

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14514

研究課題名（和文）L-DNA/SNA回路の設計と細胞内RNAの高感度・高正確検出

研究課題名（英文）Design of L-DNA/SNA circuit for detection of RNA in cell with high sensitivity and accuracy

研究代表者

村山 恵司（Murayama, Keiji）

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：70779595

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々がこれまでに開発した人工核酸SNAを媒介として用いることで、標的RNAの情報を天然DNAとは鏡像のL-DNAに転写しシグナル増幅し、蛍光で検出するシステムの構築を行った。結果、夾雑物や酵素の影響を受けずにRNAを検出するシステムの構築に成功した。また、研究の課程において、SNAに結合した核酸のらせんの巻き方向がSNAに伝播し、SNAの二重鎖形成能力に大きく影響するという新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のRNAの蛍光検出法では、細胞内に夾雑する非標的核酸や核酸分解酵素によって正確な検出が困難であった。本研究で開発した手法では、非標的核酸や核酸分解酵素による影響を受けず細胞内のRNAを正確かつ高感度で検出する手法として有力である。

また、核酸の巻き方向が一本鎖部分に伝播することで結合力が変化する現象はこれまでに報告例がなく、学術的に全く新しい知見であるため、今後様々な研究へと展開されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We attempted to develop the RNA detection system achieved by transfer of RNA information into L-DNA, mirror of natural DNA, and amplified the fluorescent signal. As a result, we successfully establish RNA detection without inhibition by contaminating and nucleases. We also found that L-DNA-bound SNA induced left-handed helicity that significantly reduced hybridization of SNA with right-handed natural nucleic acids.

研究分野：生体関連化学

キーワード：人工核酸 シグナル増幅 RNA検出 SNA L-DNA

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内 RNA が様々な遺伝子発現制御機能を有していることが明らかにされつつあり、RNA を可視化する技術が盛んに研究されている。申請者らはこれまでに、DNA のリボース環の代わりに非環状ジオールを導入した人工核酸 D-aTNA, L-aTNA, SNA の開発を行っており、RNA と結合可能な人工核酸 SNA を用いて細胞内 mRNA を検出可能な蛍光性核酸プローブの開発に成功している。しかし細胞内にはごく微量しか発現していない RNA も多数存在しており、これらを特に細胞内で正確に検出する技術は未だ確立されていない。そこで、DNA シグナル増幅回路 (Fig. 1) に着目した。DNA 回路は、特定の DNA・RNA 配列 (Input) に応答してシグナル (Output) を与える仕組みであり、設計次第では一つの標的核酸に対し複数の蛍光分子のシグナルを得ることができ、少量の核酸を検出することが可能である。しかし、細胞内での使用においては、回路を構成する DNA が核酸分解酵素により直ちに分解されシグナルを発してしまうという問題がある。加えて、細胞内の無数の天然 RNA と意図せぬ部分的な二重鎖形成 (クロストーク) をしてしまい、正確に機能させることは極めて困難であった。

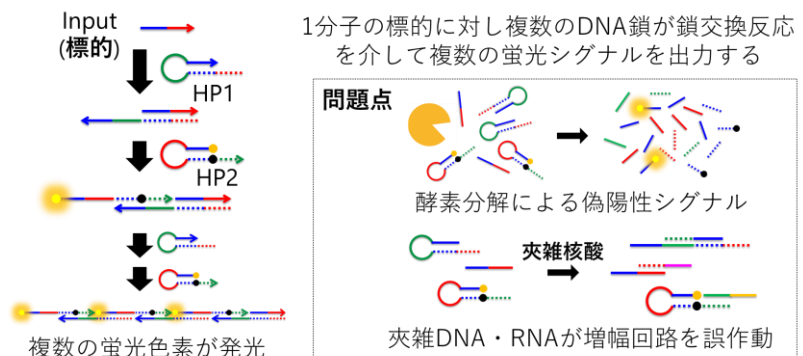


Fig. 1. DNA 増幅回路の設計と問題点

2. 研究の目的

本研究では、非天然の L-DNA を用いてシグナル増幅回路を構築し、細胞内 RNA を検出することを発案した。L-DNA は天然に存在する D-DNA のエナンチオマーであり、D-DNA と L-DNA は一切結合しない、つまり直交性がある。また L-DNA は天然には存在しておらず、分解酵素によって認識・分解されない。従って、L-DNA 回路は細胞内でも分解・クロストークが無く、正しく機能することができる。しかし L-DNA 回路だけでは、標的とする D-RNA を認識することができないため、我々がこれまでに開発した人工核酸 SNA を D 体と L 体のインターフェイス (媒介) として用いることを考えた。SNA は天然の D-DNA、D-RNA だけでなく L-DNA とも二重鎖を形成できる。つまり、標的 RNA を認識して L-DNA シグナルを放出する SNA インターフェイスと、その L-DNA シグナルに応答・増幅して蛍光発光を与える L-DNA 回路を組み合わせることで、細胞内の微量の標的 RNA を正確に検出できると考えた (Fig. 2)。

