

学籍番号：5401024B

氏名：小田ひより

生体構造医学講座/武内章英教授、細川元靖助教

責任指導教員による確認

本レポートの作成は、提出者本人が行い、研究不正に該当する剽窃、偽造、捏造を行っていないことを確認しました。

謝辞

本研究遂行にあたりご指導いただきました、武内章英先生、細川元靖先生、門屋綾技官、3年生の吉本仁さん、2年生の安田晴華さんに感謝申し上げます。

超長鎖遺伝子制御因子 *SFPQ* の相互作用因子 *hnRNPM* の分子機能

解析

要約

<導入>SFPQ は超長鎖遺伝子の転写伸長維持に重要であり、喪失すると神経変性疾患などの原因となることが示唆されている。その相互作用因子として、スプライシングなどの RNA 制御を行う hnRNPM が同定されている。hnRNPM が協調的に SFPQ と働いているかを解析する。

<方法>*Sfpq* と *hnRNPM* を transfection した HeLa 細胞を蛍光顕微鏡で蛍光観察することによって局在を解析した。また、*hnRNPM* をノックダウンさせ、下流の制御機構の変化を解析した。

<結果>Western Blotting の結果適切に発現させることができたことを確認し、蛍光顕微鏡での観察によって SFPQ と hnRNPM が共局在していることを確認した。また、*hnRNPM* のノックダウンによるスプライシング制御の変化を確認した。

<考察>SFPQ と hnRNPM が核内で共局在していたことから、SFPQ と hnRNPM が協調的に作用している可能性が示唆された。これらの相互作用の解明は、超長鎖遺伝子の発現メカニズムや神経変性疾患の治療開発に寄与することが期待できる。

諸言

愛媛大学生体構造医学講座では、RNA 結合タンパクである splicing factor proline and glutamine rich(SFPQ)が超長鎖遺伝子の転写伸長維持において重要なタンパクであり、SFPQ の機能が喪失されると神経発生が異常となり、精神疾患の原因になりうることを示唆されている (Takeuchi A. et al., Cell Rep, 2018)。また、骨格筋における SFPQ の喪失によって超長鎖遺伝子の転写障害や重度の筋肉量減少が引き起こされることも示唆されており (Hosokawa M. et al., iScience, 2019)、その詳しい標的遺伝子の予測やそのメカニズム解明も行われている (Iida, K., iScience, 2018)。また、その相互作用因子として RNA 制御に重要な役割を担うタンパクである異種核リボ核タンパク質 M(hnRNPM)が同定されていて、hnRNPM は特定のスプライシ

ングパターンに影響を及ぼすことが知られている (Rong Z. et al., Mol Cell, 2024)。

しかし、hnRNPM について核内でどのように作用しているのか詳細は未だ判明していない。そこで、今回は hnRNPM について核内での局在を解析し、またその下流における制御機構の変化を解析することを目的とした。

今回 HeLa 細胞における *hnRNPM* と *Sfpq* の Co-transfection による局在の確認によって、両タンパクが共局在していることが示された。SFPQ は超長鎖遺伝子の発現に関与し、神経の発生異常や精神疾患に関与していることから、相互作用を示す hnRNPM もそれらの疾患に関連している可能性が示唆された。今後 SFPQ と hnRNPM の相互作用を明らかにすることで、疾患のメカニズムや治療法を解明していくことが期待される。

材料と方法

1. C542,C543 の作成

hnRNPM には、2つのスプライシングバリエーションがあるので、2種とも作成し、解析を行うこととした。C542 = *pENTR-L1-mhnRNPM(var1)-L5*(4820bp)、C543 = *pENTR-L1-mhnRNPM-L5* (4703bp)を作成した。var1 と var2 は hnRNPM のスプライシングバリエーションが2種類あったために2種類作成した。C57BL/6 マウスの脳から抽出した RNA から作成した cDNA から insert を PCR で増幅させゲル抽出で精製した。1回目の PCR では Template は cDNA を使用し、Primer は PA275(TACAAAAAAGCAGGCTGCatggcggcaggggtcgaagc)-PA276(TGTAGATCCACCTCCAGatccacctccagcatttctatcaattcgaac)を使用した。2回目の PCR では、template は1回目に増幅させたものを利用し、Primer は PA277(GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCatgg)-PA278(GGGGACAAGTTTGTATACAAAGTTGTAGATCCACCTCC AGatc)を使用した。試薬は、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を使用した。試薬を混合させ、PCR 反応を 25 サイクル行った。その後電気泳動によって分離させ、Wizard SV and PCR Clean-Up System によってゲルから抽出し、2回目の PCR 反応を 6 サイクル行った。その後、Wizard Plus SV Minipreps DNA purification Systems で DNA のゲルからのカラム精製をし、BP 反応を行った。

2. C544,C545 の作成

C544 = *pcDNA_FRT_TO-3xFLAG-mhnRNPM(var1)-GGGS-eGFP*(8366bp)、C545 = *pcDNA_FRT_TO-3xFLAG-mhnRNPM(var2)-GGGS-eGFP*(8249bp)を LR 反応で作成した。それぞれ Entry clones は C544 については C311=*pENTER-L5-eGFP-L2*、C542 を使用し、C545 については C311、C543 を使用した。また Destination vector については V125=*pcDNA5_FRT_TO3xFLAG Dest* を使用した。酵素については LR Clonase II Enzyme PLUS を使用した。使用した試薬の量は以下の表の通りである。

Regent	C544(μl)	C545(μl)
Entry-1(C311)(21.5ng/μl)	0.5	0.5
Entry-2(C542 66.35ng/μl)、(C543 69.96ng/μl)	0.5	0.5
Destination Vector	1.0	1.0
LR Clonase II PLUS	0.5	0.5

その後サーマルサイクラーで 25°C で一晩放置した。

3. hnRNPM と SFPQ の共局在の確認

C544、C545、C487 =

pcDNA5_FRT_TO-3xFLAG_mCherry_GGGS-mSfpq、

V125=*pcDNA5_FRT-3xFLAG Dest* について、それぞれ①C544 と

V125、②C545 と V125、③C487 と V125、④C544 と C487、⑤C545 と

C487 の 5 条件で HeLa 細胞に導入した。Transfection reagent は FuGENE HD Transfection Reagent を使用した。なお、④、⑤は 4well 作成し、

①、②、③については 3-4 で使用するために 6well 作成した。各 well において 0.5 μg DNA/25 μl Opti、Co-transfection についてはそれぞれの DNA を 0.25 μg ずつ混合させた。試薬の混合は pipping を 20 回行い、室温で 10 分 incubate した。その後、1well あたり 25 μl 加え、24 時間 incubation し、4%PFA を各 well について 200 μl 加え固定し、PBS で 3回 wash した。核の染色は DAPI を使用し、wash したのち Prolong Gold で封入した。その後、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X800 で撮影した。

4. Western blotting(WB)

作成した融合遺伝子の分子量を確認するために WB を行った。3 で作成したサンプルを 2xSample buffer で回収し PBS で wash した後、2xSample buffer を 100 μl 加えて氷上処理をした。C544 と C545 に超音波処理を行い、Gel にマーカーと共に 5 μl ずつ apply し、SDS-PAGE を行った。Gel

については Wako SuperSeq Ace(10%)を使用した。濾紙にメンブレンとゲルを挟んで転写後、Bullet Blocking One で Blocking を行った。Blocking 試薬には Bullet Blocking One を使用した。その後 1 次抗体を加え、4°C で over night させ、TBS で 3 回 wash した。抗体は Anti-FLAG (抗 DYKDDDDK タグ、富士フィルム和光純薬、#018-22381) を使用した。その後 2 次抗体を加えて室温で 60 分反応させ、TBS で 3 回 wash した。抗体は Anti-Mouse 抗体 ab5887 (abcam)、 α Rabbit NA9340V GE(cytiva)を使用した。発色は Chemi-Lumi One Super を用いて撮影を行った。

5. RT-PCR

hnRNPM のスプライシングに関する機能を確認するために、siControl、ノックダウンサンプル *hnRNPM*#1、*hnRNPM*#2 について RT-PCR を行い、その結果を電気泳動によって解析した。*hnRNPM* ノックダウン細胞から抽出した RNA から合成した cDNA については細川助教から頂いた。8 連 PCR チューブに氷上で試薬、template を加え、pipetting を 20 回行い混合させた。試薬については Ex taq を使用した。その後、primer を加え tapping を 3 回行って混合させた。その後サーマルサイクラーで PCR 反応を 33 サイクル行った。それぞれの試料を Gel にマーカーと共に 5 μ l ずつ apply し、100V で 50 分電気泳動した。電気泳動した Gel を Ethidium Bromide に浸し、20 分間振盪させ、撮影した。Gel についてはアガロースゲル(2.7%)を作成し使用した。

Primers

PA0309	AGCTCTGCTCACGTTTCCCT
PA0310	TTCTGCCACTTGGTGAGGTCAT
PA0312	ACTGGAGACATGGGAACACGA

hnRNPM と SFPQ の共局在解析

1. WB による分子量の測定

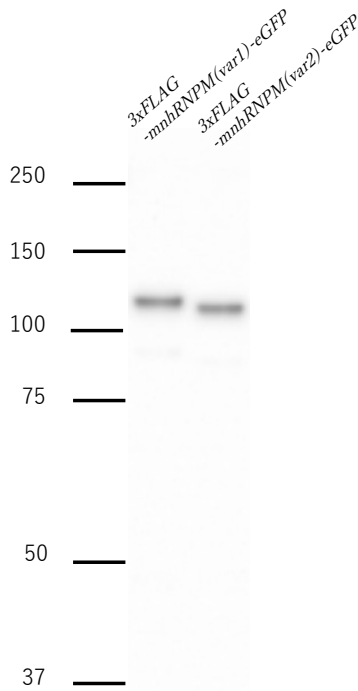


Figure 1 WB の結果

3xFLAG-mhnRNPM(var1)-eGFP、*3xFLAG-mhnRNPM(var2)-eGFP* を導入して作成したタンパク質において遺伝子が適切に発現しているかを確認するために WB を行った。バンドは *3xFLAG-mhnRNPM(var1)-eGFP*、*3xFLAG-mhnRNPM(var2)-eGFP* 共に 100kDa 上方付近に確認された。

2. 蛍光観察による局在の確認

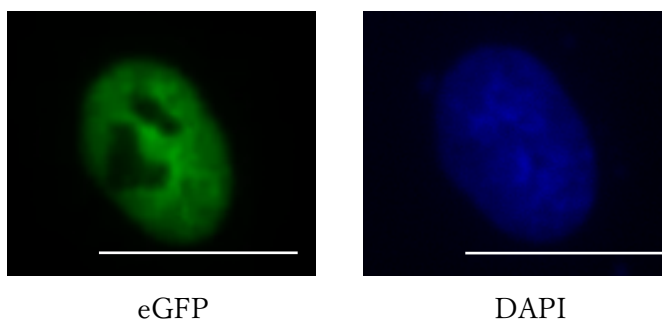


Figure 3 C544

*eGFP-hnRNPM(var1)*のみでの transfection における蛍光観察の様子 (scale:20 μ m)

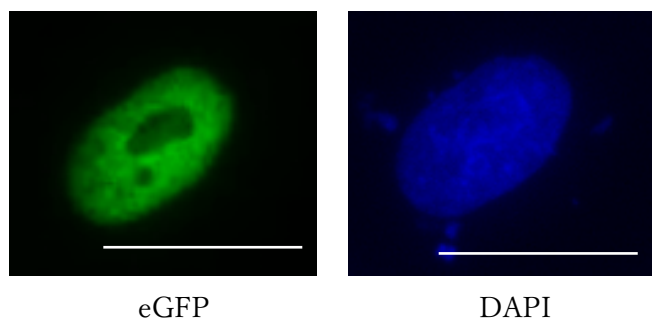


Figure 4 C545

*eGFP-hnRNPM(var2)*のみでの transfection における蛍光観察の様子
(scale:20 μ m)

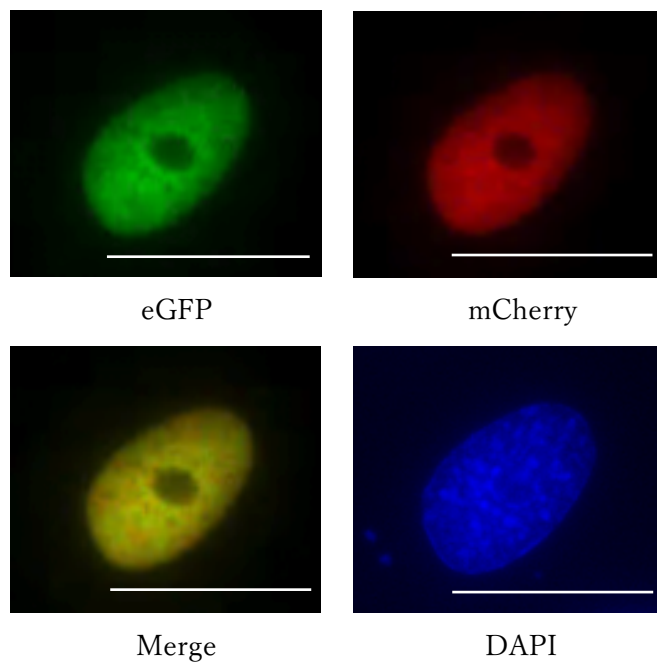


Figure 5 Co-transfection(C487-C544)

*eGFP-hnRNPM(var1)*と *mCherry-mSfpq* の co-transfection における蛍光観察の様子(scale:20 μ m)

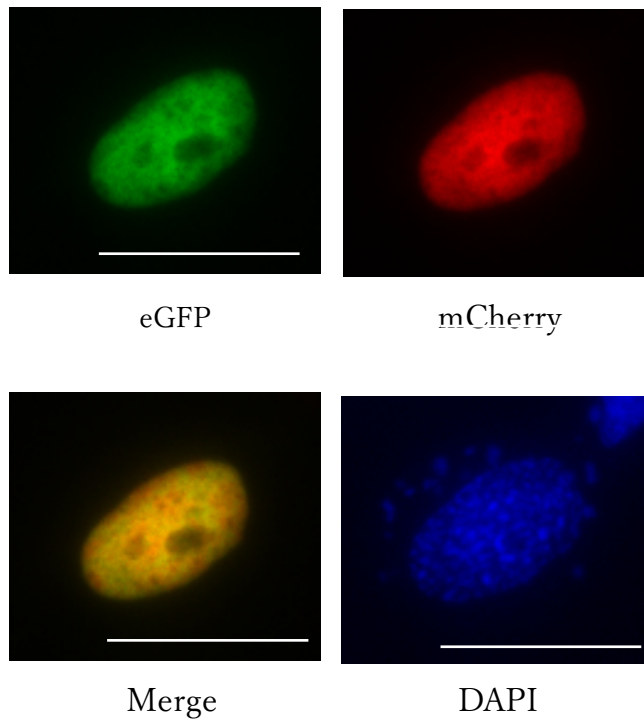


Figure 6 Co-transfection(C487-C545)

eGFP-hnRNPM(var2) と *mCherry-mSfpq* の co-transfection における蛍光観察の様子(scale:20 μ m)

hnRNPM と SFPQ の機能を確認するために、HeLa 細胞に①C544 と V125、②C545 と V125、③C487 と V125、④C544 と C487、⑤C545 と C487 の 5 条件で transfection させ、DAPI で染色し蛍光観察を行った。C544、C545、C487 のいずれにおいても核全体に細かい構造物として複数確認できた。また、C544、C545 と C487 を共発現させたところ、SFPQ と hnRNPM の核内での共局在が確認された。

3. RT-PCR

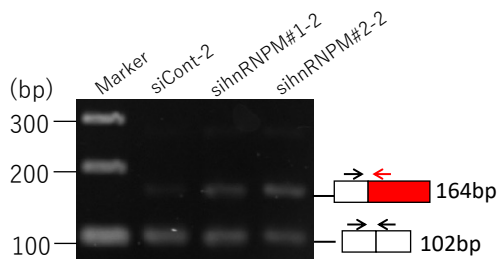
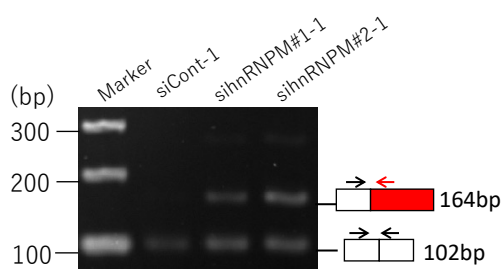


Figure 7 TRAPPC10 に対する RT-PCR の結果



Figure 8 ゲノム図

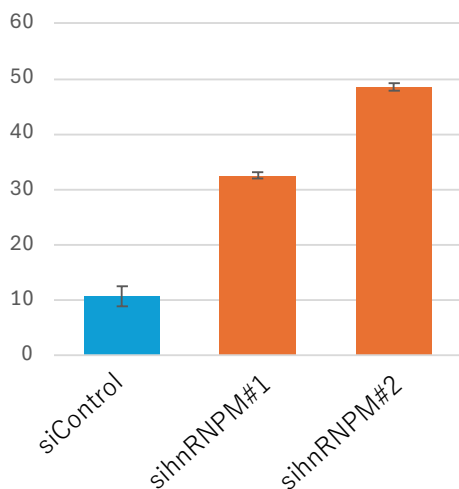


Figure 9 PSI 値

TRAPPC10 について RT-PCR を行い、その結果を電気泳動し撮影した。siControl についてはそれぞれ 100bp 付近でバンドが確認され、*hnRNPM#1*、*hnRNPM#2* についてはそれぞれ 170bp 付近、100bp 付近でバンドが確認された。また、ノックダウンによって PSI(Percent Spliced-In, 選択的エクソン含有率)は *hnRNPM#1* については 10.7%から 32.5%に、*hnRNPM#2* については 10.7%から 48.6%に変化したことが確認された。

考察

hnRNPM と SFPQ の機能を確認するために、*hnRNPM(var1)-eGFP* と *hnRNPM(var2)-eGFP* の作成と蛍光観察による共局在の解析、*hnRNPM* の機能の解析を行った。

今回 *hnRNPM(var1)-eGFP* と *hnRNPM(var2)-eGFP* の作成については Western Blotting の結果より適切に作成することができた。分子量はそれぞれ eGFP(26.9kDa)、3xFLAG(2.73kDa)、hnRNPM var1(77.5kDa)、hnRNPM var2 (73.5kDa)であることから、理論的には *hnRNPM(var1)-eGFP* は 107kDa 付近に、*hnRNPM(var2)-eGFP* は 103kDa 付近にバンドが現れると考えられる。今回の結果は、*hnRNPM(var1)-eGFP*、*hnRNPM(var2)-eGFP* 共に 100kDa 上方付近にバンドが見られたので理論値とほぼ一致しており、適切に作成、発現させることができたと考えられる。

また、*hnRNPM* と *Sfpq* について、Co-transfection を行った。*hnRNPM* を transfection した細胞においては、核が染色されたことから、*hnRNPM* は核内に局在している。一方、*hnRNPM*、*Sfpq* を共に transfection した細胞については、蛍光観察を行った結果、細かい構造物がほぼ同じ位置に核内で観察された。これらのことから *hnRNPM* と SFPQ が核内で共に協調して働いている可能性があることが示唆された。

hnRNPM をノックダウンしたサンプルについて RT-PCR を行い、その結果を電気泳動で解析することで、*hnRNPM* のスプライシングに関する機能を確認することができた。siControl については 100bp 付近に、ノックダウンサンプル *hnRNPM*#1、*hnRNPM*#2 についてはそれぞれ 170bp、100bp 付近でバンドを確認することができた。ゲノム図より、理論的にはノックダウンしたサンプルについては 102bp、164bp でバンドが現れると考えられる。今回の結果は理論値とほぼ一致しており、ノックダウン実験は成功していると考えられる。また、ノックダウンによってスプライシングパターンが変化していることから、*hnRNPM* は正常なスプライシングを行う上で重要な役割を果たしている可能性がある。また生体構造医学講座での先行研究のデータによると、*hnRNPM* のノックダウンによるスプライシングの変化は

Sfpq のノックダウンによるスプライシングの変化と一致する。このことから、*Sfpq* と同様の RNA 制御に関与している可能性が示唆された。また、*hnRNPM* と *SFPQ* が協調的に働いている可能性が示唆された。

SFPQ と *hnRNPM* の共局在については既存の文献によっても示唆されており (Bemjamin, P.L. et al., *Biogerontology*, 2019)、今回の実験結果は *SFPQ* と *hnRNPM* が協調的に働いている可能性を強く示していると考えられる。

今後 *SFPQ* と *hnRNPM* の相互作用の解析は、超長鎖遺伝子の発現のメカニズムやその関与、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や自閉症スペクトラム障害 (ASD) といった超長鎖遺伝子の転写の関与が示唆されている神経変性疾患や精神疾患への影響や機構の解明に寄与しうると考える。また、これらの疾患の新たな治療法の確立や治療薬の開発への寄与が期待される。

参考文献

Marija, M., Michael, L., Meropi, P.G., Apostolia, G. (2010). *hnRNP M* interacts with *PSF* and *p54nrb* and co-localizes within defined nuclear structures. *Experimental Cell Research*, 316(3), P390-400.

Rong, Z., Mikayla, D., Georg O M B., Carlos, G.F., Khushali J P., Jingyi L., Samuel E H., Tracey W C., Giovanni Q.V., Mudra C., Charlotte A Le Roux, Mason D B., Amy V., Ryan A F., Howard Y C., Eric L Van N., Xinshu X., Chonghui C. (2024). *hnRNPM* protects against the dsRNA-mediated interferon response by repressing LINE-associated cryptic splicing. *Mol Cell*, 84(11), 2087-2103.

Motoyasu, H., Akihida, T., Jun, T., Kei, I., Shin'ichi T., Masatoshi H. (2019). Loss of RNA-Binding Protein *Sfpq* Causes Long-Gene Transcriptopathy in Skeletal Muscle and Severe Muscle Mass Reduction with Metabolic Myopathy. *iScience*, 13, 229-242.

Kei, I., Masatoshi, H., Akihide T. (2020). Multilateral Bioinformatics Analyses Reveal the Function-Oriented Target Specificities and Recognition of the RNA-Binding Protein SFPQ. *iScience*, 23(7),

Akihide, T., Kei, I., Toshiaki, T., Motoyasu, H., Masatsugu, D., J B Brown, Kensuke, N., Mikako, I., Hiroshi, K, Takaya, A., Hiroshi, K., Kinji, O., Masatoshi, H. (2018), Loss of Sfpq Causes Long-Gene Transcriptopathy in the Brain. *Cell Reports*, 23(5), 1326-1341.

Benjamin, P.L., Luke, C.P., Stefania, B., Luigi, F., David, M., Lorna, W.H. (2019), The transcript expression levels of HNRNPM, HNRNPA0 and AKAP17A splicing factors may be predictively associated with ageing phenotypes in human peripheral blood. *Biogerontology*, 20(5), 649-663.