

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02745

研究課題名（和文）RNA可視化法と発光イメージング法に基づく生細胞遺伝子発現時空間解析法の創出

研究課題名（英文）Development of a method for spatio-temporal analysis of gene expression based on RNA visualization and bioluminescence imaging techniques

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） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では任意のRNAを細胞内で標識し、生物発光を利用して可視化検出する生物発光RNAプローブの開発を行った。開発したプローブの機能を溶液内で評価したところ、標的RNAの添加とともに発光が上昇し、RNaseの添加により標的RNAが分解すると速やかに発光が減少した。このプローブをホ乳類培養細胞に適用し生物発光顕微鏡で観察を行うと、細胞の外部刺激を受けた応答にともないRNAの局在変化が生物発光により観察された。これらの結果から、本研究では生細胞内RNAを標的とした生物発光プローブの開発を行い、細胞内での内在性RNAの局在変化の可視化追跡を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、開発したプローブは生細胞内において標的とする内在性RNAの細胞現象に伴う局在変化を可視化追跡可能な性能を有することが示された。本プローブの特徴として、標的とするRNAの配列に応じて、そのRNAを標的とするようにカスタムメイドにデザインできることがある。すなわち、本プローブの原理を用いて様々なRNAを標的として生細胞内で局在変化を経時観察できるようになる。またRNAは遺伝子発現産物であり、各種網羅的解析により同定されたRNAが標的とする生理機能の発現過程において示す動態解析にも応用可能である。

研究成果の概要（英文）：The present research aims to develop an RNA probe using bioluminescence to monitor time-course localization alteration of the endogenous target RNA in living cells. In an experiment of the probe solution, the probe quickly responds to the addition and degradation of the target RNA reversibly. Then, the probe expression plasmid was induced into living mammalian cells, and bioluminescence imaging of the cells was observed. In this observation, the target RNA, beta-actin mRNA, formed granule-like structures in the cells, to which growth factor stimulation was administered. The granule-like structures were then concentrated in the expanding cell edge region in response to the administrated stimulation. These results demonstrated the performance of the present probe in monitoring the RNA localization alteration accompanied by cellular physiological events.

研究分野：分析化学

キーワード：バイオイメージング 生物発光 RNA 細胞 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

発生、分化、リプログラミングなどの生体高次機能や、ガン、神経変性疾患などの疾病は、まず少数の細胞に変化が生じ、その変化した細胞が増殖するまたは周辺細胞へと伝搬することで最終的に組織全体など多数細胞の統合的な変化や腫瘍の形成などマクロスコピックな変化を生む。近年 RNAseq 法など遺伝子解析技術の発展により、これら生体機能や疾患と相関がある遺伝子の網羅的解析による同定が進んでいる。しかし同定された遺伝子がこれら生理機能や疾患の発現過程においてどのような役割を果たしているか、また同定された遺伝子発現と対象の生理機能・疾患の発現との因果律の解明は行われていない。この役割や因果律を解明するには、その生理機能や疾患が発現する前段階から標的遺伝子の定量追跡を行う必要がある。また、発生や文化などではいくつかの RNA の細胞内局在が重要な役割を担っていると報告されている。このような標的遺伝子の定量追跡や細胞内局在解析を行うには、従来の破壊検査法による RNAseq と異なる、ライブサンプルを対象とした長時間 1 細胞 RNA 可視化定量法が必要となる。

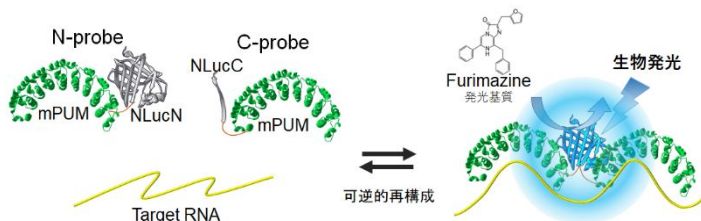
2. 研究の目的

本研究では、標的遺伝子発現の発現量および発現産物 (RNA) の細胞内局在の時間推移がどのような条件を満たしたときに、研究対象とする細胞生理現象が発現するのか、という問いに答えを出すための基盤技術を創出することを目指した。具体的には生細胞に対する 1 細胞サイズより高解像度な RNA 長時間追跡法の開発を目標とする。

3. 研究の方法

上記研究目的にある生細胞内での長時間にわたる RNA の可視化解析を実現するため、本研究では生物発光を利用した RNA プロブの開発を行った。

プロブは以下の通り設計した。まず標的 RNA 配列内で互いに近接した 2 箇所の認識部位候補を決定し、そこに結合する 2 種類の選択的 RNA 結合タンパク質 mPUM を設計作成した。この 2 つの mPUM に二分割ルシフェラーゼ断片をそれぞれ融合した。2 つの mPUM が標的 RNA に結合すると、二分割ルシフェラーゼ断片が近接・再構成し、発光能を示す。ルシフェラーゼとしては、サイズが小さく高輝度な NanoLuc を採用した。この再構成反応は可逆であるため、RNA が分解などで消失するとプロブ分子は互いに離れ発光能は消失する。本プロブを導入した生細胞を蛍光顕微鏡でライブ観察することで、遺伝子発現量および発現産物の細胞内局在を可視化定量できる。ルシフェラーゼとしては発光強度が高い青色発光タンパク質 NanoLuc を採用した。このプロブの原理実証のための標的 RNA として、これまでに局在などについての情報が得られているマウス *-actin* mRNA を採用した。



このプロブを大腸菌大量発現系を用いて単離生成したものをを用いてプロブ性能の評価を行った。また、生細胞内での標的 RNA 検出能を評価するため、生物発光顕微鏡を用いて本プロブを発現した細胞の可視化解析を行った。

