

機関番号：34506

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21850026

研究課題名（和文）Protein-RNA conjugate による細胞内代謝産物のイメージング

研究課題名（英文）Construction of Protein-RNA conjugate for intracellular imaging of metabolites

## 研究代表者

遠藤 玉樹 (ENDO TAMAKI)

甲南大学・先端生命工学研究所・講師

研究者番号：90550236

## 研究成果の概要（和文）：

代謝産物などの低分子化合物を細胞内で検出するために、ウイルス由来の Tat と TAR-RNA との相互作用をアロステリックに調整することによる検出系の構築を試みた。RNA アプタマーと TAR-RNA とを組み合わせた人工の RNA ライブラリーを設計し、標的分子の存在下で Tat と結合する改変型 TAR-RNA をセレクションにより獲得した。獲得した RNA は、Tat を挿入したルシフェラーゼと協働させることにより、発光シグナルによる標的分子の検出を可能とした。また、RNA アプタマー直結型の TAR-RNA を用いて、遺伝子発現量変化より標的分子を検出することにも成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, construction of Protein-RNA conjugate, which enables detection of small molecules, was performed. RNA libraries that consist of artificial RNA aptamer and TAR-RNA were designed. RNAs that allosterically interact with Tat-peptide in the presence of the target small molecules were selected from the libraries. By cooperative function of artificially modified Luciferase containing Tat-peptide, the selected RNAs enabled luminometric detection of the small molecules. Additionally, direct conjugation of RNA aptamer and TAR-RNA enabled detection of small molecule by an intracellular gene expression through an allosteric interaction of Tat protein.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,090,000	327,000	1,417,000
2010年度	990,000	297,000	1,287,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,080,000	624,000	2,704,000

研究分野：生体材料工学・細胞機能工学・核酸化学

科研費の分科・細目：化学・生体機能関連

キーワード：代謝産物検・細胞内イメージング・RNA-タンパク質相互作用・アロステリック相互作用・RNA 構造変化

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内には様々な化合物が存在し、細胞活動に応じてその存在量も大きく変化する。近年、細胞内の代謝産物を網羅的に解析していきこうとするメタボローム研究が盛んに行わ

れ、ハイスループット解析が可能な質量分析装置の登場と共に大きな発展を見せている。今後は、個体の発生過程や、特定の疾患に関わるような代謝産物が明らかになってくると考えられる。このような研究動向において、

生体外での解析だけではなく細胞内における代謝産物の動態を直接的かつ経時的に解析する必要が出てくるかと思われる。

細胞内での分子検出を目指した場合、検出に使用する素子（プローブ）としては、細胞内で産生することが可能な生体分子を用いることが望ましい。RNAは細胞内で転写可能な生体分子であり、さまざまな生体分子を認識して結合することができる RNA アプタマーが数多く存在する。RNA アプタマーの特性として、標的分子に結合したときに構造変化を示すことが多いという点が挙げられる。この特性は、バイオセンサー素子として広く利用されるようになってきているものの、その多くは、RNA の蛍光修飾や電極への固定化など、生体内では執り行えない反応過程を必要としている。

一方で申請者は、RNA との結合を蛍光や発光のシグナル変化として検出可能な人工タンパク質を開発している。これらの成果より、RNA アプタマーが有する特徴を利用してタンパク質と RNA との結合をアロステリックに制御することで、特定の分子をタンパク質の機能として検出する Protein-RNA conjugate を構築できると考えられる。タンパク質と RNA は共に細胞内で産生可能な生体分子であり、細胞内への適用が可能な検出用プローブとなり得る。

## 2. 研究の目的

本研究では、生理活性機能を有する代謝産物もしくは低分子化合物を対象に、これを細胞内で検出できるバイオイメージングシステムを構築することを目指す。そのための基盤として、細胞内で持続発現させることができるタンパク質と RNA との相互作用を利用する。RNA には標的分子を認識させる機能と、標的分子に応じてタンパク質とのアロステリックな結合を調整する機能を持たせる。タンパク質には RNA との結合を蛍光や発光などの細胞内検出に適したシグナルに変換させる機能を持たせ、細胞内での持続発現が可能な Protein-RNA conjugate を作製する。

## 3. 研究の方法

### (1) RNA の設計

本研究では、Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) の Tat-peptide と TAR-RNA との結合をアロステリック相互作用の作用点とすることにした。申請者は、Tat-peptide を挿入したルシフェラーゼを人工的に作製し、Tat-peptide と TAR-RNA との結合をルシフェラーゼの発光シグナル上昇として検出可能にしている。また、Tat-peptide と TAR-RNA との結合は BIV の遺伝子発現における起点ともなる相互作用であり、この相互作用を標的化合物を用いてアロステリックに調節で

きれば、遺伝子の発現量変化としても標的分子を検出できるようになると考えられる。

標的分子に応じて Tat-peptide とアロステリックに結合する RNA は、既存の RNA アプタマーと TAR-RNA とを組み合わせた RNA ライブラリーからセクションすることとした。モデルの標的分子として喘息薬としても用いられる theophylline、および微生物の代謝産物で抗生物質としても知られる tetracycline を選択し、これらの分子を認識する RNA アプタマーと TAR-RNA とをランダムな配列を介して連結した RNA ライブラリーを設計した（図 1）。

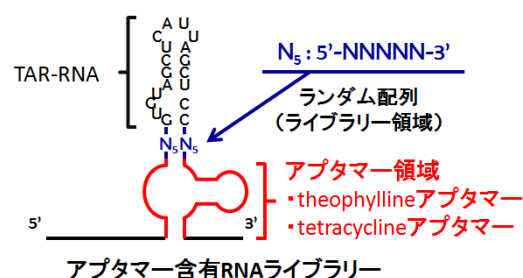


図 1 設計した RNA ライブラリーの構図

### (2) RNA のセクション

設計した RNA ライブラリーより、標的分子である theophylline と tetracycline の存在下で Tat-peptide とアロステリックに結合する RNA のセクションを行った。まず、RNA とビオチン化した Tat-peptide を標的分子の非存在下で混合した。その後、標的分子非存在下でも Tat-peptide に結合してしまう RNA を、ストレプトアビジンを固定化した磁性ビーズにて取り除いた（図 2：ネガティブセクション）。次に、残った RNA を標的分子の存在下にて再びビオチン化した Tat-peptide と混合した。その後、標的分子存在下で Tat-peptide と結合する RNA を、ストレプトアビジンを固定化した磁性ビーズにて回収した（図 2：ポジティブセクション）。最後に、逆転写と PCR による増幅、および再度の転写反応を行い、次のセクションにおける RNA ライブラリーを用意した。

以上のセクション過程を繰り返すことで、標的分子存在下で Tat-peptide とアロステリックに結合する RNA を獲得した。

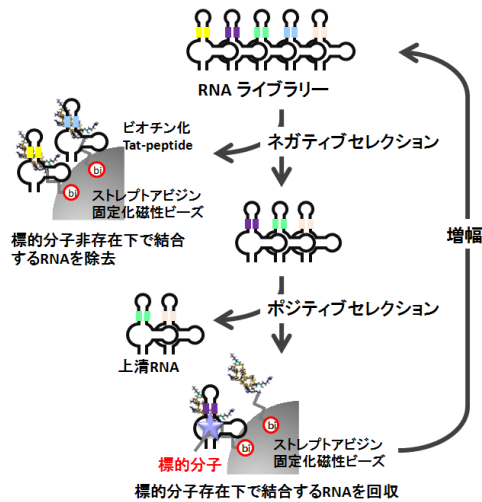


図2 RNA ライブラリーからのセレクション過程

(3) RNA の Tat-peptide への結合特性評価と発光による標的分子検出

セレクション過程を経て得られた RNA が、標的分子の存在により Tat-peptide とアロステリックに結合するかどうかを評価した。TAMRA 蛍光基で標識した Tat-peptide を用意し、theophylline もしくは tetracycline の存在下、および非存在下で RNA と混合し、RNA との結合による TAMRA の蛍光強度変化を測定した。

次に、RNA と Tat-peptide を挿入した人工ルシフェラーゼを協働させて、標的分子の発光検出を試みた。Tat-peptide を挿入したルシフェラーゼは生体外翻訳により作製した。一定濃度の RNA と一定量の生体外翻訳産物を混合し、そこに標的分子を加えてルシフェラーゼの発光シグナルを測定した。

(4) 遺伝子発現量変化による標的分子の検出

セレクションに用いた RNA ライブラリーとは別に、theophylline を認識するアプタマーと TAR-RNA とを直接的に連結したアプタマー直結型 TAR-RNA (図 3) を設計し、遺伝子発現を介した細胞内での theophylline 検出を試みた。ウイルス由来プロモーターの下流に、設計したアプタマー連結型 TAR-RNA、およびルシフェラーゼ遺伝子の配列を挿入したレポータープラスミドを構築した。そして、TAR-RNA に結合して遺伝子発現を活性化する、Tat タンパク質の発現プラスミドと共に細胞へ導入した。その後、細胞の培地に theophylline を添加し、レポータータンパク質であるルシフェラーゼの発光により theophylline を検出できるかどうかを評価した。

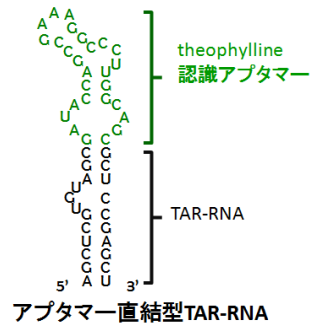


図3 アプタマー直結型 TAR-RNA の配列

4. 研究成果

(1) セレクションにより獲得した RNA による標的分子の発光検出

RNA ライブラリーから 6 回のセレクション過程を経て獲得された RNA について、標的分子の有無による Tat-peptide との結合特性を評価した。その結果、theophylline、tetracycline、どちらの化合物を標的とした場合にも、セレクションによって得られた RNA は標的分子の存在下で Tat-peptide に対して標的分子非存在下よりも高いアフィニティを示した。設計した RNA ライブラリー中のアプタマー領域にそれぞれの標的分子が結合し、RNA の構造変化を介して Tat-peptide とのアロステリックな結合が促進されているものと考えられる。得られた RNA ライブラリーの配列を解析して個別に評価を行ったところ、そのほとんどが標的分子に応じて Tat-peptide とのアロステリックな結合を示した。特に、tetracycline を標的としたものでは、100  $\mu\text{M}$  の tetracycline 存在下で Tat-peptide との結合定数を 38 倍にまで上昇させる RNA を獲得することができている。

さらに、得られた RNA を用いて、Tat-peptide を挿入したルシフェラーゼとの協働による標的分子の検出を行った。RNA 濃度と使用する生体外翻訳産物量の最適化を行い、37  $^{\circ}\text{C}$  の条件で測定を行った。その結果、theophylline の場合は 5  $\mu\text{M}$ 、tetracycline の場合は 1  $\mu\text{M}$  の濃度においても発光シグナルの有意な上昇を認めることができた。また、それぞれの標的分子のアナログ分子である、caffeine および doxycycline の存在下では、発光シグナルが変化することはなかった。このことから、セレクションによって獲得した RNA は、それぞれの標的分子を正確に認識して発光検出を可能にしている。

これまでのところ、セレクションにより獲得した RNA を用いての標的分子の発光検出は、細胞外で翻訳した翻訳溶液内での検出に留まっている。しかしながら、Tat-peptide を挿入した人工ルシフェラーゼが細胞内でも機能し、Tat-peptide と TAR-RNA との結合を生細胞内でモニタリングできることを本研

究とは別に確認している。そのため、今後セレクトーションにより獲得された RNA を細胞内に導入し、細胞内で発現している人工ルシフェラーゼと協働させることで、生細胞内における低分子化合物の発光イメージングが可能になると考えられる。

(2) RNA アプタマー直結型 TAR- RNA による遺伝子発現を介した細胞内標的分子の検出

RNA ライブラリーとは別に設計したアプタマー直結型 TAR-RNA を用いて、遺伝子発現を介した細胞内での theophylline 検出を試みた。この RNA (図 3) の場合、theophylline が TAR-RNA のループ部位に挿入されたアプタマー領域に結合し、RNA 構造を堅くすることで Tat との結合を阻害することが予測された。実際、細胞外の実験では theophylline の存在に応じてアプタマー直結型 TAR-RNA と Tat-peptide との結合定数が小さくなることが確認された。

さらに、構築したレポータープラスミドと Tat を発現するプラスミドとを共に HeLa 細胞に導入し、レポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) の発現量から theophylline の検出を試みた。その結果、培地中に添加した theophylline の濃度に依存してルシフェラーゼの発光が弱くなり、100  $\mu$ M の theophylline 濃度においても有意に遺伝子発現量の減少を認めることができた (図 4)。一方で、theophylline のアナログ分子である caffeine を培地に添加した場合には遺伝子発現量に変化はなく、theophylline を特異的に検出することができた。

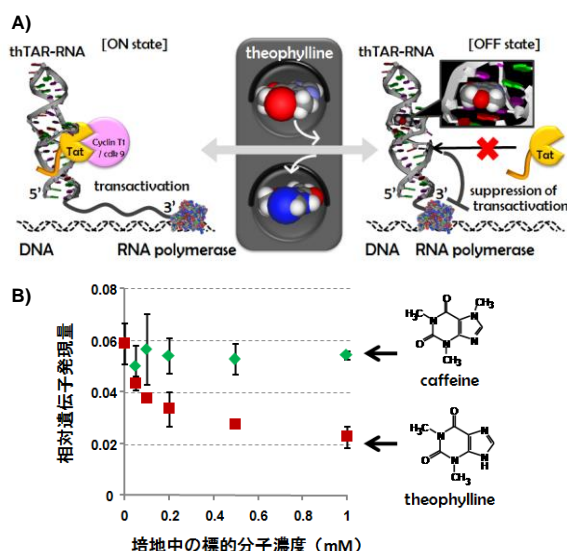


図 4 アプタマー直結型 TAR-RNA を利用した遺伝子発現を介した theophylline 検出の概念図(A)、およびルシフェラーゼ活性による theophylline 検出(B)

この結果より、標的分子により Tat と TAR-RNA との結合をアロステリックに調整することで、遺伝子発現を介した細胞内での標的分子検出も可能であることが示された。遺伝子発現を介していることから、Tat-peptide を挿入したルシフェラーゼによる発光検出よりは細胞内検出における即時性が失われると予測されるものの、既存のアプタマーを TAR-RNA に直接連結するという簡潔な形で多種類の分子に対応する細胞内検出系を構築できる可能性がある。

RNA アプタマーと標的化合物との結合による RNA 構造変化を利用したバイオセンサーは、そのほとんどが細胞外での検出を志向したものである。一方で、本研究では細胞内における低分子化合物の検出を目指し、Tat と TAR-RNA との相互作用を利用した Protein-RNA conjugate を構築した。この Protein-RNA conjugate は、標的分子の認識を RNA アプタマーに担わせ、検出のためのアウトプットシグナルつながる機能をタンパク質に担わせるという独特な形式を採っている。そのため、本研究でも示したように、タンパク質そのものの発光シグナルや、タンパク質によるレポーター遺伝子の発現調節といった、異なるアウトプットでの標的分子検出を可能にしている。申請者は発光だけではなく、FRET による蛍光シグナルとしてタンパク質-RNA 間の結合を検出可能な人工タンパク質の構築にも成功しているため、この Protein-RNA conjugate は生細胞内標的分子の蛍光によるリアルタイム検出にも応用可能であると考えられる。

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 5 件)

- 1 Endoh T., Sugimoto N., Gene Regulation System with an Artificial RNA Switch Operating in Human Cells, *Chembiochem*, 12, 1174-1178 (2011) 査読有
- 2 遠藤玉樹, 杉本直己, 話題 「遺伝子制御を可能にする RNA の構造スイッチ」, *フアルマシア*, 47, pp 146-150 (2011) 査読無
- 3 Andou T., Endoh T., Mie M., Kobatake E., Direct detection of RNAs in living cells using peptide-inserted Renilla luciferase, *Analyst*, 136, 2446-2449 (2011) 査読有
- 4 Andou T., Endoh T., Mie M., Kobatake E., Development of an RNA detection system using bioluminescence resonance energy transfer, *Sensor Actuat. B Chem.*, 152, 277-284 (2011) 査読有

- 5 Endoh T., Shintani R., Mie M., Kobatake E., Ohtsuki T., Sisido M., Detection of bioactive small molecules by fluorescent resonance energy transfer (FRET) in RNA-protein conjugates, *Bioconjug. Chem.*, 20, 2242-2246 (2009) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- 1 遠藤玉樹・杉本直己, 細胞内分子機能スイッチの構築に向けたタンパク質とのアロステリック相互作用を示す RNA のセレクション, 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 25 日, 横浜
- 2 Endoh T., Sugimoto N., Control of gene expression through an allosteric interaction of transactivator protein and its target RNA, The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, 2010 年 11 月 10 日, Yokohama
- 3 遠藤玉樹・村上健太郎・杉本直己, 分子クラウディング環境におけるリボスイッチ RNA の高次構造安定化に対する熱力学的定量評価, 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム, 2010 年 9 月 25 日, 大阪
- 4 遠藤玉樹・杉本直己, タンパク質-RNA 間相互作用を活用したヒト細胞内で機能する人工リボスイッチシステムの構築, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 28 日, 大阪
- 5 遠藤玉樹・村上健太郎・新谷諒・小島英理・大槻高史・宍戸昌彦・杉本直己, RNA 配列改変による RNA-protein conjugate バイオセンサーの効率化, 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 2009 年 9 月 14 日, 福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤玉樹 (ENDOHI TAMAKI)

甲南大学・先端生命工学研究所・講師

研究者番号：90550236