

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710264

研究課題名(和文) ボロン酸による核酸末端構造認識を利用した核酸検出プローブの開発研究

研究課題名(英文) Study of nucleic acids detecting probe which recognize 3'-end sequence of RNA by formation of boronic acid ester

研究代表者

岡本 到 (Okamoto, Itaru)

東京工業大学・生命理工学研究科・東工大特別研究員

研究者番号：40460133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、RNA鎖を配列特異的に検出可能なプローブの開発である。PET現象により消光される蛍光発色団とフェニルボロン酸部位を持つDNA鎖をプローブとして利用した。RNA鎖に特徴的な化学構造である3'末端cis-2,3-ジオール構造をボロン酸エステル形成反応により認識し、標的RNA鎖と二重鎖形成した時のみ消光が解消され、蛍光回復しRNA検出が可能となると期待した。研究の結果、蛍光発色団とフェニルボロン酸部位を併せ持つプローブの合成に成功した。このプローブはRNA鎖と二重鎖を形成した時に蛍光の回復が見られた。一方、DNA鎖存在下では蛍光の回復は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop new RNA detecting probe which consisting of a DNA strand with a fluorescing group and a phenyl boronic acid residue. The DNA strand of the probe binds to a 3'-end sequence of a target RNA to form a double helical structure, then the boronic acid residue of the probe and a diol group at the 3'-end of target RNA form boronic esters which results increasement of fluorescence intensity by cancelling photo-induced electron transfer (PET) between the fluorescent group and an amino group to which the phenyl boronic acid group attached. We successfully synthesized novel RNA detecting probe having a fluorescing group and phenyl boronic acid residue. When the probe formed a duplex with a target RNA, increasement of fluorescence intensity was observed. On the other hand, in the presence of a target DNA strand, increasement of fluorescence intensity was not observed.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：RNA検出 ボロン酸 蛍光 核酸

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする様々な生物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のみならず、非コード領域の役割の解明に積極的に焦点が当てられるようになった。その結果、mRNAのような遺伝子をコードするRNAや、tRNA、rRNAのような従来からよく知られていた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の細胞内での役割が、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ってきた。このような背景のもとRNA研究の重要性は一段と増している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RNA鎖を配列特異的に検出することが可能な化学構造を持つ、RNA検出プローブの開発である。このプローブは、標的RNA鎖と二重鎖を形成するまでは、PET現象により消光されている蛍光発色団を持つ。RNA鎖に特徴的な化学構造である3'末端cis-2,3-ジオール構造をボロン酸エステル形成反応により認識し、標的RNA鎖にハイブリダイズした時のみPET現象による消光が解消され、蛍光が回復し検出が可能となる。RNA鎖に特異的かつ配列選択的なプローブが開発できれば、細胞内でのRNA分布や定量、挙動の解析などへ応用できる可能性があり、実用的な技術になりうると期待される。

3. 研究の方法

生体分子や金属イオンを検出する方法として、PET(Photoinduced Electron Transfer)現象を用いた、ターゲットの有無によって蛍光発色団のON/OFFが可能なイメージングセンサーが報告されている。例えば、ボロン酸誘導体がジオール存在下、ボロン酸エステルを形成する反応とPET現象を組み合わせ、糖検出を可能とした実用的なセ

ンサーが開発されている。RNA鎖はリボースを持つため、3'末端にはcis-2,3-ジオール構造が存在する。すなわち、RNA鎖の3'末端部位はボロン酸誘導体とボロン酸エステルの形成が可能である。代表者は、ボロン酸エステル形成によるPET解消現象が、RNA鎖検出へ応用できる可能性があると考え研究を進めてきた。プローブの検出機構をいかに説明する。

RNA鎖は、先に述べたように3'末端にはcis-2,3-ジオール構造をもつ。このジオール構造を用いて蛍光発色団のON/OFFを行ないRNA鎖検出へと応用する。プローブは、標的RNA鎖を認識するための相補的な配列を有し、あわせて5'末端に標的RNA鎖の3'末端cis-2,3-ジオールを認識するフェニルボロン酸部位をもつ。また、このプローブのフェニルボロン酸部位にはPET現象により消光される9-メチルアミノメチルアントラセンを主要骨格とする蛍光発色団があり、標的RNA鎖と二重鎖を形成しないときは消光されている。プローブが標的RNA鎖と二重鎖を形成すると、フェニルボロン酸部位は標的RNA鎖の3'末端cis-2,3-ジオールの近傍に位置する。プローブと標的RNA鎖の3'末端間でボロン酸エステルが形成されると、蛍光発色団の蛍光が回復し標的RNA鎖が検出できる(以下図1に概念図を示した。)

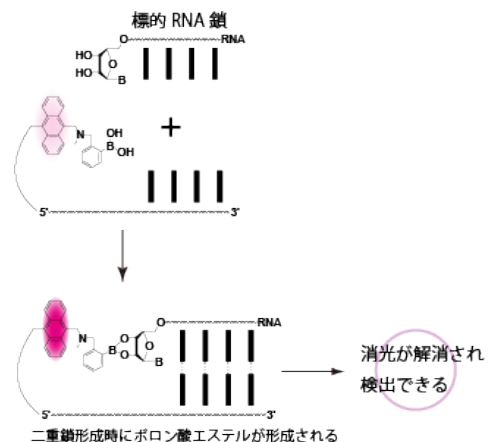


図 1

これまでに、モデル化合物を合成し、その蛍光挙動を調べ、リボヌクレオシド非存在下では蛍光発色団は消光され、RNA の構成成分であるリボヌクレオシド存在下で蛍光の回復が見られることを明らかとしている。

本研究では、モデル化合物ではなく、実際にプローブを合成し、RNA 鎖の検出が可能かどうか検討することにした。以下に示した項目を実施し研究を進めることとした。

(1) RNA 鎖検出プローブの合成：上述した概念図 1 に示した、蛍光発色団とフェニルボロン酸部位を併せ持つ RNA 鎖検出プローブを合成する。

(2) RNA 鎖検出プローブの性質の解明：合成したプローブが標的 RNA 鎖の 3'末端とボロン酸エステルを形成しているか否かを確認する。

4. 研究成果

当初、アミダイト型の化合物を利用してプローブの末端に蛍光発色団およびフェニルボロン酸部位を導入することを試みた。事前の検討結果からアミダイト法で目的物が得られると予測していたが予想と異なり、アミダイト型の化合物によるプローブの合成は困難であった。種々の合成検討を行い、蛍光発色団と、フェニルボロン酸部位を併せ持つ活性エステル化合物を 5'末端にアミノアルキル基をもつ DNA 配列と脱水縮合させることで図 2 に示したプローブを合成することが出来た。(鍵となる蛍光発色団およびフェニルボロン酸部位を青字で示した)

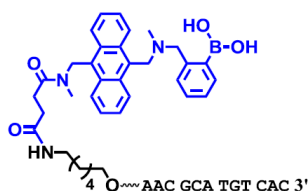


図 2

合成したプローブを用いて、RNA 鎖をターゲットとする場合と DNA 鎖をターゲットとする場合で蛍光強度の違いが生じるか否

か調べた。プローブ溶液に対して、DNA 鎖を加えた場合、RNA 鎖を加えた場合それぞれの蛍光強度の変化を調べた。(図 3)まず、DNA 鎖を加えた場合、蛍光強度に大きな変化は生じないことが分かった。(図 3 中黒線が DNA を加えた場合、青線は何も加えない場合)すなわち、プローブは DNA 鎖と二重鎖を形成しても、フェニルボロン酸部位が DNA 鎖の 3'末端と相互作用しないため、蛍光強度の変化が起きないことが示された。一方、RNA 鎖を加えると蛍光強度が上昇した。(図 3 中赤い線が RNA を加えた場合)このことから、プローブと RNA 鎖が二重鎖を形成するとフェニルボロン酸部位が RNA の 3'末端とボロン酸エステルを形成し、蛍光発光強度の回復が起きたものと推測される。

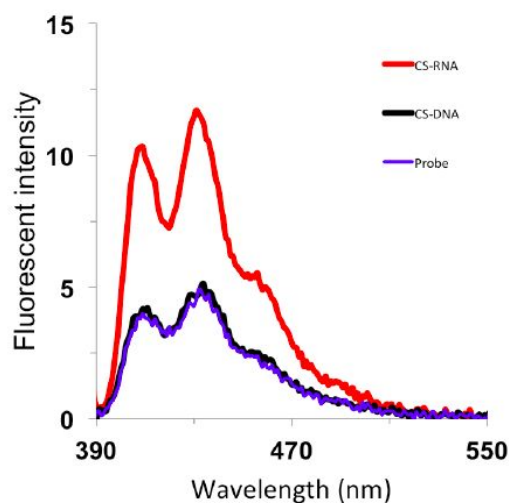


図 3

プローブの合成方法に改良の余地は残されているが、上述した蛍光測定の結果から、RNA と DNA を見分けることができる RNA 選択的プローブの作製が出来たことがわかった。

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 4 件)

1. Kentaro Ohno, Akira Ono, Itaru Okamoto

“Preparation of a Novel RNA Detecting

Probe which Increase Fluorescent Intensity by Binding to the 3' End of a Target RNA”

XX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, (Montreal, Quebec, Canada) (August 5-9, 2012)

2 . 大野健太郎・小野晶・岡本到

“標的RNA鎖3'末端と結合し蛍光強度が増加する新規RNA検出プローブの合成と性質”

日本化学会第93 春季年会(2013 年3月22 日 ~ 25 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス)

3 . 大野健太郎・實吉尚郎・小野晶・岡本到

“標的RNA鎖3'末端に結合し蛍光強度が変化する新規RNA検出プローブの合成と性質” 第7回バイオ関連化学シンポジウム(2013年9月27 - 29日、名古屋大学東山キャンパス)

4 . Kentaro Ohno, Hisao Saneyoshi, Akira Ono, Itaru Okamoto

“Synthesis of a RNA detecting probe which binds a 3'-end sequence of a target RNA and increase fluorescence intensity”

222-223pp, *The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2013), (Kanagawa University, Yokohama) (Nov. 13-15, 2013).*

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡本 到 (OKAMOTO, Itaru)

東京工業大学・生命理工学研究科・東工大特別研究員

研究者番号：40460133