

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32702

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710266

研究課題名(和文) 夾雑環境下で機能する長寿命発光発生型核酸検出プローブの開発

研究課題名(英文) Development of long-lived luminogenic probes for detection of DNA/RNA in a crude solution

研究代表者

實吉 尚郎 (Hisao, Saneyoshi)

神奈川大学・工学部・助手

研究者番号：10564784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、夾雑環境下で使用可能な核酸検出プローブを開発した。標的核酸存在下、化学反応により希土類錯体のアンテナ分子を構築する手法を開発し、標的配列依存的に長寿命発光シグナルを発生させることができた。さらに、適切なゲート時間により自家蛍光を排除し、標的核酸を高感度に検出することができた。この手法により生きた大腸菌内のRNAを検出することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed chemical reaction triggered oligonucleotide probes that could detect DNA/RNA in a crude solution. Our probes have a turn-on system that was induced by target DNA/RNA to produce long-lived luminescence. This method was applied to the detection of RNA in living bacterial cells.

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：生物分子化学・ケミカルバイオロジー

キーワード：核酸 RNA プローブ 長寿命発光

1. 研究開始当初の背景

長寿命発光特性を有する検出プローブ(希土類錯体プローブ)は、夾雑物由来の自家蛍光を時間分解測定により排除することができる。そのため、サンプルの前処理を必要としない迅速分析法や生細胞内分析における強力なツールになりつつある。これまで希土類錯体プローブは、主に生体分子のラベル化に利用され、目的物の検出能には優れていなかった。しかし、近年になり発光を制御しうる分子設計論が提唱され、各種標的の検出に用いられてきた。一方、細胞内の微量な RNA を検出するためには、化学反応により発光が起こる検出システムが有用である。標的核酸を鋳型として複数回の化学反応によりシグナルを増幅できるためである。しかし、上記機能を全て満たす夾雑環境で使用可能な核酸プローブが存在していなかった。

2. 研究の目的

夾雑環境下でも使用可能な発光特性を有する長寿命発光発生型の新規核酸検出プローブの創製を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、長寿命発光発生型核酸検出プローブに搭載可能なアンテナ分子の設計と合成、それをオリゴヌクレオチドプローブ化し標的核酸の検出能を検討する。

4. 研究成果

プローブの開発に際し、希土類錯体を発光体へ変換するアンテナ分子の設計・合成を行った。設計に際し、化学反応により、アンテナ分子構造を変換させ吸収波長を大きく変化させることにした。希土類錯体のアンテナ分子として広く用いられている carbostyri1124 の構造に注目した。しかし、構造内の不飽和ラクタム部位をエステルとアミンに切断した前駆体構造を設計した際、2重結合部位の光異性化の可能性が過去の文

献より示唆された。そこで、2重結合部位をベンゼン環に置き換えることで光異性化を回避し、反応性置換基を適切な位置に固定できる設計とした。さらに、アミノ基を還元反応に応答性を示すアジド基としてマスクすることで安定な前駆体とした。まず、アニリン誘導体から数行程を経て、アジド基とエステル基を有するビフェニル誘導体とした。この基質に対して、アジド基を還元させると速やかに環化反応が起こりフェナンスリジノン構造に変換された。吸収スペクトル測定から、340 nm 付近に新たな吸収ピークが現れたことを確認した。さらに、数行程を経てキレーターと希土類金属イオンを結合させると還元反応により希土類由来の発光特性を発生できることがわかった。得られた希土類錯体ユニットを標的核酸と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドに導入した。希土類イオンを変えることで、プローブ構造を変えることなく2色とし発光寿命の異なる特性を付与させた。次に合成した核酸プローブ分子を用いて、標的核酸検出を試みた。その結果、標的核酸(ras)依存的に長寿命発光シグナルを発生できることがわかり、一塩基ミスマッチも区別して検出できた。さらに、多量の夾雑物(BSA、FBS)存在下であっても、大きく感度を損なうことなく時間分解発光分析により自家蛍光を排除して検出できることがわかった。また、生きた大腸菌とプローブを混ぜることにより細胞内のRNAを直接検出することに成功した。現在は、オリゴヌクレオチド部位の化学修飾により酵素耐性能や細胞導入効率の高い構造を探索している。

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5件)

1. Triphenylphosphinecarboxamide: An Effective Reagent for the Reduction of

- Azides and its Application to Nucleic Acid Detection.
Hisao Saneyoshi, Tatsuya Ochikubo, Takushi Mashimo, Ken Hatano, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe. *Org Lett.* **2014**, 16, 30-33. (査読有)
2. A Fluorogenic Peptide Probe Developed by In Vitro Selection Using tRNA Carrying a Fluorogenic Amino Acid
 Wei Wang, Takanori Uzawa, Naoya Tochio, Jumpei Hamatsu, Yoshinori Hirano, Seiichi Tada, Hisao Saneyoshi, Takanori Kigawa, Nobuhiro Hayashi, Yutaka Ito, Makoto Taiji, Toshiro Aigaki, Yoshihiro Ito. *Chem Comm*, **2014**, 50 (22), 2962 – 2964. (査読有)
3. Polycation-assisted DNA detection by reduction triggered fluorescence amplification probe.
Hisao Saneyoshi, Naohiko Shimada, Atsushi Maruyama, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe. *Bioorg. Med Chem. Lett.* **2013**, 23, 6851-6853. (査読有)
4. Long-lived luminogenic probe for detection of RNA in a crude solution of living bacterial cells.
Hisao Saneyoshi, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 13632–13635. (査読有)
5. Synthesis of a nucleoside phosphorodithioate analogue responsive to microenvironmental changes through chiral induction.
Hisao Saneyoshi, Takushi Mashimo, Ken Hatano, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 9, 1080-1083. (査読有)

[学会発表](計3件)

1. 希土類発光プローブを用いた遺伝子検出プローブの開発：阿部洋、實吉尚郎、周東智、伊藤嘉浩、日本薬学会第134回年会、熊本大学黒髪キャンパス、2014年3月27日 - 3月30日
2. 隣接基関与を利用する還元反応の開発と核酸検出への応用：實吉尚郎、間下琢史、幡野健、阿部洋、伊藤嘉浩、日本化学会第93春季年会、立命館大学びわこくさつキャンパス、2013年3月22日 - 3月25日
3. Long lived luminogenic DNA probe for DNA/RNA detection. Hisao Saneyoshi, Hiroshi Abe, Yoshihiro Ito. 20th *International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acids*, Montréal, August 5-9, 2012.

[図書](計0件)

[産業財産権]
 出願状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計1件)

名称：**Fluorescent probe for detecting intracellular target mol.**

発明者：Abe, Hiroshi; Hisao Saneyoshi; Ito, Yoshihiro
 権利者：Riken Corp., Japan
 種類：PCT
 番号：WO 2012121396 A1
 取得年月日：2012.9.13
 国内外の別：国外

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織
 (1)研究代表者
 實吉 尚郎 (Saneyoshi Hisao)
 神奈川大学・工学部・助手
 研究者番号：10564784

(2)研究分担者
 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：