

チオフラビン T による RNA 代謝の高感度モニタリング法

High Sensitive Method for Monitoring RNA Metabolism

杉 本 真 也 *

SHINYA SUGIMOTO*

東京慈恵会医科大学医学部細菌学講座 〒105-8461 東京都港区西新橋港区 3-25-8

* TEL: 03-3433-1111

* E-mail: ssugimoto@jikei.ac.jp

Department of Bacteriology, The Jikei University School of Medicine,
3-25-8, Nishi-Shimbashi, Minato-Ku, Tokyo 105-8461, Japan

キーワード: チオフラビン T, RNA, アミロイド線維, persister, PNPase

Key words: Thioflavin T, RNA, amyloid fibrils, persister, PNPase

(原稿受付 2016 年 7 月 25 日 / 原稿受理 2016 年 8 月 1 日)

1. はじめに

ある特定の細胞における遺伝子発現の揺らぎが、形態形成・発生・分化・環境ストレス応答などのプロセスに大きく影響することが明らかとなり、多彩な生命現象における分子や細胞の確率的変動(揺らぎ)の重要性が近年認識されるようになってきた。このような概念の誕生には、1 分子・1 細胞レベルでの解析技術の進展が大きく寄与している。しかし、そういう観点からの解析は遺伝子組換えが容易に行えるモデル生物を用いた研究が主流であり、幅広い生物種について研究するためには、汎用性の高い研究ツール・手法の開発が必要である。近年、筆者らはアミロイド線維の検出・診断用の蛍光プローブとして汎用されているチオフラビン T が RNA にも結合することを発見した¹⁴⁾。本稿では、チオフラビン T を用いた *in vitro* における RNA 代謝酵素の活性測定と、細菌における RNA の量的変動の可視化について紹介する。

2. チオフラビン T

蛍光プローブであるチオフラビン T (Thioflavin T; 4-(3,6-dimethyl-1,3-benzothiazol-3-ium-2-yl)-N,N-dimethylaniline chloride) は (図 1A), アミロイド線維の選択的な検出・診断において“gold standard”として広く用いられている¹⁾。アミロイド線維は、アルツハイマー病やプリオン病などのタンパク質ミスフォールディング病に共通して見られる線維状のタンパク質不溶性凝集体である。また、アミロイド線維は分子内に β シート構造を多く含み、SDS などの変性剤に対して極めて難溶性である。チオフラビン T は溶液中に遊離して存在する場合、ほとんど蛍光を発しないが、アミロイド線維に結合すると

非常に強い蛍光(励起波長 385–450 nm, 蛍光波長 445–492 nm)を発するため、洗浄の操作なしで直接蛍光を測定することが可能である(図 1B)。チオフラビン T は臨床検体におけるアミロイドの診断のみならず、基礎研究においても非常に有用なツールとなっており、アミロイド線維の形成過程を高感度かつリアルタイムで解析する上でも利用されている^{7,12)}。また、チオフラビン T は水への溶解性が高く、アミロイド線維への親和性が適度(数百 nM~数 μ M)であるため、様々な実験系に利用されている。一方、チオフラビン T のアミロイド線維への結合様式は十分に理解されていない。アミロイド線維は不溶性かつ不均一な分子であるため、X 線結晶構造解析や溶液核磁気共鳴スペクトル解析が適用できない。これまで、*in silico* でのシミュレーションやアミロイド線維を模倣したモデルペプチドを用いた実験から、チオフラビン T のアミロイド線維への結合様式を推定する試みはなされているものの、原子レベルでの理解には至っていない¹⁾。

近年、チオフラビン T がグアニン四重鎖(G-quadruplex) DNA を検出する蛍光センサーとして利用できることが報告され^{5,11,13)}、アミロイド以外の研究分野における応用性にも注目が集まっている。グアニン四重鎖は、グアニン塩基を多く含む 1 本鎖の核酸の中の異なる位置の 4 つのグアニンが、特殊な水素結合によりコンパクトな正方形へと折り畳まれて形成される(図 1A)。生体内での機能や形成メカニズムは明らかになっていないが、真核生物の DNA 鎖の端にあって DNA を保護しているテロメアはグアニンを多く含み、グアニン四重鎖を形成することが示されている。それ以外にも、発癌作用のある遺伝子の発現調節に関わるゲノム領域や mRNA の非翻訳領域にもグアニン四重鎖を形成する配列が存在することが示唆されており、遺伝子発現の調節に関与することが

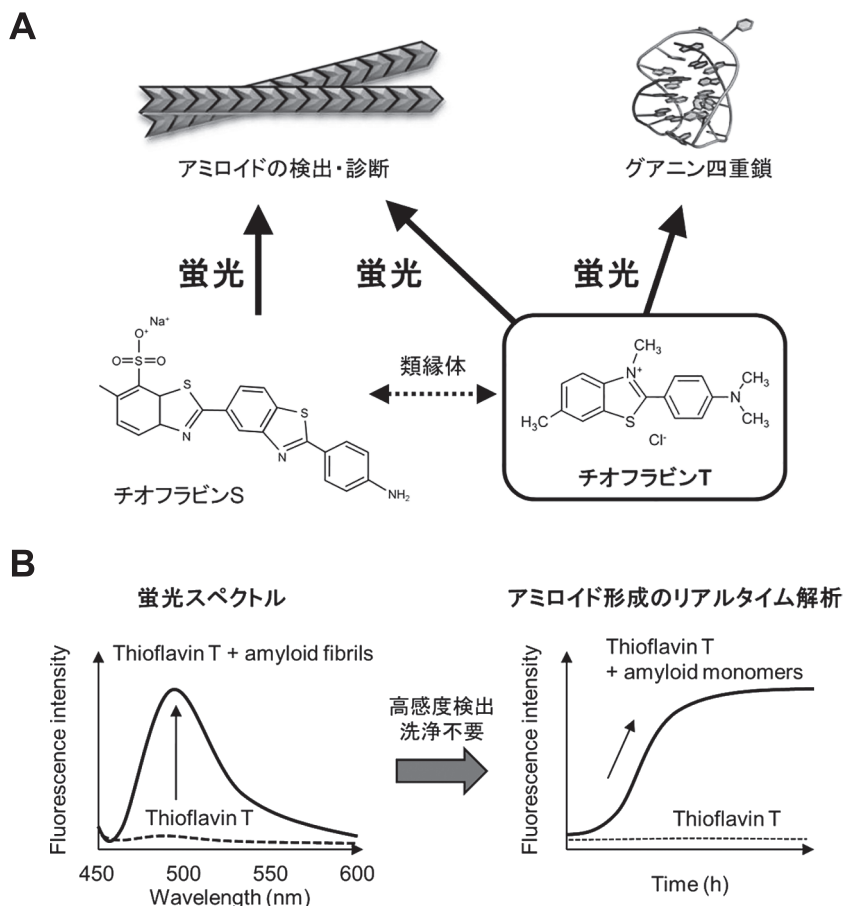


図 1. チオフラビン T の特性。

A) 従来のチオフラビン T の用途。

B) チオフラビン T を用いたアミロイドの検出例。

予想されている³⁾。チオフラビン T のグアニン四重鎖への結合様式もまた十分には理解されておらず、今後の研究の進展に期待したい。

3. *in vitro* における RNA の検出

筆者らは、大腸菌が産生するアミロイド線維に関する研究の過程で、チオフラビン T が RNA にも結合することを偶然発見した。チオフラビン T の核酸への結合能を調べた結果、DNA (大腸菌ゲノム DNA) より RNA (大腸菌トータル RNA) に結合しやすいことを見出した (図 2A)。RNA の濃度依存性を調べたところ、少なくとも 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ~10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲において蛍光強度に直線性が見られ、RNA を定量的に検出できることが示された (図 2B, C)。次に、ポリリボヌクレオチドを用いてチオフラビン T の反応特異性を調べたところ、ポリ A あるいはポリ G と混合した場合に蛍光強度の増大が見られたが、ポリ U やポリ C 存在下では蛍光強度に変化は見られなかった (図 2D)。このことから、チオフラビン T はプリン塩基を多く含む RNA に結合することがわかった。また、25 塩基の RNA (A25) よりも 50 塩基の RNA (A50) のほうがチオフラビン T の蛍光強度が格段に高いことから (図 2E)、ある一定の長さの RNA がチオフラビン T の結合に必要であることが示された。

一方、アミロイド検出用の蛍光プローブとして汎用されているチオフラビン S は RNA とは反応しなかった。このことから、チオフラビン T はアミロイド線維とは異なる様式で RNA に結合することが予想される。今後、チオフラビン T と RNA の複合体の構造が明らかになれば、チオフラビン T の特異性や反応様式の理解が一層深まり、より感度と選択性の高い RNA 検出プローブの開発に繋がると思われる。

4. RNA 代謝酵素の活性測定

これまで RNA 代謝酵素の活性測定には、放射性同位元素などで標識した基質 (RNA もしくはリボヌクレオチド) を用いたアクリルアミドゲル電気泳動による解析が主流であったが、取り扱いが煩雑で時間がかかり、リアルタイムでの観察が困難であった。上述のとおり、チオフラビン T を用いることで RNA を迅速かつ定量的に検出できることが明らかとなったため、筆者らはチオフラビン T を利用することで、*in vitro* における RNA 代謝酵素の活性をリアルタイムかつハイスループットに評価できると考えた。本稿では、大腸菌の polynucleotide phosphorylase (PNPase; E.C. 2.7.7.8) を用いた解析例を紹介する。PNPase は、ホモ 3 量体を形成し、5' to 3' oligonucleotide polymerase 活性と 3' to 5' phosphorolytic

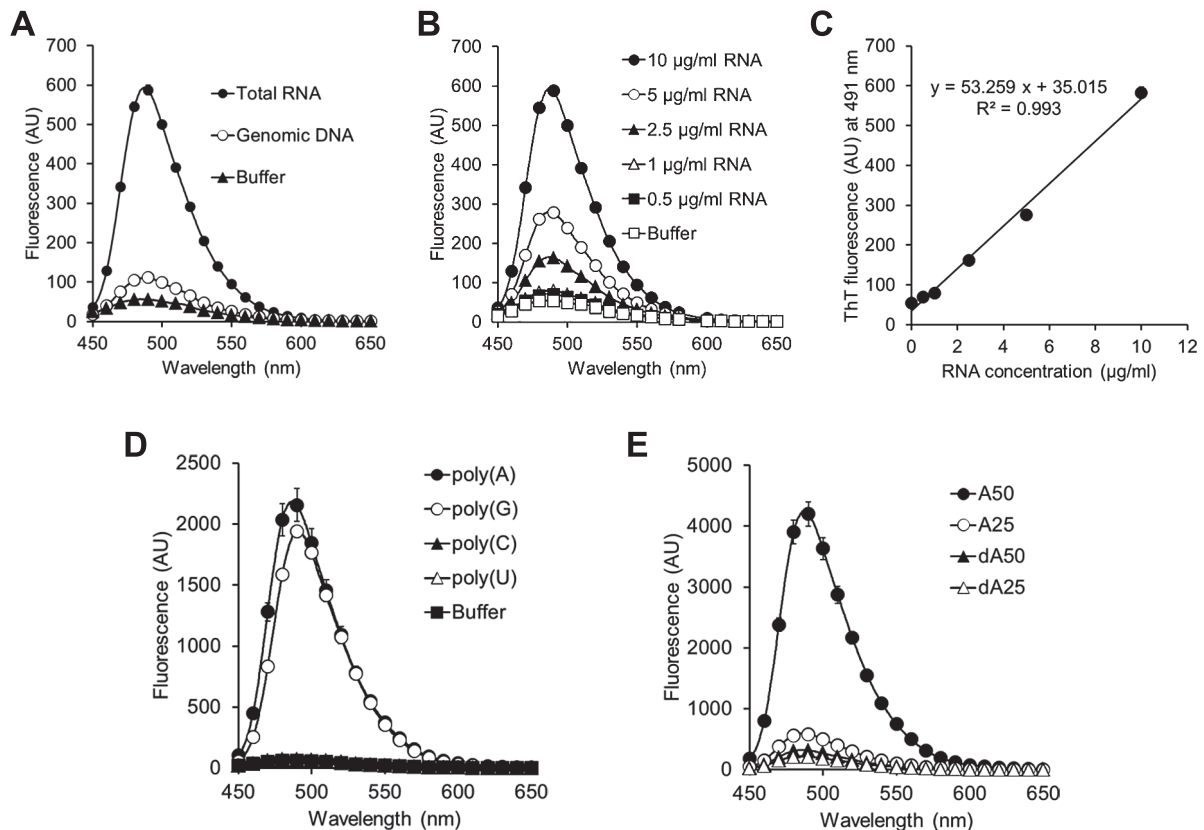


図2. チオフラビン T を用いた RNA の検出。

- A) 大腸菌ゲノム DNA とトータル RNA のチオフラビン T 蛍光スペクトル。それぞれ 10 $\mu\text{g/ml}$ となるように調製した。
 B) RNA の濃度依存的なチオフラビン T 蛍光の増加。
 C) 491 nm の蛍光強度を RNA 濃度に対してプロットした。
 D) ポリリボスクレオチドに対するチオフラビン T の反応特異性。
 E) 鎖長の異なるオリゴリボスクレオチドおよびオリゴデオキシリボスクレオチドに対するチオフラビン T の反応特異性。それぞれ 10 $\mu\text{g/ml}$ となるように調製した。

exoribonuclease 活性を有する bifunctional な RNA 代謝酵素である (図 3A)⁴⁾。リボスクレオチド二リン酸濃度が高く、無機リン酸濃度が低い場合には、RNA の 3' 末端にリボスクレオチド二リン酸を付加する (RNA の重合反応)。一方、ヌクレオチド二リン酸濃度が低く、無機リン酸濃度が高い場合には、RNA の 3' 末端からリボスクレオチド二リン酸を遊離させる (RNA の分解反応)。まず、チオフラビン T 存在下で様々な濃度 (50–500 nM) の野生型 PNPase (PNPase^{WT}) と 1 mM ADP をバッファー中で混合し、25°C でインキュベートしながら蛍光強度 (emission: 438 nm/excitation: 491 nm) の変化をリアルタイムでモニターした。その結果、時間とともに蛍光強度の増加が確認され (図 3B)、最大反応速度と PNPase 濃度の間には高い正の相関が認められた (相関係数: 0.994) (図 3C)。一方、RNA の重合・分解活性を失う変異型 PNPase (PNPase^{R398D/R399D})⁶⁾ では、蛍光強度の増加は見られなかった (図 3D)。これらのことから、ポリ A の合成過程をリアルタイムかつ定量的にモニターできることが示された。次に、RNA の分解反応への応用を試みた。チオフラビン T 存在下で、PNPase^{WT} あるいは PNPase^{R398D/R399D} とポリ A およびリン酸カリウムを混合し、25°C において蛍光強度の変化をリアルタイムでモニターした。その結果、PNPase^{WT} では速やかに蛍光強

度が減少したが、PNPase^{R398D/R399D} ではほとんど変化しなかった (図 3E)。以上より、チオフラビン T を用いることによって、RNA 代謝酵素の活性をリアルタイムかつ定量的に解析できることが示された¹⁴⁾。

5. ヌクレオチド濃度の測定

ATP や ADP などのヌクレオチドの定量には、ルシフェリンールシフェラーゼの反応による生物発光の検出、乳酸脱水素酵素とピルビン酸キナーゼを共役させた NADH に由来する吸光度 (340 nm) の減少を検出する方法、高速液体クロマトグラフィーを用いた方法、キャピラリー電気泳動と質量分析を組み合わせた方法などが用いられている。筆者らは、チオフラビン T の蛍光検出と PNPase の酵素活性を組み合わせることで ADP の濃度を測定できると考えた。チオフラビン T 存在下において異なる濃度の ADP と一定濃度の PNPase を混合し、ポリ A の合成に伴う蛍光強度の増加をモニターした (図 4A)。反応がプラトーに達した段階での蛍光強度を ADP の濃度に対してプロットすると、図 4B に示すように高い正の相関 (相関係数: 0.995) が見られたことから、ADP 濃度を定量的に測定できることが示された¹⁴⁾。

ごく最近では、DNA methyltransferase (E.C. 2.1.1.72)⁸⁾、

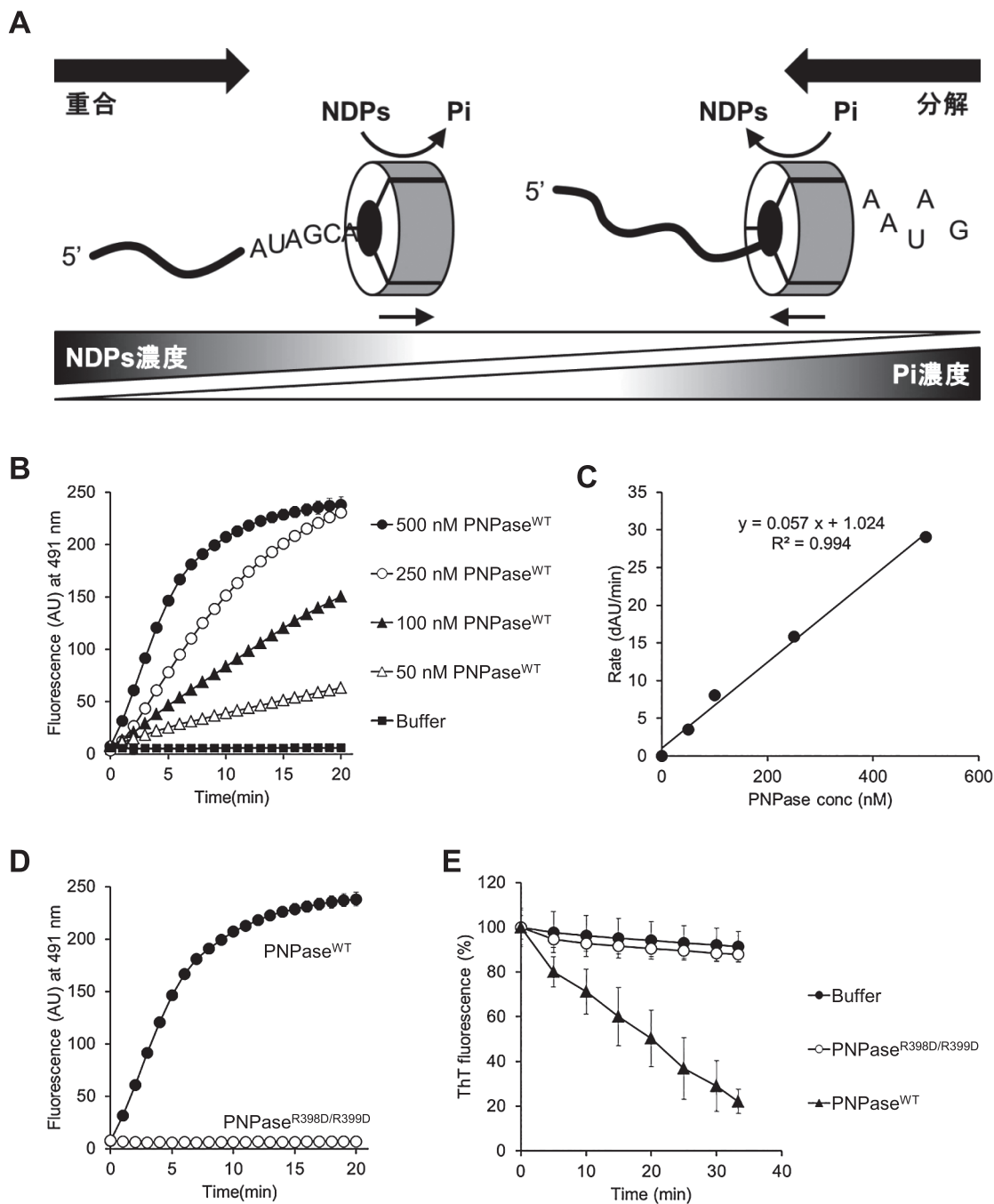


図 3. チオフラビン T を用いた PNPase の酵素活性の測定。

- A) PNPase の反応モデル。
 B) チオフラビン T を用いた PNPase の濃度依存的なポリ A 合成の解析。
 C) 最大反応速度を PNPase 濃度に対してプロットした。
 D) PNPase^{WT} と PNPase^{R398D/R399D} のポリ A 合成活性の比較。
 E) PNPase^{WT} と PNPase^{R398D/R399D} のポリ A 分解活性の比較。

T4 polynucleotide kinase/phosphatase (E.C. 2.7.1.78)¹⁵⁾, DNA polymerase (EC 2.7.7.7)⁹⁾ などの酵素の活性をリアルタイムで解析する上でもチオフラビン T が利用可能なことが示されている。今後、さらに核酸研究分野においてチオフラビン T の利用価値が高まると予想される。

6. 細菌内 RNA の量的変動のモニタリング

チオフラビン T は *in vitro* において大腸菌のゲノム DNA よりもトータル RNA に結合して強い蛍光を発することが示されたため (図 2A), 大腸菌の細胞内 RNA の量的変動を可視化することにもチオフラビン T を利用できると予想した。まず、細胞分裂が異常で長い線維状の形態を示す大腸菌 *ftsZ84* 変異株をチオフラビン

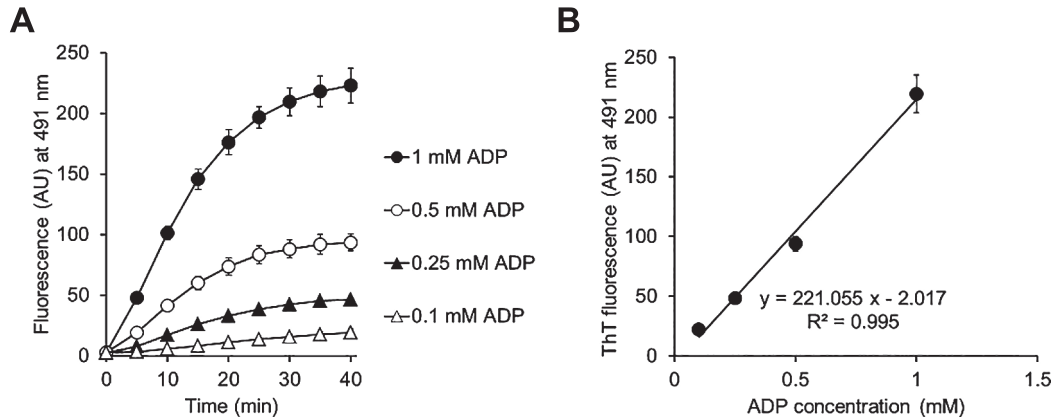


図4. チオフラビン T を用いた ADP の定量。

A) 異なる濃度の ADP を用いた場合の PNPase によるポリ A 合成。200 nM の PNPase を用いた。
B) 反応 40 分後の蛍光強度 (491 nm) を ADP 濃度に対してプロットした。

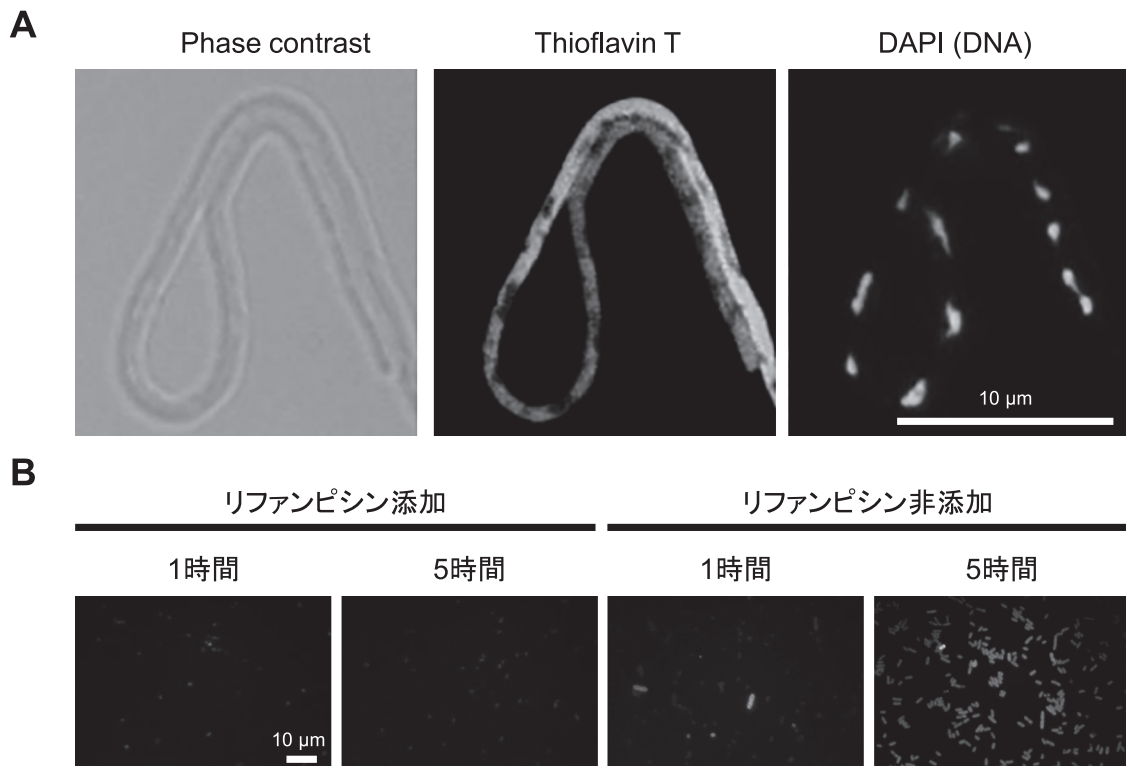


図5. チオフラビン T を用いた大腸菌内 RNA レベルの可視化。

A) チオフラビン T と DAPI で共染色した大腸菌 *ftsZ84* 変異株の蛍光顕微鏡像。
B) リファンピシン処理した後にチオフラビン T で染色した大腸菌 K-12 株の蛍光顕微鏡像。コントロールとして、リファンピシンを添加しなかったものを用いた。

T と DAPI で共染色し、蛍光顕微鏡で観察した。チオフラビン T に由来する蛍光は細胞質において観察され、その局在は明らかに核様体とは異なるものであった (図 5A)。このことから、チオフラビン T は細胞質の DAPI で染色される核様体以外の成分に結合することが示唆された。次に、リファンピシンで RNA 合成を阻害した大腸菌とチオフラビン T を混合した。この場合、蛍光強度の増大は観察されなかったことから (図 5B)、チオフラビン T は菌体内の RNA、特に mRNA と結合することが示された。

薬剤感受性菌に由来する“persister”と呼ばれるごく少

数の菌は、休眠状態にあって mRNA やタンパク質の合成が低下しており、薬剤寛容性 (トレランス) を示す。そのため、persister の識別は臨床的に極めて重要である²⁾。そこで、チオフラビン T を用いることで persister を識別できるかを検討した。ゲノムから *RpoS::mCherry* を発現する株 (MG1655 *rpoS::mcherry*)¹⁰⁾ を併用することで、通常の状態から persister へ変化する様子を経時的にモニターすることができた¹⁴⁾。さらに、チオフラビン T を用いた菌体内 RNA の量的変動を可視化する方法は、大腸菌のみならず、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、バチルス属細菌、コレラ菌、緑膿菌など様々な細菌にも

適用可能であった¹⁴⁾。チオフラビン T は RNA 代謝をモニタリングできる濃度でこれらの細菌の生育を阻害しなかったことから、ライブセルイメージングにも応用できると考えられる。

7. おわりに

チオフラビン T を用いることで、*in vitro* において RNA 代謝酵素の活性を簡便かつリアルタイムで測定できただけでなく、多様な生命現象に関わる遺伝子発現の揺らぎを 1 細胞レベルで観察でき、ライブセルイメージングへ応用できる可能性が示された¹⁴⁾。また、バイオフィーム内における RNA 代謝の時空間的変動などについても本手法が応用できることが示されている（杉本ら未発表データ）。今後、さらに様々な研究分野において応用され、未解明の課題を解明する上での一助になることを期待したい。

最後に本稿で紹介した研究は、熊本大学発生医学研究所分子細胞制御分野（小椋光教授）、ドイツハイデルベルク大学 ZMBH（Bernd Bukau 教授）、東京慈恵会医科大学医学部細菌学講座（水之江義充教授）において遂行され、その一部は日本学術振興会特別研究員（PD）奨励費、日本学術振興会優秀若手研究者海外派遣プログラム、日本学術振興会科学研究費補助金若手研究（B）、同若手研究（A）、熊本大学発生医学研究所共同利用・共同研究拠点「発生医学の共同研究拠点」による研究費・旅費支援、ならびに私立大学戦略的研究基盤形成支援事業によるサポートを受けました。ここに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Biancalana, M. and S. Koide. 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta* 1804: 1405–1412.
- 2) Bigger, J. 1944. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet* 244: 497–500.
- 3) Burge, S., G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd, and S. Neidle. 2006. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.* 34: 5402–5415.
- 4) Carpousis, A.J., G. Van Houwe, C. Ehretsmann, and H.M. Krisch. 1994. Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* 76: 889–900.
- 5) Gabelica, V., R. Maeda, T. Fujimoto, H. Yaku, T. Murashima, N. Sugimoto, and D. Miyoshi. 2013. Multiple and cooperative binding of fluorescence light-up probe thioflavin T with human telomere DNA G-quadruplex. *Biochemistry* 52: 5620–5628.
- 6) Jarrige, A., D. Bréchemier-Baey, N. Mathy, O. Duché, and C. Portier. 2002. Mutational analysis of polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 321: 397–409.
- 7) LeVine, H. III. 1993. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 2: 404–410.
- 8) Ma, C., H. Liu, W. Li, H. Chen, S. Jin, J. Wang, and J. Wang. 2016. Label-free monitoring of DNA methyltransferase activity based on terminal deoxynucleotidyl transferase using a thioflavin T probe. *Mol. Cell. Probes* 30: 118–121.
- 9) Ma, C., H. Liu, J. Wang, S. Jin, and K. Wang. 2016. Label-free molecular beacon for real-time monitoring of DNA polymerase activity. *Anal. Bioanal. Chem.* 408: 3275–3280.
- 10) Maisonneuve, E., M. Castro-Camargo, and K. Gerdes. 2013. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* 54: 1140–1150.
- 11) Mohanty, J., N. Barooah, V. Dhamodharan, S. Harikrishna, P.I. Pradeepkumar, and A.C. Bhasikuttan. 2013. Thioflavin T as an efficient inducer and selective fluorescent sensor for the human telomeric G-quadruplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 135: 367–376.
- 12) Naiki, H., K. Higuchi, M. Hosokawa, and T. Takeda. 1989. Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.* 177: 244–249.
- 13) Renaud de la Faverie, A., A. Guédin, A. Bedrat, L.A. Yatsunyk, and J.L. Mergny. 2014. Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation. *Nucleic Acids Res.* 42: e65.
- 14) Sugimoto, S., K. Arita-Morioka, Y. Mizunoe, K. Yamanaka, and T. Ogura. 2015. Thioflavin T as a fluorescence probe for monitoring RNA metabolism at molecular and cellular levels. *Nucleic Acids Res.* 43: e92.
- 15) Zhou, F., G. Wang, D. Shi, Y. Sun, L. Sha, Y. Qiu, and X. Zhang. 2015. One-strand oligonucleotide probe for fluorescent label-free “turn-on” detection of T4 polynucleotide kinase activity and its inhibition. *Analyst.* 140: 5650–5655.