

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24年5月15日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710217

研究課題名（和文） 生体内 ncRNA の機能解明を目指した蛍光性 RNA タグの開発

研究課題名（英文） In vitro selection of fluorescent RNAs for in vivo imaging

研究代表者

萩原 正規（HAGIHARA MASAKI）

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：40403000

研究成果の概要（和文）：本研究提案『生体内 ncRNA の機能解明を目指した蛍光性 RNA タグの開発』では、有機合成化学手法で作製した GFP 発色団を構造的基盤とする発色団化合物ライブラリーを構築し、およびそれに結合する分子生物学手法により獲得した RNA アプタマーペアから形成される RNA-発色団ペアライブラリーから、『蛍光性 RNA 発色団複合体』の探索を行った。

研究成果の概要（英文）：In vitro selection provides one of the most powerful strategies for obtaining functional RNA molecules. In this project, we tried to obtain RNA receptors against the synthetic chromophores by in vitro selection to investigate whether synthetic RNA receptor-chromophore complexes can emit fluorescence as other fluorescent proteins do. The selection and evolution technique has produced RNA aptamers that specifically bind small molecules and emit fluorescence only when RNA aptamers bound to synthetic chromophores.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：(1) RNA アプタマー

(2) 蛍光タンパク質

(3) 蛍光性 RNA

1. 研究開始当初の背景

緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein; GFP）は、融合タンパク質として発現させてもその優れた蛍光特性を失わないことから、タンパク質の細胞内局在をリアルタイムに検出するツールとして広く使われている。GFP は、特別な基質を必要とすること無く、それ自身が強い蛍光を発し、また融合タンパク質としてもその蛍光特性を失わないことから、シグナル伝達などに関与するタンパク質の細胞内局在をリアルタイムに生きたままで検出するタグとして、最も広く使われる蛍光タンパク質である。

GFP は樽型（バレル）構造内に蛍光発色団

を保持した特徴的な三次元構造を有するタンパク質である。蛍光発色団は、アミノ酸側鎖から非酵素的に環化、脱水反応を経て形成される。近年、GFP とは異なる多様な色彩を示すフルーツ蛍光タンパク質が開発された。蛍光波長が十分に離れた蛍光タンパク質を標的タンパク質の分子タグとして利用すると、細胞内で複数のタンパク質を同時に検出することができることから、様々な励起・蛍光波長を有する蛍光タンパク質を用いたマルチカラーイメージング技術は細胞生物学において、必要不可欠なものになっている。

GFP を利用したタンパク質可視化技術の発展に伴い、細胞内でのタンパク質動態に関

する技術基盤は整いつつある。一方で、タンパク質同様に重要な細胞内情報制御分子として明らかになった ncRNA の動態については、技術基盤が全く整備されていないため、機能解明がほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

タンパク質へと翻訳されないノンコーディング RNA (ncRNA) が細胞の癌化、分化、さらには代謝経路の制御に重要な役割を果たしていることが明らかにされ、ncRNA は学問的な対象にとどまらず医薬品開発における重要な標的として認識されている。本研究提案、『生体内 ncRNA の機能解明を目指した蛍光性 RNA タグの開発』では、細胞内でのタンパク質可視化技術と比較して、未だ十分な方法論が確立されていない、機能性 ncRNA を細胞内でリアルタイムに検出・定量し、ncRNA の機能を体系的に研究・理解するための技術基盤確立を目指し、ncRNA を標識する蛍光性 RNA タグの開発を行う。

本研究提案では、有機合成化学手法で作製した GFP 発色団を構造的基盤とする発色団化合物ライブラリーを構築し、およびそれに結合する分子生物学手法により獲得した RNA アプタマーペアから形成される RNA-発色団ペアライブラリーから、『蛍光性 RNA 発色団複合体』を創製し、細胞内 RNA の特異的な蛍光標識法を確立する。作製した蛍光性 RNA 複合体を、標的 ncRNA に対する蛍光分子タグ、に利用し、ncRNA の細胞内機能解明に応用する。

申請者は、試験管内分子進化法 (in vitro セレクション法) による RNA ライブラリーからの RNA 人工受容体 (RNA アプタマー) の創製、および蛍光センサー構築に関する研究 (JACS, 2002, 2006 など) の過程で、RNA アプタマーが、さまざまな環境場として利用できることを学んだ。GFP をはじめとする蛍光タンパク質では、バレル内部の酸性、塩基性、芳香族アミノ酸の側鎖が様々な環境を形成することで、発色団は特有の蛍光波長特性を呈示する。一方、RNA アプタマーにおいても、アデニン、グアニン、ウラシル、シトシンを含む各種塩基との π - π スタッキング相互作用、水素結合、およびリン酸バックボーンとの相互作用を通じて、タンパク質内部環境に匹敵する微小環境の異なる基質結合場を構築することが可能である。即ち、化学合成した様々な発色団化合物ライブラリーと RNA ライブラリーを組み合わせることにより、GFP を初めとする蛍光タンパク質に匹敵する多様な蛍光特性 (色彩、蛍光寿命など) を有する新奇な蛍光性 RNA-発色団複合体を創製できると着想した。

本研究提案の究極目標は、GFP で培われたタンパク質可視化・定量化技術に匹敵する

ncRNA 検出技術基盤を築き、ncRNA の機能解明、さらには産業利用、社会福祉に貢献することである。我々は、未だ細胞内で機能する核酸、タンパク質の生物学的機能を十分に理解するにはいたっておらず、ゲノム解析、プロテオーム解析などで得られた膨大な情報力を利用することができない。これまでに GFP 融合タンパク質を用いた可視化技術により、タンパク質分子間の相互作用や反応速度が、ナノメートルスケールの精度やミリ秒の分解能で、リアルタイムかつ定量的に追跡できるようになった。しかしながら、タンパク質同様に重要な情報制御分子の RNA については、未だ確固たる技術基盤は築かれていない。有機合成化学と試験管内進化学を融合して機能性分子を創製する本研究提案は、学術的な先進性を十分に世界にアピールできる。RNA-発色団ペアライブラリーを利用する全く新しい ncRNA の標識・検出技術は、GFP で培われたタンパク質可視化技術と適合性が高い。これまで発展した GFP テクノロジーの大部分が、細胞内での RNA 標識、検出技術に応用できると考えられるため、本提案技術は RNA テクノロジーのブレークスルーとなる。

3. 研究の方法

本研究提案『生体内 ncRNA の機能解明を目指した蛍光性 RNA タグの開発』では、GFP 発色団を構造的基盤とした、発色団化合物ライブラリーの構築、およびそれら発色団化合物ライブラリーに選択的に結合する RNA アプタマーの探索、を通じて優れた蛍光特性を有する『蛍光性 RNA 発色団複合体ペア』を創製することにより、細胞内 RNA の特異的な蛍光標識法を確立する。

(1) 発色団化合物ライブラリーの構築

GFP 類縁蛍光タンパク質の蛍光発色団は、3つの連続するアミノ酸側から非酵素的に環化、脱水反応を経て形成される。トリアリールメタン系色素のマラカイトグリーン、およびシアニン系色素のチアゾールオレンジなどと同様に、GFP の発色団自体は、芳香環部の自由回転により低い蛍光量子収率を示す。単独では蛍光性の無い GFP 発色団の母核構造に、化学構造修飾を施すことにより、異なる蛍光特性を有する発色団化合物ライブラリー作製を目指した。

(2) RNA-発色団蛍光ペアライブラリーの探索

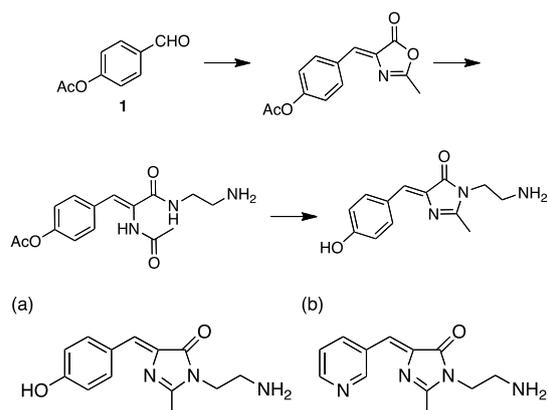
70 塩基のランダムな塩基配列を有する RNA ライブラリーを化学的に合成した後、発色団との結合活性を指標にして、選択的に結合する RNA アプタマーを試験管内分子進化法 (in vitro セレクション法) を利用することによ

り探索した。(1)で構築した発色団化合物ライブラリーの化合物それぞれに対してセレクションを行うことにより、様々な結合特性の異なる RNA アプタマーが得られる。多様な RNA 配列について、発色団との結合特性(親和性、結合速度)を解析し、発色団との結合に伴う蛍光変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 発色団ライブラリーの合成

GFP 発色団から特に蛍光特性に関わる部位を中心として合成計画を立てた。多様な化合物ライブラリーを構築するために、コンビナトリアルな手法で化合物ライブラリーを構築する。芳香族アルデヒドユニット(ユニット A)、およびグリシン誘導体ユニット(ユニット B)を予めユニットごとに合成し、R1 ユニットと、R2 ユニットの Erlenmeyer Azalactone Synthesis により環化させることにより合成した。今回の研究では、天然の GFP の発色団であるアリール基がフェノール、および天然には存在しないアリール基がピリジン系を有する芳香族アルデヒドユニットから 2 種類の発色団を合成した(図)。

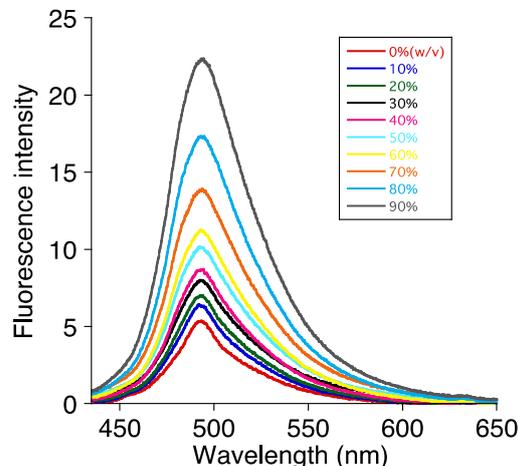


(図)(上)芳香族アルデヒドを原料とした発色団の合成スキーム(a)天然型 GFP 発色団類自体(フェノール型)(b)非天然型発色団(ピリジン型)

(2) 蛍光スペクトルの測定

GFP が強い蛍光を発する理由として、発色団が β バレルに囲まれることにより分子の回転運動が妨げられ、光照射の励起によって得られたエネルギーが蛍光として放出されやすくなるのが挙げられる。これに対して今回合成した GFP 発色団誘導体は、通常の水溶液中では分子の回転運動が自由に行える環境にあるのでほとんど蛍光を発しないと考えられる。しかし粘性溶液中では分子の運動が妨げられ、蛍光強度が増大すると予想されるので、粘度と蛍光強度の関係を調べた。この結果からグリセリンの濃度が増し、粘性が大きくなるにつれてフェノール型、ピリジン型いずれの発色団でも蛍光強度が上昇する

ことがわかった(図)。すなわち、合成された発色団は、水溶液中でほぼ無蛍光であったが、溶液の粘性が増加するに従って、蛍光強度の増強が観測された。このことから発色団を疎水的で分子の運動を抑制する空間内に置くことで、蛍光強度が増加すると考えられる。



(図)天然型 GFP 発色団類自体(フェノール型)の、グリセロール濃度増加に伴う蛍光強度変化

(3) RNA アプタマーの探索

核酸の化学合成および酵素化学的方法を用いて作製した 70 塩基のランダムな配列を有する RNA に対して、合成した発色団に対する親和性の差を利用した選択と、酵素による増幅を繰り返すことで、標的化合物に対して強く結合する核酸分子を探索したところ、フェノール、及びピリジン系を有する発色団それぞれに高い親和性で結合する RNA が得られた。獲得した RNA アプタマーと発色団誘導体の相互作用を、表面プラズモン共鳴を利用した Biacore システム(GE Healthcare)を用いて観測したところ、解離定数(Kd)で数 μ M 程度の高い親和性で結合する RNA が得られた。また RNA アプタマーの配列から、どの領域が発色団誘導体との結合に関与しているのかを調べるために、RNA アプタマーの短縮化や Doped-selection を行い、発色団との結合領域を同定することが出来た。

(4) RNA-発色団複合体の蛍光評価

得られた RNA アプタマーと発色団誘導体を混合し、蛍光強度が変化するか調べた。しかしながら現在のところ、複合体形成によって蛍光強度が増加するような RNA アプタマー・発色団のペアはまだ見つからない。現在の *in vitro* セレクション法は、化合物との結合活性のみを指標にした選択方法であるため、高い選択性、親和性で結合する RNA アプタマーが、発色団との複合体形成に際して、期待するような蛍光変化を示すとは限ら

ない。今後は、DNA ライブラリーが1分子ずつ封入された油中水滴 (w/o 型) エマルジョン内で RNA 転写反応を行った後、発色団との結合に伴う蛍光発色 (表現型) と対応する RNA 配列 (遺伝子型) を共存させながらセクションを行う方法 (in vitro compartmentalization 法) を利用することで、発色団との結合に伴う蛍光活性を指標にして『蛍光性 RNA-発色団複合体』を獲得する方法が有効であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

(1) Shiori Umemoto, Seongwang Im, Jinhua Zhang, Masaki Hagihara, Asako Murata, Yasue Harada, Takeo Fukuzumi, Takahiro Wazaki, Shin-ichi Sasaoka, and Kazuhiko Nakatani

Structure-activity studies on the fluorescent indicator in the displacement assay for the screening of small molecules binding to RNA

Chemistry European Journal, in press (査読あり)

(2) Masaki Hagihara, Hanping He, Maki Kimura, Kazuhiko Nakatani
A small molecule regulates hairpin structures in d(CGG) trinucleotide repeats. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 2000–2003 (2012) (査読あり)

(3) Masaki Hagihara, He Hanping, Kazuhiko Nakatani
Small Molecule Modulates Hairpin Structures in CAG Trinucleotide Repeats *ChemBioChem*, 12, 1686–1689 (2011) (査読あり)

(4) Changfeng Hong, Masaki Hagihara, Kazuhiko Nakatani
Ligand-Assisted Complex of Two DNA Hairpin Loops
Angewandte Chemie International Edition, 50, 4390–4393 (2011) (査読あり)

(5) Masaki Hagihara, Lisa Yamauchi, Akiko Seo, Keisuke Yoneda, Mayo Senda, Kazuhiko Nakatani
Antisense-induced guanine quadruplexes inhibit reverse transcription by HIV-1 reverse transcriptase
Journal of the American Chemical Society, 132, 11171–11178 (2010) (査読あり)

(6) Masaki Hagihara, Keisuke Yoneda,

Hiroaki Yabuuchi, Yasushi Okuno, Kazuhiko Nakatani
A reverse transcriptase stop assay revealed diverse quadruplex formations in UTRs in mRNA

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20, 2350–2353 (2010) (査読あり)

〔学会発表〕 (計 9 件)

(1) 萩原 正規、中谷 和彦 グアニン修飾アンチセンス核酸を利用したグアニン四重鎖構造制御法 日本化学会第 92 春季年会 (2012) 2012 年 3 月 28 日 慶應義塾大学日吉キャンパス

(2) 萩原 正規、中谷 和彦 新奇アンチセンス核酸を利用したグアニン四重鎖構造制御法 2011 年 9 月 13 日 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム つくば国際会議場「エボカルつくば」

(3) 萩原 正規、中谷 和彦 新奇アンチセンス核酸を利用した RNA 中のグアニン四重鎖構造の制御 2011 年 9 月 1 日 アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011 大阪大学コンベンションセンター

(4) Masaki Hagihara, Kazuhiko Nakatani
Antisense-Induced G-Quadruplex Structures Interfere with Reverse Transcription by HIV-1 Reverse Transcriptase. 2011 年 6 月 15 日 RNA 2011, the 16th Annual Meeting of the RNA Society 京都国際会議場

(5) 萩原 正規、中谷 和彦 アンチセンス核酸を利用したグアニン四重鎖構造制御法 2011 年 3 月 26 日 日本化学会第 91 春季年会 (2011) 神奈川大学

(6) Masaki Hagihara and Kazuhiko Nakatani Reverse transcriptase stop assay revealed diverse quadruplex formations in mRNA. PACIFICHEM 2010 2010 年 12 月 19 日ハワイコンベンションセンター

(7) Masaki Hagihara, Keisuke Yoneda, and Kazuhiko Nakatani. In vitro selection of RNA aptamers that can bind to GFP chromophore. PACIFICHEM 2010 2010 年 12 月 19 日ハワイコンベンションセンター

(8) Masaki Hagihara, Lisa Yamauchi, Akiko Seo, Keisuke Yoneda, Mayo Senda, Kazuhiko Nakatani Antisense-induced guanine quadruplexes interfere with reverse transcription by HIV-1 reverse

transcriptase. ISNAC2010 2010年11月10日
横浜 はまぎんホール・ヴィアマーレ

(9) Masaki Hagihara Quadruplexes in Untranslated Regions in mRNA Modulates Translation 2010年7月9日 The 4th HiPep-Okinawa International Workshop Program 沖縄産業支援センター

[その他]

ホームページ等

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/rbc/member/hagihara.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 正規 (HAGIHARA MASAKI)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：40403000

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし