

# 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℃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℃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**  
鋳型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.apta-mer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Toppin 4.1.4(Bruker Biospin社)を用いて解析した.

**T<sub>m</sub>値解析**  
apta-mer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

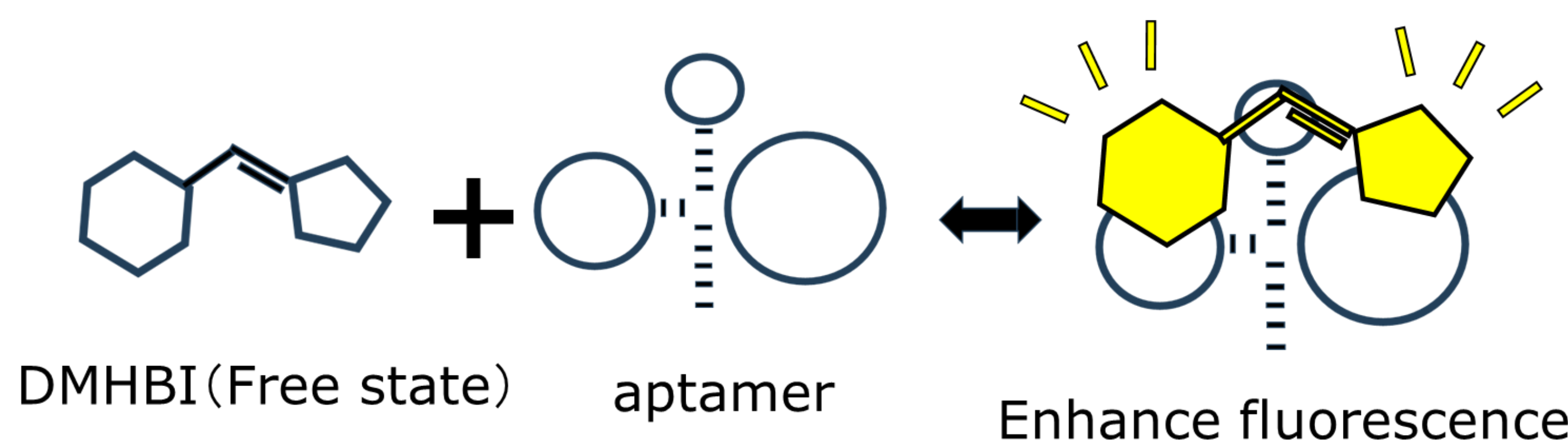


Fig. 1 Function of Fluorogenic RNA aptamer

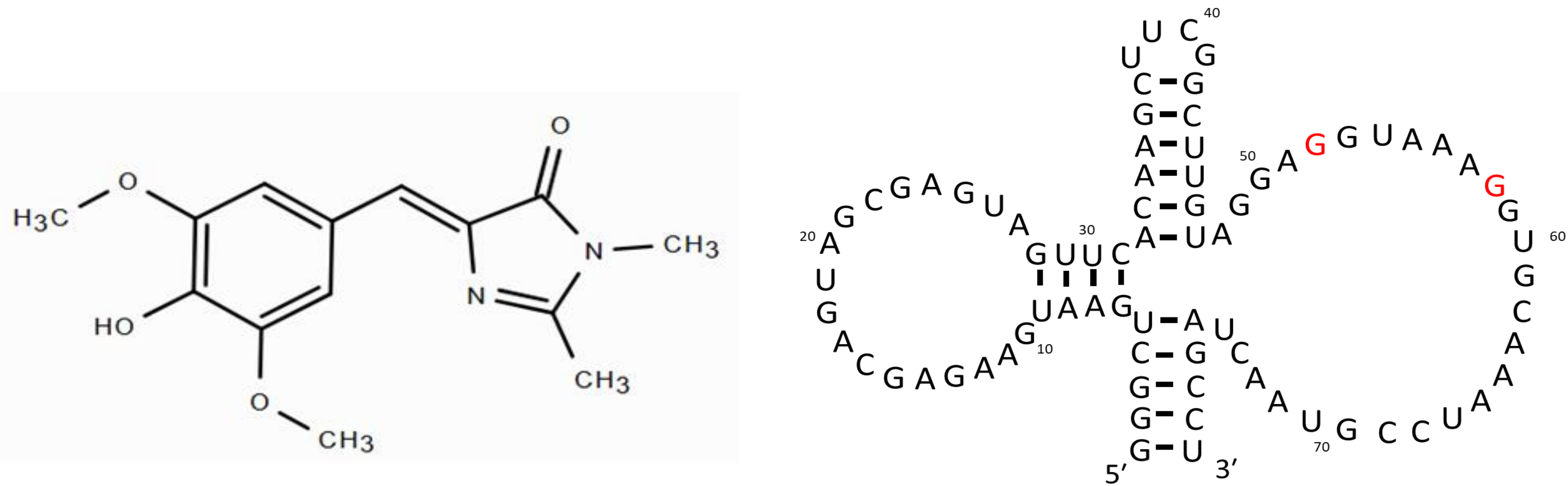


Fig. 2 Structure of DMHBI

Fig. 3 Secondary structure of 17-3min A52GU58G

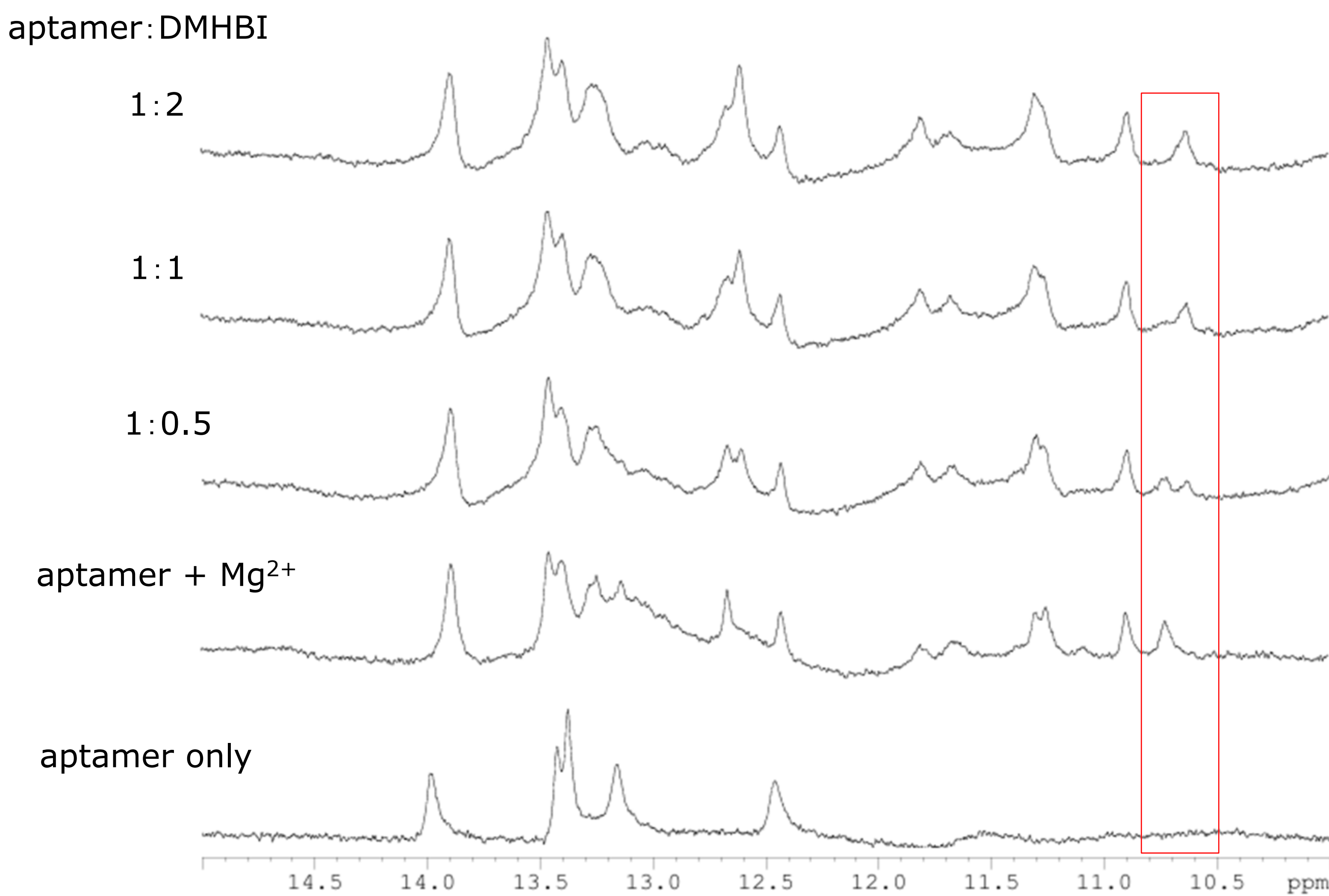


Fig. 4 1D imino proton spectra of 17-3 min A52GU58G, addition of Mg<sup>2+</sup>, and titration with DMHBI

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	<span style="color:red">—</span>	45.5	—	1 : 0
2	<span style="color:orange">—</span>	66.4	+	1 : 0
3	<span style="color:green">—</span>	41.8	—	1 : 1
4	<span style="color:blue">—</span>	62.9	+	1 : 1
5	<span style="color:purple">—</span>	42.3	—	1 : 2
6	<span style="color:black">—</span>	62.7	+	1 : 2

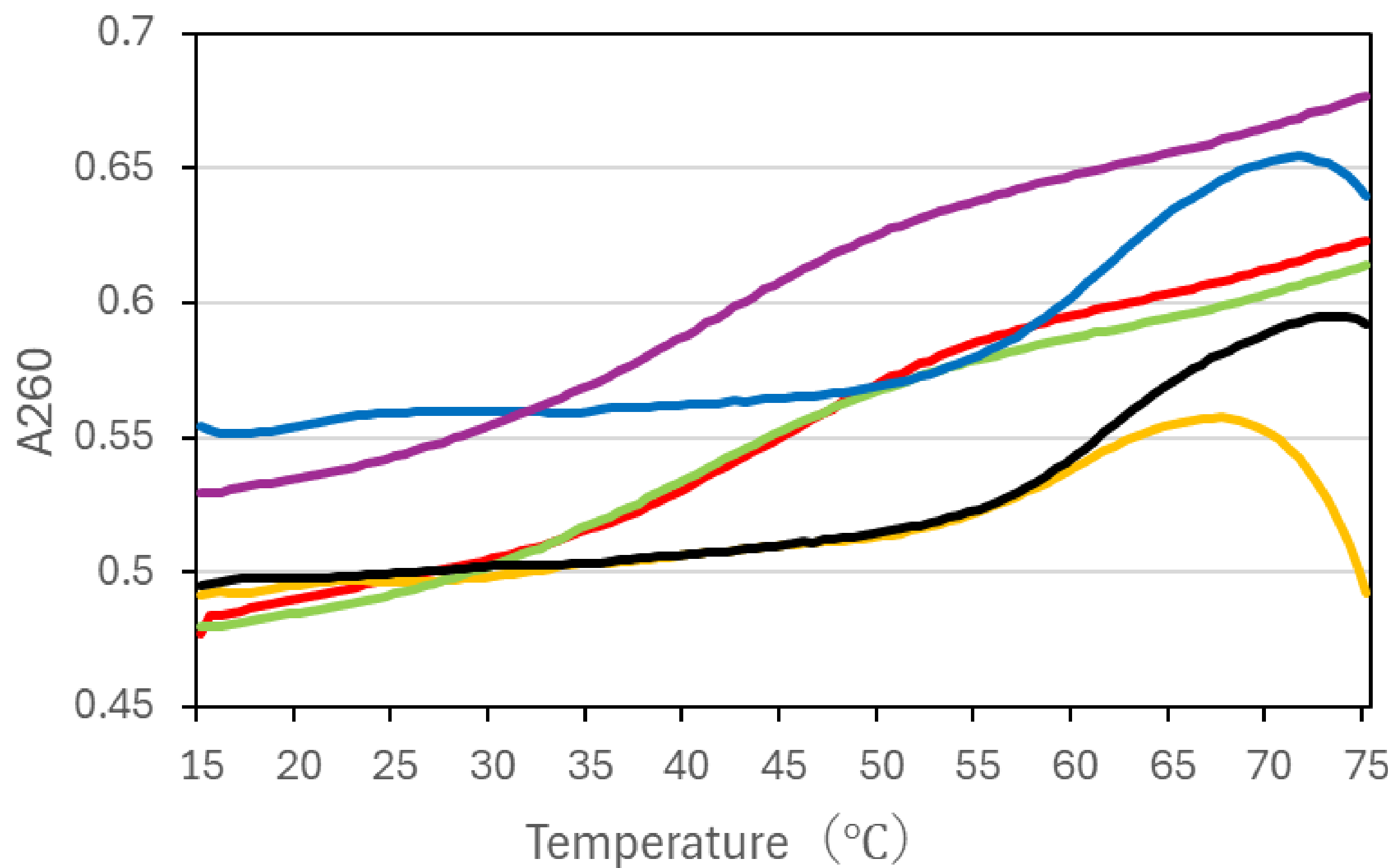


Fig. 5 Thermal melting UV curves of 17-3 min A52GU58G. The measurement conditions are shown in Table 1.