

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410181

研究課題名(和文) 反応性核酸を用いた部位特異的リジン残基ラクタム化による蛋白質への機能導入

研究課題名(英文) Introduction of lactam with useful functions into proteins at specific lysine residue by reactions with artificial nucleic acids

研究代表者

麻生 真理子 (Aso, Mariko)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：30201891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：核酸と相互作用する蛋白質の機能発現に重要なリジン残基を部位特異的に修飾し、蛋白質機能研究の情報を得るため、1,4-ジカルボニル構造をもつ反応性核酸を合成し、反応性を検討した。蛋白質との複合体形成後、還元条件下近接するリジン残基と反応し蛋白質とのクロスリンク体を効率よく生成する核酸誘導体、またリジン残基を安定な蛍光性修飾体に変換し、蛋白質を蛍光修飾する核酸誘導体の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed oligodeoxynucleotides (ODNs) containing 1,4-dicarbonyl groups to modify specific lysine residue in DNA-interacting proteins and provide information on position and function of the lysine residue in question. Reductive amination of ODNs containing 1,4-dicarbonyl groups in ribose moiety proceeded with a proximal lysine residue in protein-ODN complex and cross-link products were obtained efficiently. ODNs containing 1,4-dicarbonyl groups on substituted benzene ring modified a proximal lysine residue to produce stable fluorescent compound and turn-on fluorescent protein modification at a specific lysine residue was achieved.

研究分野：核酸関連化学

キーワード：核酸 蛋白質 リジン ラクタム 蛍光

### 1. 研究開始当初の背景

核酸に作用する蛋白質には機能や相互作用調節に関わるリジン残基が多い。リジン残基の機能や位置の特定には部位特異的の化学修飾が有効である。例として蛋白質に特異的に結合する配列を持つ核酸誘導体にアルデヒドを組み込み、近接するリジンとの間に還元条件下共有結合を形成しクロスリンク体を生成させる方法などがあった。また蛍光性官能基や生体直行型反応基(生体分子とは反応せず特定の官能基とだけ反応する官能基)の蛋白質への部位特異的導入は蛋白質の機能研究、機能導入に重要であり、研究の重要性が高まっていた。申請者はデオキシリボース4位酸化を引き金に生成するC4'酸化型核酸が1,4-ジカルボニル構造を持ち、中性の水溶液中1級アミンと反応し、効率よくラクタム構造を生成することを見出していた。また還元条件下では2つのカルボニル基の効果でクロスリンク形成が可能なることを見出していた。これらの反応性を利用し、DNAと相互作用する蛋白質のリジン残基を部位特異的に修飾可能であると予想した。またC4'酸化型核酸を改良した分子を開発し蛋白質リジン修飾を行えば蛋白質機能研究に有用な情報が得られると予想した。

### 2. 研究の目的

C4'酸化型核酸を用いて還元条件及び非還元条件下、核酸結合性蛋白質中のリジン残基を部位特異的に修飾し、蛋白質の機能に重要なリジン残基を明らかにする研究手法を確立する。C4'酸化型核酸と同程度の反応性を示し、さらに安定性に優れた反応性核酸を開発し、蛋白質部位特異的修飾に応用する。C4'酸化型核酸のアミン修飾成績体であるラクタムの反応を利用し蛋白質への機能導入を行う。また蛍光性など有用な修飾成績体を形成するC4'酸化型核酸の誘導体を開発し、蛋白質機能研究に応用する。

### 3. 研究の方法

- (1) C4'酸化型核酸の合成と蛋白質修飾。  
C4'酸化型核酸は以前確立した光分解性前駆体への光照射により調整する。C4'酸化型核酸はあらゆる配列を持つ核酸分子に導入可能である。本研究では大腸菌DNA複製開始に関わる蛋白質、DnaAの結合配列を持つC4'酸化型核酸を合成し、蛋白質修飾を行う。またC4'酸化型核酸の1,4-ジカルボニル構造をベンゼンに導入したベンゼン縮環型誘導体を合成しアミン修飾反応性を検討するとともに、DnaAの修飾を行う。
- (2) 還元条件下、C4'酸化型核酸とDnaAのクロスリンク体を形成する。一つのカルボニル基を持つ脱塩基部位核酸の反応効率と比較し、C4'酸化型核酸を用いたクロスリンク形成の有用性を評価する。C4'酸化型核酸の2'位にメトキシ基を導入し安定性を向上させた誘導体を合成し、還元条件下での蛋白質修飾の効率を評価する。また核酸医薬で注目されるペプチド核酸コンジュゲート形成における反応性を評価する。
- (3) C4'酸化型核酸、及びベンゼン縮環型誘導体から得られるラクタムの反応性を調べる。
- (4) ベンゼン縮環型誘導体から得られるラクタムのうち、ベンゼン部に置換基を導入した蛍光性ラクタムの物性評価と蛋白質蛍光修飾への応用を検討する。

