

Title	CRISPR-Cas13システムによるRNA相互作用タンパク質の同定
Sub Title	Identification of RNA interacting proteins by CRISPR-Cas13 system
Author	石津, 大嗣(Ishizu, Hirotsugu)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>Cas13はRNAにガイドされてRNAを標的とするCRISPR-Casタンパク質である。標的RNA分解活性を失活したdCas13に、10 nm以内に隣接するタンパク質をビオチン標識するAPEX2を付加することで、標的RNA上に局在化するタンパク質を特異的にビオチン標識できると考えた。本研究では、CRISPR-Cas13システムとAPEX2を用いてRNA相互作用タンパク質を同定する手法の開発を目指した。標的として、マウスES細胞で発現するレトロトランスポゾンであるLong interspersed nucleotide factor- 1 (LINE-1 RNA)を選択した。先行研究によりLINE-1 RNAはマウスES細胞の核内において、転写制御因子として機能するKap1とNucleolinと結合することが報告されている。そこで、dCas13-APEX2システムによりLINE-1 RNAとKap1、Nucleolinとの相互作用が検出できるかどうか検証した。まず、Tet on システムで発現制御できるdCas13-APEX2をゲノムに組み込んだマウスES細胞の安定細胞株を作製した。次に、LINE-1 RNAを標的とするガイドRNAを設計し、発現プラスミドを作製した。dCas13-APEX2とガイドRNAを同時に発現し、APEX2によりビオチン標識されたタンパク質を細胞抽出液から濃縮した。しかし、Kap1とNucleolinが含まれるかどうかをウェスタンブロット法で検証した結果、これらの検出には至らなかった。この原因として、ガイドRNAの標的部位がdCas13の結合効率に影響する可能性が考えられる。今後、複数の標的部位を設計し、標的RNA特異的に結合するために最適な標的部位を探索する。</p> <p>Cas13 proteins can cleave a targeted RNA through a short guide RNA with complementarity to the target sequence. I hypothesized that the catalytically dead Cas13 protein fused with APEX2, which labeled adjacent proteins within 10 nm with biotin, could specifically biotinylate proteins localized on the target RNA. In this study, I aimed to develop a method to identify RNA-interacting proteins using the CRISPR-Cas13 system and APEX2. Long interspersed nucleotide factor-1 (LINE-1 RNA), a retrotransposon expressed in mouse ES cells, was selected as a target. Previous studies have reported that LINE-1 RNA binds Kap1 and Nucleolin, which function as transcriptional regulators, in the nucleus of mouse ES cells. Therefore, I tested the ability of the dCas13-APEX2 system to detect interactions between LINE-1 RNA and Kap1 and Nucleolin. First, a stable cell line of mouse ES cells incorporating dCas13-APEX2 into the genome, which can be regulated by the Tet on system, was generated. Next, a guide RNA targeting LINE-1 RNA was designed and an expression plasmid was generated. dCas13-APEX2 and the guide RNA were expressed simultaneously, and proteins labeled with biotin by APEX2 were enriched from cell extracts. However, the presence of Kap1 and Nucleolin was failed to detect by western blotting. One possible reason for this is that the target site of the guide RNA affects the binding efficiency of dCas13. In the future, I will design multiple target sites and search for the best target sites for target RNA-specific binding.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190269

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	助教(有期・医学部)	補助額	500 (特B)千円
	氏名	石津 大嗣	氏名 (英語)	Hirotsugu Ishizu		
研究課題 (日本語)						
CRISPR-Cas13 システムによる RNA 相互作用タンパク質の同定						
研究課題 (英訳)						
Identification of RNA interacting proteins by CRISPR-Cas13 system						
1. 研究成果実績の概要						
<p>Cas13 は RNA にガイドされて RNA を標的とする CRISPR-Cas タンパク質である。標的 RNA 分解活性を失活した dCas13 に、10 nm 以内に隣接するタンパク質をビオチン標識する APEX2 を付加することで、標的 RNA 上に局在化するタンパク質を特異的にビオチン標識できると考えた。本研究では、CRISPR-Cas13 システムと APEX2 を用いて RNA 相互作用タンパク質を同定する手法の開発を目指した。標的として、マウス ES 細胞で発現するレトロトランスポゾンである Long interspersed nucleotide factor-1 (LINE-1 RNA) を選択した。先行研究により LINE-1 RNA はマウス ES 細胞の核内において、転写制御因子として機能する Kap1 と Nucleolin と結合することが報告されている。そこで、dCas13-APEX2 システムにより LINE-1 RNA と Kap1, Nucleolin との相互作用が検出できるかどうか検証した。まず、Tet on システムで発現制御できる dCas13-APEX2 をゲノムに組み込んだマウス ES 細胞の安定細胞株を作製した。次に、LINE-1 RNA を標的とするガイド RNA を設計し、発現プラスミドを作製した。dCas13-APEX2 とガイド RNA を同時に発現し、APEX2 によりビオチン標識されたタンパク質を細胞抽出液から濃縮した。しかし、Kap1 と Nucleolin が含まれるかどうかをウェスタンブロット法で検証した結果、これらの検出には至らなかった。この原因として、ガイド RNA の標的部位が dCas13 の結合効率に影響する可能性が考えられる。今後、複数の標的部位を設計し、標的 RNA 特異的に結合するために最適な標的部位を探索する。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>Cas13 proteins can cleave a targeted RNA through a short guide RNA with complementarity to the target sequence. I hypothesized that the catalytically dead Cas13 protein fused with APEX2, which labeled adjacent proteins within 10 nm with biotin, could specifically biotinylate proteins localized on the target RNA. In this study, I aimed to develop a method to identify RNA-interacting proteins using the CRISPR-Cas13 system and APEX2. Long interspersed nucleotide factor-1 (LINE-1 RNA), a retrotransposon expressed in mouse ES cells, was selected as a target. Previous studies have reported that LINE-1 RNA binds Kap1 and Nucleolin, which function as transcriptional regulators, in the nucleus of mouse ES cells. Therefore, I tested the ability of the dCas13-APEX2 system to detect interactions between LINE-1 RNA and Kap1 and Nucleolin. First, a stable cell line of mouse ES cells incorporating dCas13-APEX2 into the genome, which can be regulated by the Tet on system, was generated. Next, a guide RNA targeting LINE-1 RNA was designed and an expression plasmid was generated. dCas13-APEX2 and the guide RNA were expressed simultaneously, and proteins labeled with biotin by APEX2 were enriched from cell extracts. However, the presence of Kap1 and Nucleolin was failed to detect by western blotting. One possible reason for this is that the target site of the guide RNA affects the binding efficiency of dCas13. In the future, I will design multiple target sites and search for the best target sites for target RNA-specific binding.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			