

平成21年5月22日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19750141  
 研究課題名 (和文) 光応答性アンチセンス分子による人工転写バルブの形成と転写反応の制御  
 研究課題名 (英文) Construction of artificial DNA bulb structure and regulation of transcription by light controllable antisense molecules

研究代表者  
 開発 邦宏 (KAIHATSU KUNIHIRO)  
 大阪大学・産業科学研究所・助教  
 研究者番号：70419464

研究成果の概要：ペプチド核酸は DNA・RNA アナログであり、DNA の転写開始部位上流などに塩基配列選択的に結合した場合、DNA 二重鎖を解離させ、人工的に転写バルブ形成させ、転写反応を促進することができる。本研究では、①ペプチド核酸に新規な可視光応答性アゾベンゼンを搭載し、②ペプチド核酸-アゾベンゼン会合体の構造を可視光照射にて制御したり、③ペプチド核酸-アゾベンゼン会合体を用いて DNA 二重鎖の解離を制御したりする手法を開発した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	300,000	3,200,000

研究分野：複合科学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：アンチセンス技術、遺伝子発現制御、アゾベンゼン、ペプチド核酸、

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム情報の解読終了後、疾患関連遺伝子の発現による細胞内・細胞間情報伝達の解析が進められてきた。特に、アンチセンス技術は、標的遺伝子に核酸塩基配列特定的に結合するオリゴヌクレオチド分子を用いて、標的遺伝子発現を特異的に阻害(OFF)にできることから、今後の科学技術や医療の発展に不可欠とされている。

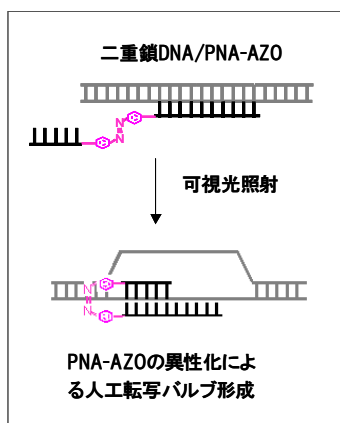
一方近年、アンチセンス分子に紫外光応答

性のアゾベンゼンを導入し、試験管内で二本鎖 DNA の会合や解離を制御して DNA の転写反応を ON/OFF 可逆的に制御させる研究例が報告された。このような光応答性アンチセンス分子の細胞内応用が望まれたが、アゾベンゼンの異性化に用いる紫外光は細胞障害性が高いことから、細胞侵襲性の低い可視光に応答するアゾベンゼンの開発が必要とされた。

## 2. 研究の目的

我々は、ペプチド核酸(PNA: Peptide Nucleic Acid)と呼ばれる DNA・RNA アナログを用い、二重鎖 DNA 内に人工的にバルブ構造を形成させ、遺伝子発現を制御する研究を進めてきた。

本研究では、Scheme 1 に示すように、PNA に可視光応答型のアゾベンゼン (AZO) を搭載した PNA-AZO を開発し、世界ではじめて光照射により二重鎖 DNA 内のバルブ構造形成を可逆的に構築させ、標的遺伝子の発現を ON/OFF を制御する技術を確立し、疾患関連遺伝子の情報ネットワークを解析や遺伝子機能を制御することを目指した。



Scheme 1. 可視応答型 PNA-AZO の異性化による二重鎖 DNA の解離と人工転写バルブの形成

### 3. 研究の方法

(1) 可視光照射により効率的にトランス-シス異性化するアゾベンゼン誘導体の開発

アゾベンゼンは紫外光を吸収して、トランス体からシス体へと幾何異性化するが、この際に利用する紫外光(365 nm)は細胞に重篤な障害を与えることがわかっている(Fig.1 左)。一方、可視光(410nm)を細胞に照射したところ、細胞毒性は殆ど認められなかった。

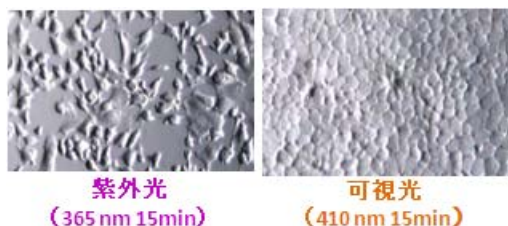


Fig. 1. 培養細胞(イヌ腎臓培養細胞)に対する紫外光および可視光照射の影響。(左)紫外光を15分間照射すると細胞の形態変化が認められ、細胞増殖活性も著しく低下した。(右)可視光を15分照射しても殆ど細胞障害性は認められなかった。

以上のことから、細胞内でアゾベンゼンの幾何異性化能を利用するためには、可視光に

応答性の高いアゾベンゼンを開発することが望まれた。

これまでに、アゾベンゼンのアゾ部位からパラ位に窒素原子を導入すると、そのトランス体の極大吸収波長が 400–450nm 付近に現れることが報告されている。そこで、Fig.2 に示すような、アゾベンゼンの X 原子に炭素(C-type)、酸素(O-type)、窒素(N-type)、硫黄(S-type)を導入したヘテロ原子置換アゾベンゼン、ベンゼン環に電子ドナーやアクセプターを導入したアゾベンゼン誘導体を合成し、それらの可視光応答性や熱安定性などの評価を行い、細胞内で使用可能な新規化し応答型アゾベンゼンの開発を目指した。

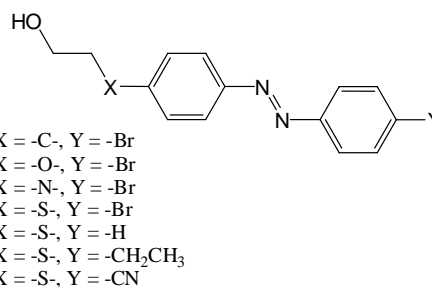


Fig. 2. ヘテロ原子置換アゾベンゼンの化学構造

(2) 可視光照射を受けて二重鎖 DNA の解離を制御できる PNA-AZO の開発

(1) で開発したアゾベンゼン (AZO) を PNA に搭載し、PNA-AZO コンジュゲートを合成し、その可視光照射時の幾何異性化を紫外-可視スペクトルの解析にて評価した。また、この PNA-AZO の相補鎖 DNA に対する会合特性を Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) などを用いて評価した。

### 4. 研究成果

(1) ヘテロ原子置換アゾベンゼンの可視光応答性、熱安定性の評価

① Fig.2 の 1–4 の各ヘテロ原子置換アゾベンゼンを合成し、これらの定常状態における紫外-可視吸収スペクトルの違いを比較した。その結果、アゾベンゼンに対して、窒素原子 (N-type 3)、または硫黄原子 (S-type 4) を導入すると可視領域に吸収帯がシフトすることを明らかにした(Fig.3)。

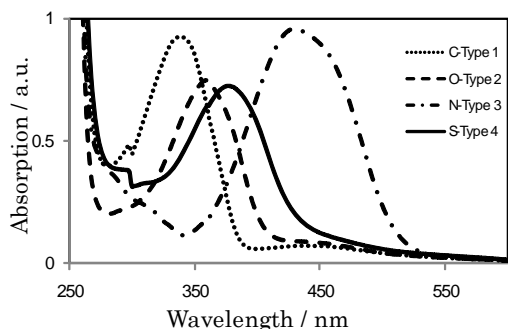


Fig. 3. ヘテロ原子置換アゾベンゼンのUV/Vis スペクトル。

②Fig. 2 に示される各ヘテロ原子置換アゾベンゼン 1-4 のジメチルスルフォキシド溶液を調整し、それらに紫外または可視光を照射することで各シス体を調整した。これらを暗条件下、40°Cにおいてインキュベートし、シス体からトランス体への熱異性化率を測定することで、各アゾベンゼンの熱安定性を評価した。

その結果、N-type については、シス体の半減期が約5分であるに対して、C-, O-, S-type についてはシス体の半減期が 240-390 分と長時間安定に存在することを明らかにした (Fig. 4)。

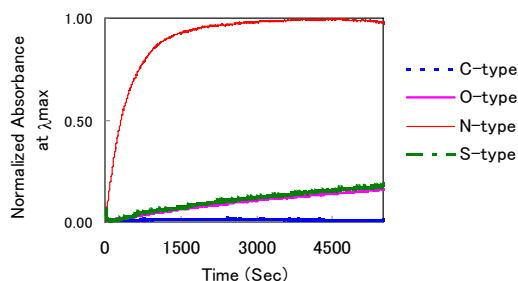


Fig. 4. ヘテロ原子置換アゾベンゼンのシス体の熱安定性を評価。

以上のことから、N-type, S-type アゾベンゼンは可視吸収特性を有し、特に S-type は生理的温度条件下においてもシス体の構造を安定に保持できることを明らかにした。

(2) 可視光応答型アゾベンゼン (AZO) を搭載した PNA-AZO の合成、光異性化能の評価、二重鎖 DNA に対する会合特性評価

①PNA-AZO の AZO ユニットには可視光応答型 N-type アゾベンゼンに  $\pi$  電子共役系を拡張することで更に可視応答性の高く、剛直な構造を有する新規窒素置換アゾベンゼンを合成した (Fig. 5)。

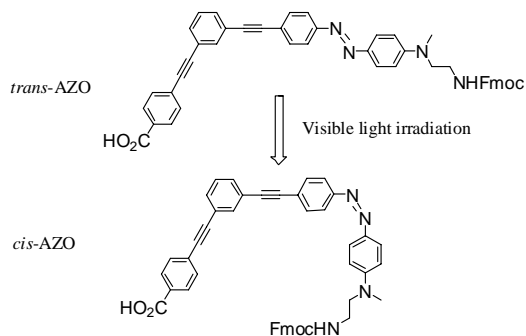


Fig. 5. N-type 可視応答型アゾベンゼンのトランス体、およびシス体の化学構造

②PNA-AZO の配列設計は、N末端からC末端にかけて、(Lys)<sub>5</sub>-CTTCT-AZO-TCTTCTC-(Lys) となるように設計し、Fmoc-固相合成により合成した。合成反応により得られた生成物はMALDI-TOF-MASにて解析し、目的物であることを確認した (予測値: 4651.8, 実測値: 4653.5、データ省略)。

PNA-AZO に対して可視光 (490 nm) を照射したときの幾何異性化をUV-Visスペクトル、および<sup>1</sup>H NMRにて解析した結果、可視光照射に伴い、490nm付近のトランス体由来の吸収がシス異性化に伴い減少することが確認された。ただし、PNA-AZO のシス異性化率は38%以下と低いことがわかった。

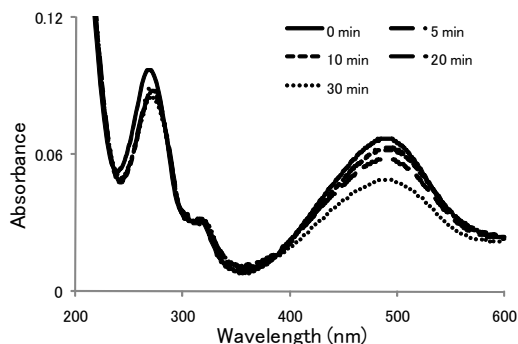
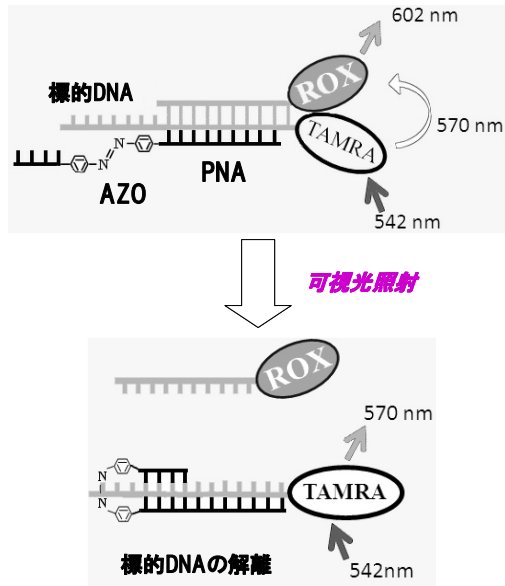


Fig. 6. PNA-AZO に対して可視光(490nm)を照射する前後のUV/Vis スペクトル

Scheme 2 のように、蛍光ラベル化した二重鎖 DNA を調整した。ここでは、二重鎖 DNA が形成されている限り、まず TAMRA (5-(and-6)-carboxy-tetramethyl-rhodamine) が 540 nm の励起光を吸収して 570 nm の蛍光を放射し、この 570 nm の蛍光を ROX (5-(and-6)-carboxy-X-rhodamine) が吸収すると 602 nm の蛍光が放射されるという FRET システムを構築した。このシステムでは、PNA-AZO の光異性化により二重鎖解離が誘起された

場合、602 nm の蛍光が消失することになる。



Scheme 2. PNA-AZO への可視光照射による二重鎖 DNA の解離をモニターするための FRET システム.  
ROX: 5-(and-6)-carboxy-X-rhodamine. TAMRA: 5-(and-6)-carboxy-tetramethyl-rhodamine.

実際、二重鎖 DNA に対して、シス型の PNA-AZO を作用させた場合、トランス型に比べて標的 DNA を解離させる効率が高くなることを見出した (Fig. 7)。PNA-AZO の幾何異性体間での DNA 二重鎖解離能の差が顕著ではなかったのは、PNA-AZO のシス異性化率が低いことに起因するものと推測された。

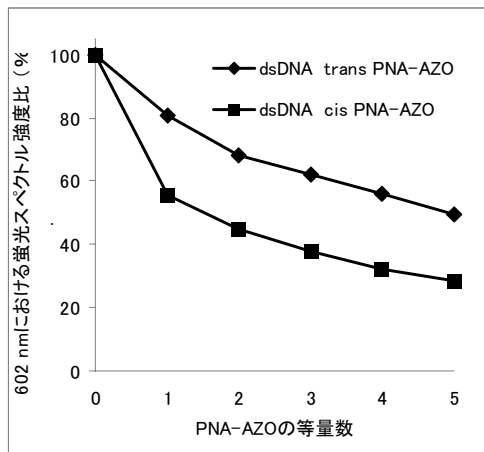


Fig. 7. 二重鎖 DNA に対して、トランス型、およびシス型の PNA-AZO を添加した場合の二重鎖解離過程を FRET により解析。シス型 PNA-AZO はトランス型に比べて二重鎖を効率的に解離させた。

以上、本研究では可視光応答型アゾベンゼンを開発し、これを PNA に搭載した新規

PNA-AZO 分子を合成することに成功した。さらにこの PNA-AZO が可視光照射によりトランス型からシス型へと幾何異性化すること、シス型の PNA-AZO を二重鎖 DNA に作用させると二重鎖解離が効率的に起こることをはじめて確認した。このように、可視光応答型 PNA-AZO により標的 DNA 内に人工的にバルブ構造の形成を可逆的に制御できれば、DNA の転写反応を可視光照射によりリモートコントロールすることが可能になると期待される。

## 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)

[学会発表] (計 7 件)

1. 開発邦宏、澤田慎二郎；可視光応答型アゾベンゼンの合成とペプチド構造制御；日本化学会第 88 回年会；2009 年 3 月 27 日；日本大学、
2. 開発邦宏、澤田慎二郎、加藤修雄；Synthesis and evaluation of photochromic properties of heteroatom-substituted azobenzene derivatives1；第 12 回産研国際シンポジウム；2009 年 1 月 22 日；大阪大学
3. 開発邦宏；可視光応答型アゾベンゼンを利用した生体機能制御技術；第五回バイオオプティクス研究会；2008 年 12 月 2 1 日；光創成大学院大学、
4. 開発邦宏、澤田慎二郎；可視光応答型アゾベンゼンの合成とその機能評価；日本化学会第 88 回年会、2008 年 3 月 4 日；立教大学、
5. 開発邦宏、澤田慎二郎、加藤修雄；Synthesis and evaluation of Vis-sensitive azobenzene derivatives for controlling cellular gene expressions；第 11 回産研国際シンポジウム；2008 年 2 月 4 日；大阪大学
6. 開発邦宏、澤田慎二郎、加藤修雄、今田一郎；可視光応答型アゾベンゼンを利用した生体機能制御分子の開発；日本化学会西日本大会；2007 年 11 月 10 日；岡山大学、
7. 開発邦宏；光応答型アンチセンス核酸を利用した遺伝子発現の制御へ向けて；第 4 回バイオオプティクス研究会；2007 年 11 月 3 日；山口大学、

## [産業財産権]

名称：光応答型アゾベンゼン誘導体の開発と応用

発明者：開発邦宏、澤田慎二郎、加藤修雄、今田一郎

権利者：大阪大学、大阪TLO  
種類：特許  
番号：特願 2008-323606  
出願年月日：2008年12月19日  
国内外の別：国内出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

開発 邦宏 (KAIHATSU KUNIHIRO)  
大阪大学・産業科学研究所・助教  
研究者番号：70419464

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし