

磁気ビーズによるプルダウンアッセイを利用した タンパク質-RNA 相互作用の解析

Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes

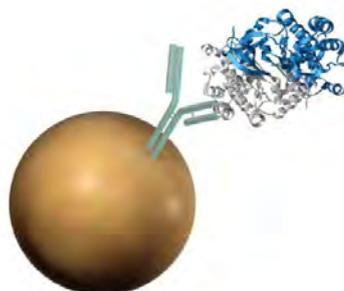
Shintaro Iwasaki,^{1,2,5} Maki Kobayashi,^{1,2,5} Mayuko Yoda,^{1,2} Yuriko Sakaguchi,³ Susumu Katsuma,⁴ Tsutomu Suzuki,³ and Yukihide Tomari^{1,2,*}

¹Institute of Molecular and Cellular Biosciences ²Department of Medical Genome Sciences ³Department of Chemistry and Biotechnology ⁴Department of Agricultural and Environmental Biology, The University of Tokyo, ⁵These authors contributed equally to this work. *Corresponding author, *Molecular Cell*, Volume 39, Issue 2, 292-299, 03 June 2010

概要

small interfering RNA (siRNA) や microRNA (miRNA) といった small RNA は、標的となる mRNA に RISC (RNA-induced silencing complex) を誘導することによって、遺伝子の発現を抑制します。small RNA に直接結合し、RISC の中核をなすのが Argonaute (Ago) と呼ばれるタンパク質です。通常 siRNA や miRNA は small RNA 二本鎖として合成されます。small RNA 二本鎖から RISC が形成されるまでの過程は、small RNA 二本鎖が Ago に取り込まれる過程 (RISC loading)、その後複合体中で片方の RNA 鎖が乖離する過程 (unwinding)、の 2 つの素過程を経ることが知られています。RISC loading が ATP 依存的であることはこれまでの研究で明らかになっていましたが、どのような因子が ATP を消費し、RISC loading を担っているかは不明でした。

今回紹介する文献中で筆者らは、Hsc70/Hsp90 シャペロン機構が RISC loading に必須であることを明らかにしました。Hsc70/Hsp90 シャペロン機構は結合したタンパク質の構造変化を誘導することがよく知られていることから、筆者らは Hsc70/Hsp90 シャペロン機構が ATP を消費し、Ago タンパク質の立体構造を変化させることによって small RNA 二本鎖が結合することができる溝を生じさせている、というモデルを提唱しています。



文献中での Dynabeads の活用例

Target Cleavage アッセイ

Anti-FLAG M2 抗体を結合した磁気ビーズ (Dynabeads Protein G) を用いたプルダウンアッセイで精製した Ago タンパク質を用いて標的 RNA の切断活性を検出

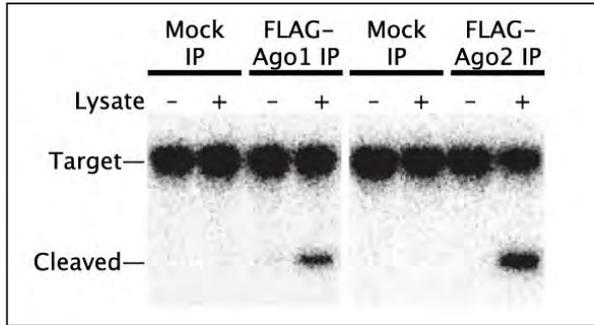
【実験に使用した試薬】

- Dynabeads Protein G
- Anti-FLAG M2 antibody
- Lysis buffer : 30 mM HEPES-KOH pH 7.4, 100 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂
- Lysis buffer containing 1% Triton X-100, 800 mM NaCl
- 40 × reaction mix : Haley, B. Tang, G., and Zamore, P.D. (2003). *Methods* 30, 330-336 を参照

【試験方法】

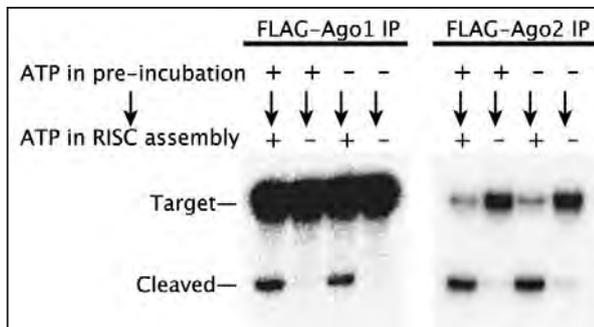
1. 8 反応分の量として、FLAG タグ融合 Ago1 または Ago2 を過剰発現する S2 細胞の抽出液 30 μL に 1 μL の Anti-FLAG M2 antibody と 10 μL の Dynabeads Protein G を加え、4°C で 1 時間インキュベートする。
2. 1% Triton X-100、800mM NaCl を含む Lysis buffer で 3 回、通常の Lysis buffer で 2 回洗浄する。
3. S2 細胞抽出液または *dcr-2;ago-2* 変異胚抽出液の存在下 / 非存在下で、small RNA 二本鎖 50 nM および 3 μL の 40 × reaction mix と、精製された Ago タンパク質を 30 ~ 60 分間インキュベートする。
4. Beads を 1% Triton X-100、800mM NaCl を含む Lysis buffer で 3 回、通常の Lysis buffer で 2 回洗浄する。
5. RI 標識した標的 RNA 1 nM と Beads をインキュベートし、RNA を抽出後、8% 変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行う。

【結果】



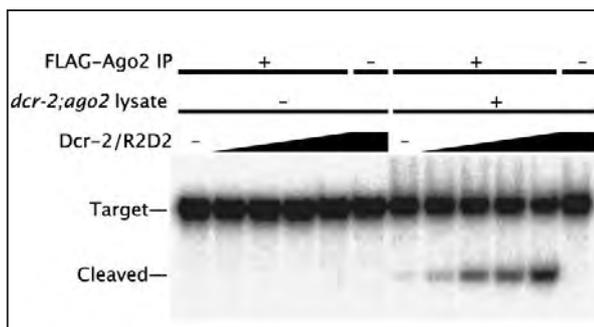
● 精製 Ago1、Ago2 だけでは RISC 形成が起こらない

図は、Anti-FLAG 抗体によって精製した FLAG タグ融合 Ago タンパク質が標的 RNA の切断を引き起こすかを解析した結果です。Ago1、Ago2 いずれも単独では RISC を形成して標的 RNA の切断を引き起こすことができず、細胞抽出液中に存在する何らかの因子が必要であることを示唆しています。



● RISC 形成に ATP が必要である

図は、ATP の存在が RISC 形成に与える影響を解析した結果です。ATP 存在下で Ago をインキュベートしたかどうかに関わらず、RISC 形成時に ATP が必要であることが示唆されています。



● RISC 形成には未知の ATP 依存的因子が必要である

図は RISC-loading complex のコア因子である Dcr-2/R2D2 ヘテロダイマーの存在が RISC 形成に与える影響を解析した結果です。Ago2 および Dcr-2、R2D2 のみでは RISC 形成が起こらないこと、Ago2、Dcr-2、R2D2 をもたない *dcr-2;ago2* 変異体胚抽出液を加えるとレスキューされることが示されました。また ATP を除いた *dcr-2;ago2* 変異体胚抽出液ではこのレスキューが起こらないこと (data not shown) から、Dcr-2/R2D2 の他に、細胞質中に存在する何らかの ATP 依存的因子が RISC 形成に必須であることが示唆されています。

免疫沈降アッセイ

洗浄時の NaCl 濃度条件を変え、Anti-FLAG M2 抗体を結合した磁気ビーズ (Dynabeads Progen G) を用いて S2 細胞の抽出液に対するプルダウンアッセイを実施

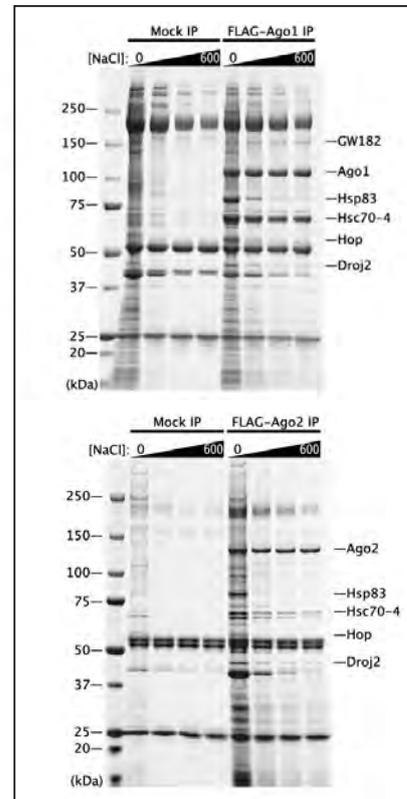
【実験に使用した試薬】

- Dynabeads Protein G
- Anti-FLAG M2 antibody
- Lysis buffer : 30 mM HEPES-KOH pH 7.4, 100 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂
- Lysis buffer containing 0.1% Triton X-100, 0-600 mM NaCl

【試験方法】

1. 4 反応分の量として、FLAG タグ融合 Ago1 または Ago2 を過剰発現する S2 細胞抽出液 200 μL に、10 μL の Anti-FLAG M2 antibody と 200 μL の Dynabeads Protein G を加え、4°C で 2 時間インキュベートする。
2. 様々な NaCl 濃度の Lysis buffer で 3 回洗浄する。
3. SDS loading buffer に溶解し、5 分間ボイルする。
4. SDS-PAGE で解析する。

【結果】



● Ago タンパク質は Hsc70/Hsp90 シャペロン機構と結合する

FLAG タグ融合 Ago1 または Ago2 による免疫沈降物を SDS-PAGE によって解析した結果です。Ago1、Ago2 ともに、Hsc70/Hsp90 シャペロン機構を構成するタンパク質 (Hsc70-4, Hsp83, Hop, Droj2) と結合することが示唆されています。

ストレプトアビジンによるキャプチャ および Target Cleavage アッセイ

ストレプトアビジン結合ペプチド (SBP) タグを持つ野生型 Hsc70-4 および ATPase 活性のない変異タンパク質 (D206S Hsc70-4) を磁気ビーズ (Dynabeads Streptavidin T1) で精製し、S2 細胞抽出液に加えて Ago1 または Ago2 による Target Cleavage アッセイを実施

【 実験に使用した試薬 】

- Dynabeads Streptavidin T1
- Lysis buffer (30 mM HEPES-KOH pH 7.4, 100 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂) containing 0.8 M NaCl and 0.05% CHAPS
- Lysis buffer containing 0.05% CHAPS
- Lysis buffer containing 10 mM biotin (pH 8.0), 5% glycerol, 0.05% CHAPS, 1 mM DTT

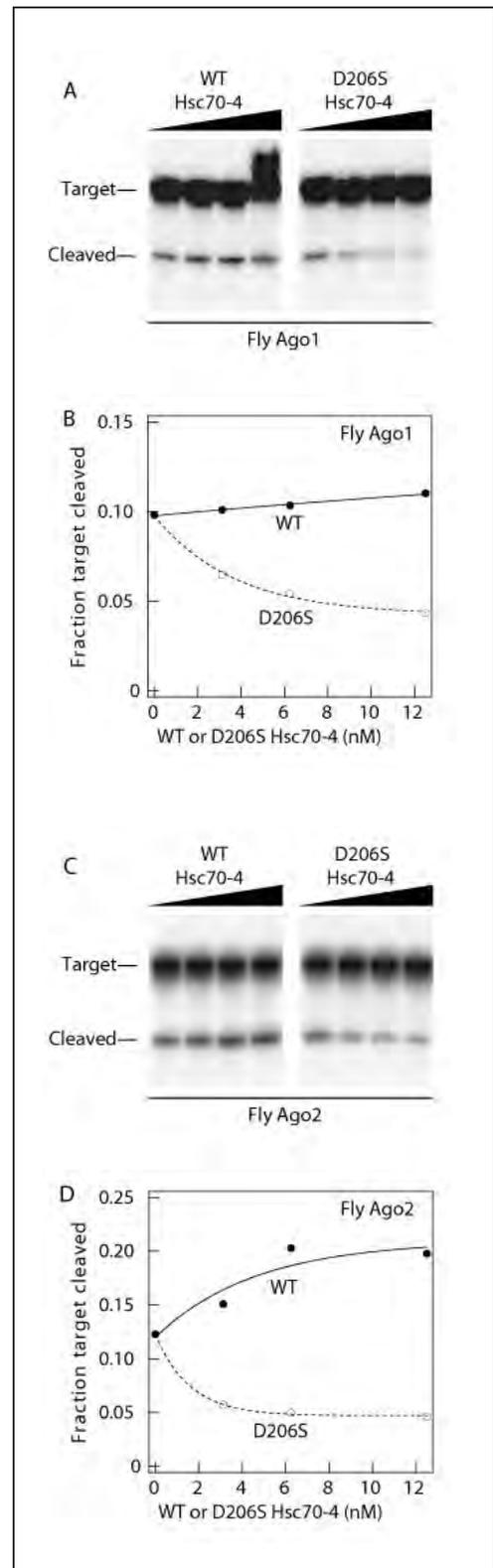
【 試験方法 】

1. SBP タグが融合した野生型 Hsc70-4 または D206S Hsc70-4 を過剰発現する S2 細胞の抽出液 400 μ L に、Dynabeads Streptavidin T1 400 μ L を加え、4 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートする。
2. 0.8 M NaCl と 0.05% CHAPS を含む Lysis buffer で 3 回洗浄し、0.05% CHAPS を含む Lysis buffer で 2 回リンスする。
3. 10 mM biotin (pH 8.0), 5% glycerol, 0.05% CHAPS, 1 mM DTT を含む Lysis buffer 40 μ L を用いて、SBP タグ融合 Hsc70-4 を溶出する。
4. S2 細胞抽出液に様々な濃度の野生型 Hsc70-4 または D206S Hsc70-4 を加え、FLAG タグで精製した Ago1 または Ago2 による Target Cleavage アッセイ (前述参照) を行う。

【 結果 】

Hsc70-4 存在量を増やすと Ago1 および Ago2 による標的 RNA 切断が向上する一方で、ATPase 活性を失った変異タンパク質 (D206S) では dominant negative に働くことが示されています。

この結果から、ATP を消費する Hsc70-4 の活性が Ago1、Ago2 による RISC 形成に重要な要素であることが示されています。



● 使用者のコメント

Dynabeads protein G は粒径が小さく beads 自体の volume も少ないので、beads 上にタンパク質を固定したままの生化学実験に重宝した。また、磁気 beads であることから洗いの操作が簡便かつ正確に行うことができ、少ない量の beads を洗うことが必要な実験を行うことができた。

Dynabeads Streptavidin T1 も同様に洗いの操作が簡便であり、ロスを少なく扱うことができた。また biotin による SBP タグリコンビナントタンパク質の溶出も可能であり、溶出上清に beads の持ち込みを少なくしつつ、精製度高く調製することができた。



Dynabeads 製品のご案内

免疫沈降用 Dynabeads Protein A/G

製品

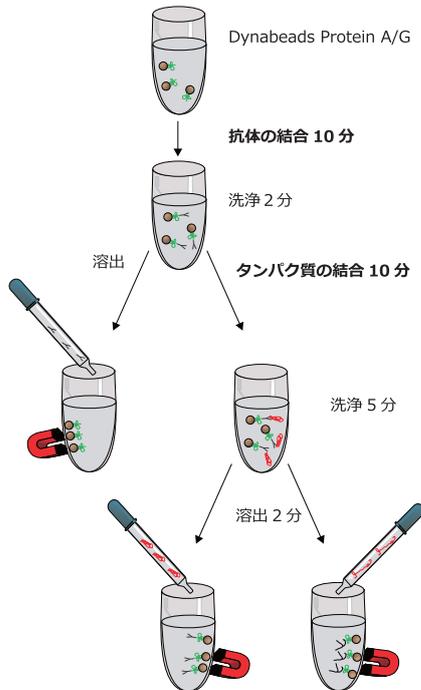
Dynabeads Protein A 及び Dynabeads Protein G は、プロテイン A 及びプロテイン G を共有結合で固定化した単一サイズの磁性ビーズ (2.8 μm) です。

