

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20750055
 研究課題名 (和文) 核酸塩基認識能を有する水素結合性希土類錯体の創製と核酸配列・構造解析への応用
 研究課題名 (英文) Development of hydrogen-bonding lanthanide complex that recognizes nucleic acid base and its application for the determination of DNA sequence
 研究代表者
 吉本 敬太郎 (YOSHIMOTO KEITARO)
 筑波大学・大学院数理物質科学研究科・講師
 研究者番号：60392172

研究成果の概要 (和文)：水素結合性核酸塩基認識試薬である AMND の機能化を試みるため、ランタノイド形成部位である DOTA をコンジュゲートした新規化合物 AMND-DOTA の合成を試みた。その結果、(1) AMND がエネルギー移動発光用のアンテナ蛍光団として利用可能、(2) ピリミジン塩基選択性を示す AMND の核酸塩基選択性が保持されたまま、DOTA 骨格の導入が可能、(3) DOTA 骨格へ Tb イオンを配位させることでピリミジン塩基選択性が消失する、ことを明らかとした。また、AMND-DOTA と AMND-DOTA(Tb) の混合溶液を利用することで、核酸塩基配列中の一塩基変異を水色から緑色への蛍光変色応答により識別可能であることを見出した。

研究成果の概要 (英文)： We newly synthesized a nucleobase-binding ligand, AMND-DOTA, in which 2-amino-5,7-dimethyl-1,8-naphthyridine (AMND) was conjugated with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid (DOTA) via an amide linker, and found that its terbium(III) complex (AMND-DOTA-Tb) showed green emission based on an energy transfer from the naphthyridine moiety to Tb³⁺. The nucleobase selectivity of AMND-DOTA was not changed by the conjugation of DOTA moiety to AMND, while the nucleobase-binding ability of AMND-DOTA-Tb disappeared. Finally, a mixed solution of AMND-DOTA and AMND-DOTA-Tb enabled the luminescence-based colorimetric discrimination of single-nucleotide transversions with the naked eye at a single excitation wavelength.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：核酸、分子認識、ランタノイド錯体、遺伝子診断・解析、蛍光識別、エネルギー移動発光

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの解析終了宣言以降、一塩基レベルでの核酸の塩基配列情報の取得が容易となり、様々な研究分野や臨床現場などに大きな波及効果、経済効果を生み出している。診断分野においては、疾病や薬剤耐性などと関連の深い遺伝子の同定作業が急ピッチで進められており、既に明らかとされた多型情報をマーカーとして利用する操作性の高い安価な診断システムの確立がポストゲノム時代における最も重要な課題の一つとして挙げられている。また、アンチセンス核酸や siRNA などの核酸製剤開発分野においては、標的となる既知の核酸塩基配列に選択的にハイブリダイゼーション可能な核酸分子（アンチセンス核酸、siRNA、microRNA）の設計が重要であり、ターゲットとなる RNA の立体構造情報を迅速且つ高精度に予測・決定可能な簡易測定法の開発が急務となっている。現在、このような診断、創薬分野における核酸塩基配列の読み出しや核酸高次構造の予測は、前者は主に色素を導入した高価な修飾 DNA を用いるマイクロアレイや PCR (polymerase chain reaction) により解析され、また後者は 4-6 程度の塩基対配列を認識する高価な制限酵素や熱力学的パラメータを算出する理論計算、さらには SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism: 一本鎖高次構造多型) などの原理を適用した電気泳動法により立体構造の予測が行われている（核酸構造の同定・決定は NMR や X 線結晶構造解析により可能であるが、迅速な測定法ではないため現実的ではない）。しかしながら、未だ全ての課題点を克服した決定的な測定法の確立はされていない。

申請者はこれまでタンパク質、核酸、カチオン、アニオンなどの生体関連分子を対象とする分離・分析法の研究に携わり（業績欄参照）、最近では核酸の非ワトソン・クリック塩基対部位の一塩基を蛍光プロービング可能な水素結合性小分子試薬の開発（業績欄：報文 1, 9-14）、さらに非ワトソン・クリック塩基対部位の一つである abasic site を有する核酸二重鎖が水素結合を介して補酵素であるビタミン B₂ を選択的に取り込むことなどを見出している（業績欄：報文 8）。核酸構造内における非ワトソン・クリック塩基対部位とは、通常ワトソン・クリック塩基対を形成しない abasic site、bulge、loop、mismatch 塩基対などのことであり、申請者は上記の研究成果において、核酸内部のような疎水場空間に置かれた核酸塩基であれば、naphthyridine、pterin、aroxazine などの二

つ以上の六員環を有する小分子化合物による水素結合を介した核酸塩基認識が水溶液中においても有効に発現すること、さらに核酸塩基と結合する際にこれらの化合物の蛍光が著しく消光することで核酸一塩基の蛍光（消光）検出が可能であることを世界に先駆けて見出している。

2. 研究の目的

本研究課題では、申請者がこれまで見出してきた水素結合性核酸塩基認識試薬のさらなる高機能化を進め、ランタノイド錯体部位を導入した様々な水素結合性核酸塩基認識試薬を新規合成し、これを利用する下記二つの核酸構造解析用アプリケーションの開発に関する研究を展開する。

(1) 申請者は Eu³⁺ や Tb³⁺ などのエネルギー移動発光特性の高いランタノイドイオン錯体部位を導入した水素結合性核酸塩基認識錯体を新規合成し、従来の測定原理とは異なる一塩基変異蛍光診断用マイクロアレイを構築する。

(2) 核酸切断能を有する水素結合性ランタノイド錯体を創製し、核酸断片電気泳動法に適用する。同錯体には切断能と一塩基識別能が兼ね備えられているため、非ワトソン・クリック塩基対部位の位置だけでなく、近傍の一塩基単位の核酸塩基情報も同時に得られる強力な核酸高次構造解析支援用ツールとして期待できる。

3. 研究の方法

初年度は、主に複数の水素結合性ランタノイド錯体の設計・合成とバルク溶液中における機能評価を行う期間とした。水素結合性ランタノイド錯体は、申請者がこれまで見出してきた核酸認識能を有する小分子試薬（naphthyridine、pterin、alloxazine誘導体）にポリアミノカルボン酸配位子を導入した新規化合物の合成を試みる。申請者は現在までに naphthyridine 誘導体にポリアミノカルボン酸配位子である DOTA を導入した ADMND-DOTA、ならびにその Tb³⁺ イオン錯体 ADMND-DOTA(Tb) の合成に成功し、同錯体がピリミジン塩基（C、T）選択性を有し、緑色の蛍光を発光することを見出している。特記すべきは、ADMND-DOTA(Tb) のピリミジン塩基選択性と結合定数は、錯体部位を有さない ADMND と同等であり、本誘導体化学法が水素結合性試薬の核酸塩基認識能を一切犠牲にすること無しに蛍光発色応答のみを改善する有効な手段である事が明らかとなっている。ランタノイド錯体部位と

して利用する DOTA 部位はランタノイドイオンに対する解離（置換）不活性特性を有するため、DOTAランタノイド錯体を新規タンパク質ラベル化剤として利用する研究なども活発に行われており（例えば *JACS*, **125** (12), 3436-3437, 2003）、測定中に金属イオンが脱離してしまう恐れは無い。ADMND-DOTA合成系では機能評価を行う上で十分な収率を達成したが（約60%程度の収率）、複素環アミノ基の反応性はかなり低いため、他の水素結合性試薬で上述した活性エステル化法を利用した場合に収率が少ない場合には、ハロゲン化末端と二級アミノ基との結合反応や、さらにイソチオシアネート基を有する DOTA 骨格（AB-DOTA）などを用いる等の別の合成経路を検討した。

DOTA と AB-DOTA を比較した場合、主な相違点は水素結合できるユニットの数（DOTA: 3 点、AB-DOTA: 4点）と水素結合部位からランタノイドイオンまでの距離が異なる点である。AB-DOTA に存在するチオ尿素基は水素結合能が高い官能基として知られているため、類似構造を持つ DOTA などの配位子と比較することによって、エネルギー移動発光能や核酸切断能におけるスペーサー長の効果や、核酸塩基認識における水素結合ユニットの役割などを評価することが可能であると考えられる。合成した試薬の機能が十分に無い場合には、多段階の合成経路を設計し、スペーサー長を伸ばしたものを合成すること、他のポリアミノカルボン酸配位子の導入等も検討項目として予定している。

4. 研究成果

水素結合性核酸塩基認識試薬である AMND とランタノイド形成部位である DOTA をコンジュゲートした新規化合物 AMND-DOTA の合成法を確立し、その核酸塩基認識能を評価するとともにテルビウムイオンとの錯体である AMND-DOTA(Tb)の機能評価を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。1. ナフチリジンがエネルギー移動発光用のアンテナ蛍光団として利用可能であること、2. 中性溶液環境下でピリミジン塩基選択性を示す 2-amino-5, 7-dimethyl-1, 8-naphthyridine (ND) の塩基選択性を維持したまま、DOTA 骨格の導入が可能であること（アミドタイプのナフチリジンが中性溶液中にてピリミジン塩基選択性を示した初の例）、3. DOTA 骨格導入により、ND のピリミジン塩基結合能を保持できること、4. DOTA 骨格へ Tb イオンを配位させることで、ピリミジン塩基選択性が消失すること。以上の成果をふまえ、AMND-DOTA と AMND-DOTA(Tb)の混合溶液を利用することで、核酸塩基配列中の一塩基変異

を水色から緑色への変色応答により識別可能であることを見出した。従来の蛍光変色を検出原理とする遺伝子診断法は、プローブオリゴの末端に色素を修飾したものを利用するが、本研究で提案する遺伝子蛍光診断法はそのような蛍光団修飾プローブオリゴを用いない点に新規性がある。

また、新規合成した水素結合性ランタノイド錯体に十分な核酸塩基認識能を付与させるため、（1）ナフチリジン環と錯形成部位のリンカー長を伸ばすアプローチ、（2）添加剤により三元錯体を形成させるアプローチを試みた。またこれとは別にナフチリジン自体の疎水性相互作用増大を期待し、メチル基の数を増加させた際の核酸塩基結合能の評価も試みた。1のアプローチは本年度内に合成が終了しなかったためリンカー長の影響は考察できなかったが、2のアプローチにより錯体の核酸塩基認識能を向上させることに成功した。有効であった添加剤はβ時ケトンであり、同配位子と三元錯体を形成することでエネルギー移動発光効率が上昇し、またDNA二重鎖と相互作用した際の融解温度が上昇した。また、ナフチリジン分子のメチル基の数を増大させることで核酸塩基に対するナフチリジンの結合能を上昇できることが明らかとなった。以上の結果から、新規合成した水素結合性ランタノイド錯体の低い核酸塩基認識能の要因が、ナフチリジン環と錯形成部位の距離が短いためであることが示唆された。今後は、1のアプローチを継続し、同時にナフチリジン環にメチル基を導入するというアプローチを導入することで、核酸塩基結合能を有する水素結合性希土類錯体の創製が期待できるという重要な知見を得られた。

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2件）

(1) 厚見宙志、吉本敬太郎、齋藤伸吾、大熊盛也、前田瑞夫、長崎幸夫、*Luminescence-based Colorimetric Discrimination of Single-nucleotide Transversions by the Combined Use of the Derivatives of DOTA-conjugated Naphthyridine and Its Terbium Complex*, *Tetrahedron Letters*, 査読有、50、2009、2177-2180.

(2) 佐藤雄介、西澤精一、吉本敬太郎、清野武博、森田幸太郎、寺前紀夫、*Influence of substituent modifications on the binding*

of 2-amino-1,8-naphthyridines to cytosine opposite an AP site in DNA duplexes: Thermodynamic characterization、Nucleic Acid Research、査読有、37、2009、1411-1422.

〔学会発表〕(計1件)

(1) 厚見宙志、吉本敬太郎、齋藤伸吾、大熊盛也、前田瑞夫、長崎幸夫、Synthesis of Functionalized Naphthyridine Derivatives and Its Application for Fluorescence-Based Colorimetric Discrimination of Single Nucleotide Transversion International Symposium on atomic technology、International Symposium on atomic technology (ISAT3) 3rd Polyscale Technology Workshop (PTW3)、2009年3月5日、Tokyo Internaitional Exchange Center (Tokyo、Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 敬太郎 (YOSHIMOTO KEITARO)
筑波大学・大学院数理物質科学研究科・
講師
研究者番号：60392172