

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620126

研究課題名(和文) ローリングサークル増幅と蛍光三重鎖DNAを組合わせたmiRNA検出法

研究課題名(英文) New miRNA detecting system utilizing fluorescent DNA triplexes and rolling circle amplification

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では一本鎖DNAとローリングサークル増幅(RCA)法と組み合わせてmicroRNA検出する手法を開発することを目的とした。そのために、5-(3-methylbenzofuran-2-yl)deoxyuridine (dUMBF)を含む一本鎖DNAの蛍光特性とRCA法との組み合わせによるmiRNA検出システムの開発を行った。また、UMBFのベンゾフラン環上に種々の置換基を導入した誘導体や7-デアザグアニンの7位にベンゾフラン環を導入したデオキシヌクレオシドと一本鎖DNAも合成しそれらの蛍光特性について調べた。

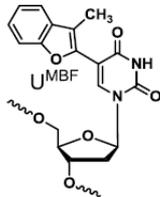
研究成果の概要(英文)：We planned to develop new microRNA detection techniques using fluorescent oligonucleotides and rolling circle amplification. As the fluorescent nucleosides developed 5-(3-methylbenzofuran-2-yl)deoxyuridine (dUMBF), the dUMBF derivatives incorporating various substituents on its benzofuran ring, and 7-deazaguanine incorporating benzofuranyl group at the 7 position. The fluorescent properties of these nucleosides and oligonucleotides incorporating them were studied.

研究分野：核酸化学

キーワード：蛍光核酸 microRNA

1. 研究開始当初の背景

miRNAは18-25塩基のRNAであり、種々の疾患の診断マーカーとして注目されている。生体内には非常に多種(ヒトで1000以上)のmiRNAが存在し、ひとつの細胞の中でさえも、それらが同時に発現して、複数の遺伝子を複雑に制御している。つまり、miRNAを迅速に検出し、診断応用するには、生体・組織・細胞中の多種類のmiRNAをワンポットで検出するmultiplex検出技術が必要不可欠である。しかし、現在のRT-PCR法ではこの課題を達成できておらず、新たな技術革新が急務である。このような技術革新を実現するために、起案者は蛍光ヌクレオシド U^{MBF} をすでに開発していた。

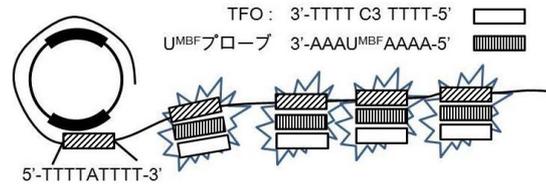


U^{MBF} は、一本鎖DNA中では非常に弱い蛍光しか示さない一方、二本鎖DNA中では弱い蛍光を示す。さらに、この二本鎖と U^{MBF} の位置にプロピレンリンカーを有する三重鎖形成核酸(TFO)が結合すると、その蛍光強度が30倍に増強する。そこで、この性質をmiRNA検出に応用し、multiplex microRNA検出システムを開発することが可能でと考えた。

2. 研究の目的

本研究では U^{MBF} を含む一本鎖DNAとローリングサークル増幅(RCA)法と組み合わせてmicroRNA検出する手法を開発することを目的とした。また、このシステムは、蛍光剤として用いる U^{MBF} 修飾DNAそれ自体が配列選択的結合能をもち、さらに U^{MBF} の化学構造を改変することで様々な蛍光波長を有するDNAをライブラリー化できるため、異なる配列を有するmicroRNAのmultiplex検出を実現する鍵技術となりうると考え、この着想に基づき種々の U^{MBF} 誘導体などを含む蛍光DNA三重

鎖の開発と、それらとRCA法を組み合わせたmultiplex microRNA検出システムを開発することを目的とした。



3. 研究の方法

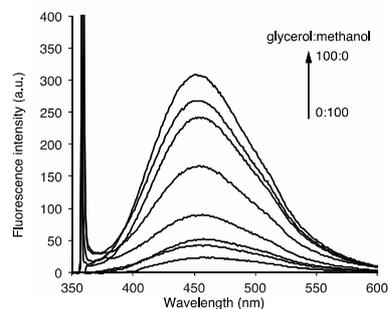
まず、蛍光核酸として U^{MBF} を含む一本鎖DNAを用い、その蛍光特性を明らかにするとともにRCA法との組み合わせによるmiRNA検出システムの開発を行った。

また、 U^{MBF} のベンゾフラン環上に種々の置換基を導入することにより、様々な波長で強い蛍光を発光する U^{MBF} 誘導体とそれらを含む一本鎖DNAを合成し、その蛍光特性を調べた。また、7-デアザグアニンの7位にベンゾフラン環を導入した7-(2-ベンゾフラニル)グアニンおよびそれらを塩基として有するデオキシヌクレオシドと一本鎖DNAを合成しそれらの蛍光特性について調べた。

4. 研究成果

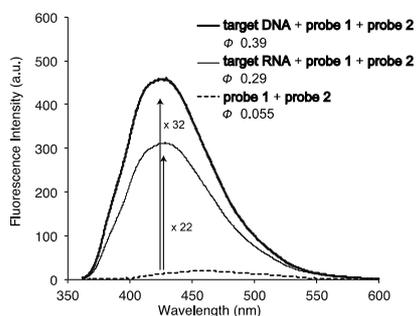
(1) U^{MBF} を含む一本鎖DNAをプローブとして用いたmiRNA検出法の開発

U^{MBF} を合成しその蛍光特性を明らかにした。その結果、 U^{MBF} は432 nm~484nmに極大蛍光波長を有し、特に酢酸エチルなどの有機溶媒中で強い蛍光を発することが分かった。また、溶液にグリセロールなどの粘性の高い溶媒を展開すると蛍光強度が著しく増大することも分かった。



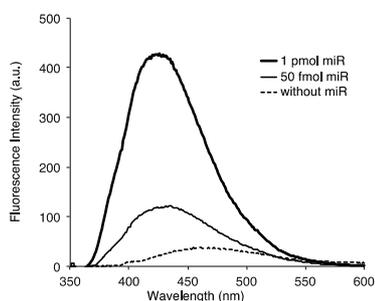
ついで、 U^{MBF} を一本鎖DNA(probe 1)に導入

し、相補的 DNA (target DNA) または相補的 RNA (target RNA) および U^{MBF} と相互作用する位置にプロピレンリンカーを導入した三重鎖形成核酸 (probe2) とが結合した三本鎖状態で蛍光スペクトルを測定しその変化を調べた。その結果 probe1 は一本鎖状態 (probe1+probe2) では全く蛍光を発しないのに対し、target DNA もしくは target RNA を添加して三重鎖を形成すると著しく増大することが分かった。この結果は U^{MBF} のメチルベンゾフラン環が、三重鎖形成に伴い probe2 の中に取り込まれて疎水的環境に置かれると同時にウラシル環とベンゾフラン環が上下の塩基とのスタッキングにより平面に固定されることによる効果である。



最後にこの系を miRNA の検出に応用した。すなわち、miRNA (miR-16) をプライマーとして用いて padlock プローブを rolling circle amplification により増幅し、生成する一本鎖 DNA 上記 target DNA の代わりに用いて、三重鎖形成に伴う蛍光スペクトル変化を測定した。

その結果、約 50 fmol の miR-16 を検出することに成功した。

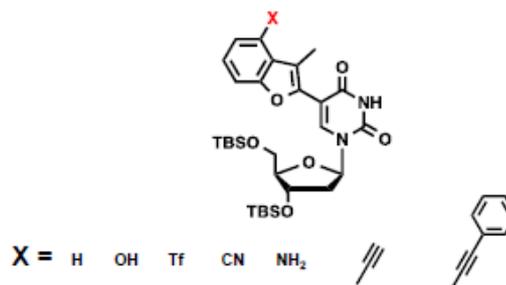


以上の検討の結果、蛍光核酸 U^{MBF} を含む一

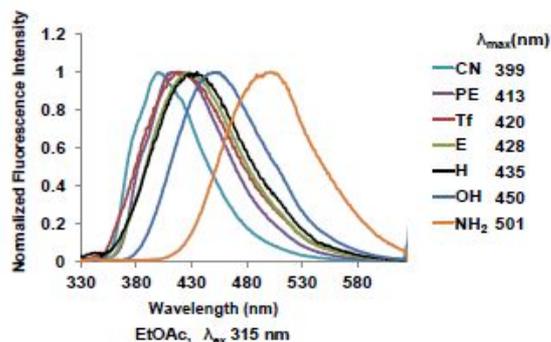
本鎖 DNA の三重鎖形成依存的蛍光特性を明らかにするとともに、rolling circle amplification と組み合わせることにより miRNA の検出システムを開発することに成功した。

