

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		非翻訳性 RNA によるテロメア長調節機構の解明－生細胞内1分子動態解析による研究			
研究テーマ (欧文) AZ		Mechanism of telomere maintenance by a non-coding RNA – An approach through single molecule live cell imaging.			
研究氏 代表名 者	カタカナ CC	姓)ヨシムラ	名)ヒデアキ	研究期間 B	2015 ~ 2017 年
	漢字 CB	吉村	英哲	報告年度 YR	2017年
	ローマ字 CZ	Yoshimura	Hideaki	研究機関名	東京大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		東京大学大学院理学系研究科化学専攻・助教			
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>本研究は、染色体末端に存在するテロメア領域からの転写産物である非翻訳性 RNA TERRA によるテロメア長調節機構を、生細胞1分子動態解析により解明することを目指した。申請者は本研究開始前に、改変型 RNA 結合タンパク質 mPUM と二分割緑色蛍光タンパク質(GFP)を用いて、TERRA を生細胞内で蛍光標識し1分子動態を観察することに成功していた。この予備研究を発展させ本研究の目的を達成するため、申請者は TERRA、テロメア、テロメア関連タンパク質の3種の分子について、生細胞内で1分子動態を同時に解析するシステムを構築した。そしてその結果から新規なテロメア調節機構を発見した。</p> <p>まず3色同時生細胞内1分子観察を行うため、テロメアマーカである TRF2 に近赤外蛍光タンパク質 iRFP を、テロメア関連タンパク質には SNAPf タグを介してテトラメチルローダミン(TMR)を用いて蛍光標識し、開発済みの TERRA プローブと共に観察した。観察の結果、20 frame/秒の時間分解能でテロメア、TERRA、テロメア関連タンパク質の動態を生細胞内で観察することに成功した。</p> <p>観察された結果から、TERRA と関連タンパク質との共局在について解析を行った。まず共局在継続時間について解析を行ったところ、HP1 と H2A は TERRA と 0.2 秒以内の共局在しか示さなかった。ここで H2A は TERRA と相互作用をしないと考えられていることから、HP1 も同様に TERRA と共局在を示さないことが明らかとなった。一方 hnRNPA1 は有意に長時間継続する共局在を示した。この結果は、TERRA が hnRNPA1 と複合体を形成していることを示している。次に共局在している TERRA と hnRNPA1 のテロメア周りでの分布について解析した。その結果、TERRA-hnRNPA1 複合体はテロメアから 1 μm 程度離れた領域でもっとも多く形成していることが明らかとなった。さらに動態解析を行った結果、静止している TERRA に動的な hnRNPA1 がやってきて共局在を示していることがわかった。</p> <p>以上の結果を基に、申請者は新規な TERRA 機能モデルを提案した。すなわち、hnRNPA1 は定常状態ではテロメア上に存在する複合体に含まれている。しかし何らかの刺激や状況変化により、TERRA がテロメア周辺で集積すると hnRNPA1 は TERRA にトラップされることでテロメア複合体から離脱する。その結果テロメア複合体の状態が変化し、テロメア調節機能が発動する。以上の結果は生細胞内 1 分子動態解析が実現したことで初めて解明できたものであり、新たなテロメア調節機構の解明に大きく貢献するものである。</p>					
キーワード FA	RNA	テロメア	1分子観察	蛍光顕微鏡	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）										
雑誌	論文標題 ^G _B	Live Cell Imaging of Endogenous RNAs Using Pumilio Homology Domain Mutants: Principles and Applications.								
	著者名 ^{GA}	Hideaki Yoshimura	雑誌名 ^{GC}	Scientific Reports						
	ページ ^{GF}	677	発行年 ^{GE}	2	0	1	8	巻号 ^{GD}	8	
雑誌	論文標題 ^G _B	Real-time fluorescence imaging of single-molecule endogenous non-coding RNA in living cells.								
	著者名 ^{GA}	Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa	雑誌名 ^{GC}	Methods in Molecular Biology						
	ページ ^{GF}	337~347	発行年 ^{GE}	2	0	1	8	巻号 ^{GD}	1649	
雑誌	論文標題 ^G _B	Spatiotemporal analysis with a genetically encoded fluorescent RNA probe reveals TERRA function around telomeres.								
	著者名 ^{GA}	T. Yamada, H. Yoshimura, R. Shimada, M. Hattori, M. Eguchi, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, T. Ozawa	雑誌名 ^{GC}	Scientific Reports						
	ページ ^{GF}	38910	発行年 ^{GE}	2	0	1	6	巻号 ^{GD}	6	
図書	著者名 ^{HA}	吉村英哲、小澤岳昌								
	書名 ^{HC}	蛍光顕微鏡を用いた生細胞内1分子可視化解析法（ナノバイオ・メディシン 第2章）								
	出版者 ^{HB}	近代科学社	発行年 ^{HD}	2	0	1	7	総ページ ^{HE}	221	
図書	著者名 ^{HA}									
	書名 ^{HC}									
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}		

欧文概要^{EZ}

This research aims to reveal the function and mechanism of a non-coding RNA, telomeric repeat-containing RNA (TERRA), through single molecule imaging in living mammalian cells.

Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) is considered to control the structure and length of telomeres through interactions with numerous telomere-binding proteins. However, little had been known on the mechanism of the TERRA function, mainly because of the lack of information of spatiotemporal dynamics on TERRA and its-interacting proteins. In preliminary experiments, I had succeeded in visualization of TERRA in living cells in single molecule sensitivity. Based on this, in this research I established a method to visualize TERRA, telomere and telomere-related proteins simultaneously in living cells in single-molecule sensitivity. Based on the obtained movies captured through this method, I analyzed diffusion dynamics and colocalization of these molecules.

First, I analyzed colocalization duration time of TERRA and the proteins, HP1, hnRNPA1, and H2A. The colocalization duration times of H2A and HP1 with TERRA were within 0.2 sec. Considering that H2A does not interact with TERRA, these two proteins do not form complex with TERRA. On the other hand, hnRNPA1 showed substantially longer colocalization than the other two did. This results indicate that hnRNPA1 forms complex with TERRA. Next, I analyzed the special distribution of TERRA-hnRNPA1 complex formation around telomeres. In this analysis, I found that the complex formation intensively occurs in a region about 1 μm away from a telomere. Furthermore, the complex formation proceeds between static TERRA and mobile hnRNPA1.

Based on these results, I propose a novel model on TERRA functioning mechanism. hnRNPA1 is included in a telomere complex and stay on a telomere in a steady state. Upon TERRA accumulates around telomere, hnRNPA1 is trapped by the TERRA and dissociates from the telomere, resulting in alteration of telomere states. In addition, this research suggests potential of an approach through single molecule imaging to reveal details of molecular mechanism in physiological phenomena.