

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288081

研究課題名(和文) 機能性核酸を用いた細胞表層分子化学

研究課題名(英文) Molecular Chemistry on Cell Membrane Using Functional Nucleic Acid

研究代表者

山東 信介 (SANDO, SHINSUKE)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20346084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜は細胞が機能を発揮する重要な場であり、細胞膜上で分子の機能を解析する分析技術の発展は急務の課題であった。本研究では、高い性能を有する蛍光核酸アプタマーセンサーの設計に取り組み、標的とする生体分子(アデニン系化合物やインターフェロンガンマ)に応答し、蛍光を発するBODIPY色素修飾蛍光核酸アプタマーセンサーの開発を実現した。また、開発した蛍光核酸アプタマーセンサーが細胞膜上でも機能し、蛍光分子イメージングに応用できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Cell membrane is an essential component of cells and there has been a continuing demand on method to analyze molecular functions on the cell membrane. In this research, we tried to design fluorescent aptamer sensors with a high performance and developed BODIPY dye-labeled fluorescent aptamer sensors that emit an enhanced fluorescence upon interaction with target biomolecule (adenine compound or interferon gamma). In addition, it was demonstrated that these fluorescence aptamer sensors work on cell membrane and can be used for a fluorescent molecular imaging.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：細胞膜 センサー 生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

我々を含む生体は分子の集合体である。これら分子の動的な活動が生命現象の根源であり、生物と無生物を区別する事象である。特に、細胞膜によって区画化され、不均一化された領域における秩序だった分子の活動こそがその本質であると考えられる。

細胞レベルで見れば、細胞膜は細胞が機能を発揮する重要な場であり、その活動異常は様々な障害を引き起こす。超分子集合、分子認識、分子放出・取り込みなど、細胞膜上で起こっているケミストリーはバルク中での分子挙動とは全く異にすることが予想され、その理解は高次な多細胞機能を理解する上で極めて重要であり、細胞膜上での分子の挙動や動態を解析する分析ツール、手法の発展は急務の課題であった。

現在まで、蛍光タンパク質センサーを細胞表面に提示する遺伝子工学的手法や蛍光色素で修飾したタンパク質受容体を細胞膜上に固定化する手法等、タンパク質受容体を中心とした蛍光センサーの開発が進められてきた。これらは優れた機能を有しており積極的な応用が期待できるものの、De Novoでのセンサー設計が難しく応用できる対象が限られている状況があった。

## 2. 研究の目的

1に記載の研究背景のもと、機能性核酸アプタマーを用いた細胞表面分子センシングに注目が集まっている。SELEX法を用いて効率的に取得できる核酸アプタマーは、標的に選択的に結合でき、また、有機合成できることから蛍光センサー化も容易である。実際、我々の研究グループも、細胞表面に固定化した蛍光アプタマーセンサーを用いて脳機能に関与するアデニン系伝達物質の蛍光分光計測に挑戦し、これに成功している (Tokunaga et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 95619)。

本研究では、「核酸アプタマーを用いた細胞表面分子化学」の実現に向け、その機能向上、応用に取り組んだ。具体的には、現在までの実験結果と実応用に向けた問題抽出をもとに、

- (1) 細胞膜への機能性分子の固定化法探索と挙動解析
- (2) 高機能な蛍光核酸アプタマーセンサーの開発
- (3) 上記技術を用いた細胞表面イメージング応用 (対象とする生体分子: アデニン系分子、およびサイトカイン)

を大きな課題とし、基礎・応用の両面から本研究を展開することを目指した。以下、「3. 研究の方法」、および「4. 研究成果」についてもこれら3課題に分けて記載する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞膜への機能性分子の固定化法探索と挙動解析

細胞膜への機能性核酸分子の固定化に向け、種々の脂質修飾核酸を合成した。末端脂質修飾核酸は、末端をアミノ基で修飾した人工核酸と活性化した脂質分子との縮合反応によって調整した。DNA鎖中に脂質を導入した脂質修飾核酸は、有機化学的に合成したホスホロアミダイトユニットを用い、DNA自動合成装置により合成した。いずれの場合も、合成後、HPLCにより精製し、MALDI-TOF MSによる同定を行なった。

細胞膜への固定化効率、保持時間の評価は蛍光顕微鏡、およびフローサイトメーターによる蛍光強度測定により実施した。

### (2) 高機能な蛍光核酸アプタマーセンサーの開発

蛍光色素で修飾した蛍光アプタマーセンサーは、DNA受託合成会社から購入、もしくは、(1)と同様に修飾核酸と活性化色素との縮合反応により調整し、HPLCによる精製の後、MALDI-TOF MSによる同定を行なった。

合成した蛍光アプタマーセンサーの蛍光応答は、蛍光分光光度計を用いて評価した。

### (3) 上記技術を用いた細胞表面イメージング応用

蛍光核酸アプタマーセンサーは、末端をビオチン修飾し、細胞膜に化学反応にて連結したビオチン-ストレプトアビジンとの相互作用を介して、細胞膜上に固定化した。

細胞表面での核酸アプタマーセンサーの標的分子に対する蛍光応答は、フローサイトメーター、および共焦点蛍光顕微鏡により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞膜への機能性分子の固定化法探索と挙動解析

種々の脂質分子を導入した核酸の細胞膜への固定化効率、その細胞膜上への保持時間を詳細に検討した。

末端に脂質を修飾した核酸分子の場合、短鎖脂質では細胞表層に固定化できる量が多いものの、その後の細胞膜からの解離が非常に早い。そのため長鎖脂質を用いることが望ましいと考えられるが、長鎖脂質を用いた場合、細胞膜からの解離が抑えられるものの、固定化できる量が減少する結果となる。この要因の1つは、長鎖脂質修飾核酸が集合し、安定なミセル構造を形成してしまうためであると考えられる。そこで、スペーサーを介して脂質を DNA 鎖中に複数（多点）導入することで、このジレンマを克服することを試みた。

実際に、様々な長さのスペーサーを介して脂質分子を導入した脂質修飾 DNA を設計し、これらを合成・同定することに成功した。細胞表層での挙動（細胞膜への固定化効率、細胞膜への保持時間）を検討したところ、いずれも細胞膜への固定化が確認された。また、その化学構造と細胞表層での挙動に対する相関が確認され、その挙動に対する理解が深まるとともに、更に改善できる可能性が示された。ただし、固定化効率/保持時間の両面で本応用に十分な機能を示すアンカリング脂質構造の開拓には至っておらず、今後の更なる研究展開が必要である。

## (2) 高機能な蛍光核酸アプタマーセンサーの開発

免疫細胞から放出され、種々の生体機能において重要な役割を担うサイトカイン「インターフェロニン」を標的とする蛍光アプタマーセンサーの開発を行なった。既知の 71 塩基インターフェロニンアプタマーから 25 塩基の主要配列を見出した。またその末端に、Fluorescein を修飾したところ、この蛍光色素修飾核酸アプタマーが蛍光 ON 型（標的の結合に伴って蛍光強度が上昇）のインターフェロニン蛍光センサーとして機能することを見出した。本結果は、学術論文に投稿し掲載されている (Siti Norulhuda Hashim et al., *Chem. Lett.* **2015**, *44*, 1670-1672)。

上記で開発した蛍光アプタマーセンサーは、消光分子を必要とせず (quencher free)、単一の蛍光色素を導入するだけで標的インターフェロンに応答する。合成が容易であり、また様々な追加修飾を可能にする点で有利である。ただし、標的の存在にともなう蛍光 OFF/ON 比が低く改善が必要であった。

詳細なメカニズム解析が必要であるが、種々の結果から、蛍光色素近傍に芯材するグアニンが自己消光剤として機能し、

標的分子の結合に伴う構造変化により蛍光強度の上昇（蛍光消光の低減）が誘起されるメカニズムが考えられた。そこでこのメカニズムをもとに、修飾に用いる蛍光色素を、BODIPY-FL、TAMRA、Alexa Fluor 488 などに変更した蛍光核酸アプタマーを合成し、その蛍光応答特性を評価した。その結果、これらが蛍光センサーとして機能し、複数の波長でセンシング可能であることが示された。また中でも BODIPY-FL 修飾蛍光核酸アプタマーがインターフェロニンに対して高い蛍光 OFF/ON 比（本実験条件下で  $F_{\max}/F_0 = 4.87$  倍）で応答することが確認できた。

また、本知見をもとにアデニン系分子に応答する蛍光アプタマーセンサーの改良を行なったところ、従来型の Fluorescein 修飾アプタマーセンサー（本実験条件下で 1.77 倍）に比べ、大幅に高い蛍光 OFF/ON 比を示すセンサーの開発に成功した（同条件下にて 4.64 倍）。

高い蛍光 OFF/ON 比は、蛍光イメージング計測において、高い S/N 比に繋がる可能性を持ち、その解析を容易にする。今回開発した蛍光アプタマーセンサーはアデニン系分子、およびインターフェロニンを標的とする生体分子計測において有用なツールになりうるものと考えられる。

## (3) 上記技術を用いた細胞表層イメージング応用

(2)において開発した高い OFF/ON 比を示す BODIPY-FL 修飾蛍光核酸アプタマーセンサーを用い、アデニン系分子、およびインターフェロニンを標的とする細胞表層生体分子蛍光イメージングを試みた。

細胞上に固定化した蛍光アプタマーセンサーは、外部から添加した標的分子に応答して蛍光強度が上昇し、細胞表層においても蛍光分子センサーとして機能することが明確に示された。細胞表層における蛍光生体分子計測に向けた重要な成果である。本結果は、学術論文に投稿し、掲載されている (Siti Norulhuda Hashim et al., *Anal. Sci.* **2016**, *32*, 543-547)。

## 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 2 件）

- ① Akira Tsuchiya, Siti Norulhuda Hashim, Shoko Ise, Takafumi Furuhashi, Kiyohiko Kawai, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto,

Noriko Kamiya, Shinsuke Sando, BODIPY-labeled Fluorescent Aptamer Sensors for Turn-on Sensing of Interferon-gamma and Adenine Compounds on Cells, *Analytical Sciences*, 査読有, Vol. 32, 2016 pp. 543-547, DOI 10.2116/analsci.32.543.

- ② Siti Norulhuda Hashim, Akira Tsuchiya, Noriho Kamiya, Shinsuke Sando, A Single Fluorophore-labeled Aptamer Sensor for the Detection of Interferon Gamma, *Chemistry Letters*, 査読有, Vol. 44, 2015, pp. 1670-1672, DOI 10.1246/cl.150794.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Siti Norulhuda Hashi, Design of fluorescent aptamer sensor for on-cell detection of biomolecules, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、2015 年 9 月 11 日、熊本大学 (熊本)
- ② 土谷 享、細胞表層を機能化する人工分子の設計 (1) : 機能性核酸を用いた細胞表層での分子センシング、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26 日、日本大学 (千葉)
- ③ 古畑隆史、細胞表層を機能化する人工分子の設計 (2) : 機能性核酸の効率的な細胞表層固定化を実現する脂質分子の探索、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26 日、日本大学 (千葉)
- ④ 桑畑耕平、細胞障害活性の向上を目指した核酸アプタマーの細胞表層固定化制御、第 30 回日本 DDS 学会学術集会、2014 年 7 月 30 日、慶應義塾大学 (東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/sandolab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山東信介 (SANDO, Shinsuke)

東京大学大学院・工学系研究科・教授

研究者番号 : 20346084

### (2) 研究分担者

岡本晃充 (OKAMOTO, Akimitsu)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号 : 60314233

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし