

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14933

研究課題名(和文)核酸配列上での発光分子構築反応の開発と遺伝子検出技術への応用

研究課題名(英文) Building up the bioluminescence molecule on the nucleic acid sequence and its application to gene detection technology

研究代表者

小島 直 (KOJIMA, Naoshi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：30356985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、遺伝子検出技術の分野では未開拓であった“生物発光”を利用した新しい遺伝子検出システムの開発を目標に、以下の2つの研究を進めた。課題1) 遺伝子配列情報を生物発光シグナルに変換する技術の開発。具体的には、標的配列への結合を引き金にして発光基質を放出する新規核酸プローブのデザインとその化学合成、課題2) 核酸プローブの機能の強化を目指した、正電化を有するグアニジン核酸をオリゴヌクレオチドに導入するための技術開発を行った。

研究成果の概要(英文)：In this research, I focused on the to development of a novel gene detection system by utilizing "bioluminescence", which was unexplored in the field of gene detection technology. To achieve this goal, I carried out the following two studies. In the first study, I developed a system to convert sequence information into bioluminescence signal. I designed and chemically synthesized novel nucleic acid probe that releases a bioluminescent substrate upon binding to the target sequence. In the second study, I have developed the method for introducing guanidine nucleic acid, which possesses positive charges instead of negative charges, into oligonucleotide with the aim to strengthen the function of nucleic acid probe.

研究分野：核酸化学、生物有機化学

キーワード：遺伝子検出 生物発光 ルシフェリン 核酸プローブ 核酸化学

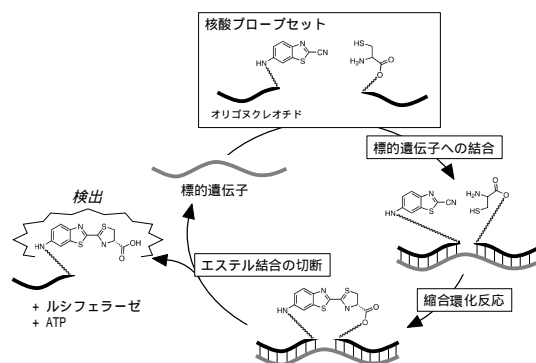
1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム解読技術の飛躍的な発展により、莫大な量の遺伝情報が入手可能になった。現在では癌などのリスク評価等、様々な病気の予知や診断、さらには個人の遺伝情報を解読することで患者に合わせた治療法の選択（テーラーメイド医療）が可能になりつつある。一方で、遺伝情報の解読が進むにつれ、細胞内に微量にしか発現していない遺伝子や非コード RNA を高感度且つ簡便に検出する技術の開発が望まれるようになった。従来、遺伝子の検出手法としては、配列の相補性を利用した検出技術が汎用されており、そのほとんどには蛍光分子が導入された核酸プローブが利用されている（TaqMan Probe 法、QProbe 法等）。これらの核酸プローブでは、標的遺伝子に結合したときの蛍光強度の変化により遺伝子を検出している。しかしながら細胞にはタンパク質等の様々な分子由来の自然蛍光が存在するため、高感度な検出には限界があった。

2. 研究の目的

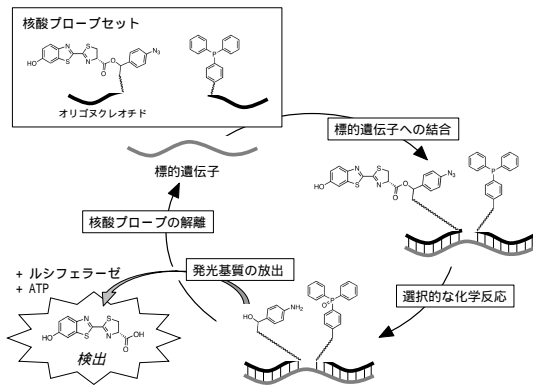
上記の問題を解決するため、本研究課題では小型で安価な汎用装置による高感度検出が可能な“生物発光”を利用した遺伝子検出技術の開発を提案した。本研究では、遺伝子の配列情報を生物発光として捉えるための新しい仕組みとして、2つのシステムを開発を目指す。第1のシステムは、標的配列上で発光分子を化学的に構築する核酸プローブ（図1）第2のシステムでは、標的配列への結合を引金に発光分子を放出する核酸プローブである（図2）。さらに、snRNA や miRNA 等の短鎖核酸配列にも安定した結合を可能にするため、提案者らが開発に成功したグアニジン核酸をプローブ部位に導入する。グアニジン核酸では、グアニジニウム基由来の正電荷により標的配列との高い親和力が期待され、また種々の核酸分解酵素にも耐性があるため、実用的なプローブの設計が可能になると期待された。

図1. 発光分子構築反応を利用した遺伝子検出システム



生物発光は細胞内外の夾雑分子由来のバックグラウンドが存在しないため、極めて高感度な検出が可能である（Nakajima, Y. *et al. Biotechniques* 38, 891, 2005）。本研究では、

図2. 発光分子放出反応を利用した遺伝子検出システム



遺伝子検出分野では今まで利用されていなかった生物発光を導入することで、従来の蛍光分子を用いた検出法よりも高感度での遺伝子検出を可能にする新規技術を目指した。さらに本研究では、静電的相互作用により標的配列に強く結合するグアニジン核酸を核酸プローブに導入することで、従来技術では困難であった短鎖遺伝子配列を標的とした核酸プローブの設計技術確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究課題では、遺伝子検出技術としては未開拓であった“生物発光”を利用した全く新しい遺伝子検出システムの確立を目指し、遺伝子配列情報を生物発光に変換するためのシステムを開発する。

第1のシステムでは、遺伝子配列情報を生物発光シグナルに変換する手法として、遺伝子配列上で発光分子（ルシフェリン）を化学的に構築する新規核酸プローブを開発する（図1）。本システムでは2つの核酸プローブを用い、片方にシアノベンゾチアゾール誘導体、もう片方のプローブにシステイン誘導体を連結する。2つの核酸プローブが標的配列上に隣接して結合すると縮合環化反応が誘起され、その結果、ルシフェリンが構築される。エステル部位の加水分解後に酵素（ルシフェラーゼ）およびATPを作用させることで、遺伝子の有無を生物発光により検出することが可能になると考えた。

第2のシステムでは、一方のプローブに発光基質を *p*-アジドベンジル基を有するリンカーにより連結し、もう一方の核酸プローブにはホスフィン基を導入する（図2）。これらのプローブが標的遺伝子上に隣接して結合すると、ホスフィン基によるアジド基の選択的な還元反応（Staudinger 反応）が誘起される。これによりアジド基がアミノ基に変換され、アミノ基からの電子移動に伴う脱離反応により発光基質が放出される。放出された発光基質を酵素により発光させることで検出が可能になる。

いずれのシステムにおいても、2つの核酸プローブが配列上に正しく結合した時のみ化学反応が進行するため、配列選択的な検出

が可能になる。さらに本システムでは、反応後に標的遺伝子が新しい核酸プローブと再結合・再反応することで、シグナルの化学的な増幅が可能であり、更なる高感度化も期待される。

本研究ではグアニジン核酸を利用した機能性核酸プローブの開発を進める。グアニジン核酸 (deoxy-ribonucleic guanidine: DNG、図3) は提案者らが開発した人工核酸であり、DNA のリン酸ジエステル結合がグアニジニウム結合に置き換わったユニークな構造を持つ。そして、グアニジニウム基由来の正電荷を有していることが最大の特徴である (Kojima, N. & Bruice, T. C. *Org. Lett.* 2, 81, 2000, Linkletter, B. A. *et al. Nucleic Acids Res.* 29, 2370, 2001)。

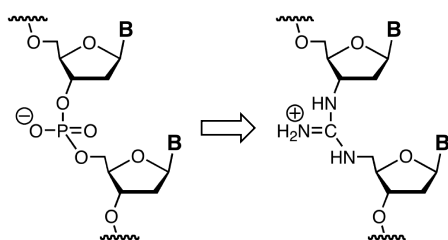


図3. グアニジン核酸の構造

既に短鎖のグアニジン核酸が標的配列と非常に強く結合することが報告されているが (Park, M. *et al. Bioorg. Med. Chem.* 14, 1743, 2006) 何れも限られた配列について報告されているのみであり、通常の DNA に導入したときの影響についてはほとんど解明されていない。本研究で提案者はグアニジン核酸をプローブ配列の一部に導入することで、1) 静電的相互作用による標的配列への結合力の増強、2) 種々の核酸分解酵素に対する耐性の獲得、及び3) 細胞表面のリン酸残基との相互作用による細胞内取り込み効率の向上、の効果により、より実用化に適した核酸プローブの創製が可能になると考えた。また結合力の向上により核酸プローブ長の短鎖化が可能となれば、miRNA 等の 20 残基程度の短鎖遺伝子配列を標的としたプローブの設計も可能となる。上記2つの技術を融合することで、蛍光分子を用いた既存の遺伝子検出システム (検出感度: 1nM 程度) よりも 100 倍優れた感度 (0.01nM) での検出の達成を目指す。

