

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22519

研究課題名（和文）RNA高次立体構造の生物学的意義の解明と疾患への応用

研究課題名（英文）Unraveling biological significance of RNA higher-order structure

研究代表者

有吉 哲郎（Ariyoshi, Tetsuro）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・客員研究員

研究者番号：00782103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において研究担当者は蛍光RNA “Romanesco” を用いてタンパク質によるRNAのグアニン四重鎖構造制御を明らかにした。  
まず293T細胞、iPS細胞を用いたスクリーニング系を開発しグアニン四重鎖解消酵素(G4-resolvase)の発現量に依りてRomanescoの蛍光強度が減弱することを見出した。さらに次世代型共焦点顕微鏡AiryScanを用いることで感度良く蛍光イメージング可能であることを見出した。G4-resolvaseの候補タンパク質に対するスクリーニングを実行したところいくつかのタンパク質は実際に細胞内でG4-resolvase活性を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA立体構造を細胞内で制御するタンパク質の同定により、RNA立体構造の異常に起因すると考えられている疾患の新たな治療法開発の道を開いた。

研究成果の概要（英文）：In this study the person in charge revealed the regulation of RNA higher-order structure by proteins.

First the person in charge developed the screening system for RNA higher-order structure regulating proteins in 293T cells and iPS cells. Then by utilizing AiryScan confocal microscope and fluorescent RNA "Romanesco" the person in charge revealed RNA higher-order structure regulating proteins-dependent fluorescence decrease. By screening some candidate RNA higher-order structure regulating proteins the person in charge successfully revealed that some proteins possess the ability to regulate RNA higher-order structure in cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA 蛍光RNA RNA高次立体構造

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ある種の RNA はグアニン四重鎖 (G4) という特殊な構造を形成すること、G4 の形成・解消がタンパク質による制御を受けることが知られている。G4 の過剰な形成は脆弱 X 症候群、ALS などの疾患に関与すると考えられているが、技術的限界から G4 解消タンパク質の同定には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が独自に開発した「G4 形成依存的に光る RNA」を用い、G4 解消タンパク質を網羅的に同定する。さらに同定された G4 解消タンパク質の標的遺伝子を決定し、G4 を介した遺伝子発現制御機構を明らかにする

### 3. 研究の方法

ドキシサイクリンの添加依存的に Romanesco を発現させる HEK293T 細胞株、iPS 細胞株を樹立した。また、レンチウイルスを用いて miRNA を発現させることでノックダウンを実行する手法を採用した。蛍光 RNA イメージングに用いる顕微鏡法を比較検討し、AiryScan を用いた蛍光 RNA イメージングが最も感度良く蛍光イメージング可能であったためこれを採用した。Romanesco の過剰発現においてはアデノ随伴ウイルスを用いた発現を用いた。

### 4. 研究成果

まずグアニン四重鎖制御タンパク質を網羅的にスクリーニングする系の開発を実行した。スクリーニングには研究担当者がこれまでに開発した蛍光 RNA “Romanesco” を用いた。探索するグアニン四重鎖制御タンパク質が Romanesco の構造を変化させることで、その蛍光強度が変化することを用いてスクリーニングするという着想である。原理検証実験として、グアニン四重鎖解消酵素 (G4-resolvase) の候補として *in vitro* での先行研究から提唱されている RNA 結合タンパク質 4 種を用いて、過剰発現により Romanesco の蛍光強度が減弱するかを確認した。ヒト由来の HEK293T 細胞を用いた検証実験の結果、検討した 4 種の候補タンパク質のうち 2 種で過剰発現により Romanesco の蛍光強度が低下した。この結果から、Romanesco を用いた G4-resolvase 探索の有効性が検証できたと同時に、従来の *in vitro* での探索手法では細胞内で実際に活性を持つ G4-resolvase の同定が困難であることが確認された。

多くの遺伝子発現調節タンパク質は、複数のサブユニットから構成される多量体構造を持つため、単独遺伝子の過剰発現でのスクリーニングには適さない。そこで、本研究計画では遺伝子網羅的なノックダウンスクリーニングによる探索を行う。その準備として、Romanesco 発現細胞において、miRNA 及び CRISPRi システムの比較検討を行い、miRNA を用いたスクリーニングを実施した。

次に薬剤添加依存的に Romanesco を発現させる ES 細胞及び iPS 細胞株の樹立を行った。複数の安定発現株樹立法を比較し条件検討を行った結果、PiggyBac というトランスポゾンを用いた安定発現株樹立法が ES、iPS 細胞では最も効率が良いことを見出した。結果、ドキシサイクリンの添加依存的に Romanesco を発現させる株の樹立に成功した。

また、遺伝子発現抑制法の条件検討を行った。複数の遺伝子ノックアウト、ノックダウン法を比較検討した結果、レンチウイルスを用いて miRNA を発現させることでノックダウンを実行する方法が最も効率が良いことを見出した。

加えて蛍光 RNA イメージングに用いる顕微鏡法の比較検討を行った。STED, Airyscan, Spinning Disc 共焦点顕微鏡法による蛍光 RNA イメージングを比較した結果、AiryScan を用いた蛍光 RNA イメージングが最も感度良く蛍光イメージング可能であることを見出した。

また、ES 細胞や iPS 細胞など多能性幹細胞における G4 形成タンパク質の同定にトラブルが生じた場合に備え、その他の細胞種におけるスクリーニングの準備を進めた。具体的には、HEK293T 細胞、DT40 細胞において Romanesco を安定発現する株の樹立を行った。さらにマウス初代培養神経細胞において Romanesco を発現させる手法を検討し、アデノ随伴ウイルスを用いた発現が最も適していることを見出した。

最後に薬剤添加依存的に Romanesco を発現させる ES 細胞及び iPS 細胞株を用いてグアニン四重鎖形成を制御するタンパク質の同定を行った。*in vitro* での先行研究から提唱されている RNA 結合タンパク質を過剰発現させた後にドキシサイクリンの添加によって Romanesco の発現を誘導し、Airyscan を用いた高感度な蛍光観察によって候補タンパク質の発現依存的なグアニン四重鎖形成の阻害を観察した。また、Romanesco の安定発現株にレンチウイルスを用いて miRNA を発現させることで RNA 結合タンパク質をノックダウンし、Romanesco 蛍光強度の減衰を指標としたグアニン四重鎖形成の阻害を見積もった。

上記の実験から、既存の RNA 結合タンパク質のうちいくつかはグアニン四重鎖形成を阻害する活性を持つことが示唆されたと同時に、in vitro 実験での探索からグアニン四重鎖形成の阻害活性が示唆されていたタンパク質の一部は in vivo においてはグアニン四重鎖形成の阻害活性を持たないことが示唆された。

さらに、一部のタンパク質は分化後の HEK293 細胞では活性を示したが未文化の ES 及び iPS 細胞においては活性を示さなかった。このことは分化前と分化後で異なる RNA の立体構造制御機構が存在している可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 有吉哲郎、岡田康志
2. 発表標題 Imaging endogenous mRNA expression dynamics with a bright fluorogenic RNA
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会第71回日本細胞生物学会年会合同年次大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 有吉哲郎、岡田康志
2. 発表標題 Imaging transcriptional dynamics of the endogenous gene with a bright fluorogenic RNA
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Tetsuro Ariyoshi, Yasushi Okada
2. 発表標題 Imaging Endogenous Messenger RNA Expression Dynamics with an RNA Counterpart of a GFP.
3. 学会等名 2019 ASCB (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020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
---------	---------