

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24350084

研究課題名(和文) RNAの編集、化学修飾情報の1分子レベル解析技術の開発

研究課題名(英文) Analysis of RNA editing and chemical modification at the single molecule level

## 研究代表者

川井 清彦 (Kawai, Kiyohiko)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50314422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：ターゲットRNAとプローブDNAのハイブリダイゼーションに加え、形成されるDNA/RNAハイブリッド構造の物性、すなわち、電荷移動特性を利用した1分子レベルRNA分析・診断法を開発した。電荷移動、電荷分離過程が蛍光の点滅(blinking)として観測されうることに着目し、暗状態の時間の長さ(OFF time)が、DNAの電荷移動特性を反映した電荷分離寿命( )と一致することを利用し、1分子レベルでDNA/RNAハイブリッドの電荷移動特性を調べ、RNA分析・診断へと応用した。

研究成果の概要(英文)：A new detection method was developed for detection of RNA at the single-molecule level. We focused on that the charge transfer rate through DNA is strongly affected by the DNA sequence and chemical modification of nucleobases. The charge-transfer dynamics in DNA/RNA hybrid was measured as the length of the duration of the off time of blinking of the fluorescence. This enabled the detection of target sequence, allowing for sample sizes as small as 5 fmol (< 0.2 nM, 20 uL). The target can be analyzed under conditions of the automatic measurement of more than 100 samples within 3 h, which makes possible the high-throughput screening needed in RNA diagnosis.

研究分野：生物有機化学、光化学、核酸化学

キーワード：遺伝子診断 RNA エピジェネティクス 1分子計測(SMD) DNA

## 1. 研究開始当初の背景

RNA は転写後、アデニン(A)のイノシン(I)への編集、そしてシトシン(C)やA、グアニン(G)のメチル化など、100種類以上の化学修飾を受けている。これら RNA のエピジェネティックな化学修飾は、様々な生命現象を制御していることが明らかになりつつある。極微量しか発現されない RNA を解析するためには、通常 cDNA への逆転写、PCR による情報増幅が必要となり、多くの化学修飾情報はこれら過程で失われてしまい、RNA の編集・化学修飾を解析することは困難であった。そこで、極微量の RNA から化学修飾を検出・定量する技術の開発が望まれている。

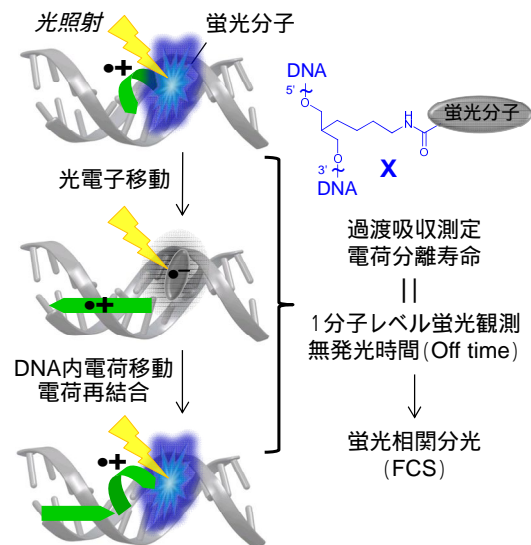
研究代表者はこれまで、DNA の電荷移動特性を電荷移動速度の測定により評価する系を確立し、DNA 内電荷移動速度が電荷の通り道となる核酸塩基の HOMO-level の並び方、すなわち、配列に応じて固有の値をとり、また、鎖内に存在するミスマッチによるスタッキングの乱れに大きく依存することを報告してきた。これは、DNA 内電荷移動速度の測定により DNA 配列情報を読み出せることを意味する。しかしながら、測定に用いた過渡吸収法は多量のサンプルを必要とし(1 nmol =  $1 \times 10^{15}$  コピー数以上)、分析・診断への応用は困難であった。

