

SOPHIA U

リボソームRNA分子スイッチを模倣した 一塩基多型検出プローブ

上智大学 理工学部 物質生命理工学科 教授

近藤 次郎

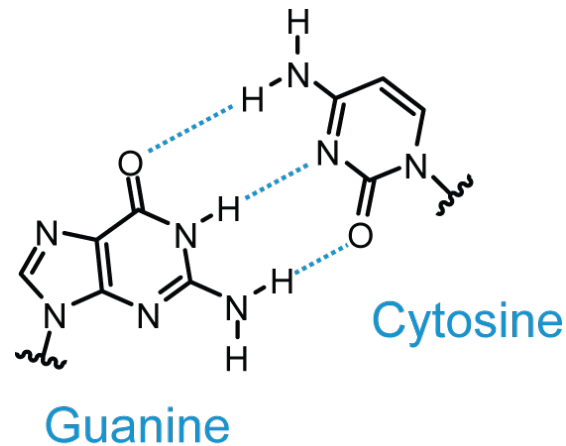
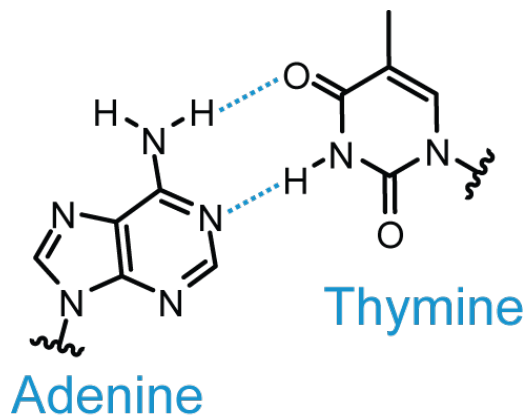
新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

2024年 8月 8日 JST 新技術説明会

FOR OTHERS, WITH OTHERS

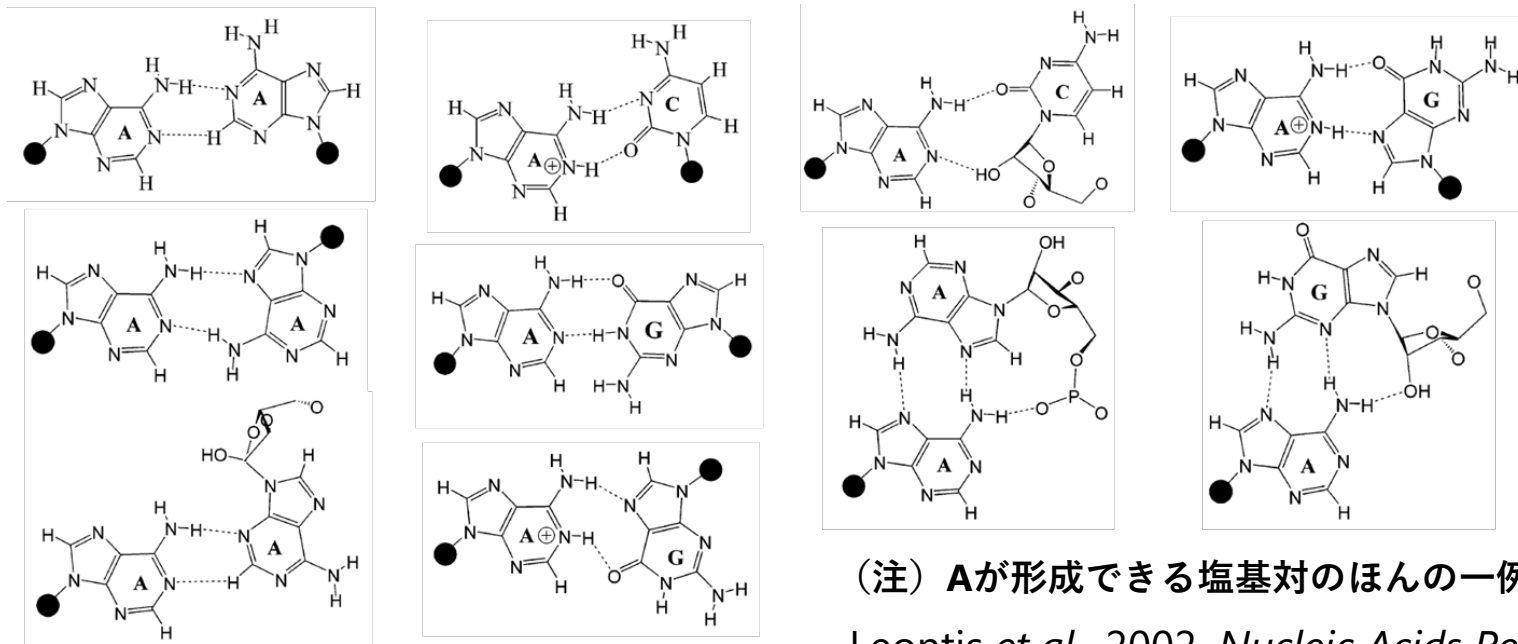
DNAを用いた従来のバイオテクノロジー技術

- ◆ DNAはバイオ・ナノテクノロジー分野で幅広く応用されている
- ◆ これらの技術はほぼすべて「塩基対の相補性」というルールに基づいているため、「塩基配列」という一次元情報のみに頼って設計されている



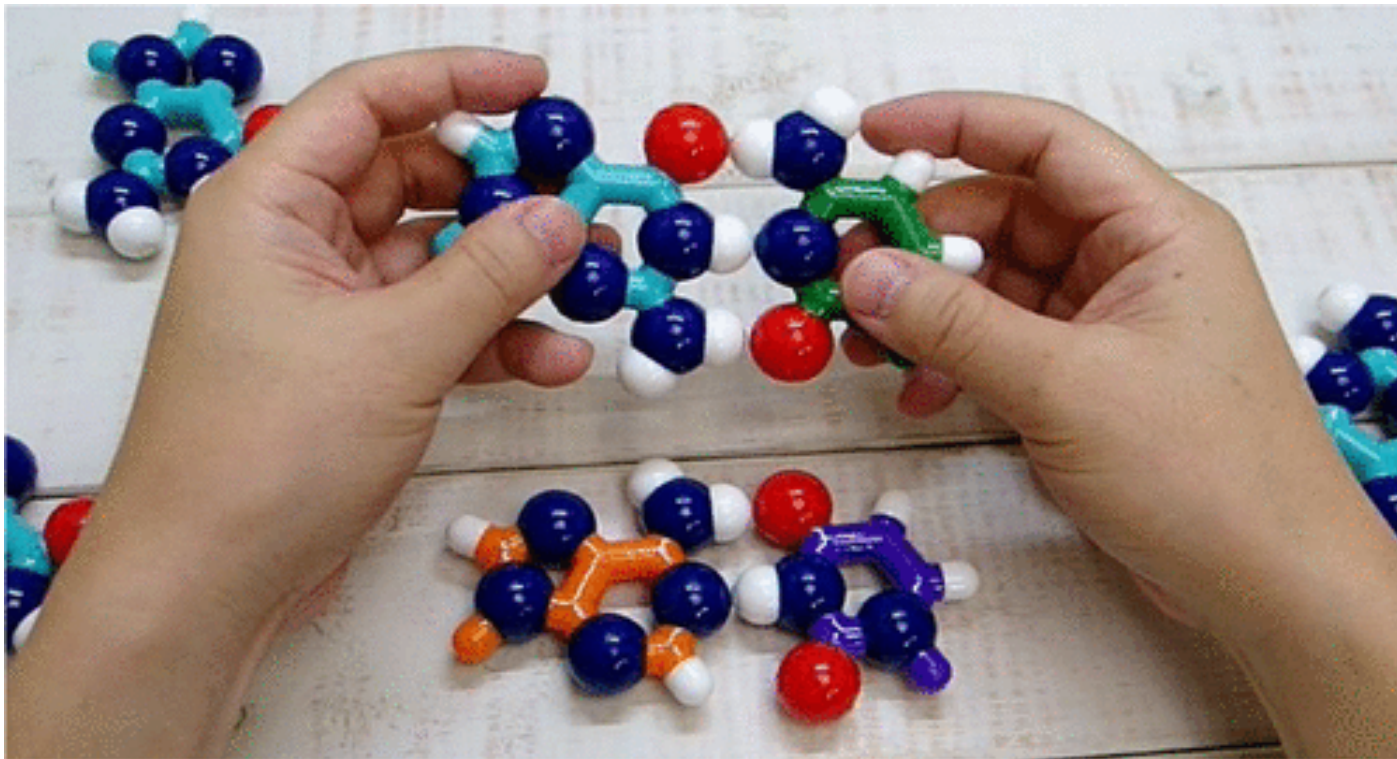
RNAの「形」と「動き」を模倣する

- ◆ 実は378種類の「非相補的塩基対」が形成可能
- ◆ 二重らせん以外の複雑な「形」や「動き」に関わる



(注) Aが形成できる塩基対のほんの一例です
Leontis et al., 2002, *Nucleic Acids Res.*

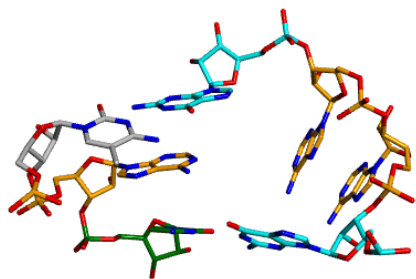
RNAの「形」と「動き」を模倣する



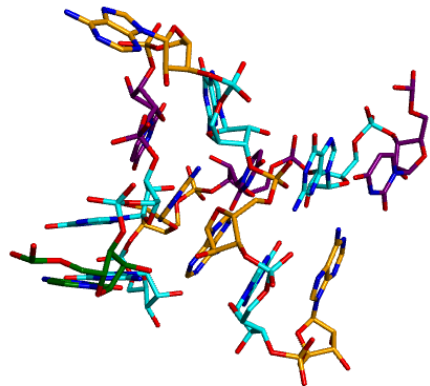
BasePairPuzzle (Jiro Kondo Lab. & StudioMIDAS)