### 4. 研究成果

- (1) C4'酸化型核酸を用いたDNA複製開始蛋白質の部位特異的リジン残基修飾; DnaAの結合配列を持つC4'酸化型核酸を合成し、還元条件下DnaA蛋白質の核酸結合ドメイン(ドメインIV)との反応を行ったところ蛋白質核酸クロスリンク体が効率よく得られた。これに対し、一つのアルデヒドしか持たない脱塩基部位構造を持つ核酸の反応では同様の条件下クロスリンク体はほとんど得られなかった。この結果からC4'酸化型核酸はDNA結合性蛋白質のリジン残基との部位特異的クロスリンク形成に有用なことが示

唆された。またドメイン IV と DNA 複合体の X 線結晶構造解析で報告されていた相互作用様式が溶液状態においても示唆された。また 2' 位にメトキシ基を導入した誘導体は C4' 酸化型核酸に比べ熱的安定性が向上した。還元条件下でのドメイン IV とのクロスリンク体も C4' 酸化型核酸に比べ少し収率が低下したが、まずまずの効率で生成した。ペプチドとのコンジュゲート形成では反応が効率よく進行した。

(2) 有用な蛍光性ベンゼン縮環型ラクタムの合成と評価；ベンゼン縮環型誘導体の中でジメトキシ基を持つ誘導体が 1 級アミンと反応し、ラクタム体、5,6-dimethoxy-3-methylene isoindolin-1-one を効率よく生成することを見出した。この化合物はメチレン基がカルボニル基に置き換わった同族体フタルイミドと同様蛍光性を示すことを見出した（蛍光波長、425 nm）。3-methyleneisoindolin-1-one はこれまで蛍光分子としては注目されていなかったため、蛍光分子としての新たな有用性を見出した。さらにフタルイミドが塩基性（pH 8）水溶液中容易に分解し蛍光性を失うのに対し、ラクタム体は長時間安定で、生体分子の蛍光修飾に適することが分かった。また 7-hydroxy-3-methyleneisoindolin-1-one を合成し、これが約 380 nm に極大をもつ蛍光を示すと共に、励起状態分子内水素移動（ESIPT）により生成する互変異性体が長波長での蛍光（約 530 nm）を示すことを明らかにした。エタノール-水混合溶媒中蛍光極大波長は溶媒の誘電率と良い相関を示したことから、周辺の誘電率をモニターする蛍光プローブとして応用可能であることが示唆された。ESIPT は二波長蛍光や大きなストークスシフトを示すことで注目されており、新たな ESIPT 蛍光分子の開発となった。

(3) ターンオン型蛋白質部位特異的蛍光修飾を行う核酸誘導体の開発；中性条件下アミンと反応し、5,6-dimethoxy-3-methyleneiso-

indolin-1-one を生成する反応性核酸を合成した。これを用いて、DnaA ドメイン IV 及び全長 DnaA の効率の蛍光修飾に成功した。反応性核酸は無蛍光であることから蛍光性生成物が容易に検出可能なターンオン型蛍光修飾法の開発となった。

## 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 3 件）

Y. Kimuro, K. Usui, S. Karasawa, G. Hirai, M. Aso, 7-Hydroxy-3-methyleneisoindolin-1-one as a new ESIPT-fluorescent probe to monitor aqueous environments, accepted (c17-00306), *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, 2017, 65 (8).

C. Gatanaga, B. Yang, Y. Inadomi, K. Usui, T. Katayama, H. Suemune, M. Aso, Site-specific turn-on fluorescent labeling of DNA-interacting protein using oligodeoxynucleotides that modify lysines to produce 5,6-dimethoxy-3-methyleneisoindolin-1-one, *ACS Chem. Biol.*, 査読有, 11, 2016, 2216-2221. DOI: 10.1021/acscchembio.6b00090.

B. Yang, A. Jinnouchi, K. Usui, T. Katayama, M. Fujii, H. Suemune, M. Aso, Bioconjugation of oligodeoxynucleotides carrying 1,4-dicarbonyl groups via reductive amination with lysine residues, *Bioconjugate Chem.*, 査読有, 26, 2015, 1830-1838, DOI:10.1021/acs.bioconjchem.5b00361.

〔学会発表〕（計 13 件）

M. Aso, C. Gatanaga, B. Yang, K. Usui, C. Ota, H. Suemune, Oligodeoxynucleotides that modify lysines to produce fluorescent lactam for DNA-interacting protein labeling, The 43<sup>rd</sup> International symposium on nucleic acids chemistry、熊本大学、熊本県熊本市中央区黒髪、2016 年 9 月 25 日。

M. Aso, B. Yang, K. Usui, H. Suemune,  
Modification of DNA replication initiator  
DnaA at specific lysine residue by amine  
reactive oligodeoxynucleotides, The 42<sup>nd</sup>  
International symposium on nucleic acids  
chemistry、イーグレひめじ、兵庫県姫路  
市本町, 2015年9月25日。

C. Gatanaga, H. Suemune, M. Aso,  
Development of amine reactive oligodeoxy-  
nucleotides for functionalization of DNA-  
interacting biomolecules, The 41<sup>st</sup>  
International symposium on nucleic acids  
chemistry、北九州国際会議場、福岡県北  
九州市小倉北区浅野、2014年11月5日。

〔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 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://sekkei.phar.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

麻生 真理子 (ASO, Mariko)  
九州大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：30201891

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

片山 勉 (KATAYAMA, Tsutomu)  
九州大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号：70264059

### (4) 研究協力者

( )