

機関番号：32702

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20810037

研究課題名（和文） PET 現象を利用した蛍光 ON/OFF 型核酸検出プローブの開発と RNA 検出への応用

研究課題名（英文） Development of PET-switch based fluorescent probe for RNA detection

研究代表者

岡本 到 (OKAMOTO ITARU)

神奈川大学・工学部・助手

研究者番号：40460133

研究成果の概要（和文）：近年、遺伝子発現調節に種々の RNA が重要な役割を担っていることが明らかとなり、RNA 研究の重要性が増している。本研究では、特定の配列の RNA を検出することが可能な新規 RNA 検出プローブの開発を目的とした。RNA 末端を認識した時のみ蛍光発光する分子を持つプローブを設計した。プローブに導入する分子が RNA 末端構造を認識し蛍光を発するか調べたところ、RNA 末端構造を認識した時のみ蛍光を発することが分かった。

研究成果の概要（英文）：In recent years, a large number of RNAs play an important role in the regulation of gene expression. Therefore, the research of RNAs become now important topics. In this study, we designed and evaluated novel probe for sequence selective RNA detection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,190,000	357,000	1,547,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,390,000	717,000	3,107,000

研究分野：核酸化学、生物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：RNA 検出、ボロン酸、光誘起電子移動、核酸、蛍光、分子認識

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする様々な生物種のゲノム情報が解読され、ゲノム研究は、遺伝子がコードされた領域の解析から、非コード領域の働き の 解明にも積極的に焦点が当てられるようになってきた。近年、mRNA のような遺伝子をコードする RNA 以外に、miRNA や siRNA といった遺伝子発現の調節に関連する non-coding RNA（非遺伝子コード RNA）が予想を遥かに超えてゲノム中に存在し、RNA の細胞内における役割が、従来考えられていたより多岐にわたっていることが明らかになりつつある。

このような事実を受け、RNA 研究の重要性が増し、細胞内に存在する RNA を網羅的に解析するトランスクリプトーム解析や、細胞内動態を解析する研究が盛んに行われている。これらの研究では、マイクロアレイ法や *in situ* ハイブリダイゼーション法、分子レベルのプローブ、組み換えタンパク質による RNA 検出法などが利用されるが、検出手法の工夫、改良が常に重ねられている状況である。

2. 研究の目的

本研究課題では、需要が大きく高まってい

る RNA 研究を支援する基盤技術として、RNA 鎖を配列特異的に検出することが可能な、新しい RNA 検出プローブの開発を目的とした。このプローブは、RNA 鎖に特徴的な化学構造である 3' 末端 *cis*-2,3-ジオール構造を認識し、標的とする RNA 鎖にハイブリダイゼーションした時のみに蛍光を発することが特徴である。このプローブが開発できれば、細胞内での RNA 分布や定量といったバイオイメージング、RNA の動的挙動解析などへ応用できる可能性もあり、実用的な技術になると期待した。

3. 研究の方法

生体分子や金属イオンなどを検出する方法として PET (photoinduced electron transfer) 現象を用いて、標的の有無による蛍光発色団の ON/OFF が可能なセンサー分子が数多く報告されている。特にジオールとボロン酸誘導体がボロン酸エステルを形成することを利用し、糖の検出を可能としたセンサーは報告が多い。RNA 鎖は、リボースを構成成分としており、3' 末端に *cis*-2,3-ジオール構造を持つため、ボロン酸誘導体類とボロン酸エステルの形成が可能である。プローブ鎖 5' 末端に PET による蛍光発色団の ON/OFF が可能なボロン酸誘導体を導入しておくことで、RNA 鎖を配列選択的に検出できるプローブオリゴマーが開発できると考えた。概念を Figure 1 に示す。

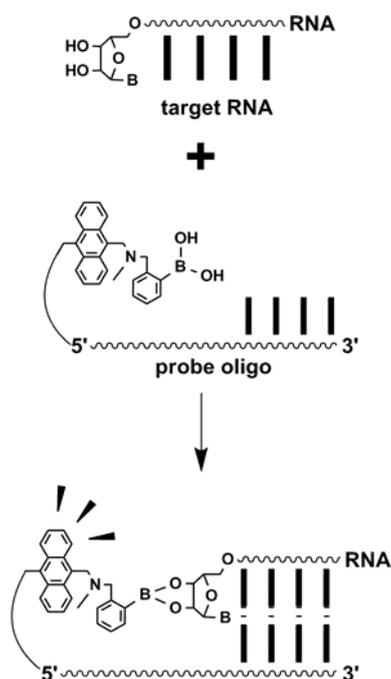


Figure 1 プローブオリゴマーの概念図

ところで、現在までに、PET 現象とボロン酸エステルの形成を組み合わせた蛍光団の ON/OFF による核酸検出を行なった例はほぼ皆無である。これは、核酸塩基が消光団とし

