

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750178

研究課題名（和文） 核酸の蛍光誘導化反応による超効率的遺伝子シグナル増幅法の開発

研究課題名（英文） Development of hyper signal amplification method by fluorogenic reaction of oligonucleotides

研究代表者

佐藤 浩輔（SATO KOUSUKE）

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：70415686

研究成果の概要（和文）：ヌクレオシドの塩基部にクロスリンク試薬の構造を取り入れたヌクレオシドホスホロアミダイト体を得ることに成功した。さらに、DNA 自動合成機によりオリゴヌクレオチドを合成した。一方で、5-ホルミルウリジンもオリゴヌクレオチド中へと導入し、これらのオリゴヌクレオチドについて、テンプレート上での反応を検討した。コンピュータモデリングにより適切な配置を取るようデザインをし、さらなる反応の検討を行っている。

研究成果の概要（英文）：We synthesized a nucleoside phosphoramidite containing an aminothiophenol structure for cross-link with 5-formyl-2'-deoxyuridine. Oligodeoxyribonucleotide (ODN) were also synthesized by DNA synthesizer, and deprotected and purified. The reaction between ODN containing aminothiophenol and 5-formyl-2'-deoxyuridine was investigated on the complementary template ODN. We also designed the sequence of ODNs by computational modeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸・蛋白質・糖化学

1. 研究開始当初の背景

最近、我々の細胞内で RNA 分子が様々な役割をしていることが明らかになってきた。例えば、microRNA と呼ばれる自己の小分子 RNA が様々な遺伝子の制御を担っており、我々生物にとって極めて重要な分子であることが明らかとなっている。しかしながら、microRNA の多くは未だにその詳細な機能は明らかとはなっていない。細胞内あるいは細胞外からのどのような刺激に対して microRNA が応答し、その機能を発現するかを調べるためには microRNA の選択的イメージング法が必要不可欠である。しかしなが

ら、生成量の少ない microRNA の“生”のイメージングは未だ困難である。

これまでに生成量の少ない RNA を生きた細胞内で検出するために、低侵襲性である蛍光を用いたプローブがいくつか開発されてきた。蛍光分子に消光分子（クエンチャー）を結合させたモレキュラービーコン型のプローブや quenched autoligation 型プローブを用いることで上記の問題の解決が試みられてきた。しかし、これらのプローブは S/B 比（シグナル/バックグラウンド比）やシグナルの増幅という点で十分な性質を有していなかった。

最近、Abe らは還元反応によりトリガーされる発蛍光性プローブを開発し、これらの問題点の解決を試みている (*Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1026)。このプローブは約 300 倍もの蛍光の増強 (発蛍光反応) と 50 回の触媒回転能を有しており、ヒト生細胞内の rRNA や b-actin の mRNA の検出に成功している。また、Okamoto らは励起子相互作用を利用したプローブを開発し、ヒト生細胞内での選択的 RNA の検出に成功している (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6480)。しかし、これらの方法でも 10^{-18} mol) レベルの小分子 RNA を実際に検出することは困難である。

2. 研究の目的

これらの現状を踏まえ、申請者は以下のような着想に至った。1) これまでとは異なる構造を有し、強い蛍光と優れた S/B 比をもつ発蛍光分子を構築し、2) 蛍光誘導化後の生成物とターゲット RNA との二本鎖を不安定化することで、超効率的な発蛍光反応プローブの触媒回転を達成し、ヒト生細胞中の microRNA を検出・定量できる。これまでに申請者は DNA 中の酸化損傷の一つである 5-formyl-2'-deoxyuridine (^5fU) を選択的に検出することを目的として、新規の蛍光性核酸である 5-benzothiazolyl-2'-deoxyuridine (^5bU) を報告している (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8392)。本反応は水中での反応が可能であり、二つの芳香族が新たに生じるもう一つの環を介してビフェニル型の延長した平面分子を形成することを特徴とする。この 5-benzothiazolyl-2'-deoxyuridine (^5bU) は最大で 0.70 の蛍光量子収率をもち、励起波長と蛍光波長の差であるストークスシフト値も 113 nm と優れた性質をもつ。また、この反応は発蛍光反応 (fluorogenic) であり、反応前の試薬と 458 nm における蛍光強度を比較したところ、約 6000 倍もの蛍光増強が観察された。すなわち、極めて低いバックグラウンド蛍光での検出が可能であった。

そこで、本研究では化学選択的な本反応を遺伝子検出オリゴヌクレオチドプローブへと応用し、上記の遺伝子検出の問題点を一挙に解決する方法の開発を行う。最終的にはヒト生細胞中の microRNA を検出・定量し、診断やテーラーメイド医療への応用を目指す。

3. 研究の方法

本研究は大きく 4 つの内容に分けることができる。A) 新規ヌクレオシド誘導体の合成、B) 新規ヌクレオシド誘導体の単量体での評価、C) In vitro でのオリゴヌクレオチドプローブの評価、D) 生細胞内でのオリゴヌクレオチドプローブの評価である。平成 2

3 年度は 2-aminothiophenol (AT) 骨格を含む新規ヌクレオシド誘導体の合成と単量体 ^5U との反応とその成績体の評価を行う。系統的に合成し、その評価結果から良い性質をもつものを再度設計・合成できるように考慮する。平成 24 年度は得られた最適化合物をオリゴヌクレオチドへ導入し、プローブとしての評価を行う。まずは別途化学合成した RNA を用いた反応性や触媒回転能を様々な実験 (T_m 測定など) から評価し、改良した後、細胞への応用を行う。生細胞での評価では豊富な rRNA から最終的には微量な microRNA の検出を条件検討しながら確立する。

4. 研究成果

まず、ヘテロ環骨格を持つ誘導体として、ピリジン骨格を有するアミノチオフェノール試薬の合成を試みたが、目的とする試薬は得られなかった。合成過程の化合物の安定性に問題があると考えられるので、今後異なる合成法での試薬合成を検討予定である。新規合成法はその他のヘテロ環、環拡張誘導体にも対応可能なものを検討中である。同時に蛍光波長の長波長化を狙い、共役系の延長について検討した。共通前駆体を合成し、種々のカップリング反応による共役延長型試薬の合成を今後も引き続き試みる。また、種々の試薬合成前、あるいは後にこれをヌクレオシドへと導入する必要があるが、その結合部位として、ヌクレオシドの水酸基だけでなく塩基部そのものを試薬の構造にすることについて検討した。塩基部に導入することにより、本研究の独創的部分である、核酸二重鎖構造の不安定化が起こりやすくなる可能性があるかと期待された。

2-ニトロアニリンを出発原料として合成した塩基部ヨード体を糖部グリカル体とのヘック反応を用いたグリコシド結合形成反応を検討した結果、望みとする C-ヌクレオシドを β -選択的に得ることができた。さらにこのものの誘導化を進め、ヨード化、チオールカップリング反応、ニトロ基の還元、保護基の脱着を経て、望みとするヌクレオシドホスホロアミダイト体を得ることに成功した。さらに、DNA 自動合成機によりオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドの脱保護等について検討を行った結果、効率的に脱保護することは困難であった。種々検討を重ねた結果、塩基部の保護をジルフィド結合型のものを用いることで解決可能であった。

一方で、オリゴヌクレオチド中の 5-ホルミルウリジンに対する反応性を評価するために、化学的に 5-ホルミルウリジンをオリゴヌクレオチド中に導入するためのユニットの合成を行った。5-ヨード-2'-デオキシウリジンを出発原料として、7 工程を経て DNA 自

動合成機に導入するためのヌクレオシドホスホロアミダイト体を得た。5-ホルミルウリジンもオリゴヌクレオチド中へと導入し、これらのオリゴヌクレオチドについて、テンプレート上での反応を検討した。しかし、予期に反して効率的な反応は進行しなかった。この理由については以下の様に考察している。試薬部アミノ基、チオール基と 5-ホルミルウリジン部ホルミル基はテンプレート DNA 上で二本鎖の構造上重なり合うように近接する必要がある。当初の配列デザインでは両反応基は適切な相対配置にないと考えられた。そこで、コンピュータモデリングにより適切な配置を取るようデザインをし直し、新たな配列にて反応の検討を行っているところである。デザインの結果より、試薬部を 3'-末端側に結合し、5-ホルミルウリジン部を 5'-末端側に結合することが重要であることが示唆された。今後は現在検討中のデザインでの反応の詳細を調べると共に、プローブ核酸の糖部化学修飾についても検討を行い、最適構造を見つけ、一般的な微量 RNA 検出法として発展させて行く予定である。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Structure of the DNA (6-4) photoproduct dTT(6-4)TT in complex with the 64M-2 antibody Fab fragment implies increased antibody-binding affinity by the flanking nucleotides.
Yokoyama, H.; Mizutani, R.; Satow, Y.; Sato, K.; Komatsu, Y.; Ohtsuka, E.; Nikaido, O. *Acta Cryst.* (2012), D68, 232-238. (査読あり)
10.1107/S0907444912000327
2. Highly Fluorescent 5-(5,6-Dimethoxybenzothiazol-2-yl)-2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate as an Efficient Substrate for DNA Polymerases.
Sato, K.; Sasaki, A.; Matsuda, A. *ChemBioChem* (2011), 12, 2341-2346. (査読あり)
10.1002/cbic.201100452
3. Fluorescence Properties of 5-(5,6-Dimethoxybenzothiazol-2-yl)-2'-Deoxyuridine (d^{bU}) and Oligodeoxyribonucleotides containing d^{bU} .
Hirose, W.; Sato, K.; Matsuda, A. *Eur. J. Org. Chem.* (2011), 2011, 6206-6217. (査読あり)
10.1002/ejoc.201100818

4. Highly efficient enzymatic synthesis of 3'-deoxyapionucleic acid (apioNA) having the four natural nucleobases.
Kataoka, M.; Kouda, Y.; Sato, K.; Minakawa, N.; Matsuda, A. *Chem. Commun.* (2011), 48, 8700-8702. (査読あり)
10.1039/C1CC12980E

[学会発表] (計 13 件)

1. 佐藤浩輔、佐々木彩乃、松田彰
5-(5,6-dimethoxybenzothiazol-2-yl)-2'-deoxyuridine を用いた蛍光ラベル化 DNA の酵素合成
日本薬学会第 133 年会、2013 年 03 月 28 日~2013 年 03 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
2. 野村勇作、柏木怜、佐藤浩輔、松田彰
ナフチリジンリボヌクレオチド 5'-トリリン酸体の合成と T7RNA ポリメラーゼによる取り込み反応の検討
日本薬学会第 133 年会、2013 年 03 月 28 日~2013 年 03 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
3. 佐藤浩輔
修飾ヌクレオシドの新規機能性分子への展開
日本薬学会北海道支部例会第 139 例会(招待講演)、2012 年 12 月 08 日~2012 年 12 月 08 日、北海道大学学術交流会館(札幌)
4. 野村勇作、柏木怜、佐藤浩輔、松田彰
ナフチリジン-イミダゾピリドピリミジン塩基対を用いた選択的転写反応の検討
アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、2012 年 09 月 24 日~2012 年 09 月 26 日、仙台市民会館(宮城県)
5. 佐藤浩輔、広瀬亘、松田彰
Selective detection method for 5-formyl-2'-deoxyuridine in DNA using a fluorogenic reagent
XX International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids、2012 年 08 月 05 日~2012 年 08 月 09 日、McGill University(カナダ)
6. 佐藤浩輔
DNA 酸化損傷の選択的検出法の開発
日本薬学会北海道支部例会第 138 例会(招待講演)、2012 年 6 月 16 日~2012 年 6 月 17 日、札幌コンベンションセンター(北海道)
7. 野村 勇作、柏木 怜、佐藤 浩輔、松田 彰

- 4 本の水素結合を有するナフチリジン-イミダゾピリドピリミジン塩基対を用いた転写反応
日本薬学会第132年会、2012年3月29日、北海道大学(札幌市)
8. 柏木 怜、佐藤 浩輔、松田 彰
T7 RNA polymerase による基質トリリン酸体認識機構の解明
日本薬学会第132年会、2012年3月31日、北海道大学(札幌市)
9. Sato, K.; Hirose, W.; Matsuda, A.
Development of Selective Detection Method for 5-Formyl-2'-deoxyuridine in DNA using a Fluorogenic Reagent
ICCEOCA-6/NICCEOCA-2, 2011年12月12日、The Chinese University of Hong Kong(香港)
10. Nomura, Y.; Kashiwagi, S.; Sato, K.; Matsuda, A.
Synthesis of 1,8-naphthyridine C-ribonucleotides and their incorporation into RNA by T7 RNA polymerase
The 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2011, 2011年11月9日、北海道大学(札幌市)
11. Kashiwagi, S.; Sato, K.; Matsuda, A.
Groove recognition of T7 RNA polymerase using base-modified triphosphate analogs
The 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2011, 2011年11月9日、北海道大学(札幌市)
12. 幸田 康生、片岡 真由美、佐藤 浩輔、松田 彰
糖部修飾型核酸 3'-deoxyapionucleic acid (apioNA) の性質と酵素合成
アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011, 2011年9月1日、大阪大学(吹田市)
13. 野村 勇作、柏木 怜、佐藤 浩輔、松田 彰
1,8-ナフチリジン C-リボヌクレオチドの合成と T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応
日本薬学会北海道支部例会第136例会、2011年5月21日、札幌コンベンションセンター(北海道)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakka/Ma>

tsuda_Lab/Matsuda_Lab_Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 浩輔 (SATO KOUSUKE)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：70415686

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし