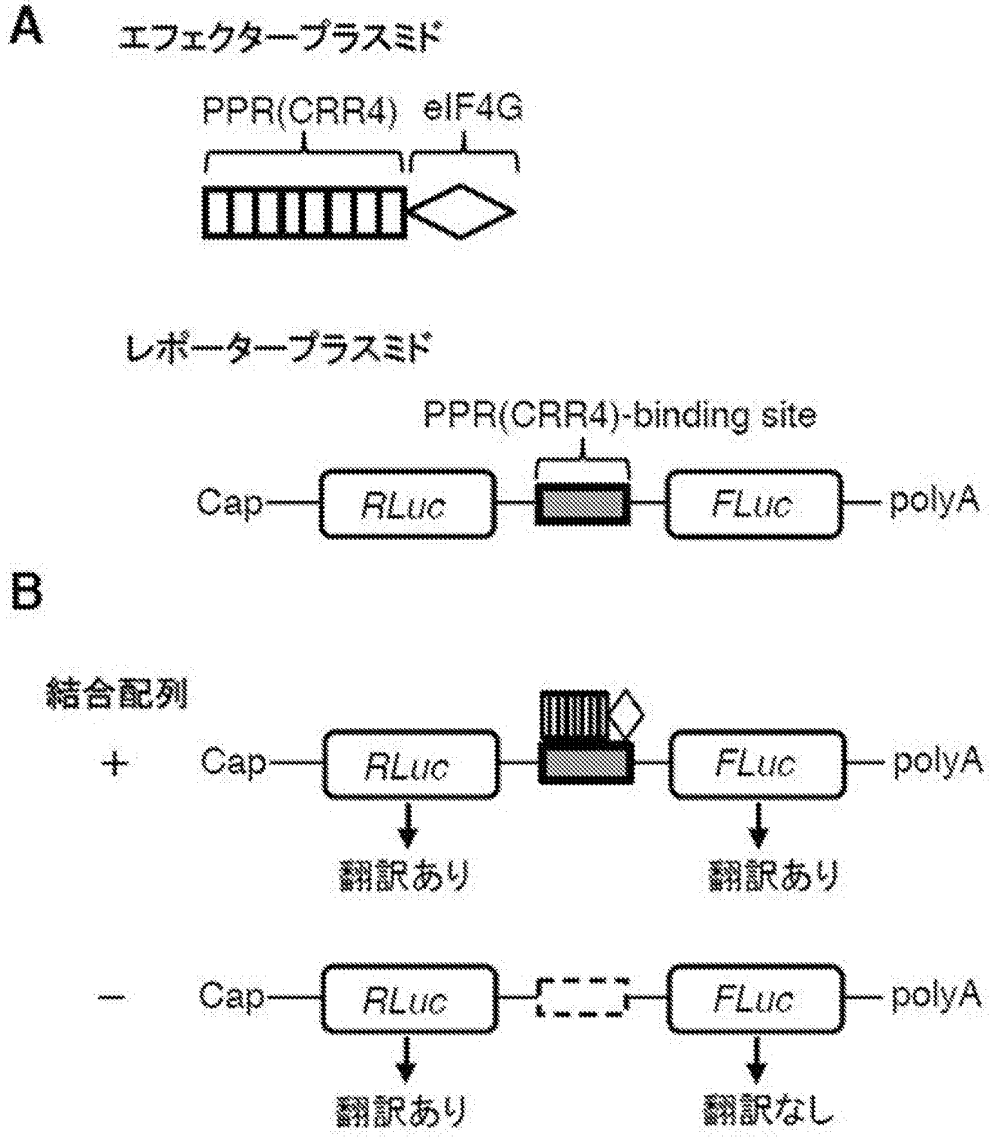
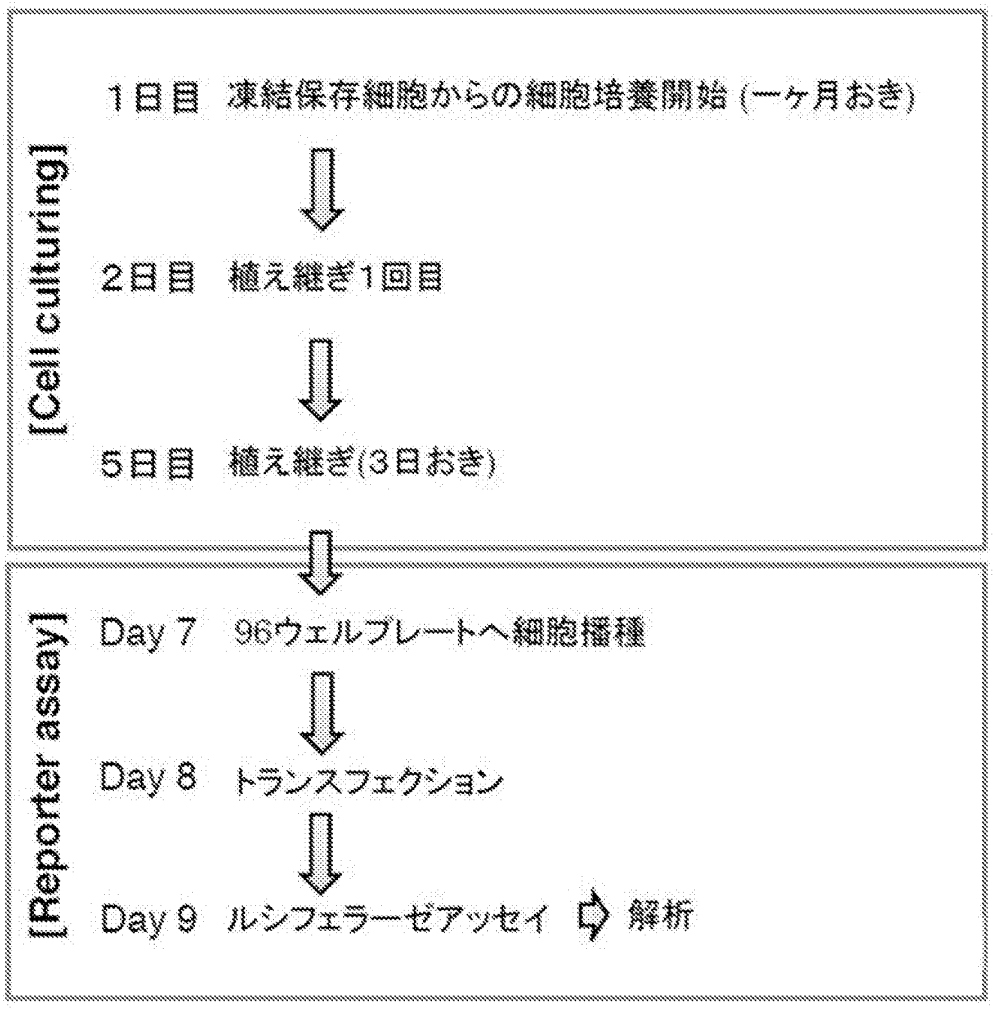
