

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25248037

研究課題名(和文) ステム構造を必要としない高感度リニアプローブの創成

研究課題名(英文) Development of highly sensitive linear probe without stem structure

研究代表者

浅沼 浩之 (Asanuma, Hiroyuki)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20282577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ステム構造を必要としないリニアプローブのコンセプトを更に発展させ、消光色素アントラキノンと蛍光色素ペリレンを併用することで超高感度(S/B比1600)と高い酵素耐性を実現し、細胞内でのmRNAの蛍光イメージングを実現した。次にストランドインベージョンを実現するため、蛍光色素としてエチニルペリレンを使用しアントラキノンと共に多数導入したリニアプローブを設計した。設計通りDNAと安定な二重鎖を形成し、PNAとは二重鎖を形成しなかった。その結果、PCR産物でもストランドインベージョンによる二重鎖DNAの直接蛍光ラベルを実現した。

研究成果の概要(英文)：We have designed new fluorescent probe termed linear probe that does not involve stem structure. In this project, we have successfully developed extremely sensitive linear probe involving both perylenes and anthraquinones as fluorophores and quenchers, respectively; signal-to-back ground ratio became as high as 1600. Due to the remarkable nuclease resistivity, newly designed linear probe could fluorescently detect mRNA in cell. We have further developed strand-invader by combining linear probe and PNA. For this purpose, we multiply introduced ethynylperylene and anthraquinones into DNA for stable complexation with DNA and suppressed complexation with PNA. When linear probe was incubated double-stranded DNA involving target site in the presence of complementary PNA, we could observe fluorescent increase due to the strand invasion. Even PCR product could be fluorescently labelled in a strand-invading manner.

研究分野：核酸有機化学

キーワード：DNA PNA 蛍光プローブ mRNA ストランドインベージョン ペリレン リニアプローブ

1. 研究開始当初の背景

蛍光標識したオリゴヌクレオチドは、標的核酸 (DNA と RNA) を配列特異的かつ簡便に検出可能なプローブとして、個人の遺伝子解析、病原体の特定、生細胞イメージング、リアルタイム PCR など様々な用途で用いられている。中でも、Tyagi らによって開発されたヘアピン型オリゴヌクレオチドの両末端に蛍光色素と消光色素を持つモレキュラービーコン (MB) は、その簡便な設計と汎用性の高さから、蛍光プローブとして広く使用されている¹⁾。しかしステム・ループ構造を持つ MB は、1) 蛍光色素と消光色素を末端に 1 対しか導入できないため、蛍光色素の複数導入による輝度の向上が困難、2) ターゲットと二重鎖形成する際にステムが解離する必要があるため応答速度が非常に遅い など、ステム・ループ構造に起因する様々な問題があった。さらに標的核酸は一本鎖である必要があった。

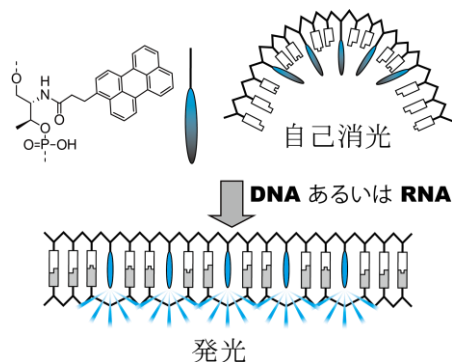


図1 D-Threosinol を骨格に持つ核酸アナログ TN と DNA のコンジュゲーションによるリニアプローブの設計

一方我々は、これまでに様々な機能性分子を核酸アナログ化して DNA 中に導入するという、全く新たな化学的再構築法を提案してきた。具体的には非環状ジオールの D-Threosinol (図 1 左上参照) を骨格として用いた核酸アナログ (Threosinol-Nucleotide: TN) をカートリッジのように DNA 中に“付加的”に導入する (TN-DNA : 図 1 右上参照)²⁾。TN-DNA は天然の DNA と同様に対応する相補鎖と配列特異的に二重鎖を形成することを明らかにした。このような配列設計は主鎖骨格を歪めるために常識的には大きな不安定化が起きると予想されるが、適切なインターカレーターを選択すれば、塩基対とのスタッキング相互作用によってむしろ二重鎖は安定化されることも見出した。この化学的再構築法の応用の一環として、我々は蛍光色素を使用した TN-DNA コンジュゲートを設計し、新たなコンセプトの蛍光プローブ「リニアプローブ」を最近提案した³⁾。リニアプローブは、天然のヌクレオチド 2 残基毎に核酸アナログ化蛍光色素を導入した TN-DNA コンジュゲートで、自由度の高い一本鎖状態では互いに接触することで自己消光する (図 1 上)。一方対

