

## 極微量小分子 RNA を網羅的に解析する 次世代型アレイチップの開発

Development of Micro Arrays for Analyzing Small RNAs

寺前 紀夫 (TERAMAE NORIO)

東北大学・大学院理学研究科・教授



### 研究の概要

本研究では、これまで困難であった極微量 ( $\text{amol}=10^{-18} \text{ mol}$ ) の小分子RNAをPCR増幅無しに検出する『超高感度核酸計測用アレイチップの開発』を目指す。具体的には、シリカメソ細孔 (細孔径: 10~20 nm) 内で特異的に発現する過冷却水状態に着目し、これを核酸検出場とする独創的な計測法を創製する。

研究分野: 化学

科研費の分科・細目: 複合化学・分析化学

キーワード: 核酸検出、蛍光検出、脱塩基空間、ナノ細孔、過冷却

### 1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝情報をコードしていない RNA が生命活動に多大の寄与を果たしていることが分かってきた。ヒトゲノムプロジェクトの中で DNA 分析法は多くの発展を遂げたが、RNA 特に小分子 RNA についてはその分析法は未発達の状態にあると言える。

### 2. 研究の目的

本研究では、小分子 RNA と特異的に結合するリガンドの開発や小分子 RNA を高感度に検出する方法論を開拓すると共に「高感度核酸検出用アレイチップの開発」を目指す。

### 3. 研究の方法

[1] 核酸塩基を認識する蛍光性リガンドの開発 小分子RNAに特異的に結合する、水素結合能を有する蛍光性リガンドの設計・合成と機能評価を行う。また、RNA二重鎖中に構築した脱塩基 (AP) 空間へのリガンド結合による塩基配列の選択的識別を検討し、高性能のアレイチップの開発へと展開する。

[2] ナノ細孔内での核酸塩基認識 孔径数十 nm程度のナノ細孔が集積したナノポーラス膜を作製し、核酸塩基の高密度修飾と過冷却効果による検出能の向上を検討する。さらに開発したナノポーラス膜を用いた蛍光及び光導波路検出によるハイスループットな核酸検出法を開発する。

[3] アレイチップの開発 ナノポーラス膜と蛍光性リガンドの組合せに対して最適な

アレイチップを設計し、小分子RNAの網羅的解析への展開を目指す。

### 4. これまでの成果

[1] 核酸塩基を認識する蛍光性リガンドの開発: 一般に、既存の核酸検出試薬の多くは DNA 二重鎖選択的であり、RNA 二重鎖に対する結合選択性や高親和力の発現は容易ではない。本研究では、蛍光性化合物を網羅的にスクリーニングすることにより、RNA 二重鎖中の脱塩基部位に強力に結合しうる化合物 (ジアミノピラジン誘導体及びナフチリジン誘導体) を見出すことに成功した (解離定数: 10~70 nM, 5~20°C)。さらに、これらの化合物を基本骨格として活用し、疎水場環境応答型蛍光色素 (ベンゾフラザン誘導体) あるいは核酸結合性蛍光色素 (シアニン誘導体) を連結することで、蛍光強度増加型及びレシオ (2波長) 検出型リガンドを開発した。特に、シアニン色素の活用が効果的で、on-offタイプの蛍光シグナルが得られるのみならず、連結するシアニン色素構造を制御することで、三色蛍光検出 (青、緑、赤) に対応させることが可能となった。また、シアニン色素の連結は、結合力の強化にも効果的で、チアゾールオレンジを連結したリガンドでは、基本骨格単体と比べて、結合力が一桁向上することがわかった。

[2] ナノ細孔内での核酸塩基認識: ナノ細孔内過冷却水の物性を包括的に評価するために、4級アミンを修飾した直径およそ 3 nm の

ナノ細孔体を作成し、蛍光プローブ分子による測定から、細孔内 pH 条件については、外部溶液の pH 条件によらずおよそ弱酸性～中性であることが分かった。蛍光寿命測定により、ナノ細孔内部では、およそ-50°C まで過冷却水が安定に存在し、その粘性が 5 mPa・s 以下であることを明らかにした。この結果に基づき、ナノ細孔内過冷却水中における DNA 二重鎖安定性について、アデニン、チミンの各 4-mer DNA 鎖にそれぞれドナーとアクセプターを化学修飾した短鎖 DNA の二重鎖形成を蛍光共鳴エネルギー移動により検討した。その結果、バルク溶液中では熱力学的に不可能な二重鎖形成が、ナノ細孔内過冷却水中で生じうることを見いだす成果を得た。この知見は、小分子 RNA のプローブ核酸とのハイブリダイゼーションによる検出や、miRNA のように RNA 鎖の末端に変異が多く存在する核酸の識別検出に有効になるものと期待できる。また、ナノ細孔内の化学種の検出法として細孔構造を調節することによりナノポーラス光導波路センシングの感度を向上しうることが分かった。さらに、この光導波路では光電場分布を、蛍光消光を誘起する金属とは位置的に離れた、試料が存在する細孔部分に偏在させることができる。このことを利用した増強蛍光分析法を新たに開発した。

#### 5. 今後の計画

今後は、各研究課題において、これまでに得られた成果をさらに進化させる。

[1] 核酸塩基を認識する蛍光性リガンドの開発：現在までに、小分子 RNA 検出に適用可能な蛍光性リガンド（基本骨格）を見出すことに成功し、これらのリガンドの結合力と蛍光特性の改良を進めてきた。今後の計画としては、置換基や側鎖導入等による基本骨格の改変合成を行うとともに、連結する蛍光色素構造やリンカー構造、連結部位などを体系的に検討することで、リガンドの検出機能のさらなる強化・改良を図る。

[2] ナノ細孔内での核酸塩基認識：現在までにナノ細孔内過冷却水の環境（pH や粘性）、DNA 二重鎖安定性について新たな知見を得た。今後は、DNA 二重鎖安定性におよぼすナノ細孔サイズと形状、温度の影響を実験的に精査すると共に、ナノ細孔内過冷却水中での DNA・RNA 二重鎖と蛍光性リガンドとの結合力増強について検証を進める。

[3] アレイチップの開発：上記[1]、[2]課題で得られた成果に基づくアレイチップの設計、ナノポーラス膜への認識部位固定化技術の検証を通してアレイチップを開発する。

#### 6. これまでの発表論文等

##### 主な原著論文

- 1) A. Yamaguchi, M. Namekawa, T. Kamijo, T. Ito, N. Teramae, "Acid-base equilibria inside amine-functionalized mesoporous silica", *Anal. Chem.*, **83**, 2939-2946 (2011).
- 2) Y. Sato, S. Nishizawa, N. Teramae, "Label-free molecular beacon system based on DNAs containing abasic site and fluorescent ligands that bind abasic sites", *Chem. Eur. J.*, **17**, 11650-11656 (2011).
- 3) S. Miura, S. Nishizawa, A. Suzuki, Y. Fujimoto, K. Ono, Q. Gao, N. Teramae, "DNA-binding small-ligand-immobilized surface plasmon resonance biosensor for detecting thymine-related single-nucleotide polymorphisms", *Chem. Eur. J.*, **17**, 14104-14110 (2011).
- 4) K. Hotta, A. Yamaguchi, N. Teramae, "Nanoporous waveguide sensor with optimized nanoarchitectures for highly sensitive label-free biosensing", *ACS Nano*, **6**, 1541-1547 (2012).
- 5) Y. Fan, K. Hotta, A. Yamaguchi, N. Teramae, "Enhanced fluorescence in nanoporous waveguide and its quantitative analysis", *Opt. Express*, *in press*.

他 14 報

##### 主な招待講演

- 1) N. Teramae, "Analytical application of abasic-site binding ligands", 14<sup>th</sup> Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis, Central Garden Hotel, Beijing, China, 2011/10/13-16.
- 2) N. Teramae, "Biosensing based on interactions between nucleic acids and small ligands", 3<sup>rd</sup> Asian Spectroscopy Conference, Xiamen Univ, China, 2011/11/29-12/01.
- 3) N. Teramae, "Molecule recognition based on abasic site-binding fluorescent ligands", France-Japan Joint Forum, Chemistry of Functional Organic Chemistry, Strasbourg Univ, France, 2011/06/23-25.

他 26 件

(原著論文 19 報、総説・解説 4 報、書籍 4 件；海外における招待・依頼講演 12 件、国内会議における招待・依頼講演 17 件；国際会議での発表（一般講演）30 件、国内学会発表（一般講演）49 件）。

受賞：寺前紀夫：平成 23 年度日本分光学会・学会賞，2011 年 12 月。

ホームページ等

<http://www.anal.chem.tohoku.ac.jp/>