

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26810091

研究課題名(和文) 核酸アプタマーを利用した対象タンパク質の“超”選択的蛍光ラベル化

研究課題名(英文) Selective labeling of target protein by using a chemical probe having a fluorogenic reactive group and an oligonucleotide aptamer

研究代表者

山口 卓男 (Yamaguchi, Takao)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：80596601

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)：対象タンパク質を選択的に蛍光ラベル化することのできる革新的なプローブ分子の創出を目指して研究を行った。当初計画において、「対象タンパク質を特異的に認識する核酸アプタマー」と「近接したタンパク質と選択的に結合を形成する発蛍光性反応基」とをリンカーで連結させたプローブ分子を設計していた。まず、計画通り肝細胞増殖因子受容体c-Metを対象とした核酸アプタマーについて合成を行い、これを達成した。続いて、発蛍光性反応基については種々精査を行い、対象タンパク質を選択的に発蛍光ラベル化するのに適した反応基を見出すことに成功した。以上、対象タンパク質の“超”選択的蛍光ラベル化に資する研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Chemical probes, consist of an oligonucleotide aptamer and a fluorogenic reactive group, were designed to achieve a specific labeling of protein of interest (POI). Here, we prepared oligonucleotide aptamer for c-Met, a model POI. In addition, several fluorogenic reactive groups were designed and synthesized. Model experiments revealed that one of the designed fluorogenic reactive groups has a suitable stability and reactivity for the POI-specific labeling.

研究分野：生体関連化学

キーワード：アフィニティーラベル化 核酸アプタマー タンパク質化学修飾

## 1. 研究開始当初の背景

研究対象のタンパク質を蛍光ラベル化することにより、細胞内での局在・機能・動態をリアルタイムで観察することが可能となる。現在、このようなアプローチの1つとして、対象タンパク質と蛍光タンパク質の融合発現ベクターを用いる蛍光タンパク質融合遺伝子法が頻用されており、生命現象の理解に必要な不可欠な技術となっている。

一方、もし培養液中の生細胞あるいは試験管中のタンパク質混合物に小さなプローブ分子を添加するのみで対象タンパク質を選択的に蛍光ラベル化することができれば、その簡便性・有用性はきわめて高い。さらに、プローブ分子自体が無蛍光で、ラベル化が蛍光の turn-ON (発蛍光) をともなって進行すれば、S/N 比良く対象タンパク質を観察・検出できる。これまで、このような革新的なプローブ分子の創製を目指して研究を行ってきた。

その結果、「対象タンパク質と強固に相互作用する低分子リガンド」と「近接したタンパク質と特異的に結合を形成する発蛍光性反応基 (O-NBD)」とをリンカーで連結させたプローブ分子により、対象タンパク質を選択的に発蛍光ラベル化することに成功している [ *Chem. Sci.* **2014**, 5, 1021. ] 例えば、アビジンというタンパク質に相互作用する低分子リガンド「ビオチン」を用いた系においては、大過剰の非対象タンパク質存在下においてアビジンのみを特異的かつ効率的に発蛍光ラベル化することに成功している。また、ミトコンドリア外膜上に発現する TSPO というタンパク質をモデルとした場合においては、TSPO に相互作用する低分子リガンド「PIGA」を用いることで、生細胞内のミトコンドリアを発蛍光ラベル化することに成功している。

しかしながら、上記の手法では対象タンパク質と強固に相互作用する低分子リガンドが必要であり、多種多様なタンパク質への適応は困難である。このような背景下、核酸アプタマーに着目した。近年、SELEX 法によって核酸アプタマーが次々に見出されている。SELEX 法とは、ランダム配列からなる DNA や RNA のライブラリに結合対象を加え、非結合配列の除去、結合配列の増幅というサイクルを繰り返し、対象に強い親和性をもつ

DNA/RNA だけを濃縮していくというセレクション法である [ *Nature* **1990**, 346, 818; *Science* **1990**, 249, 505. ] SELEX 法を用いれば、理論上どのようなタンパク質に対しても優れた結合親和性と特異性を有する核酸アプタマーが見つけれられると言われている。

## 2. 研究の目的

本研究では、「核酸アプタマー」と「発蛍光性反応基」を連結させたプローブ分子により、対象タンパク質の“超”選択的発蛍光ラベル化を実現させることを目的とする。より具体的には、(1) 肝細胞増殖因子受容体 c-Met に対する核酸アプタマーの創製と (2) 優れた発蛍光性反応基の開発を通じて、c-Met の“超”選択的発蛍光ラベル化に資する基盤技術の創出を第一目標に設定した。

## 3. 研究の方法

すでに、c-Met に高い親和性を有する核酸アプタマーとして trCLN3 が報告されている [ *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 21896. ] そこで、この trCLN3 と発蛍光性反応基をコンジュゲートすることを想定し、5'-末端にアルキンを配置した新規 c-Met 核酸アプタマーを設計した。この核酸アプタマーについて、ホスホロアミダイト法に基づいて合成を行うこととした。

また、発蛍光性反応基 O-NBD にアジドを導入した化合物を別途合成し、新規 c-Met 核酸アプタマーとコンジュゲートした後、細胞系あるいは精製タンパク質系において c-Met の選択的発蛍光ラベル化を評価することとした。

## 4. 研究成果

まず、ホスホロアミダイト法に基づいて 5'-末端にアルキンを配置した新規 c-Met 核酸アプタマーを合成した。続いて、O-NBD アジドに関しても合成を行い、これと新規 c-Met 核酸アプタマーのコンジュゲートを試みた。しかし、予想に反して、目的のコンジュゲート体を純度良く得ることは困難であった。これは、O-NBD の化学的な不安定性によるものであると考え、次に発蛍光性反応基を精査することとした。

新たに2つの発蛍光性反応基を設計し、それらの安定性および対象タンパク質への選

択性を評価する目的で、まずは低分子リガンドを用いるモデル実験で評価を行った。その結果、1つ目の発蛍光性反応基(マレイミド骨格を有する反応基)は安定性・選択性ともに不十分であったが、2つ目の発蛍光性反応基(フタルイミド骨格を有する反応基)は優れた安定性と対象選択性を有していることが明らかになった。以上の結果から、対象タンパク質の“超”選択的蛍光ラベル化に資する発蛍光性反応基の創出に成功したと考えている。現在、新たに開発した発蛍光性反応基と新規 c-Met 核酸アプタマーのコンジュゲートによって c-Met の選択的蛍光ラベル化を目指している。

#### 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)

1. Takao Yamaguchi, Masahiko Horiba, Satoshi Obika, Synthesis and properties of 2'-O,4'-C-spirocyclopropylene bridged nucleic acid (scpBNA), an analogue of 2',4'-BNA/LNA bearing a cyclopropane ring, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 9737-9740. (査読有)、DOI: 10.1039/C5CC02024G

[学会発表](計7件)

1. 千葉幸介、橋本祐一、山口卓男、アジドフタルイミドを発蛍光性光反応基とする新規アフィニティーラベル化法の開発、日本薬学会 第136回年会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2016年3月26~29日
2. Masahiko Horiba, Takao Yamaguchi, Reiko Waki, Satoshi Obika, Synthesis and properties of oligonucleotides containing 2'-O,4'-C-spirocyclopropylene bridged nucleic acids (scpBNA) having pyrimidine bases, SKO Symposium 2015 (Joint Symposium 2015 of Seoul Univ., Kyoto Univ., and Osaka Univ.), ソウル(韓国), 2015年11月16~18日
3. Takao Yamaguchi, Kosuke Chiba, Yuichi Hashimoto, Kosuke Dodo, Miwako Asanuma, Mikiko Sodeoka, Specific Fluorescence Labeling of a Target Protein Utilizing a Single, Small, Non-Fluorescent Unit, Tokyo-LUM Symposium, ミュンヘン(ドイツ)、2015

年10月28~29日

4. 堀場昌彦、山口卓男、小比賀聡、スピロシクロプロパン構造を導入した新規架橋型人工核酸の合成と物性評価、第41回反応と合成の進歩シンポジウム、近畿大学11月ホール(大阪府・東大阪市)、2015年10月26~27日
5. Masahiko Horiba, Takao Yamaguchi, Satoshi Obika, Synthesis and biophysical evaluation of 2'-O,4'-C-Spirocyclopropylene Bridged Nucleic Acids (scpBNA)、第41回国際核酸化学シンポジウム(The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, ISNAC2014)、北九州国際会議場(福岡県・北九州市)、2014年11月5~7日
6. 浅沼三和子、どど孝介、山口卓男、中西修一、斎藤洋平、岡崎正晃、袖岡幹子、蛍光turn-ON型ラベル化法を用いた生物活性化化合物の標的タンパク質の解析、第87回日本生化学会大会、国立京都国際会館(京都府・京都市)、2014年10月15~18日
7. 山口卓男、浅沼三和子、中西修一、斎藤洋平、岡崎正晃、どど孝介、袖岡幹子、ニトロベンゾオキサジアゾールを用いた蛍光turn-ON型アフィニティーラベル化法の開発、第12回次世代を担う有機化学シンポジウム、日本薬学会会長井記念ホール(東京都・渋谷区)、2014年5月23~24日

[図書](計0件)

なし

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 架橋型ヌクレオシドおよびヌクレオチド

発明者: 小比賀聡、山口卓男、堀場昌彦、脇玲子(国立大学法人 大阪大学)

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/054308

出願年月日: 2015年2月17日

国内外の別: 国外

取得状況(計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chem/IMCB-8ken-HP/Index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山口 卓男 (YAMAGUCHI, Takao)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：80596601

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし