

(7) サブテーマ5：有機ボロン酸誘導体による核酸センシングプローブの開発

福岡県工業技術センター

① 研究概要

工業技術センターにおけるこれまでの研究で、ピレンボロン酸、ポルフィリンボロン酸が光の照射によりDNAを効率よく切断することを見だし、特許申請を行っている。

このピレンボロン酸を遺伝子組換え分野において、遺伝子破壊や真核細胞におけるイントロン部を標的としたDNA切断による完全遺伝子の切り出し等に使用する目的で、DNA切断剤の開発を行った。ボロン酸誘導体はインターカレーターであるピレン基、ポルフィリン基と、光照射により核酸を切断するボロン酸基とから構成されており、しかも、その切断活性が糖質などのボロン酸結合性化合物の添加により容易にコントロールするという特徴を有している。

これら特徴を生かして、生体におけるDNAの転写活性制御、タンパク質翻訳活性制御さらには酵素活性制御にこれら化合物の応用が可能である。

② フェーズ I の取り組み（H9年11月～H12年3月）

②-1 目的及び目標

1) 2分子膜を用いたピレンボロン酸、ポルフィリンボロン酸の生体細胞への導入

工業技術センターの赤尾らで合成した2分子膜を用いて生体細胞へのピレンボロン酸、ポルフィリンボロン酸の導入を行う。

2) 糖異性化酵素を用いたボロン酸誘導体のDNAへの結合解離制御

グルコースホスフォイソメラーゼ等を用いグルコースとフラクトースの異性化を行うことによって、ボロン酸誘導体のDNAへの結合解離を制御する。

3) 金属を用いたボロン酸誘導体によるDNA切断能力の制御

糖類の他にボロン酸誘導体によるDNA切断能力を制御するものとして生体が利用しているマグネシウム、亜鉛等を利用してDNA切断能力の制御を行う。

②-2 研究方法及び成果

1) 2分子膜を用いたピレンボロン酸、ポルフィリンボロン酸の生体細胞への導入

ピレンボロン酸、ポルフィリンボロン酸を生体成分の認識プローブとして使用することを目的とし、生体細胞へのピレンボロン酸、ポルフィリンボロン酸の導入を行った。これら化合物は分子がマイナスにチャージしているため、そのままの状態では細胞内に導入することはできない。そこで導入方法としては、赤尾らの合成した2分子膜を用いたりポソーム法により行った。

細胞はアフリカミドリサル腎臓由来のCOS7細胞を用いた。この細胞に2分子膜表層に+荷電を有し、直径が50～100nmの球状のベシクルを形成する赤尾らの合成した2分子膜である12GP2を用いてピレンボロン酸、ポルフィリンボロン酸の導入を行った。その結果2分子膜を使用しない場合にはピレンボロン酸、ポルフィリンボロン酸が細胞表層にとどまるのに対して、2分子膜を使用した場合には細胞内に導入されることを確認した。2分子膜である12GP2を使用しない場合にはポルフィリンボロン酸が細胞表層に薄く分散されるのに対して、2分子膜である12GP2を使用した場合にはポルフィリンボロン酸が集合し、細胞内に取り込まれることを確認した。

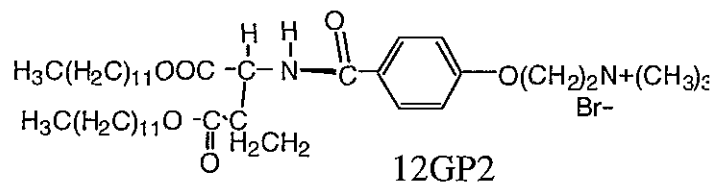


図7-1 12GP2の化学構造式

2) 糖異性化酵素を用いたボロン酸誘導体のDNAへの結合解離制御

ポルフィリンボロン酸は、これまでの我々の研究で、グルコース、フラクトースと相互作用を示すことが明らかとなっている。そこで我々は新たに、糖代謝の反応中間体として使用され、これら糖類の6位がリン酸化されたフラクトース-6-リン酸とグルコース-6-リン酸との相互作用について検討を行った。

結果を図7-2に示した。ポルフィリンボロン酸は425nmに最大吸収を示した。ここに子牛胸腺DNAを最終濃度が 1.0×10^{-6} Mになるように加えると吸光度が減少した。このことはポルフィリンボロン酸が子牛胸腺DNAと相互作用を起こしていることを示している。さらに、フラクトース-6-リン酸を最終濃度 10^{-2} Mになるように加えると、吸光度がもとの値にまで回復した。このフラクトース-6-リン酸の添加効果は、フラクトースの場合と同様であった。

