

Title	19F-NMRによる光架橋反応を用いた核酸類同時検出
Author(s)	中村, 重孝
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書: 1-4
Issue Date	2019-06-13
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/16029
Rights	
Description	研究活動スタート支援, 研究期間: 2017 ~ 2018, 課題番号: 17H06714, 研究者番号: 00786775, 研究分野: 核酸化学

令和元年6月13日現在

機関番号：13302

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06714

研究課題名（和文）19F-NMRによる光架橋反応を用いた核酸類同時検出

研究課題名（英文）Multiplexed detection of nucleic acids using 19F NMR chemical shift change based on DNA photo-cross-linking

研究代表者

中村 重孝（Nakamura, Shigetaka）

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：00786775

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では複数の核酸情報を同時に検出するため、核酸類の19F NMRによるケミカルシフトイメージングを行った。核酸類光架橋反応により誘起される大きなケミカルシフトの変化を利用し、夾雑系内でも利用できる核酸検出法を開発したとともに、複数の核酸類光架橋核酸を設計・合成し、光架橋後に現れる各光架橋核酸ごとのケミカルシフトの変化を利用することにより、複数の核酸を同時に検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRIに代表される核磁気共鳴法を用い生体深部の複数の核酸情報を同時に読み取る事ができれば、病気の診断において有用な技術である。また、光架橋反応により誘起されるケミカルシフトの大きな変化により初めて同時検出が可能となる。これ研究成果は生体イメージング技術の発展に大きく寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I demonstrated the multiple detection of any nucleic acid by using ultrafast photo-cross-linking based on 19F NMR chemical shift. The ultrafast photo-cross-linking induced large chemical shift of 19F MR signal so that this chemical shift was distinguished in miscellaneous condition. In addition, I designed and synthesis vinylcarbazole analog to detect any nucleic acid based on chemical shift. The photo-cross-linking between trifluoromethylthymidine and carboxyvinylcarbazole, aminocarbonylvinylcarbazole, or methoxycarbonylvinylcarbazole induced large chemical shift. We succeeded in detecting multiple nucleic acids simultaneously by using these photo-responsive artificial nucleic acids based on 19F NMR chemical shift

研究分野：核酸化学

キーワード：19F NMR ケミカルシフトイメージング 光架橋反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析技術の発展により、核酸配列と疾患の関係が明らかになりつつある今、核酸類の高感度検出は疾患の診断において基本でありかつ重要な技術である。現在、これら核酸検出には蛍光分子を用いた蛍光解析によるものが主流であり、この蛍光解析では生体深部での核酸類検出や複数の標的核酸の同時定量検出が難しいとされている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内の核酸情報の同時定量検出を目指し、高い生体透過性を有するフッ素を核種とする核磁気共鳴法(MRI)と光化学反応を組み合わせた、核磁気応答能と光架橋能を有する人工核酸群を合成する。そして、光架橋反応により誘起される大きなケミカルシフトの変化を利用し、一度の測定により生体内の核酸情報を同時に定量検出することが可能な新しい検出法の確立を目的とする。

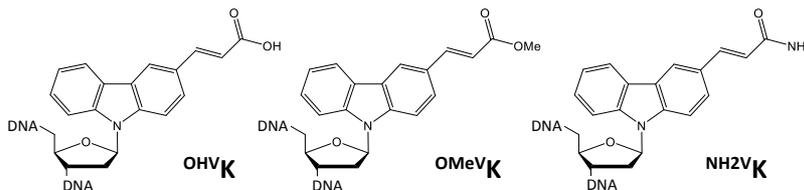
3. 研究の方法

光架橋素子として実績のあるシアノビニルカルバゾール骨格を参考に、光架橋時にケミカルシフトが変化するビニルカルバゾール誘導体を設計・合成した。合成したヌクレオシド体をホスホアミダイト法に従い、9mer のモデル配列(5'-TGCA X CCGT-3'; X 人工核酸)に組み込み HPLC 精製を行い、MALDI-TOF-MS により同定した。相補的なオリゴ DNA と混合した溶液に対して 4°C で 366 nm の照射を行い、光架橋二本鎖 DNA を作成した後、 ^{19}F -NMR 測定により、一本鎖状態、二本鎖状態、光架橋した二本鎖状態のシグナルを同定した。架橋体のケミカルシフトの変化から同時検出に利用可能な化合物セットを決定した。実際の天然核酸の検出に向け、Hybridization Chain Reaction(HCR)を利用し、miRNA をトリガーとして照射によりケミカルシフトの変化を誘起出来る系を設計した。複数の miRNA が混在する中に、検出用核酸プローブを導入し、照射によるケミカルシフトの変化を ^{19}F NMR により確認した。

4. 研究成果

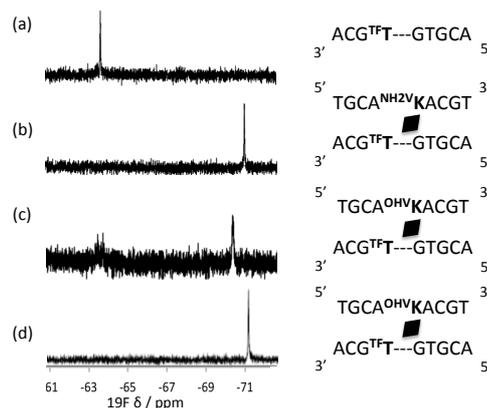
(1) ビニルカルバゾール誘導体の合成

^{19}F NMR による核酸類同時検出に向け、ピリミジン塩基に対する光架橋能を持つビニルカルバゾール誘導体の合成を行った。メトキシカルボニルビニルカルバゾールヌクレオシドを合成後、ジメトキシトリチル化、アミダイト化を行い、DNA 合成機により人工核酸を含むオリゴ DNA を得た。その後、ポストモディフィケーションにより、28% アンモニア水溶液、1M 水酸化ナトリウム溶液($\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 1:4$)、50 mM 炭酸カリウム-メタノール溶液を用い、処理することによりアミのカルボキシビニルカルバゾール(NH $_2$ VK)、カルボキシビニルカルバゾール(OHVK)、メトキシカルボニルビニルカルバゾール(OMeVK)を含むオリゴ DNA の合成に成功した。



(2) 光架橋によるケミカルシフトの変化

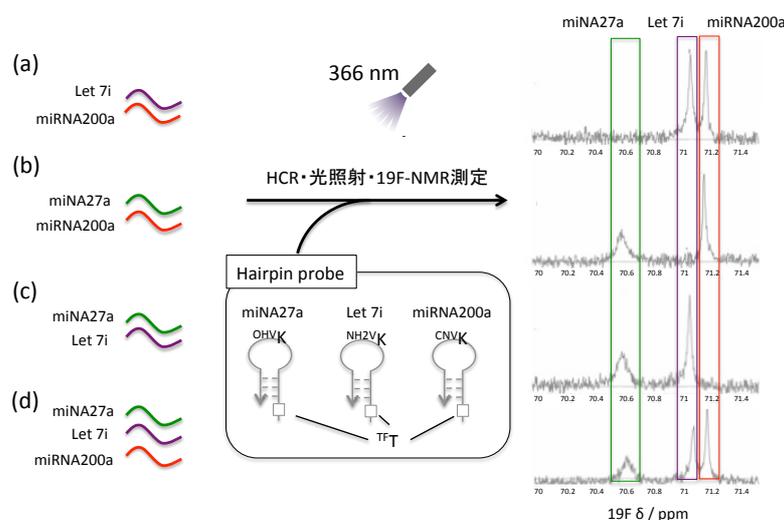
NH $_2$ VK、OMeVK、NH $_2$ VK を含むオリゴ DNA(5'-TGCA X CCGT-3'; $X = \text{NH}_2\text{VK}$, OMeVK, NH $_2$ VK)に対し、トリフルオロメチルチミジン(TFT)を含むオリゴ DNA(5'-ACGGG $^{\text{TFT}}$ TGCA-3')を混合し、照射を行った後、 ^{19}F NMR により測定した。照射前はいずれの場合でも、TFT 由来の ^{19}F シグナルが-63.1ppm に確認された。それに対し、NH $_2$ VK を含むオリゴ DNA と光架橋した際には、-71.0 ppm に新たなピークが確認された。OHVK を含むオリゴ DNA と光架橋した際には、-70.6 ppm、OMeVK と含むオリゴ DNA と光架橋した際には-71.2 ppm に新たな ^{19}F シグナルが確認され、ケミカルシフトの変化から、どの光架橋核酸と反応し



たかを識別できることが明らかとなった。

(3) 19F NMR による核酸類同時検出

miRNA を検出するため、miRNA をトリガーとした HCR を設計し、トリガー-miRNA が存在するときのみ HCR が進行し、その後、光照射を行う事により、標的の miRNA が存在する場合のみケミカルシフトの変化が確認される。miRNA Let7i に対し、NH₂VK を含むプローブを、miRNA 27a に対し、OHVK を含むプローブを、miRNA200a に対し CNVK を含むプローブを設計した。各プローブとトリガー-DNA を混合後、



光照射を行った。その結果、miRNA let7i と miRNA200a が存在する場合には、NH₂VK 由来の-71.0 ppm と CNVK 由来の-71.3 ppm に 19F シグナルが確認された。同様に miRNA27a と miRNA200a が存在する場合には OHVK 由来の-70.6 ppm と CNVK 由来の-71.3 ppm にシグナルが観察された。全ての miRNA が混在する条件下ではいずれのシグナルも確認された事から、光照射後の 19F シグナルから標的 miRNA の存在を確認することができることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Nakamura Shigetaka, Takashima Yasuharu, Fujimoto Kenzo, Multiplexed detection of nucleic acids using 19F NMR chemical shift changes based on DNA photocross-linking of 3-vinylcarbazole derivatives, *Organic & Biomolecular Chemistry* 査読あり, 16, 2018, 891-894.

DOI: 10.1039/C7OB03008H

〔学会発表〕 (計 4 件)

① Shigetaka Nakamura, Yasuharu Takashima, Kenzo Fujimoto, Multiplexed detection of nucleic acids using 19F NMR chemical shift based on DNA photo-cross-linking of 3-vinylcarbazole derivatives, 第 99 春季化学会年会、2019 年 3 月

② Shigetaka Nakamura, Hayato Kawabata, Daisuke Maeda, Kenzo Fujimoto, Photo-triggered double duplex invasion DNA using ultrafast photo-cross-linker, ISNAC2018, 2018 年 11 月

③ Shigetaka Nakamura, Hung Yang, Chihiro Hirata, Florian Kersaudy, Kenzo Fujimoto, Analysis of DNA B-Z transition by 19F NMR using fluorine labeled ODN probe, ISNAC2017 2017 年 11 月

④ 中村重孝, 前田大輔, 川端勇人, 藤本健造, ゲノム DNA の光操作に向けて: 光をトリガーとした Double duplex invasion DNA の構築, 第 28 回バイオ・高分子シンポジウム, 2017 年 7 月

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。