

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15720

研究課題名（和文）超高輝度蛍光RNAの作出と細胞内RNA動態の可視化

研究課題名（英文）Generation of super-bright fluorescent RNA and visualization of intracellular RNA dynamics

研究代表者

古旗 祐一（Furuhata, Yuichi）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：40828026

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では高輝度な蛍光RNAの取得を目的とし、蛍光RNA配列を部分的にランダム化したライブラリを細胞群に発現させ、明るく蛍光する細胞を取得するスクリーニングを予定していた。しかしランダム化ライブラリの基となる申請者が開発した高輝度蛍光RNAを詳細に解析する上で、高輝度化メカニズムについて興味深い知見が得られた。そこで高輝度化のメカニズムと高輝度化に資するRNAの性質を評価するための新規解析法の構築に研究目的を修正し、当該手法の確立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、蛍光RNAが持つ配列・構造とその蛍光特性との関係性について詳細に理解するため、蛍光相関分光法に基づいた方法論を開発するとともに、既報の蛍光RNAの蛍光特性を再評価した。本法の開発により最先端のRNAイメージングツールである蛍光RNAの特性を一分子レベルで解析し、その発光効率や分子論的性質に関する踏み込んだ評価が可能となった。本解析プラットフォームは多様化と改良が加速している蛍光RNAツールのベンチマークに有効であり、RNAに起因する幅広い疾患や生命現象の解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：To obtain bright fluorescent RNAs, we had planned to express a partially randomized library of the fluorescent RNA sequence in human cells and screen them with fluorescence. In the detailed analysis of the fluorescent RNA we developed, which is the basis of the randomized library, we obtained valuable insights into the relationship between the structure of the fluorescent RNA and its fluorescence mechanism. Thus, we altered our research objective to establish a new analytical method to evaluate the mechanism of high fluorescence and the properties of RNAs that contribute to high fluorescence, and established this method.

研究分野：バイオテクノロジー

キーワード：核酸 蛍光RNA RNA分析 蛍光相関分光法

### 1. 研究開始当初の背景

(1) **RNA** は遺伝情報の伝達やタンパク質の合成、遺伝子発現の抑制など、多様な生命現象の根幹をなす生体高分子である。近年になって、**RNA** の適切な機能発現には細胞内における時間的・空間的な制御が重要であることが報告され始めている。例えば神経細胞の樹状突起では、シナプス可塑性を担うタンパク質の **mRNA** が特異的に輸送・翻訳される。そうすることでシナプスにおける特徴的な細胞機能が制御されるのである。このように **RNA** は細胞内に一様に分布しているのではなく、配列種ごとに濃度分布をダイナミックに変動させながら、下流の生命現象を緻密に制御していると推測されている。しかしながら研究が進んでいるごく一部の **RNA** を除き、時空間制御機構やその生物学的意義は未解明である。その一因は内在 **RNA** 動態の観察における技術不足にあり、継続的なライブイメージングを可能とするツールの開発が急務である。

(2) 1962年に下村博士が緑色蛍光タンパク質 (**GFP: green fluorescent protein**) を報告して以来、タンパク質関連のイメージング技術は急速に発展してきた。**GFP** の遺伝情報を付加するだけで、細胞内における標的タンパク質の発現量や動態を継続的にモニタリングすることが可能になったのである。一方で **RNA** の検出に関しては、長い間蛍光色素による化学標識法しか選択肢が無く、**GFP** のようなライブイメージングツールは存在しなかった。そうした中 2011年に **Jaffrey** 博士らの研究グループにより、**GFP** 蛍光団由来の合成低分子である **3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene imidazolinone (DFHBI)** と、**DFHBI** を特異的に認識して一対一の複合体を形成することで同分子の蛍光能を活性化し、緑色蛍光を発する **RNA** アプタマー「**Spinach**」が報告された (**Paige J. S. et al., Science, 2011**)。DFHBI は細胞膜透過性であり細胞内に発現させた **Spinach** にアクセス可能であるため、まさに **RNA** 版の **GFP** であり、**RNA** イメージングにおける活用が大きく期待される画期的な発明であった。しかしながら、**Spinach-DFHBI** 複合体は励起光照射により即座に光異性化し蛍光強度が減弱してしまうため、細胞内のライブイメージングを行うには蛍光強度が不十分であるという大きな欠点があった。図1に示すように、**Spinach-DFHBI** 複合体は励起した瞬間こそ **GFP** と同程度の蛍光強度を示すが、励起開始わずか **0.2** 秒で初期蛍光強度の **20%** 程度まで褪色する。そのため過剰発現を前提とする外来遺伝子にしか適用できず、内在遺伝子の **RNA** 動態を解析するためには、より褪色しにくい、ないし初期の蛍光強度が高い蛍光 **RNA** の開発が必要であった。

