

機関番号：37111
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21850018
 研究課題名（和文） 細胞内シグナル伝達分子を標的とする蛍光性 RNA-ペプチド複合体
 センサーの開発
 研究課題名（英文） Construction of fluorescent ribonucleopeptide sensors for detecting
 signal transduction molecules.
 研究代表者
 福田 将虎 (FUKUDA MASATORA)
 福岡大学・理学部・助教
 研究者番号：90526691

研究成果の概要（和文）：生体内神経伝達物質に応答する蛍光性 RNA-ペプチド複合体（リボヌクレオペプチド:RNP）センサーの各サブユニットを共有結合で連結し、複合体形成が安定化した蛍光性 RNP センサーの構築方法論を開発した。また、複数の蛍光性 RNP センサーを用いて、同一溶液中に存在する複数の生体内神経伝達物質を異なる波長で同時に観測するための基盤的方法論を開発した。

研究成果の概要（英文）： This research developed the methods of constructing fluorescent ribonucleopeptide (RNP) sensors for detecting signal transduction molecules. A covalently linked RNP sensor was designed by coupling an RNA subunit with a fluorophore -modified peptide subunit. The covalent linking strategy affords fluorescent RNP sensors for simultaneous detection of multiple ligands by monitoring each wavelength corresponding to the respective ligand.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,090,000	327,000	1,417,000
2010年度	990,000	297,000	1,287,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,080,000	624,000	2,704,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：リボヌクレオペプチド、バイオセンサー、生理活性物質、分子設計、分子進化学

1. 研究開始当初の背景

生命現象を制御する細胞内シグナル伝達は、多種多様なイオン、分子のネットワークにより支配されており、ネットワークの構築に関与するイオン、有機分子の詳細な解析により得られる基礎概念は、学術的にはもちろん、医療技術、情報技術の進歩に大きく貢献できる。細胞内シグナル伝達機構を詳細に解析する為には、生きた細胞内でシグナル伝達

経路に関わるシグナル分子、イオンをリアルタイムに検出するシステム及び、細胞抽出液を用いて網羅的かつ統括的に検出するハイスループットセンシングシステムの構築が必須である。しかし現在までに、複数の分子を同時に効率よく検出するシステムは未だ確立されておらず、アミノ酸、核酸、糖や脂質などの複雑多岐にわたる分子構造を有する複数の生体内シグナル分子を、同時に高精

度かつ高感度に検出できる一般的な技術の開発が望まれている。蛍光性バイオセンサーは、優れた分子認識能を有する生体高分子リセプターと標的分子との結合を光学的シグナルとして変換・増幅するものであり、生体内シグナル分子を選択的かつ高感度に検出する方法として有用である。近年、*in vitro* セレクション法が開発され、広範な種類の標的分子に高選択的に結合する核酸分子（アプタマー）の作製が可能になり、アプタマーに蛍光分子を導入することによるアプタマーセンサー構築方法が数多く報告されている。しかしながら、細胞内シグナル伝達機構の解析を目的とする蛍光性バイオセンサー構築方法論に必要な以下の条件、(1) 任意の標的分子に対して構築できる、(2) 様々な波長領域での測定が可能 (3) 広い濃度領域での測定が可能、(4) 優れた感度を有する、(5) 複数の標的分子を同時に検出可能、(6) 細胞内で使用可能、を全て満たす方法論は報告されていない。

これまで、立体構造が明らかな Rev ペプチド-RRE RNA 複合体の RNA サブユニットに、*in vitro* セレクション法を適用することにより、RNP リセプターが構築できることが示されている (Mori et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4617-4622 (2002))。この方法は RNA アプタマーの応用であることから汎用性のあるリセプター構築法である。さらに、ペプチドサブユニットに蛍光分子を導入した蛍光修飾 Rev ペプチドを用いることにより、RNP リセプターをその分子認識能を低下させることなく蛍光性 RNP センサーに変換できることを実証した (*J. Am. Chem. Soc.*, 2008, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006 など)。また、非共有結合複合体である利点を生かすことで、RNA サブユニットライブラリーと、様々な励起・発光波長を有する蛍光分子を化学修飾した蛍光修飾 Rev ペプチドサブユニットライブラリーを組み合わせた蛍光性 RNP ライブラリーから、ハイスループットなスクリーニングにより様々な波長領域、広い濃度領域で応答する蛍光性 RNP センサーを得ることができる。しかしながら、蛍光性 RNP センサーは非共有結合複合体であるため、複合体形成が阻害される環境下及び複数の RNP センサー共存下では使用できない。また、通常の RNA アプタマーと同じく、細胞内及び細胞抽出液中での RNA サブユニットの化学的安定性には問題が残る。

