

<b>20 非標準核酸制御因子の探索と細胞内挙動解析</b>	<b>山元 淳平</b>
--------------------------------	--------------

**【目的】** 生体中の遺伝情報を担う DNA は、特異的な塩基対形成に基づく二重らせん構造を形成することで、その遺伝情報の複製・維持を担っている。しかし、従来の二重らせん構造のほかにも、DNA は安定な非標準三次元構造体を形成することが知られている。なかでも、グアニンリッチな DNA 配列において形成される DNA 四重鎖構造（グアニン四重鎖、G4）は、代表的な非標準核酸構造であり、DNA 複製や転写の阻害をきたすことが報告されている。それゆえ、G4 を特異的に認識してその機能を自在に制御する生体機能が存在することが予見され、実際に G4 構造を安定化したり解きほぐしたりするタンパク質の存在が報告されている。一方で、G4 形成配列の相補鎖にはシトシンリッチな配列が存在する。この配列では、i-motif と呼ばれるシトシン四重鎖が形成されることで、同様に DNA 複製を阻害することが知られている。従って、G4 同様、i-motif を特異的に認識して生体機能を制御する機構が存在することが考えられるが、現在までにそのような機能を示すタンパク質はほとんど発見されていない。本研究では、i-motif 結合タンパク質をターゲットとし、相互作用の大小を問わず、近接効果による化学反応を利用したタンパク質ラベル化による非標準核酸結合タンパク質のスクリーニング、およびそれらの細胞内挙動の同定を行うことを目的とした。

**【方法】** i-motif 形成オリゴヌクレオチドの 5'末端に対して反応性リンカーを介して生体直交性のアルキンを導入したプローブ分子を調製した。このプローブ分子を細胞核抽出物と混ぜたのち、Click 反応によりビオチン修飾を導入し、ストレプトアビジン含有ビーズと作用させることで、ターゲット核酸に近接した履歴のあるタンパク質をプルダウンした。得られたタンパク質を質量分析法により同定し、i-motif 結合候補タンパク質を網羅的に調べた。候補タンパク質の一部を遺伝子組換えタンパク質として得、i-motif 結合能を試験管内で評価した。

**【結果】** プロテオーム解析の結果、様々な i-motif 結合候補タンパク質が得られた。中でも、ヌクレオリン (NCL) と DHX9 に着目した。NCL は核小体の構成タンパク質であり、G4 に結合してその構造を強固にすることが知られているタンパク質である。また、DHX9 はヘリカーゼの一つであり、G4 に結合してその構造を緩和させることが知られているタンパク質である。これら G4 の構造調節タンパク質が i-motif にも結合し、構造調節を担う可能性が認められたため、これらを遺伝子組換えタンパク質として調製した。NCL は大腸菌から調製し、i-motif との結合能を評価したところ、G4 と同様に結合が認められた。また、i-motif を形成する DNA 配列をテンプレートとして用いた DNA ポリメラーゼによる DNA 伸長反応を行ったところ、NCL の非存在下では DNA 伸長が i-motif の箇所では停止したものの、NCL の添加により DNA 伸長が加速される兆候が見られた。このことから、NCL は i-motif の構造調節因子である可能性が示唆された。また、DHX9 については現在昆虫細胞発現系にてタンパク質調製を試みている。予試験として、DHX9 を HeLa 細胞にて過剰発現して免疫染色したところ、DHX9 は核小体に局在していることが明らかとなった。今後、核小体や核スペckルなどの核内構造体と i-motif の関係性に着目し、研究を進める予定である。

非標準核酸制御因子の同定戦略

