

平成22年 5月21日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間： 2008年度～2009年度  
 課題番号：20790010  
 研究課題名（和文） 遺伝子損傷の非侵襲的視覚化を目指した遺伝子配列特異的損傷塩基  
 検出プローブの創製  
 研究課題名（英文） Development of a Sequence-specific detection probe of damaged  
 nucleobase for noninvasive DNA damage imaging.  
 研究代表者  
 兒玉 哲也（KODAMA TETSUYA）  
 大阪大学・薬学研究科・助教  
 研究者番号：00432443

## 研究成果の概要：

遺伝子損傷の二本鎖 DNA 配列選択的な非侵襲的検出法の開発を目指し、まず、二本鎖 DNA 中の8-ヒドロキシグアニンを配列特異的に認識する新しい架橋型人工核酸モノマーの創製に成功した。また、光刺激によって5-ホルミルウラシルを発生する光応答性人工核酸の開発に成功した。さらに、創出した架橋型人工核酸モノマーと酸分解性ホスホロアミダート結合を組み合わせた三重鎖形成核酸プローブを設計合成するとともに、その非侵襲的可視化用途に向け、蛍光プローブ化に成功した。

To develop a sequence-specific detection method of damaged nucleobase for noninvasive DNA damage imaging, we successfully created a novel bridged nucleic acid monomer that can recognize 8-hydroxyguanine in double-stranded DNA in a sequence-specific manner. Additionally, several nucleic acids, which convert into an oxidative lesion 5-formyluridine in double-stranded DNA in response to photo irradiation, were also synthesized. Moreover, we designed and synthesized a triplex forming oligonucleotide probe by organizing the 8-hydroxyguanine-recognizing nucleic acid monomer and acid-labile phosphoramidite linkage, and the fluorescent labeling of the probe was achieved for its noninvasive imaging use.

## 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	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：生体関連物質・人工核酸・分子認識・酸化損傷塩基・可視化

1. 研究開始当初の背景

DNA損傷の集積は、癌や老化だけでなく、

糖尿病やパーキンソン病、アルツハイマー病、さらにはHCV感染時など実に広範な領域において発生することが明らかにされており、医・薬学における重要な研究課題である。

8-ヒドロキシグアニン (8-OH-G) は、グアニン塩基の酸化により生成する損傷塩基である。その最大の特徴は、シトシン (C) とだけでなくアデニン (A) ととも無理なく塩基対を形成することが出来る水素結合形成能とそれが引き起こす DNA 複製時や翻訳時のミスリーディング誘起能であり、即ち、チミン (T) として振舞う性質である。また、電離放射線や紫外線、過酸化水素などの酸化ストレスが 8-OH-G の生体内濃度を顕著に増加させることから、8-OH-G が放射線治療や加齢研究における酸化ストレスマーカーとして利用可能であると言われている。8-OH-G が最も重要な核酸損傷のひとつであるとの位置づけは揺るぐ気配はない。近年、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や質量分析 (MS) の進歩により、正常細胞中での 8-OH-G の発生頻度が 3 残基 (8-OH-G) /  $10^6$  残基 (G) 程度であると見積もられるなど、8-OH-G の検出は高感度に改善されてきた。また、生きた細胞内に生成する 8-OH-G 検出には抗体を利用した方法が報告されており、酸化的ストレスを与えた細胞中で 8-OH-G が増加する様子をリアルタイムで検出できる可能性が示されている。しかし一方で、ここ数年進歩の著しい HPLC や MS による検出法の開発研究は、機器本体の性能向上がその研究成果を牽引している割合は大きく、新しい技術が開発される度に新たに高価な大型機器を購入しなければその恩恵を受けることができない非現実的な側面があることも事実である。さらには現行の検出原理上、細胞の破碎や DNA の酵素処理による断片化やヌクレオチド (ヌクレオシド) への分解が必要であり、生きた細胞中の 8-OH-G を観察することは出来ない。一方、抗体法に関しては、標的を含む DNA に対する抗体を調製・精製・検証することに時間を要するため、誰もが利用できる技術とは言えず、既存の手法を用いては DNA 配列情報を考慮した研究 (検出) を達成することが極めて難しいと考えられる。抗体を用いた研究を除く場合、8-OH-G の極めて独特な化学構造を有効に利用した研究は 2 例のみであることも付け加えておく必要がある。

## 2. 研究の目的

8-OH-G の独特な化学構造をもとに、二本鎖 DNA 中の 8-OH-G を選択的に認識する三本鎖核酸形成オリゴヌクレオチド (TFO) を有機化学の立場から設計・合成し、現在の技術では実用化の難しい細胞内二本鎖 DNA 中に生じるグアニン損傷部位の配列選択的検

出を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 8-OH-G をより選択的に認識する人工核酸分子の合成と機能性評価

D-A-D (donor-acceptor-acceptor) 型の Hoogsteen 水素結合が可能な新たなヘテロ環化合物を 8-OH-G を選択的に認識する核酸塩基として設計し、そのものを核酸塩基として有する人工核酸を合成する。その 8-OH-G 認識能を三本鎖核酸の 50% 融解温度 ( $T_m$ ) を測定することで評価する。また、8-OH-G 認識 TFO を蛍光標識化することで、8-OH-G 検出プローブとして機能化する。さらに、8-OH-G 修復酵素存在下におけるプローブの機能性を評価する。

(2) TFO による二本鎖 DNA 中 8-OH-G の迅速検出法の開発

(1) で合成する人工核酸と酸分解性ホスホロアミダート結合を組み合わせた三重鎖形成核酸 (TFO) プローブを設計合成する。また、合成する TFO プローブを用いて二重鎖 DNA 中 8-OH-G/C の検出を検討し、弱酸性条件下、標的 8-OH-G/C 含有二重鎖 DNA を効率的に検出できる条件を見いだす。

(3) TFO による二本鎖 DNA 中 8-OH-G の細胞内検出へ向けた展開

細胞内での 8-OH-G/C 塩基対のリアルタイムかつ非侵襲的な視覚化を目指し、(2) で創出する TFO プローブを蛍光標識化する。

(2) で創出するプローブが、8-OH-G と同様に高頻度で生成することが知られている 5-ホルミルウラシル塩基 (5-fU) と認識しないことを確認するため、我々のタイミングで 5-fU 塩基を細胞内に調製できる新しい手法を開発する。

## 4. 研究成果

(1) D-A-D (donor-acceptor-acceptor) 型の Hoogsteen 水素結合で 8-OH-G を選択的に認識する核酸塩基として、プトキシカルボニル化ジアミノピリジンを核酸塩基とする架橋型人工核酸モノマーを合成した。さらに、合成した人工核酸モノマーを含むオリゴヌクレオチドの 8-OH-G 認識能を、さまざまな塩基対を有する 2 重鎖 DNA に対して形成する 3 重鎖核酸の融解温度 ( $T_m$ ) またはゲルシフトアッセイ結果を指標とすることで評価した。この新規架橋型人工核酸モノマーは、2 重鎖 DNA 中の 8-OH-G を 3 本の Hoogsteen 型水素結合により認識し、これまでに開発している第一世代人工ヌクレオシドよりも 8-OH-G : C 塩基対を選択的に認識する能力が高く、ほぼ完璧に他の天然塩基対を区別出来る事が分かった ( $\Delta T_m$ : 8-15 °C)。創出した架橋型人工核酸モノマーを約 1 グラム合成し、多様な用途への迅速な適用が可能な態勢を

整えた。

さらに効率的な水素結合形成を目的として環構造を再検討した4,8-ジオキサ-5-アザピシクロ[5.3.0]デカン骨格を有する人工核酸と *N-O* 結合を環構造に有する人工核酸を新たに設計し、チミジンまたは5-メチルウリジンを出発原料とした合成に成功した。

合成した 8-OH-G 認識プローブが、8-OH-G : C 塩基対を含む二重鎖 DNA から 8-OH-G を除去する酵素 Fpg (大腸菌) または hOGG1 (ヒト) の存在下においても強固に三重鎖を形成可能である事を、蛍光標識化核酸を用いることにより示し、少量しか存在しない遺伝子損傷の検出プローブとして有効である事を明らかにした。

(2) 合成したプトキシカルボニル化ジアミノピリジン型架橋型人工核酸モノマーと酸分解性ホスホロアミダイト結合を組み合わせた三重鎖形成核酸プローブを設計合成した。また、三重鎖形成プローブを用いて二重鎖 DNA 中の 8-OH-G の検出を検討し、本プローブが弱酸性条件と標的 8-OH-G/C 含有二重鎖 DNA の存在が揃う事によって効率的に機能する事を確認した (標的 8-OH-G/C 含有二重鎖 DNA が無い場合に比べ7倍効率的)。この際、昨年度検討したに中性条件とは分子認識能 (特にグアニンに対する認識能) が変化する事を明らかにした。この知見は、新たな TFO 指向型人工核酸塩基の設計の際に非常に有益な情報となる。

(3) 二本鎖 DNA 中の 8-OH-G の細胞内検出・非侵襲的可視化へ向け、ここまで開発した 8-OH-G 認識プローブを蛍光化した。標的が存在する場合にのみ蛍光発光するプローブとするため、プローブ内に蛍光化合物と消光化合物を同時に担持した FRET プローブとした。

(2)で創出した二重鎖核酸中の 8-OH-G/C 認識プローブが、8-OH-G と同様に高頻度で生成することが知られている酸化損傷塩基 5-ホルミルウラシル塩基 (5-fU) を認識しないことを確認するため、二重鎖核酸中の任意の配列中に我々のタイミングで 5-fU を発生させることのできる新しい手法を開発した。この手法に必要な、光刺激によって5-ホルミルウラシル発生する光応答性人工核酸モノマーは、チミジンを出発原料とした3工程を経て簡便に合成でき、さらに数工程経ることで DNA 自動合成機に適用可能なアミダイト体へと首尾よく変換することに成功した。本結果は、現在 5-fU の化学調製に用いられている過ヨウ素酸を必要としない新しい 5-fU の発生法としての代替法として利用できる他、これまで報告例のない細胞内での 5-fU 調製法として開発が可能な重要な結果と言える。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. Kunihiko Morihira, Tetsuya Kodama, Masaru Nishida, Takeshi Imanishi and Satoshi Obika. Synthesis of Light-responsive Bridged Nucleic Acid and Changes in Affinity with Complementary ssRNA. *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 1784-1788. 査読有
2. Tetsuya Kodama, Chieko Matsuo, Hidetsugu Ori, Tetsuya Miyoshi, Satoshi Obika, Kazuyuki Miyashita, Takeshi Imanishi. Design, Synthesis, and Evaluation of a Novel Bridged Nucleic Acid, 2',5'-BNA<sup>ON</sup>, with S-type Sugar Conformation Fixed by *N-O* Linkage. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2116-2123. 査読有
3. Tetsuya Kodama, Kensaku Sugaya, Takeshi Baba, Takeshi Imanishi and Satoshi Obika. Synthesis of a Novel *trans*-3',4'-BNA Monomer Bearing a 4,8-Dioxa-5-azabicyclo[5.3.0]decane Skeleton. *Heterocycles*, **2009**, *79*, 873-882. 査読有
4. Tetsuya Miyoshi, Tetsuya Kodama, Satoshi Obika and Takeshi Imanishi. Design and Chemical Synthesis of a 2',4'-BNA Probe for 7,8-Dihydro-8-oxoguanine-containing Double Stranded DNA. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 305-306. 査読無

[学会発表](計8件)

1. 兒玉 哲也, 次世代核酸系機能素材の創製を目指した高度機能化人工核酸の設計と合成、第33回大学分析者の会(大阪) 2009年7月29日
2. 伊藤 浩介、戸水 真治、根来 佳恵、折田 文子、兒玉 哲也、今西 武、小比賀 聡、三重鎖形成を基盤とした迅速かつ簡便なSNP分析法、遺伝子・デリバリー研究会 第9回シンポジウム(大阪) 2009年7月11日
3. 兒玉 哲也、菅谷 建作、馬場 武、今西 武、小比賀 聡、3-オキサ-4-アザペンチレン架橋構造を有する新しい*trans*-3',4'-BNAの設計と合成、日本薬学会第129年会(京都) 2009年3月26日-28日
4. 兒玉 哲也、二重鎖DNA中の8-オキソグアニン塩基を選択的に認識する人工核酸プローブ、第11回生命化学研究会(群馬) 2008年11月28日-29日
5. 三好 哲也、兒玉 哲也、小比賀 聡、今西 武、8-OxoGの配列特異的認識能を有する三重鎖形成人工核酸の開発(1)、第58回日本薬学会近畿支部大会(兵庫) 2008年10月25日
6. 兒玉 哲也、三好 哲也、小比賀 聡、今西 武、8-OxoGの配列特異的認識能を有する三重鎖形成人工核酸の開発(2)、第58回日本薬学会近畿支部大会(兵庫) 2008年10月25日

7. Tetsuya Miyoshi, Tetsuya Kodama, Satoshi Obika and Takeshi Imanishi, Design and Chemical Synthesis of a 2',4'-BNA Probe for 7,8-Dihydro-8-oxoguanine-containing Double Stranded DNA, Joint symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry. (京都) 2008年9月8日-12日
8. 兒玉 哲也、三好 哲也、小比賀 聡、今西 武、DNA 配列選択的な 8-ヒドロキシグアニン検出プローブの創製研究、第6回次世代を担う有機化学シンポジウム(東京) 2008年5月30日-31日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

兒玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00432443

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし