

機関番号：13302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655149

研究課題名(和文) 光誘起による核スピン偏極を利用した¹⁹F-MR 核酸類イメージング法の開発研究課題名(英文) ¹⁹F-MR Imaging of Nucleic Acids based on Photochemically Hyperpolarized Nuclear Spins

研究代表者

藤本 健造 (FUJIMOTO, KENZO)

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・教授

研究者番号：90293894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：近年、細胞内イメージング技術の進歩によって、様々な疾病の病理に関わる金属イオンや酵素活性の可視化が現実のものとなっている。しかしながら、現在最も普及している蛍光イメージング法では光の組織透過性の低さから、生体深部の可視化は困難であるという問題が指摘されている。一方で¹⁹F フッ素を各種とする MR イメージングは、シグナルの生体透過性が高く、低バックグラウンドであるという特長を持つことから注目を集めているが感度が低いという問題があった。そこで本研究では核酸類のイメージングにおいて、¹⁹F フッ素を各種とする MR イメージングの感度を光化学的に向上させるためのプローブ設計と反応開発に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：In vivo imaging technologies, such as X-ray computed tomography, positron emission tomography, and nuclear magnetic resonance imaging, are promising technologies for diagnosis of various disorders and follow up after surgical treatments. Due to the low background signal of ¹⁹F MR in vivo, these ¹⁹F MR based imaging probes have potential for high contrast and specific imaging of target biomolecules. However, molecular ¹⁹F probes that can image nucleic acids have been scarcely reported, because of low sensitivity of ¹⁹F MR signal. As the method that can tremendously enhance the MR signal of ¹⁹F nuclei by using of parahydrogen-induced hyperpolarization (PHIP) of ¹⁹F nuclei. So, ¹⁹F-MR imaging of DNA based on photochemically generalized parahydrogen caused from cyclobutane dimer by DNA crosslinking was investigated.

研究分野：核酸化学、生物有機化学、化学生物学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：フッ素 イメージング

1. 研究開始当初の背景

フッ素を検出核種とする MRI は、生体バックグラウンドの低さから新たな生体分子イメージングのモダリティとして注目されている。これまでに種々のイメージングプローブが提案されており、タンパク質、酵素、核酸の検出が報告されている。しかし、その検出感度が十分ではなく、生体内での応用例は少ない。実際、我々も最近、核酸を認識部位に用いた ^{19}F MRI プローブの開発を行い、配列選択的に核酸類を OFF/ON 型で認識することに成功しているが (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 41, 303.) 検出感度は数 mM と不十分である。一方で、光ラジカル反応により検出核の超偏極状態を作り出すことで、NMR 検出感度を数 100 倍にまで増強できる超偏極核磁気共鳴法 (Photo-CIDNP: Photochemically Induced Dynamic Nuclear Polarization) (*J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 6262.) が提案されている。しかしながら、この手法においても、超偏極状態の寿命は短く、現状では数 100 秒が限界である。これでは標的分子に到達する前に検出感度が低下してしまい、イメージング検出の高感度化は望めない。

2. 研究の目的

そこで本研究では「標的分子が存在するときのみ、超偏極状態を誘起できるような新たな原理の創出」を目指すこととした。研究スタート時点において、既に我々は [2+2] 光環化反応による DNA 光ライゲーションの開発を行い、ビニル基含有ヌクレオシドを組み込んだ合成 DNA が相補的核酸存在下でのみ光ライゲーション可能であることを見出ししていた (*J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 5646.; *Org. Lett.*, 2008, 10, 3227.)。これらの反応は Photo-CIDNP 同様に三重項ジラジカルが活性種である可能性が高く (*Chem. Rev.*, 1993, 93, 3.) 光ライゲーション反応により超偏極状態を誘起できるものと考えられる。そこでこれにより、標的核酸が存在するときのみ超偏極状態を誘起し、高感度に標的核酸を検出できると発想した。本研究では、既に実績のある配列選択的 DNA 光ライゲーション反応の系でこの原理の検証を行い、フッ素 NMR による核酸類検出感度増強効果を評価することとした。

3. 研究の方法

(1) 光二量体の構造決定

これまでの研究から、光ライゲーションに用いるカルボキシビニルウラシル (CVU) については [2+2] 光環化反応により光ライゲーション反応が進行する事が明らかとなっている。しかし、光クロスリンクに用いるシアノビニルカルバゾール (CNVK) についてはその架橋構造は明らかとなっていない (*Org. Lett.*, 10, 3227, (2008))。そこで CNVK 架橋構造の NMR 構造解析を行い、構造的知見を得ると

もに、これを基にした分子モデリングによる安定構造計算から、光クロスリンク反応による超偏極状態に関する知見を得ることとした。

(2) 新規 DNA 光クロスリンカーの開発

光ライゲーションとしての実績のあるビニルウリジン骨格 (*J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 5646.) を参考に、光ライゲーション可能なフッ素含有ヌクレオシド誘導体を設計した。ジフルオロベンゼン骨格はウリジンと類似の電子軌道をもち、塩基配列形成を大きく阻害しないことが知られている (*Angew. Chem.*, 2006, 118, 5116.)。このことから、核酸の配列認識能を阻害すること無く標的核酸と光クロスリンクできると期待できる。また、フルオロスチレン骨格は、ビニル基への過分極水素添加反応により ^{19}F NMR シグナルが数 100 倍増強することが報告されており (*J. Phys. Chem.*, 2006, 110, 3521.)、ビニル基に添加した水素からの偏極核スピン移動が比較的高効率に起こることが知られている。このことより、ジラジカル中間体を経由する光ライゲーション反応により生じた偏極核スピンの効率的に ^{19}F 核スピんに移動し、超偏極状態を誘起できると期待した。

4. 研究成果

(1) 光二量体の構造決定

光架橋後のオリゴ DNA を単離、精製後、エキソヌクレアーゼによりモノヌクレオチドまで分解した後、架橋ユニットと考えられるチミンと CNVK の光架橋体を再度 HPLC を用いて精製し、架橋構造の NMR 構造解析を行った。その結果、シアノビニル基のビニル基とチミンの C5, C6 2 重結合部分において cis-syn 型で [2+2] 光環化していることを明らかにした。またビニル基に関してシストランスの異性化が高速で進行していることや、2 重鎖構造の中ではトランス構造が優先することなど架橋反応機構についても基礎的な知見が得られた (図 1 参照)。この構造をもとに光架橋された DNA 全体の構造をシミュレーションしたところ DNA 2 重螺旋の軸が 15 度前後ずれることが判明した。本提案は元々導入したビニル基と電子相関のある炭素上にフッ素を導入することで超偏極状態を誘起しようと考えており、ビニル基が反応点であることを実証することができた。

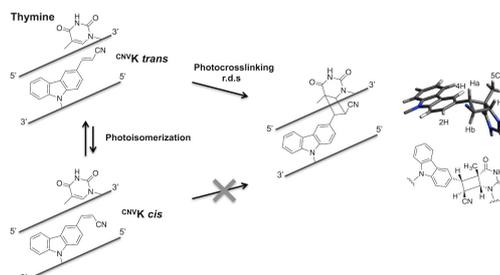


図 1. 光架橋反応ならびに構造解析

(2) 新規 DNA 光クロスリンカーとしてのジフルオロベンゼン誘導体の開発

光ライゲーションとしての実績のあるビニルウリジン骨格 (J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 5646.) を参考に、光ライゲーション可能な高感度フッ素含有ヌクレオシド誘導体を設計し合成を試みた (図 2 参照)。その合成経路の中でもジフルオロベンゼンとグリカールの C-C 結合形成反応過程が最も困難と考えており、実際に触媒、配位子、保護基、温度等、いろいろ条件検討を行ったところ、Palladium acetate ()、Triphenyl arsine の触媒系を用いる事で可能となる事が判り、この触媒系を用いた時、Glycal の 3' を保護してなくても 体を生成する事が判った。N グリコシド結合ではなく炭素炭素結合によるヌクレオシド合成の際に立体選択的に合成することは困難とされており、選択的合成に成功したことは意義深いと考えられる。

