

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871121

研究課題名(和文) 真核細胞における遺伝子発現ノイズの抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Suppression mechanism of gene expression noise in eukaryotic cells

研究代表者

小川 泰 (Yutaka, Ogawa)

独立行政法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・研究員

研究者番号：70624956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞におけるmRNAとその翻訳産物を同時に1分子レベルで可視化するために、顕微鏡開発と細胞株の樹立を行った。安定して、蛋白質を1分子レベルで可視化できるレポーター遺伝子を出芽酵母とヒト培養細胞で選定し細胞株を樹立した。出芽酵母では、自家蛍光の強いので、細胞膜に安定的に局在化する遺伝子の蛋白質発現を解析した。ヒト培養細胞では、微小管に局在化するレポーター遺伝子を用いた。ともに1分子感度での蛋白質の可視化に成功した。ヒト培養細胞では蛋白質に加えてmRNAの1分子感度での可視化についても試みた。

研究成果の概要(英文)：In order to visualize specific mRNA and its translated products simultaneously at a single molecular level in eukaryotic cells, we developed a new microscopy with single molecule sensitivity, and established various cell lines of *Saccharomyces cerevisiae* and human, which stably express reporter genes. Because *Saccharomyces cerevisiae* exhibited strong autofluorescence in the cytoplasm, we used plasma membrane localization reporter genes. In human cell lines, we used a microtubule-binding reporter gene. In both cases, we succeeded in visualizing specific reporter proteins in a single molecule sensitivity. In addition to reporter proteins, we also tried to visualize its mRNA in a single molecule sensitivity.

研究分野：遺伝子発現

キーワード：遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

近年、実験技術の進歩に伴い、全ての遺伝子発現は確率的反応過程であり、多少なりとも細胞ごとにバラつくことが明らかになってきている。この遺伝子発現ノイズは、細胞ごとの多様性を生み、急な環境変化への柔軟な対応を可能にする。さらに高等生物においては、発現ノイズを巧みに利用し、様々な機能に特化した細胞種へ分化する。

原核細胞である大腸菌でのプロテオーム解析によると、全ての遺伝子において少なくとも、±30%ものタンパク質発現のバラつきがあることが明らかになった(Taniguchi et al., Science, 2010)。一方、真核細胞である出芽酵母では、大腸菌よりもかなり抑えられ、±10%程度に収まっている(Newman et al., 2006)。つまり、出芽酵母では、大腸菌と異なり遺伝子発現の過程で、ノイズを緩和する仕組みが備わっていることが示唆される(図1)。これは、より複雑な高等生物では発現バラつきによる環境適応性の向上という利点以上に、細胞の恒常性維持のためには、精密にタンパク質発現量を制御させる必要があるためであると考えられる。

このような遺伝子発現の精度はどのように生み出されているのかは、今のところ明らかになっていないが、真核細胞が原核細胞と大きく異なる点としては、転写は核内で起こり、翻訳は細胞質で起こり、それぞれが隔離されていることである(図2)。原核細胞では、転写開始されるや否や、リボソームが翻訳を開始するため、確率的な転写開始がタンパク質発現のノイズに大きく影響を与えたと考えられている。一方、真核細胞では、核で転写された mRNA は、プロセッシングを受けた後、核外輸送因子群により核から細胞質へ輸送され、初めて翻訳が開始される。確率的な転写自体は、原核細胞と同じであるにもかかわらず、翻訳されたタンパク質の発現量のノイズは大幅に減少する。これまで、転写と翻訳産物のどちらかだけに着目した研究が行われてきているが、これらセントラルドグマ全てを可視化する研究は例がない。

そこで、申請者は、真核細胞で遺伝子発現ノイズが抑制される仕組みを、生細胞内で特定の mRNA とその翻訳産物を直接観察することにより明らかにすることを目指した。

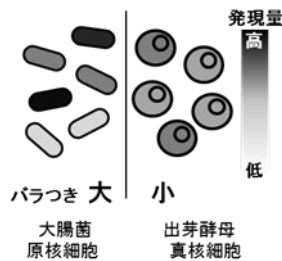


図1 真核細胞では発現ノイズが抑制される

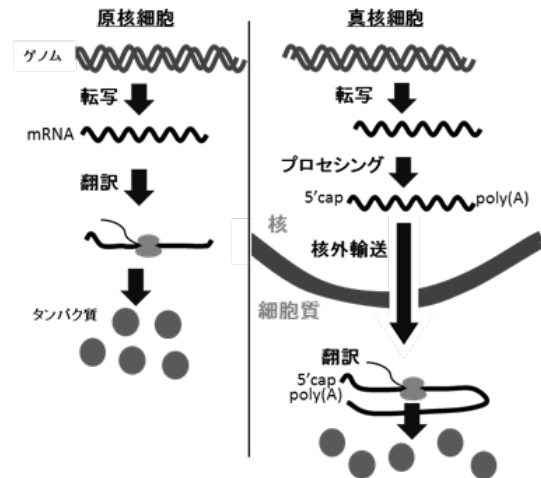


図2 原核細胞と真核細胞での遺伝子発現プロセスの違い

2. 研究の目的

遺伝子レベルで同等な細胞で全く同じ環境下においても遺伝子発現量にはバラつきが生じる。原核細胞と比較して、真核細胞は、この遺伝子発現ノイズを大幅に小さくしている。これは、転写と翻訳が核膜によって隔離され、介在する因子群により精密に制御されているためと考えられる。申請者は、これまで核-細胞質間輸送の効率が変化する仕組みの解明を明らかにしてきた。本研究のねらいは、真核細胞において mRNA の生細胞内可視化技術と蛍光タンパク質の1分子可視化技術を用いて、転写から翻訳までの全過程を追跡し、どこで発現量ノイズを制御しているのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

遺伝子発現を可視化するために、適した1分子感度の顕微鏡を開発し、出芽酵母やヒト培養細胞の細胞株の樹立を行った。それぞれの動物種において最適なレポーター遺伝子の選定を行い、安定発現株をそれぞれ樹立した。mRNA の生細胞内での可視化は、RNA結合蛋白質を用いた方法と、特殊な RNA 配列を直接蛍光ラベル新しい手法を試した。

4. 研究成果

(1) 3次元1分子感度顕微鏡の開発

研究実施計画の通り、顕微鏡開発の専門家である谷口氏と協力し、生細胞内の蛍光蛋白質を1分子感度で観察できる高感度蛍光顕微鏡の開発を行った。これを用いることにより、1細胞内における蛍光蛋白質の総数をカウントすることが原理上可能となる。ヒト由来培養細胞や出芽酵母等のそれぞれの試料への最適化等を行った。構造体に結合した状態の標的蛋白質の定量はすでに可能である。

(2) 出芽酵母を用いた1分子感度での蛋白質発現の検出系と細胞種の構築

出芽酵母は、強い自家蛍光を持ち、特に液胞部分の自家蛍光が強い。そこで、定量性の高いレポーター遺伝子として、細胞膜に局在

しブラウン運動しない遺伝子に蛍光蛋白質を融合したものをを用いる必要があった。

そこで候補に挙げたのがエイソソーム構成蛋白質群である。エイソソームは出芽酵母特有の大きな蛋白質複合体で、細胞膜のエンドサイトーシスが起る箇所に1細胞当たり50~100個程度存在する。そして、構造体そのものほとんど動かない。エイソソームを構成する遺伝子として報告がある Pil1, Nce102, Lsp1 に黄色(Venus)または赤色蛍光蛋白質(mKate2)を複数個融合した遺伝子を、GAL1 遺伝子座に挿入した細胞株を複製し、ガラクトース誘導により遺伝子発現の1分子感度経時測定を行った。

その結果、個々の蛋白質の輝点をはっきりと観察でき、高い自家蛍光の影響を最小限に抑えることに成功した。続いて、非常に弱いガラクトース誘導を行い、1個の mRNA から生じる蛋白質発現を観察した。しかし GAL1mRNA の平均寿命から想定される短い遺伝子発現バーストは観察されず、より長い mRNA 寿命からの発現バーストのパターンが観察された。その原因として考えられたのは、3'UTR 領域の配列である。遺伝子の C 末に蛍光蛋白質を融合し、人工的な 3'UTR と栄養要求マーカーがカセットとして入っている。これは、出芽酵母では一般的に用いられる手法で、既存の出芽酵母ライブラリーは全てこの方法で作成されている。過去の網羅的な遺伝子発現解析では、このままの状態で行われているが、今回、我々はより詳細な解析を行うために、野生型の 3'UTR 配列にする必要があった。そこで、3'UTR と栄養要求マーカーを Cre-Lox システムにより除去し、GAL1 遺伝子本来の 5'UTR と 3'UTR を有する Venus を融合した Pil1 を挿入した細胞株を樹立し、観察を行った。その結果、これまでと異なる発現バーストのパターンが観察された。これは、個々の mRNA の寿命が変化したこと由来する。このことから、UTR 部分の重要性が改めて確認された。

(3) ヒト培養細胞を用いた1分子感度での蛋白質の検出を行うための細胞株構築

ヒト培養細胞を用いた1分子感度での蛋白質の検出を行うためのレポーター遺伝子を持つ細胞株を各種構築した。

ヒト培養細胞でも出芽酵母と同様に定量性の高いレポーター遺伝子を選定した結果、蛍光蛋白質を融合した MAP4 を採用した。MAP4 は生細胞内においても微小管に固定されているので、蛋白質数の定量に適している。MAP4 に蛍光蛋白質を融合し、薬剤誘導型プロモーターを上流にもつカセットを細胞に導入し、安定細胞株を樹立した。1分子感度の顕微鏡で観察したところ、MAP4 の1分子の輝点をはっきりと確認することができた。

(4) mRNA とその翻訳産物の同時可視化
蛋白質に加えて、mRNA を1分子で検出で

きるヒト培養細胞株の構築を試みた。計画では、mRNA の検出方法として、PP7 と呼ばれる RNA の特異配列に結合する蛋白質に蛍光蛋白質を融合したものを細胞内で発現させ、標的 mRNA の 3'UTR に結合配列を多数組み込み、蛍光ドットとして可視化する方法を用いる予定であった。この方法では、標的 mRNA が全く発現していないときでも、PP7 の蛍光が検出されることになる。さらに、多数の標的 mRNA が発現している場合と数個程度の少数の標的 mRNA が発現している場合で、PP7 の発現量を調整する必要が生じる。これらの理由から、別の RNA 検出方法を検討する必要が生じた。

そこで新たに Spinach と呼ばれる RNA の可視化法(Paige, et al. 2012)を検討した。この方法では、まず Spinach 配列という特有の2次構造をとる RNA 配列を標的 mRNA の UTR に組み込む。可視化するときは、培養液に DFHBI という Spinach 特異的な基質を加える。細胞内にある Spinach に DFHBI が組み込まれることにより初めて蛍光を発する。この方法の利点は、Spinach 配列に組み込まれていない時に、DFHBI があまり蛍光を発しないため PP7 を用いた方法よりも S/N 比が良くなることが期待される。また、標的 mRNA の発現量によって基質の量を調整する必要もない。PP7 の認識配列の代わりに Spinach 配列を 12~36 個並べたものを 3'UTR に組み込み、ヒト培養細胞に導入し、DFHBI を加え観察した。その結果、Spinach 配列がある場合とない場合の蛍光量に差はあるが、mRNA 分子1個を可視化するには蛍光量が不足していた。原因としては、全ての Spinach 配列が正しい2次構造をとっていないことが考えられる。これは同じ配列が連続するためフォールディングを互いに阻害しているためと考えられるため、今後もう少しリンカー配列の検討が必要である。

真核細胞のモデルとして出芽酵母とヒト培養細胞において、1分子レベルでの蛋白質発現を可視化できる細胞株の樹立に成功した。一方で、その mRNA を1分子レベルで同時に可視化する技術は当初の予定通りには進んでおらず、今後もう少し工夫と条件検討が必要である。しかし、上記の Spinach 技術は、より感度の高い基質や配列も明らかになってきているので、近い将来1分子レベルでの mRNA の可視化も可能になるとと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Mizuguchi-Hata Chiaki, Ogawa Yutaka,
Oka Masahiro, Yoneda Yoshihiro.
Quantitative regulation of nuclear pore complex
proteins by O-GlcNAcylation.
Biochim Biophys Acta. 2013 1833:2682-2689.
(査読有)

〔学会発表〕(計 1件)

Takei Yodai, Ogawa Yutaka, Taniguchi
Yuichi
Identifying factors that control the fundamental
noise limit of gene expression in Escherichia coli.
The Seventh q-bio Conference
2013年8月7日～8月10日 Santa Fe, USA

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 泰 (Ogawa, Yutaka)
独立行政法人理化学研究所
今本細胞核機能研究室 研究員
研究者番号：70624956

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：