

# フッ素原子を導入した DNA プローブの合成と $^{19}\text{F}$ NMR を用いた核酸高次構造解析への応用

## 造解析への応用

### 1. 緒言

DNA はプログラム可能な自己集合特性を持ち、2次元、3次元の高次構造を形成する機能性分子である。DNA が形作る高次構造は、DNA が遺伝子の担い手としてあるいは治療薬として駆動するために、生体内で非常に重要な役割を果たしている。しかし、DNA の構造を検出し同定する方法は少なく、UV スペクトル、CD スペクトル、ゲル電気泳動など、高次構造が混在すると明確な識別が困難で定量性をもたない既存手法に頼っているのが現状である。

NMR は様々な生体高分子の構造を定量的に検出し得る有用な手法として知られる。<sup>1,2</sup>とりわけ、 $^{19}\text{F}$  NMR は、①生体内にフッ素原子が存在しない ②感度がプロトンの約 83%と高いといった特長を持ち、複雑な組成をもつ生体内でも高感度に調べたい物質を検出できることから、幅広く活用されている。本研究では、DNA 高次構造形成を  $^{19}\text{F}$  NMR で追跡する分子システムの確立を目的として、 $^{19}\text{F}$  でラベルした DNA を合成し、その機能を解析した。

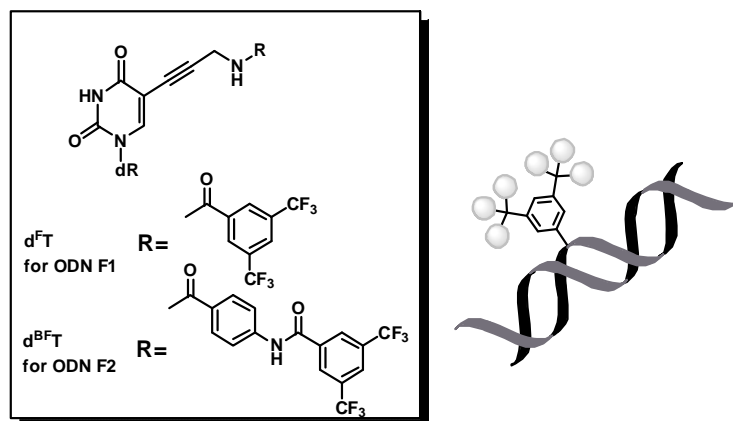
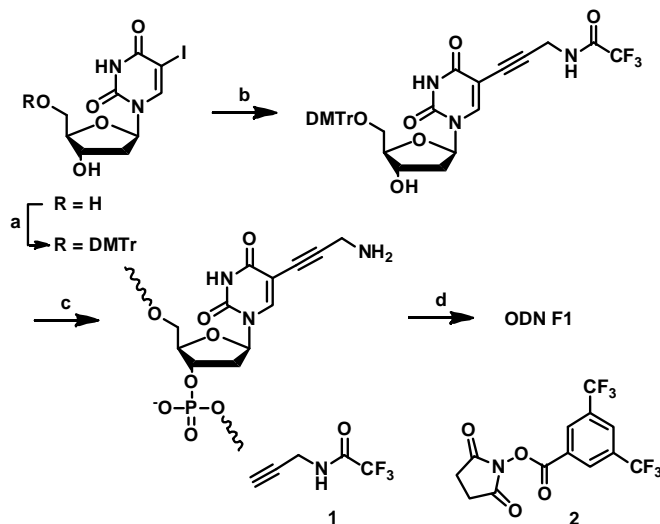


Figure 1. The structure of DNA probes for monitoring of the formation of DNA higher order structures.

### 2. 結果及び考察

#### 2.1. DNA プローブの分子設計と合成

本研究ではまず、等価な 6 個の  $^{19}\text{F}$  原子をもつ DNA オリゴマー(ODN F1)を高次構造検出用プローブとして設計した(Figure 1)。剛直性をもつ三重結合を介して  $^{19}\text{F}$  含有ユニットをチミジン上に配置することで  $^{19}\text{F}$  NMR シグナルが周辺環境に鋭敏に応答することを期待した。合成ルートを Scheme 1 に示す。2'-デオキシ-5-ヨードウリジンの 5'位をジメトキシトリチル基で保護した後、菌頭カップリング反応によりトリフルオロアセチル基で保護したプロパルギルアミン **1** と縮合させた。続いて、アミダイト化した後に DNA 合成機により DNA オリゴマーへと導いた。アンモニア処理により生成する鎖内アミノ基とスクシンイミジルエステル **2** をカップリングさせることにより目的とする DNA オリゴマーODN F1 を合成した(Table 1)。なお、ODN F1 の生成は ESI-MASS により確認した。



Scheme 1. Reagents (a) DMTrCl, DMAP, Pyridine, 53% (b) **1**, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, DMF, 54% (c) *N,N*-Diisopropylmethylphosphonamidic chloride, DIEA and then DNA auto synthesizer (d) **2**, NaHCO<sub>3</sub>.

Table 1. Oligodeoxynucleotides for the detection of DNA structures using ODN F1

ODN F1: 5'-ACGAGT <sup>F</sup> TCGCAT-3'	ODN 1: 5'-ATGCGAACTCGT-3'
ODN 2: 5'-ATGCGAACTCGT-3'	ODN 3: 5'-ATGCGACTCGT-3'

## 2.2. $^{19}\text{F}$ NMRによるDNAの二重鎖形成追跡

合成した ODN F1 を用いて DNA の二重鎖形成を  $^{19}\text{F}$  NMR で追跡した(Figure 2)。まず、ODN F1 一本鎖の  $^{19}\text{F}$  NMR を測定したところ、-63.7 ppm にシグナルが生じた。続いて、ODN F1 と完全相補的な塩基配列を持つ DNA 鎖(ODN 1)を加えて  $^{19}\text{F}$  NMR を測定したところ、0.4 ppm 低磁場側に新たなシグナルが生じた。シグナルの強度は添加した ODN 1 の物質質量に対応して変化したことから、新たに生じたシグナルは DNA 二重鎖構造の形成に由来するシグナルであることが分かった。

## 2.3. 分子モデリングによる構造の推定

生体分子の構造シミュレーションに広く用いられる分子動力学法 AMBER(Assisted Model Building with Energy Refinement)を用いて ODN F1 が形成する二重鎖構造を推定した。Figure 3 に示したように、完全相補的な二重鎖(ODN F1/ODN 1)の場合、 $^{\text{T}}$ と相補鎖上のアデニン塩基が対を形成するため、 $^{19}\text{F}$  含有ユニットは DNA 二重鎖中の Major Groove に沿う形で配置された。ODN F1 一本鎖は水素結合等の分子間相互作用の影響がなく自由な構造を取り得る一方で、相補鎖との塩基対形成が進む二重鎖では構造が固定される。その結果、 $^{19}\text{F}$  含有ユニット周辺の磁気的環境が大きく変わり、一本鎖構造と二重鎖構造間で  $^{19}\text{F}$  NMR ケミカルシフトが異なったものと考えられる。

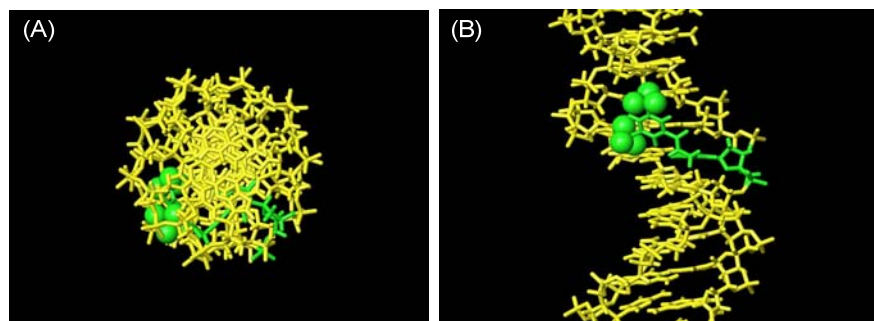


Figure 3. Molecular modeling of the simulated conditions of duplex (ODN F1/ODN 1). The model was optimized by AMBER\* force field in water using Macro Model. Top view(A) and side view(B) are shown.

## 2.4. DNAプローブの局所構造認識機能

前々項に示したように DNA 二重鎖形成を  $^{19}\text{F}$  NMR で追跡できることがわかったので、次にバルジ構造とミスマッチ構造の検出を試みた(Figure 4)。まず、アデニンの一塩基バルジ構造を形成する ODN 2 を ODN F1 に添加して NMR を測定したところ、ODN F1/ODN 1 から成る二重鎖と比較して 0.05 ppm 低磁場にシグナルがシフトした。また、G-T ミスマッチを形成する ODN 3 を添加したところ、 $^{19}\text{F}$  NMR シグナルはさらに 0.15 ppm 低磁場シフトした。さらに、ODN 1、ODN 2、ODN 3 の混合物を ODN F1 に添加したところ、それぞれの構造に対応したシグナルが 3 本観測され

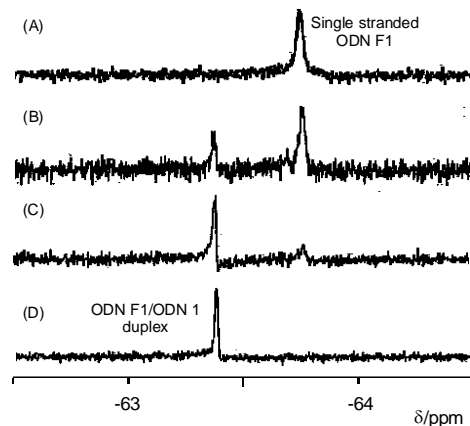


Figure 2.  $^{19}\text{F}$  NMR spectra of ODN F1 in the presence of ODN 1. (A) 50  $\mu\text{M}$  ODN F1 (B) 50  $\mu\text{M}$  ODN F1 + 17  $\mu\text{M}$  ODN 1 (C) 50  $\mu\text{M}$  ODN F1 + 34  $\mu\text{M}$  ODN 1 (D) 50  $\mu\text{M}$  ODN F1 + 50  $\mu\text{M}$  ODN 1.

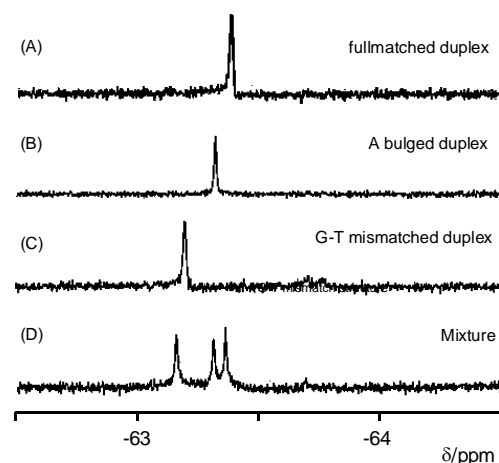


Figure 4.  $^{19}\text{F}$  NMR spectra of ODN F1 in the presence several oligonucleotides. (A) fullmatched duplex (ODN F1 + ODN 1) (B) duplex with A bulge (ODN F1 + ODN 2) (C) duplex with G-T mismatch (ODN F1 + ODN 3) (D) Mixture of duplexes (ODN F1 + ODN 1 + ODN 2 + ODN 3).

た。これらの結果から、ODN F1 は混在系であっても DNA がとる特定の構造を検出し得るプローブとなることが明らかとなった。続いて、他のミスマッチ構造(C-T)並びにバルジ構造(G, C, T バルジ)をもつ二重鎖についても同様の手法を用いて NMR による検出を試みた。しかしながら、これら高次構造中の<sup>19</sup>Fの NMR シグナルは、完全相補的二重鎖 ODN F1/ODN 1 のシグナルと重なり、それぞれを識別することは困難であった。DNA 構造の識別能を向上させるためには、各構造に対応した高度なプローブ設計が必要であることがわかった。

## 2.5. 細胞 lysate 中における DNA の構造解析

フッ素原子は生体内においても明瞭なシグナルを与え得る。そこで、細胞内での DNA 高次構造検出のモデル実験として、細胞 lysate 中の ODN F1 の二重鎖形成を NMR で追跡した。ヒト肺癌細胞 A549 から細胞溶解試薬を用いて lysate を調製した後、ODN F1 および ODN 1 を加え、NMR を測定した。Figure 5 に示したように ODN F1 のみの場合と比べて ODN F1/ODN 1 二重鎖のシグナルは 0.4 ppm 低磁場にシフトした。これらのことから、ODN F1 を用いることにより、細胞内であっても核酸の高次構造形成を調べることが可能であることが示唆された。

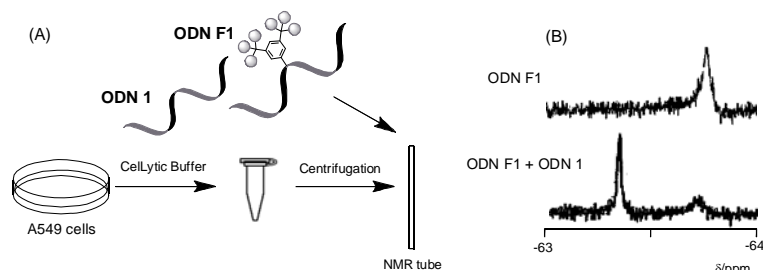
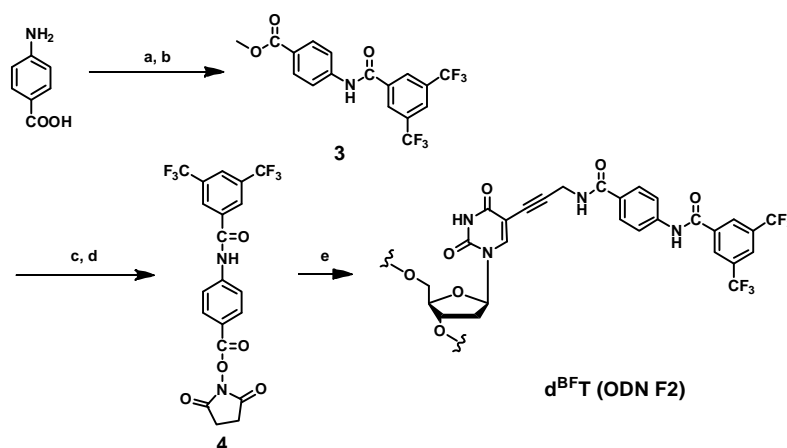


Figure 5. (A) Experimental procedure for detection of DNA structures in cell lysate. (B) <sup>19</sup>F-NMR spectra of single stranded ODN F1 and ODN F1/ODN 1 duplex in cell lysate.

## 2.6. 構造を改良した DNA プローブのデザインと合成

以上のように、ODN F1 は数種類の DNA 局所構造を <sup>19</sup>F NMR で検出し得ることがわかった。しかし、検出可能な構造は、一本鎖、完全相補的二重鎖、A バルジ、G-T ミスマッチの 4 種に留まり、汎用性の高い DNA プローブとは言い難い。そこで、多様な構造を判別できる分子プローブへの改良を目指し、新たに <sup>19</sup>F 含有ユニットとチミジン塩基間にベンゼン環を挿入した ODN F2 をデザインした。芳香環を挿入することで、ミスマッチやバルジ構造が形成される場合でも芳香環と塩基間の π-スタッキング効果により構造が安定化することを期待した。すなわち、完全相補鎖の存在下では <sup>19</sup>F T はアデニンと塩基対を形成するため、<sup>19</sup>F 含有ユニットは Major Groove 内に配置される一方、ミスマッチやバルジ構造を形成する場合は、新たに導入された芳香環と周辺塩基が相互作用するため <sup>19</sup>F 含有ユニットは塩基部近傍に配置される。従って、<sup>19</sup>F T が受ける磁気的環境が各高次構造間で明瞭に変わり、より詳細に DNA 局所構造を検出できると考えた。



Scheme 2. Reagents (a) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MeOH, 88% (b) 3,5-bis(trifluoromethyl)benzoic acid, EDCI, HOBt, DMF, 57% (c) NaOH, THF, MeOH, 86% (d) NHS, EDCI, HOBt, DMF, 47% (e) amino modified ODN, NaHCO<sub>3</sub>.

Table 2. Oligodeoxynucleotides for detection of DNA structures using ODN F2

ODN F2: 5'-ACGAGT <sup>19</sup> FTCGCAT-3'	ODN 4: 5'-ATGCGTACTCGT-3'
ODN 5: 5'-ATGCGAGACTCGT-3'	ODN 6: 5'-ATGCGCACTCGT-3'
ODN 7: 5'-ATGCGCACTCGT-3'	ODN 8: 5'-ATGCGATACTCGT-3'

ODN F2 の合成ルートを Scheme 2 に示す。*p*-アミノ安息香酸を出発原料とし、カルボン酸をメチルエステルに変換した後、ピストリフルオロメチル安息香酸と縮合した。得られた **3** を加水分解した後、活性エステル **4** へと導いた。続いて、**4** とアミノ基を持つ DNA オリゴマーをカップリングさせることにより目的の DNA プローブ (ODN F2) を得た。なお、ODN F2 の生成は ESI-Mass によって確認した。

## 2.7. プローブ ODN F2 による DNA 高次構造の検出

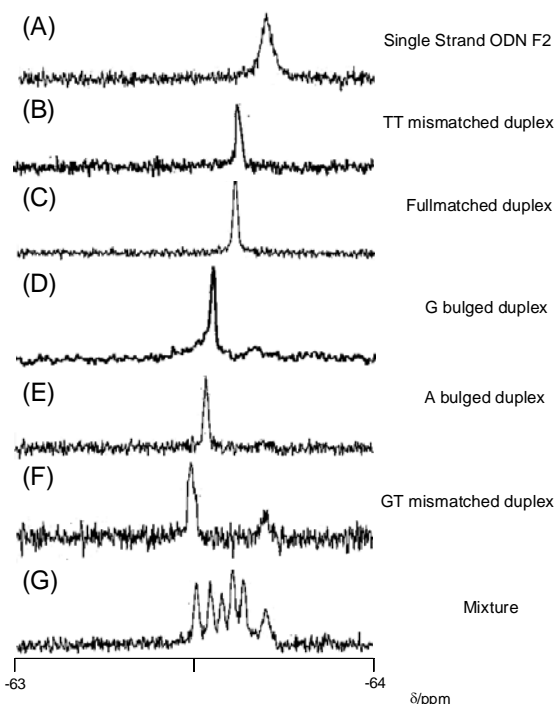
得られた ODN F2 の  $^{19}\text{F}$  NMR を各種相補鎖の共存下測定した。Figure 6 に示したように、一本鎖、完全相補的二重鎖、ミスマッチ (T-T, G-T) 構造、さらにバルジ構造 (G, A) の 6 種類の高次構造をケミカルシフト変化によって識別できた。ODN F2 が形作る二重鎖構造を検証するために、二重鎖解離温度 ( $T_m$ ) を測定し、ODN F1 の  $T_m$  値と比較した (Table 3)。その結果、ODN F2 が形成する二重鎖は全て、ODN F1 が形成する二重鎖より安定化した。とりわけ、ミスマッチ構造、バルジ構造を形成した場合は、最大  $10\text{ }^\circ\text{C}$  程度の大幅な  $T_m$  の上昇がみられたことから、ODN F2 に新たに導入されたベンゼン環は周辺塩基と  $\pi$ -スタッキングし、二重鎖構造を安定化したことが示唆された。すなわち、各種二重鎖間で  $^{19}\text{F}$  の磁気的環境が明らかに変わり、詳細な構造識別が達成されたことがわかった。

## 3. 結言

本研究では、 $^{19}\text{F}$  原子でラベル化された DNA プローブを合成し、 $^{19}\text{F}$  NMR によって DNA 構造を検出する分子システムを構築した。チミジン誘導体にアセチレン部を介して  $^{19}\text{F}$  含有ユニットを導入した ODN F1 は、一本鎖、完全相補的二重鎖、A バルジ構造、G-T ミスマッチ構造においてそれぞれ異なるケミカルシフトをもつ  $^{19}\text{F}$  NMR シグナルを与えた。ODN F1 を改良し、ベンゼン環を構造内に挿入した ODN F2 は、上述の高次構造に加えて、G バルジおよび T-T ミスマッチ構造の計 6 種類の高次構造を識別できた。本分子プローブは、DNA 局所構造を混在系であっても容易に検出する。今後、生きた細胞内での核酸構造検出への応用が期待される。

## 参考文献

- 1) Tanabe, K.; Sugiura, M.; Nishimoto, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6690–6694.
- 2) Tanabe, K.; Nishimoto, S. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15982–15983.



**Figure 6.**  $^{19}\text{F}$  NMR spectra of ODN F2 in the presence several oligonucleotides. (A) Single Strand ODN F2 (B) duplex with T-T mismatch (ODN F2 + ODN 4) (C) fullmatched duplex (ODN F2 + ODN 1) (D) duplex with G bulge (ODN F2 + ODN 5) (E) duplex with A bulge (ODN F2 + ODN 2) (F) duplex with G-T mismatch (ODN F2 + ODN 3) (G) Mixture of duplexes (ODN F2 + ODN 1 + ODN 2 + ODN 3 + ODN 4 + ODN 5).

**Table 3.** Melting Temperatures ( $T_m$ ) of ODN F1/ F2/ normal DNA for various local structures

		ODN F1	ODN F2	normal DNA
fullmatched	(ODN 1)	51.5	56.1	54.1
GT mismatched	(ODN 3)	39.5	44.8	47.5
CT mismatched	(ODN 6)	31.2	41.6	42.0
TT mismatched	(ODN 4)	31.2	41.6	42.0
A bulged	(ODN 2)	34.5	45.4	43.9
G bulged	(ODN 5)	39.6	41.6	39.6
C bulged	(ODN 7)	41.1	42.7	42.6
T bulged	(ODN 8)	41.5	42.1	42.5