

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870430

研究課題名(和文) 内在配列を標的としたRNAイメージング手法の開発

研究課題名(英文) The development of endogenous RNA imaging technique

研究代表者

八木 祐介 (Yagi, Yusuke)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：60612421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、配列特異的にRNAと結合するPPRモチーフを利用して、新しいRNAイメージングツールの開発を目指した。任意の配列に結合するPPRタンパク質の作成手法を確立した。作成したカスタムPPRのRNA結合性能は動物培養細胞内で機能するのに十分な性能を有していることが分かった。さらに安定してGFP融合カスタムPPRタンパク質が動物培養細胞内で発現する方法を構築できた。これらの結果から、PPRによる蛍光RNAイメージングのための基盤が作成できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we had tried to develop new RNA imaging tool using the PPR motif that binds to RNA sequence-specific manner. The basic method for constructing custom PPR protein that binds to any RNA sequence was established. The RNA binding performance of the constructed custom PPR was found to have sufficient performance to function in cultured animal cell. Furthermore, we have established a method for stable expressing GFP fused PPR protein in animal cultured cell. Thus, we were able to build a basic part for PPR-RNA imaging system.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA

1. 研究開始当初の背景

(1) RNA in vivo イメージング

RNA 分子は、mRNA といったタンパク質合成の鋳型情報としての役割だけでなく、非翻訳性 RNA などを介した多様な遺伝子発現制御の存在が見出されている。また、核内で転写された mRNA は、タンパク質合成の場である ER に局在するだけでなく、オルガネラ膜上(ミトコンドリアやペロキシソーム)や細胞内の特定箇所へ輸送され、局所的なタンパク質合成が行われる。この RNA の不均一な分布パターンは、細胞極性の決定や正常な胚発生に重要であることが分かってきた(Lecuyer et al., 2007 Cell)。しかし、RNA 動態を観察、解析する技術は、タンパク質局在解析技術と比べて未だ乏しいのが現状であった。

細胞内 RNA の可視化には、相補鎖核酸を用いた FISH 法、もしくは、目的 mRNA の 3' UTR などにあらかじめタグ配列を付加し、そのタグ配列を認識する RNA 結合タンパク質もしくは低分子化合物による可視化法、が用いられている(MS2 など)。FISH 法は、分子設計が容易であるが、細胞を固定化、切片化する必要があるためライブイメージングが困難である。一方、タグ配列を利用した方法では、ライブイメージング技術が確立されているが、タグ配列による mRNA の性質変化(RNA の異常安定化や翻訳阻害など)が問題となっている。そのため、内在配列を標的に RNA を可視化する技術(タグフリー)が求められている。これまで配列特異的な RNA 結合タンパク質の開発は、主に Pumilio タンパク質を用いて行われていた。Pumilio を用いることで動物ミトコンドリア RNA、RNA ウイルスの可視化に成功している(Ozawa et al., 2007 Nat. Method; Tilsner et al., 2009 Plant J)。しかし Pumilio タンパク質は、配列選択の自由度が低いことが分かり、現在開発限界が生じている。そのため、新しい基盤分子が求められていた。

(2) PPR 技術

Pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質は、配列特異的な RNA 結合タンパク質である。申請者は、この RNA 結合機構について明らかにした。PPR タンパク質は、オルガネラ(ミトコンドリアや葉緑体) RNA 代謝(切断、安定化、編集)に関わる RNA 結合タンパク質である。植物には約 500 個の PPR タンパク質が存在し、各々が 1~数個の標的 RNA を持つ。PPR タンパク質は、35 アミノ酸からなる PPR モチーフが複数(2-27 個)連なるタンデムリピート型タンパク質である。申請者らの研究によって、「1つの PPR モチーフは、1 塩基を認識すること」、「モチーフ内の 3 箇所のアミノ酸の組み合わせによって塩基を決定していること」が分かった(Yagi et al., PLoS One 2013)。

この発見により、目的の RNA 配列に合わせて PPR モチーフを並べることで、任意 RNA 分子へ結合するタンパク質のデザインが可能と

なった。また、PPR モチーフは、天然に 50 種類以上あり、リピート数が多様(2-27 回繰り返す)であるため、様々な配列、長さに対応した RNA 結合タンパク質の作成が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、PPR タンパク質を改変することで、任意の RNA 配列に結合する分子構築法の確立及び、RNA 結合時にのみ蛍光を発するような分子設計、構築手法の確立を目的とした。

具体的に作成するプローブ分子は、PPR モチーフの連続からなる RNA 結合モジュールと蛍光を発する可視化モジュールの 2 つの機能モジュールからなる。RNA 結合部位には、任意の RNA 配列へ特異的に結合するように PPR モチーフを並べる。蛍光ドメインには、RNA との結合時のみに蛍光を発するような手法を想定した(BiFC もしくは FRET 法)。

3. 研究の方法

(1) RNA 認識部位の開発

以前の研究で、典型的な 4 種類の PPR モチーフ(AUGC 認識)を選び、それらをタンデムに連ねたカスタム PPR タンパク質を作成したが、その手法では十分な RNA 結合能が発揮されなかった。つまり、PPR の全体骨格(モチーフ同士の繋ぎ方など)を考慮する必要があることが分かった。そこで、本研究では、以下で述べる手法によって開発を目指した。

まず、標的 RNA から特異配列を検索する。その標的配列に沿うように各塩基特異的な PPR モチーフを並べる。対象生物のゲノム全塩基情報から 1 カ所の配列を選ぶには、例えばオルガネラゲノム(数百 kbp)で、9~10 塩基、ヒトゲノムでは、最低でも 15~16 塩基が必要である。本研究では、まず塩基特異性が高いとされる PPR モチーフを独自の塩基認識評価パラメーターから算出し、選抜を行った。それらを連結し、任意の 18 塩基の配列に結合しうる PPR 結合タンパク質を設計、その遺伝子配列を合成した(PPRa)。PPRa の塩基認識特異性について in vitro 生化学アッセイでの評価、及び細胞ベースの RNA 結合評価を行った。

(2) 検出モジュールの開発

PPRa に GFP などの蛍光タンパク質を融合し、細胞内で発現性や局在性を調べた。

4. 研究成果

(1) RNA 認識部位の開発

作成した PPRa の RNA 結合能を調べた。PPRa の組み換えタンパク質を大腸菌内で発現させ、精製した。精製した PPRa 組み換えタンパク質を用いてゲルシフトアッセイ及び Blitz システムを用いて標的 RNA との結合キネティクスを評価した。その結果、これまで明らかになっている天然型 PPR タンパク質と

同程度の RNA 結合能力を有していることがわかった。また、配列特異性も十分に有していることが分かった。これらの結果より、モチーフアッセムリーによってカスタム PPR タンパク質が作成できることが明らかになった。

しかしながら、生化学的手法によるカスタム PPR タンパク質の RNA 結合性能評価にはいくつかの問題が見出された。ひとつは、大腸菌での発現系では、PPR タンパク質の発現不安定性、アンフォールディングによる凝集が目立つため、安定して RNA 結合活性を有する組み換えタンパク質の回収が困難であること。ふたつ目は、多数の塩基バリエーションを持つ RNA プローブを用意することが困難なことが挙げられる。そこで、より高スループットに PPR の RNA 結合性能を評価する系の構築が必要となった。そこで、動物培養細胞のレポーターシステムに着目し系の構築を行った。動物培養細胞は、複数のプラスミド DNA を高効率に導入する手法 (> 80%) や、種々の発現ベクター、試薬、および抗体が利用可能である。さらに、ハイスループットデータが容易に取得でき (96 ウェルフォーマット) かつ定量的な解析が可能である。系の構築には、図 1 のような系を考案した。

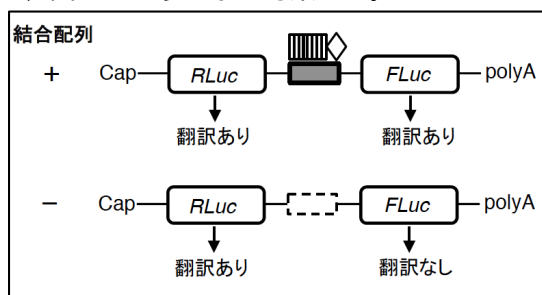


図 1. レポーターアッセイ系概略図

一般的に利用されている IRES ベクターの IRES 配列を PPR 結合配列に置換し PPR が RNA に結合した場合のみ、2nd ORF (FLUC) の翻訳が活性化されるような系を考案した。まず、翻訳活性化が期待できる蛋白質ドメイン (AD1-4) と天然型 PPR 蛋白質との融合蛋白質発現ベクターを作成した。それとレポータープラスミドを HEK293T 細胞に共導入しルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、いくつかの融合 PPR 蛋白質において、FLUC 翻訳活性上昇が標的配列特異的に見られた (図 2)。

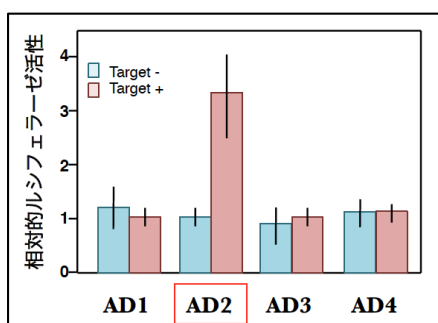


図 2. 翻訳活性ドメインの探索

次に、PPRa とその結合配列を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、天然型と比較して、非常に強い翻訳活性化が見られた (図 3)。

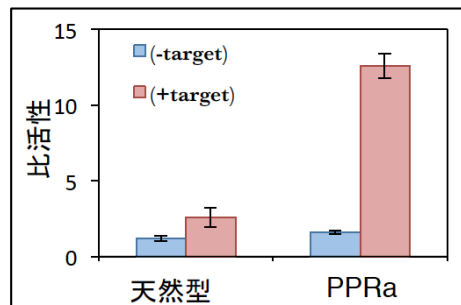


図 3. 天然型及びカスタム PPR におけるのレポーターアッセイ結果

これらの結果から、作成したカスタム PPR タンパク質が細胞内で十分に駆動することが証明できた。

さらに、この実験系を利用して機能性を有するモチーフ数の検討、及び配列特異性の解析を行った (図 4)。

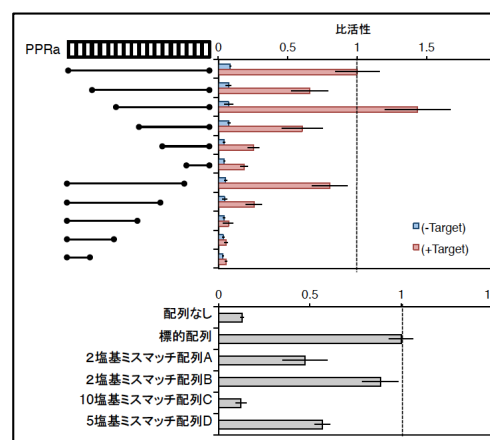


図 4. カスタム PPR タンパク質の駆動可能モチーフ数及び、非標的配列への結合性能の評価

その結果、最低でも 12 モチーフが細胞内で機能するために必要であることが分かった。また、2 塩基のミスマッチで活性が半分程度に下がったことから、一定の標的配列特異性を有していることが分かった。さらに、詳細な標的配列バリエーションを用意しアッセイを行うことで、配列特異性と各モチーフの関係を明らかにすることができると考えている。

