

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19750146

研究課題名（和文）ピレンエキシマー発光を利用した画期的な SNP 検出チップの開発

研究課題名（英文） Design of pyrene-labeled oligonucleotide probes for SNPs genotyping

研究代表者

齋藤 義雄 (SAITO YOSHIO)

日本大学工学部・講師

研究者番号：40385985

研究成果の概要：

本研究では、ビスピレン構造を有するユニットを核酸塩基に導入し、その向かいに特定の塩基が来たときのみエキシマーを形成するようなプローブの開発を行った。実際にビスピレンユニットを含むプローブの開発に成功し、ピレンエキシマー発光により標的 DNA の有無を確認できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ビスピレン, SNPs, エキシマー, DNA

1. 研究開始当初の背景

一塩基多型の識別とその利用によるオーダーメイド医療の確立は、ポストゲノムシーケンス時代における緊急かつ極めて重要な課題である。これまでも SNPs の検出法として、様々な報告がなされているが、従来法のほとんど全てがマッチ・ミスマッチ配列におけるターゲット DNA へのハイブリダイゼーションの安定性の違いに基づいて検出するものであった。そのため、避けて通れないハイブリダイゼーションエラーにより標的配列中の一塩基の違いをクリアーに検出できていなかった。そこで、全く新しい概念を用

いた SNPs 検出法の開発が求められていた。そこで我々は、全く新しい概念を用いた SNPs 検出法として BDF 塩基を開発した。しかしながら、これを市販の DNA チップ作成用のガラス基板上で検討すると、その発光波長が約 400 nm と短いため上手く検出できなかった。そこで私は本研究において、ピレンエキシマー発光の特性を利用することでより長波長側で一塩基の違いを識別できる SNP 検出プローブの開発を行うことを考えた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの問題点を克服した、

DNA チップ用キャプチャープローブの開発を行うことを目的とした。更に、このプローブを実用化に近づけるための検討を行うことも目的とした。我々のグループではこれまでに多数のBDF 塩基や蛍光プローブを報告しており、様々な検討を十分に行っているが、この長波長化の問題は、これまでの多くの検討を行った末に出てきた問題であり、これをクリアすることが大きな目的であった。

3. 研究の方法

本研究では、ビスピレン構造を有するユニットを核酸塩基に導入し、その向かいに特定の塩基が来たときのみエキシマーを形成するようなプローブを設計することで、従来にはないSNPs 検出法を開発することを考えている (図1)。従って、まず、合目的な機能ユニット (モノマーユニット) の有機合成を徹底して行い、その後にDNA 鎖に導入してプローブを作製しその構造と塩基識別能の評価を十分に行った後に、SNPs 検出の検討を行うという方法を取ることとした。

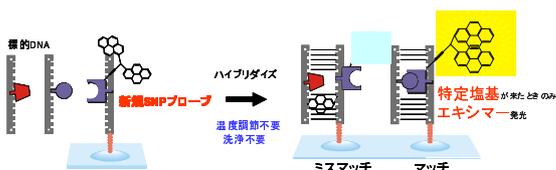


図1 新規プローブを用いた塩基識別

4. 研究成果

まず、実際にビスピレンユニットを含む核酸塩基を用いてピレンエキシマーによりビスピレンユニットの向かい側の標的塩基を識別できる分子の設計が可能であるかの検討を行った。マクロモデル等の計算ソフトを用いて分子モデリングを行った結果、オリゴヌクレオチド鎖中で目的の配列をピレンエキシマー発光により識別可能な化合物として図2に示した構造を有する化合物の設計を行った。

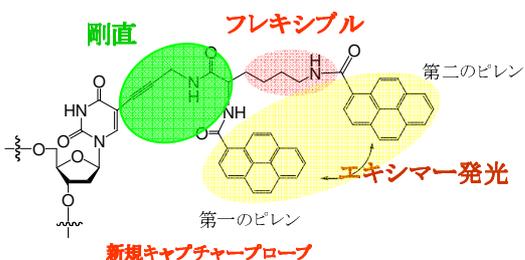


図2 新規プローブのデザイン

そこで次に、実際に何種類かの関連分子の合成を試みた。当初、ビスピレンユニットが既に導入されているモノマー分子を合成するルートを検討していたが、ビスピレンユニットを含むヌクレオシドは非常に溶媒に対する溶解度が低いことが判ったため、他のルートの検討を行った。

種々の合成ルートについて検討した結果、途中、同様に化合物の溶解性などの問題点も見られたが、第一のピレンユニットを含む新規ヌクレオシドモノマーの合成に成功した。そこでピレンを一つだけ含むヌクレオシドモノマーユニットを最初に合成し、オリゴヌクレオチド鎖に導入した後に、ポスト DNA 修飾によりビスピレンユニットを構築する方法を用いることにした。

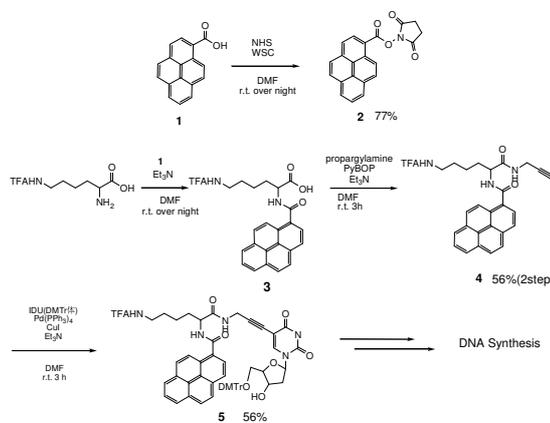


図3 モノマーユニットの合成

次に、得られたモノマーユニットを用いてオリゴヌクレオチド鎖へと導入することとした。先に合成したホスホロアミダイト体を用いて、DNA 自動合成機により目的の配列を有するオリゴヌクレオチド鎖を合成した。これをアンモニア水を用いて樹脂からの切り出しを行い、更に脱保護し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて目的とするオリゴヌクレオチド鎖の単離・精製を行った。続いて MALDI-TOFMS で目的物が得られていることを確認した。本研究を進める過程で、溶解度の問題から、目的とするビスピレンユニットを含むプローブを作製するためには、まず第一のピレンユニットを含むオリゴヌクレオチド鎖を合成し、その後ポスト DNA 修飾により第二のピレンを導入する方が良かったことは非常に大きな成果であったと考えられる。

そこで次にポスト DNA 修飾の手法を用いて、オリゴヌクレオチド鎖への第二のピレンユニットの導入の検討を行った。

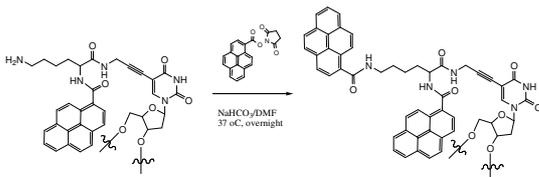


図4 ポストDNA修飾によるピレンの導入

ピレンユニットは、溶媒に対する溶解性が極めて悪かったが、種々条件検討を行った結果、DNA鎖への導入に成功した。HPLCにより単離・精製を行い、MALDI-TOFMSで目的物が得られていることを確認した。

続いて、得られたプローブDNAを用いて、DNA一塩基変異の識別能の評価を行った。

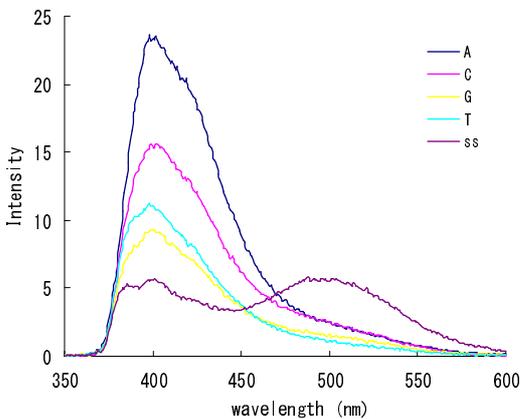
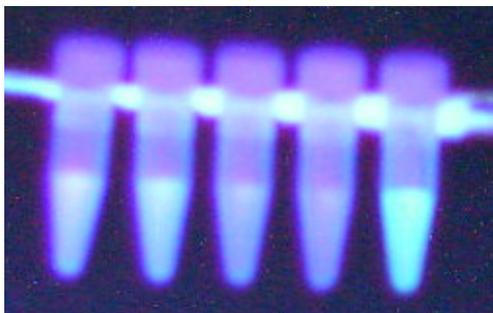


図5 蛍光スペクトル測定による塩基識別能の評価



A C G T ss

図6 エキシマー発光による一本鎖DNAの検出

フルマッチの標的DNAあるいは一塩基ミスマッチを含む標的DNAとハイブリダイズさせて蛍光スペクトルを測定した結果、フルマッチの配列のDNAの時に最も強い蛍光発光が見られ、一塩基識別能があることがわかった。しかしながら、当初の予測とは異なり、エキシマー発光が見られなかったことから、長波長での一塩基変異の検出には至っていない。今後は、モノマーユニットのリンカー部位の最適化を行い、フルマッチ配列のときにのみエキシマー発光が見られるようなプローブへと改良していきたいと考えている。

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] (計3件)

- ① Yoshio Saito, Erika Mizuno, Sekhar S. Bag, Isamu Suzuka, Isao Saito, Design of a novel G-quenched molecular beacon: A simple and efficient strategy for DNA sequence analysis. *Chem. Commun.*, 4492-4494, 2007. 査読有
- ② Yoshio Saito, Subhendu Sekhar Bag, Satoshi Kodate, Isamu Suzuka, Isao Saito, Design of dual-labeled oligonucleotide probes for SNPs genotyping. *Nucleic Acids Symp. Ser.* (2007) vol. 51, 23-24.
- ③ Yoshio Saito, Katsuhiko Matsumoto, Isao Saito, C8-alkynyl- and alkylamino substituted 2'-deoxyguanosines: A universal linker for nucleic acids modification. *Tetrahedron*, 64, 3578-3588, 2008. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 齋藤義雄、松本桂彦、水野絵梨香、小舘知史、鈴鹿敢、齋藤烈、FRETを用いた塩基識別型蛍光性核酸塩基の開発、第29回日本光医学・光生物学会、2007年7月13日、富山市
- ② 齋藤義雄、水野絵梨香、沼尻恭子、BAG Subhendu Sekhar、齋藤烈、遺伝子診断のためのクエンチャー分子を用いないモレキュラービーコンの開発、第30回日本光医学・光生物学会、2008年7月18日、松江市

6. 研究組織

研究代表者

齋藤 義雄 (SAITO YOSHIO)

日本大学工学部・講師

研究者番号 : 40385985