

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13716

研究課題名(和文) ボロン酸型RNA結合リガンドの創製に基づく高選択的piRNA定量分析法の開発

研究課題名(英文) Development of boronate affinity electrophoresis for quantitative separation and analysis of Piwi-interacting RNA

研究代表者

西澤 精一 (Nishizawa, Seiichi)

東北大学・理学研究科・教授

研究者番号：40281969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Piwi-interacting RNA (piRNA)は、生殖細胞に特異的に発現しているユニークな小分子RNAで、その構造や機能が特に注目されている小分子RNAの一つである。本研究では、piRNAに特徴的な3'末端塩基の2'-O-メチル化構造に着目し、ポリアクリルアミドゲル担持ボロン酸に基づくアフィニティー電気泳動によるpiRNAの簡便な分離・検出法を開発した。既存のpiRNA定量分析法と比較して、本手法では、total RNAの精製を全く必要とせず、1ステップでの解析が可能であることから、極めて有用なpiRNA定量分析法になりうると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Piwi-interacting RNA (piRNA), single stranded RNA of 26-31 nucleotide length, is a new class of small noncoding RNA which is mainly expressed in the germline. Their 3'-terminal nucleotides feature 2'-O-ribose methylation by 3' methyltransferase HEN1, which can enhance the piRNA stability. It has been known that piRNA plays a key role in the protection of germ cell genomes from the mobile genetic elements, thereby preventing transposon-induced defects in gametogenesis and fertility.

In this work, we have successfully improved boronate affinity electrophoresis for piRNA separation in the biological RNA samples, which is based on specific capture of boronic acid in the gel for cis-diol group in 3' terminal ribose of RNA species other than piRNAs having 2'-O-methylated ribose. Our improved method allows piRNA separation from mouse testes total RNA in a single step manner, revealing the great potential for quantitative separation and analysis of piRNA.

研究分野：分析化学

キーワード：小分子RNA 2'-O-メチルRNA 分離・検出 アフィニティー電気泳動

### 1. 研究開始当初の背景

Piwi-interacting RNA (piRNA) は、2006年に発見された新しいタイプの小分子 RNA であり、生殖細胞に特異的に発現することが他の小分子 RNA (microRNA (miRNA) や small interfering RNA (siRNA)) には見られない特徴である (*Nature*, 2006, 442, 199-202)。また、3'末端塩基のリボース骨格2位ヒドロキシ基がメチル化されているも構造上の特徴である。さらに多くの研究者が注目していることは、他の小分子 RNA が二重鎖の中間体を経て合成されるのに対し、piRNA が RNA 一本鎖のまま合成されていることが明らかになりつつあることで、このため piRNA は生殖細胞において独自の経路で合成されている可能性があることから、小分子 RNA の機能を網羅的かつ本質的に理解するために、極めて重要な研究対象となっている。

現在、piRNA 等の小分子 RNA 解析法として、逆転写 PCR (polymerase chain reaction) 法ならびにノーザンブロットング法が広く使われている。前者は、piRNA を鋳型として cDNA (complementary DNA) を合成した後、cDNA を PCR 増幅し検出する手法である (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 351, 756-763)。この手法は pM オーダーの高感度検出が可能であるが、逆転写反応効率が塩基配列に依存することから、異なる piRNA 間における発現量の相対比較をすることが容易ではない。一方、後者のノーザンブロットング法に関しては、逆転写反応を利用しないため、piRNA 発現量の定量的な解析が可能である。この手法では、細胞または組織由来 Total RNA から変性アクリルアミド電気泳動を用いて小分子 RNA を分離精製し、フィルターに転写 (ブロットング) した後、標的 piRNA 塩基配列と相補的な核酸プローブとのハイブリダイゼーションにより検出する (*Nature*, 2006, 442, 199-202)。しかし、この手法で用いられる電気泳動は、単に RNA サイズ (塩基長) の違いに基づく精製であり、ほぼ全ての種類の小分子 RNA が非選択的に回収されてくることになる。そのため、ハイブリダイゼーションによる検出過程において、類似配列を有する他の小分子 RNA に対する偽陽性シグナルを示すリスクが極めて高く、標的 piRNA の存在そのものの判定や、その定量を行うためには、極めて慎重かつ丁寧な分離・検出操作が必要となる。また、piRNA に特化した解析法として、これまでに質量分析法 (*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2007, 14, 349-350) や 2D-TLC 法 (*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2007, 14, 347-348) 等が提案されているが、標的 RNA の精製を必要とするため操作が煩雑であること、あるいは酵素を利用するため時間がかかること、さらには検出条件の最適化が難しいことが改善課題となる。したがって、piRNA の生物学的研究を進めていくためには、既存解析法の弱点を補う、piRNA に特化した新規分離・分析手法の開発・提供が重要

な課題となる。

### 2. 研究の目的

以上のような学術的背景に基づき、本研究では、piRNA に特徴的な 3'末端塩基の 2'-O-メチル化構造に着目し、ポリアクリルアミドゲル担持ボロン酸に基づくアフィニティー電気泳動による piRNA の簡便な分離・検出法の開発を試みた。

