

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：32661

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282219

研究課題名(和文) 遺伝子の機能発現を光制御するOptochemical Biologyの創生

研究課題名(英文) Development of Optochemical Biology for photo-mediated regulation of gene function

研究代表者

古田 寿昭 (FURUTA, Toshiaki)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：90231571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子の機能発現を光制御する新手法の開発を目指して研究を行った。化学合成と酵素反応を組み合わせ、長鎖2本鎖DNAおよびプラスミドDNAの任意の配列領域を光分解性保護基で修飾する方法を開発した。ビオチン付きのヌクレオチドケーシング試薬を用いて、RNAのケージド化合物が合成できること、この手法をCRISPR/Cas9システムのgRNAに適用して、ターゲットDNA認識部位、および、Cas9結合部位をそれぞれ保護したケージドgRNAを作り分けられることを実証した。

研究成果の概要(英文)：Photochemical activation of caged oligonucleotides enable the regulation of genes of interest within a single-cell level of spatial resolution. In the course of our study of the development of caged oligonucleotides, we designed and synthesized new precursor molecules of photo-releasable nucleotides having an affinity tag for purification and detection. A precursor molecule, Bio-Bhc-diazo comprises three components: biotin for an affinity tag, photoactive Bhc group, and phosphate reactive diazomethyl moiety. We developed a method to modify arbitrary sequence regions of long-chain double-stranded DNA and plasmid DNA with photolabile protecting groups by chemo-enzymatic reactions. We demonstrated that a caged compound of RNA can be synthesized using a novel nucleotide caging reagent having a biotin tag. We demonstrated that this technique can be applied to the gRNA of CRISPR / Cas9 system to synthesize caged gRNA protecting target DNA recognition site or Cas9 binding site.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ケージド化合物 光化学 遺伝子 有機合成化学

1. 研究開始当初の背景

細胞の生理機能を担う個々の分子の機能は明らかになりつつあるが、既存の研究手法の組み合わせだけでは、生命の全体像を捉えることは難しい。生命をシステムとして理解することを可能にする新しい方法論の開発が望まれる。例えば、複数の分子が協同してはたらくネットワークを解析する研究手法が必要である。そのためには、生理機能を担う分子であるタンパク質やシグナル分子の機能を、本来働くべき時期に働いている場所で制御することが望まれる。遺伝子のコンディショナルな機能制御がこれに相当するが、遺伝子ノックアウトや RNAi に高い時空間分解能は望めない。モデル生物個体内で、任意の遺伝子の機能発現を狙った時期に狙った細胞で活性化または阻害する新しい研究手法を開発する必要がある。

ケージド化合物とは、光分解性保護基を導入した生理活性分子のことで、照射によってその活性をオン(またはオフ)にできる。我々のグループも含めた国内外の複数のグループの研究で、優れた性質を持つケージド化合物が開発されてきた(ACS Chem Biol. 2009, 4, 409 や Chemical Reviews 2013, 113, 119 に総説)。我々のグループでも、1 光子および 2 光子励起の感受性が他のどれよりも高い(6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl)methyl (Bhc) ケージド化合物を開発し(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 1193, Trends Anal. Chem. 2004, 23, 501, J Synth. Org. Chem. Jpn., 2012, 1164 など)、細胞内シグナル伝達の素過程を光制御すること(ChemBioChem, 2004, 5, 1119, J. Cell Biol. 2005, 169, 725, ChemBioChem 2008, 9, 1583, Nature Immun. 2009, 10, 627. など)、また、モデル生物個体内で mRNA の機能発現を光制御することに成功している(Nature Genet. 2001, 28, 317 など)。しかし、ケージド DNA や mRNA を生物個体に利用して遺伝子発現を活性化した例はほんの数例に限られている(J. Biol. Chem. 1999, 274, 20895, Nature Genet. 2001, 28, 317, Dev. Biol. 2005, 287, 456 など)。その主な理由として、厳密に遺伝子発現がオフの状態からオンの状態にできないこと(発現漏れの問題)、動く個体の特定の細胞に狙いを付けて照射できないこと、光刺激に用いる最適な波長が紫外部にあるため体表面から深部まで光が届きにくいことが挙げられる。

2. 研究の目的

遺伝子の機能発現を光制御する新手法の開発を目指して研究を行った。ケージド化合物をモデル生物個体の遺伝子発現制御に効果的に用いるために、解決すべき問題点を以下に挙げる。問題点 1: 全長 mRNA やプラスミド DNA を完全化学合成できないためケージド mRNA (DNA) に未修飾 mRNA (DNA) が混在し、発現が完全にオフの状態を作れな

いこと(発現漏れの問題)、問題点 2: 動く個体の細胞に狙いを付けて照射することが困難なため高い空間分解能を実現できないこと、問題点 3: 光刺激に用いる最適な波長が紫外部にあるため体表面から深部まで光が届きにくいこと。そこで、本申請課題では、まず、化学合成と酵素反応を組み合わせ、化学的に単一構造で純粋なケージドプラスミド DNA とケージド mRNA 合成の新手法を開発する(問題点 1 の解決策)。次に、現時点では最高の光化学的性能を持つ Bhc 基に新たな機能を加えて、細胞の種類を見分けて、その細胞内でのみ光活性化可能な新規ケージド化合物を開発して問題点 2 の解決を図る。さらに、問題点 3 の解決につながるように、可視光で光脱保護可能な新規光分解性保護基を開発する。

3. 研究の方法

(1) 化学合成による修飾位置特異的ケージド DNA の合成: 化学合成したケージドプライマーを PCR で伸張してケージド DNA を完全化学合成する手法を開発する。(2) 細胞種選択的に光活性化能を獲得するケージド化合物の開発: β -ガラクトシダーゼ発現細胞内だけで 405 nm 照射による光活性化能を獲得する新しいケージド化合物を開発する。(3) 赤色光で活性化できる新規光分解性保護基の探索: 個体での利用に適した、赤色から近赤外領域に吸収極大を持つ新しい光分解性保護基を開発する。(4) 遺伝子の機能発現を調節する機能性分子のケージド化合物の合成

4. 研究成果

(1) 平成 26 年度
モデル生物個体内の狙った細胞で、狙った時期に、任意の遺伝子の機能発現と機能阻害を達成する手法の開発を目指して研究を進めた。平成 26 年度は、ケージドプラスミド DNA を調製する方法を確立するため、ケージドプライマーの開発と修飾位置特異的ケージドプラスミド DNA の合成を目的にした。以下の 2 通りの方法で 2 種類のケージドプライマーを調製した。1 つ目は、核酸塩基に光分解性保護基を導入したモノマーを合成して固相合成に利用する方法で、5' 端から 6 番目のグアニンの 6 位に Bmc 基を導入した 33-mer DNA の合成に成功した。合成したケージド 33-mer DNA をプライマーの一方に、3 kbp のプラスミド DNA をテンプレートに用いて PCR を行い、1 か所の塩基がケージンググループで修飾された全長のプラスミド DNA の直鎖状コピーが調製可能であることを示した。2 つ目の方法は、あらかじめ合成した短鎖 DNA をケージング試薬で修飾する方法で、化学合成した 33-mer DNA のリン酸部位を Bio-Bhc 基で修飾したケージドプライマーを合成した。この段階では未修飾 DNA が混在しているが、そのまま PCR のプライマーとし

て利用して、3 kbp のプラスミド DNA の全長コピーを調製した。得られた PCR 産物から、プライマーに設定した領域が Bio-Bhc 基でケージングされた DNA を精製できること、ケージングの有無を電気泳動で検出できることも確認した。

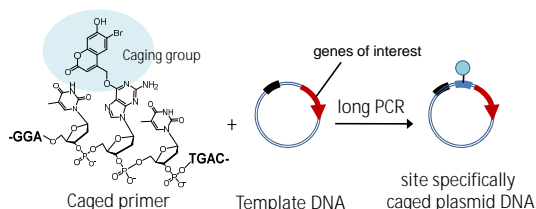


図1 ケージドプラスミド DNA の新規調製法
1. 塩基を修飾したケージドプライマーを用いて全長のプラスミド DNA をコピーする方法

(2) 平成 27 年度

長鎖 2 本鎖 DNA およびプラスミド DNA の任意の配列領域を光分解性保護基で修飾する方法を開発した。ヌクレオチド選択的ケージング試薬 Bio-Bhc-diazo と 26-mer の 1 本鎖 DNA の反応で、Bio-Bhc 基が共有結合で結合すること、紫外光照射で脱保護されて元の未修飾 DNA が生成することを確認した。導入された Bio-Bhc 基は、DNA 分子につき 1 個であることを MALDI-TOF マスペクトル測定で明らかにした。Bio-Bhc 基で修飾された 26-mer DNA をプライマーに用いる long PCR と、それに続く、アフィニティ精製、およびライゲーション反応で、プライマーに設定した領域だけにケージンググループを持つケージドプラスミド DNA を調製可能であることを示した。

