

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288077

研究課題名(和文) 光架橋反応を用いた¹⁹F-NMRによる核酸類検出法の開発研究課題名(英文) Development about photochemical detection of nucleic acids by ¹⁹F-NMR

研究代表者

藤本 健造 (Fujimoto, Kenzo)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：90293894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：¹⁹F NMRのケミカルシフトを用いた核酸類検出法は、生体バックグラウンドが皆無であり、高い生体透過性を有することから、生体内などの夾雑試料中での核酸検出法として注目されている。本研究では、夾雑試料中でもB/F分離可能な大きなケミカルシフトの変化(8.0 ppm)を誘起可能な新規核酸類検出法(¹⁹F NMRを用いた核酸類検出法)を開発した。さらに、実際の生体内に存在する核酸濃度は低い為、増幅系を組み込んだ配列選択的な核酸類検出法を開発し、最終的にnmスケールの核酸類の検出にも成功した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated an approach for the chemical shift-based detection of nucleic acids based on CNVK (cyanovinylcarbazole) mediated DNA/RNA photo-cross-linking. The ¹⁹F NMR signal of TFT(trifluoromethyl thymidine) in a DNA duplex structure was dramatically shifted from -63.2 ppm to -71.2 ppm induced by photo-cross-linking. This larger chemical shift change induced by CNVK mediated DNA photo-cross-linking enables DNA and RNA detection without confounding effects due to the influence of neighboring bases. We have also successfully demonstrated that 10 nM miRNA can be detected in a sequence-specific manner based on miRNA amplification and chemical shift caused by the photo-cross-linking of CNVK and TFT in DNA and RNA.

研究分野：核酸化学

キーワード：¹⁹F-NMR 核酸検出 ケミカルシフト

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの解読が終了し、核酸情報と様々な疾病との関連が明らかになりつつ有る。一塩基多型(SNPs)などの僅かな違いが遺伝子疾患などの病気の原因となるだけでなく、薬剤の効果に影響を与えることが報告されている。さらに近年では、miRNAなどの核酸類による遺伝子発現制御機構や生命現象の制御機構が報告されており、生体内の核酸類の情報を正確に検出することは研究応用だけでなく病気の診断においても必要な技術となりつつ有る。

2. 研究の目的

核酸類(DNA や RNA)の検出には従来、蛍光法が多く用いられて来た。しかし、蛍光分子は生体透過性が低く、生体深部の核酸類を検出することは難しい。それに対して核磁気共鳴法は生体深部の情報を読み取ることができる。その中でも、¹⁹F NMR のケミカルシフトを用いた核酸類検出法は、生体バックグラウンドが皆無であり、高い生体透過性を有することから、生体内などの夾雑試料中での核酸検出法として注目されている。しかし、既存の核酸検出プローブではケミカルシフトの変化幅が小さく、B/F 分離が困難であるため、B/F 分離可能な大きなケミカルシフトの変化を誘起可能な核酸検出プローブが求められている。本研究では、夾雑試料中でも B/F 分離可能な大きなケミカルシフトの変化を誘起し、¹⁹F NMR による核酸類検出法を開発する。

3. 研究の方法

(1)光架橋反応を用いた核酸検出

B/F 分離可能な大きなケミカルシフトの変化を誘起するため、新たに化学反応(光架橋反応)を組み込むことにより、従来よりも大きなケミカルシフトの変化を誘起出来ると考えた。NMR で用いるフッ素源としてトリフルオロメチルチミジン(TFT)と光架橋素子である3-シアノビニルカルバゾール(CNVK)を用い、光架橋前後でのケミカルシフトの変化を評価する。実際の生体内に存在する核酸濃度は低い為、増幅系を組み込んだ配列選択的な核酸類検出法を開発した。

(2)DNA 結合性小分子のフッ素ラベル化

¹⁹F NMR を用いた核酸類検出として DNA 結合性小分子であるジアジリンにフッ素を導入し、核酸類との相互作用によるケミカルシフトの変化から核酸類の検出を行う。ジアジリンの配列認識能を利用し、DNA を配列選択的に認識可能かどうかの検証を行った。

(3)アミノ酸の同時一斉検出

アミノ酸の検出に向けオルトフタルアルデヒド(OPA)法を改良し、¹⁹F NMR による遊離アミノ酸の同時一斉検出法を開発する。メルカプとエタノールの代わりにフッ素を含

むチオール化合物と反応させ、OPA 誘導体を作成、¹⁹F NMR による測定を行った。

4. 研究成果

(1)光架橋を用いた核酸類検出

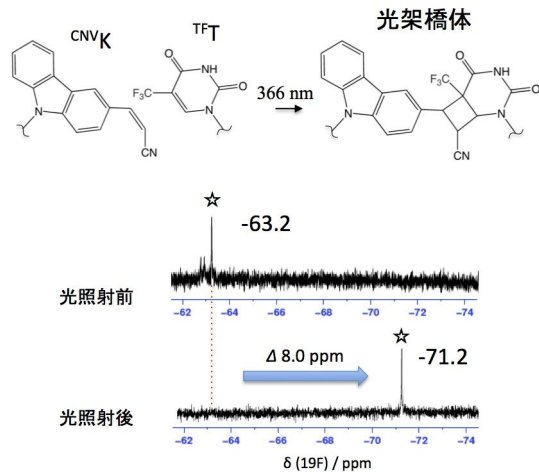


図 1. 光架橋反応によるケミカルシフトの変化

照射前には TFT 由来のシグナルが-63.2 ppm に確認できる。そこに照射を数秒行うことにより、光架橋反応が進行し、-71.2 ppm に新たなシグナルが確認できた。光架橋前後で 8.0 ppm という従来の 16 倍程度の大きなケミカルシフトの変化を誘起できることを見出した(図 1)。これは光架橋反応による電子状態の変化(TFT の 5 位の炭素が sp² 軌道から sp³ 軌道に変化)を利用することにより得られたと考えられる。また、光架橋反応によるケミカルシフトの変化は他の波長を当てることにより可逆的に操作可能であることを見出した。¹⁹F NMR を用いた核酸類検出に利用されていたプローブ(NAR, 2009, 37, 22. and Org. Lett., 2008, 10, 2745.)と比較して大きなケミカルシフトを誘起可能であることから、光架橋反応を用いることにより、夾雑試料中でも B/F 分離可能だと考えられる。

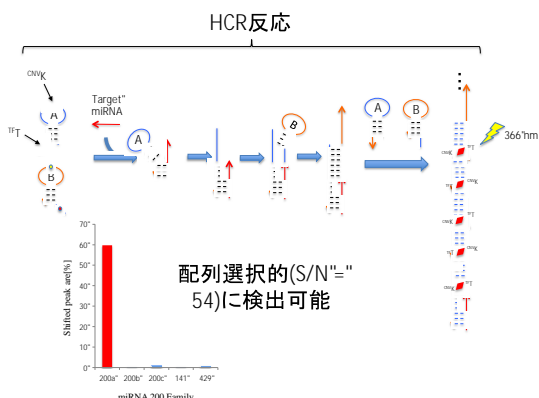


図 2. ¹⁹F NMR による miRNA の検出

次に、実際に細胞内でも ¹⁹F NMR 検出限界以下の核酸濃度のため、増幅系としてハイブリダイゼーションチェーンリアクション

(HCR)を組み込むことにより、シグナルを1000倍程度増幅することに成功した。10 nMのmiRNAを検出することに成功した。そしてmiRNA 200 familyに分類される5種類のmiRNAを標的とし、配列選択的に19F NMRから標的核酸を検出することに成功した。(図2)。

(2) DNA結合性小分子のフッ素ラベル化

DNA結合性の小分子であるジアジリンにフッ素を導入した化合物の合成に成功した(図3)。またジアジリンはDNAに結合することにより、蛍光を発するため、このジアジリンをフッ素ラベル化した際にもDNA結合能を有していることを確認した。さらにDNA二本鎖とプローブを混合し、19F NMR測定を行ったところ、ジアジリンの結合部位周辺の塩基配列に異なる19Fシグナルを示した。配列選択的にDNAを認識し、ケミカルシフトの変化から塩基を読み取ることに成功した。また、蛍光と19F NMRという二つの機能を有する新規小分子プローブの開発に成功した。

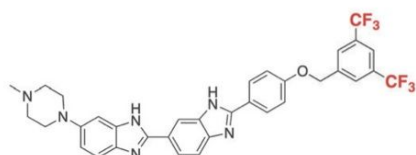


図3. フッ素修飾ジアジリンプローブ

(3) アミノ酸の同時一斉検出

改良型OPA反応によるプロダクトを質量分析により解析したところ、目的物の質量が得られ、遊離アミノ酸とフッ素を含むチオール化合物との改良型OPA反応の進行が確認された。また、19F NMRによるアミノ酸の検出能を評価した結果、各種アミノ酸と反応することにより、ケミカルシフトが変化し、アミノ酸の検出に利用可能であることが明らかとなった。また、醤油を用いた解析を行ったところ複数のアミノ酸を同時一斉検出可能であることが明らかとなった。さらに、標的の濃度変化によるケミカルシフトの変化率から標的の濃度を定量的に解析することが可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計16件)

Shigetaka Nakamura, Hayato Kawabata, Hodaka Muramatsu and Kenzo Fujimoto, The effect of 5-substitution of uracil base in DNA photo-cross-linking using 3-cyanovinylcarbazole, Chem. Lett., 査読有, 17巻, 2016, 1499-1501, DOI: 10.1002/cbic. 201600236.

Shigetaka Nakamura, Hayato Kawabata, Hodaka Muramatsu, and Kenzo Fujimoto,

Effect of 5-substitution of uracil base in DNA photo-cross-linking using 3-cyanovinylcarbazole, Chem. Lett., 査読有, 45巻, 2016, 887-889. DOI: 10.1246/cl.160382.

Takashi Sakamoto, Daisaku Hasegawa, Kenzo Fujimoto, Simultaneous detection of single-nucleotide polymorphisms in a DNA bulge structure using fluorine-modified bisbenzimidazole derivatives, Analyst, 査読有, 141巻, 2016, 1214-1217. DOI: 10.1039/C5AN02389K

Takashi Sakamoto, Minako Ooe and Kenzo Fujimoto, Critical Effect of Base Pairing of Target Pyrimidine on the Inter-strand Photo-cross-linking of DNA via 3-Cyanovinylcarbazole Nucleoside, Bioconjug. Chem., 査読有, 26巻, 2015, 1475-1478, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00352.

Shigetaka Nakamura and Kenzo Fujimoto, Photo-cross-linking using trifluorothymidine and 3-cyanovinylcarbazole induced large shifted 19F MR signal, Chem. Commun., 査読有, 51巻, 2015, 11765-11768, DOI: 10.1039/C5CC02972D.

Takashi Sakamoto, Daisaku Hasegawa, Kenzo Fujimoto, Fluorine-modified bisbenzimidazole derivatives as a molecular probe for bimodal and simultaneous detection of DNAs by 19F NMR and fluorescence, Chem. Commun., 査読有, 2015, 41巻, 8749-8752. DOI: 10.1039/C5CC01995H

Takashi Sakamoto, Yuya Tanaka and Kenzo Fujimoto, DNA Photo-cross-linking using 3-Cyanovinylcarbazole Modified Oligonucleotide with Threoninol Linker, Org. Lett., 査読有, 17巻, 2015, 936-939, DOI: 10.1021/acs.orglett.5b00035.

Takashi Sakamoto, Atsuo Shigeno, Yuichi Ohtaki, and Kenzo Fujimoto, Photo-regulation of constitutive gene expression in living cells by using ultrafast photo-cross-linking oligonucleotides, Biomater. Sci., 査読有, 2巻, 2014, 1154-1157, DOI: 10.1039/C4BM00117F

〔学会発表〕(計47件)

Kenzo Fujimoto, Development of photochemical DNA and RNA manipulation

toward for nucleic acid-based drug, The 39th Annual Meeting of Molecular Biology Society of Japan, November 30 - December 3, 2016, Pacifico Yokohama (神奈川県横浜市)

中村重孝、藤本健造、アンチジーン法に向けた光誘起型 Double duplex 構造の形成、2016年11月15-17日、東京理科大学葛飾キャンパス、(東京都葛飾区)

Hui Yang, Chihiro Hirata, Shigetaka Nakamura, Kenzo Fujimoto, Detection of DNA B-Z transition by 19F NMR based on 19F chemical shift change, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Sep. 27-29. 2016, Kumamoto university(熊本県熊本市)

Takashi Sakamoto, Daisaku Hasegawa, Kenzo Fujimoto, Disassembly-driven signal turn-on probe for multimodal detection of DNAs using 19F NMR and Fluorescence, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids, Sep. 27-29. 2016, Kumamoto university(熊本県熊本市)

藤本健造、核酸医薬を指向した光化学的RNA編集法の開発、第55回日本生体医工学会大会、2016年4月26-28日、富山国際会議場(富山県富山市)

Kenzo Fujimoto, Development of Photo-triggered RNA Manipulation, International Symposium on Bioscience and Biotechnology in JAIST, March 18, 2016, JAIST (石川県能美市)

Kenzo Fujimoto, New insight of Engineering Expression System based on ultrafast DNA and RNA photo-cross-linking, PEGS EUROPE 2015, November 3-5, 2015, Lisbon(Portgal)

藤本健造、光化学的な核酸類操作法の開発、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8-10日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Kenzo Fujimoto and Shigetaka Nakamura, Development about 19F chemical shift imaging of DNA conformation change, World Molecular Imaging Congress (WMIC2015), September 1-3, 2015, Honolulu, USA

〔図書〕(計2件)

Takashi Sakamoto and Kenzo Fujimoto, Springer, Modified Nucleic Acids, Chapter 7, 2016, 145-158

藤本健造、中村重孝、光アライアンス、3、2015、37-39

〔産業財産権〕
出願状況(計5件)

名称: アンチジーン法用光応答性人工核酸プローブ
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 2016-105622
出願年月日: 平成28年5月26日
国内外の別: 国内

名称: 光架橋核酸二重鎖の光架橋を光開裂させる方法
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 2014-224574
出願年月日: 平成26年11月4日
国内外の別: 国内

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・先端科学技術研究科・教授
研究者番号: 90292894

(2) 研究分担者

坂本 隆(Sakamoto Takashi)
和歌山大学・システム工学部・准教授
研究者番号: 80423078