

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05919

研究課題名（和文）RNA高次構造を検出可能な超効率的RNA検出プローブの開発

研究課題名（英文）Development of a fluorogenic probe for detection of ncRNA structures

研究代表者

佐藤 浩輔（SATO, Kousuke）

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：70415686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではヒト生細胞中のncRNAを検出・定量し、その構造・機能を明らかにすると共に診断や医療への応用を目指し、新規の化学構造を持つDNAプローブを開発を行った。本プローブは一方のDNA末端にアミノチオフェノール構造をもち、もう一方のDNA末端に5-ホルミル-2'-デオキシウリジン構造を持つ。これらの効率的合成法、ヌクレオシドでの蛍光特性、DNAへの導入、RNA上での蛍光誘導化反応について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新規のアミノチオフェノール構造を持つDNAプローブを開発するために、その効率的合成法、ヌクレオシドでの蛍光特性、DNAへの導入、RNA上での蛍光誘導化反応について検討した。これらの研究成果はRNAの蛍光検出により、RNAの機能と疾病の関連を明らかにすることのみならず、疾病の診断や医療への応用も将来的に可能とする。また、新規C-ヌクレオシドの合成法や蛍光特性などは学術的にも意義のある成果であり、今後の核酸化学研究の進展にも貢献するものであると期待される。

研究成果の概要（英文）：We have developed a novel DNA probe for the purpose of detecting and quantifying ncRNA in living human cells, clarifying its structure and function, and applying it to diagnosis and medicine. This probe has an aminothiophenol structure at 3'-end of one DNA and a 5-formyl-2'-deoxyuridine structure at 5'-end of the other DNA. We examined the efficient synthesis method, fluorescence properties of nucleosides, introduction into DNA, and fluorogenic reaction on RNA.

研究分野：生物有機化学

キーワード：C-ヌクレオシド 蛍光検出

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、我々の細胞内で RNA 分子が様々な役割をしていることが明らかになってきた。遺伝子をコードしていないノンコーディング RNA (ncRNA) と呼ばれる RNA の中にはいわゆる、一本鎖や二本鎖だけでなく、ヘアピンループ、バルジ、シュードノット構造などの多様な高次構造を形成することで様々な機能発現を行っているものがあることが明らかになっている。すなわち、ncRNA は配列情報のみならず、その高次構造情報が機能発現に極めて重要である。

しかし、ncRNA に関する研究は端緒に着いたばかりであり、その詳細な機能はもちろんのこと、共通する配列や構造モチーフなどはほとんど明らかとなっていない。細胞内あるいは細胞外からのどのような刺激に対して ncRNA が応答し、その機能を発現するかを調べるためには ncRNA の配列選択的・構造選択的イメージング法が必要不可欠である。しかしながら、生成量の少ない ncRNA の“生”のイメージングは未だ困難である。この困難な課題を解決するためには生成量の少ない ncRNA を効率的にかつ、高次構造選択的に検出する技術が必要である。これまでに生成量の少ない RNA を生きた細胞内で検出するために、低侵襲性である蛍光を用いたプローブがいくつか開発されてきた。蛍光分子に消光分子を結合させたモレキュラービーコン型のプローブ (図 1 a) や quenched autoligation 型プローブ (図 1 b) は S/B 比 (シグナル/バックグラウンド比) やシグナルの増幅という点で十分な性質を有していなかった。また、最近蛍光分子を化学的に活性化するプローブ (図 1 c) を用いてヒト生細胞内での選択的 RNA の検出に成功しているが、その感度は十分とは言えず、ncRNA の多様な構造検出には至っていない。

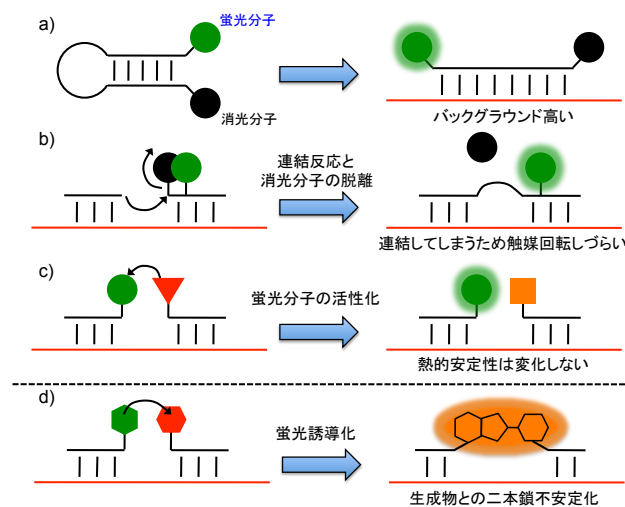


図1 従来の遺伝子検出法と本研究の概念

2. 研究の目的

これらの現状を踏まえ、申請者は以下のような着想に至った (図 1 d)。1) これまでとは異なる構造を有し、強い蛍光と優れた S/B 比をもつ発蛍光分子を構築し、2) 発蛍光反応後の生成物とターゲット ncRNA との二本鎖を不安定化することで、超効率的な発蛍光反応プローブの触媒回転を達成し、微量の ncRNA を検出・定量する。3) さらにプローブ鎖に加えて、高い二本鎖形成能をもつ化学修飾核酸 (サポート鎖) を導入することで、ncRNA 高次構造を選択的に検出することが可能となる。これまでに申請者は DNA 中の酸化損傷の一つである 5-formyl-2'-deoxyuridine (^{fo}U) を選択的に検出することを目的として、新規の蛍光性核酸である 5-benzothiazolyl-2'-deoxyuridine (^{bt}U) を報告している (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8392)。本反応は水中での適応が可能であり、二つの芳香族が新たに生じるもう一つの環を介してビフェニル型の延長した平面分子を形成することを特徴とする。^{bt}U は最大で 0.70 の蛍光量子収率をもつ (参考値 Cy5: 0.30)。また、この反応は発蛍光反応 (fluorogenic) であり、反応前と比較して約 6000 倍もの蛍光増強が観察された。すなわち、極めて低いバックグラウンド蛍光での検出が可能であった。そこで、本研究では化学選択的な本反応を ncRNA 検出プローブへと応用し、上記の ncRNA 検出の問題点を一挙に解決する方法を開発する。最終的にはヒト生細胞中の ncRNA を検出・定量し、その構造・機能を明らかにすると共に診断や医療への応用を目指す。

3. 研究の方法

本申請研究は大きく 4 つの内容に分けることができる。A) 新規ヌクレオシド誘導体のデザインと合成、B) 新規 C-ヌクレオシド誘導体の単量体での評価、C) In vitro における新規プローブの評価、D) 生細胞内における新規プローブの評価である。

まず初年度は 5-formyl-2'-deoxyuridine (^{fo}U) プローブと特異的に反応する 2-aminothiophenol (AT) プローブの反応部位となる新規ヌクレオシド誘導体のデザインと合成を行う。本研究では AT 骨格を核酸塩基部に導入した“C-ヌクレオシド”を合成する。ヌクレオシド構造とすることで、プローブ間の反応後に二本鎖のスタッキング構造が崩れ、大きな不安定化効果により二本鎖の解離が促進されると考えられる。新規 C-ヌクレオシド誘導体の評価はまず単量体の ^{fo}U との

反応により行う。¹⁶Oの単量体を別途化学合成し、合成した新規 C-ヌクレオシド誘導体と反応させる。その反応性を検討すると共に生成物を単離精製し、その構造的性質、分光学的性質等を調べ、比較検討する。

前年度までの検討で良好な結果を示した AT ヌクレオシドおよび¹⁶Oをオリゴヌクレオチドプローブの末端に DNA 自動合成機を用いて結合させる。このプローブ鎖を用いてまずは、*in vitro*での一本鎖 RNA 鎖を用いた反応を検討する。つづいて、得られた最適のプローブ鎖を用いて、サポート鎖を加えた高次構造 RNA の検出について検討する。サポート鎖は短鎖でありながら、熱的に安定な RNA 高次構造を破壊し、標的配列近傍をむき出しの一本鎖にする必要がある。そのため、これまでに RNA 鎖との安定な二本鎖形成が報告されている、2'-OMeRNA、Bridged nucleic acid (BNA)、4'-thioRNA、Peptide nucleic acid (PNA) などを適宜用いる。

*In vitro*での諸性質の検討の後、本研究の概念を証明すべく、HeLa 細胞などに対してその特異的な ncRNA 検出を試みる。まずは細胞内でその構造や性質が明らかとなっている生成量の多い ncRNA に対して本プローブの有効性を評価する。細胞内で良好な結果が得られない場合にはプローブ鎖・サポート鎖の配列や長さ、化学修飾の数と位置などについて再度検討を行う。最終的に細胞への様々な刺激により発現する細胞内の微量 ncRNA の検出を行い、その構造と細胞内での挙動を明らかにする。

4. 研究成果

5-formyl-2'-deoxyuridine (¹⁶O) プローブと特異的に反応する 2-aminothiophenol (AT) プローブの反応部位となる新規ヌクレオシド誘導体のデザインと合成を行う。本研究では AT 骨格を核酸塩基部に導入した“C-ヌクレオシド”を合成する。チオール導入はのちに温和な塩基性条件下にて脱保護可能なアルキルチオールを用いることとした。C-ヌクレオシドの合成は Heck 反応を用いて行うこととし、足がかりとなるヨード基を AT 骨格に導入した。種々検討の結果、チオールの導入及び Heck 反応による C-ヌクレオシドの合成に成功した。アミノ基の保護基はフェノキシアセチル基を用いることとし、DNA 合成機へと導入するためのホスホロアミダイトユニットの合成を進めた。また、これまでの研究により強い蛍光を示すと期待される MeO 基をアミノ基のパラ位に導入した誘導体 (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8392, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6206)の合成を検討した。誘導体合成時にこれまでの合成法の問題点の解決を試みた。1) 鍵反応となる Heck 反応の収率について、これまでの方法ではカップリング、脱保護、還元の 3 工程で 20%程度の収率であったのを、アミノ基の保護基、反応条件(Pd 触媒、リガンド、溶媒等)を検討することで、40%程度まで向上させることに成功した。2) チオールの保護基、アミノ基の保護基の脱保護条件について検討したところ、チオールの保護基は温和な塩基性条件下で脱保護可能なのに対し、アミノ基の保護基は過激な塩基性条件が必要であった。このまま、DNA 合成機へ導入すると、合成後の DNA の脱保護操作がかなり煩雑になることが予想されたので、チオールの保護基をジスルフィド型へと変換することにより、DNA 合成、精製後の使用直前にチオールを脱保護して用いることとした。さらに合成を進め MeO 基をアミノ基のパラ位に導入した誘導体のホスホロアミダイトユニットを DNA 合成に必要な十分量合成することに成功した。

一方、無保護のヌクレオシドを用いて¹⁶Oとの反応性及び得られた蛍光化合物の蛍光特性について検討することとした。アミノ基の保護基であるフェノキシアセチル基を脱保護したのち、TCEP を用いてジスルフィドの脱保護を行い、単離することなく¹⁶Oヌクレオシドとの反応を行なった。得られたジヌクレオシドを単離し、酸性、中性、塩基性条件下で紫外可視吸光度及び蛍光測定を行なった。その結果、以前に報告している¹⁶O誘導体と同様に塩基性条件下での蛍光が最も強いことが明らかとなった。一方、中性条件下の結果から生理的条件下(リン酸バッファー pH 7.4)でも充分な蛍光を検出できることも明らかにした。

ヌクレオシドでの検討により、高い蛍光強度を示す 5-MeO-2-aminothiophenol (AT) ヌクレオシド誘導体の DNA 合成の検討を行い、収率よく合成することができた。しかし、脱保護過程において、アミノ基の保護基であるフェノキシアセチル基の脱保護が困難であることが明らかとなった。そこで、新たに保護基をトリフルオロアセチル基へと変更したホスホロアミダイトユニットの合成を行った。合成はすでに確立したスキームを用いることで、ほぼ同様の収率での合成が可能であった。得られたホスホロアミダイトユニットを用いて、3'末端に 5-MeO-2-aminothiophenol (AT) 部位を導入した DNA の合成を行なったところ、トリフルオロアセチル基がアセチル基に変換される副反応が生じることが明らかとなった。種々条件を検討した結果、無水酢酸でのキャップ化を行わない条件で、収率よく目的の DNA を合成することに成功した。得られた DNA を用いてチオール基の保護基であるジスルフィドの還元による脱保護を試みた。DTT 及び TCEP を用いて種々条件を検討したところ、37°C、1 h の処理後に速やかに C18 簡易カートリッジカラムにて精製することで、比較的効率よく脱保護できることを明らかにした。また、¹⁶Oを含む DNA は常法に従い、過ヨウ素酸処理することで得た。得られた DNA を相補的な RNA と様々な条件で混合し、HPLC による反応進行を追跡したが、反応の進行は確認できなかった。これは合成した DNA の長さが短いため、RNA との二本鎖の熱的安定性が低くなったためであると考察した。今後はプローブ DNA の長さを種々検討し、反応性の良い条件を見出すとともにヒト生細胞中の ncRNA を検出・定量へと応用していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Grosvik Kristin, Tesfahun Almaz Nigatu, Muruzbal-Lecumberri Izaskun, Haugland Gyri Teien, Leiros Ingar, Ruoff Peter, Kvaloy Jan Terje, Knøvelsrud Ingeborg, ?nensen Hilde, Alexeeva Marina, Sato Kousuke, Matsuda Akira, Alseth Ingun, Klungland Arne, Bjelland Svein	4. 巻 11
2. 論文標題 The Escherichia coli alkA Gene Is Activated to Alleviate Mutagenesis by an Oxidized Deoxynucleoside	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 263-263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.00263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 K. Sato, A. Matsuda	4. 巻 -
2. 論文標題 Synthesis of 2-Amino-4-fluoropyridine-C-nucleoside Phosphoramidite for Incorporation into Oligonucleotides.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry	6. 最初と最後の頁 e77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/cpnc.77	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Y. Kasai, K. Sato, S. Utsumi, S. Ichikawa	4. 巻 19
2. 論文標題 Improvement of SNAr Reaction Rate by an Electron-withdrawing Group in the Cross-linking of DNA Cytosine-5 Methyltransferase by a Covalent Oligodeoxyribonucleotide Inhibitor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1866-1872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1002/cbic.201800244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 S. Utsumi, K. Sato, S. Ichikawa	4. 巻 28
2. 論文標題 Insight into the recognition mechanism of DNA cytosine-5 methyltransferases (DNMTs) by incorporation of acyclic 5-fluorocytosine (FC) nucleosides into DNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 2189-2194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.05.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Sato, Y. Kunitomo, Y. Kasai, S. Usumi, I. Suetake, S. Tajima, S. Ichikwa, A. Matsuda	4. 巻 19
2. 論文標題 Mechanism Based Inhibitor of DNA Cytosine 5 Methyltransferase by a SNAr Reaction with an Oligodeoxyribonucleotide Containing a 2 Amino 4 Halopyridine C Nucleoside	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 865-872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/cbic.201700688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. Katsuyama, K.e Sato, F. Yakushiji, T.i Matsumaru, S. Ichikawa	4. 巻 66
2. 論文標題 Solid-Phase Modular Synthesis of Park Nucleotide and Lipids I and II Analogues	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 84-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00828	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐々木隆浩、濱田卓弥、佐藤浩輔、村井毅
2. 発表標題 バイオ応用のための配位型分子修飾磁性ナノ粒子の安定性評価
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shohei Utsumi, Kousuke Sato, Satoshi Ichikawa
2. 発表標題 Evaluating the reactivity of oligonucleotides containing an acyclic 5-fluorocytosine nucleoside on DNA methylation
3. 学会等名 The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry/The 2nd Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内海 翔平、佐藤 浩輔、市川 聡
2. 発表標題 FC鎖状ヌクレオシドを含む核酸によるDNAメチル化阻害反応の反応性評価
3. 学会等名 第30回万有札幌シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笠井 由起子、佐藤 浩輔、市川 聡
2. 発表標題 2-アミノ-4-ハロピリジン-C-ヌクレオシドを含むオリゴデオキシヌクレオチドの DNA メチル化阻害能評価
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（金沢）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村井 毅、佐々木 隆浩、野村 幸広、小田 佳奈、佐藤 浩輔、黒澤 隆夫
2. 発表標題 胆汁酸生合成中間体のLC-MS/MS法による一斉分析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（金沢）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木 隆浩、佐藤 浩輔、村井 毅
2. 発表標題 ナノ粒子への精密位置制御表面修飾を目指した spot 修飾法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（金沢）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内海 翔平、佐藤 浩輔、市川 聡
2. 発表標題 DNMT複合体形成能の向上を指向した糖部改変型核酸の性質解析
3. 学会等名 核酸化学若手フォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Sawadaishi, K. Sato, S. Ichikawa
2. 発表標題 Synthesis and Properties of an Oligonucleotide-Natural Product Conjugate
3. 学会等名 The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内海 翔平、佐藤 浩輔、市川 聡
2. 発表標題 DNMT複合体形成能の向上を指向した糖部改変型核酸の合成と諸性質
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第3回年会
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
---------------------------	-----------------------	----