

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22654

研究課題名(和文) in situ seq法を応用したRNAの転写後プロセスの網羅的な空間情報解析

研究課題名(英文) Analyses of post-transcriptional regulation of RNA by in situ sequencing

研究代表者

砂留 一範 (Sunadome, Kazunori)

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：60872992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトとマウスの筋細胞に対してHybISS(hybridization-based in situ sequencing)による空間トランスクリプトミクス解析を行い、遺伝子間、種間でRNA局在パターンに大きな違いがある事が分かった。マウスに比べヒトの細胞では、スプライシングが終了し成熟フォームとなったRNAが核に留まる割合が高い事が分かった。また、細胞に静的な張力がかかった状態ではこれらRNAの核外移行が促進される事が分かった。以上の結果は、スプライシング後の核外移行のタイミングに種間の違いがある事と、細胞に働く張力とRNAのスプライシングや細胞内局在との間に何らかの関係がある事を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タンパク質の設計図であるRNAが細胞内のどこにどのタイミングで配置されるか、筋細胞をモデルにヒトとマウスの違いについて空間トランスクリプトミクス技術を用いて解析し、遺伝子間、種間のRNA局在パターンの多様性を明らかにした。ヒトと他の哺乳類の細胞システムの違いを生み出す要因について未だ多くの事が分かっておらず、本研究を元に種の特異性を制御する、遺伝子の転写後調節システムの解明が進む事が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, RNA localization pattern in muscle cells from human and mouse was examined with hybridization-based in situ sequencing (HybISS). The results revealed the gene-to-gene and species-to-species diversity of RNA localization pattern. Particularly, transcripts in human tend not to be exported after splicing compared to mouse. Also, nuclear export of these RNA molecules was enhanced with imposed static tension. These results suggest the relation among RNA splicing, localization, and static tension, which could produce differences in cellular system of species.

研究分野：分子生物学

キーワード：空間トランスクリプトミクス 転写後制御 スプライシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋やそれを支配する運動神経はヒトで数十センチメートルにもおよぶ細胞から成るが、このような巨大な細胞では細胞内の必要な場所に転写産物を局在させる事が輸送上のコストから重要である。転写産物の輸送と翻訳を含めた転写後制御はヒトと他の生物の細胞システムの違いを生み出す要因となる事が考えられるが、多くの事が未解明である。

2. 研究の目的

空間情報を保持したトランスクリプトーム解析法である *in situ* sequencing を応用し、骨格筋や運動神経において遺伝子の転写後プロセスの空間情報を網羅的に解析し、ヒトとマウスにおいて転写後調節システムの違いが転写産物の細胞内動態、さらには細胞システムに与える影響を明らかにする。

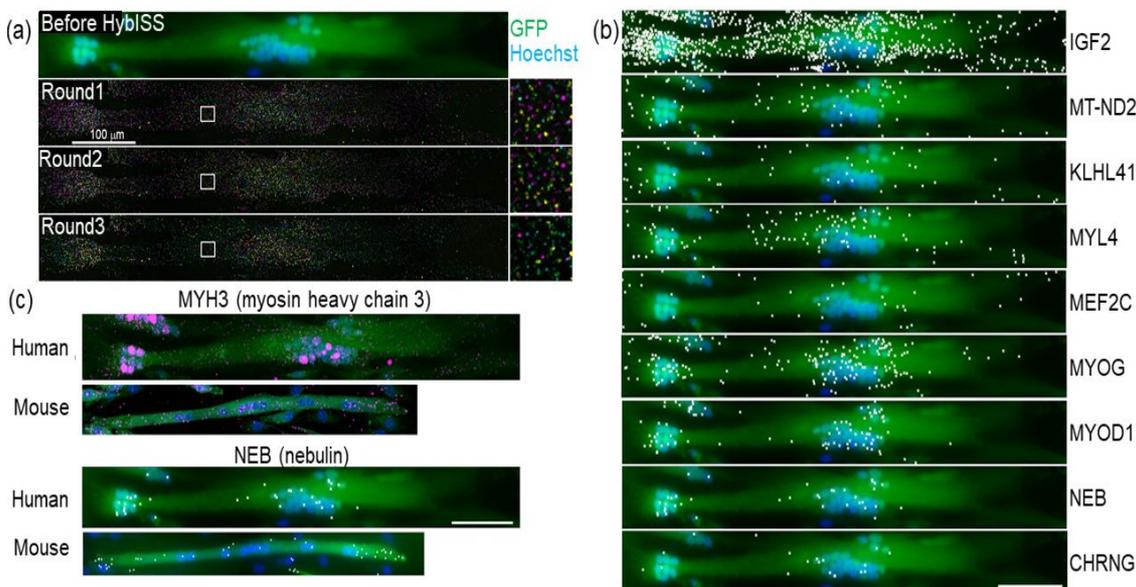
3. 研究の方法

一般的な単一細胞解析はサンプル調整の段階で細胞を組織から単離する必要があるために、細胞の持つ形態や、組織や細胞内での転写産物の位置などの情報を失ってしまう。近年この弱点を補う空間トランスクリプトミクス方法として、バーコードを付加した DNA プローブを、固定した組織にハイブリダイゼーションさせ、そのバーコードを fluorescent in situ hybridization (FISH) を繰り返す事で検出する事により、同一サンプルで遺伝子の多重解析を数 1000 の単位で行う方法が報告されている。その中の一つ、Hybridization-based in situ sequencing (HybISS) は Mats Nilsson のグループによって開発された (Gyllborg et al., (2020) *Nucleic Acids Res.* **48**: e112, Ke et al., (2013) *Nat. Methods.* **10**: 857-60)。本研究ではこの技術に応用し、転写中の RNA、スプライシングの終わった成熟 RNA、翻訳中の RNA を同時に可視化し、各転写産物の状態と位置を網羅的に可視化する。これをマイクロデバイス上で培養した筋肉、運動神経系オルガノイドに使用し、ヒト、マウスの細胞システムの違いを明らかにする。

4. 研究成果

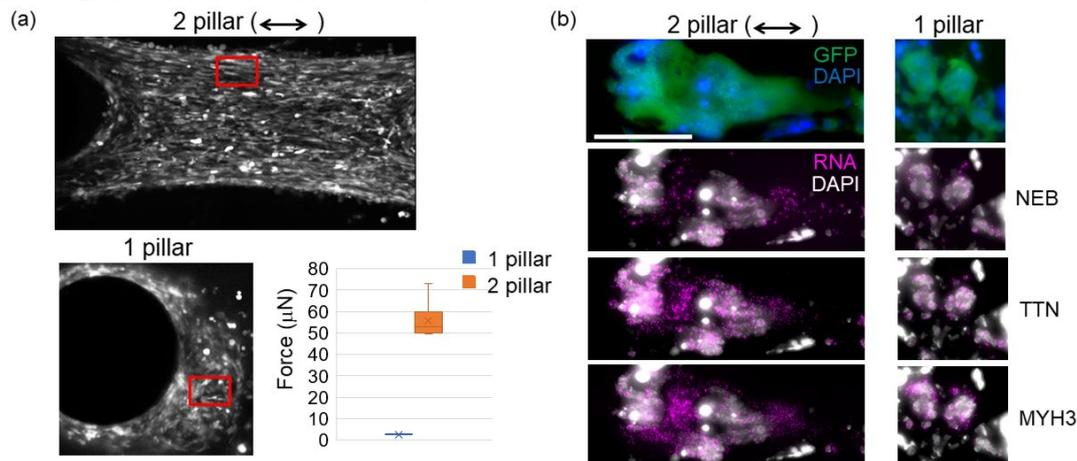
本研究課題では HybISS を応用し、転写後調節の各段階にある RNA の位置情報を取得する事を目的としている。この技術開発と並列して、通常の HybISS と筋肉オルガノイドの実験系の樹立を行い、以下の結果を得た。

ディッシュ上で培養したヒトとマウスの筋細胞に対して、約 40 遺伝子に対するエクソンジャンクション部分を標的とした HybISS を行った (図 1)。ヒト、マウス、それぞれにおいて、転写産物の核からの距離は遺伝子ごとに大きく異なった。全体的な傾向として、マウスに比べヒトの細胞では、スプライシングが終了し成熟フォームとなった RNA が核に留まる割合が高い事が分かった。特に、NEB、MYH3、TTN など筋収縮に関する遺伝子にこの傾向が見られた。ヒトとマウスの分化過程において、これら筋特異的遺伝子の RNA 量のタイムコースに大きな変化は見られず、ヒトの細胞では転写、スプライシング後に何らかのメカニズムで核外搬出を遅らせるメカニズムが存在する事を示唆している。



(図 1) (a, b) ヒト筋細胞における HybISS。3 ラウンド 4 色のイメージング(a)と、結果の 1 部について示す(b)。 (c) ヒト(Hu5)とマウス(C2C12)の HybISS における nebulin と myosin heavy chain 3 の比較

