

上村 想太郎

東京大学大学院理学系研究科
教授

革新的 1 分子計測技術による RNA サイレンシング機構の可視化
：基盤作出と応用展開

§ 1. 研究実施体制

(1) 上村グループ

- ① 研究代表者: 上村 想太郎 (東京大学理学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ZMWs 法を用いた革新的 1 分子計測技術の開発
 - ・*in vitro*での成熟型 RNA サイレンシング複合体形成過程の 1 分子可視化計測

(2) 塩見グループ

- ① 主たる共同研究者: 塩見 美喜子 (東京大学理学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・RNA サイレンシング関連タンパク質の精製
 - ・*in vitro*での RNA サイレンシング複合体の再構成実験

§ 2. 研究実施の概要

ZMWs 法を用いた革新的 1 分子計測技術の開発(上村グループ)

次世代シーケンサーである PacBio RSII(米国パシフィックバイオサイエンス社製)は Zero-Mode Waveguides (ZMWs)法を基幹技術として開発されている。我々のグループは独自の改良を施す事で、PacBio RSII を次世代型蛍光顕微鏡として使用する為の技術開発を行っている。これまでに機器の調整及び解析プログラム開発は実用可能段階まで終了しており、RNA サイレンシング関連タンパク質のみならず、膜タンパク質及びゲノム編集タンパク質など幅広いタンパク質を対象とした超ハイスループット 1 分子計測を可能とした。

*in vitro*での成熟型 RNA サイレンシング複合体形成過程の 1 分子可視化計測(上村グループ)

塩見グループが調整した RNA サイレンシング関連タンパク質と蛍光標識 2 本鎖 RNA を用いて、DmAgo1 が成熟型 RNA サイレンシング複合体になる過程の 1 分子可視化計測を行った。塩見グループが多分子レベルで行った *in vitro* 再構成実験結果と一致して、ローディング因子と予測される Dicer1 非存在下では miRNA の DmAgo1 への取り込み頻度は著しく低かったが、Dicer1 存在下では miRNA 取り込みの大幅な増加が観察された。

RNA サイレンシング関連タンパク質の発現・精製(塩見グループ)

miRNA と結合して RNA サイレンシングの中核を担う Argonaute タンパク質 (DmAgo1) を、His-tag、Halo tag 融合タンパク質として大腸菌を用いて発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。その他、miRNA の DmAgo1 への取り込みに関与すると考えられているタンパク質として、Hsp83、Hsc70-4、Hop、Droj2、p23、LoqsPA、LoqsPB を大腸菌で発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。siRNA と結合する DmAgo2、その取り込みに関与する Dicer-2、R2D2 は S2 細胞での発現系を構築した。piRNA と結合する Siwi と、その切断後の RNA を放出する働きがある BmVasa については、カイコ卵巣由来の培養細胞 BmN4 細胞を用いて発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。

in vitro での RNA サイレンシング複合体の再構成実験(塩見グループ)

DmAgo1 は miRNA を取り込んだあと、passenger 鎖が切断または解離されることで、guide 鎖だけが残り、成熟型 RNA サイレンシング複合体となる。精製した DmAgo1 が RNA サイレンシング複合体となることを調べるために、*in vitro* での miRNA 切断活性測定を行った。DmAgo1 だけでは miRNA は切断されなかったが、miRNA の取り込みに関与すると考えられている Dicer-1 を加えることにより miRNA は切断された。