

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17876

研究課題名(和文) 生細胞内での遺伝子検出を指向した分子移動型プローブの開発

研究課題名(英文) Development of the molecular transfer based oligonucleotide sensing probe

研究代表者

柴田 綾 (SHIBATA, Aya)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：50462693

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)：生細胞内の遺伝子検出法として標的核酸を鋳型とした化学反応プローブがある。この遺伝子検出法の利点は標的核酸を鋳型とした反応サイクルを回すことで、シグナルを増幅することができる点にある。

本研究では、生細胞内での遺伝子検出が実用可能なプローブの構築を目指し、芳香族求核置換反応を利用した転移型遺伝子検出プローブの開発を試みた。そして、消光剤であるメチルオレンジを連結した転移部位を組み込んだ転移プローブが標的DNA存在下で芳香族求核置換反応により分子移動することを確認した。

研究成果の概要(英文)：There is chemical reaction probe as genetic detection method in live cell. This strategy exploits the target strand as a template for two functionalized probes and provides a simple molecular mechanism for multiple turnover reactions.

We tried development of the molecular transfer based oligonucleotide sensing probe which is triggered by a nucleophilic aromatic substitution (SNAr) reaction. We synthesized the molecular-transfer probe which combined methyl orange (MO). In using this probe, we confirmed that MO transfers under the target DNA existence.

研究分野：分析化学

キーワード：遺伝子検出 芳香族求核置換反応

1. 研究開始当初の背景

生細胞内でのRNAイメージングの報告はこれまでのところごく少数に限られ、確立した方法がないのが現状である。そのため、実用的なプローブの開発が望まれている。生細胞内の遺伝子検出法として標的核酸を鋳型とした化学反応プローブがある。この遺伝子検出法の利点は標的核酸を鋳型とした反応サイクルを回すことで、シグナルを増幅することができる点にある。しかし現在の所、生細胞内で検出できるRNAはアクチン等の細胞内で発現量の多い遺伝子に限られており、さらなる検出感度の向上が求められている。加えて、これらのプローブの多くは蛍光基質の構造変化をシグナル発生の鍵としているため、使用できる蛍光波長に制限があった。申請者はこれまでに芳香族求核置換反応を利用した化学反応プローブを用いて0.5 pMの微量遺伝子のシグナルを1500倍に増幅することに成功している。しかし、青色蛍光のクマリンを用いていたため生細胞内への応用は困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、生細胞内での遺伝子検出が実用可能なプローブの構築を目指し、芳香族求核置換反応を利用した検出プローブの高いシグナル増幅能を維持したまま、多色化が容易に行えるプローブの開発を目的とした。

3. 研究の方法

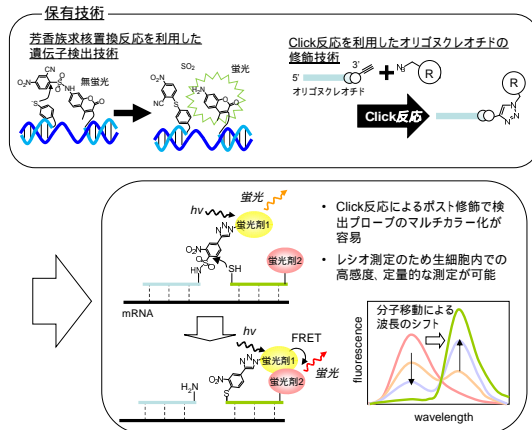


図1 S_NAr 反応を利用した転移型遺伝子検出プローブの開発

芳香族求核置換反応 (S_NAr 反応) を用いた検出プローブではテンプレート反応の際に、保護基の部分がもう一方のプローブに転移する。本研究ではその機構に着目して標的配列存在下、化学反応が起こった際に、芳香環部位に連結した分子が移動することで蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が解消もしくは誘起される分子の開発

を試みた。また、プローブの多色化を容易に行うことを目的として、転移部位にはエチニル基を持つ分子を設計した。これによりクリック反応による蛍光色素の導入が可能となり、多色化が容易に行えると考えられる。

本研究では、転移部位の設計・合成を試みた。合わせて求核部位に関してもより生体内での遺伝子検出に適すように改変を試みた。

4. 研究成果

細胞内で活性化される求核部位の設計・合成

申請者の以前の研究から芳香族求核置換反応を行う場合、求核基はチオフェノール基が最適であることが分かっている。一方で、一般的に、化学反応プローブは高濃度で存在する場合、標的配列がない状態でも化学反応が起こってしまう問題がある。そのため、核酸の導入の際に比較的細胞へのダメージが低いリポフェクション試薬は核酸を凝集させる性質を持つため、化学反応プローブの細胞導入に使用することが出来ない。そこで本研究では細胞内に導入されたときにのみ活性化される求核プローブの開発を試みた。具体的には求核基であるチオフェノール部位のチオール基を、ジスルフィド結合を介して保護した。このプローブが細胞内に導入されると、細胞内のチオール類によって結合が切断され、活性部位が露出する。

合成は4-メルカプト安息香酸 (**1**) を出発物質に用い、メチルスルフェニルクロリドと反応させることで保護化合物 **2** を得た。得られた化合物 **2** を GSH と反応させると反応時間1分後には脱保護が完了し、チオール基が露出した4-メルカプト安息香酸 (**1**) に変換されることが UV スペクトルの変化から確認できた。

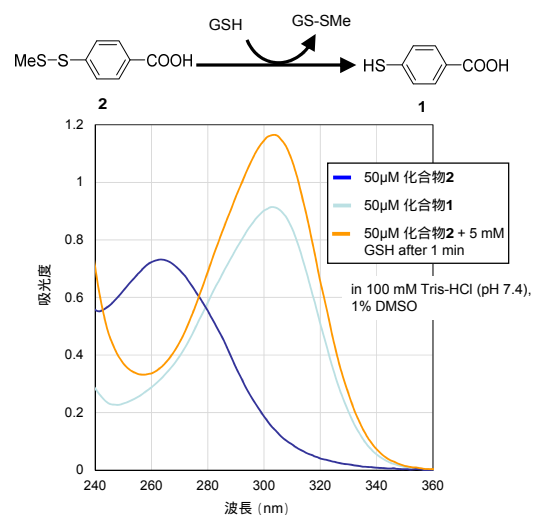


図2 化合物 **2** のUVスペクトル

得られた化合物 **2** のカルボン酸部位を活性エステル化し、化合物 **3** を得た後に3'末端アミノ基修飾オリゴヌクレオチドと反応さ

せることで、求核プローブ (MeS-MBA probe) の合成を行った。

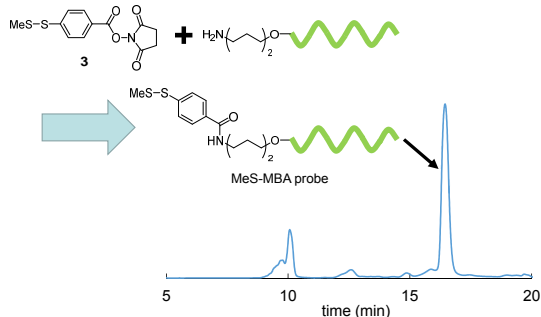
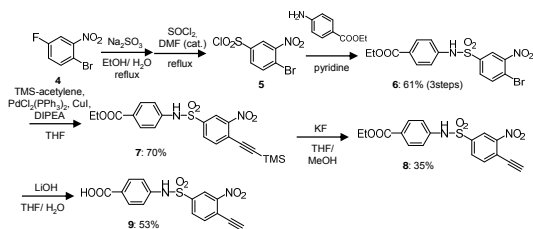


図3 MeS-MBA probe の合成

転移部位の設計・合成

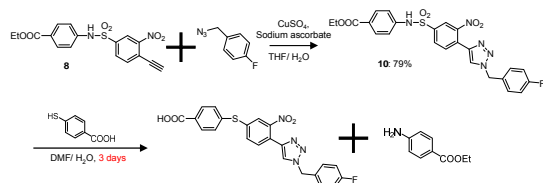
転移部位としてまず始めに化合物 9 を設計した。



Scheme 1 化合物 9 の合成

4-プロモ-2-フルオロ-1-ニトロベンゼンを出発物質とし、スルホニル化、クロロ化を得て化合物 5 を合成した後に 4-アミノ安息香酸エチルと反応させることで、化合物 6 を得た。菌頭反応を用いてエチニル基を導入した化合物 7 を得た。その後、脱 Si 化、脱エステル化を行うことで、目的化合物 9 を得た (Scheme 1)。

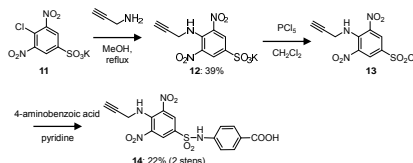
設計した化合物とアジド化合物とのクリック体が 4-メルカプト安息香酸と反応するかを確認した (Scheme 2)。



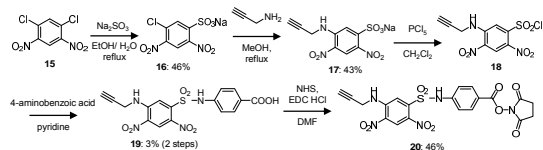
Scheme 2 クリック体 10 の合成および 4-メルカプト安息香酸との反応

クリック体 10 と 4-メルカプト安息香酸を反応させたところ、反応の進行は確認できたものの、反応の完結に 3 日間もかかることが分かった。テンプレート反応の律速段階は化学反応の段階であることがこれまでの知見から分かっているため、この分子は検出プローブの応用することは困難であることが分かった。

S_NAr 反応の反応速度は芳香環に結合する置換基の電子吸引性に依存するため、次にニトロ基を 2 つ結合させた分子での転移分子の合成を試みた。ニトロ基の位置による反応性の違いを検討するために化合物 14 と 19 をそれぞれ設計した。



Scheme 3 化合物 14 の合成



Scheme 4 化合物 19 の合成

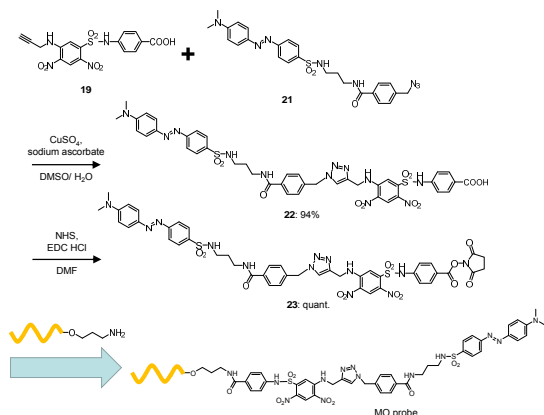
化合物 11 を出発原料に、プロパルギルアミンと反応させることで化合物 12 を得た。次いで五塩化リンと反応させることでスルホニルクロリド体 13 を得た後に、4-アミノ安息香酸と反応させることで目的化合物 14 を得た (Scheme 3)。一方、化合物 15 を出発原料に、モノスルホン酸カリウム塩 16 を得た後にプロパルギルアミンと反応させることで、化合物 17 を合成した。次いで五塩化リンと反応させることでスルホニルクロリド体 18 を得た後に、4-アミノ安息香酸と反応させることで目的化合物 19 を得た (Scheme 4)。得られた化合物 14 と 19 を 4-メルカプト安息香酸を反応させたところ、化合物 14 は 4-メルカプト安息香酸とほとんど反応しなかったのに対し、化合物 19 は反応が 30 分以内に完結した。そのため、転移分子としては化合物 19 の構造を用いることにした。

化合物 19 のカルボン酸部位を活性エステル化し、化合物 20 を得た後に 5' 末端アミノ基修飾オリゴヌクレオチドと反応させることで、エチニル基を持つ転移プローブを合成した。得られた転移プローブとアジド化合物とのクリック反応を試みたが、目的のクリック体を得ることができなかった。現在、この条件についてさらに検討中である。

転移プローブの合成およびテンプレート反応

プローブ上でのクリック反応の進行が芳しくなかったため、先に化合物 19 とアジド化合物とのクリック反応を行った。アジド化合物には消光剤であるメチルオレンジのアジド誘導体 21 を用いた。クリック体 22 を得た後に、活性エステル化し化合物 23 を定量的に得た。得られた活性エステル体 23 と 5' アミノ修飾オリゴヌクレオチドを反応させ

ることで、メチルオレンジ修飾転移プローブ (MO probe) を得た (Scheme 5)。



Scheme 5 MO probe の合成

最後に、合成した MO probe と MeS-MBS probe が標的遺伝子および GSH 存在下でテンプレート反応するかどうかの検討を行った (図4)。MeS-MBS probe は鎖中に蛍光剤フルオレセインを持ち、消光剤である MO と近接すると FRET により 520 nm 付近の蛍光強度が減少する。

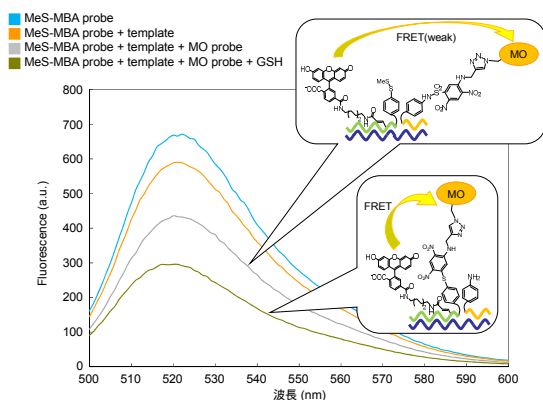


図4 DNA テンプレート存在下でのプローブの反応

結果、MO probe と MeS-MBA probe および標的遺伝子 (template) の組合せでは若干の蛍光強度の現象が見られた。これは標的遺伝子に MO probe と MeS-MBS probe が隣接して結合することで、フルオレセインと MO との間で弱い FRET が起こったためと考えられる。この蛍光強度の減少度合いは GSH を添加するとさらに大きくなることを確認できた。これは MeS-MBA probe の MeS 基が GSH によって除去され、フリーのチオフェノール基が生成し、次いで、MO probe の転移部位に対し求核攻撃を行った結果、MO 部位が MBA probe 側に転移したため FRET 効率が向上したことによるものと考えられる。

以上、 S_NAr 反応を用いた転移型遺伝子検出プローブの合成に成功した。

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 0 件)

(学会発表)(計 0 件)

(図書)(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 綾 (SHIBATA, Aya)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：50462693