

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02059

研究課題名（和文）RNAダイナミクスの学理構築とRNA標的薬剤アッセイ系の構築

研究課題名（英文）Construction of RNA dynamics science and RNA-targeted drug assay systems

研究代表者

川井 清彦（KAWAI, KIYOHICO）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：50314422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、不均一なRNA構造のダイナミクスをごく微量のRNAより μ 秒の時間分解能で調べられる、1分子蛍光観測に基づいたRNA構造転移測定法の開発を行い、開発した手法を用いて、薬剤との結合がRNAのダイナミクスに与える学理を深めることに取り組んだ。具体的には、2種類のblinking観測によるRNAダイナミクス、構造の1分子測定法を開発した。三重項-三重項エネルギー移動（TTET）によるblinkingを利用した、RNAダイナミクス測定法を開発した。核酸内電子移動によるblinkingを利用した、RNA構造の点変異検出法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAのダイナミクス、および、RNA配列中の点変異を1分子測定できる手法を開発しました。本手法は、1分子測定に基づくため、貴重な生体資料を用いた測定が可能となります。また、PCRや検査キットに必要な増幅操作が必要ないため、増幅に要していた時間とコストを削減できます。その場測定が可能であるため、病理切片等におけるその場観察が可能となり、診断や分析に幅広く応用可能な手法として期待されます。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a method for measuring RNA structural transition based on single-molecule fluorescence observations, which allows the dynamics of heterogeneous RNA structures to be investigated with μ sec time resolution from very small amounts of RNA, and we used the developed method to deepen the science on the impact of drug binding on RNA dynamics. Specifically, single-molecule measurements of RNA dynamics and structure based on two types of blinking observations were developed. We developed a method for measuring RNA dynamics using blinking by triplet-triplet energy transfer (TTET). A method for detecting point mutations in RNA structure using blinking by electron transfer within nucleic acids was developed.

研究分野：光化学

キーワード：RNA 光化学 1分子計測 核酸

1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析により様々な生体分子の3次元構造が解かれ、構造と機能の相関が明らかにされてきた。我々が用いる経口薬の多くは、酵素などのタンパク質をターゲットとしており、タンパク質の基質結合部位などに選択的に強く結合する創薬が行われてきた。近年、新たな創薬ターゲットとしてRNAが注目されている。すべてのタンパク質はRNAの翻訳により得られるため、RNAを創薬標的とすればより上流の段階でタンパク質の発現を原理的にはコントロールできる。また、DNAから転写されたRNAのうち、タンパク質へと変換されるのは2%程度であり、non-coding RNA (ncRNA) とよばれる残りの大部分のRNAが生命機能において重要な役割を果たしていることがわかりつつあり、複数の製薬会社がncRNAをターゲットとした創薬に乗り出している。しかしながら、これまでRNAをターゲットとした薬剤は数えるほどしか開発されてきておらず、その大きな要因の一つとしてあげられるのが、RNAの柔軟性である。RNAは最安定構造に加え、様々な頻度、寿命で現れる種々のコンフォメーションのdynamic ensemble (DES) として存在する分子と描写される。タンパク質のように、最安定構造だけを狙った創薬での成功は難しかった。Al-Hashimiらは、緩和分散法などのNMR手法を用いて、マイクロ(μ)秒からミリ(m)秒のタイムスケールの寿命で生じる、存在割合が全構造の5%未満程度の種々のRNA構造によりなるDESを明らかにしてきた(*Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* **2019**, *20*, 474)。点変異が、発現するタンパク質のアミノ酸配列に影響を与えるからではなく、RNA構造のDESに大きな影響を及ぼしRNA機能が変化することにより発現に影響を与えることが示唆されており、これらRNA構造間の転移速度を操る薬剤を開発すれば、RNA機能を制御できると期待される。NMRは非常に多くの有意義な情報をもたらしてくれるが、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ などの高価な同位体の導入、多量のサンプル(ca. 0.5 mM \times 0.5 mL \sim 0.2 μmol)、長時間測定(hr \times)を必要とし、種々の薬剤候補がRNAのダイナミクスに与える影響を調べることは難しかった。また、構造間の詳細な平衡定数を求めることはできるが、RNA各部位の局所的な分子運動速度に関する知見はしばしば得られなかった。細胞内環境下ではRNA構造のDESが異なることも示唆されているが、細胞内のような夾雑環境でのNMR測定はしばしば難しく、細胞内に近い環境においてRNAダイナミクスを調べられる手法開発が望まれている。

