

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 6月 3日現在

機関番号：13302

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750185

研究課題名（和文） 核酸の生体内可視化を目指した¹⁹F核磁気共鳴プローブの開発研究課題名（英文） Development of molecular probes for nucleic acids imaging based on ¹⁹F NMR/MRI

研究代表者

坂本 隆 (SAKAMOTO TAKASHI)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・助教

研究者番号：80423078

研究成果の概要（和文）：生体内で核酸を直接イメージングすることを目指し、¹⁹F MRによる核酸イメージングが可能な、新規分子プローブの検出感度の改善を目的に種々のフッ素ラベル剤を合成し機能評価を行った結果、(1) キラル制御された新規フッ素ラベル剤により5倍以上のS/N比の改善、(2) フッ素ラベル剤のマルチラベリングにより2.4倍の検出感度の向上、また、(3) ケミカルシフトレシオ変化型プローブの創成に成功した。

研究成果の概要（英文）：To improve the detection limit of the probe for ¹⁹F MR detection or imaging of target nucleic acids, new ¹⁹F labeling reagents were synthesized and introduced to the 5' end of oligonucleotide probe having stem-loop structure. Results of the ¹⁹F NMR measurement in the presence of target DNA suggesting that the ¹⁹F labels having mono chiral structure have 5-fold large S/N ratio compared with racemic one, and the multi labeling is effective for improvement of detection limit. Furthermore, the probe capable of ratiometric detection of target DNA was successfully developed.

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：核酸化学・バイオイメージング

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：分子プローブ・核酸・イメージング・核磁気共鳴

1. 研究開始当初の背景

PET（陽電子断層法）やMRI（核磁気共鳴画像法）など、近年の生体内可視化技術の発展は目覚ましく、種々の疾患の診断、治療効果判定に重要な役割を果たしている。最近では疾患特異的マーカータンパク質を標的とするアルツハイマー病 (Dimou, E. et al., *Curr. Alzheimer Res.*, 6, 312 (2009)) やガン (Domingues, R.C. et al., *Am. J. Roentgenol.*, 192, 1012 (2009)) 診断用分子プローブが開発され、これらの疾患の早期発見につながるものと期待されている。一方で、多くの疾患関連遺伝子の発見により、核酸類は疾患マーカーとして確固たる地位を

築きつつある (He, Y.D., *Cancer Biomark.*, 2, 103 (2006), Pawitan, J. A., *Int. J. Clin. Pract.*, 63, 1378 (2009))。つまり核酸は格好の生体内可視化の標的分子であるととらえる事ができる。このことから生体内で標的核酸を可視化することができれば、種々の核酸類を指標とした生体イメージングによる疾患の診断、治療効果判定が可能になると期待できる。

多くの夾雑物が混在する生体内で標的分子のみを可視化するには、高いシグナルノイズ (S/N) 比および高いシグナルバックグラウンド (S/B) 比で検出が可能な分子プローブが求められる。このような観点から、近

年、 ^{19}F 核磁気共鳴 (^{19}F MR) が注目を集めている。 ^{19}F を用いたMRIでは、(1) ^{19}F の天然存在比が100%であるため、入手が容易でコストが低い、(2) NMR感度が比較的高い (^1H 核の80%程度)、(3) 低バックグラウンド等の理由から、イメージングプローブの新たな検出法として注目を集めている。最近ではより高いS/B比をもつプローブとして、常磁性緩和促進 (PRE) 効果による距離依存的なMRシグナル消失を用いた ^{19}F MRシグナル OFF/ON型の酵素活性イメージングプローブが報告され、ガンママーカ酵素類のイメージングに成功している (Mizukami, S. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 794 (2008))。

2. 研究の目的

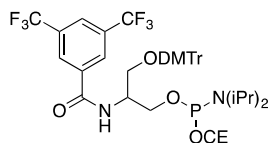
本研究では生体内で核酸を直接イメージングすることを目指し、生体バックグラウンドの低い ^{19}F MRによる核酸イメージングが可能な、新規分子プローブの創製を目的とした。既に標的DNA存在下でのみフッ素MRシグナルを示す、OFF/ON型のプローブの開発に成功していたが、検出感度の低さ(数 μM)が問題であった。そこで、検出感度の改善を目的に、(1) キラル制御された新規フッ素ラベル剤の開発、(2) マルチラベリングによる検出感度改善、を試みた。また、定量検出を目的に(3) ケミカルシフトレシオ変化型プローブの創成、を試みた。

3. 研究の方法

(1) キラル制御された新規DNAフッ素ラベル剤の開発

従来型のフッ素ラベル剤 (2-アミノ-1, 3-プロパンジオールを骨格に使用) では、ラベル剤合成時に鏡像異性体が生成していたため、 ^{19}F MRシグナルが2本線となり、検出感を低下させる一因となっていた。そこで、合成時の鏡像異性体生成を防ぐため、非等価

