

# GFP様蛍光リガンドの蛍光を誘導する非G4型RNA aptamerのNMR解析

○山本春香<sup>1</sup>,油屋紫乃<sup>2</sup>, 井川善也<sup>2,3</sup>,坂本泰一<sup>1</sup>

1千葉工業大学 先進工学研究科 生命科学専攻,2 富山大学大学院 医薬理工学環創薬・製剤工学プログラム,3 富山大学大学院理工学研究科

## INTRODUCTION

蛍光性RNA aptamerは、遊離状態では無蛍光または弱蛍光の色素に結合し、色素の蛍光発光を誘導する(Fig. 1)。蛍光性RNA aptamerは、細胞内RNAの可視化および分析科学のツールとして注目を集めている。

GFP由来色素DFHBI(3,5-ジフルオロ-4-ヒドロキシベンジリデンイミダゾリノン)を認識する蛍光性RNA aptamerが作製され、特性評価されている<sup>1)</sup>。しかし、それらのほとんどは色素結合部位でグアニン四重鎖(G4)構造を形成し、これらのG4型aptamerは蛍光を誘導するためにK<sup>+</sup>イオンを必要とする。K<sup>+</sup>濃度の低い細胞外環境では蛍光発現が制限される可能性があり、応用範囲を拡大するためには非G4型aptamerの開発が必要である。

Jaffreyらは、GFP様蛍光体であるHBIファミリーに属するDMHBI(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシベンジリデンイミダゾリノン; Fig. 2)の蛍光を誘導する4つのRNAアプタマー(2-4, 3-6, 13-2, および17-3)を作製した<sup>1)</sup>。そこで、阿部らは17-3 RNAの生化学的性質を解析し、活性二次構造を同定するために短鎖型(17-3min RNA)を作製し、17-3min RNAが3つのステムと2つの大きなループを形成する非G4型であることを明らかにした<sup>2)</sup>。

本研究では、改変aptamer(17-3min A52GU58G; Fig. 3)とDMHBIとの相互作用をNMRにより解析した。

## RESULTS & DISCUSSION

17-3min A52GU58Gに対するDMHBIの滴定実験において、Mg<sup>2+</sup>非存在下でイミノプロトンスペクトルを測定したが、DMHBIを添加してもシグナルの変化は観察されなかった。次に、17-3min A52GU58Gに50 mM MgCl<sub>2</sub>を添加すると、いくつかのイミノプロトンシグナルが出現した(Fig. 4)。さらに、50 mM MgCl<sub>2</sub>条件下でのDMHBIの滴定は、いくつかのシグナルの変化をもたらした。高磁場(赤枠)における1つのイミノプロトンシグナルに注目すると、シグナルの半分はaptamerとDMHBIの比が1:0.5のところでシフトし、すべてのシグナルは1:1のところでシフトした。これは、aptamerとDMHBIが1:1で相互作用をしていることが示唆された。

UV融解分析の結果、50 mM MgCl<sub>2</sub>存在下では、Mg<sup>2+</sup>非存在下と比較してaptamerのT<sub>m</sub>値が約20°C上昇することが示された。さらに、DMHBIはMg<sup>2+</sup>の有無に関わらず、aptamerのT<sub>m</sub>値を約4°C低下させることが示された(Table 1, Fig. 5)。これらの結果は、aptamerがMg<sup>2+</sup>によって折り畳まれたことを示している。また、DMHBIの結合が17-3min A52GU58Gの構造を部分的に不安定化させたことも示唆されている。

## METHODS

### NMR

鑄型DNAを北海道システムサイエンス社に合成を依頼し、in vitro転写後、PAGEにより精製した。NMRスペクトルは、AVANCE Neo 600分光計(Bruker Biospin社)を用いて313 Kで測定した。aptamerはNMR緩衝液(20 mM NaPB(pH 6.5), 50 mM NaCl, 5% D<sub>2</sub>O)に溶解した。NMRデータは、ソフトウェアTopSpin 4.1.4(Bruker Biospin社)を用いて解析した。

### T<sub>m</sub>値解析

aptamerのA260の温度変化を、紫外可視分光光度計V-730BIO(JASCO社)を用いて測定した。サンプルはNMR緩衝液に溶解した。各T<sub>m</sub>値は二次微分法( $x=f''(y)$ )を用いて算出した。

## References

1) J. S. Paige et al. *Science*, **333**, 642–646, 2011

2) S. Abe et al. *Molecules*, **30**, 1777, 2025

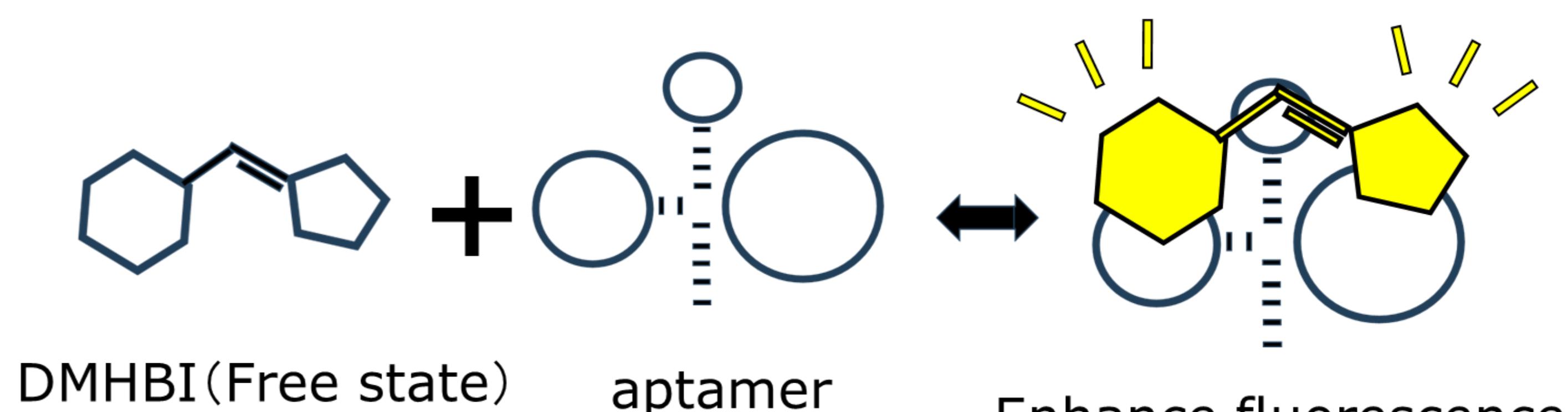


Fig. 1 Function of Fluorogenic RNA aptamer

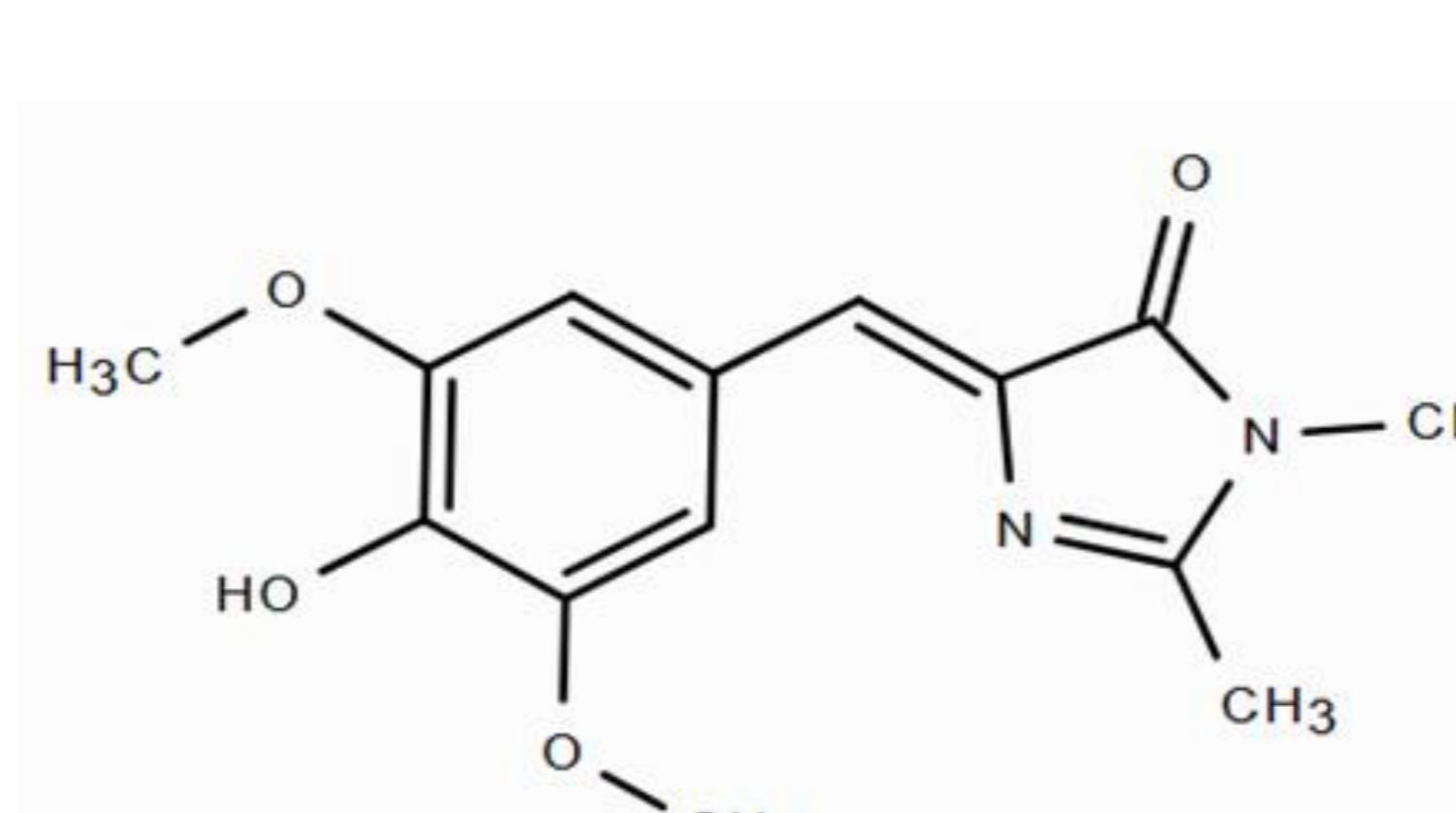


Fig. 2 Structure of DMHBI

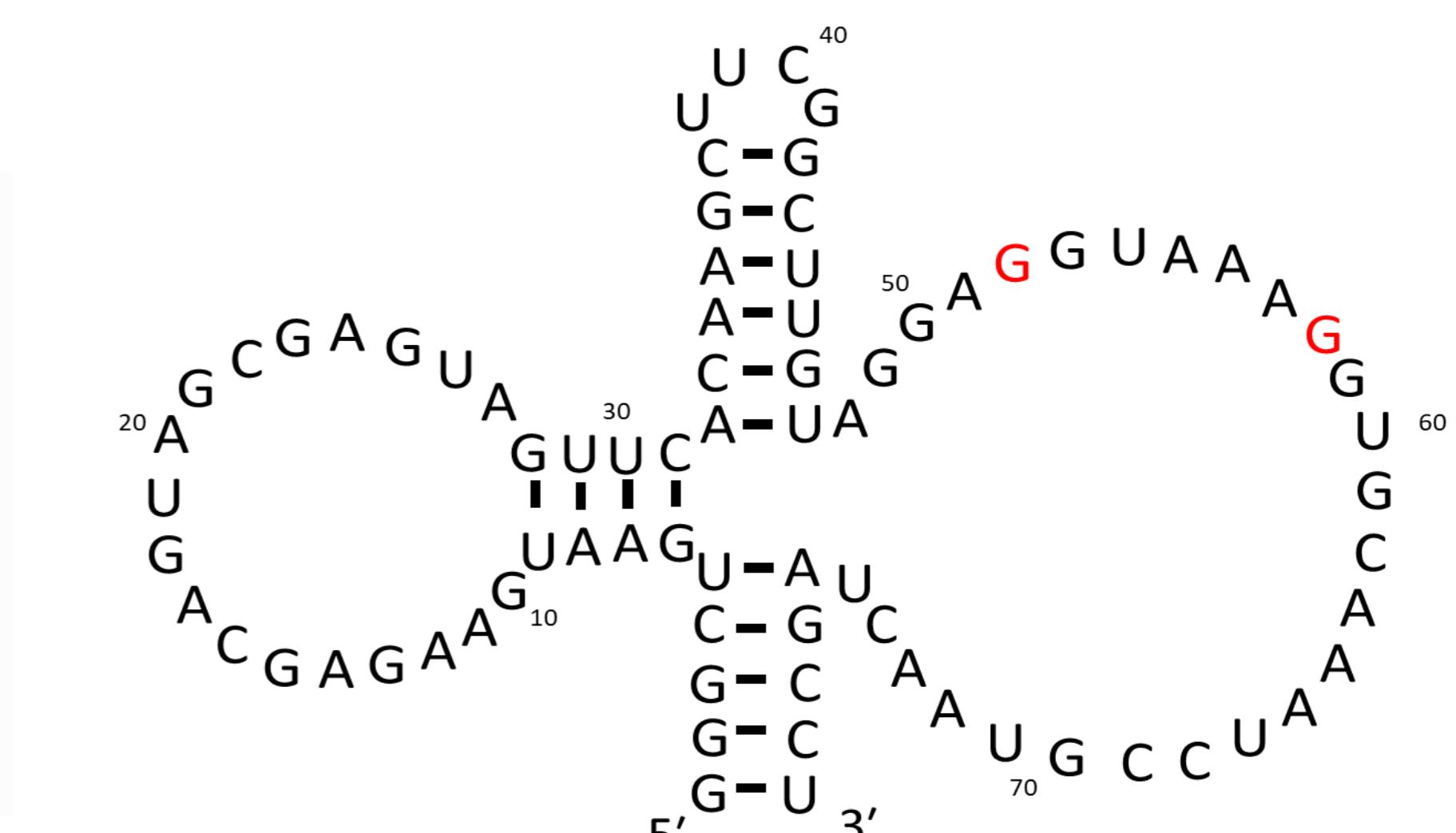


Fig. 3 Secondary structure of 17-3min A52GU58G

aptamer: DMHBI

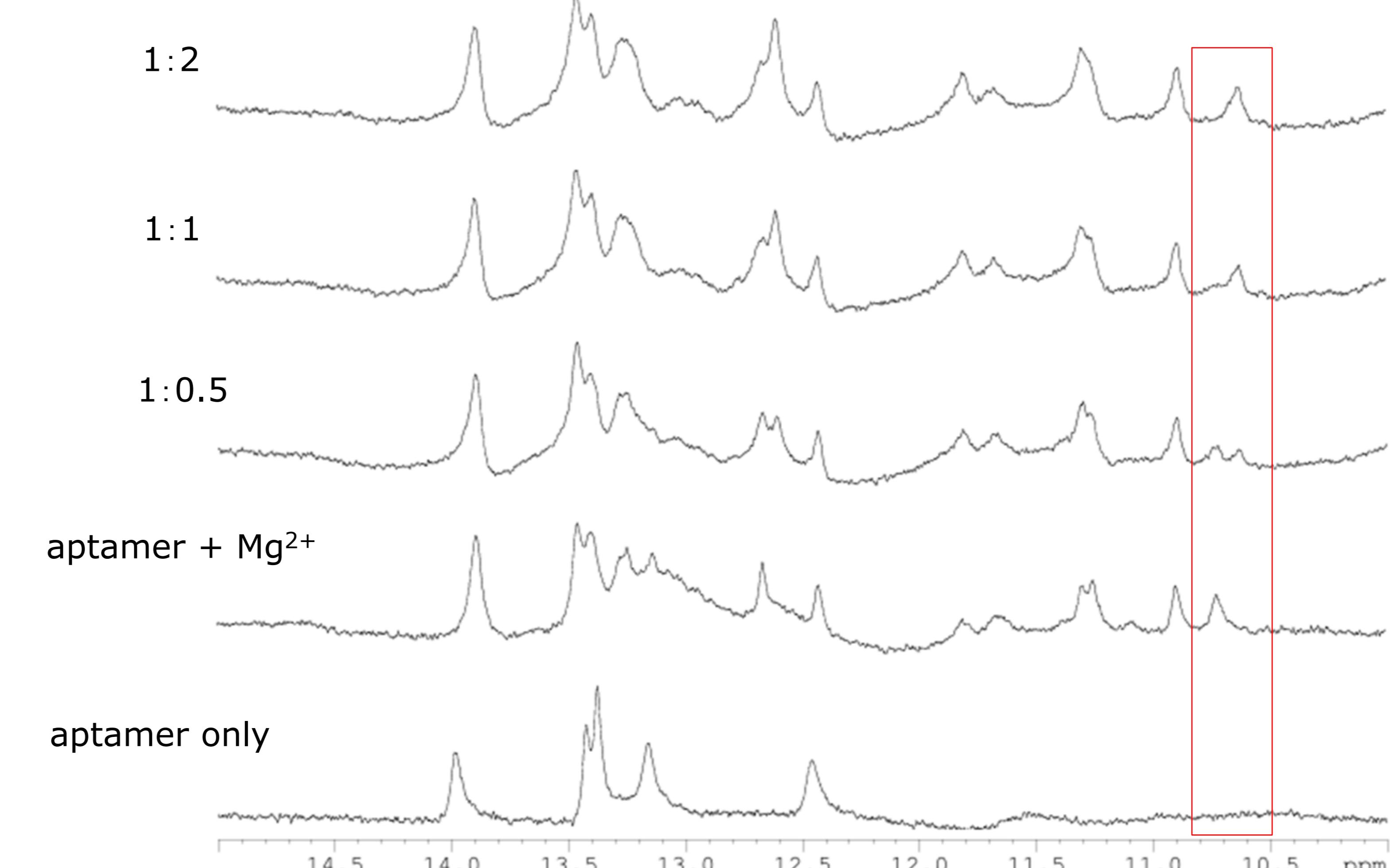


Fig. 4 1D imino proton spectra of 17-3 min A52GU58G, addition of Mg<sup>2+</sup>, and titration with DMHBI

Table 1 T<sub>m</sub> analysis under various conditions

	line in Fig. 5	T <sub>m</sub> (°C)	50 mM MgCl <sub>2</sub>	aptamer:DMHBI
1	—	45.5	—	1 : 0
2	—	66.4	+	1 : 0
3	—	41.8	—	1 : 1
4	—	62.9	+	1 : 1
5	—	42.3	—	1 : 2
6	—	62.7	+	1 : 2

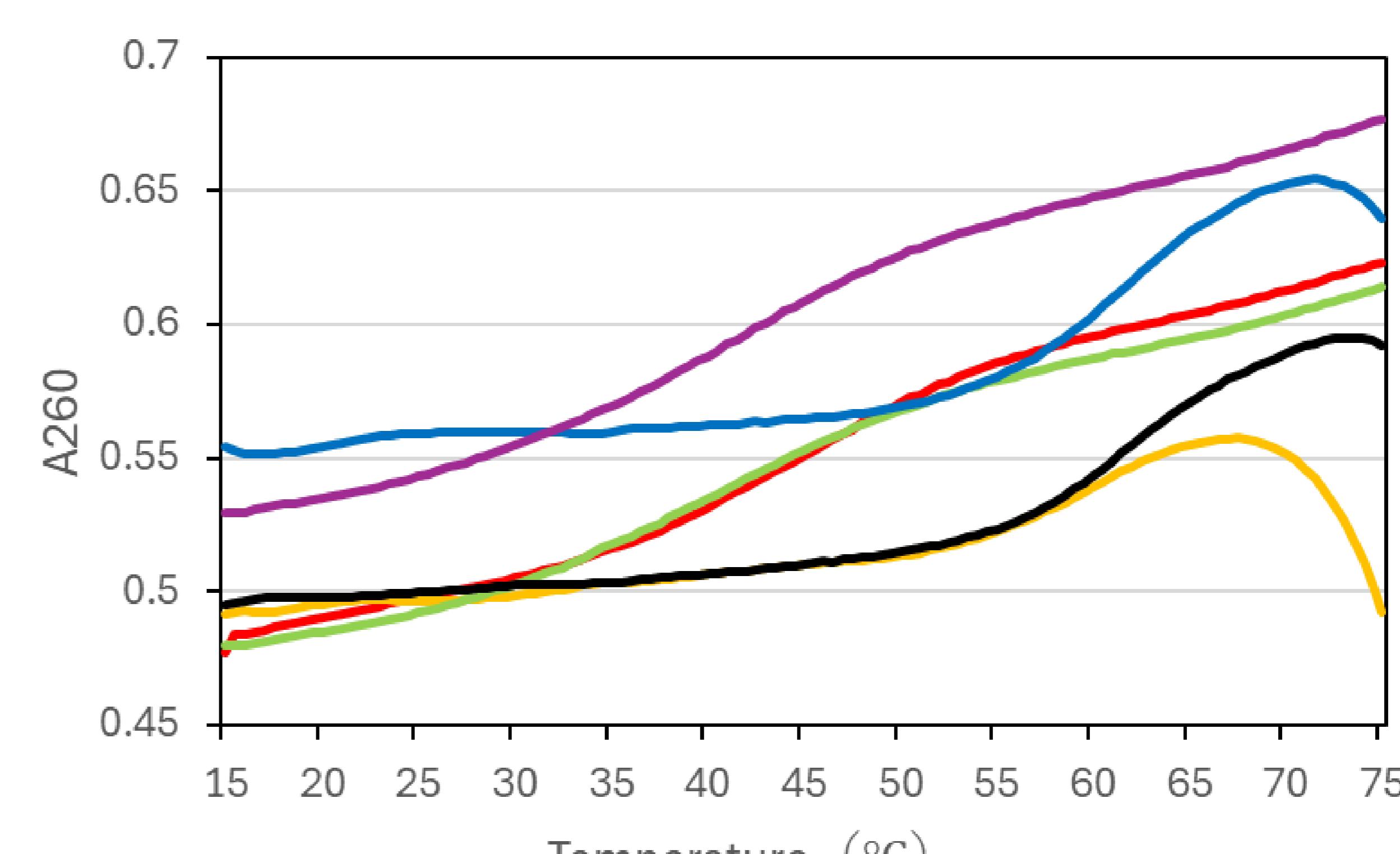


Fig. 5 Thermal melting UV curves of 17-3 min A52GU58G. The measurement conditions are shown in Table 1.