### 3. 研究の方法

ゲルに担持するフェニルボロン酸誘導体 (*N*-acroyl-3-aminophenylboronic acid) は、既報 (*Chem. Commun.*, 2009, 2106-2108) に従い合成した。合成したボロン酸誘導体 (1%) を担持したアクリルアミドゲル (15%) は、常法に準じて作製した。また、電気泳動も通常のプロトコルに従い、RNA 染色には、SYBR Gold を用いた。また、電気泳動の泳動緩衝液として、下記の緩衝液を用いた。

HEPES: 20 mM HEPES, 5.0 mM sodium acetate, 1.0 mM EDTA (pH 8.2); MOPS: 20 mM MOPS, 5.0 mM sodium acetate, 1.0 mM EDTA (pH 7.9); TAE: 89 mM Tris, 3.7 mM acetic acid, 4.0 mM EDTA (pH 8.5); TBE: 89 mM Tris, 7.3 mM boric acid, 4.0 mM EDTA (pH 8.5)

### 4. 研究成果

ボロン酸誘導体による RNA リボース環 cis-2,3-diol 認識を利用した RNA 分析は 40 年近く前に初めて提案されており (*Anal. Biochem.*, 1975, 66, 532-539)、これまで主に、トランスファー RNA の末端塩基リボース環 (ヒドロキシ基) の化学修飾検出に用いられてきた (*Nucleic Acids Res.*, 1985, 13, 6881-6898; *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 5679-5683; *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24, 515-522)。本研究では、23~31 塩基長の piRNA を対象として、ボロン酸を担持したポリアクリルアミドゲル電気泳動の分離機能を定量的に評価した。

モデル piRNA (piR1: 5'-UGA CAU GAA CAC AGG UGC UCA GAU AGC UU(mU)-3')

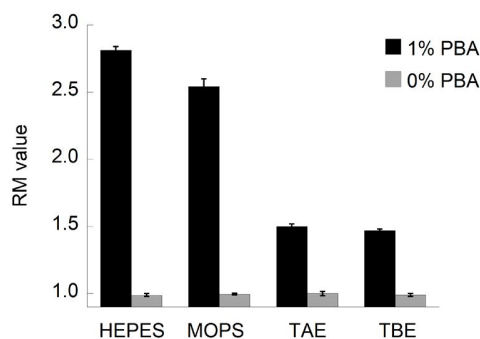


図1 分離機能に及ぼす緩衝液の効果

RM = mobility (piRNA) / mobility (RNA)

を用いて、ポロン酸誘導体を担持したポリアクリルアミドゲルの分離機能を評価した。その結果、非修飾 RNA (umpiR1: 5'-UGA CAU GAA CAC AGG UGC UCA GAU AGC UUU-3') と比べて 2'-O-メチル RNA の泳動速度が大きくなり、メチル化の有無に基づく RNA 分離が可能であることが分かった (図 1)。これは、通常の RNA は 3'末端塩基リボース環に cis-2,3-diol 構造を有しているため、ゲル内のポロン酸により捕捉されるのに対して、diol を持たない piRNA がより早い泳動を示すため、ゲルに担持したポロン酸の diol 認識機能が効果的に発現していることが示唆される。しかし、分離機能 (RM 値で評価) は、用いる泳動緩衝液に大きく依存し、TBE (1.5), TAE (1.5) << MOPS (2.5) < HEPES (2.8) の順に向上した (図 1)。TBE (トリス-ホウ酸-EDTA) 緩衝液は、DNA や RNA のポリアクリルアミドゲル電気泳動の泳動緩衝液として汎用されているが、MOPS や HEPES と比べてその分解能は明らかに低く、構成成分のトリス (tris(hydroxymethyl)aminoethane) がポロン酸の認識機能を阻害していると考えられる。事実、フェニルポロン酸と diol 構造を有する蛍光色素 (Alizarin red S) との相互作用を評価したところ、TAE 緩衝液中では結合力が一桁小さくなることがわかった (結合定数  $K_d/M^{-1}$ : HEPES, 1620; TAE, 141)。このことから、ポロン酸誘導体を担持する場合、



図 2 ポリアクリルアミドゲル担持ポロン酸による piRNA 分離 (電気泳動): 塩基配列・塩基長の効果

1% フェニルポロン酸、20 mM HEPES buffer (pH 8.2)、各 RNA 試料 50 ng  
 umpiR1: 5'-UGA CAU GAA CAC AGG UGC UCA GAU AGC UUU-3'  
 piR1: 5'-UGA CAU GAA CAC AGG UGC UCA GAU AGC UU(mU)-3'  
 piR2: 5'-UAC CUU GGA UGU CAC UUC AGA UGU UUC UG(mC)-3'  
 piR3: 5'-UGA GCA UCC ACU UCU GUG UUU GCU A(mG)-3'

ポリアクリルアミドゲル電気泳動で汎用されるトリス系の緩衝液は好ましくなく、双性イオン型緩衝液を用いることで、ポロン酸の diol 認識機能を効果的に引き出せることが分かった。

また、ポロン酸を担持しても、塩基長の識別能や感度など、ポリアクリルアミドゲル本来の機能を維持できることが分かった。図 2 に示したように、同じ塩基長 (piR1 と piR2) であれば、塩基配列に依らず同じ泳動度を示す。また、piR1 と piR2 (30nt) に比べて、piR3 (26nt) の泳動度は大きくなり、4 ヌクレオチドの差も明瞭に検出可能である。加えて、検出限界 (LOD) は、0.063 ng (6.6 fmol) であり、高感度を維持できていることが分かる。

以上の結果を踏まえて、実サンプル中の piRNA 分析に本手法を適用した (1% フェニルポロン酸、20 mM HEPES buffer (pH 8.2))。その結果、未精製のマウス精巣由来の total RNA (14.3 μg) から piRNA (29-31nt) を選択的に分離・検出できることが分かった (図 3)。

以上のように本研究では、ポリアクリルアミドゲル担持ポロン酸に基づくアフィニティー電気泳動により、piRNA の簡便な分離・検出が可能であることを実証した。本手法は、total RNA の精製を全く必要とせず、1ステップでの解析が可能であることから、極めて有用な piRNA 定量分析法になりうると期待できる。

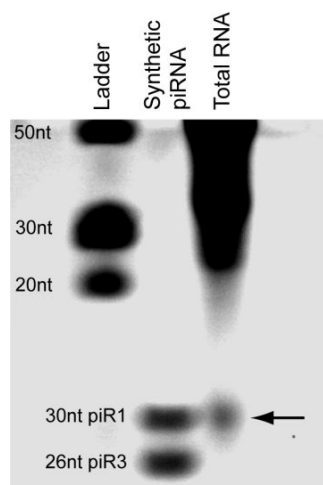


図 3 マウス精巣由来 total RNA からの piRNA (矢印で示したバンド) の分離・検出 (電気泳動)

1% フェニルポロン酸、20 mM HEPES buffer (pH 8.2))

なお、上記の研究成果の他、RNA 二重鎖中の脱塩基部位に強力かつ高選択的に結合しうる蛍光性リガンドを新たに開発した (Chem. Lett., 45, 2016, 982-984)。開発したリガンドは、プテリジン骨格にグアニジノ基を修飾した

もので、脱塩基部位の対面塩基（グアニン）と水素結合を形成して選択的に結合する（解離定数  $K_d = 31 \text{ nM}$ ）、これまで研究代表者らは、RNA 二重鎖中の脱塩基部位に結合できる蛍光性リガンドの開発を進めてきており（*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6369; *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9983; *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 515; *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 14446）、一本鎖 RNA を標的とする場合、それと相補的な脱塩基部位含有プローブ DNA・RNA を併用することで、標的 RNA の高選択的・高感度検出が可能である。今後、これらの蛍光性リガンドの機能改良をさらに進め、ポロン酸を担持したポリアクリルアミドゲル電気泳動の検出リガンド（染色剤）として活用することで、より簡便かつ高選択的、高感度な piRNA 分離・精製・検出法の開発が期待できる。

#### 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 1 件)

Y. Sato, T. Asami, Y. Toriyabe, T. Sato, N. Teramae, S. Nishizawa, Pteridine Derivatives Modified with a Guanidine for Binding and Sensing an Orphan Guanine in RNA duplexes, *Chem. Lett.*, 査読有, **45**, **2016**, 982-984.  
DOI: 10.1246/cl.160425

##### 〔学会発表〕(計 6 件)

西澤精一、核酸結合プローブの精密設計と RNA 検出・細胞内イメージング、日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 16 日、慶応義塾大学日吉キャンパス（横浜）(特別企画講演)

S. Nishizawa, Design and Synthesis of RNA-binding fluorescent molecules for analytical applications, Satellite International Mini Symposium on Middle Molecular Strategy in Sendai, September 20, 2016, IMRAM, Tohoku University (Sendai) (招待講演)

西澤精一、RNA 検出・細胞内イメージングのための蛍光性核酸結合プローブの分子設計、第 76 回分析化学討論会、2016 年 5 月 28 日、岐阜薬科大学・岐阜大学(岐阜) (招待講演)

西澤精一、核酸結合リガンドによる RNA 検出と細胞内イメージング、日本分析化学会第 64 年会、2015 年 9 月 10 日、九州大学伊都キャンパス（福岡）(招待講演)

西澤精一、核酸結合リガンドによる DNA・RNA センシングと細胞内イメージング、第 86 回化学センサ研究会、2015 年 8 月 27 日、仙台市情報・産業プラザ アエル（仙台）(招待講演)

西澤精一、核酸結合リガンドによる DNA・RNA 検出と細胞内イメージング、第 13 回

ホスト・ゲスト化学シンポジウム、2015 年 6 月 6 日、東北大学川内北キャンパス（仙台）(招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anal.chem.tohoku.ac.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西澤 精一 (NISHIZAWA, SEIICHI)  
東北大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：40281969