2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

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	研 究 分 野	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		

〇研究代表者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
田　邉　一　仁	青　山　学　院　大　学 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

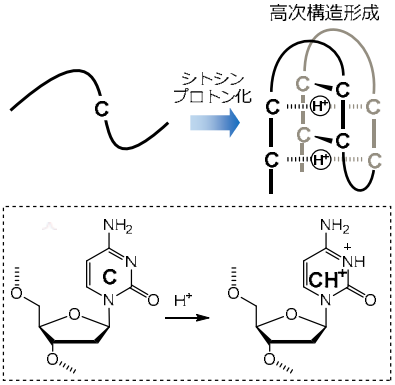
〇研究分担者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
武　　内　　亮	青　山　学　院　大　学 理　　工　　学　　部	教　　授	複素環合成実験、論文作成
鈴　　木　　正	青　山　学　院　大　学 理　　工　　学　　部	教　　授	分光測定実験、論文作成

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 は、塩基配列そのものに基づく情報担体としての役割に加え、周囲の環境条件に応じて多様な高次構造を形成し、その構造変化を通じてさまざまな機能発現に関与している。特に、三重鎖構造や i-motif 構造は、シトシン塩基のプロトン化を起点として pH 応答的かつ可逆的に形成されることが知られており、核酸構造の動的変化を理解する上で重要な研究対象である。これらの構造では、単に塩基配列や相補鎖形成だけでなく、特定塩基の化学状態、すなわちプロトン化の有無が構造形成の鍵を握る。そのため、核酸中のどのシトシンが、どのような環境下で、どのタイミングでプロトン化されるのかを明らかにすることは、高次構造の形成機構を分子レベルで理解するために不可欠である。



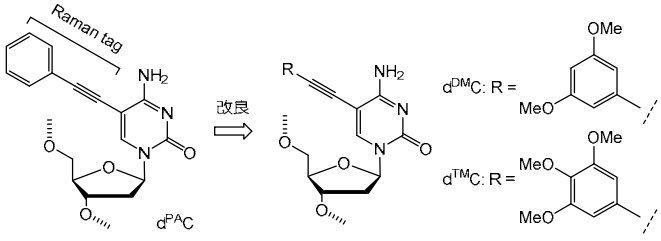
一般に、化合物のプロトン化は、その化合物が本来持つ pK_a 値と周囲の pH によって支配される。通常のシトシン塩基の pK_a は約 4.1 であり、シトシン単量体は pH 4 以下の酸性条件でプロトン化が進行すると考えられる。一方で、DNA オリゴマー中に存在するシトシン塩基は、pH 6〜7 程度の中性に近い条件下においてもプロトン化すると報告されており、この異常ともいえるプロトン化挙動が、三重鎖や i-motif などの高次構造形成に深く関与すると考えられている。すなわち、DNA 上では、単独のシトシンでは通常プロトン化が起こりにくい環境においても、周囲の塩基配列、塩基対形成、スタッキング相互作用、局所的な立体環境などの影響により、プロトン化が促進されている可能性がある。しかし、このようなプロトン化が高次構造形成のどの段階で生じるのか、また構造形成を誘導する原因なのか、あるいは形成後に安定化へ寄与する結果なのかについては、十分に解明されていない。

これまで、化合物のプロトン化状態は、NMR、紫外可視吸収スペクトル、蛍光測定などの分光学的手法を用いて解析されてきた。しかし、DNA オリゴマーのような巨大かつ複雑な分子では、得られるスペクトルが多数の塩基や骨格構造に由来する情報を含むため、特定のシトシン塩基のみのプロトン化を直接かつ選択的に観測することは極めて困難である。さらに、生細胞内のように多種多様な分子が共存する環境では、スペクトルは一層複雑化し、プロトン化のような微小な化学反応を高い選択性で可視化することは、現状では困難である。

そこで本研究では、プロトン化の有無を高感度かつ選択的に追跡可能な、ラマン散乱光計測に基づく核酸構造解析システムの開発を目指す。具体的には、ラマンタグを導入したシトシン塩基を新たに設計・合成し、DNA オリゴマー中に組み込むことで、特定塩基のプロトン化状態をラマンシグナルの変化として検出する。まずは in vitro 条件下において、pH 変化に伴うラマンタグ修飾シトシンのプロトン化挙動を詳細に解析し、高次構造形成との相関を明らかにする。その後、細胞内環境における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技術へと発展させる。これにより、従来の手法では捉えることが困難であった核酸高次構造形成の初期過程や動的変化を可視化し、核酸機能発現の分子機構解明に貢献することを目指す。

2. 研究の計画

シトシン塩基上で進行するプロトン化を検出するにあたり、これまでにフェニルアセチレン基をラマンタグとして導入したシトシン誘導体($d^{PA}C$)を開発してきた。$d^{PA}C$ は 2200 cm^{-1} 付近に強いシグナルを示す一方、そのシグナルはプロトン化によってシフトすることが確認できた。しか

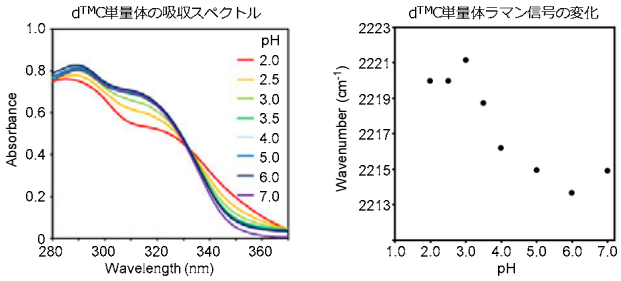


し、$d^{PA}C$ の pK_a は 2.8 程度と算出され、通常のシトシン塩基の pK_a(4.1)と比較するとより強い酸性条件下でプロトン化することがわかった。そこで、2025 年度は、通常のシトシンにより近い条件で、プロトン化し得る誘導体の開発を進めた。具体的には、ラマンタグとなるフェニルアセチレン基の芳香環上に、電子供与基を導入し、フェニルアセチレン基の電子吸引性をより弱め、合成したシトシン誘導体の pK_a 値をより高める工夫を施した。電子供与性のメトキシ基を 2 つ導入した $d^{DM}C$ および 3 つ導入した $d^{TM}C$ を設計・合成し、それら誘導体の pK_a 値を計測するとともに、DNA に導入し、プロトン化を観測できるか検討した。

3. 研究の成果

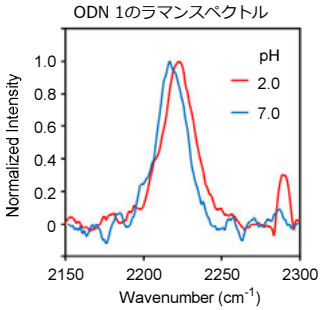
$d^{DM}C$ および $d^{TM}C$ 単量体は、5-iodo-2'-deoxycytidine を出発物質とし、対応するフェニルアセチレン誘導体との薗頭カップリング反応により、それぞれ合成した。

続いて、得られた $d^{DM}C$ および $d^{TM}C$ 単量体が、プロトン化を起こし得るか検討した。リン酸緩衝液中での各 pH における UV スペクトルを測定したところ、$d^{DM}C$ および $d^{TM}C$ それぞれについて、pH 変化に伴うスペクトル変化が観測された。このスペクトル変化には等吸収点がみられ、酸性条件にするに伴い、310 nm 付近の吸収が減少し、340nm の吸収が増大した。こうした吸収スペクトルの長波長化は、無置換シトシン単量体のプロトン化によっても生じることが報告されていたことから、この吸収の変化は、$d^{DM}C$ および $d^{TM}C$ のプロトン化に由来するものと結論付けた。また、この吸収スペクトルの 320 nm 付近の吸光度変化から、各 pH におけるプロトン化体および非プロトン化体の存在比を算出し、pK_a を求めたところ、$d^{DM}C$ および $d^{TM}C$ の値はそれぞれ 3.0、3.8 と算出された。これらの結果から、$d^{TM}C$ の方が、無置換シトシンに近いプロトン化特性を持つことがわかった。



次に、各単量体について、さまざまな pH 条件下でラマンスペクトルを測定し、プロトン化を追跡し得るか調べた。まず、532 nm の励起光を照射したところ、2200 cm^{-1} 付近に、$d^{DM}C$ と $d^{TM}C$ 上に導入したアセチレン基の伸縮振動に起因するバンドが観測された。このバンドは、酸性側で明確に長波数側へシフトすることが確認された。対応する pH には各単量体で違いが見られ、$d^{DM}C$ ではおよそ pH 3.0、$d^{TM}C$ ではおよそ pH 4.0 付近でピーク位置の変化が観測された。pH 変化によるラマンスペクトルの変化は、吸収スペクトル変化と一致したことから、この結果はシトシン塩基上で進行するプロトン化をラマンスペクトルで検出し得たことを示すと判断した。

上述のように、$d^{TM}C$ は無置換シトシンと同じ程度の条件でプロトン化することがわかったので、次に、$d^{TM}C$ を DNA オリゴマーに導入した。$d^{TM}C$ の 5'側水酸基を DMTr 化した後、通常のホスホロアミダイト法を用いて 19 量体の DNA オリゴマー(ODN 1)を合成した。得られた ODN 1 は HPLC を用いて精製し、吸収スペクトルおよび MALDI-TOF MS にて修飾塩基の導入を確認した。なお、ODN 1 は単純なオリゴマーの中央に $d^{TM}C$ を導入した一本鎖 DNA である。



ODN 1: 5'-d(TTT TTT TTT T^{TM}CT TTT TTT T)-3'

合成した ODN 1 を用いてオリゴマーでのプロトン化が追跡できるか検討した。ラマンスペクトルを測定したところ、DNA オリゴマーでもアセチレン由来の強いシグナルが 2220cm^{-1} 付近に観測できた。ODN 1 のラマンスペクトルを pH 2.0 および 7.0 で測定したところ、モノマーと同様に、酸性条件下で高波数側にシフトすることがわかった。すなわち、シトシン塩基上のプロトン化を DNA オリゴマーにおいても追跡できることが示された。

4. 研究の反省・考察

2025 年度は、ラマンタグ部位を改良することによって、より通常のシトシンに近い環境でプロトン化を起こす誘導体の開発に成功した。合成した $d^{DM}C$、$d^{TM}C$ については、現在も DNA オリゴマーへの導入を進めており、各種 pH 条件下でのラマン測定、および三重鎖構造や i-motif 構造におけるプロトン化の検出を早急に進めていく予定である。また、細胞内や細胞に類似す

るような各種生体分子が混在する実験系にて、プロトン化を検出できるのか、検討していく予定である。また、2024 年度に作成した三重鎖構造のプロトン化検出システムおよび高感度化システムの活用も進める。

5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)口頭発表

①ラマンタグを備えたシトシン誘導体の設計とpH環境応答性の制御　渡邉理央・西原達哉・田邉一仁　第106日本化学会春季年会　日本大学

②反応性分子を標的としたアルキン含有プローブの開発と組織転写TLCへの応用　山口翔吾・永野舜也・西原達哉・田邉一仁　第106日本化学会春季年会　日本大学

(3)出版物

なし