

# 筋萎縮性側索硬化症（ALS）のモデル作成を目指した超反復配列RNAの無細胞合成システムの開発

環境情報学部 3年 伊藤らら

## 【研究目的】

近年の研究にて、神経疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症(ALS)の一部の患者では、C9orf72 遺伝子の非コード領域における GGGGCC ヘキサヌクレオチドリピートが数十～数千みられ、この病を誘発するリスク要因であることが明らかとなった。ALS 患者の細胞内では、超反復された GGGGCC 配列 DNA が RNA に転写された後、その RNA が G-quadruplex という四面体構造を形成し、細胞内でゲル化することで運動ニューロンを侵食、破壊していくことが先行研究で明らかになっている(Jain & Vale, 2017, PMID:28562589)。尚、このように数十から数千までも存在する超反復配列の DNA クローニングは非常に難しく、細胞を用いた先行研究においては凡そ 20 リピート、最大でも 50 前後までが限界であることが問題になる。本研究では、まず、無細胞でこの超反復配列の DNA テンプレートを合成可能にした方法を開発する。また、さらにその DNA を環状 DNA にすることで、先行研究における Rolling Circle Transcription (Mohsen & Kool, 2016, PMID: 27797171) で数百以上のリピートを含む長い超反復配列 RNA を合成することまで可能にする。これによって、ALS 患者の神経細胞内で起きるゲル化現象、G-quadruplex 構造を試験管内に模倣し、ゲル構造を緩める、壊す条件又はゲル化のプロセスを遅くする検討を行うことで、将来的には未だに治療法の存在しない ALS における薬のスクリーニング用モデルの作成も可能であると考える。

## 【研究実績】

本研究については、無細胞での RNA 合成にどのような条件が相応しいか検討すべく、2020 年中に RNA の *in vitro* 転写の予備実験を進めてきた。通常は、*in vitro* 転写の実験では、線(直鎖)状 DNA を用いることが一般的であるが、本実験においては環状 DNA から *in vitro* 転写をすることで、より長い RNA を作れないかについて検討した。そのため、始めに環状 DNA として、RNA の転写を開始するために必要な T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を持つ pGEM3Zf(+) プラスミドを採択し、T7 ポリメラーゼで反応させた。本実験では、環状 DNA にポリメラーゼ活性を中止する配列が含まれていなければ、T7 ポリメラーゼが止まることなく、無限に長い RNA を合成し続けることを期待していたが、pGEM3Zf(+) プラスミドで *in vitro* RNA 転写を行った結果、500 塩基付近にて一度転写が止まっていることが電気泳動の結果より確認できた[1]。この結果より、既存のプラスミドではやはり TTTT という転写終結配列が含まれることから、私達が求める無限に転写を行わせるという目的を果たすことがこのプラスミド DNA では難しいと考え、転写終結配列のない無限に転写を可能とする合成 DNA を発注することにした。次には、本研究計画で最も重要になるバクテリオファージ T7 由来の T7 RNA ポリメラーゼを用いても GGGGCC 反復配列の転写が可能なのかについて確認も行う必要があった。しかし、テンプレートとなる二本鎖 DNA

を遺伝子合成サービスで発注する場合、DNA に含まれる GC 含量は 70% 以下でなくてはならない。本研究で必要

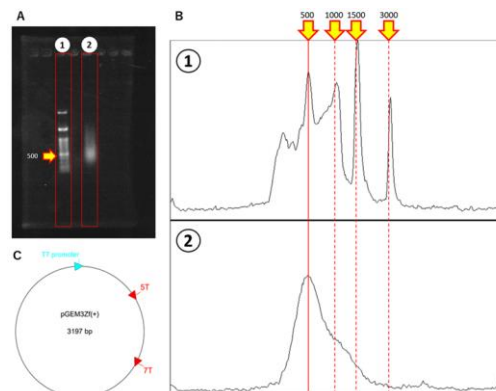


図 1. T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写は、連続 T 配列によって中止される

となる DNA は GGGGCC が何回もリピートしている 100%GC であることから、二本鎖 DNA としてではなく、一本鎖 DNA として (GGGGCC)<sub>4</sub>, 8, 17 と G-quadruplex を形成しないコントロールとして (CCCCGG)<sub>4</sub>, 8, 17 の反復の数が違う計 6 種の一本鎖 DNA の発注を行った。また、5 末端に T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列、3 末端に 50 塩基の GC 含量が 34% の配列を追加した。その 3 末端の配列に相補的な配列を持つ一本鎖 DNA にアニーリングし、Klenow ポリメラーゼで二本鎖 DNA を完成させた。

## 【研究実績】

### 実験①: T7 RNA ポリメラーゼが GGGGCC 配列を転写できるのかを確認

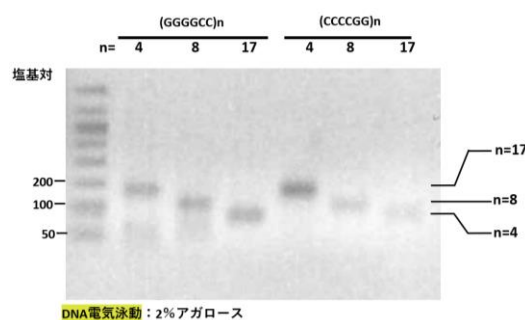


図 2. 正しいサイズの反復配列を持った二本鎖 DNA が合成されているかアガロースゲル電気泳動にて確認した結果

本実験の結果として、T7 RNA ポリメラーゼプロモーター配列と (GGGGCC)<sub>4</sub>, 8, 17 リピート配列、もしくはコントロールの (CCCCGG)<sub>4</sub>, 8, 17 リピート配列があるそれぞれの DNA を用意することに成功[図 2]したため、次に T7 RNA ポリメラーゼによってこの GGGGCC リピートを含む DNA テンプレートが RNA に転写可能であるのかについて確認した[図 3]。

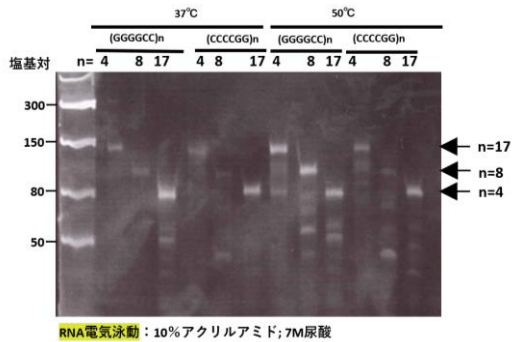


図3. 合成された DNA が RNA を転写できているのかアクリルアミドゲル (7M 尿酸入り) 電気泳動にて確認した結果

本実験では株式会社東洋紡 (Toyobo) の Thermo T7 RNA ポリメラーゼ (#TRL-201) という耐熱性を持った酵素を利用し、37°C、50°Cと2つの条件にて転写を行い、結果37°Cより50°Cで反応させた方が転写の効率が良いことがわかった。そして、(GGGGCC)4, 8, 17か(CCCCCG)4, 8, 17リピート配列を T7 RNA ポリメラーゼで問題なく転写することが可能であることを確認することができた[図 2]。この結果より、GGGGCC 反復配列の転写は可能であることが証明されたため、次に *in vitro* 転写に必要な長い GGGGCC の配列を合成する実験計画を模索した。

**実験②: GGGGCC 超反復配列 DNA を正しく合成するための方法を検討**

合成可能なリピート DNA は技術的に限られ、(最大 n=20 前後)が、ALS 患者のゲノムには数百~数千リピートが含まれることがあることから、本実験では、T4 DNA リガーゼで (GGGGCC)n もしくはネガコンとして (CCGGGG)n DNA 間を繋げることで、長いリピート配列を合成可能にする実験系を立てた。また、本 DNA は平滑末端と 50% の確率で逆向きに入ることから、(GGGGCC)n は NaeI、(CCGGGG)n は SmaI とそれぞれの制限酵素で逆向きに入った配列を切断、正しい向きに DNA を並べる必要がある。また実験の条件検討を行うべく、制限酵素とリガーゼを同時に反応させるため、まず熱処理にて不活性化可能な SmaI を使い 3.5U、17.5Uと、制限酵素は T4 DNA リガーゼと反応速度が違うことから、濃度に条件を付け、どの条件が一番全ての配列が正しい向きに整合され、長い配列を作れているのかについて確認した。

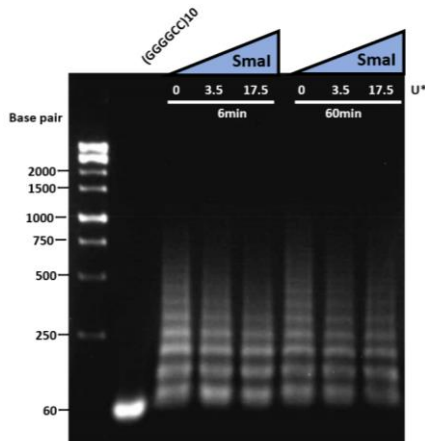


図4. 制限酵素とリガーゼを同時に反応させた DNA の整合結果をアガロースゲル電気泳動にて確認した結果

SmaI が逆向きに入った DNA を切っているのかについて目視するため、長い反復配列を断片化せずに決定可能な Nanopore シーケンサーを使い、リガーゼは一定の量で SmaI 酵素の量が 0U、3.5U、17.5Uとどちらの条件の方が適切なのかについて判断するため、配列がどれくらい正しく並んでいるのかについて確認する予定である。現在 Nanopore 解析中、今のところ Nanopore が読み込んでいる塩基対が[図 4]の結果と矛盾しないことが分かった[図 5]。

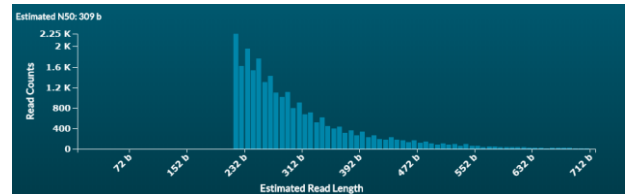


図5. Nanopore シーケンス中に読み込んでいる塩基対のグラフの結果

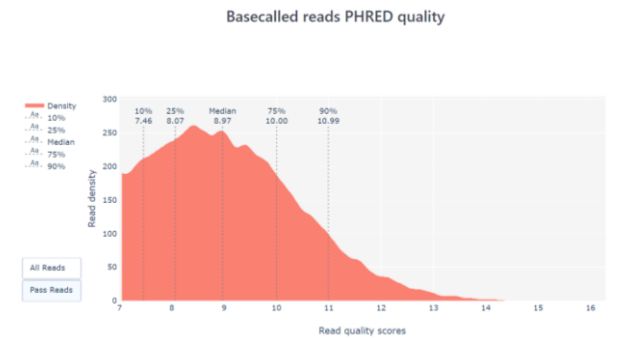


図6. pycoQC にて Nanopore シーケンサーで読み込まれた (GGGGCC) n と SmaI、T4 DNA リガーゼの "pass" した塩基の長さの解析結果

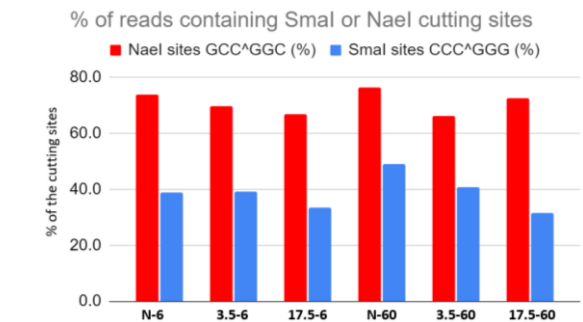


図7. SmaI のサイトを処理した場合の SmaI と NaeI サイトがどれくらい減っているのか比較した 解析結果

[図 6]の結果より、SmaI と T4 DNA ligase を同時反応させた (GGGGCC) n の Nanopore シーケンサーにおけるリード数は一般的なリード数より低かったが、私達が取り扱っている DNA は 100% GC 含量から作られた (GGGGCC) n であるため、GC 含量を読み込むことが可能な Nanopore であっても読み込みが非常に難しい配列であることが分かり、結果として良好である。また[図 7]より、本実験では、制限酵素 SmaI を使用したため、SmaI のサイトが減少することが見えるが、NaeI のサイトも検索することで本当に SmaI のサイトは NaeI サイトと比較して切られているのか比較した結果、SmaI サイトは確実に切られていることが確認できた。