

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13746

研究課題名(和文)細胞内におけるRNA分解の観測法の開発とストレス応答研究への応用

研究課題名(英文)Development of a method for imaging RNA digestion in cells and its application for studying stress response

研究代表者

大槻 高史(Ohtsuki, Takashi)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：80321735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：様々な細胞内イベントにおいて、RNAの局在変化や分解を伴う例が知られている。このとき同じRNAでも細胞内の異なる場所で分解速度が同じとは限らない。このようなことを明確に観測するために、本研究では、蛍光相関分光法により細胞内の各所におけるRNAの分解について調べる方法の確立を目指した。その際、哺乳動物細胞の熱ストレス応答において起こると考えられているtRNAの局在変化や分解促進などを題材としてtRNA分解を観測した。

研究成果の概要(英文)：Localization change and/or degradation of RNAs have been known to associated with various cellular events. In this study, a method to observe degradation of a fluorescently labeled RNA in each place in a cell by fluorescence correlation spectroscopy. We attempted to observe heat stress-induced tRNA degradation in mammal cells by this method.

研究分野：生体関連化学

キーワード：核酸関連化学 RNA分解 ストレス応答 tRNA FCS

1. 研究開始当初の背景

RNAは、翻訳の抑制や、アミノ酸の運搬、スプライシング、転写後修飾の調節、タンパク質配列情報の運搬など様々な役割をもち、ほぼ、あらゆる生命現象に関わっている。RNAの働きを調べる際、そのRNAの結合の相手や、その細胞内局在を調べ、さらにはそのRNAの立体構造を調べたりすることが一般的である。一方、そのRNAが生産されたらどのくらい長く働くのかという寿命の側面も重要である。数分で分解するものと数日残るものとは、最初に同量のRNAが生産されても働き方は全く違う。もちろん細胞外でRNAの分解をモニターするのは難しいことではないが、細胞内となるとRNAの分解を追跡することは難しくなる。さらには1つの細胞の中でも、異なる場所(核内、ミトコンドリア内、各種顆粒内など)でRNAの寿命は異なるだろうし、細胞のおかれた環境の変化によってもRNAの分解速度は変化するであろう。このようなRNAの分解速度の側面を調べることもRNA機能研究のうえで極めて重要である。

細胞のおかれた状況と細胞内の場所によってRNAの分解速度が変わると考えられる一例として、哺乳動物細胞の熱ストレス応答において、tRNA^{Met}など一部のtRNAの核内蓄積・顆粒形成・分解促進などが起こることを筆者らは最近見出した(Watanabe et al. Biochem Biophys Res Commun., 2012; Nucleic Acids Res. 2013; FEBS Lett. 2014)。このtRNAの分解の起こる程度は細胞内の場所により異なると思われる、tRNA granule << 細胞質内 < tRNA granuleを除く核内、の順に分解が速くなると思われる。ただし、これらは状況証拠に基づく推定であり直接の証拠はない。証拠が得られないのは、RNA分解について、細胞質内やオルガネラ内などを区別して調べるのが難しいからである。この熱ストレス応答にまつわるtRNAの働きや避難の様子などを知るためには、細胞内の各所で起こる分解の様子を追跡

する簡便な方法が必要である。

2. 研究の目的

細胞が様々な状況に対応する際、RNAの局在変化や分解を伴うことが多いと考えられる。そのとき同じRNAでも異なる場所(細胞質/オルガネラ等)では分解速度は同じとは限らない。このような細胞内の場所ごとのRNA分解の違い・局在変化と分解の連動に関する知見は極めて少ない。

そこで本研究では、第一に、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた蛍光相関分光法(FCS)により細胞内の各所におけるRNAの分解について調べる方法を確立する。FCSでは、分解により蛍光標識RNAの分子量が小さくなると蛍光標識部位の運動性が高まり拡散係数が大きくなるだろうと考えられる。第二に、FCSによるRNA分解度合の分析法を、tRNAの細胞内各所における分解の絡む、熱ストレス応答機構の解明へと適用することを目指した。

3. 研究の方法

1) 細胞外における蛍光標識RNAのFCS測定

まずは、RNAの分解がFCSにより検出できるかどうかを調べるために、20塩基のモデルRNAに蛍光色素を付加したものを準備した。この蛍光標識RNAをリボヌクレアーゼによる分解を行ったものを行わないものとの2種類の水溶液を準備し、スライドガラスとカバーガラスの間に作った約3 μ Lのウェル(図1)に封入してFCS測定を行った。

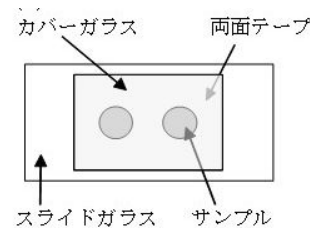


図1. FCS測定のサンプル

2) 細胞内導入法の検討

蛍光標識RNAを細胞内で分析するために、哺乳

乳動物細胞内への導入を行った。なるべく速く、効率良い導入を目指して、導入法の検討を行った。マイクロインジェクション法およびStreptolysin Oによる膜透過法の利用を試みた。

3) 細胞内での標識RNAの測定

蛍光標識RNAを哺乳動物細胞の細胞内に上述の方法で導入してすぐに(なるべく細胞内で分解を受けないうちに)、このRNAの拡散係数をFCSにより測定した。この結果を、標識RNA分解物を導入した場合と比較し、分解による拡散係数の違いが出るかを調べた。水溶液中で行った時との比較とともに、細胞質内・核内における拡散係数との違いを調べた。

4) 熱ストレス応答に関するtRNAの標識と追跡

熱ストレス応答時に核内蓄積や顆粒形成などに関わると考えられているヒトtRNA^{iMet}を追跡(蛍光顕微鏡による局在の追跡、およびFCSによる細胞内の場所ごとの分解速度の分析)を行うために、蛍光標識したtRNA^{iMet}を作製した。ただし、転写合成で部位特異的に蛍光標識することは困難であり、化学合成では狙った位置に蛍光基の付いたRNAを作ることができるが、tRNAほどの長さのRNA合成は困難である。そこでtRNAを2つの断片に分けて合成し酵素的に連結する方法で作製した。これを細胞内にマイクロインジェクションし、FCSによる観察を行った。

4. 研究成果

1) 細胞外における蛍光標識RNAのFCS測定

21塩基のモデルRNAにTAMRAという蛍光色素を付加したもの(RNA-TAMRA)を準備し、この蛍光標識RNAをRNase Aによる分解を行ったものを行わないものとの2種類の水溶液に対してFCS測定を行った。その結果、図2のように、RNase Aにより分解したRNAは、分解していないRNAと比べて拡散が速く、拡散係数は分解し

たRNAの方が約2倍の値であった。

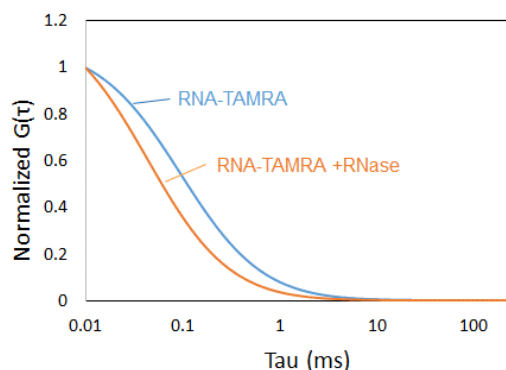


図2. 細胞外における蛍光標識RNAのFCS測定結果

2) 細胞内導入法の検討

RNA-TAMRAを細胞内で分析するための細胞内へのRNA導入法を検討した。細胞としては、ヒト肺がん由来H1299細胞株を用いた。リポフェクション法は汎用的方法であるが、「導入後にRNAがエンドソーム内にトラップされやすい」「RNAとキャリア分子(カチオン性脂質など)との複合体形成が必要であるため、導入されるRNAが自然な姿を取りにくい」などの理由により用いないことにした。マイクロインジェクション法は、細胞に与えるダメージは大きいですが、一瞬でRNA導入が可能であり、細胞質に導入したRNA-TAMRAは核にも到達した。Streptolysin O酵素により細胞膜の透過性を上げる方法によっても蛍光標識RNAの導入が可能であった。文献のプロトコルでは導入のために1時間15分を要したが、この間に蛍光標識RNAの分解も同時に起こってしまう懸念があるため、導入時間を最小化する検討を行い、40分で導入が可能になった。

3) 細胞内での標識RNAの測定

RNA-TAMRAを哺乳動物細胞の細胞質内にマイクロインジェクションした後に、RNA-TAMRAの拡散係数をFCSにより測定した。この結果を、RNA-TAMRAの分解物を導入した場合と比較し、分解による拡散係数の違いを調べた。結果として、未分解のRNA-TAMRAの拡散係数は細胞内

では水溶液中と比べてやや小さい(60~80%)程度であったが、RNA-TAMRA分解物の拡散係数は細胞内では水溶液中と比べてかなり拡散係数が小さかった(40%程度)。その結果、細胞内では分解前後の拡散係数の差が小さくなってしまった。これは分解物の中の蛍光分子(TAMRAに1塩基のRNAが結合したもの)の一部が細胞内の成分に吸着/結合して、拡散速度が遅くなっているせいかと思われる。すなわち、TAMRAは細胞内では膜か何かに結合しやすくなり、単なる水溶液中のときのように速く動けないことが示唆された。今後は、細胞内での拡散速度を下げないような蛍光色素の探索が必要だと考えられる。ただし、細胞内でも標識RNAは分解前後において拡散係数が変動することには変わりはない。現状では2-3割程度の変動であるが、このような拡散係数の差により分解を論じることが可能になった。

4) 熱ストレス応答に関するtRNAの標識と追跡

哺乳動物細胞の熱ストレス応答において一部のtRNAの核内蓄積・顆粒形成・分解促進などが起こることが知られている。このようなtRNAの例としてヒトtRNA^{iMet}を題材とし、蛍光標識tRNAの作製を行った。3'側に蛍光色素の付いた3'側のtRNA断片を化学合成により入手し、未標識の5'側tRNA断片を転写合成により調整して、これらをRNA ligaseにより連結することで3'端側を蛍光標識したtRNA^{iMet}を作製することができた。これをH1229細胞内に導入して、FCS測定を行ったところ、拡散係数は数10 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ であり、核内より細胞質内の方がやや拡散が速かった。熱ストレス応答に関しては、熱ストレスを与えてからFCS測定を行ってみたところ、ストレスに応じて、細胞質や核におけるtRNA分解が促進されているような結果が得られた。ただし、熱ストレスにマイクロインジェクションのストレスが重なったか、細胞の致死率が高く、観測が困難かつ、

測定値のばらつきが大きかった。この点についてはインジェクションしてから、熱ストレスを与えるまでの時間間隔など更なる検討により再現性の高い測定値が得られるようになる必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Jin Li, Chengzhen Xu, Naotaka Shimada, Yuichi Miyoshi, Kazunori Watanabe, Wang Cong, Takashi Ohtsuki, Detection of small, highly structured RNAs by molecular beacons. *Analytical Methods*, 査読有, 2017, in press. DOI: 10.1039/C7AY00341B

Takashi Ohtsuki, Shigeto Kanzaki, Sae Nishimura, Yoshio Kunihiro, Masahiko Sisido, Kazunori Watanabe, Phototriggered protein syntheses by using (7-diethylaminocoumarin-4-yl)methoxycarbonyl-caged aminoacyl tRNAs. *Nature Communications*, 査読有, 2016, 7, 12501. DOI: 10.1038/ncomms12501

[学会発表](計11件)

岡田真実、山本理沙子、渡邊和則、大槻高史、熱ストレス依存的な核内ストレス構造体形成機構の解析、第39回分子生物学会、2016. 11. 30-2016. 12. 2、横浜

渡邊和則、岡田真実、山本理沙子、大槻高史、熱ストレスによる核内ストレス構造体形成機構の解明、第89回日本生化学会、2016. 9. 26、仙台

Yuichi Miyoshi, Kazunori Watanabe, Hiromu Kashida, Hiroyuki Asanuma, Takashi Ohtsuki, Molecular beacons for detecting tRNA, 26th tRNA workshop, Sep 8, 2016, Jeju

(Korea)

Kazunori Watanabe, Yusuke Umemoto, Akihisa Takahashi, Kenichi Ijiri, Takashi Ohtsuki, The degradation of initiator tRNA depended on the cell cycle under heat stress. 26th tRNA workshop, Sep 6, 2016, Jeju (Korea)

内田伸哉、渡邊和則、大槻高史、Xrn2 活性化メカニズムの解明、RNA フロンティアミーティング 2016、2016. 8. 31 - 9. 2、ニセコ (北海道)

岡田真実、渡邊和則、大槻高史、tRNA granules 形成因子の同定の試み、RNA フロンティアミーティング 2015、2015. 12. 8-10、蔵王 (山形)

大西諒、中林孝和、渡邊和則、大槻高史、RNAの分解と寿命の解明、BMB2015、2015.12.1-4、神戸

三好 祐一・渡邊 和則・榎田 啓・浅沼 浩之・大槻 高史、DNA/RNA ハイブリッドを用いた低分子 RNA 追跡法の開発、第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015.9.10-12、熊本

梅本裕介、高橋昭久、井尻憲一、大槻高史、渡邊和則、温熱による細胞周期に依存した翻訳抑制機構の解明、第 32 回日本ハイパーサーミア学会、2015. 9. 4-5、大阪、

三好 祐一、渡邊 和則、榎田 啓、浅沼浩之、大槻 高史、Molecular Beaconを用いたtRNA 検出法の設計、第 17回日本RNA学会年会、2015.7.15、札幌

渡邊和則、梅本裕介、高橋昭久、井尻憲一、大槻高史、熱ストレスによる開始 tRNA^{Met} は細胞周期に依存して分解促進している、第 17 回日本RNA学会年会、2015.7.15、札幌

〔その他〕

ホームページ

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/ohtsuki/index.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大槻 高史 (OHTSUKI, Takashi)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号 : 80321735

(2)研究分担者

渡邊 和則 (WATANABE, Kazunori)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号 : 70602027

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし