

がん診断を指向したテロメア鎖長計測用 ソフトマテリアルの創製

所属：島根大学大学院自然科学研究科物質化学コース

助成対象者：山口 勲

概要

ヒトの染色体末端に位置するテロメアは、5'-TTAGGG-3'が繰り返し配列した10,000塩基ほどの一本鎖DNAである。多くのがん細胞では、テロメアDNAの短縮にともなう細胞分裂の停止が起きない。したがって、テロメア鎖長を計測することにより、がんを診断できる。本研究では、テロメアDNA中の最多含有核酸塩基であるグアニン(G)と相補の関係にあるシトシン(C)ユニットを側鎖に導入した発光性 π 共役高分子を合成し、G-C相互作用の結果生じる消光現象を利用して、極微量(ピコモル)のテロメアでも、その鎖長を短時間で計測できるシステムを構築する。

abstract

Telomeres positioned at human chromosomes consist of the same sequence of nucleotides, namely TTAGGG, and can reach up to 10,000 base pairs in length. Telomerase is found at high levels in cancer cells. This enables cancer cells to continue replicating themselves indefinitely. Information about telomerase activity is available for cancer diagnosis. In this study, luminescent π -conjugated polymers with cytosine (C) anchored groups, which are complementary with guanine (G), were synthesized. Luminescence of the polymers is expected to decrease through the interaction between C of the polymers and G of telomeres. We apply this phenomenon to develop a system that can determine the length of a considerable small amount of telomere in short time.

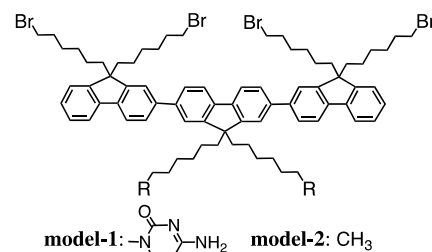
研究内容

【研究背景】 ヒトの染色体末端に位置するテロメアは、TTAGGG (T: チミン, A: アデノシン, G: グアニン) が繰り返し配列した 10 kb (10,000 塩基) 程の DNA で、その末端は一本鎖となっている。通常の体細胞では、テロメア DNA は細胞分裂の度に短くなり、細胞は分裂の限界に達する。一方、多くのがん細胞では、テロメラーゼと呼ばれる酵素が活性化されており、テロメア DNA の短縮にともなう細胞分裂の停止が起きない。したがって、テロメラーゼ活性 (テロメア鎖長) を測定することで、がんに関する診断ができる。これまでに、数種類のテロメア鎖長の計測法が開発されている。しかし、既存の計測法では、計測に長時間を要すること、計測精度があまりよくないこと、検体 (テロメア DNA) の増幅が必要となる場合があることなどの改善点が指摘されている。

【研究目的】 現在、基礎および臨床分野で最もよく使われているテロメア鎖長測定法である Telomere Repeat Amplification Protocol アッセイ法 (TRAP アッセイ法) は、ゲル電気泳動を必要とするため、結果を得るまでに約 5 時間もの長時間を要し、テロメア鎖長の計測精度は、kb (キロ塩基) のオーダーである。また、TRAP アッセイ法は、Polymerase Chain Reaction (PCR) による増幅が阻害される場合に、正確な測定結果が得られないという欠点もある。したがって、PCR を必要としない方法の開発が求められている。そこで本研究では、極微量 (ピコモル) のサンプルで計測可能とすることで PCR を必要とせず、短時間でテロメア鎖長を精度良く測定できるシステムを構築することを目的とした。

【先行研究】 これまで助成対象者は、ポリフルオレン類の発光性 p 型 π 共役高分子の側鎖に電子受容性部位を導入すると、高分子主鎖から電子受容性部位への電子移動が起き、 π 共役高分子の蛍光強度が減少もしくは消光することを見出している (*Macromolecules*, **42**, 4416-4425 (2009); *React. Funct. Polym.*, **71**, 1166-1171 (2011); *J. Appl. Polym. Sci.*, **129**, 397-403 (2013) 等)。これらの研究結果に基づき本研究では、テロメア DNA と強固に相互作用可能な電子受容性部位を発光性 p 型高分子の側鎖に導入すれば、蛍光強度の変化をモニタリングすることに基づく、テロメア鎖長センサーの開発が可能になると考えた。

実際に、右に示す model-1 溶液 ($c = 1.4 \times 10^{-5}$ M) にグアノシンを添加すると、添加量に比例して蛍光強度が減少することを見出した (*React. Funct. Polym.* **120**, 14-19 (2017))。このときの Stern-Volmer 定数は $K_{sv} = 2.00 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であった。一方、シトシル基をもたない

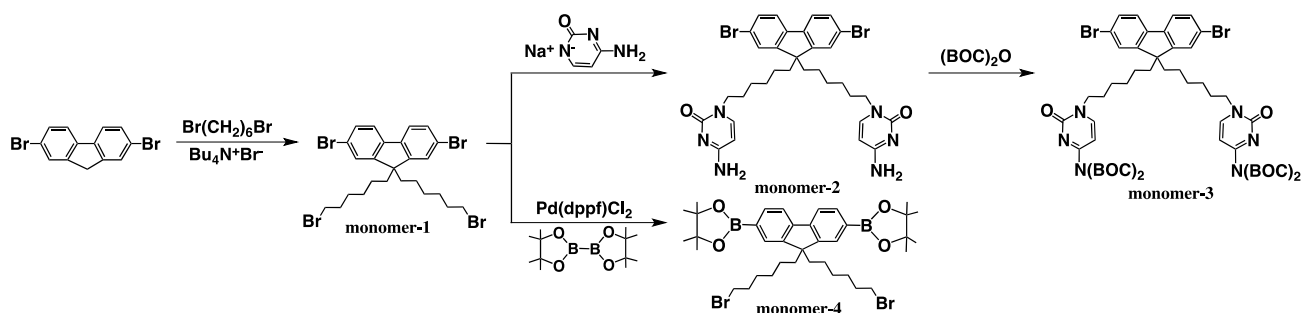


model-2 では、グアノシンを添加しても蛍光強度に変化は無かった。これらの結果は、model-1 のシトシル基がグアノシンと水素結合することで、グアノシン(消光剤)が model-1 の近傍に位置し、model-1 のフルオレン部位からグアノシンへの光誘起電荷移動の結果、蛍光強度が減少(消光)したことを示している。

【研究結果】

(1)モノマー合成

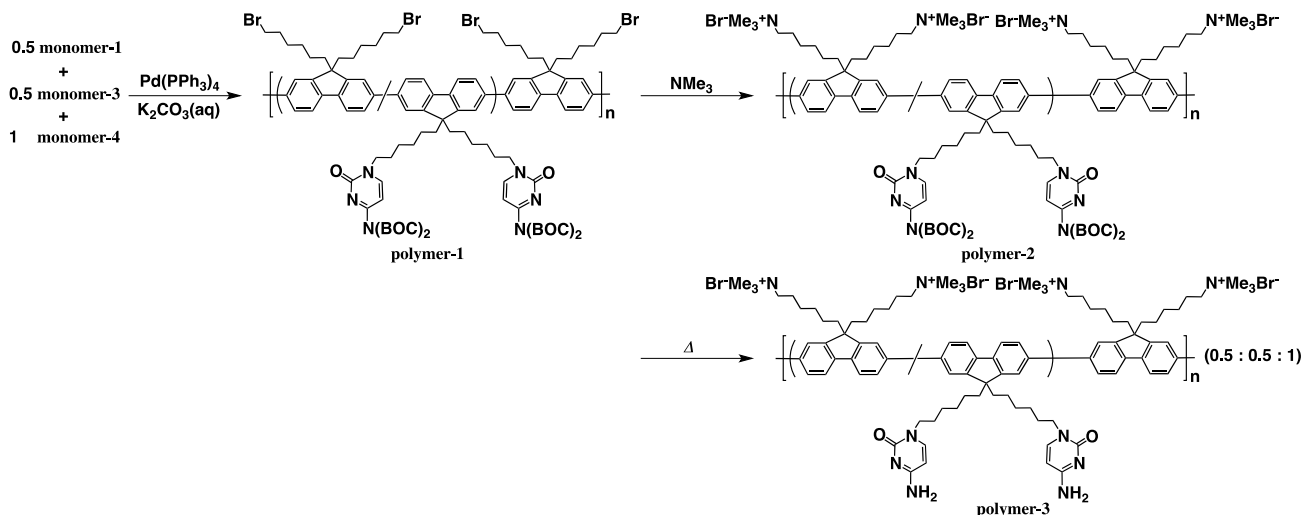
各モノマーは、Scheme 1 に示す反応により合成した。2,7-ジブロモフルオレンと 1,6-ジブロモヘキサンとの反応により monomer-1 を合成した。Monomer-1 とシトシンナトリウム塩との反応により monomer-2 を、ビスピナコレートジボランとの反応により monomer-4 を合成した。そして、Monomer-2 のシトシル基の NH₂ 水素を *t*-ブトキシカルボニル (BOC) 基で保護した monomer-3 を合成した。



