

RNA 結合タンパク質 HNRNPK の相互作用因子の探索

藤井 佑衣 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

【背景および目的】

HNRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) は、核酸代謝や mRNA の選択的スプライシング、翻訳制御において重要な役割を持つタンパク質ファミリーである。HNRNPs の一種である HNRNPK (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K) は転写・RNA スプライシング・翻訳などといったように、遺伝子発現の様々なステップにおいて機能している。また最近、当研究室の長沼らによって HNRNPK の新機能として RNA の選択的 3'末端プロセシングの制御が見出された¹⁾。HNRNPK の構造的な特徴としては、典型的な RNA 結合モチーフである KH モチーフを 3 つ持つということが知られ、そのうちの 1 つの KH モチーフは RNA のみならず DNA にも結合するということも解明されている。

さらに興味深いことに、HNRNPK はがん細胞において発現の亢進が観察されており、発現亢進した HNRNPK が遺伝子発現の様々なステップを異常調節することでがんの悪性化や転移を促進することが示唆されている²⁾。このがん細胞における HNRNPK の発現亢進は、細胞内の HNRNPK の発現制御機構の破綻によって誘発されると考えられる。

以上のように HNRNPK の局在や機能が明らかにされてきたにもかかわらず、細胞内における HNRNPK の制御機構については未だ不明である。従って、細胞内における HNRNPK の制御機構の解明を目指し、HNRNPK の制御に関わる相互作用タンパク質の探索を酵母ツーハイブリッド法により試みた。

【方法】

・酵母ツーハイブリッド法による HNRNPK と相互作用するタンパク質の探索

始めに、HNRNPK cDNA を PCR で増幅し、bait プラスミドとなる pGBKT7 に挿入することで酵母ツーハイブリッド法に必要な bait プラスミドを作製した。

その後、pGBKT7-HNRNPK プラスミドの塩基配列を DNA シークエンサーで解析し、bait プラスミドが正しく作製されていることを確認した。

この pGBKT7-HNRNPK(Bait)プラスミドを空の pGADT7 (Prey)プラスミドとともに酵母 PJ69-4A に形質転換し、HNRNPK のみでレポーター発現が起きないか、「偽陽性」の有無をチェックした。またその際、予め相互作用することが判明している pGBKT7-p53(pre)と pGADT7-T(bait)を形質転換してポジティブコントロールとした。Prey ベクターと Bait ベクターが同時に発現し、それぞれ発現するタンパク質が相互作用した場合、レポーター遺伝子(今回はアデニン合成酵素)の発現がおこるため、アデニン欠損培地で選択可能となる。

HNRNPK のみによる偽陽性がないことを確認した後、ヒト胎児脳由来の cDNA ライブラリーを pGBKT7-HNRNPK が導

入された PJ69-4A 酵母に形質転換することで酵母ツーハイブリッド法を行い、HNRNPK と相互作用するタンパク質のスクリーニングを行った。

【結果及び展望】

現在、酵母ツーハイブリッド法を用いてスクリーニングを行っており、今後 HNRNPK と相互作用する因子を取得する予定である。しかし、これらの因子の中には、HNRNPK 非依存性に Prey のみでレポーターを発現する偽陽性が含まれている可能性があるため、再現実験 (Bait+Prey でポジティブか、Bait 空ベクター+Prey でネガティブか) を通し確認する予定である。そして偽陽性でないと確認できたものをシークエンシ、相互作用因子を同定する予定である。

今後は、HNRNPK との結合が確認されたタンパク質のうち、HNRNPK をユビキチン化または脱ユビキチン化するタンパク質を特定する。そしてそのユビキチン化の生理学的意義について明らかにする予定である。HNRNPK の制御機構を明らかにすることによって、mRNA が成熟 mRNA になるまでの過程を解明することが期待され、また細胞のがん化のメカニズムの一端が解明されることによって将来的にはがん特効薬の開発につながる可能性が期待される。

【参考文献】

- 1) Naganuma T, Nakagawa S, Tanigawa A, Sasaki YF, Goshima N, Hirose T. "Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles." *EMBO J.* 2012, 31, 4020-34.
- 2) Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ, Jackson SP. "hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage." *Cell* 2005, 123, 1065-78.