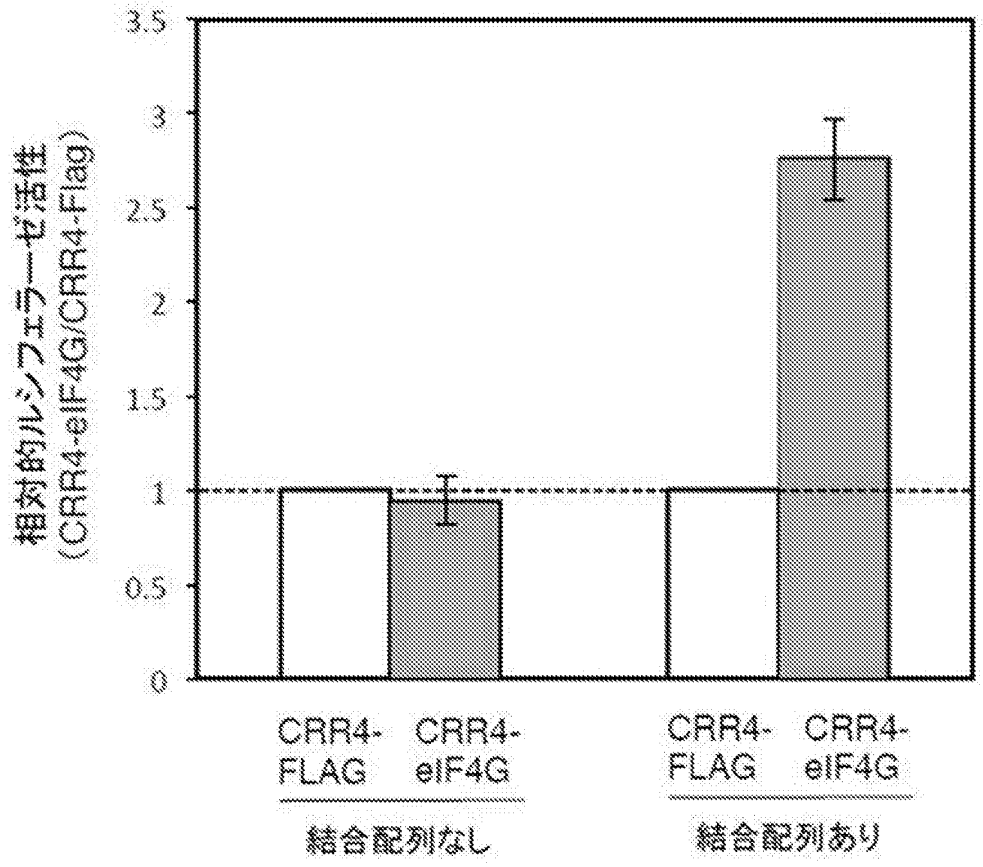
[図1]


