

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350077

研究課題名(和文)短鎖RNA選択的結合能を有する人工核酸の特性を活用したmiRNA検出法の開発

研究課題名(英文)Development of miRNA detection techniques using artificial nucleic acids capable of short RNA selective binding

研究代表者

清尾 康志(Seio, Kohji)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：20313356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円、(間接経費) 3,780,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では独自に開発した人工核酸の特性を活用した新しいmiRNA検出技術の開発を、有機合成化学と核酸検出技術を融合して開発した。まず、既に関連していた人工核酸dAChcmPNAの短鎖RNA選択的結合能をさらに高めるために化学構造を改変した第二世代の修飾核酸の開発を行い新規RT-PCR法への応用を目指した研究を行った。

また、蛍光残基で修飾した人工核酸の合成法の開発と蛍光特性の評価を行い、短鎖RNAの蛍光イメージングプローブとしての開発を目指した研究を行った。さらにはdAChcmPNAをスライドガラスに固定化した短鎖RNA選択的microarrayを開発するための基礎技術の開発を検討した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we developed new techniques for miRNA detection by using organic chemistry and nucleic acid detection platforms. We tried to improve the properties of an artificial nucleic acid, dAChcmPNA, by the chemical modification. We also evaluated the usefulness of the new artificial nucleic acid as the primers for RT-PCR. We also developed new fluorescent nucleic acids as the fluorescent probes for miRNA detection. Finally, we tried to apply these new artificial nucleic acids for miRNA detection techniques such as DNA microarray.

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：miRNA 人工核酸 核酸プローブ 有機化学

1. 研究開始当初の背景

miRNA は 22 塩基程度の内在性 RNA であり、発生・分化・癌化などにおいて重要な役割を果たしている。まず、ゲノムから転写された pri-miRNA が Drosha により切断され 70-100 塩基の pre-miRNA が生成する。これが更に Dicer により切断され、19-23 塩基程度の成熟 miRNA が生成する。

近年、この成熟 miRNA が生成するプロセシングの過程が多くの場合で制御されていることが明らかになってきた。例えば、成熟 miRNA-138 は脳・肝臓特異的に存在する一方で、pre-miRNA-138 は全ての臓器で発現している。つまり、細胞内の miRNA 情報を疾患の治療や診断に役立てるには、細胞質の pre-miRNA などの前駆体と、それらがプロセシングされた成熟 miRNA を区別して鎖長の短い成熟 miRNA だけを迅速・高精度に識別する分子プローブが必要である。

このような分子プローブを開発するために、起案者は平成 22 年度までに、オリゴヌクレオチドの 5'-末端の 1 塩基を dA^{ChcmP} (化学構造は 3. 研究の方法を参照) で化学修飾するだけで、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 dA^{ChcmP} 修飾核酸 ($dA^{ChcmP}NA$)」の開発に成功した。

人工核酸の 5'末端に導入した立体的に嵩高かつ負電荷を有する dA^{ChcmP} は、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。実際に 5'末端に dA^{ChcmP} を導入した 2'-O-メチル RNA と相補的な配列を有する短 RNA または長鎖 RNA 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 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ていた。

2. 研究の目的

本研究では平成 22 年度までに得られていた $dA^{ChcmP}NA$ の特性を最大限活用した新しい miRNA 検出技術の開発と $dA^{ChcmP}NA$ の更なる短鎖 RNA 選択的結合能の向上を、有機合成化学と microarray、蛍光核酸などの核酸検出技術を融合して開発することを計画した。

研究項目 1 ではこれまでの研究で明らかになった $dA^{ChcmP}NA$ の短鎖 RNA 選択的結合能をさらに高めるために dA^{ChcmP} の化学構造を改変した第二世代の修飾核酸の開発を行い、新規プローブの開発と新規 RT-PCR 法への応用を目的とした。

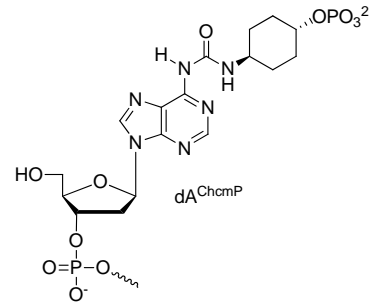
研究項目 2 では蛍光残基で修飾した人工核酸プローブの合成法の開発と蛍光特性の評価を行い、短鎖 RNA の蛍光イメージングプローブとしての開発を目的とした。

研究項目 3 では $dA^{ChcmP}NA$ をスライドグラ

スに固定化した短鎖 RNA 選択的 microarray を開発するための基礎技術の開発を検討した。特にプローブとしての $dA^{ChcmP}NA$ の性能を最大限引き出すための新しいサンプル RNA の末端標識試薬を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではこれまでに実施していた人工核酸 dA^{ChcmP} の成果をもとに下記、研究項目 1 ~ 研究項目 3 を実施した。



研究項目 1 においては、核酸塩基部の配向、糖-リン酸骨格、修飾基の配向などのコンホメーションを固定した新規ヌクレオシドの開発を検討した。さらに合成したヌクレシドを導入したオリゴヌクレオチドの合成とそれらの miRNA 選択的結合能について評価した。また、合成したオリゴヌクレオチドを用いた新規 RT-PCR 法についても検討した。

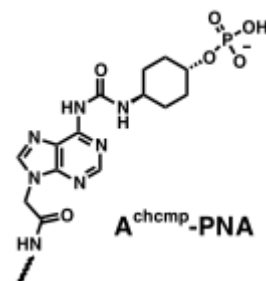
研究項目 2 においては、ターゲット RNA と二重鎖を形成した時のみ蛍光を発する蛍光核酸の開発を検討し、生体由来 RNA の検出や標本組織での in situ hybridization や細胞イメージングによる miRNA 検出を目指し、それらの合成法と蛍光特性の評価を実施した。

研究項目 3 においては、サンプル RNA に対し蛍光残基を酵素的に連結し標識するための新規蛍光導入試薬の設計および合成法の開発を行った。また、新規蛍光導入試薬を用いた RNA のラベル化法の確立ならびに、ラベル化した RNA と $dA^{ChcmP}NA$ との結合能の評価を行った。

4. 研究成果

研究項目 1
 dA^{ChcmP} を有するペプチド核酸 (PNA) の合成と性質評価

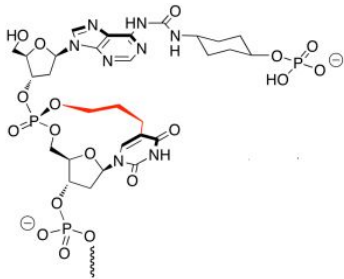
dA^{ChcmP} を有するペプチド核酸 (A^{ChcmP} -PNA) の合成法を確立しその RNA 結合能について調べた。



PNA の N 末端への A^{ChemP} の導入法を検討した結果、固相担体上での PNA のリン酸化条件を新たに最適化することによって、A^{ChemP} を有する PNA の効率的な合成に成功した。また、合成した PNA を用いて標的 RNA との二重鎖形成能および標的 RNA の 3' 末端における鎖長多様性を識別する能力を UV-熱融解温度を測定して調べたところ、A^{ChemP} を有する PNA はその骨格が柔軟なため、RNA の鎖長多様性を識別する能力が先行研究により報告された A^{ChemP} を 5' 末端に有する DNA より低下した。この結果から、A^{ChemP} を有する人工核酸が RNA 鎖長多様性を識別する能力を確保するには、核酸バックボーンの骨格を固定化することが重要であることが示唆された。

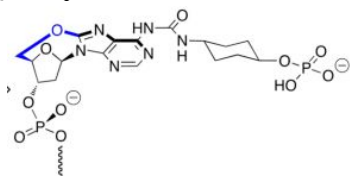
5'末端のリン酸バックボーンを固定化しオリゴヌクレオチドの合成と性質評価

A^{ChemP} を塩基部にもつデオキシヌクレオチド以下 dA^{ChemP} 残基の 3' 側のリン酸基と下流のデオキシウリジン残基の塩基部 5 位をプロピレンリンカーによって架橋した下図化合物（以下 dA^{ChemP}c3dU）の設計と合成を実施した。



また、dA^{ChemP}c3dU を 5' 末端に導入したオリゴデオキシヌクレオチドを合成し、標的 RNA の 3' 末端の鎖長多様性を識別する能力を UV-熱融解温度の測定および RNA の逆転写反応により調べた。その結果、5' 末端に dA^{ChemP}c3dU を有するプライマーよりも、先行研究で報告されている架橋をもたない dA^{ChemP} を有するプライマーの方が優れていることが分かった。この結果に基づいて dA^{ChemP} 残基の 3' 側のリン酸骨格のコンホメーション特性が標的 RNA の 3' 末端の鎖長多様性を識別する能力に影響することが分かった。

5'末端の塩基部配向を固定化したオリゴヌクレオチドの合成と性質」では、dA^{ChemP} の塩基の配向を anti に固定した下記誘導体（以下 8odA^{ChemP}）を 5' 末端に有するオリゴデオキシヌクレオチドの合成と性質について検討した。



オリゴデオキシヌクレオチドに導入した dA^{ChemP} の塩基部を anti 配向に固定化しシク

ロヘキシルリン酸残基の動きを制限すると、オリゴデオキシヌクレオチドが標的 RNA の 3' 末端の鎖長多様性を識別する能力が向上すると考え、糖部 5' 水酸基とアデニン環 8 位をエーテルで架橋した 8odA^{ChemP} を有するオリゴデオキシヌクレオチドを設計し合成した。また合成したオリゴデオキシヌクレオチドを逆転写反応のプライマーとして用いた逆転写反応を行い、予想に反して 8odA^{ChemP} を有するプライマーよりも先行研究で報告されている架橋をもたない dA^{ChemP} を有するプライマーの方が優れていることを明らかにした。この結果標的 RNA の 3' 末端の鎖長多様性を識別する修飾基として架橋をもたない dA^{ChemP} が最も優れていることが明らかになった。

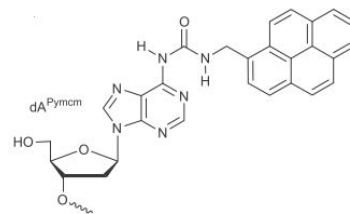
5'末端に dA^{ChemP} を有する DNA プライマーの逆転写 PCR 法への応用

dA^{ChemP} を 5' 末端に有するプライマーを用いた新しい逆転写 PCR 法を開発し、miRNA 検出のモデル実験を行った。上記 ~ で得られた結果に基づいて、最も性能が優れていると考えられる架橋構造をもたない dA^{ChemP} を有するオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして選択し、逆転写 PCR 法に応用した。その結果、標的 miRNA よりも 1 塩基長いもしくは短い isomiR よりも標的 miRNA が有意に速く増幅されることを明らかにし、従来用いられていたヘアピン型プライマーを用いた逆転写 PCR 法ではなしえなかった miRNA と isomiR の識別に成功した。

研究項目 2

塩基部をピレン残基で修飾した蛍光核酸の高次構造選択的蛍光特性

アデノシンのアミノ位をピレン基で修飾した 6-N-(ピレニルメチルカルバモイル)デオキシアデノシン (dA^{Pymcm}) を 5' 末端に導入したオリゴデオキシヌクレオチドを合成しその、標的 DNA および標的 RNA との結合能および標的と結合した際の蛍光特性について評価した。

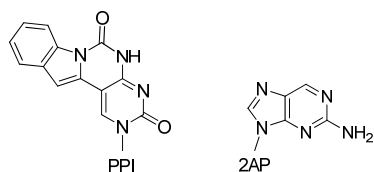


その結果、合成したオリゴデオキシヌクレオチドは標的 RNA が存在した時のみ、ピレン残基が重なりあった際に特異的に発せられるエキシマ - 発光を示すことが分かった。このエキシマ - 発光を示す理由を詳細に検討したところ、オリゴデオキシヌクレオチド中のグアニンリッチな配列がこのエキシマ - 発光に必須であることが分かった。また、質量分析および超遠心分析法を用いてオリゴデオキシヌクレオチドと標的 RNA との複合体の構造を調べたところ、オリゴデオキシヌ

クレオチドと標的 RNA の二重鎖がさらに 4 分子会合した核酸 8 重鎖構造が形成していることが示唆された。構造化学的な考察からはオリゴデオキシヌクレオチド中のグアニンリッチな配列がグアニン四重鎖を形成することで、この会合体が安定化されていることが示唆された。この現象は RNA 特異的に蛍光を発する新規核酸プローブの設計において有用な知見となりうると期待される。

蛍光シトシン誘導体と蛍光アデニン誘導体で二重に蛍光標識された蛍光核酸の合成と性質

蛍光シトシン誘導体の一種ピリミドピリミドインドール (PPI) と蛍光アデニン誘導体の一種 2-アミノプリン (2AP) を同時にオリゴヌクレオチドに導入することにより、二重に蛍光標識された蛍光核酸を合成し、その蛍光特性を評価した。



PPI および 2AP は 300 nm の光を照射することにより、それぞれ 500 nm 付近および 370 nm 付近に蛍光を発することが分かった。また、これらの蛍光塩基がオリゴヌクレオチドに導入した場合においても、それぞれの蛍光を完全に分離して観測することが可能であった。

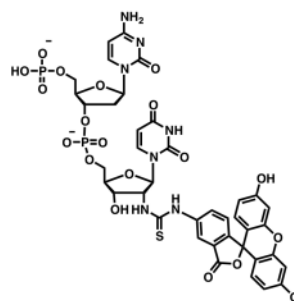
さらに、PPI と 2AP の両方を含むオリゴヌクレオチドに対し、相補的な配列をもつ核酸を結合させ、その蛍光特性を調べたところ、PPI、2AP から発せられる蛍光はお互いに影響しあうことなく、PPI が相補的核酸と塩基対を形成した場合には PPI の蛍光強度のみが増加し、2AP が相補的核酸と塩基対を形成した場合には 2AP の蛍光強度のみが増加することが分かった。

これらの結果は PPI と 2AP を導入した人工核酸を用いることで、二種類の標的核酸の有無を同時に検出することの可能な蛍光プローブの開発が可能であることを示しており、RNA を標的にした蛍光核酸プローブの設計において有用な知見となりうる。

研究項目 3

RNA 酵素的に蛍光標識するための新規蛍光導入試薬の開発

蛍光導入試薬として、下記シチジル(3',5') 2'-アミノウリジンのアミノ基にフルオレセニルイソチオシアネート (FITC) を導入した化合物を設計し合成を検討した。



初めに、2'-アミノウリジン誘導体の合成を検討し、2,2'-シクロウリジンに対しマイクロウェーブを用いてフタルイミドを反応させることで、短工程でかつ爆発性のアジ化ナトリウムなどを用いることなく、2'-アミノウリジン誘導体を合成する方法を見出した。続いて、得られた 2'-アミノウリジンを適切に保護した後、2'-デオキシシチジンホスホロアミダイトと反応することで、アミノ化したヌクレオチド二量体を合成した。さらにこのものに FITC を用いて蛍光基を導入した。

さらに、蛍光標識化のために、FITC 化したヌクレオチドと標的 miRNA とを T4-RNA リガーゼを用いて結合する反応を miRNA のモデル分子である化学合成した 8 量体 RNA を用いて検討し、反応効率の良く連結する条件をみいだした。さらに得られた FITC が導入された RNA と DNA、PNA プローブとの二重鎖形成能を評価した。FITC 基を修飾された RNA と PNA との二重鎖の安定性は二重鎖融解温度の結果から天然型 RNA との二重鎖とほぼ同等であることがわかった。この結果から、今回開発した RNA ラベル化法は miRNA の蛍光標識化に有用であることが示唆された。

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 5 件)

Iijima, Y.; Kojima, S.; Kodama, E.; Kurohagi, S.; Kanamori, T.; Masaki, Y.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. Modified oligodeoxynucleotide primers for reverse transcription of target RNAs that can discriminate among length variants at the 3'-terminus. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 8276-8282. (査読有り) doi: 10.1039/c3ob41901k

Seio, K.; Tokugawa, M.; Tsunoda, H.; Ohkubo, A.; Arisaka, F.; Sekine, M. Assembly of pyrene-modified DNA/RNA duplexes incorporating a G-rich single strand region. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 6822-6824. (査読有り) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.10.012>

Seio, K.; Kanamori, T.; Tokugawa, M.; Ohzeki, H.; Masaki, Y.; Tsunoda, H.;

Ohkubo, A.; Sekine, M. Fluorescent properties of oligonucleotides doubly modified with an indole-fused cytosine analog and 2-aminopurine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3197-3201. (査読有り)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.034>
Seio, K.; Kurohagi, S.; Kodama, E.; Masaki, Y.; Tsunoda, H.; Ohkubo, A.; Sekine, M. Short-RNA selective binding of oligonucleotides modified using adenosine and guanosine derivatives that possess cyclohexyl phosphates as substituents. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 994-1006. (査読有り) doi: 10.1039/c1ob06580g

Seio, K.; Tokugawa, M.; Kanamori, T.; Tsunoda, H.; Ohkubo, A.; Sekine, M. Synthesis and properties of cationic 2'-O-[N-(4-aminobutyl)carbamoyl]modified oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2470-2473. (査読有り) doi:10.1016/j.bmcl.2012.02.012

[学会発表](計 14 件)

吉岡美樹, 飯島良紘, 金森功史, 正木慶昭, 大窪章寛, 関根光雄, 清尾康志 miRNA 検出を指向したアミノ化 RNA 及びペプチド核酸プロープの合成。第 15 回日本 RNA 学会年会 平成 25 年 7/24-7/26 (愛媛県・県民文化会館ひめぎんホール)

Yoshihiro Iijima, Sayako Kurohagi, Erika Kodama, Shun Kojima, Takashi Kanamori, Yoshiaki Masaki, Akihiro Ohkubo, Mitsuo Sekine, Kohji Seio Synthesis of oligodeoxynucleotides incorporating conformational restriction at the 5'-terminus. 第 40 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2012) 平成 25 年 11/13-11/15 (神奈川大学)

飯島良紘, 針山智, 岡本到, 金森功史, 正木慶昭, 大窪章寛, 関根光雄, 清尾康志 4-(ジメチルアミノ)ナフタレン-1-ボロン酸で修飾したヌクレオシド誘導体の合成。日本化学会第 94 春季年会 平成 26 年 3/27-3/30 (名古屋大学 東山キャンパス)

Kohji Seio, Hiroki Ohzeki, Takashi Kanamori, Akihiro Ohkubo, Mitsuo Sekine Synthesis and properties of fluorescent oligonucleotides doubly labeled by 2-AP and PPI. Fluorescent Biomolecules and their Building Blocks – Design and Applications (FB3) 2013/7/5-7/8 (Chalmers University of Technology in Goteborg, Sweden)

飯島良紘, 兒玉恵里佳, 黒萩早耶子, 金森功史, 角田浩佑, 大窪章寛, 関根光雄, 清尾康志 5'末端修飾と架橋されたリン酸バックボーンを有する オリゴヌクレ

オチドの合成とその miRNA 検出への応用。第 14 回日本 RNA 学会年会 平成 24 年 7/18-7/20 (東北大学百周年記念会館・川内萩ホール)

Yoshihiro Iijima, Sayako Kurohagi, Takashi Kanamori, Hirosuke Tsunoda, Akihiro Ohkubo, Mitsuo Sekine, Kohji Seio Development of backbone fixed and terminally modified oligonucleotides capable of short RNA selective binding. XX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucoic Acids 2012/8/5-8/9 (Montreal, Canada)

Shun Kojima, Erika Kodama, Sayako Kurohagi, Takashi Kanamori, Yoshiaki Masaki, Akihiro Ohkubo, Mitsuo Sekine, Kohji Seio, Yoshihiro Iijima Synthesis of Terminally Modified Oligonucleotides for Discrimination of miRNA Length Variants. microRNA: Targets and Tools for Therapeutic Development 2013/3/3-3/6 (Boston Marriott, Cambridge)

小島駿, 飯島良紘, 黒萩早耶子, 金森功史, 大窪章寛, 関根光雄, 清尾康志 塩基部の配向を固定した修飾核酸の合成と短鎖 RNA 選択的結合能。第 93 日本化学会春季年会 平成 25 年 3/22-3/25 (立命館大学・びわこ、くさつキャンパス) 徳川宗史, 角田浩佑, 大窪章寛, 関根光雄, 清尾康志 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 21 回アンチセンスシンポジウム 平成 23 年 9/1-9/2 (大阪大学・コンベンションセンター)

Munefumi Tokugawa, Kaori Tasaki, Hirosuke Tsunoda, Akihiro Ohkubo, Mitsuo Sekine, Kohji Seio Self-assembly of Pyrene-Modified DNA-RNA Duplexes by RNA G-quadruplex Formation. 第 38 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2011) 平成 23 年 9/9-9/11 (北海道大学・クラーク会館)

Kohji Seio, Munefumi Tokugawa, Hiroki Ohzeki, Hirosuke Tsunoda, Akihiro Ohkubo, Mitsuo Sekine Synthesis and property of oligodeoxynucleotides doubly modified with fluorescent 2-aminopurine and a fused cytosine analog. 第 38 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2011) 平成 23 年 9/9-9/11 (北海道大学・クラーク会館) 徳川宗史, 角田浩佑, 大窪章寛, 関根光雄, 清尾康志 2'-O-カルバモイルウリジン誘導体の化学合成と酵素耐性。第 1 回 CSJ 化学フェスタ 平成 23 年 11/13-11/15 (早稲田大学・大隈記念講堂、小野梓記念館)

飯島良紘, 吉岡美樹, 角田浩佑, 大窪章寛, 関根光雄, 清尾康志 3'末端をアミノ化した RNA の新規合成法および二重鎖形成能。第 92 日本化学会春季年会

平成 24 年 3/25-3/28 (慶応大学・日吉
キャンパス、矢上キャンパス)
飯島良紘, 角田浩佑, 大窪章寛, 関根光
雄, 清尾康志 5' 末端修飾と架橋された
リン酸バックボーンを有するオリゴヌ
クレオチドの合成と短鎖 RNA 選択的結
合能。第 92 日本化学会春季年会 平成
24 年 3/25-3/28 (慶応大学・日吉キャン
パス、矢上キャンパス)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清尾 康志 (SE10, 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