

26R-am05S

新規メチル化シトシン検出法を志向した TALE タンパク質の機能改変

○辻 将吾¹, 二木 史朗¹, 今西 未来¹ (¹京大化研)

【目的】メチル化シトシン(5mC)は、癌化、発生、分化など様々な生命現象に関わっている。しかし、メチル化が生じるタイミングや、メチル化状態の変遷、それらと細胞現象との関連等に関しては未だ不明な点が多い。これは生細胞内で個々の 5mC を直接認識できる分子ツールが存在しないことに起因する。そこで本研究では DNA 配列特異的に結合するタンパク質である Transcription activator-like effector (TALE) を利用し、新たな 5mC 認識ツールを開発することを目指した。

【方法】TALE は 4 種類の DNA 塩基に特異的に結合するユニットを組み換えることで、任意の配列に結合するよう容易に設計できるが 5mC に高い選択性で結合するユニットは未だ報告されていない。そこで 5mC 選択的に結合するユニットを創製するため、既存ユニットの標的塩基認識部位周辺 4 残基をランダム化したユニットを作製した。ランダム化ユニットライブラリーの中から one-hybrid screening により 5mC 結合性ユニットの選択を行った。得られた人工ユニットの塩基選択性をルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイにより評価した。人工ユニットを用いて細胞内ゲノムの 5mC 部位を標的とした TALE を作製した。この TALE と転写活性化ドメインを融合することで人工転写因子を作製し、標的内在遺伝子のメチル化状態依存的な活性化を試みた。

【結果】スクリーニングから得られたユニットは 5mC に対して C よりも高い結合親和性を示した。また内在遺伝子を標的とした人工転写因子は、標的部位が非メチル化状態の細胞群に比べて、メチル化細胞群において有意に高い転写活性化を示した。