

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650131

研究課題名(和文) 蛍光RNA分子を用いて遺伝子水平転移を検出・解析する新規実験手法の開発

研究課題名(英文) Development of a new detection method of horizontal gene transfers by fluorescently labeled RNA molecules.

研究代表者

小保方 潤一 (Obokata, Junichi)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：50185667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：藻類を摂食するウミウシの中には、個体や卵の中で、藻類のmRNA配列に由来するcDNAが見いだされる場合がある。しかし、この特異な遺伝子水平転移の機構は分かっていない。一方、最近、蛍光発色団に結合するアプタマー配列を用いてRNA分子を蛍光標識する手法が開発された。本研究では、このRNA標識技術を用いて、藻類のRNA配列が捕食者中でどのように挙動するのかを検出する新規実験手法の開発にチャレンジした。研究期間の大半は、植物体中でのRNA蛍光標識法の開発に費やしたが、得られた蛍光強度は水平転移を検出するには不十分だった。現在引き続き、RNAの蛍光強度を高めるための検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：In some species of the sea slugs feeding on the cytoplasm of marine algae, cDNAs from algal mRNAs are sometimes found in the slug's body and eggs. However, the underlying mechanism of this novel horizontal transfer of the algal gene sequences is totally unknown. Recently, a new RNA aptamer technique to produce fluorescently labeled RNA molecules was reported in animal cells. In this study, we challenged the application of this new RNA labeling technique to visualize the transfer process of the algal mRNA sequences to the slug's body. Most of the given research period was devoted to the development of fluorescently labeling system of the plant/algal RNAs. However, fluorescence intensity of the labeled RNAs was not enough to detect small number of molecules as in the case of horizontal gene transfer. We are still challenging to improve the fluorescent intensity by several means.

研究分野：ゲノム進化生物学

キーワード：蛍光標識RNA 遺伝子の水平転移 RNA アプタマー Spinach 植物細胞 DFHBI

## 1. 研究開始当初の背景

浅海に生息するウミウシのなかには、餌となる海藻から葉緑体を自分の体内に取り込み、それを使って光合成をする仲間がいる。この現象を説明するために、多くの研究者は、葉緑体の機能維持に必要な遺伝子群が、藻類のゲノムから動物であるウミウシのゲノムに水平転移しているのではないかと考えていた。しかし実際の解析では、水平転移を指示する知見と支持しない知見が、それぞれ異なるグループによって、同時に報告されていた。

そのような最中、筆者のグループが、ウミウシの体内や卵塊中に現れる藻類由来の DNA 配列を定量的に解析したところ、そのコピー数はウミウシゲノムのわずか 1 万分の 1 程度と極めて微量であり、しかも、ゲノム DNA 型の配列ではなく、藻類の mRNA に由来する cDNA 型の配列であることがわかった。

つまり、藻類由来の配列はウミウシ核の染色体 DNA には安定に組み込まれていない可能性が高く、このことが、「水平転移配列は核染色体上に安定に組み込まれている筈だ」と思い込んでいた研究者達の解釈を混乱させ、さらに、その極端に少ないコピー数が、PCR や次世代シーケンス等による検出実験の再現性を時として阻んだと考えられる。

そこで筆者らは、被食者（海藻）の細胞質 RNA がなんらかのプロセスを経て逆転写され、それが非常に低い頻度でバラバラと捕食者（ウミウシ）の生殖系列などに紛れ込む、いわば遺伝情報の水平漏出が定常的に生じているのではないかと予想した。しかし、問題は、それをどのように調べるかだ。

ちょうどその頃、米国の Jeffrey 博士らのグループは、緑色蛍光蛋白質（GFP）の蛍光発色団の類縁化合物 DFHBI に結合する RNA アプタマー配列の開発に成功し、その配列を用いれば、細胞内の RNA 分子を GFP のように蛍光標識できることを示した (Paige et al. 2011 Science 333: 642)。

もし、Jeffrey 博士らの RNA アプタマー配列 (Spinach 配列と命名されている) を利用すれば、異なる生物種間を水平移動する RNA 配列を可視化できるのではないだろうか、... この着想が、本研究の出発点である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、被食者（海藻等）から捕食者（ウミウシ等）への RNA 配列の水平転移を、RNA 分子の蛍光標識技術を用いて、可視的に検出できる実験手法を開発することである。

しかしこれまで、“Spinach 配列(上述)”を用いた RNA 分子の蛍光標識実験が試みられたのは、大腸菌と動物の培養細胞に限られており、植物・藻類の系で、RNA 分子を蛍

光標識した例はまだ報告されていない。また、海藻は、高等植物と比べて、安定形質転換体の作製が非常に難しく、時間がかかる。そこで、これらの事情を考慮して、本研究では、次の二段階の研究目標を設定した。

(1) 形質転換体の作製が容易なシロイヌナズナを用いて、植物体中で Spinach アプタマー配列をもつ RNA 分子を産生させ、次いで、植物体に蛍光基質である DFHBI を与えることにより、それらの RNA を *in vivo* で蛍光標識して可視化する実験手法を確立する。

(2) 上記の手法に目途がつけば、それを用いて海藻のハネモの RNA を *in vivo* で蛍光標識し、そのハネモをウミウシに捕食させて、捕食者及びその子孫中で、蛍光 RNA 分子がどのように挙動するのかを観察する。

## 3. 研究の方法

本研究では、上記二つの作業目標のうち、結果的に(1)の段階での研究に注力することになったので、その部分に関する研究方法を以下に整理する。

### (1) 実験全体の構成

蛍光アプタマー配列については、発明者であるコーネル大学の Jeffrey 博士から、改良型アプタマー配列である “Spinach2” (Strack et al. 2013 Nature Methods 10:12119) をコードするプラスミド DNA (pet28\_sp2) を分与して頂いた。

このプラスミドを基に、spinach2 配列を植物に導入するための各種のコンストラクトを作製し、シロイヌナズナに形質転換した。植物体/植物細胞中で spinach2 蛍光を解析するためには、まとまった量の形質転換体種子が必要である。このため、得られた形質転換植物を自家受粉によって継代し、形質転換 T3 世代の種子が充分量得られたものから、順次、蛍光検出実験に供した。

それらの詳細は下記のとおりである。

### (2) おもなコンストラクト

pet28\_sp2

Jeffrey 博士から分与して頂いた Spinach2 のプラスミドコンストラクトで、転写された Spinach2RNA を安定化させるために、その両端に tRNA 配列が連結されている。このコンストラクトは、大腸菌や *in vitro* 系では、T7 プロモーターによって転写される。

35S::Sp2

高等植物や緑藻のハネモで高い転写活性を示すカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターの下流に Spinach2 配列 (正確に

は pet28\_sp2 の転写領域)を連結し、その 3' 末端に NOS ターミナーターを挿入した。

U6::Sp2

35S::Sp2 のプロモーターをシロイヌナズナの U6 プロモーターに置き換えたもの。

EXPA7::Sp2 と EXPA7pro::Sp2

シロイヌナズナの根毛やトライコームで組織特異的に発現する EXPANCIN A7 遺伝子、及びそのプロモーターのそれぞれ下流に、Sp2 配列 (正確には pet28\_sp2 の転写領域) を挿入したもの。

35S::luc::Sp2

35S プロモーターでドライブしたルシフェラーゼレポーター遺伝子の 3' UTR に Sp2 配列 (正確には pet28\_sp2 の転写領域) を挿入したもの。

### (3) 形質転換体の作製

コンストラクト は大腸菌に形質転換した。コンストラクト②~⑤は、それぞれアグロバクテリウム法でシロイヌナズナに形質転換した。

### (4) 蛍光測定

GFP の蛍光発色団の類縁化合物である DFHBI (35-difluoro-4-hydroxybenzylidene imidazolinone) (MW=252.22) は、Spinach の 1 本鎖 RNA が形成する quadruplex 構造 (=四重鎖構造) に特異的に結合し、その状態で青色光によって励起されると、緑色蛍光を発する (Huang et al. 2014 Nature Chemical Biol 10:686)。そこで、実験に供する大腸菌や植物片、植物のプロトプラストなどは、DFHBI 水溶液にインキュベートした状態で、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS CKX41) によって Spinach-DFHBI に由来する緑色蛍光を観察した。蛍光のスペクトルや相対強度の測定には、京都府立大学の石田昭人教授のご厚意によって、蛍光スペクトル解析装置を装着した倒立蛍光顕微鏡 (OLYMPUS LX70) を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) *In vitro* 系及び形質転換大腸菌体内での Spinach RNA 蛍光の検出

*In vitro* で転写した Spinach2 RNA の水溶液、及び形質転換した大腸菌を用いた実験では、それぞれ、標準的な生物蛍光顕微鏡 (OLYMPUS CKX41) によって、青色光 (488nm) 照射によって励起される Spinach2-DFHBI の緑色蛍光を検出できた。従って、筆者らの研究室でも、少なくともこの段階までは、Jeffrey 博士らのオリジナルな実験結果を基本的に再現できたと考えられる。

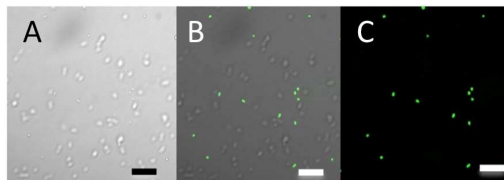


図1. 形質転換大腸菌でのSpinach2-DFHBI 蛍光

(A) 明視野像、(B) 明視野像+蛍光像、(C) 蛍光像。形質転換大腸菌を0.2mM DFHBI溶液に45分浸してから蛍光顕微鏡で観察。Spinach-DFHBIによる緑色蛍光が観察される。縮尺=10 μm

### (2) 形質転換植物体中での Spinach RNA 蛍光の検出

形質転換植物での実験については、最初に実験に必要な量の T3 世代種子が得られたのが 35S::Sp2 形質転換系統であったため、基本的に、このコンストラクト系統で解析を進めた。

しかし、ここで予想外の困難に直面した。植物体に青色光を照射する実験で、形質転換植物と野生型植物、および、DFHBI の存在の有無で、それぞれの処理区の蛍光顕微鏡像を比較したところ、そのいずれの処理区でも、葉緑体と細胞壁に由来する強い自家蛍光が認められ、それらが Spinach2-DFHBI に由来する緑色蛍光の検出を大きく妨害することがわかった。そこで、以降の蛍光検出実験では、葉緑体や細胞壁の無い植物・藻類細胞を用いることが求められた。そこで筆者らが着目したのは、葉緑体を持たない根の組織から細胞壁を消化したプロトプラストを調製することである。

### (3) 形質転換植物の根から調製したプロトプラスト中での Spinach RNA 蛍光の検出

T3 世代の 35S::Sp2 形質転換系統の種子を寒天培地に播種し、生育した植物の根をセルラーゼとマセロザイムによって処理し、プロトプラストを調製した。ついで、そのプロトプラストを、0.2mM の DFHBI を加えた培養液にインキュベートし、青色光照射によって得られる蛍光の強度とスペクトルを測定した。

その結果、図 2 に示したように、35S::Sp2 キメラ遺伝子を導入した植物では、蛍光基質である DFHBI を加えたときにかぎり (図 2, A 列) 対照処理区の野生型植物 (図 2, B 列) に比べて、強い緑色蛍光が観察された。図 2 の下段の写真では、ヒートマップ処理によって、緑色蛍光の強さが、青からオレンジ、黄色と段階的に模擬色で表されている。

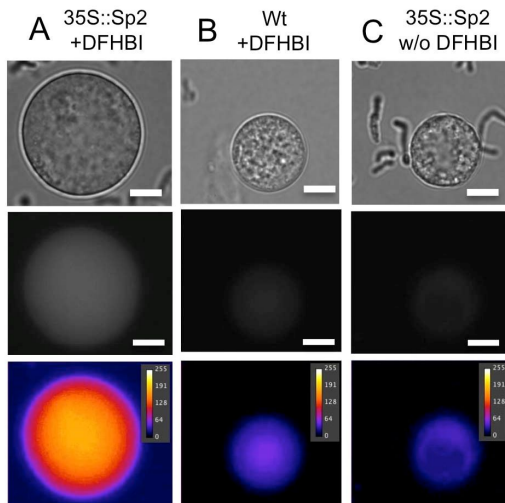


図2. シロイヌナズナの根由来のプロトプラスト中でのSpinach2-DFHBI 蛍光の検出

(A列) 形質転換細胞, 蛍光基質あり, (B列) 野生型細胞, 蛍光基質あり, (C列) 形質転換細胞, 蛍光基質なし.  
(上段) 明視野像、(中段) 蛍光像、(下段) 蛍光像のヒートマップ. 縮尺=10  $\mu$ m

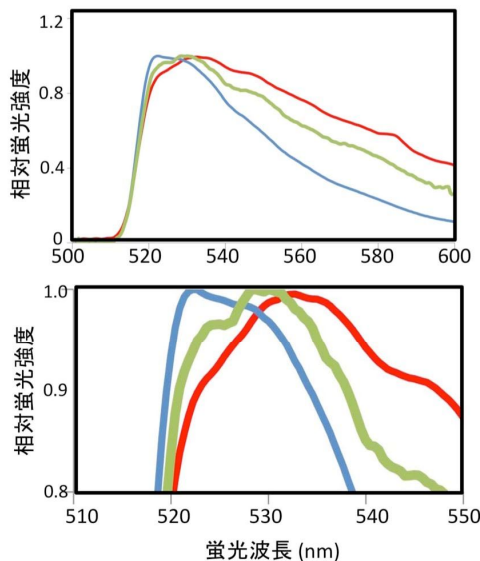


図3. 蛍光スペクトルの比較

(青) *in vitro*でのSpinach2-DFHBI、(緑)35S::Sp2形質転換植物のプロトプラスト、(赤)35S::Sp2形質転換植物の根。

また、この形質転換プロトプラストの蛍光スペクトルを測定したところ(図3、緑線) Spinach2-DFHBI が水溶液中で示す蛍光スペクトル(図3、青線)と、35S::Sp2 形質転換植物体の根が示す蛍光スペクトル(図3、赤線)の中間的な形状を呈した(図3上図の一部を拡大して図3下図に示した)。従って、プロトプラスト化することにより、植物体のもつ細胞壁成分などの自家蛍光をかなり軽減できたことが確認された。

しかし、図2の実験で得られた各プロトプ

ラスト処理区の蛍光強度を細胞の単位体積あたりで比較すると、図4に示したように、35S::Sp2植物のプロトプラストの蛍光強度は、野生型植物のプロトプラストが示すバックグラウンドの、わずか160%ほどにしかならなかった。

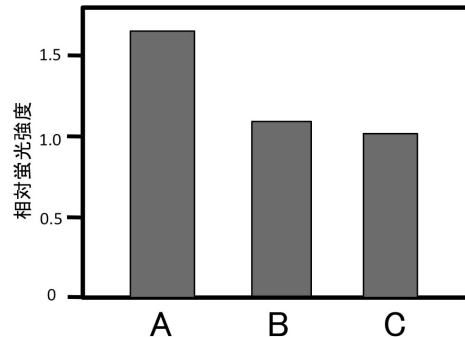


図4. 図2のA,B,C処理区での細胞体積あたりの相対蛍光輝度。(Cを1.0として図示)

#### (4) 問題点と残された課題

以上の解析によって、植物細胞中のRNA分子も、Spinach2-DFHBIによって蛍光標識出来ることが実験的に示された。筆者の知る限り、これはSpinach2-DFHBIの植物系に対する最初の適用例になるのかもしれない。しかし、得られた蛍光強度は当初予想していたレベルよりも遙かに弱く、その検出は、植物体のもつ様々な自家蛍光によって、簡単に妨害・攪乱されてしまった。

本研究で作製した形質転換植物系統は、主なキメラ遺伝子だけについても4種類あり、その誘導体を含めると、さらに多くのキメラ遺伝子系統が作成中である。しかし、それらの中で、実験に必要な量のT3種子が得られている植物系統はまだごく限られている。従って、35S::Sp2以外のキメラ遺伝子の系統の中には、より強い蛍光標識レベルを示すものがまだあるかもしれない。

しかし、本研究の本来の目的は、自然界で非常に低い頻度で進行しているであろう、遺伝子の生物種間の水平転移・水平漏出を可視化して、検出・観察する実験手法を開発することである。つまり、Spinachアプタマー遺伝子の発現量を上げることによって細胞あたりの蛍光強度を上げることに成功しても、この研究本来の目的には、あまり大きな助けにはならない。

今回の一連の解析を通じて分かった最大の知見は、少なくとも現在の植物の系では、Spinach2-DFHBI系によって得られる蛍光強度はかなり弱い、ということであり、この蛍光標識システムを、遺伝子水平転移のよう

な僅少な分子が関わる現象の探索に応用するには、Spiach アプタマー1分子あたりの蛍光強度/蛍光出力を何とかして高めることが必要である。

#### (5) 新たな改良策と実用化への展望

研究の最終年度の後半になり、本研究の問題点がほぼ明確になったので、実験と平行して、多くの労力を、Spinach2-DFHBIの蛍光出力を上げるためのアイデアの探索に費やした。その関係もあり、当初予定になかったキメラ遺伝子の様々な誘導体の作製などを企図したが、当初研究期間が終了した直後の2015年5月後半になって、驚くべき論文がChem Comm 誌に発表された。

Spinach 配列が形成する1本鎖RNAのquadruplex構造は数nMの鉛イオンによって選択的に安定化され、その結果、Spinach-DFHBIの蛍光強度が1万倍にも増強され、結果として、Spinach-DFHBIの発する蛍光を裸眼でも視認できるようになる、というものである(DasGupta et al., Chem Comm 51:9034)。

このDasGuptaらの発見の最も重要な点は、Spiachアプタマー1分子あたりの蛍光強度/蛍光出力がそれぞれ1万倍に増強される、ということである。これは、上述したように、筆者がこの半年間、まさに探し求めていた解答に他ならない。この方法を応用すれば、半ばあきらめかけていた、この研究本来の技術開発が、再び可能なるかもしれない。

#### (6) 結語

本研究は、新規開発されたばかりのRNA分子蛍光標識技術にいち早く着目し、まずその技術手法を植物細胞の系に移植し、次いで、それを使って「遺伝子の水平転移を可視化する実験手法を開発する」という極めて野心的な課題にチャレンジした。残念ながら、所与の2年間では実用的な技術開発までは至らなかったが、その過程で、本研究の障害となる具体的な技術課題が明らかになった。

しかし、渡りに船で、まさにその課題を克服するヒントが、2015年5月になって、「RNAを利用した化学センサー」の研究からもたらされた。

筆者らは現在、植物や藻類に与える培地中の鉛イオンの濃度を適切に調整すれば、本研究の当初目的である「遺伝子水平転移を蛍光標識RNAによって探索・検出する実験手法」の開発が可能になるのではないかと考えており、新しいチャレンジを進めている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

本報告書の執筆時点ではまだ研究が継続しており、それらが完了次第、原著論文を作成・投稿する予定である。

〔学会発表〕(計 2 件)

松尾充啓、片山裕樹、安井孝彰、中塚直樹、多和田香織、佐藤壮一郎、石井寿季、平野弥生、本村泰三、小保方潤一：海藻から光合成ウミウシへの遺伝情報の転移について。第2回マトリョーシカ型生物学研究会 2013年7月24-26日 京都

石井寿季、安井孝彰、佐藤壮一郎、松尾充啓、平野弥生、本村泰三、小保方潤一：海藻オルガネラの蛍光標識系の開発と光合成ウミウシの盗葉緑体研究への応用。第2回マトリョーシカ型生物学研究会 2013年7月24-26日 京都

〔その他〕

ホームページ等：

[http://www2.kpu.ac.jp/life\\_environ/plant\\_genome\\_bio/Site/Top.html](http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/plant_genome_bio/Site/Top.html)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小保方 潤一 (OBOKATA JUNICHI)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：50185667

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし