

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

SATテクノロジー・ショーケース2026

■ はじめに

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。

Jaffreyらは、GFP由来の色素DFHBI(3,5-ジフルオロ-4-ヒドロキシベンズリデンイミダゾリノン)を認識するSpinach RNAと呼ばれる蛍光性RNA aptamerを作製した¹⁾. Spinach RNAを含め、これまでに作製・特徴付けられた蛍光性RNA aptamerの大部分は、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⁺イオンを必要とする。しかし、K⁺濃度が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類似蛍光体であるHBIファミリーに属するDMHBI(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシベンズリデンイミダゾリノン; Fig 2)の蛍光を誘導する4つの異なるRNA aptamer(2-4, 3-6, 13-2, および17-3)を作製した¹⁾. これらのaptamerの一つである13-2 RNAは、切断、特性解析、最適化を経て13-2min RNAとなり、Chili RNAと命名されている。一方、17-3 RNAは十分に特性解析されておらず、二次構造および三次構造も研究されていなかった。そこで、阿部らは17-3 RNAの生化学的性質を解析し、二次構造を明らかにするために短鎖型(17-3min RNA)を作製した。彼らはこれを日本のカラシにちなんでKarashi RNAと名付けた²⁾. 彼らは、17-3min RNAが非G4型であり、3つのステムと2つの大きなループ構造を持つことを明らかにした。化学修飾実験では、2つのループ領域が三次相互作用および/または非ワトソン・クリック型塩基対を形成し、DMHBI結合によって顕著な構造変化は起こらないことが示唆された。

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

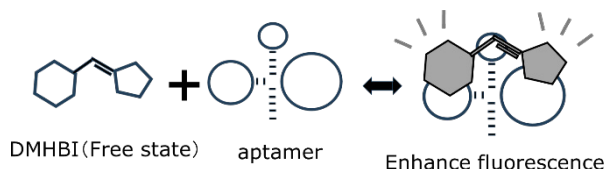


Fig. 1 Function of Fluorogenic RNA Aptamer

■ 活動内容

1. NMR測定

17-3min A52GU58Gのイミノプロトンスペクトルを測定した。Mg²⁺非存在下で測定した結果、DMHBIを添加してもシグナルの変化は認められなかった。

次に、17-3min A52GU58Gに50 mMのMgCl₂を添加すると、多くのイミノプロトンシグナルが出現した。さらに、50 mM MgCl₂条件下でDMHBIを滴定したところ、いくつかのシグナルに変化が認められた。10.7 ppmのイミノプロトンシグナルに注目すると、aptamerに対してDMHBIを等量加えるとシグナルがシフトしたことから、aptamerとDMHBIが1:1で相互作用をしていることが示唆された。

2. Tm値解析

熱融解UV曲線の解析により、50 mM MgCl₂存在下では、Mg²⁺非存在下と比較してTmが約20℃上昇することが示された。これらの結果より、aptamerがMg²⁺によって折り畳まれた安定化したことを示唆している。

また、興味深いことに、Tm値解析の結果、Mg²⁺の有無に関わらず、DMHBIはaptamerのTm値を約4℃低下させた。DMHBIはaptamerの構造に揺らぎを引き起こす可能性があると考えられた。

■ 関連情報等(特許関係, 施設)

参考文献

- 1) J.S. Paige, K.Y. Wu, S.R. Jaffrey, Science 2011, 333, 642-646.
- 2) S. Abe, S. Aburaya, T. Koyama, T. Usui, J. Yoshino, S. Matsumura, and Y. Ikawa, Molecules, 2025, 30, 1777.

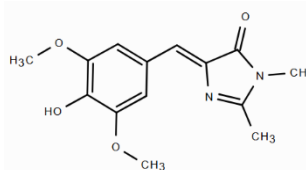


Fig. 2 Structure of DMHBI

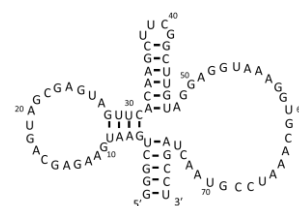


Fig. 3 Secondary structure of 17-3min A52GU58G

代表発表者 山本 春香(やまもと はるか)
所 属 千葉工業大学 先進工学研究科
生命科学専攻
問合せ先 〒275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1
津田沼キャンパス・1号棟・5階 509・510
TEL:047-478-0317

■キーワード: (1) RNA aptamer
(2) RNA の構造
(3) 蛍光

■共同研究者:

油屋紫乃¹⁾, 井川善也^{1,2)}, 坂本泰一³⁾
所属

1 富山大学大学院 医薬理工学環
創薬・製剤工学プログラム

2 富山大学大学院理工学研究科

3 千葉工業大学 先進工学部 生命科学科