

研究報告書

「シナプス可塑性に関わる RNA 群の革新的イメージング法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 阿部 洋

1. 研究のねらい

生細胞中の内在性 RNA をイメージングする革新的技術「化学反応プローブ」を開発し、神経細胞におけるスプライシング、RNA 輸送や翻訳制御などの RNA 動態を明らかにする方法論を確立する。特に、記憶や学習などの脳機能を発現するシナプスの可塑性に注目し、その鍵を握る mRNA 群を標的とした多色蛍光イメージングプローブを創製する。さらに、開発したプローブを用いて、世界で初めての海馬細胞における内在性 mRNA の検出・ライブイメージングを目指す。これまで、遺伝子改変を用いた人工蛍光タンパク質及びタグ配列を有する非天然型 RNA のライブイメージング技術は盛んに報告されているが、天然型 RNA を直接とらえることを目指す本研究計画は大きな意味を持つと考える。

2. 研究成果

(1) 概要

神経生物学研究に用いることができる細胞内 RNA の解析・機能制御技術を開発する。第一に、化学反応プローブを用いた細胞内 RNA イメージング法を開発した。本プローブは細胞内 RNA に結合することで蛍光を発生し、RNA の存在を可視化することができる。プローブを用いて、mRNA スプライシング反応の解析が可能になり、反応の結果生じる成熟型 mRNA 及びイントロン由来のラリアット型 RNA の検出に成功した。微量 RNA を細胞内で検出する方法論も検討した。すなわち、細胞内で標的 RNA を触媒化することで、化学反応が回転し、微量 RNA シグナルを増幅できる新規検出原理を考案した。原理的には、RNA シグナルを最大 1500 倍に増感できることになる。一方、生体イメージングの際に、生体物質由来の自家蛍光が本来のシグナル解析の邪魔になる。この問題を解決するために、ミリ秒以上の長寿命蛍光を有する希土類元素を用いた化学反応プローブを開発した。このプローブを用いて、時間分解蛍光解析を行うことで、有機化合物である生体物質由来の自家蛍光を除いて、希土類由来のシグナルのみを観測することが可能になった。

第二に、細胞内 RNA の機能を制御する方法論を開発した。ひとつは、RNA を環状化しその配列から終止コドンを除くことで、その RNA を用いた翻訳反応で高効率なタンパク質合成が起こることを見出した。本現象を終わりのない回転式タンパク質翻訳法と名づけて現在応用研究を展開中である。また、細胞内 RNA をロタキサン構造で強力に捕らえる新規アンチセンス法を考案した。本法は、RNA をトポロジカルに捕らえることができる全く新しい方法論である。

(2) 詳細

mRNA スプライシング反応の解析

mRNA 検出化学反応プローブとして、酸化還元反応に基づき蛍光を発する RETF (Reduction Triggered Fluorescence) プローブを合成した。本プローブは化学的な修飾により蛍光を消光させた分子とその修飾を外し、蛍光を回復させる還元剤をそれぞれ標的 RNA に相補的なオリゴヌクレオチドに結合した 2 本 1 組のプローブである。フルオレセインの水酸基をアジドメチル基で保護させた分子あるいは還元剤であるトリフェニルホスフィンを用いて標的 RNA に相補的な配列を有する DNA に結合させた。このプローブが標的 RNA に隣り合って結合することで生じる還元反応によりアジドメチル基が脱保護され、標的 RNA 特異的な蛍光を発する。

RETF プローブを用いて、未成熟 mRNA のスプライシング反応のリアルタイム解析法の開発を検討した(図 1)。具体的には、CDC (chicken d-crystallin) 遺伝子由来の未成熟 mRNA がスプライシング反応を受け、成熟型 RNA ができる過程を解析するプローブの開発に成功した。

