

図 11 蛍光抗体染色による S-14 リガンドの細胞表層でのトラップ確認

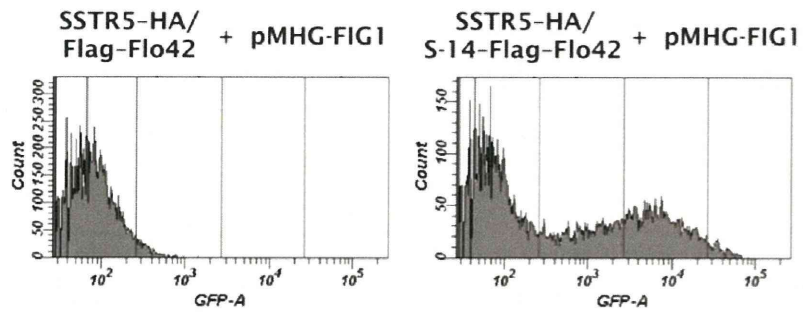


図 12 マルチコピー型プラスミドによるシグナル伝達アッセイ感度の向上

GPCR 結合性および作動性 RNA アプタマースクリーニングのための 新規レポーターアッセイ系の開発

研究代表者：近藤 昭彦 神戸大学大学院工学研究科・教授

研究要旨

ヒトソマトスタチン受容体 (SSTR) のサブタイプ 2 および 5 を機能的に発現し、リガンド応答シグナルをアッセイ可能な酵母を創製した。また、細胞内 G 蛋白質 α サブユニットをキメラ化することで、RNA アプタマースクリーニングに利用できる高感度なアッセイ系を構築した。さらに、細胞内 G 蛋白質 α サブユニットをキメラ化することで、ヒトソマトスタチン受容体 (SSTR) のサブタイプ 2 および 5 に加え、ヒトニューロテンシン受容体サブタイプ 1 (NTSR1) を機能的に発現し、リガンド応答シグナルをアッセイ可能な酵母を創製した。本系は、RNA アプタマースクリーニングに利用することができる。そして、ヒトソマトスタチン受容体 (SSTR5) の高感度リガンド応答アッセイ可能な酵母株の創製に成功した。本系は、RNA アプタマースクリーニングを可能とする。

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒトソマトスタチン受容体 (SSTR) を標的としてアゴニストとして作用する RNA アプタマースクリーニングすることである。RNA アプタマースクリーニングするために、ヒトソマトスタチン受容体サブタイプ 2 およびサブタイプ 5 (SSTR2 および SSTR5) を機能的に発現する遺伝子組換え酵母細胞の創製を試みる。また、SSTR2 および SSTR5 に加え、さらに応用範囲を広げるために、ヒトニューロテンシン受容体 (NTSR) を標的とした酵母アッセイ系の構築も試みる。そしてこれらの系を発展させ、SSTR5 を標的としてさらなる高感度リ

ガンド応答アッセイを可能とする酵母アッセイ系の開発を試みる。

B. 研究方法

H21 年度では、SSTR2 および SSTR5 を構成発現するためのプラスミドを構築し、シグナル伝達アッセイ用に改変した酵母細胞 (IMFD-70) に形質転換を行った。形質転換体を用いて、天然リガンドであるソマトスタチン (SRIF14) を添加・非添加の状態において蛍光レポーター遺伝子発現によるシグナル伝達アッセイを行った。また、細胞内の酵母由来三量体 G 蛋白質の α サブユニット (G α) の C 末端 5 アミノ酸をヒト由来 Gai3 の C

末端 5 アミノ酸と置換し、キメラ G α 蛋白質を発現する酵母細胞 (IMFD-72) にも、SSTR2 および SSTR5 を発現するプラスミドをに形質転換し、同様のアッセイを行った。

H22 年度では SSTR2 および SSTR5 を構成発現するためのプラスミドを構築し、シグナル伝達アッセイ用に改変した酵母細胞 (IMFD-70) および細胞内の酵母由来三量体 G 蛋白質の α サブユニット (G α) の C 末端 5 アミノ酸をヒト由来 G α i3 の C 末端 5 アミノ酸と置換し、キメラ Gi3 蛋白質を発現する酵母細胞 (IMFD-72) に形質転換を行った。また、NTSR1 および NTSR2 を構成発現するためのプラスミドを構築し、IMFD70 およびヒト由来 G α q の C 末端 5 アミノ酸と置換したキメラ Gq 蛋白質を発現する酵母細胞 (IMFD-74) に、NTSR1 および NTSR2 を発現するプラスミドをに形質転換を行った。それぞれの天然リガンドであるソマトスタチン (SST) およびニューロテンシン (NTS) を添加・非添加の状態において蛍光レポーター遺伝子発現によるシグナル伝達アッセイを行った。

そして、H23 年度ではシグナル伝達アッセイ用に改変した酵母細胞 (IMFD-70) および細胞内の酵母由来三量体 G 蛋白質の α サブユニット (G α) の C 末端 5 アミノ酸をヒト由来 G α i3 の C 末端 5 アミノ酸と置換し、キメラ Gi3 蛋白質を発現する酵母細胞 (IMFD-72) に加え、GFP レポーターをプラスミドで発現する酵母

株 (IM-50/pGK421-SSTR5/pMHG-FIG1) を構築した。リガンドであるソマトスタチン (SST) を添加し、蛍光レポーター遺伝子発現によるシグナル伝達アッセイを行った。

C. 研究結果

H21 年度では SSTR2 および SSTR5 を発現した IMFD-70 株において、SRIF14 に応答したシグナル伝達を確認することができた。また、同受容体を発現する IMFD-72 株においても同様に SRIF14 に応答したシグナル伝達を確認することができた (図 1)。これら 2 つの株を比較すると、キメラ G α 蛋白質を発現する IMFD-72 の方が、SSTR2 および SSTR5 両方に対して高いシグナル応答を示した (図 2)。H22 年度ではキメラ Gi3 を発現する IMFD-72 株を用いることで、SSTR2 および SSTR5 において、より高いシグナル応答を達成した (図 2)。また、キメラ Gq を発現する IMFD-74 株を用いることで NTSR1 のシグナルを活性化することに成功した (図 3)。最終年度では GFP レポーターをプラスミドで発現する IM-50/pGK421-SSTR5/pMHG-FIG1 株を構築することで、IMFD-72 株よりもさらに高いシグナル検出感度を得ることに成功した (図 4)。GFP 蛍光強度の定量比較においてもその結果が示された (図 5)。

D. 考察

G α 蛋白質の C 末端は受容体との相互

作用部位として知られている。また、SSTR はヒト細胞において、G α 蛋白質の i クラスと共役してシグナル伝達を制御している。そのため、酵母 G α 蛋白質の C 末端をヒト G α の i クラスに分類される Gai3 の C 末端と置換することで、SSTR とキメラ G α 蛋白質が相互作用しやすくなり、感度が向上したものと考えられる。高感度な SSTR2 および SSTR5 アッセイ系により、サブタイプ特異的な RNA アプタマーを取得するためのスクリーニング系が整ったといえる

レポーターの発現システムを改変することにより、SSTR5 のシグナル検出感度を大幅に向上することに成功した。本アッセイ系は、効率的な RNA アプタマーの取得が可能である。

E. 結論

SSTR サブタイプ特異的な RNA アプタマー認識を評価できる高感度な酵母リガンドアッセイ系を確立した。NTSR の RNA アプタマー認識を評価できる高感度な酵母リガンドアッセイ系を確立した。SSTR の RNA アプタマー認識を評価できる高感度な酵母リガンドアッセイ系を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishii J, Yoshimoto N, Tatematsu K, Kuroda S, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. (2012) Cell wall trapping of autocrine peptides for human

g-protein-coupled receptors on the yeast cell surface. PLoS One. 7, e37136.

Ishii J, Moriguchi M, Hara KY, Shibasaki S, Fukuda H, Kondo A. (2012) Improved identification of agonist-mediated G α i-specific human G-protein-coupled receptor signaling in yeast cells by flow cytometry. Anal Biochem. 426, 129-133.

Ryo S, Ishii J, Iguchi Y, Fukuda N, Kondo A. (2012) Transplantation of the GAL regulon into G-protein signaling circuitry in yeast. Anal Biochem. 424, 27-31.

Fukuda N, Ishii J, Kaishima M, Kondo A. (2011) Amplification of agonist stimulation of human G-protein-coupled receptor signaling in yeast. Anal Biochem. 417, 182-187.

Togawa S, Ishii J, Ishikura A, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. (2010) Importance of asparagine residues at positions 13 and 26 on the amino-terminal domain of human somatostatin receptor subtype-5 in signalling. J Biochem. 147, 867-873.

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

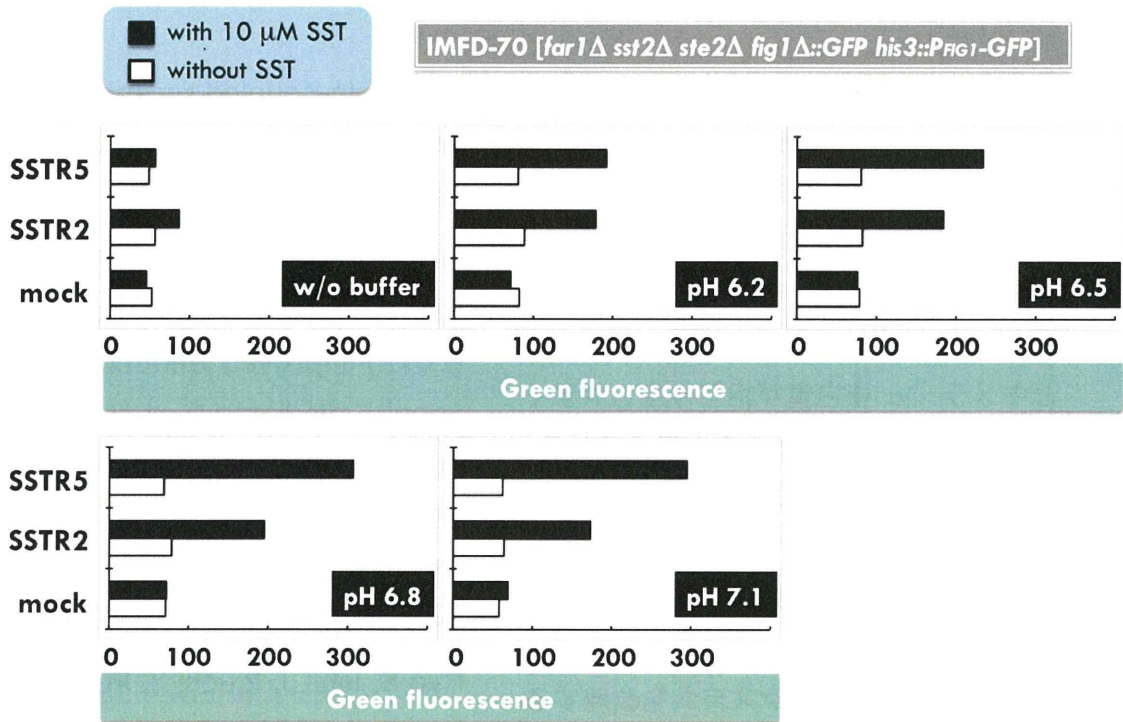


図 1. IMFD-70 株による SSTR2 および SSTR5 のシグナル伝達アッセイ

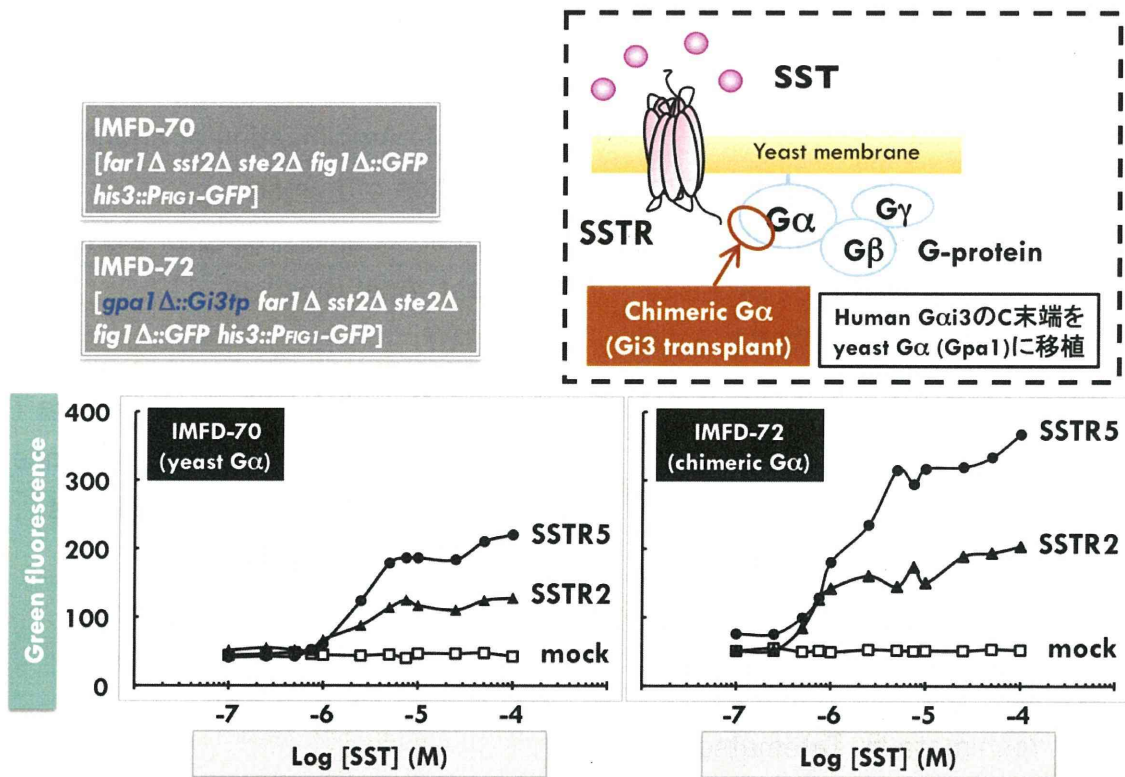


図 2. キメラ G α 発現 IMFD-72 株によるシグナル伝達アッセイ

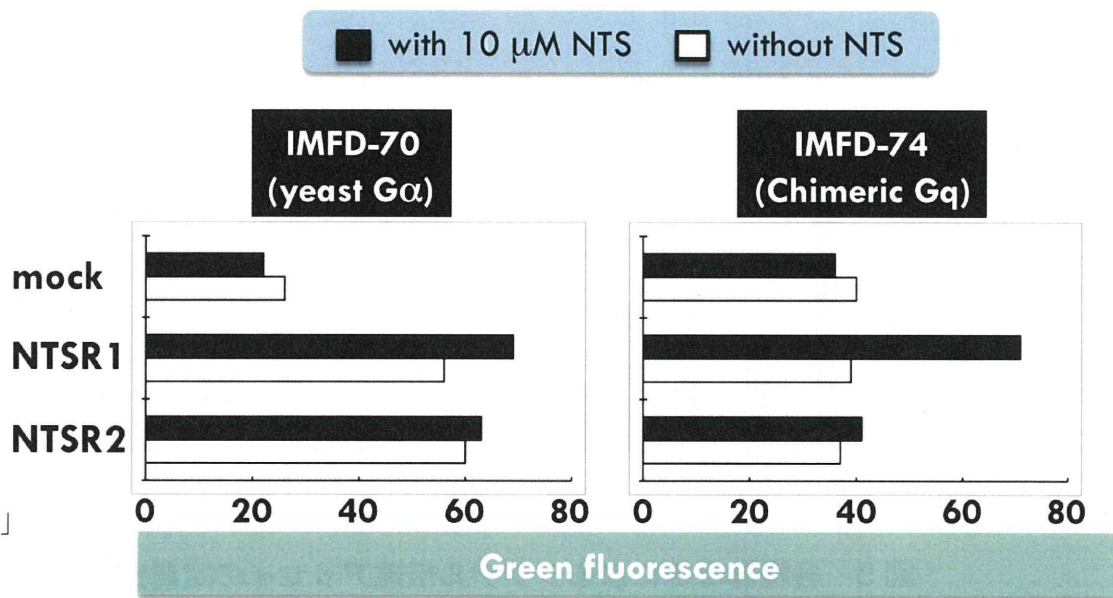


図 3. キメラ G α q 発現 IMFD-74 株による NTSR のシグナル伝達アッセイ

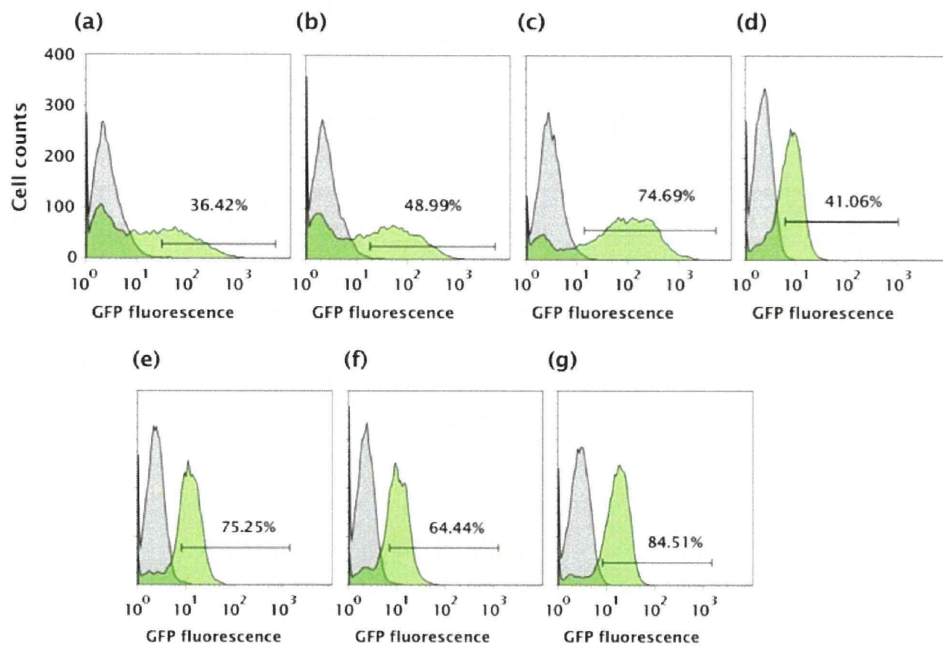


図 4 各種酵母株によるシグナル伝達アッセイ

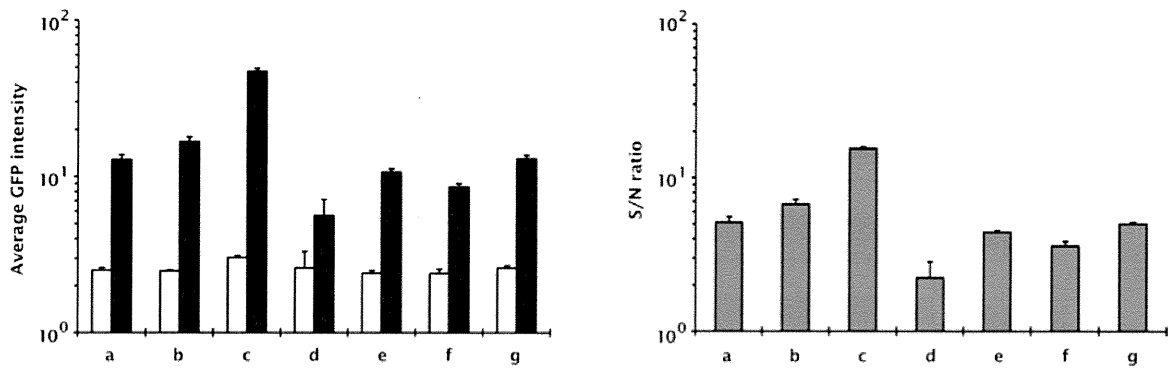


図5 各種酵母株によるシグナル伝達アッセイの定量比較

- (a) MI-150/pGK421-SSTR5/pSL-GPA1/pMHG-FIG1
- (b) MI-150/pGK421-SSTR5/pSL-Gi3tp/pMHG-FIG1
- (c) IM-50/pGK421-SSTR5/pMHG-FIG1
- (d) IMF-50/pGK421-SSTR5
- (e) IMFD-50/pGK421-SSTR5
- (f) IMFD-70/pGK421-SSTR5
- (g) IMFD-72/pGK421-SSTR5

原子間力顕微鏡(AFM)を用いたアプタマー作成系の構築

研究分担者：荻野 千秋 神戸大学大学院工学研究科・准教授

研究要旨

細胞の表面には疾病の治療薬の標的となるレセプターや抗体が多数存在することが報告されているが一細胞上に着目したとき、細胞表面の蛋白質の分布等は分かっていない。そこで AFM を用いた生体分子へのアプローチ方法を考案した。対象の細胞として培養が容易である酵母を用い、酵母表面に存在する G 蛋白質共役型受容体(GPCR)である Ste2p とそのリガンドである α -factor との相互作用の確認を行った。

A. 研究目的

細胞の表面には様々な蛋白質が存在し、疾病の治療薬の標的となるレセプターや抗体が多数存在することが報告されている。しかし一細胞上に着目したとき、細胞表面の蛋白質の分布等は分かっていないため、細胞表面に存在する生体分子へ薬剤等の局所的なアプローチを行って細胞応答や生体分子間の相互作用を明らかにすることが求められている。AFM を用いた生体分子へのアプローチ方法を考えた。対象の細胞として培養が容易である酵母を用い、酵母表面に存在する G 蛋白質共役型受容体(GPCR)である Ste2p とそのリガンドである α -factor との相互作用の確認を行った。

B. 研究方法

酵母をアガロースで固定化し、カンチレバーに α -factor を修飾し、AFM により Ste2p- α -factor 間相互作用を測定した。

C. 研究結果

カンチレバーと試料表面の親和力を測定した結果、Ste2p が存在する酵母において、 α -factor を修飾したカンチレバーと酵母表面との間に働く特異的な力が検出された。コントロールとして Ste2p をノックアウトした酵母では大きな親和力は測定されなかった。

D. 考察

カンチレバーにリガンドを修飾して、酵母上 300 nm 四方の親和力を測定し、

その値をヒストグラムにしたものを Fig. 6 に示す。 α -factor を修飾したカンチレバーには平均結合力が強く測定され、一方で未修飾のものは弱い力が働いた。また、Ste2 を欠損させた酵母でも強い力は見られなかったため、酵母表面の Ste2p とカンチレバー先端の α -factor の間に親和力が働いていると考えられる。これらの結果より、AFM により細胞表面のレセプターとリガンド間の相互作用の検出が可能になったと考えられる。

E. 結論

本研究では細胞表面のレセプターとリガンド間の相互作用評価系の構築に成功した。この評価系の構築により、取得されたアプタマーの機能評価を従来と比較して迅速に行うことが可能となると考えられる。

F. 研究発表

学会発表

○荻野 千秋・野坂 和輝・石井 純・宮地 佑典・近藤 昭彦「AFMを用いた生

細胞表面のレセプター・リガンド間相互作用解析と細胞応答の観察」『日本化学会第91春季年会』, 神奈川, 2011年3月

○荻野 千秋・早瀬 太治・宮地 佑典・近藤 昭彦「原子間力顕微鏡を用いたアミノ酸に対する機能性核酸分子・アプタマーの新規選抜法の開発」『日本化学会第91春季年会』, 神奈川, 2011年3月

○野坂和輝, 宮地佑典, 石井純, 荻野千秋, 近藤昭彦「力学的指標による生細胞表面におけるリガンド-受容体の相互作用解析」『化学工学会第42回秋季大会』, 京都, 2010年9月

○Nosaka K, Miyachi Y, Ishii J, Ogino C, Kondo A. Investigation of the interaction between GPCR and ligand by AFM equipped with bio-molecule modified cantilever. Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC 2009), 2009, Nov, Kobe, Japan

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

蛍光蛋白質を利用した、
受容体の発現量・局在性・シグナル伝達能評価系の確立

研究代表者：田中 勉 神戸大学大学院工学研究科・准教授

研究要旨

これまでに開発したシアン蛍光蛋白質（CFP）を利用した新規評価系を用いて 4 種類のヒト GPCR の発現量比較を行った。

A. 研究目的

これまでに構築した新規評価系の有効性を検証するために、4種類のヒト GPCR に CFP を融合して、発現量を比較した。本系により、SSTR5 以外の GPCR についても RNA アプタマーの評価を行うことが可能である。

B. 研究方法

H21 年度は SSTR5 の発現量が異なる酵母細胞を調製するために、N 末端に分泌シグナル配列を付加した SSTR5 を発現するプラスミドをシグナル伝達アッセイ用に改変した酵母細胞に形質転換した。形質転換体を用いて、SRIF14 を添加・非添加の状態において職色蛍光レポーター遺伝子発現によるシグナル伝達アッセイを行った。また、SSTR5 の C 末端にシアン蛍光蛋白質を融合し、細胞内での蛍光強度を測定するとともに、蛍光顕微鏡で蛍光の局在性を観察した。H22 年度では

SSTR2 および SSTR5 を構成発現するためのプラスミドを構築し、シグナル伝達アッセイ用に改変した酵母細胞（IMFD-70）および細胞内の酵母由来三量体 G 蛋白質の α サブユニット（ $G\alpha$ ）の C 末端 5 アミノ酸をヒト由来 $G\alpha i3$ の C 末端 5 アミノ酸と置換し、キメラ $Gi3$ 蛋白質を発現する酵母細胞（IMFD-72）に形質転換を行った。また、NTSR1 および NTSR2 を構成発現するためのプラスミドを構築し、IMFD70 およびヒト由来 $G\alpha q$ の C 末端 5 アミノ酸と置換したキメラ Gq 蛋白質を発現する酵母細胞（IMFD-74）に、NTSR1 および NTSR2 を発現するプラスミドをに形質転換を行った。それぞれの天然リガンドであるソマトスタチン（SST）およびニューロテンシン（NTS）を添加・非添加の状態において蛍光レポーター遺伝子発現によるシグナル伝達アッセイを行った。最終年度ではヒト GPCR の標的として、ソマト

スタチン受容体サブタイプ 5 (SSTR5) に加え、アンジオテンシン受容体 (AGTR1)、エンドセリン受容体 (EDNRB)、セロトニン受容体 (HTR1A) を選択した。これらの N 末端に分泌シグナル配列として、prepro、pre、Ste2N 配列を付加し、さらに C 末端にシアン蛍光タンパク質 (CFP) を融合した。これらを発現する酵母株を用いて、細胞内での CFP の蛍光強度を測定した。さらに、各種シグナル配列を付加した SSTR5 について、緑色蛍光レポーター (GFP) 遺伝子発現によりリガンド添加によるシグナル伝達効率を測定した。

C. 研究結果

H21 年度では C 末端にシアン蛍光蛋白質を融合した評価系により、受容体の発現量および局在性をモニターすることに成功した (図 1)。なお、分泌シグナル配列を付加することで、SSTR5 の発現量は増加することが明らかとなった (図 2)。また、分泌シグナル配列の種類が、SSTR5 の局在性に影響を及ぼすことが分かった。さらに、緑色蛍光レポーター遺伝子発現によりシグナル伝達能を評価した結果、分泌シグナル配列がリガンドに対する最大効力 (efficacy) および用量効力 (potency) にも影響することを示した (図 3)。H22 年度には、キメラ Gi3 を発現する IMFD-72 株を用いることで、SSTR2 および SSTR5 において、より高いシグナル応答を達成した (図 4)。また、キメラ Gq を発現する IMFD-74 株を用い

ることで NTSR1 のシグナルを活性化することに成功した (図 5)。そして最終年度には、C 末端に CFP を融合した評価系により、4 種類すべてのヒト受容体の発現量をモニターしたところ、SSTR5 以外の GPCR について prepro 分泌シグナル配列の付加により最も発現量を向上させることに成功した (図 6)。さらに、SSTR5 のシグナル伝達効率を GFP によりモニターした結果から、CFP での受容体の発現量とシグナル伝達効率が対応することを明らかとした。

D. 考察

これまでに、緑色蛍光レポーター遺伝子によるリガンド応答シグナルの評価系は確立していた。今回、シアン蛍光蛋白質を用いることにより、さらに受容体の発現量を間接的にモニターするとともに、局在性を観察するための評価系を構築した。これら各種蛍光を用いた評価系は簡便かつ有効である。G α 蛋白質の C 末端は受容体との相互作用部位として知られている。SSTR はヒト細胞において、G α 蛋白質の i クラスと、NTSR は q クラスと共役することでシグナル伝達を制御している。そのため、酵母 G α 蛋白質の C 末端をヒト G α の C 末端と置換することで、SSTR または NTSR とキメラ G α 蛋白質が相互作用しやすくなり、感度が向上したものと考えられる。SSTR2 および SSTR5 アッセイ系により、サブタイプ特異的な RNA アプタマーの取得が可能なことに加え、NTSR1 を標的としたア

ッセイへの応用も可能である。以上のように CFP を用いることにより、様々な受容体の発現量をモニターすることが可能であることを示した。さらに、CFP の蛍光を測定することにより、シグナル伝達効率についても評価することにも成功した。本評価系は取得したアプタマーを簡便に評価することが可能である。

E. 結論

CFP 蛍光蛋白質の蛍光強度を測定することで、受容体の発現量・局在性・シグナル伝達能を評価できる系を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Iguchi Y, Ishii J, Nakayama H, Ishikura A, Izawa K, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. (2010) Control of signalling properties of human somatostatin receptor subtype 5 by additional signal sequences on its amino-terminus in yeast. *J Biochem.* 147, 875-884.

Togawa S, Ishii J, Ishikura A, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. "Importance of asparagine residues at positions 13 and 26 on the amino-terminal domain of human somatostatin receptor subtype-5 in signalling" *J Biochem.* 2010

2. 学会発表

Iguchi Y, Ishii J, Tanaka T, Kondo A. "Expression and signaling analyses of human G protein-coupled receptor in yeast" *Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC 2009)*, 2009, Nov, Kobe, Japan

Togawa S, Ishii J, Tanaka T, and Kondo A. "Functional analysis of mutant human somatostatin receptor using a yeast-based fluorescence reporter assay" *Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC 2009)*, 2009, Nov, Kobe, Japan

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

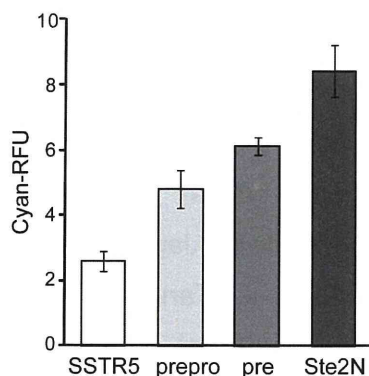


Figure 1. Estimation of expression levels of CFP-fluorescent tagged SSTR5 receptors with or without additional SS (secretion signal) sequences. Four CFP-fluorescent tagged SSTR5 constructs — SSTR5-CFP, prepro-SSTR5-CFP, pre-SSTR5-CFP, and Ste2N-SSTR5-CFP — were prepared to generate recombinant strains MI-170-6 (SSTR5), MI-170-7 (prepro), MI-170-8 (pre), and MI-170-9 (Ste2N), respectively. Cellular Cyan-RFU was measured on FACScanto II flow cytometer. Data represent the mean of triplicate independent experiments and error bars represent the standard deviation.

Figure 2. Observation of localisation patterns of CFP -fluorescent tagged SSTR5 receptors with or without additional SS. Four CFP -fluorescent tagged SSTR5 constructs — SSTR5-CFP, prepro -SSTR5-CFP, pre-SSTR5-CFP, and Ste2N-SSTR5-CFP — were prepared to generate recombinant strains MI-170-6 (SSTR5), MI-170-7 (prepro), MI-170-8 (pre), and MI-170-9 (Ste2N), respectively. The cellular cyan fluorescence was observed with the fluorescence microscope. White bars represent 10 μ m.

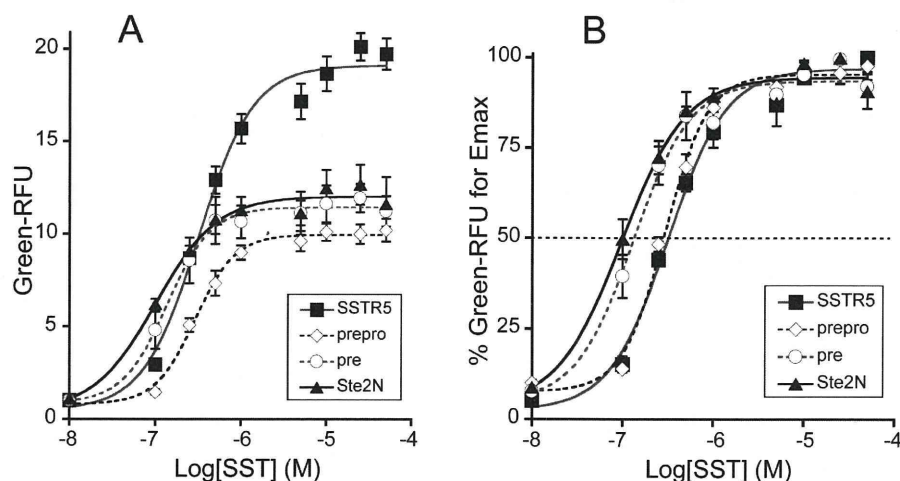
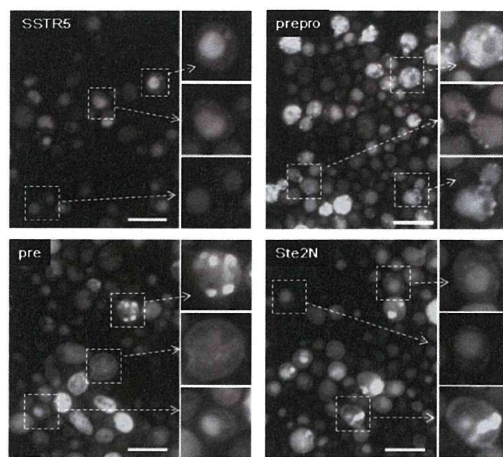


Figure 3. Dose-response curves for SST-specific signalling activities of SSTR5 with or without additional SS in yeast cells. To examine the effects of SS for the SST-specific SSTR5 signalling, prepro-SSTR5, pre-SSTR5, and Ste2N-SSTR5 were prepared. The signalling activities of recombinant strains MI-170-3 (prepro), MI-170-4 (pre), and MI-170-5 (Ste2N) were evaluated using the *GFP* reporter gene. (A) Pharmacological efficacies of yeast transformants were represented by Green-RFU normalised with the green fluorescent intensities of the SST-untreated yeast cells as the reference values, respectively. (B) Pharmacological potencies of yeast transformants were represented by relative Green-RFU normalised with the values of maximal effects of SST-specific dose responses as the reference values, respectively. Data points represent the mean of triplicate independent experiments and error bars represent the standard deviation.

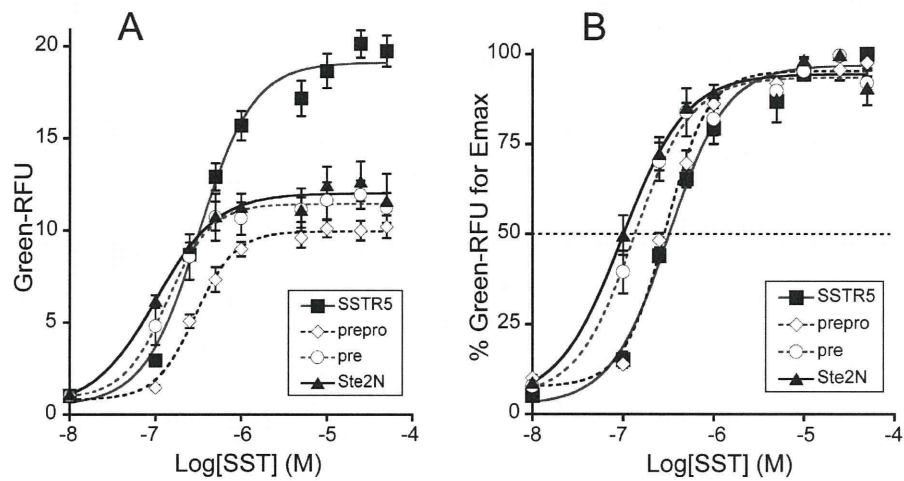


図 3. SSTR5 発現酵母におけるシグナル配列の有無による SST 濃度反応曲

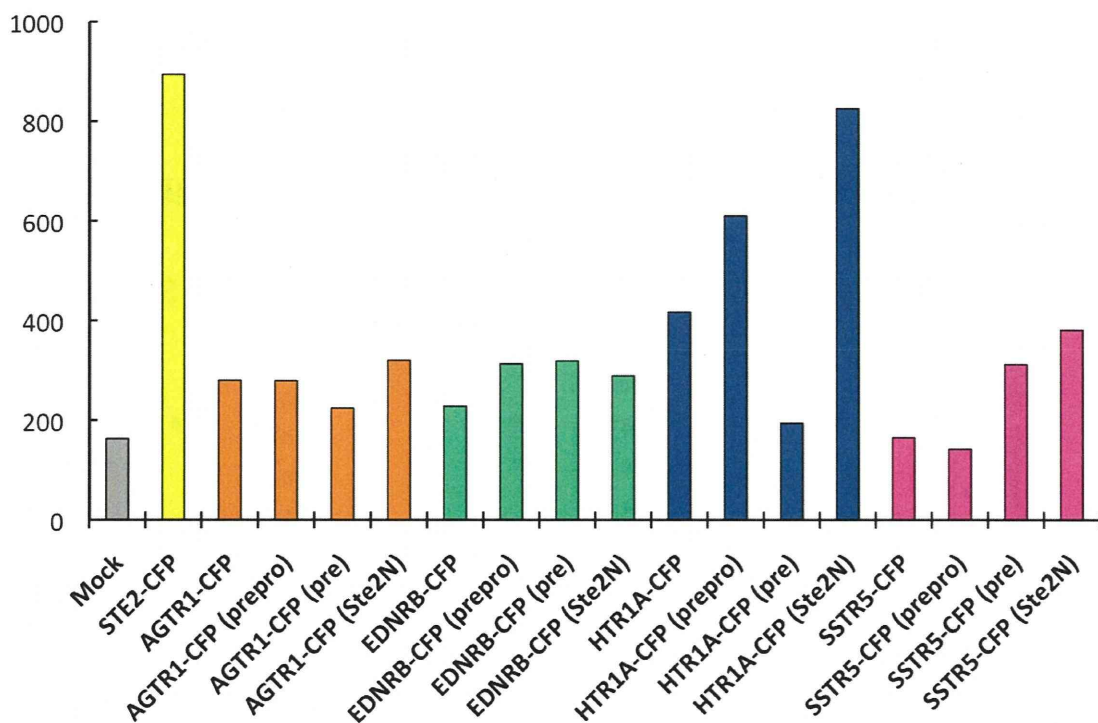


図 4. 各種ヒト GPCR の発現量の定量比較

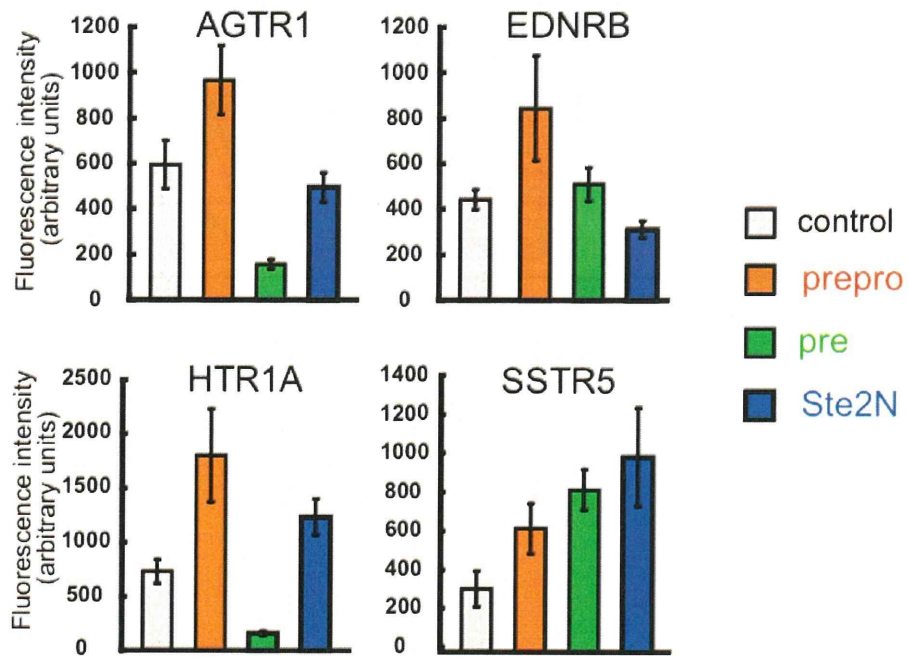


図 5. 4 種類のヒト GPCR を標的とした CFP による発現量モニタリング

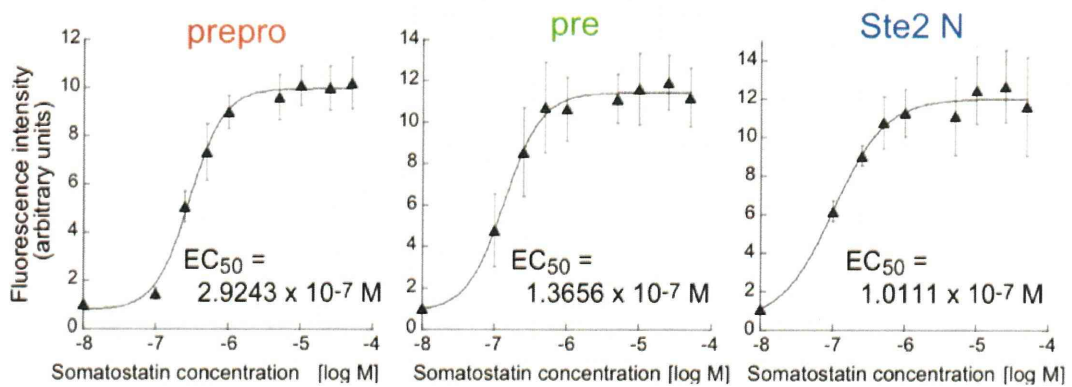


図 6. シグナル配列を付加した SSTR5 によるシグナル伝達効率の比較

塩基部 6 位に蛍光性残基を導入したプリンヌクレオシドを含む オリゴヌクレオチドの合成とその特性

研究分担者：上野 義仁 岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究要旨

新しい核酸蛍光プローブの創製を目指し、デオキシアデノシンの塩基部 6 位にナフトレン及びピレンを導入した蛍光性人工核酸 A^N 、 A^P を合成し、 A^N 、 A^P を含むオリゴマーの熱的安定性、蛍光特性を検証した。その結果、 A^P を含むオリゴマーが二重鎖安定化能、蛍光特性の観点から核酸蛍光プローブとして有望であることが分かった。

A. 研究目的

上野が開発した糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログ(Q)は、400nm を中心に強い蛍光を持つ。本アナログ Q のメタノール中での蛍光量子収率は 0.83 であり、この値は他の蛍光性ヌクレオシドアナログと比較して高い。今回は、Q を含むオリゴ核酸の合成と、その一塩基多型の検出能について検討する。さらに、アナログ Q の合成中間体を原料とし、そのものにグアニジン反応させることによりアナログ N を合成した。N の極大蛍光波長は、Q の極大蛍光波長よりも約 30 nm 長波長の 420 nm であった。また、N の蛍光強度は溶媒の極性に依存し、極性溶媒中では強く非極性溶媒中では低下した。そこで、本アナログをバルジ型に鎖の中央に導入した DNA プローブを設計・合成した。アナログに隣接する塩基が相補塩基と塩基対を形成する場合には、

自由度の高い糖部開環型の三環性アナログ N は二重鎖外にフリップアウトし、水中に露出するため蛍光を発する。一方、隣接する塩基が、標的塩基とミスマッチの場合には、よりインターカレートしやすい三環性アナログ N が二重鎖内に入り込み疎水性条件下に置かれるため蛍光が消光する。これにより一塩基多型を検出可能と考えた。薬剤代謝に関与する CYP2C9 の遺伝子を標的とした。

上野はこれまで、核酸の糖部をベンゼン環に置換した人工核酸を合成し、その性質を検証している。その結果、この人工核酸がアナログ体同士で熱的・熱力学的に安定な二重鎖を形成すること、また、塩基をナフトレンやピレンで置換したビアリール型ユニットをオリゴヌクレオチド中に連続して導入すると、二重鎖が熱的・熱力学的に安定化されること、及び二重鎖を形成した際に蛍光強度が相乗的

に増大することを見出している。これらの知見をもとに、新しい核酸蛍光プローブの創製を目指し、デオキシアデノシンの塩基部 6 位にナフタレン及びピレンを導入した新たな蛍光性人工核酸 A^N 、 A^P の合成を行なった。この人工核酸は塩基と芳香環の間に回転軸を持ち、オリゴマー中ではその回転軸が回転することで効果的な相互作用をもたらし、安定な二重鎖を形成するとともに、励起子相互作用に基づく強い蛍光を発すると考えた。

B. 研究方法

H21 年度は、アナログ Q の蛍光強度は溶媒の極性に依存し、極性溶媒中では強く非極性溶媒中では低下する。そこで、本アナログをバルジ型に鎖の中央に導入した DNA プローブを設計・合成した。アナログに隣接する塩基が相補塩基と塩基対を形成する場合には、自由度の高い糖部開環型の三環性アナログ Q は二重鎖外にフリップアウトし、水中に露出するため蛍光を発する (図 1)。一方、隣接する塩基が、標的塩基とミスマッチの場合には、よりインターカレートし易い三環性アナログ Q が二重鎖内に入り込み疎水性条件下に置かれるため蛍光が消光する。これにより一塩基多型を検出可能と考えた。薬剤耐性に関与する MDR1 の遺伝子を標的とした。H22 年度ではアナログ Q の合成中間体を原料とし、そのものにグアニジン反応させることによりアナログ N を合成した。 N の極大蛍光波長は、 Q の極大蛍光波長よりも約 30 nm 長波

長の 420 nm であった。また、 N の蛍光強度は溶媒の極性に依存し、極性溶媒中では強く非極性溶媒中では低下した。そこで、本アナログをバルジ型に鎖の中央に導入した DNA プローブを設計・合成した。アナログに隣接する塩基が相補塩基と塩基対を形成する場合には、自由度の高い糖部開環型の三環性アナログ N は二重鎖外にフリップアウトし、水中に露出するため蛍光を発する。一方、隣接する塩基が、標的塩基とミスマッチの場合には、よりインターカレートし易い三環性アナログ N が二重鎖内に入り込み疎水性条件下に置かれるため蛍光が消光する。これにより一塩基多型を検出可能と考えた。薬剤代謝に関与する CYP2C9 の遺伝子を標的とした。

最終年度では、各溶媒中濃度 $30\mu\text{M}$ にて、化合物 A^N の吸光度測定および蛍光測定を行った。励起波長 316nm にて蛍光強度を測定した。各溶媒中濃度 $3\mu\text{M}$ にて、化合物 A^P の吸光度測定および蛍光測定を行った。励起波長 355nm にて蛍光強度を測定した。核酸自動合成機にて DNA を合成した。合成した DNA は MALDI-TOFMS での分子量測定にて目的の配列を得たことを確認した。10mM Na Phosphate (pH = 7.0), 100nM NaCl 中、 $3\mu\text{M}$ の濃度にて各二本鎖をアニリングさせた後、50%解離温度である T_m 値を測定した。一本鎖濃度 2, 4, 6, 10, 16, 26, 44, 70, 120, $200\mu\text{M}$ にて T_m 値を測定し、Van't Hoff プロットを行った。

C. 研究結果

H21 年度では、標的が DNA 鎖、RNA 鎖いずれにおいても隣接する塩基が標的塩基とマッチ配列の場合に最も蛍光が強くなることが判明した。このことから本三環性アナログを用いることにより DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を検出可能であることが明らかとなった。H22 年度では、標的が DNA 鎖、RNA 鎖いずれにおいても隣接する塩基が標的塩基とマッチ配列の場合に最も蛍光が強くなることが判明した。このことから本三環性アナログを用いることにより DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を検出可能であることが明らかとなった。最終年度では、アナログ A^N は溶媒の極性に依存した蛍光強度を持つこと、また、その蛍光量子収率は溶媒の極性に反比例することが明らかとなった。また、アナログ A^P も溶媒の極性に依存して極大蛍光波長が変化することが分った。dA を導入した配列と比較し、 A^N 、 A^P を導入した配列において T_m 値が上昇し、熱的安定性が向上した。また、dA の導入数が増加すると熱的安定性が減少するのに対し、 A^N 、 A^P の導入数が増加すると熱的安定性も相対的に増加した。これは導入したナフタレン、ピレン残基の π - π スタッキングに起因するものであると推定される。オリゴマーの UV 吸収の強度は測定した温度に依存した。ネイティブには見られない吸収がアナログ A^N を導入したオリゴマーでは 300-380nm に、 A^P を導入したオリゴマーでは 340-440nm に観察された。

A^N を入れたオリゴマーにおいて ΔS° が増加し、自由エネルギー変化 ΔG° が減少することで二本鎖がより安定化された。導入した A^N は二本鎖形成を阻害せず、ナフタレン残基による疎水性およびスタッキング相互作用にて二本鎖を安定化していることが示唆された。 A^N 挿入オリゴマーにおいては、2 つ挿入した mon5 において、3 つ挿入した 7 よりも蛍光が大きくなった。この結果は A^N の高次構造形成によるものではないことが示唆された。 A^P 挿入オリゴマーにおいては、2 つ挿入した鎖では、二本鎖を組ませる以前からエキシマーによる長波長シフトが見られた。それぞれのアナログ導入 DNA での極大蛍光波長は A^N : 420-460nm A^P : 473-500nm であった。また、アナログを多数導入すると、蛍光波長が長波長シフトし、蛍光強度が増加した。さらに、センス鎖、アンチセンス鎖で同じ数のアナログを導入した配列に比べ、異なる数のアナログを導入した配列において蛍光強度が増大した。

D. 考察

標的が DNA 鎖、RNA 鎖いずれにおいても隣接する塩基が標的塩基とマッチ配列の場合に最も蛍光が強くなることが判明した。このことから本三環性アナログを用いることにより DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を検出可能である。また同時に、隣接塩基と標的塩基が T (U) : G ペアーの場合においても蛍光強度が増大した。これは、T (U)、G 塩基

間における wobble 型の塩基対形成に起因するものである。これに関しては、今後解決法を検討して行く必要がある。

標的が DNA 鎖、RNA 鎖いずれにおいても隣接する塩基が標的塩基とマッチ配列の場合に最も蛍光が強くなることが判明した。このことから本三環性アナログ **N** を用いることにより DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を目視により検出可能である。今回設計・合成した蛍光性人工核酸はこれまでに報告されている他の蛍光核酸に比べ合成が簡便であり、かつ非常に強い蛍光強度を持つことから遺伝子解析技術の1つである DNA チップを初めとし、機能性核酸として医薬品への応用が期待されているアプタマーや siRNA など、幅広い応用が可能である。

E. 結論

三環性アナログ **Q** を中央に導入したオリゴ核酸は、DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を検出する為の優れた蛍光プローブであることが明らかとなった。

三環性アナログ **N** を中央に導入したオリゴ核酸は、DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を検出する為の優れた蛍光プローブであることが明らかとなった。

新しい核酸蛍光プローブの創製を目指し、デオキシアデノシンの塩基部 6 位にナフタレン及びピレンを導入した蛍光性人工核酸 **A^N**、**A^P** を合成し、**A^N**、**A^P** を含

むオリゴマーの熱的安定性、蛍光特性を検証した。その結果、**A^P** を含むオリゴマーが二重鎖安定化能、蛍光特性の観点から核酸蛍光プローブとして有望であることが明らかとなった。

F. 研究発表

学会発表

岩田 麻里、上野 義仁; 塩基部 6 位に蛍光性残基を導入したプリンヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドの合成とその特性; 第 21 回アンチセンスシンポジウム, 講演要旨集 p63, 2011.

論文

1. Shibata, A., Unoe, Y., Iwata, M., Wakita, H., Mastuda, A. and Kitade, Y.

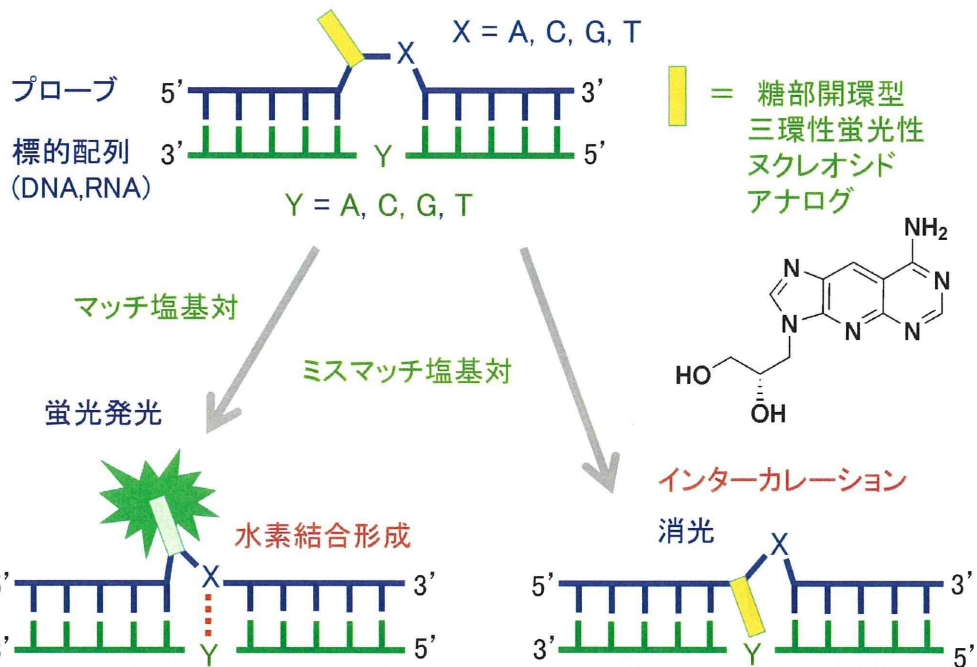
Bioorganic & Medeical Chemistry Letters 22 (2012) 2681-2683

2. Furukawa, K., Hattori, M., Ohki, T., Kitamura, Y and Ueno, Y.

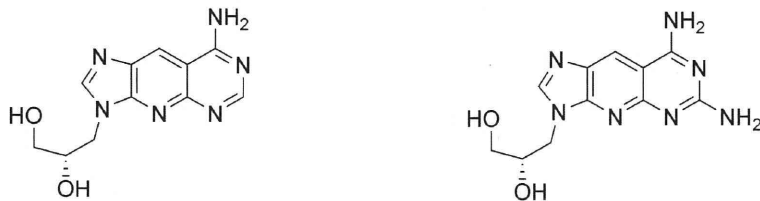
Bioorganic & Medeical Chemistry 20 (2012) 16-24

G. 知的財産の出願・登録状況

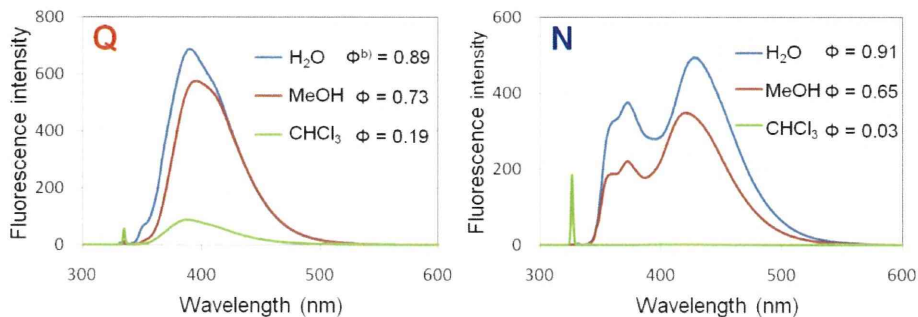
該当なし



三環性アナログQとNの構造とその蛍光特性



Photophysical data of nucleoside analog Q and N^{a)}



a) Concentration of analog : 30 μ M. b) ϕ = fluorescence quantum yield.