

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06745

研究課題名（和文）新規RNA制御プローブによるRNA顆粒の動態解析と操作

研究課題名（英文）Phase-separation dynamics of pathogenic RNA granules revealed by visualization and manipulation method of endogenous RNA

研究代表者

高井 啓 (Takai, Akira)

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：60637205

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：RNA顆粒の形成は液-液相分離によって制御され、ガンや筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経変性疾患に関与することが知られている。特に神経変性疾患では、RNA顆粒構成タンパク質の変異などによりRNA顆粒が液相からゲルへと相転移し、細胞毒性へと繋がるということが報告されている。一方でRNAそのものがRNA顆粒の相分離動態や細胞毒性にどのように関与するかはほとんど明らかになっていない。本研究では新たに病原性RNAの可視化・制御法を開発することで、病原性RNA顆粒の相分離動態をRNAレベルから明らかにし、生きた細胞におけるRNA顆粒動態の生理学的機能の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでは技術的な限界のため、RNA顆粒の液-液相分離動態の解析はRNA顆粒構成タンパク質側からのアプローチがほとんどであった。一方で2017年NatureでのJainとValeの報告により、非翻訳領域のRNA反復配列そのものが病原性のRNA顆粒形成を担うという説が提唱され、既存法ではアプローチ困難なRNA顆粒の特性が明らかになってきた。本申請研究ではこの課題にRNA側からアプローチする新たな解析法を提唱し、病原性のRNA顆粒におけるRNAそのものの病理学的意義の一端を明らかにした。今後はこのRNAそのものの病理学的意義を指標に、新たな疾患治療法の開発や創薬に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The formation of RNA granules is regulated by liquid-liquid phase separation, and is known to be involved in tumorigenesis and neurodegenerative disorders such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Especially in neurodegenerative disorders, it has been reported that RNA granules undergo a phase transition from liquid phase to gel phase due to mutations in RNA granule component proteins, leading to cytotoxicity. On the other hand, it is still unclear how RNA itself is involved in the phase separation dynamics of RNA granules and cytotoxicity. In this study, I developed a novel method for visualization and manipulation of pathogenic RNA to clarify the phase separation dynamics of RNA granules from the RNA level, and elucidated some of the physiological functions of RNA granule dynamics in living cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：RNA ライブイメージング 液-液相分離

### 1. 研究開始当初の背景

RNA 顆粒は疾患、個体発生やストレス応答など様々な生命現象に関与し、RNA 顆粒の液-液相分離の制御が創薬の標的として注目されている (Shiina, *JBC* 2019)。最近では、パラスペククルなどの核内スペククルも液-液相分離で制御される RNA-タンパク質複合体であることが報告され、構造 RNA (arcRNA) という"広義の RNA 顆粒"の形成に共通するメカニズムが提唱されている (Ninomiya et al., *EMBO J* 2020)。RNA 顆粒は非常に動的であるため、細胞から精製してその動態を解析することは困難であり、細胞内での動態解析にはライブイメージング法が必須となる。そのため、これまでは主に、GFP などの蛍光タンパク質と融合した RNA 顆粒構成タンパク質を用いて動態解析が行われてきた。一方で RNA 顆粒を構成する RNA を可視化する方法として、標的 RNA 配列に MS2 ステムループなどの RNA タグを挿入する方法が開発されている。しかしながら、ゲノム編集などにより RNA タグの導入が必要なこと、この RNA タグの導入が標的 RNA を安定化してしまうという問題点がある。加えて、非コード RNA のように機能領域が不明な RNA の場合、どこに RNA タグを導入すべきかがわからない。これらのことから、RNA を非改変のまま可視化・操作する方法論の開発が期待されていた。

一方、遺伝性の神経変性疾患の患者に見られる反復配列を有する RNA が、液-液相分離を介して核内に RNA 顆粒様の凝集体を形成する事が報告された (Jain & Vale, *Nature* 2017)。興味深いことにこの RNA は、*in vitro* において RNA 単独で凝集体を形成する。このことは、"なぜイントロンなどの非翻訳領域に形成された反復配列が病原性を示すのか"、という長年の謎の解明につながる発見である。一方で、どのように RNA 凝集体が形成され、どのように病原性を示すのか、この RNA 凝集体を構成する RNA 結合タンパク質は何なのかの詳細は明らかにされていなかった。

### 2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、本研究計画では RNA 凝集体を含む"広義の RNA 顆粒"に関して、(1)液-液相分離を介した RNA 顆粒形成における RNA 顆粒動態のライブイメージング法の開発、(2)人工 RNA 結合タンパク質と機能性タンパク質を融合した内在性 RNA 操作法の開発、(3)反復配列 RNA を含む RNA 顆粒の可視化・制御法への応用と RNA 顆粒の機能解析、の研究課題に取り組む。これは RNA レベルから RNA 顆粒の動態と機能を解明することを目的としたものであり、従来の RNA 顆粒構成タンパク質を用いた解析とは異なる極めて独自性の高い研究計画である。特に、本研究の人工 RNA 結合タンパク質を用いた RNA 可視化・制御法は、非改変の内在性 RNA を標的にできるため、(1)ゲノム編集の必要がなく簡便であり、(2)RNA タグのように標的 RNA の機能や安定性に影響せず高い信頼性で内在性 RNA を解析できる、という点で優れている。今後は本法が RNA タグに置き換わり、RNA 顆粒のみならず広く RNA 研究分野に応用されることで、RNA レベルから見た生命科学分野を新たに切り拓くものと期待される。また、RNA 顆粒の液-液相分離や相転移における"RNA の動態"を標的にした創薬は前例がなく、全く新しい作用機序の治療薬の開発が期待できる。加えて、標的遺伝子のゲノム編集が不要であるため、患者に対する治療法の開発などの臨床応用も期待できる。

### 3. 研究の方法

申請者はこれまでに、モチーフ構造からなる RNA 結合タンパク質を基に、任意の RNA 配列に結合するようデザイン可能な人工 RNA 結合タンパク質を独自に開発した。人工 RNA 結合タンパク質は、標的 RNA の塩基配列に対してモチーフ構造をカスタマイズすることで、標的 RNA 配列の改変なしに標的 RNA と特異的に結合できる画期的なタンパク質プロープである。この人工 RNA 結合タンパク質を GFP などの蛍光タンパク質と融合して生細胞に発現させることで、生きた細胞内の RNA 顆粒の動態を可視化する。人工 RNA 結合タンパク質は遺伝子工学的に他の機能タンパク質と融合することで、機能を容易に付加させることができたため、次に人工 RNA 結合タンパク質を RNase や RNA 編集酵素である APOBEC と融合したものを作製し、エンドヌクレアーゼ活性や RNA 編集活性によって RNA 顆粒の形成抑制効果が見られるかどうかを検討する。以上により、内在性 RNA の動態制御法を開発する。

次に上記の RNA 可視化・制御法を、ハンチントン病などに見られる CAG 反復配列、および ALS などに見られる GGGGCC 反復配列に応用することで、病原性 RNA 顆粒の可視化・制御法の開発に取り組む。特に液相・固相(ゲル)などの状態変化は固定した細胞では評価不可能なため、必要であれば生細胞における顆粒内の RNA の拡散性を、FRAP(光褪色後蛍光回復)法や FCS(蛍光相関分光)法を用いて評価する。また人工 RNA 結合タンパク質が正しく病原性 RNA 顆粒を可視化できているかどうかについては、RNA アプタマーを用いた RNA 可視化法や蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法などを用いて確認する。

上記の RNA 顆粒可視化・制御法の確立が順調に進めば、最後に患者由来の iPS 細胞から作製した神経細胞に応用し、内在性の反復配列からなる病原性 RNA 顆粒の可視化と動態変化、および細胞毒性との関連性を解析する。さらに ALS モデルゼブラフィッシュなどを用いることで、

個体レベルでの病原性 RNA 顆粒動態および細胞毒性の関連性の詳細を解析する。

#### 4. 研究成果

まず初めに、申請者が独自に開発した人工 RNA 結合タンパク質の性能評価を行った。同様に申請者が独自に開発した高輝度発光タンパク質 (Takai et al., *PNAS* 2015) と併用することで、*in vitro* および細胞内において、人工 RNA 結合タンパク質が標的 RNA に高い特異的とアフィニティーで結合することを確認した。さらにこの人工 RNA 結合タンパク質を GFP などの蛍光タンパク質と融合して生細胞に発現させることで、非改変の内在性 mRNA を可視化することに成功した。mRNA は亜ヒ酸処理などのストレス下において、液-液相分離により形成されるストレス顆粒という RNA 顆粒に集積する。そこでベータアクチン mRNA やポリ A 鎖に対する複数の人工 RNA 結合タンパク質を構築し、このストレス顆粒形成の動態解析を試みたところ、作製したすべての人工 RNA 結合タンパク質においてストレス顆粒の形成動態をライブイメージングすることができた。一方で mRNA に結合しないように作製した人工 RNA 結合タンパク質ではこのような現象は見られず、申請者の作製した新規内在性 RNA 可視化プローブは標的とする mRNA を特異的にライブイメージングできていることが示された。さらに同様の方法を用いて、液-液相分離により形成される核内 RNA 顆粒として知られるパラスペックルの可視化にも成功した。以上より申請者の開発した人工 RNA 結合タンパク質を応用することで、生細胞において液-液相分離を介した”広義の RNA 顆粒”の動態を可視化することが可能であることが示唆された。

次に人工 RNA 結合タンパク質を応用した内在性 RNA の動態制御法の開発に取り組んだ。人工 RNA 結合タンパク質は遺伝子工学的に他の機能タンパク質と融合し、機能を容易に付加させることができる。そこで人工 PPR をモータータンパク質と融合し、内在性 RNA の局在操作を試みたところ、内在性 mRNA を細胞突起の先端に局在変化させることに成功した。このことから、人工 RNA 結合タンパク質は機能性タンパク質と融合することにより内在性 RNA の動態操作プローブとして応用可能であることが示された。同様に、人工 RNA 結合タンパク質を RNase と融合したもの、および RNA 編集酵素である APOBEC と融合したものを作製すれば、前者はエンドヌクレアーゼ活性による RNA 分解、後者は C を U に変換する RNA 編集活性により、RNA 顆粒の形成抑制ツールとして応用できることが期待された。

ハンチントン病患者ではしばしば CAG 反復配列が見られ、さらにその転写産物である CAG 反復配列を含む RNA は液-液相分離を介して RNA 顆粒を形成することが報告されている。そこで申請者は、この CAG 反復配列に結合する人工 RNA 結合タンパク質をデザイン・構築し、CAG 反復配列を持つ RNA を細胞に発現させ、その動態を可視化できるかどうかを検討した。しかしながら予備的な結果では、RNA 顆粒と思われる構造は可視化することができなかった。そこで CAG 反復配列を含む RNA が本当に RNA 顆粒を形成しているかを確認するため、CAG 反復配列の 3' 下流に RNA アプタマー配列を融合し、アプタマー配列を可視化することで RNA 顆粒が観察できるかどうかを検討した。CAG 反復配列の長さの異なる複数の RNA 発現コンストラクトを作製して検討したところ、いくつかのコンストラクトに関しては RNA 顆粒様のシグナルが観察された。RNA 顆粒様のシグナルが観察されなかったものについては、RNA が発現しているながら RNA 顆粒が形成されなかった可能性、あるいは RNA の発現そのものが無い又は少なかった可能性が考えられた。この実験と並行して RNA 顆粒内の RNA 拡散性を解析するための FRAP 実験系を確立したが、RNA アプタマーを用いた方法では原理上、FRAP が起きない (起きたとしても、それは RNA の拡散性を反映した物ではなく RNA アプタマーの蛍光色素の拡散性を反映したものとなる)。よって RNA 顆粒内の RNA 拡散性の変化などの動態解析のためには、人工 RNA 結合タンパク質を用いた RNA 可視化法などの RNA アプタマーではない方法が必要と考えられた。

CAG 反復配列のうち、RNA アプタマー配列を用いた RNA 顆粒の可視化に成功していたものについて、人工 RNA 結合タンパク質を用いることで RNA 顆粒が可視化できるかどうかを検討した。しかしながらやはり以前の結果の通り、人工 RNA 結合タンパク質を用いた方法では RNA アプタマー配列を用いた方法で見られたような RNA 顆粒を可視化することはほとんどできなかった。これらの結果から、(1) RNA 顆粒は形成されていても人工 RNA 結合タンパク質では RNA 顆粒を可視化できない可能性、あるいは (2) RNA 顆粒が形成される条件で人工 RNA 結合タンパク質が発現することで RNA 顆粒の形成が阻害される可能性が考えられた。そこで次に人工 RNA 結合タンパク質の標識を GFP から RFP に変更し、緑色蛍光の RNA アプタマー配列を用いた RNA 顆粒可視化法と併用して (1) および (2) の可能性を検討した。すると人工 RNA タンパク質を共発現した場合には RNA アプタマーによる RNA 顆粒がほとんど存在しなくなるという結果が得られ、CAG 反復配列に対する人工 RNA 結合タンパク質そのものが RNA 顆粒の形成を阻害するという (2) の可能性が考えられた。これは、病原性 RNA 顆粒の形成はその RNA 配列にタンパク質を結合させるだけで阻害される可能性を示唆しており、今後の病原性 RNA 顆粒に関わる疾患の治療法の開発に役立つ大きな発見と考えられた。その一方で CAG 反復配列に対する人工 RNA 結合タンパク質そのものが RNA 顆粒形成を阻害するのであれば、CAG 反復配列に対する人工 RNA 結合タンパク質は RNA 顆粒の可視化法としては応用できない。今後は RNA 顆粒の可視化法として

、CAG反復配列そのものではなくCAG配列の5'側あるいは3'側の配列に結合する人工RNA結合タンパク質を使用することで、RNA顆粒を可視化しながらその動態制御と動態変化の解析を試みる予定である。この実験系が順調に確立できれば、ハンチントン病患者由来のiPS細胞を用いた内在性の病原性RNA顆粒の可視化と動態制御、およびALSモデルゼブラフィッシュを用いた個体レベルでの病原性RNA顆粒の可視化と動態制御を行なっていく。以上の新規RNA制御アプローチを応用したRNA顆粒の動態解析と操作により、病原性RNA顆粒動態の生理学的機能の解明を目指す。

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 Onai Takayuki, Aramaki Toshihiro, Takai Akira, Kakiguchi Kisa, Yonemura Shigenobu	4. 巻 オンラインバージョン
2. 論文標題 Cranial cartilages: Players in the evolution of the cranium during evolution of the chordates in general and of the vertebrates in particular	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Evolution & Development	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ede.12433	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akira Takai, Yasushi Okada
2. 発表標題 Development of genetically encodable tool for live-imaging and manipulation of endogenous RNAs in living cells
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高井啓、岡田康志
2. 発表標題 非編集の内在性RNAを可視化・制御する遺伝子にコード可能なプローブの開発
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高井啓、岡田康志
2. 発表標題 非編集の内在性RNAのライブイメージング・動態制御のためのカスタム化RNA結合タンパク質の開発
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高井啓、岡田康志
2. 発表標題 Genetically encodable tool for live-imaging and manipulation of endogenous RNAs in living cells
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高井啓、岡田康志
2. 発表標題 生細胞における内在性RNAの可視化・制御のためのカスタマイザブルRNA結合タンパク質の開発
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022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	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
---------	---------