

令和元年6月9日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18869

研究課題名(和文) 蛍光性インターカレーターを利用した新規DNAセンサーの開発

研究課題名(英文) Development of a novel DNA sensor with a fluorescent intercalator

研究代表者

塚本 効司 (Tsukamoto, Koji)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：00454794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAを可視化できる、ペリレン-ポリアミン複合体をベースとした新規蛍光DNAセンサーを開発し、その蛍光特性を詳細に検討した。その結果、開発したセンサー分子は非常に高い蛍光増大率を有し、高感度にDNAを検出できる蛍光off-on型センサーであることが明らかになった。また、開発したセンサー分子にさまざまな誘導体化を施すことで、その蛍光特性にどのような変化がもたらされるかを検討し、波長変化型センサーの開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光DNAセンサー分子は、DNAを高感度に検出、可視化できる生化学ツールのひとつであり、さまざまなDNA分析技術に対応するために、既存のものとは異なるDNAセンサーの開発が望まれる。本研究課題では、水溶性が低く用途が制限されるが、優れた蛍光特性を有するペリレンを利用して新規DNAセンサーを開発した。開発したセンサーは容易に合成できる高感度な蛍光DNAセンサーとして利用できるだけでなく、今後さらに高度な機能を有するDNAセンサーや、DNAに作用する機能性分子の基本構造となる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：A novel fluorescent sensor for visualizing DNA has been developed with a perylene-polyamine complex, and its fluorescent property has been studied. The sensor features fluorescence off-on response, and high sensitivity and selectivity toward DNA. Comparison of fluorescent properties between various compounds derived from the sensor allowed us to understand effects on a property of the sensor by the derivatization. As a result, a ratiometric fluorescence sensor for DNA has also been developed.

研究分野：分析化学

キーワード：DNA 蛍光 蛍光センサー ポリアミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA インターカレーターの重要性と問題点

DNA に特異的に結合する分子は DNA を認識したり阻害したりする化合物であり、抗がん剤や DNA センサーとして応用されている。近年では核酸医薬が注目される一方で、DNA に結合する小分子についても応用例は数多い。小分子は一般的に大量合成や化学修飾が容易なため、DNA に結合する小分子を改良して副作用の少ない抗がん剤や DNA センサーの開発を目指す研究は現在も盛んに行われている。

DNA に対する結合様式のひとつとして、平面芳香環分子が二重らせん DNA の塩基対 - 塩基対間に、各塩基対に対して平行に挿入するインターカレーションが知られている。DNA に特徴的な結合様式のため、インターカレーターは DNA を特異的に認識および阻害する分子として利用可能である。

一方、インターカレーターは平面芳香環分子に特徴的な強い疎水性相互作用やスタッキング相互作用を有するため水に難溶のものが多く、利用が制限される。特に、炭素と水素のみで構成されたペリレン等の構造が単純なものは、その疎水性ゆえ、代替塩基や蛍光標識として DNA 鎖に共有結合させる用途にしか利用されてこなかった。しかしながら、そのような分子は優れた蛍光特性を有する場合が多く、その単純な構造のため化学的安定性が高く化学修飾が容易といった利点も有するため、機能性分子としての利用価値は高く、未だ開発の余地が残されている。

(2) インターカレーターを利用した新規蛍光 DNA センサーの開発

このような背景の下、研究代表者は蛍光 DNA センサーとして利用可能な新規 DNA 結合分子として、ポリアミンの両端にインターカレーターであるペリレンとアントラキノン配した化合物 **1** を設計した (Figure 1)。ペリレンは波長約 460 nm および 490 nm の蛍光を発する蛍光色素であり、アントラキノン配はペリレンの蛍光消光剤として知られている。Figure 1 に示すように、水中では疎水性相互作用に起因するペリレンとアントラキノンのスタッキング相互作用により蛍光が消光するが、DNA 存在下ではペリレンおよびアントラキノンが DNA にインターカレーションすることでスタッキング相互作用が解消され、ペリレンの蛍光が回復すると考えられる。

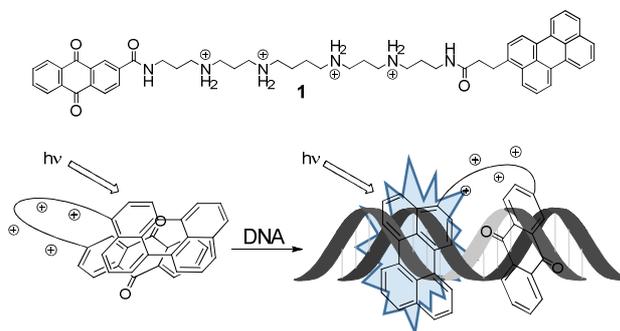


Figure 1 ポリアミンリンカー型蛍光 DNA センサーの設計

また、2 つのインターカレーターのリンカーとして、生体内ポリアミンのひとつであるスペルミンを用いた。中性条件下ではアミノ基がプロトン化されるため、分子に水溶性が付与され、かつリン酸エステル部位に負電荷を有する DNA への親和性が增大すると考えた。

この分子設計に基づき化合物 **1** を合成し、pH 7.4 の Tris 緩衝液中でその蛍光スペクトルを測定したところ、望み通り DNA 非存在下において **1** はほぼ消光され、DNA を添加すると蛍光が増大し、DNA センサーとして利用できることが分かった。

2. 研究の目的

本研究課題では、(1) 化合物 **1** の蛍光特性および DNA に対する詳細な応答メカニズムを解明するとともに、(2) **1** の誘導体を種々合成し、それらの蛍光特性を調べることで、DNA センサーとしての更なる性能向上や機能化を目指すこととした。

3. 研究の方法

合成した化合物 **1** の各種 DNA に対する蛍光応答性を蛍光分光光度計等で調べ、その蛍光特性を評価した。また、**1** のポリアミン鎖やペリレン部位について、種々の誘導体化を行い、それらの物性や蛍光特性を評価した。

4. 研究成果

(1) 化合物 **1** の蛍光特性の評価

合成した **1** の水溶液に、calf thymus DNA (ctDNA) および A-T 塩基対で構成された poly(dA-dT) を作用させたところ、ほぼ無蛍光であった **1** の蛍光が回復した (Figure 2)。poly(dA-dT)

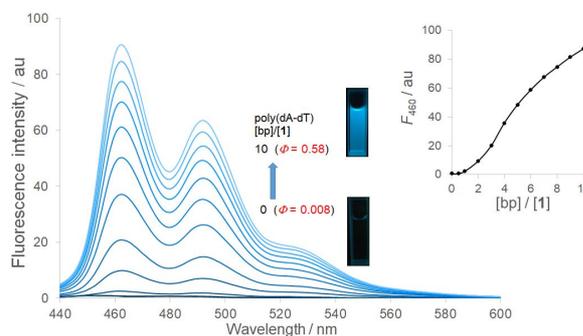


Figure 2 **1** の溶液 (1 μ M) に poly(dA-dT) を添加した際の蛍光スペクトル変化および 460 nm における蛍光強度変化 (挿入図) (pH 7.4 TBS buffer (20 mM), λ_{ex} = 425 nm) ϕ : 蛍光量子収率

における A-T 塩基対 (bp) と **1** の存在比 $[bp]/[1] = 10$ においては、**1** の蛍光増大率が約 70 倍に達し、高感度に DNA を検出できることが明らかになった。また、DNA の蛍光染色試薬として汎用される DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) との比較を行ったところ、S/B (signal to background) 比は **1** の方が DAPI よりも優れていた (Figure 3)。

また、センサー分子 **1** に対し、短鎖の二重鎖 DNA である $d(\text{CCCCAATTGGGG})_2$ および $d(\text{CCCCCGGGGG})_2$ を作用させたところ、C-G 塩基対しか持たない後者に対する蛍光増大率は、同濃度の前者に対する蛍光増大率と比較して、約 1/3 ~ 1/4 であり、A-T 選択的に応答することが明らかになった。**1** に対して、それら短鎖 DNA を徐々に加えて吸光スペクトル変化を調べたところ、どちらにおいても同様の変化が見られたことから、**1** は C-G 塩基対のみで構成された DNA にも結合するものの、C-G 塩基対によって消光されることが示唆された。

さらに、**1** の DNA に対する蛍光応答は、加熱による二重鎖 DNA の融解に伴って減弱し、また再冷却による DNA の二重鎖形成に伴って回復した (Figure 4)。このことから、**1** は二重鎖 DNA に特異的に応答し、かつ加熱によっても分解せず二重鎖 DNA に対する応答性を維持することが明らかになった。この結果より、**1** はリアルタイム PCR 等の DNA 検出試薬として利用できると考えられる。

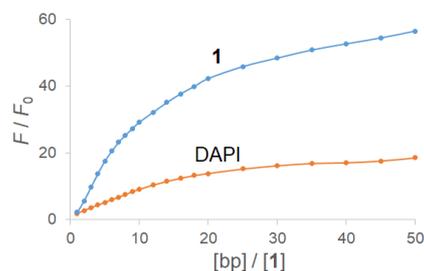


Figure 3 **1** および DAPI 溶液 (1 μM) に ctDNA を添加した際の蛍光強度 (F) / ブランクシグナル (F_0) 比 (pH 7.4 TBS buffer (20 mM), $\lambda_{\text{ex}} = 360$ (DAPI), 425 nm (**1**))

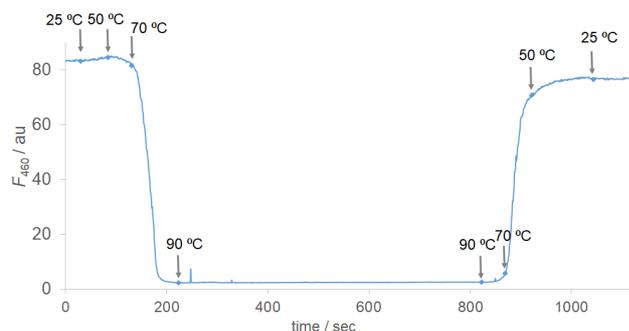


Figure 4 poly(dA-dT) を添加した **1** 溶液 ($[1] = 1 \mu\text{M}$, $[(\text{dA-dT})]/[1] = 10$) を加熱、冷却した際の蛍光強度変化 (pH 7.4 TBS buffer (20 mM), $\lambda_{\text{ex}} = 425$, $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm)

(2) 化合物 **1** の誘導体化とそれらの特性評価

開発した DNA センサー **1** について、今後の機能性向上および機能開発に資する構造情報を得る目的で、ポリアミン部位や蛍光色素部位の誘導体化が物性および蛍光特性にどのような変化をもたらすかを検討した。

ポリアミン部位のアミノ基の数およびメチレン鎖長を変更した各種誘導体

1 のポリアミン部位のアミノ基の数およびメチレン鎖長を変更した各種誘導体 (Figure 5) を合成し、それらの溶媒に対する可溶性を調べた。その結果、おもにアミノ基の数により水溶性が変化し、アミノ基が 4 つの **1** ~ **3** は水に可溶である一方、**4** ~ **6** は水にわずかに可溶もしくは難溶であった。また、アミノ基が 2 つの **5** および **6** は水に難溶で DMSO に可溶であった一方、**4** は DMSO にもやや溶けにくく、センサー分子としての利用が制限されることが分かった。また、水溶性の **1** ~ **3** について、ctDNA に対する蛍光応答性を検討した結果、いずれにおいても同様の蛍光増大が観測されたものの、各アミノ基間のメチレン鎖が 2 炭素の **2** においてはブランクシグナルが若干高く、結果として蛍光増大率がやや低いことが明らかになった。

次に、**1** のポリアミン部位の両端を 3-アミノプロピル基で延長した **7** および **8** (Figure 5) を合成し、それらの蛍光特性を調べたところ、ポリアミン鎖が長くなるほど DNA 非添加時における蛍光が十分に消光されず、かつ蛍光回復の立ち上がりに必要な ctDNA 量が増加する傾向が見られた。

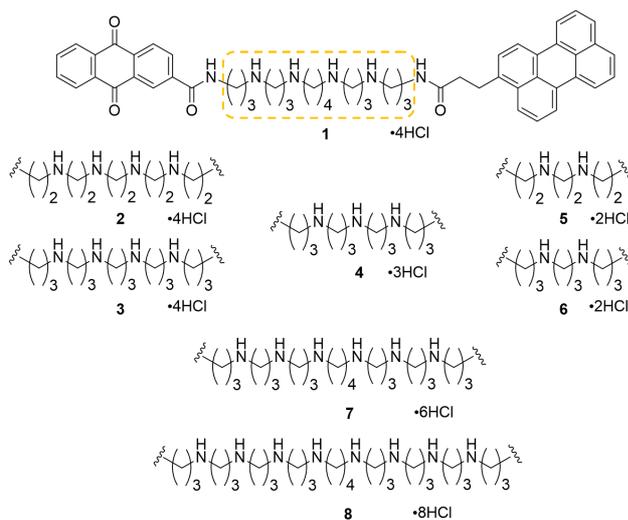


Figure 5 **1** およびそのポリアミン部位を変更した誘導体 **2** ~ **8** の構造

蛍光色素部位の誘導体化

センサー分子の蛍光スペクトルを変化させられれば、種々の蛍光センサーを用いて複数の検出対象物質を異なる蛍光波長で同時に可視化するマルチカラーイメージングに有用である。このことから、1の蛍光色素部位であるペリレンのリンカー結合部位を変更した9 (Figure 6)

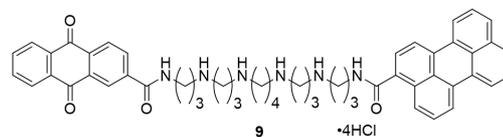


Figure 6 1のペリレン上の置換基を変更した誘導体9の構造

を合成したところ、望み通り9はctDNAに対する蛍光 off-on型の応答性を維持しつつ、1とは異なる蛍光スペクトルを示した (Figure 7)。すなわち、センサー機能を損なうことなく、青色蛍光を主に発するセンサーを青

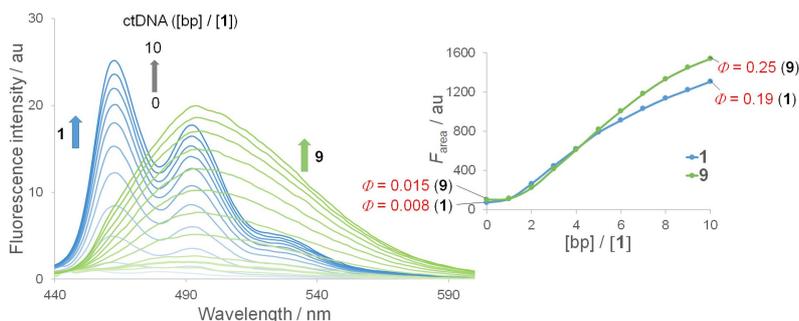


Figure 7 1および9の各溶液 (1 μ M) に ctDNA を添加したときの蛍光スペクトルおよび蛍光強度の変化 (pH 7.4 TBS buffer (20 mM), λ_{ex} = 425 nm)

緑色蛍光を発するセンサーに改変することに成功した。

また、検出対象物質を蛍光の波長変化で計測するレシオ測定には、波長変化型蛍光センサーが必要である。そこで、今回開発した DNA センサーをベースに波長変化型センサーを開発することとし、2つのピレンをポリアミンリンカーで結合し

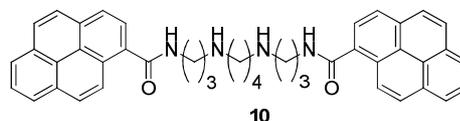


Figure 8 ピレン二量体10の構造

た10を設計した (Figure 8)。ピレンは π - π スタッキング相互作用により二量体化すると、エキシマー蛍光を発することが知られているため、10は水中でエキシマー蛍光を発し、DNAにインターカレーションするとピレン同士の π - π スタッキング相互作用が解消され、モノマー蛍光を発すると思われる。10を合成し、その蛍光特性を調べたところ、望み通り10はDNA非存在下で極大波長約500 nmのエキシマー蛍光を発し、ctDNAを添加するとエキシマー蛍光が減少し、極大波長約410 nmのモノマー蛍光が増大する波長変化型DNAセンサーになることが明らかになった (Figure 9)。

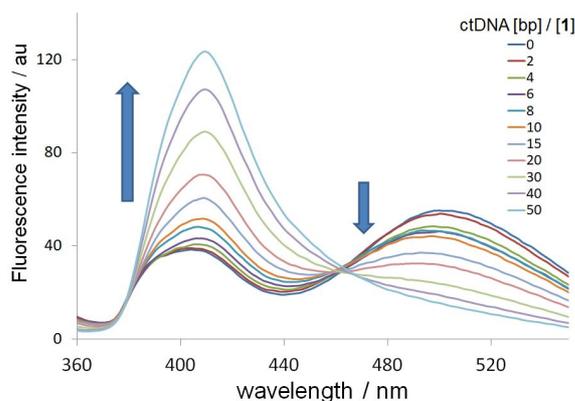


Figure 9 10の溶液 (1 μ M) に ctDNA を添加したときの蛍光スペクトル変化 (pH 7.4 TBS buffer (20 mM), λ_{ex} = 340 nm)

センサー分子の誘導体化により、物性や蛍光特性、機能性を変化させられることが示されたが、今回開発したセンサー分子は、化学修飾が容易な二級アミンを複数有しているため、今後更なる誘導体化による高機能化が期待できる。今回得られた成果は、今回開発したセンサー分子をベースとした機能性分子開発の基礎的知見としても有用であると考えられる。

生細胞 DNA イメージングへの応用

生細胞 DNA イメージングへの応用

開発したセンサー分子1およびその誘導体2~6をHeLa細胞に適用し、細胞内DNAのイメージングを試みた。その結果、いずれにおいても生細胞の核内DNAは染色されず、メタノールで固定化した細胞の核内DNAをイメージング可能であることが明らかになった。生細胞の核内DNAイメージングを指向して、1のアミノ基に対してアルキル基、アミド、グアニジノ基などを導入した化合物も合成したが、現在のところ生細胞の核内DNAイメージングには成功していない。今後さらなる誘導体化を行い、核内移行性や機能性等を検討する必要がある。

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

塚本効司、前田初男、ペリレン-ポリアミン複合体をベースとした蛍光 DNA センサーにおける誘導体化とその物性および蛍光特性変化、日本薬学会第 137 年会、2017 年

塚本効司、前田初男、ペリレンを利用した新規蛍光 DNA センサーの開発、第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。