Dynabeads Protein A 及び Dynabeads Protein G は、組織培養液、細胞抽出液やハイブドーマの上清等のサンプルから免疫沈降するための確かなツールです。また、抗体精製にもご利用いただけます。

操作概要

Dynabeads Protein A 及び Dynabeads Protein G による抗体の精製及び免疫沈降の原理

● Dynabeads の免疫沈降ワークフロー



商品コード	商品名	梱包単位
DB10001	Dynabeads Protein A	1mL
DB10002	Dynabeads Protein A	5mL
DB10008	Dynabeads Protein A	50mL
DB10003	Dynabeads Protein G	1mL
DB10004	Dynabeads Protein G	5mL
DB10009	Dynabeads Protein G	50mL
DB10006	IP Kit-Dynabeads Protein A	40 tests (2mL)
DB10007	IP Kit-Dynabeads Protein G	40 tests (2mL)

※ IP Kit には Buffer が付属しています。

ストレプトアビジン結合 Dynabeads

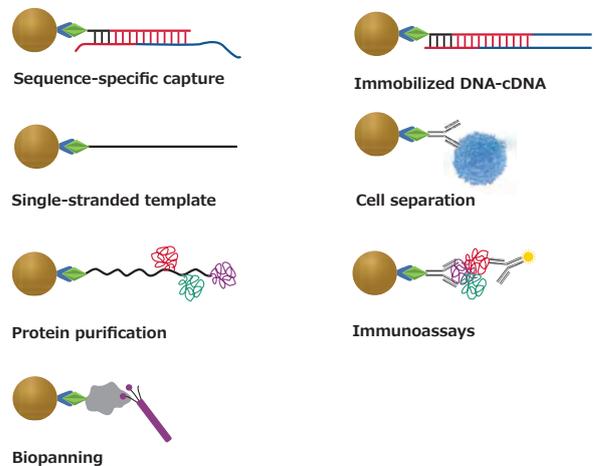
製品

粒径の均一な超常磁性高分子ポリマービーズの表面に、高品質のストレプトアビジンが化学的に結合しています。ビーズ上にビオチン化 DNA や抗体を固定し磁石を用いて不要な成分との分離、洗浄などを迅速に行えます。

製品特性

製品	ビーズ特性	ビーズ直径
Dynabeads M-280 Streptavidin	疎水性ビーズ	2.8 μm
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	疎水性ビーズ	1.0 μm
Dynabeads M-270 Streptavidin	親水性ビーズ	2.8 μm
Dynabeads MyOne Streptavidin C1	親水性ビーズ	1.0 μm

● ストレプトアビジン結合 Dynabeads を利用したアプリケーションの例



商品コード	商品名	梱包単位
DB11205	Dynabeads M-280 Streptavidin	2mL
DB11206	Dynabeads M-280 Streptavidin	10mL
DB65001	Dynabeads MyOne Streptavidin C1	2mL
DB65002	Dynabeads MyOne Streptavidin C1	10mL
DB65305	Dynabeads M-270 Streptavidin	2mL
DB65306	Dynabeads M-270 Streptavidin	10mL
DB65601	Dynabeads MyOne Streptavidin T1	2mL
DB65602	Dynabeads MyOne Streptavidin T1	10mL
DB65801	Dynabeads Streptavidin Trial Kit	1mL x 4

※ Trial Kit は 4 種類のビーズを全て含んでいます。

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL.03-3593-3211 (代) FAX.03-3593-3216
E-mail: veritas@veritastk.co.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>

ベリタスサイエンスレターは株式会社ベリタスが最新の情報のエッセンスを著者の理解を得てお届けしています。
ご質問・ご意見は(株)ベリタス技術営業部 (TEL: 03-3593-3385 E-Mail: techservice@veritastk.co.jp) までお願致します。

RDBF-12-0182