2. 研究の目的

RNAは様々な頻度、寿命で現れる種々のコンフォメーションのdynamic ensemble (DES) として存在するダイナミックな分子であり、タンパク質のように最安定構造だけを狙った創薬での成功は難しかった。RNA標的創薬のためには、RNAダイナミクスを深く理解し、RNA構造のDESに影響を及ぼす薬剤をアッセイする系の構築が望まれる。RNAのDESは、緩和分散法などのNMR手法により調べられてきたが、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ などの高価な同位体の導入、多量のサンプルを必要とし、薬剤アッセイ系への展開は難しかった。本研究では、不均一なRNA構造のダイナミクスをごく微量のRNAより μ 秒の時間分解能で調べられる、1分子蛍光観測に基づいたRNA構造転移測定法の開発を行い、開発した手法を用いて、薬剤との結合がRNAのダイナミクスに与える学理を深めることを目指した。

3. 研究の方法

蛍光相関分光法、1分子蛍光観測法に基づき、微量の試料を用いたRNAダイナミクスの測定法を開発しその理解を深めるとともに、RNAを創薬標的とした薬剤評価を行うアッセイ系の構築を行った。研究代表者はこれまで、蛍光分子1つ1つに着目した際にはじめて顕著となる発光挙動である、蛍光が点滅して観測される現象=blinkingに注目し研究を行ってきた。蛍光分子の置かれた環境に応じてblinkingパターンが変化するように化学反応を制御し、blinkingパターンにより環境情報を調べることが出来るKinetic Analysis based on the Control of Fluorescence Blinking : KACB法の開発に取り組んできた。核酸への化学修飾の導入、および、蛍光相関分光、1分子レベル蛍光観測により、マイクロ秒から数十ミリ秒の時間領域において核酸上で進行する化学反応を速度論的に検証してきた(*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, 15329, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 7740)。RNA創薬において必要

となるのは、まさにこのタイムスケールにおける RNA ダイナミクスの理解である。20 種のアミノ酸よりなるタンパク質とは異なり、わずか 4 種の塩基よりなるダイナミックに動く RNA を標的とした創薬においては、強く結合すること (K_d) を主とした判断基準としない、今まで見過ごされてきた弱い相互作用が RNA ダイナミクスに与える影響に特に注視した創薬が必要であると考えられる。本研究では、2 種類の blinking 観測による RNA ダイナミクス、構造の測定法の開発に取り組んだ。

4. 研究成果

I. 三重項-三重項エネルギー移動 (TTET) による RNA ダイナミクス測定法の開発:

一重項-一重項エネルギー移動である FRET では、一般にエネルギードナー、アクセプター間の距離が 50 Å 程度以上変化する大きな構造転移の観測に優れている。これに対し、三重項-三重項エネルギー移動では、ドナー、アクセプター間の衝突が必要であるため、ドナー、アクセプターが衝突する RNA の分子運動に絞って追跡できる。ここで、1 分子蛍光観察特有の現象である blinking を利用し、蛍光相関解析から三重項-三重項エネルギー移動が起こるのに要する時間 (τT) を求めることを試みた ($1/\tau T$ は RNA 分子運動速度に対応)。 τT は、blinking における無発光状態の持続時間 = τ_{OFF} として測定することができる。三重項エネルギーのアクセプターとしては 1,4,5,8-cyclooctatetraene (COT) を用いた。COT は、三重項-三重項エネルギー移動によりエネルギーを受け取り、100 マイクロ秒以内にそのエネルギーを熱として放出し、蛍光分子の光安定性を向上させることが報告されている。

