

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16560

研究課題名(和文) レシオ変化型核磁気共鳴プローブによる核酸の同時並列的検出法の開発

研究課題名(英文) Development of a simultaneous detection system for nucleic acids using ratiometric NMR molecular probes

研究代表者

坂本 隆 (Sakamoto, Takashi)

和歌山大学・システム工学部・准教授

研究者番号：80423078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：複雑な生命現象における分子ネットワークを紐解くには、複数の標的生体分子を同時一斉に定量解析可能な新たな生体分子検出手法の開発が必要である。そこで本研究ではDNAを標的分子とし、単一の分子プローブで複数の標的DNAを検出可能な新たなDNA検出プローブの開発に挑戦した。検出法として複数の信号分離が容易な¹⁹F NMR法を採用し、オリゴDNA、並びにDNA結合性低分子を基本骨格とする数種類の分子プローブを合成し、その標的DNA検出能力を評価した結果、配列の異なる4種類の1本鎖DNA並びに2本鎖DNAを同時一斉に検出可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To understand molecular networks in life phenomenon, simultaneous and quantitative detection method for biomolecules is required. In this study, we tried to develop molecular probes that can detect various DNA on a ¹⁹F NMR spectra. Two different types of the probes, i.e. oligoDNA- and DNA binding small molecule-based probes, were synthesized and these abilities on DNA detection were evaluated. Results indicated that these probes can detect 4 different single-stranded DNAs and 4 different double-stranded DNAs simultaneously on a ¹⁹F NMR spectra.

研究分野：生物有機化学

キーワード：同時一斉計測 核酸 ¹⁹F NMR 分子プローブ

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の働きが明らかになりつつある現在、個々の遺伝子の発現量の相関、すなわち遺伝子発現ネットワークを解明することは、疾患の病理解明や生命現象の理解につながると期待されている。すでに遺伝子発現ネットワーク解析の結果から、種々の疾患の原因遺伝子が発見されて来ており、これを基にした創薬研究が実績をあげつつある。一方で、これらの遺伝子発現量の経時的变化、すなわち、「動的」遺伝子発現ネットワークの重要性が指摘されており、これを解析可能な新たな解析手法の開発が望まれている。(E. J. Olson, et al., Nat. Methods, 11, 449 (2014))

現状の遺伝子発現ネットワーク解析では DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析手法に大きく依存している。この手法では、一度に数千～数万種類の遺伝子の発現量を解析可能であり、多いに力を発揮してきた。しかし、細胞や組織を一旦「壊す」必要があるため、時間分解能の高い時系列的解析は困難である。一方で、遺伝子発現をリアルタイムに検出可能な手法として蛍光イメージング法が挙げられる。この手法は、時系列的解析を得意とするが、蛍光のシグナル分離能の悪さから、基本的には1種類の遺伝子発現のみ解析可能で、複数の遺伝子の同時検出は困難である。

2. 研究の目的

研究代表者らは、遺伝子発現の *in vivo* イメージングを目的とし、生体バックグラウンドが皆無で、かつ、シグナル透過性の高い ¹⁹F NMR/MRI による遺伝子検出プローブの開発を行って来た (Bioorg. Med. Chem. Lett., 21, 303-306 (2011))。この開発過程で、3,5-ビストリフルオロメチルベンゼンで標識したステムループ型のオリゴ DNA プローブが、標的核酸添加により ¹⁹F NMR のケミカルシフトを濃度依存的に変化させる、レシオ変化型プローブとして働くことを見出した。このプローブでは蛍光に比べ、シグナルが非常に鋭いことから、シグナル分離が容易で、各標的遺伝子に対応し、かつ、ケミカルシフトの異なるプローブを準備しておけば、同時に数10種類の遺伝子の検出が可能になる可能性が高い。また、標的核酸の存在量に応じてシグナル強度比が変化することから、定量検出が可能であると期待できる。さらに、溶液中での直接検出が可能であることから、原理的にはリアルタイム検出が可能である

と期待できる。

本研究課題では、上記の「ケミカルシフトレシオ変化型プローブの基本原理の解明」、それに基づく「新規プローブ群の設計・合成」、さらにはこれを用いた「多種類の標的核酸を同時、定量的、かつリアルタイムに検出可能な新手法の確立」を目的とする。当初目標として10種類以上の標的核酸の同時・定量検出を目標に掲げ、多種類の標的核酸の同時・定量検出に挑戦した。

3. 研究の方法

既に関済みのステムループ型のプローブを足がかりに、標的依存的にケミカルシフト変化が起こる原理の解明と、異なるケミカルシフトをもつプローブ群の創製を試みた。具体的には、¹⁹F ラベル近傍の「塩基配列」「親水・疎水環境」「核酸構造」を変化させ、ケミカルシフト変化の原理に迫るとともに ¹⁹F ラベルの化学構造の多様化により、異なるケミカルシフトをもつプローブ群の創製を試みた。また、得られたプローブ群による標的核酸の同時・定量検出を試みた。また、細胞膜透過性の高い、ビスベンゾイミド骨格を持つ蛍光 DNA プローブにフッ素化合物を連結させた新たな核酸検出プローブを合成し、配列の異なる2重鎖 DNA の同時一斉計測を試みた。

4. 研究成果

核酸の同時一斉計測が可能な分子プローブとして、大きく2つの分子プローブの開発に成功した。以下にその概略を述べる。

(1) オリゴ DNA を骨格とする1本鎖核酸検出プローブ

ケミカルシフトの異なるフッ素化合物で修飾したヘアピン型オリゴ DNA プローブを合成した。具体的には、オルト、メタ、パラ位にそれぞれ CF₃ 基を持つ安息香酸を5'末端に修飾したヘアピン型オリゴ DNA プローブ(27量体)を合成し、¹⁹F NMR を測定した。結果、プローブのみの場合、および相補的 DNA 添加後のケミカルシフトが、それぞれ修飾した CF₃ 含有安息香酸の種類によって異なることを見出した。このことから、本手法により原理的に複数の標的核酸を同時に定量検出できることが示された。このプローブはループ部分の塩基配列の変更により、様々な1本鎖核酸の検出に利用できる可能性があり、今後、検出感度や定量性の評価を行うことで、

複数種類の核酸の同時一斉計測に応用可能であると考えられる。

(2) 核酸結合性低分子を骨格とする2重鎖DNA検出プローブ

DNA結合性の低分子蛍光プローブであるヘキスト33258に3,5-ビストリフルオロメチルベンゼンを修飾した低分子プローブを合成した。この19F NMRを測定した結果、認識配列であるAATT配列を含む2重鎖DNAを添加した場合、プローブのみの場合とは異なるケミカルシフトが現れ、さらにこのケミカルシフトがAATTに隣接する塩基に依存した固有の値をとることを見出した。これにより配列の異なる4種類のDNAを同時一斉に検出できることが明らかとなった。また、AATT結合領域近傍にバルジ構造を有する標的2重鎖DNAの場合には、このプローブの結合配向性が1方向に限定され、バルジアウトした塩基に依存した固有の19F NMRケミカルシフトを示すことが明らかとなった。これによりDNA配列中の1塩基多型(SNP)を19F NMRスペクトル上で同時・一斉に解析可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Takashi Sakamoto, Daisaku Hasegawa, Kenzo Fujimoto, Simultaneous detection of single-nucleotide polymorphisms in a DNA bulge structure using fluorine-modified bisbenzimidazole derivative, *Analyst*, **141**(4), 1214-1217 (2016), 査読有 DOI: 10.1039/C5AN02389K

[学会発表] (計13件)

- ① Takashi Sakamoto, Daisaku Hasegawa, Kenzo Fujimoto, Disassembly-driven signal turn-on probe for multimodal detection of DNAs using 19F NMR and fluorescence, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2016), 348-349, September 27-29, 2016, 100th Anniversary Hall, Kumamoto University, Kumamoto, Japan.
- ② 坂本隆、長谷川大策、藤本健造「蛍光・19F NMRデュアルモードDNA検出を可能とするOFF/ON型分子プローブの開発」第10回バイオ関連化学シンポジウム(2016.9.7)石川県立音楽堂・もてなしドーム地下イベント広場

- ③ 坂本隆、長谷川大策、藤本健造「フッ素標識ヘキストプローブを用いた19F NMRによるDNA検出」第26回バイオ・高分子シンポジウム(2016.7.29)東京工業大学 大岡山キャンパス 西9号館デジタル多目的ホール
- ④ 坂本隆、長谷川大策、藤本健造「19F NMRを用いたDNA1塩基多型の同時一斉解析」日本化学会第96春季年会(2016.3.27)同志社大学 京田辺キャンパス
- ⑤ 長谷川大策、坂本隆、藤本健造「フッ素修飾ビスベンズイミド誘導体を用いた19F NMRによるDNAのOFF/ON検出」日本化学会第96春季年会(2016.3.26)同志社大学 京田辺キャンパス
- ⑥ Daisaku Hasegawa, Takashi Sakamoto, Kenzo Fujimoto, 19F NMR-based analysis of the local sequence and structure of DNAs using fluorine-modified bisbenzimidazole derivative, PACIFICHEM 2015, December 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii, USA.
- ⑦ Takashi Sakamoto, Daisaku Hasegawa, Kenzo Fujimoto, Development of molecular probes for 19F NMR/fluorescence bimodal detection of DNAs in living cells, PACIFICHEM 2015, December 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii, USA.
- ⑧ 長谷川大策、坂本隆、藤本健造「フッ素修飾ベンズイミド誘導体を用いたDNA構造解析」平成27年度北陸地区講演会と研究発表会(2015.11.27)金沢大学 角間キャンパス
- ⑨ 長谷川大策、坂本隆、藤本健造「フッ素修飾ヘキストプローブを用いたDNA構造解析」第9回バイオ関連化学シンポジウム(2015.9.11)熊本大学 工学部黒髪南地区キャンパス 百年記念会館
- ⑩ Takashi Sakamoto, Daisaku Hasegawa, Kenzo Fujimoto, Fluorine-modified bisbenzimidazole derivative as a molecular probe for simultaneous detection of DNAs by 19F NMR, The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2015), 158-159, September 23-25, 2015, Himeji, Hyogo, Japan.
- ⑪ 坂本隆、長谷川大策、藤本健造「異なる核酸の同時検出を可能にする新規核酸

検出プローブの開発」第9回バイオ関連化学シンポジウム (2015. 9. 11) 熊本大学 工学部黒髪南地区キャンパス 2号館 222 教室

- ⑫ 坂本隆、長谷川大策、藤本健造「¹⁹F核磁気共鳴による核酸検出を可能とする新規分子プローブの開発」第25回バイオ・高分子シンポジウム (2015. 7. 24) 東京工業大学 大岡山キャンパス 西9号館デジタル多目的ホール
- ⑬ 坂本隆、長谷川大策、藤本健造「蛍光および¹⁹F核磁気共鳴によるDNA検出を可能にする新たな分子プローブの開発」日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会 (2015. 6. 12) 東北大学 川内キャンパス 萩ホール

〔図書〕 (計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 隆 (SAKAMOTO, Takashi)

和歌山大学・システム工学部・准教授

研究者番号：80423078