従来型フッ素ラベル剤



キラル制御された新規フッ素ラベル剤

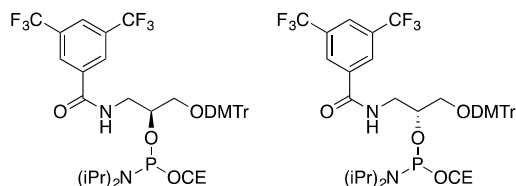


図1 開発した新規フッ素ラベル剤の構造

な水酸基を持つリンカーとして (R)あるいは(S)-3-アミノ-1,2-プロパンジオールを用いた。アミノ基に3,5-ビストリフルオロメチル安息香酸を縮合、トリチル化、アミダイト化を経て、新規フッ素ラベル剤の合成を行った。Stem-Loop型のオリゴDNA (CCTACGCCA ACAGCTCCgtagg)の5'末端にフッ素ラベル剤を導入し、3'末端にGd-DOTA錯体を導入したプローブを合成し、標的オリゴDNA (gtagttGGAGCTGTGGCGTAGGcaag)存在下での ^{19}F NMR測定結果から検出感度の改善効果の評価した。

(2) マルチラベリングによる検出感度改善

ジオール骨格を持つフッ素ラベル剤の場合、DNA固相合成により容易に複数のフッ素ラベル剤をプローブに導入することが可能である。そこで、従来型のDNAフッ素ラベル剤をプローブの5'末端にタンデムに複数個導入することで、プローブあたりのフッ素原子含有量を増やし、検出感度の改善を試みた。

(3) ケミカルシフトレシオ変化型プローブの創成

標的核酸の定量検出を目指す場合、ケミカルシフトが標的核酸の濃度依存的に変化 (レシオ変化) することで、信頼性の高い定量検出が可能となる。そこで、5'末端にヘキサメチレンリンカーを介して3,5-ビストリフルオロメチル安息香酸を導入したプローブを合成し、標的核酸添加によるケミカルシフトの変化を調べた。

4. 研究成果

(1) キラル制御された新規DNAフッ素ラベル剤の開発

(R)あるいは(S)-3-アミノ-1,2-プロパンジオール骨格に3,5-ビストリフルオロメチル安息香酸を縮合させたホスホアミダイトユニットを良好な収率で得ることができた。各フッ素ラベル剤をオリゴDNAの5'末端に導入し (収率93%以上)、精製後、 ^{19}F NMRを測定した結果、いずれも先鋭な1本線のシグ

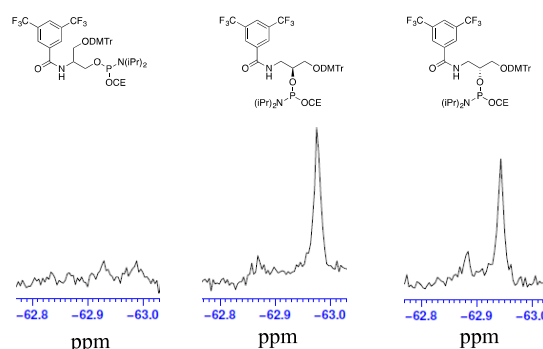


図2 新規フッ素ラベル剤で修飾したプローブの ^{19}F NMRスペクトル

ナルを示し、従来型でみられた2本線は観測されなかった。従来型のフッ素ラベル剤の場合とS/N比を比較した結果、それぞれ63(R体)、70(S体)、12(従来型)となり、約5.8倍のS/N比の改善に成功した。

(2) マルチラベリングによる検出感度改善

従来型のプローブの最低検出濃度が2.5 μM程度であったのに対して、上記の改良型プローブでは1~1.2 μMで、2倍以上の検出感度改善が見られた。しかしながら数十~数百nMしか存在しない細胞内RNAを検出するには更なる検出感度の改善が必要である。そこで、従来型フッ素ラベル剤をStem-Loop型プローブの5'末端に連続的に複数個ラベル(1個、2個および4個導入)した核酸検出プローブを合成した。ラベル効率ほぼ定量的であった。標的DNA存在下で¹⁹F NMR測定を行った結果、2個連続して導入したプローブで、2.4倍の検出感度向上が見られ(検出限界500 nM程度)、細胞内RNA検出に適用可能なプローブの開発に成功した。今後、細胞内RNA検出に挑戦する。

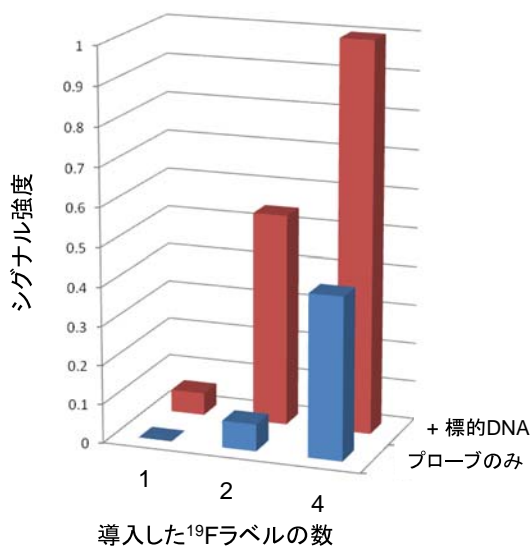


図3 従来型フッ素ラベル剤を複数導入したプローブの¹⁹F NMRシグナル強度

(3) ケミカルシフトレシオ変化型プローブの創成

6-アミノヘキサノールリンカーを介して3,5-ビストリフルオロメチル安息香酸を導入したステムループ型オリゴDNAプローブを合成した。標的DNA存在下、¹⁹F NMRを測定したところ、標的DNA濃度依存的に¹⁹F NMRのケミカルシフトが変化することを見出した。これを用いた核酸の定量イメージングの可能性が示された。

レシオ検出用新規フッ素ラベル剤

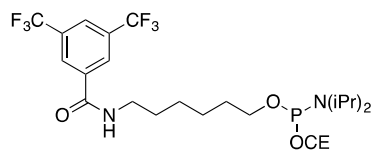


図4 レシオ検出用に開発した新規フッ素ラベル剤の構造

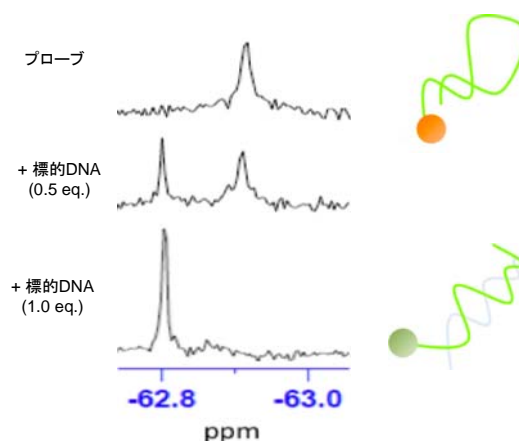


図5 ケミカルシフトレシオ変化型プローブに標的DNAを添加したときの¹⁹F NMRケミカルシフトの変化

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5件)

(1) Atsuo Shigeno, Takashi Sakamoto, Yoshinaga Yoshimura, Kenzo Fujimoto, Quick regulation of mRNA functions by a few seconds of photoirradiation, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10, 2012, 7820-7825 【査読有】

(2) Kenzo Fujimoto, Kaoru Hiratsuka-Konishi, Takashi Sakamoto, Tomoko Ohtake, Ken-ichi Shinohara, Yoshinaga Yoshimura, Specific and reversible photochemical labeling of plasmid DNA using photoresponsive oligonucleotides containing 3-cyanovinylcarbazole, *Molecular BioSystems*, 8, 2012, 491-494 【査読有】

(3) Takashi Sakamoto, Takehiro Ami, Kenzo Fujimoto, 5-Methylcytosine selective photoligation using photoresponsive oligonucleotides containing various 5-vinyl-2-deoxyuridines having an aromatic group, *Chemistry Letters*, 41, 2012, 47-49 【査読有】

(4) Takashi Sakamoto, Hikaru Hayakawa,

Kenzo Fujimoto, Development of a potassium ion sensor for ^{19}F magnetic resonance chemical shift imaging based on fluorine-labeled thrombin aptamer, *Chemistry Letters*, 40, 2011, 720-721 【査読有】

(5) Takashi Sakamoto, Yu-ki Shimizu, Jun Sasaki, Hikaru Hayakawa, Kenzo Fujimoto, Signal turn-on probe for nucleic acid detection based on ^{19}F nuclear magnetic resonance, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 2011, 303-306. 【査読有】

〔学会発表〕(計5件)

(1) Takashi Sakamoto, Hikaru Hayakawa, Yu-ki Shimizu, Jun Sasaki, Kenzo Fujimoto, Development of nucleic acids based probes for the ^{19}F MRI/MRS of biomolecules, The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2012), 2012年11月16日、名古屋、愛知.

(2) Takashi Sakamoto, Hikaru Hayakawa, Jun Sasaki, Satomi Kishi, Kenzo Fujimoto, Development of Nucleic Acids Based-Probes for the ^{19}F MRI/MRS of Biomolecules, World Molecular Imaging Congress (WMIC2012), 2012年9月8日, ダブリン、アイルランド

(3) 早川輝、佐々木淳、坂本隆、藤本健造「フッ素核磁気共鳴によるカリウムイオンセンサーの開発」H23年度北陸地区研究発表会、2011年11月18日、つくば市、千葉

(4) 坂本隆、清水勇喜、佐々木淳、早川輝、藤本健造「フッ素化合物修飾オリゴ DNA を用いた ^{19}F NMR による核酸の検出」第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月12日、つくば市、茨城

(5) 早川輝、佐々木淳、坂本隆、藤本健造「カリウムイオンをセンシングする ^{19}F MRI 用造影プローブの開発」第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月12日、つくば市、茨城

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 隆 (SAKAMOTO TAKASHI)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアル

サイエンス研究科・助教

研究者番号：80423078