

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620115

研究課題名(和文)1分子レベルでの生細胞内RNAリアルタイム計数プローブの開発

研究課題名(英文)Development real-time and quantitative RNA probe for live cell imaging

研究代表者

吉村 英哲 (Yoshimura, Hideaki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90464205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生細胞内における目的RNAの動態解析と定量を同時に実現するRNA可視化蛍光プローブの開発を目指した。本プローブは円順列変位型蛍光タンパク質とRNA認識領域からなり、目的RNAの結合により蛍光性が変化するように設計した。RNA認識領域としてPUM-HD変異体を用い、マウス由来 アクチンmRNAをターゲットとした。本プローブをマウス由来細胞に導入し蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞質から明瞭な蛍光が観測できた。一方、RNAの有無による蛍光性変化、1分子検出感度での生細胞内RNA検出には不十分であった。以上より、今後はより高検出感度が期待できる二量体形成型蛍光タンパク質を採用する。

研究成果の概要(英文)：I developed an RNA probe for dynamics analysis and quantification of target RNA in living cells. The present probe consists of circularly permuted fluorescent protein (cpFP) and two RNA recognition domains. In this design, I expected that binding of RNA to the RNA recognition domains induces reversible fluorescence intensity change. The RNA recognition domain is derived from an RNA binding protein domain PUM-HD mutant that targets for mouse β -actin mRNA. I introduced this probe into cultured mouse cells and observed using a fluorescence microscope. In this observation, obvious fluorescence was detected from the cytoplasmic region. On the other hand, the ON/OFF ratio of the fluorescence is not sufficient to detect single molecule target RNA in living cells. Thus I am planning to adopt dimer-type fluorescent protein to achieve high detectability of target RNA in living cells.

研究分野：分析化学

キーワード：生体分子 1分子計測(SMD) バイオテクノロジー 細胞・組織 分析化学

1. 研究開始当初の背景

バイオイメージングのターゲットとして RNA が注目を集めている。多くの mRNA は細胞外刺激に応じて特徴的な細胞内局在を示し、初期発生や増殖、遊走など多様な生命現象を制御している。また非翻訳性 RNA も様々な生命現象への関与が知られている。ところが生細胞内 RNA 可視化技術が不十分なため、生細胞内の動態に基づく RNA 作動機構の研究は十分進んでいない。

申請者は近年、新たな生細胞内 RNA 可視化技術を開発した。RNA 結合タンパク質 Pumilio と蛍光タンパク質の融合分子を作成し、全反射蛍光顕微鏡で観察を行うことで、生細胞内 RNA の 1 分子可視化解析を実現した。本研究はこの技術を元に、mRNA のリアルタイム計数と動態解析を同時に実現する革新的な RNA プローブを構築する。さらにそのプローブを用いて、特定の mRNA が生成し、細胞内を輸送され、リボソームに取り込まれ翻訳されるまでの一連の経緯について、mRNA の計数と動態観察を元に解析する。

2. 研究の目的

本研究の大きな目標は以下の 2 点である

- 特定の RNA の分子数の計数と 1 分子動態追跡を実現する生細胞内 RNA 可視化プローブの開発
- 転写から翻訳に至る一連の mRNA 作動経緯を分子数の計数と動態解析により記述する

プローブ開発は、申請者自身が持つ RNA プローブの知見と、既報の Ca^{2+} プローブ G-CaMP の原理を融合して行う。G-CaMP は変位蛍光タンパク質と Ca^{2+} 応答部位からなる。 Ca^{2+} 応答部位に Ca^{2+} が結合することで蛍光タンパク質に構造変化が生じ、消光していた蛍光が回復する。この分子設計を参考に、変異蛍光タンパク質の両末端に Pumilio を結合した融合タンパク質を構築する。Pumilio が観察目的の RNA と結合すると蛍光を発する RNA プローブを作成する。

続いて本プローブを用いて生細胞内 1 分子観察を行い、mRNA の生成を可視化解析し、生成する mRNA 分子数を、濃度ではなく個数の単位で計数する。さらに細胞内輸送、翻訳に至る過程を 1 分子動態追跡により明らかにする。以上の結果を基に数理・統計モデルを構築し、遺伝子発現から細胞機能発現に至る過程をシステムとして理解することに挑む。

3. 研究の方法

本研究では、RNA を生細胞内で定量性を持って可視化するプローブの開発を目指した。その設計として、円順列変位を導入し蛍光性を失った蛍光タンパク質の両末端に RNA 結合タンパク質ドメインである PUM-HD を融合させたプローブを構築した。目的 RNA に PUM-HD が結合すると円順列変異型蛍光タンパク質部分に構造歪みが生じ、失われていた蛍光性が回復するという原理に基づいている。円順列変位型蛍光タンパク質部分の分子設計はカルシウムイオンセンサー G-CaMP でも用いられており、その分子設計を参考にしつつ RNA センサーとして適切な分子設計を構築する。本研究は

