

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2009 ～ 2010  
 課題番号：21710191  
 研究課題名 (和文) 改良 SELEX 法による哺乳類リボヌクレオプロテオーム (RNPOm) 動態の解明  
 研究課題名 (英文) Analyses of mammalian ribonucleoproteome dynamics via modified SELEX procedure.  
 研究代表者  
 大内 将司 ( Shoji OHUCHI )  
 東京大学・医科学研究所・助教  
 研究者番号：20422412

研究成果の概要(和文):生体内で蛋白質と相互作用する新規な RNA 因子群を同定するため、試験管内分子進化 (SELEX) 法と *in silico* スクリーニングを応用して、種々の蛋白質と相互作用する RNA をヒト転写産物より探索した。その結果、転写伸長制御因子である HEXIM1 蛋白質と、複数の mRNA との相互作用が見いだされ、新規な転写後発現調節機構の存在が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : In order to identify natural RNA elements which interact with intracellular proteins, I performed the modified SELEX procedure coupled with *in silico* screening employing whole human transcriptome library, and found the interactions between a transcription elongation regulator protein, HEXIM1, and several mRNAs. The result indicates the presence of a novel class of post-transcriptional gene regulatory mechanism mediated via RNA-protein interactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム調節

#### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現は、転写開始から翻訳終結に至る様々な段階で調節を受けており、その多くで RNA と蛋白質との相互作用が中心的な役割を果たしている。また、高等真核生物において大量の非翻訳 RNA (non-protein-coding RNA, ncRNA) が存在する事が明らかになっているが、その中には、tRNA や rRNA のように特異的な立体構造を形成し、蛋白質と直接相互作用してその機能を制御する新規な機能

性 ncRNA も存在すると推測される。

これまで、一般的な RNA 結合モチーフをもたない蛋白質に結合する、人工的な親和性 RNA (aptamer、アプタマー) が多数取得されており、この事から、多くの蛋白質は潜在的に RNA と相互作用し得るものであり、生体内で RNA との相互作用による機能制御をうけているのではないかと考えられる。すなわち、適当な解析技術の欠如から報告例がわずかに限られているものの、人工的なアプタマー

の様に特異的な立体構造を形成して、特定の蛋白質と相互作用する機能性 ncRNA (や mRNA 上の機能領域) はもっと多数存在する可能性がある。

そのような、RNA 因子を同定・解析する実験技術としては、3 ハイブリッド・システムといった *in vivo* 検出系や免疫沈降等が応用されているが、これらはそれぞれ、探索する事が可能な RNA 因子の分子種数に制限がある、検出感度の制約によって発現量の小さい分子種の検出が困難である、といった問題があり、標的としたい RNA との相互作用が未知の蛋白質の解析には不向きであった。また、バイオインフォマティクス的手法による、生物種間で一次配列や発現特性が保存された領域の同定も盛んに行われているが、この手法はそれ単独では、RNA 因子がどのような機能を担っているのか分からないという、転写産物内部プロモーターのように DNA 上の配列として機能する領域と、RNA 因子として機能する領域とを区別する事も困難である。さらに、立体構造に依存して機能する RNA 因子は、多くの自己スプライシング・イントロン RNA が蛋白質コード領域によって数千塩基にもわたって分断されているように、しばしば一次配列上は分断化されている事、機能が保持されるためには、ごく一部の塩基以外は、二次構造を崩さない限り一次配列が保存されている必要がない事から、配列情報のみ依存したような探索方法では取りこぼされてしまう可能性が小さくないと考えられる。このため、以上の欠点を克服するような実験技術による RNA 因子の同定・解析が望まれていた。

## 2. 研究の目的

申請者は、人工のアプタマーを作製する技術である SELEX 法を改良し、任意の蛋白質と相互作用している天然の RNA 因子を同定する手法を確立していた。この手法では、逆転写 PCR 用のタグ配列や反応条件を工夫する事によって、培養細胞より抽出した全 RNA を、その鎖長や配列、5' 末端のキャップ構造等に依存する事無く、すなわち抽出した RNA の分子種を取りこぼす事無く網羅的に探索する事が出来る。この改良 SELEX 法では、初期プールとして  $10^{15}$  以上という膨大な分子種を容易に取り扱う事が可能であり、また、選別・増幅の操作を繰り返すという特徴から、初期プール内における存在量が極めて小さい分子種であっても (原理的には 1 分子しか存在しない場合でも)、その同定を行う事が可能である。

モデル実験として、相互作用する RNA 因子が既知である HEXIM1 ならびに U1A を標的蛋白質として、ヒト培養細胞より抽出した全 RNA をもちいてこの改良 SELEX 法を行い、期待通りに、それぞれと相互作用する 7SK snRNA

ならびに U1 snRNA の取得に成功している。当該研究課題では、この改良 SELEX 法を応用して、RNA 結合モチーフを持たない転写因子・翻訳因子等と相互作用するような天然の RNA 因子群を同定し、リボヌクレオプロテオーム (RNPome) のダイナミクスを介した高等真核生物のゲノム調節機構を解明するための足がかりとする事を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規 RNA 因子群の探索

哺乳類培養細胞より抽出した全 RNA を初期プールとして用い、上述の改良 SELEX 法によって、標的蛋白質と直接相互作用する新規な RNA 因子群の同定を試みた。標的としては、① RNA 結合モチーフを持たない転写因子、② RNA 結合モチーフを持たない翻訳因子、③ RNA 結合モチーフを持つものの相互作用する RNA 因子が不明であり、現段階では明確な機能が未知である蛋白質、という特徴の蛋白質を候補とした。①と②の転写因子や翻訳因子は、申請者の研究から、比較的容易に複数の人工 RNA アプタマーを取得することが可能であることがわかっており、このことから、これらの蛋白質が生体内でも様々な RNA と相互作用している可能性が高いと考えられる。③の RNA 結合モチーフを持った蛋白質は、当然ながら生体内で RNA と相互作用しているものと考えられる。

### (2) 同定された RNA 因子の解析

(1) で同定された RNA 因子について、フィルター結合法によって、標的蛋白質への結合特性の解析、ならびにホモログ蛋白質への結合の有無を検証した。また、RNA 因子の部分欠失変異体を作成して、標的蛋白質への結合に必要な領域・構造を特定し、同様な構造を持った RNA 因子を *in silico* で探索した。以上によって同定された RNA 因子は、標的蛋白質に対する抗体をもちいた共免疫沈降法によって、実際に細胞内で標的蛋白質と相互作用しているか否かを検証した。さらに、培養細胞で標的蛋白質の過剰発現を行い、RNA 因子の発現量やプロセッシングパターンに影響が見られるか否かを解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 改良 SELEX 法による新規 RNA 因子の探索

ヒト培養細胞より抽出した全転写産物を初期プールとして用いた改良 SELEX 法により、新規 RNA 因子群の探索を行った。その結果、翻訳開始因子である eIF-4E と相互作用する内在性の RNA としてヒト HDGF (hepatoma-

derived growth factor) mRNA が、転写伸長制御因子である HEXIM1 と相互作用する RNA として CAD(carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydro-orotase) mRNA が同定された。同定された相互作用領域は、いずれの RNA とも蛋白質コード領域内に位置していた。

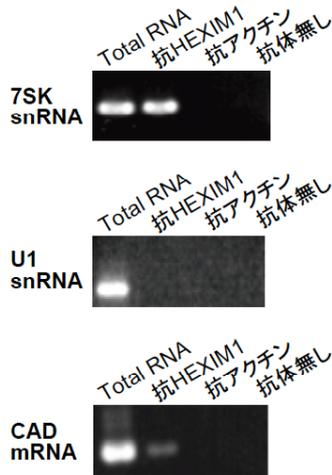


図1

### (2) 同定されたRNA因子の解析

同定されたRNA-蛋白質相互作用が、細胞内で実際に存在する事を確認するため、標的蛋白質に対する抗体をもちいて、細胞抽出液からの共免疫沈降を行った。その結果、特に HEXIM1 蛋白質-CAD mRNA相互作用について、さまざまな条件下において再現性良く相互作用の存在が確認された (図1)。

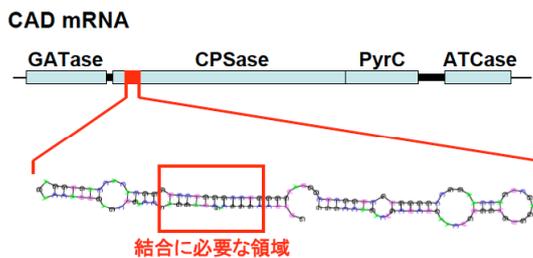


図2

同定されたCAD mRNAのコード領域 (以降、CAD RNA) のうち、HEXIM1蛋白質との相互作用に必要な領域を絞り込むため、部分的に配列を取り除いた変異RNAを作成し、それらの結合活性をフィルター結合法によって確認した (図2、表1)。その結果、結合活性にはコード領域内の約20塩基の領域で十分である事が判明した。続いて、このRNAエレメントの結合活性に必要な構造・配列を決定するため、種々の

塩基置換変異体を作成し、その結合能を確認した。その結果、10塩基のコンセンサス配列を持ったステム-バルジ構造 (以降、CAD stem) が、結合活性に必要な十分である事が判明した。

表 1. 各 RNA の Kd 値

	7SK RNA	CAD RNA	CAD stem	U1 RNA
HEXIM1	309	30	33	$> 10^4$
HEXIM2	1,017	99	76	$> 10^4$
HEXIM1(ILAA)	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$
HEXIM1(AAA)	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$

(単位: nM)

フィルター結合法によって、CAD RNAならびにCAD stemのHEXIM1蛋白質への解離定数を決定したところ約30 nMと、既知のHEXIM1蛋白質結合RNAである7SK snRNAよりも1桁高い親和性を示した (表1)。また、HEXIM1蛋白質のホモログであるHEXIM2に対しても約100 nMと高い親和性を示した。さらに、CAD RNA、CAD stemと7SK snRNAとは、HEXIM1蛋白質への結合を互いに競合する事、7SK snRNAへの結合活性を失う変異HEXIM1蛋白質 (HEXIM1 (ILAA)ならびにHEXIM1 (AAA)) が、CAD RNAへの結合も失った事から、結合様式も類似している事が示唆された。

培養細胞で HEXIM1 蛋白質の過剰発現を行い、CAD mRNA の発現量やプロセッシングパターンに影響が見られるか否かを検証したが、解析した条件下においては目立った影響は確認されなかった。

### (3) In silicoスクリーニングによるRNA因子の同定

CAD stemと同様の構造をもつRNAをヒトゲノムデータベースより検索し、同定されたRNAとHEXIM1蛋白質との相互作用を共免疫沈降法によって検証したところ、複数のmRNAがHEXIM1蛋白質と細胞内で相互作用している事が示された。

以上の結果は、HEXIM1が、RNAポリメラーゼIIの転写伸長活性を普遍的に制御するという既知の機能とは別に、特定のmRNAと直接相互作用し、その動態を特異的に制御するという新規な発現調節機構を担っている事を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

①藤本悠希、大内将司、中村義一『HEXIM1タンパク質と相互作用する新規mRNAエレメントの同定/Identification of a novel mRNA element that associates with HEXIM1 protein.』BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、2010年12月10日、神戸)

[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:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大内 将司 ( Shoji OHUCHI )

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 20422412

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: