

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01965

研究課題名(和文) RNase Hを利用したmRNAの増幅的検出法の開発と薬剤スクリーニングへの応用

研究課題名(英文) Development of amplificative detection of mRNA using RNase H and its application for drug screening

研究代表者

春木 満 (HARUKI, Mitsuru)

日本大学・工学部・教授

研究者番号：30273593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、標的RNA依存的にRNase Hにより切断され、切断断片が蓄積して増幅されることにより、微量のmRNAを検出する新規プローブを開発することを目指した。このプローブは、標的配列が存在する場合にプローブのステム部分の塩基対がずれてDNA配列とRNA配列が対合し、RNase Hにより切断されるように設計した。検出するRNAをプローブに対して1/10量加えると、加えたプローブがすべてRNase Hにより切断された。従って、プローブの結合と切断・解離が繰り返され、少量のターゲットRNAを増幅的に検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

標的RNA依存的にRNase Hによる切断のスイッチをオン・オフする例はこれまでになく、独自性の高い研究成果が得られたと考えている。また、本研究は、RNase Hの基質の構造形成をコントロールすることが可能であることを示し、DNA/RNA工学やRNase Hの応用の新たな展開を切り拓くという点でも有意義であると考えている。本研究で開発したプローブをさらに改良すれば、細胞内のmRNAを簡便に検出することが可能となり、mRNAの増減を指標としたハイスループットスクリーニングが容易になる期待される。従って、創薬研究を加速することが期待され、社会的にも有意義であると考えている。

研究成果の概要(英文)：To detect trace amounts of cellular mRNA, amplification of signals such as recycling of probes by catalytic reaction is required. In this study, we aimed to develop a novel probe that is cleaved by cellular RNase H upon binding to target RNA, thereby resulting in accumulation of the cleavage products. This probe has a stem-loop structure with a tract of rA-rU and dA-Um base pairs. A sequence complementary to the target sequence and a clamp sequence for stem formation are added to both ends. Binding of the probe to the target sequence causes a shift of the stem base pairs to allow formations of a tract of dA-U base pairs which can be cleaved by RNase H. After the cleavage, the probe is expected to be liberated from the target RNA to allow another cycle. When the probe was added to the target sequence at a ratio of 10:1, the probe was completely cleaved, suggesting that the probe experienced turnover cycles of binding and cleavage.

研究分野：生物工学

キーワード：RNase H DNA/RNAヘテロ二重鎖 RNA発現解析 RNA検出プローブ 薬剤スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な疾患には、その原因遺伝子が活性化され mRNA 合成量が増大することによって引き起こされるものも多い。従って、その mRNA 量を簡便に解析することができれば、極めて有用な診断法になりうると期待される。また、疾患の原因となる mRNA 合成を抑制することにより治療効果を示す薬剤のスクリーニングに利用できる。しかしながら、mRNA は微量であるため、検出には工夫を要する。細胞から RNA を抽出し、逆転写して得られた DNA をリアルタイム PCR で増幅するという手法が多く用いられているが、RNA の抽出に多大な時間とコストを要する。そこで、触媒反応等によりシグナルを増幅して目的 RNA の検出を容易にする方法が多く試みられており、そのなかでも他の特別な因子を必要としない方法、例えばリボザイムの自己切断反応を利用した RNA のシグナル増幅検出法は手軽に利用できて好ましいと考えられる。このような方法に(蛋白質型)酵素による切断反応を利用できれば、さらに大きなシグナルの増幅が可能になると期待される。このような酵素として、DNA/RNA ヘテロ二本鎖の RNA 鎖を特異的に切断するリボヌクレアーゼ H (RNase H) の利用が考えられる。実際に RNase H による切断を利用した方法として、標的 DNA に結合する DNA-RNA-DNA プロブを用いる方法 (CPT 法) が開発されて実用化されている。RNase H は核や細胞質に存在することが知られており、アンチセンス DNA の作用を引き起こす主体であると考えられている。また、申請者はこれまで RNase H の機能解析や応用に関する研究を多く行っており、最近も細胞内の RNase H により分解されることで蛍光を発するモレキュラービーコン型アクチベータブル蛍光プロブを開発している。しかしながら、RNase H を用いる方法は、これまで標的が DNA の場合のみに適応が限られてきた。そこで、RNA を標的として RNase H 切断によりシグナルを増幅する方法を開発するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、標的 RNA 依存的に RNase H により切断され、蛍光シグナルが蓄積して増幅することにより、微量の mRNA を検出する新規プロブを開発する。さらに、このプロブを利用して、食塩感受性高血圧において合成量が増大する上皮性ナトリウムチャネル (ENaC) mRNA の合成を抑制することにより食塩感受性高血圧に効果を示す薬剤のスクリーニングを行う。本研究は、微量の mRNA 検出や発現量解析を可能にすることにより、新たな薬剤スクリーニングによる画期的な治療薬の開発や疾患診断法の開発につながると期待される。

