

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 87-2314-B-040-018

計畫名稱：於哺乳類細胞中表現正常與變異 FMRP 之定性分析

執行期限：86 年 8 月 1 日至 87 年 7 月 31 日

主持人：李宣佑 中山醫學院 生命科學系

## 一、中文摘要

*FMR-1* 基因的突變是造成易脆 X 染色體症候群的原因，而此症候群佔了遺傳性智能障礙原因中的大多數。隨著 *FMR-1* 基因的發現，使得我們對此基因產物 (FMRP) 有進一步瞭解。FMRP 含有兩個 heterogeneous nuclear RNP K homology domain (KH domain) 和兩個 RGG box 組成的 RGG box domain。在 *in vitro* 的實驗中已被證實 FMRP 有 RNA 結合能力。

我們以 pSFV 蛋白表現系統在 BHK-21 細胞株表達了 wild-type FMRP 及 mutant FMRP (FMRP<sup>R546H</sup>)，並以 poly G 和 *FMR-1* mRNA 在不同 NaCl 濃度下和 normal 及 mutant FMRP 做結合實驗。我們發現隨著 NaCl 濃度的提高，蛋白的結合能力隨著下降。當 NaCl 濃度達到 0.5M 時，FMRP 和 poly G 的結合幾乎已不存在，而 FMRP<sup>R546H</sup> 在 NaCl 濃度達 0.25M 時即已失去與 poly G 的結合能力，在與 *FMR-1* mRNA 結合實驗中也得到相似的結果。因此，我們認為 RGG box 的突變 (R546H) 在 FMRP 的功能上扮演著很重要的角色。

**關鍵詞：**易脆 X 染色體症候群、*FMR-1*、FMRP

## Abstract

Fragile X syndrome is one of the most common form of human hereditary mental retardation. The gene that causes fragile X syndrome, *FMR-1*, have been identified and sequenced. The *FMR-1* encoded protein, FMRP, contains two types of structural motifs: two heterogeneous nuclear RNP K homology domains (KH domain) and an RGG box domain, which contains two RGG boxes. Therefore, it was suggested that FMRP is an RNA binding protein. It has been demonstrated that FMRP can bind to RNA *in vitro*.

We have expressed the wild-type FMRP and mutant FMRP (FMRP<sup>R546H</sup>) in baby hamster kidney cell (BHK-21) by using pSFV protein expression system and demonstrated that FMRP can bind to poly G and to *in vitro* transcribed *FMR-1* mRNA as well as FMRP<sup>R546H</sup>. In these experiments we found that the binding ability of FMRP and FMRP<sup>R546H</sup> to poly G decreases with increasing NaCl concentrations. The binding of FMRP to poly G was still stable in NaCl

concentration up to 0.25 M. However, the binding of this mutant FMRP to poly G was severely impaired in 0.25 M NaCl. The similar results were also seen in *FMR-1* mRNA binding assay. These results demonstrate an essential role for RGG box in RNA binding.

**Key Words:** Fragile X syndrome, *FMR-1*, FMRP

## 二、緣由與目的

造成易脆 X 染色體症候群的主要原因是位於 *FMR-1* 基因 5'端不轉譯區(5' untranslated region)的 CGG trinucleotide 發生倍增突變所致(Fu et al., 1991; Verkerk et al., 1991; Oberlé et al., 1991; Wang and Li, 1993)。但亦有少數原因是 *FMR-1* 基因缺失(Gedeon et al., 1992; Wöhler et al., 1992; Tarleton et al., 1993; Gu et al., 1994; Meijer et al., 1994; Lugenbeel et al., 1995)及點突變(De Boulle et al., 1993; Wang et al., 1997)。*FMR-1* 基因產物是一個 RNA 結合蛋白(RNA binding protein)，它具有兩個 KH domains 及由兩個 RGG box 所組成的 RGG box domain，這些 domains 與 RNA binding 的能力有關(Ashley et al., 1993; Siomi et al., 1993 and 1994)。實驗證明 FMRP 能與自己的 mRNA 結合(Ashley et al., 1993)，且 RGG box 對 FMRP 的 RNA 結合能力有重要的影響(Siomi et al., 1993)。

本實驗室於過去幾年來的研究，我們從 406 位智障患者中找到 29 位疑似易脆 X 染色體症候群患者，其 *FMR-1* 基因病無 CGG repeat 之倍增。從這 29 位患者中我們找到 3 位患者，他們的 *FMR-1* 基因之

intron 10 的第 14 個核 酸由 CÚT (IVS10+14 CÚT)。以 RT-PCR 進一步分析其 mRNA，發現此 IVS10+14 CÚT 之突變導致 mRNA 的異常接合(alternative splicing)，使得 exon 9 跳接到 exon 11。此 mutant mRNA 在 exon 9-11 接合位置後發生了 frame-shift，在 exon 11 的第 11 個胺基酸位置產生終止密碼而導致一個缺乏 C-端的 FMRP。令人感到有趣的是這三位病人中的一位，同時在 exon 15 有另一 1856GÚA(依 cDNA 序列位置計算)之突變，使得 FMRP 的第 546 個胺基酸由 Arg 變成 His(Wang et al., 1997)。雖然病人身上的 FMRP 已不具有此 RGG domain，但是此 Arg 正位於 RGG domain 中的第二個 RGG box 上。因此，我們非常感興趣想知道單由此 Arg 變成 His 時對 FMRP 的功能有何影響。

為了達到此目標，我們把 wild-type cDNA 與 mutant cDNA 分別選殖到 Semliki forest virus 基因表現質體 pSFV 中，值得注意的是我們為了將來純化方便，已將此 vector 做過改良：在 cloning site 前加入 ATG 及 6X His tag 序列，以便做出來的蛋白能以 Ni<sup>+</sup>-NTA column 純化。將帶有 insert 的 pSFV 以 *in vitro* transcription 做出 mRNA，然後 transfect 到 baby hamster kidney cell (BHK-21)中製造 wild type 與 mutant FMRPs。最後分別以 poly G 和 *FMR-1* mRNA，在不同 NaCl 濃度下做 RNA binding assay。

## 三、結果與討論

取 4 µg 的 FMRP 與 FMRP<sup>R546H</sup> 分別和 40 µl 的 poly G 或 700 ng biotinylated *FMR-1* mRNA 在含不同 NaCl 濃度(0 M, 0.125 M, 0.25 M, 0.5 M, and 1.0 M)的

binding buffer 下進行結合實驗。結果顯示 FMRP 與 FMRP<sup>R546H</sup> 之 poly G 結合能力隨 NaCl 濃度增加而降低。當 NaCl 濃度達 0.25M 時, mutant FMRP 即幾乎不與 poly G 結合, 而當 NaCl 濃度達 0.5 M 時 FMRP 亦不與 poly G 結合。類似的結果我們也在 mRNA 的結合實驗中看到。由此我們認為位於第二個 RGG box 之 Arg 對 FMRP 的 RNA 結合能力有重要的影響。

由於我們使用的蛋白表現系統是由 Semliki forest virus 演變而來的 pSFV 質體, 因此我們需先以 *in vitro* 方式表現出 mRNA 再 transfect 到 BHK-21 細胞中。此方法的好處是我們直接 transfect recombinant mRNA 到細胞中, 它們便能直接進行 RNA replication 及 translation 而獲得大量蛋白, 並且經由我們的努力改良使得我們的蛋白能以 Ni<sup>+</sup>-NTA column 純化; 可是 transfection 的條件需經過一連串的試驗才能找到, 且 RNA 不若 DNA 般好操作, 所以在實驗初期我們遭遇許多困難。不論如何, 本實驗的價值不僅止於對 FMRP 功能與結構的探討, 更重要的是本實驗室借此機會建立了新的 mammalian cell protein expression system。

#### 四、成果自評

我們覺得本計劃執行成果優良, 不僅對 FMRP 做了功能與結構關係的探討, 更建立了 mammalian cell protein expression system, 此對本實驗室未來的發展有著重要的影響。

#### 五、參考文獻

Ashley Jr. et al., 1993. *FMR1* protein: Conserved RNP family domains and

selective RNA binding. *Science* 262, 563-566.

De Boulle et al., 1993. A point mutation in the *FMR-1* gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genet.* 3, 31-35.

Fu et al., 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67, 1047-1058.

Gedeon et al., 1992. Fragile X syndrome without CCG expansion has an *FMR1* deletion. *Nature Genet.* 1, 341-344.

Gu et al., 1994. A *de novo* deletion in *FMR1* in a patient with development delay. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1705-1706.

Lugenbeel et al., 1995. Intragenic loss of functions demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nature Genet.* 10, 483-485.

Meijer et al., 1994. A deletion of 1.6 kb proximal to the CGG repeat of the *FMR1* gene cause the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 3, 615-620.

Oberlé et al., 1991. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252, 1097-1102.

Siomi et al., 1993. The protein of the fragile X gene, *FMR1*, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* 74, 291-298.

Tarleton et al., 1993. An extensive *de novo* deletion removing *FMR-1* in a patient with mental retardation and the fragile X syndrome phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1973-1974.

Verkerk et al., 1991. Identification of a gene

- (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65, 905-914.
- Wang and Li, 1993. Molecular and cytogenetic detection of the fragile X chromosome in fibroblast culture. *J. Genet. Mol. Biol.* 4, 15-22.
- Wang et al., 1997. Novel point mutation within intron 10 of *FMR-1* gene causing fragile X syndrome. *Hum. Mut.* 10, 393-399.
- Wöhler et al., 1992. A microdeletion of less than 250 Kb, including the proximal part of the *FMR-1* gene and the fragile-X site, in a male with the clinical phenotype of fragile-X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 299-306.