

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20350074

研究課題名（和文）鎖長識別能を有する人工核酸プローブを利用した miRNA 検出法の開発

研究課題名（英文）Detection of miRNAs using artificial oligonucleotide probes capable of chain length discrimination

## 研究代表者

清尾 康志 (SEIO KOHJI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：20313356

研究成果の概要（和文）：本研究では miRNA の機能を解明しそれらの情報を疾患の診断や治療に応用するために、細胞内の成熟 RNA を迅速かつ網羅的に検出する人工オリゴヌクレオチドプローブの開発を目指し研究を行った。その結果、microarray や蛍光プローブに有用な、成熟 miRNA の鎖長と配列を精密に認識する人工核酸や蛍光核酸を計算化学的手法を用いた合理的な設計と有機合成を組合わせて開発することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Artificial oligonucleotide probes were developed for the detection of mature miRNA in living cells. The new nucleic acids derivatives such as the oligonucleotide probes having short RNA selectivity, the nucleic acid analogs capable of precise base recognition and the fluorescent nucleic acids applicable for the monitoring of the hybridization events were developed. These artificial nucleic acids are useful for the miRNA detection.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：複合化学：生体関連化学

キーワード：microRNA、鎖長識別能、短鎖 RNA 選択的結合、人工核酸、塩基識別能、蛍光核酸

## 1. 研究開始当初の背景

miRNA は生物のゲノムから転写された 21 塩基程度の RNA であり、細胞の発生、分化、癌化などの過程やウイルスの感染などに重要な役割を果たしている。

miRNA の発現機構は以下の通りである。

ゲノムより転写された 1000 塩基程度の pri-miRNA が Drosha により切断され、70-100 塩基の pre-miRNA が生成する。この pre-miRNA

は更に Dicer により切断され、21 塩基程度の成熟 miRNA が生成する。この成熟 miRNA が標的 mRNA に結合しその翻訳を制御する。

従来、生体内に存在する成熟 miRNA の量は、ゲノムから Pri-miRNA が転写される段階で主に制御されており、Pri-miRNA から Pre-miRNA および、Pre-miRNA から成熟 miRNA へのプロセッシングは迅速に進行すると考えられていた。しかし最近になって、成熟 miRNA の生

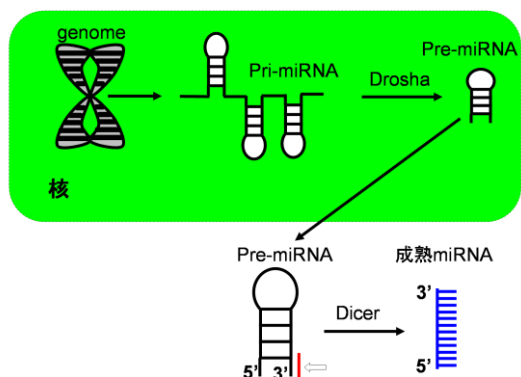
成量が Pri-miRNA から成熟 miRNA へのプロセシングの段階で制御されている例も明らかになってきた。

例えば, Obernosterer らによれば miRNA-138 の成熟体が、脳や肝臓などに特異的に発現している一方で、その前駆体 Pre-miRNA-138 は全ての臓器で均一発現している (RNA 12, 1161-1167, 2006)。また, Thomson らによればマウスの発生や細胞ガン化の過程では、Pri-miRNA から Pre-miRNA へのプロセシングの段階が制御されている。(Genes&Development 20, 2202-2207, 2006)。

また、miRNA のひとつである let7 については、そのプロセシングを制御する細胞内因子 Lin-28 も同定されそのメカニズムに興味もたれている (Viswanathan *et al.* Science, 320, 97, 2008)

このように、現在では miRNA の発現量は pri-miRNA の転写の段階だけでなく、転写に続くプロセシングの段階で制御されていると考えられている。一般的にこのような RNA プロセシングは古典的なノーザンブロットを用いて解析することは可能であるが、解析に時間や手間がかかるなどのハイスループットな検出方法としては問題がある。

従って、細胞内の miRNA 情報を迅速に解析し疾患の治療や診断に役立てるには、細胞内の Pri-miRNA や Pre-miRNA などの前駆体と、それらがプロセシングされて生成する成熟 miRNA を区別して、迅速かつ高感度で識別する新しいプローブが必要である。



## 2. 研究の目的

これらの miRNA の機能を解明しそれらの情報を疾患の診断や治療に応用するためには細胞内に存在する多数の RNA の中から成熟 RNA を迅速かつ網羅的に検出する技術の開発が必要である。そのためには、簡素な化学修飾のみで優れた成熟 miRNA 選択的に結合する、人工オリゴヌクレオチドプローブの開発と、それらを用いた信頼性の高い miRNA 検出デバイスの開発が望まれる。本研究では、これら

の着想に基づき、網羅的検出に適した microarray や一分子蛍光プローブへの利用を念頭に、成熟 miRNA の鎖長と配列を精密に認識する検出プローブを計算化学的手法を用いて合理的に設計し、有機化学的手法により合成することを計画した。

本起案研究の成果は、miRNA の迅速かつ正確な検出を可能にし、miRNA が関る疾患の治療・診断や、miRNA を利用した万能細胞の作製など幅広い分野での応用が期待される。

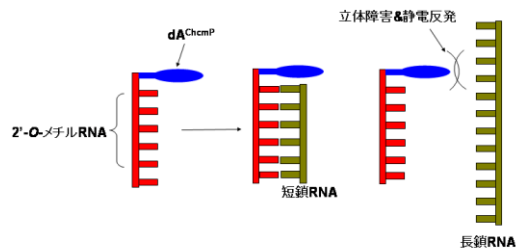
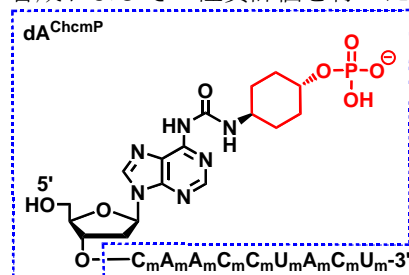
## 3. 研究の方法

### (1) 特異な塩基識別能を有する人工核酸の開発

報告者はこれまでに高精度な塩基識別能を有する人工グアニン塩基として、2-N-カルバモイルグアニン (cmG) と 2-N-アセチル-3-デアザグアノシン ( $a^2c^3G$ ) を見出している。本研究ではこれらの人工塩基を含むオリゴヌクレオチドプローブの実用的合成法の開発と、塩基識別能の詳細な検討およびその発現メカニズムを実験的および理論的に行った。また特異なミスマッチ塩基対認識能を有する 2'-O-カルバモイルウリジン誘導体の合成と性質評価を検討した。

### (2) 短鎖 RNA 選択的検出能を有する人工核酸の開発

鎖長の短い短鎖 RNA のみに結合する核酸プローブを開発するため、末端に高高く、かつ負電荷を有する修飾基をもつ、人工核酸の合成と短鎖 RNA 選択的結合能の評価を行った。具体的には、2'-デオキシアデノシンのアミノ基にシクロヘキサン環とリン酸基を有する  $dA^{ChcmP}$  の設計とそれを末端に含む 2'-O-メチル RNA の合成およびその性質評価を行った。



### (3) miRNA 検出を指向した新規蛍光核酸の開

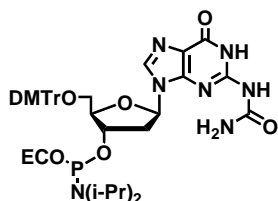
発

短鎖 RNA を選択的に検出するための蛍光核酸を目指し、蛍光核酸の分子設計と合成を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)-① cmG を含むオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) の実用的な合成法の開発と塩基識別能

cmG の実用的な合成法を目指し、既報のホスホロアミダイトユニットの構造を簡略化し、グアニン 6-0 位を保護せずにアミダイトユニットを合成する方法とそれを用いた ODN 合成を検討した。



6-O-無保護ホスホロアミダイト

6-O-無保護ホスホロアミダイトは通常のヌクレオシドユニット合成法を用いて問題なく合成することができた。

ついで、合成したホスホロアミダイトを用いた ODN 合成を検討した。その結果 6-0 を保護せずに合成を行うと、カルバモイル基の求核性が高まり、キャップ化反応に用いるアシル化剤との副反応に続き、脱カルバモイル化が進行することが分かった。この結果、cmG のホスホロアミダイトとしては 6-0 位を保護した従来型の合成ユニットが実用的であることが分かった。また、合成した ODN を用いて cmG の塩基対識別能の評価を行い、複数の配列中で天然型グアニンよりも優れた塩基識別能を示すことを明らかにした。