応する相補鎖と二重鎖形成すると、蛍光色素同士の相互作用が塩基対で遮蔽されるため蛍光が回復する (図 1 下)。すなわち導入する蛍光色素の数を増やすほど消光能と輝度の増加により高感度化する。またステム構造を持たないため、標的核酸との二重鎖形成速度は MB より 100 倍速いなど、従来型の MB が抱えていた欠点を全て克服したプローブの設計に成功した。さらにリニアプローブと同様の配列設計の TN-DNA コンジュゲートは相補的なペプチド核酸 (PNA) と二重鎖を形成しないことも明らかにした。

2. 研究の目的

本申請では、我々が提案したリニアプローブのコンセプトとその特徴を更に発展させて、モレキュラービーコンを遥かに凌駕する高輝度・高感度リニアプローブを開発し、1) 高い酵素耐性と高速応答を活かした mRNA の細胞内でのイメージング、2) PNA と組み合わせたストランドインバージョンによる二重鎖 DNA の直接蛍光ラベルへの応用を目指した。

3. 研究の方法

(1) mRNA を認識する高感度リニアプローブの設計

DsRed をコードしているプラスミドから転写される mRNA の一部をターゲットとしたリニアプローブを設計した。これまでの知見を基に、DNA 認識用リニアプローブと同様に D-Threosinol にペリレンを結合した核酸アナログを、16mer の DNA 中に複数導入した。なお Threosinol とペリレンを繋ぐリンカーには、RNA 認識に適したエチレン鎖を用いた³⁾。またバックグラウンド蛍光を更に低下させるため、アントラキノンを D-threosinol に結合した核酸アナログ (Q) との併用も検討した⁴⁾。リニアプローブの酵素耐性の評価は、Hela 細胞の Lysate にリニアプローブを混合し、電気泳動でプローブの分解を追跡することで行った。

(2) ストランドインバーダー型リニアプローブの設計

ストランドインバーダーとして機能するためには、1) リニアプローブが相補的な配列を持つ PNA と二重鎖を組まないが、2) DNA とは安定な二重鎖を組む必要がある。さらに蛍光ラベルに利用するためには、リニアプローブが 3) PNA 存在下では消光しているが、DNA と二重鎖を組むと発光しなければならない。このような条件を満たすリニアプローブを設計するため、蛍光色素として電子吸引性のエチニル基修飾したペリレンを導入したリニアプローブを設計した。

4. 研究成果

(1) 超高感度とヌクレアーゼ耐性を併せ持つリニアプローブの設計

天然の D-ribose と全く異なる骨格を持つ本研究の核酸アナログ TN は、高い酵素耐性を持つと期待できる。この核酸アナログの導入位置を変えた様々な TN-DNA を合成し、細胞抽出液中での分解挙動を調べたところ、TN を DNA の両末端あるいは末端から一残基内側に導入すると、ヌクレアーゼからの分解が抑制されることが判明した。そこで図 2 のように両末端近傍に E_2 を導入した様々なリニアプローブを設計・合成し、その RNA 認識

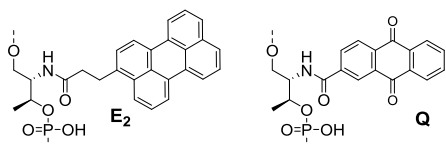
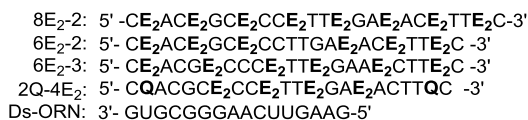


図 2 DsRed をターゲットに設計した各種リニアプローブおよび Ds-ORN の配列

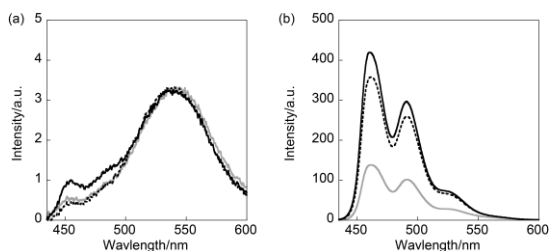


図 3 $8E_2-2$ (灰色実線), $6E_2-2$ (黒点線), および $6E_2-3$ (黒実線) の蛍光スペクトル。

(a) および (b) は、それぞれ Ds-ORN 非存在下および存在下で測定。[Probe] = 1.0 μ M, [Ds-ORN] = 2.0 μ M, 100 mM NaCl, 10 mM リン酸バッファー, pH 7.0, 20 $^{\circ}$ C.

挙動を Buffer のみの水溶液中でまず調べた。天然のヌクレオチド 2 残基毎に E_2 を 8 残基導入したリニアプローブ $8E_2-2$ は、ターゲット RNA (Ds-ORN) 非存在下では十分に消光したものの、Ds-ORN との二重鎖形成に伴う蛍光増強は低かった (図 3 : 灰色の実線)。これは E_2 の多数導入に伴う二重鎖の不安定化が原因の一つと考え、 E_2 を 2 残基減らした $6E_2-2$ および $6E_2-3$ を設計した (図 3 黒線)。その結果、Ds-ORN 存在下で十分強い蛍光を発生し、シグナル/バックグラウンド比 (S/B 比) が 500 前後に達する高感度リニアプローブが設計出来た。またいずれのプローブも高いヌクレアーゼ耐性を有しており、細胞抽出液中で 24 時間インキュベーションしても分解されなかった。そこで細胞内での mRNA の蛍光検出を想定し、細胞抽出液中でも Ds-ORN が検出可能か検討した。しかし細胞抽出液中に含まれる様々な夾雑物とリニアプローブが相互作用したためか、Ds-ORN が存在しなくても蛍光を発生してしまった。そのため細胞抽出液中では S/B 比が 5 前後と、バッファー中と比較して大幅に感度が低下した。そこで、夾

雑物が存在しても十分に消光させるため、ペリレンの効率的な消光剤であるアントラキノ (Q) を導入したリニアプローブを設計した。その際、1) 高いヌクレアーゼ耐性を維持し、2) ターゲット RNA と二重鎖形成した際にペリレンを消光させないため、Q 残基を末端近傍に導入し、 E_2 残基との間に天然のヌクレオチドを 4 残基挿入した (図 2 : $2Q-4E_2$)。このようにリニアプローブ中に消光色素を導入したところ、Ds-ORN 非存在下でのバックグラウンド蛍光はさらに低下した。一方ターゲット RNA 存在下では消光色素を含まない $6E_2-2$ と遜色ない程の蛍光増強を示した。その結果、Buffer 中での S/B 比は 1600 にも達した (図 4b)。我々の知る限り、S/B=1600 は世界最高感度である。また細胞抽出液中でのバックグラウンド蛍光も Q 残基により十分抑制され、細胞抽出液中でも S/B=40 と十分な感度を維持できた (図 4a)。

そこで $2Q-4E_2$ を使用して、実際に生細胞

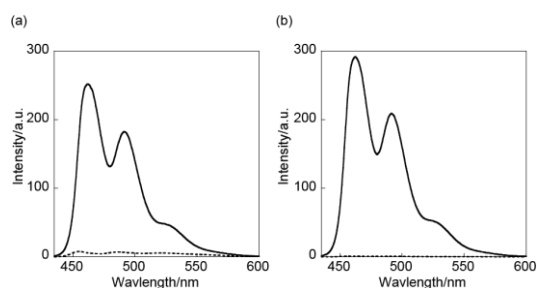


図 4 HeLa 細胞抽出液中 (a) および buffer 溶液中 (b) での $2Q-4E_2$ プローブの蛍光スペクトル。実線および点線は、それぞれターゲット Ds-ORN 存在下および非存在下でのスペクトルを示す。[$2Q-4E_2$]=1.0 μ M, [Ds-ORN]=2.0 μ M, 37 $^{\circ}$ C.

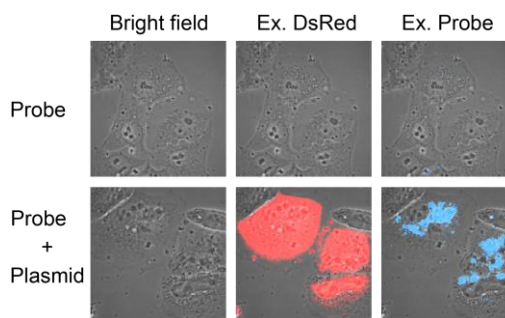


図 5 DsRed から転写される mRNA の、 $2Q-4E_2$ プローブによる可視化。DsRed: 543 nm 励起、 $2Q-4E_2$: 405 nm 励起

中の mRNA の検出を試みた。その結果、図 5 に示すように、DsRed をコードしているプラスミドをトランスフェクションしていない細胞ではほとんど蛍光を発生しなかったのに対し、DsRed が発現している細胞中ではペリレンに基づく青い蛍光が観察された。ターゲットではない eGFP を発現している細胞中に $2Q-4E_2$ を導入してもペリレンに基づく青い蛍光が観察されなかったことから、細胞中で配列選択的に mRNA を蛍光検出しているこ

とが明らかとなった。

以上のように、当初の目的通りリニアプローブを用いることで細胞中の mRNA を蛍光モニタリングすることに成功した。

(2) PNA との併用によるストランドインバーダー型リニアプローブの設計

リニアプローブと PNA による長鎖 DNA 二重鎖の蛍光ラベル化の機構を図 6 a に模式的に示す。多数の TN を導入した DNA は PNA と二重鎖を形成しない。したがってリニアプローブは PNA と共存しても蛍光発光しない。一方 PNA は天然の DNA とは安定な二重鎖を形成するので、リニアプローブが同様に相補鎖側の DNA と安定な二重鎖を形成すれば、ストランド・インバージョンが可能となる。同時にリニアプローブは蛍光を発するので、DNA 二重鎖の蛍光ラベルが実現する。そこで二重鎖を安定化させる核酸アナログとしてアントラキノン(Q)とエチニルペリレン(F: 蛍光色素)を用いたリニアプローブを設計した(図 6b: F1Q6~F3Q6)。融解温度を測定した結果、これら全てのリニアプローブは設計通りに相補的な PNA とは二重鎖形成せず、DNA とは安定な二重鎖を形成した。またこれらのリニアプローブは、一本鎖ではほとんど発光せず、相補的な配列を持つ PNA 存在下でも発光しなかったが、DNA と二重鎖形成することで強い蛍光を発した。

次に設計したリニアプローブと PNA(P15b)を用いて 50bp の合成 DNA へのインバージョンを検討した。中央部分に認識配

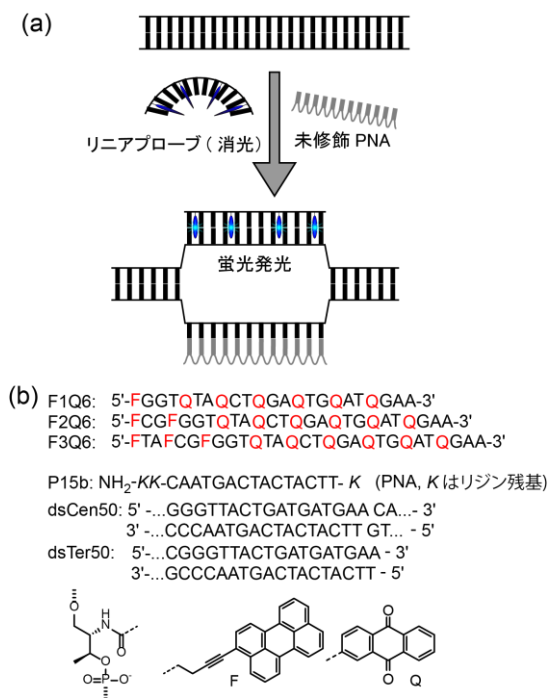


図6 (a) リニアプローブと未修飾 PNA の併用による DNA 二重鎖へのストランド・インバージョンの模式図 (b)本研究で使用した核酸アナログおよび配列。

列を持つ DNA 二重鎖(dsCen50)と 40°C でインキュベーションしたところ、24 時間後でもインバージョンに基づくバンドは検出されなかった。そこで PCR と同様にヒートショック処理(95°C で 5 分間インキュベーション後、氷水で冷却)を行った。まずポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で分析したところ、インバージョンに基づくバンドの出現が観測された。次にヒートショック前後の蛍光スペクトルを測定したところ、図 7 の実線のようにヒートショック後にペリレンのインターカレートに基づく明確な蛍光増強が観察された。一方一塩基ミスマッチを持つ DNA 二重鎖とヒートショック処理をしても、このような強いライトアップは観察されず、また PAGE でもインバージョンに基づくバンドは観察されなかった。これらの事実から、PNA とリニアプローブを組み合わせることにより、ヒートショック処理で配列特異的にインバージョンし、蛍光標識可能なことが明らかとなった。そこで実際に PCR 産物でもヒートショック処理で蛍光ラベルが可能か検討した。配列中央に認識部位を持つ 500bp および 300bp の PCR 産物と、リニアプローブと PNA を混ぜてヒートショック処理を行ったところ、リニアプローブからの明確な蛍光増強が観察された。さらに PAGE で分析したところ 3 つの新たなバンドが出現したが、そのうちのひとつからペリレンの発光に基づくバンドが認められた。以上より、PCR 産物でもリニアプローブと PNA を共存させることで蛍光ラベルが可能かとも判明した。すなわち、非対称 PCR で一本鎖 DNA を調製しなくても、ターゲットを二本鎖のまま蛍光検出可能なことが明らかとなった。

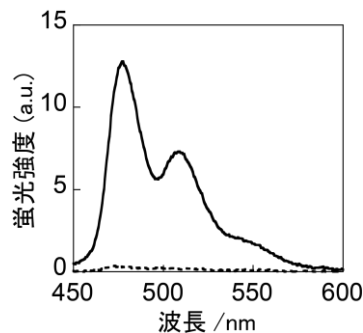


図7 DNA 二重鎖とストランド・インバーダーの、ヒートショック処理に伴う蛍光スペクトルの変化

点線・・・F3Q6 と P15b のみ

実線・・・ヒートショック処理後の F3Q6, P15b, dsCen50 混合溶液

[F3Q6] = 1.0 μ M, [P15b] = 1.0 μ M,
 [dsCen50]=0.2 μ M, 100 mM NaCl, 10 mM リン酸バッファー(pH7.0).

次に DNA の末端部位に認識配列を持つ二重鎖 DNA への、恒温インキュベーションによるインバージョンが可能か検討した。まずは 50 bp の合成 DNA 二重鎖(dsTer50)と、

PNA(P15b)とリニアプローブを 40°Cでインキュベーションして PAGE で分析したところ、30 分後にはインベージョンに基づくバンドが出現した。しかしさらにインキュベーション時間を延長してもバンドの濃さはあまり変化しなかった。そこでインベージョン反応を蛍光スペクトル変化で追跡したところ、数分後にはインベージョンが起き、ほぼ 30 分程度で実質的に完了していることが分った。インベージョンの塩濃度依存性を調べたところ、図 8 に示すように NaCl が 50 mM 以上でもインベージョンが観察された。一般に修

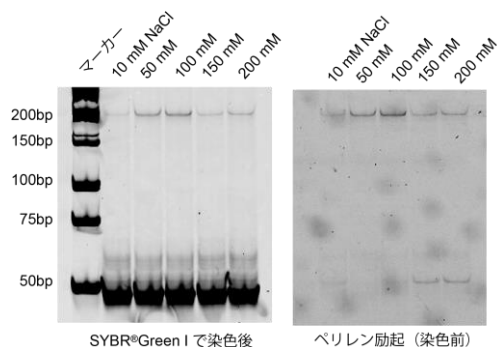


図 8 恒温ストランド・インベージョンの NaCl 濃度依存性 (40°Cで 24 時間インキュベーションの後の PAGE 分析) [dsTer50]=0.2μM, [F2Q6]=[P15b]=2.0μM, 10 mM (pH 7.0)

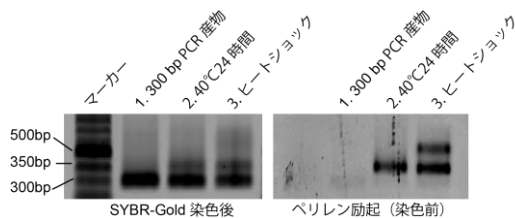


図 9 末端にターゲット配列を持つ PCR 産物へのストランド・インベージョン (アガロース電気泳動)

Lane 1, 300 bp PCR 産物のみ ; Lane 2, PCR 産、F2Q6、P15b の混合溶液を 40°C24 時間インキュベーション ; Lane 3, PCR 産物、F2Q6、P15b の混合溶液をヒートショック処理

[F2Q6]=[P15b]=2.0μM, [PCR 産物]=0.1μM, 100 mM NaCl, 10 mM リン酸バッファー (pH 7.0)

