

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440005

研究課題名(和文) 小分子蛍光プローブ利用した内在性mRNA細胞内動態の網羅的イメージング解析

研究課題名(英文) Live-cell imaging of endogenous mRNAs with a small molecule

研究代表者

佐藤 慎一 (SATO, SHINICHI)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：70534478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、研究代表者自らが開発したRNA検出法をすべての内在性RNAの細胞内動態観察に適用できる方法へと改変し、その方法を利用してこれまでに局在や動態の知られていないmRNA標的を生細胞内で観察することになった。このRNAイメージング法の有効性は、 α -アクチンの生細胞内動態の観察により評価した。本研究では、このRNAイメージング法を84種の細胞骨格タンパク質のmRNAに適用して、そのmRNAの局在と動態を網羅的に解析した。この実験で、これまでに動態が知られていないARFIP2, CTTN, CYFIP2のmRNAの生細胞内動態観察に成功した。これらの成果は、インパクトある国際的な科学論文へ発表した。

研究成果の概要(英文)：Determination of subcellular localization and dynamics of mRNA is increasingly important to understanding gene expression. We developed a new convenient and versatile method that permits spatiotemporal imaging of specific non-engineered RNAs in living cells. The method uses transfection of a plasmid encoding a gene-specific RNA aptamer, combined with a cell-permeable synthetic small molecule whose fluorescence is restored only when the RNA aptamer hybridizes with its cognitive mRNA. The method was validated by live-cell imaging of the endogenous mRNA of α -actin. Application of the technology to mRNAs of a total of 84 human cytoskeletal genes allowed us to observe cellular dynamics of several endogenous mRNAs including ARFIP2, CTTN, and CYFIP2. The RNA-imaging technology and its further optimization might permit live-cell imaging of any RNA molecules.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：RNA生細胞内イメージング 蛍光プローブ ケミカルバイオロジー RNAアプタマー

1. 研究開始当初の背景

近年、RNA があらゆる生命現象に関与していることが明らかとなってきた。したがって RNA を研究することは、生命現象の全貌を明らかにする上で極めて重要な課題として位置付けられている。RNA は細胞内でその機能を発揮するために、複雑な時間的・空間的制御を受ける。例えば、タンパク質合成の鋳型となる mRNA は、細胞内局在を高度に制御されている。また、ジャンクと呼ばれてきたノンコーディング RNA は、複雑なプロセッシングを受けた後に機能を発現する。だが、細胞内における RNA の動的・空間的な制御機構の大部分は未だ謎に包まれている。その一因は、内在性の RNA の動態を観察・解析するためのツールがないことなど技術面の難しさにある。不安定な RNA の機能発現に合わせた「速いタイムスケールにおける空間的観察」を可能とするツールの開発が課題だ。申請者は、これまでに小分子蛍光化合物プローブとそれを認識する RNA アプタマーを応用した RNA イメージングツールの開発を行ってきた。申請者が開発した RNA 検出技術を改良・発展させれば、内在性 RNA を生細胞内イメージングできると考えた。そこで、

簡便に利用できる内在性 RNA の細胞内動態をイメージングするための基盤技術を構築し、

そのイメージング法により、顕著な細胞内挙動・局在を示す mRNA 種を網羅的に探索する、

ことの2点を目的とする本研究提案を着想するに至った。

2. 研究の目的

mRNA は細胞内で顕著な局在を示し、タンパク質翻訳の「場所」や「時間」の制御に関与していることが明らかとなってきた。しかし、細胞内で mRNA を含めた時間的・

空間的なタンパク質翻訳制御機構の大部分は未だ謎に包まれており、生細胞内 mRNA の動態観察が大きな興味の対象となっている。本研究では、申請者が開発した RNA 検出法を改良し、すべての研究者が簡単に利用可能できる新たな RNA 動態観察ツールの創出を目指した。本研究提案では、具体的な3つの研究目的を挙げた。

小分子蛍光プローブを用いた内在性 mRNA 動態イメージング法の確立
RNA アプタマーライブラリーの作製と利用
新たな蛍光クエンチャーを認識する RNA アプタマーの創製

3. 研究の方法

目的を早期に達成するため、段階的に研究を進めた。

第1段階: In vitro の実験系で機能する任意の RNA を蛍光プローブで標識する方法を確立する。次に確立された方法を生細胞内の mRNA 検出に適用し、その有効性を評価する。

第2段階: 本 RNA イメージング法を利用して mRNA の生細胞内局在を網羅的にスクリーニングする。新たに発見した細胞内動態が明らかとなっていない内在性 mRNA についてその細胞内動態の詳細を観察する。

第3段階: 方法論の適用範囲を広げる。具体的には、新たな蛍光クエンチャーを認識する RNA アプタマーを創出し、2種以上の mRNA 動態の同時観察を行えるようにする。

4. 研究成果

第1段階: RNA イメージング法の有効性の検証

: 任意 RNA 配列の蛍光標識:

申請者が考案した RNA 検出技術を改良することで、任意の RNA を蛍光標識する方法を確立した。本研究提案で利用する RNA アプタマーは、BHQ1 認識ループとそのループ

構造を安定化するステム構造からなる(図3 a, b). この RNA アプタマーはステム構造を短くすると, BHQ1 認識ループが不安定化し, BHQ1 の認識能が失われる. この性質を利用して, ステム構造を RNA 認識アームに置きかえれば(図1c), 標的 RNA 存在下でのみ BHQ1 認識ループが安定化し, BHQ1 を捕えることができると考えた. この設計を基に行った実験で, 標的 RNA 存在下でのみ強い蛍光シグナルが観察できることを確認できた. この結果は, 任意の RNA 配列を蛍光標識する方法論が確立できたことを意味した.

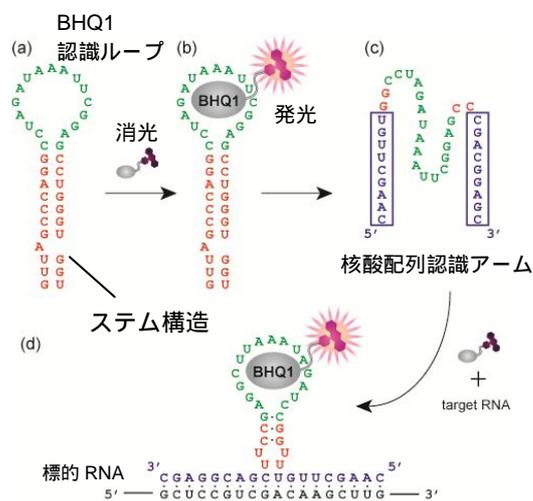


図1. BHQ1 アプタマーへの核酸認識能の付加 (a) BHQ1 認識ループ(緑)とステム構造(赤)(b) BHQ1 アプタマーと蛍光プローブの結合 (c)ステム構造(赤)を核酸配列認識アーム(青)への置換 (d) 標的 RNA への検出モデル

第2段階: RNA アプタマーライブラリーの作製と利用

本方法の利点は, mRNA をとらえる RNA アプタマーの設計・作製が簡便であることにある. 本研究ではこの利点生かし, RNA アプタマーのライブラリーを作製し, mRNA の生細胞内局在を網羅的にスクリーニング観察した. 具体的には, 市販されている細胞骨格形成関連タンパク質の DNA アレイ(QIAGEN 社)を基に選出した 84 種類の mRNA をターゲットとして RNA アプタマーライブラリーを作製し, 生細胞内局在をスクリーニングの

に観察した.

第3段階: 新たな蛍光クエンチャーを認識する RNA アプタマーの創製

生細胞内で複数種類の mRNA 動態を同時検出するため, BHQ1 とは異なる蛍光クエンチャーを認識する RNA アプタマーの取得を行った. 本研究コンセプトではステム-ループ構造を持つ RNA アプタマーが必要であるため, 予めステム構造とランダムループからなる RNA ライブラリーから RNA アプタマーを選出した. 結果, 蛍光クエンチャー-DNB に結合する RNA アプタマーの取得に成功した. BHQ1 プローブと同様の設計で蛍光プローブを設計・作製し, 標的 RNA の蛍光標識能を評価したところ, 標的 RNA 存在下でのみ DNB プローブの蛍光を回復することを確認した. この結果は, 複数の RNA 種を同時観察するための 2 種類の RNA 標的アプタマーと蛍光プローブのペアを得られたことを意味した.

今後, 得られた RNA アプタマーと蛍光プローブを利用して, 細胞内の内在性 mRNA の動態を網羅的に解析する予定である.

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)

Asano L., Watanabe M., Ryoden Y., Usuda Y., Yamaguchi T., Khambu B., Takashima M., Sato S., Sakai J., Nagasawa K., and Uesugi M., Vitamin D Metabolite, 25-Hydroxyvitamin D, Regulates Lipid Metabolism by Inducing Degradation of SREBP/SCAP., *Cell Chem. Biol.*, **24(2)**, 207-217, 2017 (査読有)

Mao D., Ando S., Sato S., Qin Y., Hirata N., Katsuda Y., Kawase E., Kuo T. F., Ueda K., Nakatsuji N., and Uesugi M., A Synthetic Hybrid Molecule for the Selective

Removal of Human Pluripotent Stem Cells From Cell Mixtures., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56 (7)**, 1765-1770, 2017 (査読有)

Katsuda Y., Sato S.*, Asano L., Morimura Y., Furuta T., Hagihara M.*, Uesugi M.*, A Small Molecule That Represses Translation of G-Quadruplex-Containing mRNA., *J. Am. Chem. Soc.*, **138(29)**, 9037-9040, 2016 (査読有)

Parvatkar P., Kato N., Uesugi M., Sato S., Ohkanda J., Intracellular generation of a diterpene-peptide conjugate that inhibits 14-3-3-mediated interactions., *J. Am. Chem. Soc.*, **137(50)**, 15624-15627, 2015 (査読有)

Sato S.*, Watanabe M., Katsuda Y., Murata A., Wang D. O., Uesugi M.*, Live-Cell Imaging of Endogenous mRNAs with a Small Molecule., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54(6)**, 1855-1858, 2015 (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

Yatsuzuka K., Sato S., Katsuda Y., Pe K. B., Uesugi M., Live-Cell Imaging of Bioorganic Molecules with a Small Molecule and a Short RNA, 日本化学会 第97春季年会, 横浜, 慶応大学, 2017年

Katsuda Y., Sato S., Yatsuzuka K., Uesugi M., Exploration the RNA G-quadruplex using a small molecule, 日本化学会 第97春季年会, 横浜, 慶応大学, 2017年

八塚 研治, 佐藤 慎一, 勝田 陽介, 上杉 志成, 蛍光プローブを用いた内在性 mRNA イメージング法の改良, 第10回バイオ関連シンポジウム, 金沢, 2016年

勝田 陽介, 佐藤 慎一, 萩原 正規, 八塚 研治, 上杉 志成, RNA G-quadruplex 選択的化合物を用いた網羅的な RNA G-quadruplex の探索, 第10回バイオ関連シンポジウム, 金沢, 2016年

八塚 研治, 佐藤 慎一, 勝田 陽介, 上杉

志成, 内在性 mRNA 可視化プローブの機能改善に向けた検討, 日本化学会 第96春季年会, 京都, 同志社大学, 2016年

Katsuda Y., Sato S., Hagihara M., Uesugi M., RNA G-quadruplex-targeting translational inhibition using a small molecule, 日本化学会 第96春季年会, 京都, 同志社大学, 2016年

勝田 陽介, 佐藤 慎一, 古田 智行, 萩原 正規, 上杉 志成, 小分子化合物を用いた新規 RNA G-quadruplex の発見, ケミカルバイオロジー学会 第11回年会, 京都, 2016年

〔図書〕(計1件)

佐藤 慎一, 勝田陽介, 上杉志成, ピオチン化体を利用した生化学的標的タンパク質精製法, 化学同人, Chapter 7, 42-47, 2015

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: リボソーム侵入サイト(IRES)を用いた人工リボスイッチ

発明者: 佐藤慎一・上杉志成・勝田陽介

権利者: 京都大学

番号: 特願 2016-102872

出願年月日: 2016年5月23日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 慎一 (SHINICHI, Sato)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号: 70534478