

「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

H29 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(東京大学)

- 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(東京大学)

- 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、DNA 結合タンパク質、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認し、平成29年度に於いては、装置の汎用化及び小型化などの技術改良を行なっている。

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 及びヘリカーゼ BmVasa を用いてガラス基板上で部分的に再構成する事で、ピンポン機構の1分子蛍光計測を行なっている。塩見グループによる調整された Siwi、蛍光標識 BmVasa 及び蛍光 RNA を使用しての1分子蛍光計測を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、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。特に、piRNA と結合し、トランスポゾン RNA を切断する Siwi に注目し、piRNA による標的 RNA 認識機構の解明に迫るため、Siwi へ任意の RNA 配列を導入するための人工 piRNA 結合実験系の構築を進めた。

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)

カイコ piRNA 経路では、Siwi, Ago3 と呼ばれる Argonaute タンパク質が、互いにその切断断片を受け渡すことで、効率的に piRNA を増幅している。Siwi から Ago3 への受け渡しには Vasa と呼ばれる RNA ヘリカーゼが必須であることは示されてきたが、Ago3 から Siwi への受け渡し機構は不明のままである。塩見グループでは、この機構を解明し、新たな RNA サイレンシング複合体を発見するため、新規 RNA ヘリカーゼの単離・同定に取り組み、成功した。さらにこの因子を精製し、*in vitro* での RNA 解離実験を行うことにより、同定した因子が Ago3 から切断 RNA を解離させることを明らかにした。