

平成21年6月22日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年度～2008年度

課題番号：19510230

研究課題名（和文） RNAの定量的検出を目指した核酸標識試薬の開発

研究課題名（英文） Development of labeling reagents for quantitative RNA detection

研究代表者 小松 康雄（Komatsu Yasuo）

独立行政法人産業技術総合研究所・ゲノムファクトリー研究部門・研究グループ長

研究者番号：30271670

研究成果の概要：

本研究では RNA の高感度、定量検出を目的に、酸化した RNA の 3'末端に高い反応効率で一分子の標識試薬のみが結合する新規な試薬の合成を行った。この新規標識試薬は、核酸の塩基とリン酸部に高い親和性を有するように設計、合成したところ、RNA に対して高効率で反応することが明らかとなった。さらに、この化合物にビオチンを導入した化合物も合成し、RNA の検出が可能であることも明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：RNA、検出、定量、遺伝子、DNA

1. 研究開始当初の背景

近年、microRNA が多くの生物から発見され、それらが mRNA ならびにタンパク質と相互作用し、遺伝子発現の調節において重要な役割を果たしていることが示されている。そのため、microRNA をはじめとした small non-coding RNA 群と、mRNA の二つの発現プロファイルを関連付けて解析することが急務となっている。

RNA の発現解析には RNA の標識が必要であるが、これまでに用いられている RNA の標識方法は、標的 RNA 一分子中に導入される蛍光色素やビオチンの数が、その配列や酵素活性によって異なるため、配列の異なる遺伝子間では、測定値が RNA 量を直接反映していなかった (図 1)。さらに逆転写反応、転写反応、PCR などの多くのステップを解析までに行う必要があるため、結果を得るまでに時間を要し簡便性に欠けていた。また、mRNA と microRNA は密接に関連しているにも関わらず、サンプルの調製法の違いから、現在では別々に発現量が測定されていた。

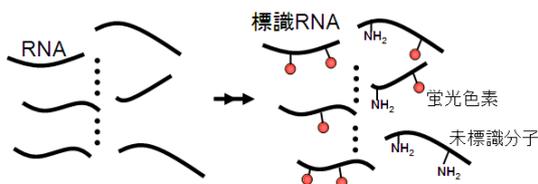


図 1

2. 研究の目的

RNA の配列に依存せず全ての RNA 分子を均一に、且つ簡便に標識する試薬を確立し、RNA の高感度、定量検出を達成することを目的に本研究を開始した (図 2)。この目的を達成するため、以下の目標を定めて研究を進めた。① RNA 一分子あたりに一定量の検出基を高効率で導入する新型試薬の基本構造の合成と反応解析、② 開発した試薬の高感度化、③ 生体サンプルを解析するための簡便な標識方法の確立。これらの目標は、既存の手法との間で性能を十分に比較しながら研究を進めることとした。

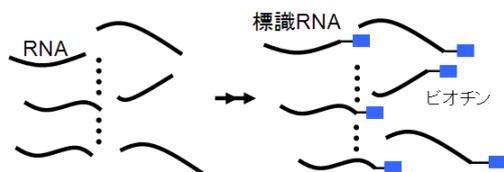


図 2

3. 研究の方法

RNA の 3'末端を過ヨウ素酸によって酸化するとアルデヒド基が生成する。本研究ではこの酸化 RNA の 3'末端に生成させたアルデヒド基に対して高い反応効率で定量的に反応する試薬の合成を目指した。アルデヒド基と反応するアミノオキシ基を試薬側の反応基に選択し、さらに試薬の RNA に対する親和性を高めるため、RNA の塩基と疎水的相互作用をする芳香族基 (ナフタレン; N)、加えて負電荷のリン酸ジエステル基に対し、静電的相互作用をするグアニジノ基(g)を併せ持った新しい低分子化合物を数種類合成した (試薬 1-Ng)。また、ナフタレン、グアニジンそれぞれの反応効率への寄与を明らかにするため、それぞれを持たない化合物 (試薬 2-N, 試薬 3-g) も合成した。はじめに有効な基本構造を明らかにするため、試薬 1~3 に関し、3'末端を過ヨウ素酸酸化させた合成 RNA に対する反応を行い、従来試薬と反応性を比較した。

続いて、最も高い反応性を示した試薬 1-Ng を検出に適した構造にするため、そのビオチン体 (試薬 1-Ng-bio) を化学合成し、合成 RNA に対する反応性を調べた。続いて、この試薬 1-Ng-bio を用い、DNA チップによる解析を行った。

