

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月8日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310141

研究課題名（和文） 動物個体内で遺伝子の機能を光制御する新手法の開発

研究課題名（英文） Development of new methods for controlling gene functions in vivo

研究代表者

古田 寿昭（FURUTA TOSHIAKI）

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：90231571

研究成果の概要（和文）：モデル生物の個体内で、任意の遺伝子の機能発現を光制御する新手法の開発を目的に研究を行った。ケージド DNA および RNA を合成する要素技術として、修飾位置特異的ケージド DNA を化学合成するためのケージドヌクレオチドを合成した。また、モジュール型ケージドヌクレオチドを設計・合成し、塩基配列選択的ヌクレオチドケーシング試剤の開発に応用した。さらに、最も長波長光で光活性化できる新規光分解性保護基の開発にも成功した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the study is to develop a new method for regulating biological functions of any genes of interest with high spatial and temporal resolution. To this goal we have been trying to synthesize caged mRNAs and DNAs. We designed new precursor molecules of caged nucleotides having an affinity tag for purification, targeting and molecular recognition. To demonstrate utility of the compound, we developed a new nucleotide caging agent, PNA-Bhc-diazo, that has a peptide nucleic acid (PNA) tag complementary to a target gene for sequence-selective nucleotide caging. A new caging group which can be photo-activated by a visible light was designed and synthesized.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：ケミカルバイオロジー，有機光化学，ケージド化合物

1. 研究開始当初の背景

細胞の生理機能を担う個々の分子の機能は明らかになりつつあるが、既存の研究手法の組み合わせだけでは、生命の全体像を捉えることは難しい。生命をシステムとして理解することを可能にする新しい方法論の開発が急務である。そのためには、生理機能を担う分子であるタンパク質やシグナル分子の機

能を、本来働くべき時期に働いている場所で制御することが望まれる。例えば、遺伝子のコンディショナルな機能制御がこれに相当するが、遺伝子ノックアウトやRNAiに高い時空間分解能は望めない。そこで、これを可能にする要素技術を確立するため、ケージド化合物の化学を活用して時期および細胞（組織）特異的に細胞の生理現象を制御する技術

の開発を目指して研究を続けてきた。DNA あるいは RNA の機能を光で制御する研究も国内外のグループによって進められている。しかし、実際に生きた細胞や生物個体内で遺伝子の機能発現を光制御したのは、「ケージド化合物」を用いた数例に限られている。一方、ケージド化合物による細胞の生理機能制御の試みは、欧米の複数のグループによる研究例がある。それらは、有機合成に基づいて、より高性能なケージド化合物を開発する研究と、既存の化合物を利用して生理的に意味のある現象の光制御を試みる研究に大別される。しかし、化学的な性能の面で、我々のグループが開発した Bhc 基を超えるものはまだ開発されていない。よって現時点では、Bhc 基を用いたケージド化合物のレパートリーを増やしていくことが、「遺伝子の機能発現を光制御する方法」を達成するもっとも現実的かつ確実な方法と考えられる。しかし、Bhc 基も万能ではない。例えばマウスのような哺乳動物の個体で利用するためには、より長波長光で活性化されるものが望ましい。そこで、Bhc 基の活用と並行して、より長波長光で活性化できる光分解性保護基の開発も目指すことにした。

2. 研究の目的

新規ケージド化合物の設計・合成を通じて、個体レベルで遺伝子の機能発現を制御する手法への展開が可能な開発を目的にした。個体内で光制御するためには以下を実現する必要がある。(1) 照射前後で大きな活性の上昇が実現できること、(2) 組織による散乱の少ない長波長光によって光活性化できること、(3) 個体内への導入が容易であること、(4) 働かせたい場所へのターゲティングが可能であること。そこで、平成 22 年度からの 3 年間で、各項目を実現できる要素技術を開発し、研究期間終了時にはモデル生物個体内で、遺伝子の機能発現と機能抑制を光制御する実用的な方法を開発することを目標にする。

3. 研究の方法

(1) ケージドプライマーの開発と修飾位置特異的ケージド DNA の化学合成
哺乳動物個体に外来性遺伝子を導入する場合は、プラスミド DNA のケージド化合物が有効である。そこで、ケージドプライマーを化学合成する。続いて、EGFP あるいは luciferase をコードするプラスミド DNA (pEGFP-N2, pRL-SV40 など) をテンプレートにして、long PCR または overlap extension PCR によってケージドプライマーを伸張して、環状の全長ケージドプラスミド DNA を調製する。合成したケージドプラスミド DNA

を、HeLa 細胞および COS-7 細胞に導入して、紫外光照射の有無による発現量を定量する。光照射によって高い発現上昇を実現するためには、照射前に完全に転写活性が止まっていることが望ましい。そこで、プロモーター領域、TATA box、マルチクロニングサイト、および転写開始コドン近傍に相当する塩基配列のケージドプライマーを合成し、いずれが最適かを検討する。この方法の利点は、照射後に intact なプラスミド DNA を生成する点にある。SV40 ori を持つプラスミドと large T-antigen を持つ細胞の組み合わせでは、複製によるコピー数の増幅が見込めるので一過的に大量のタンパク質を発現することができる。さらに、目的遺伝子の ORF をコードするプラスミド DNA を用いれば発現上昇が、shRNA をコードするプラスミドを用いれば発現抑制も実現可能になる。合成したケージドプラスミドは、遺伝子銃を用いてマウスの皮下に導入し、照射で遺伝子の発現誘導が可能か検討する。

(2) 塩基配列選択的ケージング試剤の開発
DNA や RNA のケージド化合物の調製において、ランダムケージングの利点は、操作の簡便性、低コスト、適用範囲の広さにある。しかし、プラスミド DNA のケージングに適用すると、遺伝子をコードする領域以外がケージングされても、照射前の転写を抑制することができない。約 5,000 bp の dsDNA 上の必要な配列のみを選択的に修飾する必要がある。そこで、塩基配列を認識して狙った位置を修飾できるケージング試剤を開発する。認識部位としては、ペプチド核酸 (PNA) を利用する。PNA は dsDNA の配列を認識して triplex を形成することができるので、この用途に最適である。PNA が認識する配列の挿入位置、ケージングの条件および照射によるケージ解除条件を最適化する。ケージングの配列選択性をフットプリント解析で調べる。続いて哺乳動物培養細胞にリポフェクション法で導入して、照射の有無によるレポーター遺伝子の発現量を定量する。認識配列と PNA の組み合わせは自由に選べるので、混合物の中から狙ったプラスミドだけをケージド化合物に変換することも可能になる。また、PNA の duplex 形成能を利用して、細胞内で内在性の mRNA をケージングできるか検討する。期待通りケージングできれば、共有結合が形成されるので、強力にアンチセンス効果を発揮する。また、照射でレスキューする実験系の構築も期待できる。培養細胞で期待通り働くことが確認されたものは、マウス皮下での照射による発現誘導を検討する。

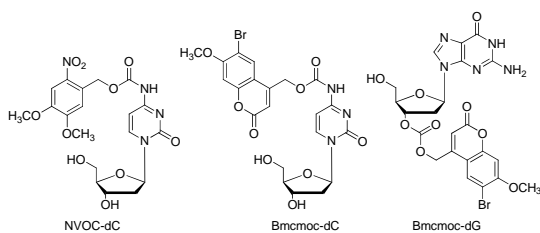
(3) 赤色光で活性化できる新規光分解性保護基の探索
哺乳動物個体で照射するためには、「生体

の窓」と呼ばれる 650-1,000 nm の光を用いることが望ましい。Bhc 基は 375 nm に吸収極大を持ち、赤色から近赤外光 (700-800 nm) を用いる 2 光子励起によって、他のどのケージド化合物よりも高い効率で活性化できる。機能付与による Bhc 基の活用と並行して、個体での利用をより簡便にするため、赤色から近赤外領域に吸収極大を持つ新しい光分解性保護基も開発する。1 光子励起条件下で、500 nm より長波長光で活性化できるケージド化合物は報告されていない。そこで、xanthene 系、および cyanine 系色素を基本骨格にして、合理的な分子修飾によりその光物理学的および光化学的性質の改変を図る。

