

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12757

研究課題名(和文) オワンクラゲの発光機構を再現する核酸分子

研究課題名(英文) Development of luminescent artificial oligonucleotide having a function of luminescence in *Aequorea victoria*

研究代表者

片岡 正典 (Kataoka, Masanori)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・非常勤講師

研究者番号：10324401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は蛍光性人工ヌクレオシドを含有する核酸アプタマーを開発し、オワンクラゲと等価の発光機構を核酸一分子で実現しようというものである。オワンクラゲは緑色蛍光タンパク質とイクオリンからなる蛍光タンパク質複合体を利用して発光する。本課題では天然の核酸塩基シトシンを2工程で緑色蛍光タンパク質の発光本体であるパラヒドロキシベンジリデンイミダゾリノンに変換し、イクオリンのようにセレンテラジンを認識する核酸アプタマーに組み込んでオワンクラゲの発光機構を核酸分子で再現することを目指した。発光体は完成したが、高い認識能を有する核酸アプタマーは完成せず、発光機構の再現には研究継続が必要である。

研究成果の概要(英文)：This research aims to develop a oligonucleotide aptamer containing a fluorescent artificial nucleoside That has a luminescent function to *Aequorea victoria*. *Aequorea victoria* emits to produce a fluorescent protein complex composed of green fluorescent protein and aequorin. In this investigation, a natural nucleobase cytosine is converted to p-hydroxybenzylideneimidazolinone which is the luminescent body of green fluorescent protein, and searched for oligonucleotide sequences which recognizes coelenterazine like aequorin. The synthesis of luminescent material was completed, but the aptamer sequences with high recognizing ability was not completed, and it is necessary to continue the research.

研究分野：核酸化学

キーワード：人工核酸 RNAアプタマー 発光ヌクレオシド

1. 研究開始当初の背景

発光生物として知られるオワンクラゲの発光機構は、2種類の蛍光タンパク質が協調して緑色発光に至るタンデム機構であることが明らかとされている。カルシウム濃度に応答して内包する発光色素セレンテラジンを活性化し青色光を発するイクオリンと、青色光で励起されて緑色に発光する緑色発光タンパク質が協同的に作用するユニークな発光機構は、未だ多くの研究者の興味を引いている。イクオリンのカルシウムイオン感受性は細胞の生理機能を可視化する応用研究に利用され、GFPの色素本体であるイミダゾリジノン環はタンパク質中のセリン-チロシン-グリシン配列から構造変換される自家生産型発光体であり、基質や補因子がなくとも幅広いpH範囲で安定に発光するため、GFPをコードする遺伝子をレポーター遺伝子とする細胞イメージングに広く利用される。

2. 研究の目的

申請者らは抗体様物質であるRNAアプタマーに注目し、セレンテラジンを内包するRNAアプタマーがイクオリンのミミックになり、自身が開発したGFPの発光色素本体と等価な構造を有するヌクレオシドをGFPのミミックとして同一のRNA内に組み込むことでオワンクラゲの発光機構を人工核酸一分子で実現できると考えた。申請者は、GFPのイミダゾリジノン環と等価な構造を核酸塩基から変換できることを見出し、RF nucleoside) 青色光で励起され発光する蛍光特性から GFP と等価な機能を有している。これを、抗体のように標的物質を認識して強く結合する核酸分子 RNA アプタマーに適用し、高カルシウム濃度下で発光物質セレンテラジンを取り込み発光する RNA を開発して結合させれば GFP の機能とイクオリンの機能を同一分子内に組み込んだ核酸となり、オワンクラゲの生物発光機構を再現できると考えた。

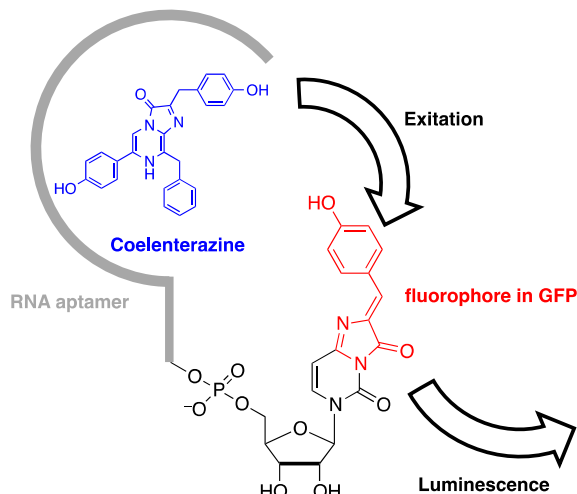


図1. オワンクラゲの発光機構を再現する核酸分子の概念図。

3. 研究の方法

本課題においては(1)RF nucleosideのRNA合成用モノマー化(2)セレンテラジン認識RNAアプタマーの開拓(3)イミダゾリジノン環を有するヌクレオシドのRNAアプタマーへの導入(4)オワンクラゲ様発光システムの再現、(5)応用技術開発、に細分した実施項目でオワンクラゲの発光機構を再現する人工核酸分子の創出を目指した。

4. 研究成果

シチジンをエテノヌクレオシドに変換したのち、アルドール縮合によって、GFPの発光体と等価のp-ヒドロキシベンジリデンイミダゾリジノン骨格に変換することに成功し、アデノシンも同様の方法でRF nucleoside変換することができた。エテノ化反応については次世代シーケンサー開発における前処理技術に応用可能であり、本合成法を含めた論文発表、学会発表をおこない、本合成法を公開した。このRF nucleosideについて、カルシウム濃度感受的発光特性について調査したが、顕著な特性変化は確認されなかった。RF nucleosideを核酸分子に導入するにあたり、保護基の導入、官能基変換、リン酸化反応をおこなって、オリゴヌクレオチド合成で使用するビルディングブロックの合成に成功した(現在、特許出願、論文投稿準備中)。また、オリゴヌクレオチドを合成するにあたり、RNAアプタマーに安定性を付与するための糖鎖やペプチド導入方について、一般的手法を開発し、論文化、発表をおこなった。

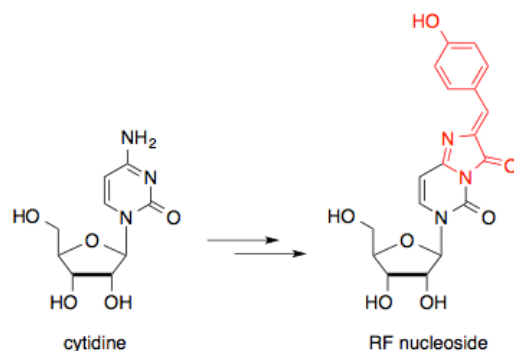


図2. イミダゾリジノン骨格を有するヌクレオシドの合成。

一方で、アプタマーの探索は困難を極めた。当初予定していたRNAアプタマーの探索については採択時研究費の大幅な減額により遂行が困難となった。一般的にRNAアプタマーより機能が劣るとされるDNAアプタマーが安価に探索研究をおこなえることから、これらについて探索をおこなう

こととした。まずは、研究室に整備されている自動合成装置を使用してランダム配列のデオキシリボヌクレオチド40量体（ランダムオリゴライブラリー）を合成し、セレンテラジン結合性DNAの探索研究に利用した。磁性流体に担持したセレンテラジンに対してランダムオリゴライブラリーの中から解離定数  $K_d = 1.0 \text{ mM}$  以下のオリゴヌクレオチド配列を探索したが、実験の再現性が低く、候補配列を特定するのに多くの時間を費やした。最終的に解離定数の上限を数  $K_d = 5.0 \text{ mM}$  として配列を20に絞り込んだが結合力が低いため、アプタマーとしての機能は不十分であった。

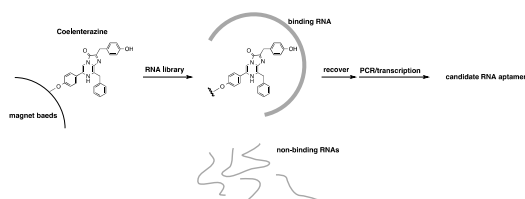


図3．セレンテラジン認識核酸アプタマーの探索工程．

前記発光ヌクレオチドを候補配列の一つの5'末端に組み込むことに成功したが、思い通りの発光機能や、カルシウム濃度応答性は確認されなかった。

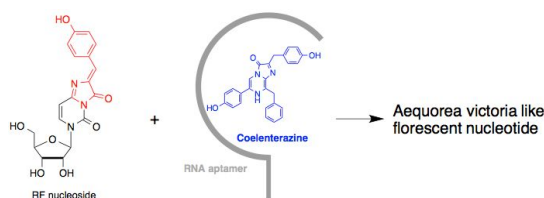


図4．発光ヌクレオチド導入セレンテラジン認識核酸アプタマーの合成工程．

課題終了後も本研究を継続し、解離定数  $K_d = 1.0 \text{ mM}$  以下のRNAアプタマーの探索を早期におこなって、発光機構の獲得と、特性のカルシウム濃度応答性の詳細な調査を実施したい。

## 5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

(1) Masanori Kataoka, Chiharu Fukui, Akiko Mimoto, Hideaki Kuge, Koichi Honke, and Hiyoshizo Kotsuki, A NEW STRATEGY FOR SYNTHESIS OF THE DINUCLEOTIDE pdCpA:

A CONVENIENT METHOD FOR THE DEPROTECTION OF CYANOETHYL, TBDMS, AND BENZOYL GROUPS IN ONE STEP AT HIGH PRESSURE, *HETEROCYCLES*, 査読あり, 91, 2015, 11164-1169D

DOI: 10.3987/COM-15-13223

(2) Masanori Kataoka, Kuniaki Nagayama, Hidehiro Oana, SINGLE MOLECULAR DNA/RNA SEQUENCING WITH MICROSCOPY, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 査読あり, 11, 2016, 83-84

DOI: 10.1016/j.ajps.2015.11.113

[学会発表](計3件)

(1) 片岡正典, アミノアシルヌクレオチドの効率的合成法, CPhI 2015 アカデミックフォーラム, 2015

(2) 片岡正典, 核酸中のすべての塩基を就職する技術, CPhI 2015 アカデミックフォーラム, 2015

(3) 片岡正典, 新規低コスト核酸合成法, 核酸医薬製造技術発表会, 2015

(4) Masanori Kataoka, Single molecular DNA/RNA sequencing with microscope, AFPS2015, 2015 (国際学会)

(5) 片岡正典, 喜多山篤, 安田崇, セグメント縮合によるオリゴヌクレオチド合成, 日本核酸医薬学会第1回年会, 2015

(6) 片岡正典, 本家孝一, 小槻日吉三, 福井千春, GlcNAc-Asn 担持ジヌクレオチドの効率的合成, 第35回糖質学会年会, 2016

(7) Masanori Kataoka, SOLUTION-PHASE NUCLEOTIDE MANUFACTURING TECHNOLOGIES, TIDES 2017, 2017 (国際学会)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片岡正典 (KATAOKA, Masanori)  
神戸大学・大学院科学技術イノベーション  
研究科・非常勤講師  
研究者番号：10324401

### (2) 研究分担者

小野寺健一 (ONODERA, Ken-ichi)  
高知大学・教育研究部総合科学系複合領域  
科学部門・助教  
研究者番号：50500196

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )