

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：14701  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K05309  
研究課題名(和文) 三脚型キノン-シアニン色素の特徴を活かした4重鎖核酸イメージング蛍光色素の開発

研究課題名(英文) Development of fluorescent dyes for quadruplex nucleic acids imaging utilizing tripodal quinone-cyanine dye

研究代表者  
坂本 隆 (Takashi, Sakamoto)  
和歌山大学・システム工学部・准教授

研究者番号：80423078  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：4重鎖(G4)などの非標準的な核酸構造が、遺伝子発現制御や疾患との関連が指摘されている。これらの生物学的意義に注目が集まっているが、G4核酸の細胞内挙動を『見る』技術が未発達であり、これがG4核酸の機能解明の障害となっていた。本研究では独自開発した蛍光色素(QCy(MeBT)3)を用いて、細胞内G4核酸を『見る』新技術の開発に挑戦した。結果、QCy(MeBT)3を用いた2重鎖DNAとG4核酸の生細胞内色分け蛍光染色を実証した。また、QCy(MeBT)3誘導体の合成法の確立に成功し、近赤外蛍光(800 nm)でのG4核酸選択的な可視化が可能であることを明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

4重鎖(G4)核酸の細胞内挙動を『見る』ために、これまでにG4核酸の可視化を可能とするG4選択的蛍光色素がいくつか報告されてきている。しかし多くの場合、蛍光信号の核酸構造に対する選択性が低く、2重鎖DNAと4重鎖核酸の違いを見分けるには蛍光寿命を計測する必要があり、特別な顕微鏡システムを必要とした。本研究の成果により見出されたQCy(MeBT)3によるG4核酸可視化法では、生細胞内の2重鎖DNAと4重鎖核酸を蛍光の色で見分けることができるため、汎用の蛍光顕微鏡システムでG4核酸を可視化できる。さらにG4核酸のみに応答する蛍光色素の開発にも成功したことから、G4機能解明に大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Non-canonical nucleic acid structures, such as guanine-quadruplex (G4), have been linked to gene expression regulation and disease. Although the biological significance of these nucleic acids has attracted attention, the technology to visualize the intracellular behavior of G4 has not been developed, and this has been an obstacle to elucidating the function of G4. In this study, we challenged the development of a new technology that can visualize intracellular G4 using a fluorescent dye, QCy (MeBT)3, that we developed independently. As a result, we demonstrated in-cell color-coding fluorescence staining of double-stranded DNAs and G4 nucleic acids using QCy (MeBT)3. In addition, we succeeded in establishing a method for synthesizing QCy(MeBT)3 derivatives, and clarified that it is possible to selectively visualize G4s in near-infrared fluorescence (800 nm).

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光プローブ 4重鎖核酸

## 1. 研究開始当初の背景

DNAは細胞核に収納され、通常、そのほとんどは2重鎖構造をとっている。しかし近年、4重鎖(G4)DNAに代表される非標準的な核酸構造が、遺伝子発現の制御や疾患に関わることが指摘され、これらの生物学的意義や疾患との関連に注目が集まっている。ヒトゲノムの塩基配列中には、潜在的にG4形成可能な領域は100万以上あるとされ、また、G4構造をとるRNA(G4 RNA)が細胞内に存在することも明らかとなっている。これらの事実は、G4核酸が未知の生体制御機構の一旦を担う可能性が高いことを示しており、G4核酸の機能解明は生命科学の大きなターゲットの一つとなっている。

核酸のG4構造は動的であり、2重鎖構造とG4構造を行き来していると考えられる。そのため、これらの機能解明には、G4核酸を生細胞内でリアルタイムに可視化できる方法論が必要となる。このような観点から、細胞内のG4 DNAやG4 RNAを選択的に可視化できる蛍光分子プローブは、G4核酸の生命科学を切り拓くための重要な分子ツールとして期待されている。これまでにG4核酸可視化用の蛍光プローブとしていくつかの蛍光色素が報告されているが、多くの場合2重鎖DNAとの区別が困難で、蛍光寿命を計測し、G4核酸と2重鎖DNAに結合した蛍光プローブの蛍光寿命の違いを頼りに見分けるしかなかった。

研究開始当初までに研究代表者らは、G4核酸に蛍光応答するキノンシアニン蛍光色素(QCy(MeBT)<sub>3</sub>)の開発に成功していた。この蛍光プローブはG4核酸存在下では700 nm 蛍光の蛍光増強を、一方2重鎖DNA存在下では600 nm 蛍光の蛍光増強を示すという特異な性質を示す。既存の多くのG4核酸検出蛍光プローブと異なり、蛍光の色でG4核酸と2重鎖DNAを識別できるため、蛍光寿命計測の必要がなく、一般的な汎用の蛍光顕微鏡での観察が可能になると考えられた。

