

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14554

研究課題名(和文) RNA・タンパク質の多分子反応過程を解析する為のRNA相互作用型FRET法の開発

研究課題名(英文) RNA-interacting FRET assay that allows realtime detection of RNA-protein interaction

研究代表者

小保方 潤一 (Obokata, Junichi)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50185667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理を利用して、RNAとタンパク質分子間の近接相互作用をリアルタイムで検出・解析する新しい実験手法(Ri-FRET法)の開発を試みた。具体的には、近年開発されたRNA分子の蛍光標識技術であるspinach法を応用し、それによって蛍光標識した各種のRNA分子と、それとは異なる蛍光色素で標識したRNA結合タンパク質の間でのFRETを検討した。その結果、spinach蛍光単独での経時減衰が予想以上に速いことが明らかになるなど、本手法を確立する上での技術的問題点が明らかになったため、現在、それら克服するための実験・検出系の改良を続けている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop a novel analytical method to detect the RNA-protein interaction by using the fluorescence resonance energy transfer (FRET), and we named this new method as RNA-interacting FRET (RiFRET). For this sake, we introduced the aptamer sequence, namely iSpinach that binds to the fluorophore DFHBI, to the given RNAs, and then examined the FRET between this fluorescent RNA molecules and fluorescently labeled RNA-binding proteins, by spectrofluorometer. In this study, our effort was focused on making the RiFRET system between chloroplast psbE RNA editing site and CREF3, a PPR protein that binds to this editing site as an RNA editing trans-factor labelled by yellow fluorescent protein, Venus. Unfortunately, we still refrain from declaring the success in detecting RiFRET effect between the above molecules. We need improvement of RiFRET system especially in stabilizing the iSpinach-DFHBI fluorescence.

研究分野：ゲノム生物学、分子生物学

キーワード：RNA-protein interaction FRET RNA-Interacting FRET RiFRET psbE CREF3 venus

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は、高等植物の葉緑体内で生じる RNA 編集の分子機構を生化学的手法によって解析してきた。その結果、UV クロスリンク法を用いた RNA とタンパク質因子の結合状態の解析から、基質 RNA と編集装置タンパク質群との間には何段階かの結合・乖離反応が順番に生じ、それによって、転写された新生 RNA が、まずプロセッシングと RNA 編集を受けてから翻訳プロセスに移行するような、いわば転写後ステップでの工程制御機構の存在を示唆する知見を得た。

そこで、その可能性を実験的に検証するため、RNA と複数のタンパク質による多段階の結合・乖離のプロセスを連続的にモニターできる新しい実験手法の開発が必要になった。

(2) これまで、2 種類のタンパク質分子間の結合・乖離をリアルタイムでモニターする方法としては、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer = FRET) を利用した FRET 法が実用化されている。これは、2 種類のタンパク質をそれぞれ異なる蛍光色素で標識し、それらの蛍光発色団が近接することによって生じる蛍光スペクトルの変化を検出・観察する方法である。FRET 法がタンパク質分子間の結合や相互作用の動態解析に有効であることは広く知られており、この用途に使える各種の蛍光標識も実用化されている。

(3) しかしこれまで、RNA 分子の動態解析に FRET 法を応用した例は、筆者の知る限り、報告されていない。その最大の理由は、FRET 解析そのものの前提となる RNA 分子の蛍光標識技術自体が未成熟だったからだと考えられる。

(4) 2011 年に、コーネル大学の Paige らが、緑色蛍光タンパク質 GFP の蛍光発色団の類縁化合物に結合する RNA アプタマー配列を SELEX 法によって人為的に選抜し、その配列を導入することによって RNA 分子を蛍光標識できることを示した。彼らはこの RNA アプタマーを、Spinach と名付けた (Science 333:642, 2011)。

そこで本研究では、この新しい RNA の蛍光標識法を利用して、目的とする RNA 分子とタンパク質との結合・乖離を FRET によってモニターする新しい実験手法の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、世界に先駆けて、任意の RNA とタンパク質の結合・乖離を、FRET の変化で連続的に解析する、RNA 相互作用型 FRET 法 (RNA-interacting FRET 法=RiFRET 法=リーフレット法) の開発を試みる。

(2) RiFRET 法を新たに開発するためには、RNA とタンパク質の相互作用の状況がある程度分かっているモデル系が必要である。そこで本研究では、筆者等がこれまで研究を進めてきた「シロイヌナズナの葉緑体ゲノムにコードされている *psbE* RNA 編集部位と、そこに結合するトランス因子である CREF3 タンパク質」の系を主要なモデルにして、研究を進める。そして可能であれば、新開発の RiFRET 法を利用して、葉緑体 RNA 編集の分子機構について先端的な知見を得ることを目指した

(3) Ri-FRET 実験系の概念図

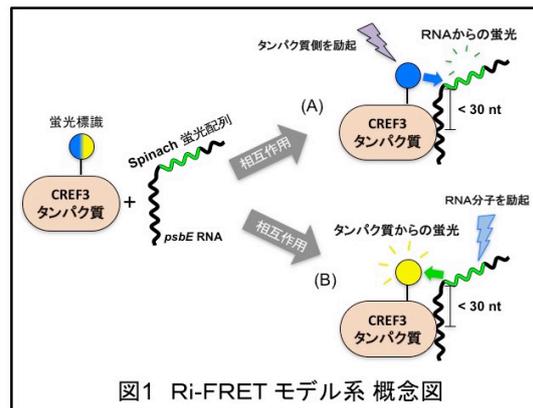


図1 Ri-FRET モデル系 概念図

蛍光アプタマー配列 spinach を導入した *psbE* RNA と、蛍光標識した *psbE* 結合タンパク質 (例: CREF3) が実際に結合すると、両者の蛍光発色団の間で FRET 反応が生じ、それによる蛍光成分の変動を、蛍光分光光度計によって定量的に検出・解析する。タンパク質側の蛍光標識の種類 (波長特性) を変えることにより、RNA とタンパク質の間で、励起分子 (一次蛍光分子) と二次蛍光分子の関係をスイッチすることも、技術的な課題の一つである。

3. 研究の方法

(1) 蛍光標識 RNA の調製

シロイヌナズナ葉緑体の *psbE* 遺伝子配列を単離し、5' 末端に T7 プロモーター配列を連結した後、図 3 に示した位置に、DFHBI 結合性のアプタマー配列「Spinach」を挿入し、*in vitro* 系で RNA を調製した。

(2) 蛍光標識した RNA 結合タンパク質の調製

シロイヌナズナの核ゲノムから単離した *psbE* RNA 結合性タンパク質 CREF3 の遺伝子 (642aa) を大腸菌の発現ベクターにクローン化して生化学的手法でタンパク質を調製・精製することを試みたが、後述するように、大腸菌の菌体内では一切発現させることが出来なかった。そこで、図 5 のように、CREF3 遺伝子に SP6 プロモーターを連結し、*in vitro* 転写した後、小麦胚芽由来の *in vitro* 翻訳系で、目的とするタンパク質を調製した。

(3) 蛍光標識した RNA とタンパク質間の FRET 解析

目的とする RNA とタンパク質等の成分を *in vitro* で混合し、蛍光分光光度計 (JASCO FP8600) を用いて、それぞれ所定の波長で励起した際の蛍光スペクトルとスペクトル成分の経時変化を解析した。

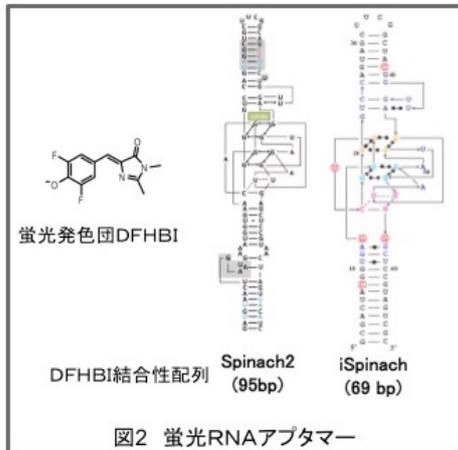
4. 研究成果

(1) 蛍光標識型 *psbE* RNA 分子の作製

① spinach アプタマーの示す蛍光特性

Spinach 配列は、GFP の蛍光発色団の類縁化合物である DFHBI を結合する RNA アプタマーであり、Spinach, Spinach2, babySpinach, iSpinach, などのバリエーションが開発されている (図 2)。これらの RNA アプタマーが DFHBI 存在下で示す蛍光特性等を比較したところ、iSpinach (69bp) が、蛍光強度や RNA 鎖長さなどの点で、本研究の目的に適していることが分かった。そこで、以下の実験では、主に iSpinach 配列を実験に用いた。

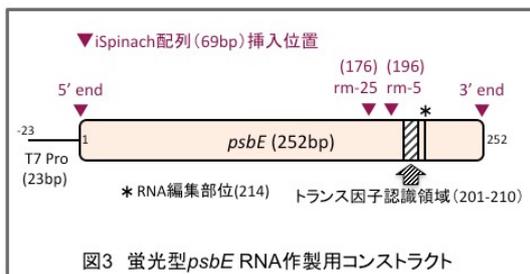
また、Spinach アプタマーが示す蛍光強度に対する溶液中のカチオンの影響を、Spinach2 配列を用いて調べたところ、30mM 以上のカリウムイオンの添加によって、*in*



vitro での蛍光強度が 100 倍ほど増強することがわかった。そこで、以降は、至適濃度のカリウムイオン存在下で、蛍光測定を行った。

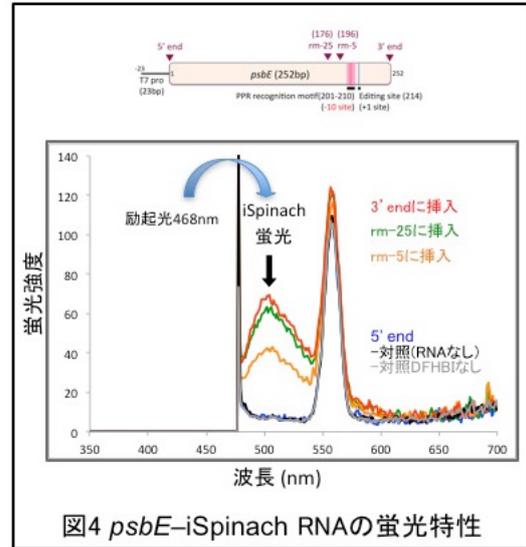
② *psbE* RNA の蛍光標識特性

まず、図 3 に示した *psbE* RNA 上の位置に、それぞれ、図 2 に示した iSpinach 配列を挿入した各種 RNA 分子を作製した。



次に、それらのキメラ RNA が DFHBI 存在下

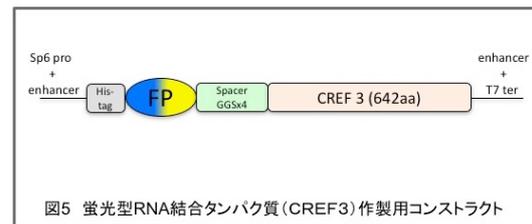
で示す蛍光強度とスペクトルを検討した。その結果、図 4 に示したように、iSpinach 配列を 5' 末端に付加したケースでは殆ど蛍光が観察されなかったのに対し、それ以外の部位に挿入したケースでは、いずれも、468nm の



励起光照射によって、500nm ほどの蛍光成分が DFHBI 存在下特異的に観察された。そこで、これらの RNA 分子を以下の実験に用いた。

(2) 蛍光標識 CREF3 タンパク質の作製

①リコンビナントタンパク質の調製 本研究を遂行する上で最も困難だったのが、*psbE* RNA の RNA 編集部位に特異的に結合するトランス因子である CREF3 タンパク質の調製だった。大腸菌を宿主にする様々な発現ベクターと、それらに適した様々な発現誘導・発現抑制の培養条件を、文字通り数多く比較検討したが、残念ながら、大腸菌の中で目的とするタンパク質を発現させることは一切出来なかった。このタンパク質断片がもつ RNA 結合特性は、大腸菌の中で致命的に作用するものと推測される。そこで、図 5 のコンストラクトを用



いて、小麦胚芽由来の *in vitro* 翻訳系で目的タンパク質を合成した。しかし、大腸菌等の発現ベクターを用いる一般的な方法と比べ、以後の実験に用いることの出来るタンパク質量は、当初予定よりもかなり少なくなった。

②蛍光標識 リコンビナントタンパク質に導入する蛍光標識については、数種類の蛍光タンパク質を用いて予備的検討を行ったが、510nm で励起されて黄色の蛍光を発する Venus が、図 1 の B のモデル系の構築に適し

ていることが分かった。そこで、以後は Spinach→Venus 間での FRET について実験的に検討を進めた。

(3) *psbE* RNA と CREF3 タンパク質の Ri-FRET 解析

① FRET 測定結果とその解釈 上記で調製した蛍光標識 RNA (*psbE*-iSpinach RNA) と蛍光標識タンパク質 (Venus-CREF3) を *in vitro* で混合し、蛍光分光光度計で蛍光の経時変化を測定して、RNA→タンパク質間の FRET (RiFRET) 効果の有無を検討した。そのような測定データの一部を図 6 に示す。

図 6(A) は、蛍光標識 RNA (*psbE*-iSpinach RNA) と、RNA 結合部位を持たない単体の蛍光タンパク質 (Venus) をインキュベートし、0 分、5 分、10 分の時点で蛍光スペクトルを測定したものであり、図 6(B) は、同様の実験を、RNA 結合部位をもつ蛍光タンパク質

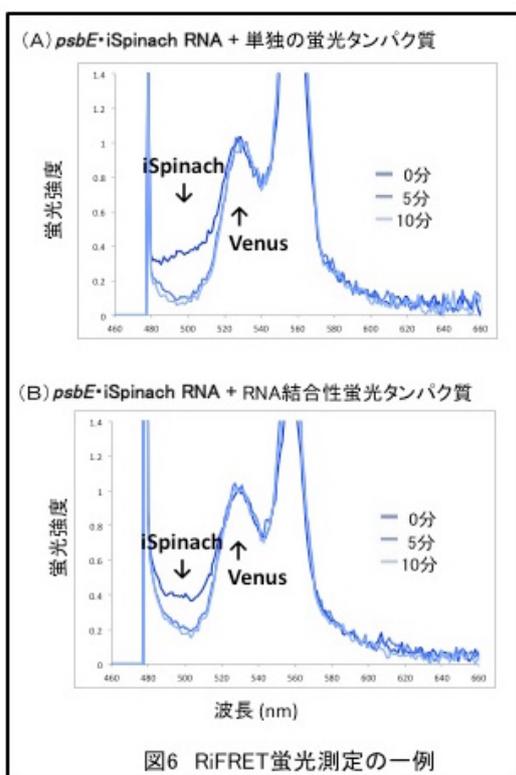


図6 RiFRET蛍光測定の一例

(Venus-CREF3) で行ったものである。この図では、ともに、Venus の蛍光ピークには殆ど経時変化が見られないが、iSpinach の蛍光波長域では顕著な経時減少がみられ、その変化程度が図 6(B) では図 6(A) よりも大きいように見える。

そこで、この iSpinach 蛍光の減少の再現性と、この減少が Venus の蛍光発色団による FRET 効果によって生じたものかどうかを、様々な対照実験によって、比較検討した。しかし、得られた結論は、次のようなものだった。

② iSpinach アプタマーと DFHBI の会合体由来する蛍光は、複合分子単体での経時減衰が

非常に速く、RiFRET のような分子間相互作用の定量的な解析に用いるには、蛍光強度の安定化を含めた実験系の改良が必要である

図 7 に示したのは、暗所で保存した *psbE*-iSpinach 標品と、蛍光スペクトルの測定を数回行った後の標品で、蛍光強度を単純に比較したものである。測定を繰り返すだけ

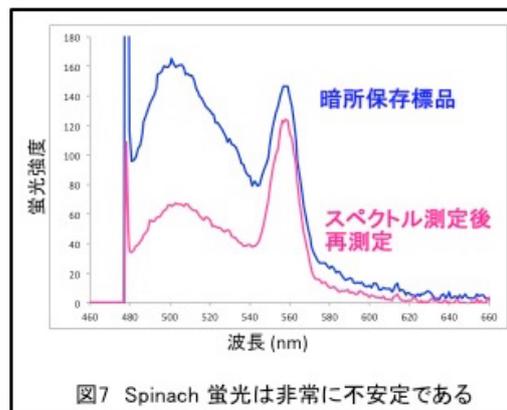


図7 Spinach 蛍光は非常に不安定である

で、蛍光強度が急速に減少していることがわかる。少なくとも Venus の蛍光にはこのような非常に速い減少は見られない。

(4) RiFRET 法を確立する上での問題点と今後への課題

本研究は、RiFRET という、まだ世界で誰も報告していない新しい実験手法の開発を企図している。実際に、蛍光標識 RNA 分子と、蛍光標識 RNA 結合タンパク質を用いて実験を進めたところ、二つの技術的な問題点が明らかになった。

第一点は、RNA 結合タンパク質を、遺伝子組み換え大腸菌を用いて生産することが、予想以上に難しかったことである。大腸菌などの原核細胞では、細胞内で発現・生産された RNA 結合タンパク質が、そのまま細胞内の様々な RNA 成分に結合しやすいため、遺伝子の発現や細胞の増殖が阻害されやすいのではないかと考えられる。実際には、数多くのベクター種やホスト株、培養条件などを試し、さらには、CREF3 以外にも、葉緑体 RNA 編集に係わる数種の RNA 結合タンパク質の発現を試みたが、いずれもうまくいかなかった。おそらく、モデル系に用いる RNA 結合タンパク質を、大腸菌に対する毒性が低いものに換えるか、真核細胞の発現系を用いるなどの工夫が今後必要なのではないかと考えている。

第二点は、Spinach-DFHBI に由来する蛍光の時間安定性が、FRET の定量解析に用いるには、想像以上に、悪かったことである。これについては、①失活したり乖離した Spinach-DFHBI の再会合・再活性化を促進する実験条件の検討を進めるとともに、②大量の RNA 結合タンパク質を実験系に投入するなどの方法で、FRET 効果そのものの検出効率を上げる、などの対応策を考えている。

いずれにせよ、RiFRET 効果が生じることを実証できさえすれば、現在そして近い将来の

分子生物学の方法論に、大きなインパクトを与えることが出来るものと確信している。今回の研究で、RiFRET系を作製するために必要な基盤的な知見が多数明らかになったので、それらを基にして、今後、問題点の改良を進め、是非とも我が国で、RiFRET効果の実証とそれを応用した技術の開発を実現したい。

5. 主な発表論文等

残念ながら、2017年6月中旬の時点では、RiFRET効果を明確に示す実験結果はまだ得られていない。論文発表や学会発表については、上述した問題点の検討を含めて、実験系の改良をもう少し進めた上で、改めて検討したい。

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www2.kpu.ac.jp/life_environt_genome_bio/Site/Top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小保方 潤一 (OBOKATA Junichi)
京都府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：50185667

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

佐藤壮一郎 (SATO Soichirou)
松尾 充啓 (MATUO Mitsuhiro)
杉岡 篤 (SUGIOKA Atsushi)