

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659047

研究課題名(和文)RNA中のピンポイント酸化損傷に基づく疾患の新規診断法、治療法の創製研究

研究課題名(英文)Development of the recognition molecule for 8-oxo-rG in RNA

研究代表者

谷口 陽祐 (TANIGUCHI, YOSUKE)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00452714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ストレスなどによる核酸の損傷に基づく疾患の新規診断法、治療薬の創製に向けて、これまでに未達成な1本鎖RNA中のグアニン(G)の酸化損傷塩基である8-オキソグアニン(8-oxoG)の配列特異的検出法を開発を目的とした。研究期間内に、RNA型8-oxoGの新しい合成法を見だし、また、人工的に合成した核酸誘導体を用いて、特異的に認識、検出する事に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed the novel nucleoside analogues for the recognition of the damage to the nucleic acid in order to establish a new diagnosis of disease based on the stress. 8-Oxo-G is the oxidative damage base of guanine, and it is unknown the properties of it in single-stranded RNA. Thus, the purpose of the present work was developed a sequence specific detection molecules and methods of 8-oxo-rG in RNA. We developed a new synthesis method of RNA-type 8-oxoG. And we found the novel nucleoside analogues, 2-amino-Adap and 2'-OMe-Adap. These analogues could recognize and detect the 8-oxo-rG in RNA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ゲノム創薬 酸化損傷塩基 遺伝子検出

1. 研究開始当初の背景

細胞は酸化ストレスなどにより絶えず損傷を受けており、その代表的な生成物にグアニン(G)が酸化された8-オキシグアニン(8-oxoG)の存在が知られている。8-oxoGは、加齢やアルツハイマーなどの神経変性疾患に関与していると考えられており、国内外で多くの研究がなされている。特にDNA中の8-oxodGは、その発生機構や修復機構、病気との関連が明らかにされている。一方、より速やかに分解され細胞機能への影響が小さいと考えられていた1本鎖RNA中の小さな傷である8-oxoGは、最近の研究により、8-oxoGの存在する位置で翻訳阻害、異常タンパク質の発現などにより病気の原因になる可能性が考えられるようになってきた。このような状況下、RNA中の8-oxoGの発生部位の特定を行い翻訳過程や修復過程に与える影響を詳細に検討する事で、疾患との関連や存在意義をより詳細に解明する事ができると考えられるが、既存の機器分析的・免疫学的手検出法では、8-oxoGの発生部位の特定は不可能である。

2. 研究の目的

本研究では、RNAのピンポイント酸化損傷に基づく疾患の新規診断法、治療薬の創製に向けて、これまでに未達成な1本鎖RNA中の8-oxoGの配列特異的検出法を開発し、発生部位が翻訳や修復に与える影響を詳細に検討する事にチャレンジする。mRNA中の小さな傷である8-oxoGは、翻訳過程の阻害や機能不完全なタンパク質の発現により病気の原因になる可能性が考えられているが、8-oxoGの発生部位と疾患やタンパク質の機能阻害への詳細な関係は明かとなっていない。そこで、申請者が開発したDNA中の8-oxodGと非天然型塩基対形成可能な人工核酸であるAdap(Adenosine-diazaphenoxazine)の構造の最適化を行い、独自のRNA中の8-oxoGの配列特異的な検出法の開発、独自の検出系を用いた8-oxoGの役割や存在意義の解明研究を行うことにした。

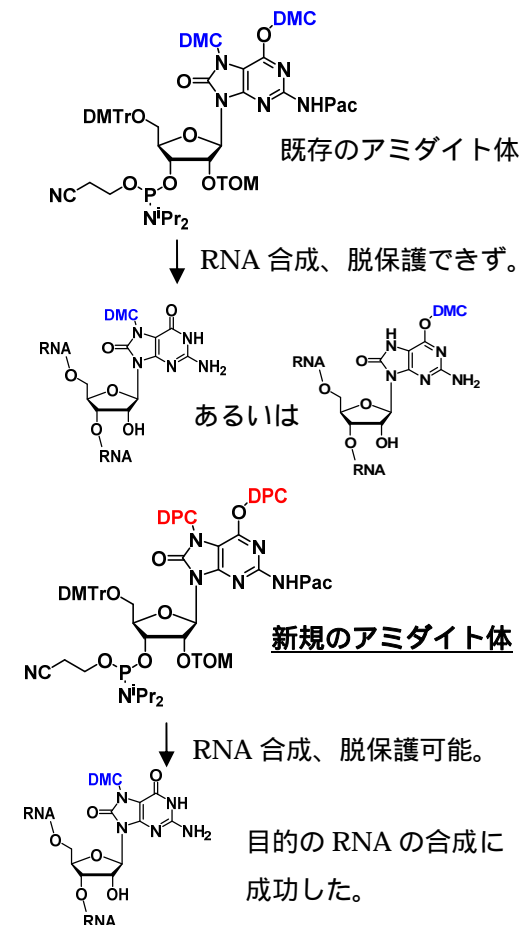
3. 研究の方法

8-oxoGへの親和性を向上したAdap誘導体と検出プローブの創製
速やかに分解されるRNA中での8-oxoGの発生は翻訳のエラーを引き起こし、病気の原因となると考えられている。しかし、既存の検出法やPCR増幅法では、発生部位の特定や損傷遺伝子の情報をそのままの状態を増やすことはできない。そこで、本項目では、RNA中の8-oxoGを特異的に認識するために、RNAへ親和性を高めた人工核酸の開発を、独自に見いだしたDNA中の8-oxodG認識人工核酸Adapを発展させて行い、RNA中の8-oxoGの配列特異的な検出法の創製に挑戦する。新たにRNAの糖部コンフォメーションに合わせたAdap誘導体、水素結合サイトを増やしたAdap

誘導体を合成し、8-oxoG発生部位特異的認識を達成する。同時に、Adap搭載プローブを固相担体へ固定化しマイクロアレイ技術への展開することで、より簡便な検出法の開発に展開する。

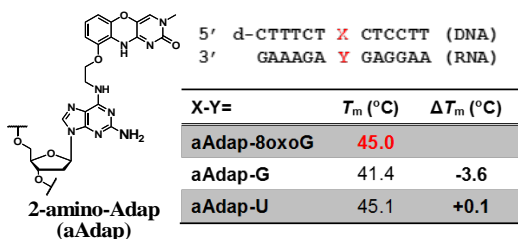
4. 研究成果

(1) 8-oxoGを含むRNAの合成法の確立
RNA中の8-oxoGの性質を正確に調べるために、8-oxoGを含むRNAの合成を行った。既に報告はされていたが、報告データなどに不自然な点があり、さらに同様の方法で合成を行ったが、目的である8-oxoGを含むRNAを得ることはできなかった。原因として8-oxoGの保護基(DMC:dimethylcarbamoyl)の脱保護ができず、結果として保護基が残ったまま塩基対形成能を評価したところ、論文に報告されたデータが得られた。このことは、既に報告された論文の化合物には保護基が残っていたことを示している。そこで、別の保護基(DPC:diphenylcarbamoyl)による合成を行い、目的の8-oxoGを含むRNAの合成に成功し、MALDI-TOF MASS測定により構造決定した。このRNAを用いて、RNA/DNAヘテロ2本鎖の性質、RNA/RNA2本鎖の性質を調べた結果、RNA中の8-oxoGはDNA中と同じく、rCのみならずrAとも塩基対を形成する事を見出し、さらにrGとも比較的安定な塩基対を形成することも見出した。この事はこれまでに報告例が無く、RNA中の8-oxoGの性質に関して詳細に調べた事は初めての例である。



(2) 新規 Adap 誘導体の開発

塩基の 2 位にアミノ基を有するアミノ Adap、あるいは糖の 2' 位にメトキシ基を有する 2'-OMeAdap の合成に成功し、評価を行った。その結果、2-Amino-Adap を組み込んだ DNA とその相補 RNA (8-oxo-G, G, U を導入) 二本鎖の T_m 値を測定した。G に比べて 8-oxo-G の T_m 値は高かったが、その差は 3.6 oC に留まった。また、2-Amino-Adap の相補塩基が U のとき、8-oxo-G と同等の T_m 値を観測した。



The duplex DNA (2 μ M) was heated to 90°C for 10 min and annealed by slow cooling in the buffer containing 100 mM NaCl and 10 mM sodium phosphate at pH 7.0. UV melting behavior was monitored at 260 nm from 20°C to 80°C with a rate of 1.0°C/min with a DU 800 spectromete.

一方、2'-OMeAdap では RNA ホモプリン鎖中あるいは RNA ホモピリミジン鎖中のどちらにも 8-oxoG が存在していても、8-oxoG と rG を区別可能なプローブの開発に成功した。さらに、蛍光消光作用も調べた結果、oxoG 選択的に蛍光が消光する事も見出した。結果として、RNA 中の 8-oxoG の効率的な検出法の開発に成功した。

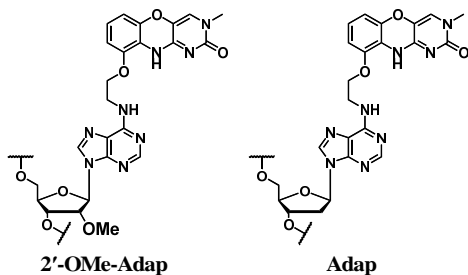
プリン鎖中の 8-oxo-rG に対する評価

target sequence

ODN1 : 2'OH-3'r(GAA AGA 8-oxoG GAG GAA)5'
ODN2 : 2'OH-3'r(GAA AGA G GAG GAA)5'

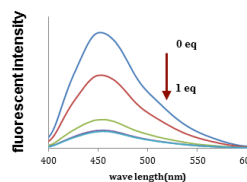
probe sequence

ODN5 : 2'OMe-3'r(UUC CUC 2'-OMe-Adap UCU UUC)5'
ODN6 : 3'd(UUC CUC Adap UCU UUC)5'

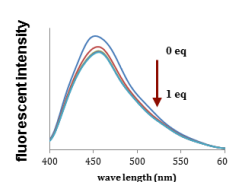


| | T_m (°C) | |
|-------|------------|-------|
| | ODN 5 | ODN 6 |
| ODN 1 | 54.35 | 48.46 |
| ODN 2 | 52.53 | 41.79 |

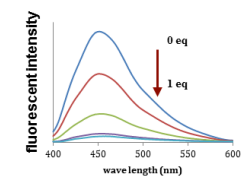
Target strand concentration: 2 μ M, probe strand concentration: 2 μ M, buffer: 100 mM NaCl and 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)



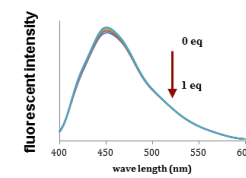
ODN1 : ODN5



ODN2 : ODN5



ODN1 : ODN6



ODN2 : ODN6

Buffer: 100 mM NaCl 10 mM phosphate buffer ex 365 nm, probe concentration 50 nm, target was added 0.25 eq per addition to a total 1.00 eq. solution total volume was 1.5 mL

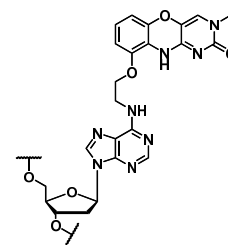
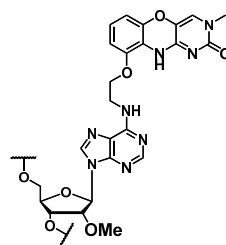
ピリミジン鎖中の 8-oxo-rG に対する評価

target sequence

ODN3 : 2'OH-3'r(UUC CUC 8-oxoG UCU UUC)5'
ODN4 : 2'OH-3'r(UUC CUC G UCU UUC)5'

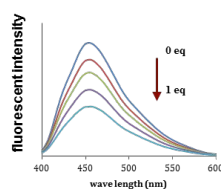
probe sequence

ODN7 : 2'OMe-3'r(GAA AGA 2'-OMe-Adap GAG GAA)5'
ODN8 : 3'd(GAA AGA Adap GAG GAA)5'

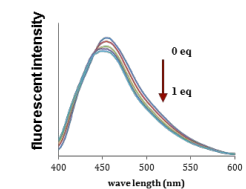


| | T_m (°C) | |
|-------|------------|-------|
| | ODN 7 | ODN 8 |
| ODN 3 | 51.49 | - |
| ODN 4 | 46.00 | - |

Target strand concentration: 2 μ M, probe strand concentration: 2 μ M, buffer: 100 mM NaCl and 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)



ODN3 : ODN7



ODN4 : ODN7

Buffer: 100 mM NaCl 10 mM phosphate buffer ex 365 nm, probe concentration 50 nm, target was added 0.25 eq per addition to a total 1.00 eq. solution total volume was 1.5 mL

さらに、Adap を含むオリゴヌクレオチドを固相単体に固定化し、さらにガラス基板上にスポットする事にも成功した。本結果は Adap 搭載プローブをマイクロアレイ技術へ展開可能であることを示している、重要な結果を得ることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Taniguchi Y., Koga Y., Shigeki Sasaki*. Synthesis of 8-oxoguanosine phosphoramidite and its incorporation into oligoribonucleotides. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, UNIT4.58 56:4.58.1-4.58.10 (2014) DOI:10.1002/0471142700.nc0458s56
2. Taniguchi Y., Fukabori K., Kikukawa Y., Koga Y and Sasaki S., 2,6-Diaminopurine nucleoside derivative of 9-ethyloxy-2-oxo-1,3-diazaphenoxazine (2-amino-Adap) for recognition of 8-oxo-dG in DNA. *Bioorg. Med. Chem.* 22(5), 1634-1641 (2014) DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.01.024
3. Koga Y., Taniguchi Y and Sasaki S*. Synthesis of the Oligoribonucleotides Incorporating 8-Oxo-guanosine and Evaluation of their Base Pairing Properties, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 32(3), 124-136. (2013) DOI: 10.1080/15257770.2013.767461

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 菊川誉也、谷口陽祐、深堀慶太郎、佐々木茂貴「8-OxodG 選択性向上を目指した Adap 誘導体の開発」、日本薬学会第 134 回年会
2. 菊川誉也、谷口陽祐、深堀慶太郎、佐々木茂貴「8-oxodG に対する塩基選択性の向上を目指した Adap 誘導体の開発」第 30 回日本薬学会九州支部大会
3. 谷口陽祐、深堀慶太郎、古賀洋平、佐々木茂貴「2-aminoAdap による DNA 中の 8-oxodG 検出法の開発」日本ケミカルバイオロジー第 8 回年会
4. 谷口陽祐、深堀慶太郎、古賀洋平、佐々木茂貴「2-aminoAdap の合成と DNA 中の 8-oxodG 認識能の評価」薬学会第 133 回年会
5. Yosuke Taniguchi, Yohei Koga, Keitaro Fukabori, Shigeki Sasaki 「Fluorescence detection of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA by Adap-masked ODN probe」第 39 回国際核酸化学シンポジウム
6. Yohei Koga, Yosuke Taniguchi, Shigeki

Sasaki 「The Fluorescent Probe for 8-oxo-Guanosine in RNA」第 39 回国際核酸化学シンポジウム

7. 深堀慶太郎、谷口陽祐、古賀洋平、佐々木茂貴「8 - オキソグアノシンの特異的認識を目指した Adap 誘導体の合成及び機能評価」第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム
8. 古賀洋平、谷口陽祐、佐々木茂貴「RNA 中の 8-オキソグアノシン認識及び検出を目指した人工核酸の開発」第 6 回バイオ関連化学シンポジウム
9. Yosuke Taniguchi, Yohei Koga, Keitaro Fukabori, Ryota Kawaguchi and Shigeki Sasaki 「Recognition and Fluorescence Detection of 8 Oxo 2' Deoxyguanosine in DNA By Adenosine 1,3 Diazaphenoxazine Derivative」XX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids
10. 谷口陽祐、古賀洋平、深堀慶太郎、佐々木茂貴「DNA 中の 8-oxodG 認識人工核酸 Adap 搭載プローブによる蛍光検出法の開発」日本ケミカルバイオロジー学会第 7 回年会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称 : Nucleoside analog derivative and utilization thereof

発明者 : 佐々木茂貴、谷口陽祐、深堀慶太郎
権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : PCT2013/079789

出願年月日 : 2013 年 11 月 1 日

国内外の別 : 外国

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

<http://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 陽祐 (TANIGUCHI, Yosuke)

研究者番号 : 00452714