2025 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	**U2AF65 タンパク質を活用した人工的遺伝子発現制御法の開発** **－3 本鎖核酸との複合体の立体構造・結合システムの解明－**
キーワード	①3 本鎖核酸、②3 本鎖核酸結合タンパク質、③クライオ電子顕微鏡

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏　名	クロカワ　ミナミ 黒川　南
配付時の所属先・職位等 （令和 7 年 4 月 1 日現在）	東京理科大学　理学部第一部　応用化学科　嘱託助教
現在の所属先・職位等	京都大学　複合原子力科学研究所　助教
プロフィール	物理化学的な手法を軸に、ペプチドやタンパク質といった生体高分子の構造や物性を詳細に解析しています。得られた知見を基に、新規バイオナノ材料の設計や、生体分子間相互作用の理解を深める研究に取り組んでいます。

1. 研究の概要

本研究は、東京理科大学理学部応用化学科鳥越研究室が見出した、mRNA スプライシングに関与する 3 本鎖核酸結合タンパク質 U2AF65 と 3 本鎖核酸との相互作用に着目し、その分子基盤を解明することを目的とした基礎研究である。本年度は研究初年度として、今後の解析を進める上で不可欠となる実験基盤の整備に重点を置いた。特に、クライオ電子顕微鏡での詳細な構造解析の前提となる U2AF65 タンパク質試料について、大腸菌を用いた発現および精製条件の検討を行い、高純度かつ均一な試料の調製に取り組んだ。

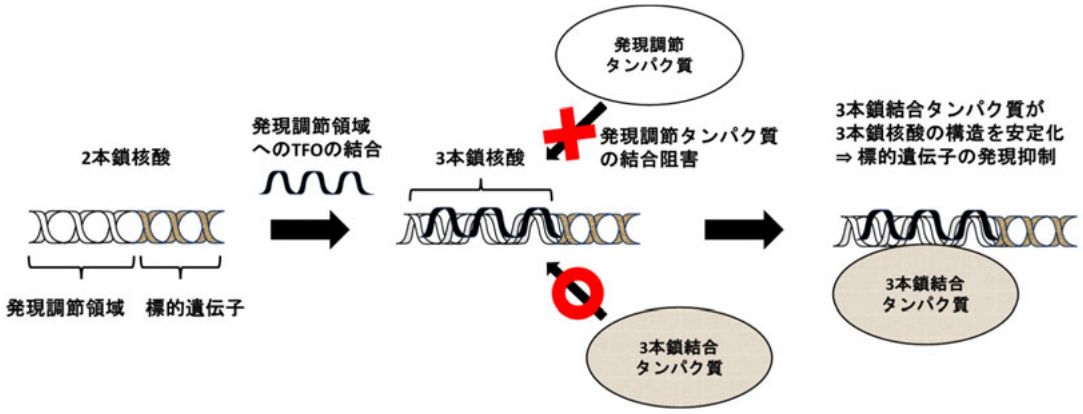
2. 研究の動機、目的

3 本鎖核酸は、2 本鎖核酸に 1 本鎖核酸（TFO:Triplex-Forming Oligonucleotide）が結合することにより形成される。3 本鎖核酸が形成されると、本来結合するべき発現調節タンパク質が立体障害により結合できなくなるため、下流の標的遺伝子の発現が抑制される。

3 本鎖核酸構造を認識するタンパク質として、東京理科大学理学部応用化学科鳥越研究室が見出した、U2AF65 タンパク質が挙げられるが、このタンパク質が 3 本鎖核酸を認識する分子基盤はまだ明らかになっていない。そこで本研究では、U2AF65 タンパク質と、3 本鎖核酸との相互作用を分子レベルで明らかにすることを目指した（図）。

近年、クライオ電子顕微鏡の解析技術が大きく進歩しており、タンパク質の構造を高解像度で可視化できるようになっている。そこで本研究では、U2AF65-3 本鎖核酸複合体の結合部位や構造変化を原子レベルで明らかにすることを目指し、クライオ電子顕微鏡を用いた解析を行うこととした。しかしながら、クライオ電子顕微鏡などを用いた高分解能な構造解析を行うためには、単にタンパク質が精製できるだけでなく、原子レベルでの解析に耐えうる高度な均一性を有する試料が不可欠である。そこで本年度は、解析の確度を担保するため、高純度な U2AF65

タンパク質の調製プロトコルの開発に取り組んだ。



（図）3 本鎖核酸と 3 本鎖結合タンパク質による人工的遺伝子発現抑制

3. 研究の結果

本年度は、U2AF65タンパク質の発現および精製条件の検討を行った。培養条件については、培養時間および培養開始時の条件を中心に検討し、目的タンパク質を高純度で得られる条件の探索を行った。プレートに播種する大腸菌の濃度について複数条件を比較した結果、希釈を行わず培養液の原液を用いた場合に、コロニーが良好に得られた。また、培養時間については発現誘導物質IPTGを添加後、4時間および6時間の条件を検討したところ、4時間培養の条件において、可溶性画分として回収可能なU2AF65タンパク質が良好に得られることを確認した。精製条件については、複数のプロテアーゼ阻害剤の組み合わせや、還元剤の濃度について検討を行った。その結果、適切な培養・精製条件下において、構造解析および相互作用解析に使用可能な、単一成分からなるU2AF65タンパク質試料を安定に調製できる条件を見いだした。これらの条件は、東京理科大学理学部応用化学科鳥越研究室が過去に見出した条件とほぼ一致する結果であった。

これらの検討により、今後の解析に向けた実験基盤を整えることができた。

4. 研究者としてのこれからの展望

本研究を通じて得られた知見や技術的基盤を土台として、今後は特定の研究課題に限定せず、遺伝子やタンパク質といった生体高分子の機能や相互作用を分子レベルで理解する研究に、引き続き取り組みたいと考えている。

また、本助成により、生化学実験を遂行する上で必要となる基本的な実験器具や消耗品を整備することができ、今後の研究活動を自立的かつ継続的に進めるための環境が整った。これらの研究基盤を活用し、基礎生命科学分野における理解の深化に貢献していきたい。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

本研究は、遺伝子発現制御という生命現象の根幹に関わる分子機構の解明を目指すものです。初年度は基盤構築段階でしたが、今後の研究発展に不可欠な準備を着実に進めることができました。本研究を支援してくださった皆様、特に実験を行うにあたり協力して頂いた、東京理科大学理学部応用化学科鳥越研究室の大学院生の方々に心より感謝申し上げます。

