

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19313

研究課題名（和文）イメージングとRNA-seqをシームレスにつなぐ光誘導性リボソーム標識技術の開発

研究課題名（英文）Platform for light-inducible, biochemical labeling of ribosomes in living single cells for the novel single-cell analytics based on seamlessly connected live cell imaging and transcriptomics

研究代表者

小松 直貴（Komatsu, Naoki）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：30737440

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：生細胞イメージング技術により特定した任意の細胞について、細胞剥離操作を介さずに遺伝子発現解析を行う方法論の開発を目指し、そのための要素技術開発を行った。具体的には、光照射により活性化し、細胞内タンパク質をビオチン化修飾するというビオチン化酵素改変体の開発に取り組んだ。候補分子の機能解析の結果、光照射前におけるビオチン化のバックグラウンドが高いことが判明した。そこでバックグラウンドを下げるために、異なる動作原理に基づく候補分子の設計と遺伝子構築を行った。候補分子の機能解析と最適化を引き続き進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞からなる組織や細胞集団の性質に関する理解を更に進めていくにあたり、細胞内のmRNAやタンパク質を1細胞レベルかつ網羅的に解析する手法の高度化・多岐化が求められている。生細胞を標識するための、光と化学修飾を組み合わせた新たな手法について、本研究の実施によりその開発基盤を構築することができた。開発を今後進めることにより、多細胞集団を1細胞解析するための新たな手法が構築されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We tried to develop a technical element that would contribute the development of new methodologies that enable gene expression analysis for any cells identified by fluorescence live cell imaging while circumventing the need for a cell detachment process. In particular, we tried to develop a light-activated biotinyltransferase that can be activated by light illumination and chemically modify intracellular protein by biotinylation only in cells illuminated. We noticed that tested candidate molecules showed high background of biotinylation before light illumination. To lower the background, we designed other candidate molecules based on different working principles and constructed expression plasmids for the designed molecules. Further characterization and optimization of the candidate molecules will be performed in future.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ビオチン化 光操作

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

組織や癌細胞は性質が異なる多様な細胞から成る細胞集団であり、個々の細胞の相互作用により集団全体の挙動が規定される。このように高度に動的かつ可塑的な細胞集団の特性を理解するためには、1細胞解析の手法が有効である。近年の1細胞シーケンシングの発展により、多数の“個々の”細胞における遺伝子発現を網羅的に解析できるようになった。一方、ライブセルイメージングの発展により、生きた個々の細胞における遺伝子発現やシグナル伝達、細胞周期等の時間変化、および細胞間の位置情報について計測できるようになってきている。今後、細胞集団の特性に関する理解を更に推し進めていくにあたり、個々の細胞が遺伝子発現解析に至るまでの時空間履歴も考慮した、新たな1細胞解析技術の開発およびその活用が望まれている。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、ライブセルイメージングで得られる時空間情報と次世代シーケンシングで得られる網羅的な遺伝子発現情報を1細胞単位で紐づける技術の基礎となる解析手法を開発することを目標とした。この目標を達成するために、二つの目的を設定した。すなわち、ライブセルイメージングで注目した特定の1個から数個の細胞について、光により細胞および細胞内 mRNA を標識する手法の開発を第一の目的とした。更に、開発した新規手法を用いることで注目した細胞から mRNA を回収できること、および、アーティファクトが多いにも関わらず代替手法に乏しいために現在頻用されている細胞剥離操作を回避して注目細胞から mRNA 回収が可能であることの実証を第二の目的とした。

### 3. 研究の方法

上述の研究目的を達成するために、狙った1細胞に含まれる mRNA を光学的かつ化学的に修飾、回収するための技術の開発に取り組んだ。具体的には、タンパク質ビオチン化酵素と光により構造変化する蛍光タンパク質または光感受性タンパク質を組み合わせることで、光により不活性化状態から活性化状態へと変化するビオチン化酵素(以下、光ビオチン化酵素)を開発することとした。さらに光ビオチン化酵素および mRNA 結合タンパク質を用いることで、任意の細胞で任意のタイミングで細胞内 mRNA を標識し、標識された mRNA を選択的に回収する方法を開発することとした。

### 4. 研究成果

#### ・不可逆的に活性化する光ビオチン化酵素の開発

大腸菌由来ビオチンリガーゼ birA と光変換蛍光タンパク質の一種である、PhoCl を組み合わせ、birA の活性化を光により不可逆的に誘導する系の構築を試みた。birA の全長について、その N 末端側と C 末端側の両方に PhoCl とケージング分子として利用されている分子である ERT2 をタンデムに付加した融合タンパク質を遺伝子工学的に構築した。PhoCl は 405 nm の光により光開裂するタンパク質であり、ERT2 は自己阻害ドメインとして機能する。すなわち光を照射する前は birA が PhoCl-ERT2 によりケージされており(不活性化されており)、光照射によりケージが外れて birA が不可逆的に活性化することを期待した。構築した光ビオチン化酵素ならびに、リボソーム構成因子かつ mRNA 結合タンパク質の一つである、RPL10A に被ビオチン化配列である Avitag を付加した Avi-RPL10A を光ビオチン化酵素の基質として培養細胞に発現させ、405 nm 光照射を行った。光照射無し有りの群でウェスタンブロッティングにより Avi-RPL10A のビオチン化状態を検討したところ、期待に反して、光照射無しの場合にも関わらず Avi-RPL10A の大部分がビオチン化されているという結果を得た。すなわち birA のケージングが不十分であることが示唆された。次にケージング分子として PhoCl の代わりに 490 nm と 405 nm の光により可逆的に二量体化および単量体化する蛍光タンパク質 pdDronpa を birA と融合させたタンパク質も構築し、先述の酵素同様に解析を行ったが、やはり光照射無しでも基質のビオチン化が起きており、birA のケージングが不十分であることが示唆された。

#### ・可逆的に活性化する光ビオチン化酵素の開発

上述の検討結果を踏まえ、次に birA のケージング以外の動作原理により、ビオチン化活性を回復する系の構築を試みた。具体的には、ビオチン化酵素の高活性型変異体の一つで、近接するタンパク質を非選択的にビオチン化する性質をもつ TurboID について、TurboID タンパク質の立体構造のうちループ構造に該当するアミノ酸の位置にて、タンパク質を N 末端側と C 末端側の 2 つに分割し、分割した各断片を光依存的にヘテロ 2 量体化するタンパク質ペアである iLiD/sspB にそれぞれ連結した分子を設計した。設計した分子の発現プラスミドの構築は完了しており、今後、光依存的にタンパク質ビオチン化を誘導できるか、検討を進める予定である。

#### ・リボソーム構成因子 RPL10A を用いた mRNA 回収の検討

光ビオチン化酵素を利用した細胞内 mRNA の標識および回収を目指し、光ビオチン化酵素の開

発と並行して、細胞内 mRNA の回収法について検討した。真核生物のリボソームの構成因子である RPL10A は mRNA 結合能を有する。RPL10A に被ビオチン化タグ配列を付加して細胞内に発現させることで、光照射によりビオチン化された RPL10A(およびそれを取り込んだリボソーム)を細胞溶解液から生化学的に回収し、そこから結合している mRNA を回収するという解析スキームを設計した。予備検討により被ビオチン化タグ配列を付加した RPL10A が内在性のリボソームに取り込まれることを確認した。一方で、研究開始後に複数の海外グループから RPL10A と結合する mRNA には選択性があることが報告され、RPL10A を用いた mRNA 回収は回収できる mRNA の種類の網羅性については課題があることが判明した。また別の検討により 1 から数細胞由来の mRNA を回収するには回収効率が必ずしも十分ではない可能性が判明した。

ビオチン化酵素の一種である TurboID は被ビオチン化タグ配列だけでなく、近接するタンパク質を非選択的にビオチン化する性質を持つ。そこで、RPL10A を介した mRNA 回収法とは別に、TurboID を用いた光ビオチン化酵素を用いることで、光照射した細胞に含まれるタンパク質を非選択的に化学標識し、それを質量分析するというスキームに変更した。今後は光ビオチン化酵素の開発を先行し、開発が進み次第、ビオチン化タンパク質の回収解析法について検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Toru Hiratsuka and Naoki Komatsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Single-Cell Live Imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Single Cell Methods	6. 最初と最後の頁 409-421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-9240-9	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Naoki Komatsu, Sakaue-Sawano Asako, Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Unraveling mTORC1 activity dynamics and its biological roles in cell cycle progression
3. 学会等名 ResonanceBio International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Komatsu, Sakaue-Sawano Asako, Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Unraveling mTORC1 activity dynamics and its biological roles in cell cycle progression
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松 直貴
2. 発表標題 mTORC1活性動態の細胞周期進行における生物学的意義の解明
3. 学会等名 多次元細胞計測ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松 直貴
2. 発表標題 癌細胞増殖シグナルのライブイメージング
3. 学会等名 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理XI」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松 直貴
2. 発表標題 mTORC1活性動態の細胞周期進行における生物学的意義の解明
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松 直貴、宮脇 敦史
2. 発表標題 細胞周期依存的なmTORC1活性波の可視化
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------