4. 研究成果

(1) 合成 RNA に対する反応性の評価

5'末端がフルオレセイン標識された 18 塩基の RNA を合成し、過ヨウ素酸によって酸化させた。この RNA に対する試薬 1-Ng、試薬 2-N、試薬 3-g による標識反応をそれぞれ行い、反応産物を変性ポリアクリルアミドゲルによって分析した。反応の結果、ナフタレンおよびグアニジンの両方を分子内に有する試薬 1-Ng が最も高い反応性を示した (図 3)。また、グアニジンのみを有している試薬 3-g の方が、ナフタレンのみを有している試薬 2-N よりも高い反応性を示した。これらの結果より、①ナフタレン残基単独では試薬の反応性を増加させる効果はグアニジン残基よりも低い、②しかしながら、両者を同一分子内に有する場合には、グアニジン残基のみを有する試薬よりも高い反応性を示す、ということが明らかになった。また、1 本鎖 RNA に相補的な DNA を結合させた RNA/DNA ハイブリッド 2 本鎖の場合、RNA に対する試薬の反応性は、ナフタレン残基を有する場合に有意に増加した。

以上の結果は、核酸に試薬が接近する段階には、正電荷のグアニジンが効果的に作用し、接近後には塩基とナフタレン残基間で疎水的相互作用が効果的に働くため、二つの基の

相乗効果が試薬の反応に発揮されるということを示していると考えられている。また、2本鎖の方が1本鎖よりも効率的に標識されたことから、ナフタレンと塩基とのスタッキング効果が反応に寄与していることも示唆された。

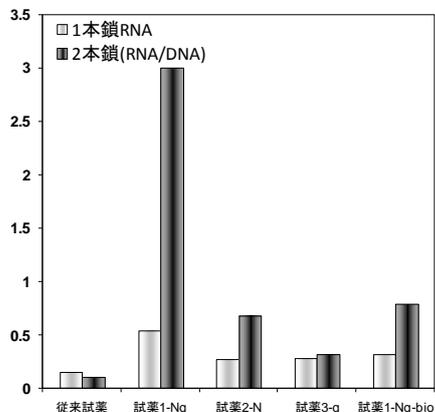


図 3

次に、最も高い反応性を示した試薬 1-Ng にビオチンを連結した化合物 (試薬 1-Ng-bio を合成し、同様に合成 RNA18 塩基に対する反応性を調べた。反応の結果、試薬 1-Ng-bio は、試薬 1-Ng よりも大きく反応性が低下した。これは、試薬 1-Ng のグアニジノ基にビオチンが導入されたことで、グアニジノ基とリン酸ジエステル結合との相互作用が阻害されたことが主要な原因として考えられる。また、導入されたビオチンの立体的嵩高さによって立体障害が生じたことも原因であると考えている。

(2) RNA 標識のプロトコルの開発

開発した試薬によって RNA を標識する場合、RNA を酸化する必要がある。しかしながら、過剰の過ヨウ素酸が反応系内に残っている場合、その後に添加する標識試薬と過剰の過ヨウ素酸が反応し、目的の RNA への標識反応が阻害される。また、カラムによる精製は RNA サンプルの量を低下させるため、過剰の過ヨウ素酸を還元して除去し、その後連続して標識試薬を添加する標識プロトコルの開発を行った。

種々の還元剤を検討した結果、過ヨウ素酸酸化後にジチオスレイトール (DTT) を添加することによって、過剰の過ヨウ素酸が還元され、続いて添加した標識試薬も酸化されずに標的 RNA に反応できることが明らかになった。この方法によって、RNA の酸化から標識までを連続して行うプロトコルが完成した。

(3) DNA チップを用いた検出

次に、25 塩基の RNA を合成し、その濃度を変えて試薬による標識反応を行い、DNA チップで検出する実験を行った。標識反応は、作成したプロトコルに従って行った。DNA チップは、標的 RNA と相補的な配列を有する 40 塩基のアミノ修飾 DNA を合成後、プラスチックプレートに固定化して作製した。

9.0×10^{-3} pmol または 3×10^{-2} pmol の RNA に対し、従来試薬と試薬 1-Ng-bio それぞれで酸化～標識反応を行い、DNA チップ上でハイブリダイゼーションさせ、Cy5 標識ストレプトアビジンで染色してその強度を測定した (図 4)。その結果、DNA チップを用いた場合でも、試薬 1-Ng-bio の方が従来の類似試薬よりも高い蛍光強度で検出できることが示された (図 4、5)。また、十分なシグナル強度が得られたことから、作成したプロトコルで問題がないことも確認できた。

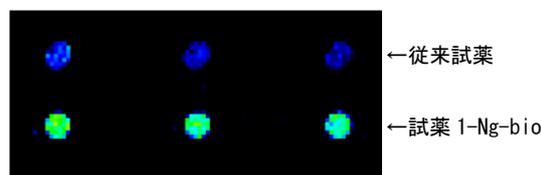


図 4 DNA チップの解析画像 (RNA 量 3×10^{-2} pmol)

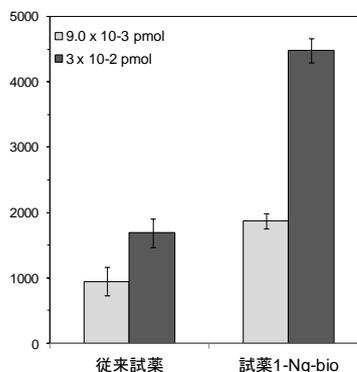


図 5 DNA チップの解析結果

以上の結果より、今回の研究において RNA の 3' 末端に高効率で反応する新規な標識試薬の開発に成功した。この標識試薬は、核酸の塩基部分と疎水的相互作用するばかりではなく、リン酸ジエステル結合部分と静電的相互作用するため、従来の試薬とは異なった反応様式を有している。本研究では、ビオチン結合体を合成し、標識された RNA の量を蛍光あるいは酵素反応によって測定できるように修飾し、実際に RNA の測定まで行った。今回の成果は、さらに反応効率の高い試薬の開発につながると考えている。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① **Kojima, N., Takebayashi, T., Mikami, A., Ohtsuka, E. and Komatsu, Y.** Efficient synthesis of oligonucleotide conjugates on solid-support using an (aminoethoxycarbonyl)aminoethyl group for 5'-terminal modification. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有り, **19**, 2009, 2144-2147.
- ② **Komatsu, Y., Kojima, N., Takebayashi, T., Mikami, A., Sugino, M. and Ohtsuka, E.** Construction of an aminoxy derivative for RNA and DNA labeling. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)*, 査読無し, **52**, 2008, 393-394.
- ③ **Kojima, N., Takebayashi, T., Mikami, A., Sugino, M., Ohtsuka, E. and Komatsu, Y.** Comparison of the chemical properties of a novel amino-linker with various amino modifications. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)*, 査読無し, **52**, 2008, 463-464.
- ④ **Hirano, Y., Nishimiya, Y., Kowata, K., Mizutani, F., Tsuda, S. and Komatsu, Y.** Construction of time-lapse scanning electrochemical microscopy with temperature control and its application to evaluate the preservation effects of antifreeze proteins on living cells. *Anal. Chem.*, 査読有り, **80**, 2008, 9349-9354.
- ⑤ **Hirano, Y., Nishimiya, Y., Matsumoto, S., Matsushita, M., Todo, S., Miura, A., Komatsu, Y. and Tsuda, S.** Hypothermic preservation effect on mammalian cells of type III antifreeze proteins from notched-fin eelpout. *Cryobiology*, 査読有り, **57**, 2008, 46-51.
- ⑥ **Komatsu, Y., Kojima, N., Sugino, M., Mikami, A., Nonaka, K., Fujinawa, Y., Sugimoto, T., Sato, K., Matsubara, K. and Ohtsuka, E.** Novel amino linkers enabling efficient labeling and convenient purification of amino-modified oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有り, **16**, 2008, 941-949.
- ⑦ **Saito, Y., Kon, S., Fujiwara, Y., Nakayama, Y., Kurotaki, D., Fukuda, N., Kimura, C., Kanayama, M., Ito, K., Diao, H., Matsui, Y., Komatsu, Y., Ohtsuka, E. and Uede, T.** Osteopontin small interfering RNA protects mice from fulminant hepatitis. *Hum. Gene Ther.*, 査読有り, **18**, 2007, 1205-1214.

[学会発表] (計 4 件)

- ① **小松 康雄**, アルデヒド含有核酸を検出す

る試薬の開発, 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 03 月 27 日, 京都国際会議場

- ② **小島 直**, 新規アミノ化試薬の開発と, 固相上でのオリゴヌクレオチド修飾反応への応用, 第 18 回アンチセンスシンポジウム, 2008 年 11 月 17 日, 岐阜大学
- ③ **小松 康雄**, Construction of an aminoxy derivative for RNA and DNA labeling.; Joint Symposium of the 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and the 35th Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2008 年 9 月 11 日, 京都大学
- ④ **小島 直**, Comparison of the chemical properties of a novel amino-linker with various amino modifications.; Joint Symposium of the 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and the 35th Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2008 年 9 月 11 日, 京都大学

[図書] (計 1 件)

小松 康雄, 講談社 (東京), 共有結合型 DNA チップの開発, 「新しい DNA チップの科学と応用」, 2007, 41-52.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 康雄 (Komatsu Yasuo)
独立行政法人産業技術総合研究所・ゲノム
ファクトリー研究部門・研究グループ長
研究者番号: 30271670

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし