

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 (東京大学大学院理学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・PacBio RS II のセットアップ
 - ・蛍光標識 DNA オリゴを用いた1分子 FRET 計測
 - ・MatLab 言語を用いた解析プログラムの開発

(2)「塩見」グループ

- ① 主たる共同研究者: 塩見 美喜子 (東京大学大学院理学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・His-Halo tag 及び His-Avi-Halo tag ベクターの作製
 - ・His-Halo-DmAgo1 及び His-Avi-Halo-Aubergine の作製
 - ・大腸菌でのタンパク質発現とタンパク質精製

§ 2. 研究実施の概要

本研究は従来とは異なる革新的 ZMW 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 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、RNA サイレンシングの至適化を目指す。本年度は以下の項目を実施した。

PacBio RS II のセットアップ(上村グループ)

パシフィックバイオ社 PacBio RSII を納入し、機器の機能評価を行った。研究課題遂行に十分低レベルに背景光を抑え、且つ Cy3 色素及び Cy5 色素に関して1分子蛍光観察に十分な S/N 比、撮影速度 及び 褪色時間を達成した。

蛍光標識 DNA オリゴを用いた1分子 FRET 計測(上村グループ)

2 種類の蛍光標識 DNA オリゴ(Cy3 標識オリゴ DNA 及び 相補的な Cy5 標識オリゴ DNA)を用いて、1分子 FRET 計測を行った。PacBio RSII の専用基盤である SMRT Cell 上にアビジン-ビオチンシステムにより固定した Cy3 標識オリゴ DNA に対して、特定のタイミングで PacBio RS II 内部のロボットアームにより Cy5 標識オリゴ DNA を注入する事により、相補鎖同士がアニーリングする過程を1分子 FRET 計測により検出する事に成功した。

MatLab 言語を用いた解析プログラムの開発(上村グループ)

PacBio RSII より得られたデータを解析する為のプログラム開発を、MatLab 言語を用いて行った。1度の計測から得られる膨大なデータ(15 万強トレース)から、蛍光強度に基づき目的のトレースのみを選別するプログラムを作製した。また、選別されたトレースに対して FRET 効率算出を行なう為の解析プログラム及び、カイ二乗検定方法に基づきステップ状蛍光強度変化の自動検出を行なう解析プログラム開発を行った。

His-Halo tag 及び His-Avi-Halo tag ベクターの作製(塩見グループ)

2 種類の Primer (Infusion-His-F、Infusion-His-R)を用いて PCR を行った PCR 産物(His)及び 2 種類の Primer (Halo-F、Halo-R)を用いて PCR を行った PCR 産物(Halo)を増幅させた。増幅させた PCR 産物 His と Halo を更に PCR で 1 つの PCR 産物(His-Halo)にした。

His-Halo-DmAgo1 及び His-Avi-Halo-Aubergine の作製(塩見グループ)

His-Halo-DmAgo1 及び His-Avi-Halo-Aubergine は、作製した His-Halo tag 及び His-Avi-Halo tag ベクターを 2 種類の Primer (pGEX-His-Halo-F、pGEX-His-Halo-R)を用いて PCR を行った産物と Primer (Infusion-Aub-F、Infusion-Aub-R) で増幅した産物または Primer (Infusion-DmAgo1-F、Infusion-DmAgo1-R) で増幅した産物を In-Fusion HD Cloning kit (TaKaRa)を用いて、ライゲーションし作製した。

大腸菌でのタンパク質発現とタンパク質精製(塩見グループ)

作製した His-Halo-DmAgo1 及び His-Avi-Halo-Aubergine を大腸菌(ロゼッタ株)に transformation した。1mM IPTG、4℃の条件下で、タンパク質の発現を行った。

タンパク質は、大腸菌を HisTALON x Tractor Buffer で懸濁後、ソニケーションを行い、遠心後の上清を HisTALON beads に通し wash した後、beads から HisTALON Elution Buffer を使ってタンパク質を精製した。