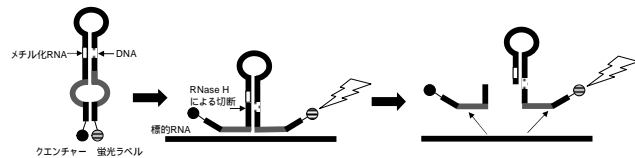


Fig.1 新規 Probe による RNA 検出の概念図

3. 研究の方法

本研究では、端に蛍光色素とクエンチャーでラベル化したモレキュラービーコン型の Probe を設計した。標的配列が存在しない場合は DNA 部分とメチル化された RNA が対合して RNase H により切断されないような構造となっている。標的 RNA に結合すると塩基対がずれて DNA と非修飾 RNA が対合して RNase H により切断されることで、Probe が解離し蛍光シグナルの蓄積と増幅が起きると期待される (Fig.1)。検出対象として、食塩感受性高血圧において、食塩の摂取により発現が増大する腎臓の ENaC の mRNA を選んだ。アフリカツメガエルの ENaC の mRNA を標的配列 (Target) として、これにハイブリダイズするような配列の Probe 1~3 を設計した。RNase H はモデルとして大腸菌由来の RNase HI を用いた (バイオアカデミア社)。Probe と Target の割合は 1:1~10:1 となるよう調製し 37 °C で反応を行った。結合および切断反応をポリアクリルアミドゲル

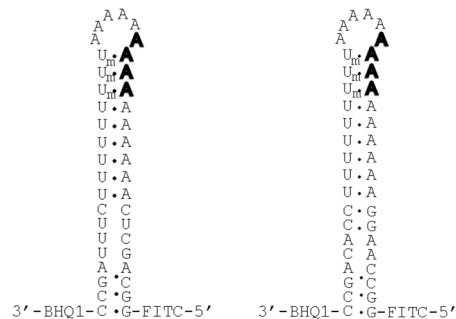


Fig.2 Probe1(左), Probe2(右)の構造

太字: DNA, Um: 2'-O-メチル化 rU

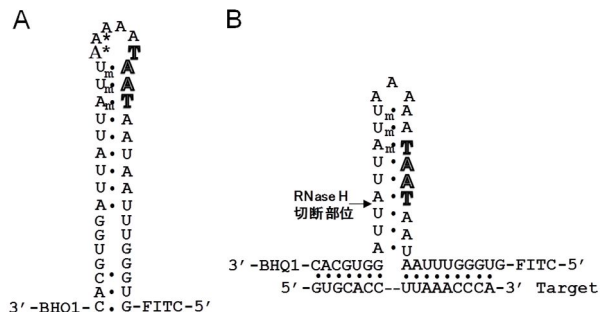


Fig.3 Probe3 の配列 (A) と、Target に結合したときにとると予想される構造 (B)

太字: DNA, Am: 2'-O-メチル化 rA, A*: Probe3m でメチル化

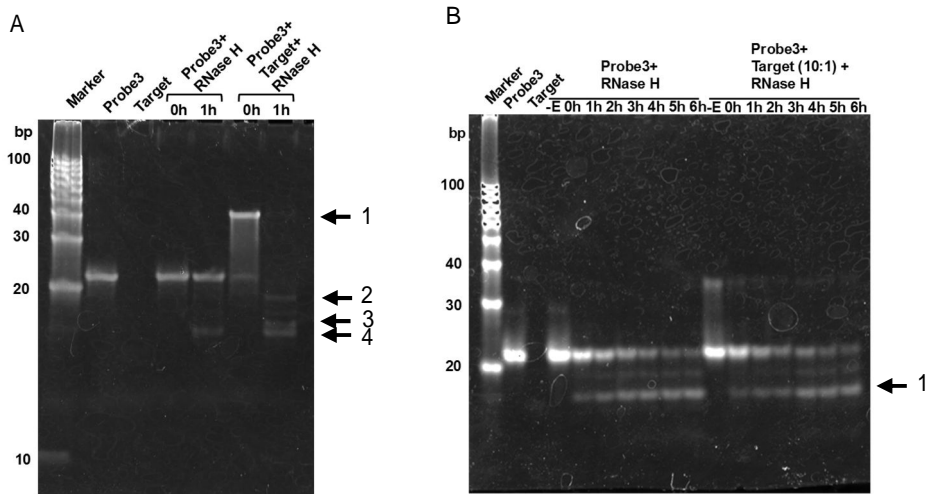


Fig. 4 Probe3 に Target と RNase H を加えて反応させた結果 A, Probe3:Target=1:1 B, Probe3:Target=10:1

電気泳動 (PAGE) にて確認した。Probe の蛍光測定には、蛍光分光光度計を用いた。

4. 研究成果

Probe1 (Fig. 2) では、単独で時間経過とともに蛍光強度の増加がみられ、ヘアピン構造が解離していることが示唆された。そこで、ヘアピン構造を安定化するために、GC 塩基対を 2 個導入した Probe2 (Fig. 2) を作製したが、ヘアピン構造が安定すぎて Target に結合しにくいことが示唆された。また、Probe1 では塩基対のずれのため RNase H による切断や蛍光ラベルがクエンチャーから離れてしまうことが懸念されたため、UA 塩基対を AU 塩基対間に導入することにより塩基対のずれを防止した Probe3 を作成した (Fig. 4)。この Probe は、安定にヘアピン構造を形成することが蛍光測定により確認され、PAGE により Probe3 との結合も確認できた (Fig. 4A, 矢印 1 のバンド)。Probe3 と Target を 1:1 の比率で混合し RNase H を加えて 1 時間反応させると、Probe3 は完全に切断され、切断産物がみられた (Fig. 4A, 矢印 2,3 のバンド)。しかしながら、Probe 3 単独でも RNase H により生じたと思われる断片が見られた (Fig. 4A, 矢印 4 のバンド)。また、Probe3 と Target を 10:1 の比率で混合し RNase H を加えて反応させると、Probe 3 が単独で切断された断片が大半を占めた (Fig. 4B, 矢印 1 のバンド)。これは、Probe が切断されても Target から解離せずにターンオーバーが起こらず、遊離の Probe が切断されていると考えられる。Probe3 では DNA 部分と塩基対を形成する RNA 部分が RNase H により切断される可能性が考えられたので、その部分を 2'-O-メチル化した Probe3m を用いた (Fig. 3)。その結果、遊離の Probe の切断をかなり抑制することができた。

Probe と Target の塩基対を形成する部分の長さを短くしてターンオーバーしやすくするために、Probe3 の 5' 側と 3' 側の鎖長を 1 塩基ずつ短くした Probe4、2 塩基ずつ短くした Probe5 を作製し、Target を 10:1 の比率で混合し RNase H を加えて 1 時間反応させると、Probe3 の場合と比較して Probe4 では切断断片の顕著な増加が見られた (Fig. 5, 矢印のバンド)。また、Probe:Target が 10:1 の場合の蛍光強度は Probe:Target が 1:1 の場合の 4 割程度まで増大した (Fig. 6)。これらの結果から、Probe4 は Target と結合する部分が短くなったため、ある程度ターンオーバーするようになったと考えられる。一方、Probe5 では切断断片の増加は見られなかった (Fig. 5)。これは Target と結合する部分が短かすぎて、Target と十分結合できないためと考えられる。Probe4 のみで RNase H と反応させた場合、時間とともにかなりの蛍光強度の増加が見られたので、単独でも RNase H により切断されてしまうと思われる。

さらに、Target の長さを短くすることによって、Probe と Target の塩基対を形成する部分の長さを微調整

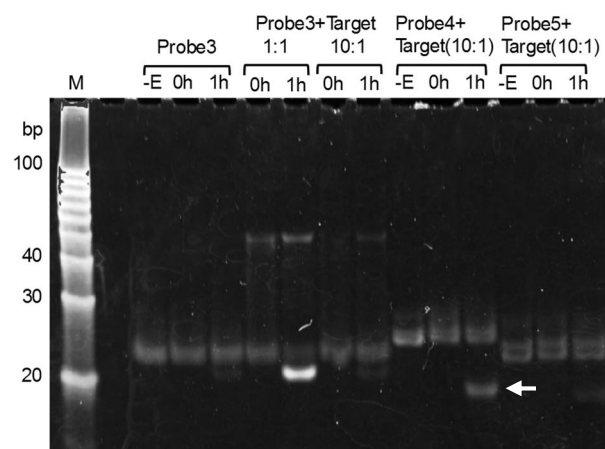


Fig. 5 Probe4, 5 に Target と RNase H を加えて反応させた結果 (Probe:Target=10:1)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

した。Target の 5' 側を 1 塩基短くした Target-G, Target の 3' 側を 1 塩基短くした Target-A, および Target の 5' 側と 3' 側を 1 塩基ずつ短くした Target-AG を, Probe:Target が 10:1 の割合で Probe3 に加えて RNase H による切断を行った。その結果, Target-AG の場合には, もとの長さの Target の場合に比べて切断断片の増加が見られた (Fig. 7, 矢印のバンド)。Probe が Target と結合する部分が短くなったため, ターンオーバーが改善されたと考えられる。

そこで, Probe4 に Target-AG を, Probe:Target が 10:1 の割合で加えて RNase H による切断を行った。その結果, 1 時間の反応で完全に Probe4 が切断された (Fig. 8, 矢印 1 のバンド)。た, Probe:Target が 10:1 の場合の蛍光強度は Probe:Target が 1:1 の場合と同程度まで増大した (Fig. 9)。従って, かなりターンオーバーを達成できたと考えられる。しかしながら, Probe 単独でもかなりの切断が見られ (Fig. 8, 矢印 2 のバンド), 蛍光強度の増大もかなり生じており (Fig. 9), 単独で切断されないように設計する必要がある。

効率よくターンオーバーするには, Probe のヘアピン構造の解離が容易で Target へ結合しやすいことが必要であると考えられる。そうした場合には, 単独でも RNase H で切断される構造にシフトしやすくなる可能性が考えられる。また, Probe のヘアピン構造が解離しやすくなると, Probe 単独で生じる蛍光のバックグラウンドが高くなる。これらをうまく兼ね合わせることでできる Probe の

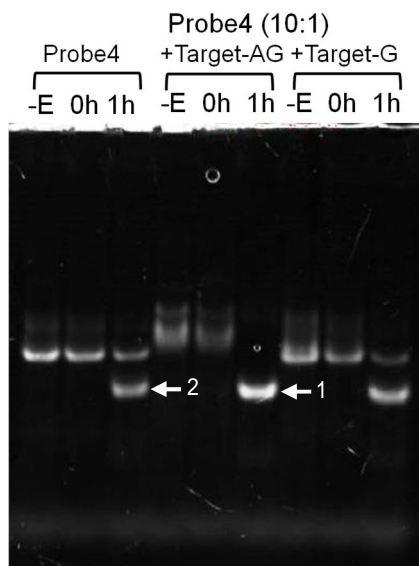


Fig. 8 Probe4 に Target-G, Target-AG と RNase H を加えて反応させた結果 (Probe:Target=10:1) (Probe:Target=10:1)

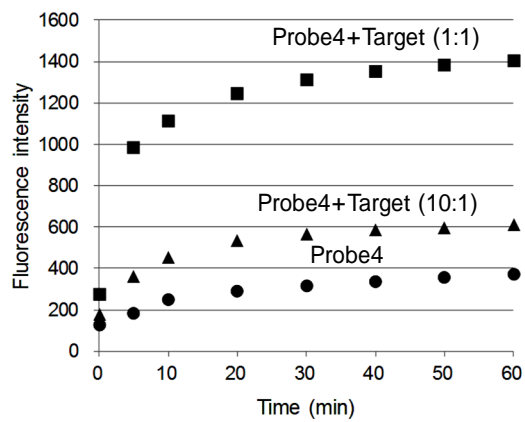


Fig. 6 Probe4 に Target と RNase H を加えた反応における蛍光強度の変化

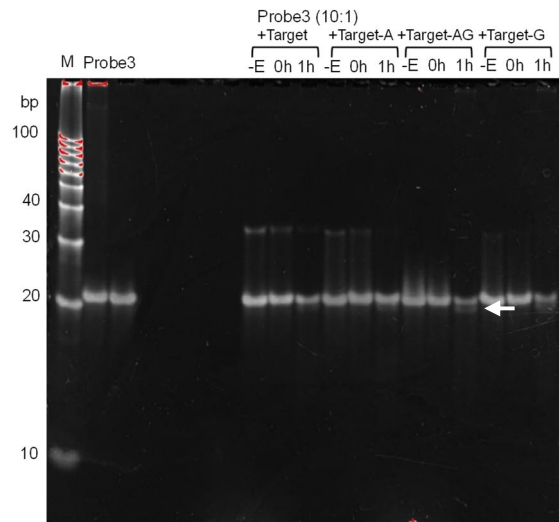


Fig. 7 Probe3 に Target-A, Target-G, Target-AG と RNase H を加えて反応させた結果 (Probe:Target=10:1)

設計が今後の課題である。本研究により, 設計した Probe が実際に Target 依存的に RNase H により切断され, ターンオーバーして RNA シグナルを増幅することが示された。今後細胞内での RNA 検出およびその薬剤スクリーニングへの応用を行いたいと考えている。

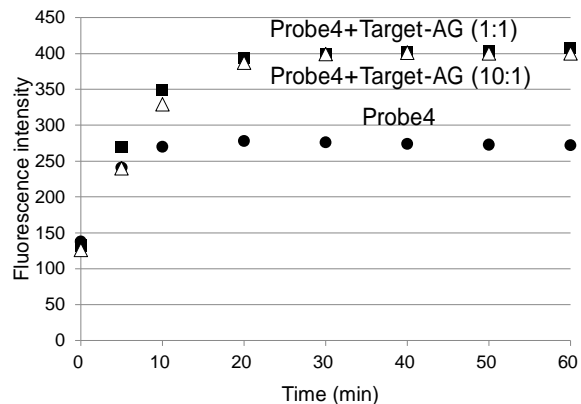


Fig. 9 Probe4 に Target-AG と RNase H を加えた反応における蛍光強度の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原諒太, 平野展孝, 春木 満
2. 発表標題 Amplificative detection of RNA using target-dependent cleavage of probes by RNase H
3. 学会等名 2020年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原諒太, 平野展孝, 春木満
2. 発表標題 Amplification of RNA signal by iterated target-induced cleavage of fluorescent probes by intracellular RNase H activity
3. 学会等名 平成30年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今泉梓, 木原慶彦, 市川司, 根本修克, 平野展孝, 春木満
2. 発表標題 Detection of macrophage cells by RNase H activity-dependent activatable fluorescence probe
3. 学会等名 平成29年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----