4. 研究成果

(1) ケージドプライマーの開発

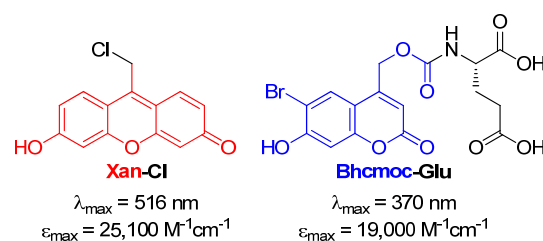
光分解性保護基で修飾したホスホロアミダイトモノマーを開発することが出来れば、PCR によりケージドプラスミド DNA を容易に合成することが可能となる。そこでまず、核酸塩基への光分解性保護基の導入法を最適化した。その結果、デオキシシチジン (dC) やデオキシグアノシン (dG) の環外のアミノ基に NVOC 基を導入できること、Bmcmoc 基を dC の環外のアミノ基および dG のヒドロキシ基に導入できることを明らかにした。また、環外アミノ基を修飾した dC 誘導体を、対応するホスホロアミダイトに変換することも明らかにした。合成したケージドヌクレオチドは、350 nm の紫外光照射によって、元のデオキシヌクレオチドを生成することを確認した。光分解性保護基で修飾したプライマーを用いて、ケージドプラスミド DNA を調製する実験系を構築した。



(2) 可視光で光活性化できる新規光分解性保護基

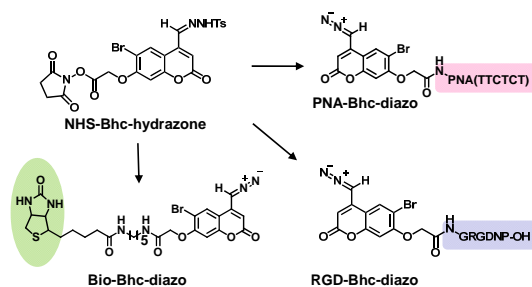
ケージド化合物に使われている既存の保護基の中で、最も高い効率で活性化できるのは (6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl) methyl 基 (Bhc 基) である。しかし、375 nm に吸収極大を持つため、厚みのある組織切片や生物個体で利用するには、より長波長の可視光で活性化できる保護基が望ましい。そこで、本研究では可視光で活性化できる光分解性保護基を開発することを目的とした。キサンテンを基本骨格として、500 nm より長波長に吸収極大をもつ保護基 Xan の合成

を考えた。クロロ酢酸から出発して、3 段階で Xan-Cl の合成に成功した。収率は 73 % となった。合成した Xan-Cl は pH7 の緩衝液中で 516 nm に吸収極大を持つこと、さらに 516 nm の光照射によって光分解し、Xan-OH を生成することを明らかにした。このときの光反応効率は 5278 であった。さらに、Xan-Cl と Bmcmoc-Glu の混合物に 516 nm の光を照射すると Xan-Cl だけを、350 nm の光照射では Bmcmoc-Glu をそれぞれ選択的に光活性化できることも明らかにした。Xan-Cl はこれまでに報告されたケージド化合物のどれよりも、長波長光で活性化可能である。

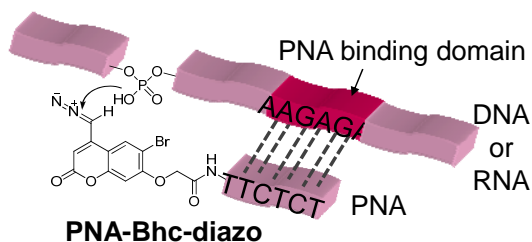


(3) モジュール型ケージドヌクレオチドの開発

遺伝子の機能発現を光制御することを可能にするため、ケージド DNA の開発を進めてきた。ケージング試薬である Bhc-diazo によりケージド dsDNA の合成が可能である。しかし、プラスミド DNA のケージングに適用すると、ケージング反応がランダムに起こるため、ケージングされたプラスミドと未修飾プラスミドの混合物が生成する問題点があった。そこで、モジュール型ケージド化合物のプラットフォーム分子を 2 種類開発した。そのうちのひとつを利用してピオチンタグを持つ新規ケージング試薬 Bio-Bhc-diazo を合成し、ストレプトアビジンで修飾した磁気ビーズを利用したアフィニティー精製によって、未修飾 DNA との混合物からケージド DNA を分離精製できることを明らかにした。分離精製したケージド dsDNA を HeLa 細胞にトランスフェクトしたところ、ケージングしていない dsDNA と比較して、目的遺伝子の発現が 20% に低下し、UV 照射によって 80% まで発現が回復することを確認した。



(4) 塩基配列選択的ケーシング試剤の開発
DNA や RNA のケージド化合物を合成するために、塩基配列を認識して狙った位置を修飾できるケーシング試剤の開発を目指した。DNA の塩基配列を認識するための 6-mer PNA, および, DNA のリン酸結合と共有結合を作るためのジアゾメチル基を持つ新しいケーシング試薬, PNA-Bhc-diazo の合成に成功した。合成した PNA-Bhc-diazo を用いて, PNA 結合配列を含む 80-mer の ssDNA をケーシングできること, PNA-Bhc 基が PNA 結合配列近傍に結合すること, さらに 350 nm 光照射でアンケーシングされることを, 機器分析と酵素反応を利用して確認した。PNA 結合配列を挿入したプラスミド DNA を用いて, 哺乳動物細胞内で発現するルシフェラーゼの定量でケーシング反応の有無を確認する実験系を構築した。



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)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① T. Furuta, K. Manabe, A. Teraoka, K. Murakoshi, A. Ohtsubo, A. Suzuki, Design, synthesis and photochemistry of modular caging groups for caged nucleotides, *Org. Lett.* 査読有, 14, 6182-6185 (2012). DOI: 10.1021/ol3029093
- ② T. Furuta, Designing caged compounds for spatiotemporal control of cellular chemistry, *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan*, 査読有, 69, 1164-1169 (2012). DOI:10.5059/yukigoseikyokaiishi.70.1164
- ③ W. Nomura, T. Narumi, N. Ohashi, Y. Serizawa, N. E. Lewin, P. M. Blumberg, T. Furuta, H. Tamamura, Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically Controlled Activation of Protein Kinase C, *ChemBioChem*, 査読有, 12, 535-539 (2011). DOI:10.1002/cbic.201000670

- ④ 古田寿昭, 鈴木商信, 過渡的複合体の解析を可能にするケージド化合物, *生化学, 査読有*, 83, 966-974 (2011). <http://www.jbsoc.or.jp/event/magazine/pdf/83-10-10.pdf>
 - ⑤ 古田寿昭, 遺伝子の機能発現を光制御するケージド化合物, *光化学, 査読有*, 42, 2-8 (2011). http://photochemistry.jp/journal_j/index.htm
 - ⑥ S. Mizukami, M. Hosoda, T. Satake, S. Okada, Y. Hori, T. Furuta and K. Kikuchi, Photocontrolled Compound Release System Using Caged Antimicrobial Peptide, *J. Am. Chem. Soc.* 査読有, 132, 9524-9525 (2010). DOI:10.1021/ja102167m
 - ⑦ A. Shigenaga, J. Yamamoto, Y. Sumikawa, T. Furuta, A. Otaka, Development and photo-sensitive peptide bond cleavage reaction of two-photon near infrared excitation-responsive peptide, *Tetrahedron Lett.* 査読有, 51, 2868-2871 (2010). DOI:10.1016/j.tetlet.2010.03.079
 - ⑧ S. Yamaguchi, Y. Chen, S. Nakajima, T. Furuta, T. Nagamune, Light-activated gene expression from site-specific caged DNA with a biotinylated photolabile protection group, *Chem. Commun.* 査読有, 46, 2244-2246, (2010). DOI:10.1039/b922502a
- [学会発表] (計 3 4 件)
- ① 岡 映里, 鈴木 商信, 古田 寿昭, β -ガラクトシダーゼ存在下で光解離するケージド化合物の開発, 日本化学会第 93 春季年会, 立命館大学 (滋賀県), 2013 年 3 月 25 日
 - ② 利根川千尋, 中山智裕, 鈴木商信, 古田寿昭, 任意のタンパク質をラベル化できる新規ケージドフルオロフォアの合成と光反応性, 日本化学会第 93 春季年会, 立命館大学 (滋賀県), 2013 年 3 月 25 日
 - ③ T. Furuta, Modular caged compounds: Design, synthesis and their use, 3rd International symposium on Creation of Functional Materials, Dec. 11, 2012 (Keynote lecture), University of Tsukuba (Ibaraki)
 - ④ C. Tonegawa, T. Nakayama, A. Suzuki and T. Furuta, Synthesis and photochemistry of new caged fluorophores, 13th Tetrahedron

- Symposium Asian Edition, Challenge in Bioorganic & Organic Medicinal Chemistry, Nov. 30, 2012, Taipei (Taiwan)
- ⑤ E. Oka, A. Asaba, A. Suzuki and T. Furuta, Synthesis and photochemistry of caged nucleosides, 13th Tetrahedron Symposium Asian Edition, Challenge in Bioorganic & Organic Medicinal Chemistry, Nov. 30, 2012, Taipei (Taiwan)
- ⑥ A. Teraoka and T. Furuta, Affinity purification of biotinylated caged nucleotides using a streptavidin magnetic bead, 13th Tetrahedron Symposium Asian Edition, Challenge in Bioorganic & Organic Medicinal Chemistry, Nov. 28, 2012, Taipei (Taiwan)
- ⑦ 寺岡 葵・石橋 彩・古田寿昭, ビオチンタグを持つケージドヌクレオチドを用いた遺伝子発現の光制御, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 25 日, 慶応大学 (神奈川県)
- ⑧ 星田智子・古田寿昭, 塩基配列選択的ケージング試薬の設計と合成, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 25 日, 慶応大学 (神奈川県)
- ⑨ T. Furuta, A. Suzuki, J. Ohmuro, Controlling cellular functions using caged compounds, 17th International Biophysics Congress, November 2, 2011, Beijing (China)
- ⑩ T. Hoshida, A. Takada, M. L. Jikko, T. Furuta, Caged nucleotides: design, synthesis and their use, 17th International Biophysics Congress, November 1, 2011, Beijing (China)
- ⑪ A. Teraoka, T. Furuta, Manipulation of gene expression with caged nucleotides having a biotin tag, 17th International Biophysics Congress, November 1, 2011, Beijing (China)
- ⑫ T. Furuta, Design and synthesis of caged nucleotides, 第 48 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 17 日, 兵庫県立大学 (兵庫県)
- ⑬ 齊藤貴譜, 鈴木商信, 古田寿昭, 核酸塩基を保護したケージドヌクレオシドの合成と光反応性, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011 年 9 月 13 日, つくば国際会議場 (茨城県)
- ⑭ 岡 映里, 浅場貴一, 鈴木商信, 古田寿昭, リボースを保護したケージドヌクレオシドの合成と光反応性, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011 年 9 月 12 日, つくば国際会議場 (茨城県)
- ⑮ 古田寿昭, 遺伝子の機能発現を光制御するケージド化合物の設計と合成, 第 26 回生体機能関連化学部会若手フォーラム, 筑波大学, 2011 年 9 月 11 日, 筑波大学 (茨城県) (シンポジウム依頼講演)
- ⑯ 星田智子, 高田 梓, 実光真理, 古田寿昭, PNA を導入したケージドヌクレオチドを用いた遺伝子の光発現制御, 2011 年光化学討論会, 2011 年 9 月 7 日, 宮崎市 (宮城県)
- ⑰ 寺岡 葵, 古田寿昭, ビオチンタグを持ったケージドヌクレオチドを用いた遺伝子の光発現制御, 2011 年光化学討論会, 宮崎, 2011 年 9 月 7 日, 宮崎市 (宮城県)
- ⑱ 古田寿昭, 遺伝子の機能発現を光制御するケージド化合物の開発, 日本化学会第 91 春季年会, シンポジウム依頼講演, 2011 年 3 月 26 日, 神奈川大学 (神奈川県)
- ⑲ A. Teraoka and T. Furuta, Synthesis of caged nucleotides having a biotin tag, 2010 International chemical congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), December 19, 2010, Honolulu (USA)
- ⑳ T. Asaba, A. Z. Suzuki and T. Furuta, Synthesis and photochemistry of the new caged Ca²⁺ chelators, 2010 International chemical congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), December 19, 2010, Honolulu (USA)
- ㉑ A. Okuizumi, A. Z. Suzuki and T. Furuta, Synthesis and photochemistry of new caged firefly luciferins, 2010 International chemical congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), December 19, 2010, Honolulu (USA)
- ㉒ T. Saito, A. Z. Suzuki and T. Furuta, Chemo-enzymatic synthesis of caged oligonucleotides, 2010 International chemical congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), December 19, 2010, Honolulu (USA)
- ㉓ K. Manabe and T. Furuta, Design and synthesis of multifunctional caged

compounds, 2010 International chemical congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), December 19, 2010, Honolulu (USA)

- ②④ T. Hoshida and T. Furuta, Development of a sequence selective nucleotide caging agent, 2010 International chemical congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), December 19, 2010, Honolulu (USA)
- ②⑤ 古田寿昭, 細胞の局所刺激を可能にするケージド化合物の開発, BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会 合同大会), 2010年12月8日 (ワークショップ依頼講演) 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ②⑥ T. Hoshida and T. Furuta, Sequence-selective Nucleotide Caging with PNA-Bhc-diazo, ICPOC20 (20th International Conference on Physical Organic Chemistry), Aug. 26, 2010, Busan (Korea)
- ②⑦ K. Manabe and T. Furuta, Design and Synthesis of Multifunctional Caging Agents, ICPOC20 (20th International Conference on Physical Organic Chemistry), Aug. 26, 2010, Busan (Korea)
- ②⑧ A. Teraoka and T. Furuta, Synthesis of Caged Nucleotides Having a Biotin Tag, ICPOC20 (20th International Conference on Physical Organic Chemistry), Aug. 26, 2010, Busan (Korea)

[図書] (計7件)

- ① 尾藤晴彦, 松崎政紀, 吉村由美子, 古田寿昭, 羊土社, 光技術を用いた神経回路機能の解読と操作, 「実験医学増刊 心と体のクロストークから解く精神・神経疾患」櫻井武, 澤明編集, 2012年, 100-106
- ② 古田寿昭, 羊土社, ケージド DNA/RNA を用いる遺伝子発現の光制御, 「実験医学別冊 遺伝子導入プロトコール」仲嶋一範, 北村義浩, 武内垣成編集, 2012年, 69
- ③ 古田寿昭, 羊土社, ケージド化合物を利用した *in vivo* での遺伝子の機能調節, 「実験医学増刊 疾患克服をめざしたケミカルバイオロジー」浦野泰照編集, 2012年, 150-155
- ④ 古田寿昭, シーエムシー出版, 二光子励起で活性化可能なケージド化合物, 「高効率

二光子吸収材料の開発と応用」2011年, 167-177

- ⑤ 古田寿昭, 化学同人, 遺伝子の機能発現を光制御するケージド核酸誘導体, CSJ Current Review 06 「核酸化学のニュートレンド」2011年, 138-143
- ⑥ 古田寿昭, 化学同人, 細胞の生理機能を光制御する Caged 化合物, 化学フロンティア 22 「生命現象を理解する分子ツール最前線」2010年, 119-126
- ⑦ 古田寿昭, シーエムシー出版, 多機能ケージド化合物の開発, 「シングルセル解析の最前線」神原秀記, 松永是, 植田充美監修, 2010年, 49-55

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 細胞種選択的に光活性化可能なケージド化合物

発明者: 古田寿昭, 曾根雅紀, 鈴木商信, 岡映里

権利者: 東邦大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-36379 号 (2013)

出願年月日: 2013年2月26日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/biomol/tfuruta/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 寿昭 (FURUTA TOSHIAKI)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号: 90231571

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし