

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月23日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22850001

研究課題名（和文） 蛍光性核酸結合リガンド群を用いたマルチカラー蛍光アッセイ法の開発

研究課題名（英文） Development of multicolor fluorescent assay based on nucleic acid-binding ligands

研究代表者

佐藤 雄介 (SATO YUSUKE)

東北大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：90583039

研究成果の概要（和文）：脱塩基部位結合リガンドと蛍光応答性インターカレーターとを連結した一連のコンジュゲートを設計・合成し、これら新規コンジュゲートを用いて遺伝子解析（一塩基多型検出）へと適用した。ここでは、多彩な蛍光波長を示すシアニン色素を当該設計におけるインターカレーターとして用いることに着目し、脱塩基部位対面ピリミジン塩基選択性を有する青・緑・赤色蛍光応答型コンジュゲートを開発することに成功した。

研究成果の概要（英文）：A series of conjugates of abasic site-binding ligands with fluorescent signaling intercalators have been synthesized with a view toward gene analysis, especially single nucleotide polymorphisms (SNPs). With focusing on the variability of the emission wavelength of DNA-binding cyanine dyes by modification of their structures, blue, green, red fluorescence signaling conjugates have been developed for the selective detection of pyrimidine nucleobase over purine nucleobases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,250,000	375,000	1,625,000
2011年度	1,150,000	345,000	1,495,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：分析化学

キーワード：AP site；蛍光性リガンド；シアニン誘導体；マルチカラー蛍光解析；遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

核酸は本来遺伝情報を担う生体高分子である一方で、水素結合、スタッキング相互作用、静電相互作用などの分子間力を有効に活用しうる分子認識素子としても有望である。分子認識能を有する機能性核酸はアプタマーと呼ばれており、これらを基盤としてイオン・有機小分子・核酸・タンパク質など様々

標的に対するバイオセンサーが盛んに開発されている。特に、蛍光性バイオセンサーは高い時間・空間分解能を有しており、明瞭なシグナルが獲得できるという特徴から、分析化学的な有用性は極めて高い。しかし、天然の核酸は天然の核酸は非蛍光性であるため、蛍光性核酸プローブ調製のために、複数の蛍光色素、消光団等を共有結合によって核酸に化学標識（ラベル化）する必要がある。しか

し、ここではラベル化反応後、未反応ラベル化剤の洗浄操作が不可欠であるため、多大な合成労力を必要とするとともに操作の迅速性、簡便性という点において大きな問題点がある。加えて、高価な蛍光色素等を複数使用するため、1 アッセイあたりの経済性という点においても改善が必要であり、既存の化学修飾による蛍光ラベル化法の弱点を補う新たな核酸へのラベル化法の開発が重要な研究課題となっている。

そこで、核酸に対して非共有結合的に結合し、蛍光応答を示す分子（リガンド）を用いたラベル化に着目した。このタイプの試薬としては、インターカレーターとグロブバインダーがよく知られており、両者とも核酸染色剤として極めて有用な分析試薬としての位置づけが確立している。しかし、その一方でこれらリガンドの結合選択性は乏しく、前者は1本鎖/2本鎖DNAの識別能、後者はATリッチ配列選択性を持っているのみであり、その機能と分析化学的応用には限界があると言わざるを得ない。事実、これら既存のリガンドを用いた場合、DNA構造（または部位）特異的な蛍光ラベル化を達成することができない。さらには、上記既往のリガンドでは、一般的に蛍光特性を合理的に可変することは困難であり、同一溶液内において使用が限られているため、多検体同時計測が困難である。

2. 研究の目的

本研究では、マルチカラー蛍光アッセイを指向したDNA構造特異的な蛍光ラベル化試薬の開発とこれらを用いた多検体同時測定・検出を目的とした。具体的には、これまでに本研究グループにより開発を進めてきた脱塩基部位（AP site）結合リガンドを基盤として、さらに蛍光特性を容易に可変できる特徴があるシアニン色素を導入した機能性コンジュゲートを網羅的に設計・合成し、これらコンジュゲートを蛍光ラベル化試薬として様々な標的に対するアプタマー系と併用することで多検体検出へと適用する。

