

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 26 年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 挑戦的萌芽研究 4. 補助事業期間 平成 25 年度～平成 27 年度

5. 課題番号

2	5	5	6	0	4	0	4
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 第 2 世代ケージド化合物による新規細胞セレクション法の開発

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
6 0 1 5 2 5 9 2	カキウチ キヨミ 垣内 喜代三	物質創成科学研究科	教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

本研究課題では、我々が新規に開発したチオクロモン型光解離性保護基を用いて、従来法と比較してより詳細に生命現象を解明できる「第二世代のケージド化合物」の創成を目的としている。これまでケージド化合物に用いられてきた光解離性保護基とは異なり、本課題で使用しているチオクロモン骨格を有する光解離性保護基は、光照射によってアンケーシングされる際に強い蛍光を発する特長を有している。昨年度までにホタルルシフェリンを生理活性分子に選択し、保護・脱保護反応を検討して、チオクロモン型光解離性保護基がケージド化合物として利用可能であることを明らかにしている。本年度は細胞内でのアンケーシング挙動を観察するために、新規のケージド核酸の合成に着手した。ターゲット核酸としてデオキシチミジンを選択し、合成したケージドチミジンの光脱保護を検討した。その結果、光照射依存的に蛍光強度が増大し、蛍光測定による脱保護過程のモニタリングに成功したかに思われたが、その構造は予想される蛍光発光体の構造とは異なっていた。より詳細に検討した結果、新たに生成した蛍光発光体を中間体として一度経由したのち、元のデオキシチミジンが再生されることが明らかとなった。このように蛍光発光体を中間体とするため、デオキシチミジンの再生効率は必ずしも高くはなかったが、合成したケージドチミジンを用いてケージドオリゴ核酸を合成し、アンチセンス分子としてのオリゴ核酸の機能を評価した結果、光照射を行うことで、アンチセンス分子としての機能が復元することを見出すことに成功した。

10. キーワード

- | | | | |
|-------------|--------------|------------|-------------|
| (1) ケージド化合物 | (2) チオクロモン | (3) 生理活性分子 | (4) アンケーシング |
| (5) オリゴ核酸 | (6) アンチセンス分子 | (7) | (8) |

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

目的の新規ケージド核酸の合成を達成するとともに、光脱保護後に蛍光発光を検出することも達成できたが、蛍光発光体が予想とは異なる構造であり、その解明調査を先に進めることが必須であったため、当初予定していた細胞内評価を実施することができなかった。しかしながら、ケージド核酸をケージドアンチセンスオリゴ核酸へと展開すると共に、光照射によるアンチセンス機能の復元を確認することができたことから、チオクロモン型光解離性保護基の有用性は明らかにできており、次年度には細胞内評価へと展開可能と考えている。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

今年度の成果を踏まえ、細胞内におけるケージド化合物のアンケーシングと細胞内蛍光強度の測定に着手する。さらに細胞内評価を行うためには細胞にダメージを与えない弱い光で十分に生理活性分子を放出し、低濃度で利用できるとともに、高い水溶性が求められる。これらを満たすような保護基の合成にも着手する予定としている。
加えて、フローサイトメトリーによって、光照射により細胞内でアンケーシングされることで生理活性分子の機能が発現している細胞とアンケーシングされていない細胞にセレクションすることにも着手する。これにより得られた、生理活性分子の機能が均一に発現している細胞群について、従来法で得られる結果と比較して本手法の有用性の確認を行う。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

目的のケージド化合物の合成を達成し、光脱保護後に蛍光発光を検出することも達成できたが、蛍光発光体が予想とは異なる構造であり、その解明調査を先に進めることが必須であったため、当初予定していた細胞内評価を実施することができなかった。

(使用計画)

蛍光発光体の構造解明に目途がついたため、予定していた細胞内での脱保護評価やフローサイトメトリーを用いた検討を行う。そのため消耗品の購入や得られる成果を基に各種学会、シンポジウムで発表するための費用に利用する。

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(1)件 うち査読付論文 計(1)件

著者名		論文標題			
Yasuo Sasaki, Ryo Sugiura, Yasuhiro Nishiyama, Hiroki Tanimoto, Tsumoru Morimoto, Kiyomi Kakiuchi		Synthesis and evaluation of new caged compound with thiochromone derivative			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Tetrahedron	有	70	2014	7973-7976	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1016/j.tet.2014.08.047					

(学会発表) 計(8)件 うち招待講演 計(1)件

発表者名		発表標題	
日影 新, 佐々木康雄, 久井輝亘, 西山靖浩, 垣内喜代三		新規ケージド核酸の合成とその脱保護の評価	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第35回光化学若手の会	2014年06月13日~2014年06月15日	休暇村志賀島(福岡県福岡市)	

発表者名		発表標題	
西山靖浩		蛍光性光解離性保護基を用いたケージド化合物の開発	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第4回グリーンフォトニクスセミナー-異分野融合による生体内の力場・反応場の理解-(招待講演)	2014年09月02日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市)	

発表者名		発表標題	
佐々木康雄, 久井輝亘, 日影 新, 西山靖浩, 垣内喜代三		蛍光特性を有する新規ケージドDNAの合成と評価	
学会等名	発表年月日	発表場所	
2014年 光化学討論会	2014年10月11日~2014年10月13日	北海道大学 札幌キャンパス(北海道札幌市)	

発表者名		発表標題	
Yasuhiro Nishiyama, Yasuo Sasaki, Terunobu Hisai, Shin Hikage, Kiyomi Kakiuchi		Synthesis of Novel Caged Thymidine for Caged Oligonucleotide	
学会等名		発表年月日	発表場所
The 8th Asian Photochemistry Conference (APC-2014)		2014年11月10日～2014年11月13日	The Leela Hotel (Kovalam, India)

発表者名		発表標題	
西山靖浩		遺伝情報を高次に制御するケージド化合物の創成	
学会等名		発表年月日	発表場所
高次複合光応答分子システムの開拓と学理の構築第2回公開シンポジウム		2015年01月23日～2015年01月24日	千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)

発表者名		発表標題	
Yasuhiro Nishiyama, Yasuo Sasaki, Terunobu Hisai, Shin Hikage, Kiyomi Kakiuchi		Synthesis and Evaluation of Novel Caged Antisenseoligonucleotide possessing fluorescence property	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本化学会 第95春季年会		2015年03月26日～2015年03月29日	日本大学 理工学部船橋キャンパス (千葉県船橋市)

発表者名		発表標題	
Daisuke Katagiri, Sayaka Sakaguchi, Arata Yoneda, Taku Demura, Yoichiro Hosokawa		Evaluation of trade-off between femtosecond laser manipulation and viability of plant cell	
学会等名		発表年月日	発表場所
PSROC 2015 Annual Meeting		2015年01月28日～2015年01月30日	National Tsing Hua University (Hsinchu, Taiwan)

発表者名	発表標題	
片桐 大輔, 坂口 さやか, 米田 新, 出村 拓, 細川 陽一郎	フェムト秒レーザーを用いた植物単細胞への巨大分子の導入	
学会等名	発表年月日	発表場所
第62回応用物理学会春季学術講演会	2015年03月11日～2015年03月14日	東海大学湘南キャンパス(神奈川県平塚市)

〔図書〕計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15.備考

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 反応制御科学研究室
<http://mswebs.naist.jp/LABs/kakiuchi/index-j.html>