RNAの「形」と「動き」を模倣する

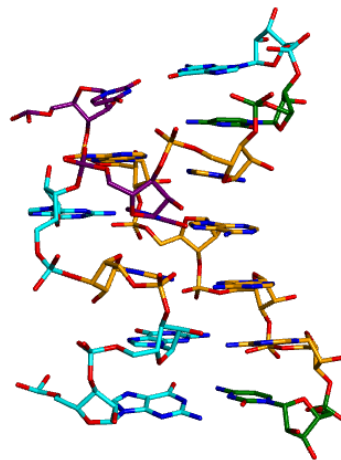
- ◆ 378種類の「非相補的塩基対」が形成可能
- ◆ 二重らせん以外の複雑な「形」や「動き」に関わる



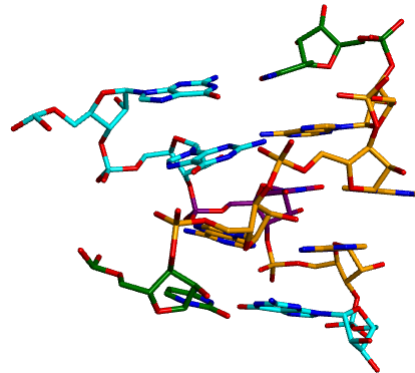
A site



Kink-turn



Bulged-G



UAA/GAN

「NA3DMotif」: <https://jkondo.wixsite.com/na3dmotif>

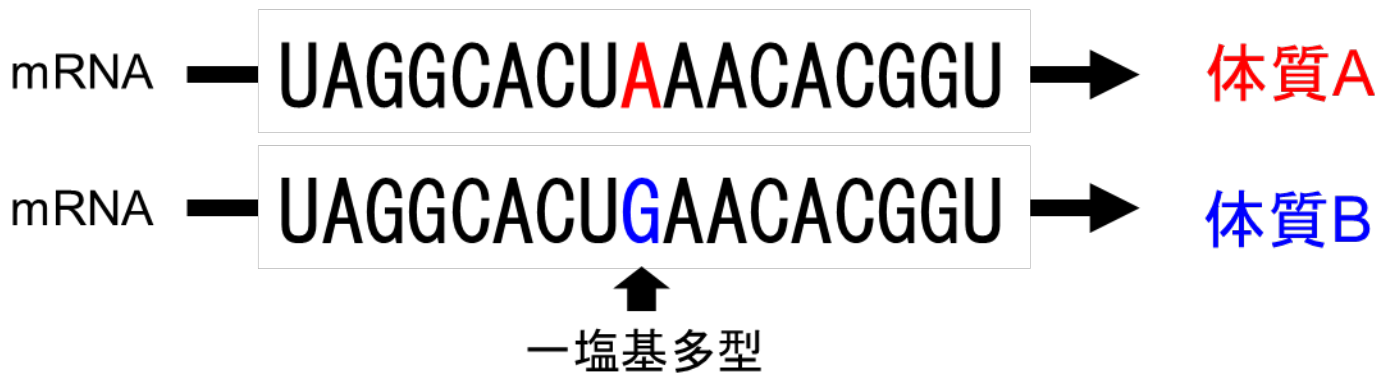
一塩基多型（SNP）検出プローブ

核酸塩基検出剤

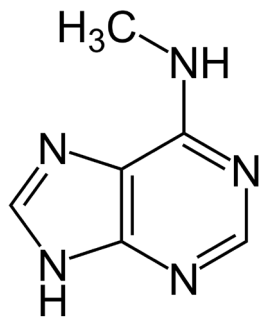
- 出願番号：特願2023-194666
- 出願人：学校法人 上智学院
- 発明者：近藤 次郎

一塩基多型 (SNP)

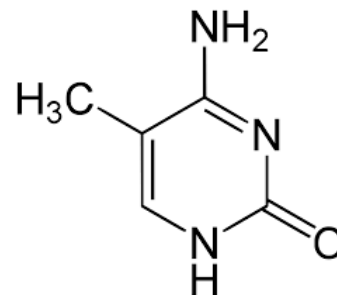
- ◆ ゲノムDNA上やmRNA上の特定の位置に生じるヌクレオチド1つ分の置換
- ◆ おおよそ1000ヌクレオチドに1つの頻度で現れる
- ◆ 一部の一塩基多型は特定の病気や薬の副作用と関係
- ◆ 一塩基多型検出技術はオーダーメイド医療に役立つ



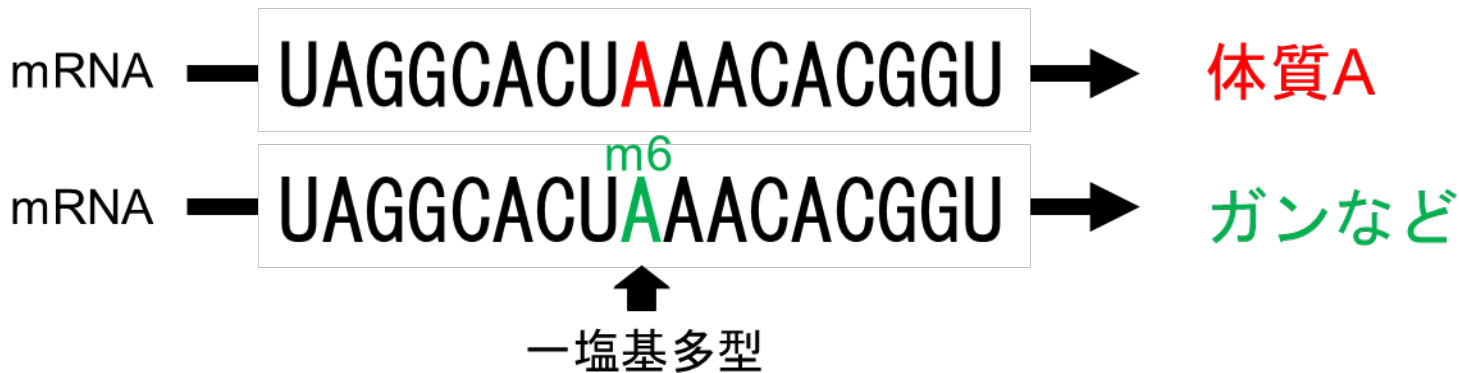
RNAのメチル化修飾によるSNP



N6-methyl-A (m6A)

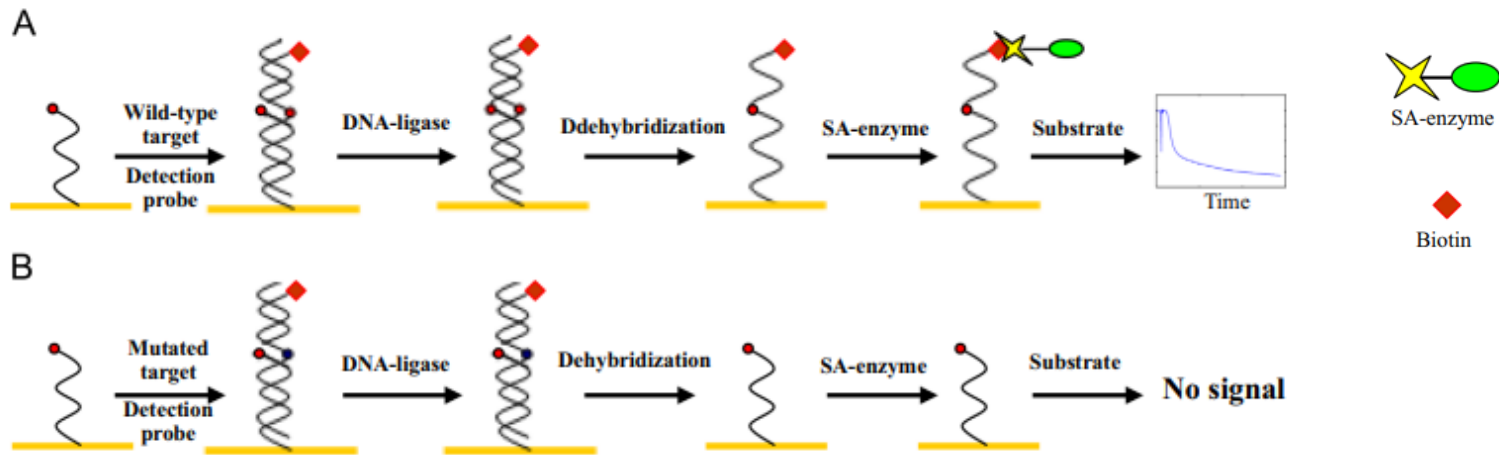


5-methyl-C (m5C)



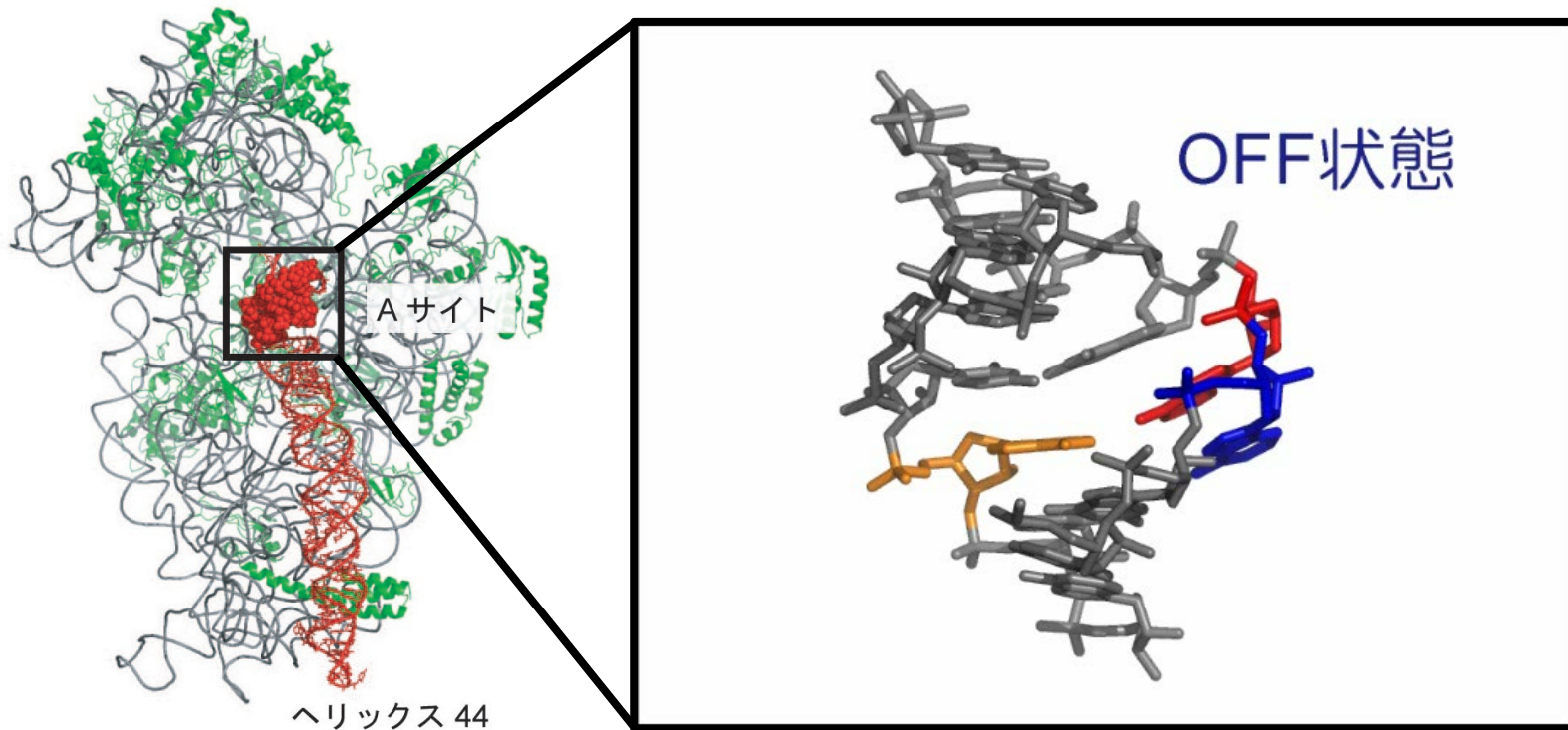
既存のSNP検出技術の課題

- ◆ 安価だが感度が低い、または感度が高いが高価な技術のいずれかである
- ◆ 工程が多く、検出の仕組みが複雑なものが多い



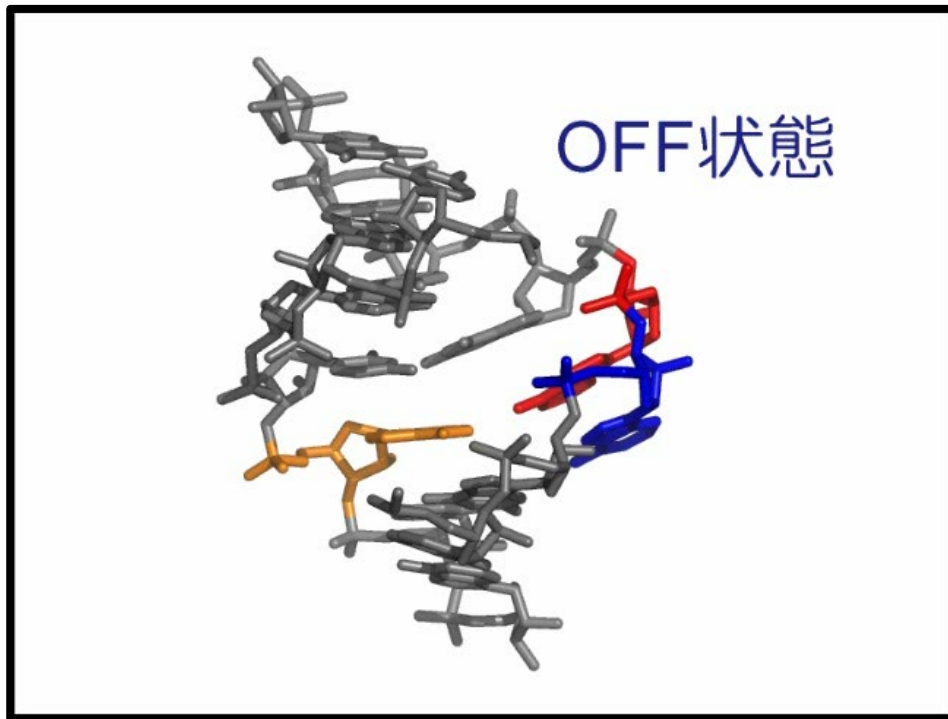
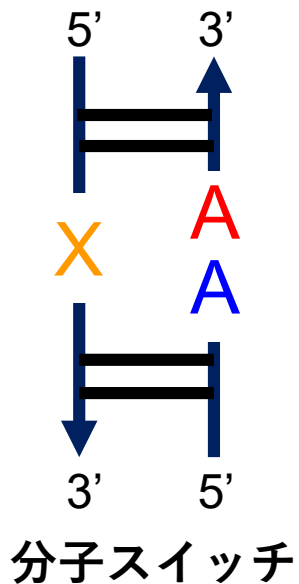
Chang et al., 2015, *Biosens. Bioelectron.*

