

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25708025

研究課題名(和文) 生細胞内RNAの可視化と制御を実現する革新的技術の創出

研究課題名(英文) Development of innovative technologies to visualize and control RNAs in living cells

研究代表者

吉村 英哲 (Yoshimura, Hideaki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90464205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生細胞内においてテロメアRNA (telomere repeat-containing RNA: TERRA) の1分子可視化蛍光プローブを開発し、TERRAの機能解明を行なった。全反射蛍光顕微鏡を用いてTERRAとテロメアの生細胞内分布を解析し、テロメアから1~2  $\mu\text{m}$ 離れた領域にTERRAが集積することを明らかにした。さらに、hnRNPA1とTERRA、テロメアの同時観察を行い、hnRNPA1とTERRAがこの領域内で共局在を示すことを発見した。以上より、テロメア上のhnRNPA1をTERRAが捕捉し、hnRNPA1のテロメア調節能を制御していることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：I developed a probe to visualize single-molecule dynamics of telomere repeat-containing RNA (TERRA) in living cells to reveal mechanism of TERRA function in telomere maintenance. I performed single molecule imaging of TERRA and telomere in living U2OS cells using the present probe. Analysis of spatial distribution of TERRA and telomere revealed that TERRA intensively localize in a region 1-2  $\mu\text{m}$  apart from a telomere. Next I performed simultaneous single molecule observation of TERRA, telomere, and hnRNPA1 which is a telomere-related protein. The results of this observation showed that TERRA and hnRNPA1 frequently colocalize to each other in the telomere-surrounding region. On the basis of these results, I propose a novel mechanistic model of TERRA, in which TERRA in the telomere-surrounding region traps hnRNPA1 and control the function of hnRNPA1 to maintain telomere length.

研究分野：分析化学

キーワード：RNA イメージング 1分子観察 テロメア

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの生命科学、特に生化学や分子生物学の分野では、タンパク質が主たる研究対象であった。様々な生命現象に関わるタンパク質が同定され、それらタンパク質の構造、生化学的機能、およびバイオイメージングによる細胞内局在や動態の解析を通じて、生命現象の作動原理が解明されてきた。各種生命現象を実現するタンパク質の作動機構について一定の理解が得られた今、RNA は生命科学研究の次のターゲットの一つとして有力な候補である。RNA は、古くは主に遺伝子情報の単純な仲介者と思われてきた。しかし実際は、mRNA 以外に多数の非翻訳性 RNA が存在しており、様々な生理機能に携わっていることがわかってきた。さらに、遺伝情報の仲介者である mRNA も様々なシグナルに応答して特徴的な細胞内局在を示すことが明らかとなっており、その動態の生理的意義に興味が集まっている。

これら RNA の作動機構や動態を解析し、生理的意義を理解するためには、目的 RNA の細胞内における時空間情報を得る必要がある。細胞内分子の時空間情報を得る最良の手法は生細胞イメージング、すなわち、生きたままの細胞中で観察対象の分子を選択的に可視化追跡することが必要である。しかしこれまでの RNA 研究では、生化学的手法や、固定細胞イメージングによる研究が中心で、RNA の生細胞イメージング研究はほとんど成されていない。その理由は明白で、研究目的とする RNA を生細胞内で選択的に標識・可視化する手法が確立していないからである。この現状が RNA 研究の進展にとって、大きな足かせになっていた。

申請者らのグループは最近、革新的な生細胞内 RNA 可視化プローブを開発した(図 1)。このプローブは RNA 結合タンパク質 Pumilio と蛍光タンパク質から成る。目的 RNA の配列に合わせて、Pumilio は、テラーメイドに変異導入を行うことで、任意の RNA 配列に選択的に結合させられるという特長を有している。そこで、プローブの Pumilio 部分に、目的 RNA と選択的に結合するように変位を導入する。そのプローブを細胞内に発現させ、蛍光顕微鏡で観察することで目的 RNA の可視化観察が可能になる。2007 年に小澤(現在申請者が所属する研究室の主宰者)らは、このプローブを用いてミトコンドリアに局在する NADH 脱水素酵素の mRNA を生細胞内で可視化することに成功した。申請者はこの原理を応用して、生細胞中の  $\beta$  アクチン mRNA の可視化に成功した。申請者が得た特筆すべき成果は、細胞外部か

らの刺激に応答して起こる  $\beta$  アクチン mRNA の細胞内局在変化の可視化解析に成功したこと、および  $\beta$  アクチン mRNA がモータータンパク質に輸送される動態の 1 分子追跡を実現したことである。さらにこのプローブは発現ベクターを導入することで、細胞内で容易に産生させられ、目的 mRNA に結合しても、その翻訳を阻害しないなどの長所がある。「研究業績」発表論文 1, 2)。この技術は *Nature Methods* 誌でも紹介され、広く注目を集めるところとなった。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが開発してきた、Pumilio を利用した RNA 可視化技術をさらに発展・展開し、生細胞 RNA 研究の革新的基盤技術を確立することを目指している。そのために、より高度な生細胞内 RNA 可視化解析を成功させ、この RNA 可視化技術の汎用性・発展性を証明する。

本研究では RNA 可視化プローブをさらに改良して、テロメア RNA 可視化プローブを構築する。テロメア RNA は、2007 年に発見された非翻訳性 RNA である。染色体 DNA 末端のテロメア領域は細胞の寿命や老化、不死化に関わると考えられており、生物学、基礎医学などの重要なターゲットである。テロメア RNA はテロメア DNA に集合するタンパク質群と協同的に働くことで、テロメア DNA の伸長、分解、複製に関わっていると考えられている。

テロメア RNA の作動機序として、動態の異なる 2 つのモデルが提唱されている。1 つはテロメア DNA と関連タンパク質群からなる複合体(テロメア複合体)の安定性を高める足場として機能しているという静的なモデル(scaffold モデル)、もう一つはテロメア DNA へのタンパク質輸送の仲立ちをするという動的なモデル(decoy モデル)である。しかし、いずれのモデルで機能しているか、あるいは複数のモデルが使い分けられているのか、はっきりした答えは得られていない。この課題に答えを出すために、本研究ではテロメア RNA の可視化プローブを構築し、生細胞内 1 分子イメージングを行う。特に、テロメア複合体に含まれるタンパク質との同時 1 分子観察を行う。その結果から、テロメア RNA の動態を評価し、テロメア RNA の作動機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、まずテロメア RNA (TERRA) を生細胞内で選択的に標識する蛍光プローブを開発した。本プローブは二分割型蛍光タンパク質と RNA 認識ドメインからなるタンパク質ベースのプローブである。RNA 認識ドメインとして、RNA 結合タンパク質 Pumilio1 の RNA 認識ドメイン PUM-HD を採用した。PUM-HD に変異を導入して、TERRA の繰り返し配列と選択的に結合するように改変した。

開発したプローブを生細胞内に導入し、全反射蛍光顕微鏡を用いて TERRA の 1 分子イメージングを行なった。TERRA はテロメアと関連して作動していることが予測されるため、TERRA に加えてテロメア可視化プローブも生細胞内に導入し、TERRA とテロメアの生細胞内 1 分子同時可視化を行なった。得られた可視化観察結果について、TERRA とテロメアの空間的な相関や、局所密度について解析を行なった。

続いて、TERRA、テロメアに加えて、テロメア関連タンパク質である hnRNPA1 のプローブも細胞に導入し、TERRA、テロメア、hnRNPA1 の生細胞内 3 色同時 1 分子イメージングを行なった。この観察結果についても、テロメアを中心とした空間分布の解析や、局所密度についての解析を行なった。

#### 4. 研究成果

まず本研究で開発したプローブの性能について、ゲルシフトアッセイで評価を行なった。その結果、本プローブは目的 RNA 配列に対して解離定数 100 nM の親和性で選択的に結合することが明らかとなった。この親和性は、生細胞内で目的 RNA を標識するのに十分である。また、細胞内において TERRA を *in situ hybridization* 法により染色し、プローブとの局在を同時観察した。その結果、本プローブは TERRA と共局在していることが確かめられた。以上の結果から、本プローブは TERRA に対して十分な親和性を有し、細胞内の TERRA を蛍光標識する性能を有していることが確かめられた。

続いて、TERRA とテロメアの 2 色同時蛍光観察をおこなった。その結果、テロメアはほぼ静止している蛍光輝点として観察されたのに対し、TERRA を示す蛍光輝点は拡散運動を示すものと静止するものの両方が存在した。また、TERRA はテロメア上のみならず、テロメアから 1 ~ 2  $\mu\text{m}$  程度離れた領域にも集中して存在することが明らかとなった。また、この領域においては他の領域よりも静止している TERRA の割合が大きいことが明らか

となった。

次に TERRA、テロメア、hnRNPA1 の 3 色同時蛍光観察を行なった。その結果、TERRA と異なり、hnRNPA1 はテロメアからの距離に依存せず均一に分布していた。しかし、TERRA と hnRNPA1 の共局在については、TERRA が集中している領域でより頻繁に起こることが明らかとなった。なお、シミュレーションにより発生した均一分布な点と TERRA においては共局在においてそこまで顕著な領域依存性は観られなかったため、TERRA と hnRNPA1 とがテロメアから離れた領域で共局在することは hnRNPA1 特有の性質であることが示された。また、この領域において共局在する TERRA は大多数が静止しているものであったのに対し、hnRNPA1 が拡散運動を示しており、TERRA と共局在することで運動を停止することが観察された。また、TERRA が周辺領域に集中しているテロメアでは、テロメア上の hnRNPA1 存在量が減少していることが明らかとなった。

以上の結果から、申請者はこれまでに無かった新たな TERRA 機能発現モデルを構築した。定常状態においては、hnRNPA1 はテロメア上に多く存在する平衡状態にある。そのテロメア周辺に TERRA が集中すると、hnRNPA1 はテロメアから解離した後 TERRA にトラップされ、テロメア上に戻れなくなる。その結果、hnRNPA1 のテロメア上の存在量が減少し、テロメア状態が変化することでテロメア長調節機能に変化が生じる。このモデルは、テロメア機能調節がテロメア上に存在する複合体のみならずその周辺部に存在する分子によって制御されるという非常に新規なものであり、生細胞内における RNA とタンパク質の動態を 1 分子追跡により可視化することで実現したものである。

#### 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 9 件)

1. Y. Nasu, Y. Asaoka, M. Namae, H. Nishina, H. Yoshimura, T. Ozawa  
Genetically encoded Fluorescent probe for imaging apoptosis *in vivo* with spontaneous GFP complementation.  
*Anal. Chem.* **2016**, 88(1), 838-844.  
査読あり  
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03367

