

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300167

研究課題名（和文） 生体機能分子プローブによる RNA の時空間解析

研究課題名（英文） Spatiotemporal analyses of RNA with biofunctional probes

研究代表者 小畠 英理 (Kobatake Eiry)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：00225484

研究成果の概要（和文）：本研究は、細胞内で発現している特定 RNA を時空間的に定量解析することを目的として行った。RNA の結合により構造変化を起こすペプチド配列の両末端に、発光酵素分割断片を連結した新規組換えタンパク質を構築した。このタンパク質とターゲット RNA に結合する RNA プローブを合成し、これらの組み合わせによりターゲット RNA を発光により高感度に検出できることを示した。また細胞内で発現している RNA の検出にも成功した。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to develop a method for quantitative analyses of specific RNA in cells. The novel recombinant protein was constructed by connecting fragments of separated bioluminescent enzyme to both ends of peptide which is induced structural change by binding with RNA. RNA probes which bind both the constructed protein and target RNA were also synthesized. Through the use of these components, target RNA could be detected with high efficiency. Furthermore, RNAs in cells could be successfully detected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：RNA 解析、生体機能分子プローブ、ルシフェラーゼ、ARM-ペプチド、構造変化

1. 研究開始当初の背景

細胞内の mRNA は転写レベルにおいて緻密に制御されており、細胞外からの刺激や細胞内環境の変化に応じてその転写レベルが大きく異なっていることが知られている。また近年では micro-RNA と呼ばれる翻訳されない機能性 RNA が遺伝子発現制御において

重要な役割を担っていることが分かってきている。そのため特定の mRNA や翻訳されない機能性 RNA が、いつ・どこで・どの程度、転写されてくるのかを評価することは、各種疾病診断や創薬において、また細胞機能を理解するうえでも非常に重要である。

これまで、任意の配列を有する RNA を検

出すには、細胞を破碎して核酸を抽出する方法や、蛍光標識した核酸プローブを使用するのが常であった。しかしこれらの手法は化学的に合成した蛍光修飾プローブを細胞内に導入するという点から、細胞内での検出期間に限りがあり、長期的な RNA 検出には適さないという欠点がある。また非特異的な相互作用や、細胞内での分解によって擬陽性シグナルを生じるという難点も指摘されている。そこで、化学的に合成した蛍光修飾プローブを使用せずに、細胞内で産生可能なコンポーネントのみで RNA を検出することが可能になれば、非破碎かつ非侵襲的な RNA 検出法として、細胞内での経時的な RNA バイオイメージングが可能になると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究は、peptide-RNA 間の特異的な相互作用を利用してタンパク質と RNA とを関連付けることにより、生細胞内で産生可能な組換え発光タンパク質による RNA の超高感度検出法を開発し、細胞内における RNA バイオイメージングへと応用展開することを目的として行った。

検出シグナルとして酵素の発光シグナルを利用することにより、より高感度かつリアルタイムな特定 RNA 検出系の開発を目指した。酵素 Luciferase を利用した検出系では、活性の「あり・なし」で明確なシグナルの差異を期待することができる。また酵素の触媒能によりシグナルを増幅することで、より高感度な測定を行うことができると考えられる。さらに、この系を細胞系に適用して、発光による RNA のバイオイメージングへと展開し、RNA の時空間解析が可能な技術の開発を最終的な目標とした。

3. 研究の方法

構造変化を示す RNA 結合 peptide(ARM-peptide)の両末端に発光酵素分割断片を連結した新規組換えタンパク質

を構築した。そして、hybridized-complex への結合に伴う分割断片間の距離変化に基づいた酵素活性回復による検出を行った。

(1) RNA検出系の構築と最適化

活性回復させる酵素としてはルシフェラーゼを利用した。まず、*in vitro* での実験にて RNA 検出系を構築した。RNA 結合性 peptide と酵素分割断片の融合タンパク質を作製し、RNA と結合していない状態でどの程度の活性を有しているかを native ルシフェラーゼとの比較により評価した。次にタンパク質に結合する TAR-RNA を分割した split-RNA を設計・合成し、タンパク質との特異的結合をゲルシフトアッセイにより調べた。最後に、融合タンパク質・オリゴ RNA・target-RNA の全てのコンポーネントを混合し、図 1 の原理に従って酵素活性に変化が表れるかどうかを検討し、target-RNA 検出系の基礎を構築した。

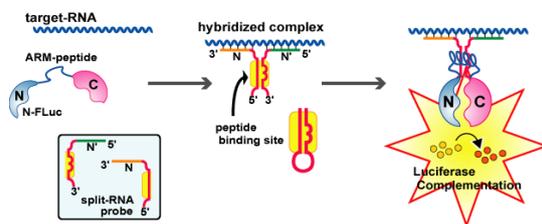


図1 本研究のRNA検出原理

(2) 細胞内におけるtarget-RNAの検出

In vitro における RNA 検出系の最適化を行ったところで、次にタンパク質プローブおよびオリゴ RNA を細胞内で生産し、一細胞内で転写されてくる mRNA の RNA イメージングを試みた。まず、細胞内にて多く mRNA コピー数を有する遺伝子を target として細胞内でのイメージングが可能であるかどうかを検証した。次に、薬剤や成長因子などの刺激に応じて転写量を変化させる mRNA を target として、刺激に応答した転写量の変化を検出できるかどうかを検討した。

以上の実験は全て株化された培養細胞を用いて行った。

4. 研究成果

(1) RNA検出系の構築と最適化

酵素の発光シグナルを指標とした高感度RNA検出法を開発するにあたり、RNA結合時における peptide の構造変化を利用した分子内酵素活性回復による検出原理に基づいて系の構築を進めた。構造変化を示す RNA 結合 peptide (ARM-peptide) の両末端に発光酵素分割断片を連結した新規タンパク質を構築した。そして、hybridized-complex への結合に伴う分割断片間の距離変化に基づいた酵素活性回復による検出を試みた。遺伝子工学的手法を用いて RNA 結合 peptide-ルシフェラーゼ分割断片の融合タンパク質を作製し、小麦胚芽ライセートを用いた生体外翻訳系でタンパク質の発現を行った。得られたタンパク質と転写合成した RNA との結合を Native-PAGE によるゲルシフトアッセイによって確認した。また RNA を混合することにより hybridized-complex を作製し、タンパク質との結合時におけるルシフェラーゼ活性の変化を測定した。その結果、RNA 濃度に依存したルシフェラーゼ発光の変化が認められ、本手法の妥当性が示された (図 2)。

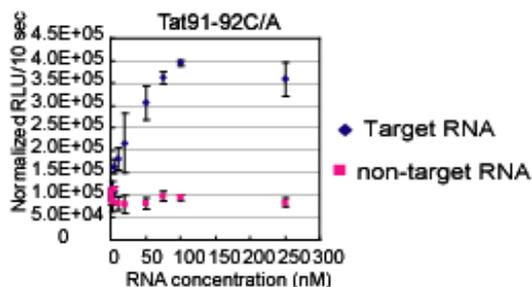


図2 発光によるRNAの定量分析

(2) 細胞内におけるtarget-RNAの検出

構築した RNA 結合ペプチドとルシフェラーゼ分割断片との融合タンパク質 (RLuc probe)

を用いて、RLuc probe およびオリゴ RNA を細胞内で生産し、細胞内で転写されてくる mRNA のイメージングを試みた。まず RLuc probe の細胞内発現用プラスミドを構築し、細胞への導入により株化細胞を樹立した。次いで株化した細胞に対して、target となる mRNA に合わせて設計したオリゴ RNA 転写用プラスミドを導入し、mRNA の転写レベルに応じた酵素活性回復が見られることを明らかにした。さらに RLuc probe の細胞内での局在と発現量を核外輸送シグナル配列付加と Tet-system を利用することにより制御できることを示した。これら局在と発現量が制御され生細胞内で安定発現した RLuc probe の RNA 導入時の活性変化を評価し、RLuc probe は生細胞内でも RNA に対する特異性と活性変化を示すことを明らかにした。最後に外部から細胞内部に導入した RNA の検出に成功し、本研究で構築した RLuc probe、split-RNA probe が生細胞中でも設計通りに機能することを明示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Takashi Andou, Tamaki Endoh, Masayasu Mie, Eiry Kobatake, Direct detection of RNAs in living cells using peptide-inserted Renilla luciferase, *Analyst*, 査読有、136 (12), (2011) 2446-2449
- ② Takashi Andou, Tamaki Endoh, Masayasu Mie, Eiry Kobatake, Development of an RNA detection system using bioluminescence resonance energy transfer, *Sensors and Actuators B*, 査読有、152, (2011), 277-284
- ③ Masayasu Mie, Rie Sugita, Tamaki Endoh, Eiry Kobatake, Evaluation of small-ligand protein interactions by using T7 RNA polymerase with DNA-modified ligand, *Anal. Biochem.*, 査読有、405(1), (2010), 109-113
- ④ Rie Sugita, Masayasu Mie, Hisakage

Funabashi, Eiry Kobatake, Evaluation of small ligand-protein interaction by ligation reaction with DNA-modified ligand, *Biotechnol. Lett.*, 査読有、32(1), (2010), 97-102

- ⑤ Takashi Andou, Tamaki Endoh, Masayasu Mie, Eiry Kobatake, RNA detection using peptide-inserted Renilla luciferase, *Anal. Bioanal. Chem.*, 査読有、393(2), (2009), 661-668

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 安藤高史、遠藤玉樹、三重正和、小島英理、生体分子プローブを利用した RNA 検出法の開発、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム、2010 年 9 月 24 日～26 日、大阪大学豊中キャンパス
- ② 小島英理、バイオセンシングのための生体分子プローブ設計、遺伝子・デリバリー研究会 第 10 回シンポジウム、2010 年 6 月 2 日、3 日、北海道大学 学術交流会館
- ③ 安藤高史、遠藤玉樹、三重正和、小島英理、BRET を利用した RNA イメージング法の開発、第 31 回日本バイオマテリアル学会大会、2009 年 11 月 16 日、17 日、京都テルサ

〔図書〕(計 3 件)

- ① 高橋史生、小島英理 (分担)、シーエムシー出版、コンビナトリアル・バイオエンジニアリング「無細胞タンパク質合成に基づいた酵素選択法」p185-195、(2010) 351p
- ② 三原久和、中村聡、小島英理 (分担)、シーエムシー出版、ソフトマテリアルの応用展開「ソフトマテリアルとしてのタンパク質・ペプチド」p3-15、(2010)302p
- ③ 小島英理 (分担)、工学図書、酵素・タンパク質をはかる・とらえる・利用する「抗体でタンパク質をはかる」p29-39、(2009) 175p

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 英理 (KOBATAKE EIRY)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
准教授
研究者番号：00225484