リボソームRNA分子スイッチ



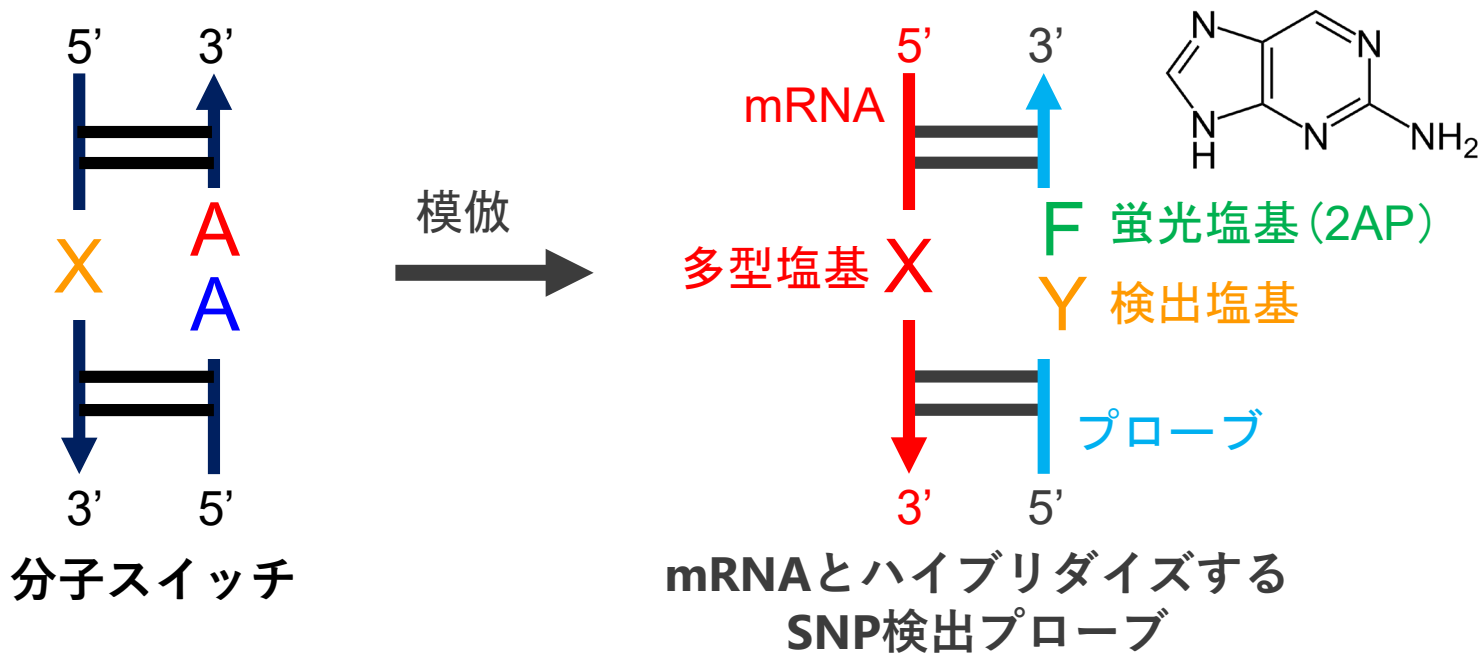
タンパク質合成のON/OFFを制御している

リボソームRNA分子スイッチ

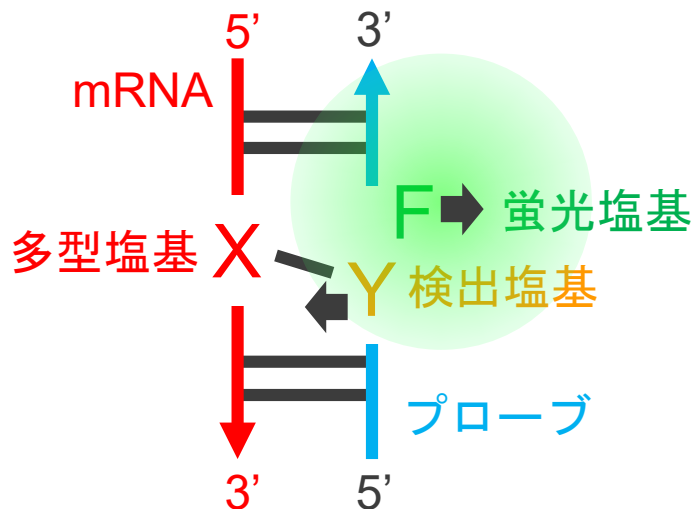


タンパク質合成のON/OFFを制御している

スイッチを模倣したSNP検出プローブ



SNP検出プローブの想定される作動機構



X-Y = Watson-Crick型塩基対

検出塩基Yが多型塩基XとWatson-Crick型塩基対を形成
⇒ 蛍光塩基Fが分子の外側に飛び出して蛍光強度が増大

実験① mRNA中のSNP検出

実験に使ったRNAとプローブ配列

X = A, C, G, U

mRNA-X

5' -ACUCUCCUCG X CUCUUCAUCAUGU-3'

3' -TGAGAGGAGC Y_F GAGAAGTAGTAGTACA-5'

Yプローブ

Y = A, C, G, T F = 2AP

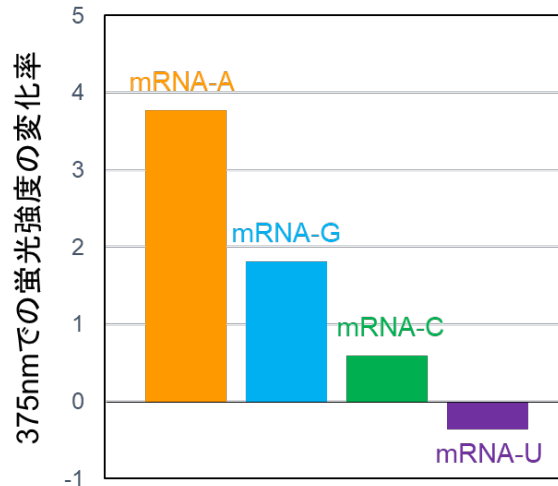
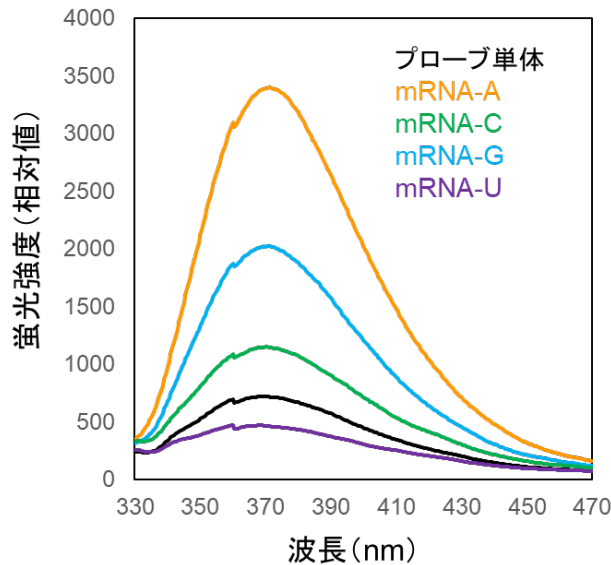
Y = T は X = A を検出するはず ⇒ Aプローブ

Y = G は X = C を検出するはず ⇒ Cプローブ

Y = C は X = G を検出するはず ⇒ Gプローブ

Y = A は X = U を検出するはず ⇒ Uプローブ

AプローブによるSNP検出

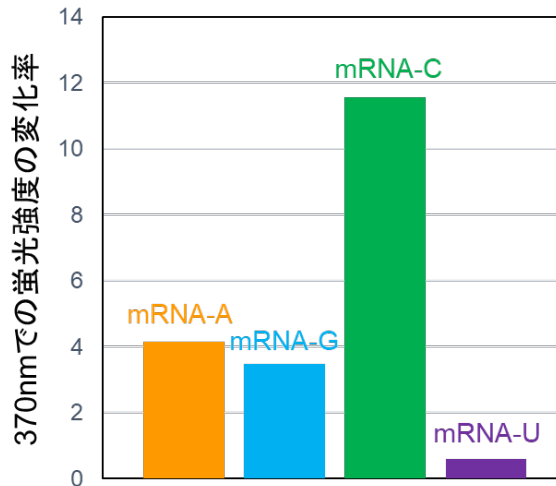
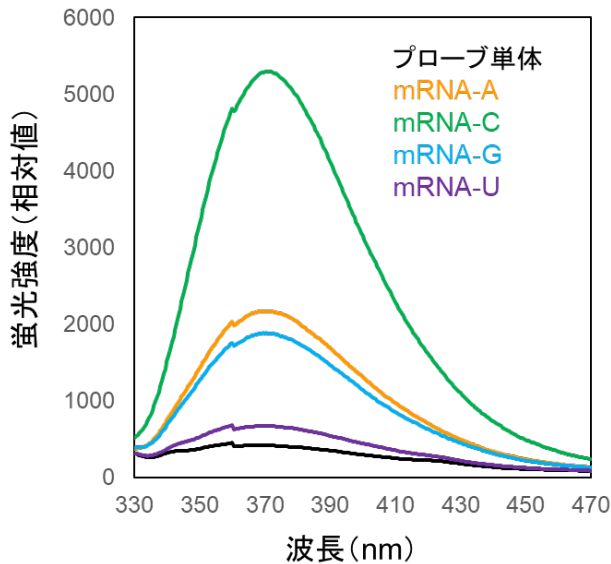


0.01 mM A-Probe, 0.01 mM SNP-mRNA
10 mM MOPS(pH 7), 100 mM NaNO₃, 励起波長 305 nm

mRNA-A存在下で蛍光強度が著しく上昇 ⇒ 検出成功

mRNA-G存在下でも蛍光強度が上昇 ⇒ 安定なWobble型のT-G塩基対を形成

CプローブによるSNP検出

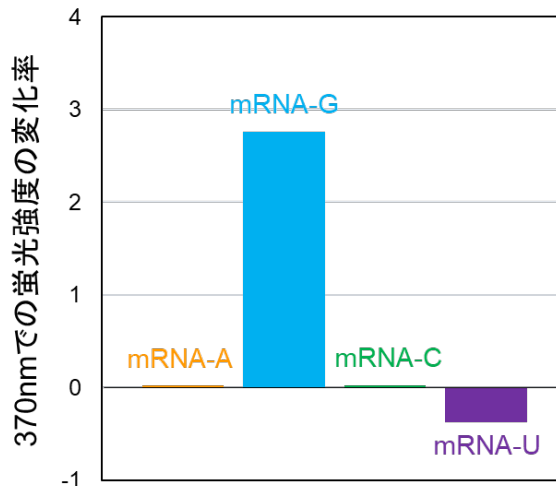
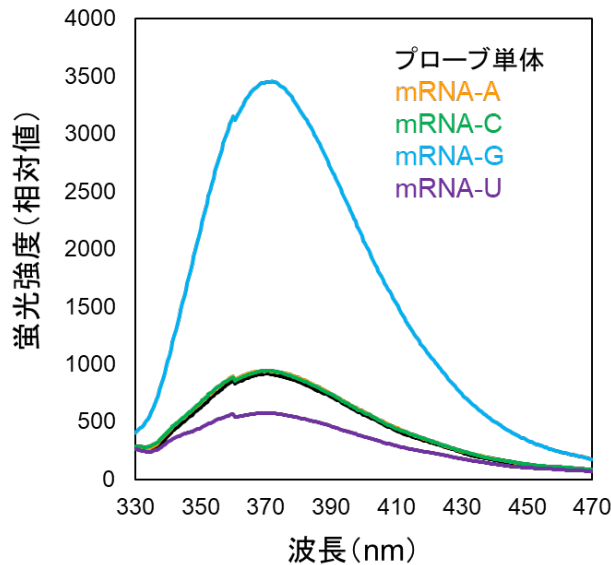


0.01 mM C-Probe, 0.01 mM SNP-mRNA
10 mM MOPS(pH 7), 100 mM NaNO₃, 励起波長 305 nm

mRNA-C存在下で蛍光強度が著しく上昇 ⇒ 検出成功

mRNA-A, mRNA-G存在下でも蛍光強度が上昇 ⇒ 非相補的なG-A, G-G塩基対を形成

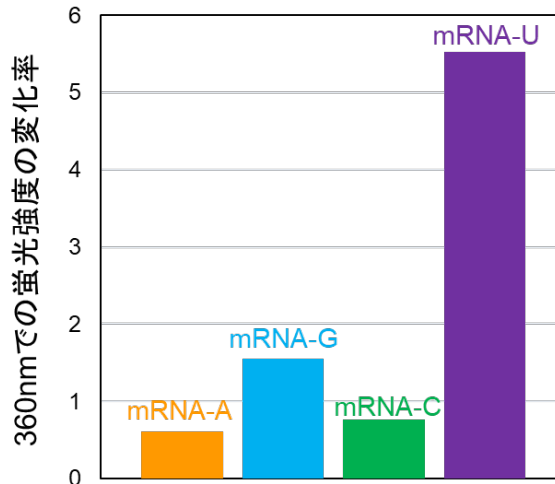
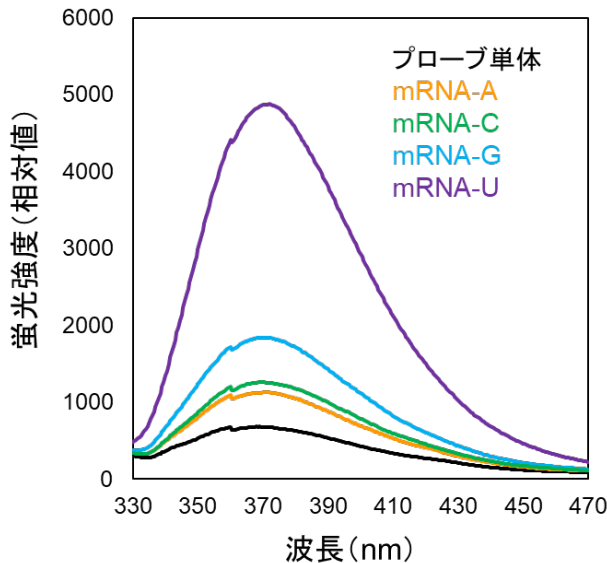
GプローブによるSNP検出



0.01 mM G-Probe, 0.01 mM SNP-mRNA
10 mM MOPS(pH 7), 100 mM NaNO₃, 励起波長 305 nm

mRNA-G存在下で蛍光強度が著しく上昇 ⇒ 検出成功

UプローブによるSNP検出



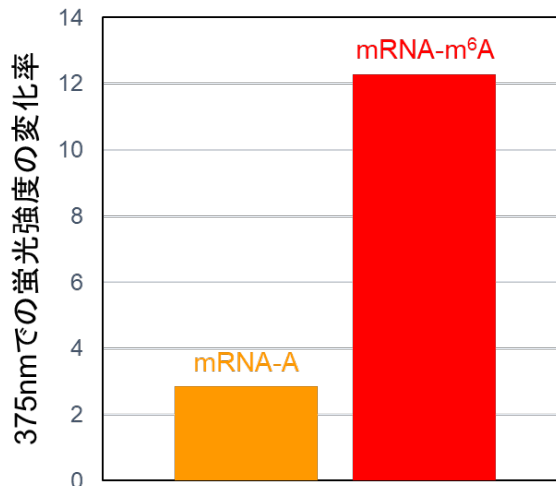
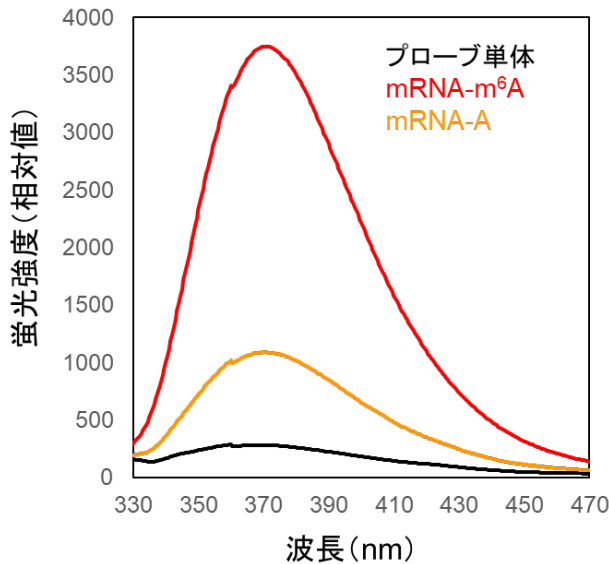
0.01 mM U-Probe, 0.01 mM SNP-mRNA
10 mM MOPS(pH 7), 100 mM NaNO₃, 励起波長 305 nm

mRNA-U存在下で蛍光強度が著しく上昇 ⇒ 検出成功

mRNA-G存在下でも蛍光強度が上昇 ⇒ 非相補的なA-G塩基対を形成

実験② mRNA中のメチル化修飾の検出

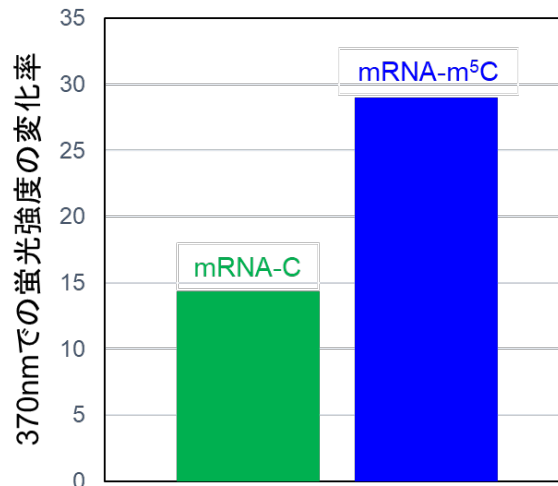
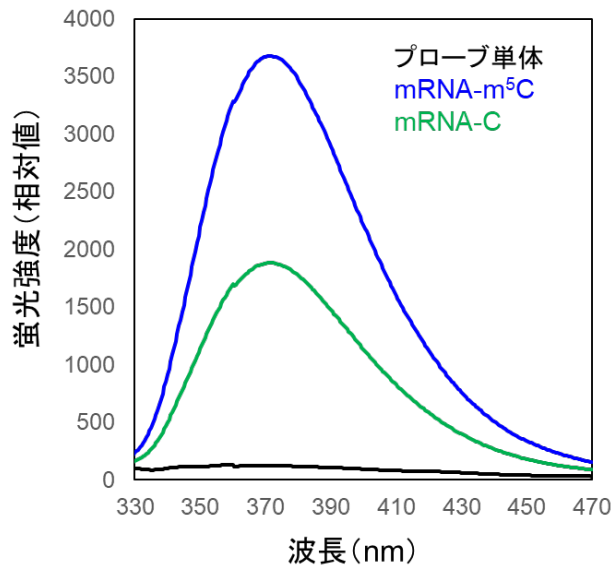
Aプローブによる6-methyl-Aの検出



0.01 mM A-Probe, 0.01 mM SNP-mRNA
10 mM MOPS(pH 7), 100 mM NaNO₃, 励起波長 305 nm

**mRNA-m6A存在下で蛍光強度が著しく上昇
mRNA-Aと比較して3.4倍上昇 ⇒ 検出成功**

Cプローブによる5-methyl-Cの検出



0.01 mM C-Probe, 0.01 mM SNP-mRNA
10 mM MOPS(pH 7), 100 mM NaNO₃, 励起波長 305 nm

**mRNA-m⁵C存在下で蛍光強度が著しく上昇
mRNA-Cと比較して2.0倍上昇 ⇒ 検出成功**

本技術の概要

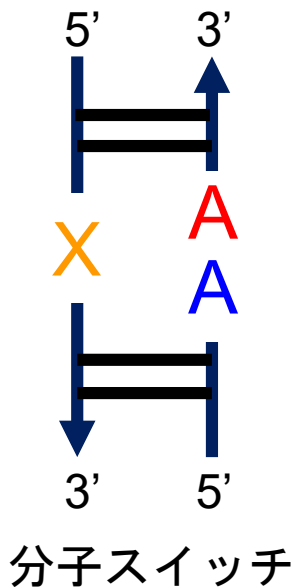
- ◆ 一塩基多型SNPを高感度に検出できる
- ◆ 複数のプローブを組み合わせて使えば、より正確に一塩基多型を検出できる
- ◆ わずか一塩基のメチル化修飾を高感度に検出できる

水銀イオンなどの重金属イオン検出プローブ

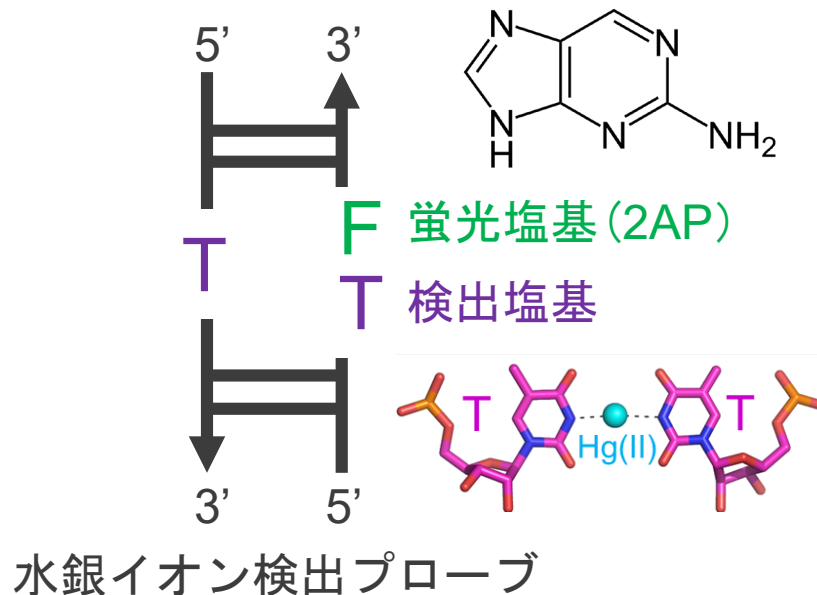
金属イオン捕捉剤

- 出願番号：特願2022-143419
- 出願人：学校法人 上智学院
- 発明者：近藤 次郎

スイッチを模倣した水銀イオン検出プローブ

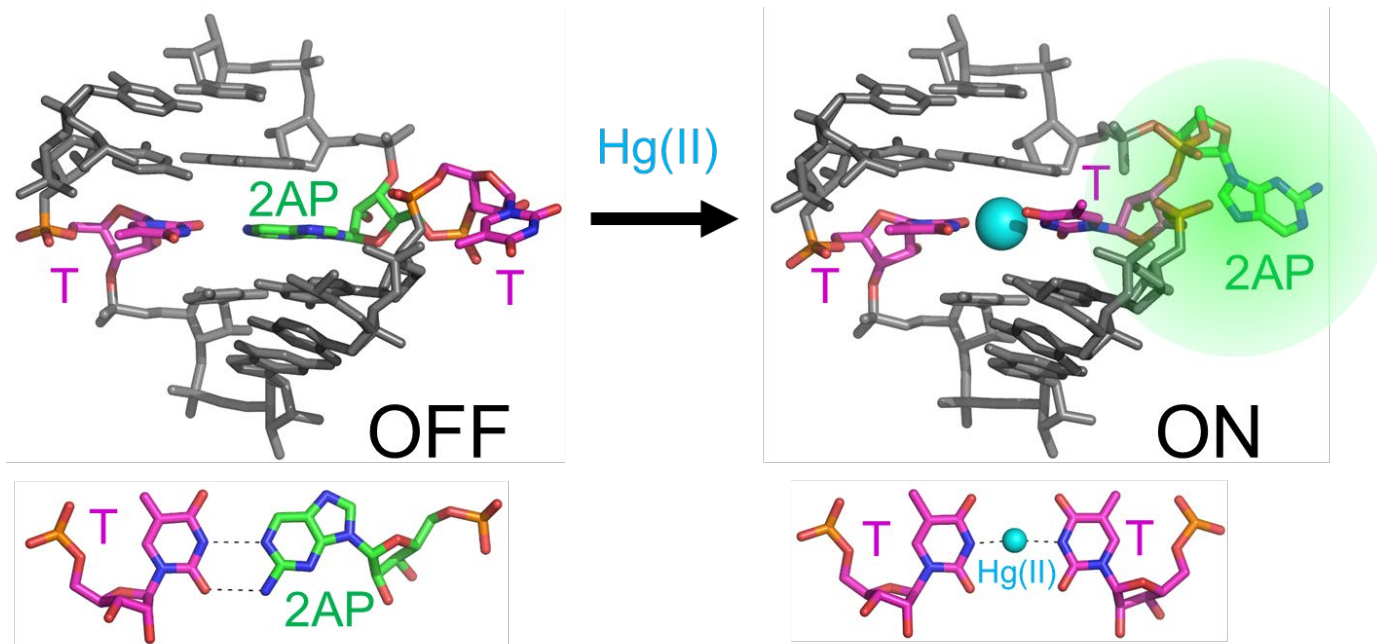


模倣
→



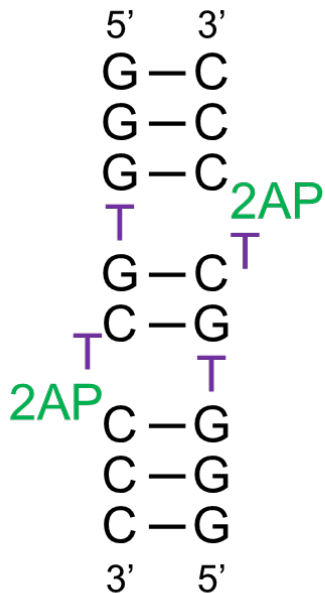
Hg(II)はTT mismatchesに選択的に結合
(神奈川大 小野晶教授のグループ)

水銀イオン検出プローブの想定される作動機構

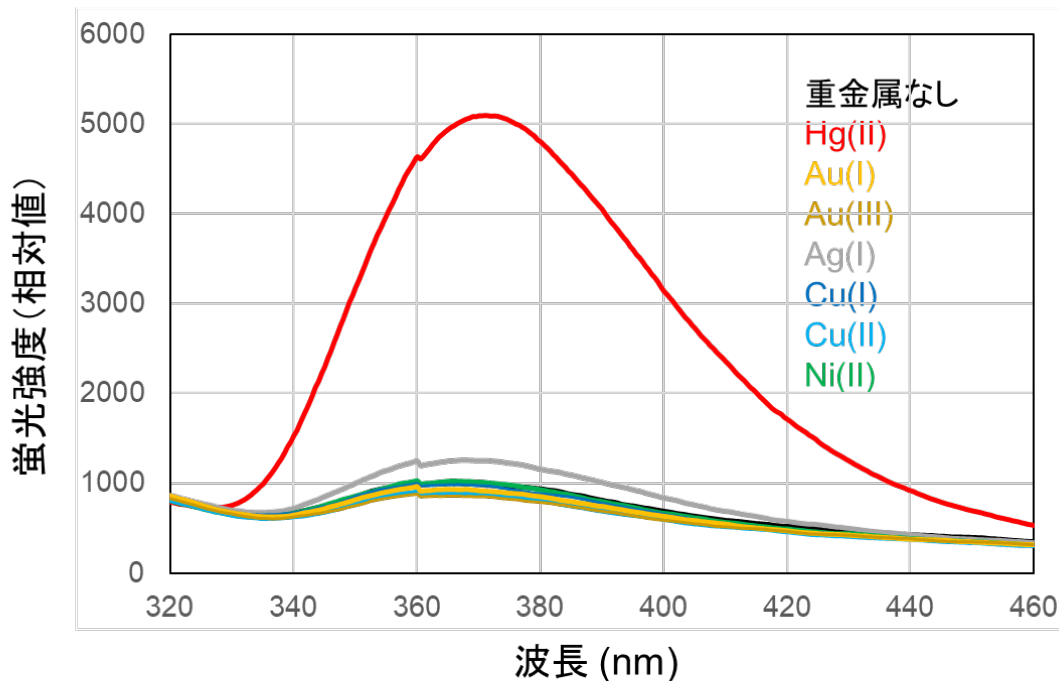


水銀イオンを含む溶液に添加する
⇒ T-Hg(II)-T塩基対を形成する ⇒ 蛍光強度が増加する

水銀イオンの特異的検出



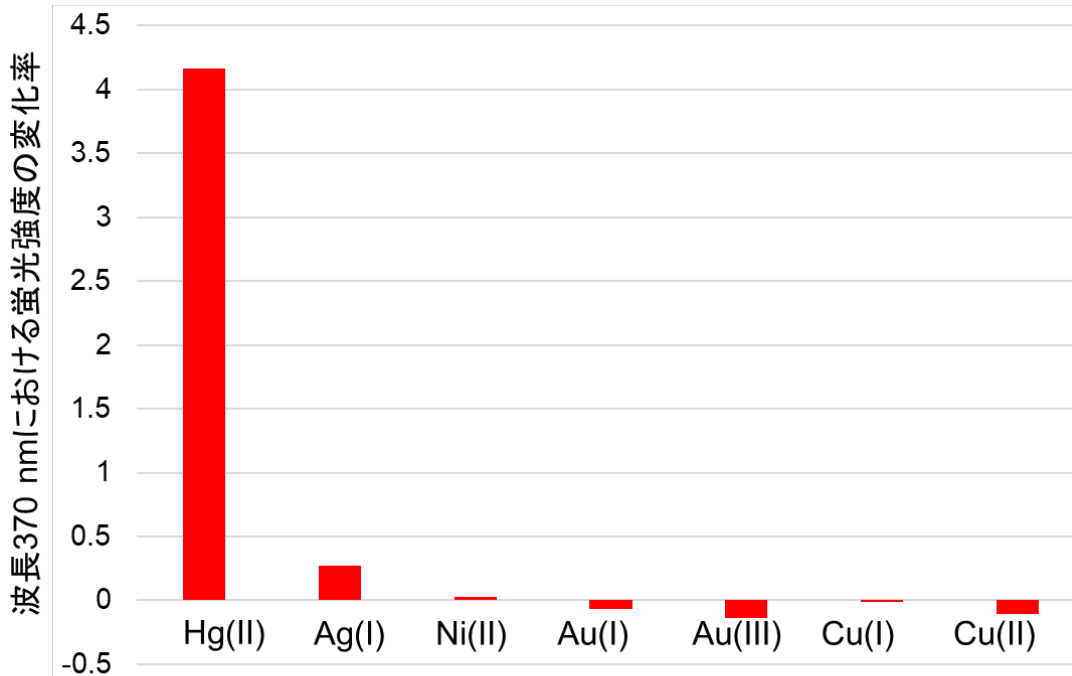
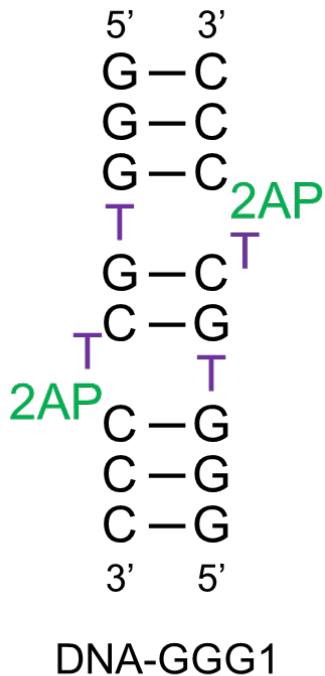
DNA-GGG1