2. 研究の目的

本研究では、従来の RNA-ペプチド複合体 (RNP) を用いた蛍光性バイオセンサー構築方法論を発展させ、RNP 複合体を安定化させ、

「細胞内で複数の生理活性分子を同時に計測する」ことが可能な蛍光性 RNP センサー構築方法論の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 複数の生理活性分子類を異なる波長で検出する蛍光性 RNP センサー群の構築

蛍光性 RNP センサー構築法に従い、ドーパミン、ヒスタミン、セロトニンに対して応答する蛍光性 RNP センサー群を作製した。

(2) RNA-ペプチド複合体蛍光センサーの共有結合による安定化法の開発

RNA サブユニットと蛍光修飾 Rev ペプチドサブユニットを共有結合により連結し、複合体形成の安定化した蛍光性 RNP センサー構築方法論を開発した。また、Hela 細胞抽出液中で、蛍光性 RNP センサーに生理活性分子を添加し、生体試料中の標的分子を蛍光強度変化により定量できるかを評価した。加えて、細胞抽出液中での蛍光性 RNP センサーの安定性を評価した。

(3) 蛍光性 RNP センサーを用いた複数の生理活性物質の同時検出

複数の共有結合複合体 RNP センサーを同時に用いることにより、「同一溶液中に存在する複数の標的分子をそれぞれ同時に異なる波長で検出する」方法を開発した。

4. 研究成果

(1) 異なる波長で複数の生理活性物質を検出する蛍光性 RNP センサーの構築

従来の蛍光性 RNP センサー構築法に従い、ドーパミンに対して、それぞれ異なる波長で応答する蛍光性 RNP センサー群を作製した。まず、インビトロセレクションにより、ドーパミンに特異的に結合する RNP リセプター群を得た。続いて、7-メトキシマリリン (励起波長 355 nm、発光波長 390 nm)、ピレン (励起波長 355 nm、発光波長 390 nm)、フルオレセイン (励起波長 485 nm、発光波長 535 nm)、NBD (励起波長 475 nm、発光波長 535 nm) の蛍光分子を N 末端に導入した蛍光修飾 Rev ペプチドサブユニットと各 RNA サブユニットとの複合体を形成させた。その後、1 μ M 各蛍光性 RNP が存在する溶液中にドーパミン 0.01 mM (青)、0.1 mM (緑)、1mM (赤) 加え、ドーパミン比存在化との相対蛍光強度を測定した (図 1)。その結果、ドーパミン添加に伴い様々な波長で蛍光強度が増加、もしくは減少する蛍光性 RNP ライブラリーを作製することに成功した (図 1)。また、ヒスタミ

ン、セロトニンに対する蛍光性 RNP センサーも同様の方法が適用可能である事を明らかにした。

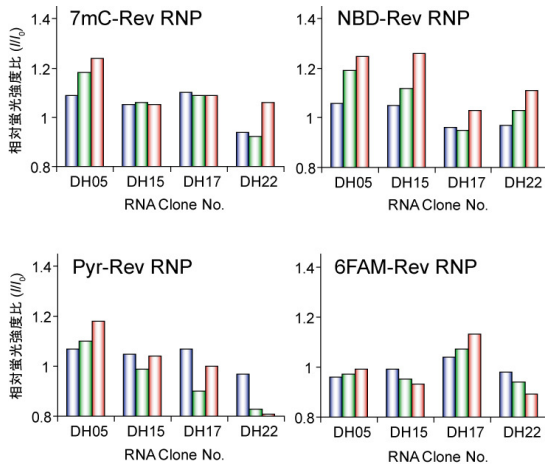


図1 ドーバミンに対する蛍光性 RNP ライブラリーの作製

(2) 共有結合による蛍光性 RNP センサー安定化法の開発

フルオレセインをペプチドサブユニットに化学修飾した ATP 応答性蛍光 RNP センサー (ATP/F-Rev) を用いて、RNA サブユニットと蛍光修飾 Rev ペプチドサブユニットを共有結合により連結し、複合体形成の安定化した蛍光性 RNP センサー構築方法論を開発した。共有結合複合体は、ペプチドサブユニットの C 末端と RRE RNA の 3' 末端を、リンカー分子を介して連結することにより構築した。まず、基本骨格である Rev ペプチド/RRE RNA 複合体の三次元構造を基に、ヒドラジド基を有する Gly-Gly-Ser の繰り返し配列を用いてペプチドリンカー (ヒドラジン修飾ペプチドリンカー) を設計し、蛍光修飾 Rev ペプチドの C 末端に導入した。一方、RNA サブユニットは、過ヨウ素酸により酸化することで、3' 末端のジオール部分を開裂シアルデヒドを形成させた。これらペプチドサブユニットと RNA サブユニットにヒドラゾン結合を形成させることで、共有結合により安定化した蛍光性 RNP センサーを合成した (c-ATP/F-Rev)。非共有結合複合体センサー ATP/F-Rev は、複合体濃度が低下すると蛍光応答性が低下するが、共有結合複合体センサー c-ATP/F-Rev は、低複合体濃度 (50 nM) 条件下でも蛍光応答性に影響はなかった (図 2)。また、Hela 細胞抽出液中で蛍光強度測定を行った結果、ATP/F-Rev は蛍光強度変化を示さなかったが、c-ATP/F-Rev は緩衝液中と同様に ATP 濃度の増加に伴い蛍光強度が増加した (図 3a)。さらに、細胞抽出液中で少なくとも 2 時間は ATP に対して蛍光応答を示すことを明らかにした (図 3b)。

以上の結果より、蛍光性 RNP センサーの機能を損なう事なく、共有結合により複合体形成を安定化できること及び、共有結合センサーを用いる事により細胞抽出液中での生理活性分子の検出が可能である事を明らかにした。

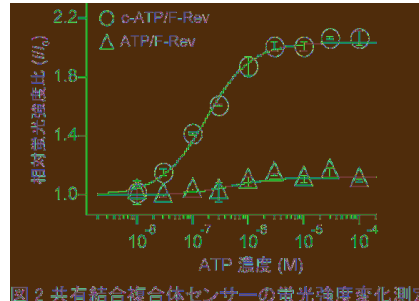


図2 共有結合複合体センサーの蛍光強度変化測定

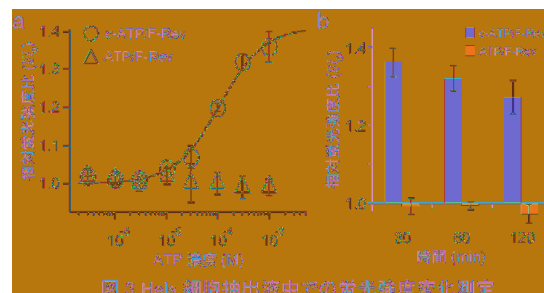


図3 Hela 細胞抽出液中での蛍光強度変化測定

(3) 蛍光性 RNP センサーを用いた複数の生理活性物質の同時検出

研究成果(2)の方法論により、ATP 応答性蛍光 RNP センサーと GTP 応答性蛍光 RNP センサーを共有結合により安定化した。その際、ATP センサーは Cy5-Rev (励起、発光波長: 650 nm, 670 nm) を、GTP センサーはフルオレセイン-Rev (励起、発光波長: 485 nm, 535 nm) を用いて作製した (c-ATP/Cy5-Rev、c-GTP/F-Rev)。同一溶液中に存在する両蛍光センサーに対して、濃度既知の ATP と GTP を添加し、それぞれの蛍光センサーに特徴的な励起・発光波長を用いて、ATP と GTP を異なる波長で同時に検出できるかを評価した (図 3)。まず、c-ATP/Cy5-Rev と c-GTP/F-Rev が共存する溶液に、終濃度 0.5 mM ATP、GTP 及び、ATP と GTP を同時に加えたサンプルを準備した。それぞれ 670 nm、535 nm における蛍光強度を測定し、基質分子非存在下における蛍光強度との相対蛍光強度比を算出した結果、670 nm で ATP を、535 nm で GTP を特異的に検出することができた。以上の結果より、複数の共有結合により安定化した蛍光性 RNP センサーを用いる事により、同一溶液中に存在する複数の標的分子をそれぞれ同時に異なる波長で検出可能である事を明らかにした。

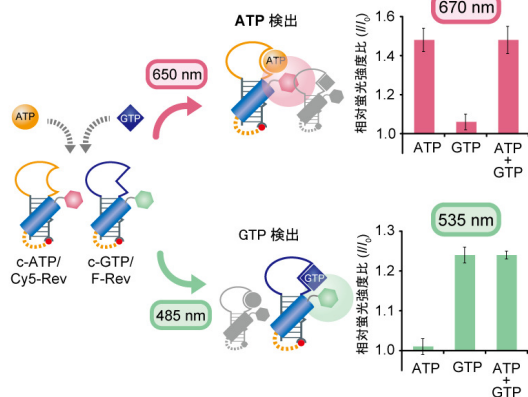


図4 同一溶液中に存在するATP、GTPの異なる波長での同時検出

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4件)

1. Nakano S., Fukuda M., Mashima T., Katahira M., Morii T., Structural aspects for substrate binding and fluorescence of the ATP-binding ribonucleotide receptors and sensors. (査読あり) *Pptide Science 2010* (in press)
2. Fukuda, M., Hayashi, H., Hasegawa, H., Morii, T., Development of A Fluorescent Ribonucleotide Sensor for Histamine. (査読あり) *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* **2009**, 34, 515-527.
3. Fukuda, M., Liew, F. F., Morii, T., Covalently linked fluorescent ribonucleotide sensors. (査読あり) *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* **2009**, 53, 257-258
4. Nakano, S., Fukuda, M., Mashima, T., Katahira, M., Morii, T. (査読あり) Structural aspects for the function of ATP-binding ribonucleotide receptors. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* **2009**, 53, 259-260

[学会発表] (計11件)

1. Nakano S., Fukuda M., Mashima T., Katahira M., Morii T., The structural characterization of an ATP-binding ribonucleotide receptor. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. 平成22年12月17日 (ホノルル・アメリカ)

2. Liew F. F., Fukuda M., Tainaka, K., Nakano S., Morii T., Development of ribonucleotide-based fluorescent sensors for dopamine. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 平成22年12月17日 (ホノルル・アメリカ)

3. Tanaka Y., Kato S., Fukuda M., Deshimaru M., Alteration of RNA editing profile of HTR2C mRNA depending on the dose of double-stranded RNA adenosine deaminase. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 平成22年12月17日 (ホノルル・アメリカ)

4. Nakano S., Fukuda M., Mashima T., Katahira M., Morii T., Structural aspects for substrate binding and fluorescence of the ATP-binding ribonucleotide receptors and sensors. 5th International Peptide Symposium in conjunction with 47th Japanese Peptide Symposium 平成22年12月8日 (京都国際会議場)

5. 田中泰圭、加藤卓、福田将虎、弟子丸正伸、セロトニン2C型受容体 mRNA における ADAR1 発現量依存的な編集パターン変化の解析、BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 平成22年12月8日 (神戸ポートアイランド)

6. 喜多村春菜、鈴木智巳、山口彰太、田中泰圭、福田将虎、弟子丸正伸、セロトニン2C型受容体 mRNA におけるリボース 2'-O-メチルが RNA 編集におよぼす影響、BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 平成22年12月10日 (神戸ポートアイランド)

7. 田中泰圭、加藤卓、福田将虎、弟子丸正伸、セロトニン2C型受容体 mRNA における編集パターンの決定機構 第12回日本RNA学会年会、平成22年7月27日 (一橋記念堂)

8. 仲野瞬、福田将虎、真嶋司、片平正人、森井孝、ATP結合性リボヌクレオペプチドリセプターの構造と基質認識、日本化学会第90春期年会 平成22年3月28日 (近畿大学)

9. 劉芳芳、福田将虎、仲野瞬、田井中一貴、森井孝、蛍光性リボヌクレオペプチド複合体によるカテコールアミン類の選択的認識、日本化学会第90春期年会 平成22年3月28日 (近畿大学)

10. Fukuda, M., Liew, F. F., Morii, T.,
Covalently linked fluorescent
ribonucleopeptide sensors. 第 6 回国際核
酸化学シンポジウム 平成 21 年 9 月 29 日 (高
山文化会館)

11. 福田将虎、Liew Fong-Fong、仲野瞬、森
井孝、蛍光性リボヌクレオペプチドセンサー
を用いた複数の生理活性分子の同時検出、第
24 回生体機能関連化学シンポジウム、第 12
回バイオテクノロジー部会シンポジウム 平
成 21 年 9 月 15 日 (九州大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 将虎 (FUKUDA MASATORA)

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：90526691