プローブ候補分子のおよびターゲット RNA のスクリーニングを通じた最適なプローブ設計の探索

開発したプローブの、生細胞内 RNA 可視化への適用性の調査を通じて遂行した。

プローブ候補分子としては、PUM-HD 部分と円順列変異型蛍光タンパク質とをつなぐリンカー部分の構造を変化させたものを作成している。PUM-HD が目的 RNA に結合して円順列変異型蛍光タンパク質部分に構造歪みを引き起こすには、リンカー部分は剛直な構造を取る必要がある。そこでリンカーとして ヘリックス構造を取るペプチド配列を採用した。このペプチド配列長を 0~10 アミノ酸の範囲で変化させたものを構築することで、最適なリンカー長および PUM-HD の配向について検討が可能となる。PUM-HD 部分には、申請者自身によって既に理論上対応する配列への十分な結合が確認されている 2 種類の PUM-HD 変異体を採用した。

同時に、プローブにより大きな構造歪みを生じさせる RNA 配列についても検討した。すなわち、2 カ所の PUM-HD 変異体結合領域間の塩基数を変え、より大きな構造歪みを生じさせる RNA 配列を探索した。そこでターゲットモデル RNA として、採用した 2 種類の PUM-HD 変異体認識配列を 2 カ所持ちその間の塩基長を 0~11 塩基の間で変化させたものを作成している。

4. 研究成果

まずプローブが細胞内で蛍光性を示すことを確かめるために、作成したプローブ遺伝子をほ乳類細胞発現用ベクターに挿入し、マウス繊維芽細胞由来細胞株 NIH3T3 に導入した。本プローブはマウス由来の β アクチン mRNA をター

ゲット RNA とするように設計されているので、プローブが NIH3T3 細胞内で発現し機能すれば、明瞭な蛍光が検出されると予想できる。プローブを導入した細胞に対してウェスタンブロッティングを行ったところ、プローブタンパク質由来のバンドが検出された。この結果から、本プローブは培養細胞内において発現することが確認された。続いて、プローブを発現させた細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果、細胞内に明瞭な蛍光が観察された。この蛍光は一部の細胞でしか見られなかったことから、自家蛍光ではなくプローブ由来の蛍光であると考えられる。これらの結果から、細胞内で発現したプローブが β アクチン mRNA を検知し蛍光を示すことが示唆された。

続いて、目的 RNA との結合 ON/OFF により蛍光性を変化させるプローブを構築するために、円順列型蛍光タンパク質領域と 2 つの RNA 結合領域をつなぐリンカー長を 0 ~ 11 アミノ酸まで変化させたプローブバリエーションを構築した。また、ターゲットとなる RNA として、2 つの認識配列間の塩基数を 0 ~ 11 塩基に変えたものを構築した。得られたプローブバリエーションは大腸菌内で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより単離精製した。得られたプローブバリエーション溶液に精製した RNA を添加し、目的 RNA の有無による蛍光スペクトル変化を、蛍光分光光度計を用いて測定した。その結果、いずれのプローブも蛍光性は示したが、RNA の有無による優位な蛍光強度の差は得られなかった。

以上のように、本研究では円順列変位型蛍光タンパク質と RNA 認識タンパク質ドメインを利用して、生細胞内で蛍光を示すプローブの開発には成功した。一方、本プローブの構造を最適化してスクリーニングした結果、RNA に対して十分な応答は得られなかった。今後は円順列変位型蛍光タンパク質部分を二量体化により蛍光性を変化させる蛍光タンパク質に入れ替えたものを構築し、より RNA に対する応答性の高いプローブの構築を目指す。

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9件)

1. Y. Nasu, Y. Asaoka, M. Namae, H. Nishina, H. Yoshimura, T. Ozawa
Genetically encoded Fluorescent probe for imaging apoptosis in vivo with spontaneous

GFP complementation.

Anal. Chem. **2016**, 88(1), 838-844.

査読あり

DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03367

2. 「RNA と生細胞内 1 分子イメージングの可能性」
吉村英哲
査読なし
Labcab p19-20, Vol.12 No.1 2015
3. 「蛍光顕微鏡を用いた生細胞内 1 分子可視化解析法」
吉村英哲、小澤岳昌
The Bulletin of the Society of Nano Science and Technology (ナノ学会会報)
第 13 巻 第 2 号 2015 年 3 月, p61-65
査読あり
ISSN 1347-8028
4. 「生細胞内 RNA イメージング」
吉村英哲、小澤岳昌
細胞工学 Vol.34 No.1 2015
査読あり
5. T. Nishiguchi, T. Yamada, Y. Nasu, M. Itoh, H. Yoshimura, T. Ozawa
Development of red-shifted mutants derived from luciferase of Brazilian click beetle *Pyrearinus termitilluminans*
J. Biomed. Opt. **2015**, 20, 101205.
査読あり
DOI: 10.1117/1.JBO.20.10.101205.
6. A. Takamura, M. Hattori, H. Yoshimura, T. Ozawa.
Simultaneous time-lamination imaging of protein association using a split fluorescent timer protein.
Anal. Chem. **2015**, 87(6), 3366-3372.
査読あり
DOI: 10.1021/ac504583t
7. H. Yoshimura, T. Ozawa
Method of split-reporter reconstitution for the analysis of biomolecules.
Chem. Rec., **2014**, 14, 492-501.
査読あり
DOI: 10.1002/tcr.201402001

[学会発表](計26件)

1. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Takeaki Ozawa
Analysis of single molecule dynamics to reveal the functional mechanism of telomeric repeat-containing RNA
第 95 日本化学会春季年会
20160324-20160327
同志社大学京田辺キャンパス(京都府京

- 田辺市)
2. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Rintaro Shimada, Takeaki Ozawa
Single-molecule live-cell imaging of a non-coding RNA
Focus on Microscopy 2016
20160320-20160323
台北 (台湾)
 3. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Rintaro Shimada, Takeaki Ozawa
A fluorescent probe for single-molecule imaging of telomeric-repeat containing RNA using fluorescent protein reconstitution and an RNA binding domain PUM-HD
Pacifichem2015
20151215-20151220
ホノルル (アメリカ合衆国)
 4. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Takeaki Ozawa
Development of a genetically-encoded probe to visualize b-action mRNA in living cells based on a reconstituted GFP and an RNA binding domain PUM-HD
Pacifichem2015
20151215-20151220
ホノルル (アメリカ合衆国)
 5. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Takeaki Ozawa
Single molecule imaging of telomeric-repeat containing RNA in living cells
9th International Symposium on Nanomedicine (招待講演)
20151210-20151212
三重大学 (三重県津市)
 6. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Hiroki Segawa, Takeaki Ozawa
Single molecule imaging of telomeric repeat containing RNA in living cells
第 53 回生物物理学会
20150913-20150915
金沢大学角間キャンパス (石川県金沢市)
 7. 吉村英哲, 山田俊理, 瀬川尋貴, 小澤岳昌
テロメア RNA 生細胞内 1 分子動態の定量評価法
分析化学会第 64 年会
20150909-20150911
九州大学伊都キャンパス (福岡県福岡市)
 8. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada, Hiroki Segawa, Takeaki Ozawa
Analysis of dynamics on a non-coding RNA in living cells using a single molecule tracking approach
JASIS RSC Tokyo international conference
20150903-20150904
幕張メッセ (千葉県千葉市)
 9. 吉村英哲, 山田俊理, 瀬川尋貴, 小澤岳昌
細胞内 1 分子動態分析に基づくテロメア RNA の作動機構解析法
第 75 回分析化学討論会
20150523-20150524
山梨大学 (山梨県甲府市)
 10. Hideaki Yoshimura
Single molecule imaging to reveal mechanisms of complex cellular systems
NTU-SNU-UT Chemistry Symposium (招待講演)
20150116-20150116
台北 (台湾)
 11. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa
Single molecule imaging of Akt on the plasma membrane in living cells
「細胞のメソスケール構造機能」シンポジウム
20141213-20141213
京都大学 iCeMS 本部棟 (京都府京都市)
 12. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa
Single molecule imaging in living cells to reveal relationship between motions and functions of biological molecules
8th International Symposium on Nanomedicine (招待講演)
20141204-20141206
愛媛大学 (愛媛県松山市)
 13. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa
Signal transduction mechanism of Akt revealed by single molecule imaging of Akt and receptor molecules
第 52 回生物物理学会年会
20140925—20140927
サッポロコンベンションセンター (北海道札幌市)
 14. 吉村英哲, 小澤岳昌
生細胞 1 分子動態分析によるシグナル伝達タンパク質 Akt の機能発現機構解明
第 65 回分析化学会年会
2014-0915-20140917
広島大学東広島キャンパス (広島県東広島市)
 15. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa
Analysis of single-molecule dynamics of signal transduction molecule Akt in living cells
RSC-TIC JAIMA conference 幕張

2014-0904-20140905
幕張メッセ（千葉県千葉市）

16. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa
Signal transduction mechanism of Akt
based on single molecule dynamics in living
cells
第 37 回内藤コンファレンス
20140715-20140718
ニセコヒルトンビレッジ（北海道ニセコ
町）
17. 吉村英哲、小澤岳昌
新規蛍光プローブ開発を通じたテロメ
ア RNA の生細胞内 1 分子動態分析
第 74 回分析化学討論会
20140524-20140525
日本大学郡山キャンパス（福島県郡山
市）
18. Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa
A study of a molecular mechanism of
intracellular signal transduction base on
single molecule imaging
The 2nd japan-China Symposium on
Nanomedicine (招待講演)
20140516-20140517
広島大学霞キャンパス（広島県広島市）
19. Hideaki Yoshimura, Toshimichi Yamada,
Asumi Inaguma, Takeaki Ozawa: “Live cell
imaging of single-molecule RNAs using
PUM-HD based RNA probes
Focus on Microscopy 2014 (FOM 2014)
20140413-20140416
シドニー（オーストラリア）

〔図書〕（計 0 件）

〔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

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉村 英哲（YOSHIMURA, Hideaki）
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：90464205

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(3)研究協力者

なし