

平成30年6月13日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14773

研究課題名(和文) 超解像ライブイメージングによるRNA動態解析法の開発

研究課題名(英文) Super-resolution live-imaging of RNA molecules

研究代表者

増井 修 (Masui, Osamu)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：30579305

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)：本研究課題では、超解像顕微鏡とライブイメージングを組み合わせた超解像ライブイメージング解析法の実現を目指した。超解像ライブイメージング解析法の実現に繋がる基礎的なデータの取得を終え、また関連する研究として以下の成果を得た。
(1) RNA分子を蛍光シグナルとして検出する新しい手法を開発した (Methods Mol Biol, 印刷中)。
(2) この手法と超解像顕微鏡による解析を組み合わせ、Xist RNA とポリコーン蛋白質複合体の空間位置関係を明らかにした (Science, 2017, 356, 1081-1084)。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we aimed to develop a new microscopic technology, super-resolution live-imaging, by combining 3D-SIM and time-lapse analysis. We have succeeded in establishing the basis of super-resolution live-imaging with 3D-SIM in this study. We have also published 2 scientific papers as relating researches. (1) We have developed a new methodology to visualize RNA molecules as GFP signals (Methods Mol Biol, in press). (2) We have clarified the spatial relationship between Xist RNA and PCGF3/5-PRC1 protein complex, a subcomplex of PRC1 (Science, 2017, 356, 1081-1084).

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス non-coding RNA X染色体不活性化 Xist 超解像顕微鏡 ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

2014年のノーベル化学賞を受賞した超解像顕微鏡技術は、それまでの光学的な空間分解能 200 nm を越え、光学顕微鏡ではそれまでは見ることが出来なかった微細構造を可視化して解析することを可能とした画期的な発明であった。その後、超解像顕微鏡は顕微鏡各社から実用化されて急速に市場に普及することとなり、強力な実験ツールとなりつつあった。その潮流は RNA 研究にも及ぶこととなり、蛍光プローブを用いて可視化した RNA 分子を超解像顕微鏡で解析して、その構造的な特徴や、関連する蛋白質因子などとの空間的位置関係を詳細に解析した研究結果が各国から報告されつつあった。しかし、これらの研究報告では対象とする細胞サンプルを化学的に固定した状態で解析を行っており、次の技術的な進歩としては超解像解析を生きた細胞を用いて行い、対象とする分子の経時的変化を追って解析する超解像ライブイメージングを行うことが求められていた。超解像ライブイメージングにより、対象分子の詳細な空間的情報を時間軸に沿って追跡することが可能となり、その標的分子の動的力学、すなわち標的分子がどのくらい速く移動するのか、方向性を持って移動するのかなど、そこから多くの生物物理学的情報を得ることが出来ると期待された。

2. 研究の目的

Xist RNA は哺乳類の雌において不活性 X 染色体の形成に必須の RNA 分子であり、2 本存在する X 染色体の 1 本をヘテロクロマチン化して、そこからの遺伝子の転写を遮断する。Xist RNA は X 染色体全体を包み込むように蓄積し、さらに様々なエピジェネティクス修飾因子を X 染色体上に呼び込むことで、染色体をヘテロクロマチン化すると考えられており、Xist RNA の蓄積から実際に標的遺伝子の転写が遮断されるまでは 24~48 時間程度の

時間しか必要としないことから、そのヘテロクロマチン化の過程は非常にダイナミックであると考えられていた。従来、光学顕微鏡を用いたイメージングによる解析では、対象とする試料を化学固定した物を解析する場合が殆どであったが、Xist RNA による標的遺伝子の不活性化のように比較的短時間の間に生じる事象を解析するためには経時的なライブイメージングを行って、Xist RNA や関連が予想されるエピジェネティクス修飾因子などの動的ダイナミクスを解析する手法が有効であると考えられた。さらに前述の超解像顕微鏡を用いて超解像ライブイメージングを行うことで Xist RNA 分子の詳細な動的力学や、他の関連する分子群との相互作用などが明らかになると期待された。本研究では Xist RNA をモデルとして超解像ライブイメージングを実用化することで、Xist RNA のダイナミクスを明らかにし、さらには Xist RNA が X 染色体全体をヘテロクロマチン化する過程の詳細を解明することを目的とする。本研究により RNA 分子を用いた超解像ライブイメージングの手法を確立し、mRNA などの他の RNA 種や蛋白質にも広く適用できる汎用性の高い超解像ライブイメージング技術とその解析技法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

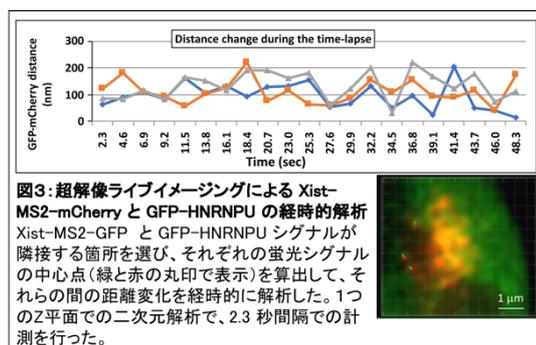
生きた細胞内で対象とする RNA を蛍光シグナルとして可視化するには GFP などの蛍光物質で対象 RNA を標識する必要がある。そのためにアプタマーと呼ばれる RNA 配列を対象 RNA 内に挿入しておき、アプタマー結合蛋白質に GFP を融合させたものを発現させることによって、標的 RNA を GFP で標識することができる (図 1)。このアプタマーを用いて対象 RNA を GFP 標識する方法には MS2 アプタマーを用いた方法などが存在しているが、細胞に対する毒性が強いのが欠点であった。本研究では、まずより細胞毒性の低いアプタマーシ

性の *Xist* 遺伝子に、さらに Bgl-GFP を *Rosa26* locus にノックインしたマウス個体の作製を試みた。その結果、作製されたマウス個体では内在性の *Xist* RNA を GFP シグナルとして可視化できることが確かめられたことから、現在この *Xist*-Bgl-GFP マウスを用いて、マウス初期発生胚での *Xist* RNA の発現変化の解析を行っている（未発表データ）。

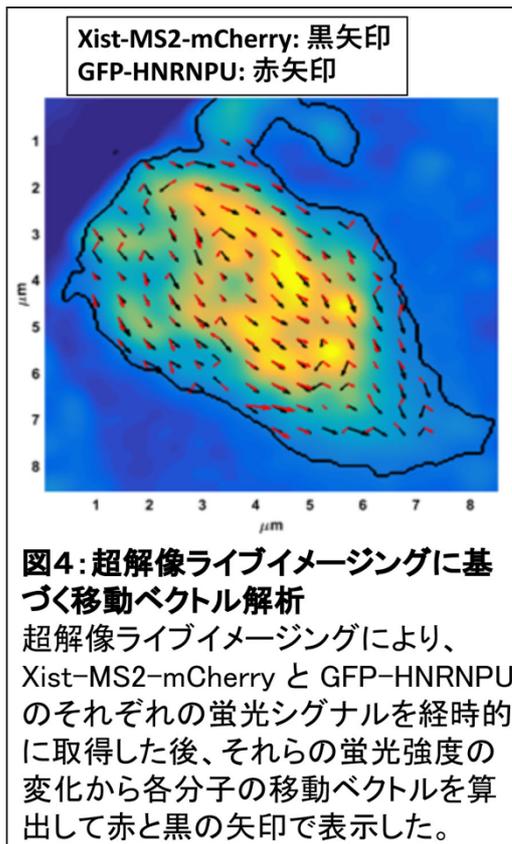
次に我々はこの *Xist*-Bgl-GFP システムを用いて、*Xist* RNA と、*Xist* RNA への結合が予想される蛋白質との空間的位置関係を明らかにするために、超解像顕微鏡による解析を試みた。Polycomb repressive complex 1 (PRC1) は標的とするゲノム DNA 領域に存在するヌクレオソーム内のヒストン H2A 蛋白質を基質としてその 119 番目のリジン残基にユビキチン分子を1つ付加することで、標的遺伝子の転写を抑制する。近年の研究により、従来は単一の複合体であると考えられてきた PRC1 が、実際には機能の異なる4つのサブ複合体に分かれて存在することが明らかになっていたことから、我々はこれら4つの PRC1 サブ複合体について固定した細胞での超解像顕微鏡による解析を行って、*Xist*-Bgl-GFP との空間的距離を計測した。その結果 PCGF3/5-PRC1 サブ複合体が他の3つのサブ複合体よりも、より *Xist* RNA の近傍に存在していることが明らかとなった。この結果は PCGF3/5-PRC1 が *Xist* RNA と直接結合していることを強く示唆する結果であった。我々はこれらの結果を *Science* 誌に報告した。

Xist-Bgl-GFP システムの固定細胞での超解像顕微鏡解析と並行して、我々は超解像ライブイメージングによる計測の条件検討を行った。この実験には主に MS2 システムを使用し、*Xist* RNA を赤色蛍光蛋白質である mCherry 蛋白質で標識し、この *Xist*-MS2-mCherry シグナルと GFP-HNRNPU の両シグナルを構造化照明法 (3D-SIM) で超解像ライブイメージングすることを試みた。HNRNPU 蛋白質は RNA と DNA の

両方に結合する活性を持つことから *Xist* RNA を X 染色体上につなぎ止める役割を持つと考えられている蛋白質であり、*Xist* RNA と HNRNPU は超解像ライブイメージングにおいて近接した空間距離を保ちながら経時的な位置変化を示すことが予想された。実際に *Xist*-MS2-mCherry と GFP-HNRNPU を発現させたマウス ES 細胞を超解像ライブイメージングにより計測したところ、両者は細胞核内でおおよそ 100 nm の空間距離を保ったまま経時的に移動することが明らかになった (図3)。



また、この時の *Xist*-MS2-mCherry と GFP-HNRNPU の両シグナルに関して、フランス Curie institute の Eldad Kepten 博士と共同研究を行い、彼が開発した解析ソフトウェアを用いて両シグナルの移動ベクトルを算出したところ、*Xist*-MS2-mCherry と HNRNPU-GFP の各シグナルは細胞核内で同方向の移動ベクトルを示すことが明らかになった (図4)。このことから両分子は直接または間接的に結合していることが示唆された。



現時点では構造化照明法(3D-SIM)により、二次元(平面)で2.3秒間隔での超解像ライブイメージングを行うことが可能となっている(図3)が、三次元(立体)での解析には1分程度の時間を要することとなり、超解像レベルで分子の動きを可視化解析するためには構造化照明法(3D-SIM)では時間分解能が不十分であることが判明しつつある。最近になり時間分解能を大幅に改善した超解像顕微鏡が各社から実用化されつつあり、今後は、それらの超解像顕微鏡を用いて、より短い時間間隔でかつ光毒性を低く抑えた条件で超解像ライブイメージングを行うことが必要であると考えられ、現在その準備を進めている。また、最近報告されたSuper-resolution radial fluctuation (SRRF)を用いることで、通常の落射蛍光顕微鏡を用いて取得した画像を超解像顕微鏡と同等のレベルまで高繊細化できることが報告されており、これを用いて光毒性を軽減した状態での超解像ライブイメージング解析法を実用化すべく取り組んでいる。

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3件)

1. Live-imaging of Xist RNA.

Masui O, Heard E, Koseki H.

Methods Mol Biol. *in press*

査読無し

2. PCGF3/5-PRC1 initiates Polycomb recruitment in X chromosome inactivation.

Almeida M, Pintacuda G, Masui O, Koseki

Y, Gdula M, Cerase A, Brown D, Mould A,

Innocent C, Nakayama M, Schermelleh L,

Nesterova TB, Koseki H, Brockdorff N.

Science. 2017 vol. 356, 1081-1084.

査読有り

Doi: 10.1126/science.aal2512

3. PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes.

Endoh M, Endo TA, Shinga J, Hayashi K,

Farcas A, Ma KW, Ito S, Sharif J, Endoh

T, Onaga N, Nakayama M, Ishikura T, Masui

O, Kessler BM, Suda T, Ohara O, Okuda A,

Klose R, Koseki H.

Elife. 2017 vol. 6, e21064.

査読有り

Doi: 10.7554/eLife.27970

[学会発表] (計1件)

Masui O, Spatio-temporal analysis of Xist non-coding RNA, X-chromosome

inactivation: a tribute to Mary Lyon,

2016 October 3-5, London (UK)

〔図書〕（計1件）

増井修、羊土社、実験医学別冊 初めてでもできる！超解像イメージング「SIMによる超解像ライブイメージング」、2016、157-167

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増井 修 (MASUI Osamu)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・研究員

研究者番号：30579305

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

Eldad Kepten (KEPTEN Eldad)

Curie Institute, France