

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21350091

研究課題名（和文） 光るRNAモジュールをタグとするRNAの動的挙動解析

研究課題名（英文） ANALYSIS OF DYNAMIC BEHAVIOR OF RNA USING LIGHT-UP RNA MODULE AS A TAG

研究代表者

青山 安宏 (AOYAMA YASUHIRO)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：00038093

研究成果の概要（和文）：トブラマイシンを置換した蛍光色素フェニル-BODIPY（プローブ）の蛍光強度はトブラマイシンアプタマー（トブラマイシンを特異的に捕捉するRNA配列）との相互作用により増大する。標的遺伝子（ここではtRNA）の下流にアプタマーをタグとして配した融合遺伝子の転写（DNA→RNA）により生成する融合（標的-アプタマー）RNAのアプタマー部分は、プローブの存在下、蛍光増強（大きくはないが）により検出できる。これによりこの過程（標的遺伝子の転写過程）を蛍光モニターできることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The fluorescence intensity of tobramycin-bearing phenyl-BODIPY as a probe increases upon interaction with tobramycin-aptamer, an RNA sequence that specifically binds to tobramycin. Transcription of a target gene (tRNA in this case) containing the aptamer sequence downstream thereof affords a fused (target-aptamer) RNA, the aptamer component of which can be detected by enhanced fluorescence, although no big, in the presence of the probe. In this way, the transcription of the target gene can be fluorescence monitored.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：化学生物学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：転写・RNA・蛍光・蛍光モニタリング・BODIPY・アプタマー・トブラマイシン・融合遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 2008年のノーベル化学賞は“緑色蛍光タンパク質 (GFP)”の発見と応用に對

して授与された。これを遺伝子レベルで標的タンパク質の下流に配置することにより標的タンパク質の動的挙動（生成や移動、局在

化など) をタグとして用いた GFP の蛍光によりモニターできるのが最大の利点である。このような手法を遺伝情報の転写過程 (DNA → RNA) の挙動解析に適用できないか、というのが本研究のスタートであった。GFP の手法にしたがうなら必要なものは“光る RNA” タグであるが、残念ながらこれは知られていない。

(2) そこで、水中では弱蛍光だが核酸などに結合すると著しく蛍光強度を増す環境応答型の蛍光色素と、これを特異的に捕捉し蛍光強度を高める特定の RNA 配列 (アプタマー) のペアを“光る RNA タグ”として用いることにした。特定のアプタマー配列はいわゆる人工進化 (SELEX) 法によりランダム配列から取得できる。色素として生細胞の核染色に多用されるヘキストを修飾したものを扱い、SELEX 法によりそのアプタマーを得、これらのペアを“光る RNA (青色蛍光 RNA; BFR) タグ”として(1)で述べた方法により *in vitro* 系での遺伝子の転写解析に応用したところ、実際にこの過程が蛍光モニターできることがわかった。

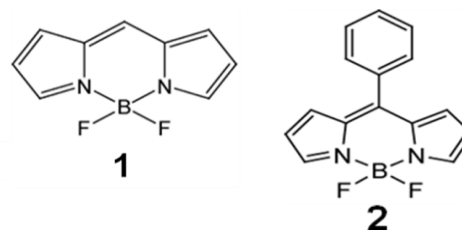
(3) 次の課題は“光る RNA タグ”が細胞内の転写解析に使えるかどうかである。難点は、上記の蛍光オン化がプローブのおかれた“場”の極性変化 (高極性 → 低極性) に基づいており、必ずしも特異的でないことである。人工プローブと生体物質との相互作用には疎水性会合を駆動力とする種々の非特異吸着が付きものあり、これが雑音 (ノイズ) シグナルを発生し、測定精度の低下をきたす。特異的な相互作用により蛍光強度が増大する新たな蛍光色素の開発が望まれた。マルチチャネル化に対応可能な蛍光波長の多様化も興味深い課題であった。このような事柄を背景に本研究では BODIPY とよばれる色素に着目した。

(4) 一方、“光る RNA タグ”を転写以外の RNA の動的挙動解析に応用することもこの研究の重要な展開であった。

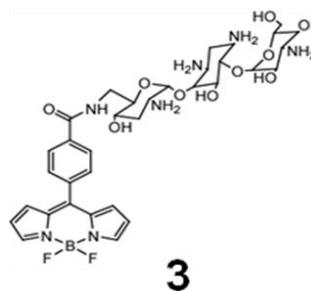
## 2. 研究の目的

(1) BODIPY (boron-dipyrromethene; **1**) は高い輝度 (1 に近い蛍光量子収率) を示すが、フェニル-BODIPY (**2**) は例外的に弱蛍光である。励起エネルギーがフェニル基と BODIPY 骨格を繋ぐ単結合周りの回転運動に消費されるためであるとされている。本研究では、分子間相互作用によりこの回転を抑制することを試みた。相互作用 (錯形成) する A (小分子) と B (高分子) を念頭に、(1) A を **2** のフェニル基に導入する、(2) B は A を取り込むが、その際、立体障害効果のた

めにフェニル-BODIPY 結合の回転が阻害 (抑制) され蛍光が増強される、というのが目論見である。A として抗生物質であるトブラマイシン (対応する RNA アプタマーが既知である) を選び、トブラマイシン置換フェニル-BODIPY と、これを特異的に捕捉する RNA アプタマー配列 (SELEX 法により取得) のペアを光る RNA モジュールとして使い、RNA の転写解析を検討する。立体規制に基づく蛍光オン化の一般性・有用性、特に転写解析における有用性、を検証することが本研究の主目的である。



(2) 一方、転写以外の RNA の動的挙動として、センサーへの応用を検討した。青色蛍光 RNA の蛍光が RNA 部分のコンホメーション変化に応じてオン/オフ制御できることに着目し、これを用いた ATP 蛍光センサーの開発に取り組んだ。



## 3. 研究の方法

(1) プローブの合成。アミノ糖であるトブラマイシンをアミド結合を介してフェニル基のパラ位に結合した置換フェニル-BODIPY プローブ (**3**) を合成した。

(2) アプタマーの取得。SELEX 法は、ランダム配列を有する RNA ライブラリーから、標的小分子 (ここではプローブ) を特異吸着する結合性配列 (アプタマー) を選択 (標的を担持した磁気ビーズへの吸着) / 増幅 (RTP-PCR) する手法である。アミノ糖置換フェニル-BODIPY プローブの磁気ビーズ (アビジン) への固定化にはプローブのアミノ基とアビジンとの相互作用を利用した。

(3) プローブ-アプタマー相互作用と蛍光増幅。得られたトブラマイシン/カナマイシン置換フェニル-BODIPY プローブとアプタマーの相互作用を蛍光 (強度滴定および偏向解

消) 法により調べた。また、原理の普遍性を確認するため、アプタマー/プローブの代わりに酵素/阻害剤、抗生物質修飾酵素/抗生物質、ボロン酸/糖の組み合わせを対象に、阻害剤、抗生物質、ボロン酸置換フェニル-BODIPYを用いる酵素、抗生物質修飾酵素(抗生物質耐性菌)、糖の蛍光センシングを検討した。

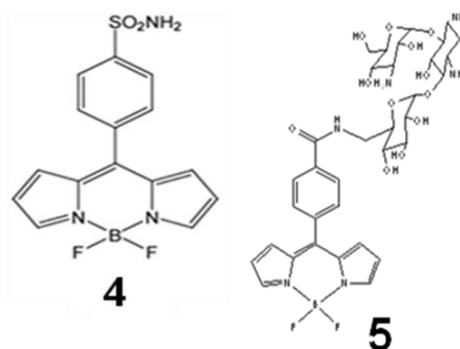
(4) 転写解析。まず、アプタマー配列のみを有するDNAの転写をトブラマイシン置換フェニル-BODIPY プローブ (3) 存在下に行い、この過程の蛍光強度変化を追跡した。ついで、tRNAを標的RNAとし、その下流にアプタマー配列を配した融合DNAの転写を同様にプローブ存在下に行い、標的RNAの転写がアプタマータグの蛍光を指標として蛍光モニターできるかどうか検討した。

(5) ATPセンサー。修飾ヘキストとそのアプタマーからなる青色蛍光RNAタグは、アプタマーのコンホメーションを変化させることにより両者間の相互作用を抑制し、これにより蛍光オフ化することができる。標的物質ATPの存否によりコンホメーション変化を誘起できるようなシステムの構築を検討した。

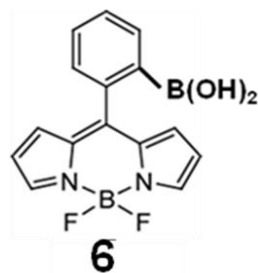
#### 4. 研究成果

(1) 光るRNAモジュール。トブラマイシン置換フェニル-BODIPY プローブ (3) のアプタマーを SELEX により取得する試みは結局うまくゆかなかった。トブラマイシンのCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>基はBODIPYへの結合に、CHNH<sub>2</sub>基は磁気ビーズへの結合に、それぞれ使われ、トブラマイシン部位の周りに大きな立体障害要因を作り、これがトブラマイシンとRNAとの有効な相互作用を妨げた結果と判断される。このような状況で、アプタマーとしてはトブラマイシンそのものの既知アプタマー、5'-GGGACUUGGUUUAGGUA AUGAG-UCCC-3' (26塩基) を使わざるを得なかった。

既知アプタマーとパラ体プローブは強く相互作用し(化学量論比~1:1で飽和)、小さいながらも明確な蛍光増強(約1.7倍)をもたらす。アプタマー配列の代わりにランダム配列を用いると蛍光増強はまったく見られず、これが特異的なプローブ-アプタマー相互作用に基づくことがわかる。増強率が大きくないのは、プローブ-アプタマー錯体においてアプタマー部位がフェニル-BODIPY単結合周りの回転を有効に阻害するほど嵩高くないからであろう。それはともかく、このペアが光るRNAモジュールとしての基本的な役割を担いえることが示された。



(2) 回転阻害と蛍光増強。蛍光増強がほんとうに回転阻害に基づくのか否かを明らかにするため、パラ位にスルホンアミド(SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)基やカナマイシン部位を導入したフェニル-BODIPY (4, 5) を合成した。ベンゼンスルホンアミドは炭酸脱水酵素の阻害剤であり、またカナマイシンはカナマイシン耐性菌が産生するカナマイシン修飾酵素の基質であり化学修飾を受ける。検討の結果、炭酸脱水酵素はスルホンアミド置換プローブの蛍光を約2.6倍増強し、カナマイシン修飾酵素はカナマイシン置換プローブの蛍光を10.5倍高めることが判明した。また、オルト位にボロン酸を導入したフェニルボロン酸-BODIPY (6) はフルクトースとの錯形成に際し蛍光強度が6倍増加すること、<sup>19</sup>F-NMRの検討から蛍光増強を起こす錯体においてBODIPY骨格の前後両面が非等価になっていること、つまり、置換ベンゼン環の回転が阻害されており、これが蛍光増強の原因であることが明らかになった。



(3) 幾何異性体比蛍光センシング。上記の結果は、程度に差はあるが、パラ置換体についての蛍光増強が相互作用に基づく回転抑制に起因することを示している。ところで、メタ置換体は異なる挙動を示す。メタ位にスルホンアミドあるいはトブラマイシン部位をもつ3や4のメタ異性体は、パラ体同様、炭酸脱水酵素やアプタマーと強く相互作用するが、蛍光強度は逆に減少する。カナマイシン置換体の場合はカナマイシン修飾酵素との相互作用において蛍光は増すが、その程度はきわめて小さい(1.5倍程度)。これらの結果は、実際の蛍光強度はフェニル面とBODIPY骨格の二面核に依存し、パラ体の場

合はこれが蛍光性の大きな捩れ角に固定されるが、メタ体の場合は無蛍光性の共平面に近い構造に固定されることを示唆している。また、特異的相互作用はこのように強い幾何異性体（パラ、メタ）依存性を示すが、非特異吸着はこのような依存性を示さず、これ（幾何異性体比蛍光センシング）により両者を区別できることが明らかになった。

(4) 転写解析。RNAアプタマーがトブラマイシン置換プローブ(3)との相互作用において小さいながらも特異的な蛍光増強をもたらすことが確認できた。ついで、当該のRNAアプタマーをDNAの転写により発生させ、これをプローブ存在下の蛍光モニターにより検出できるかどうかを大腸菌のSer用tRNAの下流にアプタマー配列を配した融合DNAの転写について検証した。その結果、蛍光強度は時間とともに増大し、その後一定値(約1.7倍増強)を示した。メタ体プローブ(3)のメタ異性体の場合は逆に蛍光強度がわずかながら減少(約0.8倍)した。また、アプタマー配列の代わりにランダム配列を配した融合DNAを用いた場合や、トブラマイシン部位をもたないプローブを用いた場合は蛍光変化がまったく観測されず、蛍光強度の変化がアプタマーとプローブの特異的相互作用に基づくことが確認できた。

(5) ATPセンサー。修飾ヘキストとこれの特異的に捕捉するRNAアプタマーのペアからなる青色蛍光RNAをATPに対するアプタマーとコミュニケーションモジュールを介して連結した蛍光アプタマーセンサーを開発した。これにATPが結合するとモジュール部分に構造変化が起こり、蛍光RNA部分が活性形になり青色蛍光を発する仕組みになっている。これにより、ラベル化の必要がないATPセンサーが実現した。

#### 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)

[雑誌論文] (計1件)

- ① C. Furutani, K. Shinomiya, Y. Aoyama, K. Yamada, S. Sando, “Modular Fluorescent RNA Sensors for Label-Free Detection of Target Molecules”, *Molecular BioSystems*, **6**, 1569-1571 (2010) (DOI: 10.1039/C001230K, 査読有)。

[学会発表] (計14件)

- ① 井出敬一朗・清水康映・山本達望・青山安宏、“抗生物質耐性菌の蛍光センシング”、第64回有機合成化学協会関東支部

新潟シンポジウム、2012年12月1日、長岡技術科学大学、長岡、新潟。

- ② 山本達望・田中愛・青山安宏、“抗生物質部位を有する蛍光色素と抗生物質耐性菌との相互作用”、2012年日本化学会西日本大会、2012年11月10日、佐賀大学、佐賀。
- ③ 辻智広・権田勝也・青山安宏・徳永武士・山東信介、“幾何異性体比蛍光センシング—特異的相互作用と非特異吸着の区別—”、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月6日、北海道大学、札幌。
- ④ 山本達望・田中愛・青山安宏・徳永武士・山東信介、“抗生物質部位を有する蛍光色素と抗生物質耐性菌との相互作用”、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月6日、北海道大学、札幌。
- ⑤ 井出敬一朗・清水康映・青山安宏・徳永武士・山東信介、“抗生物質置換BODIPYを用いる抗生物質耐性菌の蛍光センシング”、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月7日、北海道大学、札幌。
- ⑥ 井出敬一朗・清水康映・水上久美・青山安宏・徳永武士・山東信介、“抗生物質部位を有する蛍光プローブの開発と応用”、2011年日本化学会西日本大会、2011年11月12日、徳島大学、徳島。
- ⑦ 井出敬一朗・清水康映・水上久美・青山安宏・徳永武士・山東信介、“抗生物質部位を有する蛍光プローブの開発と応用(1)”、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月13日、つくば国際会議場「エポカルつくば」、筑波、茨城。
- ⑧ 清水康映・井出敬一・水上久美・青山安宏・徳永武士・山東信介、“抗生物質部位を有する蛍光プローブの開発と応用(2)”、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月13日、つくば国際会議場「エポカルつくば」、筑波、茨城。
- ⑨ Y. Aoyama, “New Tools for Bioimaging: A Step toward in situ Chemistry of Complicated Admixture Systems”, 2010 International Chemistry Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem), 2010年12月18日, Sheraton Hawaiian Village, Honolulu, Hawaii, USA.
- ⑩ 青山安宏、“バイオイメージングの新展開—夾雑系の有機化学に向けて—”、日本化

学会東海支部地区講演会、2010年11月13日、B-nest 静岡市産学交流センター ペガサート、静岡。

- ⑪ 辻智広・青山安宏・徳永武士・山東信介、“阻害剤部位を有する蛍光色素の合成とそれを利用したタンパク質検出の試み”、2010年日本化学会西日本大会、2010年11月6日、熊本大学、熊本。
- ⑫ 水上久美・青山安宏・徳永武士・山東信介、“核酸相互作用部位としてのアミノ糖を置換した蛍光色素の合成と応用”、2010年日本化学会西日本大会、2010年11月6日、熊本大学、熊本。
- ⑬ 青山安宏、“生体イメージンの新手法開発—混雑系の有機化学に向けて—”、20周年記念万有福岡シンポジウム、2010年5月22日、九州大学医学部百年講堂、福岡。
- ⑭ 青山安宏、“生体イメージンに向けた新手法”、筑波大学学際物質科学センター第8回機能性分子シンポジウム、2009年12月19日、筑波大学、筑波。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青山 安宏 (AOYAMA YASUHIRO)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：000348093