て蛍光発色団と相互作用し、消光を起こすことが予期されるためである。そのため、消光団として機能しえない（芳香族性を示さない）核酸塩基をもつジドロウリジン検出センサーへ応用した報告以外は知られていない。しかし、この報告を注意深く検討すると、9-メチルアミノメチルアントラセンを蛍光発色団としてもつセンサーは、ウリジンのような消光団として働く核酸塩基に対しても消光が起きていないことが報告されている。この報告例に着目し 9-メチルアミノメチルアントラセンを利用すれば、Figure 1 に概念を示した検出へ応用できる可能性があると考えた。

上記したプローブを作製するために以下の手順で研究を進めた。

- (1) プローブオリゴマーに導入するボロン酸誘導体の設計および合成を行なう。
- (2) ボロン酸誘導体が RNA 鎖末端を認識可能か調べる
- (3) ボロン酸誘導体をプローブオリゴマーへと組み込む方法を確立する。
- (4) プローブオリゴマーが配列選択的に RNA 鎖を認識できるか調べる。

(1) ~ (4) を順次遂行することとした。

4. 研究成果

(1) 前述した 9-メチルアミノメチルアントラセンを蛍光発色団としてもつボロン酸誘導体がプローブオリゴマーに導入されている状態のモデルとして Figure 2 に示した新規化合物を合成した。

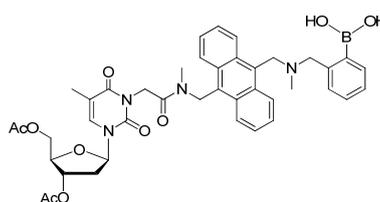


Figure 2 合成したモデル化合物

(2) この化合物を用いて RNA 鎖の末端構造に相当するリボヌクレオシドを認識し蛍光強度がどのように変化するか、蛍光スペクトル測定により調べた。

リボヌクレオシドの一種であるウリジンとこのモデル化合物を混合させる (Figure 3) と、ウリジンの濃度が上昇するに従い蛍光強度が上昇していくことが観察された。結果を次ページの Figure 4 に示した。

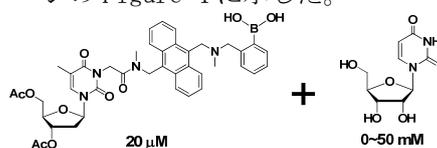


Figure 3

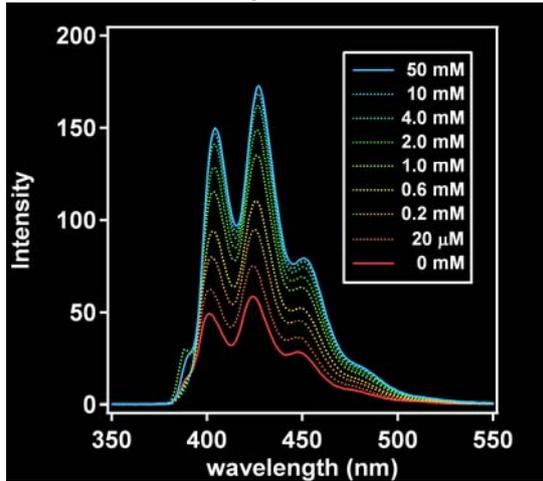


Figure 4 ウリジンとモデル化合物の混合液の蛍光スペクトル

以上の結果からウリジンの *cis*-2,3-ジオール構造とモデル化合物が Figure 5 に示したようにボロン酸エステルを形成し、蛍光を発していることが示唆された。

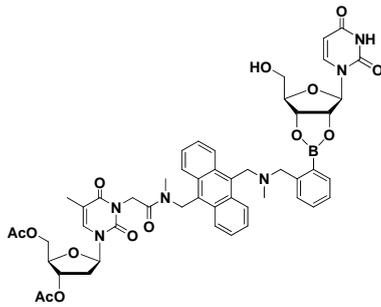


Figure 5

また、研究を開始するにあたって予測したとおり、9-メチルアミノメチルアントラセンを蛍光発色団としてもつこのモデル化合物はウリジンによる消光を受けることなく蛍光発光が見られたことから、プローブオリゴマーへ 9-メチルアミノメチルアントラセン構造をもつボロン酸誘導体を導入すれば、目的とする RNA 検出プローブの作製が可能であることが十分期待される結果である。さらに、この混合液は蛍光強度の変化が UV 照射下、目視で十分可能であった。(Figure 6)

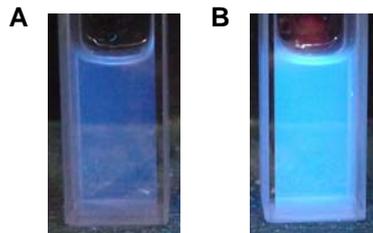


Figure 6 A ウリジン非存在下、B ウリジン存在下

cis-2,3-ジオール構造を持たないデオキシウリジン (Figure 7) 存在下で蛍光スペクトル測定 (Figure 8) を行なうと蛍光強度が増大しないことから Figure 5 のボロン酸エステル形成が示唆される結果を得ている。

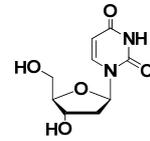


Figure 7 デオキシウリジン

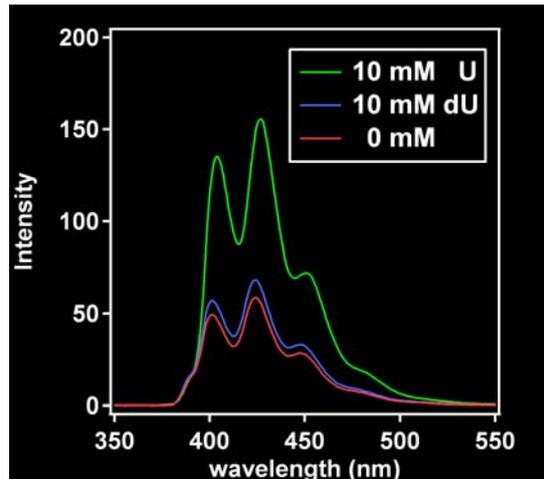


Figure 8 デオキシウリジン (dU) 存在下、ウリジン (U) 存在下の蛍光スペクトル

(3) 合成したモデル化合物の構造をプローブとなるオリゴヌクレオチド鎖に組み込む方法について検討した。

まず、核酸自動合成機で使用される、固相ホスホロアミダイト法により、プローブオリゴマーへの組み込みを検討した。ホスホロアミダイトユニット (Figure 9) を合成することとし、フェニルボロン酸部位の保護基等種々の検討を行なったが、このホスホロアミダイトユニットの合成は困難であった。

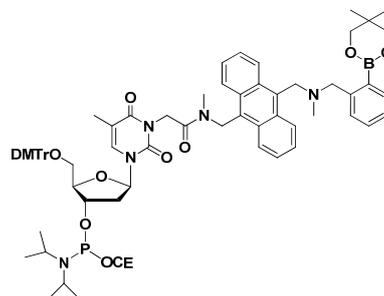


Figure 9

そこで、プローブオリゴマー末端にカルボン酸を有するオリゴヌクレオチドを合成した後、このカルボン酸部位に蛍光発色団を脱水縮合により導入することを検討した。(Figure 10)

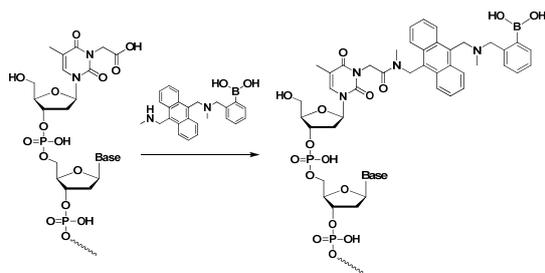


Figure 10

しかしながら、この方法で蛍光発色団を導入することは出来なかった。蛍光発色団に存在するアミノ基の求核性が十分でないなどの理由が考えられる。現在、プローブオリゴマー末端と蛍光発色団を接続する方法を種々検討中である。プローブオリゴマーの作製に成功した後は、プローブオリゴマーが標的とする配列とハイブリダイゼーションしたときのみ蛍光を発するかなど調べていく予定である。

以上の成果については、日本化学会春季年会で発表を行なった。

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)

[学会発表] (計2件)

岡本到・藤井紫乃・小野晶

「フェニルボロン酸を利用した RNA 検出プローブの開発」

日本化学会第 90 春季年会 (2010 年 3 月 26 日～29 日、近畿大学本部キャンパス)

岡本到・藤井紫乃・小野晶

「フェニルボロン酸構造をもつ RNA 検出センサーの開発」

日本化学会第 89 春季年会 (2009 年 3 月 27 日～30 日、日本大学理工学部船橋キャンパス)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 到 (OKAMOTO ITARU)

神奈川大学・工学部・助手

研究者番号：40460133

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：