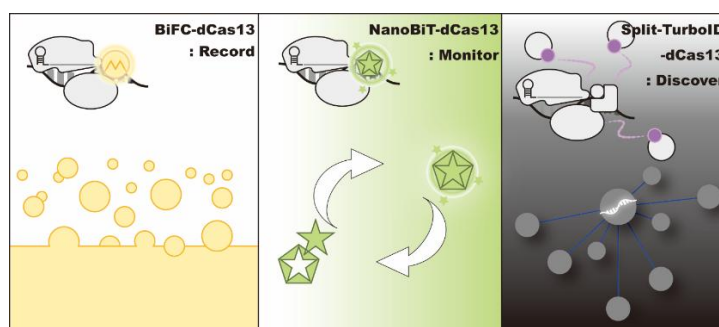


RNA-タンパク質相互作用を対象とした 新たな研究ツールの開発 ——「記録」「測定」「探索」で RPI を多角的に解析——

発表のポイント

- ◆RNA を標的とする CRISPR/Cas13 と既存のタンパク質間相互作用解析技術を組み合わせ、「BiFC-dCas13」「NanoBiT-dCas13」「split-TurboID-dCas13」という三つの RNA-タンパク質相互作用 (RPI) 解析ツールを開発しました。
- ◆BiFC-dCas13 は RPI の履歴を「記録する」、NanoBiT-dCas13 は RPI の変化を「測定する」、split-TurboID-dCas13 は RPI 周辺の分子を「探索する」という、それぞれ異なる特徴を持つことを示しました。
- ◆これらの技術を駆使して RNA とタンパク質の相互作用を多角的に解析することで、未解明の生命現象の理解につながる可能性があります。



本研究で開発した三つの RNA-タンパク質相互作用解析技術の概念図

概要

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻メディカルサイエンス講座先進分子腫瘍学分野の合山進教授、山本圭太助教、四方紫織学術専門職員と同大学医科学研究所タンパク質代謝制御分野の佐伯泰教授、富田拓哉助教らによる研究グループは、RNA を標的とする CRISPR/Cas13(注 1)と既存のタンパク質間相互作用解析技術を組み合わせ、「BiFC-dCas13」「NanoBiT-dCas13」「split-TurboID-dCas13」という三つの新しい RNA-タンパク質相互作用 (RPI、注 2) 解析ツールを開発しました (図 1)。

RPI は、RNA の機能制御や細胞内構造体の形成など多くの生命現象に関わっています。しかし、生きた細胞内で特定の RPI を解析する手法は限られていました。

研究グループは、今回開発した三つの RPI 解析ツールを長鎖ノンコーディング RNA「NEAT1」(注 3)と RNA 結合タンパク質「NONO」(注 4)の相互作用解析に応用し、RPI の蛍光検出、動的变化の測定、周辺タンパク質の網羅的探索を実現しました。さらに、周辺分子として同定した YTHDC1 (注 5)が NEAT1 の安定化を介してパラスペックル (注 6)形成を支えることを明らかにしました。本研究で開発した技術は、さまざまな RPI や細胞内高次構造の解析に役立つことが期待されます。