4. 研究成果

1) 核酸プローブの化学合成:

研究初年度は、“発光基質構築型核酸プローブ”についての開発を進めた。シアノベンゾチアゾール誘導体、およびシステイン誘導体をそれぞれ配列末端に導入した核酸プローブをデザインし、合成を進めた。2つのプローブが標的配列上に隣接して結合すると、シアノ基とシステイン間での縮合環化反応が起きルシフェリンが構築される。なお、ル

シフェリンは 6'-位水酸基のアルキル化により発光活性が失われるため、構築するルシフェリンは 6'-位アミノ誘導体とし、この部位で核酸と連結するデザインとした。合成した2つの分子を弱塩基性水溶液中で混合することで、計画通りにルシフェリン分子が構築されることを確認出来た。

研究2年目では、“発光基質放出型核酸プローブ”についての開発を進めた。ここでは発光基質 (ルシフェリン) が *p*-アジドベンジル基を介して結合したプローブ分子が必要となるため、この分子についての化学合成を行った。また合成したプローブ分子では、トリフェニルホスフィン試薬によりアジド基が選択的に還元され、ルシフェリンが定量的に放出されることが確認できた。

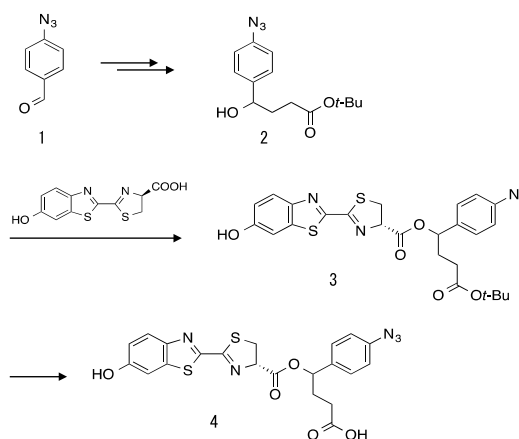


図4. プローブ分子の合成 (1)

以上のように、研究2年目までに2つのシステム構築に必要な分子の化学合成を重点的に進めた。しかしながらこれらのプローブ分子の化学合成が当初の計画よりも困難であり、想定以上の時間を要した。そこで開発するプローブ分子を“発光基質放出型核酸プローブ”に絞り、以後の研究を進めることとした。当初の合成デザインでは、*p*-アジドベンジルアルコールのベンジル位から核酸と連結させるためのリンカー側鎖を伸ばした分子 (図4、化合物2) を用いていた。しかしながら化合物2と発光基質分子 (ルシフェリン) との縮合反応が低収率でしか進行しないと分かった。これはリンカー側鎖による立体障害が反応の妨げになっていると考えられた。

そこで次に、リンカー側鎖がベンゼン環のオルト位に導入された *p*-アジドベンジルアルコール誘導体 (図5、化合物7) を用いるデザインへと変更した。この化合物7を合成し、ルシフェリン分子との縮合反応を行ったところ、目的とする化合物 (図5、化合物8) が効率良く得られることが明らかとなった。これにより目的とするプローブ分子の合成を達成した。

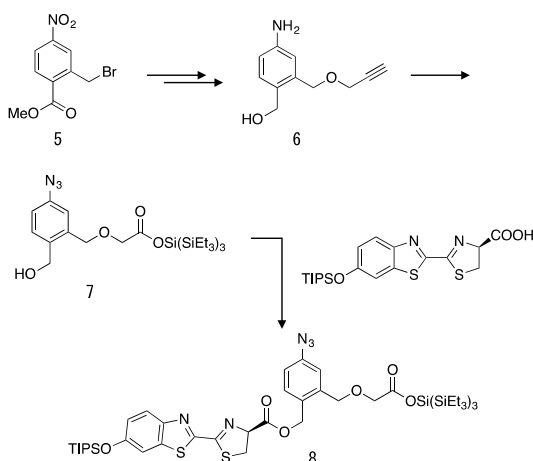


図5. プローブ分子の合成 (2)

2) グアニジン核酸の開発

本研究課題ではさらに、miRNA 等の短鎖核酸配列へのプローブ分子の結合を安定化する技術として、グアニジン核酸を導入した核酸プローブの開発を進めた。グアニジン核酸は、DNA のリン酸ジエステル結合がグアニジンニウム結合に置き換わった核酸誘導体であり、正電荷を有していることが最大の特徴である。本研究では先ず、通常のオリゴヌクレオチド鎖内にグアニジン核酸を部位特異的に導入するための技術開発を行った。その結果、グアニジン核酸を合成核酸の3'-末端部位に導入するための新規ダイマー型固相担体試薬、および配列内部や5'-末端部位に導入可能な新規ダイマー型アミダイト試薬の化学合成を達成した。

続いて、これらの試薬を用いて 16 残基のオリゴヌクレオチドの 3'-末端部位、5'-末端部位、および両末端部位にグアニジン核酸を導入した Gapmer 型 DNA 分子を化学合成した。DNA 分子の合成は核酸自動合成機により行い、3'-末端部位への導入は合成した固相担体を用いて、5'-末端部位への導入はダイマー型アミダイト試薬を用いた。ダイマー型アミダイト試薬の縮合反応は、通常の条件よりも反応時間を延長することにより効率的に進行した。合成した Gapmer 型 DNA 分子は、アンモニア処理により脱保護を行なった後、HPLC により精製することで、いずれも高純度で目的の Gapmer 型 DNA 分子を得ることができた。

続いて合成した Gapmer 型 DNA 分子が、相補鎖配列と形成する二本鎖の熱的安定性に与える影響を、融解温度 (T_m) を測定することにより評価した。その結果、グアニジン核酸を 3'-末端部位のみに導入したもの、5'-末端部位のみに導入したもの、および両末端に導入したもののいずれにおいても、融解温度の若干の低下が観察された。この結果からグアニジン核酸では、当初期待していた相補鎖配列との間の静電的な相互作用は強く働いていないことが示唆された。一方で融解温度の低下がわずかであったことから、二本鎖

は問題なく形成されることが明らかとなった。

以上のように本研究では、当初目標とした各要素技術の開発については、目的をほぼ達成することができた。一方で、核酸プローブユニットの化学合成が想定よりも困難であり時間を要したため、実際の遺伝子検出の実施までは研究を進めることができなかった。現在、上記により得た成果を踏まえて、本研究課題の最終目標である新規高感度遺伝子検出システムの実施に向けた研究を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

栗之丸隆章、小島直、栗田僚二
 “An alkylating immobilization linker for immunochemical epigenetic assessment”
 Chemical Communications、査読有、
 Vol.53, No.59, 2017, pp.8308-8311.
 DOI: 10.1039/c7cc02883k

小綿恵子、小島直、小松康雄
 “Development of a 3'-amino linker with high conjugation activity and its application to covalently cross-link blunt ends of a duplex”
 Bioorganic & Medicinal Chemistry、査読有、Vol.24, No.9, 2016,
 pp.2108-2113.
 DOI: 10.1016/j.bmc.2016.03.039

〔学会発表〕(計4件)

栗之丸隆章、小島直、栗田僚二
 “Immunochemical Sensing of Epigenomic Modification Using An Alkylating Immobilization Linker”
 第44回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2017、日本核酸学会第1回年会) 2017年11月14日、東京理科大学葛飾キャンパス(東京都葛飾区)

栗之丸隆章、小島直、吉岡恭子、栗田僚二
 「抗がん剤を有する新規リンカー分子を用いたメチル化 DNA 免疫センサーの開発」
 日本化学会第97春季年会 2017年3月17日、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県横浜市)

加藤義雄、小島直
 “Site-Specific incorporation of a uracil nucleoside into a protein”
 第42回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2015) 2015年9月24日、イ

グレひめじ（兵庫県姫路市）

加藤義雄、小島 直

「チミンを側鎖とする人工アミノ酸の
タンパク質内への導入」

日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回
年会、2015 年 6 月 12 日、東北大学川内
キャンパス（宮城県仙台市）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：核酸の液中固定化剤

発明者：栗田僚二、小島 直、栗之丸隆章

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2017-033930

出願年月日：平成 29 年 2 月 24 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

産業技術総合研究所バイオメディカル研究
部門 研究グループ紹介 ナノバイオデバ
イス研究グループ

<https://unit.aist.go.jp/bmd/gr/nbd-4/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 直 (KOJIMA, Naoshi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生
命工学領域・主任研究員

研究者番号：30356985