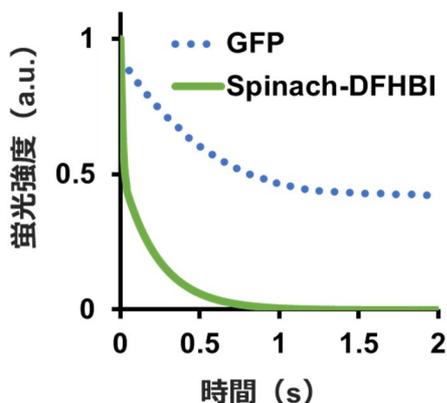


図1. Spinachの蛍光変化模式図

### 2. 研究の目的

上述の背景のもと申請者は既報の蛍光 **RNA** の中で最も明るい **Broccoli** とその蛍光基質 **DFHBI-1T** の組み合わせに着目し、ドメイン置換や塩基変異を用いた高輝度蛍光 **RNA** の開発に取り組んできた。本研究では、申請者が開発した新規高輝度蛍光 **RNA** 「**Romanesco**」の性状解析及び高輝度化メカニズムの解明と、本蛍光 **RNA** をベースとした部分的変異ライブラリのヒト細胞発現スクリーニングによる更なる高輝度化を目的とし、研究を開始した。

### 3. 研究の方法

本研究では、申請者が開発した **Romanesco** について、基質との結合キネティクスやフォールディング効率等、多面的な性状解析を行った。また、こうした蛍光 **RNA** の性状解析はこれまでバルクで行われることがほとんどであったが、**RNA** の濃度測定法や実験器具への吸着などの影響により、蛍光 **RNA** の物性を正確に評価できないという欠点があった。そこで蛍光相関分光法に基づく一分子レベルの蛍光 **RNA** 解析法の構築を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高輝度蛍光 RNA の性状解析

本研究では、申請者が開発した高輝度蛍光 RNA **Romanesco** について *in vitro* における多角的な性状解析を行った。以下に主要な結果を記載する。

まず励起・蛍光スペクトル解析の結果を図2に示す。**Romanesco** は **DFHBI-1T** と複合体を形成することで、**Broccoli** と同じ励起波長・蛍光波長を示すが、蛍光強度はおよそ4倍高かった。本蛍光強度はこれまでに報告されている **Broccoli** 高輝度変異体と比較しても最も明るかった。

**Romanesco** の高輝度化メカニズムを探るため、基質である **DFHBI-1T** の滴定実験を行った。その結果、**Broccoli** の  $K_d$  はおよそ **250 nM** であったのに対し、**Romanesco** の  $K_d$  はおよそ **150 nM** であり、**Romanesco** は **DFHBI-1T** に対する高い基質親和性を持つことが分かった(図3)。

蛍光 RNA の蛍光誘導能には溶液中における複雑な立体構造の形成が必須である。全 RNA 分子に対し、成熟立体構造をとり **DFHBI-1T** の蛍光を励起できる分子の割合、すなわちフォールディング効率は **100%** ではないため、本効率は蛍光強度に直接的に影響する。そこで **Romanesco** のフォールディング効率の測定を行った。その結果、**Broccoli** のフォールディング効率は **14%** 程度だったのに対し、**Romanesco** のフォールディング効率は **20%** を超えており、高効率にフォールディングできることが明らかとなった。

また先行研究では同溶液条件における **Broccoli** のフォールディング効率はおよそ **50%** 程度と報告されており、我々の解析によって得られた値と大きく異なっていた。仮に我々の値が正しいとすれば、蛍光 RNA のフォールディング効率には改善の余地が多分に残されており、フォールディング効率の向上に重点を置いた改変を行うことで、大幅な高輝度化が可能であると考えた。既存の解析法ではバルクの RNA 溶液を用いているため、RNA の濃度測定法や実験器具への吸着などの影響により正確なフォールディング効率を求めることができない。そこで本仮説を検証するために、一分子レベルで蛍光 RNA の特性を解析できる実験系を構築し、**Broccoli** の真のフォールディング効率を導出することを新たな研究目的として設定し、以降の実験を実施した。

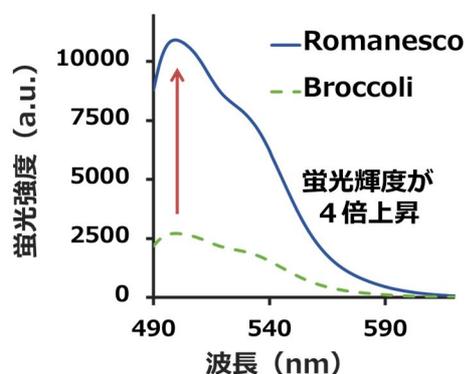


図2. Romanesco の蛍光スペクトル

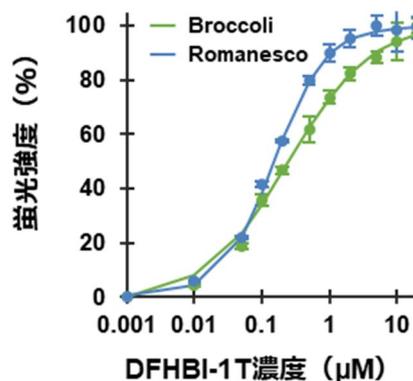


図3. Romanesco の基質親和性

##### (2) 蛍光相関分光法に基づくフォールディング効率の測定

蛍光相関分光法は検出領域を溶液中のごく微小な範囲に限定し、同領域内の蛍光分子のブラウン運動に由来する蛍光強度のゆらぎの変化を測定する手法である。このゆらぎは標的分子の大きさや分子数の増減を反映しており、継続的に解析することで蛍光ラベルされた分子の大きさや分子数、一分子当たりの蛍光強度など、標的分子に関して分子レベルの様々な情報を得ることが可能である。

まず *in vitro* 転写した **Broccoli RNA** と **DFHBI-1T** を用いて、蛍光相関分光法による蛍光 RNA の解析プラットフォームを構築した。その結果、自己相関関数の変化を観測することに成功した(図4)。

続いて、**Broccoli** の真のフォールディング効率の解析に挑戦した。フォールディング効率を正確に算出するために、我々は5'末端に赤色の蛍光色素である **ATTO647** を化学標識した **Broccoli RNA** を合成した。本蛍光修飾 **Broccoli** を用いて、十分量の **DFHBI-1T** 存在条件における **Broccoli-DFHBI-1T** と **ATTO647** それぞれの自己相関関数及び相互相関関数の解析を行った。その結果、**ATTO647** で標識された全 **Broccoli RNA** のうち、わずか **20%** 程度の分子しか **DFHBI-1T** 由来の蛍光を発していないことが明らかとなった。本知見は一分子レベルの性状解析が可能な蛍光相関分光法を蛍光 RNA に適用したからこそ得られたものであり、非常に有用かつ興味深い情報である。また我々の仮説通り蛍光 RNA のフォールディング効率には大きな改善の余地が残されており、今後フォールディングに重点を置いた研究開発を行うことにより、優れた蛍光 RNA を作出可能であることが明らかとなった。

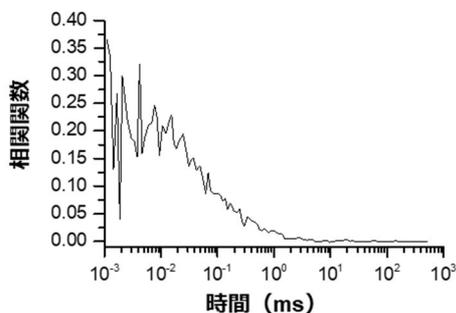


図4. Broccoli の自己相関関数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furuhata Yuichi, Kobayashi Mizuki, Maruyama Ryo, Sato Yusuke, Makino Kurumi, Michiue Tatsuo, Yui Hiroharu, Nishizawa Seiichi, Yoshimoto Keitaro	4. 巻 25
2. 論文標題 Programmable RNA detection with a fluorescent RNA aptamer using optimized three-way junction formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 590 ~ 599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1261/rna.069062.118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furuhata Yuichi, Sasaki Akira	4. 巻 12
2. 論文標題 Monitoring Molecular Properties of a Fluorescence Light-Up Aptamer Using Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 2002 ~ 2002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app12042002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古旗祐一
2. 発表標題 蛍光RNAシステムの高輝度化とRNA検出プローブの開発
3. 学会等名 第11回関西バイオ医療研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古旗祐一
2. 発表標題 蛍光RNAシステムの高輝度化とRNA検出プローブの開発
3. 学会等名 第1回 計測・センシング技術学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 RNA蛍光体複合体	発明者 古旗祐一	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2021-063014	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐々木 章  (Sasaki Akira)  (30580162)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員   (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------