AFMを用いた観察によって明らかにできる。また、複合体の動的な形態変化を経時的に観察することにより、凝集体形成の速度論的な知見が得られる。それとともに、凝集体と結合、分解する分子のスクリーニングが可能になるため、以下の、の研究展開が期待出来る。

CUG30RNAの数・空間配置を制御したCUGリピートRNA集積場において、それぞれのRNA集積状態(=リピート数)でMBNL1タンパク質が形成する複合体(凝集体)の大きさ・形状を、高速AFMを用いた観察によって明らかにする。また、複合体および凝集体の動的な形態変化を経時的に観察することにより、凝集体形成の速度論的な知見を得る。さらに、CUGリピートRNA結合分子(中谷ら、Nature Chem. Biol. 2005, 1, 39; ZimmermanらJ. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 14180)と凝集体との結合を観測する。

MBNL1と凝集体を形成するCUGリピートRNA集積場から形成されるRNP凝集体に特異的に結合するペプチドをファージディスプレイ法(Science 1985, 228, 1315)によって探索する。得られたペプチドを蛍光色素で修飾し、細胞内でCUGリピートRNAとMBNL1が形成する凝集体を可視化する検出ツールとしての機能を検証する。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. Nakano, S., Tamura, T., Das, R. K., Nakata, E., Chang, Y.-T., Morii, T.  
A diversity-oriented library of fluorophore-modified receptors constructed from a chemical library of synthetic fluorophores.  
ChemBioChem 2017, 18, 2212-2216.  
DOI: 10.1002/cbic.201700403
2. Y. Park, D. Nim-anussornkul, T. Vilaivan, T. Morii, B.H. Kim  
Facile conversion of ATP-binding RNA aptamer to quencher-free molecular aptamer beacon  
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 28, 2, 77-80  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.12.008
3. Nakano, S., Shimizu, M., Dinh, H., Morii, T.  
Highly selective dual sensing of ATP and ADP using fluorescent ribonucleopeptide sensors.

ChemChem. 2018, 55, 1611-1614.

DOI: 10.1039/C8CC09934K

〔学会発表〕(計 8件)

1. A. Rajendran, S.-J. Park, E. Nakata, Y. Kwon, T. Morii

Assembly of DNA Rotaxane and Catenane Inside a DNA Origami Frame

第 11 回バイオ関連化学シンポジウム

2017.9.6-8

2. 仲野瞬, 田村友樹, Das Raj Kumar, 中田栄司, Chang Young-Tae, 森井孝

蛍光分子ライブラリーとリボヌクレオペプチドリセプターを利用したセンサーの作製

第 11 回バイオ関連化学シンポジウム

2017.9.6-8

3. S. Nakano, T. Tamura, Das Raj Kumar, E. Nakata, Y.T. Chang, T. Morii

Selection of biosensors from a library of fluorescent ribonucleopeptide receptors

第 44 回国際核酸化学シンポジウム/日本核酸化学会第 1 会年会 The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry /The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry

2017.11.15

4. A. Rajendran, S.J. Park, E. Nakata, Y. Kwon, T. Morii

Supramolecular Assemblies of Mechanically Interlocked Components Inside a DNA Origami Frame

日本化学会第 98 春季年会 2018

2018.3.20-23

5. Arivazhagan Rajendran・Seo-jeong Park・Eiji Nakata・Youngjoo Kwon・Takashi Morii

Integration of Topologically-Interlocked Functional Structures With a DNA Nanostructure

第 12 回バイオ関連化学シンポジウム

2019.9.9-11

6. Arivazhagan Rajendran, Seo-jeong Park, Eiji Nakata, Youngjoo Kwon, Takashi Morii

DNA Catenane and Rotaxane Inside a DNA Origami Frame

International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2018

2018.11.7

7. Shun Nakano, Musashi Shimizu, Takashi Morii

Dual sensing of ATP and ADP by fluorescent ribonucleopeptide sensors

International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2018

2018.11.7

8. Shun Nakano, Musashi Shimizu, Huyen Dinh, Takashi Morii

Fluorescent ribonucleopeptide sensors for selective detection of ATP and ADP

日本化学会第 99 春季年会

2019.3.16-19

〔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 なし

研究分担者氏名：

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 なし

研究協力者氏名：

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。