

ライブラリー vs. ライブラリーの共進化実験を通じた直交性 RNA-RNA 結合タンパク質の探索

(OIST) ○福永 圭佑・横林 洋平

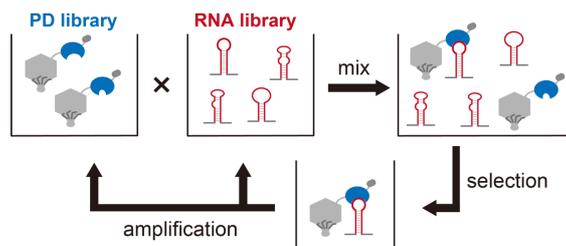
Identification of orthogonal RNA-RNA-binding protein pairs through library-versus-library in vitro selection (*Nucleic Acid Chemistry and Engineering Unit, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University*) ○Keisuke Fukunaga, Yohei Yokobayashi

Keywords : Phage Display; SELEX; in vitro evolution; NGS; Synthetic Biology

進化分子工学の手法では通常、単一のターゲット分子に対してライブラリーの選択を行うが、“ライブラリー vs. ライブラリー”の共進化実験を行うことで相互作用するペアの情報を網羅的に取得しようとする試みがある。そこで我々は(1)“タンパク質”と“RNA”、2種類のライブラリーを *in vitro* で共進化させることによって、RNA-タンパク質複合体 (RNP) ペアを複数取得することができ、また(2)その中に互いに直交性を示す RNP ペアが含まれるのではないかと考えた。

まずは概念実証のためモデル系の立ち上げを行った。翻訳制御など合成生物学のツールとして利用されている(1)古細菌由来の RNA 結合タンパク質 L7Ae を提示するファージ粒子と(2) RNA 結合に関わるアミノ酸に変異を導入した iL7Ae を提示するファージ粒子を作製した。また、*in vitro* 転写で(3) L7Ae に結合する Kink-turn (Kt) RNA と(4) その変異体である dKt を調製した。この4者の中で相互作用しうるペアは L7Ae - Kt の組み合わせのみである。ファージ、RNA それぞれ 2 種類を試験管内で混ぜ、ファージ-RNA 複合体のみを選択・増幅したところ、正しいペアの濃縮が確認された。

次に、L7Ae の RNA 結合面周辺のアミノ酸をランダム化したファージディスプレイ (PD) ライブラリーを構築した。PD ライブラリーと RNA プールを試験管内で混ぜ合わせ、ファージ-RNA 複合体の選択・増幅を行うサイクルを複数回



繰り返した (右図)。次世代シーケンシング (NGS) で配列を解析したところ、タンパク質ライブラリー、RNA ライブラリーともに一定の濃縮が見られ、複数のタンパク質-RNA ペアが選択されていることが示唆された。次にどのタンパク質と RNA が対応しているのかを調べるため、配列が濃縮されたタンパク質 (LSx) を 20 種類リコンビナントタンパク質として調製し、これら個別の LSx に対して RNA ライブラリーの再選択を行い、結合ペアの特定を行った。現在、表面プラズモン共鳴装置を用いた分子間相互作用解析を進めているところである。