

Title	PUFを基盤とした機能性RNA結合タンパク質の創製(Abstract_要旨)
Author(s)	篠田, 昂樹
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2019-03-25
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k21712
Right	許諾条件により本文は2020-03-25に公開; 許諾条件により要旨は2019-06-25に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（薬科学）	氏名	篠田 昂樹
論文題目	PUFを基盤とした機能性RNA結合タンパク質の創製		

（論文内容の要旨）

任意のRNA塩基配列を標的として自在に設計可能なRNA結合タンパク質は、RNAレベルでの遺伝子発現制御など生命科学技術への応用が期待される。Pumilio and fem-3 mRNA-binding factor (PUF) は約36アミノ酸からなる類似構造リピートを含むRNA結合タンパク質であり、1つのリピートがRNA 1塩基を認識する。これらのRNA結合リピートの12、16番目のアミノ酸の組み合わせによって認識する塩基が決定される。このため、12、16番目のアミノ酸ペアを置換するだけで、任意のRNA塩基配列を標的とするPUFを設計できる。しかし、一般的に8リピートから構成されるPUFは8塩基しか認識できないため、その標的RNA配列が様々な遺伝子転写産物に含まれる可能性が高い。したがって、標的遺伝子に対する選択性を高めるために、PUFが認識する塩基数の増加が求められる。また近年、RNA代謝の様々な段階が遺伝子発現制御と関連することが示唆されており、より詳細な解析のために、PUFを基盤としたRNA制御ツールをさらに拡張することが必要である。そこで、本研究では、PUF伸長骨格の構築（第一章）、及びPUFを基盤としたRNA制御ツールとして、標的RNA特異的な脱メチル化酵素の創出、単一RNA配列を標的とする遺伝子発現抑制の検討を行った（第二章）。

第一章 PUF伸長骨格の構築

PUFは各リピートとRNA塩基が1対1で相互作用することから、PUFのリピートを増やすことで、その認識塩基数を増やすことができると期待される。そこで、PUFのリピート間に別の8リピートを挿入することで16リピートPUFを作製し、伸長に最適な骨格を検証した。その結果、8リピートの連結体と6、7リピート間への8リピート挿入体が挿入位置として有望であることが示唆された。さらに16リピートPUFのRNA結合能を検証した結果、標的RNA配列に対して結合活性を示した一方で、標的配列の一部を欠くRNA配列に対しては、結合親和性が低下した。以上から、これらの骨格が認識塩基数の増加に有効であることが示唆された。

第二章 PUFを基盤とした標的RNAの特異的制御

PUFをRNA標的化の基盤とした翻訳促進・抑制などの遺伝子発現制御ツールが報告されている。近年、RNAの修飾塩基も遺伝子発現制御に関連することが報告されており、塩基修飾を標的RNA特異的に制御する手法が求められる。N⁶-methyladenosine (m⁶A) は真核生物のRNAに広範にみられる修飾塩基であり、mRNA代謝との関連が示唆されている。これまで、細胞包括的にm⁶Aの機能解析が行われてきたが、その詳細な機能は未だ不明な点も多い。そこでm⁶A脱メチル化酵素の一つであるFat mass and obesity-associated protein (FTO) とPUFの融合体 (FTO-PUF) によって、PUFと標的RNAの結合を足場として、周辺のm⁶Aを特異的に脱メチル化できると考えた。作製したFTO-PUFの脱メチル化能を評価した結果、野生型FTOと比較して標的RNA特異的なm⁶A脱メチル化活性を示した。

また、PUFを基盤としたRNA制御ツールは、細胞内で標的RNA特異的に作用することが求められる。しかし、従来の8リピートPUFを用いたツールでは、標的配列を含む様々な遺

伝子転写産物にも作用する可能性が高い。そこで、標的遺伝子に対する選択性の向上を期待して、16リピートPUFを用いた細胞内での内在RNAの人為的制御について検討した。血管内皮増殖因子（VEGFA）のmRNA 3'UTRにのみ標的配列を有する16リピートPUFをデザインし、RNA不安定化因子Tristetraprolin (TTP) との融合体（TTP-PUF）を細胞内に発現させた。VEGFAの産生量を検証した結果、16リピートTTP-PUFによる有意な抑制効果が示された。トランスクリプトーム中で単一な配列を標的とすることで、遺伝子選択的にRNAを制御できることが示唆された。

本研究では、PUFの認識塩基数を増やすために伸長骨格の構築を行うと共に、PUFを基盤とするRNA制御法として、標的RNA特異的なm⁶A脱メチル化酵素の創出、及び細胞内での内在RNAの制御における標的選択性の向上に成功した。本研究成果は、PUFを利用したRNA制御や転写後修飾に関する研究など多方面への応用が期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

RNA結合タンパク質であるPumilio and fem-3 mRNA-binding factor (PUF)は、高い配列特異性を持ち、任意の配列に結合するようにデザイン可能である。このことから、PUFは特定のRNAを操作するRNA制御ツールにおけるRNA標的化の基盤になると期待されている。一方で、PUFの認識塩基数は8塩基程度に制限され、標的遺伝子の転写産物以外のRNAにも作用することが懸念されている。申請者はこのPUFに改変を加えることで、その認識塩基数を増加させるとともに、PUFを基盤としたRNA制御ツールの創出に取り組んだ。

第一章においては、PUFの連続した8つのリピートを、別の8リピートPUFに挿入することで伸長骨格を構築した。8リピートの挿入位置を検討することによって、その挿入位置によってRNA結合能が異なることを示し、認識塩基数の増加に有望な16リピートPUFを選出した。これによって、野生型PUFよりも長いRNA配列を標的にするPUFを設計することが可能になった。

第二章では、脱メチル化酵素FTOとPUFを融合することで、真核細胞mRNAで広範にみられる N^6 -methyladenosine (m^6A)を標的RNA特異的に脱メチル化する新規RNA制御ツールを創出した。さらに、16リピートPUFを用いることで、細胞内において、単一配列を標的配列とする内在遺伝子の発現抑制に成功した。PUFを基盤としてRNA塩基修飾の制御が可能となったことに加えて、16リピートPUFを利用することで、より標的RNA選択的にRNAを操作することが可能であると考えられる。

以上のように、本研究はPUFの標的選択性を向上させる16リピートPUFの設計指針を与え、PUFを基盤としたRNA制御ツールのさらなる応用可能性を示した。PUFを利用したRNA制御や転写後修飾の研究、疾患治療など多方面への応用が期待される。

よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年2月18日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 2019年6月25日以降