

機関番号： 82401
 研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20350083
 研究課題名（和文）
 核酸機能の効果的時空間解析のための励起子制御イメージング
 研究課題名（英文）
 Exciton-controlled imaging for effective spatiotemporal analysis of nucleic acid functions
 研究代表者
 岡本 晃充（OKAMOTO AKIMITSU）
 独立行政法人理化学研究所・岡本独立主幹研究ユニット・ユニットリーダー（独立主幹研究員）
 研究者番号： 60314233

研究成果の概要（和文）：

励起子相互作用による蛍光消光を効果的に使用した新しい発想のオン・オフ蛍光核酸プローブ（近赤外）を設計・作成した。このプローブは、プローブだけのときには色素の二量体によってほとんど蛍光を示さないが、標的配列（DNA・RNA）とハイブリダイゼーションしたとき二量体構造が崩れ、強い蛍光発光を与えた。

研究成果の概要（英文）：

A series of near-infrared fluorescent probes was designed based on the concept of emission control caused by inter-dye excitonic interaction. The fluorescent probes showed very weak emission in the unhybridized state, whereas they emitted near-infrared fluorescence after hybridization with the complementary nucleic acid. The hybridization-dependent switching of fluorescence emission made it possible to monitor mRNA in a human cell in the range of near-infrared wavelengths.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：励起子相互作用・蛍光イメージング・蛍光色素・DNA

1. 研究開始当初の背景

典型的な遺伝性疾患のみならず、「生活習慣病」の類も、多くの遺伝子発現が関係している。その理解のために、細胞内でダイナミ

ックに変化し続ける RNA 発現をモニターすることが重要である。しかし、ひとつの RNA が辿る一生を連続的に観察することは容易でない。また、特定の RNA がいつ、どこで、どのくらいの量が、

どのような三次元構造で、どのように働いているかを知りたい。したかつて、RNAの量や働きを動的・定量的・網羅的に可視化するための技術が今まさに必須の課題として要求されている。これが、RNA構造・発現量との相関や細胞内ネットワークの時空間追跡などの基礎研究のための手段として役立つことは言うに及ばず、RNAノックアウトによる遺伝子治療や疾患の高度な診断や新薬候補物質の効果判定に威力を発揮することは、種々の文献・学会発表・技術動向調査において繰り返し指摘されている。

2. 研究の目的

これまで、色素が会合したときに示す励起子結合効果に着想を得て、標的の配列を持つRNAを認識したときにだけ蛍光を発するハイブリッド特異的ライトアップ核酸プローブを創出した。本研究課題では、3年間の研究期間において、励起子制御機構に立脚したハイブリッド特異的ライトアップ核酸プローブ群を構築し、これらを基盤として、生体内のRNAを動的・定量的に可視化する技術へ多面的に展開する。

3. 研究の方法

初年度にハイブリッド特異的ライトアップ核酸プローブの技術の最適化・機能向上を行った。その知見を元に、次の2年間で各課題研究へ展開し同時並行で進めた。

(1) RNAカラリング

プローブの多色化：同時もしくは前後して働く複数のRNAを異なる波長を持つ蛍光で標識する方法とプローブの開発。近赤外光まで対応した色素まで探索。

プローブ多重染色法：スプライシングや遺伝子転座など2つの核酸領域が結合する系の検出を容易にするプローブ多重染色法の構築。

(2) RNAトラフィクス

レシオイメージング法：細胞内でのプローブの分布・特定のRNAの局在とともにそれらを時空間的・定量的に追跡するための高蛍光機能プローブの開発。

RNAタグシステム：特定のRNAの発現だけを際立って強力な蛍光発光させるための新規RNA技術の開発。

部位選択的RNA動態解析：光活性化プローブを創製し、これを用いて細胞内の特定の部位で働くRNAだけを追跡する方法論の確立。

(3) RNAフォールディング

RNAフォールディング解析法：mRNAなどのフォールディングを効果的に生細胞中で可視化するための核酸結合機能制御プローブの開発。

4. 研究成果

色素構造の最適化など有機合成および光物理学的考察を行い、励起子制御機構に立脚

したハイブリッド特異的ライトアップ核酸プローブの性能の向上を目指し、要素技術としての新規プローブ群を創製した。修飾や改変が容易な合成経路を採用し、原理や概念を損なうことなく、技術目標や各応用技術に応じて適切かつフレキシブルに改変できるプローブ設計を試みた。

色素の機能化：プローブの多色化・安定化は、ライブセルRNAマルチカラーイメージングへの展開に大きく寄与する。色素メチン部位の安定化を環状骨格構造にすることによって輝度の向上や多色化を達成した。この手法を用いて、生体内分子による光吸収干渉を回避できる近赤外波長領域でも励起子相互作用が効果的に生じるプローブを設計することもできた。

プローブ骨格の機能化：生細胞内RNA機能の観察においてプローブ機能を長期間維持するためには、ヌクレアーゼ耐性は必須である。プローブ機能を保ちつつプローブ骨格変換を行って、長時間観察を可能にした。具体的には、DNA骨格を2'-O-MeRNA骨格やLNA骨格に変換した。その場合の励起子制御機能維持を確認し、細胞内外でのヌクレアーゼ耐性も得ることができた。

上記のように種々開発したハイブリッド特異的ライトアップ核酸プローブ群を用いて、生細胞内のRNAの挙動を動的・定量的に可視化する手法を順次確立した。従来とはまったく異なる光化学的発想、励起子制御機構に立脚した分子設計を持つRNA染色プローブを創製することによって、

(1) RNAカラリング (2) RNAトラフィクス

(3) RNAフォールディング

の3題の動的RNAの効率的イメージング法へ多面的な観点に基づいて推進した。

(1) RNAカラリング

プローブの多色化：同時もしくは前後して働く複数のRNAを異なる波長を持つ蛍光で標識するためのハイブリッド特異的ライトアップ核酸プローブ群の開発を行った。ハイブリッド特異的に蛍光発光する色素について、紫外線領域から近赤外線領域まで15種類作成した。特に、RNAの発現を個体レベルで観察するために、近赤外領域で色素間励起子相互作用が効果的に働くプローブを創出した。700~1200nmの近赤外光は、生体中の水分子やヘムタンパクによる光吸収を最小化できる波長であり、当波長領域で働くプローブが作成されれば生体内RNA観察に極めて有力な方法になる。ヘミチアシアニンやビスキノリンを基本構造とした色素の π 共役系を拡張して近赤外領域に吸収を有する蛍光色素を作成した。これらを導入したプローブは、ハイブリッド特異的に蛍光を発した。

プローブ多重染色法：スプライシングや遺伝子転座など2つの核酸領域が結合する系の検出を効率化するプローブ多重染色法を構築した。上記の合成経路ではDNA合成後に修飾する方法を用いているために、プローブに同時に導入できる色素は1種類に限定される。DNA合成前にヌクレオシドユニットへ色素導入できる合成経路を新たに開発することで、プローブ1個に導入できる色素の種類を複数にすることができた。方法としては、従来

の正電荷を有する色素系ではなく、電荷を持たない「チアズールオレンジ」誘導体（水に溶解した場合にだけプロトン化されて正電荷を有するpKa制御蛍光色素）を新たに開発した。これをあらかじめヌクレオチドに導入した後、DNA合成を行った。電荷を有しないので有機溶媒系に可溶であり、高いDNA合成収率を示した。この方法により、干渉しない関係の異なる波長を持つハイブリッド特異的蛍光ヌクレオチド2種をひとつのプロープに同時に導入することができた。

(2) RNA トラフィクス

レシオイメージング法：生細胞内の特定のRNAの増減、核外輸送、局在化を定量的に観測するための効果的な高蛍光機能プロープの提案をした。例えば、定常的に蛍光発光するFAMやCy5などの蛍光色素をプロープ末端に付けておき、一方、ハイブリダイゼーションしたときにだけ蛍光発光するヌクレオチドをプロープの中心近くに導入した。そういうプロープは、常にプロープの居場所を定常発光系を用いて知らせてくれると同時に、標的RNAと結合したプロープは別の蛍光波長で標的RNAの局在化を示した。その蛍光強度を定常発光系の蛍光強度と比較することによりその場所に局在するRNAの量を見積もる方法も確立した。

RNAタグシステム：RNAの発現量が少ないときには、蛍光シグナルを増強しなければ観測が難しい場合がある。特定のRNAの発現だけを強い蛍光で追跡するための新規RNA技術としてRNAタグシステムを開発した。RNA構造と干渉しない20塩基程度の配列をRNAの非翻訳領域へ繰り返し導入する系を検討した。ハイブリッド特異的ライトアップ核酸プロープと組み合わせることによって、翻訳領域のRNA配列・構造への影響なしにRNA繰り返しタグだけを染色した。具体的には、タグの配列を各数十万種類から計算によって30種類に絞り込み、それらを実際に合成・機能評価し（最適の蛍光変化・強度を示すタグ配列を選択）、最適な系を探索した。最終的には3種類の配列を候補として残した。配列繰り返し数については、作りやすさや必要蛍光強度を鑑みて、32~128回の繰り返しを達成した。また、マルチカラーイメージングへの展開も考慮して、相互干渉しないタグ配列の組み合わせも作成することができた。

部位選択的RNA動態解析：光活性化プロープを創製し、これを用いて細胞内の特定の部位で働くRNAだけを追跡する方法論を確立することを試みた。細胞の中のある特定の位置に局在するRNAに結合したプロープだけが光活性化によって蛍光を発するシステムであり、これによりそのRNAだけを、細胞内でどのように輸送され使われていくかモニターすることが期待される。したがって、ここでは、新規光ケージドプロープを開発した。細胞内の特

定の位置にあるRNAだけを360~420nmの光で脱ケージングして、その後のRNAの動態を調べられるようにした。プロープが標的RNAに結合できないよう、色素を損傷しない波長で活性化されるニトロベンジル型の分子によってケージング設計した。

(3) RNA フォールディング

RNAフォールディング解析法：mRNAは、高次構造の形成やタンパク質の結合によって機能制御を行っており、時々刻々と変化するその状態をモニタリングする方法の開発が、細胞機能の理解に必須である。その点で、今回開発するハイブリッド特異的ライトアップ核酸プロープは、ハイブリダイゼーションした時にのみ発光するので、標的のRNAのフォールディング強度に応じてプロープ結合機能を効果的に制御することができれば、RNAフォールディング解析に有用だろう。mRNA配列に結合できるはずのプロープが結合できない、つまり蛍光発光の欠落によってmRNAの構造を容易に推測することができる。この実験では、ステム構造やタンパク結合部位に結合する力のない弱結合型プロープを作成した一方で、検量標準としての強結合型プロープも設計した。具体的には、弱結合型プロープとして短鎖DNA骨格を採用した一方、強結合型プロープとしてLNA骨格を採用した。まず、その場合の励起子制御機能維持を確認した。つづいて、細胞内外でのRNAフォールディング形態（ステム・ループ・バブル構造など）での解析能力を、ステム・ループ構造を有することが知られるHIV-1 TAR RNAへの結合制御とベースにして検討した。

以上のように、本技術は、蛍光色素間励起子相互作用を基盤としており、不要な蛍光を「効果的に見えなくする」技術であり、見たい対象だけが低バックグラウンドで浮かび上がって現れた。励起子制御機構に立脚したハイブリッド特異的ライトアップ核酸プロープ群によるRNA染色法は、研究代表者によって新規に確立された概念と分子に基づいている。研究背景に従えば、学術・産業の両面において新規性の高い有意義な細胞内RNA解析法へ発展していくことが期待でき、さらに従来技術に対して遙かに優位に立つといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計18件）

1. Sugizaki, K.; Okamoto, A. ECHO-LNA Conjugates: Hybridization-sensitive Fluorescence and its Application to Fluorescent Detection of Various RNA Strands. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (12), 2276-2281. (査読有)
2. Kubota, T.; Ikeda, S.; Yanagisawa, H.; Yuki, M.; Okamoto, A. Sets of RNA Repeated Tags and Hybridization-Sensitive Fluorescent Probes for Distinct Images of RNA in a Living Cell. *PLoS ONE* **2010**, *5* (9), e13003. (査読有)

3. Okamoto, A. Excitonic interaction: Another photophysical process for fluorescence-controlled nucleic acid sensing. *Chem. Rec.* **2010**, *10* (3), 188-196. (査読有)
 4. Yoshida, Y.; Niwa, K.; Yamada, K.; Tokeshi, M.; Baba, Y.; Saito, Y.; Okamoto, A.; Saito, I. A Probe Containing Two Base-discriminating Fluorescent (BDF) Nucleosides for SNP Typing. *Chem. Lett.* **2010**, *39* (2), 116-117. (査読有)
 5. Lezhava, A.; Ishida, T.; Ishizu, Y.; Naito, K.; Hanami, T.; Katayama, A.; Kogo, Y.; Soma, T.; Ikeda, S.; Murakami, K.; Nogawa, C.; Itoh, M.; Mitani, Y.; Harbers, M.; Okamoto, A.; Hayashizaki, Y. Exciton-Primer Mediated SNP Detection in SmartAmp2 Reactions. *Hum. Mutat.* **2010**, *31* (2), 208-217. (査読有)
 6. Ikeda, S.; Kubota, T.; Yuki, M.; Yanagisawa, H.; Tsuruma, S.; Okamoto, A. Hybridization-sensitive fluorescent DNA probe with self-avoidance ability. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (3), 546-551. (査読有)
 7. Ikeda, S.; Yuki, M.; Yanagisawa, H.; Okamoto, A. Doubly thiazole orange-labeled cytidine for functional expansion of a hybridization-sensitive probe. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (51), 7191-7195. (査読有)
 8. Ikeda, S.; Kubota, T.; Yuki, M.; Okamoto, A. Exciton-Controlled Hybridization-Sensitive Fluorescent Probes: Multicolor Detection of Nucleic Acids. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48* (35), 6480-6484. (査読有)
 9. Kubota, T.; Ikeda, S.; Yanagisawa, H.; Yuki, M.; Okamoto, A. Hybridization-Sensitive Fluorescent Probe for Long-Time Monitoring of Intracellular RNA. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (6), 1256-1261. (査読有)
 10. Nomura, A.; Okamoto, A. Photoresponsive Tandem Zinc Finger Peptide. *Chem. Commun.* **2009**, 1906-1908. (査読有)
 11. Nomura, A.; Tainaka, K.; Okamoto, A. Osmium Complexation of Mismatched DNA: Effect of the Bases Adjacent to Mismatched 5-Methylcytosine. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (3), 603-607. (査読有)
 12. Kubota, T.; Ikeda, S.; Okamoto, A. Doubly Thiazole Orange-Labeled DNA for Live Cell RNA Imaging. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2009**, *82* (1), 110-117. (査読有)
 13. Okamoto, A. Chemical approach toward efficient DNA methylation analysis. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (1), 21-26. (査読有)
 14. Nomura, A.; Okamoto, A. Heterogeneity of osmium oxidation efficiency at consecutive thymines. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (21), 3905-3907. (査読有)
 15. Ikeda, S.; Kubota, T.; Kino, K.; Okamoto, A. Sequence Dependence of Fluorescence Emission and Quenching of Doubly Thiazole Orange-Labeled DNA: Effective Design of a Hybridization-Sensitive Probe. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (8), 1719-1725. (査読有)
 16. Ikeda, S.; Okamoto, A. Hybridization-Sensitive On-Off DNA Probe: Application of the Exciton Coupling Effect to Effective Fluorescence Quenching. *Chem. Asian J.* **2008**, *3* (6), 958-968. (査読有)
 17. Umemoto, T.; Okamoto, A. Synthesis and characterization of the 5-methyl-2'-deoxycytidine glycol-dioxosmium-bipyridine ternary complex in DNA. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (2), 269-271. (査読有)
 18. Tanaka, K.; Okamoto, A. Design of a pyrene-containing fluorescence probe for labeling of RNA poly(A) tracts. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (1), 400-404. (査読有)
- [学会発表] (計 25 件)
1. Akimitsu Okamoto: "Photochemical design for live cell RNA imaging", International

- Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Honolulu, USA, Dec. (2010). (Invited)
2. Akimitsu Okamoto: “DNA-osmium complex: Pinpoint detection of methylated cytosines”, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Honolulu, USA, Dec. (2010). (Invited)
 3. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto: “Artificial Zinc Finger Peptide for Recognition of Methylated DNA Duplex”, The 5th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Kaohsiung, Taiwan, Nov. (2010).
 4. Akimitsu Okamoto: “Fluorescent Nucleotides for Efficient Nucleic Acid Sensing”, 11th International Chemistry Conference and Exhibition in Africa (11 ICCA), Luxor, Egypt, Nov. (2010). (Invited)
 5. Akimitsu Okamoto: “A short talk on ICON and ECHO probes”, Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids (A3RONA 2010 JAPAN), Osaka, Japan, Oct. (2010). (Invited)
 6. Akimitsu Okamoto: “Application of artificial DNA probes in genome-scale DNA methylation analysis and evaluation of nucleic acid functions”, BIG-CAS Seminar, Beijing, China, Oct. (2010). (Invited)
 7. Akimitsu Okamoto: “Hybridization-Sensitive Fluorescent Nucleic Acids for Live Cell RNA Imaging”, 2nd Workshop on Fluorescence Chemosensor and Bio-imaging, Dalian, China, Sept. (2010). (Invited)
 8. Takeshi Kubota, Shuji Ikeda, Hiroyuki Yanagisawa, Mizue Yuki, Kaori Sugizaki, Akimitsu Okamoto: “Exciton-controlled Hybridization-sensitive Fluorescent Oligonucleotides”, 29th International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRT 2010), Lyon, France, Aug. (2010).
 9. Akimitsu Okamoto, Shuji Ikeda, Takeshi Kubota: “Thiazole Orange Dimer on a Nucleotide: Application to Live Cell RNA Imaging”, 23th IUPAC Symposium on Photochemistry, Ferrara, Italy, July (2010).
 10. Shuji Ikeda, Takeshi Kubota, Akimitsu Okamoto: “Hybridization-Sensitive Fluorescent Nucleic Acids for Effective RNA Imaging”, Challenges in Organic Chemistry and Chemical Biology (ISACS1), San Francisco, USA, July (2010).
 11. Akimitsu Okamoto: “ICON Probe: Osmium Complexation for Pinpoint Detection of Methylated Cytosines”, BIT Life Sciences’ 2nd Annual Congress and Expo of Molecular Diagnostics (CEMD-2009), Beijing, China, Nov. (2009). (Invited)
 12. Takeshi Kubota, Shuji Ikeda, Akimitsu Okamoto: “Photochemical Probe Design for Multicolor RNA Imaging in Living Cells”, 11th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-11), Kyoto, Japan, Nov. (2009).
 13. Akimitsu Okamoto, Shuji Ikeda, Takeshi Kubota, Mizue Yuki, Hiroyuki Yanagisawa: “Exciton-controlled fluorescence: Application to hybridization-sensitive fluorescent DNA probe”, The 6th International symposium on Nucleic Acid Chemistry (6ISNAC2009), Takayama, Japan, Sept. (2009).
 14. Akimitsu Okamoto: “Doubly Dye-Labeled Nucleotide: Toward Efficient RNA Imaging”, The 13th Asian Chemical Congress, Shanghai, China, Sept. (2009). (Invited)
 15. Akimitsu Okamoto: “Exciton-controlled probes for live cell RNA imaging”, 42nd IUPAC Congress, Glasgow, UK, Aug. (2009). (Invited)
 16. Akimitsu Okamoto: “Addition of Osmium to DNA Pyrimidine Bases”, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Nagoya, Japan, July (2009). (Invited)

17. Akimitsu Okamoto: “Excitonic Interaction: New Photochemical Control for Nucleic Acid Imaging”, The Fifth iCeMS International Symposium, Kyoto, Japan, July (2009). (Invited)
18. Akimitsu Okamoto, Shuji Ikeda, Mizue Yuki, Takeshi Kubota: “Doubly Dye-Labeled Nucleotide: Synthesis, Photochemistry, and Application to RNA Imaging”, Tenth Tetrahedron Symposium, Paris, France, June (2009).
19. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto: “Control of DNA binding by a zinc finger peptide having and azobenzene photo-switch”, 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Jeju, Korea, Nov. (2008).
20. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto: “Reactivity of Thymine Doublet in Single Strand DNA with Osmium Reagent”, Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kyoto, Japan, Sept. (2008)
21. Takeshi Kubota, Shuji Ikeda, Akimitsu Okamoto: “Intracellular mRNA imaging with a hybridization sensitive fluorescent nucleotide”, Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kyoto, Japan, Sept. (2008).
22. Akimitsu Okamoto, Takeshi Kubota, Shuji Ikeda: “Design of a fluorescent probe for DNA/RNA imaging”, Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kyoto, Japan, Sept. (2008)
23. Takeshi Kubota, Shuji Ikeda, Akimitsu Okamoto: “Doubly Thiazole Orange-Labeled Nucleotide: Application to Hybridization-Sensitive DNA Probe”, 2008 Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience (KJFP 2008), Jeju, Korea, Sept. (2008). (Invited)
24. Akimitsu Okamoto: “DNA-Osmium Complex for DNA Methylation Analysis”, 31st National Medicinal Chemistry Symposium, American Chemical Society, Pittsburgh, USA, June (2008). (Invited)
25. Kazuki Tainaka, Akimitsu Okamoto: “Synthesis of bipyridine-adenine conjugates for DNA methylation analysis”, 14th Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, Cesky Krumlov, Czech, June (2008)
- [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]
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
岡本 晃充 (OKAMOTO AKIMITSU)
独立行政法人理化学研究所・岡本独立主幹研究ユニット・ユニットリーダー(独立主幹研究員)
60314233
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし