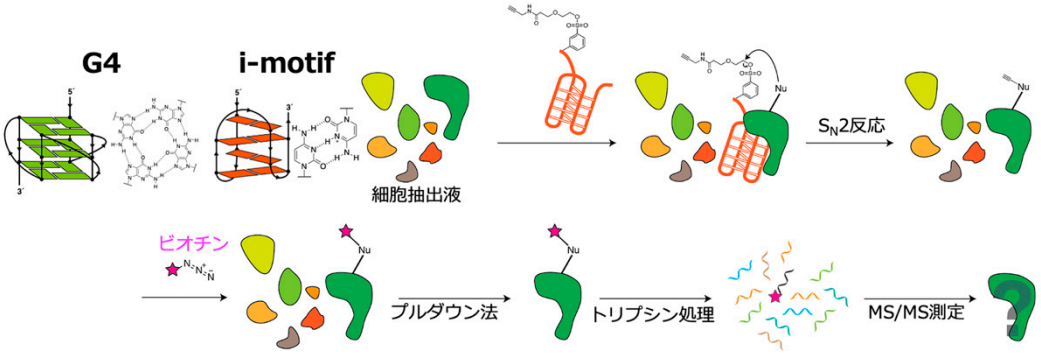
20　非標準核酸制御因子の探索と細胞内挙動解析	山元　淳平

【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、核小体や核スペック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



20. 非標準核酸制御因子の探索と細胞内挙動解析

山元　淳平

大阪大学 大学院基礎工学研究科 物質創成専攻 機能物質化学領域 生体機能化学研究室

Key words：非標準核酸，核酸結合タンパク質，近接ラベリング，プロテオーム解析

緒　言

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、図1上）は、ヒトテロメアやがん原遺伝子であり山中ファクターとして知られるc-Mycのプロモーター領域でよく見られる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［1］。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［2］。

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と呼ばれる別の非標準核酸構造が形成されることが知られており（図1上）、ヘミプロトン化したシトシン同士が対合して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［3］。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［4］。G4を解きほぐすタンパク質の機能不全は指定難病であるウェルナー症候群やファンコーニ貧血など多くの遺伝子疾患の原因となることから、これら非標準核酸の調節因子は創薬ターゲットとなることが大いに期待される（図1下）。したがって、現在盛んに研究がなされている領域である。

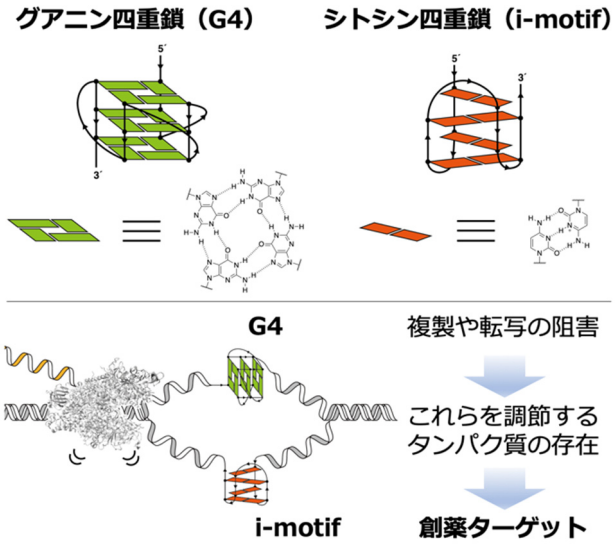


図1. 非標準核酸構造

上）グアニン四重鎖（G4）およびシトシン四重鎖（i-motif）の構造。

下）非標準核酸構造が生体に与える影響。

従来、核酸結合タンパク質はそのターゲットである核酸構造に対して高い親和性を示すため、その核酸を固定化したビーズなどを用いることで、ターゲット核酸に特異的に結合するタンパク質をプルダウン法により回収し、スクリーニングを行うことができる。G4 結合タンパク質はこの方法によって同定された一方で [5]、同法によって i-motif に特異的に結合するヒト由来のタンパク質は同定されていない。熱力学的に安定な相互作用を示すタンパク質が生命機能に重要な役割を果たすことは自明であるが、過渡的に形成するタンパク質-DNA 相互作用が機能を果たす可能性も十分にある。このようなタンパク質群を既存の熱力学的安定性に依存した方法によってとらえることは困難であり、全く異なるアプローチが必要となる。

我々は、核酸上に反応性リンカーを介して蛍光色素を導入することで、核酸-タンパク質複合体形成時の近接効果を利用して蛍光色素をタンパク質上へと共有結合的に移し、タンパク質の機能を人工的に向上させることに成功した [6]。この報告は、核酸結合タンパク質が熱力学的に安定な複合体を形成することを利用したが、一般に核酸結合タンパク質は基質となる核酸に対して結合の強さとは関係なく、適切に核酸を認識することができる。これに着想を得、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種々の核酸結合タンパク質のスクリーニングが可能ではないかと考えた。本研究では、G4 および i-motif に注目し、既知の強い相互作用を示す核酸結合タンパク質のほか、弱い相互作用を示すタンパク質を網羅的に同定することで、G4 および i-motif 結合タンパク質の細胞内挙動研究の第一歩を展開することを目的とした。その結果、これまでに報告例のない新規 i-motif 結合タンパク質を同定した。その役割について検討したので、以下報告する。

方法および結果

1. 修飾核酸を用いたタンパク質修飾反応とプロテオーム解析

i-motif を形成することが知られているオリゴヌクレオチド（WT）、およびその配列を一部変更したオリゴヌクレオチド（Mut）の 5’末端にアミノリンカーを導入した。その後、反応性リンカーを介して末端アルキン部位と NHS 活性エステル部位を繋いだ分子を反応させることで、タンパク質修飾プローブオリゴヌクレオチドを調製した。HeLa 細胞核抽出物とこのプローブを混和したのち、強酸性条件で核酸を分解すると同時にタンパク質を凝集・回収した。ビオチンアジドとの Click 反応によってアルキン部位にビオチン修飾をしたのち、ストレプトアビジン–アガロースゲルを用いてビオチン化されたタンパク質を回収した（図 2A）。この際の沈澱画分および上清画分を SDS-PAGE にて分離し、銀染色およびストレプトアビジン–HRP を用いてウェスタンブロッティングを行った（図 2B）。その結果、250 kDa 付近に WT 特異的なスメアなバンド 1、100～150 kDa の間のバンド 2、75 kDa 付近にバンド 3、4 が検出された。1 を除いて Mut でも同じ位置にバンドが弱く検出されたことから、何らかの核酸結合タンパク質が特異的に i-motif 構造を認識することで、プローブ分子上のアルキンがタンパク質に移動したと考えられる。

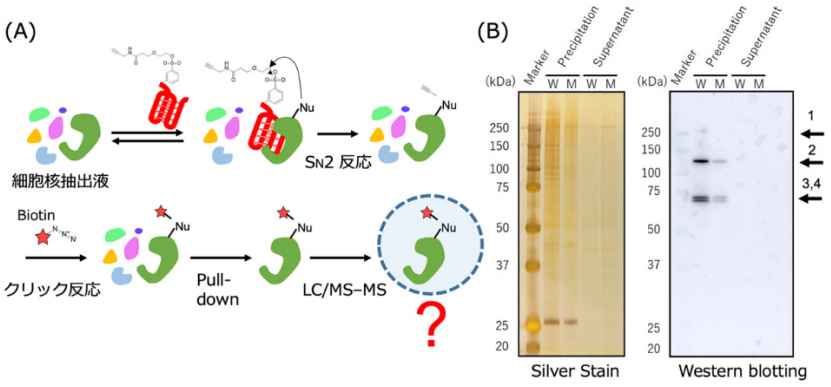


図 2. 新規 i-motif 結合因子の同定戦略

A) 細胞核抽出物からの探索。

B) SDS-PAGE および Western blotting の結果。

銀染色 SDS-PAGE の結果を用いて、プロテオーム解析を行った。WT および Mut において前述のバンド領域に含まれるタンパク質を解析し、得られたタンパク質群の中で WT においてスペクトルカウントの大きいタンパク質を表 1 にまとめた。スペクトルカウントに差が見られたのはバンド 2 のみで、バンド 1 およびバンド 3、4 においては、WT と Mut のスペクトルカウントに大きな違いは観測できなかった。

