

三次元分子設計による蛋白質応答型 RNA スwitch の設計

Three-dimensional molecular design of Protein-responsive RNA switches

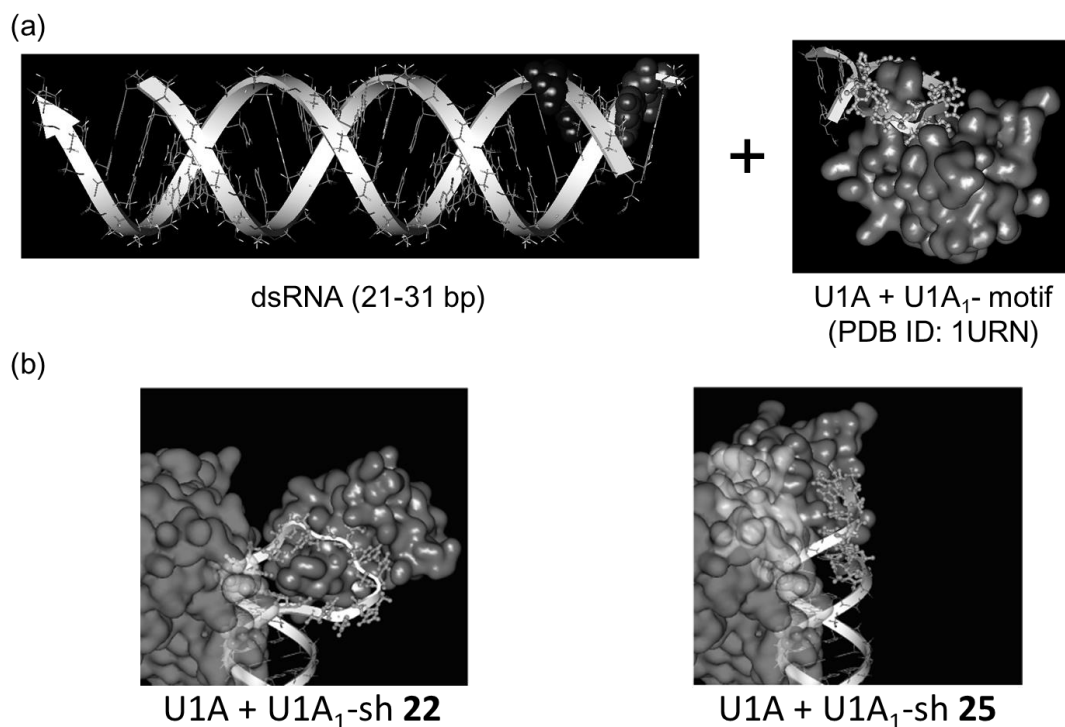
iPS 細胞研究所 初期化機構研究部門 齊藤博英

背景と目的

我々は、細胞内で発現する特定の蛋白質に応答してショートヘアピン RNA (shRNA) の活性を ON/OFF 制御することで、細胞の状態に応答する RNAi システムを開発している。具体的には、shRNA のループ部に特定の蛋白質と相互作用する RNA モチーフを導入した shRNA スwitch (蛋白質応答型 shRNA スwitch) の構築を進めてきた。この蛋白質応答型 shRNA スwitch の作動原理を明確にし、多様な蛋白質に適用できるシステムに拡張するため、我々は新たに switch の 3D 分子設計法を提案し、この設計法をもとに、ヒト内在性の蛋白質である U1A および NF- κ B の p50 ドメインに応答する shRNA スwitch を構築した (Nucleic Acids Res. 2012)

検討内容

まず、Discovery Studio 上で Protein Database から取得した RNP モチーフの結晶構造と 21~27 塩基対の A 型 RNA 二重鎖を結合して shRNA スwitch の 3D 分子モデルを構築した (図 a)。そして図 b のように、蛋白質 (ここでは U1A 蛋白質の例を表示) に結合した shRNA スwitch と Dicer を 3D 分子モデル上で重ね合わせた時に、結合した蛋白質と Dicer が立体障害を起こせば、RNAi の抑制が起こると考えられる。この設計をもとに作製した switch を Dicer cleavage Assay 及び ヒト培養細胞で評価した。



結果

3D 分子設計による Dicer 切断阻害機能及び細胞内での shRNA スイッチ機能の予想と、スイッチの機能評価実験の結果が一致した。この結果から立体構造的に蛋白質応答型 shRNA スイッチの細胞内での機能や効率を予測する手法を確立することに成功した。この設計法を詳細に検討し公表した (Method Mol. Biol. 2014)

考察

現在、新たな蛋白質分子に応答する shRNA スイッチを設計開発するとともに、強制発現レベルではないに内在性の蛋白質発現量にも応答できる shRNA スイッチ開発を目指している。

参考論文

1. Kashida S, Inoue T, Saito H. (2012). Three-dimensionally designed protein-responsive RNA devices for cell signaling regulation. *Nucleic Acids Res.* 40: 9369–78.
2. Kashida S, Saito H. (2014). A Three-Dimensional Design Strategy for a Protein-Responsive shRNA Switch. *Methods Mol. Biol.* 1111: 269–86.