

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16319

研究課題名（和文）膜の無い構造体における蛋白質-RNA相互作用の役割の解明

研究課題名（英文）Analysis of protein-RNA interactions in membraneless organelles

研究代表者

山本 圭太（Yamamoto, Keita）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：70899301

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内には複数の蛋白質と核酸によって形成される膜の無い構造体（MOs：Membraneless Organelles）が多数存在している。MOsは細胞内で様々な機能を有していると考えられるが、その生物学的役割の多くは未解明である。本研究は、代表的なMOsの一つであるパラスペックルを対象に、MOs形成における蛋白質-RNA相互作用の役割を明らかにすることを旨とし、「BiFC-dCas13」「NanoBiT-dCas13」「split-TurboID-dCas13」の三つの技術の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内には膜のない構造体と呼ばれる蛋白質とRNAの複合体が多数あります。その役割については大部分が未解明です。膜のない構造体の機能を明らかにするため、RNAを標的とするCRISPR/CasシステムのCRISPR/Cas13とBiFC、NanoBiT、Split-TurboIDの三つの技術を組み合わせた新しいシステムを開発し、代表的な膜の無い構造体「パラスペックル」の解析を行いました。

研究成果の概要（英文）：Inside the cells, there are many structures composed of proteins and nucleic acids. Because they exist without membranes, they are called membraneless organelles (MOs). MOs are expected to have a lot of functions, most of which have not been elucidated. To establish the technique to analyze the function of MOs, we combined CRISPR/Cas13 systems and BiFC, NanoBiT, and Split-TurboID, and developed novel methods. We named them BiFC-dCas13, NanoBiT-dCas13, and Split-TurboID-dCas13, respectively. They are useful for understanding the interaction between protein and RNA, which is important for MOs.

研究分野：医学

キーワード：CRISPR/Cas13 膜の無い構造体 BiFC NanoBiT Split-TurboID

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内には様々な役割を持った蛋白質や核酸が存在している。これらの蛋白質や核酸は全て均一に分布しているわけではなく、一部は巨大な複合体となり高次構造体として存在している。複数の蛋白質と核酸によって形成される高次構造体は、脂質二重膜によって形成される古典的なオルガネラと対比して、膜のない構造体 (membraneless organelles : MOs) と呼ばれる。MOs は細胞内で様々な機能を有していると考えられ、転写制御や DNA 三次元構造の変化、ストレス応答など幅広い生理現象に関与していることが明らかになってきている。様々な生物学的意義を持つと考えられる MOs ではあるが、大部分の機能は未解明である。

代表的な MOs のパラスペックルは長鎖ノンコーディング RNA の NEAT1 と NONO などの複数の RNA 結合蛋白質が複合して形成される MOs である。パラスペックルを含む多くの MOs は蛋白質-RNA 相互作用によって形成される複合体であると考えられ、この構造体の包括的な評価のためには蛋白質と RNA の関係性を多角的に評価できる方法の開発が不可欠である。CRISPR/ Cas13 system ( Cas13) は crRNA を介して任意の RNA に Cas 蛋白質を誘導し切断する RNA ノックダウン技術である。また、核酸切断活性を不活化した catalytic-dead Cas13 ( dCas13) をエフェクターと融合させる事で、標的 RNA に特異的な現象を誘導する技術へと応用されている。申請者は標的 RNA を特異的に認識する Cas13 の性質と、3 つの蛋白質相互作用解析技術「BiFC」「NanoBiT」「Split-TurboID」を組み合わせることで、RNA-蛋白質相互作用の研究に活用することが出来る新しい技術が出来るのではないかと着想した。本研究ではこの着想に基づき、「BiFC-dCas13」「NanoBiT-dCas13」「split-TurboID-dCas13」を開発し、代表的な lncRNA である NEAT1 による高次構造体の形成を観察することを目標とした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、代表的な MOs の一つ「パラスペックル」を対象に「BiFC-Cas13」「NanoBiT-Cas13」「split-TurboID-Cas13」を用いて解析を行い、パラスペックルの形成における蛋白質-RNA 相互作用の役割を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### 細胞培養

293T 細胞の培養には 10%のウシ胎児血清および 1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM を用いた。K562 細胞の培養には 10%のウシ胎児血清および 1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した RPMI を用いた。

#### クローニング

本研究に用いたすべてのプラスミドは、制限酵素処理を行ったプラスミド DNA に PCR 増幅産物またはアニーリングしたオリゴヌクレオチドを挿入し作成した。DNA の PCR 増幅には Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ( NEB) を用いた。プラスミド DNA と PCR 増幅産物の結合には NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix ( NEB) を使用した。またプラスミド DNA とオリゴヌクレオチドのライゲーション反応には DNA Ligation Kit < Mighty Mix > ( Takara) を用いた。形質転換には NEB 5-alpha Competent E. coli ( NEB) を用いた。

#### 遺伝子導入

293T 細胞への遺伝子導入は Polyethylenimine を用いた化学的トランスフェクション法により行った。

#### 遺伝子編集

K562 細胞の遺伝子編集は、アデノ随伴ウイルス ( AAV) と CRISPR/Cas9 Virus Like Particle ( Cas9-VLP) を用いて行った。AAV および Cas9-VLP は、リン酸カルシウム法によってプラスミド DNA を化学的トランスフェクションした Producer 細胞 ( 293T 細胞) の培養上清より回収して作成した。

#### 蛍光顕微鏡観察

BiFC の評価のために、遺伝子導入した 293T 細胞を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。観察には生細胞および、ホルムアルデヒド固定をした細胞を用いた。NEAT1 RNA-FISH には NEAT1 middle segment with Quasar 570 Dye ( LGC Biosearch Technologies)を用いた。NONO の蛍光免疫兼職には抗 NONO 抗体 ( Santa Cruz Biotechnology) を用いた。細胞の蛍光観察には EVOS M7000 Imaging System または共焦点レーザー顕微鏡システム A1 ( Nikon) を用いた。取得画像の解析には ImageJ を用いた。

#### FACS Analysis

BiFC の評価のために、遺伝子導入した 293T 細胞を用いて FACS Analysis を行った。データの取得には FACS Aria および FACSDiva software (BD Biosciences) を用いた。データの解析には Flowjo (BD Biosciences) を使用した。

#### Luciferase Assay

NanoBiT の評価のために、遺伝子導入した 293T 細胞を用いて Luciferase Assay を行った。96 well plate に播種した 293T 細胞に遺伝子導入を行い、Nano-Glo Live Cell Assay System (Promega) を添加後に発光シグナルを FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) を用いて検出した。

#### 近接依存性標識法

Split-TurboID を用いた近接依存性標識法を実施した。遺伝子導入した 293T に 50 $\mu$ M または 500 $\mu$ M のピオチンを投与し 24 時間後に回収した。回収した細胞から蛋白質を抽出し、Dynabeads M-280 Streptavidin (Thermo Fisher) を用いて免疫沈降した。Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行い、抗ピオチン抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いたウエスタンブロッティング法により蛋白質のピオチン化を評価した。免疫沈降後の蛋白質サンプルを質量分析に供し、RNA-蛋白質複合体の構成因子を網羅的に解析した。質量分析の解析には Metascape (<https://metascape.org/>) を用いた。

### 4. 研究成果

#### 「BiFC-dCas13」「NanoBiT-dCas13」「split-TurboID-dCas13」の作成

RNA 切断活性を不活化した dCas13 に「BiFC」「NanoBiT」「split-TurboID」の分割エフェクター (VC と VN、LgBiT と SmBiT、TbN と TbC) を結合した融合蛋白質を作成した。パラスペックル構成因子の NONO に、上述のエフェクターを結合した融合蛋白質も同様に作成した。dCas13 を目的の RNA-蛋白質複合体に誘導するため、パラスペックル構成 lncRNA の NEAT1 を標的とする crNEAT1 を作成した。設計したプラスミドを用いて 293T 細胞に遺伝子導入を行い、融合蛋白質が細胞内で発現することを確認した。以降、それぞれ「BiFC-dCas13 for paraspeckles」「NanoBiT-dCas13 for paraspeckles」「Split-TurboID-dCas13 for paraspeckles」と記載する。