表 1. 同定された i-motif 結合候補タンパク質

Identified protein	Accession Number	MW	WT	Mut
DHX9	DHX9_HUMAN	141 kDa	14	0
Carbamoyl–phosphate synthetase	A0A024R454_HUMAN (+4)	165 kDa	6	0
Pyruvate carboxylase	A0A024R5C5_HUMAN (+1)	130 kDa	6	0
Fatty acid synthase	A0A0U1RQF0_HUMAN (+1)	273 kDa	4	0
Nucleolin	A0A024R4A0_HUMAN (+4)	77 kDa	4	0
Lon protease	B3KXS5_HUMAN (+4)	103 kDa	4	0
DNA dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC_HUMAN	469 kDa	4	0
ATP–citrate synthase	A0A024R1T9_HUMAN (+3)	121 kDa	3	0
RNA cytidine acetyltransferase	NAT10_HUMAN	116 kDa	3	0

WT および Mut の値は、検出されたペプチドフラグメントの数を表す

2. 遺伝子組換えヌクレオリンの精製と生化学解析

表 1 に含まれている数種類のタンパク質のうち、まずはヌクレオリン（NCL）に注目した。NCL は核小体の構成タンパク質であり、酸性アミノ酸が豊富な N 末端ドメイン、4 つの RNA 結合ドメイン、およびアルギニンとグリシンリッチな C 末端 RGG ドメインからなる。NCL は G4 への結合が報告されており、その構造を強固にすることが知られている［7］。G4 と類似した非標準核酸高次構造である i-motif にも同様に結合する可能性が高いことから、NCL を遺伝子組換えタンパク質として精製し、i-motif に対する挙動について調べた。過去の報告例［7］を参考に、N 末端ドメインを欠失させたタンパク質（NCL-Δ_{NTD}）および結合に関与することが報告されている RGG ドメインを欠失させたタンパク質（NCL-$\Delta_{NTD\cdot RGG}$）を、GST 融合タンパク質として大腸菌から得ることに成功した。5'末端を蛍光標識した i-motif 形成オリゴヌクレオチドに対する結合を、EMSA によって評価した。その結果、NCL-Δ_{NTD} ではタンパク質濃度の上昇に伴い、複合体バンドの形成が認められた（図 3A）。NCL-$\Delta_{NTD\cdot RGG}$ では、複合体の割合が減少したことから、RGG ドメインが部分的に i-motif 結合に関与していることが考えられる。

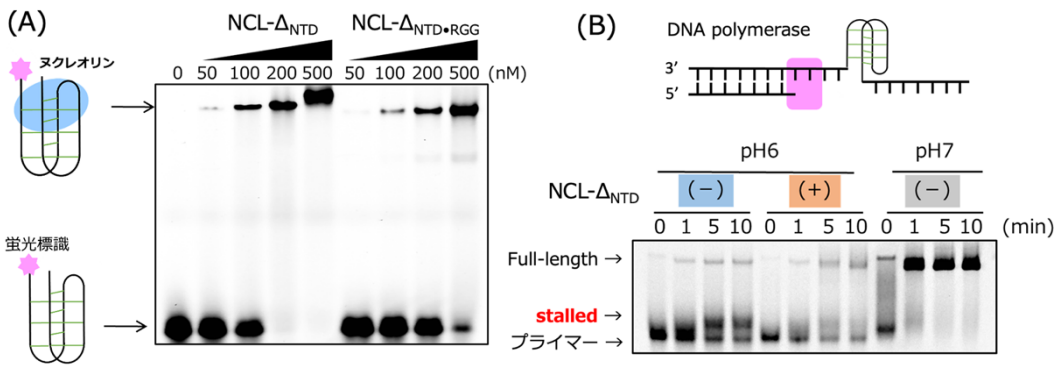


図 3. ヌクレオリンによる i-motif 認識および構造制御解析

A) EMSA 解析。

B) NCL-Δ_{NTD} 存在下における DNA 伸長実験。

G4 や i-motif などの非標準核酸構造の形成は DNA の複製を阻害する。通常、DNA ポリメラーゼによって鋳型鎖に相補的な配列を持つプライマーの伸長反応が起こり、DNA が合成されるが、鋳型鎖に G4 や i-motif などの非標準核酸構造が存在すると、プライマーの伸長が阻害される。ヌクレオリンは G4 構造を安定化することで、プライマーの伸長をより阻害することが報告されているため、i-motif 構造に関しても構造を制御するような機能を示すかどうか調べるために、プライマー伸長実験を行った（図 3B）。中性条件の pH 7 では、プライマーが完全に伸長した Full-length の産物がすみやかに得られたが、 i-motif 構造が安定化する pH 6 の酸性条件下では、鋳型鎖に形成された i-motif 構造により DNA 複製が阻害され、途中で反応が停止したと考えられるバンドが現れた。一方で、NCL-Δ_{NTD} の存在下では、伸長停止したバンドが薄くなった。このことから、NCL が i-motif に結合することで、DNA 伸長が促進される可能性が示唆された。

3. ヘリカーゼ DHX9 の細胞内挙動解析

表 1 に含まれているタンパク質のうち、DHX9 にも同様に注目した。DHX9 はヘリカーゼのひとつであり、これまでに二本鎖 DNA や二本鎖 RNA・DNA:RNA ハイブリッド・DNA fork・RNA fork・D-loop・R-loop・Triplex DNA・DNA G4・RNA G4 を基質として認識し、巻き戻すことができると報告されている［8］。i-motif 構造に対しても活性を示す、つまり i-motif 構造を巻き戻すことができるならば、DNA 複製や転写・翻訳における下流の遺伝子発現の促進に寄与すると考えられる。遺伝子組換え DHX9 の調製に先立ち、過剰発現系における DHX9 の細胞内局在について検討を行った。FLAG タグを付与した DHX9 発現プラスミドを構築し、HeLa 細胞にトランスフェクションしたのち免疫染色を行ったところ、DHX9 は核内の核小体に局在する様子が観測された（図 4）。現在、DHX9 の i-motif への挙動を調べるために昆虫細胞発現系による遺伝子組換え DHX9 の調製を試みている。

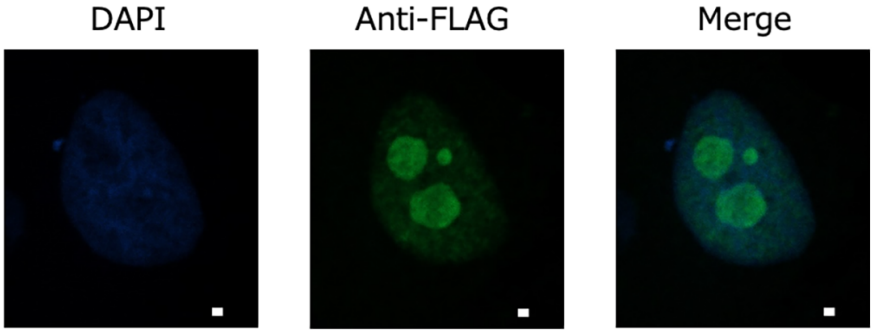


図 4. DHX9 過剰発現 HeLa 細胞の免疫染色
スケールバー：2 μ m。

考　察

本研究において、これまでに報告例のない i-motif 結合候補タンパク質が検出された。一方で、既知の i-motif 結合タンパク質については検出が認められていない。その一因として、本法は結合位置依存的なラベル化法であることが考えられる。今回はタンパク質修飾プローブの 5'末端にラベル化部位を導入したが、既知の i-motif 結合タンパク質である hnRNP A1 は、i-motif の 5'末端とは逆の位置に結合する可能性が報告されており［9］、ラベル化部位から物理的に距離があることから検出が認められなかったと考えている。今後、プローブ分子におけるラベル化部位の修飾位置依存的な網羅的検出を行うことで、より広範な新規 i-motif 結合タンパク質が検出できる可能性がある。

また、今回着目した NCL は核小体構成タンパク質であり、DHX9 も同様に核小体に局在することが示唆された。この偶然の一致は、i-motif および i-motif 結合タンパク質群が核小体において何らかの生物学的役割を担っている可能性を示すと考えている。核小体はリボソーム DNA を多く含んでおり、興味深いことに rDNA にはグアニンリッチな配列が存在している。このことから、リボソーム RNA の形成のために G4 や i-motif を動的に構造制御している可能性を提案したい。今後、核小体や核スペック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。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学高等共創研究院の鈴木啓一郎特命教授である。

文　献

1) Rhodes D, Lipps H J. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. Nucleic Acids Res. 2015 Oct 15;43(18):8627-37. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26350216 DOI: 10.1093/nar/gkv862

2) Mendoza O, Bourdoncle A, Boulé J B, Brosh R M, Mergny J L. G-quadruplexes and helicases. Nucleic Acids Res. 2016 Mar 18;44(5):1989-2006. Epub 2016 Feb 15. PMID: 26883636 DOI: 10.1093/nar/gkw079

3) Takahashi S, Brazier J A, Sugimoto N. Topological impact of noncanonical DNA structures on Klenow fragment of DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Sep 5;114(36):9605-9610. Epub 2017 Aug 21. PMID: 28827350DOI: 10.1073/pnas.1704258114

4) Abou Assi H, Garavis M, Gonzalez C, Damha M J. i-Motif DNA: structural features and significance to cell biology. Nucleic Acids Res. 2018 Sep 19;46(16):8038-8056. PMID: 30124962 DOI: 10.1093/nar/gky735

5) Williams P, Li L, Dong X, Wang Y. Identification of SLIRP as a G Quadruplex-Binding Protein. J Am Chem Soc. 2017 Sep 13; 139(36): 12426–12429. Epub 2017 Sep 5. PMID: 28859475 DOI: 10.1021/jacs.7b07563

6) Terai Y, Sato R, Matsumura R, Iwai S, Yamamoto J. Enhanced DNA repair by DNA photolyase bearing an artificial light-harvesting chromophore. Nucleic Acids Res. 2020 Oct 9;48(18):10076-10086. PMID: 32901252 DOI: 10.1093/nar/gkaa719

7) Gonzalez V, Hurley L H. The C-terminus of nucleolin promotes the formation of the c-MYC G-quadruplex and inhibits c-MYC promoter activity. Biochemistry. 2010 Nov 16;49(45):9706-14. Epub 2010 Oct 21. PMID: 20932061 DOI: 10.1021/bi100509s

8) Chakraborty P, Grosse F. Human DHX9 helicase preferentially unwinds RNA-containing displacement loops (R-loops) and G-quadruplexes. DNA Repair (Amst). 2011 Jun 10;10(6):654-65. Epub 2011 May 10. PMID: 21561811 DOI: 10.1016/j.dnarep.2011.04.013

9) Miglietta G, Cogoi S, Pedersen E B, Xodo L E. GC-elements controlling HRAS transcription form i-motif structures unfolded by heterogeneous ribonucleoprotein particle A1. Sci Rep. 2015 Dec 17;5:18097. PMID: 26674223 DOI: 10.1038/srep18097