

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02834

研究課題名（和文）新規人工RNA結合タンパク質の革新的デザイン法の開発

研究課題名（英文）Development of innovative design method for new artificial RNA-binding proteins

研究代表者

世良 貴史（Sera, Takashi）

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・教授

研究者番号：10362443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：人工RNA結合タンパク質の開発のため、RNA認識にどう関わるのかが不明であった、ヒトPumilioタンパク質（hPUM）のN末およびC末にあるR1'/R8'ドメインに着目し、それらのRNA結合に関わる機能を明らかにした。当該ドメインの各種変異体を作製し、そのRNA結合特性を野生型と比較検討することにより、標的RNAの塩基とは直接相互作用しないR1'/R8'ドメインがhPUM全体の構造の安定化することにより、hPUMのRNA認識に重要な寄与をしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムDNA情報の読み取りだけでなく、mRNA情報の読み取りを自由に行えるようになると、遺伝情報の流れをさらに自在に制御することが可能となる。このためのツールとしての候補蛋白質として優位性を有するhPUMの機能ドメインを深く理解することは重要である。今回の成果により、より精緻な人工RNA結合タンパク質のデザインが可能となり、mRNA情報を自由に制御する手法の一つとして新たに加わることで、様々な生命現象の解明や、新しいバイオテクノロジーの創出に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：To develop artificial RNA-binding proteins, we focused on the R1'/R8' domains at the N- and C-termini of the human Pumilio protein (hPUM), whose involvement in RNA recognition was unclear, and clarified their functions related to RNA binding. By preparing various variants of the domain and comparing their RNA binding characteristics with the wild type, we found that these domains, which do not directly interact with the base of the target RNA, makes an important contribution to RNA recognition of hPUM by stabilizing the entire protein structure.

研究分野：蛋白質工学・遺伝子工学・細胞工学

キーワード：RNA タンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生命現象は、セントラルドグマ、すなわち遺伝情報の流れを調節することにより、制御されている。研究代表者は、まずゲノム情報の読み取りに着目し、各種生物のゲノム上の特定の標的 DNA 配列に結合できる、人工 DNA タンパク質のデザイン・創出法を開発し、当該タンパク質単体あるいは、各種機能ドメインを付加した人工生体機能分子を用いて、遺伝子発現の人為的操作など、生命現象の人為的制御を行ってきた。さらに、制御可能な生命現象の対象を広げるべく、RNA 情報の読み取りを目指し、人工 RNA タンパク質の開発に着手した。人工 RNA タンパク質も、世界中の研究グループにより精力的に研究が行われている。CRISPR-Cas13 や PPR などの RNA 結合タンパク質を基にした、結合能の向上や特異性の改変が行われているが、それぞれ結合能や特異性に関して、解決すべき問題が知られている。その中で、ヒト Pumilio タンパク質 (hPUM) は、これらタンパク質に比べて、結合能や特異性において優れた結合特性を有しており、様々なグループにより標的 RNA 配列の拡張を目指した研究が精力的に行われている。しかしながら、PUM の RNA 認識メカニズムに関してまだ明らかになっていない点があり、人工 RNA 結合タンパク質としての利用には、まだ改善すべき点が残されている。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、標的 RNA に結合できる人工 RNA 結合タンパク質を自在にデザインできる、新たな手法を開発することである。そのために、RNA 認識にどう関わるのか不明であった、hPUM タンパク質の N 末および C 末にあるドメイン、すなわち R1'ドメインおよび R8'ドメインに着目し、それらの機能を明らかにすることを目指した。具体的には、当該ドメインの各種変異体を作製し、その RNA 結合特性を野生型と比較検討することにより、当該ドメインの機能の解明を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) プラスミドの構築

各種欠失変異体をコードするプラスミドは、PCR を用いて当該 DNA フラグメントを作製し、精製したフラグメントを大腸菌用発現ベクターにクローニングすることにより構築した。アミノ酸残基の各種アラニン変異体をコードするプラスミドは、長い領域のアミノ酸を同時に変異させる場合には変異させた合成 DNA フラグメントをクローニングし、変異アミノ酸が 2 個以下の場合には元となるタンパク質の該当残基のコドン QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて変異させて構築した。

#### (2) 変異体タンパク質の精製

各種変異体は大腸菌 BL21(DE3) で過剰発現させ、回収した大腸菌細胞を超音波処理して溶解し、遠心分離によって清澄化した後、ニッケルカラムにロードし、目的タンパク質を 150 mM イミダゾール緩衝液で溶出した。最終タンパク質試料をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、クマシーブリリアントブルー染色によって分析した。タンパク質濃度は、NI タンパク質アッセイキットを用いて決定した。

