

光クロスリンク法を用いた Dicer-PAZ/Platform の dsRNA 認識時における複合体構造の特定

(名大院工) ○鈴木 駿也・横田 徳子・津田 弘貴・神谷 由紀子・浅沼 浩之
 Identification of the complex structure between Dicer-PAZ/Platform and dsRNA by using photo-crosslink analysis (Graduate School of Engineering, Nagoya University) ○Shunya Suzuki, Noriko Yokota,

In RNAi, generation of short double strand RNA (siRNA or miRNA/miRNA*) by Dicer is important step for subsequent formation of RNA induced silencing complex (RISC) which cleaves a target mRNA. Understanding of interaction between RNA and Dicer helps to develop siRNA or RNAi inhibitor. We designed the RNA introduction with carbazole diazirine to analyze interaction positions between the dsRNA and Dicer-Platform/PAZ (Dicer-PP) which recognizes the 3' end of RNA. As a result, Dicer-PP interacts not only the 3' end of dsRNA but also the inner region of dsRNA. We found that secondary structure of inner region of the dsRNA influences the photo-crosslinking between Dicer-PP and dsRNA. Furthermore the crosslinking position on Dicer-PP complexes with the dsRNA were identified by using LC-MS/MS analyses. Based on these results we propose a contact state between pre-siRNA and hDicer-Platform/PAZ.

Keywords : *Oligonucleotide therapeutic; Interaction analyses; Photo-crosslink*

RNAi 機構において重要な役割をもつタンパク質である Dicer は pre-miRNA や pre-siRNA を切断し、短鎖 dsRNA (miRNA, siRNA) を生産する。Dicer によって生み出された短鎖 dsRNA は Ago2 タンパク質に受け渡され RISC を形成し、標的である mRNA を切断する。このことから、Dicer による dsRNA の認識・切断機構の解明は RNAi を理解する上でも、RNAi を基盤とする核酸医薬を開発する上でも非常に重要である。本研究では、基質 RNA の末端の認識に重要な役割をもつ Dicer-Platform/PAZ ドメイン (Dicer-PP) と RNA の相互作用部位を特定するため、光反応性架橋分子である carbazole diazirine を導入した RNA を設計し、光クロスリンク解析を行った。クロスリンカーの導入位置が異なる dsRNA を用いて、各 dsRNA と Dicer-PP の光クロスリンク反応産物を解析した結果、Dicer-PP は dsRNA の末端だけでなく、内部領域とも相互作用することが明らかとなった。また、dsRNA 内部の二次構造の違いは Dicer-PP の認識に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、LC-MS/MS 解析によって Dicer-PP 上の RNA 相互作用部位を特定し、新たな複合体構造を予測することができた。