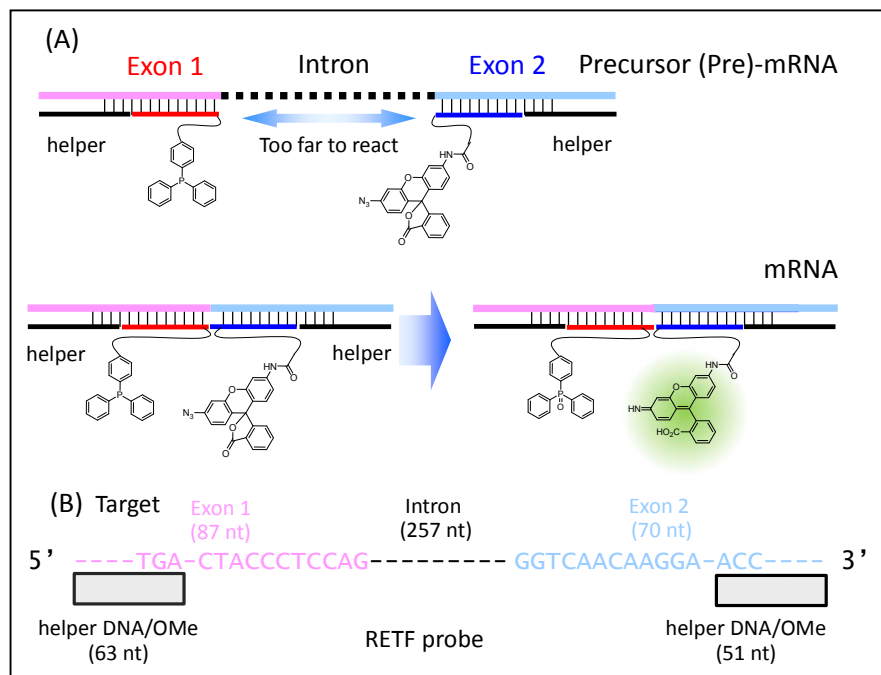


図1 スプライシング反応の検出

Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, 22(23), 7248–7251 (2012).

環状 RNA における終わりのない翻訳現象の解析

mRNA を解析するプローブの開発中に、真核生物の mRNA がタンパク質と複合体を形成し、環状構造をとることに注目した。そこで、人工的に作成した環状 RNA でタンパク質翻訳を起すこと着想した。ストップコドンを除いた環状 RNA を用いると終わりのないタンパク質翻訳現象が起こる。さらに、タンパク質合成の効率の観点で考察する。通常の直鎖型構造(終わりのある)RNA を用いたタンパク質合成において、一反応サイクルの律速段階はリボソームが開始複合体を形成する開始段階にある。タンパク質をたくさん作るためには、リボソームは直鎖型 RNA 鋳型上を端から端までターンオーバーする(くっついて離れてを繰り返す)必要がある。一方、環状 RNA をタンパク質翻訳の鋳型に用いた場合、律速段階は最初の翻訳開始の結合

時のみとなり、それ以降のタンパク質合成は効率よく行われる。本メカニズムは高効率タンパク質合成法となりえることを確認した(図2)。

Angewandte Chemie International Edition, 52(27), 7004–7008 (2013).

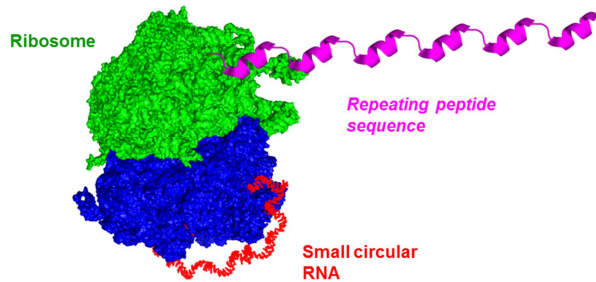


図2 終わりのない回転式タンパク質翻訳現象

細胞内で高効率なシグナル増幅を可能とする化学反応プローブの開発

2-シアノ-4-ニトロベンゼンスルホニル(CNs)基で保護したアミノクマリン(AMCA)を修飾したCNs-AMCAプローブと、チオフェノール基で修飾されたMBAプローブの2本を合成した。プローブは、RNA配列特異的に結合するように設計します。プローブ同士が隣あって結合すると、チオフェノール基がCNs基に求核置換反応を起こし、脱保護されフリーになったAMCAが

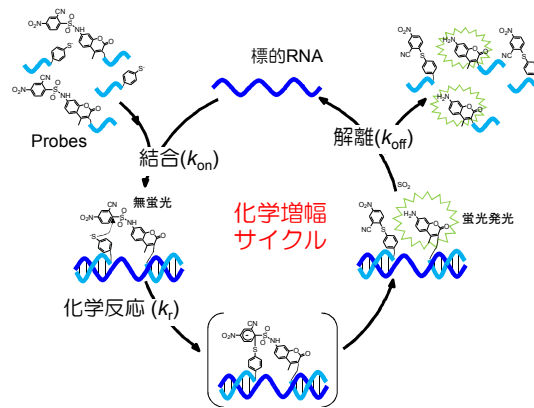


図3細胞内でのRNAシグナルの化学増幅

が試験管中で起こるか検討した。標的DNAを用意して、プローブを導入すると時間経過とともに化学反応が進行してAMCAが生成した。AMCAの生成率は60秒後には頭打ちになっており、反応が完結しました。一方で、標的DNAがない場合は、AMCAは全く生成されませんでした。以上のことから、開発したプローブは従来法と比較して非常に反応速度が速いのに加え、標的が存在しない場合に副反応が起こりにくいため、シグナル/ノイズ比が高いことが分かりました。次に、低濃度の標的DNAを検出できるかを検討するため、プローブ濃度は変えずにDNAの量を変えて混合し、15時間後の蛍光を検出しました。結果、試験管内で0.5pM(生細胞内で一分子のDNAに相当)の微量の遺伝子を検出することに成功しました。また、この条件では、15時間でDNA一分子に対して1500個のプローブが結合して蛍光シグナルを発することが明らかとなった。今回の実験より、芳香族求核置換反応を利用したプローブが、化学増幅反応を起こすことで、標的RNAを高感度に検出できることが明らかとなった(図3)。

Journal of the American Chemical Society, 135 (38), 14172–14178 (2013).

長寿命蛍光を有する希土類発光化学反応プローブの開発

細胞や組織を観察する際に、生体由来の自家蛍光は大きな問題となる。希土類錯体蛍光は数百マイクロ秒オーダーの長寿命であるため、有機化合物由来の数ナノ秒オーダーの自家蛍光を完全に除去できると考えられる。これは時間分解蛍光測定を行うことで可能になる。そこで、蛍光寿命が長い希土類錯体をプローブの発光システムに組み込むことを考えた。希土類錯体は直接励起できないため、アンテナ分子を介して励起する。そこで、アンテナ分子にスイッチ機能をつけることで、シグナル発生をコントロールすることにした。まず、新規化合物であるフェナンスリジノン環がアンテナ分子として機能することを確認した。アンテナ分子は、励起されるとまず一重項状態となり続いて速やかに三重項状態に遷移し、その後希土類にエネルギーを渡す機能を有する必要がある。特に重要なのが一重項で蛍光発光や熱失活を起こさずに、確実に三重項状態に移行することである。今回設計した分子は、340nm 付近に吸収を持ち、アンテナ分子として希土類錯体であるランタノイド金属(Eu 及び Tb)の両方を励起することができることが明らかとなった(図4)。続いて、フェナンスリジノン環を開裂させ、アジド基とエステル基を導入し、アンテナ分子の機能をオフにしたプレアンテナ分子を作成した。このプレアンテナ分子は、アジド基を還元することでフェナンスリジノン環が再生しアンテナ分子となる。プレアンテナ分子と希土類錯体を導入した DNA プローブと、還元剤であるトリフェニルフォスフィンを導入した DNA プローブを作成し、標的 DNA 中で蛍光発光が起こるかを検討したところ、標的が存在するときのみ蛍光発光が起こることを確認できた。また、これを用いた懸濁液中のバクテリアの RNA を検出できることを明らかにした。

Journal of the American Chemical Society, 135 (37), 13632–13635 (2013).

環状構造による mRNA の補足法の開発

mRNA を検出するプローブは、強力に標的に対して結合する必要がある。これまでの核酸プローブは基本的には平衡下可逆的に結合する性質を有するものがほとんどである。そこで不可逆的に標的 mRNA に結合するプローブを設計することを試みた。mRNA の化学構造には傷をつけずに標的を補足する方法論として、トポロジカルに標的に絡みつくとタキサン構造を利用することにした。ロタキサンは、環の中にひも状の分子(軸)が貫通しその両端にストッパーが付くことで、環が抜けなくなっている分子集合体である。核酸化学において、ロタキサンのようなトポロジカルな分子集合体は核酸二本鎖間の塩基対を利用して構築される。DNA を用いてロタキサンを形成する方法はこれまでにいくつか報告されているが、化学試薬や酵素を必要とし、細胞内でこのような構造を人工的に形成させることは困難であった。このような背景の下、我々は混ぜるだけで化学反応が進行し核酸分子の擬ロタ



図5 ロタキサン構造による RNA 補足法

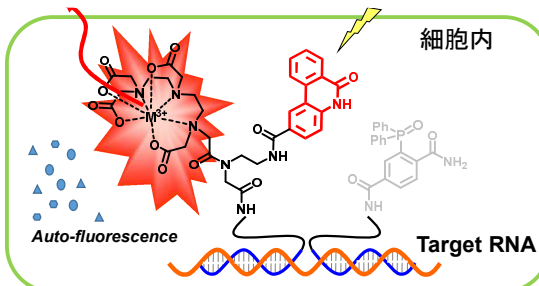


図4 希土類を利用した長寿命発光化学反応プローブ

キサンの形成される新しい方法の開発に着手した。2つの化学反応性オリゴ DNA(ODN)を設計・合成し、実際にこの2つのODNを標的核酸に加えたところ速やかに反応が進行し、擬ロタキサンの形成が観測された(図5)。この方法で形成された二本鎖は非常に安定であり、細胞内の mRNA に対してこの反応を実現できれば確かな mRNA 検出や効果的な翻訳の阻害や可能になると期待できる。

Journal of the American Chemical Society, 136 (20), 7201-7204 (2014).

3. 今後の展開

細胞内 RNA の解析と機能制御に焦点をあて研究を展開する。解析では、化学反応プローブを用いた内因性 RNA のイメージング法開発を進める。特に、一分子レベルの RNA でも解析可能なプローブを開発し、スプライシングなどの細胞内現象のリアルタイム解析を可能にすることを目指す。機能制御では、ロタキサン分子を用いた遺伝子発現制御法や高効率なタンパク質発現を実現する方法論を開発することで、生命科学研究の重要なツールを研究者に向けて提供する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

神経生物学研究に用いることができる RNA 解析技術や機能制御技術の開発に取り組んできた。方法論の開発については、成果項目に記載した 5 報の論文の他にも、4報の関連論文を報告し、4件の関連特許を出願しており、十分な研究成果を達成したと考えている。神経細胞内の RNA イメージング研究は、共同研究を進めており、数年以内に成果がまとまる予定である。また、RNA イメージング法及びタンパク質発現法に関するプレスリリースを行った。RNA イメージング法では、細胞内で微量 RNA のシグナルを化学増幅できる方法論を報告した。非酵素的に1500倍のシグナル増幅を可能とするプローブは前例がなく、RNA イメージングによる基礎研究のみならず、遺伝子解析技術などの産業応用も期待できる。また、環状 RNA を利用したタンパク質合成もタンパク質材料の生産技術への利用が期待できる。プレスリリースの結果、多くの研究者や複数の企業から連絡を受け、現在、上記研究に関連した複数の共同研究を進めている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

遺伝子情報はまず RNA として発現し、その多くは各種の制御のもとに蛋白質に翻訳されて細胞機能に組み込まれてゆく。神経細胞はその突起の広がりゆえに特定の RNA の局在とその変化に特に関心がもたれるが、生細胞でそれを解析する手段はない。本研究はそこに着目して、神経細胞内に導入してスプライシング、RNA 輸送や翻訳制御など RNA 動態のイメージング解析を可能にするプローブの開発をねらったものである。このために一対のオリゴヌクレオチドにマスクした蛍光性原子団あるいは還元剤を結合させたものを細胞に導入し、これらが標的 RNA に結合すると化学反応により蛍光団が生じるプローブの開発と実証に成功したものである。さらに、

高感度化するためにこの反応を回転増幅して 1500 倍の増感を達成し、また標本に固有の自家蛍光を克服するため希土類元素を用い時間分解蛍光解析を行うことでさらに感度と特異性を向上できることを見出した。論文発表も行い、特許活動も行っている。今後、現在進めている神経細胞への応用を進展させ、実用化に供される日が待たれる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1.	Kazumitsu Onizuka, Fumi Nagatsugi, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Automatic Pseudorotaxane Formation Targeting on Nucleic Acids Using a Pair of Reactive Oligodeox-ynucleotides <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 136 (20), 7201–7204 (2014).
2.	Hisao Saneyoshi, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Long-lived luminogenic probe for detection of RNA in a crude solution of living bacterial cells <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 135 (37), 13632–13635 (2013).
3.	Aya Shibata, Takanori Uzawa, Yuko Nakashima, Mika Ito, Yukiko Nakano, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Very rapid DNA templated reaction cycle for efficient signal amplification and its steady-state kinetic analysis of the turnover cycle <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 135 (38), 14172–14178 (2013).
4.	Naoko Abe, Michio Hiroshima, Hideto Maruyama, Yuko Nakashima, Yukiko Nakano, Akira Matsuda, Yasushi Sako, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Rolling circle amplification in a prokaryotic translation system using small circular RNA <i>Angewandte Chemie International Edition</i> , 52(27), 7004–7008 (2013).
5.	Yasutsugu Tamura, Kazuhiro Furukawa, Rei Yoshimoto, Yuto Kawai, Minoru Yoshida, Satoshi Tsuneda, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Detection of Pre-mRNA Splicing in vitro by an RNA-Templated Fluorogenic Reaction. <i>Bioorganic Medicinal Chemistry Letters</i> , 22(23), 7248–7251 (2012).

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件

1. 発明の名称: 環状 RNA 及びタンパク質の製造方法
発明者: 阿部洋、阿部奈保子、伊藤嘉浩、西原みづき
出願人: 理化学研究所
国際出願番号: PCT/JP2013/053095
出願国: 日本・米国に移行予定
2. 発明の名称: 機能性核酸分子の構築法、および当該方法に用いる核酸組合せ物
発明者: 阿部洋、丸山豪斗、伊藤嘉浩
出願人: 独立行政法人科学技術振興機構
国際出願番号: PCT/JP2013/055732
3. 発明の名称: 機能性核酸分子の構築法
発明者: 阿部洋、伊藤美香、伊藤嘉浩
出願人: 理化学研究所
出願番号: 特願 2013-012686
4. 発明の名称: 核酸連結法
発明者: 阿部洋、丸山豪斗

出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願番号:特願 2014-171540

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

プレスリリース

平成 25 年 9 月 6 日 「生きた細胞内での画期的な RNA 検出法を開発」

JST、理化学研究所、北海道大学

上記論文1に関するリリース

遺伝子検出に関する報道

- 日経バイオテクネット 2013 年 9 月 9 日 生きた細胞内での画期的な RNA 検出法を開発
- QLifePro、2013 年 9 月 13 日 生きた細胞内で RNA 検出を可能にする分子プローブを開発
- 日経産業新聞、2013 年 9 月 17 日、細胞を壊さず RNA 検出
- 科学新聞 2013 年 9 月 27 日、遺伝子発現の有無解析「その場検査」に応用期待