

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19041

研究課題名(和文)細胞内の標的蛋白質を可視化するturn-on型蛍光RNAアプタマーの開発

研究課題名(英文)Development of turn-on fluorescent RNA aptamer to visualize target proteins in vivo

研究代表者

池袋 一典(Kazunori, Ikebukuro)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・卓越教授

研究者番号：70251494

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、細胞内の標的蛋白質の局在と動態を解析する為、標的蛋白質に結合すると蛍光を発する、turn-on型蛍光RNAアプタマーの開発を目的として研究を行った。

昨年度は、我々が開発した三本鎖融合蛍光アプタマーである、Bright Baby Spinach(BBS)が細胞内で安定に蛍光を発する事を確認し、細胞内での局在を蛍光顕微鏡で観察できることを確認した。今年度は、BBSがpH変化により、三本鎖部分の構造が大きく変化し、蛍光強度が大きく変わることを確認した。つまり、標的分子と結合して構造が変化するアプタマーを連結すべきBBSの部位を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の標的蛋白質の局在と動態を解析する手法としては、標的蛋白質とGreen Fluorescence Protein(GFP)を融合して、GFPの蛍光を顕微鏡で観察する手法が主流だが、ここで観察できるのは外部から導入したGFP融合標的蛋白質であり、これが細胞内で発現している時点で、細胞内の環境は通常と異なっている。通常状態での標的蛋白質の局在と動態を観察するためには、細胞内で標的蛋白質に蛍光等の信号を結合させる必要がある。その為に目的とする細胞の中で発現し、標的細胞に結合した時に初めて蛍光を発するRNAアプタマーを開発する事を目指し、その開発に必要な情報をすべて得ることができた。

研究成果の概要(英文):We aimed at developing turn-on type fluorescent RNA aptamer for in situ visualization of target molecules in cell. First year, we used our turn-on type fluorescent RNA aptamers consisting 'Spinach' which is a well known fluorescent RNA aptamer and triplex RNA strands to stabilize G-quadruplex structure of the Spinach, for visualization of those localization in cell. Since we succeeded in improving its fluorescent intensity more than ten times, the visualization was achieved, We named our new fluorescent RNA aptamer as Bright Baby Spinach(BBS). Last year, we investigated BBS's pH dependence and found its structure changes depending on pH change, which means we can construct turn-on type fluorescent aptamer by fusing target-recognizing aptamer and BBS. We also tried intensive mutational analysis and found proper site to fuse BBS with target-recognizing aptamer.

研究分野：生物工学

キーワード：標的分子の蛍光検出 蛍光アプタマー 構造変化 細胞内動態 in situ 観察

1. 研究開始当初の背景

細胞内の標的蛋白質の局在や動態を解析することは、様々な生命活動のメカニズムを解明するのに必須であり、これを可能にする GFP を発見した下村脩先生にノーベル賞が授与されたことから、その重要性は明白である。通常標的蛋白質に GFP を融合させた蛋白質を構築し、その遺伝情報をコードした DNA を細胞に導入し、細胞内で発現した GFP 融合標的蛋白質を観察するが、これは細胞内で通常働いている標的蛋白質ではなく、外部から導入し、過剰発現させた標的蛋白質になるので、標的蛋白質の本来の細胞内局在や動態を反映しているかは定かでない。

蛍光アプタマーである Spinach が報告されているが、細胞内の標的蛋白質を可視化するには、蛍光強度が不十分であり、標的蛋白質に結合するアプタマーと Spinach を連結した報告はない。相補鎖 RNA や cyclic di-AMP 等の低分子に結合する RNA と連結した Spinach は報告されており、その連結により Spinach の構造が壊れ、標的 RNA や低分子と結合することで元の Spinach の構造が形成されて蛍光を示すことが報告されている。

そこで申請者らは、より蛍光強度の強い RNA アプタマーを開発するために、Spinach の蛍光団を保持している G4 構造に着目し、これを安定化すると蛍光強度が向上すると予測した。まず G4 構造を形成する塩基に網羅的に変異を導入してみたが、ほとんどの変異は蛍光の減少を示し、塩基配列自体はほぼ最適化されていることが確認できた。そこで、この G4 構造に標的蛋白質結合アプタマーを連結すれば、Spinach の構造は変化して低い蛍光しか示さないが、標的蛋白質の結合により G4 構造が安定化し、より強い蛍光を示す turn-on 型蛍光アプタマーを創出できると発想した。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内の標的蛋白質の局在と動態を解析するため、標的蛋白質に結合すると蛍光を発する、turn-on 型蛍光 RNA アプタマーの開発を目的とした(図 1)。

細胞内の標的蛋白質の局在と動態を解析する手法としては、標的蛋白質と Green Fluorescence Protein(GFP)を融合して、GFP の蛍光を顕微鏡観察する手法が主流だが、ここで観察できるのは外部から導入した GFP 融合標的蛋白質であり、これが細胞内で発現している時点で、細胞内の環境は通常と異なっている。細胞内の環境の変化をできるだけ小さくして、通常状態での標的蛋白質の局在と動態を観察するためには、細胞内で標的蛋白質に蛍光等の信号を結合させる必要がある。

その目的のために、蛍光を示す RNA アプタマーである Spinach は好適だが、その蛍光強度が弱く、現状では細胞内の標的分子の局在や動態を解析するのに十分でない。また、cyclic di-AMP 等の低分子に結合すると蛍光を示す Spinach は報告されているが、やはりその蛍光強度は弱く、局在や動態を観察することはできない。そして標的蛋白質に結合すると蛍光を発する RNA アプタマーはまだ報告されていない。

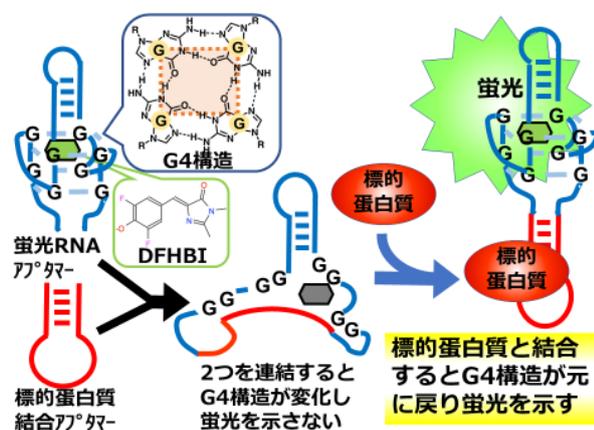


図1 標的蛋白質に結合すると蛍光を発するRNAアプタマーの原理

3. 研究の方法

申請者らは、Spinach の蛍光団である DFHBI に結合しているグアニン四重鎖(G4)構造(図 1)に、三重鎖を連結すると、その蛍光が 10 倍以上増強されることを見出した(論文投稿準備中)。また、これまでの様々な知見と自身の実験結果を総合し、DFHBI の蛍光は、その周辺の G4 構造の安定化が重要であることを確認している。

そこで、三重鎖を連結した部分に、標的蛋白質に結合するアプタマーを連結することを発想した。通常 Spinach のような G4 構造を有するアプタマーに他のアプタマーを連結すると、部分配列が様々な相補鎖を形成し、元のアプタマーの構造が壊れることが多い。しかし、標的蛋白質が結合すると、そのアプタマーが元の構造を形成するので、Spinach が元の G4 構造を形成し、これが標的蛋白質の結合によりさらに安定化するので、より強い蛍光を発すると期待される。

4. 研究成果

初年度

細胞内における pH 応答性蛍光発光アプタマーの評価

ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) における Bright Baby Spinach アプタマーの蛍光強度および pH 感受性を評価した。アプタマー配列を PCR 増幅し、アガロース 1%ゲルを用いた電気泳動と FastGene gel clean kit によるゲル抽出により DNA 断片を調製し、ヒト細胞中において転写誘導が可能なサイトメガロウイルスプロモーターを有するベクターである pcDNA3.1 (+) ベクターと共に制限酵素 NheI、XbaI を用いて 37°Cにて 24 時間反応させ、制限酵素消化を行った。次にベクターと DNA 断片のそれぞれを等量混合し、Takara Ligation Kit Ver. 2.1 を用いて 16°Cにて 20 時間反応させ、ライゲーションを行ったのち、大腸菌 E. coli DH5 α を形質転換した。得られたコロニーを 2 mL LB 培地 (Km f.c. 50 μ g/mL) に植菌し、FastGene Plasmid Mini Kit を使用してプラスミド DNA を抽出した。得られたプラスミドとプライマーを混合してシーケンス解析を委託解析し、目的のベクターが構築できたことを確認した。

凍結保存していた HeLa 細胞 を 37°C の恒温槽中において融解し、D-MEM 培地 (10%FBS) を融解した細胞と併せて 10 mL となるように添加し、懸濁した。その後、遠心分離 (4°C、300 g、5 min) して細胞を回収し、上清を除去した。回収した細胞を培地 1 mL を添加して再懸濁した後、9 mL の培地を添加した 100 mm ディッシュに播種し、5% CO₂ 添加 37°C 下で培養を行った。3 日間の培養後、アスピレーターを用いて培地上清を除去したのち細胞をガラスベースディッシュへ播種し直した。具体的には、2 mL の TrypLE™ Express Enzyme を添加して 37°C で 5 分間インキュベートした。8 mL の培地を添加して 10 mL へメスアップし、ピペッティングにより単細胞にして回収した。回収した細胞を遠心分離 (4°C、300 g、5 min) により回収し、上清を除去した。培地 1 mL を添加して再懸濁し、50%コンフルエント以下となるように分けて細胞をガラスベースディッシュへ播種した。培養した HeLa 細胞を、Baby Spinach アプタマーあるいは Bright Baby Spinach アプタマーの配列を有するベクターを用いて Lipofectamine2000 を用いてトランスフェクトした。詳細な手順としては、5% CO₂ 添加 37°C 下で 24 時間培養した後、PBS 緩衝液 (130 mM NaCl、2.7 mM KCl、8 mM Na₂HPO₄、2 mM KH₂PO₄) を用いて洗浄し、Opti-MEM 培地 (pH7.4、Gibco) 中において 600 ng のプラスミドを用いて

Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific) で形質転換した。

形質転換体を 37°C で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を DFHBI (f. c. 1.2 μ M) を含む PBS 緩衝液で処理した。加えて pHrodoRED (f. c. 5 μ M, Thermo Fisher Scientific) を添加した状態で、37°C において 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を HEPES 緩衝液 (10 mM HEPES、30 mM NaCl、120 mM KCl、1 mM NaH₂PO₄、1mM CaCl₂、10 μ M ニゲリシンナトリウム、pH7.0) または CHES 緩衝液 (100 mM CHES、30 mM NaCl、120 mM KCl、1 mM NaH₂PO₄、1mM CaCl₂、10 μ M ニゲリシンナトリウム、pH10) を用いて処理した。また、処理した細胞の蛍光を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (オリンパス、FV-300) で観察した。蛍光強度の定量化には ImageJ を用いて解析した。

HeLa 細胞内において Bright Baby Spinach アプタマーを転写させ、その蛍光強度を評価した結果、pH7 の条件下において Bright Baby Spinach アプタマーの蛍光強度が改良前のアプタマーよりも顕著に強い蛍光を発した。各細胞の蛍光強度について ImageJ を用いて定量したところ、Bright Baby Spinach アプタマーの蛍光強度が改良前のアプタマーより 12 倍と強い蛍光強度を示した。これより、改良した Bright Baby Spinach アプタマーは、細胞内環境においても強い蛍光を発することが明らかとなった。

また、pH 条件を変化させた条件においても Bright Baby Spinach アプタマーは改良前のアプタマーよりも顕著に強い蛍光を発した。改良前のアプタマーは pH8, pH9 の条件下においてほとんど蛍光を発さなかったのに対し、高い pH 条件下においても Bright Baby Spinach アプタマーは蛍光を発した様子が観察された (Fig. 1)。

2 年度

pH 応答性蛍光発光アプタマーの蛍光強度評価

先に評価した RNA pH-nanoswitch の配列を蛍光発光アプタマーに融合し、pH 応答性蛍光発光アプタマーを設計した。三重鎖形成配列を融合する蛍光発光アプタマーとしては、最初に報告された Spinach アプタマーの配列を最小化した Baby Spinach アプタマーを選択した。この Baby Spinach アプタマーは、リガンド結合と蛍光発光に必須の配列しか持たず、蛍光発光アプタマーの中でも非常に短い 51 塩基のアプタマーであるため、三重鎖形成配列を融合した場合における構造変化の影響が現れやすいと考えた。また、融合する三重鎖形成配列についても、ウラシルおよびデニン(UAU) の含有率を変化させた配列を設計し融合した。この理由としては、三重鎖形成配列に含まれるグアニンおよびシトシンの連続した配列が、Baby Spinach アプタマーの有する G4 構造に対して影響を与える可能性があると考えられたためである。

Baby Spinach アプタマーと同様に短い 51 塩基の配列を有する Broccoli アプタマーに融合した場合には 2.6 倍の蛍光強度の増強が確認された (Fig. 2)。一方で 104 塩基と長い配列を有する Spinach アプタマーに融合した場合には、蛍光強度の増強が確認されなかった。Spinach アプタマーにおいて三重鎖形成配列の融合によって蛍光強度が増強されなかった理由として、Spinach アプタマーが有する蛍光リガンドとの結合に重要である G4 構造と、三重鎖形成配列を融合した末端の間には元々 Spinach アプタマーが有するステムループ構造が存在したために三重鎖を融合させても構造自体に影響がなく、蛍光強度の増強が起らなかった可能性が考えられた。蛍光強度の増強が確認された 100%UAU 融合 Baby Spinach アプタマーを Bright Baby Spinach と名付けた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oshikawa D, Inaba S, Kitagawa Y, Tsukakoshi K, Ikebukuro K	4. 巻 23(12)
2. 論文標題 CpG Methylation Altered the Stability and Structure of the i-Motifs Located in the CpG Islands.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 6467-6474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23126467.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北川雄大, 押川大起, 稲葉真太郎, 塚越かおり, 池袋一典
2. 発表標題 CpGのメチル化がi-motifの構造に与える影響
3. 学会等名 第32回日本MRS年次大会
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

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			
イタリア	ローマ大学 Tor Vergata			
米国	ノースカロライナ大学チャペル ヒル校			