##### (1)-② a<sup>2</sup>c<sup>3</sup>G を含む 2'-O-メチル RNA の二重鎖形成能の計算化学的な評価

報告者の過去の研究により a<sup>2</sup>c<sup>3</sup>G を含む 2'-O-メチル RNA は相補的な RNA と高い結合能を示すことが分かっている。そこで、この現象をさらに詳しく解明するために分子動力学計算 (MD 法) と *ab initio* 量子化学計算を用いた計算化学的研究を行なった。

2'-O-methyl-5'-(C<sup>1</sup>G<sup>2</sup>C<sup>3</sup>C<sup>4</sup>X<sup>5</sup>A<sup>6</sup>G<sup>7</sup>G<sup>8</sup>A<sup>9</sup>G<sup>10</sup>)-3'/3'-r(G<sup>20</sup>C<sup>19</sup>C<sup>18</sup>G<sup>17</sup>C<sup>16</sup>U<sup>15</sup>C<sup>14</sup>C<sup>13</sup>U<sup>12</sup>C<sup>11</sup>)-5' (X = G, c<sup>3</sup>G または a<sup>2</sup>c<sup>3</sup>G) の二重鎖の分子モデルを作成し、2 ns の分子動力学計算を行なった。その構造から中央の 3 塩基対を抜き出し、水素結合、intrastrand stacking、interstrand stacking の各エネルギーを *ab initio* 法により MP2/aug-cc-pVDZ のレベルで計算した。その結果、二重鎖の安定性は X の位置に 3-デアザグアニン (c<sup>3</sup>G) をもつ場合がもっとも小さいことが予想され、これは実験的にもとめた二重鎖の安定性の順序と一致していた。

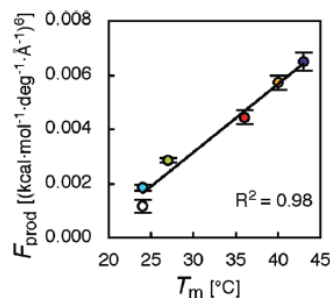
さらに詳細な検討により、c<sup>3</sup>G の二重鎖安定化能が小さい理由としては、c<sup>3</sup>G の双極子モーメントが大きく、二重鎖内で大きな双極子-双極子反発をもつためであることが示唆された。また a<sup>2</sup>c<sup>3</sup>G はアセチル基によるスタッキング面積の増加により二重鎖を安定化することが示唆された。

また、水溶液中での二重鎖の安定性を予測するために、種々の溶媒モデルを検討したところ、UAO および UAHF を用いることで実験的に得られた二重鎖の安定性を説明できることが分かった。

##### (1)-③ 核酸二重鎖の安定性の計算化学的な予測法の開発

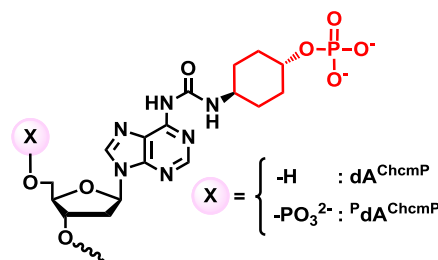
ターゲット RNA と優れた親和性を有する人工核酸を分子設計するために、MD シミュレーションを用いて、核酸二重鎖の  $T_m$  を予測する手法を開発することを検討した。

その結果、MD シミュレーションによりえられた trajectory から、塩基対間パラメーター (roll, twist, tilt, slide, shift, rise) を抽出し、変形能 (deformability:  $F_{prod}$ ) を算出したところ、実験的に測定された UV 融解温度 ( $T_m$ ) と deformability の間に線形の相関が見出され、シミュレーションで求めた deformability により  $T_m$  値を  $\pm 2^\circ\text{C}$  で予測することができた。



##### (2) 短鎖 RNA 選択的検出能を有する人工核酸の開発

下図、dA<sup>ChcmP</sup> を 2'-O-メチル RNA の末端に導入し、短鎖 RNA 結合能を評価したところ、自身よりも鎖長の長いターゲット RNA には結合せず、短い RNA とのみ結合する「短鎖 RNA 選択的結合能を有する修飾核酸」の開発に成功した。



本研究で開発した新規プローブの短鎖 RNA 選択的結合能は人工核酸 (DNA または 2' 修飾 RNA) の 5' 末端に導入した立体的に嵩高くか

つ負電荷を有する  $dA^{ChcmP}$  が、長鎖 RNA と立体的および静電的に反発することで長鎖 RNA との結合を阻害することができるためであると考えられる。

また、さらに検討を重ねた結果、上図 X で表わされる位置にリン酸基を有する  ${}^p dA^{ChcmP}$  を新たな修飾基として見出した。

すなわち 5' 末端に  ${}^p dA^{ChcmP}$  を導入した 2'-O-メチル RNA (5'- ${}^p dA^{ChcmP} C_m A_m A_m C_m C_m U_m A_m C_m U_m$ -3') と相補的な配列を有する短鎖

RNA (3'-GUUGGAUGA-5') または長鎖 RNA

(3'-AUUAUAUGUUGAU

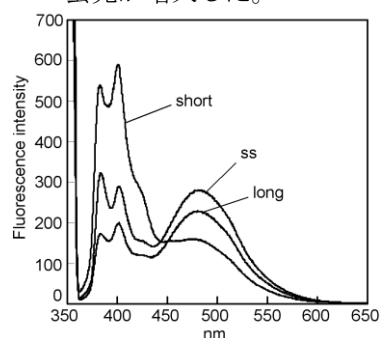
GAUGGUUA-5') に対する結合能を二重鎖解離温度  $T_m$  を測定して比較したところ、長鎖 RNA との二重鎖の融解温度が短鎖 RNA との二重鎖に比べて 10°C 以上も低下しており、この単純な化学修飾を施すだけで、成熟 miRNA 選択的検出に充分用いると期待される高い選択性が得られた。

### (3) 短鎖 RNA 選択的検出能を有する人工核酸の開発

短鎖 RNA を選択的に検出するための蛍光核酸を目指し、蛍光核酸の分子設計と合成を行い、その性質評価を行った。具体的には 6-N- (ピレンメチルカルバモイル) デオキシアデノシン ( $dA^{pymcm}$ ) やピリミドピリミドインドールヌクレオシド (PPI) の合成法とそれを導入した DNA プローブの合成およびその蛍光特性の評価を行った。

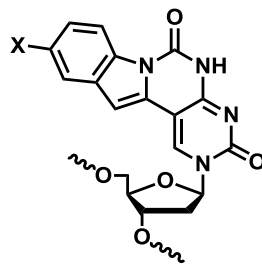
すなわち、5' 末端付近に 2 個連続して  $dA^{pymcm}$  が導入された修飾 DNA : d (CTC

[ $dA^{pymcm}$ ][ $dA^{pymcm}$ ]TATACAACCT) のピレン由来の蛍光を相補鎖 RNA の非存在下 (ss)、修飾 DNA よりも長い RNA の存在下 (long)、修飾 DNA よりも短い RNA の存在下 (short) で測定した。その結果 ss, long では 500nm 付近のピレンエキシマーのシグナルが 400nm 付近のピレンモノマーと同程度の強度をもつのに対し、short の条件ではエキシマー蛍光が弱まりモノマー蛍光が増大した。



また、これとは別に、新たに蛍光ヌクレオシド PPI を見出し、その誘導体合成および蛍光特性の評価を行い、グアニンと塩基対を形成することによる特異的な蛍光消光現象や、二重鎖形成に伴う蛍光増大など、細胞内の機能性 RNA をリアルタイムで検出する蛍光プロー

ブとして活用しうる有用な性質を見出した。



X = H, -OMe, CN, F, etc

### 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 10 件)

1. Tsunoda, H., Kudo, T., Masaki, Y., Ohkubo, A., Seio, K., Sekine, M. (2011) *Nucleic Acids Research*, **39**, 2995-3004. 査読有
2. Seio, K., Shiraishi, M., Utagawa, E., Ohkubo, A., Sekine, M. (2010) Synthesis of oligodeoxynucleotides using the oxidatively cleavable 4-methoxytritylthio (MMTrS) group for protection of the 5-hydroxyl group. *New Journal of Chemistry*, **34**, 984-992. 査読有
3. Tsunoda, H., Kudo T., Ohkubo, A., Seio, K., Sekine, M. (2010) Synthesis of oligodeoxynucleotides using fully protected deoxynucleoside 3'-phosphoramidite building blocks and base recognition of oligodeoxynucleotides incorporating N3-cyano-ethylthymine *Molecules* **15**, 7509-7531. 査読有
4. Masaki, Y., Miyasaka, R., Ohkubo, A., Seio, K., Sekine, M. (2010) Linear relationship between deformability and thermal stability of 2'-O-modified RNA hetero duplexes. *Journal of Physical Chemistry B*, **114**, 2517-2524. 査読有
5. Sasami, T., Odawara, Y., Ohkubo, A., Sekine, M., Seio, K. (2009) Synthesis of oligodeoxynucleotides incorporating 2-N-carbamoylguanine and evaluation of the hybridization properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**, 1398-1403. 査読有
6. Sasami, T., Tawarada, R., Ohkubo, A., Sekine, M., Seio, K. (2009) Computational evaluation of the stability of 2'-O-methyl-RNA/RNA duplexes incorporating

- 3-deazaguanine derivatives by ab initio calculations and a molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Structure-Theochem*, **899**, 54-60. 査読有
7. Seio, K., Takaku, Y., Miyazaki, K., Kurohagi, S., Masaki, Y., Ohkubo, A., Sekine, M. (2009) Synthesis of terminally modified oligonucleotides and their hybridization dependence on the size of the target RNAs. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **7**, 2440-2451. 査読有
  8. Mizuta, M., Seio, K., Ohkubo, A., Sekine, M. (2009) Fluorescence properties of pyrimidopyrimidoindole nucleoside dC<sup>PPI</sup> incorporated into oligodeoxynucleotides. *Journal of Physical Chemistry B*, **113**, 9562-9569. 査読有
  9. Seio, K., Tawarada, R., Sasami, T., Serizawa, M., Ise, M., Ohkubo, A., Sekine, M. (2009) Synthesis and hybridization of 2'-O-methyl-RNAs incorporating 2'-O-carbamoyluridine and unique participation of the carbamoyl group in U-G base pair. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**, 7275-7280. 査読有
  10. Seio, K., Mizuta, M., Tasaki, K., Tamaki, K., Ohkubo, A., Sekine, M. (2008) Hybridization-dependent fluorescence of oligodeoxynucleotides incorporating new pyrene-modified adenosine residues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 8287-8293. 査読有
- [学会発表] (計 29 件)
1. 清尾康志、大関弘貴、徳川宗史、角田浩佑、大窪章寛、関根光雄 蛍光シチジン誘導体(dC<sup>PPI</sup>)と2'-アミノプリンを有する二重鎖核酸の蛍光特性 第91日本化学会春季年会 平成23年3月29日 神奈川大学
  2. 清尾康志、○徳川宗史、金森功史、角田浩佑、大窪章寛、関根光雄 2'-O-カルバモイルウリジン誘導体を有する人工核酸の合成と性質 第20回アンチセンスシンポジウム 平成22年12月2日 甲南大学 ポートアイランドキャンパス
  3. Kanamori, T., Tsunoda, H., Ohkubo, A., Sekine, M., Seio, K. Development of triplex forming oligonucleotide incorporating cytosine derivative capable of selective recognition of pseudouridine in DNA duplex. 第10回国際核酸化学シンポジウム 平成22年11月10日 浜銀ホール (横浜)
  4. Tokugawa, M., Kanamori, T., Tsunoda, T., Ohkubo, A., Sekine, M., Seio, K. Synthesis and properties of oligonucleotides incorporating 2'-O-carbamoyl modifications. 第10回国際核酸化学シンポジウム 平成22年11月10日 浜銀ホール (横浜)
  5. Satoh, Y., Tsunoda, H., Ohkubo, A., Sekine, M., Seio, K. Synthesis of oligopeptide using phosphoramidite method and transacylation. 第10回国際核酸化学シンポジウム 平成22年11月10日 浜銀ホール (横浜)
  6. 清尾康志、兒玉恵里佳、黒萩早耶子、角田浩佑、大窪章寛、関根光雄 5'末端に修飾アデニンを導入したオリゴヌクレオチドの合成と短鎖RNA選択的結合能 第12回日本RNA学会年会 平成22年7月27日一橋記念講堂
  7. 正木慶昭、宮坂隆太、角田浩佑、大窪章寛、清尾康志、関根光雄 2'-O-修飾RNAにおける変形能と二重鎖融解温度の線形関係 第90日本化学会春季年会 平成22年3月29日 近畿大学
  8. 清尾康志短鎖RNAの検出を指向した新規人工核酸の開発 第90日本化学会春季年会平成22年3月27日近畿大学
  9. 清尾康志、徳川宗史、伊勢美沙子、角田浩佑、大窪章寛、関根光雄 2'位に4-アミノブチルカルバモイル基を有する人工核酸の合成と性質 第90日本化学会春季年会 平成22年3月26日近畿大学
  10. Kanamori, T., Tsunoda, H., Ohkubo, A., Sekine, M., Seio, K. Development of new DNA triplex triads by using 5-substituted deoxycytidine. 第6回国際核酸化学シンポジウム 平成21年9月28日 高山市民文化会館
  11. Seio, K., Miyazaki, K., Kurohagi, S., Masaki, Y., Tsunoda, H., Ohkubo, A., Sekine, M. Synthesis and properties of terminally modified oligonucleotides capable of short-RNA selective hybridization. 第6回国際核酸化学シンポジウム 平成21年9月28日 高山市民文化会館
  12. 清尾康志、黒萩早耶子、宮崎一也、正木慶昭、角田浩佑、大窪章寛、関根光雄 末端修飾を施したオリゴヌクレオチドの合成と短鎖RNA 選択的結合能 第11RNAミーティング平成21年7月27日 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター
  13. 清尾康志、田崎香、佐藤由理、角田浩佑、大窪章寛、関根光雄フルオレseinとピレンを含むオリゴヌクレオチドの合成と分光学的評価 日本化学会 第89春季



- 年会 平成21年3月29日 日本大学  
船橋キャンパス
14. 清尾康志, 黒萩早耶子, 宮崎一也, 正木慶昭, 角田浩佑, 大窪章寛, 関根光雄 高い末端修飾を施したオリゴヌクレオチドの合成と短鎖RNA選択的結合能 日本化学会 第89春季年会 平成21年3月29日 日本大学 船橋キャンパス
  15. 清尾康志, 宮崎一也, 黒萩早耶子, 角田浩佑, 大窪章寛, 関根光雄 末端に修飾グアニン残基を有するオリゴヌクレオチドの合成と鎖長選択的RNA結合能 日本化学会 第89春季年会 平成21年3月28日 日本大学 船橋キャンパス
  16. 清尾康志, 佐藤由理, 田崎香・大窪章寛・関根光雄 アデニンN-6位をピレンで修飾した新規DNAの合成と蛍光特性 日本化学会 第89春季年会 平成21年3月28日 日本大学 船橋キャンパス
  17. 清尾康志, 田崎香, 佐藤由理, 大窪章寛, 関根光雄 6-N-ピレニルカルバモイルアデニンを含む人工オリゴデオキシヌクレオチドの蛍光特性 第18回アンチセンスシンポジウム 平成20年11月17日 岐阜大学
  18. 佐々見武志, 小田原洋子, 大窪章寛, 関根光雄, 清尾康志 2-N-カルバモイルグアニンを含むオリゴヌクレオチドの合成における副反応の検討と塩基対形成能の評価 第18回アンチセンスシンポジウム 平成20年11月17日 岐阜大学
  19. Seio, K., Takaku, Y., Miyazaki, K., Kurohagi, S., Ohkubo, A., Sekine, M. Synthesis of oligonucleotides terminally modified by bulky and negatively charged substituents and their hybridization with RNA targets. 第35回 国際核酸化学シンポジウム 平成20年9月8日 京都大学

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：オリゴヌクレオチド誘導体  
発明者：清尾 康志 関根光雄 宮崎一也 黒萩早耶子 兒玉恵理佳  
権利者：国立大学法人東京工業大学  
種類：PCT 出願  
番号：PCT/JP2011/053373  
出願年月日：2011年2月17日  
国内外の別：外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清尾 康志 (SEIO KOHJI)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授  
研究者番号：20313356