

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655165

研究課題名(和文) 進化分子工学を利用した蛍光性RNAの獲得

研究課題名(英文) Screening of fluorescently detectable RNA using evolutionary molecular engineering

研究代表者

加藤 義雄 (Kato, Yoshio)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：20415657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円、(間接経費) 510,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ランダム配列を有するRNAライブラリーを細胞内で発現させ、蛍光性の細胞を取得することによって、生体内で自発的に蛍光を発する新規RNA配列を獲得することを目指す。細胞内の蛍光性分子FMN(フラビンモノヌクレオチド)と結合するRNA群をin vitroで作成し、大腸菌内で発現させた。1000000クローンについて蛍光特性を解析したものの、現時点では蛍光性RNAを獲得できていない。

研究成果の概要(英文)：To obtain the spontaneously fluorescent RNA in cells, we have expressed the randomized RNA library in E. Coli and analyzed the fluorescent characteristics in E. Coli. We have constructed RNA library binding to FMN (flavin mono nucleotide), which emits fluorescence and ubiquitously dispersed all over cells, and expressed the cDNA library in E. Coli. We analyzed the fluorescent characteristics of 1000000 E.Coli clones, however, we have not obtained the expected fluorescent RNA yet.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・整体関連化学

キーワード：核酸 蛍光性RNA 進化分子工学

1. 研究開始当初の背景

生命は DNA から構成される遺伝子が設計図となり、様々な生命現象を生み出している。近年の DNA 配列解析技術（シーケンシング技術）の発展により、遺伝子に書き込まれた設計図を読み取ることが可能となったが、具体的にどの細胞が、どのタイミングで、どのような遺伝子を発現するのかについては、遺伝子配列からは完全に予測することができない。

遺伝子発現パターンを知るためには、遺伝子の発現産物である RNA やタンパク質を観測する必要がある。分子生物学の黎明期には、1種類の分子を検出するために膨大な数の細胞を必要としていたが、バイオテクノロジーの発展によって、1細胞レベルで遺伝子発現を捉えることが可能となってきた。その代表例が緑色蛍光タンパク質（GFP; Green Fluorescent Protein）である。

GFP は、1962年にオワンクラゲから見いだされた蛍光タンパク質である。発見者である下村脩教授は 2008年にノーベル化学賞を受賞した。それまでの常識では、蛍光色素と言えば有機合成された染料のような分子に限られており、蛍光を発しないアミノ酸だけから構成されるタンパク質が蛍光を発するという発見は、その後の医学生物学分野で多大な貢献をもたらしている。

特に、遺伝子にコードされたタンパク質が蛍光の目印「タグ」として機能する点が重要である。仮に、発現パターンを観測したい特定のタンパク質があるのであれば、遺伝子レベルで当該タンパク質の遺伝子と GFP 遺伝子を融合させることによって、目的とするタンパク質に蛍光タグを付すことが可能となる。この融合遺伝子を細胞または生物に導入することによって、目的遺伝子の細胞内での挙動を蛍光によって追跡することが可能となる。

タンパク質の生体内挙動がわかれば、遺伝子発現パターンがすべて理解できるか、と言えば、そうではない。遺伝子には、タンパク質をコードしない RNA があることが知られている。そうした RNA は、1980年代までは単なる情報の仲介役としか考えられていなかったが、近年ではタンパク質をコードしない RNA が生体内で重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。RNA 酵素（リボザイム）、マイクロ RNA、リボスイッチ、CRISPR 等の様々な RNA が生体内では遺伝子の発現調節に関与していることが分かっている。

そこで、多種多様な RNA の機能を解析すべく、様々な手法が開発されている。特に、目的 RNA 分子を低分子蛍光化合物で蛍光標識して観測する技術が発展を遂げてきた。しかしながら多くの蛍光標識法では、RNA 分子の機能を損なってしまうという問題点も孕んでいる。

これまでの代表的な RNA 検出例としては、モレキュラービーコン法が挙げられる。プロ

ーブ自身では蛍光を発せず、目的 RNA とハイブリダイズした時のみ蛍光を発するような核酸プローブを用いる事により、生きた細胞内で RNA を検出しようとするものである。しかしながら、申請者自身も新規蛍光 DNA プローブ（特許第 5142244 号）を開発する過程で直面してきたように、以下の問題点を考慮しなければならない。すなわち、生きた細胞内において、外部から加えられたプローブ分子を利用して目的 RNA 分子を検出しようとした場合、(1) プローブ分子自体の局在化、および(2) プローブ分子との相互作用による目的 RNA 分子の機能阻害および局在変化、が重大かつ深刻な問題となる。

