

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	標的miRNAの3'末端における鎖長多様性を識別する人工核酸プローブの開発
Title(English)	
著者(和文)	飯島良紘
Author(English)	Yoshihiro Iijima
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9401号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:清尾 康志,関根 光雄,湯浅 英哉,林 宣宏,大窪 章寛,相澤 康則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9401号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	分子生命科学	専攻	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 (理学)
学生氏名： Student's Name	飯島 良紘		指導教員 (主)： Academic Advisor(main)	清尾 康志 准教授
			指導教員 (副)： Academic Advisor(sub)	関根 光雄 教授

要旨 (和文 2000 字程度)
Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

microRNA (miRNA)は 22 塩基程度の non-coding RNA の一種であり、遺伝子の転写後調節を介して、細胞の分化や増殖、成長、代謝、アポトーシスといった生命現象に関わっている。最近になって、細胞中では各々の miRNA は、前駆体 pre-miRNA に加えて、主に 3'末端の鎖長がわずかに数塩基異なるもの(isomiR)との混合物として存在することが明らかになってきた。しかし、この isomiR の生物学的な意味やその生成機構については、十分な知見が得られていない。その原因として、miRNA の検出において、標的 miRNA と同じ配列を含む isomiR と識別する手法が確立していないことが挙げられる。

当研究室では過去に、塩基部がリン酸化シクロヘキシル基によって修飾されたデオキシアデノシン誘導体である dA*を 5'末端に有するオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)が、長鎖 RNA よりも標的とする鎖長の RNA と強く結合することを報告している。この RNA の鎖長に対する選択性は、dA*残基中のリン酸化シクロヘキシル基と標的 RNA との疎水性相互作用および CH- π 相互作用による二重鎖の安定化、ならびに長鎖 RNA との立体障害および静電反発による二重鎖の不安定化によると考えられている。そのため、このリン酸化シクロヘキシル基の位置を制御することによって、RNA の鎖長に対する選択性が向上する可能性がある。

そこで本博士論文では、リン酸化シクロヘキシルアデニン A*を有する人工核酸を設計・合成し、それらの構造と miRNA の鎖長に対する選択性との関係性を評価した。さらに構造最適化された dA*誘導体を有する ODN を用いて、逆転写 PCR 法によって標的 miRNA と isomiR の識別をおこなった。

第一章では、A*を有するペプチド核酸(PNA)について述べる。PNA 骨格は DNA 骨格と比較して柔軟であることが報告されており、RNA の鎖長に対する選択性への影響に興味をもたれる。そこで、PNA のアミノ末端への A*の導入法を検討した。種々検討したところ、固相担体上での PNA のリン酸化反応を新たに見出すことによって、A*を有する PNA の効率的な合成に成功した。二重鎖形成能を測定したところ、A*を有する PNA は、RNA の鎖長に対する選択性が、dA*を有する DNA よりも低下することを明らかにした。

第二章では、dA*の 3'側のリン酸骨格を固定した ODN について述べる。dA*残基の 3'側のリン酸骨格の回転を抑制することによってリン酸化シクロヘキシル基の位置が固定されると、RNA の鎖長に対する選択性が向上する可能性がある。そこで、dA*の 3'側のリン酸基とデオキシウリジンの塩基部 5 位をプロピレンリンカーによって架橋することを考えた。この架橋を有する二量

体 dA*c3dU は、5 位にヒドロキシプロピル基を有するデオキシウリジン誘導体とデオキシアデノシンのホスホロジアミダイト誘導体とのカップリングによって合成し、ODN の 5'末端に導入した。こうして得られた dA*c3dU を 5'末端に有する ODN を用いた二重鎖融解温度測定および逆転写反応によって、miRNA の鎖長に対する選択性を評価した。その結果、5'末端に dA*c3dU を有するプライマーは、架橋をもたない dA*を有するプライマーよりも、miRNA の鎖長に対する選択性が低いことを明らかにした。

第三章では、dA*の塩基の配向を *anti* に固定した ODN について述べる。dA*の塩基部が *anti* を向くようにグリコシド結合の回転を抑制することによってリン酸化シクロヘキシル基の位置が固定されると、RNA の鎖長に対する選択性が向上する可能性がある。そこで、このグリコシド結合の回転を抑制するために、糖部 5'水酸基とアデニン環 8 位をエーテルで架橋した 8odA*を有する ODN を設計した。量子化学計算および分子動力学計算をおこなったところ、8odA*を有する ODN が標的 RNA との二重鎖を安定化することが示唆された。種々検討したところ、糖部 5'水酸基とアデニン環 8 位のエーテル架橋によるデオキシアデノシンの環化反応を新たに見出すことで、8odA*を 5'末端に有する ODN の合成に成功した。つづく二重鎖融解温度測および定逆転写反応によって、8odA*を有するプライマーは、架橋をもたない dA*を有するプライマーよりも、miRNA の鎖長に対する選択性が低いことがわかった。

第四章では、dA*を有するプライマーを用いて、逆転写反応、残存 RNA の分解、相補鎖 DNA の鎖伸長反応、PCR の 5 つの反応からなる逆転写 PCR 法による miRNA の検出をおこなった。そこで、第二章および第三章の結果から構造最適化された、架橋構造をもたない dA*を有するプライマーを用いて逆転写 PCR 法をおこなった。その結果、標的の鎖長を有する miRNA が isomiR よりも有意に速く増幅され、従来用いられていたヘアピン型プライマーを用いた逆転写 PCR 法ではなしえなかった miRNA と isomiR の識別に成功した。本博士論文研究によって、isomiR に関する研究のさらなる進展が期待される。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	分子生命科学	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 (理学)
学生氏名 : Student's Name	飯島 良紘		指導教員 (主) : Academic Advisor(main)	清尾 康志 准教授
			指導教員 (副) : Academic Advisor(sub)	関根 光雄 教授

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

microRNAs (miRNAs) are ~22-nucleotide non-coding RNAs that regulate physiological process as the post-transcriptional regulator of gene expression. Recently, it has been revealed that individual miRNAs co-exist with pre-miRNAs, which are precursors of mature miRNAs, and isomiRs, which are length variants of miRNAs that contain the same sequence but include length variety mainly at their 3'-terminus. However there are few suitable methods to discriminate among the miRNA length variants. That was why our group previously reported that oligodeoxynucleotide (ODN) containing dA* residue, deoxyadenosine derivative containing phosphorylated cyclohexane moiety, at its 5'-terminus bound to length-match RNA more tightly than to long RNA. In this report, mimics of the ODN containing dA* were synthesized to make clear the relationship between their structure and the discriminating ability among miRNA length variety. In the chapter 1, synthesis and properties of PNA containing A* at N-terminus was described. Phosphorylation of PNA on the solid phase was developed to perform efficient synthesis of PNA containing A*. It was shown that PNA containing A* has low selectivity on the length of RNAs than DNA containing dA*. In the chapter 2, ODN containing the restricted DNA backbone and dA* was synthesized in order to fix the position of dA*. In the chapter 3, ODN containing the restricted glycosidic bond and dA* was designed and synthesized in order to fix the base to *anti* conformation. UV melting temperature and Reverse transcription of miRNAs using these ODNs revealed that ODN containing dA* without any conformational restriction showed the highest selectivity on the miRNA length variety among them. In the chapter 4, RT-PCR using the optimized ODN made clear that RT-PCR using the optimized ODN enabled the length-selective detection of the target miRNA. Moreover, this strategy successfully discriminated the target miRNA from the isomiRs and the pre-miRNA. This result suggested the possibility of the direct detection of the target miRNA from RNA pool containing isomiRs and pre-miRNAs.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).