

「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」
平成 26 年度採択研究代表者

H28 年度 実績報告書

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 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)

Zero-Mode Waveguides (ZMWs)法を基幹技術として、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、モーター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 分子蛍光計測を可能とした。1 分子蛍光計測に汎用される全反射型蛍光顕微鏡で使用可能な蛍光基質濃度上限 (50 nM) を大幅に上回る数 μ M の蛍光基質存在下に於いても、基盤への非特異的な吸着を抑えつつ高 S/N 比を持って 1 分子蛍光計測を可能とする技術を確立した。

蛍光顕微鏡を用いた *in vitro* での RNA サイレンシング複合体の再構成実験 (上村グループ)

塩見グループが調整した生殖細胞特異的な RNA サイレンシング経路を担うタンパク質である Siwi を用いて、ガラス基板上での多分子系でのピンポン機構の部分的再構成を行なっている。塩見グループによる *in vitro* 溶液系での計測結果と一致して、Siwi のみでは標的蛍光標識 RNA 切断産物の解離を引き起こさないが、Siwi 及び BmVasa の共存条件下では効率よく標的蛍光標識 RNA の切断産物が Siwi から解離する事をガラス基板上での *in vitro* 再構成系に於いても確認する事に成功した。現在は引き続き蛍光標識 Siwi 及び蛍光標識 BmVasa を使用しての多分子再構成系計測を進めると共に、同部分的再構成系を使用しての 1 分子蛍光計測も遂行している所である。

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)

生殖組織特異的な RNA サイレンシングを行う piRNA 経路に注目し、1 分子可視化計測系に向けて蛍光標識タグを融合した piRNA 生合成因子をカイコ卵巣由来培養細胞である BmN4 を用いて発現させ、精製した。具体的には、piRNA と結合し、トランスポゾン RNA を切断する Siwi、切断後の RNA を放出するために必須である BmVasa、そして切断後の RNA を piRNA 前駆体として受け取る BmAgo3 を、カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。Siwi に関しては、Siwi-piRNA 複合体の結晶構造解析に基づき、RNA 切断活性を欠損した Siwi をクローニングし、同様に精製した。

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)

Siwi は他の RNA サイレンシング経路で働く Argonaute とは異なり、標的 RNA を切断しても、そこから解離することができない。切断産物から Siwi が解離するためには、RNA ヘリカーゼの一種である BmVasa が必要であることが明らかになっている。精製 Siwi 及び BmVasa が標的 RNA の切断及び解離を行うことができるかどうかを検証するため、*in vitro* での RNA 切断活性測定を行った。その結果、Siwi のみでは標的 RNA を効率よく切断できなかったが、Siwi 及び BmVasa が共存する条件下では効率よく標的 RNA が切断された。