A
エフェクタープラスミド
PPR(CRR4)
eIF4G
レポータープラスミド
PPR(CRR4)-binding site
Cap
RLuc
FLuc
polyA
B
結合配列
+
Cap
RLuc
FLuc
polyA
翻訳あり
翻訳あり
−
Cap
RLuc
FLuc
polyA
翻訳あり
翻訳なし

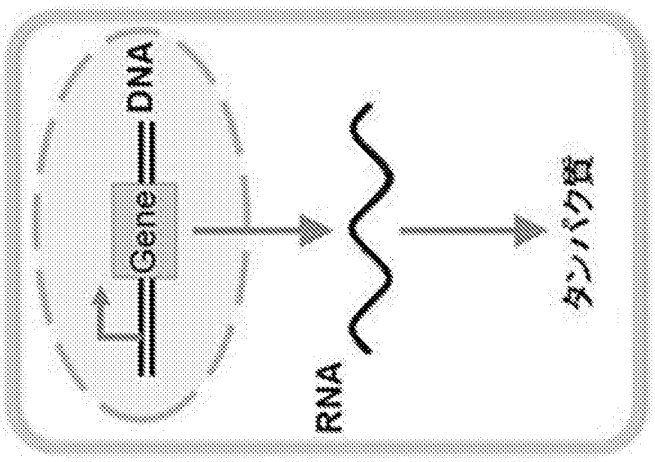
[図2]


[Cell culturing]
1日目 凍結保存細胞からの細胞培養開始 (一ヶ月おき)
2日目 植え継ぎ1回目
5日目 植え継ぎ(3日おき)
[Reporter assay]
Day 7 96ウェルプレートへ細胞播種
Day 8 トランスフェクション
Day 9 ルシフェラーゼアッセイ
解析

[図3]


相対的ルシフェラーゼ活性
(CRR4-eIF4G/CRR4-Flag)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
CRR4-FLAG
CRR4-eIF4G
CRR4-FLAG
CRR4-eIF4G
結合配列なし
結合配列あり

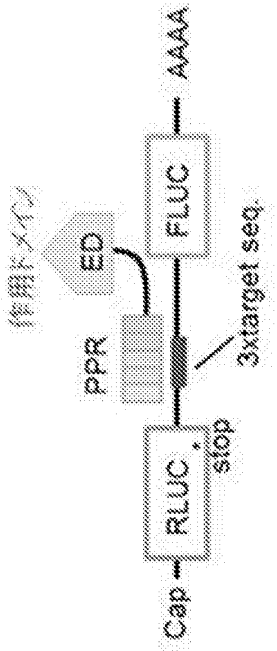
[図4]



タンパク質産生量を決定する要素

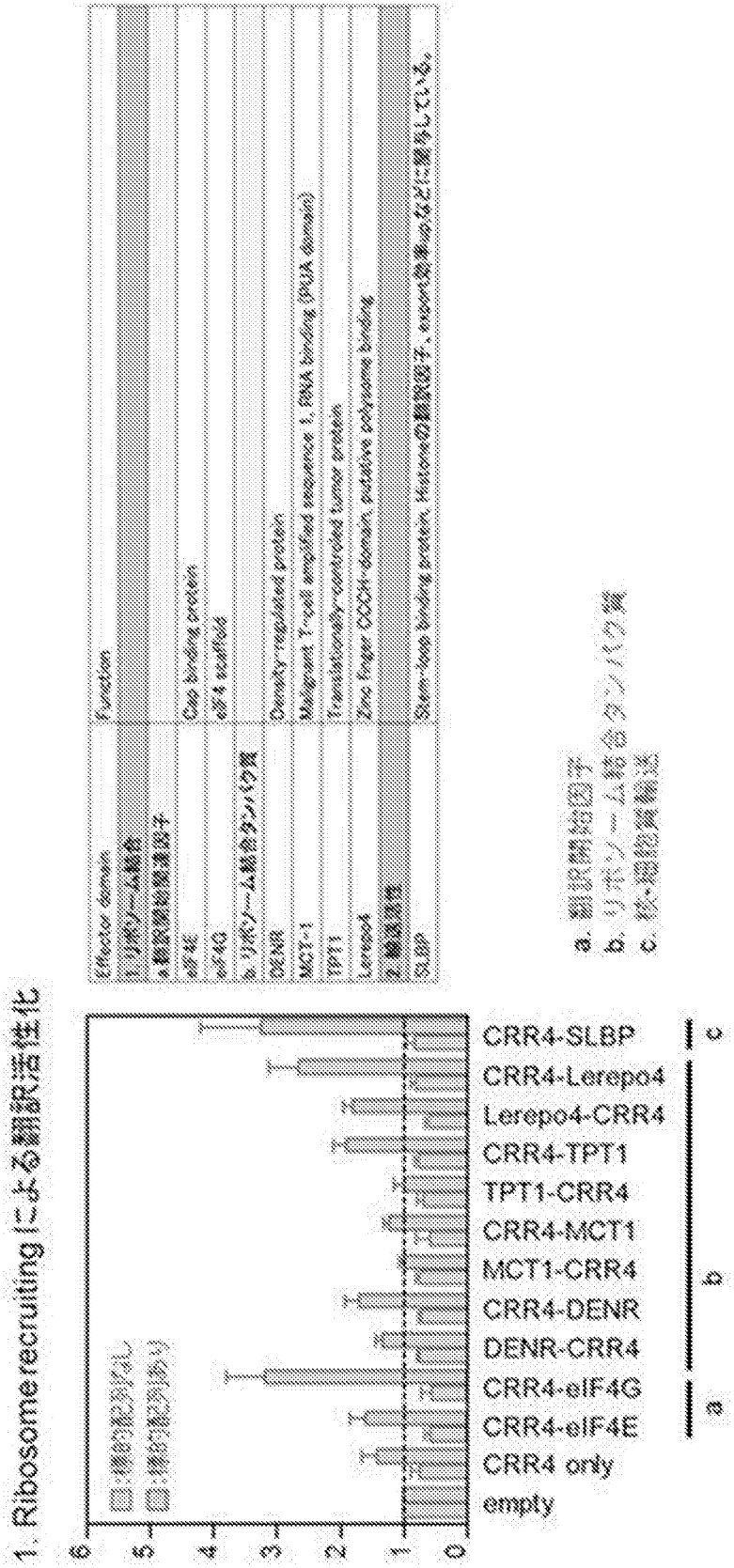
1. 遺伝子の挿入位置
2. 転写活性
3. RNAレベルでの調節
4. 翻訳後修飾

・翻訳
・核→細胞質輸送
・ER膜への輸送、など

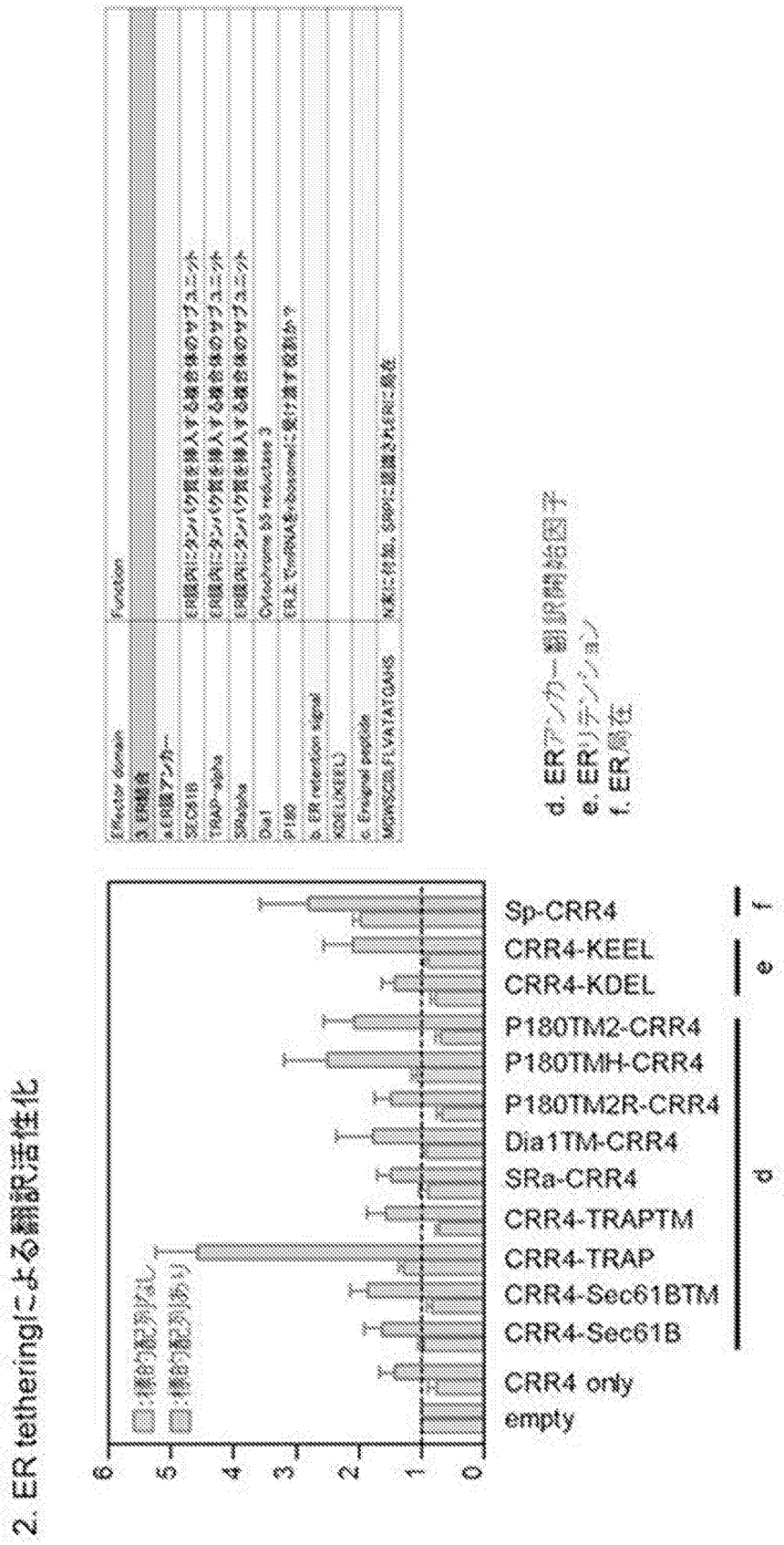


動物培養細胞にこのようなレポーターシステムを導入し、FLUCレポータータンパク質量が増加するかを調べる。
FLUCタンパク質量は、PPRが結合しかつ作用ドメインに効果があった場合にのみ増加する。

[図5]


1. Ribosome recruitingによる翻訳活性化
□:標的配列なし
□:標的配列あり
0
1
2
3
4
5
6
empty
CRR4 only
CRR4-eIF4E
CRR4-eIF4G
DENR-CRR4
CRR4-DENR
MCT1-CRR4
CRR4-MCT1
TPT1-CRR4
CRR4-TPT1
Lerepo4-CRR4
CRR4-Lerepo4
CRR4-SLBP
a
b
c
a. 翻訳開始因子
b. リボソーム結合タンパク質
c. 核-細胞質輸送
Effector domain
Function
1. リボソーム結合
a.翻訳開始因子
eIF4E
Cap binding protein
eIF4G
eIF4 scaffold
b. リボソーム結合タンパク質
DENR
Density regulated protein
MCT-1
Malignant T-cell amplified sequence 1, RNA binding (PUA domain)
TPT1
Translationally-controlled tumor protein
Lerepo4
Zinc finger CCCH-domain, putative polyprotein binding
2. 輸送活性
SLBP
Stem-loop binding protein, Histone

[図6]


2. ER tetheringによる翻訳活性化
□:標的配列なし
□:標的配列あり
0
1
2
3
4
5
6
Sp-CRR4
CRR4-KEEL
CRR4-KDEL
P180TM2-CRR4
P180TMH-CRR4
P180TM2R-CRR4
Dia1TM-CRR4
SRa-CRR4
CRR4-TRAPTM
CRR4-TRAP
CRR4-Sec61BTM
CRR4-Sec61B
CRR4 only
empty
f
e
d
d. ERアンカー翻訳活性因子
e. ERリテンション
f. ER局在