2. 「RNA と生細胞内 1 分子イメージングの可能性」  
吉村英哲  
査読なし  
Labcab p19-20, Vol.12 No.1 2015
  3. 「蛍光顕微鏡を用いた生細胞内 1 分子可視化解析法」  
吉村英哲、小澤岳昌  
The Bulletin of the Society of Nano Science and Technology (ナノ学会会報)  
第 13 巻 第 2 号 2015 年 3 月, p61-65  
査読あり  
ISSN 1347-8028
  4. 「生細胞内 RNA イメージング」  
吉村英哲、小澤岳昌  
細胞工学 Vol.34 No.1 2015  
査読あり
  5. T. Nishiguchi, T. Yamada, Y. Nasu, M. Itoh, H. Yoshimura, T. Ozawa  
Development of red-shifted mutants derived from luciferase of Brazilian click beetle *Pyrearinus termitilluminans*  
*J. Biomed. Opt.* **2015**, *20*, 101205.  
査読あり  
DOI: 10.1117/1.JBO.20.10.101205.
  6. A. Takamura, M. Hattori, H. Yoshimura, T. Ozawa.  
Simultaneous time-lamination imaging of protein association using a split fluorescent timer protein.  
*Anal. Chem.* **2015**, *87(6)*, 3366-3372.  
査読あり  
DOI: 10.1021/ac504583t
  7. H. Yoshimura, T. Ozawa  
Method of split-reporter reconstitution for the analysis of biomolecules.  
*Chem. Rec.*, **2014**, *14*, 492-501.  
査読あり  
DOI: 10.1002/tcr.201402001
  8. L.Z. Yang, Y. Nasu, M. Hattori, H. Yoshimura, A. Kanno, T. Ozawa,  
“Bioluminescent Probes to Analyze Ligand-induced Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate Production with Split Luciferase Complementation”, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 11352-11359.  
査読あり
  9. T. Ozawa, H. Yoshimura, S.B. Kim,  
“Advances in fluorescence and bioluminescence imaging”, *Anal. Chem.*, **2013**, *85*, 590-609.  
査読あり
- [学会発表](計 26 件)
1. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Takeaki Ozawa  
Analysis of single molecule dynamics to reveal the functional mechanism of telomeric repeat-containing RNA  
第 95 日本化学会春季年会  
20160324-20160327  
同志社大学京田辺キャンパス(京都府京田辺市)
  2. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Rintaro Shimada, Takeaki Ozawa  
Single-molecule live-cell imaging of a non-coding RNA  
Focus on Microscopy 2016  
20160320-20160323  
台北(台湾)
  3. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Rintaro Shimada, Takeaki Ozawa  
A fluorescent probe for single-molecule imaging of telomeric-repeat containing RNA using fluorescent protein reconstitution and an RNA binding domain PUM-HD  
Pacifichem2015  
20151215-20151220  
ホノルル(アメリカ合衆国)
  4. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Takeaki Ozawa  
Development of a genetically-encoded probe to visualize b-action mRNA in living cells based on a reconstituted GFP and an RNA binding domain PUM-HD  
Pacifichem2015  
20151215-20151220  
ホノルル(アメリカ合衆国)
  5. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Takeaki Ozawa  
Single molecule imaging of telomeric-repeat containing RNA in living cells  
9<sup>th</sup> International Symposium on Nanomedicine (招待講演)  
20151210-20151212  
三重大学(三重県津市)
  6. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Hiroki Segawa, Takeaki Ozawa  
Single molecule imaging of telomeric repeat containing RNA in living cells  
第 53 回生物物理学会  
20150913-20150915  
金沢大学角間キャンパス(石川県金沢市)
  7. 吉村英哲、山田俊理、瀬川尋貴、小澤岳昌  
テロメア RNA 生細胞内 1 分子動態の定

- 量評価法  
分析化学会第 64 年会  
20150909-20150911  
九州大学伊都キャンパス (福岡県福岡市)
8. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Hiroki Segawa, Takeaki Ozawa  
Analysis of dynamics on a non-coding RNA in living cells using a single molecule tracking approach  
JASIS RSC Tokyo international conference  
20150903-20150904  
幕張メッセ (千葉県千葉市)
  9. 吉村英哲、山田俊理、瀬川尋貴、小澤岳昌  
細胞内 1 分子動態分析に基づくテロメア RNA の作動機構解析法  
第 75 回分析化学討論会  
20150523-20150524  
山梨大学 (山梨県甲府市)
  10. Hideaki Yoshimura  
Single molecule imaging to reveal mechanisms of complex cellular systems  
NTU-SNU-UT Chemistry Symposium (招待講演)  
20150116-20150116  
台北 (台湾)
  11. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa  
Single molecule imaging of Akt on the plasma membrane in living cells  
「細胞のメゾスケール構造機能」シンポジウム  
20141213-20141213  
京都大学 iCeMS 本部棟 (京都府京都市)
  12. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa  
Single molecule imaging in living cells to reveal relationship between motions and functions of biological molecules  
8<sup>th</sup> International Symposium on Nanomedicine (招待講演)  
20141204-20141206  
愛媛大学 (愛媛県松山市)
  13. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa  
Signal transduction mechanism of Akt revealed by single molecule imaging of Akt and receptor molecules  
第 52 回生物物理学会年会  
20140925—20140927  
サッポロコンベンションセンター (北海道札幌市)
  14. 吉村英哲、小澤岳昌  
生細胞 1 分子動態分析によるシグナル伝達タンパク質 Akt の機能発現機構解明  
第 65 回分析化学会年会  
2014-0915-20140917  
広島大学東広島キャンパス (広島県東広島市)
  15. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa  
Analysis of single-molecule dynamics of signal transduction molecule Akt in living cells  
RSC-TIC JAIMA conference 幕張  
2014-0904-20140905  
幕張メッセ (千葉県千葉市)
  16. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa  
Signal transduction mechanism of Akt based on single molecule dynamics in living cells  
第 37 回内藤コンファレンス  
20140715-20140718  
ニセコヒルトンビレッジ (北海道ニセコ町)
  17. 吉村英哲、小澤岳昌  
新規蛍光プローブ開発を通じたテロメア RNA の生細胞内 1 分子動態分析  
第 74 回分析化学討論会  
20140524-20140525  
日本大学郡山キャンパス (福島県郡山市)
  18. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa  
A study of a molecular mechanism of intracellular signal transduction base on single molecule imaging  
The 2<sup>nd</sup> japan-China Symposium on Nanomedicine (招待講演)  
20140516-20140517  
広島大学霞キャンパス (広島県広島市)
  19. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Asumi Inaguma, Takeaki Ozawa: "Live cell imaging of single-molecule RNAs using PUM-HD based RNA probes  
Focus on Microscopy 2014 (FOM 2014)  
20140413-20140416  
シドニー (オーストラリア)
  20. 山田俊理・吉村英哲・服部 満・小澤岳昌: "Fluorescence Imaging of Telomeric Repeat-Containing RNA in Living Cells"  
日本化学会第 94 春季年会  
(20140327-20140330). 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市)
  21. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Hiroki Segawa, Asumi Inaguma, Takeaki Ozawa: "Analysis of RNA dynamics in living cells based on single molecule imaging" 7th International symposium on nanomedicine (ISNM2013)(招待講演).  
(20131107-20131109). 九州工業大学 (福岡県北九州市)

- |   |  |
|---|--|
| <p>22. 山田俊理・吉村英哲・服部 満・小澤岳昌 : "Single molecule imaging of endogenous telomeric RNA in living cells" 第 51 回日本生物物理学会年会 . (20131028-20131030). 国立京都国際会館 (京都府京都市)</p> <p>23. Hideaki Yoshimura: "Visualization of molecular motion in living cells using a single molecule imaging method" 錯体化学会第 6 3 回 討 論 会 ( 招 待 講 演 ). (20131103-20131105). 琉球大学千原キャンパス (沖縄県西原町)</p> <p>24. 山田俊理・吉村英哲・服部 満・小澤岳昌: "生細胞内における内在性テロメア RNA 可視化法の開発" 第 3 回 CSJ 化学フェスタ 2 0 1 3 . (20131021-20131023). タワーホール船堀 (東京都江戸川区)</p> <p>25. 山田 俊理・吉村 英哲・服部 満・小澤 岳昌: "緑色蛍光タンパク質を利用した内在性テロメア RNA の一分子イメージング法の開発" 日本分析化学会第 6 2 年会 . (20130910-20130912). 近畿大学東大阪キャンパス (大阪府東大阪市)</p> <p>26. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Asumi Inaguma, Takeaki Ozawa: "Live-cell imaging of single <math>\beta</math>-actin mRNAs through development of a specific RNA labeling method" RSC-TIC2013 (JASIS カンファレンス). (20130905-20130906). 幕張メッセ (千葉県千葉市)</p> | <p>吉村 英哲 (YOSHIMURA, Hideaki)<br/>         東京大学・大学院理学系研究科・助教<br/>         研究者番号 : 90464205</p> <p>(2)研究分担者<br/>         なし</p> <p>(3)連携研究者<br/>         なし</p> <p>(3)研究協力者<br/>         なし</p> |
|---|--|

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者