生体高分子プローブを利用した RNA 検出システム

遠藤玉樹・小島英理

タンパク質や核酸といった生体高分子は、生命システムを構成・維持するために必須な機能性分子である。これらは、アミノ酸とヌクレオチドという基本単位の繰り返しでありながら、配列の改変や機能単位の組合せによって無限とも言える多様性を生み出すことができる。それゆえに、機能性材料として非常に魅力的な高分子である。

筆者らは、タンパク質と RNA、それぞれの特性を巧みに利用したハイブリッド型の分子プローブを用いて、特定配列を有する RNA の検出法を開発してきた^{1), 2)}。図 1 には、開発したタンパク質-RNA ハイブリッドの基本的な構成要素を示してある。まず、発光タンパク質であるルシフェラーゼの N 末端ドメインと C 末端ドメインの間に Tat ペプチドを挿入したタンパク質プローブを作製する。Tat ペプチドはウイルス由来の RNA 結合ペプチドであり、TAR-RNA と呼ばれる RNA を特異的に認識して結合する。また、RNA への結合に伴いペプチド構造が大きく変化することが知られている。この Tat 挿入ルシフェラーゼは、TAR-RNA への結合とそれに続く Tat ペプチドの構造変化に伴い、ルシフェラーゼ活性を大きく上昇させた。そのため、ルシフェラーゼの発光シグナルを指標に高感度な TAR-RNA 検出が可能である。

次に、このタンパク質-RNA ハイブリッドを特定配列の RNA 検出に適用させるため、TAR-RNA を 2 本に分割し、それぞれの末端に検出したい標的 RNA 配列の相補配列を付け加えた。これら 2 本の分割 TAR-RNA プローブは、標的 RNA 配列の隣接部位に結合して 3 本の RNA からなる複合体を形成する。すると、TAR-RNA の分割断片もつられて近接し、Tat ペプチドの結合部位が再構成されて Tat 挿入ルシフェラーゼが再度結合できるようになる。つまり、この 3 本の RNA からなる複合体に結合した Tat 挿入ルシフェラーゼの発光シグナルを指標に、標的 RNA の検出を行うことができる (図 2a)。Tat 挿入ルシフェラーゼを分割 TAR-RNA プローブおよび標的 RNA とともに混合した結果、標的 RNA を特異的かつ高感度に検出することができた (図 2b)。

ここで紹介したタンパク質-RNA ハイブリッド型の分子プローブでは、RNA 側の配列を変化させるだけでどのような配列も検出可能になる。また、タンパク質と RNA

図 1 タンパク質-RNA ハイブリッド型分子プローブの構成要素

Tat 挿入ルシフェラーゼは TAR-RNA と特異的に結合し、Tat ペプチドの構造変化を起点としてルシフェラーゼ活性を上昇させる。

図 2 タンパク質-RNA ハイブリッド型分子プローブによる RNA 検出

a) 基本原理: 分割 TAR-RNA プローブが標的 RNA に結合し、Tat ペプチドの結合部位が再構成される。ここに Tat 挿入ルシフェラーゼが結合すると活性が上昇する。b) 特定配列を有する標的 RNA の検出。

という生体高分子のみからなるプローブであるため、生細胞内での発現が容易である。現在筆者らは、生細胞内での RNA 検出を試みている。

文 献

- 1) T. Endoh, M. Mie, H. Funabashi, T. Sawasaki, Y. Endo, E. Kobatake: *Bioconjug. Chem.*, **18**, 956 (2007)
- 2) T. Endoh, H. Funabashi, M. Mie, E. Kobatake: *Anal. Chem.*, **77**, 4308 (2005)

Tamaki ENDOH 岡山大学大学院自然科学研究科・助教, 博士(工学)。専門は生体機能工学。

Eiry KOBATAKE 東京工業大学大学院生命理工学研究科・准教授, 工学博士。専門はタンパク質工学, 細胞工学。
RNA Detection System Using Protein-RNA Hybrid Probe