飾 PNA のみを用いたインベージョンでは、DNA が安定に二重鎖形成できない低塩濃度条件 (例えば NaCl 濃度が 10 mM) が必要である^{5,6)}。一方リニアプローブは DNA と同様にリン酸ジエステル結合を持ち、塩濃度が高い程 DNA と安定な二重鎖を形成する。そのため PNA と組み合わせても 100 mM という生理条件に近い塩濃度でもインベージョンが起きたと考えられる。

最後に末端にターゲット配列を持つ PCR 産物(300 bp)でも恒温インベージョンが起き

るか検討した。図 9 に示すように 40°Cで 24 時間インキュベーションすることで、インベージョンに基づくインベージョンバンドが観察された。

以上のように、リニアプローブと PNA を組み合わせることで、当初の目的通り DNA 二重鎖をストランド・インベージョンにより蛍光ラベルすることに成功した。

(参考文献)

- 1) S. Tyagi and F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.*, **1996**, *14*, 303.
- 2) H. Kashida, X.G. Liang, H. Asanuma, *Curr. Org. Chem.*, **2009**, *13*, 1065.
- 3) H. Asanuma *et al.*, *Chem. Sci.*, **2012**, *3*, 3165.
- 4) H. Kashida *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 7044.
- 5) J. Lohse, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11804.
- 6) I. V. Smolina, V. V. Demidov, V. A. Soldatenkov, S. G. Chasovskikh, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e146.

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 25 件)

- 1) "A stem-less probe using spontaneous pairing between Cy3 and quencher for RNA detection" H. Kashida, K. Morimoto, H. Asanuma, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **2016**, *in press.* (査読有)
- 2) "Highly sensitive and robust linear probe for detection of mRNA in cells" H. Asanuma, M. Akahane, R. Niwa, H. Kashida, Y. Kamiya, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 4315. (査読有)
- 3) "De Novo Design of Functional Oligonucleotides with Acyclic Scaffolds" H. Asanuma, H. Kashida, Y. Kamiya, *Chem. Rec.* **2014**, *14*, 1055-1069. (査読有)

[学会発表] (計 160 件)

- 1) H. Asanuma, M. Akahane, H. Kashida, Y. Kamiya, "Stemless linear probe with multiple fluorophores on D-threoninols for the fluorescent imaging of m-RNA in cell.", *1st International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials.*, September 8-10, Caparica, Portugal. (Invited)
- 2) H. Asanuma, "de novo Design of functional oligonucleotide with acyclic scaffold", *From Duplexes to Quadruplexes - Understanding DNA Structure and Function*, July 3, 2014, Reading, UK. (Invited)
- 3) H. Asanuma, "RNA detection in living cell with super-sensitive linear probe",

International Conference on Small Science 2015 (ICSS-2015), Nov. 4-7, Phuket, Thailand. (Invited)

- 4) H. Asanuma, M. Akahane, R. Niwa, Y. Kamiya, H. Kashida, "Stemless linear probe for the detection of RNA in living cell", *Pacificchem2015*, Dec. 15-20, Honolulu, U.S.A. (Invited)

[図書] (計 3 件)

- 1) 1. "非環状骨格型人工核酸：*a*TNA, SNA", 神谷由紀子、村山恵司、樫田 啓、浅沼浩之、"核酸医薬の創製と応用展開"、監修：和田 猛、p79-86、シーエムシー出版 (2016)
- 2) "生体材料化学－基礎と応用－"
浅沼浩之、樫田啓、神谷由紀子
コロナ社 (2015)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：人工核酸を含むオリゴヌクレオチド
発明者：浅沼浩之、樫田啓、村山恵司
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2015-003424
出願年月日：2015 年 1 月 9 日
国内外の別： 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：蛍光標識オリゴヌクレオチド誘導体及びその利用
発明者：浅沼浩之、樫田啓、近藤展代、大澤卓矢、赤羽真理子
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特許第 5920763 号
取得年月日：2016 年 4 月 22 日
国内外の別： 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/seigy01/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅沼浩之 (ASANUMA Hiroyuki)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20282577

(2)研究分担者

神谷由紀子 (KAMIYA Yukiko)
名古屋大学・エコトピア科学研究所・講師
研究者番号：00527947

樫田啓 (KASHIDA Hiromu)
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30452189

(3)連携研究者 なし