

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20750146

研究課題名（和文）化学反応プローブによる遺伝子シグナルの増幅

研究課題名（英文）Chemical probe for amplification of genetic signal

研究代表者

阿部 洋 (Abe Hiroshi)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・専任研究員

研究者番号：80415067

研究成果の概要（和文）：

本研究では、遺伝子シグナルを飛躍的に増幅できる化学反応プローブを創出し、生細胞内遺伝子検出法へ応用することを目的とする。

研究成果の概要（英文）：

Our aim is to develop a new method for genetic detection which can amplify signal through multiple chemical reactions. The method will be applied for gene diagnosis in living cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学 ・生体関連化学

キーワード：増幅、遺伝子、RNA、蛍光、検出

1. 研究開始当初の背景

化学反応プローブの遺伝子検出は、核酸鋳型上で配列依存的におこる化学反応を基にシグナルを作り出す。後述するが、この化学

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。酵素を用いることなしにシグナル増幅でき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、その概念は極めて重要で様々な分野に応用できる。また、この化

学的な遺伝シグナル増幅法は、生細胞内微量遺伝子発現のイメージングに威力を発揮する実用的な技術として価値がある。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子シグナルを飛躍的に増幅できる化学反応プローブを創出し、生細胞内遺伝子検出法へ応用することを目的とする。新規プローブの達成すべき能力として、次の4項目を挙げる。1) 非連結反応による反応生成物の増幅。2) 高速反応である。3) 蛍光シグナルを作る。4) プローブ分解によるバックグラウンド蛍光を生じない。以上の能力を有するプローブを完成させ、細胞内RNA検出に応用する。

3. 研究の方法

高速反応を可能とする蛍光発生物の設計・合成を検討する。ローダミン或いはクマリン等の蛍光化合物を各種保護基でマスクすることにより、無蛍光性にできるかを検証する。さらに、この保護された蛍光性化合物をDNA鎖に結合し、遺伝子検出プローブを作成する。蛍光発生物の脱保護がDNA鋳型反応により、短時間で脱保護され蛍光シグナルを発生できるかを検討する(図1)。

プローブとして機能することが確認できれば化学的シグナル増幅反応を検討する。一定濃度の標的DNAに対して過剰量のプローブを用いて、何回鋳型反応が進行するかを解析し、その能力を明らかにする。

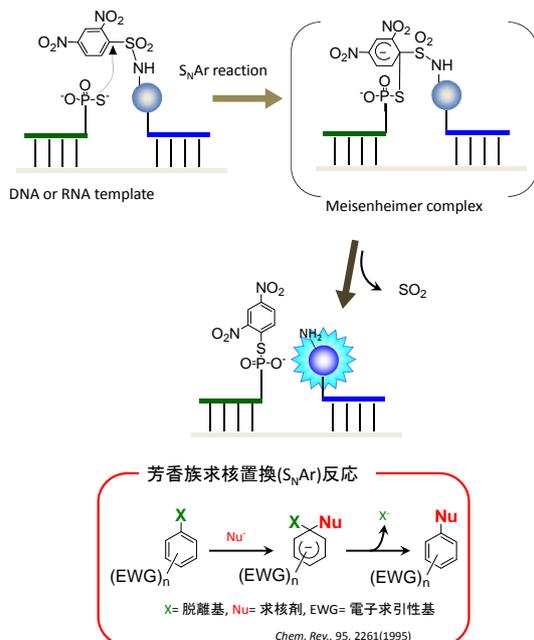


図1 SNAr反応による遺伝子検出

4. 研究成果

蛍光発生物となる化合物の合成をおこなった。ローダミン110のアミノ基をジニトロベンゼンスルホニル基で保護することにより、蛍光を消光させることに成功した。また、この分子はチオールなどの求核性分子が高濃度存在すると、ジニトロベンゼンスルホニル基が脱保護され再び蛍光を発することがわかった。そこで、この化合物を細胞内に導入したところ、GSHと選択的に反応し、蛍光を発生することが明らかになった。しかしながら、本化合物は反応性が高すぎるために、遺伝子検出プローブに導入する分子には向かなかった。次に、核酸鋳型上で選択的に蛍光発生する分子として、モノニトロベンゼンスルホニル基で保護したローダミン誘導体を合成した。この分子を核酸プローブに導入することにより、遺伝子検出プローブを作成したが、反応性が低くプローブとして機能できなかった。

新たに蛍光発生物としてジニトロベンゼンスルホニル基で保護したクマリン誘導体を合成した。この分子を求核剤であるチオフェノールで処理すると、保護基が脱保護され飛躍的に蛍光強度が増大した(図2)。そこで、この分子を核酸プローブに導入することにより、遺伝子検出プローブ(AMCAプローブ)を合成した。AMCAプローブを用いて、核酸鋳型上での反応を検討したところ、核酸配列特異的に化学反応が進行し、蛍光シグナルの発生が観測された。残念ながら、4時間で20%程度の反応速度であ

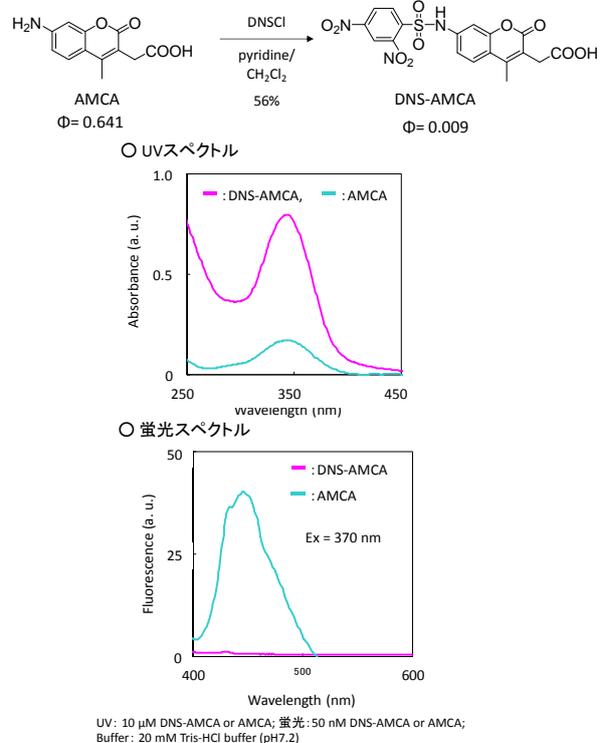


図2 ジニトロベンゼン保護したクマリン誘導体の蛍光発生特性

ることから、化学反応の回転効率は高いものではなかった(図4)。本プローブにおいては、求核プローブとしてホスホロチオエートプローブを用いたが、さらに求核性の高い官能基に変換することにより、さらに反応性の高いプローブを設計する必要があった。そこで、種々の求核性官能基を修飾したプローブを合成し、その反応性を評価した結果、チオフェノール基が極めて高い反応性を示した。そこで、ジニトロベンゼンスルフォニル保護クマリン誘導体およびチオフェノールをそれぞれ有するDNAプローブを用いてDNA鑄型反応を検討したところ、約120ほどの反応回転数を示した。

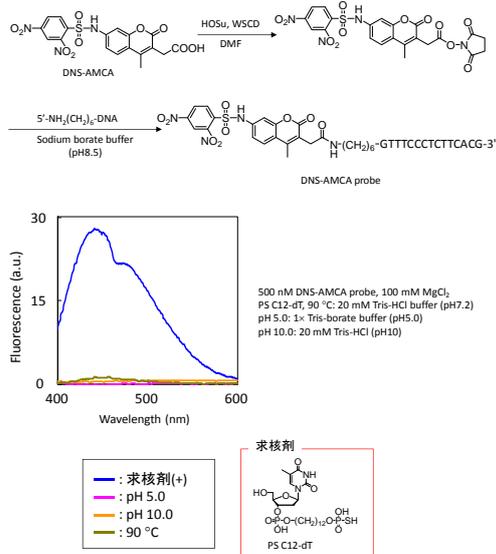


図3 クマリン誘導体AMCAを用いた遺伝子検出プローブの安定性

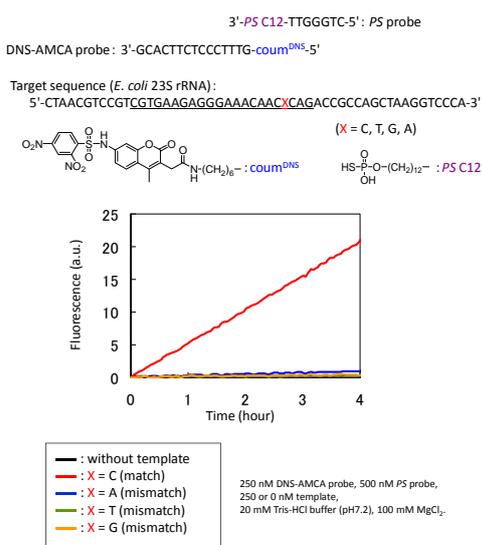


図4 AMCAプローブを用いた一塩基変異検出

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3件)

1. Aya Shibata, Hiroshi Abe, Mika Ito, Yuko Kondo, Shigeru Shimizu, Kyoko Aikawa, Yoshihiro Ito
DNA templated nucleophilic aromatic substitution reactions for fluorogenic sensing of oligonucleotides
Chemical Communication, 43, 6586-6588 (2009). 査読あり
2. Kazuhiro Furukawa, Hiroshi Abe, Kayoko Hibino, Yasushi Sako, Satoshi Tsuneda, Yoshihiro Ito
Reduction-triggered Fluorescent Amplification Probe for Detection of endogenous RNAs in Living Human Cells
Bioconjugate Chemistry, 20, 1026-1036 (2009). 査読あり
3. Kazuhiro Furukawa, Hiroshi Abe, Jin Wang, Miwako Uda, Satoshi Tsuneda, Yoshihiro Ito
Reduction-triggered red fluorescent probes for dual-color detection of oligonucleotide sequences
Organic Biomolecular Chemistry 7, 671 - 677 (2009). 査読あり

[学会発表] (計4件)

4. 伊藤 美香, 柴田 綾, 阿部 洋, 中嶋 裕子, 清水 繁, 相川 京子, 伊藤 嘉浩: "芳香族求核置換反応を引き金とした新規蛍光発生分子システムを導入した遺伝子検出プローブの開発", 日本薬学会第130回年会, 岡山, 3月(2010).
5. 古川 和寛, 阿部 洋, 常田 聡, 伊藤 嘉浩: "RNA情報を釣り針とする微生物生細胞の分離・濃縮技術の開発", 第61回日本生物工学会大会, 名古屋, 9月(2009).
6. 阿部 洋, 古川 和寛, 王 瑾, 烏田 美和子, 常田 聡, 伊藤 嘉浩
細胞内RNA検出プローブの開発
第18回アンチセンスシンポジウム, 2008年11月, 岐阜, 口頭
7. 阿部 洋, 古川 和寛, 王 瑾, 烏田 美和子, 常田 聡, 伊藤 嘉浩
新規蛍光化合物を導入したプローブによる遺伝子シグナルの化学増幅
第34回反応と合成の進歩シンポジウム, 2008年11月, 大阪, ポスター

〔図書〕（計1件）

8. 伊藤嘉浩、北嶋隆、阿部洋
細胞機能制御高分子と再生医療
高分子 58巻、3月号 2009年3
月

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：蛍光発生分子

発明者：阿部洋、伊藤嘉浩、古川和寛、
王瑾

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：特開

番号：JP2007/074424

出願年月日：成20年1月9日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.riken.go.jp/r-world/research
/lab/wako/medical/index.html](http://www.riken.go.jp/r-world/research/lab/wako/medical/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 洋 (Abe Hiroshi)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学

研究室・専任研究員

研究者番号：80415067