0.02 mM センサー, 0.02 mM 金属塩
100 mM NaNO₃, 10 mM MOPS(pH 7), 励起波長 280 nm

Hg(II)を添加したときのみ蛍光強度が著しく上昇 ⇒ 検出成功

水銀イオンの特異的検出



蛍光強度の変化率 $\Delta F = (F_{\text{金属存在下}} - F_{\text{金属なし}}) / F_{\text{金属なし}}$

Hg(II)を添加したときにのみ蛍光強度が著しく上昇 ⇒ 検出成功

本技術の概要

- ◆ 水銀イオンを特異的かつ高感度に検出できる
- ◆ 検出塩基を変えることで他の重金属イオンを検出することも可能

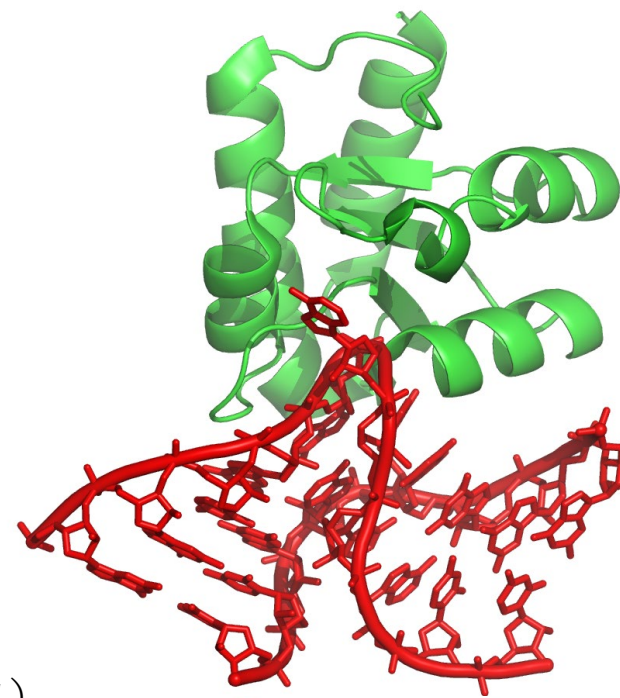
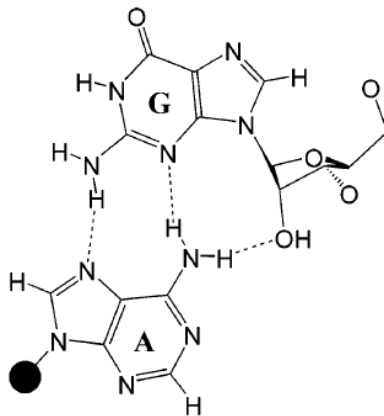
塩基配列特異的な核酸標識プローブ

蛍光標識核酸プローブ

- 出願番号：特願2021-126617
- 出願人：学校法人 上智学院
- 発明者：近藤 次郎

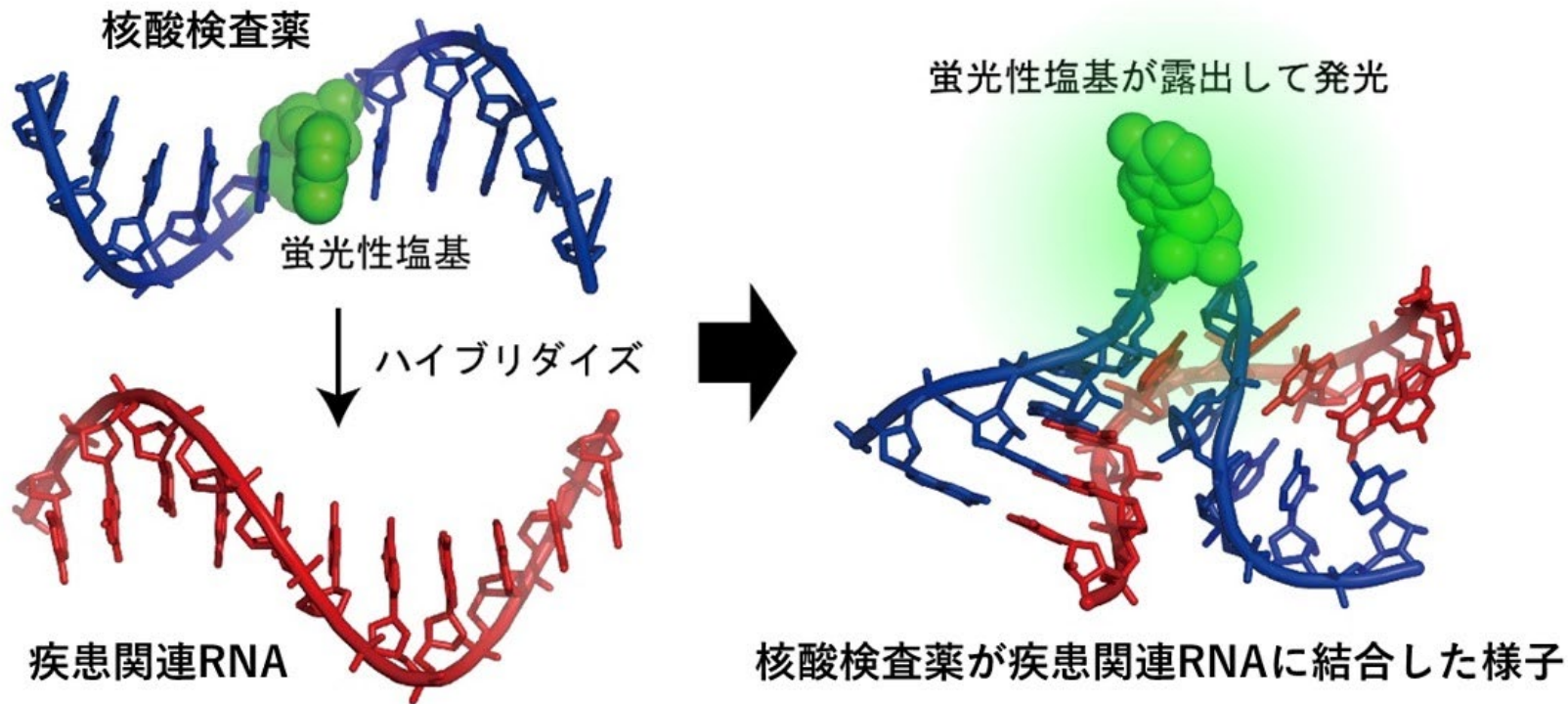
Kink-turnモチーフを模倣する

- ◆ 様々なRNA中に存在する立体構造モチーフ
- ◆ 二本鎖が約50°折れ曲がる
- ◆ 様々なタンパク質が結合する



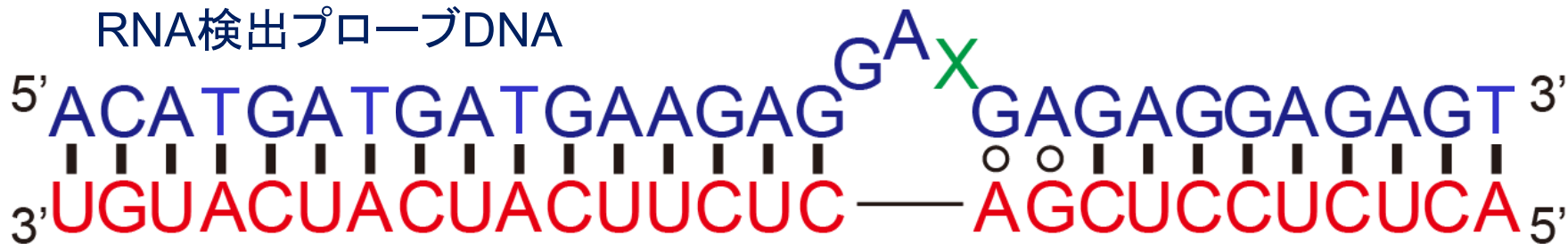
Kink-turnモチーフ (Klein *et al.*, 2001, *EMBO J.*)

塩基配列特異的RNA検出プローブ

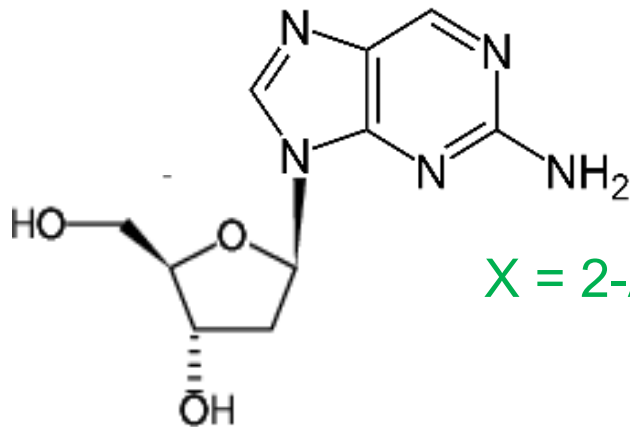


塩基配列特異的RNA検出プローブ

RNA検出プローブDNA

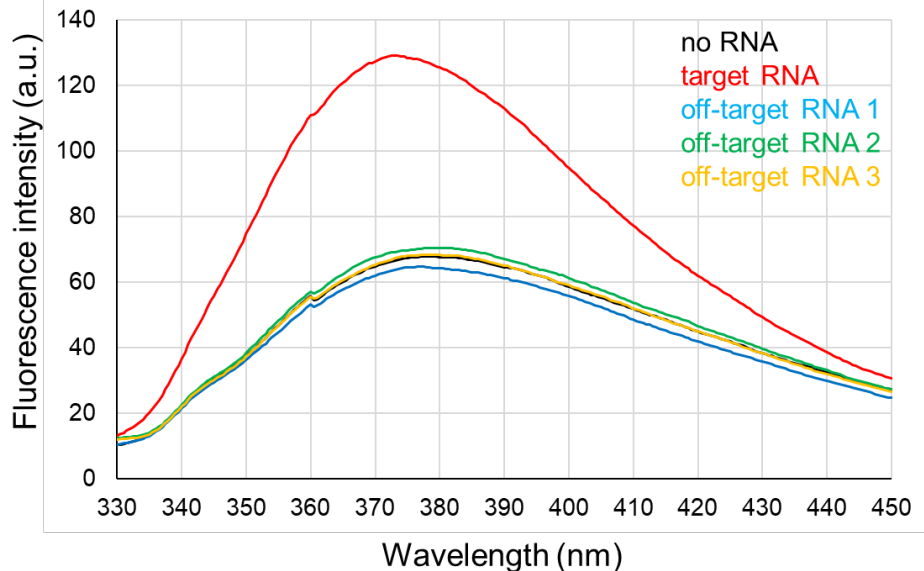


標的RNA

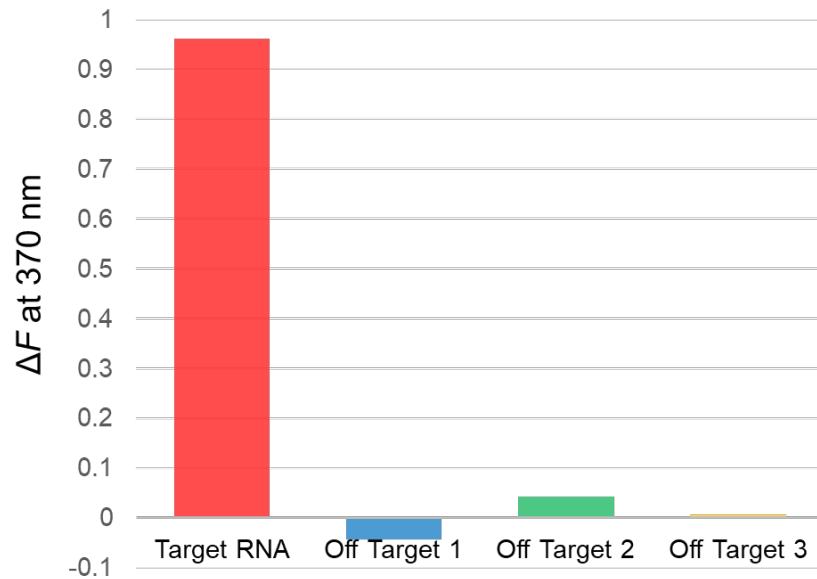


X = 2-Aminopurine (2AP)

塩基配列特異的RNA検出プローブの機能解析



0.01 mM DNA-based XFO sensor, 0.01 mM Target or Off target RNA
10 mM Na Cacodylate (pH7), 100 mM NaCl, Excitation wavelength 305 nm

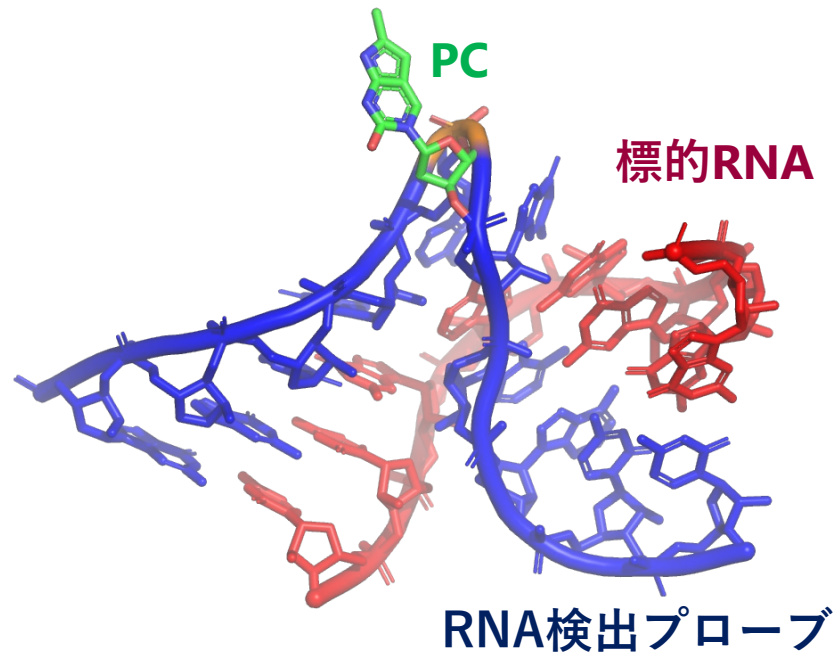
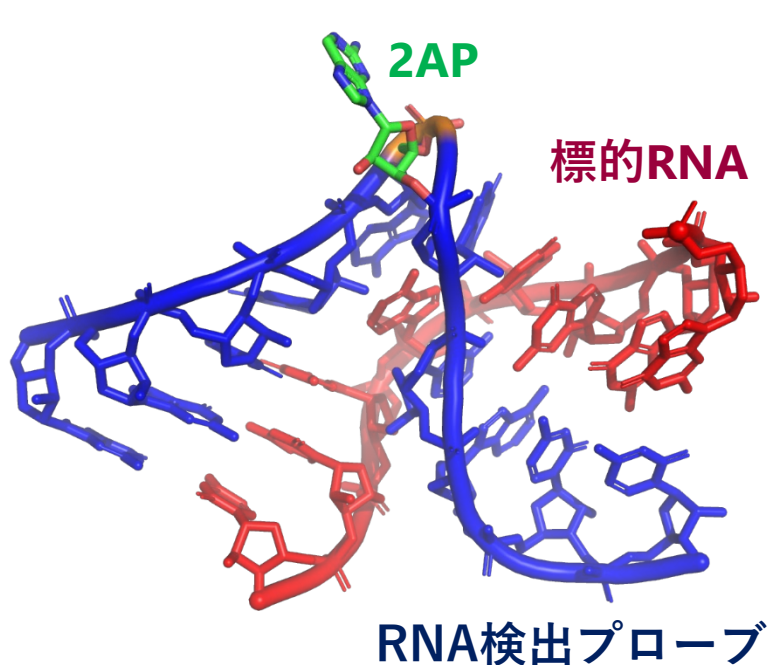


Fluorescence intensity change rate at 370 nm

$$\Delta F = (F_{with RNA} - F_{no RNA}) / F_{no RNA}$$

**Kink-turnモチーフを模倣してデザインしたプローブは
標的RNAを塩基配列特異的に検出した**

塩基配列特異的RNA検出プローブの構造解析



Kondo *et al.*, in preparation

導入した蛍光性塩基はデザインどおりに分子の外側に露出していた

本技術の概要

- ◆ **miRNAやmRNAを塩基配列特異的に高感度に検出**
⇒ **ガンなど疾病の早期発見**
RNAウイルス感染の検査

脳腫瘍：miR-21

食道がん：miR-184a

肺がん：miR-25, miR-223, miR-21, miR-17-3p, miR-155

乳がん：miR-195

肝臓がん：miR-500

大腸がん：miR-17-3p, miR-92

卵巣がん：miR-141, miR-200

前立腺がん：miR-141

白血病：miR-98

リンパ腫：miR-21

ご紹介した技術に関する知的財産権

① 核酸塩基検出剤

- 出願番号：特願2023-194666
- 出願人：学校法人 上智学院
- 発明者：近藤 次郎

② 金属イオン捕捉剤

- 出願番号：特願2022-143419
- 出願人：学校法人 上智学院
- 発明者：近藤 次郎

③ 蛍光標識核酸プローブ

- 出願番号：特願2021-126617
- 出願人：学校法人 上智学院
- 発明者：近藤 次郎

上智大学 学術情報局
研究推進センター

TEL: 03-3238-3173

FAX: 03-3238-4116

g_rant-co@sophia.ac.jp



上智大学
SOPHIA UNIVERSITY

FOR OTHERS, WITH OTHERS