(2) U^{MBF} のベンゾフラン環に置換基を導入した新規蛍光核酸の開発

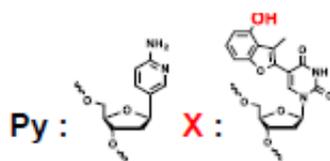
様々な蛍光波長を有する蛍光核酸を開発することを目的に、 U^{MBF} のベンゾフラン環上に置換基を導入した誘導体を合成した。種々の置換基を有する 3-メチルベンゾフランとその 2-位にホウ酸を有する試薬を合成し、それらと 5-ヨードデオキシウリジンとのカップリング反応により目的物を合成した。具体的には下図に示すように 3-メチルベンゾフラン環の 4 位に水酸基、トリフルオロメタンスルホキシ基(Tf)、シアノ基、アミノ基、エチニル基、2-フェニルエチニル基を導入した誘導体を合成した。合成した下記誘導体の蛍光スペクトルをメタノール中および酢酸エチル中で測定した。



その結果、アミノ、水酸基などの電子供与性基を導入した場合、極大蛍光波長はアミノ基の場合で 501 nm、水酸基の場合で 450 nm と、置換基を有しない dU^{MBF} (X = H) と比較して長波長シフトすることが分かった。一方、エチニル (E)、2-フェニルエチニル(PE)を導入して共役系を拡大したり、シアノ基、トリフルオロメタンスルホキシ基のような電子吸引基を導入すると、 dU^{MBF} と比較して短波長にシフトすることが分かった。また、蛍光強度が最も強いのは 2-フェニルエチニル基を導入したものであった。



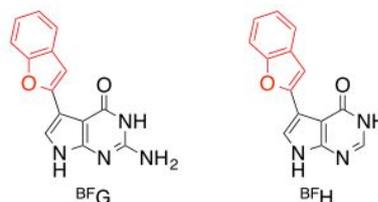
このうち、水酸基を導入したものについてはベンゾフラン環上の水酸基をピバロイル基で保護した後、ホスホロアミダイト体へと誘導しオリゴヌクレオチド（下図 probe）を合成した。合成した probe を相補鎖である target DNA と二重鎖形成し、ついで TFO と三重鎖形成したところ、一本鎖の probe と比較して約 20 倍程度に蛍光が増強することが分かった。以上の検討より dU^{MBF} よりも長波長の蛍光を有し、かつ dU^{MBF} と同様の三重鎖形成に伴う蛍光増強を示す新規蛍光核酸を開発することに成功した。



DNA 3'-d(GTTTTTCTATCTTTG)-5'
 probe 5'-d(CAAAAAGAXAGAAAC)-3'
 TFO 5'-d(TTTTTT Pv T C3 T Pv TTT)-3'

(3) 7-(2-ベンゾフラン)-7-デアザグアニンを塩基部にもつデオキシヌクレオチドと一本鎖 DNA の蛍光特性

ベンゾフラン環が塩基部に導入された蛍光核酸塩基として、7-(ベンゾフラン-2-イル)-7-デアザグアニン(^{BF}G)および7-(ベンゾフラン-2-イル)-7-デアザヒポキサンチン(^{BF}H)を合成しその蛍光特性を調べた。



^{BF}G は 2-N-ピバロイル-7-ヨード-7-デアザグアニンに対して 2-ベンゾフランルホウ酸をパラジウム触媒を用いてカップリング後、ピバロイル基塩基性条件下除去することで合成した。また ^{BF}H についても類似のカップリング反応により合成した。

合成した核酸塩基についてその蛍光特性を評価した。まず ^{BF}G について調べたところ、^{BF}G は酢酸エチルやアセトニトリルなどの非プロトン性溶媒中で 360 nm 付近に強い蛍光を示し、その量子収率は約 0.3 であった。一方、メタノールなどプロトン性溶媒中においては 1/10 程度に蛍光が弱まること分かった。^{BF}H についてもその蛍光特性を評価した。^{BF}H は量子収率は 0.03 と小さいものの、^{BF}G とは逆にメタノールなどのプロトン性溶媒中で蛍光が大きくなること分かった。

次に蛍光の大きかった ^{BF}G を塩基部にもつヌクレオチドとそれを含むオリゴヌクレオチドをホスホロアミダイト法を用いて合成し、その蛍光特性を調べた。その結果、オリゴヌクレオチドへ導入によりその蛍光強度は著しく小さくなること分かった。

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 2 件)

1. Takashi Kanamori, Hiroki Ohzeki, Yoshiaki Masaki, Akihiro Ohkubo, Mari Takahashi, Kengo Tsuda, Takuhiro Ito, Mikako Shirouzu, Kanako Kuwasako, Yutaka Muto, Mitsuo Sekine and Kohji Seio. Controlling the Fluorescence of Benzofuran-Modified Uracil Residues in Oligonucleotides by Triple-Helix Formation. *ChemBioChem* **2015**, 16, 167-176. 査読あり doi: 10.1002/cbic.201402346
2. Munefumi Tokugawa, Kazuhei Kaneko,

Masanori Saito, Takashi Kanamori, Yoshiaki Masaki, Akihiro Ohkubo, Mitsuo Sekine, Kohji Seio. Synthesis of Responsive Fluorescent Nucleobases 7-(Benzofuran-2-yl)-7-deazahypoxanthine and 7-(Benzofuran-2-yl)-7-deazaguanine Using Cross-coupling Reaction. *Chem. Lett.* **2015**, 44, 64-66. 査読あり doi: 10.1246/cl.140879

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Takashi Kanamori, Daichi Miyamura, Akihiro Takamura, Yoshioaki Masaki, Mitsuo Sekine, Kohji Seio. Synthesis and fluorescent properties of deoxyuridines having 2-methylbenzofuran derivatives. The 41th international symposium on nucleic acids chemistry. 2014/11/05-07, Kitakyushu International Conference Center, (Fukuoka・Kitakyushu-City).
2. Munefumi Tokugawa, Kazuhei Kaneko, Jan Cristian Canggadibrata, Takashi Kanamori, Yoshiaki Masaki, Akihiro Ohkubo, Marcus Wilhelmsson, Morten Grotli, Mitsuo Sekine, Kohji Seio. Synthesis and photophysical properties of 7-modified 7-deazaguanosine analogues. The 41th international symposium on nucleic acids chemistry 2014/11/05-07, Kitakyushu International Conference Center, (Fukuoka・Kitakyushu -City).
3. 金森功史、宮村大地、正木慶昭、大窪章寛、関根光雄、清尾康志 3-メチルベンゾフラン誘導体を導入した新規蛍光ヌクレオチドの合成と蛍光特性 日本化学会第 94 春季年会、2014/3/29、名古屋大学(愛知県・名古屋市)
4. 徳川宗史、金森功史、正木慶昭、大窪章寛、関根光雄、Wilhelmsson Marcus、Grotli Morten、清尾康志 7-(1-フェニルトリアゾール-4-イル)-7-デアザグアノシン誘導体の合成と性質 日本化学会第 94 春季年会、2014/3/27、名古屋大学(愛知県・名古屋市)
5. 徳川宗史、金子和平、齋藤正憲、金森功史、正木慶昭、大窪章寛、関根光雄、清尾康志 ベンゾフラン環を導入した 7-デアザヒポキサンチンの合成法とその蛍光特性 日本化学会第 94 春季年会 2014/3/27、名古屋大学(愛知県・名古屋市)
6. 徳川宗史、Christopher Lawson、Anke Dierckx、関根光雄、Wilhelmsson Marcus、Grotli Morten、清尾康志 7-トリアゾリル-7-デアザグアニン誘導体の合成と蛍光特性 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、2013/9/28、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.skn.bio.titech.ac.jp/>

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：39220240