

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：34506

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23639

研究課題名（和文）核酸の高次構造が液-液相分離に与える影響の解明

研究課題名（英文）The effect of non-canonical structure of nucleic acids on liquid-liquid phase separation

研究代表者

松本 咲 (Matsumoto, Saki)

甲南大学・先端生命工学研究所・特任教員（助教）

研究者番号：50850822

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内には多様な膜のないオルガネラ（液滴）が存在しており、遺伝子の発現制御などの様々な生命現象と関わっていること、さらにはがんや神経変性疾患の発症にも寄与することが示唆されている。液滴のほとんどは核酸を含んでいるが、その核酸の性質や、核酸が液滴の性質に及ぼす影響を説明する一般則はまだない。本研究では、液滴の形成・消失のメカニズムを核酸の構造変化という視点から解明することを目指した。核酸の非標準構造の一つであるグアニン四重らせん構造に着目して、その特性を系統的に調べた結果、構造中のグアニカルテットの枚数により、液滴形成に与える影響が異なることを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内に存在する液滴は、認知症やアルツハイマー病などの神経変性疾患を引き起こすアミロイド形成に関わる。RNAグアニン四重らせん（G4）は、液滴形成に関わるRNA配列中に存在する核酸の高次構造の一つであり、本研究ではRNA G4に着目して、この構造の周辺環境への応答、液滴形成への影響を調べた。その結果、G4に含まれるグアニカルテットの枚数により、周辺環境の変化への応答が異なることが明らかになった。この結果は、RNA G4が液滴形成に与える影響が、グアニカルテットの枚数で異なることを示唆するものであり、RNA G4の疾患への影響解明やRNA G4を標的とした創薬研究の基盤となる成果である。

研究成果の概要（英文）：The membrane-less organelles (droplets) in cells has been suggested to be involved in various biological phenomena, such as the regulation of gene expression, and also to contribute to the pathogenesis of cancer and neurodegenerative diseases. Most droplets contain nucleic acids, but there is still no general rule that explains the properties of these nucleic acids and the effect of nucleic acids on the properties of droplets. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of droplet formation and disappearance from the viewpoint of structural changes of nucleic acids.

We focused on G-quadruplexes, which is one of the non-canonical structures of nucleic acids, and systematically investigated its properties. The results suggest that the number of guanine quartets in the structure has different effects on droplet formation.

研究分野：核酸化学、生体関連化学

キーワード：DNA RNA 核酸高次構造 遺伝子発現制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内には、液-液相分離することにより形成する膜のないオルガネラ (Membrane-less organelles) や生体分子の濃縮体 (Biomolecular condensates)、液滴 (Droplet) とよばれる構造体が多数存在していることが明らかになりつつある (以下液滴とする)。細胞内に存在するこれらの液滴には核酸分子 (特に RNA) が含まれている例が多く報告されている。しかしながら、核酸が液滴形成に及ぼす影響や液滴に含まれる核酸の特性を総括的に説明する一般則はない。核酸の細胞内での液滴形成への寄与及び必然性を理解することは、細胞がストレスなどの環境変化に応じて瞬時に遺伝子発現制御を行うメカニズムの解明に繋がる重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、多様な核酸の高次構造の液-液相分離による液滴の形成への影響を分子レベルで定量的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、多様な核酸の高次構造の液-液相分離による液滴の形成への影響を分子レベルで定量的に解明する。そのため、下記の2ステップに分けて研究を行う。(1) 液滴に含まれる RNA の特徴を明らかにする。(2) 核酸が液滴の性質に及ぼす影響を明らかにする。

(1) RNA グアニン四重らせん (G4) は、液滴形成に関わる RNA 配列中にも存在する核酸の高次構造の一つであり、本研究では RNA G4 に着目して、この構造の周辺環境への応答、さらには液滴形成への影響を調べることとした。RNA G4 が周辺の分子環境の変化によりどのようにその熱力学的安定性を変化させるのかを系統的かつ定量的に調べた。具体的には、0-40 wt% の PEG200 (ポリエチレングリコール (平均分子量 200)) の存在下における、2-4 枚のグアニカルテットおよび 2-4 塩基長のループを有する G4 の熱安定性を調べた (図 1)。

(2) 試験管内に形成させた液滴に共局在する核酸の特徴を調べる。具体的には細胞質でストレス粒に局在していることが報告されている hnRNPA1 を用いて試験管内に液滴を形成する。hnRNPA1 は多様な RNA 結合タンパク質ファミリーに属しており、選択的スプライシングや核輸送といった RNA プロセッシングに広く関わるタンパク質である。hnRNPA1 のプリオン様ドメインはセリンやグルタミン、アスパラギン等の極性無電荷アミノ酸残基や、チロシン、フェニルアラニン等の芳香族アミノ酸残基を多く持ち、液滴形成に寄与していることが知られている。蛍光ラベルした RNA G4 を形成した液滴に添加し、蛍光顕微鏡で hnRNPA1 の液滴との局在を観察する。また、共局在する核酸とタンパク質の相互作用を等温滴定型カロリメーター (ITC) 及び、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定により解析する。核酸構造の安定性は融解温度測定 (T_m) により解析する。これによりそれぞれの核酸構造の持つ物性がタンパク質との相互作用及び液滴形成に及ぼす影響を調べる。

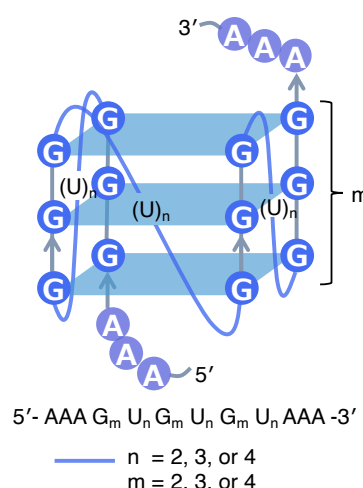


図 1 本研究に用いた RNA 配列が形成する G4 構造

4. 研究成果

(1) 系統的に配列を変化させた RNA G4 の熱安定性を調べたところ、グアニカルテットの枚数が多いほど、PEG200 による安定化の程度が大きいことが明らかになった。PEG200 非存在下での熱安定性と比べて、3 枚のグアニカルテットを有する RNA では 40 wt% の PEG200 により ΔG_{25}° はほとんど変化しなかったのに対し、3、4 枚のグアニカルテットを有する RNA では安定化することが明らかになった (図 2)。この結果は、細胞内の様々なクラウディング環境における応答がグアニカルテットの枚数によって異なることを示しており、

同じグアニン四重らせん構造でもグアニンカルテットの枚数により相分離への影響や液滴内での挙動が異なることが示唆された。さらに、グアニンカルテットの枚数が異なる G4 は、ヒトのノンコーディング RNA 内で異なる分布を示すことも明らかになった (図 3)。この研究成果は、ノンコーディング RNA を介した疾患が細胞内環境に依存する可能性を示唆する重要な報告であり、米国化学会の *Biochemistry* 誌の Supplementary Cover の論文として掲載された (*Biochemistry*, 59, 2640-2649 (2020))。

- (2) (1) で用いた核酸が液滴の性質に及ぼす影響を調べるため、モデル系として hnRNPA1 を用いた液滴の形成を試みた。全長 hnRNPA1 及び変異 hnRNPA1 の配列を導入したプラスミドベクターを遺伝子工学的に作製し、大腸菌を用いたタンパク質の合成・精製を行なった。しかしながら、hnRNPA1 は精製後すぐにゲル化してしまい、顕微鏡を用いた液滴の観察実験に至らなかった。そのため、液滴を形成することが報告されている PR (プロリン-アルギニン) ポリペプチドを用いて実験を行うこととした。条件検討の結果、PR ポリペプチドは 30wt% PEG200 存在下では顕微鏡下で液滴の形成が確認されなかったのに対し、40wt%以上の PEG200 存在下では液滴が形成することが明らかになった。またコントロールとして調整した GP (グリシン-プロリン) ポリペプチドでは PEG200 を添加しても液滴の形成は観察されなかった。今後、蛍光ラベル化した様々な配列を有する RNA G4 を調整し、様々なクラウディング条件下における PR ポリペプチドによる液滴形成への影響や、相互作用を詳細に調べる予定である。これにより RNA G4 が液滴の性質に及ぼす影響の詳細を明らかにする。

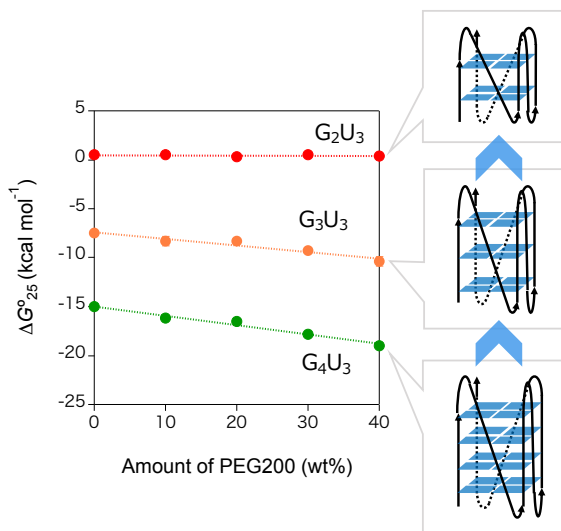


図 2 0-40 wt% PEG200 存在下における G₂U₃ (赤)、G₃U₃ (オレンジ)、G₄U₃ (緑) の熱安定性 (ΔG°_{25})

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Matsumoto Saki, Tateishi-Karimata Hisae, Takahashi Shuntaro, Ohyama Tatsuya, Sugimoto Naoki	4. 巻 59
2. 論文標題 Effect of Molecular Crowding on the Stability of RNA G-Quadruplexes with Various Numbers of Quartets and Lengths of Loops	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2640 ~ 2649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00346	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 Matsumoto Saki, Sugimoto Naoki	4. 巻 379
2. 論文標題 New Insights into the Functions of Nucleic Acids Controlled by Cellular Microenvironments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Topics in Current Chemistry	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s41061-021-00329-7	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 S. Matsumoto, H. Tateishi-Karimata, S. Takahashi, and N. Sugimoto
2. 発表標題 Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix(58): The effect of molecular crowding on the stability of RNA G-quadruplexes with various number of quartets and loops
3. 学会等名 日本化学会第100回春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本咲, 建石寿枝, 高橋俊太郎, 大山達也, 杉本直己
2. 発表標題 異なるGカルテット数とループ長を有するRNAグアニン四重らせんの安定性への分子クラウディングの効果
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Matsumoto, T. Ohyama, and N. Sugimoto
2. 発表標題 Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (XX) : Topology and functions of DNA G-quadruplexes in CpG island regulated by cations and molecular crowding during senescence
3. 学会等名 日本化学会第101回春季年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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