

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K05898

研究課題名（和文）芳香族求核置換反応を利用した分子移動型プローブの開発

研究課題名（英文）Development of the nucleic acid sensing probe based on molecule transfer.

研究代表者

柴田 綾 (Shibata, Aya)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：50462693

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生細胞内での遺伝子検出が実用可能なプローブの構築を目指し、芳香族求核置換反応を利用した検出プローブの高いシグナル増幅能を維持したまま、クリック反応を利用したポスト修飾可能なプローブの開発を試みた。構造の異なる3つのプローブを合成しその評価を行った。結果、いずれのプローブでも芳香族求核置換反応による分子移動が起こることを確認した。加えて、生体内への応用を考えた場合、NO₂-CN型のプローブが一番望ましいことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生細胞内の遺伝子検出法として標的核酸を鋳型とした化学反応プローブがある。この遺伝子検出法の利点は標的核酸を鋳型とした反応サイクルを回すことで、シグナルを増幅することができる点にある。しかし、これらのプローブの多くは蛍光基質の構造変化をシグナル発生の鍵としているため、使用できる蛍光波長に制限がある。本研究ではこの問題を解決すべく、蛍光分子をポストで修飾可能な化学反応プローブを開発した。

研究成果の概要（英文）：In this research, we tried development of the nucleic acid sensing probe based on molecule transfer which is triggered by a nucleic aromatic substituted (SNAr) reaction. In addition, the probe was designed to be easily multi-coloring by the click reaction.

We synthesized three probes with different structures and evaluated them. As a result, it was confirmed that molecular transfer due to the SNAr reaction occurs in all the probes. In addition, we found that the NO₂-CN type probe is the most desirable.

研究分野：分析化学

キーワード：遺伝子検出

1. 研究開始当初の背景

RNAは細胞内で遺伝情報を伝達する重要な役割を果たしているが、最近では、non-coding RNA (ncRNA)の発見など、RNAが生体内で様々な機能を果たしていることが示唆されている。ncRNAなど細胞内RNAの機能解明を進めるためには、生細胞でRNAがいつ、どのように機能発現をしているかを知る必要がある。生細胞内RNAの検出の際には、過剰量の試薬を洗浄・除去することができないことから、標的特異的な蛍光シグナルを発生させる必要がある。その方法として、標的核酸を鋳型とした化学反応プローブが複数のグループから報告されている(*Molecules*, 17, 2446)。この遺伝子検出法の利点は標的核酸を鋳型とした反応サイクルを回すことで、シグナルを増幅することができる点にある。しかし、これらのプローブの多くは蛍光基質の構造変化をシグナル発生の鍵としているため、使用できる蛍光波長に制限がある。

申請者はこれまでに芳香族求核置換反応を利用した化学反応プローブを用いて0.5 pMの微量遺伝子のシグナルを1500倍に増幅することに成功している(*JACS*, 135, 14172)。このプローブは検出感度としては十分な値であったが、青色蛍光のクマリンを用いていたため生細胞内への応用は困難であった。一方、申請者の研究室ではアジドとアルキンによるClick反応を利用したオリゴヌクレオチドの簡便なポスト修飾法を確立している(*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24, 1519)。本研究では、これらの技術を組み合わせることで、多色化が容易な分子移動型遺伝子検出プローブの開発ができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、生細胞内での遺伝子検出が実用可能なプローブの構築を目指し、芳香族求核置換反応(S_NAr 反応)を利用した検出プローブの高いシグナル増幅能を維持したまま、多色化が容易に行えるプローブの開発を目的とした(図1)。

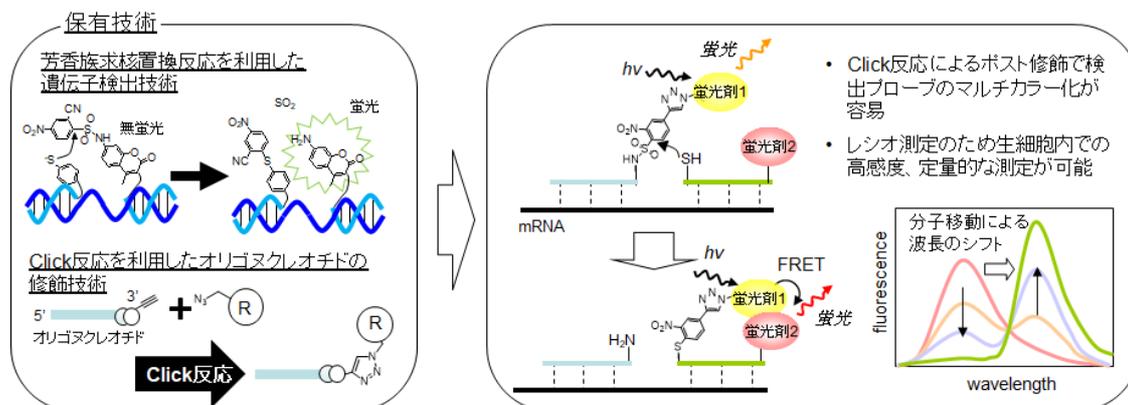


図1 S_NAr 反応を利用した転移型遺伝子検出プローブの開発

3. 研究の方法

S_NAr 反応を用いた検出プローブではテンプレート反応の際に、保護基の部分がもう一方のプローブに転移する。本研究ではその機構に着目して標的配列存在下、化学反応が起こった際に、芳香環部位に連結した分子が移動することで蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が解消もしくは誘起される分子の開発を試みた。また、プローブの多色化を容易に行うことを目的として、転移部位にはエチニル基を持つ分子を設計した。これによりクリック反応による蛍光色素の導入が可能となり、多色化が容易に行えると考えられる。本研究では、転移部位の設計・合成を試みた。

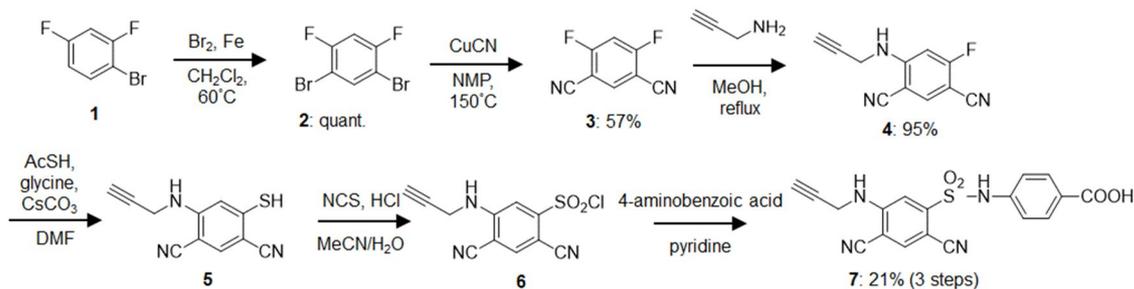
4. 研究成果

転移部位の設計・合成

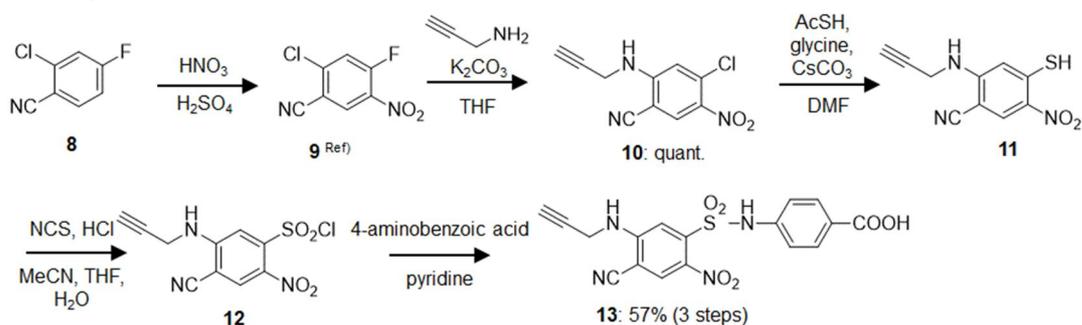
申請者はこれまでに di-NO₂ 型の転移分子を用いて分子移動型検出プローブを作成したが、標的配列がない状態でも反応の進行が見られた。一般的に、 S_NAr 反応の反応速度は芳香環に結合する置換基の電子吸引性に依存する。そのため、環内の電子吸引性を落とすことで非特異的の反応の

進行を抑制できないか検討することにした。置換基を 1 か所もしくは 2 ヲ所 NO₂ 基から CN 基に変更した化合物の合成を試みた (Scheme 1, 2)。

Scheme 1 di-CN 型移動分子の合成



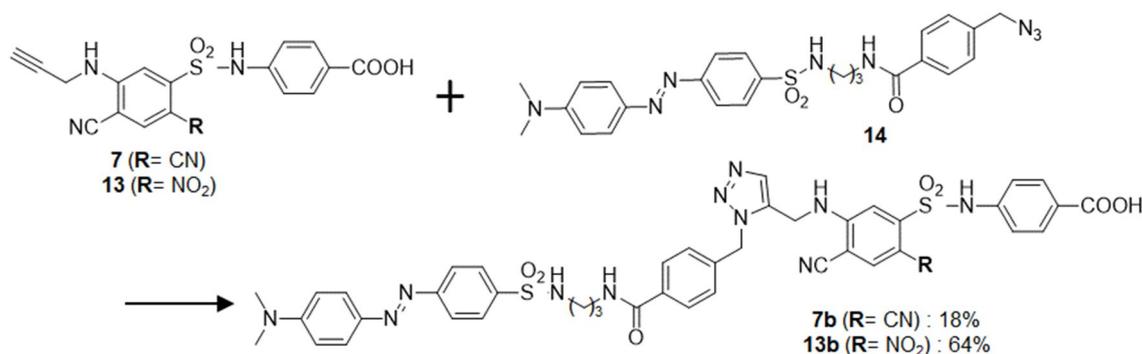
di-CN 型転移分子の合成は次の手順で行った。2,4-ジフルオロプロモベンゼン 1 を出発原料とし、プロモ化、シアノ化を行うことで化合物 3 を収率 57% で得た。次いでプロパルギルアミンと反応させることで化合物 4 を収率 95% で得た。次いでチオール体 5 を経由してスルホニルクロリド体 6 を得た後に、4-アミノ安息香酸と反応させることで目的化合物 7 を収率 21% (3 steps) で得た。



Ref) Y. M. Pu, A. Christesen, Y. Y. Ku, *Tetrahedron Lett.*, **51**, 418–421 (2010).

Scheme 2 NO₂-CN 型移動分子の合成

NO₂-CN 型移動分子の合成は次の手順で行った。2-クロロ-4-フルオロベンゾニトリル 8 を出発原料とし、Y. M. Pu らの文献を参考に化合物 9 を得た。次いでプロパルギルアミンと反応させることで化合物 10 を定量的に得た。次いでチオール体 11 を経由してスルホニルクロリド体 12 を得た後に、4-アミノ安息香酸と反応させることで目的化合物 13 を収率 57% (3 steps) で得た。



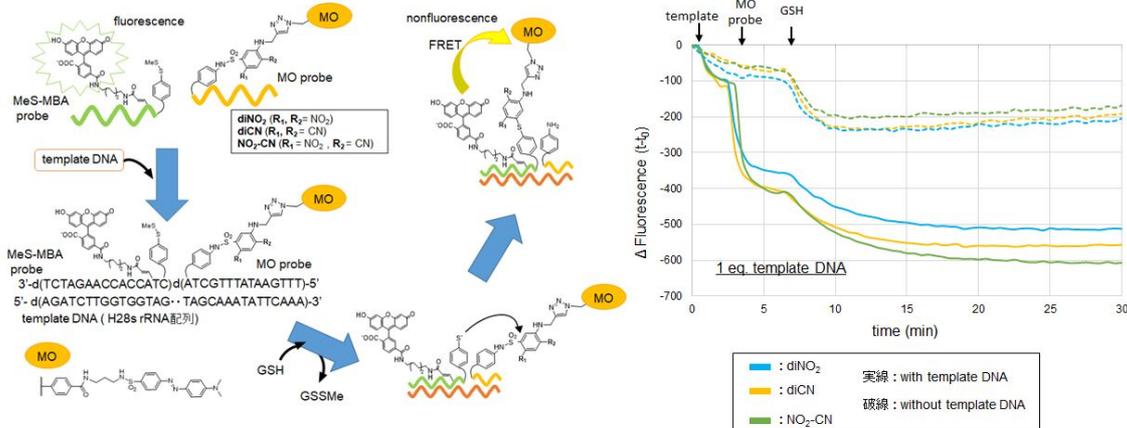
Scheme 3 ダブル修飾移動分子の合成

得られた化合物 7 および 13 とアジド修飾ダブルシ 14 を Click 反応させることで、ダブル修飾移動分子 7b および 13b の合成を行った (Scheme 3)。次いで、得られた分子のカルボン酸部位を NHS と反応させることで、活性エステル化した後に単離精製を行わずにアミノ修飾 DNA と反応させた。

転移プローブを用いたテンプレート反応

合成した各 MO プローブ と MeS-MBS プローブ が標的遺伝子およびグルタチオン (GSH) 存在下でテンプレート反応するかどうかの検討を行った (図 2)。MeS-MBS プローブ は MeS 基が GSH によって除去されることで活性型の MBS プローブ へと変換される。また、MeS-

MBS プローブは鎖中に蛍光剤フルオレセインを持ち、消光剤である MO と近接すると FRET により 520 nm 付近の蛍光強度が減少する。各 MO プローブの評価は 520 nm の蛍光強度の経時変化を測定することで行った。MeS-MBS probe の溶液に測定開始 1 分後にテンプレート DNA、4 分後に MO probe、7 分後に MeS-MBS プローブを活性化するための GSH を添加した。



その結果、テンプレート DNA 存在下においていずれの MO probe を用いた場合でも GSH 添加によって蛍光強度の低下が見られたことから、テンプレート上での S_NAr 反応の進行が確認できた。特に、NO₂-CN 型の MO probe (緑、実線) が 3 種の中では一番蛍光強度の減少が大きいことから転移部位が効率よく MBS プローブ側へ移動していることが分かった。加えて、テンプレート DNA 非存在下 (破線) の結果から非特異的な反応についても NO₂-CN 型の MO probe が 3 種のプローブの中では一番低く抑えられていた。今回、MeS-MBS プローブの活性化に GSH を用いたが、GSH は MO プローブと反応する可能性がある。そのため 3 種の転移分子プローブとグルタチオンとの反応性を調べた。結果、グルタチオンとの反応性は diNO₂ 型 > NO₂-CN 型 > diCN 型の順であることが分かった。生体内には GSH が豊富にあることから用いる MO プローブは NO₂-CN 型が望ましいことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------