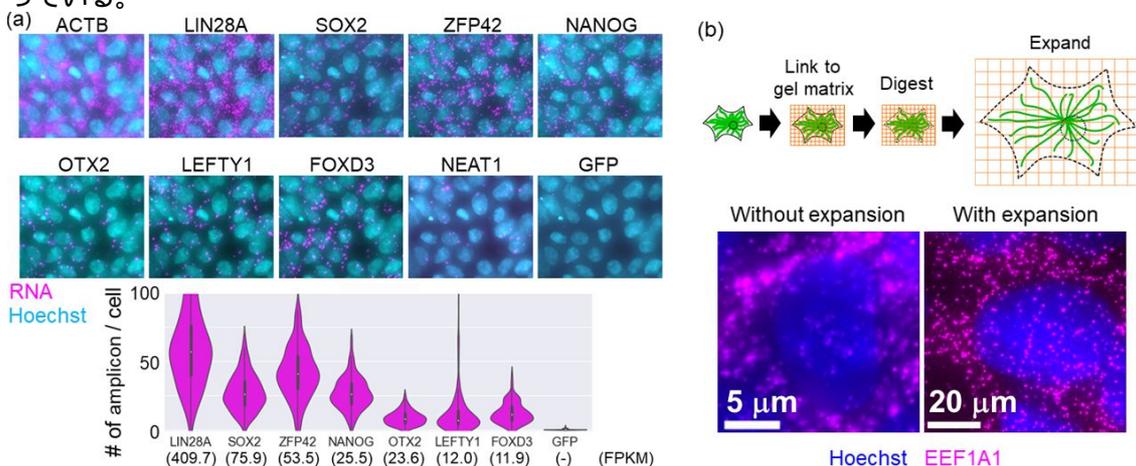
マイクロデバイスを用いて、ヒト筋肉オルガノイドを培養し、張力に対する転写産物の影響を調べた (図 2)。繊維にかかる張力は、筋肉の支点の数を選擇する事により変化させた。興味深い事に、支点が1つで張力がない状態 (1 pillar) では NEB、MYH3、TTN の RNA は核内に存在するのに対して、支点が2つで張力が存在する状態 (2 pillar) では、これら RNA は核外へと搬出されていた。この事は、転写産物の核外搬出や細胞内での拡散において、細胞にかかる力が何らかの影響を及ぼす事を示唆している。



(図 2) ヒト筋細胞を2つの支点 (2 pillar) あるいは1つの支点 (1 pillar) で培養し、HybISSを行った (b)。

本研究課題を遂行するための以下の技術開発を行った。1つは、HybISSの遺伝子検出効率の改善である。HybISSの遺伝子検出効率は2-5%程度である (つまり100分子のmRNAがあれば2-5分子のスポットが検出できる)。これは細胞内でのmRNAの位置を解析するには十分であるものの、転写中のRNAのような量の少ないもの、また、細胞内で特定の狭い空間に存在するRNAや、RNAとRNAの共局在について解析を行うには不十分である。HybISSの検出効率をあげるために、プローブの構造やバーコードのamplificationについて改変を行い、逆転写をせずに直接パドロックプローブをハイブリさせ、隣接する別のプローブを起点にrolling circle hybridizationを行う方法を開発した。これにより、検出効率が30%程度にまで改善した (図 3a)。また、この方法を用いてミトコンドリア遺伝子のRNAとミトコンドリアタンパク質であるCOXIVの局在を観察した所、想定された通り共局在した。

当初の予定では翻訳中のmRNAを検出するために、抗リボソーム抗体に付加したオリゴを起点に近傍のパドロックプローブに対してrolling circle amplificationを起こす事を予定していた。しかし、非特異的なシグナルを排除する事が難しく、方針を転換し、翻訳が起きている場所をイメージングし、その空間にあるRNAを改良版HybISSで特定する事に切り替えた。翻訳が起きている場所はpuromycylation assayや、あるいはsunTagプローブを用いて蛍光ラベルできる。私の手でpuromycylation assayを行った所、既報通り直径が数マイクロメートル程度のスポットが観察された。この領域に翻訳を受けている転写産物が集積していると考えられるが、改良版HybISSで検出されるRNAスポットは0.5-1μmであるために、解析に十分な空間が存在しない。そこでexpansion microscopy (Chen et al., (2015) *Science* 347: 543-548,) によりサンプルを物理的に拡大し、これに改良版HybISSを用いるプロトコルを確立した (図 3b)。Expansion microscopyによりサンプルは30倍以上の体積をもつようになるため、翻訳スポットに存在する大量のRNAを同時に解析できると考えている。現在、puromycylation assay染色との両立性について検討を行っている。



(図 3) (a) 改良版 HybISS による遺伝子検出効率。発現量の目安として bulk RNA-seq における FPKM 値を示す。ddPCR の結果から細胞あたりの RNA コピー数は SOX2: 90.8, NANOG: 75.0, OTX2: 23.3 (b) expansion microscopy で体積を拡大した細胞に改良版 HybISS を行った (右図)

また、本研究課題で使用了 HybISS の技術を使い、京都大学 ASHBi の Cantas Alev 博士と共同研究で、ヒト iPS 細胞から樹立した体節形成体において HOX 遺伝子群のマッピングを行った (Yamanaka et al., (2015) *Biorxiv* <https://doi.org/10.1101/2022.06.03.494621>)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Yoshihiro Yamanaka, Kumiko Yoshioka-Kobayashi, Sofiane Hamidi, Sirajam Munira, Kazunori Sunadome, Yi Zhang, Yuzuru Kurokawa, Ai Mieda, Jamie L. Thompson, Janet Kerwin, Steven Lisgo, Takuya Yamamoto, Naomi Moris, Alfonso Martinez-Arias, Taro Tsujimura, Cantas Alev	4. 巻 -
2. 論文標題 Reconstituting human somitogenesis in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 biorxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.06.03.494621	査読の有無 無
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0件

〔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

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		
ドイツ	Department of Physics	University of Erlangen-Nuremberg	