

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06093

研究課題名(和文) がん抑制に関わる選択的スプライシング制御蛋白質の標的遺伝子の同定と認識機構の解明

研究課題名(英文) Structural basis for the sequence-specific RNA-recognition mechanism of a human splicing regulatory protein

研究代表者

桑迫 香奈子 (Kuwasaki, Kanako)

武蔵野大学・薬学部・講師

研究者番号：10568736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：特定のスプライシング制御蛋白質が、アポトーシス誘導に関わる遺伝子の選択的スプライシングを制御することで、がん化の抑制に寄与すると考えられている。しかし、この蛋白質が制御する遺伝子の数や種類、標的配列とその認識機構は未知である。本研究では、立体構造および機能解析によって、この蛋白質によるスプライシング制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。この蛋白質のRNA結合を担うドメイン領域を調製し、申請者の予備実験から導き出された標的配列を含むRNA断片との共結晶の作製を試みている。また、この蛋白質のスプライシングに与える影響を解析するため、培養細胞を用いてこの蛋白質の発現抑制も試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞においてスプライシング因子の遺伝子に高頻度に変異が生じていることが報告され、mRNA前駆体スプライシングを作用点とする抗がん剤の開発が期待されてきている。しかし、これらの多くの研究の場合、「スプライシングに必須の基本的な因子で、かつ、複数の因子」が対象になっており、実際に特異性をもつ阻害剤を開発するのは困難である。しかし、本研究で対象としているスプライシング制御蛋白質は、この一つの蛋白質が選択的スプライシングを制御することで限定された複数の遺伝子の発現に影響を与える点が特徴であり、抗がん剤への開発に繋がる可能性が高く、研究する価値は十分に高いと考えている。

研究成果の概要(英文)：The splicing regulatory protein is thought to contribute to the suppression of tumorigenesis by regulating the alternative splicing of genes involved in apoptosis. However, the number and types of genes regulated by the protein, as well as its target sequences and recognition mechanisms, are unknown. In this study, we aimed to elucidate the splicing regulation mechanism mediated by the protein using structural and functional analyses. We prepared the RNA-binding region of the protein and attempted to co-crystallize it with RNA fragments containing the putative target sequence. We also tried to suppress the expression of this protein in cultured cells to analyze the effect of this protein on splicing.

研究分野：構造生物学

キーワード：pre-mRNAスプライシング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺がん由来の細胞のゲノムでは、高い頻度である蛋白質の遺伝子が欠損していた。この蛋白質は、アポトーシス誘導に関わる2つの遺伝子の選択的スプライシングを制御することで、アポトーシス誘導に関係し、その結果として、がんの抑制に寄与すると考えられてきた。最近では、この蛋白質が欠失している肺がん由来の培養細胞において、この蛋白質を発現させると増殖が遅くなり、抗がん剤感受性が高まるという報告や、肺がん以外の様々ながんとの関連も示されてきたため、この蛋白質のアポトーシス誘導作用を利用した新規抗がん剤の開発が期待されている。しかし、実際に、このスプライシング制御蛋白質が選択的スプライシングを制御する遺伝子の数と種類、標的配列とその認識機構は未知である。

この蛋白質には、N末端側にRNA結合ドメインが3つあり、この部分が協動的にRNA結合を担っていると考えられる。既知の標的mRNA前駆体において、この蛋白質の結合部位はだまかには報告されているものの、標的配列は明確ではなかった。申請者は、これまでのRNA結合ドメインと標的RNA配列との複合体の立体構造解析を行ってきた知見を応用し、さらに予備的な実験の結果から、この蛋白質の認識・結合部位は15塩基長の領域であると推定した。実際、この予測標的配列を、もう1つの既知の標的mRNA前駆体に当てはめると、特定のイントロン上に対応した配列が確認された。

### 2. 研究の目的

本研究では立体構造解析および機能解析により、この蛋白質によるスプライシング制御メカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)この蛋白質のRNA結合を担うのは、N末端側の3つのRNA結合ドメインである。この3つのドメイン部分の蛋白質(以下トリプルドメイン)と、標的配列をもつRNA断片との共結晶を作製し、X線回折法による立体構造解析を行う。

(2)培養細胞を用いて、この蛋白質の発現を誘導もしくは抑制したときに影響を受ける遺伝子を同定し、さらに同定した遺伝子のがんとの関連、特にアポトーシスとの関連性を調べる。

### 4. 研究成果

(1)トリプルドメインと標的配列をもつRNA断片との共結晶を作製するため、トリプルドメインの調製を行った後、結晶化スクリーニングを行った。

まず、大腸菌を宿主とした遺伝子組み換えでトリプルドメインを発現させ、あらかじめ付加しておいたタグの親和性により粗精製した後、タグを切断し、さらにゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。しかし、このように調製したサンプルは、わずかに大腸菌由来のRNaseが混在しており、RNA断片を分解してしまうことがわかった。これまでRNA結合蛋白質を調製してきた経験では、2段階目のクロマトグラフィーでイオン交換を用いると大腸菌由来のRNaseを除去できる。しかし、トリプルドメインは塩濃度を下げると沈殿してしまうためイオン交換を利用できず、ゲルろ過を用いた点が問題だと考えられた。

次に、RNaseを含まない無細胞蛋白質合成系を利用したトリプルドメインの合成を試みた。無細胞蛋白質合成系に適したHisタグをN末端側に付加したところ、トリプルドメインを大量に合成できることがわかった。しかし、合成できたトリプルドメインのうち、ほぼ半分が不溶化してしまい、収量が低くなる点が問題となった。そこで、いくつかの界面活性剤を無細胞蛋白質合成系に添加して条件検討を行い、特定の界面活性剤を添加した場合にトリプルドメインの大半を可溶性画分に合成できることを見出した。このようにして合成したトリプルドメインを、Hisタグによるアフィニティークロマトグラフィー、タグの切断、ゲルろ過クロマトグラフィーの順に精製すると、最終的に無細胞蛋白質合成系1mL反応液当たり1mg程度の安定した収量が得られることがわかった。

このような方法で調製したトリプルドメインに、標的配列を含むRNA断片を混合し、結晶化スクリーニングを行った。まず、シットティングドロップ法で384条件スクリーニングを行った。その中の1つの条件のみで均一な沈殿を確認できたため(図1)、ハンギングドロップ法で再現性を確認した。しかしながら、微結晶を生じさせることはできず、再現できなかった。一般的に、構造的に柔軟な部位が



図1 シットティングドロップ法で得られた均一な沈殿

あると結晶化が難しいとされる。実際、トリプルドメインのドメインの間には十数個のアミノ酸残基が存在している。この部分が RNA 結合には関与せず、構造的に柔軟な状態であることが問題となっている可能性が考えられた。

そこで、ドメイン間のアミノ酸残基の欠失が可能かどうか、つまり、この部位が RNA 結合を担っているかどうかを明らかにするため、トリプルドメインと標的配列を含む RNA 断片との相互作用を定量的に検出する系をバイオレイヤー干渉法 (bio layer interferometry, BLI) で構築することとした。ストレプトアビジンバイオセンサーにビオチン修飾した RNA 断片を固定し、これに様々な濃度のトリプルドメインを作用させたところ、図 2 に示すようなセンサーグラムが観測され、再現良く相互作用を検出することができた。今後は、この実験系を用いて、ドメイン間のアミノ酸残基を欠失させたトリプルドメインでも RNA 結合能に変化がないかを確認し、結晶化に適したコンストラクトを作製していく予定である。さらに、この実験系を用いれば、トリプルドメインの N 末端および C 末端 標的配列をもつ RNA 断片についても最適化が可能なので、立体構造解析に適した共結晶の作製に利用していく予定である。

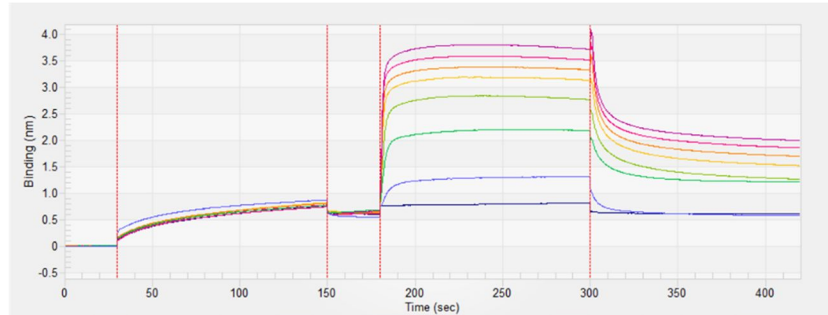


図2 BLI法で観測されたセンサーグラム

(2)培養細胞を用いた実験では、本研究に適した細胞を選定して培養を開始した後、この標的蛋白質の発現抑制を行った。

この標的蛋白質は、肺がん細胞においてアポトーシスを誘導し、がんの抑制に寄与していると考えられている。そこで、この蛋白質の発現抑制における機能を解析するにあたって、がん細胞由来ではなく、正常細胞由来であること、安定した結果を得るために、安定に培養でき、細胞老化を起こしにくいものであること、肺がんに関連した論文で使われているものであること、の3点を考慮し、正常気管支上皮細胞由来の BEAS-2B 細胞を使用することとした。

この標的蛋白質の発現を抑制する siRNA との2種類と、ネガティブコントロール (NC) およびポジティブコントロールの Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の siRNA の計4種類を購入し、BEAS-2B 細胞にトランスフェクションした。48時間後、これらの細胞から蛋白質と RNA を回収した。蛋白質試料に関しては、GAPDH と本研究で標的としている蛋白質の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、図3に示す通り、の siRNA を用いた場合に、標的蛋白質の発現を抑制できていた。また、RNA 試料に関しても、逆転写反応と quantitative PCR (qPCR) によって、この標的蛋白質の mRNA の量を調べた。その結果、図4に示す通り、の siRNA を用いた場合に、NC と比較して標的蛋白質の mRNA の量が4割程度になっていた。以上から、の siRNA を利用することで、標的蛋白質の発現抑制が可能であることが示唆された。今後は、この標的蛋白質の発現を抑制した細胞において、既知の標的 mRNA 前駆体の選択的スプライシングがどのようにになっているかを確認するとともに、RNA-seq で網羅的な解析を行い、アポトーシス誘導に関わる遺伝子およびそれ以外の遺伝子の mRNA 前駆体のスプライシングがどのように制御されているか解析を行う予定である。

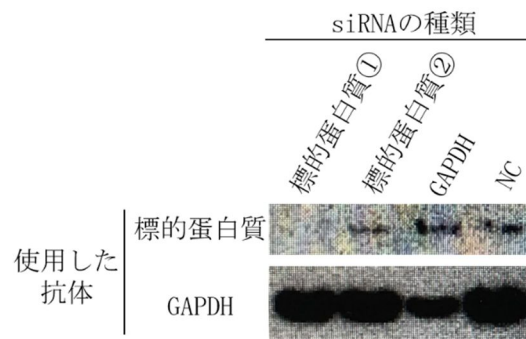


図3 発現抑制した細胞から抽出した蛋白質のウエスタンブロッティング

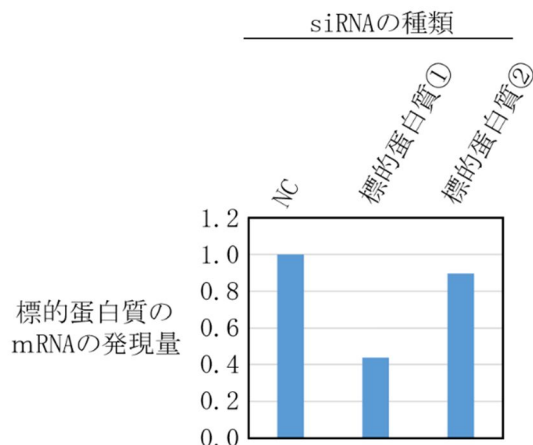


図4 発現抑制した細胞から抽出したmRNAのqPCR (NCにおける発現量を1とした場合の相対値)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 裕介  (Inoue Yusuke)  (90304302)	群馬大学・大学院理工学府・教授    (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関