3. 研究の方法

マルチカラー蛍光アッセイに供しうる蛍光性リガンド群の開発に向けて、合理的かつ効率的な戦略に基づいてリガンド設計を行った。ここでは、これまでに開発してきたDNA二重鎖中AP site結合リガンド（図1a）に、DNA結合性蛍光色素であるシアニン誘導体（図1b）を連結したコンジュゲートを創製することに着想した。ここでは、AP site結合部位と蛍光シグナル応答部位とを分割し、それぞれの部位に対して連結のための官能基

を導入した後、コンジュゲートすることで、AP site 対面塩基選択性およびシアニン誘導体が示す蛍光波長とを論理的に組み合わせることが可能であり、合理的にコンジュゲート網羅の開発を行うことができる（図1）。

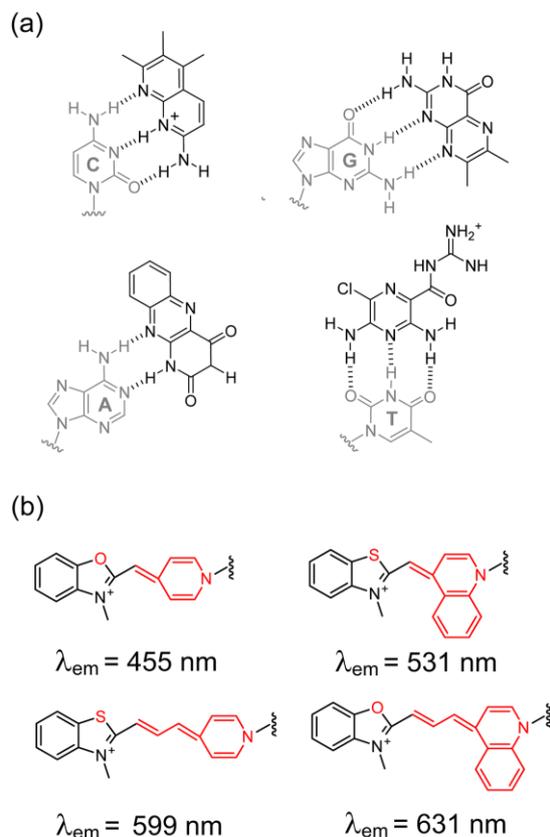


図1 (a) 脱塩基部位結合リガンドならびに (b) シアニン誘導体

本研究で目的とするコンジュゲート設計において、蛍光シグナル応答部位としてシアニン誘導体を用いている。これは、上記に述べたようにその構造により容易に蛍光波長を調節できる点（図1b）に加えて、シアニン誘導体が核酸二重鎖に結合し、明瞭な発蛍光応答（10～1000倍）を示すことも本系において重要な特性である。すなわち、シアニンを導入したコンジュゲートにおいて、AP site結合とシアニンによる二重鎖への結合により、AP site結合単独と比較して、結合親和力が增大するものと期待できる。さらに、コンジュゲートのAP site含有DNA二重鎖への結合イベントをシアニン由来の蛍光波長において明瞭な発蛍光応答として効果的に読み出すことが可能となる（図2）。

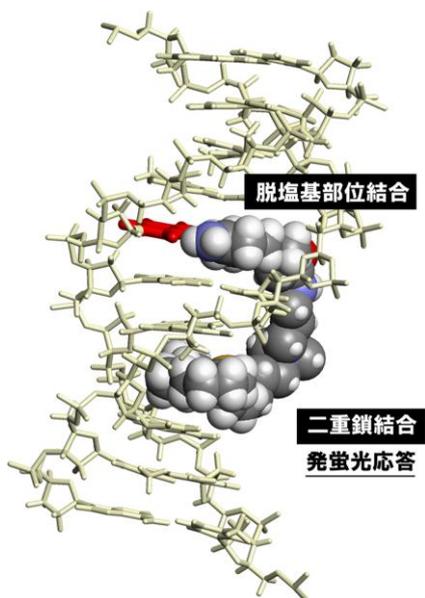


図2 予想されるコンジュゲートの結合様式

4. 研究成果

コンジュゲート設計における AP site 結合リガンドとして、DNA 二重鎖中 AP site 対面のシトシンおよびチミン塩基に選択的に強固に結合する ATMND (2-amino-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridine) を用いた。一方で、シアニン誘導体として、二重鎖にインターカレーションして発蛍光応答を示す Thiazole Orange (TO) を用いた。合成スキームは図3に示す通り、ATMND 2位アミノ基からアルキルリンカーを介して末端アミノ基を導入した誘導体(1)および TO のキノリン環に末端カルボン酸を導入した誘導体(2)をそれぞれ独立に合成した後、脱水縮合にてこれらの誘導体を連結し、コンジュゲート ATMND-C10-TO を得た。ここでは、縮合剤存在下で反応させ、中圧カラムクロマトグラフィーにて精製し、構造を NMR, HRMS にて確認した。コンジュゲートにおいて、各部位間に比較的長いリンカーを用いているが、これは AP site 結合およびインターカレーションという異なる二種の結合を効果的に作用させることを期待した。

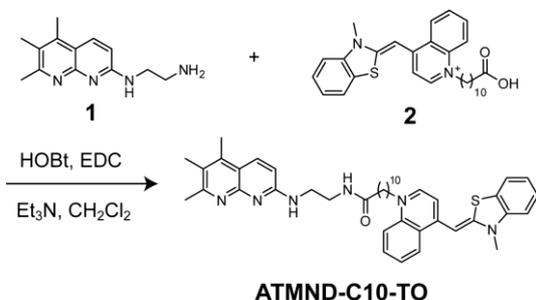
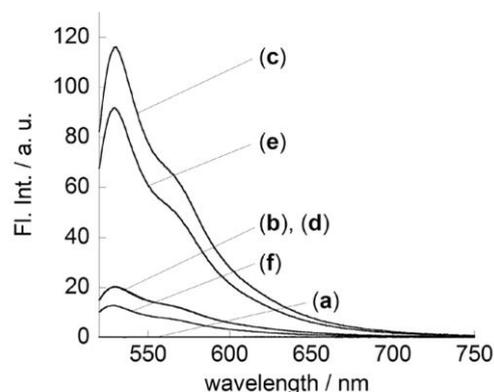


図3 ATMND-C10-TO 合成スキーム

ATMND-C10-TO と AP site 含有 DNA 二重鎖 ($5' -ATT TGG GTG AXA TTG CTC ACA-3' / 3' -TAA ACC CAC TNT AAC GAG TGT-5'$, $X =$ AP site (dSpacer) or A, $N = G, C, A$ or T) との相互作用を蛍光測定により評価した ($pH = 7.0$, $I = 0.11 M$, EtOH $4.1 \times 10^{-3}\%$, $20^\circ C$)。その結果、コンジュゲートはシトシンおよびチミンに選択的に結合し、TO 由来の蛍光 ($\lambda_{em} = 530 nm$) が著しく増加することを見出した (図 4a)。観測された塩基選択性は、AP site 結合部位であるナフチリジン誘導体の結合選択性を反映している。また、TO 部位の明瞭な発蛍光応答は、TO が DNA 二重鎖に挿入されることに起因していると考えられ、誘起 CD (円二色性) 測定の結果もこれを支持している。蛍光滴定測定からシトシンおよびチミンに対する 1 : 1 結合に基づく解離定数はそれぞれ 4.5、15 nM に達し、コンジュゲートが極めて高い結合力を発現することが分かった。また、ATMND-C10-TO のシトシン、チミンに対する明瞭な発蛍光応答を用いて、25 nM DNA サンプルに対して UV ランプ照射下において目視検出することが可能であることを見出した (図 4b)。

(a)



(b)

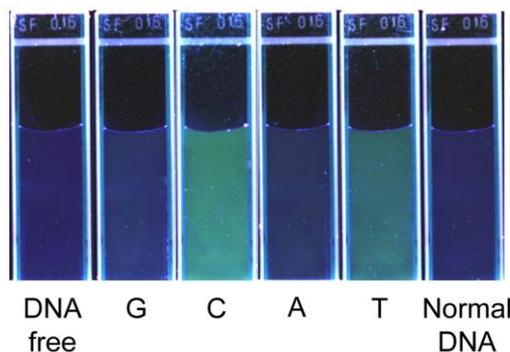


図4 (a) ATMND-C10-TO の蛍光応答: AP site 含有 DNA 二重鎖 (a) DNA free, (b) N = G, (c) N = C, (d) N = A, (e) N = T; (f) fully-matched DNA 二重鎖 (b) UV 照射下における目視検出

コンジュゲートの蛍光応答に与えるリン

カー効果を検討するために、記合成スキームに従って合成した ATMND-C9-T0 および ATMND-C11-T0 の AP site 含有 DNA 二重鎖に対する蛍光応答を検討した。その結果、リンカー長に関わらずいずれのコンジュゲートもシトシン、チミン塩基選択的な発蛍光応答が観測された。しかしながら、その蛍光応答はリンカー長に依存しており、C10 リンカーを持つコンジュゲートが最も大きな蛍光応答を示すことが分かった。

異なる蛍光特性を有するシアニン誘導体を導入することにより、緑色蛍光を示す ATMND-C10-T0 に加えて、青色、赤色蛍光応答を示すコンジュゲート (ATMND-C10-B0、ATMND-C10-T03) を開発することに成功した。ここでは、シトシン、チミン選択性を保持したまま、導入するシアニン誘導体を変化させることで蛍光波長を合理的に調節できることを実証した(図5)。

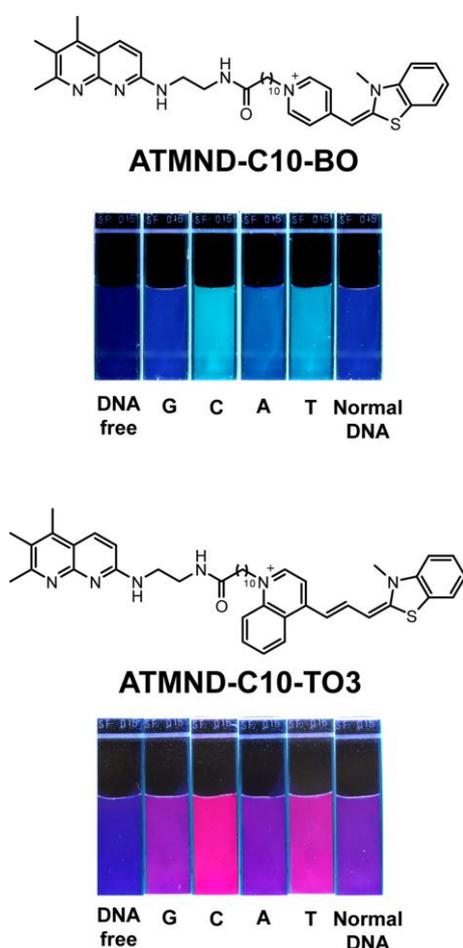


図5 ATMND-C10-B0 および ATMND-C10-T03 の蛍光応答

さらに、AP site 結合部位を変化させることで、塩基選択性を制御できることを見出した。ここでは、AP site 対面シトシン選択性を示すナフチリジン誘導体をコンジュゲート

ト設計に組み込むことで、高いシトシン選択的な発蛍光応答を実現した。

以上のことから、AP site 結合部位およびシアニン誘導体を組み合わせることで、コンジュゲートの塩基選択性および蛍光波長を論理的に制御できることを見出した。したがって、本設計指針に従って網羅的に AP site 結合リガンド-シアニン誘導体コンジュゲートを開発し、アダプターを基盤とするバイオセンサーへと展開できるものと期待できる。さらに、開発したコンジュゲートは DNA, RNA 変異に関連する遺伝子解析においても有効であるものと考えている。

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0件)

[学会発表] (計5件)

- (1) マルチカラー蛍光アッセイを指向した脱塩基部位結合リガンド群の開発
佐藤雄介、工藤恵、王春霞、西澤精一、寺前紀夫、日本化学第92春季年会、慶應義塾大学、2012/3/25-28
- (2) Megumi Kudo, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa, and Norio Teramae
Light-up response to pyrimidine nucleobase opposite an abasic site in DNA duplexes by naphthyridine-cyanine conjugates
3rd Asian Spectroscopy Conference, Xiamen University, China, 2011/11/29-12/01
- (3) 脱塩基部位を標的とする核酸結合リガンドの開発と遺伝子解析への応用
佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫
日本分析化学会第60年会、名古屋大学、2011/9/14-16
- (4) ナフチリジン-シアニン誘導体コンジュゲートを用いた核酸発蛍光検出
工藤恵、佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫
日本分析化学会第60年会、名古屋大学、2011/9/14-16
- (5) ナフチリジン-シアニン誘導体コンジュゲートの合成と遺伝子解析への応用
工藤恵、佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫
みちのく分析科学シンポジウム 2011、山形大学、2011/7/23

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 雄介 (SATO YUSUKE)
東北大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：90583039

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：