Scheme 1 モノマー合成

(2)ポリマー合成

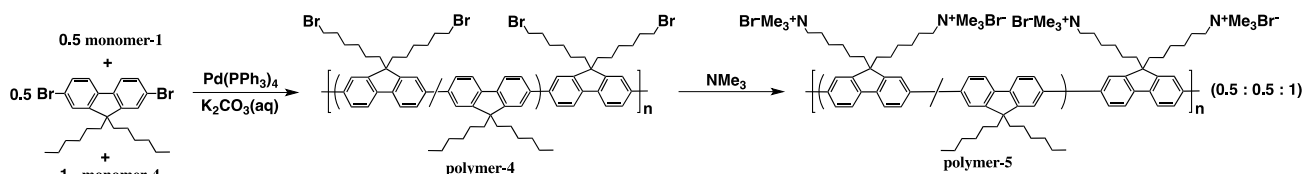
鈴木反応を利用した monomer-2 と monomer-4 の重合反応から、*N*-ヘキシルシトシル基とブロモヘキシル基を側鎖にもつポリフルオレンが得られたが、このポリマーの有機溶媒に対する溶解性は極めて低かった。この原因として、側鎖のシトシル基同士が、高分子間で水素結合を形成することによる架橋を起こしたためと考えた。そこで、シトシル基同士が高分子間で水素結合を形成しないように、NH₂ 水素を BOC で保護した monomer-3 と monomer-1 および monomer-4 を物質質量比 0.5:0.5:1 の割合で重合反応させて、可溶性の polymer-1 を合成した (Scheme 2)。続けて polymer-1 とトリメチルアミンとの反応により、水溶性に寄与する四級アンモニウム塩構造をもつ polymer-2 を合成し、これを熱処理することで BOC 基を脱保護した polymer-3 を合成した (Scheme 2)。



Scheme 2 ポリマー合成

(3) モデルポリマー合成

側鎖にシトシル基をもたないモデルポリマー (polymer-4, polymer-5) を、Scheme 3 に示す反応により合成した。



Scheme 3 モデルポリマー合成

(4) 物性評価

Polymer-1 と polymer-4 は、クロロホルムに可溶であり、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) やジメチルスルホキシド (DMSO) 等の極性溶媒に一部可溶であった。一方、polymer-2, polymer-3, polymer-4 は、DMF と DMSO 以外にも、トリメチルアンモニウム塩基導入効果により水にも可溶であった。

本研究で得られた可溶性のポリマーは、全て蛍光発光を示した。今後は、polymer-3 水溶液に、種々の鎖長をもつテロメア DNA を添加することで、発光性がどのように変化するかを調べ、テロメア鎖長センサー開発のためのデータを得る。

本助成に関わる成果物

[論文発表], [口頭発表], [ポスター発表] 現時点では、いずれもなし