

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0052

研究課題名(和文) 核酸鋳型化学反応の遷移状態制御に基づく触媒回転数の向上

研究課題名(英文) Improvement of catalytic turnover based on transition state control of oligonucleotide template chemical reaction

研究代表者

阿部 洋 (Abe, Hiroshi)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：80415067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：核酸鋳型反応に基づく発蛍光反応は、RNA検出プローブの最も基本的な作用原理の一つである。この方法では、反応性官能基を持つ核酸プローブと、保護基で蛍光を抑えた蛍光前駆体を持つ核酸プローブが、標的RNA上で会合し、保護基除去反応が進行することで蛍光を発する。この発蛍光反応は、標的RNA存在下で特異的に起こるため、RNA検出プローブの作用原理となる。本研究では高感度な細胞内RNA検出を目指し、核酸鋳型反応の高速化、リポフェクションを用いない核酸プローブの細胞内投与方法の開発に取り組んだ。では反応の求核剤を適切に選択することで、では核酸のリン酸部をチオ化することで、有望な結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA検出法は、病気の診断、ウイルスの検出、細胞現象の解明など、様々な分野で重要な技術である。RNA検出では、いかに微量な標的RNAを検出できるか、すなわち検出感度の高感度化が重要な課題である。核酸検出プローブの作用原理である核酸鋳型反応の高速化により、高感度化が可能になるが、本研究ではその反応の高速化の指針を見出すことに成功した。また、核酸プローブの細胞投与方法において、既存の手法では望みでない蛍光シグナルを発してしまう問題があるが、本研究で開発した新たな投与方法により、その問題を回避することが可能になった。両成果は、細胞内で微量なRNAの検出を可能にする技術の開発において重要な結果である。

研究成果の概要(英文)：The fluorescence reaction based on the oligonucleotide (ON) template reaction is one of the most basic working principles of the RNA detection probe. In this method, an ON probe having a reactive functional group and an ON probe having a fluorescent precursor whose fluorescence is suppressed by a protecting group are associated on the target RNA, and then the protective group is removed and fluorescence signal is generated. Since this fluorescence reaction specifically occurs in the presence of target RNA, it can be the working principle RNA detection probe. In order to detect intracellular RNA highly sensitively, we worked on (1) accelerating ON template reaction and (2) development of a new method of intracellular administration of ON probe without lipofection. Prospective results were obtained in (1) by appropriately selecting the nucleophile for the reaction, and in (2) by use of phosphorothioate in the ON probe.

研究分野：生体関連化学

キーワード：核酸プローブ 蛍光プローブ 核酸鋳型反応 触媒回転数

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸鋳型化学反応では、2つのDNA鎖の末端に化学反応性の官能基が結合されたプローブを用意する。反応では、2つのプローブが配列特異的に核酸鋳型上で隣り合って結合することで、官能基同士が近づき化学反応が進行する(図1)。通常の有機化学反応における2分子間反応は高濃度(mM以上)にしないと反応速度が遅くなる。一方、核酸鋳型反応の場合、プローブが低濃度(nM程度)でも鋳型効果により局所濃度が高まるために反応が進行する。つまり、プローブを低濃度に設定すると、化学反応が起こることを指標に標的核酸の存在を知ることができる。

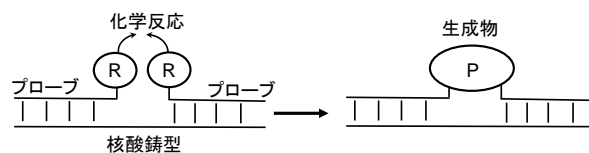


図1 核酸鋳型化学反応

反応生成物で蛍光シグナルを作り出すことによって核酸鋳型化学反応は遺伝子検出法として利用できる。さらに、化学反応が複数回起こることによりシグナル増幅が可能となる。酵素を用いずにシグナル増幅を可能にする反応機構のデザインは化学分野におけるチャレンジングな課題であり、その概念は重要で様々な分野に応用できる。

1990年代に核酸鋳型上での化学的DNA連結反応が報告された(Herrlein, *JACS* 1995, 10151)。この反応は、試薬の添加を必要とせず、2つのDNAプローブ(求電子的プローブと求核的プローブ)が標的核酸鋳型上に配列特異的に結合し S_N2 反応が進行し、連結生成物を与える(図2)。上記の反応では、触媒回転が起こらず鋳型核酸に対して当量の連結生成物を与えた。

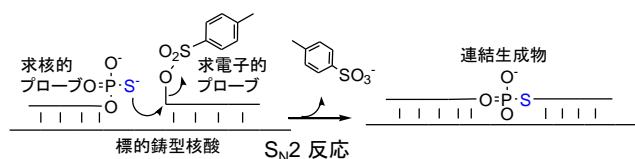


図2 化学的DNA連結反応

2000年以降になると、核酸鋳型化学反応におけるシグナル増幅法が報告された。すなわち、標的核酸鋳型を触媒として利用して反応サイクルが繰り返されることにより鋳型核酸に対して複数

の連結生成物を与える原理である。Koolと筆者らの共同研究であるバルジ形成プローブを例に説明する(図3)。標的核酸鋳型にプローブが結合し S_N2 反応が進行し蛍光シグナルを有する連結生成物を与える。この連結生成物と鋳型核酸の二本鎖はバルジ構造を形成しており不安定であることから、連結生成物が鋳型から解離し、新しいプローブが鋳型に結合することで次の反応サイクルに向かう。このプローブは92回の反応回転数を記録した。しかしこの反応系では長い連結生成物は短いプローブの結合を阻害している点、つまり生成物阻害が問題となった。

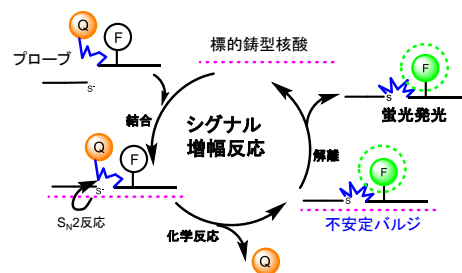


図3バルジ形成プローブによるシグナル増幅反応

一方、連結生成物を生じることになしに、シグナルを作る核酸鋳型化学反応が報告された。我々はシュタウディンガー反応を基盤とした複数の

蛍光発光型プローブを開発し、約100回の反応回転数を報告した(Furukawa, *ACIE*, 2011, 12020)。

Seitzらは鋳型反応により蛍光消光剤が隣のプローブ移動し蛍光性生成物が生じる転位反応プローブを考案した(図4; Grossmann, *JACS*

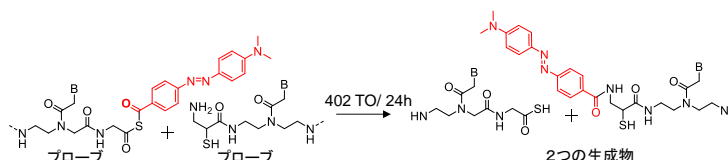


図4 非連結型核酸鋳型化学反応: 転移反応プローブ

2006, 15596)。この方法ではプローブと反応生成物は同じ長さであり、その鋳型核酸に対する結合定数は等しいことから、生成物阻害はなくなる。この反応は 402 回の反応回転数を記録し、この記録は 2013 年に我々が新記録を報告するまで最高記録であった。上述した研究例では、触媒反応を効率化するために生成物阻害の緩和のみが考慮されている。すなわち、熱力学的な観点から反応サイクルが有利になる分子メカニズムが提案されてきた。生成物阻害の緩和を狙った分子メカニズムは反応回転数の最大到達点(理論値)を向上させることができる。

新たに我々は速度論的な観点から核酸鋳型化学反応の触媒サイクルを考察した。核酸鋳型化学反応においては、大きく 3 つの遷移状態が存在する。すなわち、結合(k_{on})、化学反応(k_r)、解離(k_{off})の 3 つの段階がある。各段階の反応速度を測定し、従来の核酸鋳型化学反応の律速段階が化学反応(k_r)であることを突き止めた。すなわち、核酸鋳型化学反応における触媒サイクルを効率化するためには高速化学反応が必要であると認識した。そこで、高速化学反応の探索を行い芳香族求核置換反応に着目した。DFT 計算を用いて、芳香族求核置換反応における各種求核剤および求電子剤の反応遷移状態を解析した。その結果、チオフェノールとジニトロベンゼンスルホンアミドの反応剤ペアが最も活性化エネルギーが低く高速反応を与えることを見出した。この反応剤ペアを DNA 鎖に導入した化学反応プローブを作成し、核酸鋳型化学反応を検討したところ 1504 回の反応回転数を与えた(Shibata, *JACS*, 2013, 14172)。この値は当時で世界最高記録であった。この鋳型反応の遷移状態では、化学反応(k_r)と解離(k_{off})の速度がほぼ同じ値であり律速段階を形成している。以上の考察を踏まえて、核酸鋳型反応の高速化により、検出感度の向上を目指すこととした。

更に核酸プローブの細胞内投与方法にも着目した。従来良く用いられているリポフェクション法では、細胞内でプローブが凝集し非特異的な蛍光発光が起こり、これが正確な標的核酸検出の妨げとなる。本研究では、その核酸プローブの新規の投与方法についても検討を行うこととした。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、鋳型反応の高速化による触媒回転数の向上、それによる核酸プローブの検出感度の向上を目指した。さらに、鋳型反応以外の観点で検出感度に影響を与えるファクターとして、核酸プローブの細胞内投与方法に着目し、リポフェクションに依らない核酸プローブの細胞投与方法の開発を目指した。

3. 研究の方法

我々は以前の研究から、チオフェノールを求核剤、7-アミノクマリンのスルホンアミド保護体を求電子的プローブ前駆体とした反応で、既存の核酸プローブ反応と比較して化学反応速度が大幅に向上することを見出している。本反応において反応を高速化するためには、求核剤の求核力を向上させることが有効であると考え、セレノフェノールを求核剤とするプローブの設計・合成を行い、その化学反応速度の評価を行った。

またプローブの新規投与方法に関しては、核酸プローブのリン酸基の硫黄修飾により細胞内取り込みが促進すると期待し、ホスホロチオエート修飾プローブの合成と細胞内取り込みの評価を行った。

4. 研究成果

セレノプローブの合成は以下のように行った。4-アミノ安息香酸をジアゾ化し、ジソジウムジセレニドと反応させ、ジセレニド体を得た。このジセレニド体を NHS エステル体に誘導し、末端をアミノ修飾したオリゴ核酸と反応させた後に、DTT 処理をすることでセレノフェノール末端を持つ求核的プローブを得た。また、クマリン保護体プローブは既報(Shibata, *JACS*, 2013, 14172)を参考に合成を行った。両プローブを鋳型鎖存在下で混合し、その発蛍光反応の時間プロファイルを測定したところ、セレノフェノールを用いた場合、チオフェノールより有意に反応速度が向上した。セレノフェノールの酸化を防ぐ処置などを行うことで、一層の発蛍光反応の速度向上が見込まれる。(日本薬学会第 137 年会にて発表)

また、核酸プローブの新規投与法の開発については、ホスホロチオエート修飾を導入した核酸プローブを合成し、大腸菌をモデルとして細胞導入法の検討を行った。リポフェクション試薬等を用いずに細胞にプローブを投与し、標的である rRNA の検出に成功した。

今後は、プローブ核酸にさらなる修飾を導入することにより、標的 RNA の結合・乖離を促進し、検出感度の一層の向上を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件) 全て査読有

1. Shu Zhaoma, Tanaka Iku, Ota Azumi, Fushihara Daichi, Abe Naoko, Kawaguchi Saki, Nakamoto Kosuke, Tomoike Fumiaki, Tada Seiichi, Ito Yoshihiro, Kimura Yasuaki, Abe Hiroshi Disulfide-Unit Conjugation Enables Ultrafast Cytosolic Internalization of Antisense DNA and siRNA, *Angewandte Chemie International Edition*, **2019**, 58, 6611.
2. Onizuka Kazumitsu, Miyashita Takuya, Chikuni Tomoko, Ozawa Mamiko, Abe Hiroshi, Nagatsugi Fumi, Structural optimization of pseudorotaxane-forming oligonucleotides for efficient and stable complex formation, *Nucleic Acids Research*, **2018**, 46, 8710.

