
細胞内の複数のマイクロ RNA を同時に検知して

細胞を生きたまま精密に分けることに成功

ポイント

- メッセンジャーRNA (mRNA)^{注1)}を細胞内に導入することで、一度に複数の細胞内マイクロ RNA (miRNA)^{注2)}を検知し、生きた細胞で多変量解析^{注3)}を実行することができた。
- 細胞によって発現量が異なる複数の miRNA を同時に検出することで、細胞の種類や分化段階に応じて細胞を分画することに成功した。

1. 要旨

遠藤慧助教（東京大学大学院新領域創成科学研究科）、齊藤博英教授（京都大学 CiRA 未来生命科学 開拓部門）らの研究グループは、人工 RNA を細胞に導入することで、生きた細胞内の複数のマイクロ RNA (miRNA) を検知して、細胞の種類に応じて精密に分画することに成功しました。これにより、特定の種類の細胞を生きたまま検知することが可能になり、将来的には標的細胞の純化に用いるなど、医療応用に貢献できると期待されます。

この研究成果は 2019 年 8 月 22 日午前 4 時（日本時間）に米国科学誌「*Science Advances*」でオンライン公開されました。

2. 研究の背景

iPS 細胞を用いた再生医療や薬剤スクリーニングを行うには、iPS 細胞を目的の細胞に分化させることが必要です。しかし、必ずしもすべての iPS 細胞が目的の細胞に分化するわけではなく、未分化の細胞や目的と異なる細胞が混じっています。このような細胞集団は、細胞種によって異なる細胞表面の抗原を抗体で検出することで分画する(分ける)ことが可能ですが、最適な表面抗原が同定されていない細胞種も多くあります。

そこで研究グループは、細胞内の miRNA に着目し、細胞種に特異的な miRNA を識別する人工 RNA の開発に取り組んできました。人工 RNA は、細胞内に導入しても一定時間後に消失する点や、細胞内の状態を生きたまま検出できる点が、医療応用における利点であると考えられています。同グループはこれまでに、細胞内の 1 種類の miRNA を識別し、細胞運命を制御する回路(参考: CiRA HP 研究成果 2015 年 8 月 4 日「細胞の機能を精密に制御する人工回路を RNA で構築: ヒトの細胞で成功」 <https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/150804-110938.html>) や、2 種類の miRNA の有無によって論理演算を行い、任意のタンパク質の発現を制御する回路(参考: CiRA HP 研究成果 2018 年 11 月 20 日「人工 RNA 論理回路で細胞の運命を制御する」 <https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/181120-000000.html>) を人工 RNA 上に実現してきました。本研究ではさらに、複数種類の miRNA の発現量を同時に検知して、生きた細胞のまま多変量解析を行い、細胞の状態を定量的に算出できる人工 mRNA の開発に取り組ましました。

3. 研究結果

1) 生細胞内で多変量解析を実行する mRNA の設計

研究グループはまず、1本の mRNA によって複数の miRNA を検知することを試みました。mRNA の 5' 非翻訳領域^{注4)}に、目的の miRNA に相補的^{注5)}な配列を入れる 5つのスロット(任意の配列を挿入できる位置)と蛍光タンパク質の配列を挿入し、細胞内の miRNA が結合すると蛍光タンパク質の発現が低下するような mRNA を作製しました(図 1)。

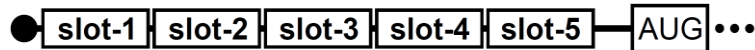


図 1 複数の miRNA を検知する人工 mRNA の構造。slot…miRNA に相補的な配列を入れる部分、AUG…開始コドン^{注6)}

この mRNA のスロットに、HeLa 細胞^{注7)}において発現している複数の miRNA に相補的な配列を挿入し、HeLa 細胞に導入しました。導入する際、それぞれの miRNA の阻害剤を同時に細胞内に入れ、人工 RNA に miRNA が結合していない場合と、1つの miRNA のみが結合している場合、および複数の miRNA が結合している場合での蛍光タンパク質の発現量を比較しました。

その結果、複数の miRNA が同時に作用する場合、その活性はそれぞれの miRNA の活性の乗算値と近い数字になることが明らかになりました。例えば、2種類の miRNA(miR-17-5p および miR-92a-3p)を検知する人工 mRNA において、両者の miRNA に対する阻害剤を導入した場合の蛍光タンパク質の発現量を 1 とすると、miR-17-5p または miR-92a-3p だけを阻害した場合の発現量はそれぞれ 0.78、0.84 でした。さらに、阻害剤を導入しなかった場合(両者の miRNA の活性が阻害されていない場合)には、蛍光タンパク質の発現量は 0.67 となり、これは、一方の miRNA のみを阻害した場合の発現量の乗算値($0.78 \times 0.84 = 0.66$)とほぼ一致しました(図 2A)。同様に、検知する miRNA の数と組み合わせが異なる 12 通りの実験を行ったところ、1種類の miRNA のみを検出した際の数値から試算した値と、実際に複数の miRNA を検出した場合の蛍光タンパク質の発現量はどの組み合わせでもほぼ一致しました(図 2B)。

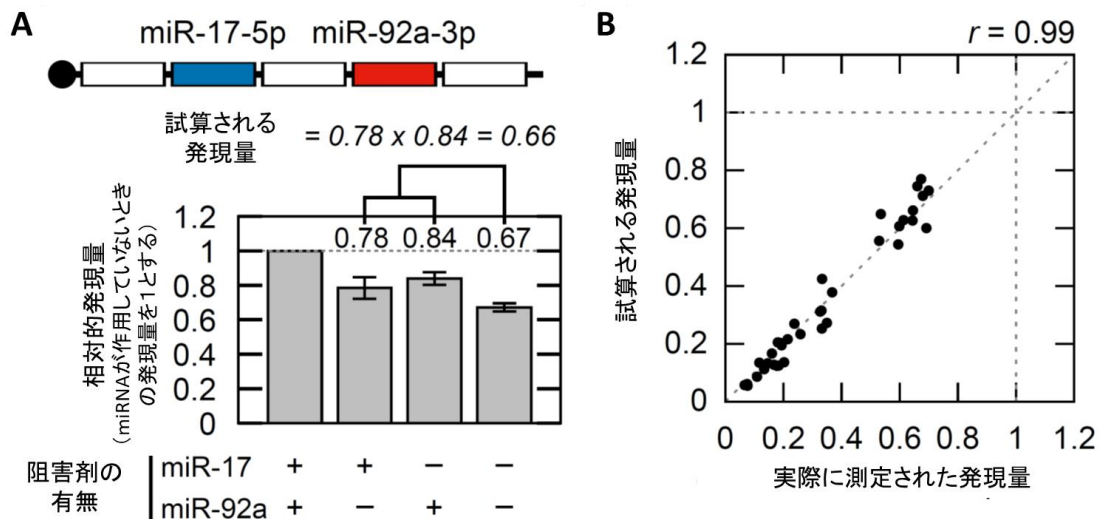


図 2 A: 2種類の miRNA 相補的配列をもつ人工 mRNA の構造と蛍光タンパク質の相対的発現量
B: 複数種類の miRNA を同時に検知した場合の蛍光タンパク質の発現量(横軸)および 1種類の miRNA を検知した場合の発現量に基づく試算値(縦軸)

2) ターゲット配列を入れるスロットの位置による蛍光タンパク質の発現量の変化

1)の実験によって、研究グループは、同じ miRNA を検知する場合であっても、相補的な配列がどのスロットにあるかによって、蛍光タンパク質の発現を阻害する度合いが異なることに気がきました。そこで、相補的な配列の位置が蛍光タンパク質の発現にどのように影響するのかを調べるため、同じ配列を複数、異なるスロットに入れた人工 mRNA を作成しました。1)の実験から、人工 mRNA 上の 5 つのスロットのうち 1 つに miRNA 相補的配列を入れた場合の蛍光タンパク質発現の相対値を ρ とすると、この人工 mRNA からの蛍光タンパク質の発現量は、 ρ の乗算と試算されます(図 3A)。4 種類の miRNA について、試算値と実際の測定値から、測定値を精度よく予測できる各スロットの ρ を算出できました(図 3B)。すると、スロットの位置と発現量には明確な相関関係があり、開始コドンからの距離が大きいほど、発現を抑制する度合いは小さいことがわかりました(図 3C)。

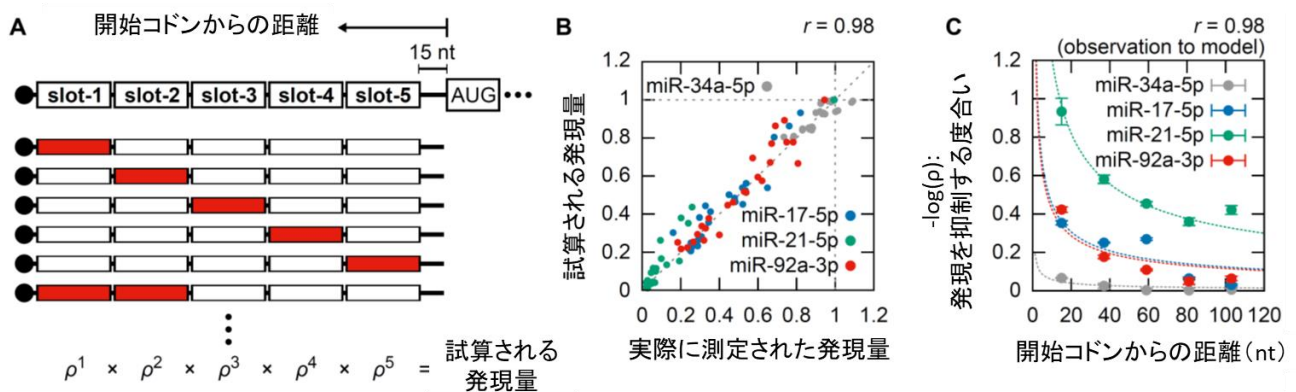


図 3 A: 人工 mRNA 上のターゲット配列の位置の模式図。赤色がターゲット配列の入ったスロットを示す。
B: 同じターゲット配列を複数入れた人工 mRNA を細胞内に導入した場合の蛍光タンパク質の相対的発現量の予測値(縦軸)および実測値(横軸)。
C: ターゲット配列を入れるスロットの位置(横軸)と蛍光タンパク質の発現を抑制する度合い(縦軸)。

3) 生細胞内多変量解析に基づく細胞の分画

続いて、1)、2)の実験をもとに、異なる種類の細胞や、iPS 細胞から分化している途中の段階の細胞を、細胞内の miRNA に基づいて分画することを試みました。まず、細胞内の状態によって特徴的な miRNA を検知できるよう、シミュレーションに基づいて 4 種類の人工 mRNA を設計しました(図 4A)。mRNA は、それぞれが異なる組み合わせの miRNA を検知し、異なる蛍光タンパク質を発現するように設計されており、蛍光の強さの比によって細胞を分画できると予測しました(図 4B)。実際に、設計した人工 RNA をそれぞれの細胞に導入したところ、細胞ごとの蛍光強度の比は、シミュレーションに近い値を示しました(図 4C)。

これらの実験から、生きた細胞を用いて多変量解析を実現することに初めて成功するとともに、iPS 細胞を含む異なる細胞集団を生きたまま精密に分画することができました。複数の miRNA の活性を同時に検出することで、iPS 細胞の分化の過程を精密に識別することにも成功しました。

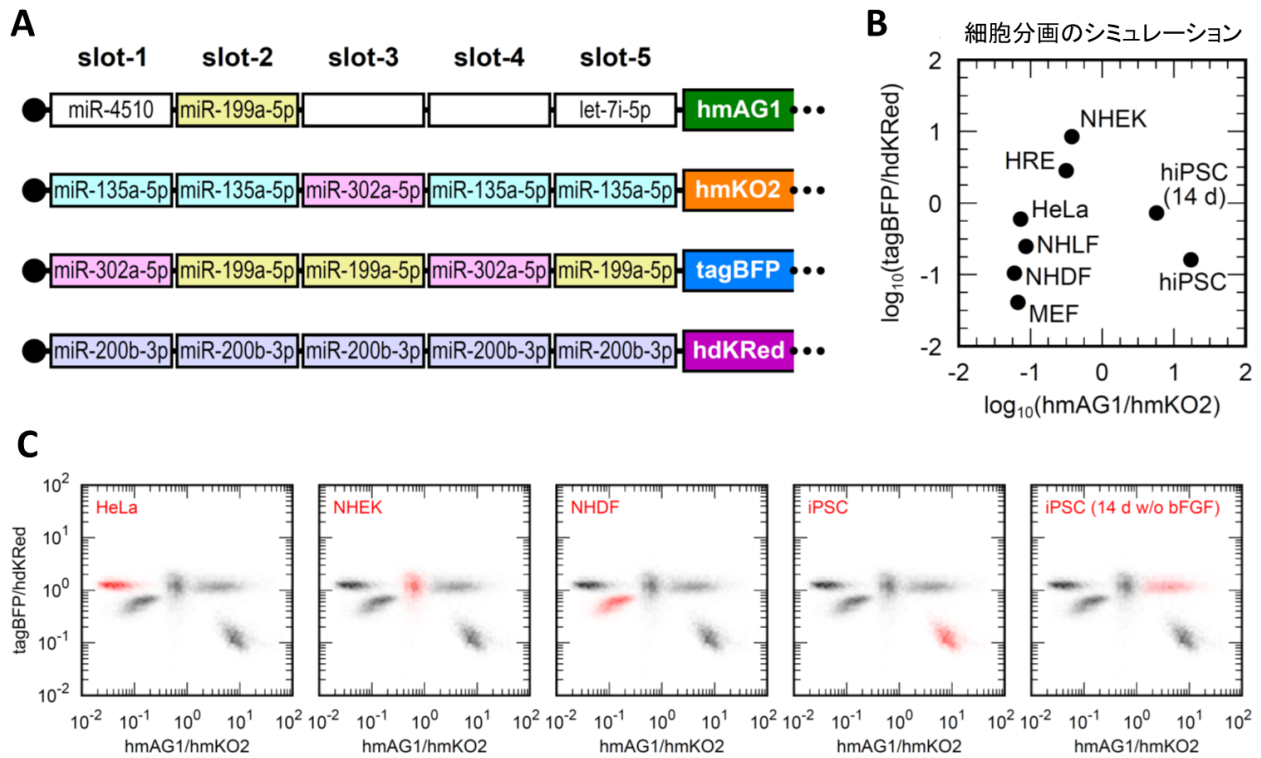


図 4 A: 4 種類の人工 RNA の模式図。スロット内の文字はターゲット配列を示し、hmAG1、hmKO2、tagBFP、hdKRed は蛍光タンパク質の種類を示す。
 B: 蛍光強度の比による細胞分画のシミュレーション。NHDF…ヒト皮膚線維芽細胞、NHLF…ヒト肺線維芽細胞、NHEK…ヒト新生児角化細胞、HRE…ヒト腎臓上皮細胞、MEF…マウス胎児線維芽細胞、HeLa…HeLa 細胞、hiPSC…ヒト iPS 細胞、hiPSC (14 d w/o bFGF)…増殖因子を除いた培地で 14 日間培養したヒト iPS 細胞
 C: 実際に人工 RNA をそれぞれの細胞に導入した場合の蛍光強度の比。赤字は細胞の種類を示し、赤い分画はその種類の細胞を示す。

4. 本研究の意義と今後の展望

従来、細胞内の複数の要素に基づく多変量解析は、細胞を破壊し、その内容物を抽出しなければ行うことができませんでした。一方、本研究では、mRNA を導入することで、細胞内の複数の miRNA の活性に基づき、細胞を生かしたまま多変量解析を行うことを実現しました。また、この解析によって、細胞集団を細胞の種類や分化段階に応じて分画することに成功しました。

今後は、分画の精度をさらに向上させ、純度の高い細胞集団を作り出すことで、再生医療に用いる分化細胞を精密に分画するなどの医療応用への貢献が期待されます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“Numerical operations in living cells by programmable RNA devices”

○ ジャーナル名

Science Advances

○ 著者

Kei Endo^{1,2*}, Karin Hayashi¹, and Hirohide Saito^{1*}

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 東京大学大学院新領域創成科学研究科

*:責任著者

6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より支援を受けて実施されました。

- 日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業 (科研費) 基盤研究 (S)、若手研究 (B)
- 内藤記念科学振興財団
- 日本医療研究開発機構 (AMED) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム

7. 用語説明

注1)メッセンジャーRNA (mRNA)

DNA 上の遺伝子情報は mRNA に転写された後、mRNA から読み取られた情報をもとにタンパク質が合成され (翻訳され)、細胞内で機能する。

注2)マイクロ RNA (miRNA)

マイクロ RNA のこと。20~30 塩基程度の長さの短いノンコーディング (タンパク質をコードしていない) RNA。相補的な配列を持つ mRNA と結合して翻訳を抑制したり、mRNA を分解したりすることで、その mRNA からのタンパク質の合成を抑制する働きをもつと考えられている。

注3)多変量解析

複数の変数を統計的に処理する手法のこと。ここでは、細胞内の複数の miRNA を同時に検知し、それぞれの活性に基づいて細胞種を特定すること。

注4)5' 非翻訳領域

mRNA において、タンパク質に翻訳されない領域。翻訳が始まる部分 (開始コドン) の上流にある。

注5)相補的

DNA や RNA の特定の配列に結合する配列を持っていること。

注6)開始コドン

mRNA の情報をもとにタンパク質を合成するとき、情報の読み取り (翻訳) を始める位置。

注7)HeLa 細胞

ヒト由来の最初の細胞株。ヒト子宮頸がんから分離され、株化された。