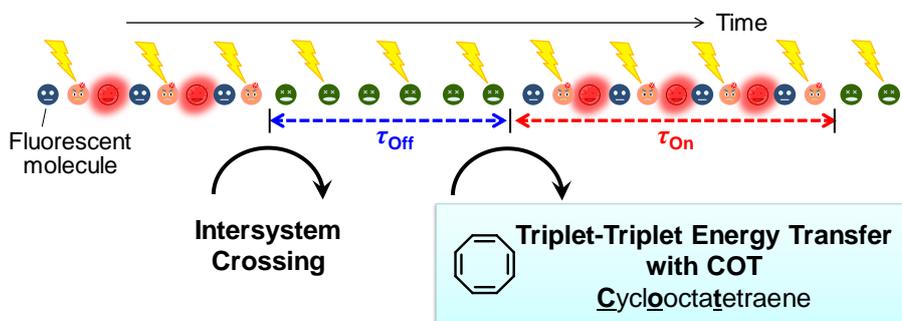


図 1. 三重項-三重項エネルギー移動による blinking 測定を利用した、核酸構造転移の 1 分子測定法の開発。

DNA をプラットフォームとして、蛍光分子として ATTO 647N、エネルギーアクセプターとして COT、ATTO 647N と COT の間に種々の長さ・配列の 1 本鎖 DNA をスパーサーとして導入した DNA 配列群を構築した。蛍光相関分光法を用いて三重項励起状態を OFF 状態とする blinking 観測により、三重項-三重項エネルギー移動の測定を試みた。 τ は、1 本鎖 DNA スパーサーが 3、6、12 塩基と長くなるに従い長くなった。また、スパーサー塩基が単員環のチミンであるときに比べ、より強い π スタッキングにより核酸構造がより強直となる 2 員環のアデニンを用いたときに τ は長くなった。これらの結果は、blinking が蛍光分子と COT の分子衝突に支配されていることと首尾一貫し、三重項-三重項エネルギー移動に由来する blinking 観測により、核酸のダイナミクスを調べられることがわかった (図 1)。核酸をガラス基板上に固定することにより、本系を 1 分子測定へと発展した。RNA と DNA の結合により生じる核酸のダイナミクスの変化を、三重項-三重項エネルギー移動に伴う blinking 変化として観測可能な 1 分子測定評価系の構築に成功した。

II. 核酸 2 本鎖中の電子移動速度測定による RNA 配列の 1 塩基違いの読みわけ法の開発:

我々生物の遺伝情報を司る DNA 中の電子移動 (電気が流れること) については、世界でもホットな研究の 1 つで注目も高く、実験、および、理論の両面から様々な研究がなされてきた。研究代表者らの研究を含む一連の研究により、電子の移動する速さが配列により変わることがわかっていた。RNA 中を電子が移動する速度を測れば、RNA の配列情報を読むことができ、遺伝子診断へと応用することもできるが、測定に多量のサンプルを必要とし、分析・診断への応用はできなかった。今回、修飾核酸プローブを設計・合成し、DNA/RNA ハイブリッド内の電子移動速度を蛍光 blinking より 1 分子測定する技術を開発した。蛍光 blinking は様々な試料上でその場測定が可能であり、腫瘍細胞病理切片上で、成人グリオ

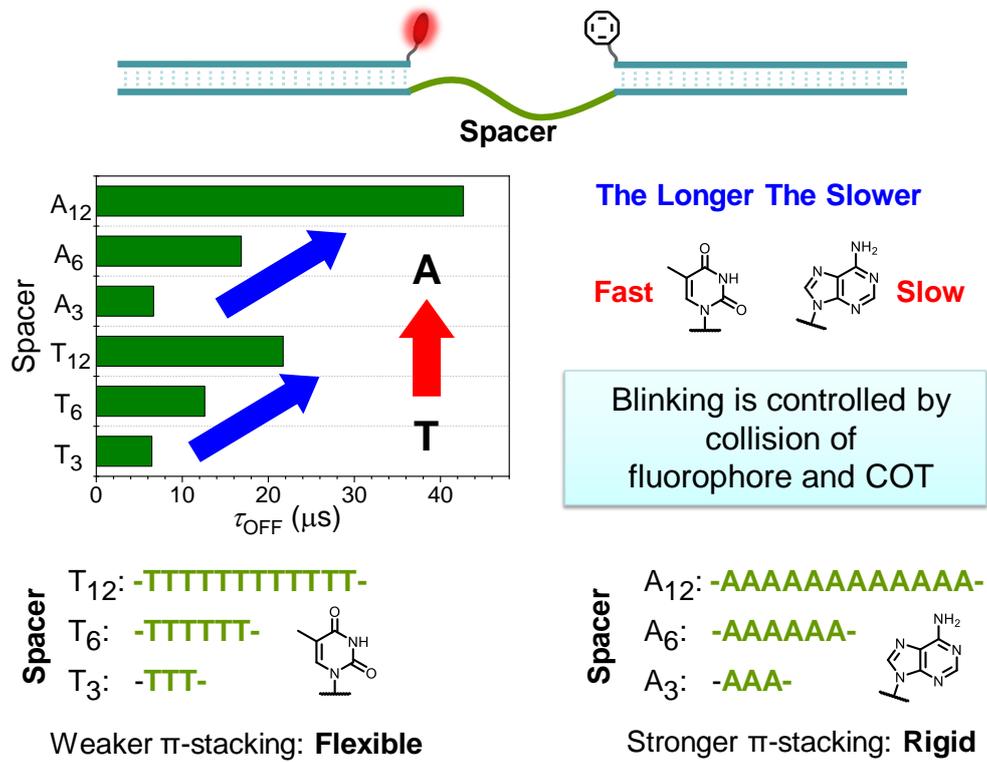


図 2. DNA をプラットフォームとして用いた三重項-三重項エネルギー移動をトリガーとした blinking の測定。

一マの治療効果と相関のある isocitrate dehydrogenase (IDH) 遺伝子の点突然変異の診断を試みました。IDH の mRNA を修飾核酸プローブより捕捉し、形成される二本鎖中の電子移動速度を蛍光 blinking により 1 分子測定することにより、点変異を 1 分子診断することに成功した。

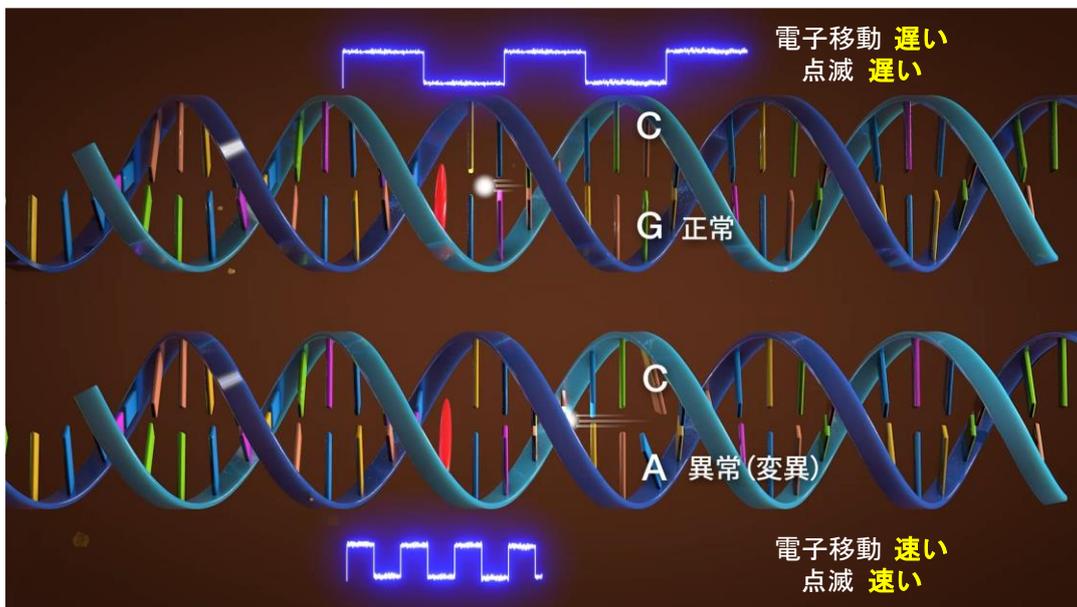


図 3. 核酸配列中を電子が移動する速度が配列に依存して変化することを利用して、電子移動を blinking パターンとして読み出し可能な蛍光分子修飾プローブ DNA を開発し、RNA 配列の点変異の一分子検出に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fan Shuya, Takada Tadao, Maruyama Atsushi, Fujitsuka Mamoru, Kawai Kiyohiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Programmed Control of Fluorescence Blinking Patterns based on Electron Transfer in DNA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202203552	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 Fan Shuya, Takada Tadao, Maruyama Atsushi, Fujitsuka Mamoru, Kawai Kiyohiko	4. 巻 95
2. 論文標題 Large Heterogeneity Observed in Single Molecule Measurements of Intramolecular Electron Transfer Rates through DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1697~1702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20220220	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 Fan Shuya, Xu Jie, Osakada Yasuko, Hashimoto Katsunori, Takayama Kazuya, Natsume Atsushi, Hirano Masaki, Maruyama Atsushi, Fujitsuka Mamoru, Kawai Kumi, Kawai Kiyohiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Electron-transfer kinetics through nucleic acids untangled by single-molecular fluorescence blinking	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chem	6. 最初と最後の頁 3109~3119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chempr.2022.07.025	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 川井清彦、丸山厚、藤塚守	4. 巻 77
2. 論文標題 蛍光分子を1つ1つみると～蛍光の点滅=プリンキングのパターンから情報を読む	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学	6. 最初と最後の頁 68~69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Xu Jie, Fan Shuya, Xu Lei, Maruyama Atsushi, Fujitsuka Mamoru, Kawai Kiyohiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Control of Triplet Blinking Using Cyclooctatetraene to Access the Dynamics of Biomolecules at the Single Molecule Level	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 12941 ~ 12948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202101606	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 Takada Tadao, Nishida Koma, Honda Yurika, Nakano Aoi, Nakamura Mitsunobu, Fan Shuya, Kawai Kiyohiko, Fujitsuka Mamoru, Yamana Kazushige	4. 巻 22
2. 論文標題 Stacked Thiazole Orange Dyes in DNA Capable of Switching Emissive Behavior in Response to Structural Transitions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2729 ~ 2735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202100309	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 Kawai Kiyohiko, Fujitsuka Mamoru	4. 巻 51
2. 論文標題 Single-molecule Fluorescence Kinetic Sandwich Assay Using a DNA Sequencer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 139 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210726	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 川井 清彦
2. 発表標題 蛍光の点滅現象 = blinking観測に基づく1分子分析・診断
3. 学会等名 バイオ機能医工学研究領域セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土取 章太郎、米澤 祐基、Shuya FAN、丸山 厚、藤塚 守、川井 清彦
2. 発表標題 レドックス制御型蛍光blinkingを用いた生体還元剤の定量
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川井 清彦
2. 発表標題 1分子蛍光blinking観測に基づく分析・診断法
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuya FAN、Jie XU、Yasuko OSAKADA、Katsunori HASHIMOTO、Kazuya TAKAYAMA、Atsushi NATSUME、Masaki HIRANO、Atsushi MARUYAMA、Mamoru FUJITSUKA、Kumi KAWAI、Kiyohiko KAWAI
2. 発表標題 In situ single molecule identification of point mutations in tumor cell block specimens by monitoring fluorescence blinking
3. 学会等名 ISANC 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuya FAN、Jie Xu、小阪田泰子、橋本克訓、高山和也、夏目敦至、平野雅規、丸山厚、藤塚守、川井久美、川井清彦
2. 発表標題 1分子blinking測定による腫瘍細胞病理切片上での点変異診断
3. 学会等名 第16回 バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuya FAN、Atsushi MARUYAMA、Mamoru FUJITSUKA、Kiyohiko KAWAI
2. 発表標題 Distance-dependent electron transfer kinetics in DNA at the single-molecule level
3. 学会等名 光化学討論会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kiyohiko KAWAI
2. 発表標題 Single-molecule photochemistry of nucleic acids and its application to single-molecule analysis and diagnosis
3. 学会等名 光化学討論会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jie Xu, Atsushi Maruyama, Mamoru Fujitsuka, Kiyohiko Kawai
2. 発表標題 Exploring the Dynamics of Nucleic Acids at the Single-Molecule Level Using Triplet-Triplet Energy Transfer Kinetics
3. 学会等名 ISNAC 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jie XU, Shuya FAN, Lei XU, Atsushi MARUYAMA, Mamoru FUJITSUKA, Kiyohiko KAWAI
2. 発表標題 Using Triplet-Triplet Energy Transfer Kinetics to Access the Dynamics of Biomolecules at the Single-Molecule Level
3. 学会等名 光化学討論会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyohiko KAWAI, Atsushi MARUYAMA, Mamoru FUJITSUKA
2. 発表標題 Single molecule analysis and diagnosis by measuring chemical reaction rates
3. 学会等名 The 25th SANKEN International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川井 清彦、藤塚 守
2. 発表標題 DNAシーケンサーを用いたDNAアダプターの1分子計測
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会 (2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	田邊 一仁 (Tanabe Kazuhito) (40346086)	青山学院大学・理工学部・教授 (32601)	

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
---------	---------