

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06848

研究課題名(和文)人工RNA結合タンパク質によるRNA定量・制御法の開発と総和RNA量の機能解析

研究課題名(英文) Development of visualization and manipulation of RNAs based on artificial RNA-binding protein and analysis of sum total RNA

研究代表者

高井 啓 (Takai, Akira)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：60637205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RNAは細胞内で恒常性維持、個体発生、腫瘍形成など様々な生物学的機能を担っている。そのため、生きた細胞内で内在性RNAを可視化・制御する方法論は、基礎生物学のみならず医学的にも大きな意義を持つ。本申請研究では、申請者が独自に開発した人工RNA結合タンパク質を用いて新たに内在性RNAの可視化・制御法を開発した。さらにこれを応用することで、生きた細胞内における総和mRNAの可視化法を開発し、その時空間動態を解析することに成功した。以上の成果により、生きた細胞や個体発生における総和mRNA量の時空間動態と生物学的意義が明らかとなり、総和mRNAの生物学という新たな学問の創造につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果で確立した内在性RNAの可視化・制御法は従来では不可能であった非改変の内在性RNAを非破壊的に解析することを可能にし、これまでに明らかにされていなかったRNAの新たな機能解明が期待される。特に生きた細胞や個体における総和mRNAの動態に関してはこれまでに研究例がなく、新たな生物学的分野の創出にもつながると期待される。

またRNAの制御はガンなどの疾患や長期記憶の形成などへの関与が知られている。また近年のmRNAワクチンの開発など、RNA全体が社会的により身近な存在となりつつある。本研究成果がこれら医学分野に応用されることで将来的に重要な社会的意義を担うことが期待される。

研究成果の概要(英文)：RNAs play wide variety of biological functions such as homeostasis, embryonic development and tumorigenesis in cells. Thus, the methodology to visualize and manipulate endogenous RNAs in living cells would be beneficial not only for the basic biology but also for the medical science. In this study, we report the development of the method to visualize and manipulate endogenous RNAs by using originally-developed artificial RNA-binding proteins. In further application, we developed the visualization method of sum total mRNAs, which can monitor a spatio-temporal dynamics of sum total mRNAs in living cells. These results suggest that our method will elucidate spatio-temporal dynamics and biological significances of sum total mRNAs in living cells or developing embryos, which will further contribute to originate the new academic field of the sum total mRNA biology.

研究分野：細胞生物学

キーワード：RNA ライブイメージング 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

RNA の発現は恒常性維持、個体発生、腫瘍形成など様々な生命現象に関連することが知られており、その動態を可視化・定量・制御する方法は生物学的側面のみならず、将来的な医学・薬学応用の観点からも非常に重要である。近年では次世代シーケンサーを利用したトランスクリプトーム解析に比べ、MERFISH などの RNA 発現量と細胞内局在を同時に解析できる新技術の開発が次々と報告されており、生命科学分野における RNA の重要性に注目が集まっている。一方で上記の解析方法では、細胞・組織の固定・破壊操作を必要とし、そのために RNA の三次元的な位置情報が損なわれるという課題を抱えていた。この課題を克服するため、現在までに MS2 ステムループなどの RNA タグ、あるいは Broccoli などのアプタマー配列を応用した、生細胞における RNA の非破壊的な可視化・定量法の開発が進められている。しかしながらこれらの方法では標的 RNA 配列の改変が必要という別の大きな問題があり、非改変の内在性 RNA をそのまま可視化する方法論の重要性が議論されてきた。

また、ゲノム編集技術の開発・改良などにより、特定の個々の遺伝子の転写産物としての mRNA の可視化や機能解析は進んできたが、mRNA 全体の三次元的動態、およびその生物学的意義についてはこれまでにほとんど議論が進んでいなかった。mRNA 全体の発現動態の変化の一例として、脊椎動物初期胚に見られる母性-胚性転移 (maternal-zygotic transition: MZT) という現象が知られており、個体発生過程において母性 mRNA の分解と胚性 mRNA の発現亢進が起こること、この MZT が個体発生に必須であることが知られている。しかし、この総和としての mRNA 全体の量的変化が三次元組織内でどのように起こるのか、あるいは各部位における総和 mRNA 量の動態変化が発生過程においてどのような生物学的意義を持つのかについては、解析方法が限定的でありほとんどが未解明であった。