[学会発表] (計 13 件)

1. 川口紗貴, Zhaoma Shu, 太田杏摘, 中本航介, 阿部奈保子, 友池史明, 木村康明, 阿部洋 膜透過性核酸の開発 日本薬学会年会, 2019 年 3 月
2. Azumi Ota, Zhaoma Shu, Iku Tanaka, Daichi Fushihara, Naoko Abe, Fumiaki Tomoike, Yasuaki Kimura, Seiichi Tada, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Improvement of Oligonucleotide Cellular Uptake with Latently Cationic Molecules The 45th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2018 年 11 月
3. Zhaoma Shu, Iku Tanaka, Azumi Ota, Naoko Abe, Seiichi Tada, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe The development of membrane permeable oligonucleotides The 45th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2018 年 11 月
4. 田中育, 太田杏摘, 伏原大地, Shu Zhaoma, 阿部奈保子, 友池史明, 木村康明, 多田誠一, 阿部洋 潜在性カチオン分子を利用したオリゴ核酸の膜透過性向上 日本核酸医薬学会第 4 回年会、2018 年 7 月
5. 田中育, 太田杏摘, 伏原大地, Shu Zhaoma, 阿部奈保子, 友池史明, 木村康明, 多田誠一, 阿部洋 ジスルフィド構造導入によるオリゴ核酸の膜透過性向上 日本核酸医薬学会第 4 回年会、2018 年 7 月

6. Zhaoma Shu, Iku Tanaka, Azumi Ota, Naoko Abe, Seiichi Tada, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe

膜透過性核酸の開発

第 34 回日本 DDS 学会学術集会, 2018 年 6 月

7. 友池史明、山岡和樹、伊藤真央、木村康明、井上貴文、阿部洋

RETf プローブを用いた生体内の核酸検出

日本化学会 第 98 春季年会 2018 年 3 月

8. 山岡和樹、伊藤真央、阿部奈保子、友池史明、木村康明、阿部洋

蛍光オフ・オン型分子を導入した核酸プローブの開発

日本化学会 第 98 春季年会 2018 年 3 月

9. 阿部洋、阿部奈保子、木村康明、友池史明

遺伝子発現制御のための RNA 分子の形状デザイン

ConBio2017 (招待講演) 2017 年 12 月

10. 阿部洋、伊藤真央、友池史明、木村康明、阿部奈保子

Development of intracellular RNA detection probe enable chemical signal amplification

The 44th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (国際学会), 2017 年 11 月

11. 伊藤真央、阿部奈保子、友池史明、木村康明、阿部洋

化学的シグナル増幅を可能とするプローブによる細胞内 RNA 検出法

日本核酸医薬学会第 3 回年会 2017 年 7 月

12. 伊藤真央、柴田綾、阿部奈保子、友池史明、木村康明、阿部洋

化学的シグナル増幅を可能とするプローブによる細胞内 RNA 検出法

日本 RNA 学会 2017 年 7 月

13. 伊藤真央 柴田綾 阿部奈保子 木村康明 阿部洋

高効率な核酸検出を可能にする核酸鋳型反応の開発

日本薬学会年会 2017 年 3 月

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 修飾ポリヌクレオチド

発明者: 阿部 洋、シュージャオマー

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 国際特許

番号: PCT/JP2018/030549

出願年: 2018 年

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://biochemistry.chem.nagoya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：木村 康明

ローマ字氏名：Yasuaki Kimura

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院理学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：80769977

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：該当無し

ローマ字氏名：