

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14987

研究課題名(和文) RNA結合タンパク質の特異的RNA認識を利用した細胞センサーの構築

研究課題名(英文) Development of cell sensor by using RNA binding protein

研究代表者

秋光 信佳 (Akimitsu, Nobuyoshi)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：40294962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：RNAの塩基配列を特異的に認識できるようにデザインしたPUM1タンパク質のRNA結合ドメインを利用し、RNA発現を検出するシステム構築を目指した。そのため、まず、細胞内の野生型PUMが制御するRNAについての情報が基盤的情報として必要であったため、RIP-seqとBRIC-seqを用いて、PUMによる分解制御を受けるヒト遺伝子群を網羅的に同定した。その結果、約50種類のRNAが野生型PUMの分解制御を受けていることを明らかにした。次に、GFPに連結した野生型PUMと変異型PUMをデザインし、現在、安定発現細胞株を樹立できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I design PUM, an RNA binding protein, conjugated Green Fluorescent Protein (GFP) to establish the cell line for monitoring RNA expressions in vivo. To this end, at first, I determined the RNAs that are controlled by PUM in vivo. By integrating RIP-seq data and BRIC-seq data, I determined 50 PUM targets. Based on this data, I designed PUM-GFP construct and established the cells expressing PUM-GFP.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA

1. 研究開始当初の背景

生命科学の幅広い分野において、生きた細胞における特定遺伝子の発現を迅速かつリアルタイムに求めるニーズが存在する。医薬品開発等でも遺伝子発現変動を生きた細胞でリアルタイム検出することは重要な技術である。例えば、新規医薬品候補化合物のスクリーニングや副作用の有無の検出などで大きなニーズが存在する。そのため、薬学領域においても、生きた細胞の遺伝子発現検出法の開発は重要な研究課題である。

こまでに、蛍光タンパク質やルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子の上流に測定対象遺伝子の転写プロモーターを連結したレポーター遺伝子システムなどが開発されてきた。この手法はシンプルな方法であり、汎用性があるため、様々な遺伝子の発現制御を解明するために利用されてきた。しかしながら、転写を制御するプロモーターが長い DNA 領域に渡って複数存在する遺伝子や遠位エンハンサーによって制御される遺伝子の発現誘導を正確にモニターすることができないなどの問題点も明らかになってきた。さらに、DNA メチル化やヒストン修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御を受ける遺伝子の発現誘導をモニターできないという原理的問題が存在する。

2. 研究の目的

本研究では、生細胞での遺伝子発現 (RNA の発現誘導) をリアルタイム検出できる細胞センサーの開発を行う。具体的には、検出対象となる RNA の塩基配列を特異的に認識できるようにデザインした “PUM1 タンパク質 RNA 結合ドメイン” と “再構成型蛍光タンパク質 GFP (N 末と C 末の 2 つに分断された蛍光タンパク質が空間的に隣接することで蛍光発光活性を再構成できる蛍光タンパク質)” を連結したキメラタンパク質を構築して、細胞を生かし

た状態で検出対象の RNA 発現を自在に検出するシステムの開発を目指す (図 1)。GFP の蛍光は細胞が生きた状態で検出可能であるため、特定の遺伝子発現を生細胞で検出可能になることが期待できる (図 2)。転写プロモーターのレポーターアッセイ法などの従来法とは異なり、RNA の塩基配列情報のみで生細胞での遺伝子発現誘導を検出できるため、従来法に比べて本法は極めて便利なシステムと期待される。この目的のため、まず、野生型 PUM が標的とする内在性遺伝子に関する情報を得ることにした。そして、この情報をもとに、PUM-GFP のデザインを行った。当初、構築した野生型 PUM と変異型 PUM の結合特異性を SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment、RNA 結合タンパク質に結合する特異的 RNA 配列を高速に濃縮し、決定できる技術) で決定する予定であったが、細胞内で PUM が結合する標的 RNA を同定し、その配列情報から PUM デザインをする方が生理的に意味があると考え、上述の通り、PUM の in vivo 標的を同定することにした。

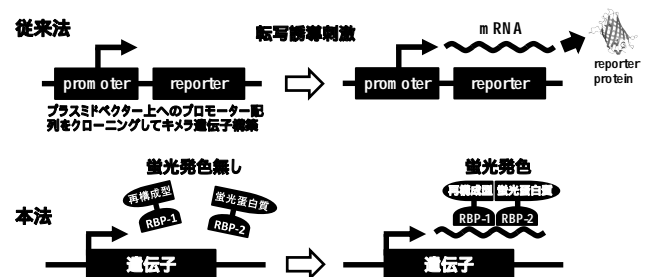


図1:従来法と本法の原理比較

上段(従来法): 検出対象遺伝子のプロモーターを用いたレポーターアッセイでは、検出対象となる遺伝子のプロモーター領域を決定することが必須である。また、プラスミドベクターを利用するため、エピジェネティックな転写制御による遺伝子発現誘導を検出することができない。

下段(本法): 2種類のキメラタンパク質(検出対象となるRNAの配列に特異的に結合するRNA結合タンパク質と再構成型蛍光タンパク質)を細胞で発現させる。標的RNAが発現誘導したときだけ、標的RNA上で2種類のキメラタンパク質が隣接し合い、その結果、蛍光タンパク質が再構成されて蛍光を発する。

従来のレポーター遺伝子システムの問題を克服する本システムの完成は、遺伝子発現をモニターする必要がある幅広い生命科学分野(創薬、衛生化学、神経科学、発生学、環境影響評学、毒性学、など)の発展に多大な貢献が期待できる。また、PUM1のRNA結合ドメインの改変技術は研究協

力者の山田が長年培ってきた技術であり、国際的にもユニークかつ競争力のある技術であると考え、研究を進めた。

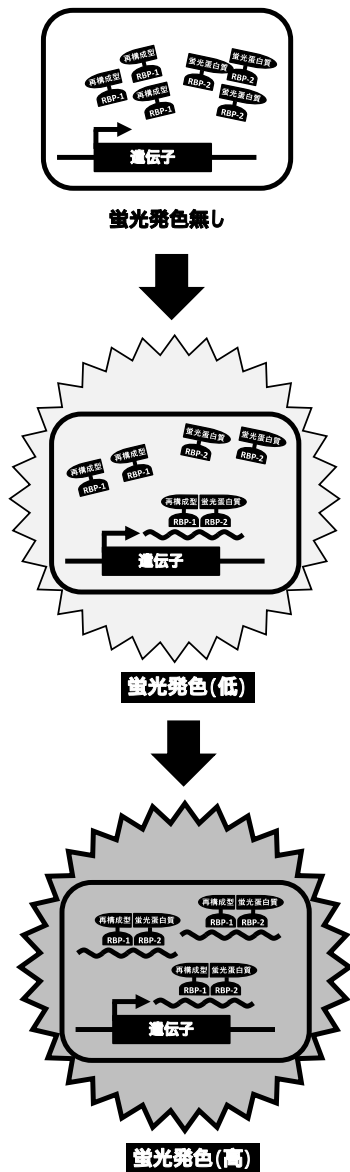


図2: 標的RNAの発現に応じた、RNA配列上でのGFPタンパク質の再構成とGFP蛍光の増大の模式図

3. 研究の方法

RIP (RNA-protein complex immunoprecipitation)-seq とは、注目する RNA と相互作用する RNA 分子を網羅的に同定する分子生物学的手法である。すなわち、PUM を免疫沈降したときに同時に回収される RNA を次世代シーケンサー解析で同定した。

BRIC (2-bromouridine immunoprecipitation chase assay)-seq とは、

2-bromouridine を用いて細胞内の RNA 分解速度を網羅的に同定する方法である。すなわち、150 μ M の 2-bromouridine で 24 時間処理した細胞 (細胞内 total RNA のラベリング) を用いて、2-bromouridine を除去した後の経時的な RNA 減少を元に RNA 分解を測定した。

以上の BRIC-seq と RIP-seq 解析ではヒト細胞株の HeLa 細胞を用いた。

次世代シーケンサー解析 (RNA-seq) による RNA 解析は illumina の HiSeq3000 を用いた。シーケンスライブラリーの調製は、illumina 社のスタンダードプロトコールに従った。

得られた次世代シーケンサーのデータは TopHat と Cufflinks を用いてデータ解析した。このデータ解析をもとに、RIP-seq による PUM 結合 RNA の同定と BRIC-seq による PUM によって分解される RNA の同定を行った。

RNA 分解速度の計算では、1 次反応式としてデータ解析を実施した。データ解析では、R パッケージを用いて計算した。計算時のオーバーフィッティングを避けるため、Akaike's Information Criterion (統計モデルの良さを評価するための指標として、汎用される) を導入した。

PUM の配列デザインは、PUM 結晶構造解析データをもとにデザインした。

4. 研究成果

RIP-seq と BRIC-seq を用いて、PUM による分解制御を受けるヒト遺伝子群を網羅的に同定した。RIP-seq では 3093 種類の mRNA が PUM と結合することが分かった。この結果から、PUM 結合モチーフのみを使って標的 RNA 選別を行うことは特異性の観点から問題のあることが判明した。一方、BRIC-seq 解析から 101 種類の mRNA が PUM ノックダウンによって安定化することがわかった。これら 2 種類のデータを

統合解析することによって、48 種類の RNA が野生型 PUM の分解制御を受けていることを明らかにした。興味深いことに、これら 48 種類の RNA はストレス応答に係る遺伝子が多く存在したことから、PUM の生理的役割がストレス応答に関係することが示唆された。

次に、GFP に連結した野生型 PUM と変異型 PUM をデザインし、現在、安定発現細胞株を樹立できた。クローニング時の困難があったため、当初予定よりクローニングに時間が必要であったが、最終的には予定の構造を持つプラスミドを構築することができた。

現在、樹立した細胞を使って期待通りの遺伝子発現のモニタリングが可能かを最終的に検証している段階である。この検証実験では、薬剤処理した細胞で高発現する mRNA をモデル RNA として検証している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ric.u-tokyo.ac.jp/akimitsu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
秋光 信佳 (AKIMITSU Noburoshi)
東京大学・アイソトープ総合センター・教授
研究者番号：40294962

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者

山田俊理 (YAMADA Toshimichi)
東京大学・アイソトープ総合センター・特任
研究員