

研究終了報告書

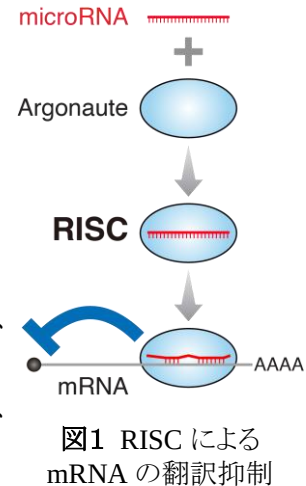
「RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで「見る・操る」」

研究期間：2021 年 4 月～2025 年 3 月

研究者：小林 穂高

1. 研究のねらい

microRNA は、わずか 22 塩基ほどの非常に小さな RNA であるが、「相補的な mRNA の翻訳を抑制する」という極めて大きな役割を果たす(図1)。特筆すべき点として、microRNA は単独では機能することができず、Argonaute 蛋白質に取り込まれ、2 MDa を超える動的な高次構造体「RNA-induced silencing complex (RISC)」として機能を発揮する。RISC は microRNA を介して標的 mRNA を認識し、Argonaute を介してその翻訳を抑制する。ヒトには 2000 種類を超える microRNA が存在しており、蛋白質をコードする遺伝子のおよそ 70% が RISC の制御下にあるとされている。そのため、RISC が一体どのようにしてその機能を発現するのか、その仕組みを本質的に深く理解することは、生命科学において極めて重要である。



その重要性ゆえに、これまで RISC について数多くの先行研究が行われてきたが、その大部分は生化学的な手法によるものである(細胞抽出液を試験管内で解析する手法など)。生化学的な手法はメカニズムを解析する上では極めて強力であるものの、そこから得られる主要な情報は RISC が「機能したかどうか」であり、RISC が細胞内において「いつ・どこで機能したのか」については踏み込むことができない。そのため、極めて本質的な点であるにも関わらず、RISC の時空間的な側面は長年にわたり理解が進んでいなかった。そこで本研究では、RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで「見る・操る」ための新規技術を開発することで、RISC の知られざる時空間的な側面について、その理解を格段に深めることを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究【RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで「見る・操る」】の研究提案書は、以下の 4 つの研究計画から成る。

研究計画 1: RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで可視化する新規手法の開発

研究計画 2: RISC の細胞内における時間的解析

研究計画 3: RISC の細胞内における空間的解析

研究計画 4: RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで操作する新規手法の開発

本研究では、研究期間である 2021-2023 年度において、4 つの研究計画を全て実施した。その成果として、研究計画 1「RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで可視化する新規手法の開発」に実際に成功した。さらに、この開発した新規手法を活用して、研究計画 2「RISC の細胞内における時間的解析」・研究計画 3「RISC の細胞内における空間的解析」を行い、RISC が細胞内において「いつ・どこで機能するのか」といった時空間的な側面を大きく開拓する

ことに成功した。以上の内容は、Kobayashi & Singer (2022) **Nature Communications** をはじめとする研究成果として、筆頭著者または責任著者として国内外に報告した。なお、当該論文は全体トップ<5%の Altmetrics を獲得し、国際純粋応用生物物理学連合 IUPAB award (2022 年)、日本生物物理学会 若手奨励賞 (2022 年)、日本蛋白質科学会 若手奨励賞優秀賞 (2023 年)をいただいた。また、研究計画 4「RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで操作する新規手法の開発」についても、早期の論文化を目指して、精力的に研究を継続している。

以上のように、本研究では、当初の研究計画の大部分が実際に成功に至り、「RISC の知られざる時空間的な側面について、その理解を格段に深める」という当初の目的を十分なレベルで達成することができた。さらに、非公開ながら当初の研究計画では全く想定していなかった驚くべき知見を得ることに成功しており、今後はこうした新規知見も主軸に、新たな研究に果敢に挑戦していきたいと考えている。

(2) 詳細

研究計画 1: RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで可視化する新規手法の開発

本研究では第一に、RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで可視化する新規手法の開発を試みた。RISC の機能発現 (mRNA の翻訳の抑制) を 1 分子 mRNA レベルで可視化するためには、① 1 分子 mRNA、②翻訳活性、③RISC の 3 要素を、細胞内において可視化する必要がある。そこで、まずは、以上の 3 要素を可視化できる原理を実装した人工的なレポーター mRNA を構築した。このレポーター mRNA は、以下にまとめる特徴を有している。

- ① レポーター mRNA 自体を、single-molecule FISH (smFISH) と呼ばれる手法 (1 種類の mRNA に対して、40 種類ほどの蛍光プローブをタンデムにアニールさせる手法) によって、1 分子感度で可視化できる。
- ② レポーター mRNA の ORF に、SunTag と呼ばれるペプチドがコードされている。SunTag は、GCN4 と呼ばれる因子のエピトープが 24 回連続したペプチドであり、この GCN4 エピトープはフォールディングを必要としない。そのため、レポーター mRNA から新規合成される翻訳ペプチドを、GCN4 抗体を用いた免疫染色によって 1 分子感度で可視化できる。
- ③ レポーター mRNA の 3'UTR に、microRNA の標的配列が挿入されている。具体的には、本研究で用いたヒト培養細胞において高発現していた microRNA、miR-21 の相補的配列が 8 箇所タンデムに挿入されている。そのため、Argonaute 抗体を用いた免疫染色により、レポーター mRNA 上の RISC を高感度で可視化できる。

このレポーター mRNA により、① 1 分子 mRNA、②翻訳活性、③RISC の 3 要素を、実際に細胞内において可視化できるようになった (図 2)。ただし、この段階ではまだ、以上の 3 要素を「可視化しただけ」の状態であり、研究計画 2 および研究計画 3 の時空間解析を行うためには、可視化した画像データを定量的に解析することが肝となる。そこで、次に、以上の 3 要素の画像データを解析する画像解析パイプラインを整備した。この画像解析パイプラインは、基本的に MATLAB 上で動作する仕様で、具体的には以下に示すような流れで行われる。

- まず、細胞全域を解析するために、① 1 分子 mRNA、②翻訳活性、③RISC をイメージングするにあたっては、XY 平面だけでなく Z スタックも取得し、3D データを用意する。この時、DAPI を用いて核についても 3D イメージングを行う。
- 次に、CellProfiler と呼ばれるアルゴリズム (McQuinn et al., 2018, PLoS Biol) を介して、①②

③の蛍光シグナルと DAPI の蛍光シグナルにより、イメージングした視野全域の細胞について、細胞のアウトラインと核のアウトラインを抽出する。

- 続いて、①②③の 3D データについて、FISH-quant と呼ばれるアルゴリズム (Mueller et al., 2013, Nat Methods) を介して、シグナルの検出→シグナルの定量→シグナルの中心点の抽出 (x,y,z 座標、超解像精度) を行う。
- 最後に、それぞれの蛍光シグナルについて、中心点-中心点間の 3D 距離を算出することで、3D 共局在解析を行う。

この画像解析パイプラインによって、1 回の実験で生じる 100 GB を超える画像データを一晚でバッチ解析し、細胞内の全ての 1 分子 mRNA について、その翻訳状態と RISC 結合状態を in situ で定量解析することが可能となった (図2、全ての mRNA 一つ一つに 3D 空間情報が紐づいている)。さらに、本研究で構築したレポーター mRNA は、Ponasterone A (PonA) と呼ばれる薬剤により、転写を厳密にコントロールできる仕様とした。そのため、レポーター mRNA の転写を誘導後、特定の経過時間においてイメージングを行うことで、mRNA に時間情報を紐づけることも可能となっている。以上の原理から、本手法によって、RISC の機能発現、すなわち mRNA の翻訳の抑制を、細胞内において 1 分子 mRNA レベルで、そして空間情報と時間情報の両方を紐づけて「見る」ことが実際に可能となった。

