

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860100

氏名 小林 穂高

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: ニューヨーク (国名: 米国)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

生細胞内一分子 mRNA 翻訳イメージングを用いた RNA サイレンシングの時空間的解析3. 派遣期間: 平成・令和 30 年 10 月 1 日 ~ 令和 2 年 12 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名: Albert Einstein College of Medicine部局名: Department of Anatomy & Structural Biology5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究・調査実施状況】

microRNA は、タンパク質をコードしない 22 塩基ほどの小さな RNA であり、相補的な配列を持つ mRNA の発現を抑制する (図 1)。この現象は、「RNA サイレンシング」と呼ばれる。microRNA はヒトゲノムに約 2,000 種類もコードされており、タンパク質をコードする全遺伝子の 70% ほどの発現を制御すると考えられている。そのため、RNA サイレンシングは様々な生命現象において重要な役割を果たしており、その破綻は多様な疾患を引き起こす。従って、RNA サイレンシングへの本質的な理解を深めることは、生命科学において極めて重要である。

microRNA は Argonaute (AGO) タンパク質に取り込まれ、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成することで機能する (図 1)。RISC は、3' UTR 内に microRNA と相補的な配列を持つ mRNA を認識した後、その翻訳を抑制する。その後、翻訳を抑制された mRNA は分解される。

RNA サイレンシングは、これまで主に、生化学的手法 (レポーター mRNA を用いた *in vitro* アッセイなど) を用いて研究が進められてきた。

こうした手法は、生命現象の分子機構に迫る上で非常に強力であり、RNA サイレンシングの分子側面については理解が進んでいる。ただし、生化学的手法から得られる知見には限界もある。特筆すべき点として、生化学的なデータには細胞内の時空間情報が含まれない。そのため、RNA サ

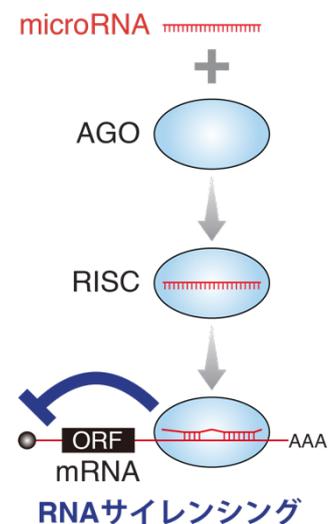


図 1: microRNA による
遺伝子発現抑制
(RNA サイレンシング)

イレンシングの時空間的な側面については、驚くほど理解が遅れている。さらに、生化学的手法による RNA サイレンシングの実験結果は、数多くの細胞に由来する数多くの mRNA の総和である。そのため、こうした手法では、RNA サイレンシングという現象の細胞間の差異・mRNA 間の差異については検証することが出来ない。そこで、本研究では、こうした RNA サイレンシングの未解明の側面にアプローチすべく「細胞内で起こる RNA サイレンシングを可視化する」イメージング法の確立を試みた。

本研究では第一に、受入先である Robert H. Singer 研究室 (Howard Hughes Medical Institute, Janelia Research Campus 及び、Albert Einstein College of Medicine) で開発された、生細胞内一分子 mRNA 翻訳イメージング (Wu et al., 2016, *Science*) の原理を活用し、RNA サイレンシングを可視化するためのレポーター mRNA を作成した。このレポーター mRNA の特徴は以下の通りである。

- A) Single-molecule FISH (smFISH) と呼ばれる手法を用いることで、細胞内において一分子レベルで可視化できる。
- B) ORF 内に、SunTag と呼ばれる配列が挿入されている。SunTag は GCN4 エピトープを 24 箇所タンデムに有するため、GCN4 抗体を用いた免疫染色により、新生ペプチドを一分子レベルで可視化できる。すなわち、smFISH と免疫染色を同時に行うことで、mRNA とその翻訳活性を同時に可視化できる。
- C) 3' UTR 内に、microRNA の相補的配列 (あるいは、変異を導入したコントロール配列) が挿入されている。

