

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14338

研究課題名（和文）細胞内RNA G-quadruplexの同定および機能解明

研究課題名（英文）Comprehensive search for the G-quadruplex structure in mRNA

研究代表者

勝田 陽介（KATSUDA, YOUSUKE）

熊本大学・大学院先端科学研究部（工）・助教

研究者番号：50632460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：申請者らは、細胞内RGq構造のみを安定化し、内在性タンパク質発現量に変化を与えることが可能なRGq選択的結合化合物RGB-1を既に見出している（JACS, 2016）。本研究期間内においては下記に示す手順で細胞内RGqを網羅的に探索した。培養細胞群に対してRGB-1処理を行い、タンパク質発現量の変化を抗体アレイにより評価した。RGqにより逆転写酵素の伸長反応が停止することを応用したストップアッセイによりCAPG, Nectin4でRGqを構築していることを確認した。当該mRNAに対してin vitro translationを行い、タンパク質翻訳反応に影響を与えていることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオインフォマティクス技術の向上によりmRNAの構造が正確に予想すること可能になってきている。しかし近年、核酸高次構造は環境依存的に変化することが明らかになってきており、細胞内環境を具体的に数値化することが困難であることから、バイオインフォマティクスのみで細胞内の核酸高次構造を正確に予想することは困難であると考えられる。

そこで申請者はRNA G-quadruplexに選択的に結合する化合物RGB-1を用いて細胞内RGqの網羅的な探索を可能とする技術を開発した。同手法を用いて、今まで知られていなかった遺伝子からRGqを同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Guanine-rich RNA sequences can form thermodynamically-stable four-stranded RNA structures known as RNA G-quadruplex (RGq). It has been long understood that RGq structures are linked to essential biological processes, yet the physiological significance of RGq structures in cells still remains unclear. Here, we demonstrate a method that permits the discovery of RGq structures which affect protein translation in mammalian cells. The method is an integration of antibody array technology and a small-molecule RGB-1, which selectively stabilizes RGq structures. By applying this technique to 84-human-cancer-related genes, we found NECTIN-4 and CAPG as two genes carrying G-quadruplex structures on the 5' UTR of their mRNA. Further investigations revealed that the RGq structures of CAPG exhibits a structural polymorphism. This infers that the polymorphic G-quadruplex structure in the 5' UTR of the mRNA would promote environment-responsive regulation of gene expression.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：RNA G-quadruplex translation

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA G-quadruplex (RGq) の生理学的な機能は不明である (Fig. 1)。しかし、RGq を構築し得る塩基配列が非翻訳領域に偏在していること、また RGq が他の RNA 構造体と比較して熱力学的に非常に安定であることなどを考えると、RGq が種々の生体内反応に影響を与えている可能性は高い。また、バイオインフォマティクス研究から、RGq がガンなどの疾病に関連する遺伝子の mRNA で高頻度に存在している可能性が示唆されている。さらに、近年の試験管レベルの実験からは、RGq とタンパク質翻訳反応の関連性を示唆する結果が次々と報告されるようになった。すなわち、RGq の生物学的役割の解明は、病態診断や医薬品開発に資する非常に魅力的な研究対象である。

本研究は、「細胞内において“どの mRNA”が“どの位置”で RGq を形成し、その RGq が“何をしているのか”」である。RGq 探索においては、mRNA の塩基配列から RGq 形成可能な配列を絞り込むが、多くの場合、 $d(G_3+N_{1-7}G_3+N_{1-7}G_3+N_{1-7}G_3)$ という基本ルールが利用されている。すなわち、「3塩基以上の連続するグアニン配列が4つ必要で、それら連続するグアニン配列間をつなぐグループは7塩基以下でなければならない」というものである。そもそも、このルールは核酸塩基配列情報から予測される熱力学的な安定性に基づいて算出されたものであり、特に細胞内環境を考慮していない単純な Buffer 条件下を念頭にしている¹。しかし、mRNA は塩濃度が変わることにより全体構造を変えることも知られており²、細胞内環境を正確に把握することが現時点において不可能である以上、一義的なルールで RGq の存在位置を特定することは困難である。もちろん、細胞内における RGq の存在位置がわからないので、試験管レベルの実験で予測できる RGq 機能以外の細胞内 RGq 機能を解明することも不可能である。

2. 研究の目的

申請者は先行研究により RGq に対して選択的に結合する小分子リガンド RGB-1 (Fig. 2) を見出した。本研究期間においては、RGB-1 を用いて細胞の中で形成される RGq を探索し、見つけ出した RGq の生体内機能解明を目指した。具体的には、mRNA を対象として以下の流れで研究を行った。

- ① 抗体アレイを利用し、RGq を構築する mRNA を絞り込む。
- ② 絞り込んだ mRNA に対してストップアッセイを行い、“どの位置”で RGq が構築されているのかを特定する。
- ③ RGB-1 を用いて特定した RGq の安定性に変化を与え、RGq の機能を解明する。

この研究により、バイオインフォマティクス等では見出すことができなかった RGq を探し出し、今まで知られていなかった RGq の生理学的機能解明できることが期待される。

3. 研究の方法

- ① 抗体アレイにより細胞の中で形成される RGq を網羅的に探索し、RGq を持っている mRNA を絞り込む。

現時点において、先行研究および予備実験で明らかにした RGB-1 の特徴を以下にまとめる。

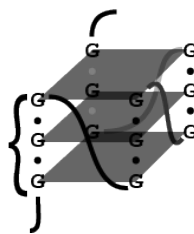


Fig. 1 G-quadruplex の構造図。この構造体はグアニン塩基の連続配列とリンカー塩基配列から構築される。本図においてはリンカー塩基配列を実線で表記しているが、実際には核酸塩基により構成されている。

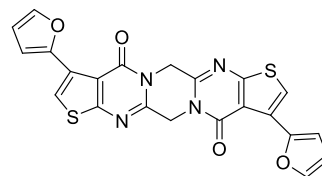


Fig.2 化合物 RGB-1 の構造。様々な試験管レベルの評価を行った結果、RGB-1 は RGq のみに結合し、構造を安定化することが明らかになった。また、細胞実験を行う上で極めて重要な要素である細胞膜透過性に関しても問題ないことを明らかにしている。

- RGB-1 は RGq に高い選択性をもって結合し、その構造を安定化する。
- RGq が RGB-1 により安定化することでリボソームの進行が阻害されタンパク質合成が抑制される。
- RGB-1 は RGq を有する遺伝子の内在性タンパク質発現量に変化を与えることができる。

RGB-1 が有するこれらの特性を活かし、培養細胞群に対し RGB-1 処理を行う。RGB-1 は細胞透過性が高いため、特別な処理を施す必要なく細胞内へと侵入する。細胞の中に入った RGB-1 は高い選択性で RGq に結合し RGq 構造を安定化する。つまり RGq を有している mRNA のタンパク質発現量は、RGB-1 の存在により変化が生じるはずである (Fig. 3)。もちろん、RGB-1 が他の遺伝子発現に影響を与え、副次的に当該遺伝子のタンパク質発現量に変化を生じさせる可能性もある。そこで当該 mRNA そのものの発現量を定量的 PCR で比較評価し、転写レベルでの発現量に変化がないことを確認する。この二段階の評価を行うことで RGq をもつ mRNA を絞り込むことができる。

② 抗体アレイにより絞り込んだ遺伝子に対してストップアッセイを行うことで“どの位置”で RGq を形成するのか特定する。

申請者のグループでは先行研究において逆転写酵素の伸長反応が RGq により止まってしまうことを利用して (ストップアッセイ³⁾)、どの位置で RGq が構築されているのかを同定するシステムを確立している (Fig. 4) (*JACS* 2016)。もちろん、ストップアッセイのみでも運が良ければ RGq を見出すことは可能である。しかし、ラベル化されたプライマーは高価であり、何万種と存在する mRNA をしらみつぶしに検討していく方法は効率的ではない。抗体アレイの結果と本方法を組み合わせることで、効果的に RGq を同定する。

4. 研究成果

抗体アレイ

mRNA 中に存在する RNA G-quadruplex を同定するために、RNA G-quadruplex (以下 RGq) を選択的に安定する化合物 RGB-1 を利用したスクリーニング法を設計した (Fig. 3a)。RGB-1 の存在下においてタンパク質の発現レベルが変化するタンパク質は、理論的には、その発現が RGq によって制御されていることを示唆している (Fig. 3b)。この仮説を念頭に置いて、ヒト乳がん MCF-7 細胞を DMSO または RGB-1 (10 μ M) で処理し、細胞抽出液のタンパク質レベルを 84 の癌関連タンパク質評価用抗体アレイにより解析した。その結果 RGB-1 の存在によりタンパク質の発現が向上したものと抑制されたものの両パターンが存在することが明らかになった。我々はその中から最も抑制効果が示された 6 つの遺伝子 (BIRC5、FOXO1、AREG、TP53、NECTIN-4、CAPG) に焦点を当てたこととした。なお 6 つの選択された遺伝子の中で、BIRC5 は検出シグナルが著しく低かったことから、以降の実験から除外した。

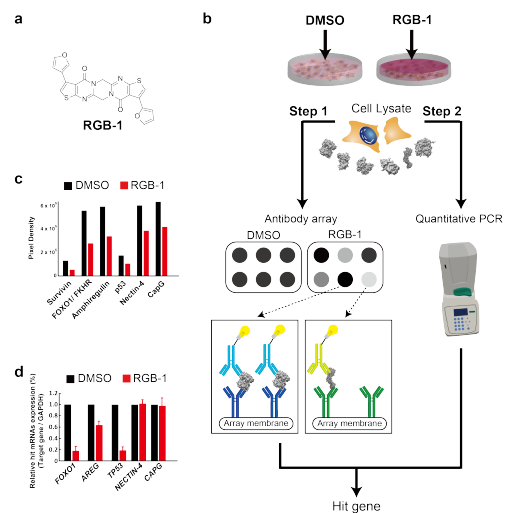


Fig. 3 |タンパク質翻訳反応に影響を与える細胞内機能性 RGq を同定する方法の略図。 a: RGB-1 の化学構造 b: Step1 タンパク質発現レベルと抗体アレイの直接比較。タンパク質は、まず RGB-1 または DMSO (RGB-1 溶液の溶媒) で処理された MCF-7 細胞から抽出する。次に、各抽出物を抗体アレイで分析しました。 Step2 抗体アレイから選択されたダウンレギュレートされた遺伝子の mRNA 発現レベルの RT-qPCR 分析。 Step1 と Step2 から選択した遺伝子候補をさらに調査して、機能性 RGq を同定。 c: 6 つのダウンレギュレートされたタンパク質の RGB-1 処理ありまたはなしのタンパク質発現レベルの比較。 d: 選択した遺伝子の RGB-1 の存在下と非存在下での RNA 発現レベルの比較。 相対的発現レベルは GAPDH によって規格化。

次に定量的PCRによって5つのダウンレギュレートされた遺伝子の mRNA 発現レベルを確認した (Fig. 3d)。その結果、FOXO1、AREG、および TP53 の mRNA 発現レベルが、タンパク質レベルと並行して RGB-1 処理によって減少したのに対して、NECTIN-4 と CAPG の mRNA レベルには変化が認められないにもかかわらず、タンパク質発現レベルは大幅に低下していることがわかった。これらの結果は、Nectin-4 や CapG に関して RGB-1 が両遺伝子に存在する RGq に結合して mRNA 合成を抑制することなく、タンパク質合成を抑制していることを示唆している。

RGq の同定

Nectin-4 および CAPG mRNA の配列を確認すると、両遺伝子の 5'UTR には RGq を構築することが可能だと言われている配列 (G₃₊ X₁₋₇ G₃₊ X₁₋₇ G₃₊ X₁₋₇ G₃₊) が存在していた。

そこで実験的に RGq を同定するため逆転写酵素の DNA 伸長反応停止位置を確認する RT ストップアッセイを行った。このアッセイは、mRNA の逆転写反応中に RNA G-quadruplex サイトの位置をピークとして検出できる。

実際に評価を行なったところ Nectin-4 と CAPG mRNA では RGq の存在を示すピークを検出することができたが、TP53 mRNA の 5'UTR では検出されなかった。ほんピークは KCl を含むバッファー条件下でのみ検出され (Fig. 4a, b)、RGB-1 の存在下で増強されたことから RGq 由来のピークであると判断した。興味深いことに Nectin-4 mRNA の 5'UTR には、相互に近接して位置する4つのグ Guanine tract (連続したグアニンヌクレオチド、G-tract) が含まれていた。その5つの mutant の RT ストップアッセイにより、G 四重鎖は4つの連続した G-tract ではなく、3つの G-tract と離れた G-tract の組み合わせによって形成されることが明らかになった (Fig. 4a)。おそらく、そのような分離された G-tract の組み合わせの立体配置は、NECTIN-4 mRNA が形成する全体構造の中で近接した G-tract を利用していると考えられる。一方、5つの G-tract (tract 1~5) を含む CAPG mRNA の 5'UTR の RT ストップアッセイ結果は、より複雑なパターンを示した (Fig. 5)。高および低 KCl 条件下での RGq の存在を示すピークは、CapG mRNA 中には2つの RGq が存在していることを明らかにした。G tract を A tract に変異したサンプルを作製 RT ストップアッセイを行なったところ、tract 1 または 5 に変異を入れたサンプルは、多型性を示すピークが消失した。これらの結果は、CAPG mRNA が 100 mM KCl で tract 2-5 の G-quadruplex を形成し、25 mM KCl で tract 1-4 の G-quadruplex を形成することを示唆している。

これらの RGq の特性をよりよく理解するために、35 nt のオリゴ RNA (shCapG mutant1 と shCapG mutant2) を用意した。それぞれの短鎖オリゴ RNA は対応する RGq の構築最小配列が含まれており、RGq の典型的な融解曲線を示した。さらにそれらの短鎖オリゴ RNA は、低濃度の KCl (2 mM) を含む Buffer 溶液でも高い安定性を示しましたが、shCapG mutant2 (tract 1-4) は、shCapG mutant1 (tract 2-5) よりも高い安定性を示した。2つの mutant 間の ΔTm 値は、最大 6 mM の KCl 濃度の増加に伴って減少し、shCapG mutant1 の安定性のより高い KCl 依存性を示した。残念ながら、KCl 濃度をさらに上げると、Tm 値が測定範囲外になるためこれ以上の KCl 濃度を上昇さ

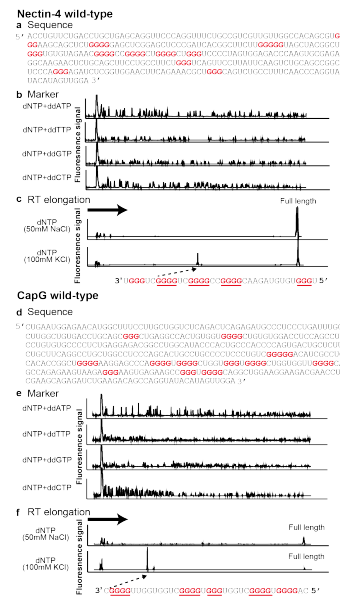


Fig. 4 | Nectin-4 wildtype および CapG wildtype mRNA における RGq の同定。a、d:Nectin-4 wildtype および CapG wildtype mRNA のヌクレオチド配列。G-tract は赤で表示されます。b、e:template マーカー。c、f:RTase を介した cDNA 合成は、100 mM KCl の存在下では Nectin-4 wildtype および CapG wildtype mRNA で停止したが、50 mM NaCl の存在下では影響はない。

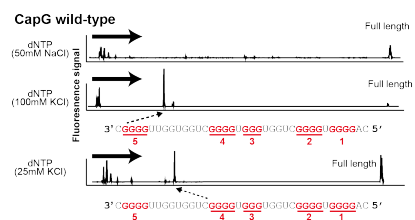


Fig. 5 | CapG wildtype の多型 RGq。多型構造の RGq 比率は、50 mM NaCl、100 mM KCl および 25 mM KCl 塩濃度下で RT ストップアッセイによって評価した。RGq を構築する4つの G-tract を赤で示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 KITAMURA Yusuke, TANIGUCHI Takaaki, TSUTSUMI Miwako, NURDIWIJAYANTO Leanddas, MATSUO Tomoya, KATSUDA Yousuke, IHARA Toshihiro	4. 巻 36
2. 論文標題 A RuO ₂ Nanosheet as a Novel Quencher-free Platform for the Detection of Nucleic Acids in a Homogeneous Solution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 397 ~ 400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20c004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitamura Yusuke, Nagai Koki, Furuzono Tomohiro, Katsuda Yousuke, Ihara Toshihiro	4. 巻 39
2. 論文標題 Cooperative recognition of a repetitive sequence through consecutive formation of triplex and duplex structures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 97 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1679833	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimada Hiroshi, Kiyozumi Yuki, Koga Yuki, Ogata Yoko, Katsuda Yousuke, Kitamura Yusuke, Iwatsuki Masaaki, Nishiyama Katsuhiko, Baba Hideo, Ihara Toshihiro	4. 巻 298
2. 論文標題 A novel cholinesterase assay for the evaluation of neurotoxin poisoning based on the electron-transfer promotion effect of thiocholine on an Au electrode	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 126893 ~ 126893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2019.126893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitamura Yusuke, Nozaki Akihiro, Ozaki Rie, Katsuda Yousuke, Ihara Toshihiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Catalytic Formation of Luminescent Complex Clusters Based on Autonomous Strand Exchange Reaction of DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 2988 ~ 2993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.9b00326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamura Takuto、Katsuda Yousuke、Kitamura Yusuke、Ihara Toshihiro	4. 巻 526
2. 論文標題 G-quadruplexes in mRNA: A key structure for biological function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 261 ~ 266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 勝田 陽介, 佐藤 慎一, 井上 舞美, 嘉村 匠人, 北村 裕介, 萩原 正規, 上杉 志成, 井原 敏博
2. 発表標題 がん関連遺伝子を対象とした 細胞内RNA G-quadruplexの網羅的探索
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第13回 年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 勝田 陽介, 井上舞美, 嘉村匠人, 北村裕介, 萩原正規, 佐藤慎一, 井原 敏博
2. 発表標題 細胞内特殊核酸の同定法の開発
3. 学会等名 第41回 ケモインフォマティクス討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上 舞美, 勝田 陽介, 北村 裕介, 上杉 志成, 萩原 正規, 佐藤 慎一, 井原 敏博
2. 発表標題 小分子を用いたRNA四重鎖構造の網羅的探索
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----