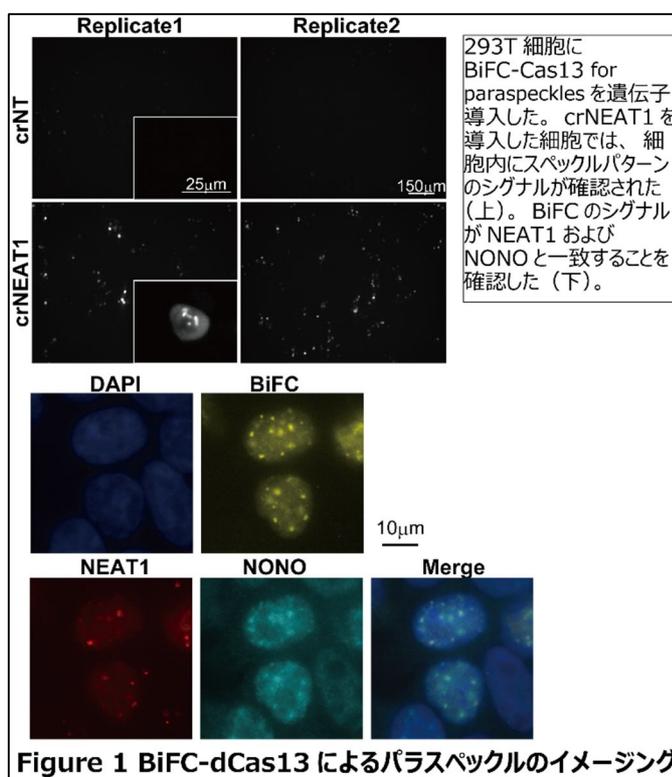


Figure 1 BiFC-dCas13 によるパラスペックルのイメージング

#### BiFC-dCas13 によるパラスペックルのイメージング

BiFC は蛍光蛋白質「mVenus」を VN と VC に分割し、二分子の会合が顕微鏡・FACS を用いて評価するシステムである。

293T 細胞に BiFC-Cas13 for paraspeckles を遺伝子導入した。crNEAT1 を導入した細胞では、細胞内にスペックルパターンのシグナルが存在し、mVenus のシグナルが NEAT1 と NONO に一致することが確認された (Figure 1)。また、FACS を用いてパラスペックルの形成が mVenus のシグナルにより検出できることを確認した。これらの結果から、BiFC-Cas13 はパラスペックルを蛍光シグナルで描出することが出来ることが示された。

#### NanoBiT-dCas13 によるパラスペックル形成の検出

NanoBiT はルシフェラーゼ蛋白質「NanoLuc」を LgBiT および SmBiT に分割し目的分子に融合させて、二分子の近接を発光シグナルで評価する。このシステムを用いることで、二分子の会合・解離の双方を発光シグナルで評価することが可能である。

293T 細胞に NanoBiT-Cas13 for paraspeckles を遺伝子

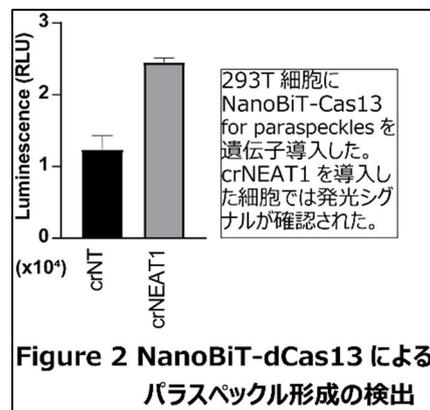


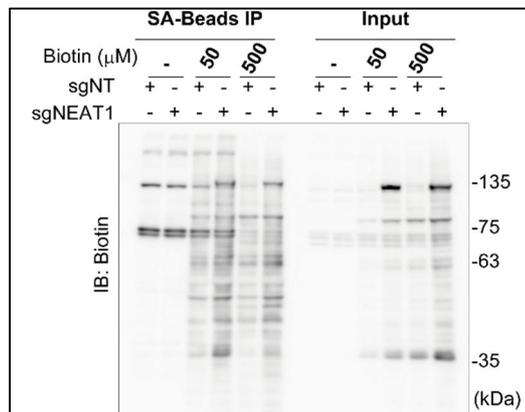
Figure 2 NanoBiT-dCas13 によるパラスペックル形成の検出

導入した。crNEAT1 を導入した細胞では基質に反応して発光が見られ、パラスペックルの形成を、発光を用いてレポートできることが示された ( Figure 2 )。

### Split-TurboID-dCas13 を用いたパラスペックル構成因子の網羅的解析

Split-TurboID は、ビオチンリガーゼ「TurboID」を TbN および TbC に分割して目的分子に融合する。二分子の近接に伴い TurboID のビオチンリガーゼの機能が補完され、ビオチンの添加により二分子複合体周囲の蛋白質をビオチン化する。ビオチン化された蛋白質は、ストレプトアビジンと強固に結合する性質を持つため、免疫沈降などの手法を介して抽出することが可能になる。

293T 細胞に Split-TurboID-Cas13 for paraspeckles を遺伝子導入した。細胞をビオチン無、ビオチン有の条件下で培養後、ストレプトアビジンビーズを用いた免疫沈降実験に供した。crNEAT1 を導入した細胞ではビオチン化された蛋白質が増加し、免疫沈降によりビオチン化蛋白質が抽出された ( Figure 3 )。ビオチン化反応により enrich された蛋白質を質量分析に供し網羅的解析を行った。crNEAT1 を導入した細胞から抽出された蛋白質には、既知のパラスペックル構成蛋白質や、RNA 代謝に関わる蛋白質が多く enrich されていた。

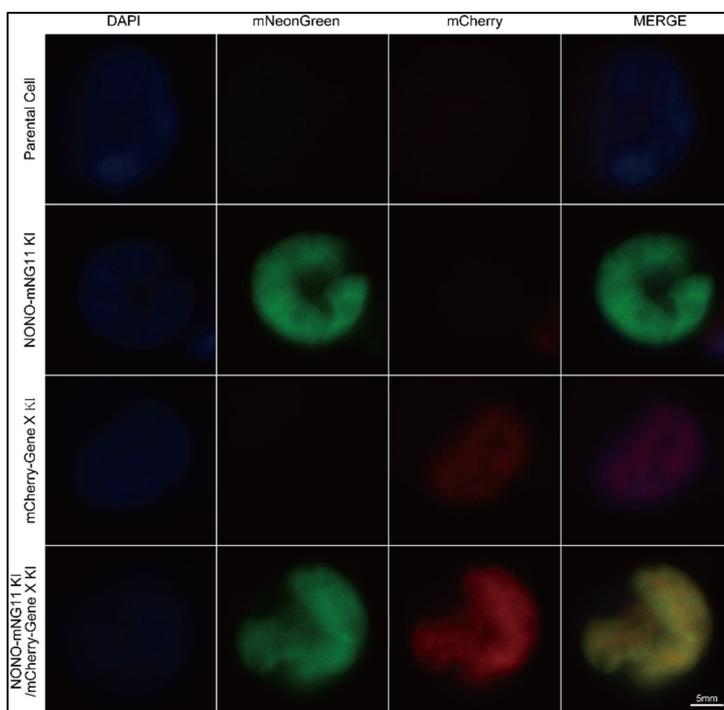


293T 細胞に split-TurboID-Cas13 for paraspeckles を遺伝子導入した。Biotin 化後の蛋白質を Streptavidin ビーズを用いた免疫沈降実験に供した。sgNEAT1 を導入した細胞ではビオチン化されたタンパク質が増加し、免疫沈降によりビオチン化タンパク質が抽出された。

**Figure 3 Split-TurboID-dCas13 を用いたパラスペックル構成因子の網羅的解析**

### パラスペックルと RNA 修飾関連因子の評価

RNA 修飾に関わる遺伝子が認められた。パラスペックルと RNA 修飾関連因子とのかかわりを明らかにするため、CRISPR/Cas9 を用いて RNA 修飾関連因子をノックアウトし、パラスペックルの形成への影響を評価した。特定の RNA 修飾関連因子のノックアウトにより NEAT1 の発現が低下し、パラスペックルの形成が阻害された。パラスペックルと RNA 修飾因子との関係を明らかにするため、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集技術により白血病細胞株 K562 の遺伝子領域に蛍光蛋白質レポーターをノックインした。蛍光シグナルの観察により、パラスペックル構成因子 NONO と RNA 修飾因子の共局在が確認された ( Figure 4 )。



K562 細胞の NONO および Gene X 遺伝子領域に mNeonGreen11 および mCherry をノックインした。ノックイン後の細胞を蛍光顕微鏡を用いて観察し、二つの分子が細胞内で共局在することを確認した。

**Figure 4 パラスペックルと RNA 修飾関連因子の評価**

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zhang Wenyu, Li Jingmei, Yamamoto Keita, Goyama Susumu	4. 巻 -
2. 論文標題 Modeling and therapeutic targeting of t(8;21) AML with/without TP53 deficiency	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	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） 10.1007/s12185-024-03783-3	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 -
1. 著者名 Emi Sugimoto, Jingmei Li, Yasutaka Hayashi, Kohei Iida, Shuhei Asada, Tsuyoshi Fukushima, Moe Tamura, Shiori Shikata, Wenyu Zhang, Keita Yamamoto, et al.	4. 巻 6
2. 論文標題 Hyperactive Natural Killer cells in Rag2 knockout mice inhibit the development of acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	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） 10.1038/s42003-023-05606-3	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 -
1. 著者名 Nakahara Jakushin, Yamamoto Keita, Yabushita Tomohiro, Chinen Takumi, Ito Kei, Takeda Yutaka, Kitagawa Daiju, Goyama Susumu	4. 巻 -
2. 論文標題 Group comparison based on genetic information reveals lineage-specific therapeutic vulnerabilities in acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023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） 10.1101/2023.05.18.541265	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 -
1. 著者名 山本 圭太	4. 巻 64
2. 論文標題 白血病関連遺伝子ASXL1によるバラスベックル制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 719～730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.64.719	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keita Yamamoto
2. 発表標題 ASXL1 is involved in paraspeckle formation in hematopoietic cells
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yu-Hsuan Chang, Keita Yamamoto, Takeshi Fujino, Teh-Wei Wang, Emi Sugimoto, Wenyu Zhang, Tomohiro Yabushita, E. Christine Pietsch, Barbara A. Weir, Ramona Crescenzo, Glenn S. Cowley, Ricardo M. Attar, Ulrike Philippar, Yutaka Enomoto, Yoichi Imai, Toshio Kitamura, Susumu Goyama
2. 発表標題 SETDB1 Suppresses Interferon Responses and NK Cell-Mediated Immunosurveillance Specifically in Monocytic AML
3. 学会等名 The 65th American Society of Hematology annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wenyu Zhang, Keita Yamamoto, Yu Hsuan Chang, Tomohiro Yabushita, Yangying Hao, Jakushin Nakahara, Toshio Kitamura, Susumu Goyama.
2. 発表標題 HDAC7 is a potential therapeutic target in acute erythroid leukemia
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jakushin Nakahara, Keita Yamamoto, Tomohiro Yabushita, Takumi Chinen, Kei Ito, Yutaka Takeda, Daiju Kitagawa, Susumu Goyama
2. 発表標題 Group comparison based on genetic information reveals lineage-specific vulnerabilities in AML
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jingmei Li, Emi Sugimoto, Keita Yamamoto, Toshio Kitamura, Susumu Goyama
2. 発表標題 Dual targeting of mTOR and p53 shows potent activity against aggressive acute myeloid leukemia
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yu Hsuan Chang, Takeshi Fujino, Keita Yamamoto, Yutaka Enomoto, Toshio Kitamura, Susumu Goyama
2. 発表標題 SETDB1 suppresses interferon responses and NK cell-mediated immunosurveillance in monocytic AML
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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