

26R-am06S

RNA 配列特異的な制御を目指した RNA 結合タンパク質の認識塩基拡張

○篠田 昂樹¹, 今西 未来¹, 二木 史朗¹ (¹京大化研)

【背景と目的】 Pumilio and FBF homology domain (PUM-HD) タンパク質は類似したユニットの繰り返し構造を持ち、各ユニットが RNA1 塩基を認識することで任意の RNA 配列を認識することができる。そのため、RNA ターゲティングの基盤として有望な候補である。しかし、その野生型は 8 塩基しか認識できない。従って、配列特異的に特定の遺伝子転写物だけを標的にするには、認識能が不十分であることが懸念される。そこで本研究では、認識塩基の拡張を目指して、PUM-HD タンパク質の伸長方法の検討を行った。

【方法】 以前報告された伸長型 PUM-HD (Filipovska, *et al. A. Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 425)を参考に、8 ユニットからなる 2 種類の PUM-HD を組み合わせて、ユニット間に 8 ユニートを挿入した 16 ユニット型 PUM-HD 発現ベクターを構築した。PUM-HD の RNA 結合機能を評価するために、5'UTR 中に標的配列が導入されたルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制を指標として、レポーターアッセイを行った。さらに、ゲルシフトアッセイによって、16 ユニット型 PUM-HD の標的配列、あるいは部分的に一致する配列との親和性を評価した。また内在の RNA 配列を標的として機能するか検討するために、mRNA 不安定化タンパク質を融合した 16 ユニット型 PUM-HD による標的遺伝子の発現抑制を調べた。

【結果と考察】 レポーターアッセイの結果、16 ユニット型 PUM-HD はユニットの挿入位置によって様々な抑制の強さを示した。異なる標的配列に対しても共通して強い抑制を示した 16 ユニット型 PUM-HD は、ゲルシフトアッセイにおいて、8 塩基のみ一致する配列よりも、16 塩基が一致する配列に対して強い親和性を示した。これらの 16 ユニット型 PUM-HD が野生型 PUM-HD よりも長い塩基配列を選択的に認識することができる可能性が示唆された。また、16 ユニット型 PUM-HD によって標的遺伝子の発現が抑制されたことから、内在配列を標的として機能することが示唆された。