

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05317

研究課題名(和文) SATIC法による細胞内マイクロRNAイメージング技術の開発

研究課題名(英文) Development of intracellular microRNA imaging technology using SATIC method

研究代表者

桑原 正靖 (KUWAHARA, Masayasu)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号：40334130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SATIC法における核酸増幅反応の起点となる開始複合体の形態を最近接塩基対パラメータ(nearest neighbor parameters)を用いた核酸の安定性予測に基づき種々検討し配列等を最適化した。さらに、多検体同時検出を指向して、ThTをドナーとしスチリルベンゾチアゾール(SB)をアクセプターとするFRET型蛍光プローブ(ThT-SB)を新たに設計合成し、当該核酸増幅法で生成するグアニン四重鎖(G4)の存在下で発光波長がレッドシフトすることを確認した。細胞を用いて当該核酸増幅試薬によるアッセイを行ったところ、標的RNA存在下でのみ核および細胞質からの蛍光発光を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、さまざまな疾患や生化学的プロセスの低侵襲的な診断に利用できるバイオマーカーとして、血清や血漿などの体液中のRNAが注目されており、最近では、定量PCR法を改良したアッセイ法を用いることで、感度および特異性ととも信頼性の高いRNAプロファイリングを行うことが可能となった。一方、細胞内miRNAイメージングについては今後の技術革新が期待されているところである。本開発において細胞サンプルで標的RNAが特異的に検出されたことから、既存の方法・原理と一線を画す独自の核酸増幅法による細胞内miRNAイメージングシステムの実効可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The form of the initiation complex that is the starting point of the nucleic acid amplification reaction in the SATIC method was examined in various ways based on the prediction of nucleic acid stability using nearest neighbor parameters, and thereby, the sequences were optimized. Furthermore, aiming at simultaneous detection of multiple samples, a FRET type fluorescent probe (ThT-SB) was newly designed and synthesized with ThT as the donor and styrylbenzothiazole (SB) as the acceptor. Then, it was confirmed that the emission wavelength was red-shifted in the presence of guanine quadruplex (G4) generated by the nucleic acid amplification method. When assays were performed using cells with the nucleic acid amplification reagents, fluorescence emission from the nucleus and cytoplasm was confirmed only in the presence of target RNA.

研究分野：バイオ分析化学

キーワード：miRNA バイオマーカー イメージング 等温遺伝子増幅法 グアニン四重鎖

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物や植物の細胞において、20 残基程度のオリゴヌクレオチドで構成されるマイクロ RNA (miRNA) は、一種の小さな非タンパク質コード化リボ核酸である。それらはヒトの癌を含むさまざまな病状で重要な役割を果たすことが知られている。さまざまな癌細胞に存在する miRNA は、癌の診断と治療に関する豊富な情報を提供する上で関連するバイオマーカーとなる。そのため、生細胞における腫瘍関連 miRNA の発現レベルを分析することは、腫瘍増殖における細胞分裂と miRNA の相乗的調節メカニズムを理解するのに大いに役立つと期待される。これまでに miRNA の検出に、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) やマイクロアイ技術を適用する方法が報告されている。しかし、それらは、測定原理上、細胞活動の破壊と面倒なステップをめぐり課題に直面する。これを回避するために、近年、細胞を直接観察する方法である細胞内 miRNA イメージング技術の開発が種々検討されている。しかし、依然として、感度や正確性、操作の煩雑さ等の点において大きな課題が残っている。SATIC 法は、高い感度 (反応液あたり mRNA では 1 aM 程度, miRNA では 0.1 fM 程度) を有する核酸増幅法であり、操作も簡便であるため、本法の原理を応用した細胞イメージング技術を開発することで、これらの課題を克服できる可能性がある。

2. 研究の目的

検出反応が 1 ステップ・等温下でなされ実施当該核酸増幅法に基づく細胞内 miRNA のイメージング技術を創出し、その性能の実用可能性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

miRNA は短鎖であるため、増幅反応における開始複体の形態は、miRNA 標的と環状 DNA (cT₁) のハイブリダイゼーションによる反応開始 (図 1a) と、miRNA 標的、環状 DNA (cT₁) およびキャプチャー鎖の三者複合体形成による反応開始 (図 1b) とがある。いずれの場合も、miRNA 標的はプライマー鎖として働くので、miRNA は反応開始の三者複合体形成において mRNA のようにターンオーバーしない。

これまでの研究で、蛍光顕微鏡 (キーエンス・BZ-X700) 下において約 0.1 fM の検出感度を達成しているが、これは夾雑物のない緩衝液中の結果であるため、本研究では細胞抽出液等を用いて、検出系の最適化および改良を行う。最適化を図るため、これらについてデタージェントの添加やオリゴ核酸への化学修飾、環状 DNA の配列設計、チオフラビン T 誘導体等の蛍光色素等を検討する。また、複数種の標的 RNA の同時検出のために、ThT 誘導体/グアニン四重鎖 (青色蛍光) を色素/色素結合性 DNA アプタマーに代えた系の構築等の検討を行うこととした。

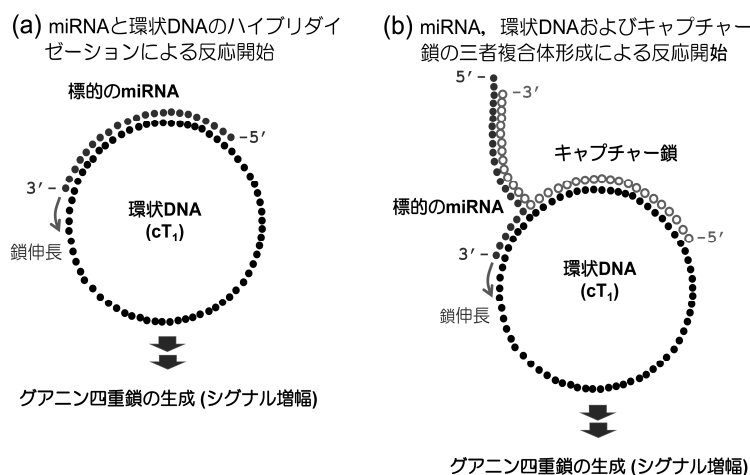


図 1 miRNA の検出における増幅反応の開始複体の形態

4. 研究成果

本研究で実施した標的イメージングの例を図 2 に示した。実験では、まず HeLa 細胞(JCRB9004) を培養後、細胞数が 6.6×10^3 となるように播いた 96 穴ウェルプレート上でホルムアルデヒドやメタノールを用いてそれぞれ固定し、透過処理を行った後、4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) で核を染色したものをを用いた。この細胞に標的となるプライマー鎖、環状テンプレート、キャプチャー鎖を添加したもの (図 2a) について、標的由来の核酸増幅反応の進行を 37 °C でインキュベートしながら 1 時間毎に顕微鏡観察を行ったところ、1 時間後に核酸増幅反応が起こったことを示す ThT-HE 由来の蛍光発光を確認した。次いで、3 時間後に反応液を除去し、バッファー置換して観察したところ、核酸増幅反応が進行したことによる核および細胞質からの蛍光発光が確認された。なお、負の対照実験 (ネガティブコントロール) の反応液として、プライマー鎖、環状テンプレート、キャプチャー鎖のうち、キャプチャー鎖が三者開始複体を組まない配列のものを 2 種類 (図 2bc)、キャプチャー鎖を含まないもの (図 2d)、プライマー鎖を含まないもの (図 2e)、キャプチャー鎖もプライマー鎖も含まないもの (図 2f) を用いた。これら 5 つのネガ

タイプコントロールでは 3 時間経っても蛍光は観察されなかった。このように、外部から導入した標的に対して細胞中で当該核酸増幅反応が生じることが実証された。ただし、内在性の標的を検出することはできなかった。

複数標的の同時検出に用いるために、ThT をドナーとしスチリルベンゾチアゾール(SB)をアクセプターとする蛍光体(リンカー長の異なる 2 つの誘導体 ; ThT-SB および ThTp11-SB)を新たに設計した(スキーム 1)。ThT-SB は、ドナー部位である N^3 位アミノエチルThT(ThT-AE)を、原料である 2-アミノ-6-メチルベンゾチアゾールから 10 段階の反応により合成し、それとアクセプター部位である SB 誘導体(カルボン酸体)をアミドカップリングすることで得ることができた。G4 存在下における発光波長の長波長化を検証したところ、励起波長 430nm で最大蛍光波長は 600nm(橙)を示した。一方、ThT は励起波長 430nm で最大蛍光波長は 480nm(青)であることから、当該分子設計により約 120 nm の長波長化を実現することができた(図 3)。合成した ThT-SB と ThTp11-SB を比較すると、同濃度において前者の方が、蛍光強度が高いことが分かった。しかし、リンカー鎖中に水溶性のエチレングリコール鎖を含む後者に比べ水溶性に劣るため、測定の際には 3% DMSO 溶液を要した。この他に、エチレンジアミン四酢酸とコンジュゲート化した ThT 誘導体や当該核酸増幅系の電界効果トランジスタ(FET)バイオセンサへの応用(共同研究)等についても学会発表や論文発表を通して報告した。

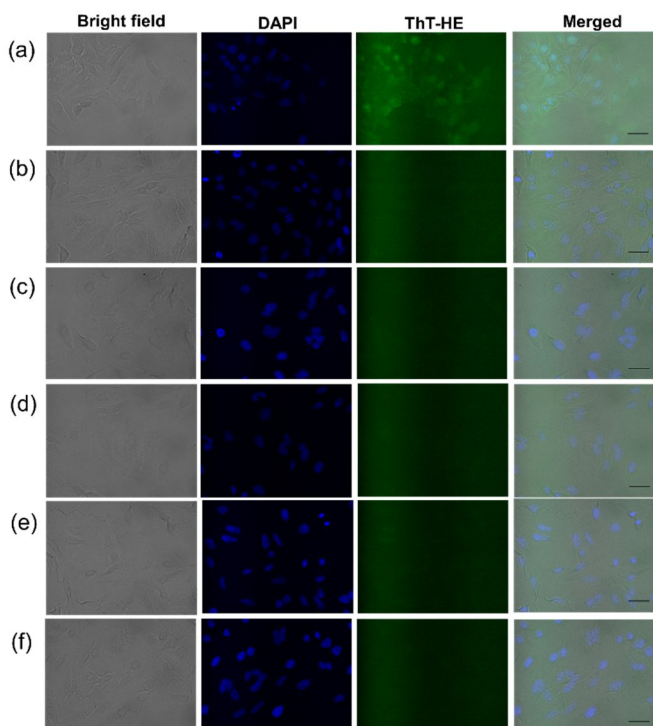


図 2 細胞を用いた標的イメージングの例

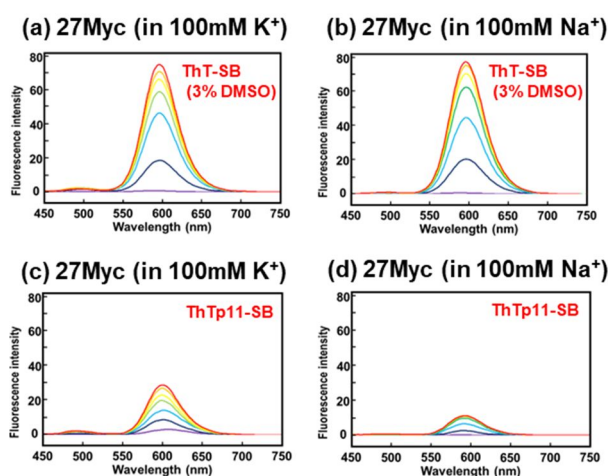
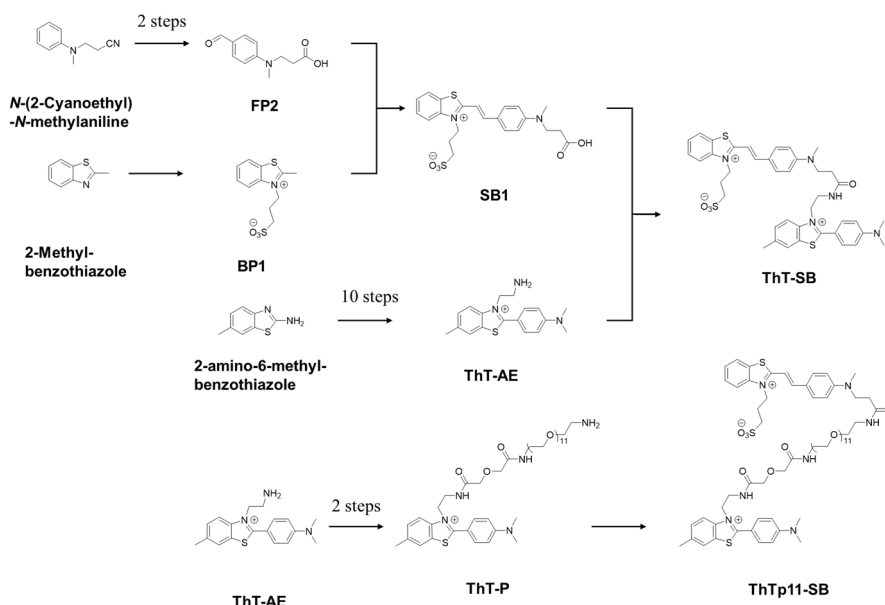


図 3 ThT 誘導体の蛍光スペクトル



スキーム 1 ThT-SB および ThTp11-SB の合成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wariishi Tomoko, Kataoka Yuka, Nakamura Tomoaki, Kasahara Yuuya, Kuroda Masataka, Obika Satoshi, Kuwahara Masayasu	4. 巻 690
2. 論文標題 Lantern-type G-quadruplex fluorescent sensors for detecting divalent metal ions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 115525 ~ 115525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2024.115525	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 Hayashi Hiroki, Enami Akihiro, Fujita Hiroto, Kuroiwa Shigeki, Ohashi Keishi, Kuwahara Masayasu, Osaka Tetsuya, Momma Toshiyuki	4. 巻 273
2. 論文標題 Field-effect transistor biosensor with signal amplification by ternary initiation complexes for detection of wide-range RNA concentration	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 125846 ~ 125846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2024.125846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 割石智子, 片岡由佳, 藤田博仁, 笠原勇矢, 小比賀聡, 桑原正靖
2. 発表標題 チオフラビンT誘導体 / グアニン四重鎖複合体の多価金属イオンに対する蛍光特性評価
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会(2024)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 白鳥悠香, 中村友昭, 割石智子, 片岡由佳, 桑原正靖
2. 発表標題 グアニン四重鎖 / チオフラビンT誘導体の複合体形成におけるグアニジノ基の導入効果
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会(2024)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 片岡由佳, 久保千尋, 割石智子, 藤田博仁, 桑原正靖
2. 発表標題 Ab initio DNA合成における効率的増幅の検討
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会(2024)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 割石智子, 片岡由佳, 藤田博仁, 笠原勇矢, 小比賀聡, 桑原正靖
2. 発表標題 チオフラビンT誘導体を用いた2価金属イオンの検出
3. 学会等名 日本分析化学会第72年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuka Kataoka, Chihiro Kubo, Tomoko Wariishi, Hiroto Fujita, Masayasu Kuwahara
2. 発表標題 Investigation of important factor for efficient amplification by ab initio DNA synthesis
3. 学会等名 The 50th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村友昭, 熊谷俊輔, 割石智子, 片岡由佳, 桑原正靖
2. 発表標題 Forster共鳴エネルギー移動によるチオフラビンT発光の長波長化の検討
3. 学会等名 日本化学会第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久保 千尋, 藤田 博仁, 桑原正靖
2. 発表標題 Detection systems that start with the ternary initiation complex formation
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会 (2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masayasu Kuwahara
2. 発表標題 Detection systems that start with the ternary initiation complex formation Detection systems that start with the ternary initiation complex formation
3. 学会等名 FIBER International Summit for Nucleic Acids 2022 (FISNA2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原正靖
2. 発表標題 新規バイオマーカー検出法 (SATIC 法) の開発と今後
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田博仁, 田村美雪, 桑原正靖
2. 発表標題 等温遺伝子増幅法におけるマルチプレックス検出に向けたグアニン四重鎖結合性蛍光色素の検討
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 (2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村美雪, 藤田博仁, 桑原正靖
2. 発表標題 マラカイトグリーン結合性DNAアプタマーのセレクションおよび蛍光特性評価
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 (2022)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiroyuki Fujita, Masayasu Kuwahara	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 18
3. 書名 Detection systems using the ternary complex formation of nucleic acids (Handbook of chemical biology of nucleic acids)	

〔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
研究分担者	藤田 博仁 (FUJITA Hiroyuki) (60822244)	日本大学・文理学部・助手 (32665)	令和3年度～4年度
研究分担者	片岡 由佳 (KATAOKA Yuka) (20978796)	日本大学・文理学部・助手 (32665)	令和5年度

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------