

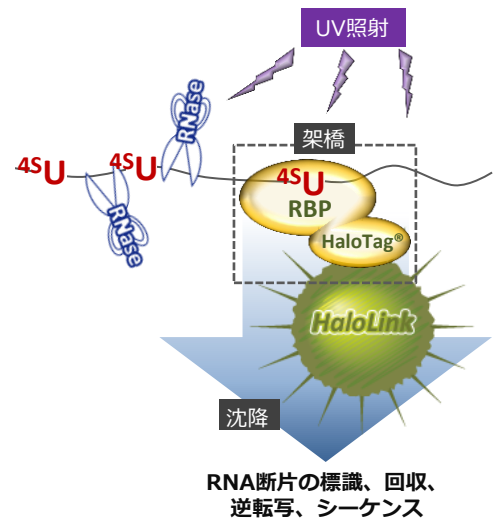
## Vol. 2 HaloTag®を用いた 蛋白質に結合するRNAの網羅的解析

大阪大学大学院医学系研究科 神経遺伝学講座 河原 行郎 先生

### はじめに

RNA結合蛋白質は、転写、スプライシングなどの修飾、RNAの安定性制御、翻訳など、RNAの代謝を様々なレベルで調節しています。また、蛋白質をコードしたmRNAのみならず、non-coding RNAの発現や機能調節にも関与しています。最近の報告 (Castello et al, Trends in Genetics, 2013)によれば、我々ヒトの体には1,500個ものRNA結合蛋白質が存在している可能性が示唆されていますが、具体的な機能が特定できているものは限られています。このため、各RNA結合蛋白質の標的を網羅的に同定することが、機能を明らかにする上でも重要です。蛋白質に結合するRNAの回収には、従来RIP (RNA immunoprecipitation)法が用いられてきました。これは、原理的にはDNAを標的としたChIP (Chromatin immunoprecipitation)法と同じで簡便ではありますが、RNAを抽出するまでに弱く結合したRNAを相当量失ってしまうことや、非特異的に結合したRNAが混入してしまうなど弱点も多いのが実情です。このため、これらの諸問題を解決するべく、CLIP (UV crosslinking and immunoprecipitation)法やその改変法であるPAR (Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced)-CLIP法 (Hafner et al, Cell, 2010)などが開発されてきました。

我々の研究室では、HaloTag®を利用したPAR-CLIP法の確立に取り組んできました。その結果、これまで具体的な機能が特定できていなかったAtaxin-2の標的と機能を明らかにすることに成功し、最近Molecular Cell誌 (参考文献)に発表しました。本手法は、今後のRNA研究に欠かせないツールの1つとなることが期待されますので、ここで紹介させていただきます。



### 1. コンストラクトの設計

pFN21Aベクターをベースにした、HaloTag®のN末端融合型ヒトAtaxin-2発現ベクターを、プロメガ社から購入しました (Flexi® ORF Clone)。これをテンプレートにして、様々な変異体も作成しました。蛋白質の発現量にもよりますが、PAR-CLIP法では細胞が大量に必要となるため (15cmプレートで20~120枚)、これらのベクターを哺乳類培養細胞に導入し、安定発現細胞株を樹立しました。

### HaloTag®を選んだ理由

免疫沈降が可能なタグにはFLAGをはじめとして複数あります。これらは、抗体を使った沈降法ですが、HaloTag®は、ビーズと共有結合するため抗体を必要とせず、結合力が高い点も魅力でした。抗体の性状に左右されないため、一旦手法を確立すれば、他の蛋白質への汎用性が高いことも魅力でした。またPAR-CLIP法では、ビーズにRNA-蛋白質複合体が結合した状態で、リンカーの付加や放射線によるラベリングなど様々な酵素反応を行う必要があります。このとき、バッファーに高濃度のDTTが含まれていることがあり、抗体への影響が懸念されますが、HaloTag®ならその影響を最小限に抑えられます。一方で、共有結合であるため、蛋白質をビーズから再度外すことは難しく、沈降した蛋白質は、HaloTEV Protease (プロメガ)を用いてHaloTag®を切断し抽出します。このため、タグに非特異的に結合してしまう蛋白質やRNAの混入リスクも軽減することが可能です。

### 2. PAR-CLIP法によるサンプル調整

図1に、PAR-CLIP法の流れを示します。実験ステップが多いので、RNAを失ったり、分解してしまわないように細心の注意を払う必要があります。はじめに、細胞を回収する前夜に、培養液中に4-チオウリジン (4-SU)を添加し、これをウリジンの代わりにRNAに取り込ませます。4-SUを含むRNAは、長波長紫外線照射によって、蛋白質と強力に架橋します。次にCell lysis buffer (プロメガ)を用いてcell lysateを回収し、Mammalian Protein Purification System (プロメガ)を用いて、Halo-Ataxin-2複合体をビーズに結合させます。ビーズ上で、次世代シーケンサーで読める程度にRNAを短くし、放射線でラベルをします。(裏面へ続く)

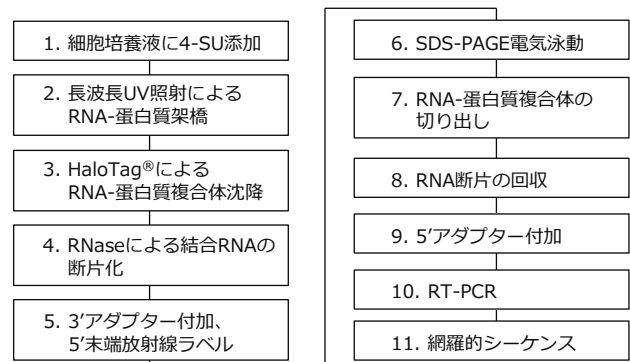


図1 : PAR-CLIP法による蛋白質に結合するRNAの回収方法の概略

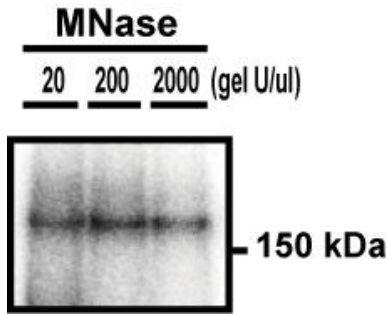


図2 : Ataxin-2結合RNA断片の検出

TEV Protease処理により、RNA-Ataxin-2複合体を回収した後、サンプルをSDS-PAGE電気泳動で分離しました。Ataxin-2は150 kDa程度ですが、HaloTag®とAtaxin-2の間にリンカーがあることやRNAが結合していることもあり、若干上方で、放射線でラベルされたRNA断片が可視できました。RNAの断片化にはMNaseを用いました。このオートラジオグラフィーから、MNaseの濃度が高くなると、バックグラウンドがきれいになりますが、同時にAtaxin-2に結合するRNA量も減ることが確認できます。したがって、適切な濃度 (通常は、200 gel U/μl) で処理する必要があります。

(表面から続く) 次に、HaloTEV Proteaseで処理し、RNAの結合したAtaxin-2複合体をビーズから切り離し、回収します。これを電気泳動すると、Ataxin-2の予想サイズ付近に、放射線でラベルされたRNAが検出されます (図2)。これを切り出すことによって、非特異的に結合したRNAの混入を低減させることができます。次に、Ataxin-2をProteinase Kで分解し、RNA断片のみを回収します。最終的にこのRNA断片を使ってcDNAライブラリーを作成し、次世代シーケンサーを使って網羅的解析を行います。

## 2. シーケンス結果の検証

PAR-CLIP法では、4-SUと蛋白質の架橋部位には、T-to-C置換が生じます。このため、情報解析を通して、更に非特異的に結合したRNAを除外できるだけでなく、結合部位を1塩基レベルで決定できるのが、PAR-CLIP法の最大の利点です。実際、今回の得られたリードを解析すると、80%以上のリードにミスマッチが確認され、更にそのうちの70%程度がT-to-C置換でした (図3)。この結果から、作成したライブラリーの質を確かめることができただけでなく、RNA上の結合部位を約1,500箇所同定することに成功しました。また、置換の生じた場所を参照することによって、Ataxin-2が認識する結合モチーフを同定することもできました。この結合モチーフが、すでに機能のよく知られた他の蛋白質の結合モチーフと重複していたことから、最終的にAtaxin-2の機能の特定に成功しました。

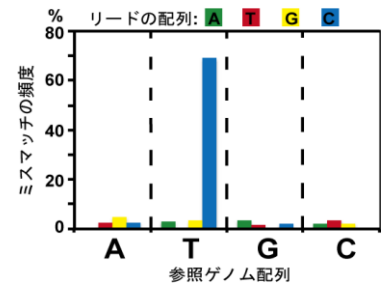


図3 : リード中に認められたミスマッチの頻度

網羅的シーケンスで得られた各リードにあるミスマッチのパターンを、ゲノム配列を参照して、解析しました。T-to-C置換が全体の70%程度を占めていました。

## こんなところで苦労しました

CLIP法やPAR-CLIP法は、比較的新しい手法であり、周りに経験者が全くいませんでした。細かい技術的なコツなどが分からず、途中で諦めかけたこともありました。特に網羅的シーケンスで得られた結果は、最終的には情報解析によって検証する必要があり、ウエットとドライの両方の解析が一体となっています。このため、シーケンスから検証までに数ヶ月を要することもあり、手法の改善・改良に長い時間を費やしました。これからCLIP法やPAR-CLIP法を試してみようとお考えの方は、結合モチーフなどがよく知られている蛋白質をpositive controlにして、最初に系を立ち上げることをお勧めします。

## 参考文献

Yokoshi, M., Li, Q., Yamamoto, M., Okada, H., Suzuki, Y., Kawahara, Y.  
*Molecular Cell* 55(2): 186-198 (2014). Direct binding of Ataxin-2 to distinct elements in 3'UTRs promotes mRNA stability and protein expression.

## 関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Flexi® ORF Clone (Flexi® HaloTag® Type)	1クローン	オンラインカタログをご覧ください	50,000~
pFN21A HaloTag® Flexi® Vector	20μg	G2821	51,000
Mammalian Lysis Buffer	40ml	G9381	10,000
HaloTag® Mammalian Protein Purification System	1システム	G6790	89,000
Protease Inhibitor Cocktail, 50X	1ml	G6521	15,000

日本語 Web site : [www.promega.co.jp](http://www.promega.co.jp)

テクニカルサービス ● Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 ● E-mail: [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com)

# プロメガ株式会社

本社 〒103-0011  
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル  
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011  
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室  
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

販売店: