

2024年度（第49回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	青 山 学 院 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	見えそうで見えない核酸微小環境を可視化する		理 学 (理工系)
キ ー ワ ー ド	①プロトン化 ②核酸高次構造 ③ラマン分光法 ④修飾核酸塩基 ⑤核酸医薬品 ⑥核酸構造イメージング		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 邊 一 仁	理 工 学 部	教 授	研究代表者 統括、核酸合成、生化学実験、論文作成

○研究分担者

[illegible]

見えそうで見えない核酸微小環境を可視化する

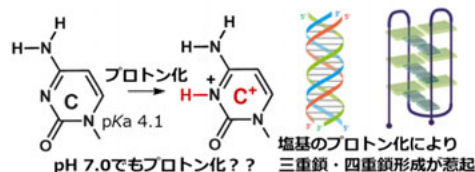
1. 研究の目的

DNA や RNA といった核酸は、多様な高次構造を形作り、機能を発現する。しかし、この高次構造の形成過程は、分かっているようでわかっていない。その最たるものが核酸塩基上で生じるプロトン化である。一般的にプロトン化は、化合物が示す pK_a よりも、化合物周囲の液性 (pH) が酸性側にあるときに生じる。例えば、シトシン塩基の pK_a は約 4.1 であるため、pH が 4 より小さい時にプロトン化される。しかし、DNA オリゴマー中のシトシン塩基は、pH6 や 7 といった中性に近い条件であってもプロトン化されるものとされ、同塩基のプロトン化に関わる高次構造 (三重鎖形成や四重鎖形成) に関わる。

しかし、本当に中性条件下でシトシン塩基はプロトン化しているのか？という疑問は尽きない。というのは、実際にそのプロトン化は直接観測されたわけではなく、高次構造を形成しているという事実から、プロトン化の発生を推測しているにすぎないからである。一般に有機化合物のプロトン化は、NMR や吸収スペクトル等の分光学的計測を用いて追跡されてきた。しかし、DNA オリゴマーのように巨大な分子では、既存の分光学的手法では得られるスペクトルが煩雑になり、特定塩基のプロトン化を直接観測することは不可能である。ましてや、細胞内などの混在系ではさらにスペクトルは解析が困難となり、プロトン化のような小さな化学反応の可視化は現状できない。

こうした現状を打破するため、本研究では、プロトン化の詳細を追跡可能なラマン散乱光計測による核酸構造解析システムを開発することを目指した。

具体的には、ラマンタグを備えたシトシン塩基を開発し、DNA オリゴマー上でのプロトン化を調査する。まずは、*in vitro* でのプロトン化検出を実現した後に、生きた細胞内での核酸上のプロトン化を原子レベルの精密さで直接観測することを最終的な目的とした。

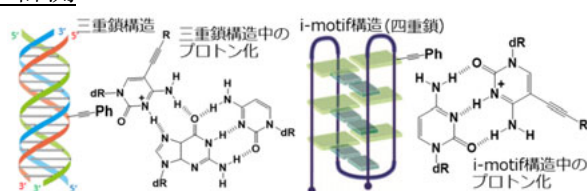


2. 研究の計画

本研究 1 年目 (2024 年度) は、ラマンタグ (置換アセチレン基) で修飾したシトシン塩基を開発するとともに、DNA 鎖 (オリゴマー) へと導入することとした。アセチレン基は 2200cm^{-1} 付近に混在系でも強く識別し易いシグナルを与える。また、シグナル増強に向けた化学修飾を進め、高感度にプロトン化を検出するシステムを確立することを目指した。具体的な研究項目を以下に示した。

1 ラマンタグ修飾 DNA オリゴマーの合成とラマン計測

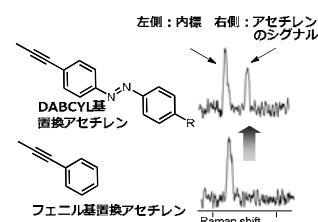
アセチレン基 (ラマンタグ) を備えた核酸塩基を高収率で合成する手法を確立することを検討した。続いて、ホスホロアミダイト法を用いて同官能基を備えた核酸塩基を DNA 鎖内に導入することを試みた。以下の核酸塩基および DNA 鎖の合成を検討した。①ラマンタグを備えた核酸塩基を鎖中



②プロトン化が関与する DNA 高次構造形成鎖のシトシン塩基 この他に、関連する DNA オリゴマーの塩基部に必要に応じてラマンタグを導入することとした。まずは、合成を行い、合成が完了した核酸塩基および DNA オリゴマーについてラマンスペクトルを計測し、プロトン化を追跡可能か調べた。

2 シグナル増強官能基の開発：

ラマン散乱光を計測する際に、シグナル受信を妨害する現象は化合物の蛍光発光である。ラマン散乱光は微弱であり、蛍光発光が少し生じるだけで、散乱光は観測しづらい。そこで、蛍光の消光色素にラマンタグを導入した機能性官能基を設計・合成することを計画した。特に、可視光領域に吸収帯をもつ消光色素は、前期共鳴ラマン散乱を誘起するた



め、強いシグナル発信を実現可能である事実に基づき、DABCYL 基を導入したラマンタグを開発することとした。

3. 研究の成果

2024 年度は研究計画に基づき、以下の 2 つのテーマを進め、それぞれ成果を得た。

1 ラマンタグ修飾 DNA オリゴマーの合成とラマン計測

本テーマでは、ラマン分光顕微鏡によって明瞭に観察可能なアセチレン基をラマンタグとして備えたシトシン誘導体 (Methoxy phenyl acetylene cytosine; $MPAC$) を設計した。 $MPAC$ の合成は、ヨードシチジン誘導体を出発物質とし、菌頭反応と続く保護基の除去によって進めた。次に、合成した $MPAC$ からのラマン散乱光を計測し、pH に対するスペクトル変化を調べた。532nm の励起光を用いて $MPAC$ のラマンスペクトルを測定したところ、 2218 cm^{-1} にアセチレンに由来するシグナルが観測された。次に、酸性条件下 (pH 2.0) で同様に $MPAC$ のスペクトルを測定したところ、シグナルが 2225 cm^{-1} にシフトした。また、同じ条件で吸収スペクトルを測定したところ、pH 変化に応じてスペクトルが変化した。これらの結果は、 $MPAC$ のプロトン化をラマンスペクトルで追跡できたことを示している。

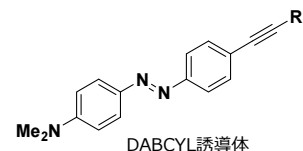
次に、ホスホアミダイト法を用いて、 $MPAC$ を DNA オリゴマーに導入した。DNA 鎖の同定は MALDI-TOF MS を用いて行った。得られた DNA オリゴマーについて、ラマンスペクトルを測定したところ、酸性環境下で単量体の場合と同様のシグナルシフトが確認されたことから、 $MPAC$ を含む DNA でのプロトン化追跡が可能であることが示唆された。そこで次に、三重鎖を形成する DNA オリゴマー ($MPAC$ -T-CG6) に $MPAC$ を導入し、三重鎖形成に伴うラマンスペクトルの変化を追跡した (下図参照)。 $MPAC$ -T-CG6 に三重鎖を形成するヘアピン型 DNA (HP-CG6) を添加し、ラマンスペクトルを測定したところ、pH 7.0 の条件では三重鎖を形成しない結果、シグナルは 2217.6 cm^{-1} に現れた。一方、pH 5.0 の酸性条件にし、ラマンスペクトルを測定したところ、2 本の鎖は三重鎖を形成し、ラマンシグナルが 2220.3 cm^{-1} へと約 3 cm^{-1} シフトした。これらの結果から、 $MPAC$ を含む DNA はラマンスペクトルを用いることでプロトン化を経由した三重鎖形成を追跡可能であることがわかった。



(a) $MPAC$ の化学構造 (b) $MPAC$ を含む DNA 鎖の配列および三重鎖構造 (c) $MPAC$ 含有 DNA 三重鎖のラマンスペクトル (中性条件：青線、酸性条件：赤線)

2 シグナル増強官能基の開発：

ラマン散乱光の強度は極めて弱く、プローブの高感度化が不可欠であることから、高感度化を目的として、アセチレンを備えた DABCYL 誘導体を設計し、ラマンタグとして活用することを検討した。3 段階の合成過程を経て、アセチレン基を導入した DABCYL 誘導体を合成し、ラマンスペクトルを計測した。532 nm の励起光を用いてラマン散乱光を測定した結果、アセチレン由来の強いシグナルが 2200 cm^{-1} 付近に観察された。このシグナルは、シグナル強度は DABCYL 基を導入していない参照化合物と比較すると、約 4.4 倍増強した。この結果は、DABCYL 誘導体がアセチレン基のラマン信号の高感度化に有効であることを示している。



4. 研究の反省・考察

2024 年度はラマンタグとなる新たな候補化合物が見つかった。しかし、上記 2 に示したシグナルの高感度化については、4 倍程度とあまり大きな感度増強は見られなかったため、改善を進めていく。現時点では、金ナノ粒子等の DNA 鎖への導入によるさらなる高感度化を目指す予定であ

る。チオール基を備えた人工 DNA を合成し、金ナノ粒子表面に DNA 鎖を導入したいと考えている。また、三重鎖におけるプロトン化が検出し得ることが示されたので、次に、i-motif といった四重鎖構造のプロトン化検出を進めていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①ジメトキシフェニルアセチレン基をラマンタグとして備えた人工核酸の合成とpH環境応答性 渡邊 理央・石田 るな・板谷 亮汰・西原 達哉・田邊 一仁 第105日本化学会春季年会 関西大学

②標的依存性i-motifを備えた四面体DNAの開発と応用 黒住結生・西原達哉・田邊一仁 第105日本化学会春季年会 関西大学

(3) 出版物

なし