(2) GFP 融合 PPR タンパク質の培養細胞での発現

作成したカスタム PPR タンパク質による RNA イメージングのために、まずは単体で GFP タンパク質を融合し細胞内での局在性につ

いて調べた。HEK293T 細胞に EGFP-PPRa 発現プラスミドを導入し、蛍光顕微鏡により観察を行った。その結果、発現が非常に弱いものの細胞質に満遍なく分布している細胞が観察された(図5)。しかし、一部の細胞では、非常に強く発現した結果、GFP-PPRa が凝集していると思われる蛍光が観察された(図5矢印)

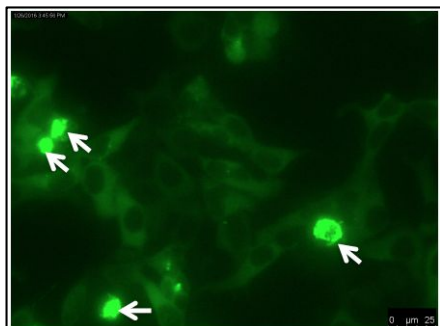


図5 GFP-PPRa 発現細胞の蛍光画像

この結果より、カスタム PPR タンパク質による RNA イメージングのためには、発現量のコントロール、及び発現安定性を向上させる必要があることが分かった。

発現安定性の向上のために PPR タンパク質の改良を行った。可溶性が向上すると期待されるモチーフ、タンパク質タグを PPR に導入することで、GFP-PPRa の凝集性改善を目指した。その結果、可溶性アミノ酸を多く含む配列を付加した場合に、凝集性、発現量の改善が認められた。

さらに、PPR 1 分子での細胞内 RNA イメージングのため、核局在 GFP-PPRa の開発を進めた。細胞質に存在する RNA 分子に結合した場合は、細胞質に残留し、結合しない PPR は核へ輸送されることで、RNA イメージングのバックグラウンドを下げる事が可能になる。一般的に利用される NLS 配列を GFP-PPRa に挿入し、局在を確認したが、核局在性が得られなかった。そこで、NLS のタンデム化や他の NLS 配列を試した結果、特定の配列を付加した場合に効率よく核に局在できることが分かった。これらの研究から、PPR による RNA 分子のイメージングの基礎ツールの準備が完了した。今後、実際に PPRa 標的配列を発現させ、蛍光による RNA 分子のイメージングや、2 分子を介した低バックグラウンドの RNA イメージングの開発に進められると考えている。

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 2 件)

T.kobayashi, Y.Yagi, T.Nakamura, "Development of genome engineering tool(s) by plant specific PPR proteins using animal cultured cell" Methods

in Mol. Biol. 査読有 in press

八木祐介、中村崇裕 『PPR モチーフを用いた DNA/RNA 操作技術』 科学評論社 「内分泌・糖尿病・代謝内科」 査読無 42, 5, 352-356

〔学会発表〕(計 4 件)

八木祐介、中村崇裕 『植物オルガネラ遺伝子発現制御因子である PPR 蛋白質の RNA 認識機構』 第 4 回植物 RNA 研究者ネットワークシンポジウム 2015 年 1 月 19 日 京都

八木祐介、中村崇裕 『PPR モチーフを用いた RNA 操作技術の開発』 第 4 回ゲノム編集研究会 2014 年 10 月 7 日 広島

八木祐介、中村崇裕 『PPR 蛋白質を利用した標的 mRNA 特異的な翻訳制御ツールの開発』 日本分子生物学会 2015 年 12 月 1 日 神戸

八木祐介、中村崇裕 『PPR タンパク質を利用した標的 mRNA 翻訳制御ツールの開発』 植物生理学会 2016 年 3 月 18 日 岩手

〔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：
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
八木 祐介
Yagi Yusuke
九州大学

農学研究院
学振特別研究員 PD
研究者番号：60612421

(2)研究分担者
なし()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし()

研究者番号：