

令和元年6月5日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14027

研究課題名(和文) microRNAの画期的な迅速、高感度検出法の開発

研究課題名(英文) Development of novel microRNA detection system

研究代表者

武井 史恵 (TAKEI, FUMIE)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・医学教育部・准教授)

研究者番号：30252711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本提案ではPCRを基盤とした簡便、高感度なmiRNA検出法の開発を主目的とし、HP-PCR法を使ったmiRNA検出法の開発に関する研究を行なった。microRNAの特徴はその長さであり、長くても25塩基程度しかない。10塩基程度のPCRのプライマーの5'末端に15塩基程度のDNAタグをつけたプライマーを使うと逆転写、PCR共に効率的に進行し、微量のmicroRNAでも検出できることが明らかとなった。またこのタグは、miRNAの蛍光検出にも大きな役割を果たしており、画期的な検出法が開発できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

microRNA(miRNA)は21-25塩基長の1本鎖RNA分子であり、真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与する。現在ヒトのmiRNAは2500種類以上知られており、様々な疾患や病気に関わっていることが明らかにされている。本提案では、PCRを基盤とした簡便、高感度なmiRNA検出法の開発を目的とし、研究を行なった結果、特殊な技術、試薬がなくても、誰もがmiRNAを検出できる画期的な方法の開発に成功した。今後、miRNAの検出分野において大きな役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：A novel rapid, simple, and cost-effective miRNA detection system using a primer having a tag at the 5' end was developed. miRNA is the 20-25 mers, and it is too short RNA to do reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) under the general RT-PCR method. We used a RT-primer having DNA tag to increase the length of cDNA. In PCR, tag-primer with template cDNA having complementary sequence of tag hybridized, and melting temperature of primer and cDNA increased. As a result, PCR efficiency increased, and miRNA can be detected quantitatively.

研究分野：ゲノム化学

キーワード：PCR reverse transcription fluorescence molecule miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与する。現在ヒトの miRNA は 2500 種類以上知られており、癌、感染症、生活習慣病および難聴などの様々な疾患や病気に関わっていることが明らかにされている。特に癌の転移や病態変化などに関与している各種のがん特有の miRNA は、新しい疾病マーカーとして有望視されている。この miRNA の検出法としては、マイクロアレイを使う方法やノーザンハイブリダイゼーションを使う方法がある。しかしこれらの方法は検出するまでに時間もかかり、サンプルの量も必要となる。また近年は遺伝子増幅反応 (Polymerase Chain Reaction, PCR) を使った方法も使われるようになってきている。しかしながら、プライマーやプローブの設計において熟練した技術が必要であること、また修飾した DNA が必要で

あること等から簡便な方法とはなっていない。我々は以前に、DNA のシトシンバルジ (C-バルジ) 構造に特異的に結合し、特徴的な蛍光を発する蛍光分子 (DANP、図 1) を発見し、報告している (*Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4507-4512)。我々はこの C-バルジ構造とプライマーの蛍光変化を使った新規アレル特異的 PCR プライマーの設計を提案・実証し、既存のリアルタイム法とは原理の異なる PCR モニタリング技術、HP-PCR 法を研究・報告し、今回の miRNA 検出法の基礎となる研究を積み重ねてきた (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7822-7824, 図 1)

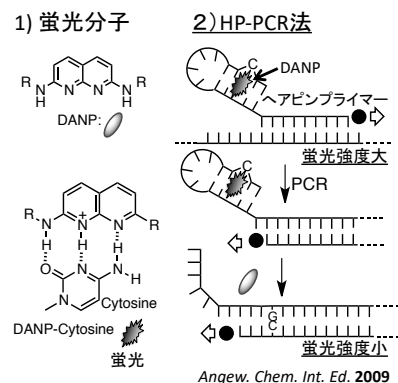


図1. DANPの構造とHP-PCR法の概要

## 2. 研究の目的

本提案では、PCR を基盤とした簡便、高感度な miRNA 検出法の開発を主目的とし、HP-PCR 法を使った miRNA 検出法を開発する。この方法を実用的な技術に仕上げするために、3 年間の研究期間を設定し、

- (1) RT-HP-PCR 法を基盤とした miRNA 検出法の構築
- (2) DNAプローブを用いた蛍光増大型HP-PCR法 (Hpro-PCR法) とmiRNA検出法の開発
- (3) 新規蛍光分子の開発によるHP-PCR法、Hpro-PCR法の高性能化 を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) RT-HP-PCR 法を使った miRNA 検出法の構築

HP-PCR 法を使った高精度な miRNA 検出法を確立する。この HP-PCR 法は、修飾していない DNA と DANP のみで構築された蛍光減少型の極めてシンプルな検出系であり、1) one-step RT-PCR 法に必要な基本的なデータの収集、2)実際の患者の血清を用いた miRNA 検出とその定量を行う。まずはターゲットとして、化学合成した miRNA-122a の検出を行う。RNA から DNA への逆転写(RT)-HP-PCR 法を使った RNA の検出法についての知見を得る。PCR 産物を電気泳動により分析し、PCR の進行を確認するとともに蛍光測定を行ない、PCR の進行と蛍光強度変化に良い相関が認められる条件を探し、RT-HP-PCR 検出法の有効性を実証する。この場合、miRNA-122a は 23 塩基の非常に短い RNA のため、プライマー自身は 10mer 前後となり、逆転写の際に温度が高いと DNA プライマーが RNA に結合しにくいことが懸念される。その場合は逆転写の温度を低温に設定し、逆転写の効率化を図る。また酵素も数種類使用し、逆転写が効率よく進行する条件を選ぶ。次に pre-miRNA-122a を Dicer で処理したサンプル (成熟型とセンス鎖の混合) を

使い、至適条件を使って夾雑物存在下でも成熟型 RNA を特異的に検出可能な系に仕上げる。最後に実際の現場を想定して患者の血液から抽出した血清を用いて RT-Hpro-PCR 法での miRNA 検出が可能であることを実証する。

## (2) 蛍光増大型HP-PCR法 (Hpro-PCR法) の開発とmiRNAの検出法への応用

今まで述べた HP-PCR 法は PCR 前の蛍光強度が高く、PCR 後が低い蛍光減少型である。しかし市販されている蛍光検出装置では、PCR 後に蛍光強度が高くなる蛍光増大型が殆どである。我々は、新たにヘアピンプライマーのヘアピン部分を PCR プライマーから分離、独立させてプローブとして利用した蛍光増大型 Hpro-PCR 法の開発、実証を行い、miRNA の検出に応用する。pUC18 をテンプレートとし、タグプライマー、プローブそして DANP を使って Hpro-PCR の予備実験を行ったところ、PCR 進行に伴う蛍光強度の増大が確認できた。このデータをもとにプローブ、タグの配列、塩基数等を詳細に検討し、PCR 前後で最も蛍光の強度の差が大きくなるタグとプローブ配列を決定する。更に pre-miRNA-122a をテンプレートとして RT-Hpro-PCR を行い、その結果をもとに条件検討をして、効率よく RT-Hpro-PCR が進行する条件を確立した後、成熟型 miRNA の検出へと応用し、実用化に向ける。

## (3) 新規蛍光分子の開発による HP-PCR 法、Hpro-PCR 法の高性能化

蛍光エネルギー移動を使った長波長で発光する新規蛍光分子の開発 を行う。現在市販されている Real-time PCR 装置は、検出可能な蛍光波長がほぼ 500 nm 以上となっている。一方、HP-PCR 法もしくは Hpro-PCR 法で使用する DANP の発光波長は 430 nm~460 nm と市販の Real-time PCR 装置では測定できない。そこで miRNA の検出に市販の PCR を使う、より汎用性の高い方法に仕上げるために、DANP-シトシン(C)複合体から隣接分子への蛍光エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer, FRET)を使った発光波長の長波長化を狙う。蛍光分子としては DANP-クマリン(Co)化合物を用いる。Co は 430 nm 付近に最大吸収波長を持ち、515 nm 付近で発光する。リンカーの長さ、結合様式、FRET 効率など徹底的に検討して、構造を最適化する。

## 4. 研究成果

### (1) 蛍光増大型 HPro-PCR 法の開発。

HP-PCRのヘアピンプライマーのヘアピン部分をPCRプライマーから分離、独立させてプローブとして利用した蛍光増大型Hpro-PCR法の開発を行った。図2にHpro-PCR法の概要を示した。

- 1) プローブの配列は、DANPが特異的に結合する領域 (C-バルジ) を含むヘアピン構造を形成するように設計する。プライマーの5'末端にプローブと相補的なタグ配列を付加する。PCRの前はタグとプローブが二本鎖を形成しているため、DANPは結合箇所がなく、遊離した状態で存在するため、溶液の蛍光強度は低い。
- 2) 伸長されたタグプライマーがテンプレートになり、逆鎖側のプライマーが伸長される。
- 3) タグ領域にも相補的なDNAが合成されると同時に、タグからプローブが遊離する。

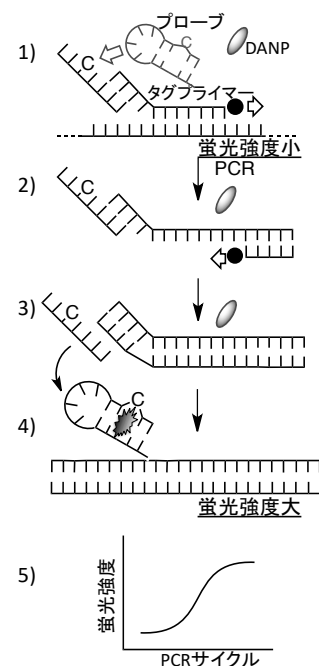


図2 Hpro-PCR 法の概要

4) 遊離したプローブは自発的にヘアピン構造を形成する。そのヘアピン構造中のC-バルジに DANPが結合して蛍光強度が増大する。

5) PCR の進行は DANP の蛍光強度の増大として観察される。

pUC18 をテンプレートとし、タグプライマー、プローブそして DANP を使って Hpro-PCR の予備実験を行ったところ、PCR 進行に伴う蛍光強度の増大が確認できた (図 3)。

このデータをもとにプローブ、タグの配列、塩基数等を詳細に検討し、PCR 前後で最も蛍光の強度の差が大きくなるタグとプローブ配列を決定した。

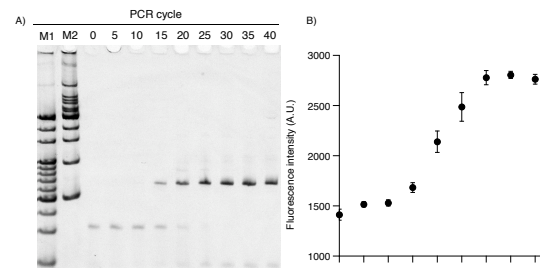


図 3 A) PAGE ゲル分析結果。約 130 bp 付近が PCR 産物 B) PCR 溶液の蛍光強度変化

(2) 蛍光増大型 HPro-PCR 法を使った miRNA の検出

miRNA の検出において最も問題になるのは miRNA が 20bp から 25bp と短い点にある。このため、短いプライマーと逆転写された cDNA 間の DNA-DNA 融解温度 ( $T_m$ ) が低く、PCR が進行しないと推測できた。そこでテンプレートとなる cDNA を長くすることを考えた。5'末端に DNA のタグをつけた逆転写用の DNA を使い cDNA の配列を長くする。リバースプライマーにも同様にタグをつけ PCR を行う。少しでも長い DNA が生成すれば、それがテンプレートとなって DNA-DNA の  $T_m$  が上がり、PCR が進行できると期待した。

タグ配列を持つプライマーと持たないプライマーを使って PCR を行なった結果、フォワードプライマーとリバースプライマーの両方がタグを持つ場合にのみ、PCR が進行することがわかった (図 4)。

次に miRNA-122a (23mer) の検出をタグ付きのプライマーを使って行ない、その時のゲル分析結果と PCR 溶液の蛍光強度変化を図 5 に示した。

PCR が進行するに従って、PCR の増幅産物のバンドが確認できた。蛍光強度も同時に増大したことから、Hpro-PCR 法によって miRNA の検出が可能であることが明らかとなった。

またテンプレートの濃度を変えて定量性を調べると、テンプレート濃度によって蛍光変化に差が生じたことから、miRNA の検出においても定量性があることが示唆された。さらに miRNA-17a、miRNA-18a、miRNA-20a についても miRNA-122a と同様に検討すると、いずれの場合も検出が可能であることが明らかとなった。

このように、DNA のタグをつけたプライマーを使うだけで、簡便かつ迅速、高感度で miRNA の検出ができる方法を開発できた。またこのタグは蛍光で PCR をモニタリングする際に必要となり、RT-Hpro-PCR 法は miRNA の蛍光検出法としては最も簡便で高感度な方法と考えられる。

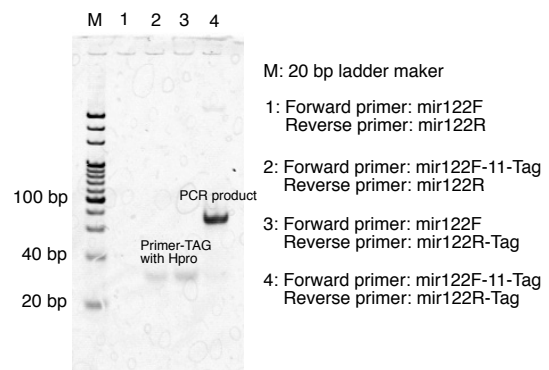


図 4 PAGE ゲル分析結果  
Tag を持たないプライマーを使った時には PCR 産物が生成しない。

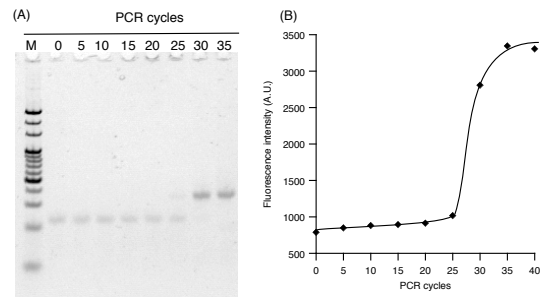


図 5 (A) PAGE ゲル分析結果。約 80 bp 付近が PCR 産物 (B) PCR 溶液の蛍光強度変化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Fumie Takei, Misaki Akiyama, Kazuyuki Nobusawa, Norhayati Binti Sabani, Huanwen Han, Kazuhiko Nakatani, and Ichiro Yamashita “PCR under Low Ionic Concentration Buffer Conditions” *ChemistrySelect* **2018**, 3, 973 –976

〔学会発表〕（計 13 件）

- (1) Fumie Takei et.al “Development of a SNP typing in the low ionic PCR condition” ISNAC2016, Kumamoto, Sep. 27. 2016
- (2) Fumie Takei et.al “Design of ligand for sensing: the combination of hairpin primer DANP ligand” IWSBN2017, Kyoto, Dec. 27. 2017
- (3) Fumie Takei et.al “Development of novel miRNA detection system using PCR with C-Bulge probe and fluorescence molecule” ISNAC2018, Kyoto, Nov. 8. 2018

他 11 件

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：miRNA 用プライマー及び該プライマーを用いた核酸増幅反応法

発明者：武井史恵

権利者：武井史恵

番号：特願 2018-195280 号

出願年月日：平成 30 年 10 月 16 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

武井 史恵 (TAKEI, Fumie)

防衛医科大学校・その他の部局等・准教授

研究者番号：30252711

### (2) 連携研究者

中谷 和彦 (NAKATANI, Kazuhiko)

大阪大学産業科学研究所・教授

研究者番号：70237303