## 2. 研究の目的

極微量の RNA から化学修飾を検出・定量する技術を開発するため、DNA/RNA の電荷移動特性が、配列、および、核酸の化学修飾により変化することに注目した。一つ一つの DNA 鎖に注目すると、蛍光分子は通常、光を吸収し蛍光を放つ明状態(ON 状態)にあるが、近傍の核酸塩基と電子移動が進行すると一電子還元された状態となり、光を吸収しても光らない暗状態(OFF 状態)へと移行する。DNA 二本鎖中に注入された正電荷は、DNA 内電荷移動を経て、最終的に電荷再結合が進行し、再び ON 状態へと戻る。ここで、暗状態の時間の長さ(OFF time)が、DNA の電荷移動特性を反映した電荷分離寿命( $\tau$ )と一致する。本系を RNA へと発展し、RNA の配列、および、化学修飾を blinking により 1 分子レベルで検出する手法開発を目指した(Fig. 1)。

従来の RNA の編集・化学修飾の読み出し法は、逆転写における塩基の識別や DNA 鎖の伸張阻害、すなわち逆転写酵素による基質識別、あるいはターゲット RNA とプローブのハイブリダイゼーションの有無、すなわち結合解離定数の違いを検出基盤としていた。迅速かつ

簡便な RNA 情報の読み出しを実現するためには、後者のハイブリダイゼーション法に立脚した、DNA マイクロアレイや、in situ ハイブリダイゼーションなどに応用可能な技術の開発が望まれる。極微量の RNA をターゲットとする場合、ターゲット RNA に対し親和性の高いプローブの構築が必要となるが、高い結合定数は配列選択性とトレードオフの関係にあり、ハイブリダイゼーションの有無により RNA のわずかな化学修飾を読み出すことは一般に極めて困難である。本応募課題では、ターゲット RNA とプローブ DNA のハイブリダイゼーションに加え、形成される DNA/RNA ハイブリッド構造の物性、すなわち、電荷移動特性を利用して情報の読み出しを行うため、極めて高い選択性を得ることができる。



(Fig. 1) DNA/RNA 内電荷移動速度の違いによる配列の読みわけ。電荷分離中は傾向分子が発光できず、off time が電荷分離寿命に相当する(その逆数が電荷再結合速度となる)。蛍光の点滅過程 = blinking として、電荷移動速度を 1 分子レベルで計測する。

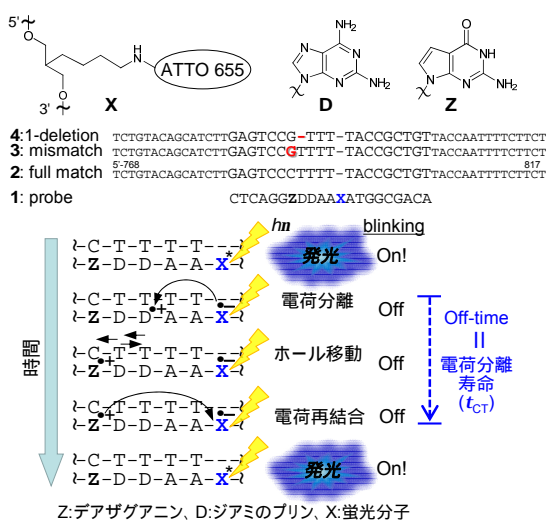
## 3. 研究の方法

蛍光分子 ATTO 655、ホールアクセプターとして天然の核酸塩基より酸化されやすい(HOMO 準位の高い)デアザグアニンを導入したプローブ DNA を合成し、RNA と結合し二本鎖を形成する。DNA/RNA ハイブリッド二重鎖の電荷移動特性を蛍光相関分光法(Fluorescence Correlation Spectroscopy: FCS)を用いて blinking として観測し、最適なプローブの開発、および、測定法の確立を行う。

## 4. 研究成果

まず、DNA をターゲットとして、1 分子観

測可能なプローブの開発を行い、測定可能な配列の拡張を行った。DNA 自身はそれほど優れた電荷移動媒体ではないため、必要に応じて配列中のアデニン (A) を、ジアミノプリン (D)、デアザアデニン (zA) などに置換し、導電性を高めたプローブ DNA を設計した。点変異、SNPs の検出を可能にする 1 塩基違いの検出を達成するため、B 型肝炎ウイルスの DNA をモデルとして検討を行った (Fig. 2)。Wild type に相補的な probe DNA (1) を設計・合成した。ターゲット鎖は wild type (2) に加え、点変異のモデルとして、C G トランスポージョン変異 (3)、および、一塩基欠損 (4) を有する DNA において検討を行った。ターゲットが無い場合は、電荷移動に由来する blinking は観測されない。ターゲットが存在すると、電荷分離に由来する blinking が観測され、blinking 観測によりターゲット鎖の検出が可能であることが示された。ここで、ターゲット鎖に変異が存在すると (3) 全体としては 2 重鎖が形成されるものの、変異部位で正しい塩基対が形成されないためこの箇所で DNA の構造が乱れる。これにともない、電荷移動速度が遅くなった。逆に、一塩基欠損では (4) 塩基が 1 塩基足りないため、結果として電荷の渡し手 (デアザグアニン:Z) と貰い手 (ATTO 655) の距離が短くなり、電荷移動速度が高速化した。このように、blinking の観測により、ターゲット鎖の有無だけでなく、その配列中のわずか 1 塩基の違いを識別できることが実証された。



(Fig. 2) B 型肝炎ウイルス DNA をターゲットとした、1 塩基違い (ミスマッチ、一塩基欠損) 識別の実証。  
 翻訳、化学修飾の読み出しを検討するため、アデニン (A) の翻訳により生じるイノシン

(I) および、シトシンのデアミネーションにより生じるウリジンを、DNA 内電荷移動測定による検出を検討した。A の I への置換、および、C の U への置換は、ともに配列中にミスマッチを引き起こし、これに伴い電荷移動速度が遅くなることを確認した。本測定系を RNA へと拡張し、DNA 発ガンに深く関わる RNA 配列中の点変異を極微量の RNA をターゲットとして測定可能とした。プローブ DNA 配列の改変により、種々の off time を有する blinking 系の構築に成功し、より高感度にターゲット RNA を検出可能となった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- Hole transfer in LNA and 5-me-2'-deoxyzebarine-modified DNA, K. Kawai, M. Hayashi, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 9406-9409 (2012)
- HOMO energy gap dependence of hole-transfer kinetics in DNA, K. Kawai, M. Hayashi, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 4806-4811 (2012)
- Excess electron transfer dynamics in DNA hairpins conjugated with N,N-dimethylaminopyrene as a photosensitizing electron donor, M. J. Park, M. Fujitsuka, H. Nishitera, K. Kawai T. Majima, *Chem. Commun.*, **48**, 11008-11010 (2012)
- Excess-electron injection and transfer in terthiophene-modified DNA: terthiophene as a photosensitizing electron donor for thymine, cytosine, and adenine, M. J. Park, M. Fujitsuka, K. Kawai, T. Majima, *Chem. Eur. J.*, **18**, 2056-2062 (2012)
- Generation of singlet oxygen during photosensitized one-electron oxidation of DNA, Y. Osakada, K. Kawai, T. Tachikawa, M. Fujitsuka, K. Tainaka, S. Tero-Kubota, T. Majima, *Chem. Eur. J.*, **18**, 1060-1063 (2012)
- Detection of single-nucleotide variations by monitoring the blinking of fluorescence induced by charge transfer in DNA, K. Kawai, T. Majima, A. Maruyama, *ChemBioChem*, **14**, 1430-1433 (2013)
- Synthesis and charge transferability of DNA possessing a naphthalimide

- photosensitizer at an extrahelical position, T. Takada, Y. Kawano, A. Ashida, M. Nakamura, K. Kawai, T. Majima, K. Yamana, *Tetrahedron Lett.*, **54**, 4796-4799 (2013)
- 8 Kinetics of charge transfer through DNA across guanine-cytosine repeats intervened by adenine-thymine base pair(s), Y. Osakada, K. Kawai, T. Majima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **86**, 25-30 (2013)
  - 9 Hole transfer kinetics of DNA, K. Kawai, T. Majima, *Acc. Chem. Res.*, **46**, 2616-2625 (2013)
  - 10 DNA microenvironment monitored by controlling redox blinking, K. Kawai, K. Higashiguchi, A. Maruyama, T. Majima, *ChemPhysChem*, **16**, 6846-6851 (2015)
  - 11 Triple helix conformation-specific blinking of Cy3 in DNA, K. Kawai, A. Maruyama, *Chem. Commun.*, **51**, 3590-3594 (2015)
  - 12 Photocurrent generation through charge-transfer processes in noncovalent perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic diimide/DNA complexes, T. Takada, M. Ido, A. Akane, M. Nakamura, M. Fujitsuka, K. Kawai, T. Majima, K. Yamana, *Chem. Eur. J.*, **21**, 6846-6851 (2015)
- [学会発表](計13件)
1. 川井 清彦, 蛍光の blinking を自在に操る分子技術の創出, 日本化学会第 95 回春季年会, 2016 年 3 月 26 日, 京都(同志社大学)
  2. Kiyohiko Kawai, Kenji Higashiguchi, Atsushi Maruyama, Tetsuro Majima, DNA microenvironment monitored by fluorescence blinking, The 42th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2015 年 9 月 24 日, 姫路(イーグレ姫路)
  3. 川井 清彦, 丸山 厚, DNA 三重鎖構造特異的な蛍光 blinking, 日本化学会第 95 回春季年会, 2015 年 3 月 26 日, 千葉(日本大学)
  4. Kiyohiko Kawai, Takeshi Koshimo, Atsushi Maruyama, Tetsuro Majima, Solvent accessibility of the fluorescent molecule monitored by fluorescence blinking, The 41th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2014 年 11 月 6 日, 小倉(北九州国際会議場)
  5. 川井 清彦, 古下 嵩, 丸山 厚, 真嶋 哲朗, DNA 中における蛍光分子三重項励起状態生成による blinking, 光化学討論会 2014, 2014 年 10 月 13 日, 札幌(北海道大学)
  6. 川井 清彦, 真嶋 哲朗, 丸山 厚, 1 分子レベル電荷分離寿命測定による DNA 1 塩基違いの検出, 第 8 回バイオ関連化学プログラム, 2014 年 9 月 11 日, 岡山(岡山大学)
  7. 川井 清彦, 古下 嵩, 丸山 厚, 真嶋 哲朗, 蛍光分子の溶媒接触表面積に基づく blinking, 日本化学会第 94 回春季年会, 2014 年 3 月 30 日, 名古屋(名古屋大学)
  8. Kiyohiko Kawai, Tetsuro Majima, Atsushi Maruyama, Detection of Single-Nucleotide Variations by Monitoring the Blinking Triggered by Charge Separation in DNA, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2013 年 11 月 14 日, 横浜(神奈川大学)
  9. 川井 清彦, 真嶋 哲朗, 丸山 厚, Blinking 観測による DNA 1 塩基違いの検出, 光化学討論会 2013, 2013 年 9 月 12 日, 松山(愛媛大学)
  10. 川井 清彦, 小阪田泰子, 真嶋 哲朗, DNA 内ホール移動における電荷非局在化, 日本化学会第 93 回春季年会, 2013 年 3 月 24 日, 草津(立命館大学)
  11. 川井 清彦, 林 光雄, 真嶋 哲朗, DNA 内空間を介したホール移動の高速化, 高次空間の創発と機能開発第 9 回公開シンポジウム, 2013 年 3 月 14 日, 神戸(シーサイドホテル舞子ビラ)
  12. Kiyohiko Kawai, Tetsuro Majima, Atsushi Maruyama, Single molecule level DNA analysis based on charge transfer measurement, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), 2012 年 11 月 28-29 日, 東京(東京工業大学)
  13. Kiyohiko Kawai, Mitsuo Hayashi, Tetsuro Majima, Hole-transfer dynamics determined by DNA flexibility, The 39th International Symposium on

Nucleic Acids Chemistry, 2012年11月  
16日, 名古屋(名古屋大学)

〔図書〕(計3件)

- 1 “Increasing the hole transfer rate through DNA by chemical modification” in “Topics in Current Chemistry: Chemical science of pi-electron systems”, ed. by T. Akasaka, A. Osuka, S. Fukuzumi, H. Kandori, Y. Aso. K. Kawai, T. Majima, Springer-Japan, KK, Tokyo, 751-760 (2015).
- 2 “遺伝子の蛍光ラベル化、蛍光標識” “光と生命の事典” 真嶋哲朗、飯野盛利、七田芳則、藤堂剛 編、川井 清彦, 朝倉書店、東京、364-365 (2015).
- 3 “Photoinduced charge-separation in DNA” in “Topics in Current Chemistry: Photoinduced phenomena in nucleic acids II”, ed by M. Barbatti, A. Borin, S. Ullrich, K. Kawai, T. Majima, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **356**, 165-182 (2015)

〔その他〕

ホームページ等

研究成果は、下記ホームページにて随時公開している。

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/kawairesearch.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川井 清彦 (KAWAI, Kiyohiko)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50314422