このレポーター mRNA をヒト U2OS 細胞へ導入し、smFISH と免疫染色により、mRNA と翻訳活性を可視化した。その後、蛍光顕微鏡を用いて 3D イメージングを行い、MATLAB を用いてデータを定量解析した。その結果、コントロールと比較して、一細胞レベル・一分子 mRNA レベルの両方で翻訳活性の低下が確認された。すなわち、細胞内で起こる RNA サイレンシングを可視化する手法の確立に成功した。今後、本手法を足がかりとして、RNA サイレンシングの時空間的な側面について解析を進めていく予定である。なお、本手法は固定細胞を用いたものであるため、今後、生細胞イメージングも可能な手法へと改良したいと考えている。

従来の生化学的手法とは異なり、本手法を用いれば RNA サイレンシングの活性を細胞ごと・mRNA ごとに解析できる。そこで、本研究では第二に、RNA サイレンシングの一細胞一分子 mRNA 解析を行った。まず、一細胞解析の結果、細胞集団中には RNA サイレンシングによって翻訳活性が 0 になる細胞もいれば、ほとんど RNA サイレンシングが起こらない細胞もいることが明らかになった (図 2 上部)。次に、一分子 mRNA 解析を行ったところ、RNA サイレンシングが起こっている細胞では、翻訳されない mRNA の数が増加すること、さらに翻訳される mRNA についてもリボソームの数が減少することを見出した (図 2 下部)。

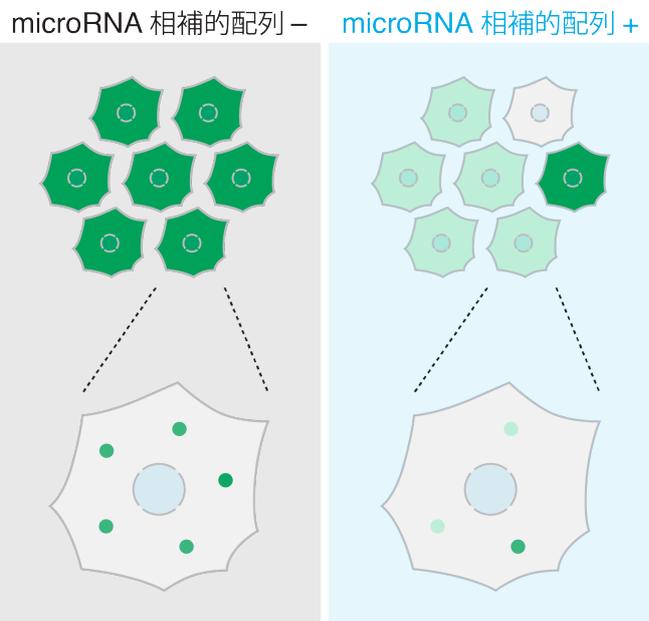


図 2 : RNA サイレンシングの一細胞一分子 mRNA 解析

以上の「細胞内で起こる RNA サイレンシングを可視化する」手法と、一細胞一分子 mRNA 解析の結果については、筆頭著者・責任著者として論文投稿へ向けた準備を進めている。

【成果の発表・関係学会への参加状況】

海外特別研究員としての派遣期間中、本研究に関連する内容を、筆頭著者・責任著者として *Molecular Cell* 誌、*Cell Reports* 誌、*Autophagy* 誌に発表した。また、JMSA New York Life Science Forum 2019 において、研究発表を行った。

- 1) Iruka Eliminates Dysfunctional Argonaute by Selective Ubiquitination of Its Empty State.
Hotaka Kobayashi#, Keisuke Shoji, Kaori Kiyokawa, Lumi Negishi, Yukihide Tomari#
(# *Corresponding authors*)
Molecular Cell 73(1) 119-129. January, 2019
- 2) VCP, which is associated with multiple genetic disorders, mediates quality control of Argonaute, the core of microRNA-mediated gene silencing.
Hotaka Kobayashi, Keisuke Shoji, Kaori Kiyokawa, Lumi Negishi, Yukihide Tomari
JMSA New York Life Science Forum 2019 (Poster presentation). April, 2019
- 3) VCP Machinery Mediates Autophagic Degradation of Empty Argonaute.
Hotaka Kobayashi#, Keisuke Shoji, Kaori Kiyokawa, Lumi Negishi, Yukihide Tomari#
(# *Corresponding authors*)
Cell Reports 28(5) 1144-1153. July, 2019
- 4) Identification of an AGO (Argonaute) protein as a prey of TER94/VCP.
Hotaka Kobayashi#, Yukihide Tomari# (# *Corresponding authors*)
Autophagy 16(1) 190-192. January, 2020