

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (A)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18201026
 研究課題名 (和文) 塩基識別型蛍光核酸塩基の分子設計と画期的な遺伝子検出法の開発
 研究課題名 (英文) Design of Base-discriminating Fluorescent Nucleosides and Their Application to Gene Analysis and SNP Genotyping
 研究代表者
 齋藤 烈 (SAITO ISAO)
 日本大学・工学部・教授
 研究者番号：20026082

研究成果の概要 (和文)：我々は塩基識別型の蛍光性核酸塩基を考案し、これを用いた画期的な遺伝子検出手法、特に 1 塩基多型(SNP)を簡便に検出定量する手法を開発した。さらに、細胞内で遺伝子の発現を検知することのできる消光剤を必要としない画期的なモレキュラービーコンを開発し、実用に耐えかつ低コストで作成可能であることを実証した。環境に感応して色が変化する新しい蛍光性核酸塩基の開発にも成功している。

研究成果の概要 (英文)：We have designed novel base-discriminating fluorescent (BDF) nucleosides which are successfully used for SNP genotyping and gene detection. Quencher and end free molecular beacons (MB) were discovered for the first time. These low cost MB were used for the gene detection in a cell. We have also succeeded to design environmentally sensitive fluorescent nucleosides that emits strong fluorescence at different wavelengths depending upon a local environment around the nucleobase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	14,200,000	4,260,000	18,460,000
2007年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
総計	36,900,000	11,070,000	47,970,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ・ ナノ材料ナノバイオサイエンス

キーワード：DNA デバイス、DNA チップ、遺伝子検出、遺伝子診断、SNP 検出

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来の DNA チップではサンプル抽出後 PCR で DNA を増幅する際、蛍光分子でラベル化する必要があったが、我々は研究当初煩雑で高コストの蛍光ラベル化を必要としない DNA 検出を行えば画期的な遺伝子検出法になるだろうと考え、蛍光ラベルを必要としないが DNA チップの開発研究に着手した。
 (2) 従来遺伝子検出に多用されているモレキ

ュラービーコン(MB)は末端に蛍光分子と消光分子がついたもので、合成に手間がかかり高コストであるので、消光剤の必要としない画期的な MB を開発しようと研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) 現在の DNA チップでは、発現した遺伝子の有無を判定する事はできるが、誤差が大きく定量することは極めてむずかしく、加えて

その遺伝子内の1塩基多形 (SNP) を検出するには、かなり高度の技術が必要とされる。我々は、最近独自のコンセプトに基づき、相手塩基を識別して蛍光を発する画期的な蛍光性核酸塩基を開発した。我々が独自に開発した方法は、PCR 時に蛍光ラベリングを必要とせず、現在世界を席巻している外国製のDNA チップのもつ欠陥のほとんどを克服した画期的なものであり、更に改良を加えて国内外で今後広く使われる事を目標としている。そのためには、より S/N 比が高くより長波長で塩基選択的に蛍光を発する分子の開発が必要不可欠であるのでこれらを目標とした。

- (2) 現在遺伝子の検出に用いられているモレキュラービーコンはヘアピンオリゴヌクレオチドの両末端に蛍光分子と消光剤の双方を導入しなければならないが、我々は消光剤を必要としない全く新しいタイプのモレキュラービーコン (MB) の開発を目指した。
- (3) 周辺の環境に感応して蛍光強度や蛍光波長が変わる環境対応型の核酸塩基を開発することを目標に、様々な置換基を有する蛍光性核酸塩基を合成し、その蛍光特性と構造との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

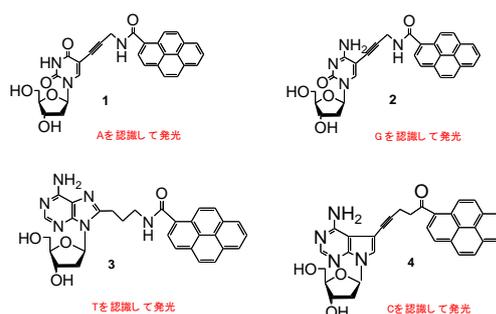
(1) 2重鎖DNA中で対塩基となる4種類の塩基 (A, T, G, C) を蛍光の有無で全て完全に読み分けることができれば、遺伝子の検出、1塩基変異 (SNP) の解析、DNA チップ、細胞内でのDNAやRNAのマッピングなど様々な目的に利用することができる。我々はこのような目的のために、対となる相手塩基を蛍光でみ分けられる塩基識別型蛍光核酸塩基 **BDF** をそれぞれ4種類開発する研究に取り組み、世界で初めて開発に成功し、国内外の特許を取得するとともに、実用化にむけて研究を行ってきた。

(2) アントラセンやアクリジンを発色団としてもつBDFを合成したところ、450nmの長波長領域に蛍光を有し対塩基をきれいにセンシングできることがわかったので、これらのチップ上での性能を調べこのシリーズが実際にチップ上で使えるかどうか検討する。

(3) 末端にグアニンにより蛍光が消光される蛍光分子を導入したMBを開発する。

4. 研究成果

(1) 対となる相手塩基4種 (A, T, G, C) を蛍光で見分けられるピレンを含有する塩基識別型蛍光核酸塩基**BDF**をそれぞれ4種類開発する研究に取り組み、次の4種類のピレン含有BDFを開発した。

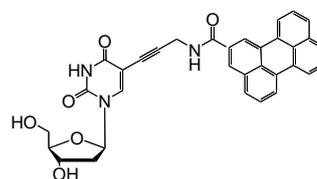


これらのBDF 塩基を塗布したDNAチップを企業と共同で開発し、数種のコンテンツを含む遺伝子診断用DNAチップを開発した。

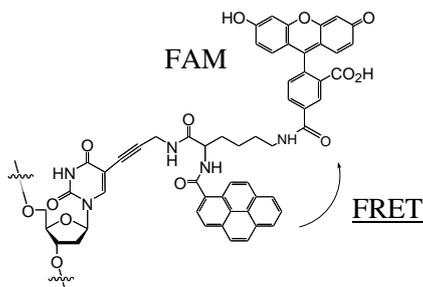
印刷用インクに暗号となるDNAオリゴマーを入れICチップのように使うDNAインクは工業的に重要なものになると考えられているが、DNAインクの簡便な検出にBDF 塩基がきわめて有効なことがわかり、企業と共同でDNAインク検出システムの開発を行っている。

学術の面では、我々のBDF 塩基に関する論文を発表して以来、我々の論文に対して世界的に大きな反響があり、今や我々の命名したBDF 塩基という名称は世界で広く使われている。我々のJ. Am. Chem. Soc.に出したBDF 塩基に関する論文は、過去10年間で日本人が出した論文で化学の分野で引用度が最も多いランキングで10位以内には入っている。

(2) 細胞内を透過できる550nm以上の蛍光を発し、なおかつ塩基識別能を有するBDFの開発を行った。既に、候補となるBDFをいくつか合成しているので、その性能を調べた後、実際のターゲットとなる遺伝子の検出と1塩基多形 (SNP) のタイピングを行った。アクリドン、ペリレン、アントラセンなどの蛍光発色団を有する新しいBDFを開発した。

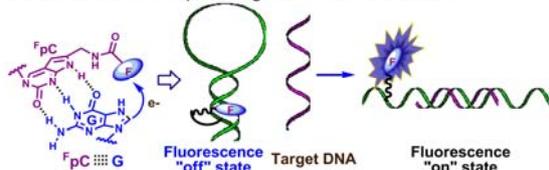


FRETを用いて長波長で蛍光発光を検出する新しいシステムの開発にも成功した。DNAインクに使うのに相応しい新しいBDFの開発にも成功し、企業で現在その有用性が検討されている。



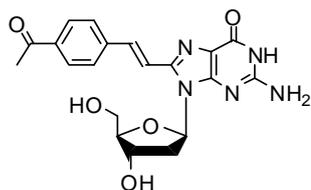
(3) 消光剤を必要としない画期的なモレキュラービーコン(MB)を3種類開発した。いずれも、天然のグアニン塩基(G)を消光剤とするもので、簡便性とコストの点で従来のMBをはるかに凌がするものである。

Mode of fluorescence quenching and mechanism of action:

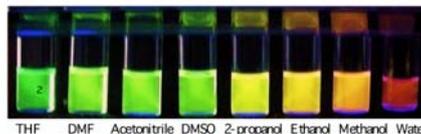
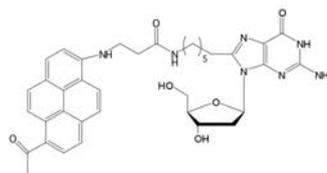


ピレンのエキシマーは特徴的な超寿命の長い波長領域の蛍光を発生するが、このピレンエキシマーで遺伝子を検出する新しいタイプのMBを初めて開発する事に成功した。

(4) 周辺環境の極性に感応して蛍光の強度および波長を変える新しい蛍光性核酸塩基をデザインするコンセプトを提唱し、これらを実際に合成し、これらをDNAオリゴマーに導入し、環境依存型の蛍光プローブを開発した。これらの蛍光プローブにより遺伝子の検出、1塩基多型(SNP)のタイピングが行えることを実証した。代表的な環境依存蛍光核酸塩基の1例を下に示す。



(5) 周辺の環境により色が変わるカメレオン型の核酸塩基を開発した。紫外線照射下で発光する蛍光の波長が、周辺の極性により変化しその結果として紫外線下で色が変わる核酸塩基をカメレオン型蛍光核酸塩基というが、この種の分子のデザインコンセプトを提唱した。



この種のカメレオン型蛍光核酸塩基をターゲット DNA の蛋白結合サイトに導入し、DNA と蛋白との結合を蛍光の波長でモニターするシステムの開発を現在行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (総計 38 件)

- ① Fluorescence Switching of Photochromic Vinylpyrene Substituted 2'-Deoxyguanosine. Y. Saito, K. Matsumoto, Y. Takeuchi, S. S. Bag, S. Kodate, T. Morii and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, **50**, 1403-1406 (2009), 査読有り.
- ② Ends Free and Self-quenched Molecular Beacons with Pyrene Labeled Pyrrolocitidine in the Middle of the Stem. Y. Saito, Y. Sinohara, S.S. Bag, Y. Takeuchi, K. Matsumoto and I. Saito, *Tetrahedron*, **65**, 934 (2009), 査読有り.
- ③ C8-Alkynyl- and Alkylamino Substituted 2'-Deoxyguanosines: A Universal Linker for Nucleic Acids Modification, Y. Saito, K. Matsumoto, S. S. Bag, S. Ogasawara, K. Fujimoto, K. Hanawa and I. Saito, *Tetrahedron*, **64**, 3578-3488 (2008), 査読有り.
- ④ Anthracene Based Base-discriminating Fluorescent Oligonucleotide Probes for SNPs Typing: Synthesis and Photophysical Properties Y. Saito, K. Motegi, S. S. Bag, I. Saito. *Bioorg. Med. Chem. Symposium-in-Print*, **16**, 107-113 (2008), 査読有り.
- ⑤ Design of a Novel G-quenched Molecular Beacon; A Simple and Efficient Strategy for DNA Sequencing Analysis, Y. Saito, E. Mizuno, S. S. Bag, I. Suzuka and I. Saito., *Chem. Commun.*, 4492-4494 (2007), 査読有り.
- ⑥ Reversible Photopadlocking on Double-stranded DNA. K. Fujimoto, S. Matsuda, Y. Yoshimura, T. Ami, and I. Saito, *Chem. Commun.*, 2968-2970 (2007), 査読有り.

⑦ PRODAN-Conjugated DNA: Synthesis and Photochemical Properties, K. Tainaka, K. Tanaka, Ikeda, K.-i., Nishiza, T. Unzai, Y. Fujiwara, I. Saito and A. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 4776-4784 (2007)、査読有り。

⑧ Synthesis and Fluorescence Properties of Dimethylaminonaphthalene-deoxyuridine Conjugates As Micropolarity-sensitive Probes. Okamoto, A.; Tainaka, K.; Unzai, T.; Saito, I. *Tetrahedron*. **63**, 3465-3470 (2007)、査読有り。

⑨ Highly Selective Fluorescent Nucleobases for Designing Base-Discriminating Fluorescence Probe. Saito, I.; Saito, Y.; Hanawa, K.; Hayashi, K.; Motegi, K.; Bag, S. S.; Dohno, C.; Ichiba, T.; Tainaka, K.; Okamoto, A. *Pure. Appl. Chemistry*, **78** (12), 2305-2312 (2006)、査読有り。

⑩ Simple SNP Typing Assay Using a Base-discriminating Fluorescent Probe. A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Ochi, K. Kanatani and I. Saito, *Molecular BioSystem.*, **2**, 81 (2006)、査読有り。

[学会発表] (総計 45 件)

① 齋藤義雄、松本桂彦、篠原雄太、沼尻恭子、齋藤烈
C8 位にリンカーをもつ新規グアノシン誘導体の応用
日本化学会第 89 回春季年会、2009 年 3 月 27 日、日本大学理工学部船橋キャンパス

② 齋藤義雄、竹内辰樹、松本桂彦、高橋尚也、齋藤烈
ビニルピレン置換グアニン塩基を用いる蛍光スイッチの開発
日本化学会第 89 回春季年会、2009 年 3 月 27 日、日本大学理工学部船橋キャンパス

③ 齋藤義雄、篠原雄太、松本桂彦、沼尻恭子、齋藤烈
両末端フリーの自己消光型モレキュラービーコンの開発
2009 年光化学討論会、2009 年 9 月 16 日、桐生市市民文化会館

④ 齋藤義雄、鈴木梓、篠原雄太、石下真也、今井和俊、根本修克、齋藤烈
DNA 検出のためのアントラセン、ピレン骨格を有する Twin プローブの開発
2009 年光化学討論会、2009 年 9 月 16 日、桐生市市民文化会館

⑤ 齋藤義雄、高橋尚也、松本桂彦、篠原雄太、竹内辰樹、齋藤烈

新しい Solvatofluorochromic なプリン核酸塩基のデザインと応用
2009 年光化学討論会、2009 年 9 月 16 日、桐生市市民文化会館

[図書] (計 1 件)

① 齋藤烈、杉山弘、中谷和彦 共編、化学同人、「化学フロンティア 18 ゲノム化学の最先端」、2007。

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

①名称：水素結合性置換基を有する 8-置換グアノシン誘導体及びそれを含むオリゴヌクレオチド
発明者：齋藤烈、齋藤義雄、花輪和夫、松本桂彦

権利者：日本大学

種類：特許

番号：2006-352017

出願年月日：2006 年 12 月 27 日

国内外の別：国内

②名称：ステムループ構造を有する蛍光プローブ

発明者：齋藤烈、齋藤義雄、松本桂彦

権利者：日本大学

種類：特許

番号：2008-225347

取得年月日：2008 年 9 月 2 日

国内外の別：国内

③名称：C8 位置置換プリン塩基誘導体及びそれを利用した蛍光プローブ

発明者：齋藤烈、齋藤義雄、高橋尚也

権利者：日本大学

種類：特許

番号：2009-188664

取得年月日：2009 年 8 月 17 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 3 件)

①名称：光反応性核酸及び可逆的核酸光連結又は開裂方法

発明者：齋藤烈、齋藤義雄

権利者：日本大学

種類：特許

番号：2006-76905

取得年月日：2006 年 3 月 23 日

国内外の別：国内

②名称：ヌクレオチド誘導体及びその利用 (FRET)

発明者：齋藤烈、齋藤義雄、吉田安子

山田和成、丹羽孝介

権利者：日本大学

種類：特許

番号：2007-31388
取得年月日：2007年2月8日
国内外の別：国内

③名称：ヌクレオチド誘導体及びその利用
(アントラセン)

発明者：齋藤烈、齋藤義雄、茂木かおり、
吉田安子、山田和成、丹羽孝介

権利者：日本大学

種類：特許

番号：2007-31389

取得年月日：2007年2月8日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 烈 (SAITO ISAO)

日本大学・工学部・教授

研究者番号：20026082

(2)研究分担者

齋藤 義雄 (SAITO YOSHIO)

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：40385985

(3)連携研究者

なし