

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2015

課題番号：26708020

研究課題名(和文) 進化分子工学を用いた細胞内蛍光増幅反応系の構築

研究課題名(英文) in cell Templated Reaction by employing in vitro selected RNA aptamers

研究代表者

鶴澤 尊規 (UZAWA, Takanori)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・専任研究員

研究者番号：60554376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,900,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞内にあるmRNAのある時点での位置と量を測定する手法の確立を目指し、光励起により酸化還元反応を誘起できるルテニウム(II)トリスビピリジン錯体と、光励起されたルテニウム錯体に還元されることで蛍光を発するアジドローダミンの2つの色素に結合するRNAアプタマーの選出および利用を試みた。ルテニウム錯体に関しては、得られているRNAアプタマーと結合すると励起状態の寿命が4倍伸びるうえに酸素によって消光されないことが分かった。一方でアジドローダミンに結合するRNAアプタマーの選出については、30種類のアプタマー候補を調べてものの、残念ながら再現性良く結合を確認できるRNAの選出には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：I aim to construct a method to determine position and concentration of a specific mRNA in a live cell. We tried to select and utilize the aptamers for two compounds: ruthenium trisbipyridine whose photo-excited state possesses strong redox ability and aziderhodamine which emits fluorescence after reduction to amino rhodamine by the photo-excited ruthenium trisbipyridine. We have found that the aptamer which binds ruthenium trisbipyridine elongated the lifetime of the photo-excited ruthenium trisbipyridine 4 fold by reducing oxygen quenching. Although we have tried 30 candidate RNA obtained by the selection for aziderhodamine, none of them exhibit a reproducible positive result.

研究分野：進化分子工学

キーワード：アプタマー ルテニウム錯体

1. 研究開始当初の背景

細胞システムの根幹である遺伝子発現の制御を理解するためには、生きた個々の細胞内に置いて数コピーしか存在しない mRNA のある時点での位置と量を正確に測定する必要がある。

実用的で感度が高い蛍光を利用して、細胞内に数コピーしか存在しない mRNA を観測するためには、特定の RNA 配列が存在する場合に蛍光が増幅されるシステムが必要である。そこで本研究課題では、近年報告した蛍光増幅反応に基づいて、一般の生きた個々の細胞内での mRNA のある時点での位置と量を測定する系の確立を目指した。

本申請者が J. Am. Chem. Soc 誌に報告した蛍光増幅反応 (Shibata, Uzawa, Nakashima, Ito, Nakano, Shuto, Ito, and Abe, "Very rapid DNA templated reaction for efficient signal amplification and its steady-state kinetic analysis of the turnover cycle", *J. Am. Chem. Soc.*, (2013) 135, 14172–14178) では、1 つの標的核酸に対して、隣り合った位置で結合する 2 つの短い修飾 DNA を用いる。一つには 2-シアノ-4-ニトロベンゼンスルホニル基で無蛍光化されたクマリンが修飾されており、もう一つには求核基が修飾されている。2 つの修飾 DNA が同時に標的核酸に結合すると、求核攻撃が起こり、クマリンが蛍光を発するようになる。2 つの修飾 DNA は共に 7 塩基と短いために、標的核酸に対して結合・解離を繰り返している。これにより蛍光を発するようになったクマリン修飾 DNA は標的核酸から離れ、標的核酸に別の修飾 DNA が結合できるようになる。不可逆の求核反応を含むので、一連の反応を繰り返すことで、1 分子の標的核酸から蛍光分子が多数生産される。この系では、生細胞内での 1 分子の DNA に相当する 0.5pM の遺伝子を試験管内で検出することに成功している。

上述の系には「修飾核酸が細胞膜を透過できない」と「蛍光増幅のトリガーである求核反応の開始トリガー制御できない」という 2 つの問題がある。細胞膜透過に関しては、一般の生細胞では難しいが生命力の強い大腸菌に限っては、薄い界面活性剤で細胞膜の安定性を下げることで 2 つの修飾核酸を大腸菌内に導入し、リボソーム RNA を標的として蛍光が増幅されることが確認できている。このことから、細胞内への 2 つの修飾核酸の導入と蛍光増幅のトリガーシステムの構築ができさえすれば、界面活性剤が使えない一般の生細胞内においても mRNA を検出・観測できると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、「進化分子工学的手法により小分子の結合する RNA アプタマー」を選出し詳細を調べるとともに、これらを使用

することで、光をトリガーとした蛍光増幅反応を細胞内で行い、ある時間での特定の mRNA の位置と量を正確に測定できる系の構築を目指した。

3. 研究の方法

細胞内に数コピーしか存在しない mRNA を観測する手法として、特定の RNA 配列が存在する場合に蛍光が増幅されるシステムの構築を目指した。修飾 DNA は細胞膜を透過できないが、DNA に修飾されているクマリンなどの小分子であれば細胞膜を透過できること、およびアジド基修飾により消光したローダミンが光励起されたルテニウム錯体 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) によって還元されることで、アジド基がアミノ基となりローダミンが蛍光を発するという反応に注目した (Winssinger(2012) *Organic letters*, 14, p482) もし、細胞膜を透過できるローダミンや $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ に結合する RNA アプタマー配列 (細胞質の mRNA を観測したいので核内にある DNA は利用できない) と、標的核酸の相補鎖 RNA を併せ持つ 2 つの RNA を細胞内で発現させることができれば、細胞膜透過の問題を解決できると考えた。さらに、この系では $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の光励起をトリガーとして蛍光増幅反応を開始できるため、「蛍光増幅のトリガーである求核反応を制御できない」という問題も解決できる。

このような系を実現するためには、「アジドローダミンに結合する RNA アプタマー配列」と「 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ に結合する RNA アプタマー配列」が必要となる。本研究課題ではこのような小分子に結合する RNA アプタマー配列を進化分子工学的手法を用いて明らかとすることを目指した。進化分子工学的手法とは、非常に多様な配列集団の中から、ターゲット分子に特異的に結合する核酸もしくはポリペプチドを選出する方法である。

本研究課題開始時において既に進化分子工学的手法を用いて、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ に結合する RNA アプタマー配列を得ていた (論文投稿中)。この RNA アプタマーは、2 つの鏡像体のうち $\Lambda\text{-Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ のみに非常に強く ($K_d=70\text{nM}$) 結合し、さらに配位子の修飾や修飾位置も認識できるほど分子認識能が高い。加えて、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の可視光による励起電子が消光分子へ移動する二分子間の電子移動速度は RNA アプタマーに結合していても変化しないことも分かっている。このことは、RNA アプタマーに結合している状態においても $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の酸化力・還元力は低下していないことを示している。この $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ に結合する RNA アプタマーの末端に、標的配列の相補鎖を 7 塩基分ほど加えることで細胞内蛍光増幅反応系のプローブの 1 つとして利用することとした。

本研究課題では、既に得られている $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 結合 RNA アプタマー存在下での

Ru(bpy)₃²⁺の物性を調べることと並行して、残り一つのプローブを確立するために必要な「アジドローダミンに結合する RNA 配列を明らかにすること」および「Ru(bpy)₃²⁺に結合する RNA と共に細胞内で発現させ、生きた個々の細胞内での RNA の位置と量を正確に測定できる系の確立」を目指した。

4. 研究成果

まず、「アジドローダミンに結合する RNA の選出」に関しては、進化分子工学を用いて 10¹³ 種類ほどの RNA 配列集団の中からアジドローダミンに結合する RNA の選出を行った。具体的には、(1)50 塩基のランダム配列を含む DNA を用意し、これを鋳型として試験管内転写によって RNA を得た。(2)RNA を各配列に特有の構造に折り畳ませた。次に、(3) アミノローダミンを固定化したカラムに通し、結合しなかった RNA を回収した。引き続き、(4)アジドローダミンを固定化したカラムに通し、結合した RNA を熱をかけて変性させて回収した。(5)逆転写と PCR を用いた増幅によって、二本鎖 DNA を得た。このような一連の操作を 13 回繰り返し、得られた二本鎖 DNA の配列を調べた結果、いくつかの配列については重複が見られた。重複が見られなかった配列も含めて計 30 種の RNA 配列について、Bio-Layer Interferometry 法を使ってアジドローダミンへの結合を調べた結果、再現良く結合が確認される配列は得られなかった。

次に「ルテニウム(II)トリスピリジン錯体の細胞内への取り込みの観察」に関しては、まず大腸菌内で恒常的に発現するプロモーター支配下に Ru(bpy)₃²⁺に結合する RNA アプタマーもしくは Ru(bpy)₃²⁺には結合しない RNA の配列を置いた 2 種類のプラスミドを作成した。これらのプラスミドそれぞれを大腸菌にトランスフォームした後、培養液に Ru(bpy)₃²⁺を加えたものの細胞内の蛍光分布に優位な差は得られなかった。

そこで、RNA アプタマーと Ru(bpy)₃²⁺の結合状態について詳細に調べることとした。具体的には、好気下と嫌気下の条件下での、Ru(bpy)₃²⁺の光励起状態の寿命を測定した。その結果、好気下においては Ru(bpy)₃²⁺に RNA アプタマーが結合することでルテニウム錯体の励起状態の寿命が 4 倍の伸びること、その一方でアプタマー結合時の励起状態の寿命は酸素濃度に依存しないことが明らかとなった。これは、ルテニウム錯体の励起状態から酸素へのエネルギー移動がアプタマーの結合によって抑制されることを示している。一方で、メチルピオロゲンを使った二分子間の消光速度を調べた結果からは、ルテニウム錯体からの電子移動はアプタマーの存在によって抑制されないことが分かった。このことから、アプタマーはルテニウム錯体の励起状態のエネルギーをエネルギー移動ではなく電子移動に使うように仕分けしている

と考えられた。

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 5 件)

1. Uzawa ‘Improvement of a photosensitizer performance by employing an RNA aptamer’ 2016/1/14 CEMS supra 東京大学
2. Thoa, Minagawa, Aigaki, Ito and Uzawa ‘Fabrication of photosensitizing and electron-storage RNA-modules’ 2016/1/22 高分子学会 埼玉地区懇話会、さいたま市
3. Thoa, Minagawa, Ponnurengam, Aigaki, Ito and Uzawa ‘Fabrication of photosensitizing and electron-storage RNA-modules’ 2014/9/25 生物物理学会 札幌コンベンションセンター
4. Thoa, Aigaki, Ito and Uzawa “Selection of an RNA aptamer binding to a photosensitizer-Ru(bpy)₃²⁺” Vietnamese and Japanese Student’s Scientific exchange meeting 2014/9/13 神戸大学
5. KC, Abe, Ito and Uzawa “selection of RNA aptamers to develop a sensor using rhodamine as a fluorogenic probe” 2014/9/25 生物物理学会 札幌コンベンションセンター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.riken.jp/nano-med.eng.lab/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴澤 尊規 (UZAWA, Takanori)
国立研究開発法人理化学研究所・
伊藤ナノ医工学研究室・専任研究員
研究者番号：60554376

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：