

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04162

研究課題名(和文) 生細胞内RNA動態の包括的可視化分析技術の創発

研究課題名(英文) Development of comprehensive visualization techniques to monitor RNA dynamics in living cells

研究代表者

吉村 英哲 (Yoshimura, Hideaki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：90464205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では独自開発したRNA標識技術mPUMテクノロジーを用いて、生細胞内RNAを1分子レベルから1細胞レベル、短時間の動態から長時間の可視化解析までを実現する分子ツール群の開発を目指した。1分子レベル・短時間の動態観察では二分割緑色蛍光タンパク質を用いたプローブを作製し、テロメア反復配列含有RNA(TERRA)と染色体テロメア領域、テロメア関連タンパク質の同時1分子追跡を実現し、未知の機能モデル構築に至った。1細胞レベル・長時間RNA可視化検出プローブとしては、二分割発光タンパク質を用いたプローブを開発した。本プローブを用いて1細胞解像度で数10分間の アクチンmRNA可視化検出を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年様々な細胞生理機能について、RNAの動態や局在の直接関与が知られている。一方生細胞内RNAの動態・局在の可視化解析法は極めて限られていた。また、RNAは遺伝子発現の一次産物であり、生細胞内RNAの可視化定量法開発はすなわち非破壊的な遺伝子発現解析法の創出と言える。本研究では独自に構築したmPUMテクノロジーを用いて、1分子解像度での生細胞内RNA動態解析から、数10分間にわたる1細胞解像度RNA可視化定量法を構築した。すなわち本研究の成果により、生細胞内のRNA機能について1分子単位・秒単位の現象から細胞ごとに特徴が現れる長時間の遺伝子発現までを可視化解析する分析技術群の構築が実現した。

研究成果の概要(英文)：The target of this study is to develop a series of molecular probes to monitor RNA, from single molecule to single cell resolution, and from short to long observation time, using mPUM technology, which has been originally established in our group. As an RNA probe that covers single-molecule and short-time observation, I developed a split-GFP based probe that addresses monitoring telomere repeat-containing RNA (TERRA), and observed TERRA, telomeres, and telomere-repeated protein in living cells simultaneously at the single molecule level. For visualization of RNA in single-cell resolution and long time domain, I developed split luciferase-based RNA probe that targets beta-actin mRNA in living cells. Using this probe, beta-actin mRNA in living cells were observed for tens of minutes at single cell resolution.

研究分野：生体分析化学

キーワード：RNA 1分子計測(SMD) ナノバイオ イメージング 細胞 蛍光プローブ バイオイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

RNA はポストゲノム時代の主役の1つと言われ、様々な生化学的解析や、RNA-seq 法による網羅的解析などが進められている。その成果として、mRNA の細胞内局在による生理機能発現の促進・調節や機能性 RNA による遺伝子制御など、重要な生理現象への RNA の関与が明らかになりつつある。しかしその分子機構の多くは未解明である。その最大の原因は、RNA の生細胞内動態解析に用いる RNA プローブの性能が不十分であることにある。この現状が RNA 研究の進展にとって、大きな足かせになっていた。申請者は、RNA 結合タンパク質ドメイン PUM-HD と蛍光タンパク質を利用した生細胞内 RNA 可視化プローブを開発した。このプローブを高度な顕微鏡技術と融合することで、生細胞内の内在性 RNA の1分子追跡を世界で初めて実現した。本プローブは PUM-HD に目的 RNA と結合するよう変位を導入し、二分割蛍光タンパク質断片を付加した融合タンパク質である。そのプローブを発現した細胞の蛍光顕微鏡観察により、目的 RNA の1分子動態可視化分析に成功した。今後、RNA の生体機能への関与とその機構をより具体的かつ詳細に解明するためには、二種類の分析技術開発が求められる。1つはより高精度・長時間の1分子 RNA 動態解析。もう1つは多細胞・長期間の生体高次現象における RNA 局在・動態変化の追跡である。タンパク質を対象とする生命科学は、蛍光タンパク質を用いた生細胞内可視化法の開発によって発展した(ゆえに、下村博士による GFP の発見と利用法開発はノーベル賞に輝いた)。上記生細胞内 RNA 可視化法は、タンパク質研究における GFP 同様、RNA 研究を飛躍させる可能性を秘めている。

## 2. 研究の目的

本研究では申請者が培ってきた RNA 可視化技術を基に、飛躍的な性能向上および従来と異なる時空間単位での RNA 動態分析を実現する革新的な生細胞内 RNA 分析技術群を創発する。

### 研究1. 生細胞内 RNA 長時間1分子追跡法開発

RNA などの生細胞内分子は、機能発現時に関連タンパク質などの他分子と相互作用し、平均数秒から10秒前後にわたる一過的動態変化(拡散運動の停止など)を示す。研究1では従来の RNA プローブの蛍光安定性を向上させ、目的 RNA の一過的動態変化における継続時間や分子間相互作用の有無などの定量統計解析を実現する。また、その RNA 機能と関連するタンパク質との同時観察系を構築し、標的 RNA および関連タンパク質の相互作用や動態の影響について解析できるシステムを構築する。すなわち、目的 RNA が機能する瞬間の動態や分子間相互作用を検出解析することで RNA 機能発現機構を解明する基盤技術を創出する。

### 研究2. 生細胞集団内 RNA 長期間定量・局在追跡法の開発

初期発生・器官形成や神経回路形成などの生体高次機能発現は、数時間から数日間続く RNA の発現と細胞集団内分布の変化を伴う。研究2ではこれら生体高次機能発現についての RNA 機能の解析を目指し、細胞集団内の RNA 局在変化を数日間継続追跡できるプローブ開発を目的とする。開発したプローブを用いることで、高次機能発現時の RNA 発現・局在変化追跡を実現し、生体高次機能に対する RNA の関与機構解明に資する方法論を与える。

## 3. 研究の方法

研究1について、関連タンパク質との同時観察敬意を構築するため、1分子観察全反射蛍光顕微鏡の励起光路を分岐し、3色同時観察が可能な蛍光1分子顕微鏡システムを構築した。また、標的 RNA としてテロメア反復配列含有 RNA (TERRA) を対象として、その関連分子に蛍光標識を施したものを作製した。これらをヒト由来細胞株 U2OS 細胞に発現させ、3色同時1分子顕微鏡を用いて観察した。また、蛍光安定性を向上した RNA プローブとしては、従来用いてきた二分割蛍光タンパク質の再構成法に替わって有機色素を共有結合を介して修飾できる SNAPf タグの二分割断片を作製し、その再構成によって標的 RNA を標識する手法の開発を行った。

研究2については、単量体では蛍光性を示さないが二量体化することで蛍光性を示すようになる蛍光タンパク質 ddGFP を用いた蛍光プローブ開発を行った。二分割蛍光タンパク質角再構成と異なり ddGFP の二量体化は可逆であるため、標的 RNA の分解により蛍光を消失することが期待できる。すなわち、ddGFP を用いることで、より定量性と長時間追跡性の高い RNA 標識プローブの構築が期待できる。また、ddGFP に加えて可逆的に再構成反応を示す二分割蛍光タンパク質の再構成を利用した RNA プローブの開発も行った。

## 4. 研究成果

研究1について、予備研究として開発していた TERRA プローブに加え、テロメアマーカータンパク質 TRF1 に iRFP 修飾し蛍光標識を施したものを作製した。また、テロメア関連タンパク質として hnRNPA1、HP1、H2A を選び、それぞれに SNAP タグを融合したものを作製し

た。観察の際にはテトラメチルローダミン (TMR) を SNAP タグに修飾した。なお、これらテロメア関連他泊質について、hnRNPA1 は decoy model と呼ばれる機能モデル、HP1 は scaffold model と呼ばれる機能モデルにおいて TERRA との相互作用の可能性が指摘されているタンパク質である。また、H2A はこれまでの研究で TERRA との相互作用が報告されていないネガティブコントロールとなるタンパク質である。TERRA、TRF1、テロメア関連タンパク質の 3 種を U2OS 細胞に導入し、3 色同時 1 分子観察蛍光顕微鏡を用いて、これらの 1 分子動態を観察した。その結果、テロメア関連タンパク質の中で hnRNPA1 のみが TERRA と相互作用に基づく共同在を示すことを見出した。またその共同在を示す場所はテロメアから約 1 $\mu$ m 離れた場所で多く見られ、静止している TERRA に hnRNPA1 が拡散運動して衝突し共同在を示すことを見出した。この結果から、TERRA の作動機構について、1 分子動態解析からでしか得られない機能モデル「トラッピングモデル」を提唱するに至った。

また、より安定性の高い蛍光プローブの開発を目指して、この TERRA プローブの二分割 GFP 部分を二分割 SNAPf タグに替えたものを開発した。本プローブを培養細胞内に導入し、SNAPf タグを TMR で標識した後 4%パラホルムアルデヒドを用いて化学固定し、TERRA をオリゴ核酸プローブで標識した。このサンプルを蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、二分割 SNAPf タグプローブとオリゴ核酸プローブの局在は良く一致した。すなわち本プローブを用いて細胞内の TERRA を蛍光標識することを実現した。

研究 2 について、可逆的二量体形成タンパク質 ddGFP を用いたプローブを設計した。RNA 認識部位としては既の実績のあるマウス由来 アクチン mRNA の 3' UTR を標的とする 2 種類の mPUM2 を用いて設計した。本プローブが標的 RNA に結合すると ddGFP 部分が近接し二量体化することで蛍光性を示す。一方標的 RNA が消失するとプローブが互いに離れ、ddGFP が単量体に戻ることで蛍光性が消失する。本プローブの遺伝子を作製し、大腸菌発現系からプローブを単離精製した。得られたプローブ溶液にと標的配列を有する合成 RNA を添加し、その後 RNase を加える実験を行った。その結果、標的 RNA 存在下で蛍光が検出され、RNase 添加によりその蛍光は消失した。すなわち、本プローブは設計通り標的 RNA の存在に应答して蛍光を示し、その RNA が消失することにより蛍光を失う、標的 RNA に対する定量的な蛍光性を示した。また、ddGFP を用いたプローブに加え、退色の影響を受けずにより長時間にわたる RNA 検出が可能な、二分割ルシフェラーゼを用いた RNA 検出発光プローブを開発した。深海エビ由来ルシフェラーゼである NanoLuc の二分割断片をマウス由来 アクチン mRNA の 3' UTR を標的とする 2 種類の mPUM2 と融合したプローブを開発した。標的 RNA 存在下で NanoLuc 二分割断片が近接し再構成することで発光能を示す。この再構成反応は可逆であるため、標的 RNA の消失によりプローブが互いに離れ発光能は消失する。大腸菌発現系からプローブ分子を単離精製し、得られたプローブ溶液に標的 RNA を添加、さらに RNase を加える実験を行った。その結果標的 RNA 添加により発光値が上昇し、RNase 添加により発光が消失した。すなわち、二分割 NanoLuc 由来プローブも設計通りの RNA 検出能を示した。また、本プローブをマウス由来 NIH3T3 細胞およびヒト由来細胞 HEK293 細胞に導入し、細胞サンプルにおける発光値測定を行った。その結果標的 RNA を発現している NIH3T3 細胞では発光が検出されたのに対し、HEK293 細胞では発光が検出されなかった。この結果は、本プローブが標的 RNA を選択的に標識して発光を示していることを強く示唆している。以上のように、研究 2 では標的 RNA に対して定量的なある蛍光・発光プローブ開発を行い、試験管内および細胞内で標的 RNA をに対して定量的に应答するプローブを構築した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa	4. 巻 1649
2. 論文標題 Real-time fluorescence imaging of single-molecule endogenous non-coding RNA in living cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 337-347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-7213-5_22.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hideaki Yoshimura	4. 巻 57
2. 論文標題 Live Cell Imaging of Endogenous RNAs Using Pumilio Homology Domain Mutants: Principles and Applications.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 200-208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.7b00983.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Toshimichi, Yoshimura Hideaki, Shimada Rintaro, Hattori Mitsuru, Eguchi Masatoshi, Fujiwara Takahiro K., Kusumi Akihiro, Ozawa Takeaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Spatiotemporal analysis with a genetically encoded fluorescent RNA probe reveals TERRA function around telomeres	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 38910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep38910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimura H., Ozawa T.	4. 巻 572
2. 論文標題 Monitoring of RNA Dynamics in Living Cells Using PUM-HD and Fluorescent Protein Reconstitution Technique	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 65 ~ 85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2016.03.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takenouchi Osamu, Yoshimura Hideaki, Ozawa Takeaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Unique Roles of $\beta$ -Arrestin in GPCR Trafficking Revealed by Photoinducible Dimerizers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-19130-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura
2. 発表標題 Simultaneous single molecule observation of telomeric-repeat containing RNA and proteins in living cells
3. 学会等名 CMCB2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Rintaro Shimada, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Visualization of Single-Molecule Motion of a Non-Coding RNA in Living Cells.
3. 学会等名 Focus on Microscopy 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Rintaro Simada, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Telomeric-repeat containing RNA captures hnRNP1 around telomeres in living cells: a single molecule imaging study.
3. 学会等名 内藤コンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉村 英哲、山田 俊理、児島 友哉、島田 林太郎、小澤 岳昌
2. 発表標題 RNA結合タンパク質PUM-HDを用いた生細胞内RNA可視化分析法
3. 学会等名 分析化学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Rintaro Simada, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Dynamics and localization of a non-coding RNA TERRA in living cells revealed by single molecule imaging
3. 学会等名 生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 A TECHNOLOGY FOR RNA LABELING IN LIVING CELLS TO MONITOR SINGLE-MOLECULE DYNAMICS UNDER FLUORESCENCE MICROSCOPY
3. 学会等名 Focus on Microscopy 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura
2. 発表標題 Simultaneous single molecule observation of telomeric-repeat containing RNA and proteins in living cells
3. 学会等名 CMCB2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura
2. 発表標題 Simultaneous single molecule imaging of non-coding RNA and proteins in living cells
3. 学会等名 AnalytiX 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura
2. 発表標題 Single molecule imaging in living cells to reveal the relationship between motions and functions of biological molecules
3. 学会等名 10th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura
2. 発表標題 Single molecule imaging approach to reveal molecular motions and functions in cellular events
3. 学会等名 1st Nano/Bioscience International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura
2. 発表標題 Analysis of distribution and motion of a non-coding RNA in living cells using a single molecule tracking approach
3. 学会等名 The 5th Serendipiter seminar (招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宇理須 恒雄、佐久間 哲史、高田 望、竹中 繁織、小澤 岳昌、吉村 英哲、胡桃坂 仁志、越阪部 晃永、 原田 昌彦、東田 裕一、宮成 悠介、塩見 美喜子、大西 遼	4. 発行年 2017年
2. 出版社 近代科学社	5. 総ページ数 232
3. 書名 ナノバイオ・メディシン	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----