

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25810102

研究課題名(和文) DNAアナログとして損傷塩基を活用した機能性ソフトマターの開発

研究課題名(英文) Development of functional soft matter based on damaged DNA.

研究代表者

小野 利和 (Toshikazu, Ono)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20643513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：『DNA修復酵素』は、紫外線、酸化、アルキル化、脱アミノ化、複製エラー等で生じる『DNA損傷』を認識し除去するタンパク質であり、遺伝情報の変異を防ぐ『DNA修復』の役割を果たす。その性質から、癌細胞、HIV研究における重要なターゲットであり、医学、生物、化学の観点から、そのタンパク質機能の理解と制御を志向した研究が活発に行われている。

本研究では、「損傷塩基」としてウラシルもしくは8オキソグアニンを導入した蛍光性オリゴDNAを設計することにより、「ウラシルDNAグリコシラーゼ」や「ホルムアミドピリジンDNAグリコシラーゼ」の酵素活性に応じて、塩基除去修復に伴い発光する分子ツールの創製を行った。

研究成果の概要(英文)：We report the development of simple fluorogenic probes that report on the activity of uracil DNA glycosylase (UDG) enzymes. The probes are built from short, modified single-stranded oligonucleotides containing natural and unnatural bases. The combination of multiple fluorescent pyrene and/or quinacridone nucleobases yields fluorescence at 480 and 540 nm (excitation 340 nm), with large Stokes shifts of 140 to 200 nm. They are strongly quenched by uracil bases incorporated into the sequence, and they yield light-up signals of up to 40-fold, or ratiometric signals with ratio changes of 82-fold, on enzymatic removal of these quenching uracils. The use of similar concepts, we report the development of simple fluorogenic probes that report on the activity of 8-oxoguanine glycosylase.

研究分野：高分子化学、超分子化学、ケミカルバイオロジー、結晶工学

キーワード：ナノ材料 エキシマー エキシプレックス センサー

1. 研究開始当初の背景

『DNA 修復酵素』は、紫外線・放射線・酸化・アルキル化・脱アミノ化・複製エラー等で生じる『DNA 損傷』を認識し除去するタンパク質の一群であり、遺伝情報の変異を防ぐ『DNA 修復』の役割を果たす。その性質から、癌細胞・HIV 研究における重要なターゲットであり、医学・生物・化学の観点から、そのタンパク質機能の理解と制御を志向した研究が活発に行われている。

2. 研究の目的

DNA 修復のメカニズムを調べると、例えば、ウラシル DNA グリコシラーゼ(UDG)は、シトシン(C)の脱アミノ化で生じるウラシル(U)を選択的に認識し切断する。ホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼ(FPG)は、グアニン(G)の酸化で生じる 8-オキシグアニン(8OG)を選択的に認識し切断することが過去の知見より確認されている。以上の背景をもとに本研究では、このようなタンパク質と核酸(DNA)との間に働く分子認識や反応機構を解明するための分子ツールの創製を目的とした。

3. 研究の方法

『DNA 修復酵素』と『損傷 DNA』間に働く分子認識や反応機構を解明するための分子ツールの創製を目的として、『損傷塩基』を導入した人工核酸、超分子材料、高分子材料の創製を目指した。具体的には①DNA 修復酵素の酵素活性に反応して光る蛍光性核酸プローブの合成(図 1)、②DNA 修復酵素の酵素活性に反応してゲスト放出可能な DNA アプタマーの創製、③DNA 修復酵素の酵素反応に反応して変形・分解可能なヒドロゲルシステムの構築、を目的とし研究を行った。①～③の研究では、『損傷塩基』を含む人工核酸の取得が鍵となるが、これは DNA 固相合成法で確立されたホスホアミダイト法を適用し合成する。その他、吸収スペクトル、蛍光スペクトル、ゲル電気泳動、顕微鏡観察等を駆使し、酵素反応をナノ→マイクロ→目視で呼び出し、出力可能なバイオソフトマテリアルの創製と評価法の確立を目指した。

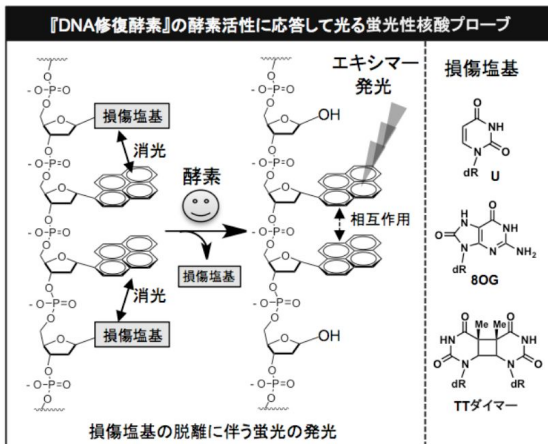


図 1. DNA 修復酵素の酵素活性に反応して光る蛍光性核酸プローブの合成 (概念図)

