

## 蛍光明滅を利用した RNA 立体構造検出に成功

～生細胞内における RNA グアニン四重鎖構造の新規検出法を確立～

### ポイント

- ・シアニン色素の光異性化状態が RNA の立体構造変化に応じて変化することを実証。
- ・光異性化を用いて RNA のグアニン四重鎖構造を生細胞内で検出する方法を確立。
- ・病態に関連した RNA 立体構造変化の生細胞内検出へ発展させることに期待。

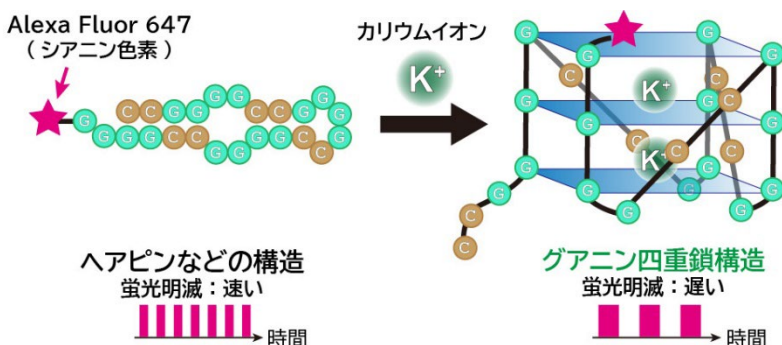
### 概要

北海道大学大学院先端生命科学研究院の北村 朗講師らの研究グループは、シアニン蛍光色素の光異性化状態の変化を検出できる手法を用いて、生細胞内でグアニン四重鎖構造という RNA の特殊立体構造を識別することに成功しました。本成果は、スウェーデン王立工科大学応用物理学部 Jerker Widengren 教授らとの国際共同研究によるものです。

シアニン蛍光色素は、光励起に依存して分子構造の異性化（光異性化）を起こし、動的に消光する（蛍光明滅する）ことが知られている蛍光色素です。この蛍光明滅の速度と蛍光を発する状態の割合から生きた細胞内における生体分子の構造変化検出に使えないかと着想しました。蛍光明滅状態を短時間かつ定量的に測定できる手法である Transient state monitoring (TRAST 法)を用いて、RNA の立体構造の一つであるグアニン四重鎖<sup>\*1</sup> (G-quadruplex; 以下 Gq) の生細胞内検出に成功しました。まず溶液における検証から、RNA の 5'末端に標識した赤外蛍光シアニン色素である Alexa Fluor 647 の光異性化状態は、Gq 構造となると蛍光明滅の速度が遅くなることに加え、蛍光を発する分子の割合が非 Gq 構造状態よりも増加することが分かりました。さらに生細胞内において RNA 分子の運動性が溶液中よりも低下した状態であっても、TRAST 法を用いることで細胞内へ導入した蛍光標識 RNA の Gq 構造を読み出すことに成功しました。

RNA の中に形成された Gq 構造は、遺伝子の転写、タンパク質への翻訳を制御するなど種々の生理的機能の調節に関与すると共に、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) やがんなどの疾患との関与が示唆されるなど、様々な生理恒常性維持や疾患の原因として着目されており、その構造状態を生きた細胞の中で計測可能な検出手法の確立は世界的にもインパクトの大きなものです。

なお、本研究成果は、2023 年 1 月 18 日（水）公開の Nucleic Acids Research 誌にオンライン掲載されました。



シアニン色素（図中★）で標識された GGGGCC 四回繰り返し RNA の配列と構造。（左）ヘアピン構造。（右）カリウムイオンの存在下で形成されるグアニン四重鎖構造。蛍光明滅の頻度を各図下のマゼンタ色の線で示す。

## 【背景】

Gq は、DNA 及び RNA の核酸においてみられる特徴的な立体構造です。グアニンに富んだ塩基配列 (GGGXXX; X は任意の塩基) が 4 回以上繰り返し、カリウムイオンが存在したとき、Gq 形成の条件を満たします。RNA の Gq は細胞内における転写や翻訳の制御に関与しており、神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) やがんなど疾患発症への関与が示唆されるなど、恒常性維持から疾患の原因としても着目されています。従って、Gq 構造が細胞内のいつどこで形成されるのかについては、そのような恒常性維持機構や疾患原因の解明を行う上で、重要な課題と考えられています。

しかしながら、生きた細胞の中でリアルタイムに Gq 構造検出を行う実験系はとても限定的なものでした。例えば、Gq 構造に結合したときに蛍光を発する試薬が存在しますが、特定の RNA 配列を区別して Gq 構造を検出することは不可能です。また、溶媒に露出した塩基を修飾する手法と次世代シーケンサー技術を組み合わせることで、立体構造を形成していた塩基配列部位を検出するという方法が知られていますが、生細胞内において Gq 構造をリアルタイムに検出するための手法ではありません。あるいは、核磁気共鳴 (NMR) 信号を生細胞内から直接得るという方法 (In-cell NMR) では、極めて多量の RNA が必要で測定時間が数時間以上かかるなど、ローコストで高い時間分解能による計測を行うことが困難でした。

そこで本研究では、ローコスト、リアルタイムかつ高い時間分解能で生細胞において特定 RNA 配列の Gq 構造を蛍光ベースで検出する手法を確立することにしました。

## 【研究手法】

本研究成果では、Gq 構造を形成することが知られており、ALS の原因としても知られている配列である GGGGCC の 2、4、8 回繰り返し RNA である  $r(G4C2)_2$ 、 $r(G4C2)_4$ 、 $r(G4C2)_8$  の 5' 末断端にシアニン蛍光色素の一つである Alexa Fluor 647 を標識したものを用意しました。Gq を形成しない対照配列として、AAAAUU の 2、4、8 回繰り返し RNA である  $r(A4U2)_2$ 、 $r(A4U2)_4$ 、 $r(A4U2)_8$  にも同様に Alexa Fluor 647 を標識したものを用意しました。これら RNA を含む溶液を蛍光相関分光法 (FCS)<sup>\*2</sup> 及び Transient state monitoring (TRAST 法、図 1) で解析しました。さらに、これら蛍光標識 RNA を生細胞内へ導入し、TRAST 法で解析しました。

## 【研究成果】

シアニン色素のトランス-シス光異性化<sup>\*3</sup>による蛍光明滅状態は、 $r(G4C2)_4$  が Gq 構造を形成した時に有意に遅くなり、また蛍光を発するトランス異性体状態が多発することが分かりました。また生細胞内においても同様に蛍光明滅状態変化から  $r(G4C2)_4$  の Gq 構造の存在をリアルタイムに測定可能であることが分かりました。これは Gq を形成したことにより、5' 末端のシアニン色素が立体障害を受けることに加え、核酸塩基との相互作用を介してトランス体が安定化するためと考えられます。これは小さな色素の光物理化学状態変化を測定することにより、細胞内で直接可視化することが困難な RNA の分子構造変化を読み取り可能であることを実証した重要な成果です。

また、 $r(G4C2)_4$  はナトリウムイオン存在下では Gq ではなくヘアピン構造を形成することが知られていますが、この状態では Alexa Fluor 647 の光異性化状態は Gq 状態のそれと明確に区別されることが実証できました。さらに生細胞内では、TRAST 法を使うことで蛍光明滅状態がより定量的に測定できたことで、Gq 構造の同定が可能なが分かりました。

$r(G4C2)_8$  は塩基配列上、Gq 構造を最大 2 か所で形成できますが、連続した四つの GGGGCC 配列が必要なことから、配列の組み合わせ上、1~2 か所の Gq が形成された状態が混在すると予想されま

す。実際、FCS 及び TRAST 法で測定した  $r(G4C2)_8$  に標識された Alexa Fluor 647 の光異性化状態は、他の  $r(G4C2)_2$ 、 $r(A4U2)_2$ 、 $r(A4U2)_4$ 、 $r(A4U2)_8$  よりも遅く、 $r(G4C2)_4$  より速かったことから、実際の試料においても Gq 構造の混在が示唆されました。また生細胞内においてはその違いがそれほど顕著に検出されなかったことから、細胞内で  $r(G4C2)_8$  は  $r(G4C2)_4$  ほど画一的な Gq 構造を形成していないことが考えられます。

さらに、GGGGCC とは異なる Gq 形成配列である GGGUUA の四回繰り返し RNA についても検証したところ、本法を用いて生細胞内における Gq 構造の安定性を評価可能なことが示唆されました。

## 【今後への期待】

本成果により確立された方法は、従来の方法よりも簡便かつ核酸配列特異的に Gq 構造を判別可能であることから、迅速な計測手法としての利用価値があると考えられます。また例えば ALS やがんの病因細胞内で Gq 構造がいつどこでどの程度形成されているのかは重要な検証事項です。これらの検証を行うための基盤的技術として本手法が利用可能と考えられます。

また本研究で用いた  $r(G4C2)_4$  は、ALS の原因タンパク質である TDP-43 の凝集形成を抑制することが研究グループの別研究から示されており、凝集抑制に働く RNA 構造を明らかにすることが近々の課題であると考えられます。それにより、ALS など疾患における Gq 構造とその構造変化が実際の細胞内タンパク質恒常性（プロテオスタシス）にどのような影響を与えているのかが明らかになると期待されます。また、様々な核酸の生細胞内構造を検出するための一般的手法になることも考えられます。

## 【謝辞】

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業・国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）（課題名：タンパク質恒常性による運動機能および寿命制御機構の解明、代表者：北村 朗）（16KK0156）、新学術領域研究『情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理』・公募研究（課題名：蛍光動的消光測定による生細胞内 RNA 立体構造の情報物理解析、代表者：北村 朗）（22H04826）、基盤研究（C）（課題名：神経変性疾患に関連したタンパク質凝集形成を防ぐシャペロン RNA の実証、代表者：北村 朗）（18K06201）、国立研究開発法人日本医療研究開発機構・革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ（AMED-PRIME）・研究開発領域「プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出」（課題名：細胞内プロテオスタシスを維持するシャペロン RNA の作動機序解明、代表者：北村 朗）（JP22gm6410028）、国立研究開発法人日本医療研究開発機構・異分野融合型研究開発推進支援事業（課題名：ALS におけるタンパク質凝集とその毒性を抑制する低分子 RNA の薬剤性質解析、代表者：北村 朗）（JP22ym0126814）、公益財団法人「蓬庵社」・研究助成（代表者：北村 朗）、公益財団法人「萩原学術振興財団」・研究助成（代表者：北村 朗）、公益財団法人「中谷医工計測技術振興財団」・技術開発研究助成（代表者：北村 朗）、公益財団法人「キャノン財団」・研究助成（代表者：北村 朗）、北海道大学 L-Station 研究支援（代表者：北村 朗）などの支援を受けて行われました。

## 論文情報

論文名 Trans-cis isomerization kinetics of cyanine dyes reports on the folding states of exogeneous RNA G-quadruplexes in live cells (シアニン色素のトランス-シス異性化速度論を用いた生細胞内外来 RNA のグアニン四重鎖フォールディング状態解析)

著者名 北村 朗<sup>1</sup>、Johan Tornmalm<sup>2</sup>、Bariş Demirbay<sup>2</sup>、Joachim Piguet<sup>2</sup>、金城政孝<sup>1</sup>、Jerker Widengren<sup>2</sup> (<sup>1</sup>北海道大学大学院先端生命科学研究院、<sup>2</sup>スウェーデン王立工科大学応用物理学部)

雑誌名 Nucleic Acids Research (分子生物学・核酸学の専門誌)

DOI 10.1093/nar/gkac1255

公表日 2023年1月18日(水)(オンライン公開)

## お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院 講師 北村 朗 (きたむらあきら)  
TEL 011-706-9542 FAX 011-706-9045 メール akita@sci.hokudai.ac.jp  
URL <https://altair.sci.hokudai.ac.jp/infmcd/index.html>

## 配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)  
TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

## 【参考図】

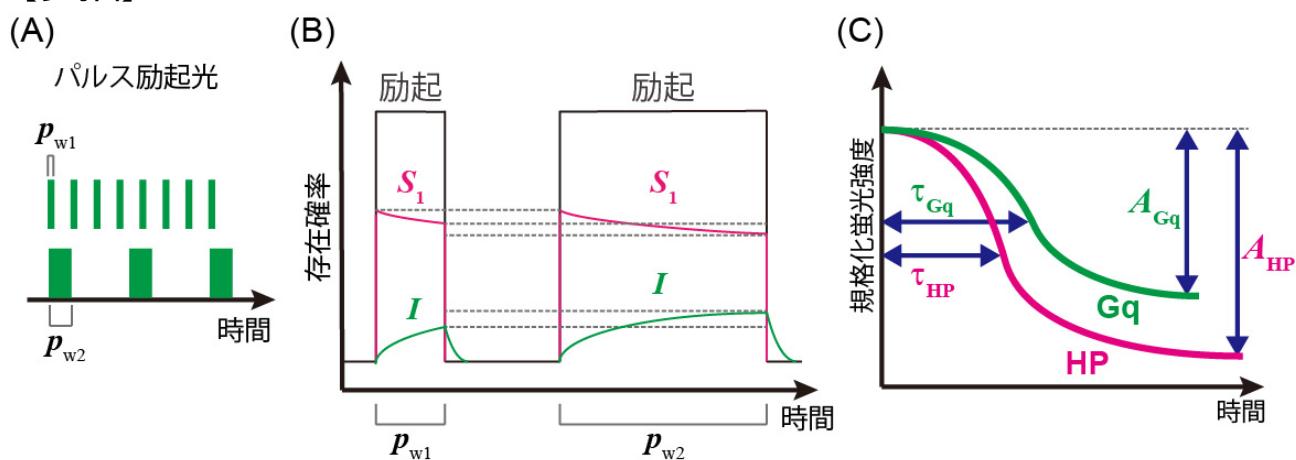


図1 TRAST法の概要 (A) パルス励起光。照射時間の異なる励起光 ( $p_{w1}$ ,  $p_{w2}$ , ...) を規則的に発振する様子。(B) (A)のように発振した励起光が照射されたときの光励起状態の存在確率。 $S_1$ は励起状態。 $I$ は光異性化状態。(C) 計測された TRAST カーブの概形図。 $Gq$ 構造のとき、ヘアピン (HP)と比べて、標識したシアニン色素の蛍光明減速度が遅くなり ( $\tau_{Gq} > \tau_{HP}$ )、消光割合は減少 (発光割合が増加) する ( $A_{Gq} < A_{HP}$ )。

## 【用語解説】

- \*1 グアニン四重鎖 … 4つのグアニンにより形成される平面構造がカリウムイオンなどのモノカチオンを囲むように重なり合っている核酸の特殊構造のこと。
  
- \*2 蛍光相関分光法 (FCS) … 蛍光強度のゆらぎから蛍光明滅状態や蛍光標識分子の運動速度を定量的かつ単一分子感度で解析可能な手法。分子運動速度が極端に遅くなると、蛍光分子が励起光を受ける時間も長くなり蛍光褪色が起きて定量解析が行いにくくなる。
  
- \*3 トランス-シス光異性化 … 炭素原子間の二重結合は平面上で形成される。このとき、炭素骨格の主鎖が反対側につくとトランス型 (シアニン色素では発光できる)、同じ側につくとシス型 (シアニン色素では発光できない) と呼ばれ、この転移が光励起を介して行われるため光異性化という。