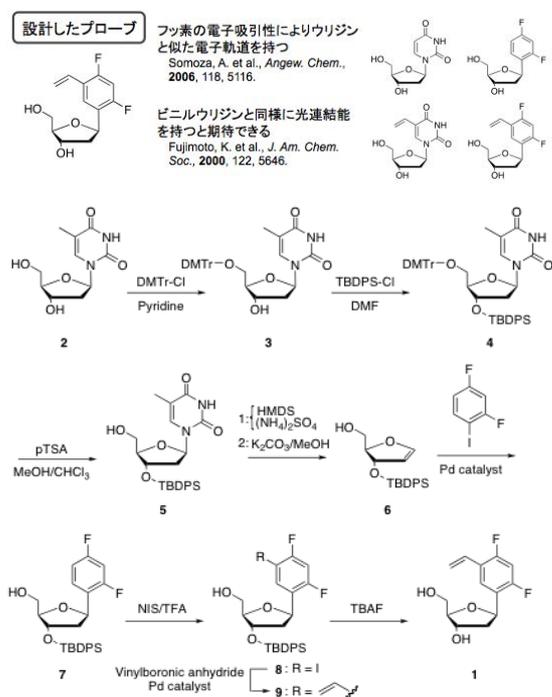


図 2. ジフルオロベンゼン誘導体と合成経路

(3) トリフルオロメチルチミンを用いた光反応の活用

成果 (1) で得られた構造解析の結果も考慮し、光架橋前後により周辺環境を大きく変化させることが可能であることから、大きなケミカルシフトの変化を生み出すことでより扱いやすいイメージングが可能になるのではと着想した。まず、フッ素の導入のために、トリフルオロチミン (TFT) を組み込んだ DNA の合成を行い、TFT と ^{cnv}K との光反応性を調べた。通常の 5 位がメチルの場合と比較すると、少し遅いものの、2 秒の光照射で光架橋反応が進行していた。[2+2] 光環化反応に伴う CF₃ の周辺の電子状態の変化に伴うケミカルシフトの変化を追跡したところ、光架橋によって約 8 ppm 高磁場側にシフトすることがわか

った。また、光架橋を利用しない場合でも CF₃ 周辺の電子状態の変化を伴う核酸構造の変化 (G-quadruplex など) を 19F-NMR でのケミカルシフトの変化から読み取ることも可能であることを見出した。これらの結果については特許出願を済ませている。

以上の通りフッ素含有人工塩基ならびに修飾塩基を含むオリゴ核酸の合成に成功した。またトリフルオロチミンと超高速光架橋反応を組み合わせることでフッ素のケミカルシフトイメージングの可能性を広げることが出来た。

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 11 件)

Kenzo Fujimoto, Asuka Yamada, Yoshinaga Yoshimura, Tadashi Tsukaguchi and Takashi Sakamoto, Details of the ultra-fast DNA photocrosslinking reaction of 3-cyanovinylcarbazole nucleoside; Cis-trans isomeric effect and the application for SNP based genotyping, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有、135 巻, 2013, 16161 - 16167, DOI: 10.1021/ja406965f

Kenzo Fujimoto, Satomi Kishi and Takashi Sakamoto, Geometric Effect on the Photocrosslinking Reaction between 3-Cyanovinylcarbazole Nucleoside and Pyrimidine Base in DNA/RNA Heteroduplex, *Photochemistry and Photobiology*, 査読有、89 巻, 2013, 1095-1099, DOI: 10.1111/php.12118

Kenzo Fujimoto, Hiroki Yoshinaga, Yasumasa Yoshio and Takashi Sakamoto, Quick and Reversible Photocrosslinking Reaction of 3-Cyanovinylcarbazole Nucleoside in DNA Triplex, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読有、11 巻, 2013, 5065-5068 DOI: 10.1039/C3OB40915E

Atsuo Shigeno, Takashi Sakamoto, Yoshinaga Yoshimura and Kenzo Fujimoto, Quick Regulation of mRNA Functions by a Few Seconds of Photoirradiation, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読有、10 巻, 2012, 7820-7825. DOI: 10.1039/C2OB25883H

Kenzo Fujimoto, Kaoru Hiratsuka-Konishi, Takashi Sakamoto, Tomoko Ohtake, Ken-ichi Shinohara and Yoshinaga Yoshimura, Specific and reversible photochemical labeling of plasmid DNA using photoresponsive oligonucleotides containing 3-cyanovinylcarbazole, *Molecular BioSystems*, 査読有、8 巻, 2012, 491-494 DOI: 10.1039/C2MB05422A

Takashi Sakamoto, Takehiro Ami, and Kenzo Fujimoto, 5-Methylcytosine

Selective Photoligation Using
Photoresponsive Oligonucleotides
Containing Various 5-Vinyl-2'-
-deoxyuridines Having an Aromatic Group
Chem. Lett., 査読有、41 巻, 2012, 47-49、
DOI:10.1246/cl.2012.47

[学会発表](計 17 件)

Takashi Sakamoto, Asuka Yamada,
Yoshinaga Yoshimura, Kenzo Fujimoto,
Details of the ultra-fast DNA
photocrosslinking reaction of
3-cyanovinylcarbazole nucleoside,
Internal Symposium of Nucleic Acids
Chemistry 2013, November 12-15, 2013、
Kanagawa Univ. (神奈川県)

Atsuo Shigeno, Takashi Sakamoto, Kenzo
Fujimoto, Development of
cyanovinylcarbazole mediated
photocrosslinking reaction toward for
regulation of RNA, 40th Annual Meeting
& Exposition of the Controlled Release
Society, July 21-25, 2013, Hawaii, USA
藤本健造, 超高速光 DNA・RNA 操作法の開
発, バイオアカデミックフォーラム 2013、
2013 年 5 月 7-9 日, 東京ビッグサイト (東京)

Kenzo Fujimoto, Development of
Photochemical DNA and RNA Manipulation、
International Symposium on SYNTHESIZING
LIFE AND BIOLOGICAL SYSTEMS, October
26-28, 2012, SENRI LifeScience Center
(大阪)

Kenzo Fujimoto, Development about
Photochemical RNA Manipulation, 14th RNA
Meeting, July 18-20, 2012, Tohoku Univ.
(宮城県)

Shigetaka Nakamura, Kenzo Fujimoto、
Template directed DNA photochemical
ligation toward for construction of DNA
architecture, 13th Tetrahedron Symposium、
June 23-26, 2012, Amsterdam, Nederland

[産業財産権]

出願状況 (計 7 件)

名称: 光架橋形成抑制方法、及び自己架橋
体形成抑制型光応答性核酸

発明者: 藤本健造 中村重孝

権利者: 北陸先端科学技術大学院大学

種類: 特許

番号: 特許願 2013-225799

出願年月日: 平成 25 年 10 月 30 日

国内外の別: 国内

名称: 鎖交換された二重鎖オリゴヌクレオ
チドの製造方法

発明者: 藤本健造、中村重孝、橋本浩寿、
小林聡

権利者: 北陸先端科学技術大学院大学、電
気通信大学

種類: 特許

番号: 特許願 2013-133163

出願年月日: 平成 25 年 6 月 25 日

国内外の別: 国内

名称: 光クロスリンク能を有する光応答
性ヌクレオチドアナログ

発明者: 藤本健造、坂本隆、田中佑弥

権利者: 北陸先端科学技術大学院大学

種類: 特許

番号: 特許願 2013-70381

出願年月日: 平成 25 年 3 月 28 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 3 件)

名称: 光クロスリンク能を有する光応答性人
工ヌクレオチド

発明者: 藤本健造、吉村嘉永

権利者: 北陸先端科学技術大学院大学

種類: 特許

番号: 特許第 8,481,714 号 (米国)

取得年月日: 平成 25 年 5 月 9 日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 健造 (FUJIMOTO Kenzo)

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・教授

研究者番号: 90293894