さらにグルコース-6-リン酸の添加効果を検討した。結果を図7-3に示した。ポルフィリンボロン酸に子牛胸腺DNAを加え、吸光度が減少した状態にグルコース-6-リン酸を 10^{-2} M加えるとフラクトース-6-リン酸の場合とは異なり、吸光度がさらに減少した。このことはグルコース-6-リン酸の添加により、DNAとポルフィリンボロン酸がさらに強くDNAに結合したことを示している。

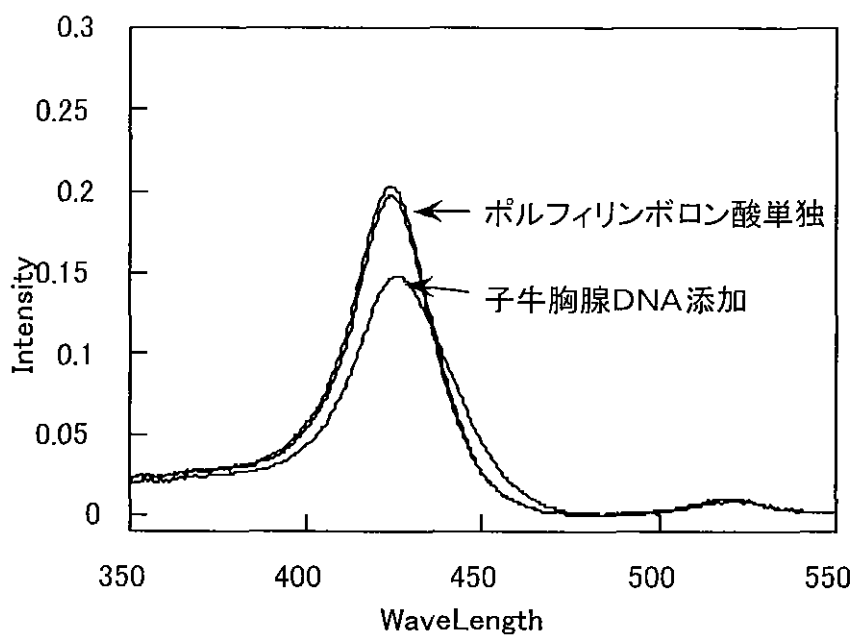


図 7 - 2 子牛胸腺 DNA、フラクトース-6-リン酸添加に伴うプロトフィリンポロン酸 (1.0×10^{-6} M) の吸光度変化; 測定温度は 25°C で行った。溶媒は 0.01% の DMSO を含む pH 6.50 の 10.0 mM リン酸緩衝液を使用した。

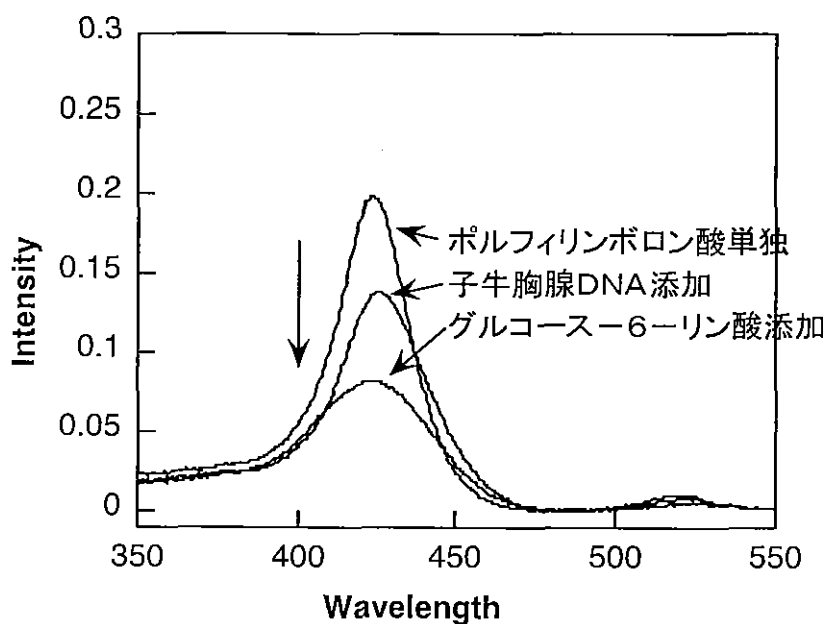


図 7 - 3 子牛胸腺 DNA、グルコース-6-リン酸添加に伴うプロトフィリンポロン酸 (1.0×10^{-6} M) の吸光度変化; 測定温度は 25°C で行った。溶媒は 0.01% の DMSO を含む pH 6.50 の 10.0 mM リン酸緩衝液を使用した。

フラクトース-6-リン酸は、グルコース 6-リン酸イソメラーゼを用いることにより、グルコース-6-リン酸へと異性化させることができる。この酵素の作用が上記のプロトフィリンポロン酸、子牛胸腺 DNA、フラクトース-6-リン酸中でも作用可能かを検討し

た。結果を図7-4に示した。その結果、酵素を作用させた場合の吸光度の変化は図7-3のグルコース-6-リン酸を加えた系のそれと類似しており本ポルフィリンボロン酸、子牛胸腺DNA、フラクトース-6-リン酸中でも酵素が作用していることが示唆された。

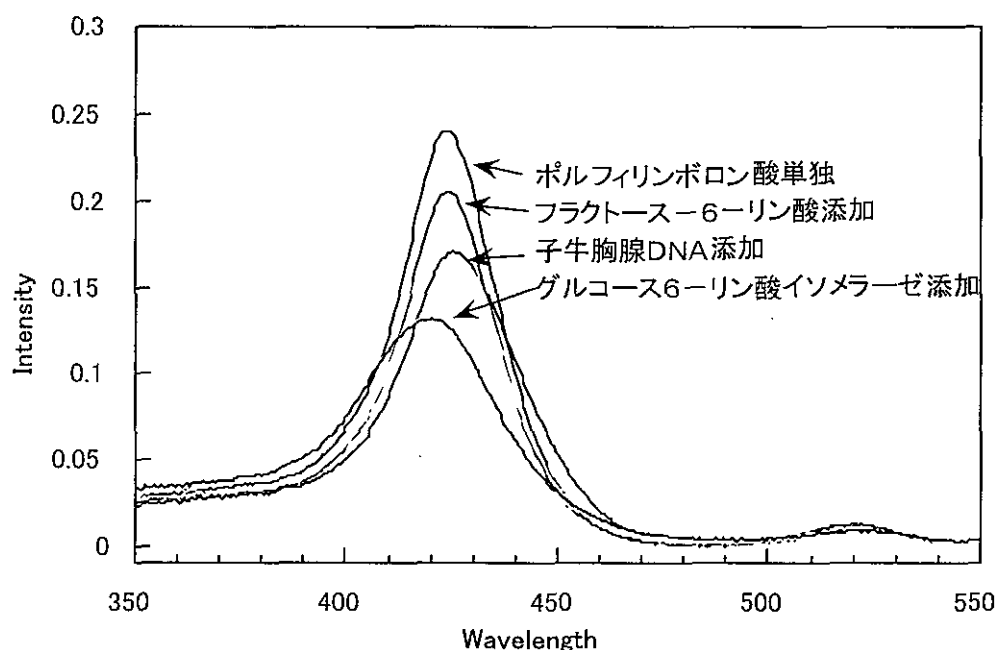


図7-4 子牛胸腺DNA、フラクトース-6-リン酸、グルコース-6-リン酸、グルコース6-リン酸イソメラーゼ添加に伴うポルフィリンボロン酸(1.0×10^{-6} M)の吸光度変化;測定温度は25℃で行った。溶媒は0.01%のDMSOを含むpH 6.50の10.0 mMリン酸緩衝液を使用した。

次にDNA切断実験を行った。

ポルフィリンボロン酸を用いたDNA切断結果を図7-5に示した。ポルフィリンボロン酸の添加(1.0×10^{-6} M)によってプラスミドDNAは切断された。一方レーンに示すように、D-フラクトースを添加するとボロン酸はボロネートアニオン状態となり、DNAの切断能力が著しく減少した。これはUVのデータから判断して、D-フラクトースの添加によってポルフィリンボロン酸がDNAから解離することに起因すると考えられた。興味深い事にD-フラクトース、ポルフィリンボロン酸、グルコース6-リン酸イソメラーゼを存在下に光を照射してもDNAの切断は起こらなかった。このことは図7-4の結果より、ポルフィリンボロン酸に結合したD-フラクトースがグルコース6-リン酸イソメラーゼによって異性化されグルコース6-リン酸へと変化し、その結果ポルフィリンボロン酸が再度DNAに結合することによって、DNAの光による切断が回復したと考えられた。このようにD-フラクトース、ポルフィリンボロン酸、グルコース6-リン酸イソメラーゼを用いることにより、DNA切断のオフからオンへの制御が可能になった。

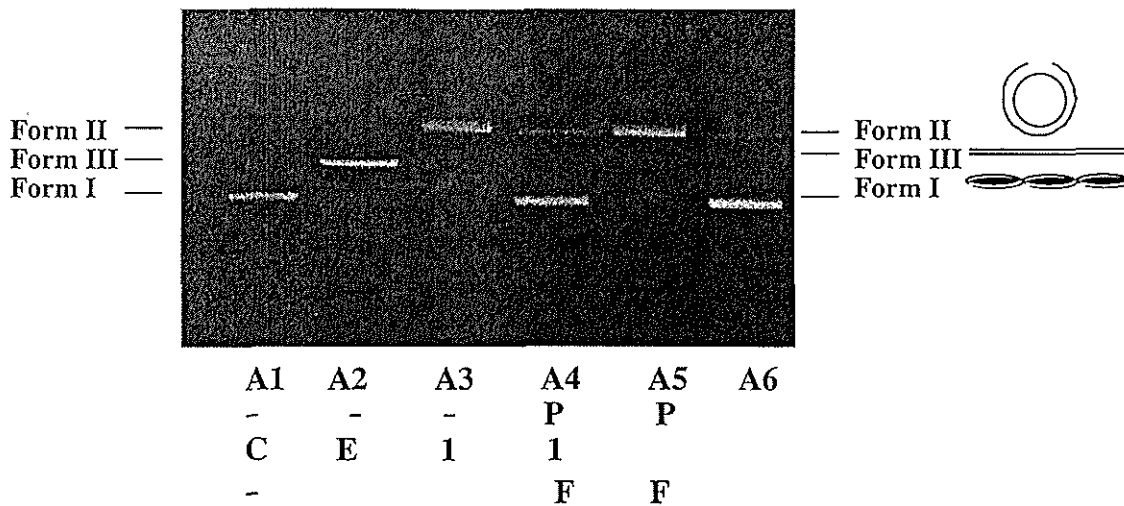


図7-5 2本鎖閉環状プラスミドDNA (form I) を基質としたポルフィリンボロン酸による光分解反応のゲル電気泳動写真

レーン A1 はDNAのみのコントロール(cDNA 濃度は 1.8×10^{-6} M) である。レーン A2 は cDNA を制限酵素 EcoRI (0.1 unit/ μ l) で処理した。レーン A3 は cDNA とポルフィリンボロン酸(濃度 1.0×10^{-6} M) 存在下に光を照射した。レーン A4 では D-フラクトース (濃度 1.0×10^{-2} M) と cDNA とポルフィリンボロン酸 存在下に光を照射した。レーン A5 では D-フラクトース (濃度 1.0×10^{-2} M) 、グルコース 6-リン酸イソメラーゼ、cDNA 、ポルフィリンボロン酸 存在下に光を照射した。レーン A6 は cDNA とポルフィリンボロン酸(濃度 1.0×10^{-6} M) 存在下に光を照射しなかった。

3) 金属を用いたボロン酸誘導体によるDNA切断能力の制御

糖類の他にボロン酸誘導体によるDNA切断能力を制御するものとして、生体が利用しているマグネシウム、マンガン等を利用してDNA切断能力の制御を行った。ボロン酸誘導体としてピレンジボロン酸を用い、金属としてマグネシウム、マンガンの添加効果を検討した。その結果、両金属においてDNA切断の阻害効果を認めたが、その効果は、遷移金属であるマンガンにおいて顕著であった。

②-3 考察

今回の研究でピレンボロン酸、ポルフィリンボロン酸等の有機ボロン酸誘導体が、遺伝子の本体であるDNAの染色剤や光刺激による切断剤としての可能性を有していることを明らかとした。今後は、これら有機ボロン酸誘導体の試薬、医薬としての具体的な用途開発についてその市場性を調査しつつ、研究を進める。