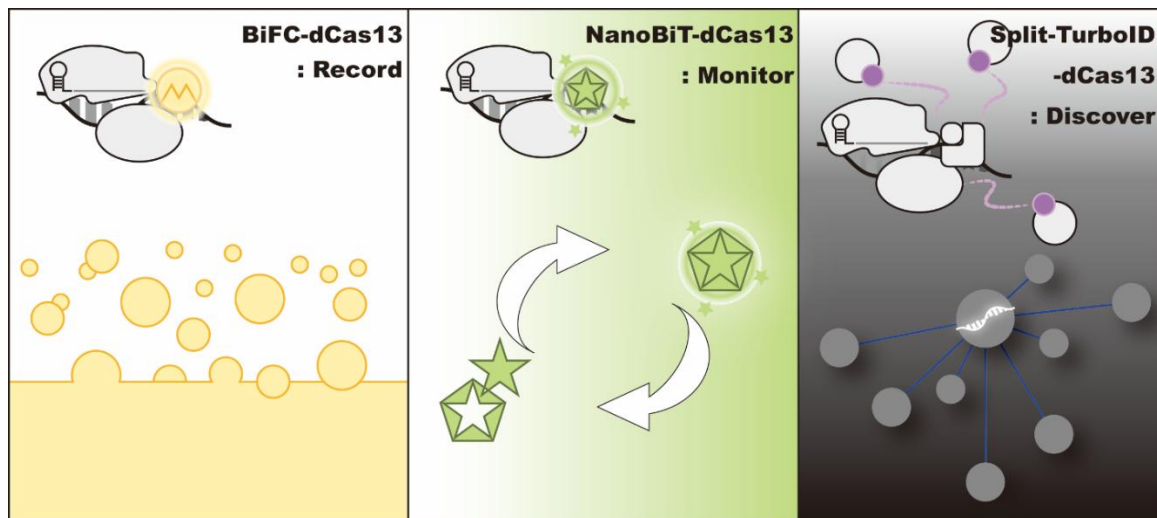


図 1：本研究で開発した三つの RNA-タンパク質相互作用解析技術の概念図

RNA を標的とする dCas13（注 7）と既存のタンパク質間相互作用解析技術を組み合わせ、三つの新しい RNA-タンパク質相互作用（RPI）解析ツールを開発した。BiFC-dCas13 は RPI の履歴を蛍光として「記録する」、NanoBiT-dCas13 は RPI の動的な変化を化学発光によって「測定する」、split-TurboID-dCas13 は RPI 周辺に存在するタンパク質を標識して「探索する」という、それぞれ異なる特徴を持つ。

発表内容

細胞の中では DNA・RNA・タンパク質などさまざまな分子が相互作用して機能しています。特に、タンパク質同士の相互作用であるタンパク質-タンパク質相互作用（PPI）は長年にわたり活発に研究されてきました。一方、タンパク質と RNA の相互作用である RNA-タンパク質相互作用（RNA-Protein Interaction：RPI）については、PPI ほど十分に理解されていません。この背景には、「特定の RNA とタンパク質の相互作用を、生きた細胞内で捉える」ための技術的な壁がありました。

RNA は蛍光タンパク質や酵素などの機能性分子を直接融合することが難しく、生きた細胞内で特定の RNA やその相互作用を追跡するには技術的な制約があります。RPI は RNA が細胞内どのように働き、維持され、分解されるかを制御するだけでなく、近年注目を集める細胞内の相分離構造体の形成などにも密接に関わっています。そのため、新しい RPI 研究ツールの開発は、未解明の生命現象を研究する上で重要です。

CRISPR/Cas システムの一つである CRISPR/Cas13（Cas13）は、RNA を標的として切断し、遺伝子発現を抑制する技術として利用されています。また、RNA 切断活性を不活化した catalytic-dead Cas13（dCas13）は、RNA を切断せずに特定の RNA へ誘導することができます。

今回、研究グループは、「BiFC-dCas13」「NanoBiT-dCas13」「split-TurboID-dCas13」という新たな三つの RPI 研究ツールを開発しました。「BiFC」「NanoBiT」は、それぞれ蛍光・化学発光シグナルを活用して PPI を検出する技術で、「split-TurboID」は PPI 周辺の分子を標識する近接標識法です。本研究ではこれらの技術を dCas13 と組み合わせることで、RPI を多角的に観察する新しいツールを開発することを目指しました。

本研究では三つの新技术を用いて、NEAT1 と NONO の RPI を観察しました。NEAT1 と NONO の相互作用は核内高次構造体であるパラスペックルの形成において重要な RPI であることが知られています。

研究グループは初めに、BiFC-dCas13 のタンパク質設計・ガイド RNA (注 8) 設計を最適化し、細胞内で NEAT1 と NONO の相互作用を蛍光シグナルとして検出することに成功しました。BiFC-dCas13 は、一度生じた蛍光シグナルが残るため、RPI の履歴を蛍光として蓄積する性質を持ちます。この性質によって、NEAT1 と NONO の相互作用を蛍光シグナルの積算として顕微鏡で観察したり、フローサイトメーター (注 9) で検出したりすることが可能になりました (図 2A, 2B)。

一方で、BiFC-dCas13 の積算的な性質・不可逆性は RPI の変化の検出には適していません。そこで研究グループは、新たに NanoBiT-dCas13 を開発しました。NanoBiT は化学発光により PPI を検出するシステムで、可逆的な性質を持つことが特徴です。NanoBiT-dCas13 を用いることで、NEAT1 と NONO の相互作用を化学発光シグナルで検出することができました (図 2C)。さらに、試薬を用いてパラスペックル形成を阻害すると、発光シグナルも低下しました (図 2D)。これらの結果から、NanoBiT-dCas13 を用いて RPI の動的な変化を細胞内で評価できることが示されました。

研究グループはさらに、split-TurboID-dCas13 を開発しました。NEAT1 と NONO を対象として split-TurboID-dCas13 を用いると、RPI 周辺に存在するタンパク質が網羅的に標識されます (図 2E)。質量分析器を用いて標識されたタンパク質を調べると、既知のパラスペックル構成タンパク質やさまざまな RNA 結合タンパク質が多数含まれていることが明らかになりました。研究グループは NEAT1 と NONO の相互作用周辺に RNA 修飾に関わるタンパク質が多数あることに着目し (図 2F)、その中で YTHDC1 が NEAT1 の安定化を介してパラスペックル形成を支えることを明らかにしました。これらの結果から、split-TurboID-dCas13 が RPI 周辺分子探索のスクリーニングツールとして有用であることが分かりました。また、研究グループは NEAT1-YTHDC1 や XIST-YTHDC1 といった、NEAT1-NONO とは異なる RNA-タンパク質相互作用にも BiFC-dCas13 を応用できることを示しました。

本研究で開発された三つのツールはそれぞれ異なる特徴を持っています。BiFC-dCas13 は相互作用の履歴を「記録する」、NanoBiT-dCas13 は相互作用の変化を「測定する」、split-TurboID-dCas13 は相互作用の周囲に存在する分子を「探索する」ためのツールです。生命現象に深く関わる RPI には、いまだ解明されていない点が多く残されています。今回開発した三つの技術は、さまざまな RPI を解析し、その役割を明らかにするための新たなツールとして活用されることが期待されます。

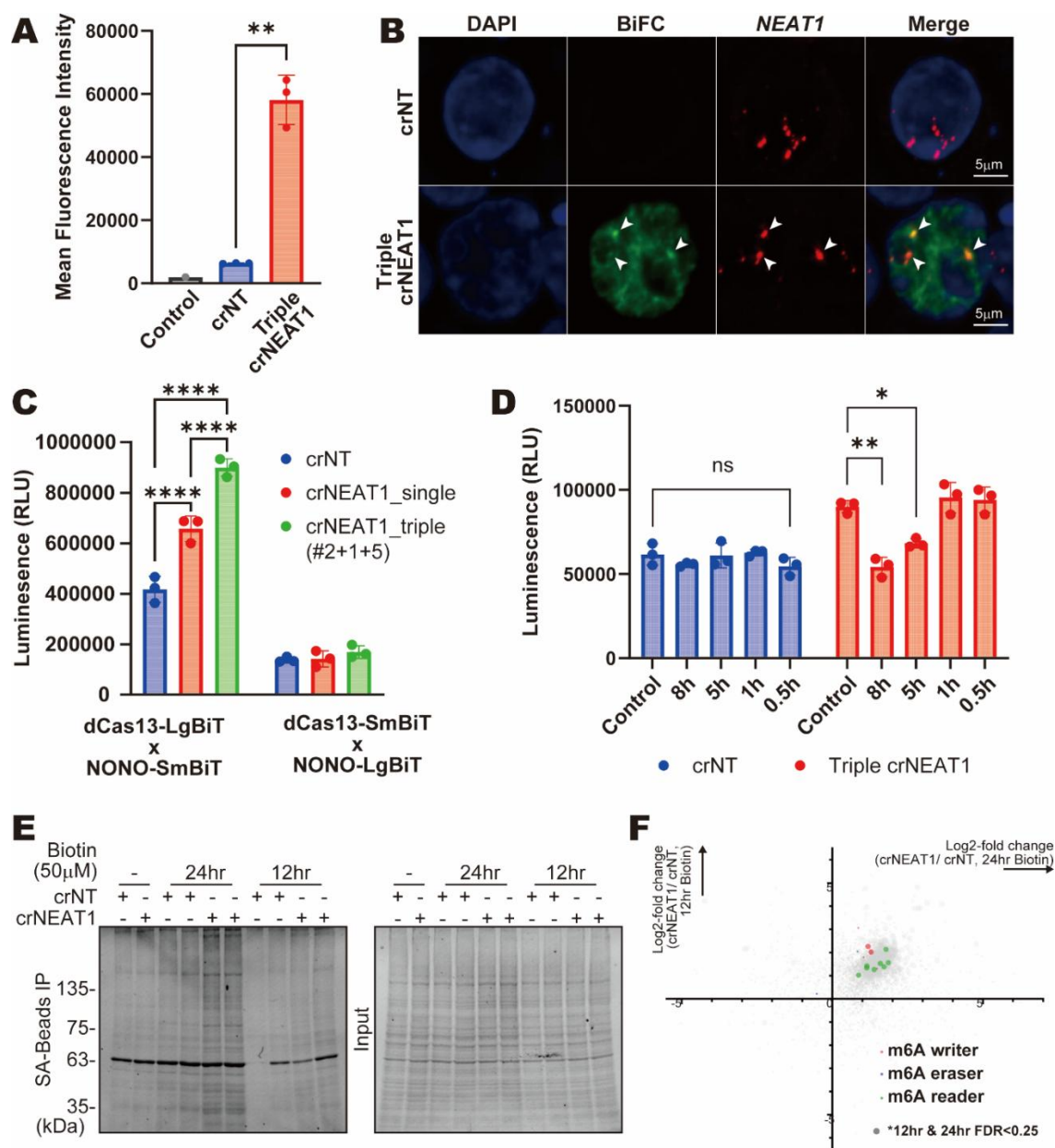


図 2 : NEAT1-NONO を対象とした BiFC-dCas13・NanoBiT-dCas13・split-TurboID-dCas13 の開発

A、B : BiFC-dCas13 による RPI の蛍光記録

NEAT1 を標的とするガイド RNA (crNEAT1) を用いることで、非標的ガイド RNA (crNT) と比較して強い蛍光シグナルが検出された (A)。顕微鏡観察でも、crNEAT1 を用いた細胞で BiFC 蛍光が検出され、その一部は NEAT1 陽性領域と重なっていた (矢頭、B)。

C、D : NanoBiT-dCas13 による RPI の動的変化の測定

NEAT1 を標的とすることで NEAT1-NONO 相互作用に依存した化学発光シグナルが得られた (C)。転写を阻害すると NEAT1-NONO に依存する発光シグナルが時間とともに低下し、RPI の動的な変化を検出できることが示された (D)。

E、F : split-TurboID-dCas13 による RPI 周辺分子の探索

NEAT1-NONO 相互作用の周辺に存在するタンパク質をビオチン標識して回収し、質量分析により網羅的に解析した (E)。その結果、RNA 修飾に関わるタンパク質、特に YTHDC1 を含む m6A 「リーダー」 タンパク質が NEAT1-NONO 周辺分子として検出された (F)。

発表者・研究者等情報

東京大学

大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 メディカルサイエンス講座

先進分子腫瘍学分野

合山 進 教授

山本 圭太 助教

四方 紫織 学術専門職員

医科学研究所 基礎医科学部門 タンパク質代謝制御分野

佐伯 泰 教授

富田 拓哉 助教

論文情報

雑誌名 : Nucleic Acids Research

題 名 : Development of CRISPR/Cas13-based analytical tools to study RNA-Protein Interactions (10月13日付)

著者名 : Keita Yamamoto, Shiori Shikata, Yangying Hao, Takuya Tomita, Rina Kanai, Els Verhoeven, Yasushi Saeki, Susumu Goyama*

DOI: 10.1093/nar/gkag928

URL: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkag928>

研究助成

本研究は、日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業 基盤研究（B）（22H03100）、新学術領域研究（研究領域提案型）（21H00274）、国際共同研究加速基金（国際共同研究強化（B））（22KK0127）、科学研究費助成事業（JP22K16319；JP24K19216；JP23H05479）、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の次世代がん医療加速化研究事業「RNA 作動療法に関する研究開発」、日本血液学会研究助成、公益財団法人東京生化学研究会研究助成、公益財団法人上原記念生命科学財団研究助成、公益財団法人持田記念医学薬学振興財団研究助成の支援を受けて実施されました。

用語解説

（注1）CRISPR/Cas13

RNA を標的とする CRISPR/Cas システムの一種。ガイド RNA と呼ばれる短い RNA によって特定の RNA 配列を認識し、標的 RNA を切断することができる。遺伝子発現の抑制や RNA 研究などに利用されている。

（注2）RNA-タンパク質相互作用（RPI）

RNA とタンパク質が結合したり、近接したりすることで生じる分子間相互作用。RNA の安定性、局在、翻訳などの制御に関わるほか、細胞内構造体の形成にも重要な役割を持つ。本研究では RNA-Protein Interaction の略称として RPI を用いている。

（注3）長鎖ノンコーディング RNA 「NEAT1」

タンパク質の設計情報を持たない比較的長い RNA の総称を「長鎖ノンコーディング RNA」という。英語では long non-coding RNA (lncRNA) と呼ばれる。タンパク質を作るための情報を伝える RNA とは異なり、遺伝子発現や細胞内構造の制御など、RNA そのものがさまざまな機能を

担う。「NEAT1」は長鎖ノンコーディング RNA の一つで、細胞核内に存在するパラスペックル（注 6）と呼ばれる構造体を形成するための足場として重要な役割を持つ。本研究では、RNA-タンパク質相互作用を解析するための代表的な標的 RNA として用いた。

（注 4）RNA 結合タンパク質「NONO」

RNA や DNA に結合するタンパク質の一つ。NEAT1 と相互作用し、パラスペックルを構成する主要なタンパク質として知られている。本研究では NEAT1 と NONO の相互作用をモデルとして、新たに開発した解析技術の性能を評価した。

（注 5）YTHDC1

RNA に付加される化学修飾の一つである m6A を認識するタンパク質。RNA の成熟、輸送、安定性などの制御に関わる。本研究では split-TurboID-dCas13 を用いた解析から NEAT1-NONO 相互作用周辺の分子として着目し、NEAT1 の安定化を介してパラスペックル形成を支えることを明らかにした。

（注 6）パラスペックル

細胞核内に形成される膜を持たない微小な構造体。長鎖ノンコーディング RNA である NEAT1 を足場として、NONOをはじめとする多くのタンパク質が集合して形成される。RNA や遺伝子発現の制御などに関与すると考えられている。

（注 7）dCas13

Cas13 の RNA 切断活性を人工的に失わせたタンパク質。RNA を切断せず、ガイド RNA によって指定された RNA へ結合させることができる。本研究では、この性質を利用してさまざまな解析分子を特定の RNA の近くへ運んでいる。

（注 8）ガイド RNA

CRISPR/Cas システムにおいて、Cas タンパク質を目的の標的配列へと誘導する役割を持つ短い RNA。Cas13 では crRNA（CRISPR RNA）と呼ばれ、Cas13 と複合体を形成して、相補的な配列を持つ標的 RNA を認識する。本研究では、ガイド RNA の配列を設計することで、dCas13 を目的の RNA へ誘導している。

（注 9）フローサイトメーター

細胞などの微小な粒子を液体の流れに乗せて一つずつ通過させ、レーザー光を照射することで、その大きさや内部構造、蛍光などの性質を測定する装置。蛍光タンパク質や蛍光色素と組み合わせることで、多数の細胞について特定のタンパク質の発現量や蛍光シグナルの強さなどを一細胞単位で定量することができる。装置によっては、測定した性質に基づいて特定の細胞を分離・回収することも可能である。

問合せ先

〈研究内容について〉

東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 先進分子腫瘍学分野
教授 合山 進（ごうやますすむ）

<https://www.cbms.k.u-tokyo.ac.jp/lab/goyama.html>

〈機関窓口〉

東京大学大学院新領域創成科学研究科 広報室

<https://www.k.u-tokyo.ac.jp/>

東京大学医科学研究所 プロジェクトコーディネーター室（広報）

<https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/>