#### (3) RNA 結合アッセイ

両末端を蛍光標識した合成 RNA プローブを、精製した各種変異体タンパク質と共に 10  $\mu$ l の緩衝溶液中でインキュベートした。1 時間反応後、プローブ-タンパク質複合体と遊離プローブを 6% 非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して分離した。蛍光シグナルは、イメージングシステムを用いて検出した。

#### (4) タンパク質構造解析

タンパク質の三次元グラフィック表示と構造解析は、RASMOL ソフトウェア (バージョン 2.7.5.2) を用いて行った。

#### (5) タンパク質二次構造の解析

精製された hPUM 誘導体の二次構造は、円二色性 (CD) を使用して分析した。25 mM Tris-HCl、pH 7.5/150 mM NaCl/5 mM DTT 中のタンパク質 (20  $\mu$ M) の CD スペクトルを、分光偏光計を用いて 0.2 mm の光路長で記録した。サンプルは、波長 200 nm から 250 nm まで、速度 50 nm/min、応答時間 1 秒、バンドパス 1.0 nm、データピッチ 0.05 nm、標準感度セットでスキャンした。二次構造要素の比率は、Yang のレファレンスに基づいて、二次構造推定ソフトウェアを用いて計算した。

#### 4. 研究成果

##### (1) R1'/R8'ドメイン欠失変異体の RNA 結合能の解析

R1'/R8'ドメインの機能を明らかにするために、まず R1'ドメイン、R8'ドメインあるいは R1'/R8'ドメインの欠失変異体の作製を試みた。各変異体の大腸菌発現プラスミドを構築し、大腸菌で過剰発現させたところ、温度など発現条件の最適化を試みたが、可溶化しなかった。そこで、可溶化を促進するグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) またはマルトース結合タンパク質 (MBP) のいずれかのタグを欠失変異体の N 末端側に融合させたタンパク質を作製し、可溶化能を比較したところ、MBP タグ付加体のほうが可溶化しやすいことがわかり、野生型も含め、すべての変異体タンパク質は、MBP タグを付加したタンパク質として本研究に用いることとした。

R1'/R8'ドメインに関して上記 3 種類の MBP 融合欠失体を作製し、可溶性タンパク質として精製した。各精製タンパク質の RNA 結合能を MBP 融合野生型タンパク質と比較したところ、図 1 に示すように、R1'/R8'ドメイン両方の欠失体の RNA 結合能は完全に失われた。さらに、1 ドメインの欠失体においては、R8'ドメイン欠失体では弱い RNA 結合能を保持していたが、R1'ドメイン欠失体では 1000 nM という高い濃度でも全く RNA 結合は見られず、RNA 塩基とは直接相互作用していない R1'/R8'ドメインが RNA 結合に重要な寄与をしていることが初めて示唆され、その寄与は R1'ドメインのほうが R8'ドメインより強いことが示唆された。

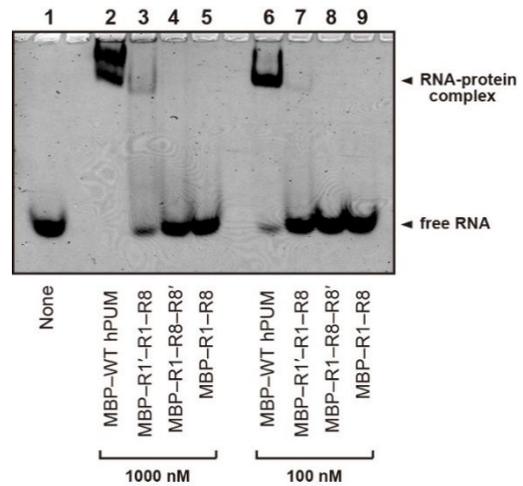


図 1 . R1'/R8'ドメイン欠失体のゲルシフト

##### (2) R1'/R8'ドメインの構造解析

上項の結果を受けて、まず、hPUM の R1'/R8'ドメインのアミノ酸配列を、これまでに脊椎動物で同定されている PUM の当該アミノ酸配列と比較してみると、i) R1'ドメインにおいては、同じ位置に 6 つの疎水性アミノ酸残基が保存され、ii) R8'ドメインにおいては、同じ位置に 5 つの疎水性アミノ酸残基が保存されていることが明らかとなった。さらに、タンパク質モデリングソフトウェア RasMol を使用した各リピード周辺の三次構造を詳しく見てみると、保存された疎水性アミノ酸残基が相互作用することにより、R1'ドメインと R8'ドメインの両方において、疎水性コアが形成されることが明らかとなった。

さらに興味深いことに、ゲルシフトアッセイ (図 1) に示されたように R8'ドメインよりも強く RNA 結合に寄与する R1'ドメインは、疎水性コアのポケットに、R1'ドメインに隣接する R1'ドメインの 2 つの疎水性フェニルアラニン残基 (Phe) が収容されていることがわかった。これは、R1' と R1' の間の疎水性相互作用が hPUM の標的 RNA への結合に重要である可能性を示唆している (このような相互作用は、Wang らによる hPUM 構造解析の報告では言及されていなかった)。これに対し、R8'ドメインの疎水性コアには R8 の疎水性アミノ酸残基は見出されなかった。

##### (3) R1'/R8'ドメインの疎水性ポケット形成アミノ酸残基のアラニン変異体の RNA 結合能の解析

そこで、hPUM の RNA 結合における R1'/R8'ドメインの疎水性コアの重要性を明らかにするために、上記の疎水性アミノ酸を頻繁に「アラニンスキャン変異誘発」として使用されているアラニン (Ala) に置き換えることにより、2 つの変異体 [MBP-hPUM\_R1' (Ala) および MBP-hPUM\_R8' (Ala)] を作製した。

作製したアラニン変異体の RNA 結合をゲルシフトアッセイによって解析した。図 2 のレーン 3 および 7 に示すように、R1'アラニン変異体 MBP-hPUM\_R1' (Ala) の結合は、MBP-R1 などの R1'欠失変異体と同様に、最終タンパク質濃度が 100 および 10nM になると完全に消失した。対照的に、R8'アラニン変異体 MBP-hPUM\_R8' (Ala) の RNA 結合はそれほど減少しなかった。これらの結果から、R1'ドメインの疎水性ポケットが、RNA 結合により重要であることが示唆された。

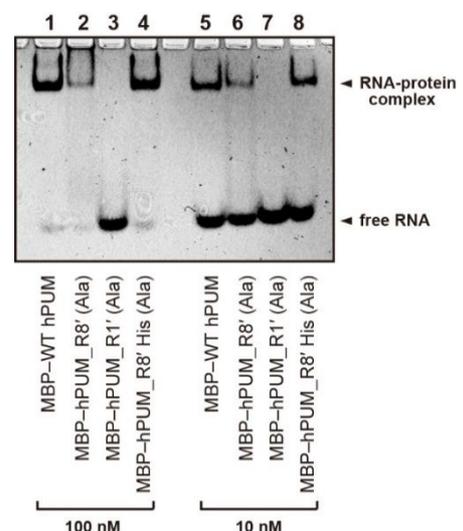


図 2 . R1'/R8'ドメインの疎水性ポケットのアラニン置換体ゲルシフト

##### (4) 各種変異体の二次構造の解析

R1'/R8'の除去と変異による hPUM の構造変化を調べるために、これらの誘導体の CD スペクトルを測定し、4 つ

の構成要因 ( $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シート、ターン、ランダムコイル)の比率を測定した。R1'が削除された MBP-R1-R8-R8'の二次構造の各要素の比率は、MBP-WT hPUM の比率とは大幅に異なっており、 $\alpha$ -ヘリックスの割合は 59.2%から 88.2%に上昇した(図3)。逆に、ターンの割合は 18.9%から 11.8%に半減した。また、現在のところその理由はよくわかっていないが、ランダムコイルの割合は 21.4%からゼロに低下した。

MBP-WT hPUM と比較して、R8'が削除された MBP-R1'-R1-R8 の二次構造の各要素の比率も大幅に変更されていた。 $\alpha$ -ヘリックスの割合は 59.2%から 79.6%に上昇し、ターンの割合は 18.9%から 10.0%に半減した(図3)。しかし、ランダムコイルの比率はゼロにはならず、21.4%から 10.4%に半減した。

R1'と R8'の両方が削除された MBP-R1-R8 の二次構造の変化は、R1'と R8'の削除の効果の総和と考えられた。MBP-R1'-R1-R8 から R1'を削除すると、 $\alpha$ -ヘリックスの割合がさらに 79.6%から 90.9%に増加し、ターンとランダムコイルの割合がそれぞれ 1.1%と 1.7%にさらに低下した(図3)。

興味深いことに、MBP-hPUM\_R1'(Ala) および MBP-hPUM\_R8'(Ala) は、それぞれ R1'欠失変異体 MBP-R1-R8-R8'および R8'欠失変異体 MBP-R1'-R1-R8 と非常によく似た二次構造を有していた(図3)。たとえば、MBP-hPUM\_R1'(Ala) の  $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シート、ターン、およびランダムコイルの構成比率は 91.8%、0%、8.2%、および 0%であったが、MBP-R1-R8-R8'の二次構造の構成比率は、それぞれ 88.2%、0%、11.8%、および 0%であった。これは、R1'および R8'の疎水性コアを形成する疎水性アミノ残基が hPUM の構造の安定化に寄与するという上記の発見をさらに支持している。