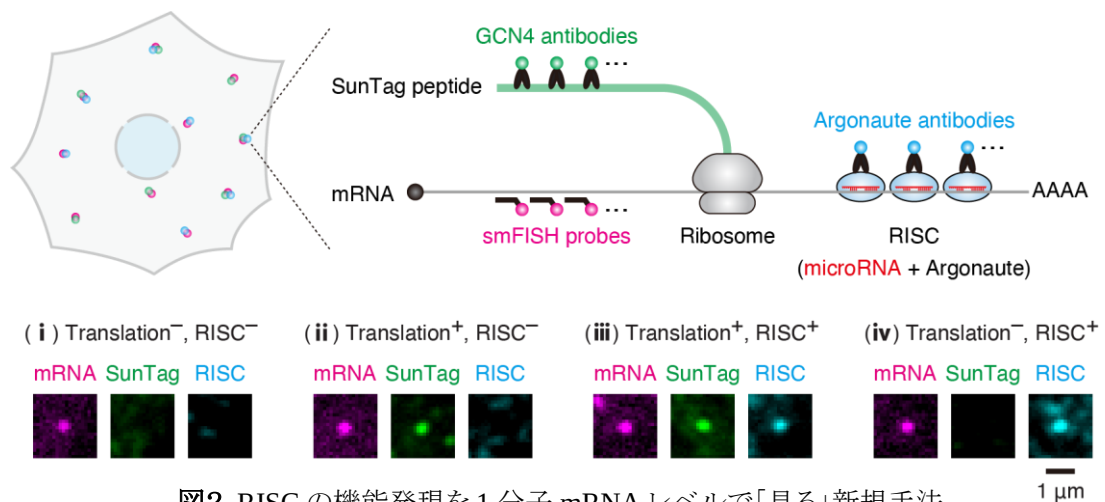


図2 RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで「見る」新規手法

研究計画 2: RISC の細胞内における時間的解析

研究計画 3: RISC の細胞内における空間的解析

本研究では続いて、研究計画 1 で開発した新規手法 (図2) を用い、RISC が細胞内において「いつ・どこで機能するのか」といった時間的解析および空間的解析を行なった。具体的には、レポーター mRNA の転写を誘導後、0 分、30 分、60 分といった経過時間において、① 1 分子 mRNA、②翻訳活性、③RISC の 3 要素を可視化し、上述した画像解析パイプラインにより定量解析を行なった。その結果、以下にまとめる新規知見が明らかになった。

- RISC は、標的 mRNA が核内から細胞質へと輸送されると、その mRNA に即座に結合する。
- RISC は、翻訳されている mRNA と翻訳されていない mRNA を比較すると、翻訳されている mRNA へと優先的に結合する。

- C) RISC は mRNA に結合後、即座に翻訳を抑制するわけではなく、30 分ほどで翻訳を抑制する。
- D) RISC は、翻訳を抑制するにあたり、翻訳されている mRNA の数を減らすだけでなく、翻訳されている mRNA 上のリボソーム数も減少させる。
- E) RISC は mRNA に結合後、60 分ほどで(翻訳を抑制してから、およそ 30 分後)mRNA の分解を引き起こす。
- F) RISC による mRNA 抑制効率は、1 細胞ごとに大きく異なり、さらに 1 分子 mRNA ごとにも大きく異なる。

以上のように、RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで「見る」新規手法により、これまでの生化学的な手法では実施できなかった時空間解析を行うことが可能となり、これにより RISC の知られざる時空間的な側面を大きく開拓することに成功した(図3)。A-F の新規知見において、例えば B, C は当初は全く予想していなかった結果であり、生命を支える極めて重要な動的高次構造体 RISC について、その本質的な理解を格段に深めることができた。

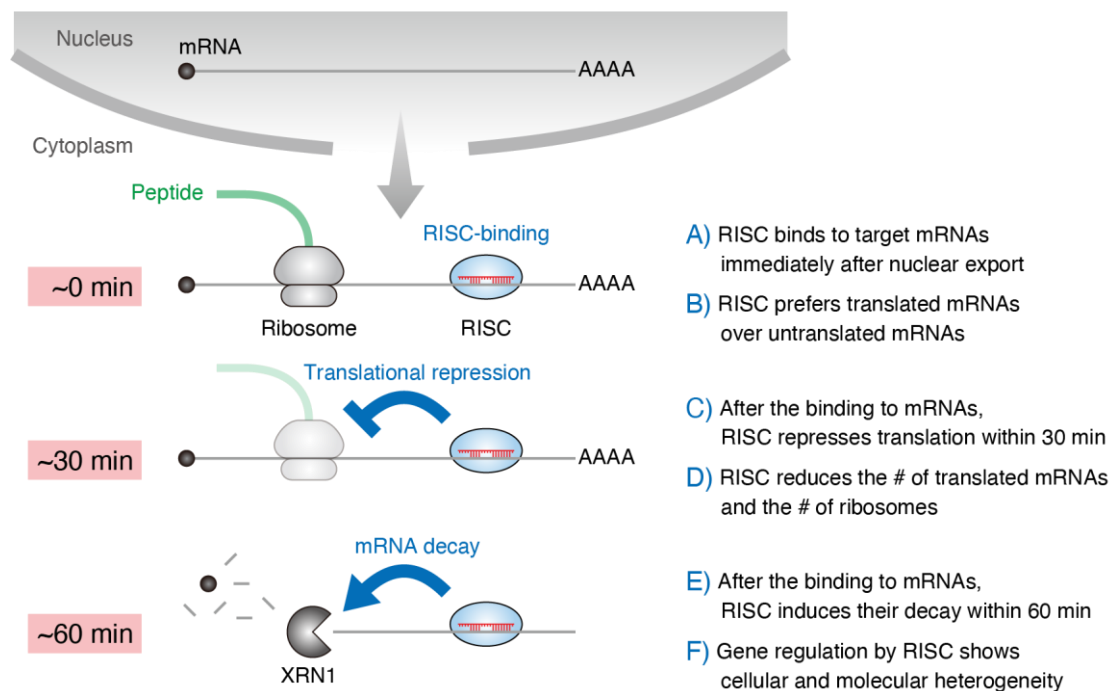


図3 RISC の細胞内における時空間解析から得られた新規知見

研究計画 4: RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで操作する新規手法の開発

本研究では最後に、RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで操作する新規手法の開発を試みた。ここでは、光誘導性の蛋白質間相互作用により、光照射した任意のレポーター mRNA へと RISC をリクルートし、mRNA 抑制を強制誘導できる手法を開発中である。具体的には、光照射によって RISC と相互作用する「光反応性レポーター mRNA」、光照射によってレポーター mRNA と相互作用する「光反応性 RISC」を構築中である。現在、光反応性レポーター mRNA と光反応性 RISC は、いずれも各種の配列要素を変更したバリエーションの作成が完了している。そこで、このバリエーションの中から、最も効率よく光操作できるペアを同定するべく、精力的に条件検討を進めている。

3. 今後の展開

RISC は生命科学だけでなく、医科学にも極めて大きなインパクトを与える動的・高次構造体である。1 でも言及したように、蛋白質をコードする遺伝子のおよそ 70% が RISC の制御下にあるとされ、RISC はあらゆる生命現象において中心的な役割を果たしている。そのため、その機能の破綻はがんをはじめとする極めて多様な疾患に繋がる。そこで現在、RISC の性質を利用することで、RISC に取り込まれる microRNA を核酸医薬として用いる試みも始まっており、複数のがん・C 型肝炎・2 型糖尿病などが治験の対象となっている (Rupaimoole & Slack, 2017, Nat Rev Drug Discov)。しかしながら、RISC および microRNA については現在も多くの謎が残されており、その本質的な理解は決して十分とは言えない。こうした状況において、本研究では RISC の知られざる時空間的な側面を大きく開拓することに成功し、数多くの本質的な新規知見を得ることに成功した。RISC に関する当該知見、さらには本研究で開発した新規手法によって今後明らかになっていく各種の知見は、RISC と microRNA の医療応用をより合理的に推進するための確かな基盤として、今後社会に還元されていくことが大いに期待される。

4. 自己評価

本研究では、当初の研究計画の大部分が実際に成功に至り、研究計画 4 こそ道半ばではあるものの、「RISC の知られざる時空間的な側面への理解を格段に深める」という当初の目的を達成することができた。また、非公開ながら当初の研究計画では全く想定していなかった驚くべき知見も得られており、本研究は高く設定した当初のゴールに恥じない成果が得られたものと考えている。その一方で、研究計画 1, 2, 3 の成果をまとめたメイン論文がいわゆるトップジャーナルからは最終的にリジェクトされてしまい、Nature Communications 誌での発表になったことには、大いに悔いが残る。このメイン論文については、論文自体の評価こそ高いものの (全体トップ < 5% の Altmetrics、国際純粋応用生物物理学連合 IUPAB award、日本生物物理学会 若手奨励賞、日本蛋白質科学会 若手奨励賞優秀賞など)、本研究は「publication」という観点からは胸を張れるものとは言い難い。今後、精力的に研究を継続することで、研究計画 4 の結果をはじめとする本研究の成果を全て論文化し、microRNA の医療応用といった社会実装にも貢献するべく、早期に国内外に共有していきたい。

最後に「自己評価」として、このさきがけの 3 年間で、研究者として多くの面で別人のように成長できたと感じている。力ある研究者が集う領域会議は常に学びの宝庫であり、自分にはない技術や手法、時には研究のマネジメント方法など、良い意味で幾つも盗むことができた。さらに、領域会議だけでなく、さきがけ研究者による勉強会「サテライト ミーティング」や、さきがけ研究者で企画する「さきがけ共催ワークショップ」をはじめ、さきがけ研究者と何度も顔を合わせ、さきがけ終了後も続く素晴らしい人の繋がりを築くことができた。また、さきがけ開始前は米国に留学中の無名なポスドクだった立場も、2 度の異動を経て、現在は准教授 PI として自らのイメージング設備と自らの研究グループと共に、研究を進める立場となった。そして何より、自らの研究者としての「色」を確立し、自らのライフワークとなる「問い」を見出すことができた。こうした全ての飛躍の原動力たるさきがけ「細胞の動的・高次構造体」には、心から感謝申し上げたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:2件

1. Hotaka Kobayashi*, Robert H Singer* (*, Corresponding authors)
Single-molecule imaging of microRNA-mediated gene silencing in cells
Nature Communications 13(1):1435 2022

本論文では、研究計画 1「RISC の機能発現を 1 分子 mRNA レベルで可視化する新規手法の開発」に成功し、この新規手法を用いて、研究計画 2「RISC の細胞内における時間的解析」および研究計画 3「RISC の細胞内における空間的解析」を行った。その結果、2 (2) A-F といった RISC の時空間的な新規知見を数多く得ることに成功し、「RISC の知られざる時空間的な側面への理解を格段に深める」という本研究の目的に適用成果に繋げることができた。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【招待講演】

- ① 小林 穂高
翻訳制御の細胞内 1 分子イメージング
第 2 回 タタバイオ分子クラブ 2022 年 1 月 17 日
- ② Hotaka Kobayashi
Simultaneous visualization of single mRNAs, translation, and RBPs in cells
JASS Meeting 2022 2022 年 5 月 20 日
- ③ Hotaka Kobayashi
Imaging big roles of microRNAs at single-molecule resolution in cells
Symposium on the Life of an mRNA 2022 年 6 月 28 日
- ④ 小林 穂高
microRNA の機能発現を 1 細胞 1 分子レベルで可視化する新規技術の開発
第 60 回 日本生物物理学会年会 2022 年 9 月 28 日
- ⑤ 小林 穂高
mRNA の翻訳制御を 1 分子解像度で in situ イメージングする
第 60 回 日本生物物理学会年会 2022 年 9 月 29 日
- ⑥ Hotaka Kobayashi
Single-molecule imaging of RNA silencing in cells
2022 East Asian Single-Molecule Biophysics Symposium 2022 年 10 月 18 日
- ⑦ 小林 穂高
mRNA・翻訳・RBP の三者を単分子感度で細胞内イメージングする技術
第 2 回 バイオ単分子研究会 2023 年 2 月 6 日
- ⑧ 小林 穂高
蛋白質合成の制御過程を細胞内 1 分子イメージングで見る
第 23 回 日本蛋白質科学会年会 2023 年 7 月 6 日

⑨ 小林 穂高

ncRNA が機能する様子をこの目で見てみたい

第 63 回 生物物理若手の会 夏の学校 2023 年 9 月 6 日

⑩ 小林 穂高

ストレス応答を支える microRNA – その背後にある不思議な現象を複合的なオミクス解析から紐解く –

第 17 回 日本臨床ストレス応答学会大会 2023 年 11 月 17 日

【受賞】

⑪ 小林 穂高

日本生物物理学会 若手奨励賞 2022 年 9 月

⑫ Hotaka Kobayashi

International Union for Pure and Applied Biophysics, IUPAB award 2022 年 9 月

⑬ 小林 穂高

日本蛋白質科学会 若手奨励賞 2023 年 4 月

⑭ 小林 穂高

日本蛋白質科学会 若手奨励賞優秀賞 2023 年 7 月