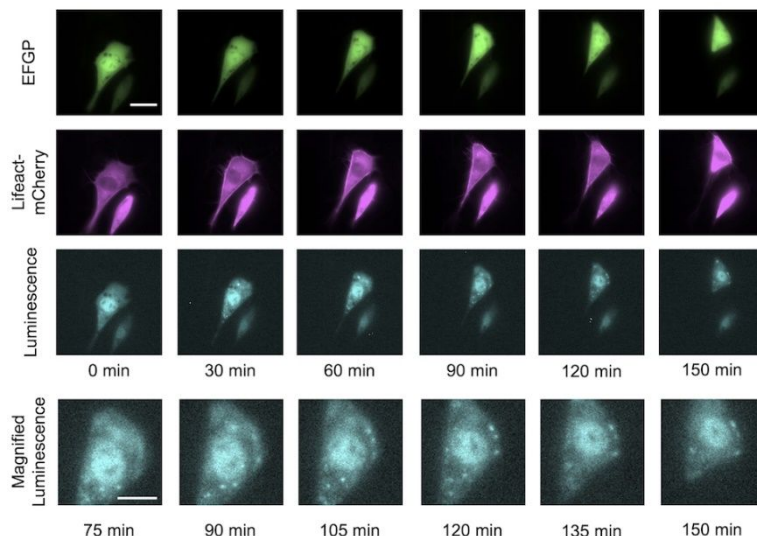
4. 研究成果

開発したプロブの遺伝子を大腸菌発現用プラスミドに組み込み、大腸菌 BL21 株を用いて大量発現した。得られたプロブタンパク質をカラムクロマトグラフィーを用いて単離精製した。得られた精製プロブ溶液に *-actin* mRNA の標的配列部分を含む合成 RNA を添加し、プレートリーダーを用いて発光測定を行った。その結果、発光値は RNA 添加前 3 倍程度に増大した。また RNA と同時に RNase も添加したところ、発光値はプロブのみの場合と同等となった。この結果から、本プロブは標的 RNA の存在に反応して発光することが示された。次に、プロブ溶液に異なる濃度の標的 RNA を添加し、発光強度を測定した。その結果、発光値は標的 RNA 濃度 1 nM 以下の時点から増大し、10 nM 付近でおおむね一定値に達した。すなわちプロブそのものの性質として、1 nM 程度のごく微量の細胞内標的 RNA の増減を検出できるだけの性能を有していることが示唆された。次に、プロブによる RNA 増減の経時変化を調べるために本プロブ溶液に RNA を添加し、その後 RNase を添加した際の発光強度変化について経時追跡を行った。その結果、RNA 添加後約 400 秒でおおむね一定値に達するように発光値は上昇した。そこに RNase を添加すると、添加後から約 100 秒程度で発光値は RNA 添加前とほぼ同等の強度まで下がった。この結果

から、発光値は RNA の増減に対して可逆的かつ速やかに応答することが示された。以上の結果から、本プローブは細胞内標的 RNA の検出および存在量変化の追跡を実現するために検出感度・反応速度の両面から十分な性能を有していることが示唆された。

続いて本プローブの生細胞における RNA 可視化検出実験を行った。本プローブの哺乳類細胞用発現プラスミドをマウス由来線維芽細胞株 NIH3T3 細胞に導入し、生物発光顕微鏡で観察を行った。その結果、プローブを発現した細胞からは生物発光が生じ、数 10 分間にわたる発光像が取得できた。一方標的 RNA を発現しないヒト由来細胞株 HEK293T 細胞では発光は検出できなかった。この結果から、開発したプローブは生物発光顕微鏡下において、標的 RNA を 1 細胞感度・解像度で可視化追跡できる性能を有することが示された。次に本プローブの生細胞イメージングでの定量性を評価するため、赤色蛍光タンパク質 mCherry の遺伝子に標的 RNA 配列を融合した遺伝子の発現プラスミドを作成した。この発現プラスミドを用いることで、mCherry mRNA と標的 RNA とが単一細胞内で同数産生されるため、mCherry の蛍光強度が標的 RNA 発現量のインジケータとして機能する。この発現プラスミドを HEK293 細胞に導入し、生物発光顕微鏡を用いて NLuc の青色発光と mCherry の赤色蛍光を同一試料で観察した。観察の結果、個々の細胞におけるプローブ由来の生物発光強度と mCherry 由来の蛍光強度に正の相関が見られた（相関係数 0.71）。この結果から、本プローブは生細胞内において 1 細胞ごとに標的遺伝子の多寡を定量できる性能があると示唆された。

開発したプローブを用いた細胞生理現象の観察における原理実証として、生細胞内で内在性の標的 RNA の経時的局在変化観察を試みた。標的 RNA であるマウス β -actin mRNA を発現している NIH3T3 細胞を試料として選び、血小板由来成長因子 (PDGF) 刺激導入により生じる細胞の変形や遊走過程と同時に起こる β -actin mRNA の細胞内輸送及び局在変化を生物発光顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。標的 mRNA 以外にアクチンタンパク質および細胞形状を同時に観察するため、本プローブに加え、アクチン骨格プローブとして Lifeact-mCherry、細胞形状マーカー (ボリュウムマーカー) として GFP を同時に発現させ、生物発光・蛍光観察を行った。成長因子を培地に添加すると細胞は仮足を形成し伸展した。その細胞形状変化にともない、細胞内では生物発光を示す顆粒状の構造が複数生成した。その顆粒は細胞遊走にともない伸展する膜状仮足部に局在した。ボリュウムマーカーである GFP は顆粒構造には集合しなかったため、この顆粒はタンパク質や RNA が非特異に凝集した構造では無い。成長因子刺激により β -actin mRNA を含むストレス顆粒が形成することや β -actin mRNA が細胞遊走時に形成する仮足部に局在することは報告されている。これらのことから、外部刺激に応答した細胞内における内在性 β -actin mRNA の局在変化が本プローブを用いて観察可能であることが示された。



最後に、本プローブを用いて神経細胞における RNA 局在可視化観察を行った。プローブの発現プラスミドをマウス胎児海馬由来初代培養神経細胞にリポフェクションにより導入した。細胞にはプローブに加えて Lifeact-mCherry およびボリュウムマーカーとしての GFP も同時に発現させた。得られた細胞を生物発光顕微鏡を用いて観察したところ、 β -actin mRNA は神経軸索や樹状突起上で不均一に存在している様子が見られた。この局在は β -actin タンパク質の局在とは一致していなかった。この結果は、軸索上においてタンパク質合成を行うスポットが存在し、そこで合成されたタンパク質が輸送されスプラインなどの形成に寄与するという既報の見解と一致する。以上の結果から、本プローブは神経細胞内において β -actin mRNA を可視化検出し、その細胞内局在について解析できる性能を有することが実証された。

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 Mizui Yuki, Eguchi Masatoshi, Tanaka Masanobu, Ikeda Yuma, Yoshimura Hideaki, Ozawa Takeaki, Citterio Daniel, Hiruta Yuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Long-term single cell bioluminescence imaging with C-3 position protected coelenterazine analogues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 579 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D00B02020F	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 Watabe Masaki, Yoshimura Hideaki, Arjunan Satya N. V., Kaizu Kazunari, Takahashi Koichi	4. 巻 102
2. 論文標題 Signaling activations through G-protein-coupled-receptor aggregations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Review E	6. 最初と最後の頁 32413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1103/PhysRevE.102.032413	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 Nishiguchi Tomoki, Yoshimura Hideaki, Kasai Rinshi S., Fujiwara Takahiro K., Ozawa Takeaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Synergetic Roles of Formyl Peptide Receptor 1 Oligomerization in Ligand-Induced Signal Transduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2577 ~ 2587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c00631	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 Mizui Yuki, Eguchi Masatoshi, Tanaka Masanobu, Ikeda Yuma, Yoshimura Hideaki, Ozawa Takeaki, Citterio Daniel, Hiruta Yuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Long-term single cell bioluminescence imaging with C-3 position protected coelenterazine analogues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 579 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ob02020f	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 Orioka Mariko, Eguchi Masatoshi, Mizui Yuki, Ikeda Yuma, Sakama Akihiro, Li Qiaojing, Yoshimura Hideaki, Ozawa Takeaki, Citterio Daniel, Hiruta Yuki	4. 巻 33
2. 論文標題 A Series of Furimazine Derivatives for Sustained Live-Cell Bioluminescence Imaging and Application to the Monitoring of Myogenesis at the Single-Cell Level	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 496 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.2c00035	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6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 吉村英哲
2. 発表標題 生命の仕組みを解明する蛍光分析 - 生きたままの細胞を対象に -
3. 学会等名 光とレーザーの科学技術フェア2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura
2. 発表標題 The roles of receptor oligomerization for signal transduction - A study through single-molecule live-cell imaging-
3. 学会等名 13th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村英哲
2. 発表標題 分子動態からメカニズムを探る - 生細胞1分子イメージングを用いたアプローチ -
3. 学会等名 第11回光塾 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村英哲
2. 発表標題 生細胞RNAイメージング技術とその可能性
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村英哲
2. 発表標題 生細胞1分子イメージングで見るRNAの動態と作動機構
3. 学会等名 第4回 形態解析ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura
2. 発表標題 Analysis of molecular motility in living cells for understanding mechanisms of living system through single-molecule imaging
3. 学会等名 15th International Symposium on Nanomedicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 永井 健治、小澤 岳昌	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 223
3. 書名 発光イメージング実験ガイド プロトコール編 II-4 「二分割ルシフェラーゼ再構成法による発光プローブ」	

1. 著者名 Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 12
3. 書名 Springer Series in Chemical Physics, "Progress in Photon Science"	

〔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
---------	---------