

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命動態の理解と制御のための
基盤技術の創出」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2020年3月

研究代表者:上村 想太郎
(東京大学大学院理学系研究科、
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究は革新的 Zero-Mode-Waveguides (ZMWs)法や全反射顕微鏡法を用いた 1 分子可視化技術を独自に RNA サイレンシング過程に応用することで RNA-induced silencing complex (RISC)形成から標的 RNA 切断とその解離までを 1 分子レベルで可視化する基盤を作出するのみならず、Argonaute ホモログやオーソログ、修飾型 siRNA, miRNA, piRNA を用いることによって RNA サイレンシングの至適化を目指すものである。

上村グループは ZMWs 法を用いた革新的 1 分子計測技術の開発と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を行った。

Zero-Mode Waveguides (ZMWs)法を基盤技術として、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立し、Siwi 及びヘリカーゼ BmVasa の高濃度における 1 分子計測に成功した。

また、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では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た。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 分子蛍光計測を行ったところ、RNA の切断過程において BmVasa が多量体化していることがわかった。

塩見グループにおいては RNA サイレンシング関連タンパク質の発現・精製と in vitro での RNA サイレンシング複合体の再構成実験を行った。

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。

また、in vitro での RNA サイレンシング複合体の再構成実験ではカイコ 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。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1.

概要:

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、サイレンシング増幅機構であるピンポン機構の 1 分子蛍光計測を行なった。精製された Siwi、蛍光標識 BmVasa 及び蛍光 RNA を使用しての 1 分子蛍光計測を行ったところ、RNA の切断過程において BmVasa が多量体化し

ていることがわかった。この多量体化が切断効率を高めていることを明らかにした。

2.

概要:

in vitro での RNA サイレンシング複合体の再構成実験ではカイコ 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 RNA ヘリカーゼ Vasa 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であった。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・同定に取り組んだ結果、DDX45 因子を同定し、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。

3.

概要:

CRISPER-Cas9 システムは簡便なゲノム編集ツールとして世界中で使われるようになった。しかし、オフターゲットやゲノム編集効率の低下などの問題点も多い。本研究では Cas9 分子が切断過程においてどのような構造変化を起こすのかに着目し、1分子蛍光エネルギー移動法を用いて Cas9 の構造変化を捉えることに成功した。その結果、Cas9 分子内の HNH ドメインが切断箇所を頻りに移動する様子を捉え、さらに中間状態が存在することを明らかにした。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要:

RNA 発現制御の過程を 1 分子レベルでリアルタイムに計測する技術は RNA 創薬への応用や膜たんぱく質などのターゲット分子を阻害する薬剤の働きを可視化するなどの応用が期待され、科学技術イノベーションに貢献すると考えられる。

< 代表的な論文 >

1. S. Osuka, K. Isomura, S. Kajimoto, T. Komori, H. Nishimasu, T. Shima, O. Nureki and S Uemura “Real-time observation of flexible domain movements in CRISPR-Cas9” EMBO J, 37, e96941 (2018)
2. T. Shima, M. Morikawa, J. Kaneshiro, T. Kambara, S. Kamimura, T. Yagi, H. Iwamoto, S. Uemura, H. Shigematsu, M. Shirouzu, T. Ichimura, T. Watanabe, R. Nitta, Y. Okada, and N. Hirokawa. “Kinesin-binding triggered conformation switching of microtubules contributes to polarized transport” J. Cell. Biol., 217, 4164-4183 (2018)
3. K. M. Nishida, Y. W. Iwasaki, Y. Murota, A. Nagao, T. Mannen, Y. Kato, H. Siomi, M. C. Siomi. “Respective Functions of Two Distinct Siwi Complexes Assembled during PIWI-Interacting RNA Biogenesis in Bombyx Germ Cells” Cell Reports.. 10:193-203 (2015)

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

「上村グループ」

主たる共同研究者：上村 想太郎（東京大学大学院理学系研究科 教授）

研究項目

- ・ ZMW s 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

「塩見グループ」

主たる共同研究者：塩見 美喜子（東京大学大学院理学系研究科 教授）

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
- ・ piRNA 増幅経路：ピンポンサイクル経路における RNA ヘリカーゼの探索・解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

生殖細胞における piRNA 増幅経路であるピンポンサイクル経路の解明に向け、Ago3 結合性 RNA ヘリカーゼを同定するため、東京大学定量生命科学研究所胡桃坂研究室所属の根岸瑠美氏と共同研究を行い、質量分析法によるタンパク質同定を行った。