## 2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、本申請研究では新たに総和としての mRNA を可視化・定量する方法論の開発に取り組む。申請者らはこれまでに、任意の RNA 配列に結合可能な人工 RNA 結合タンパク質の開発と生細胞における内在性 RNA の可視化に成功してきた。これを応用することで、細胞の固定操作や破壊操作を必要としない総和 mRNA の定量ライブイメージング法を開発する。次にこれを応用し、生きた細胞内における総和 mRNA の動態制御法の開発に取り組む。順調に総和 mRNA の可視化・定量・制御法が開発が進めば、これらの方法をゼブラフィッシュ個体に導入し、脊椎動物個体における総和 mRNA の三次元的動態変化の実態解明、およびその生物学的意義の解析に取り組む。

## 3. 研究の方法

申請者らはこれまでに任意の RNA 配列と結合する人工 RNA 結合タンパク質を独自に作製することに成功している。本申請研究ではまず、この人工 RNA 結合タンパク質を様々な蛍光タンパク質や発光タンパク質と組み合わせることで、内在性 RNA の可視化・定量法を開発する。特に申請者らがこれまでに開発した高輝度発光タンパク質である Nano-lantern (高井ら、PNAS 2015) と組み合わせることで、高感度かつ高い定量性の RNA 可視化法の開発に取り組む。次にこの人工 RNA 結合タンパク質を様々な機能性タンパク質と融合することで、内在性 RNA の動態制御法の開発に取り組む。さらに総和 mRNA の可視化・制御のため、mRNA に共通して存在するポリ A 配列に対する人工 RNA 結合タンパク質を作製し、培養細胞において総和 mRNA 動態解析に取り組む。上記研究計画が順調に進めば、上記の総和 mRNA の可視化・制御プローブをゼブラフィッシュ個体に導入することで、脊椎動物個体、特に初期発生段階における総和 mRNA の三次元的動態変化の実態解明、およびその生物学的意義の解析に取り組む。

## 4. 研究成果

まず初めに、申請者らの開発した人工 RNA 結合タンパク質と高輝度発光タンパク質を応用した RNA の可視化・定量法について、*in vitro* および培養細胞での実験系での評価に取り組んだ。まず研究分担者である池田一穂博士の協力の元、コドンを最適化した上で大腸菌および哺乳類培養細胞での発現に適した人工 RNA 結合タンパク質発現プラスミドの高速・高効率な構築法を確立した。これを用いて人工 RNA 結合タンパク質と Nano-lantern の融合タンパク質を大腸菌発現系で発現・精製し、*in vitro* における ELISA 様アッセイで人工 RNA 結合タンパク質の活性を評価した結果、申請者らの開発した人工 RNA 結合タンパク質は標的配列を持つ RNA に対して特異的かつ高いアフィニティーで結合することが示された。次にこの人工 RNA 結合タンパク質を用いて、哺乳類培養細胞における RNA の可視化法を評価した。比較として MS2 システム、および独自に研究分担者である有吉哲郎博士が独自に開発した改良型 RNA アプタマーを用い、標的 RNA の可視化能、及び定量性について評価した。その結果、我々の人工 RNA 結合タンパク質は MS2 システムと同等かそれ以上の RNA 可視化性能を示したが、一方で定量性に関しては RNA アプタマーを用いた方法には及ばなかった。申請者らは分割型 Nano-lantern を用いて遺伝子発現などの

様々な定量化法の開発に取り組んできており、分割型 Nano-lantern と人工 RNA 結合タンパク質との併用なども検討したが、十分な改善は得られなかった。一方でその後、この際に用いた分割型 Nano-lantern を用いた遺伝子発現解析のデータ等を学術論文としてまとめあげ、一定の成果を挙げることができた（垣塚、高井ら、Chem Commun 2020）。

次に哺乳類培養細胞系を用い、人工 RNA 結合タンパク質を用いた内在性 RNA の可視化に取り組んだ。内在性 アクチン mRNA、非コード RNA である Neat1、および総和 mRNA としてのポリ A mRNA と結合する各種人工 RNA 結合タンパク質を作製し、蛍光タンパク質と融合して培養細胞に発現させた結果、いずれの人工 RNA 結合タンパク質も目的の RNA を良好に可視化することに成功した。この内在性 RNA 可視化法の更なる改善のため、SunTag システムや GFP11tag システム、およびフィードバックプロモーターを用いた発現量調節システムを応用した結果、検出感度や S/N の改善が認められた。さらに人工 RNA 結合タンパク質と共沈する RNA を免疫共沈法と定量 PCR 法を組み合わせ解析した結果、我々の作製した人工 RNA 結合タンパク質は細胞内で目的の内在性 RNA と特異的に結合していることが示された。

一方で定量性に課題があった総和 mRNA 可視化法について、細胞の転写活性状態により細胞質内と核内でのプローブの存在比率に変化が見られた。そこで画像解析により細胞の転写活性状態と核/細胞質の存在比率との関連性を解析したところ、プローブの空間情報により転写活性状態を定量することができた。以上より総和 mRNA 可視化プローブの空間情報により、転写活性状態の定量性を向上することに成功した。

次にこの人工 RNA 結合タンパク質を他の機能性タンパク質と応用することで、内在性 RNA の動態制御法の開発に取り組んだ。まず初めに内在性 RNA の局在制御を目的とし、人工 RNA 結合タンパク質をモータータンパク質であるキネシンと融合し、内在性 RNA の局在変化を検討した。その結果、標的の内在性 RNA はキネシンと融合した人工 RNA 結合タンパク質依存的に細胞突起の先端に運ばれることが示された。さらにデアニラーゼと人工 RNA 結合タンパク質を融合することで標的 RNA の翻訳抑制を検討したところ、人工 RNA 結合タンパク質依存的に標的 RNA の翻訳が抑制される活性が認められた。以上より申請者らの開発した人工 RNA 結合タンパク質は、内在性 RNA の局在・翻訳などの動態制御に応用可能であることが示された。

最後に脊椎動物個体における内在性 RNA、および総和 mRNA の解析のため、ゼブラフィッシュに遺伝子導入するための Tol2 トランスポゾンベクターに上記の人工 RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子をサブクローニングした。しかしながら 2020 年初頭から続く新型コロナウイルス感染症の感染拡大による日本国内の緊急事態宣言、およびそれに伴う所属研究機関の研究活動自粛のため、本申請研究期間内にこれ以上の実験計画に着手することが不可能であった。一方で研究自粛期間を利用して上述の画像解析やデータ解析を行い、総和 mRNA 可視化法の定量性の改善に取り組んだ。今後も引き続き本申請計画を継続することで、脊椎動物個体、特に初期発生過程における総和 mRNA 量の動態解析、および生物学的意義の解明に取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taishi Kakizuka, Akira Takai, Keiko Yoshizawa, Yasushi Okada, Tomonobu M Watanabe	4. 巻 56
2. 論文標題 An Improved Fluorescent Protein-Based Expression Reporter System That Utilizes Bioluminescence Resonance Energy Transfer and Peptide-Assisted Complementation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 3625-3628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9cc08664a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akira Takai and Yasushi Okada
2. 発表標題 Development and application of designer RNA-binding protein for live-cell imaging and manipulation of authentic RNAs
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Takai and Yasushi Okada
2. 発表標題 Development of designable RNA-binding proteins for visualization and manipulation of authentic RNAs in living cells
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Takai and Yasushi Okada
2. 発表標題 Development and application of designer RNA-binding protein for live-cell RNA imaging and manipulation of authentic RNAs in living cells
3. 学会等名 2019 ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高井啓、岡田康志
2. 発表標題 Designable RNA-binding protein for live-cell imaging and manipulation of authentic RNAs
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会大会（日本発生生物学会合同大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高井啓、岡田康志
2. 発表標題 Development of programmable RNA-binding protein and its application for live-cell imaging and manipulation of authentic RNAs
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高井啓、岡田康志
2. 発表標題 Development of designer RNA-binding protein for live-cell imaging and manipulation of authentic RNAs
3. 学会等名 2018 ASCB EMBO Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高井啓、岡田康志
2. 発表標題 デザイナーRNA結合タンパク質の開発と内在性RNAの可視化・制御法への応用
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Takai and Yasushi Okada
2. 発表標題 A customizable RNA-binding protein for the visualization and manipulation of endogenous RNAs in living cells
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回 日本生理学会大会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	有吉 哲郎  (Ariyoshi Tetsuro)  (00782103)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・客員研究員   (12601)	
研究 分担者	池田 一穂  (Ikeda Kazuho)  (20642565)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師   (12601)	

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
---------	---------