理想を言えば、GFP の様に自ら発色団を含有して蛍光を発するような蛍光 RNA を利用して、直接的に RNA をイメージングすることである。しかしながら研究開始当初にそのような RNA タグ配列の報告例はなく、間接的な方法を用いることが主流である。

2. 研究の目的

本研究では、進化分子工学を利用し、新規蛍光性 RNA の取得を目標とする(図 1)。種々異なる RNA 配列を大腸菌内に発現させたライブラリーを用意し、個々の大腸菌の蛍光値を定量化した後、蛍光性の大腸菌を選択する。

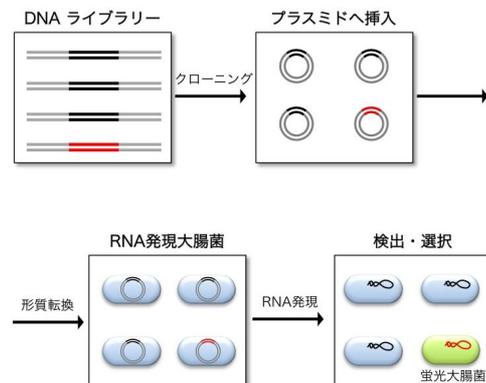


図 1. 研究開始当初の計画。大腸菌を利用して、蛍光性 RNA を獲得するための進化分子工学の概略。

ただし、蛍光性 RNA を取得するのは極めて困難であることが想定される。RNA には、化学構造の類似した 4 種類の核酸塩基 (A,G,C,U) があるが、タンパク質は官能基の多様性に富んだ 20 種類ものアミノ酸から構成される。GFP に代表される蛍光タンパク質は、3 種のアミノ酸を材料に環化・脱水・酸化反応を触媒して電子共役系を拡張して蛍光発色団を作り出すことから、単なる構造タンパク質ではなく、むしろ酵素と言った方が近い。一方で RNA には、一部に酵素活性が認められているものの、pKa が中性付近の側鎖が無く、一般的に反応性に乏しい。側鎖に芳香環はあるが、核酸自身によって共役系が拡張されるような反応は、なかなか期待できない。

それでは蛍光性 RNA が報告されていない

かという、そういう訳ではない。プリン塩基であれば芳香環由来の微弱な蛍光を発することが知られており (~ 0.0001) tRNAなどに含まれる修飾核酸塩基の中には、蛍光性を有するものが幾つか存在する。天然の核酸塩基としては 2-Amino purine、Wyosine (図 2 A, B)、人工的なものとしては tC0 などが蛍光性核酸塩基として挙げられる (図 2 C)。しかしこうした修飾塩基は特殊な状況で作られ出されたものであり、本研究で目的とする蛍光性 RNA タグとしては適さない。

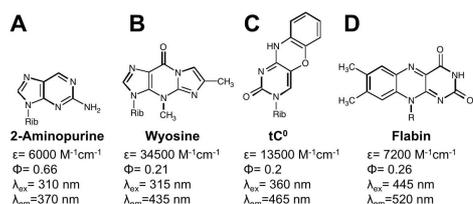


図 2. 核酸塩基の蛍光特性。Rib: リボース、 ϵ : モル吸光係数、 Φ : 蛍光量子収率、 λ_{ex} : 最大励起波長、 λ_{em} : 最大蛍光波長。

他方、蛍光色素に特異的に結合するような RNA 分子を利用して、RNA を蛍光検出する手法が報告されている。in vitro セレクション (SELEX) 法を利用して色素に結合する RNA アプタマーを取得する手法 (Ellington & Szostak, Nature, 1992) を応用し、これまでにローダミン、フルオレセイン、ヘキスト、マラカイトグリーン等の蛍光色素に結合する RNA アプタマーなどが取得されている。しかし、このような合成色素を利用して RNA を生きた細胞内で可視化しようとする、色素自体の局在化が問題となるのは前述の通りである。

そこで、細胞内に豊富に存在する蛍光性の生体低分子・コファクターに結合する RNA アプタマーを利用すれば、そのような問題を回避できるかもしれない。蛍光性の生体分子としては、水溶性ビタミンの一種であり、遍く細胞に存在するフラビン類 (FMN, FAD) が挙げられる (図 2 D)。フラビン結合アプタマー (Burgstaller & Famulok, Angew. Chem., 1994) を利用した試験管内での RNA の蛍光検出は行なわれているものの、実際に細胞内で発現すれば、大量に存在する遊離フラビン類のバックグラウンド蛍光 (自家蛍光) に埋もれてしまうことになる。

したがって、コファクターと RNA の結合によって蛍光の特性が変化するような環境が必要となる。ここで言う蛍光特性の変化とは、好ましくは蛍光波長の長波長シフト (Red-shift) であるが、蛍光寿命の変化や蛍光偏光の変化であっても良い。例えばフラビン類は緑色の蛍光を発するが、細胞全体が緑色の自家蛍光を発してしまうことから、RNA の結合によってフラビン分子の環境変化によって黄色や赤色の蛍光を発すれば、顕微鏡下で観測できる可能性がある。

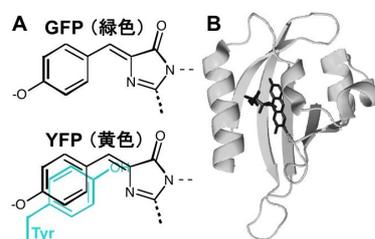


図 3. 蛍光タンパク質の発色団の構造。A: GFP と YFP は同一の発色団。B: フラビン内包蛍光タンパク質の推定構造。

例えば、GFP と YFP の発色団は、全く同一であるにも関わらず、YFP において発色団近傍のチロシン残基が相互作用することにより Red-shift を引き起こす (図 3 A)。また最近、フラビンを内包した蛍光タンパク質 (図 3 B) が見出され (Drepper et al., Nat. Biotechnol., 2007) GFP に匹敵する明るさの蛍光を示していることから、RNA においても、RNA の結合によって細胞内の蛍光性コファクターの蛍光特性を変化させる可能性はあると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、進化分子工学を利用して蛍光性 RNA を獲得する。進化分子工学の技術要素は、遺伝子型と表現型のリンク、および目的分子の取得方法にあり、本研究では、蛍光性を指標として分子集団から目的分子を取得する。大腸菌にランダム配列を有する RNA を発現させ、1 クローンずつ大腸菌を定量化する。

in vitro で進化させる SELEX 法ではなく、大腸菌を用いる理由は、2 点ある。1 つ目の理由は、コピー数の問題である。本研究で観測する RNA の蛍光変化量が微量であると予想されるため、同一 RNA 分子種が局所的に多量に存在していなければならない。また、細胞という明確な区分けを使うことによって、他の分子種と区別して蛍光を指標に分取することが可能となる。

大腸菌を用いる 2 つ目の理由は細胞が有する自家蛍光の影響を、初期の段階で除去しておきたいからである。in vitro の実験で蛍光性 RNA が得られたとしても、細胞内では自家蛍光に埋もれて見えないという可能性がある。エマルジョンを使ったコンパートメント法 (Doi & Yanagawa, FEBS Lett., 1999) を用いれば、コピー数の問題点をクリアでき、in vitro でもスクリーニング自体は可能になるが、細胞の自家蛍光の問題は避けがたい。実験初期段階から細胞を用いる事により、細胞自身が持つ自家蛍光のバックグラウンドを加味し、それを上回る蛍光特性が見られれば良いというスタンスであれば、分子進化の結果獲得された RNA は検出できる可能性が高いと想定した。

4. 研究成果

【大腸菌発現系の検討】

はじめに、大腸菌内で短いRNAを高発現させる系の検討を行った。大腸菌内にて大量の遺伝子を発現させる最も有名な系としては、pETシステムが知られている。pETシステムでは、T7 RNAポリメラーゼをコードする大腸菌株BL21(DE3)とT7プロモーターを搭載したプラスミドを利用する。そこで短いRNAを発現する様に新規設計したプラスミドを構築した。

T7プロモーターの下流に、RNAの分解を防ぐためのステムループを配置し、その下流にランダムな50塩基を組み込むためのクローニングサイト、最下流にはT7転写終結配列を配置した(図4A)。このプラスミドをBL21(DE3)に形質転換し、IPTGにて発現誘導を行った。しかしながら、種々条件において目的の短いRNAの発現が見られなかった。大腸菌内でのRNAの分解が原因と考えられたため、RNA分解酵素変異株であるBL21(DE3)Star株を用いてさらに条件検討をおこなったが、期待される様な、目的のRNA発現は見られなかった。

そこで文献例などを参考に、別のRNA発現系を検討する事にした。プロモーターには恒常的に発現するlppプロモーター、構造安定化配列としてtRNAを用いた(図4B)。tRNAは大腸菌内においてRNA分解酵素から逃れる事が知られており、tRNAと融合させた短いRNAは、大腸菌内にて蓄積される事が期待される。ランダムな配列は、tRNAのアンチコドン領域に配置する。コントロールとしてクローニングサイト(EagIおよびSacII)を有する、tRNA(Met)およびtRNA(Lys)を発現させた。

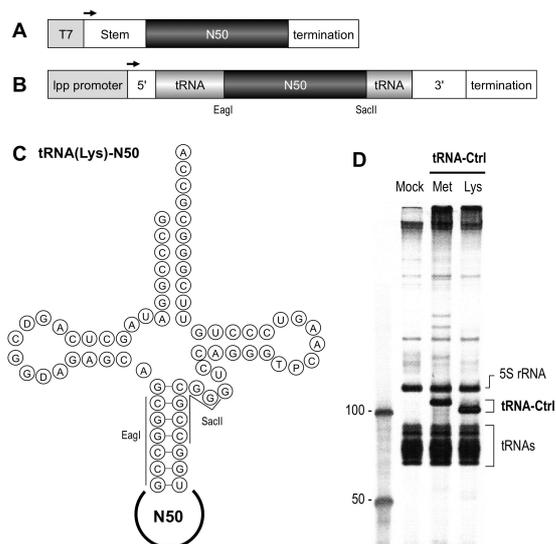


図4. 大腸菌内でRNAを発現させる工夫。

A: pETシステムに基づいてT7プロモーターからRNAの発現を試みたが、発現が見られなかった。B:改良したRNA発現ベクター。tRNA周辺配列の採用により、大腸菌内でのRNAを安定化。C:tRNA(Lys)とN50の挿入。D:大腸菌内において、短いRNAを大量に発現させることに成功。RNAはエチジウムブロマイドで染色。

使用した大腸菌は、JM109、DH5、BL21(DE3)、BL21(DE3)starである。大腸菌へtRNA-Ctrl発現プラスミドをトランスフォーム後、37°Cでオーバーナイト培養し、ISOGEN-II(和光純薬)を用いてRNAを抽出した。RNAは8M尿素を含む6%アクリルアミドにより電気泳動し、エチジウムブロマイドにてRNAの染色を行った。

tRNA(Lys)-Ctrl発現プラスミドおよびtRNA(Met)-Ctrl発現プラスミドの比較を行ったところ、特にtRNA(Lys)において大量にRNAを発現させられる事が分かった。エチジウムブロマイド染色で十分観測できるほどの発現量が見られ、大腸菌の5S rRNAよりも多く、1細胞あたり10000分子以上のRNA発現が見られた(図4D)。また、大腸菌としてはJM109およびDH5で高発現、BL21(DE3)およびBL21(DE3)starでは低発現であった。

【ランダム配列のスクフォールド】

進化分子工学のライブラリーとして、ランダムな配列として50塩基のランダムな配列(N50)を発現させることも想定していたが、一方で、細胞内の低分子と結合して蛍光を発するためには、一定のスクフォールドを有している必要がある。例えば、50塩基が完全にランダムな配列だとすると理論的分子多様性は $4^{50} \approx 10^{30}$ である。実際に大腸菌でのスクリーニングに使用できる多様性は高々 10^8 であるため、残りの 10^{22} 種類の分子をスクリーニングから除外してしまうことになる。

そこで、細胞内低分子に狙いを定めてその分子にある程度の親和性を有するRNA分子ライブラリーを構築し、そのRNAライブラリーを大腸菌で発現させることにより、蛍光性を有するRNAの獲得を試みた。細胞内低分子としては、前述のフラビンに狙いを定めた。

すなわち本研究では、(1) *in vitro* でフラビンに親和性を持つRNA群を獲得した後、(2) フラビン親和性RNA群を大腸菌にて発現させて蛍光を発する大腸菌を取得する、という2段階のスクリーニングを行うこととした。

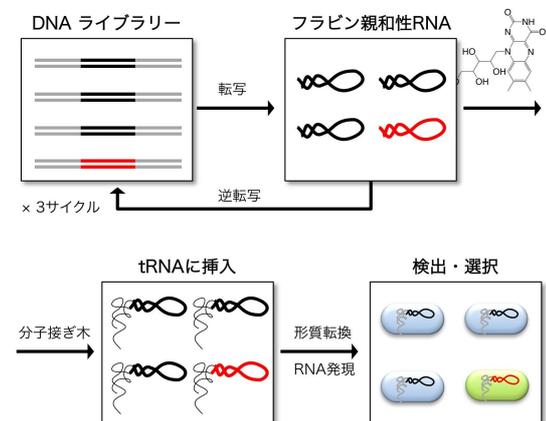


図5. 改良を加えたスクリーニング系。 *in vitro* でのスクリーニングと大腸菌でのスクリーニングの2段階。

フラビン分子の固相化法には種々の手法が報告されているが、そのどれもが芳香環から側鎖を延ばしていくものであった。しかし、芳香環と RNA との密接な相互作用を期待する本研究では、できるだけ芳香環はインタクトな天然の状態にしておきたい、という観点からリビトール-リン酸側から固相化を試みた。図 6 に記載の手順に従って、フラビンモノヌクレオチド (FMN) のリン酸基を活性化した後ヒドラジンビーズへ結合させた。

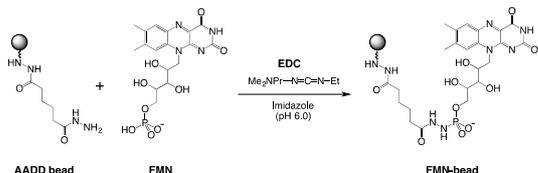


図 6. フラビンの固相化法。芳香環の周辺に構造変化を生じないように、リン酸基を介してビーズに結合。

次に、RNA ライブラリーを *in vitro* 転写で作成した。DNA ライブラリー (20 μ g: 10^{14} 分子) から出発して RNA ライブラリー (100 μ g: 10^{14} 分子 \times 5 コピー) を作成した。上記フラビン固相化ビーズへ結合させ、FMN にて溶出し、逆転写および転写を行うことによってセレクションサイクルを回した。

3 回のセレクションサイクルを回した後、DNA フラグメントを *EagI* および *SacII* で切断し、tRNA(Lys)-*Ctrl* プラスミドに挿入した。tRNA 発現プラスミドにフラビン親和性 RNA ライブラリーを挿入した際、RNA 全体の構造が変化しないように、DNA ライブラリーの段階で「分子接ぎ木」を想定した配列設計を行っている。大腸菌は、24cm 角の LB アガロースプレート 6 枚に展開し、コロニーとして取得した。LB アガロースプレートには、最終濃度 1 μ M のリボフラビンを添加した。

LB アガロースプレート上の大腸菌コロニーを蛍光イメージスキャナー (GelDoc XR、バイオラッド社) にて観測した (図 7、例として)。蛍光検出には青色励起光 (470nm)、蛍光フィルター 緑 (535-585nm) または橙 (548-630nm) を使用した。いずれの蛍光フィルターにおいても、他のコロニーよりも蛍光強度が高いコロニーは観測できず、本研究により期待していた蛍光性の大腸菌クローンおよび蛍光性 RNA の獲得には至っていない。



図 7. LB アガロースプレート上における大腸菌コロニーの蛍光スキャン像の例。蛍光波長を切り替えて検出してみたが、蛍光性の大腸菌は観測されなかった。

本研究は、非常に獲得が難しいと想定されていた蛍光性 RNA を取得しようとする挑戦的な試みであったが、現時点までに期待された

分子は得られていない。しかしながら、*in vitro* セレクション法と大腸菌でのスクリーニング用の融合という点で、新たな RNA 分子を獲得するための礎を構築してきた。方法論的にはまだ改善の余地もあり、本研究で得られた知見をもとに、引き続き蛍光性 RNA の獲得を目指していく。

また、本研究課題とは直接的に関連しないものの、生体内の RNA の挙動観測という点では、本研究実施期間中に計 3 報の論文【Yamashita et al. *J. Biol. Chem.* (2012); Shimbo et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014); Wada et al. *Eur. J. Physiol.* (2014)】を発表しており、周辺関連分野への展開も期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 1 件)

名称: 新規蛍光標識核酸
発明者: 加藤義雄、多比良和誠
権利者: 産業技術総合研究所
種類: 特許
番号: 特許第 5142244 号
取得年月日: 2012 年 11 月 30 日
(出願日: 2006 年 10 月 5 日)
国内外の別: 国内

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
加藤義雄 (KATO, Yoshio)
産業技術総合研究所・バイオメディカル研究
部門・主任研究員

研究者番号: 2 3 6 5 5 1 6 5

(2) 研究分担者
なし