4. 研究成果

「損傷塩基」として、ウラシルを用い、その近傍に蛍光色素としてピレン、ペリレン、等の多環芳香族を導入した蛍光性オリゴ DNA を設計することにより、「ウラシル DNA グリコシラーゼ(UDG)」の酵素活性に応じて、塩基除去修復に伴い発光する分子ツールの設計を行った。結果として、UDG によって認識されるためには、少なくとも7塩基以上のオリゴ DNA が必要である事を明らかとした(図 2)。また適切な分子設計を施す事により、UDG の酵素活性に応じて蛍光発光する分子ツールの創製を達成した(図 3)。In vitro だけでなく、in cell 中でも有効に機能することもあわせて見出した。

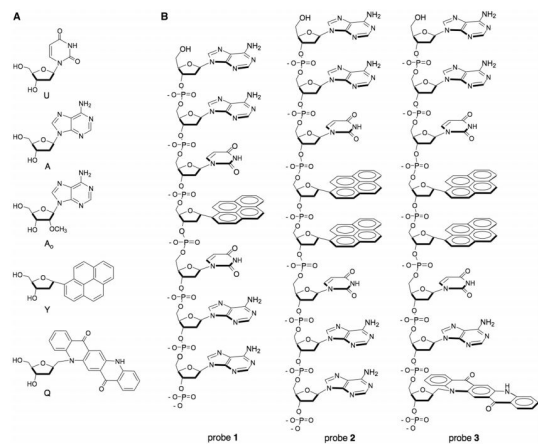


図 2. UDG に対する蛍光性オリゴ DNA の構造

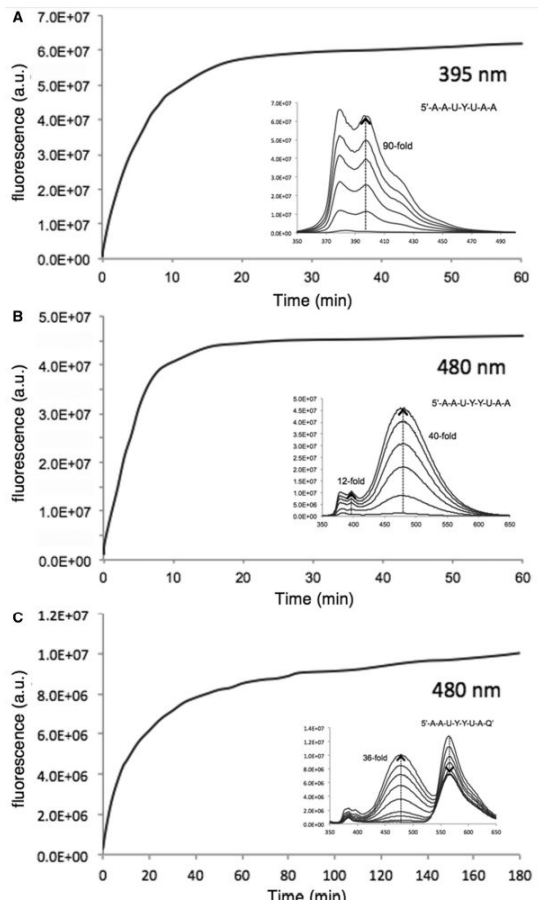


図 3. UDG に対する応答

引き続き「損傷塩基」として、8オキソグアニンをを用い、同様に、その近傍にピレン、ペリレン等の多環芳香族を導入した蛍光性オリゴ DNA を設計する事により、「ホルムアミドピリジン DNA グリコシラーゼ(OGG1)」の酵素活性に応じて、塩基除去修復・DNA 鎖の切断に伴い発光する分子ツールの創製を行った。結果として、OGG1 に効率よく認識されるためには2重鎖を組むことが必要で有ることが明らかになり、適切な設計を施すことにより、OGG1 の酵素活性に応じて蛍光発光する分子ツールの創製を達成した(図4)。In vitro だけでなく、in cell 中でも有効に機能することもあわせて見出した。

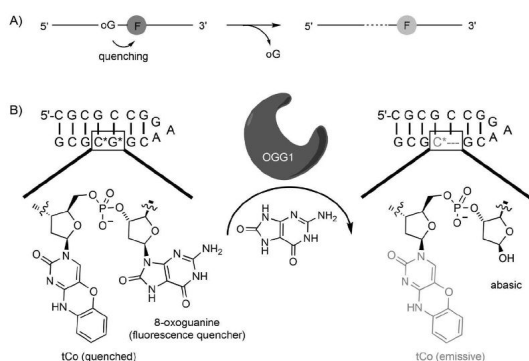


図4. OGG1 に対する蛍光性オリゴ DNA の構造

蛍光性オリゴ DNA が、導入する色素の配列の違いによって、ユニークな光化学特性を示すことが実験進捗により明らかとなった。そこで蛍光性オリゴ DNA をポリスチレンビーズ上に固定化し、例えば揮発性有機化合物(VOCs)等との相互作用による発光強度や発光色を变化が起こることを利用することにより、VOCs センサーとして機能することを見出した(図5)。

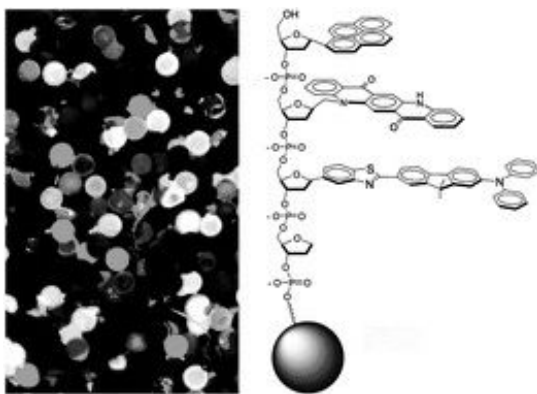


図5. VOC センサーアレイ

この知見を生かし、共役分子の結晶を用いることにより、同様に VOCs センサーの創製ができることを見出し、新たな研究の種を見出した。

、 に関しては、時間及び設備の都合上、完遂することができなかったが、 に関しては当初の目標以上の成果を出すことができ、研究コンセプトの大きな山は越えたと考えている。今後も研究を継続することにより、是非とも目標を達成したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1) Monitoring Eukaryotic and Bacterial UDG Repair Activity with DNA-Multicolor Phosphorescence Sensors, T. Ono, S.K. Edwards, S. Wang, W. Jiang, E.T. Kool, *Nucleic Acids Research*, 41 (12), e127, (2013). (査読有) DOI: 10.1093/nar/gkt309
- 2) DNA-Polyfluorophore Chemosensors for Environmental Remediation: Vapor-Phase Identification of Petroleum Products in Contaminated Soil, W. Jiang, S. Wang, L.H. Yuen, H. Kwon, T. Ono, E.T. Kool, *Chemical Science*, 4(8), 3184-3190, (2013). (査読有). DOI: 10.1039/C3SC50985K
- 3) In Vitro Fluorogenic Real-Time Assay of the Repair of Oxidative DNA Damage, S. K. Edwards, T. Ono, S. Wang, W. Jiang, R. M. Franzini, J. W. Jung, K. M. Chan, E. T. Kool, *ChemBioChem*, 16(11), 1637-1646, (2015). (査読有). DOI: 10.1002/cbic.201500184
- 4) Synthesis and X-ray Crystallography of bipyroles: Impacts of a CO-Interaction on their Structure, T. Okawara, A. Doi, T. Ono, M. Abe, K. Takehara, Y. Hisaeda, *Tetrahedron Letter*, 11, 1407-1410 (2015) (査読有). DOI:10.1016/j.tetlet.2015.01.159
- 5) Myoglobin-based Non-Precious Metal Carbon Catalysts for an Oxygen Reduction Reaction, A. Onoda, Y. Tanaka, T. Ono, S. Takeuchi, A. Sakai, T. Hayashi, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 19, 510-516, (2015). (査読有). DOI: http://dx.doi.org/10.1142/S108842461550039X
- 6) Oxygen-Binding Protein Fiber and Microgel: Supramolecular Myoglobin-Polyacrylate Conjugates, T. Ono, Y. Hisaoka, A. Onoda, K. Ohora, T. Hatashi, *Chemistry an Asian Journal*, 11, 1036-1042, (2016). (査読有). DOI: 10.1002/asia.201501415

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 多孔性有機結晶のナノ空間を利用した芳

香族炭化水素の高感度蛍光検出, 畠中  
創, 小野 利和, 嶋越 恒, 阿部 正明, 久  
枝 良雄, 日本化学会第 95 春季年会,  
2015 年 3 月

- 2) ビタミン B12 誘導体を利用したラジカル  
的フルオロアルキル化反応の開拓, 小野  
利和, 脇谷 航介, 久枝 良雄, 第 9 回バイ  
オ関連化学シンポジウム, 2015 年 9 月

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

小野 利和 (ONO, Toshikazu)  
九州大学・大学院工学研究院・助教  
研究者番号 : 20643513

##### (2) 研究連携者

久枝 良雄 (HISAEDA, Yoshio)  
九州大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号 : 79777251