

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19107

研究課題名（和文）蛍光バーコードを利用したインタラクトームイメージング法の開発

研究課題名（英文）Visualization of biomolecular interaction by using fluorescent barcodes

研究代表者

榎田 啓（Kashida, Hiromu）

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：30452189

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では我々が開発した蛍光バーコードの拡張、及びそれを利用した生体分子間相互作用解析を目指した。まず、D-トレオニール核酸の鎖交換反応について詳細に検討した。その結果、鎖交換反応に最適な鎖長や反応温度を明らかにすることが出来た。また、蛍光バーコードの拡張について検討を行い、蛍光変化回数を3回に増加させても設計通り機能することがわかった。更に、タンパク質間相互作用を可視化するために近接ライゲーションについての検討を行い、通常の蛍光標識核酸を利用したイメージングが可能であることを確認した。以上のように、蛍光バーコードを利用した生体分子間相互作用を可視化するための基盤技術の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体分子間の相互作用は全ての生命現象の基盤であるため、これを可視化することは生命現象を理解する上で非常に重要である。これを実現するためには多数の蛍光ラベルを調製する必要があるが、従来の技術では蛍光波長にオーバーラップがあるため同時検出可能な数に大きな制約があった。それに対し、我々が開発した蛍光バーコードは膨大な種類の蛍光ラベルを簡便に調製することが可能である。また、本研究成果によって生体分子間相互作用イメージングに必要な基盤技術を確立することが出来た。今後、我々が開発した技術を更に発展させることで複数の生体分子間相互作用の同時イメージングが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a method to visualize interactions among biomolecules by using color-changing fluorescent barcodes (CCFB). First, we analyzed strand displacement reaction of acyclic D-threoninol nucleic acid and revealed optimal chain length and temperature. We prepared a barcode which changes its color three times. Fluorescent measurements indicated that the barcode worked as designed. Moreover, we tried to visualize protein-protein interaction by using proximity ligation assay. As a result, interaction could be visualized by using fluorescently labeled DNAs. From these results, we successfully developed basic technologies necessary for interactome imaging in cells.

研究分野：生体関連化学

キーワード：蛍光バーコード 抗体 インタラクトーム

1. 研究開始当初の背景

タンパク質-タンパク質間やタンパク質-核酸間など、生体分子間の相互作用を網羅的に解析するインタラクトーム解析が近年非常に注目されている。しかしながら、従来のインタラクトーム解析法は主に質量分析を利用しており、細胞内における位置情報を取得することが困難であるという問題点があった。一方、蛍光タンパク質間の Förster 型エネルギー移動 (FRET) を利用する手法やタンパク質の分割体を利用した BiFC 法など、生体分子間相互作用をイメージングする手法も報告されている。しかしながら、従来の大半の手法では蛍光色素の励起波長・蛍光波長にオーバーラップがあるため、同時イメージング可能な色素の種類には大きな制限があった。従って、従来の相互作用イメージング法では実質 3, 4 種類の分子間相互作用しか同時にイメージング出来ないという極めて大きな制約があった。

2. 研究の目的

それに対し、我々はあらかじめ決められた“配列”に従って蛍光色が変わる蛍光バーコードの開発に成功した (図 1)¹⁾。具体的には、半分ずれて相補的な色素修飾核酸二重鎖を蛍光ラベル化剤として使用した。核酸骨格としては、我々が開発した D-トレオニノール核酸 (D-aTNA)²⁾ を利用した。D-aTNA を利用することで、天然核酸との直交性や効率的な蛍光消光が可能であることがわかっている。初期状態では他の蛍光色素が消光されているため、末端の蛍光色素のみが発光する。それに対し、相補鎖 (Q1, Q2, Q3) を順番に添加することによって鎖交換反応を介して核酸鎖を解離させる。その結果、赤→緑→青のように発光する蛍光色素を決められた順序で変化させることができる。

この設計は核酸鎖に結合させる蛍光色素を変化させれば蛍光変化の順番を任意に変更可能である。そのため、蛍光バーコードを利用すれば蛍光波長だけでなく蛍光色変化の“配列”によって分子を識別することが出来る。このように蛍光バーコードを利用すれば従来の蛍光イメージングと比較してはるかに多くの種類の生体分子を同時にイメージングすることが可能となる。

実際、我々はこれまでに 3 種類の蛍光色素を用いて 2 回蛍光変化させることで、 $3^3=27$ 種類の蛍光バーコードを調製した。また、これを利用した複数のタンパク質のイメージングに成功した。

本手法は 1) 多数の配列を必要とせず設計・合成が容易であるという特長がある。また、2) 煩雑な洗浄操作を必要としないため、操作が短時間かつ簡便である。更に、3) 蛍光色素の種類や蛍光変化回数を増加させれば、識別可能な分子数を指数関数的に増大させることができる。そこで、本研究ではこの蛍光バーコードを利用した生体分子間相互作用を可視化する手法の開発を目指した。

3. 研究の方法

具体的には、タンパク質に対する抗体を核酸でラベル化し、核酸鎖を増幅することで生体分子間相互作用を可視化する近接ライゲーションアッセイ (PLA)³⁾ を利用することを考えた。従来の PLA は、可視化の際に蛍光標識された DNA を利用していたため、同時に検出可能な種類に大きな制限があった。それに対し、我々が開発した蛍光バーコードを利用することが出来れば、多数の分子間相互作用の同時イメージングが期待できる。しかしながら、これまで開発した蛍光バーコードには、ラベルの種類が 27 種類に限定されているという問題があった。また、D-aTNA の鎖交換反応については、詳細に検討を行った例がなく、反応における最適な鎖長や温度が不明であった。そこで本研究では、まず (1) 人工核酸の鎖交換反応の詳細な検討を行うことで、蛍光バーコードの蛍光色変化の際に最適な条件を明らかにすることを目指した。また、(2) 蛍光変化回数を増加させることで蛍光バーコードの拡張について検討した。更に、蛍光バーコードを利用した生体分子間相互作用解析へ展開するために (3) 近接ライゲーションアッセイに関する基礎的検討を行った。

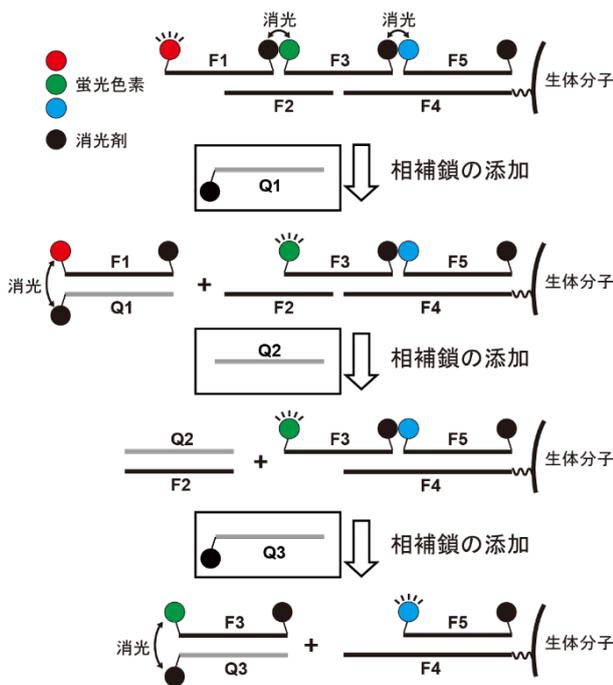


図 1. 蛍光バーコードの概略図。

4. 研究成果

(1) 人工核酸の鎖交換反応の詳細な解析

本手法では D-aTNA の鎖交換反応を利用している。DNA の鎖交換反応については多数の研究例があるものの、D-aTNA の鎖交換反応についてはその速度を詳細に検討した例は無かった。そこで、D-aTNA の鎖交換反応を検討し、類似の化学構造を持つ人工核酸であるセリノール核酸 (SNA)³⁾、L-トレオニノール核酸 (L-aTNA)⁴⁾ との比較を行った。具体的に検討した鎖交換反応の模式図を図 2 に示す。一本鎖部位 (toehold) を持つ核酸二重鎖をレポーターとし、相補的なインプット添加時に鎖交換反応する設計とした。また、レポーターをそれぞれ蛍光色素及び消光剤で標識することで、鎖交換反応が進行した際の蛍光変化を測定することで反応速度を決定することが出来る。それぞれの核酸について、一本鎖部位の長さを変更し蛍光変化を測定することで核酸の化学構造が鎖交換反応速度に及ぼす影響を検証した。

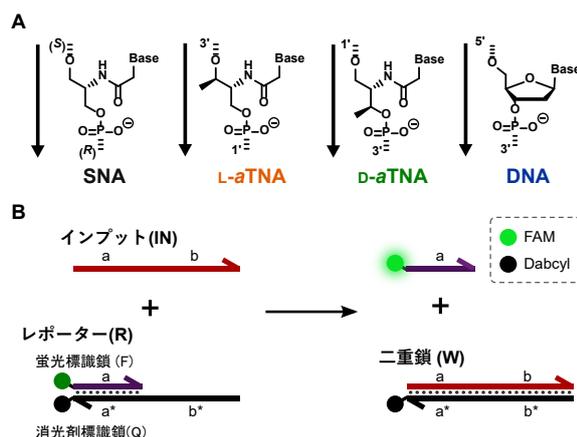


図 2. (a)本研究で使用した核酸の化学構造及び(b)鎖交換反応の模式図。

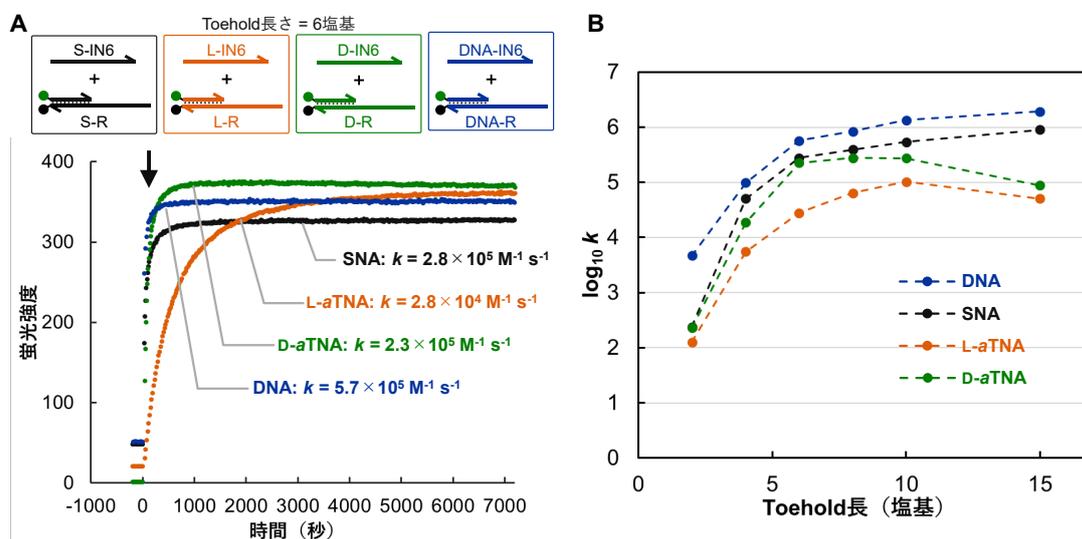


図 3. (A) 6 塩基の toehold 長におけるそれぞれの核酸の鎖交換反応時の蛍光変化。(B) Toehold 長と反応速度 (k) の関係。

6 塩基の toehold をもつインプットを使用した際の結果を図 3A に示す。DNA では迅速に蛍光が増大したのに対し、D-aTNA では反応速度が若干低下することがわかった。一方、SNA は D-aTNA より反応速度が大きかったのに対し、L-aTNA では速度が低下することがわかった。それぞれの toehold 長さにおける反応速度定数 (k) の関係を図 3B に示す。DNA では 6 塩基程度で反応速度が飽和したのと同様に、D-aTNA でも 6 塩基でほぼ飽和することがわかった。一方、反応速度は DNA と比較すると若干低下することも明らかとなった。これは D-aTNA 二重鎖が DNA 二重鎖と比較して遥かに安定であることに起因すると考えられる。このように、核酸の化学構造が鎖交換反応速度に及ぼす影響を明らかにすることが出来た。また、これまでの蛍光バーコードの設計では 7 塩基の toehold を利用してきたが、反応速度を向上させるうえで適した長さであることが確認された。

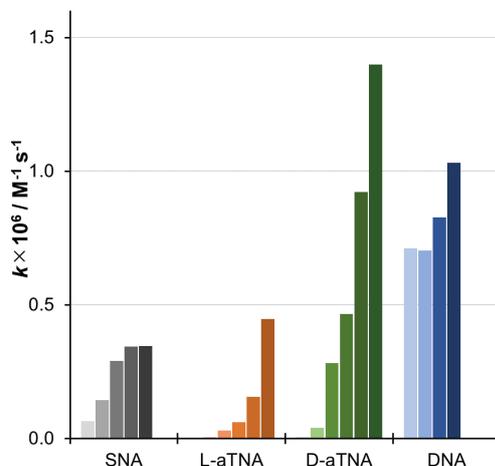


図 4. 様々な温度における反応速度の比較。左から 10, 17, 25, 29, 35, 45 °C の結果を示す。

また、鎖交換反応の温度依存性についても検討を行った(図4)。その結果、DNAは温度を変化させても鎖交換反応速度定数がほとんど変化しないことがわかった。一方、非常に興味深いことにD-aTNAの反応速度定数は温度に強く依存し、高温下ではDNAとほぼ同程度の速度定数を示すことがわかった。従って、D-aTNAによる鎖交換反応においては温度を上昇させることで反応を高速化できることがわかった。このことは、蛍光バーコードの蛍光色変化を観察する際においても温度を上昇させることで反応を高速化できることを示している。更に、D-aTNAを利用することで温度によって制御された“回路”を構築できることを示している。以上のように、D-aTNAによる鎖交換反応を詳細に解析し、これまで不明であった鎖交換反応速度を明らかにすることに成功した。

更に、核酸のキラリティが鎖交換反応に及ぼす影響について検討を行った(図5)。D-aTNAから構成されるレポーター二重鎖に対し、D-aTNAインプットを添加したところ、迅速な蛍光上昇が観察された。一方、D-aTNAの鏡像異性体であるL-aTNAインプットをD-aTNAレポーターに対し添加したところ、蛍光強度が全く増加しないことがわかった。このことは、D-aTNAとL-aTNAの鎖交換反応は全く干渉しないことを示している。このように、D-aTNAから構成される蛍光バーコードはL-aTNAからなる蛍光バーコードと独立に使用できることが明らかとなった。

以上のように、D-aTNAによる鎖交換反応について詳細に検討し、鎖交換反応における最適な鎖長や温度などを明らかにすることが出来た。これらの知見は今後蛍光バーコードを用いた手法を発展させるうえで極めて重要な知見であると言える。これらの成果は現在、論文投稿中である。

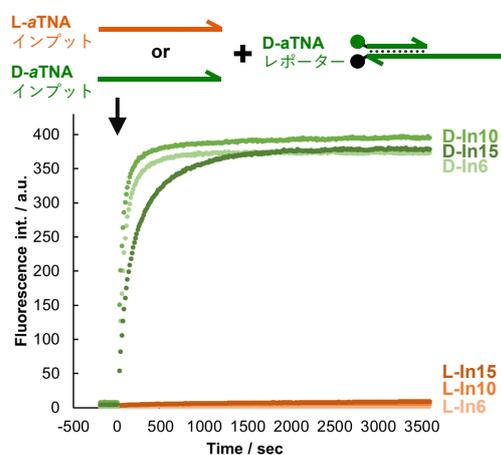


図5. D-aTNAレポーターに対し、D-aTNAもしくはL-aTNAインプットを添加した際の蛍光変化。

(2) 蛍光バーコードの拡張

これまでに3色の蛍光色素を2回蛍光変化させることで $3^2=9$ 種類の蛍光バーコードを調製することに成功している。しかしながら、生体分子間相互作用を可視化の上では、更に多数の蛍光ラベルを調製する必要がある。そこで、蛍光変化回数を増加させることで蛍光バーコードの種類を増加させることが出来るかどうか検討した。具体的には、蛍光変化回数を3回に増加させた蛍光バーコードを調製した。末端を蛍光色素及び消光剤で標識したD-aTNAを4配列、相補鎖を3配列合成し、これらを二重鎖形成させた(図6上)。その後、それぞれの鎖と完全に相補的なD-aTNAを添加し、その際の蛍光強度変化を蛍光分光光度計によって測定した。一本鎖部位から順番にCy5、Cy3、FAM、Cy3の順番で蛍光色素を導入した二重鎖を調製した。この蛍光バーコードはCy5→Cy3→FAM→Cy3

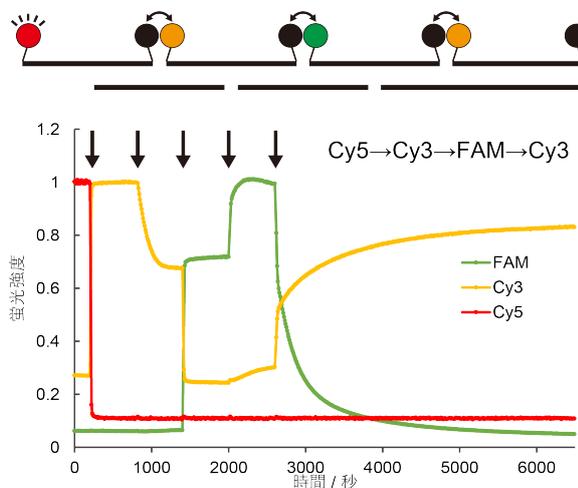


図6. 3回蛍光変化する蛍光バーコードの蛍光測定結果。

という“配列”で蛍光変化が観察されることが期待できる。実際に蛍光強度変化を測定した結果を図6に示す。その結果、設計通りCy5→Cy3→FAM→Cy3の順番で蛍光変化が観察された。従って、蛍光変化回数を3回に増加させても、設計通りの順番で蛍光変化が観察されることが確認された。このことは3色蛍光色素を利用し、3回蛍光変化させることで $3^3=27$ 種類の蛍光ラベルを調製可能であることを示している。本手法の大きな特長として必要となる核酸鎖の数が少ない点が挙げられる。本例のように81種類の蛍光ラベルを調製するために必要となるD-aTNA鎖はわずか20配列である。これは、本手法が核酸合成・精製の手間やコストの面において非常に優れた手法であることを示している。以上のように、蛍光変化回数を増加させることで蛍光バーコードの種類を指数関数的に増大させることに成功した。

(3) 近接ライゲーションアッセイの検討

生体分子間相互作用を可視化するために近接ライゲーションアッセイ (PLA) ⁵⁾ について検討を行った。具体的な設計を図7に示す。タンパク質 (X,Y) に結合する抗体にそれぞれ DNA 鎖を結合させる。そこに、テンプレートとなる DNA を結合させライゲーションさせる。2種類のタンパク質が近接している場合のみ環状の DNA が生成する。その後、環状 DNA をテンプレートとしたローリングサークル増幅 (RCA) を行うことで

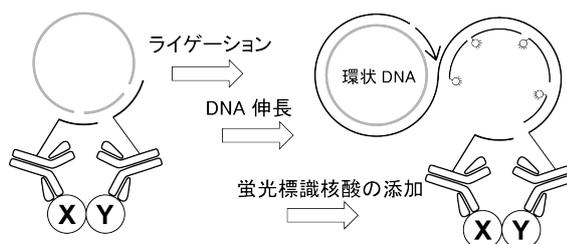


図7. 近接ライゲーションアッセイの模式図。

DNA を増幅し、蛍光色素で標識した DNA を二重鎖形成させることで可視化する。2種類のタンパク質が近接している場合のみ蛍光シグナルが観察されるため、相互作用しているかどうかを可視化することが可能となる。また、従来手法では蛍光色素で標識した DNA を利用しているため、同時に可視化できる種類に限度があった。それに対し、蛍光バーコードでラベルした DNA を用いることで、複数種類の相互作用を同時に可視化することが期待できる。そこで、本研究ではまず通常の PLA を用いたタンパク質—タンパク質間相互作用解析が可能かどうか検証した。

具体的には RNA 干渉関連タンパク質である AGO2 及び GW182 を標的とした PLA を行った。これらは細胞内の P-body において共局在していることが報告されているタンパク質である ⁶⁾。これらのタンパク質に対する抗体を利用して、PLA が機能するかどうかの検証を行った。共焦点レーザー顕微鏡で細胞イメージングを行った結果を図8に示す。抗 AGO2 抗体のみを使用した場合、蛍光シグナルは観察されなかった。一方、抗 AGO2 抗体及び抗 GW182 抗体を使用し PLA を行った際には、細胞内から蛍光シグナルが観察された。このことは、通常の PLA を利用することでタンパク質間の相互作用を解析することが可能であることを示している。今後は、蛍光標識 DNA の代わりに蛍光バーコードで標識した核酸を利用することで、複数種類の生体分子間相互作用のイメージングを行う予定である。

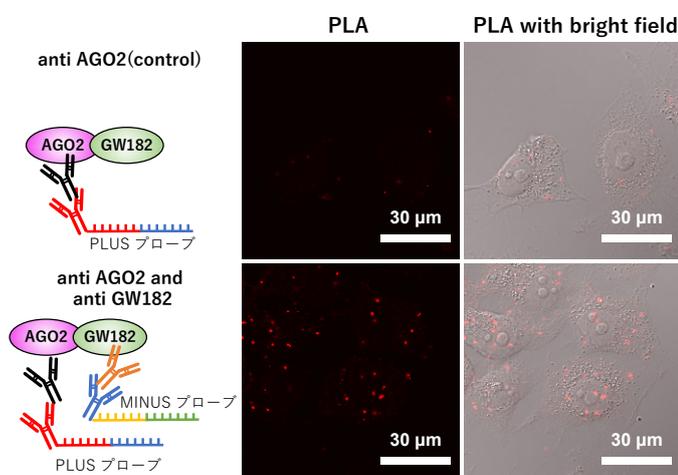


図8. PLA を利用した RNA 干渉関連タンパク質間相互作用の蛍光イメージング結果。

【参考文献】

- 1) K. Makino, E. A. Susaki, M. Endo, H. Asanuma, H. Kashida, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 1572-1579.
- 2) H. Asanuma, T. Toda, K. Murayama, X. Liang, H. Kashida, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14702-14703.
- 3) H. Kashida, K. Murayama, T. Toda, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1285-1288.
- 4) K. Murayama, H. Kashida, H. Asanuma, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6500-6503.
- 5) O. Söderberg, M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstråle, K.-J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L.-G. Larsson, U. Landegren, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 995-1000.
- 6) G. L. Sen, H. M. Blau, *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 633-636.

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 0件）

1. 著者名 Kashida Hiromu, Azuma Hidenori, Sotome Hikaru, Miyasaka Hiroshi, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 63
2. 論文標題 Site Selective Photo Crosslinking of Stilbene Pairs in a DNA Duplex Mediated by Ruthenium Photocatalyst	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202319516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202319516	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 榎田啓
2. 発表標題 核酸の多様化を目指した人工核酸の開発
3. 学会等名 第9回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎田啓
2. 発表標題 人工核酸を利用した機能性材料の開発
3. 学会等名 第4回発動分子科学サロン（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koki Makino, Hiroyuki Asanuma, Hiromu Kashida
2. 発表標題 Multiplexed Imaging with Color-Changing Fluorescent Barcode Based on Strand Displacement Reaction
3. 学会等名 ISNAC 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野航海、浅沼浩之、櫻田 啓
2. 発表標題 蛍光色が変化する核酸蛍光バーコードを用いたタンパク質のマルチイメージング
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野航海、浅沼浩之、櫻田 啓
2. 発表標題 核酸の鎖交換反応を利用した蛍光色変化型バーコードによる多重タンパク質イメージング
3. 学会等名 第32回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野航海
2. 発表標題 生体直交性人工核酸D-aTNAを用いた蛍光色変化型バーコードの開発
3. 学会等名 日本化学会 生体機能関連化学部会若手の会 第33回サマースクール
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 櫻田啓
2. 発表標題 人工核酸を基盤とする超分子材料の開発
3. 学会等名 第72回高分子年次大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koki Makino, Hiroyuki Asanuma, Hiromu Kashida
2. 発表標題 Color-Changing Fluorescent Barcode (CCFB) Labeling Based on Toehold-Mediated Strand Displacement Reaction
3. 学会等名 The 3rd International Symposium on Biofunctional Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------