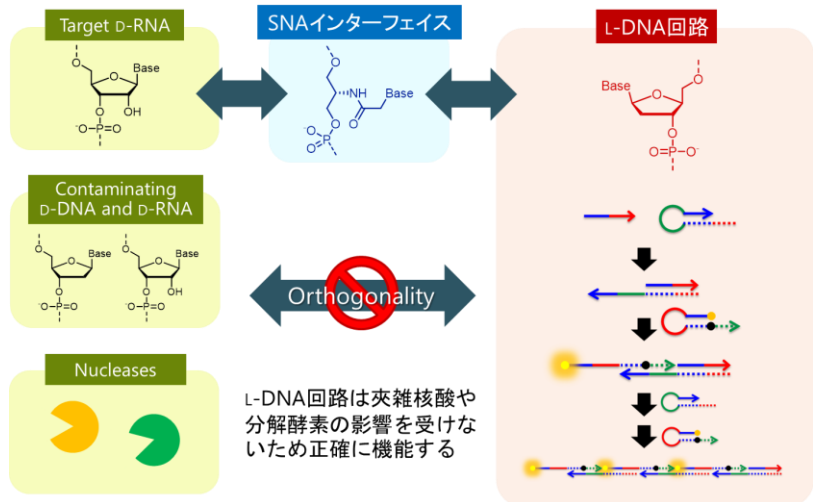


Fig. 2. 本研究で開発する RNA 検出システム概要

3. 研究の方法

(1) SNA インターフェイスの構築

SNA インターフェイス部分は、SNA/L-DNA 二重鎖で構成し、標的 RNA 非存在下では L-DNA が SNA から解離せず、標的 RNA 存在下で SNA との二重鎖形成によって L-DNA を放出するように設計する。miR-21 を標的とし、最適な配列長について検討を行い、非特異的な L-DNA のリークが起こらず、逆に標的 RNA の結合によって効率的に L-DNA を放出できる設計を模索する。L-DNA の合成費用は D-DNA に比べ遥かに高額なため、まずは D-DNA で配列検討を行い、最適化後の配列を L-DNA で検証することにした。

(2) L-DNA 増幅回路の構築

Input L-DNA 一分子に応答し、蛍光分子複数個分に相当する蛍光発光を得ることを目指し、配列設計・条件検討を行う。D-DNA を用いて増幅回路に用いる配列の各セグメントの配列長を検討し、L-DNA に適用する。

(3) RNA 検出の実証

(1) 及び (2) で最適化した配列を使用し、実際に標的 RNA の検出を行う。また、標的 RNA を変

更して検出を試み、本検出システムの配列設計の一般性について確認する。

4. 研究成果

(1) SNA インターフェイスの構築

まず、標的 RNA (miR-21) に相補的な SNA (S-0) を合成し、この SNA に一部結合できる L-DNA を、続く増幅回路の Input と仮定して設計した (Fig. 3)。すなわち、SNA の一本鎖領域を足がかりとして RNA が結合し、鎖交換反応で SNA に結合している L-DNA を引き剥がす設計となっている。SNA 末端には FAM、DNA に Dabcy1 (DAB) を導入し、二重鎖形成・解離を蛍光変化から観測した。まずは SNA と D-DNA を用いて鎖長の最適化を試みた結果、16mer 以上でなければ室温条件で SNA/DNA 二重鎖を形成できないことを確認した。そこで、16mer の D-DNA (D-16) と S-0 の二重鎖に対し標的 RNA を添加したところ、効率よく D-DNA が解離することが明らかとなった (Fig. 4)。そこで、同じ配列を L-DNA へと適用し鎖交換を検証した。しかし興味深いことに、SNA/D-DNA

核酸	配列名	配列
RNA	miR-21	5'-UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A-3'
SNA	S-0	(R)-FAM-ATC GAA TAG TCT GAC TAC AAC T-(S)
D-DNA	D-22	5'-DAB-TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG A-3'
	D-16	5'-DAB-TAG CTT ATC AGA CTG A-3'
	D-14	5'-DAB-TAG CTT ATC AGA CT-3'
	D-12	5'-DAB-TAG CTT ATC AGA-3'

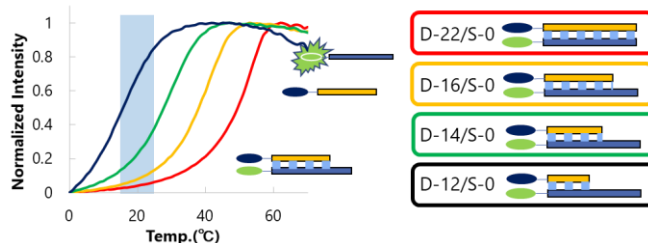


Fig. 3. 検証用配列と二重鎖融解曲線

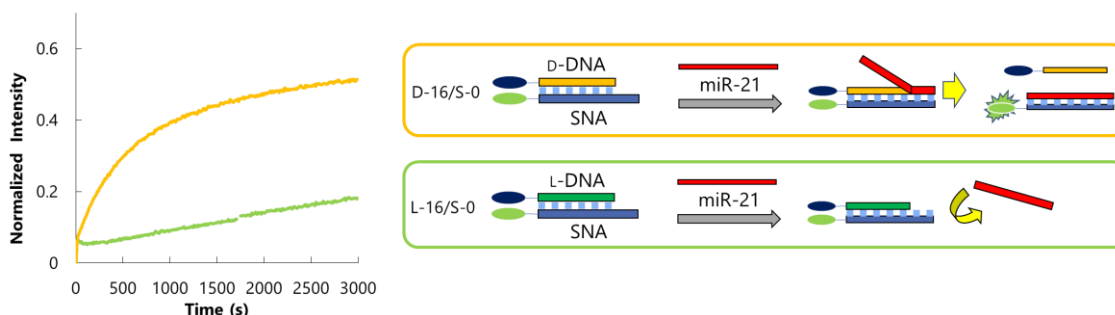


Fig. 4. 標的 RNA 添加による蛍光強度の時間変化

の反応に比べ、同じ配列の SNA/L-DNA と RNA との反応速度は大幅に低下した (Fig. 4)。SNA の一本鎖部分に L-DNA の左巻きが伝播し、右巻きの RNA の結合速度が低下したと考えられる。この現象はキラリティの伝播という観点から非常に興味深い結果であるが、本系においては反応を阻害する要因となってしまふ。

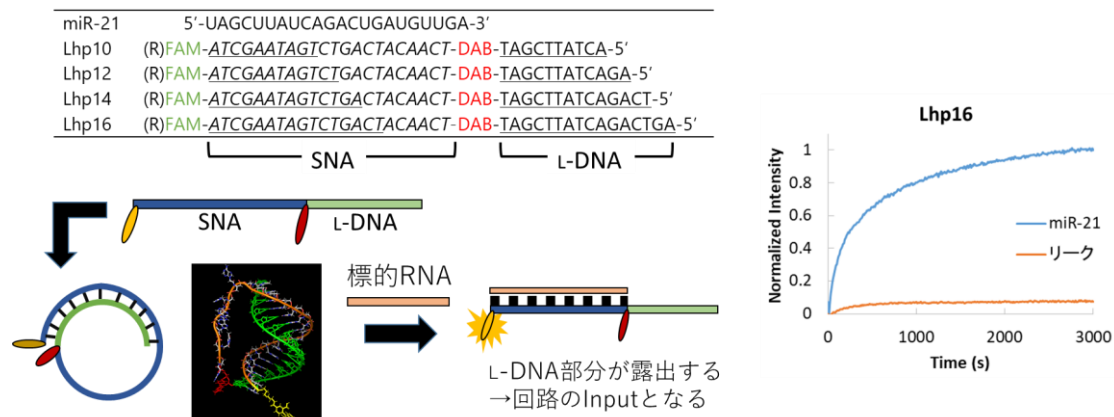


Fig. 5. 新たな SNA/L-DNA キメラ体インターフェイスと標的 RNA との反応

そこで次に、SNA/L-DNA キメラ体を用いて分子内で SNA/L-DNA 二重鎖を形成させることで、構造を歪ませることで RNA との反応速度向上を期待した。L 体 SNA と L 体 DNA は合成方向に対しパラレル型の二重鎖を形成するため、Fig. 5 のような環状構造をとると予想される。RNA が標的 SNA に結合すると L-DNA が一本鎖となり、増幅回路が起動する設計である。当初の設計では増幅回路は標的 RNA から離れた場所で起動するため、RNA の局在は観測できないが、本設計では標的 RNA と増幅回路が連結されるため、局在の観察も可能となる。蛍光測定で分子内二重鎖形成を評価した結果、いずれの長さにおいても分子内での二重鎖形成が確認された。しかし、14mer 以下の場合、一部分だけが相補的な非標的 RNA と反応し L-DNA を解離してしまうリーク反応が見られた (data not shown)。一方、16mer ではリーク反応を殆ど起こさず、また期待

通り標的 RNA 存在下ですみやかに L-DNA を解離することが確認された (Fig. 5 右図)。以上のように、設計を新たにすることで、標的 RNA に応じて L-DNA の一本鎖部分を遊離させることができる SNA インターフェイスの構築に成功した。

(2) L-DNA 増幅回路の構築

モデル系として D-DNA を用いて配列長の異なる HCR 回路をいくつか設計し、最適な設計を模索した (Fig. 6)。Input としては SNA/L-DNA キメラ体インターフェイスの L-DNA 部分を含む配列を設定した。

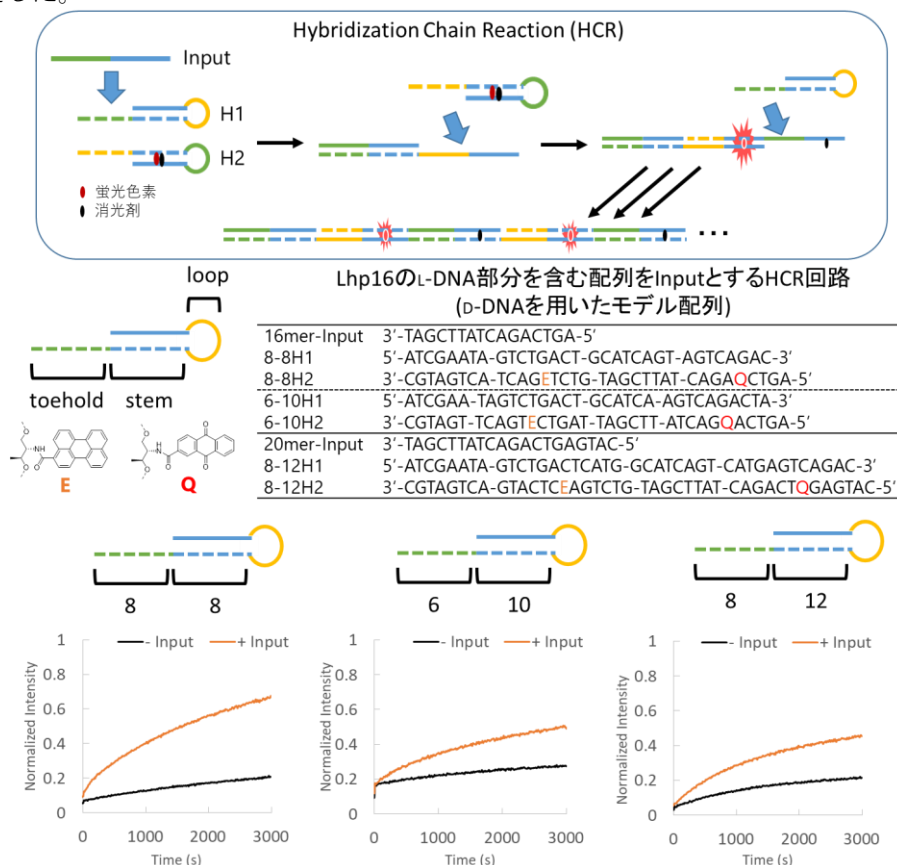


Fig. 6. HCR 回路の設計と配列検討

stem と loop の長さを変えて検討を行った結果、いずれの長さにおいても Input 非存在下では消光状態を維持したのに対し、Input を添加すると蛍光強度の増大が確認されたことから設計通り HCR の進行が示された。特に stem 8mer / loop 8mer の場合に Input 存在下での蛍光強度が強くなり、結果として、Input 添加の 3000 秒後には 1 分子の Input に対し蛍光色素 6-7 分子分に相当する蛍光発光強度を示したことから、設計通りシグナルの増幅が可能であることを確認できた。この配列を L-DNA で再構築し評価した結果、D-DNA の場合と同様に機能することが示された (data not shown)。

(3) RNA 検出の実証

そこで、標的 RNA が SNA/L-DNA キメラ体インターフェイスを介して L-DNA HCR 回路を起動できるかについて検討をおこなった (Fig. 7)。

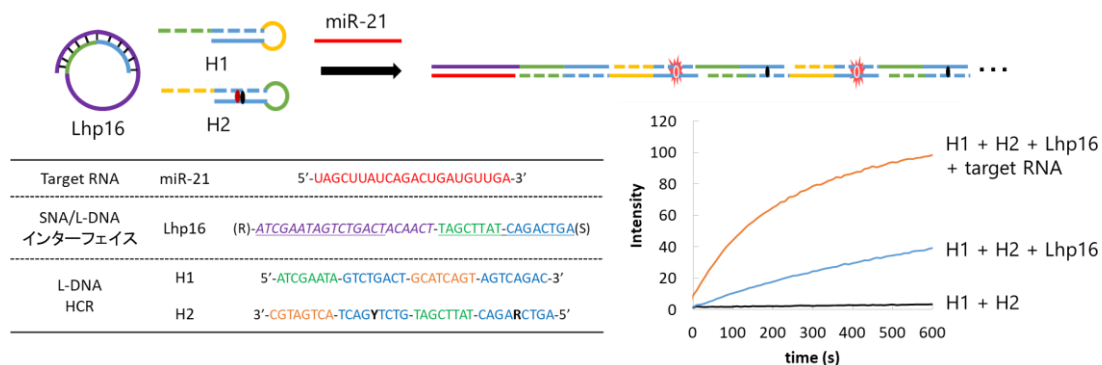


Fig. 7. L-DNA HCR 回路と SNA インターフェイスによる RNA 検出 (全て 100 nM)

その結果、target RNA 非存在下では蛍光増大が緩やかであったのに対し、target RNA 存在下では顕著な蛍光増大が観測されたことから、D-RNA の情報を、本来干渉することのない L-DNA へと伝達することに成功した。また、標的 RNA を変更し同じ配列設計を行ったところ、こちら

も機能することがわかり、配列設計に一般性があることが明らかとなった。しかし、target 非存在下で HCR 回路に対しインターフェイスだけ添加した場合においても蛍光の増加が観測された。これは、インターフェイスの分子内二重鎖が一部解離していることにより H1、H2 と反応してしまったと考えられる。インターフェイス量を減らし、増幅回路配列が過剰になるような条件下では、狙い通りのシグナル増幅反応と並行してリーク反応による蛍光増大が相対的に増加し、RNA 検出の感度が低下する結果となった (data not shown)。

リーク反応が起こってしまう場合でも、FISH 等、特定の実験においては洗浄プロセスで非特異発光を除去できるため、RNA 検出への応用は可能である。しかし、溶液中で簡便に検出を行いたい場合や living cell での観察においては問題となるため、今後改善の必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamiya Yukiko, Donoshita Yuka, Kamimoto Hiroshi, Murayama Keiji, Ariyoshi Jumpei, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Introduction of 2,6-Diaminopurines into Serinol Nucleic Acid Improves Anti-miRNA Performance	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1917-1922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201700272	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 Murayama Keiji, Nagao Ryuya, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 2
2. 論文標題 D-aTNA circuit orthogonal to DNA can be operated by RNA input via SNA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ChemistrySelect	6. 最初と最後の頁 5624-5627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/slct.201701126	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 Murayama, K.; Kashida H.; Asanuma, H.	4. 巻 1973
2. 論文標題 The Use of Serinol Nucleic Acids as Ultrasensitive Molecular Beacons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Method in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 261-279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Skugor Marko, Valero Julian, Murayama Keiji, Centola Mathias, Asanuma Hiroyuki, Famulok Michael	4. 巻 58
2. 論文標題 Orthogonally Photocontrolled Non Autonomous DNA Walker	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 6948 ~ 6951
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.201901272	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 該当する

1. 著者名 Asanuma Hiroyuki、Ishikawa Teruchika、Yamano Yuuhei、Murayama Keiji、Liang Xingguo	4. 巻 3
2. 論文標題 cis On/trans Off of DNA Hybridization with Alkylthio azobenzene on L Threoninol Responding to Visible Light	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemPhotoChem	6. 最初と最後の頁 418 ~ 424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cptc.201900060	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 Murayama Keiji、Yamano Yuuhei、Asanuma Hiroyuki	4. 巻 141
2. 論文標題 8-Pyrenylvinyl Adenine Controls Reversible Duplex Formation between Serinol Nucleic Acid and RNA by [2 + 2] Photocycloaddition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 9485 ~ 9489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b03267	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 Murayama Keiji、Asanuma Hiroyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 A Quencher Free Linear Probe from Serinol Nucleic Acid with a Fluorescent Uracil Analogue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 120 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900498	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 Kamiya Yukiko、Sato Fuminori、Murayama Keiji、Kodama Atsuji、Uchiyama Susumu、Asanuma Hiroyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Incorporation of Pseudo complementary Bases 2,6 Diaminopurine and 2 Thiouracil into Serinol Nucleic Acid (SNA) to Promote SNA/RNA Hybridization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 1266 ~ 1271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201901728	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 Chen Yanglingzhi, Murayama Keiji, Kashida Hiromu, Kamiya Yukiko, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 56
2. 論文標題 A triplex-forming linear probe for sequence-specific detection of duplex DNA with high sensitivity and affinity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 5358 ~ 5361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC01865A	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16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Keiji Murayama, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Design of novel fluorescent probe with fluorescent nucleobase on artificial acyclic nucleic acid
3. 学会等名 International Symposium on Photochemistry (27th PhotoIUPAC) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村山恵司, 山野雄平, 浅沼浩之
2. 発表標題 修飾核酸塩基導入による人工核酸SNAの高機能化
3. 学会等名 第6回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村山恵司, 浅沼浩之
2. 発表標題 蛍光性核酸塩基導入による非環状型人工核酸プローブの開発
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiji Murayama, Ryuya Nagao, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Development of signal amplification circuit composed of acyclic artificial nucleic acids for detection of natural nucleic acids
3. 学会等名 第66回高分子学会年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keiji Murayama, Ryuya Nagao, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Acyclic artificial nucleic acid circuit for sensitive detection of RNA
3. 学会等名 The Second International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村山恵司, 長尾竜弥, 浅沼浩之
2. 発表標題 非環状型人工核酸で構成されるシグナル増幅回路の開発とRNA可視化への応用
3. 学会等名 第66回高分子討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村山恵司, 山野雄平, 浅沼浩之
2. 発表標題 光架橋型修飾核酸塩基導入による非環状型人工核酸SNAの光制御
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村山恵司, 浅沼浩之
2. 発表標題 蛍光性核酸塩基導入による非環状型人工核酸プローブの開発
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山野雄平, 村山恵司, 浅沼浩之
2. 発表標題 光応答性修飾核酸塩基の導入による機能性SNAの開発
3. 学会等名 第29回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾根務史, 村山恵司, 浅沼浩之
2. 発表標題 人工核酸SNAを用いたRNA/L-DNAシグナル変換と直交性シグナル増幅回路の構築
3. 学会等名 第169回東海高分子研究会講演会(夏期合宿)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾根務史, 村山恵司, 浅沼浩之
2. 発表標題 人工核酸SNAを利用したRNA/L-DNAシグナル変換と直交性シグナル増幅回路の構築
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuuhei Yamano, Keiji Murayama, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Functional control of serinol nucleic acid (SNA) using photo-crosslink type nucleobase: 8-pyrenylvinyladenine
3. 学会等名 2019年光化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山野雄平, 村山恵司, 浅沼浩之
2. 発表標題 8-ピレニルビニルアデニンの可逆的[2+2]光環化反応を利用した人工核酸SNAの光制御
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiji Murayama, Hiromu Kashida, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Artificial Nucleic Acids Composed of Acyclic Backbone for Fluorescent Probe and Antisense Reagent
3. 学会等名 15th Annual Meeting Of The OTS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiji Murayama, Yuuhei Yamano, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Photo-control of reversible duplex formation between SNA and RNA by [2+2] photocycloaddition of 8-pyrenylvinyl adenine
3. 学会等名 ISNAC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村山恵司, 飯塚洋平, 浅沼浩之
2. 発表標題 人工核酸L-aTNAを基にした新たな非環状型人工核酸の合成
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020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