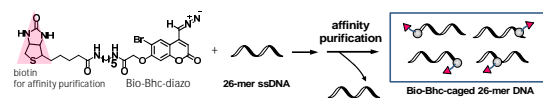


図2 Bio-Bhc 基は ssDNA に一つだけ導入される

ビオチン付きのヌクレオチドケージング試薬を用いて、RNA のケージド化合物が合成できることを示した。100 塩基程度の 1 本鎖 RNA のリン酸部位に共有結合でケージンググループを導入できること、紫外光照射で脱保護できることを確認した。ゲノム編集技術を光制御する手法に展開することを目指して、CRISPR/Cas9 システムの gRNA の修飾を行った。合成後アフィニティ精製したケージド gRNA を用いて、インピトロで Cas9 活性の光制御能を検討する実験系を構築した。

特定の細胞にターゲティング可能なケージド化合物を調製するプラットフォームとしてクリッカブルケージンググループを開発した。細胞ターゲティングのためのハロタグリガンドとイメージング用の蛍光性グループを併せ持つケージドドーパミンの

合成に成功した。

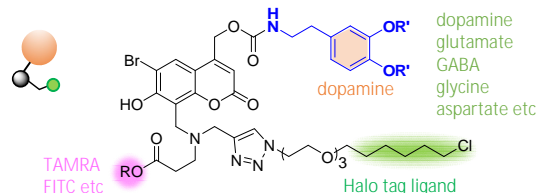


図3 モジュール化して機能性グループの導入を容易にしたケージドドーパミン

(3) 平成 28 年度

核酸の機能を光制御することができれば、遺伝子の機能発現や調節を制御する手法になると考えられる。本研究では我々のグループで開発したモジュール型ケージング試薬 (Bio-Bhc-diazo) を用いて、核酸の機能を光制御することを目的とした。前年度までの研究で、Bio-Bhc-diazo と短鎖の 1 本鎖 DNA との反応で、光解離性グループである Bio-Bhc 基が 1 個だけ導入された修飾 DNA が合成できることを明らかにした。合成および精製法の最適化を図ることである程度の量の Bio-Bhc 基修飾 DNA を調製できることを明らかにした。Bio-Bhc-DNA をプライマーに用いる long PCR を利用して、予め選択した位置に Bio-Bhc 基を 1 個だけ導入したプラスミド DNA を調製する方法も最適化した。プロモーター領域を Bio-Bhc 基で修飾したケージドプラスミド DNA を調製して、目的遺伝子の機能発現の光制御を試みたところ、in vitro の転写翻訳系、および、生細胞系のいずれにおいても期待した発現制御を観察することができなかった。プラスミド内の修飾領域が重要であることが示唆された。本研究で開発したケージドプラスミドの合成法は、任意の領域にケージンググループを導入可能なので、Bio-Bhc 基の修飾位置と発現制御との相関を検証する実験が可能になった。

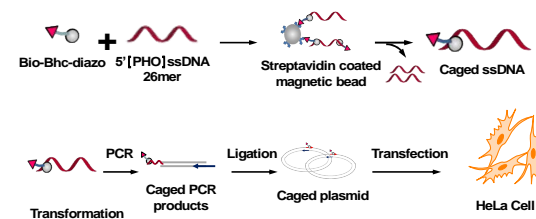


図4 領域選択的に修飾したケージドプラスミド DNA の新規調製法。リン酸エステルを修飾したケージドプライマーを用いて全長のプラスミド DNA をコピーする方法

塩基配列選択的にオリゴヌクレオチドを修飾することが期待できる Bio-PNA-Bhc-diazo を設計・合成した。PNA は 1 本鎖および 2 本鎖 DNA のいずれも配列選択的に認識することが期待できる。短鎖の 1 本鎖 DNA を用いて検証した結果、PNA 認識配列を持つ DNA は、高収率・高選択性で

Bio-PNA-Bhc 基で修飾可能であることを明らかにした。この手法を CRISPR/Cas9 システムの gRNA に適用して、ターゲット DNA 認識部位、および、Cas9 結合部位をそれぞれ保護したケージド gRNA を作り分けられることを実証した。

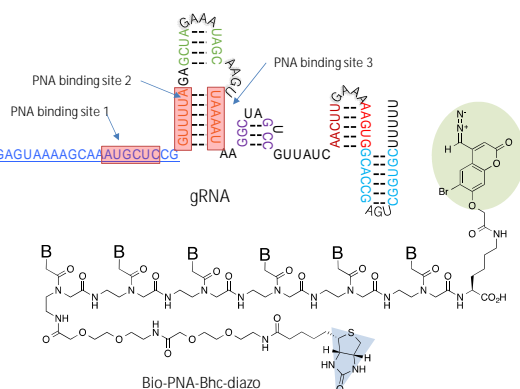


図5 Bio-PNA-Bhc-diazo を用いた位置選択的 gRNA ケージング反応

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 4 件)

H. Takano, T. Narumi, W. Nomura, T. Furuta, H. Tamamura, Utilization of the Heavy Atom Effect for the Development of a Photosensitive 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Group, 査読有, *Org. Lett.* **17**, 5372-5375 (2015). DOI: 10.1021/acs.orglett.5b02720

N. Ieda, K. Hishikawa, K. Eto, K. Kitamura, M. Kawaguchi, T. Suzuki, K. Fukuhara, N. Miyata, T. Furuta, J. Nabekura, H. Nakagawa, A double bond-conjugated dimethylnitro benzene-type photolabile nitric oxide donor with improved two-photon cross section, 査読有, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 3172-3175 (2015). DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.05.095

T. Watanabe, T. Hoshida, J. Sakyō, M. Kishi, S. Tanabe, J. Matsuura, S. Akiyama, M. Nakata, Y. Tanabe, A. Suzuki, S. Watanabe, T. Furuta, Synthesis of nucleobase-caged peptide nucleic acids having improved photochemical properties, 査読有, *Org. Biomol. Chem.* **12**, 5089-5093 (2014). DOI: 10.1039/c4ob00418c

H. Takano, T. Narumi, N. Ohashi, A. Suzuki, T. Furuta, W. Nomura, H. Tamamura, Development of the 8-aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl group as a new entry of photolabile protecting groups, 査読有, *Tetrahedron*, **70**, 4400-4404 (2014). DOI: 10.1016/j.tet.2014.04.063

〔学会発表〕(計 32 件)

古田寿昭, 細胞種選択的に光活性化できるケージド化合物の設計と合成, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 27 日, 仙台国際会議場 (宮城県仙台市)

T. Furuta, Caged Compounds as Optochemical Genetic Tools—Design, Synthesis and Their Use, The 17th RIES-HOKUDAI International Symposium on Ju, December 14, 2016, シャトラーゼガトーキングダム札幌 (北海道札幌市)

S. Tada, A. Z. Suzuki, T. Furuta, Design and synthesis of site-selectively modified caged plasmid DNAs using modular nucleotide caging agents, The Fourth Asian Chemical Biology Conference (ACBC2016), November 30, 2016 (Kaohsiung, Taiwan)

K. Kodama, S. Tada, A. Z. Suzuki, T. Furuta, Synthesis of caged gRNAs for photoactivatable CRISPR-Cas9, The Fourth Asian Chemical Biology Conference (ACBC2016), November 30, 2016 (Kaohsiung, Taiwan)

児玉一徳, 多田慎之介, 鈴木商信, 古田寿昭, CRISPR/Cas9 の光制御を目指したケージド gRNA の合成, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ (2016), タワーホール船堀 (東京都江戸川区), 2016 年 11 月 16 日

S. Tada, A. Suzuki, T. Furuta, Design and synthesis of caged oligonucleotides with modular nucleotide caging agents, 日本化学会 第 96 春季年会 (2016), 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府京田辺市)

K. Kodama, S. Tada, A. Suzuki, T. Furuta, Synthesis of caged gRNA for photoactivatable CRISPR/Cas9, 日本化学会 第 96 春季年会 (2016), 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府京田辺市)

S. Tada, W. Hashiba, E. Ikeda, A. Suzuki, T. Furuta, Chemo-enzymatic preparation of site-selectively modified caged DNAs, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), December 19, 2015 (Honolulu, USA)

W. Hashiba, T. Furuta, New caging agent having a PNA tag for sequence selective nucleotide caging, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), December 19, 2015 (Honolulu, USA)

多田慎之介, 古田寿昭, プラスミド DNA に領域選択的に光分解性保護基を導入する手法の開発, 第5回 CSJ 化学フェスタ(2015), 2015年10月15日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

T. Furuta, Modular caging groups – new platforms for multifunctional caged compounds, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), December 20, 2015 (Honolulu, USA)

T. Furuta, Toward in vivo manipulation of intracellular signaling pathways, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (2015), December 19, 2015 (Honolulu, USA)

T. Furuta, Chemical tools to control cellular chemistry, the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, March 23, 2015 (神戸国際会議場, 兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/biomol/tfuruta-lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 寿昭 (FURUTA, Toshiaki)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：90231571

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者

鈴木 商信 (SUZUKI, Akinobu)