## 2. 研究の目的

独自開発したQCy(MeBT)<sub>3</sub>の細胞内G4核酸可視化能力を明らかにし、さらに、QCy(MeBT)<sub>3</sub>誘導体の合成法を開発することで、より高機能なG4核酸検出蛍光プローブの化学構造を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

培養細胞に染色液(QCy(MeBT)<sub>3</sub>の水溶液)を添加し、静置、洗浄後、蛍光顕微鏡観察を行った。染色液の組成、静置時間、洗浄方法などの諸条件を検討し、最適な蛍光イメージング条件を探索した。また、QCy(MeBT)<sub>3</sub>の誘導体の合成法を検討し、得られた誘導体の蛍光特性および非細胞系でのG4核酸検出能力、さらに細胞内G4核酸可視化能力を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 生細胞内の2重鎖DNAと4重鎖核酸とを色分けして可視化できることを実証<sup>[1]</sup>

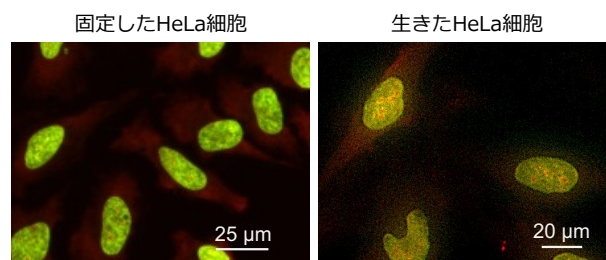


図 1. HeLa 細胞の QCy(MeBT)<sub>3</sub> による蛍光染色像。緑色：600 nm 蛍光、赤色：700 nm 蛍光

生きた HeLa 細胞の内部に存在する2重鎖DNAと4重鎖核酸に対して、QCy(MeBT)<sub>3</sub>を用いた蛍光色分けイメージングを試みた結果(図1)、2重鎖DNA由来の600 nm 蛍光とG4核酸由

来の 700 nm 蛍光が異なる位置に観測され、2重鎖 DNA と G4 核酸とを蛍光色分けして可視化できることが確認できた。種々の比較共染色実験の結果から、QCy(MeBT)<sub>3</sub> の 700 nm 蛍光は生細胞内の G4 DNA および G4 RNA に、また 600 nm 蛍光は 2重鎖 DNA に由来することを明らかにした。

(2) 生きた細胞内での G4 核酸形成ダイナミクスを可視化できることを実証<sup>[1,2]</sup>

潜在的に G4 構造を形成し得るグアニンリッチな 2重鎖 DNA の構造は、環境によって 2重鎖状態と G4 状態とを行き来する動的な状態にあると考えられ、この G4 形成のダイナミクスを生きた細胞内で解析できれば、G4 機能解明において重要な情報を提供できると考えられる。これを実証するために、まずは非細胞系での検討を行った。化学合成したグアニンリッチ DNA (カリウムイオンや相補的 DNA を加えること 2重鎖構造と G4 構造を行き来できる) を準備し、QCy(MeBT)<sub>3</sub> の蛍光応答による構造変化の検出を試みた結果、非細胞系において G4 構造の形成過程・崩壊過程を追跡できることを明らかにした。<sup>[2]</sup>

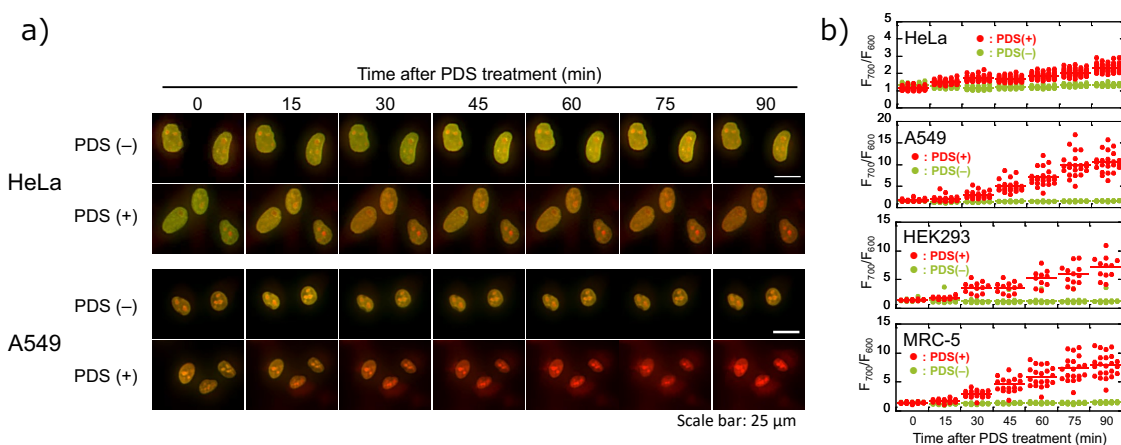


図 2. 生細胞内における G4 核酸形成のタイムラプスイメージング. a) G4 核酸安定化剤 (PDS) 添加後の蛍光像の経時変化. b) 細胞内の蛍光強度比 (緑色 : 600 nm 蛍光, 赤色 : 700 nm 蛍光) の経時変化.

次に、生細胞内の G4 形成ダイナミクスの可視化を実証するために、QCy(MeBT)<sub>3</sub> で染色した細胞に、G4 核酸安定化剤であるピリドスタチン (PDS) を添加し、その後の蛍光画像の変化を追跡した (図 2 a)。結果、PDS 添加後、徐々に 700 nm 蛍光 (赤色) の強度が増加していく様子が観測された。この変化は PDS を添加しない場合には観測されなかったことから、PDS により誘導された核酸 G4 構造の形成過程を追跡できることが明らかとなった。2重鎖 DNA 由来の 600 nm 蛍光と G4 核酸由来の 700 nm 蛍光の強度比を解析した結果 (図 2 b) から、PDS による生きた細胞内での G4 核酸形成を、さまざまな細胞で追跡できることが明らかとなった。<sup>[1]</sup>

(3) QCy(MeBT)<sub>3</sub> 誘導体の合成に成功し、4重鎖核酸選択的な近赤外蛍光可視化プローブとして有用であることを実証<sup>[3]</sup>

QCy(MeBT)<sub>3</sub> に種々の官能基を導入することで、蛍光の長波長化や細胞導入効率の向上が望めると考え、QCy(MeBT)<sub>3</sub> の誘導体化法を検討した。結果、合成原料の 2-メチルベンズチアゾリウムカチオンのメチル基を種々の官能基に変更することで誘導体化が可能であることを明らかにした。得られた QCy(MeBT)<sub>3</sub> 誘導体の蛍光特性や核酸応答能力を調査した結果、QCy(BnBT)<sub>3</sub> (図 3 a) が特徴的な蛍光特性および核酸応答性を示すことが明らかとなった。具体的には、QCy(BnBT)<sub>3</sub> の蛍光は 2重鎖 DNA には応答せず G4 核酸にのみ応答し、この蛍光波長が 800 nm をピークトップに持つことが明らかとなった。このことは QCy(MeBT)<sub>3</sub> のメチル基をベンジル基に変更することで、2重鎖 DNA への親和性が著しく低下したことを示しており、G4 核酸選択的な蛍光プローブとして有用であることを示している。また、蛍光波長が大幅に長波長シフト (700 nm → 800 nm) し、生体組織透過性の高い近赤外領域に位置することから、G4 核酸の in vivo イ

メージングプローブとしての有用性も示唆された。<sup>[3]</sup>

この QCy(BnBT)<sub>3</sub> を用いて生細胞内 G4 核酸の可視化を試みた結果 (図 3 b)、QCy(MeBT)<sub>3</sub> の場合に見られる 2 重鎖 DNA 由来の 600 nm 蛍光が全く観測されず、G4 核酸由来の 800 nm 蛍光のみ観測されることが確認でき、G4 核酸選択的な近赤外蛍光可視化プローブとしての有用性を示すことができた。

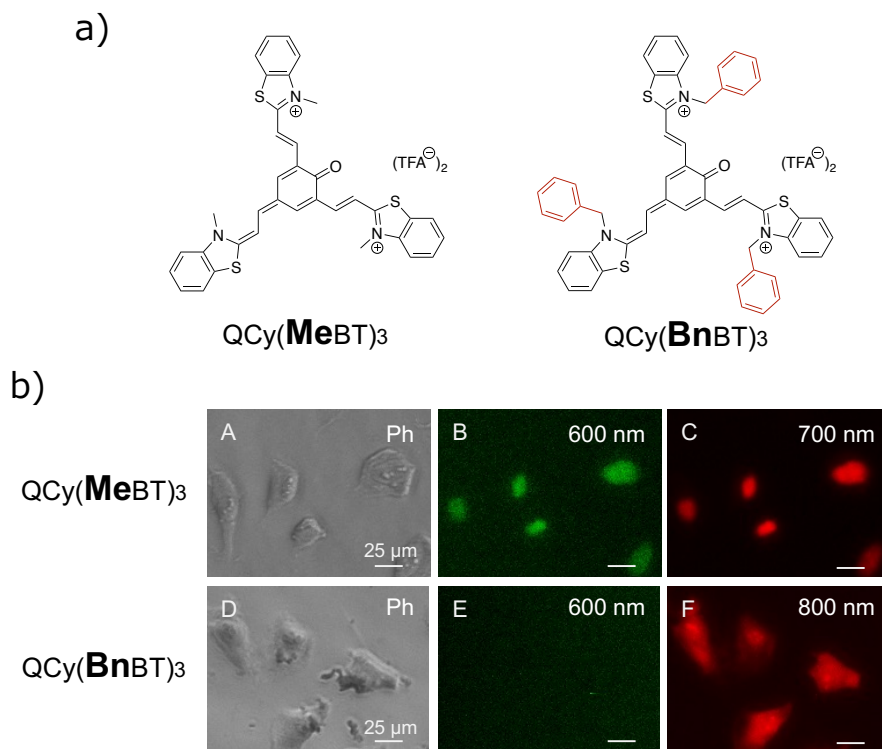


図 3. QCy(MeBT)<sub>3</sub>、およびその誘導体 (QCy(BnBT)<sub>3</sub>) の化学構造 (a) と、生細胞内核酸の染色結果 (b)。

以上のことから、QCy(MeBT)<sub>3</sub> の細胞内 G4 核酸可視化プローブとしての有用性を実証するとともに、同様の骨格を持つ誘導体の合成法の確立、また、極めて高い G4 核酸選択性という新たな機能の創出に成功した。

<引用文献>

- 1) Takashi Sakamoto, Zehui Yu, Yuto Otani, Dual-color fluorescence switch-on probe for imaging G-quadruplex and double-stranded DNA in living cells, *Analytical Chemistry*, **94**(10), 4269–4276 (2022)
- 2) Takashi Sakamoto, Zehui Yu, Tripodal quinone-cyanine fluorescent dye as a tool for analyzing structural dynamics of DNA guanine-quadruplex, *Chemistry Letters*, **51**(12), 1139–1142 (2022)
- 3) Yuka Muraoka, Junya Muramoto, Yu Yasuhara, Mayuko Kawatake, Takashi Sakamoto, Near-infrared fluorescent switch-on probe for guanine-quadruplex imaging with extremely large stokes shift, *Analytical Chemistry*, **95**(47), 17162–17165 (2023)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Sakamoto Takashi, Yu Zehui  | 4. 巻<br>51                |
| 2. 論文標題<br>Tripodal Quinone-cyanine Fluorescent Dye as a Tool for Analyzing Structural Dynamics of DNA Guanine-quadruplex | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>Chemistry Letters   | 6. 最初と最後の頁<br>1139 ~ 1142 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1246/cl.220420  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Sakamoto Takashi, Yu Zehui, Otani Yuto  | 4. 巻<br>94                |
| 2. 論文標題<br>Dual-Color Fluorescence Switch-On Probe for Imaging G-Quadruplex and Double-Stranded DNA in Living Cells | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>Analytical Chemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>4269 ~ 4276 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1021/acs.analchem.1c04804   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Muraoka Yuka, Muramoto Junya, Yasuhara Yu, Kawatake Mayuko, Sakamoto Takashi                                | 4. 巻<br>95                  |
| 2. 論文標題<br>Near-Infrared Fluorescent Switch-On Probe for Guanine-Quadruplex Imaging with Extremely Large Stokes Shift | 5. 発行年<br>2023年             |
| 3. 雑誌名<br>Analytical Chemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>17162 ~ 17165 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1021/acs.analchem.3c04318   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                   |

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 2件／うち国際学会 3件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>坂本隆、村岡優香、于ゾウ慧、川竹万柚子                  |
| 2. 発表標題<br>D3A型キノン-シアニン蛍光色素の核酸認識に与えるアクセプター構造の影響 |
| 3. 学会等名<br>第17回バイオ関連化学シンポジウム                    |
| 4. 発表年<br>2023年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>坂本隆、村岡優香、于ゾウ慧、川竹万柚子          |
| 2. 発表標題<br>D3A 型キノン-シアニン蛍光色素による核酸イメージング |
| 3. 学会等名<br>第33回バイオ・高分子シンポジウム            |
| 4. 発表年<br>2023年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>村元順哉、安原優、坂本隆日本化学会第103春季年会              |
| 2. 発表標題<br>がんの光線力学療法を志向した三脚型キノン-シアニン色素の活性酸素生成能の評価 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第103春季年会                          |
| 4. 発表年<br>2023年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>村岡 優香、安原 優、岩井 まり奈、坂本 隆               |
| 2. 発表標題<br>DNA 2 重鎖・4 重鎖二色蛍光スイッチオンプローブの結合選択性の制御 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第103春季年会                        |
| 4. 発表年<br>2023年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>村元順哉、安原優、坂本隆                         |
| 2. 発表標題<br>がんの光線力学療法を指向した3脚型キノン-シアニン色素の光増感活性の評価 |
| 3. 学会等名<br>第16回バイオ関連化学シンポジウム                    |
| 4. 発表年<br>2022年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>村岡優香、安原優、岩井まり奈、坂本隆                 |
| 2. 発表標題<br>3脚型キノン-シアニン蛍光色素の核酸構造認識を制御するための化学修飾 |
| 3. 学会等名<br>第16回バイオ関連化学シンポジウム                  |
| 4. 発表年<br>2022年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>村岡優香、安原優、岩井まり奈、坂本隆                    |
| 2. 発表標題<br>3脚型キノン-シアニン色素誘導体の4重鎖および2重鎖DNAに対する蛍光応答 |
| 3. 学会等名<br>日本ケミカルバイオロジー学会第16回年会                  |
| 4. 発表年<br>2022年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>坂本隆、岩井まり奈                                       |
| 2. 発表標題<br>生細胞内局所粘度イメージングを目指した3脚型キノン-シアニン近赤外蛍光色素の粘度応答性能の制御 |
| 3. 学会等名<br>日本ケミカルバイオロジー学会第16回年会                            |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takashi Sakamoto, Yuka Muraoka, Yu Yasuhara, Marina Iwai   |
| 2. 発表標題<br>Controlling the fluorescence response of tripodal quinone-cyanine dyes upon nucleic acid binding |
| 3. 学会等名<br>The 49th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2022) (国際学会)                   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大谷悠人、坂本隆                       |
| 2. 発表標題<br>膜透過性官能基を導入した三脚型キノン-シアニン蛍光色素の合成 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第102春季年会                  |
| 4. 発表年<br>2022年                           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>村岡優香、坂本隆   |
| 2. 発表標題<br>種々のベンゾチアゾリウムカチオン誘導体を含む3脚型キノン-シアニン蛍光色素の核酸に対する蛍光応答 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第102春季年会                                    |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>坂本隆、于ゾウ慧、大谷悠人                                |
| 2. 発表標題<br>DNA構造に選択的な2色蛍光スイッチオンプローブを用いた4重鎖構造形成のリアルタイム追跡 |
| 3. 学会等名<br>第15回バイオ関連化学シンポジウム                            |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>坂本隆、于ゾウ慧、大谷悠人                            |
| 2. 発表標題<br>2重鎖と4重鎖を色分けして検出できる蛍光プローブを用いた細胞内DNAイメージング |
| 3. 学会等名<br>第31回バイオ・高分子シンポジウム                        |
| 4. 発表年<br>2021年                                     |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>坂本隆、于ゾウ慧、大谷悠人                         |
| 2. 発表標題<br>細胞内 4 重鎖核酸イメージングのための 3 脚型キノーンシアニン蛍光色素 |
| 3. 学会等名<br>日本ケミカルバイオロジー学会第15回年会                  |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takashi Sakamoto, Zehui Yu, Yuto Otani   |
| 2. 発表標題<br>A dual fluorescence turn-on probe for simultaneous imaging of double-stranded DNA and G4 DNA |
| 3. 学会等名<br>The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2021) (国際学会)               |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>坂本隆                                   |
| 2. 発表標題<br>核酸構造の色分けイメージングを可能とする蛍光プローブの開発         |
| 3. 学会等名<br>第17回若手技術者交流会 (主催: 和歌山県化学技術者協会) (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takashi Sakamoto  |
| 2. 発表標題<br>A dual-color fluorescence switch-on probe for imaging the dynamics of guanine quadruplexes in cells |
| 3. 学会等名<br>FIBER Webinar Universe in Nucleic Acids Chemistry 4 (招待講演) (国際学会)                                   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|