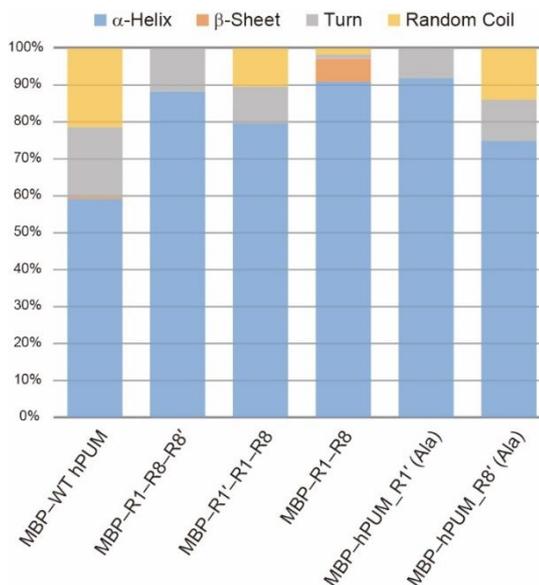


図3 . 欠失あるいは置換変異体の二次構造の構成比

#### (5) R1'ドメインの疎水性ポケットと相互作用する R1 ドメイン中のアミノ残基の同定

上記の実験では、RNA 結合のための R1'の疎水性コアの重要性が実証された。この疎水性コアは、R1 の 2 つの Phe 残基と相互作用している。RNA 結合に対するこの相互作用の寄与を調べるために、MBP-hPUM\_MT (F856A)、MBP-hPUM\_MT (865A) および MBP-hPUM\_MT (F856A/F865A) の 3 つの Ala 変異体を構築し、RNA 結合を分析した。予想通り、すべての変異体は明らかに減少した RNA 結合特性を示した (MBP-hPUM\_MT (856A) での RNA 結合の 10 分の 1 の減少、および MBP-hPUM\_MT (865A) での 10 分の 1 の減少)(図4)。1000 nM の高タンパク質濃度でも、MBP-hPUM\_MT (F856A/F865A) は、RNA-タンパク質複合体の形成による明確なバンドシフトを示さず、非特異的 RNA 結合によるバンドスミアリングのみが観察された。したがって、RNA 塩基と接触しない R1 の 2 つの Phe 残基のみの変異により、hPUM の RNA 結合特性が完全に失われたと考えられる。

以上のように、これまで RNA 塩基と直接相互作用しないため、RNA 結合・認識には寄与しないと考えられてきた、hPUM 末端にある R1'/R8'ドメインが hPUM の RNA 認識に極めて重要であることが初めて示され、特に R1'ドメインの疎水性ポケットと隣接する R1 ドメインの 2 つの Phe 残基との相互作用により、hPUM 全体の構造の安定化することにより、hPUM の RNA 認識に重要な寄与をしていることが示された。

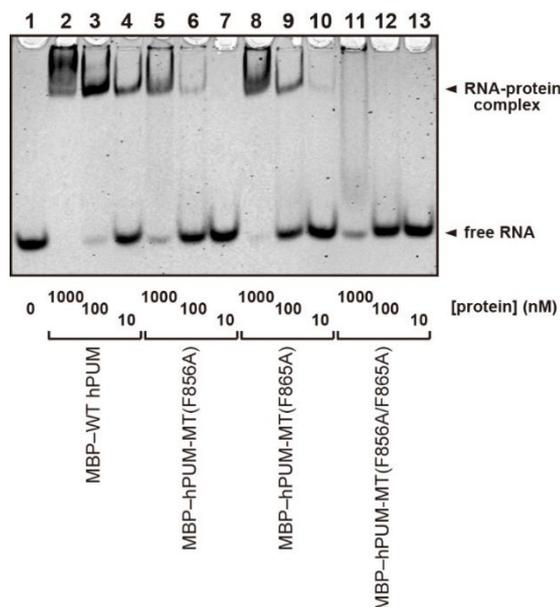


図4 .R1 ドメインの Phe 残基のアラニン置換体のゲルシフト

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 K. Nakamura, T. Nakao, T. Mori, S. Ohno, Y. Fujita, K. Masaoka, K. Sakabayashi, K. Mori, T. Tobimatsu, T. Sera*	4. 巻 60
2. 論文標題 Necessity of flanking repeats R1 and R8 of human Pumilio1 protein for RNA binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3007; 3015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.1c00445	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------