

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05563

研究課題名(和文) miRNAの生細胞内検出を指向した化学反応プローブの開発

研究課題名(英文) Development of the chemical reaction probes for intracellular miRNA detection

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：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目指した。具体的には、芳香族求核置換反応を利用した分子移動型遺伝子検出プローブの開発を試み、プローブの反応条件の検討を行った。結果、0.25 nMのテンプレート量でも検出可能であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAは組織または時期特異的に多数のmRNAを制御することで、細胞増殖・アポトーシス・分化などに深く関与している。そのため、生きた細胞内でmiRNAの挙動を調べることは生命現象を理解するうえで重要である。今回、開発した分子移動型遺伝子検出プローブはFRETベースのプローブのため多種多様な蛍光剤を組み合わせることができる。そのため、複数のmiRNAの挙動を同時に観察することが可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：One method of nucleic acid sensing in living cells is the chemical reaction probes using a target nucleic acid as a template. The advantage of this probes is that the signal can be amplified by running a reaction cycle using the target nucleic acid as a template. Many of these probes use structural changes in the fluorescent substrate as the key to signal generation. So, it is limiting the wavelengths of fluorescence that can be used. In this study, we aimed to solve this problem by developing new FRET based chemically reaction probe that can be post modified with fluorescent molecules using crick reaction. Herein, we report the development of a molecular transfer probe which triggered by a nucleophilic aromatic substitution reaction. As a result, it was found that the probe detected until 0.25 nM template DNA in the catalytic templated reactions.

研究分野：核酸化学

キーワード：遺伝子検出

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

miRNA は組織または時期特異的に多数の mRNA を制御することで、細胞増殖・アポトーシス・分化などに深く関与している(*Annu. Rev. Pathol.*, **9**, 287)。そのため、生きた細胞内で miRNA の挙動を調べることは生命現象を理解するうえで重要である。現在、生細胞内の miRNA を含む RNA の検出にはモレキュラービーコンを用いるのが一般的ではあるが、1 分子に対し 1 シグナルしか発生しないため比較的発現量の多い RNA の検出に限られている。一方で標的 RNA を鋳型とした化学反応プローブは 1 分子に対し多シグナルを発生できるため微量 RNA を検出できる可能性を秘めているが、いまだ生細胞内で十分な感度を示すプローブは開発されていない。

また、世界的な感染症の拡大の折、逆転写定量 PCR (RT-qPCR) を用いた遺伝子診断は病原の早期発見に大きく寄与したものの高価な機器が必要であったため限られた機関でしか受診できない問題があった。目視で病原の有無を診断可能な比色分析による遺伝子診断法の開発を求められている。

2. 研究の目的

本研究では、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、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反応条件の最適化を目指した。加えて、比色分析による遺伝子検出法の開発を試みた。

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) が誘起される分子の開発を試みた。本研究では、図 1 に示す MO プローブ と MeS-MBA プローブを用いて、標的遺伝子の検出を試みた。MO プローブは転移部位にクリック反応を用いて消光剤であるメチルオレンジ (MO) を導入した。MeS-MBA プローブは還元剤によって MeS 基が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-MBA プローブは鎖中に蛍光剤フルオレセインを持つ。テンプレート存在下、 S_NAr 反応により分子が移動することで MO とフルオレセインが近接すると FRET により 520 nm 付近の蛍光強度が減少する。この分子転移型遺伝子検出プローブの反応条件の検討と検出感度についての検討を行った。加えて pH 指示薬から一重項酸素に応答して呈色する色素の合成を試みた。

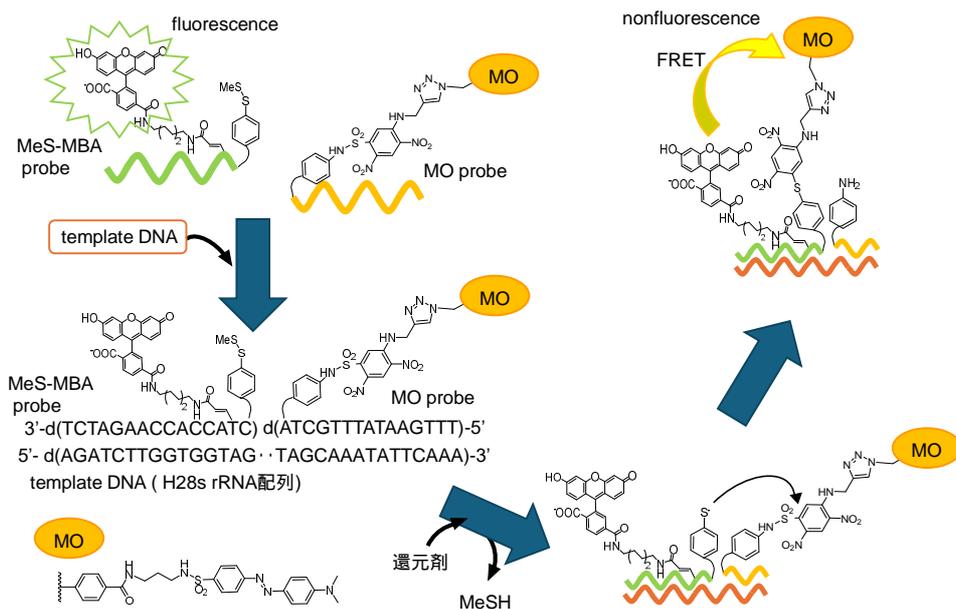
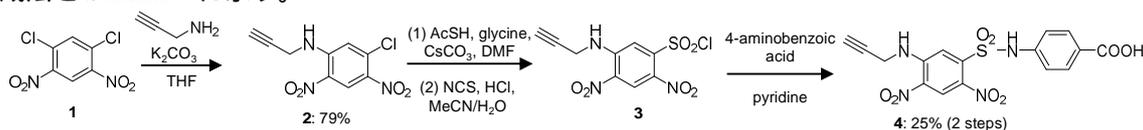


図 1 分子移動型遺伝子検出プローブ

4. 研究成果

転移部位の合成法の再設計

申請者は転移分子として化合物 4 を用いて分子移動型検出プローブを作成している。しかし、出発物質である 1,5-ジクロロ-2,4-ジニトロベンゼンから鍵となる化合物 4 までの総収率が 6% と非常に低かった。そのため、原料からの化合物 4 までの合成法の再検討を行った。再検討した合成法を Scheme 1 に示す。



Scheme 1 移動分子パーツ化合物 4 の合成

1,5-ジクロロ-2,4-ジニトロベンゼンを出発原料とし、プロパルギルアミンと反応させることで化合物 2 を収率 79% で得た。次いでチオール体を経由してスルホニルクロリド体 3 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 4 を収率 25% (2 steps) で得た。これにより出発物質から化合物 4 までの総収率を 20% にまで改善できた。

分子転移型遺伝子検出プローブを用いたテンプレート反応

MeS-MBS プローブを活性化させるための還元剤の検討を行った(図 2)。還元剤としては生体内に豊富にあるグルタチオン(GSH)と高い還元力を持つことで知られているトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を用いた(図 2A)。結果、TCEP ではテンプレート非存在下での蛍光強度の低下が見られた。また、テンプレート存在下での消光率も GSH より低い結果となった。さらに GSH 濃度について検討を行った結果、GSH 濃度依存的に消光率は上昇した。一般的に細胞内 GSH 濃度は 5~10 mM であることから、MeS-MBS プローブは細胞内 GSH で十分に活性化されることが確認できた。

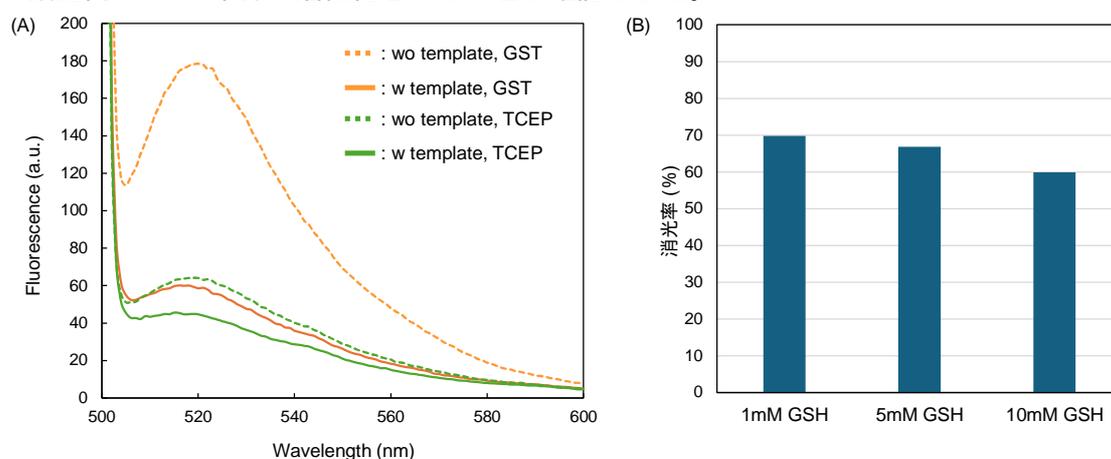
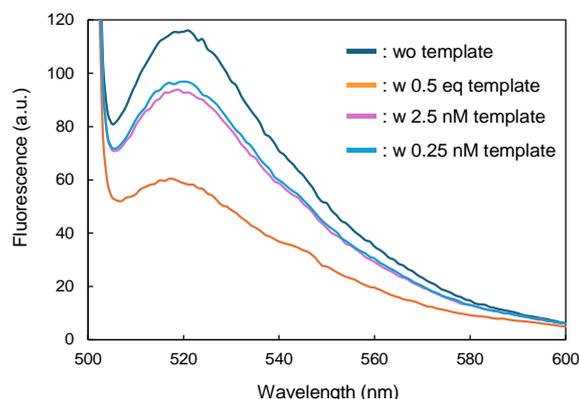


図 2 (A) 還元剤の種類および (B) GSH 濃度の検討

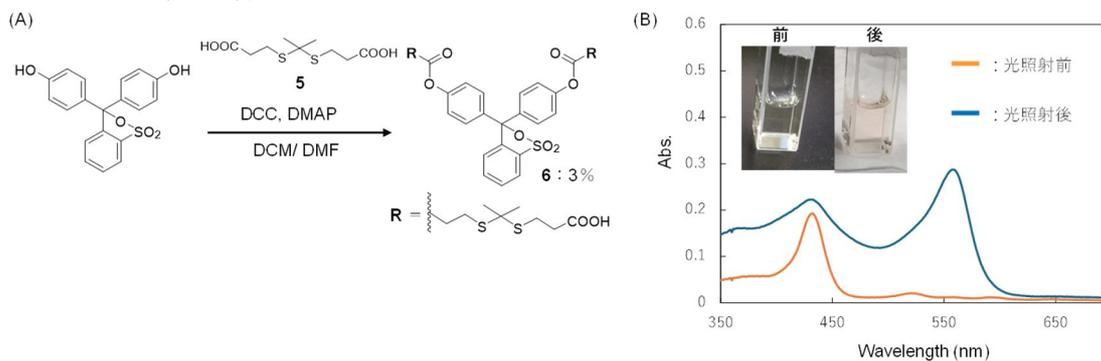
次に、プローブの検出感度についての検討を行った(図 3)。プローブ濃度を 50 nM に固定し、テンプレート量を 25~0.25 nM 変化させて測定を行った。結果、0.25 nM テンプレート存在下でも優位な蛍光の減少が見られた。

図 3 分子転移型遺伝子検出プローブを用いた検出感度の検討



一重項酸素に反応して呈色する色素の開発

比色分析による遺伝子検出への応用を目的として一重項酸素に反応して呈色する色素の合成を試みた。一重項酸素反応色素 **6** は pH 指示薬の 1 種であるフェノールレッドを基本構造に持ち、呈色の鍵となる水酸基を一重項酸素で除去可能なリンカー-5 (*Poly. Chem.*, **11**, 1198) で保護することで得た(図 4A)。



合成した化合物 **6** が一重項酸素に反応して呈色するかの検討を行った(図 4B)。一重項酸素はカチオン性のポルフィリン化合物 TMPyP4 に光を照射することで発生させた。化合物 **6** と TMPyP4 を溶解させた溶液 (in リン酸 Buffer (pH 7.4)) に光を 1 時間照射した。結果、溶液は薄い赤色を呈色した。吸収スペクトルの結果からも光を照射前には見られなかったフェノールレッドの塩基型 X- に特徴的な 550 nm 付近の吸収が見られた。また、光照射後のスペクトルでは 430 nm 付近に TMPyP4 の吸収帯と被っているものの酸型 HX 由来とみられる吸収が観察された。

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
---------	---------