

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15395

研究課題名(和文) RNA認識モジュールを利用した転写物発光検出プローブの開発

研究課題名(英文) Development of luminescence indicator of transcript abundance using RNA recognition module

研究代表者

河村 玄気 (Kawamura, Genki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：10852791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新たな原理により任意の転写物の細胞内存在量を発光により検出するプローブの開発を試みた。そのため、RNA切断酵素Cas13およびルシフェラーゼを用い、転写物認識に伴う構造変化をルシフェラーゼの発光能変化へと変換するプローブを構築した。構築したプローブを発現した細胞に対し転写物量に摂動を加えたところ、プローブの発光値に変化が見られた。さらに、このプローブの特性を活かしてスプライシング変異体選択的な転写物量変化の検出を試みた。結果、スプライシング産物量の割合を人為的に摂動した場合に発光量変化が生じた。これらの結果は、開発したプローブが転写物選択的な検出を可能にすることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、既存の手法とは異なる原理に基づいて細胞内転写物量の経時変化を測定する技術を開発した。近年では次世代シーケンスなどによる大規模な転写物関連のデータが蓄積されており、特定の転写物の時空間的動態を調べるニーズが高まっている。開発したプローブは比較的容易に標的転写物を変更できること、また、実際の転写物量変化に対する時間的な遅延が小さいこと、などの特徴を持つ。これらの特徴は様々な転写物の動態を解析する際に有益であるため、転写物の動態解析において新たな選択肢となる技術として確立することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, an attempt to develop a probe that detects the intracellular abundance of target transcript based on a new measurement principle using luciferase. To this end, we constructed a probe that converts the structural changes associated with transcript recognition into changes in the luminescent activity of luciferase, using the RNA-cleaving enzyme Cas13 and luciferase. When perturbation of transcript levels was applied to cells expressing the developed probe, changes in the luminescence values were observed. Furthermore, we attempted to detect splicing variant-specific transcript levels using this probe. As a result, the probe showed a fluctuation in luminescence intensity when the splicing product ratio was artificially perturbed. These results indicate that the developed probe is capable of transcript-selective detection in living cells.

研究分野：生体関連化学

キーワード：発光 ルシフェラーゼ RNA Cas13 スプライシング

## 1. 研究開始当初の背景

生物において遺伝情報を生体機能へと変換する転写の過程は生命維持に不可欠なものであり、細胞内で転写は緻密に制御されている。近年においては、転写物はタンパク質へと変換される媒体として機能するのみならず自身が機能的に他の転写物の抑制などに働くことが見出された。また、次世代シーケンシングに代表される転写物の大規模解析により、膨大の種類転写物が日々新たな研究対象として同定されている。そこで、標的とする様々な転写物の経時変化を定量的に追跡する技術が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では従来とは異なる原理により特定の転写物の経時変化を追跡可能な測定系の開発を行う。そこで、測定対象とする転写物を自在に変更可能であり、かつ、高い時間分解能を持つ測定系を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規測定原理に基づく発光プローブの構築

ホモロジーモデリングによる構造予測によると、RNA 認識モジュール中には円順列変異を施したルシフェラーゼを挿入する候補位置が二か所存在し、それぞれの候補は 10 残基程度に及ぶ。そこで、最適なループの選定、ループ内での最適残基の選定、という二段階のスクリーニングによって最適なプローブを選抜する。

### (2) 発光プローブの性能評価

開発するプローブが異なる標的転写物を認識しその転写物を定量可能であることを確認する。まず定量性の高い従来法である qPCR 法との比較を行う。また、発光値の経時変化を測定することで、発光プローブの連続測定可能な時間、および、測定の時間分解能を評価する。

### (3) 発光プローブによるスプライシング変異体の検出

スプライシング変異体量比を人為的に制御する光操作ツールの開発

発光プローブによるスプライシング変異体量比検出能を検証するため、スプライシング変異体量比を人為的に制御することを可能にする光操作ツールを開発した。また、この光操作ツールの性能を評価するための測定系を構築した。

スプライシング変異体の検出

発光プローブ、およびスプライシングの光操作ツールを同時に発現した HEK293T 細胞に対し、光照射前後での発光量変化を測定した。また、発光プローブが検出するスプライシング産物の種類を変更して同様の実験を行うことで、開発した発光プローブがスプライシング変異体を区別して検出できるかどうかを検証した。

## 4. 研究成果

### (1) 新規測定原理に基づく発光プローブの構築

構造予測に基づき、ルシフェラーゼを挿入するのに適していると予測されたループに実際に円順列変異を施したルシフェラーゼを融合したプローブを構築したところ、片方の候補ループにおいてのみ発光が得られた。そこで、このループに対し異なるアミノ酸残基位置でルシフェラーゼを挿入したプローブ候補を 8 種類用意し、様々な標的転写物存在下での発光量を測定した(図 1)。結果、どの標的転写物に対しても比較的高い発光値を示すプローブ候補が見出された。そこで、このプローブを以後の実験で用いることにした。

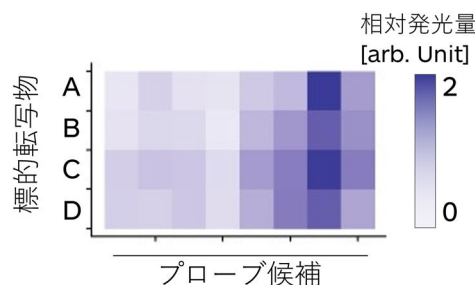


図 1: プローブの選定  
転写物認識モジュールの異なるアミノ酸残基に円順列変異を施したルシフェラーゼを挿入し、発光値を測定した結果のヒートマップ。

## (2) 発光プローブの性能評価

発光値が実際の RNA 量と対応していることを調べるため、細胞内標的 RNA 量を RNA 干渉により低下させた場合との比較を行った。プローブを HEK293T 細胞に発現させ、標的 RNA 量を RNA 干渉によって減少させた細胞 (RNAi) と未処理の細胞 (Untreated) とで発光測定を行った。結果、RNAi 処理群と未処理群では平均で 1.2 倍程度の発光値の差が見られた (図 2)。また、発光値の経時変化測定により、発光は 10 分強持続するが、時間とともに減衰することが明らかとなった。この結果は、開発したプローブが標的転写物の量に応じて発光値変化を示すことを示している。

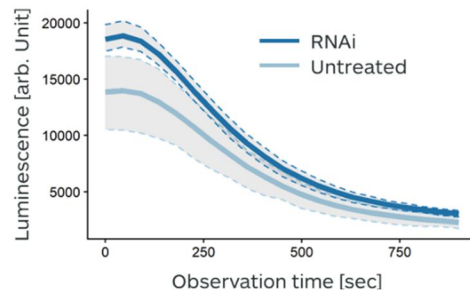


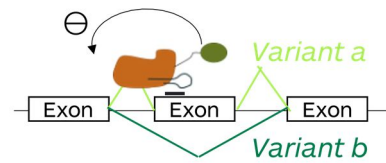
図 2：発光プローブの性能評価  
細胞に発光プローブを発現させ、標的転写物に対する RNA 干渉の有無の条件下で発光量の経時変化を測定した。

## (3) 発光プローブによるスプライシング変異体量比の検出

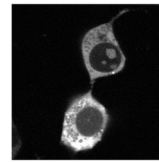
スプライシング変異体量比を人為的に制御する光操作ツールの開発

開発するプローブの応答性をリアルタイムで検証することを目的として、スプライシング変異体の割合を人為的に制御する光操作ツールを構築した。この光操作ツールでは、光照射依存的にスプライシングを誘導するスプライセオソーム構成タンパク質を標的転写物へと近接させることでスプライシング変異体の量比を制御する (図 3 A, B)。また、この光操作ツールの性能を評価するためエキソンスキップを利用して、スプライシングの有無により異なるレポータータンパク質が発現する、スプライシング変異体量比測定系を構築した。この測定系により、光操作ツールによりスプライシング変異体の量比に摂動を加えられることが明らかとなった (図 3 C)。

A



B



C

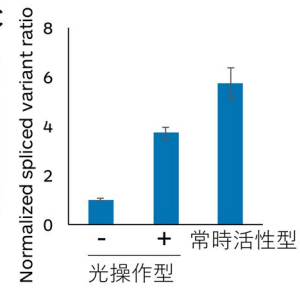


図 3：スプライシング摂動系の開発

A. 光操作ツールの原理。スプライセオソーム構成因子を光により標的転写物へと近接させる。B. 光操作ツールの細胞内発現。C. 光依存的なスプライシング量の摂動。

## スプライシング変異体の検出

発光プローブ、およびスプライシングの光操作ツールを同時に発現した細胞に対し、光照射前後での発光量変化を測定した。ここでは、3 種類の異なる "guide RNA" を用意することで異なるスプライシング変異体の検出を試みた。結果、光照射により量が減少すると予想される変異体を標的とした "guide1" および "guide2" の場合には光照射前後で発光量の差は無く、光照射により量が増加すると予想される変異体を標的とした "guide3" の場合には光照射により発光量が増加した (図 4)。この結果は、guideRNA の配列により結果が変動しうることを示唆しており、今後は裏付けを取るための検証実験を行いたいと考えている。

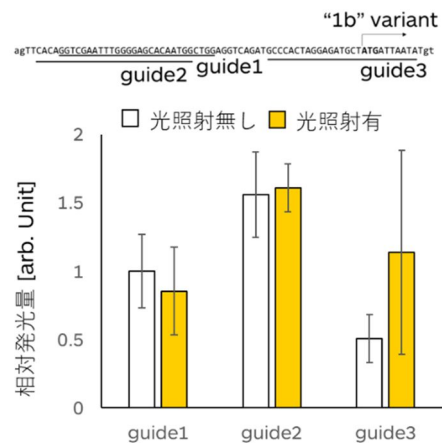


図 4：スプライシング変異体の検出  
異なるスプライシング変異体量を測定するため、3 種類の guideRNA を用意した。それぞれの guideRNA を使い、光照射によりスプライシング量の摂動を施した際のプローブの発光量変化を图示した。

本研究では、従来の測定法の課題点を克服するため、「レポーターの量ではなく質的な変化により、測定対象の転写物量を観測可能なシグナルに変化させる」という新たな観点から転写物量の経時変化を測定する系の開発を目指した。性能面でさらなる改良を施すことで、本研究で構築された測定系が今後ますます重要となる転写物の時空間的動態を捉えるための新たな手段となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kawamura Genki, Kokaji Toshiya, Kawata Kentaro, Sekine Yuka, Suzuki Yutaka, Soga Tomoyoshi, Ueda Yoshibumi, Endo Mizuki, Kuroda Shinya, Ozawa Takeaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Optogenetic decoding of Akt2-regulated metabolic signaling pathways in skeletal muscle cells using transomics analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eabn0782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.abn0782	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Genki Kawamura
2. 発表標題 Reconstruction of Akt2-mediated cellular signaling pathways by integrating multiple omics data
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Genki Kawamura
2. 発表標題 Optogenetic approach to analyze Akt2-regulated cellular metabolic signaling pathways
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Genki Kawamura
2. 発表標題 Analysis of Akt signaling pathway using a molecule-specific Akt activation tool by an optogenetic approach
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Genki Kawamura
2. 発表標題 Single-cell analysis of circadian synchronization process using luciferase probes.
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Genki Kawamura
2. 発表標題 Optical control of Akt to analyze cellular metabolic signalling pathways
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022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
---------	---------