

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05120

研究課題名（和文）FRETを応用したmiRNAおよびアデニン修飾酵素の新規測定法の開発

研究課題名（英文）Development of novel assay methods for miRNA and adenine methyltransferase using FRET

研究代表者

椋島 力（Kabashima, Tsutomu）

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：20274673

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、様々な疾患に關与するマイクロRNA(miRNA)およびエピジェネティクスに關与しているアデニンのメチル化酵素の新規測定法を開発した。
本測定法は、申請者が開発した蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)のバックグラウンドを大幅に低下させる方法を応用したものであり、簡便で特異的かつ高感度な測定法である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAは、様々な生命現象と關わっており、さらに各種がんや心疾患、ウイルス感染症など、種々の疾患のバイオマーカーとしても注目されている。また、miRNA中のアデニンもメチル化されることが報告され、アデニンメチル化酵素についても、これら疾患との關連性が注目されている。
現在のアデニンメチル化酵素やmiRNAの検出・測定には、特別な機器や抗体などを使用した煩雑な操作が必要である。本課題で開発した測定法は、これら特別な機器や試薬を必要とせず、非常に簡便な測定法であり、汎用性の高い新たな解析ツールとなり得ると考える。

研究成果の概要（英文）：In this research subject, a novel assay methods for adenine methyltransferase activity and micro RNA (miRNA) were developed. Adenine methylation is occurred in DNA and miRNA, and it related to various diseases and epigenetics.
I developed the method to reduce a background of fluorescence resonance energy transfer (FRET), previously. And this method is applied to the assay method of adenine methyltransferase activity. The present assay method is very convenient, and specific and high sensitive method.

研究分野：分析化学

キーワード：FRET miRNA メチル化酵素 アデニン シトシン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) は、20~25 塩基程度の短い RNA であり、生体内において遺伝子の発現を調節している機能性核酸である。自然界でも、昆虫、植物、動物と広く存在し、細胞の発生、分化、増殖などの調節に関与している。また、種類も豊富で、ヒトだけでも、2000 種類以上の miRNA が知られており、今後も、その数は増えると考えられている。このように、miRNA は、基本的な生命現象と深く関わっていることから、がん、循環器疾患、精神疾患、炎症性疾患など、様々な病気との関連性も多数報告されている。

エピジェネティクスは、DNA の塩基配列の変化 (変異) なしにゲノム構造を変化させ、遺伝子発現を調節する制御機構を指す。エピジェネティクスは、胚発生や細胞の分化、老化、X 染色体の不活性化など様々な生命現象と関連しており、細菌から動物に至るまで広く存在し、生物にとって重要な制御機構である。エピジェネティクスの分子レベルでの主なメカニズムとして、クロマチンを構成する DNA のメチル化が知られている。真核生物での DNA メチル化は、シトシンのメチル化を中心に研究されてきたが、アデニンもメチル化されることが報告された。また、miRNA 中のアデニンのメチル化も報告され、がん診断のバイオマーカーとして注目されている。これら DNA や RNA のメチル化は、それぞれ対応する酵素が触媒しており、この中でも DNA メチル化酵素は創薬の標的分子としても注目されており、実際に、その阻害剤は抗がん剤として臨床適用されている。

以上のように、miRNA およびその質的調節を行うアデニンメチル化酵素は、疾病や生命現象と深く関わっており、これらの測定法は、治療薬・診断法の開発や生命現象の解明に重要と考えられる。

現在の miRNA 解析は、主に、RNA シークエンスやマイクロアレイ、リアルタイム PCR、質量分析などが使用されている。これらの解析法は、それぞれ利点を有するが、特別な機器や、煩雑または習熟した操作が必要であり、簡便で安価な測定法が求められている。一方、エピジェネティクスに関係するメチル化酵素の解析は、主にリアルタイム PCR や抗体による発現解析であり、この場合、他のタンパク質との複合体形成や翻訳後修飾による酵素活性の変動を知ることができない。そのため、生体内での詳細な機能解析には、簡便、特異的、高感度な活性測定法が必要であるが、要求を満たすような測定法は開発されていない。

2. 研究の目的

前述のように、現在使用されている miRNA やアデニンメチル化酵素の解析法は、特別な機器や煩雑な操作を必要とするなど、汎用性に欠けている。そこで本研究課題では、miRNA やアデニンメチル化酵素の簡便で高感度、かつ特異的な測定法の開発を目的とした。

本研究課題では、分析化学分野で広く使用されている蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を応用した測定法の開発を試みた。本研究で使用する FRET は、蛍光基と消光基が接近すると、蛍光基からの蛍光は消光基に吸収され、蛍光は観察されないが、この接近が解消されると蛍光が観察されるというものであり、リアルタイム PCR でも利用されている。この FRET は、シグナルノイズ比 (S/N 比) が低いという問題があったが、申請者は、複数の消光基を導入することでバックグラウンドを大幅に低下させ、結果として高い S/N 比を得る方法を開発した。

3. 研究の方法

本研究では、FRET を応用したアデニンメチル化酵素の新規活性測定法および miRNA の特異的な高感度検出法の開発を試みた。

(1) アデニンメチル化酵素の新規活性測定法の開発

基質 DNA は、アデニンメチル化酵素によるメチル化部位と制限酵素切断部位が重なるように設計している。また、基質の末端は蛍光基と 2 つの消光基を結合させている。この 2 つの消光基による FRET 効果のため、基質の蛍光は消光されている。この基質がアデニンメチル化酵素によってメチル化されると、制限酵素で切断できるようになり、蛍光基と消光基が離れる結果、蛍光を発する。一方、メチル化されていない基質は、制限酵素では切断できない (無蛍光)。つまり、アデニンメチル化酵素の活性に比例して、制限酵素切断後の蛍光強度は増加するというものである。

(2) miRNA の特異的な高感度検出法の開発

本検出法のプローブは二本鎖 DNA であり、標的 miRNA と同じ配列を含み、末端は蛍光基と 2 つの消光基で標識している。この 2 つの消光基による FRET 効果のため、プローブの蛍光は消光されている。このプローブに標的 miRNA がハイブリダイズすると、miRNA/DNA の二本鎖が形成される。この miRNA/DNA は、RNaseH および S1 ヌクレアーゼにより酵素分解できることから、分解によって蛍光基と消光基が離れ、蛍光を発する。一方、プローブの二本鎖 DNA は、これらの酵素では分解できない。つまり、miRNA の量に比例して蛍光強度が増加するとい

うものである。

4. 研究成果

(1) アデニンメチル化酵素の新規活性測定法の開発

アデニンメチル化酵素のモデル酵素として、dam methyltransferase (dam)を使用し、【3. 研究の方法】で述べた方法で dam の活性が測定できるか調べた。まず、基質の長さについて検討した。塩基数 12 と 18 の 4 種類の一本鎖 DNA を合成し、それらを組み合わせた二本鎖 DNA を調整した。その後、dam によるメチル化の有無によって、制限酵素切断後の蛍光強度がどのように変化するか調べた。その結果、図 1 に示すように、すべての組み合わせの二本鎖 DNA において、メチル化(図 1 の Enzyme+)されることで制限酵素分解後の蛍光強度の回復が見られた。このとき、メチル化の有無による蛍光強度比 (Enzyme+ / Enzyme-) が最も大きかったのは、塩基数 12 を組み合わせた DNA であり、これは蛍光基と消光基が最も接近しているため、高い FRET 効率によるバックグラウンドの低下が貢献していると考えた。

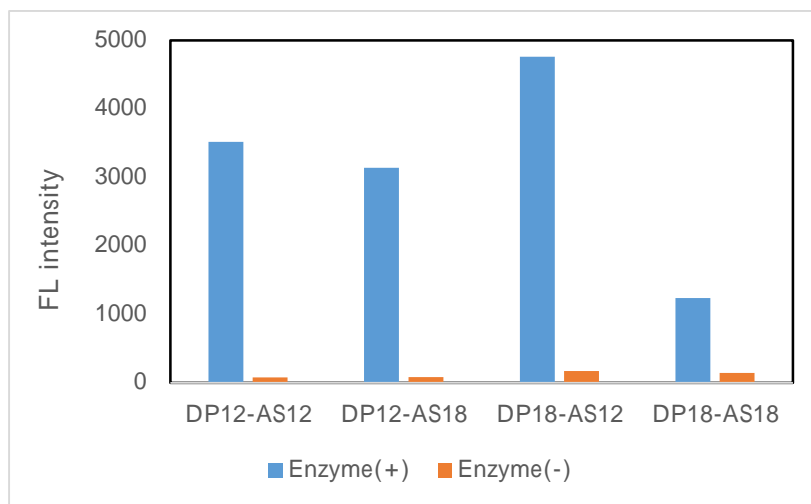


図 1 FRET 効率における基質の塩基数の影響

DP12 および AS12 は塩基数 12 の一本鎖 DNA であり、DP18 および AS18 は塩基数 18 の一本鎖 DNA である。DP と AS の配列は相補的であり、二本鎖を形成できる。

上記の 12bp の基質 DNA を用いて、dam の活性測定を行った。その結果、図 2 に示すように、dam の量に比例して、蛍光強度が増加した。また、基質 DNA の配列をシトシンメチル化酵素で認識できる配列に変更したところ、蛍光強度に変化は見られなかった。このことから、本測定法は、特異的にアデニンメチル化酵素の活性を測定できることがわかった。

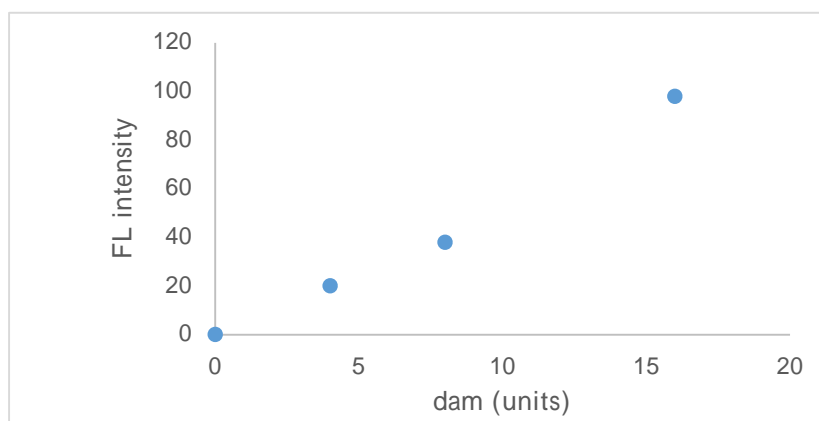


図 2 FRET を応用したアデニンメチル化酵素(dam)の活性測定
基質は、図 1 の DP-12 と AS-12 を組み合わせた二本鎖 DNA を使用した。

(2) miRNA の特異的な高感度検出法の開発

最初に、miR-96-5p を標的 miRNA、これと相補的な配列を含み末端を蛍光基と消光基で標識した一本鎖 DNA をプローブとして、標的 miRNA とプローブを混合したときの蛍光強度の変化を調べた。

その結果、図 3 に示すように、標的 miRNA 濃度の増加にともなって、蛍光強度の増加が観察された。これは、標的 miRNA とプローブが二本鎖を形成することで、蛍光基と消光基が離れた位置に固定化され FRET が起こりにくくなったため、蛍光が回復したと考えた。次に、標的 miRNA とは異なる配列の RNA (図 3 の AS) を用いて、同様の実験を行ったところ、蛍光強度に変化は見られなかった。この結果より、本研究で目的とする検出法は、標的となる miRNA を特異的に検出できると考えられる。現在、二本鎖 DNA をプローブとして、RNaseH および S1 ヌクレアーゼを用いた検出法の高感度化を試みている。

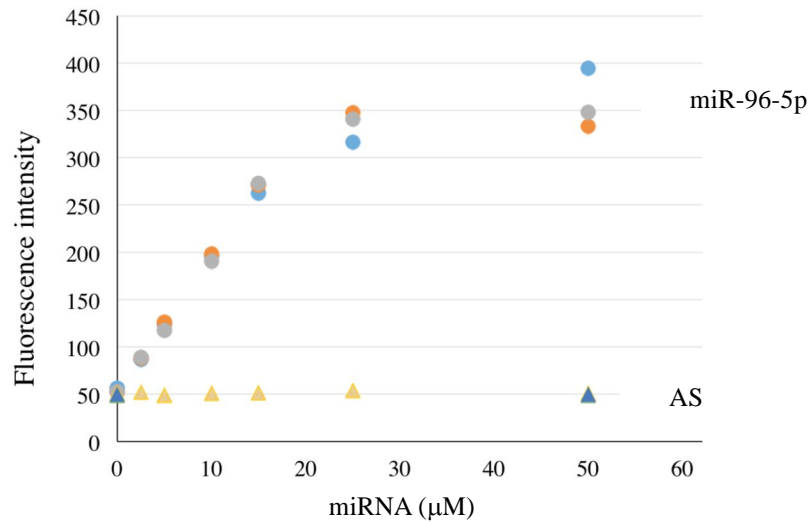


図 3 FRET を応用した miRNA の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kabashima Tsutomu, Hamasaki Nana, Tonooka Keiko, Shibata Takayuki	4. 巻 71
2. 論文標題 A Facile Method to Determine Prolidase Activity Using a Peptide-Specific Fluorometric Reaction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 15 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00467	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 -
1. 著者名 Takada Makoto, Watanabe Ichika, Naito Kazuya, Mutoh Junpei, Ohba Yoshihito, Kabashima Tsutomu, Wada Mitsuhiro	4. 巻 71
2. 論文標題 Extremely Simple and Rapid HPLC Analysis of Tocilizumab in Human Serum with Selective Precipitation Using Alkylamine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 19 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00475	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 -
1. 著者名 Shibata Takayuki, Narita Tomohiro, Suto Yutaka, Yasmin Hasina, Kabashima Tsutomu	4. 巻 23
2. 論文標題 A Facile Fluorometric Assay of Orotate Phosphoribosyltransferase Activity Using a Selective Fluorogenic Reaction for Orotic Acid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 2507 ~ 2507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s23052507	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 Shibata Takayuki, Shimamura Ryosuke, Yamamoto Yuji, Sakurai Hiroki, Fujita Junya, Yamayoshi Asako, Nemoto Toshimitsu, Kabashima Tsutomu	4. 巻 69
2. 論文標題 A Facile Method for the Quantification of Urinary Uracil Concentration by a Uracil-Specific Fluorescence Derivatization Reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 768 ~ 772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00221	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 -

〔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 池下実里、神谷誠太郎、椛島力
2. 発表標題 FRETを応用したDNAメチル化酵素の新規活性法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 糸数萌々、椛島力、井出遥香、神谷誠太郎
2. 発表標題 ロールミル及び超音波ホモジナイザーを用いたケトプロフェン含有ナノ粒子製剤の調製
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 神谷誠太郎、河津祐輝、椛島力
2. 発表標題 ケトプロフェン含有ナノ粒子製剤の調製
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------