

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350082

研究課題名(和文)環境感応型蛍光核酸塩基の分子設計と画期的な蛍光核酸プローブへの展開

研究課題名(英文) Design of Environmentally Sensitive Fluorescent Nucleosides and Their Application to Innovative Fluorescence Probe for Gene Analysis

研究代表者

斎藤 烈 (SAITO, Isao)

日本大学・工学部・研究員

研究者番号：20026082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環境に感応しその蛍光強度、波長が劇的に変わる画期的な環境感応型蛍光核酸塩基の開発を行なった。例えば、新たな分子内CT構造を有する蛍光核酸塩基をデザインし、溶媒の極性により劇的に蛍光強度を変化させる性質を有する事を見いだしている。さらに、多くの候補となる修飾蛍光核酸塩基の中から、ミクロ環境に特異的に感応して蛍光が大きく変化させる核酸塩基を多数見いだしており、中でも特に優れた蛍光特性を有する7-デアザプリン誘導体を用いたプローブの開発に成功している。また、細胞内での分子イメージング等にも使えるような構造認識機能をもつ蛍光核酸塩基をデザインする事にも初めて成功している。

研究成果の概要(英文)：We have designed a novel type of base-discriminating fluorescent (BDF) nucleosides which are used for SNP genotyping and gene detection. We also succeeded to design environmentally sensitive fluorescent (ESF) nucleosides that emit strong fluorescence at different wavelengths depending upon a difference of local environment near the ESF base. The newly designed ESF nucleosides may discriminate structural changes such as single strands, matches, mismatches and deletions when incorporated in DNA by a significant change of emission wavelengths as well as their intensities. Quencher and end free molecular beacons (MB) were discovered for the first time by using newly designed ESF nucleosides. These low cost MB were used for the gene detection in a cell. ESF nucleosides that are sensitive to pH were also designed. Such pH sensor ESF nucleoside that emits strong fluorescence only at below pH 5.5 was used for the detection of cancer cell.

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：DNA プローブ

1. 研究開始当初の背景

近年、環境により鋭敏に蛍光波長が変わる環境感応型のアミノ酸 (Environmentally Sensitive Fluorescent Amino Acids, ESF アミノ酸) が開発され、これを蛋白に導入することにより、蛋白の会合、結合、フォールディングなどの構造変化を蛍光で直接モニターする研究が Schulz らにより開始され大きな反響を呼んでいる。それに対して、蛍光を発する蛍光性核酸塩基は多数開発されているものの、周りのマイクロ環境に感応して蛍光強度、波長が劇的に変わる環境感応型の蛍光核酸塩基 (Environmentally Sensitive Fluorescent Base, ESF 塩基) はこれまでほとんど知られておらず、その分子設計のコンセプトを提唱した例もない。

2. 研究の目的

本研究では、1) ESF 核酸塩基を分子設計するための新しいコンセプトを提唱し、それに基づいて世界で始めて実際に ESF 蛍光核酸塩基を分子設計し、2) これを様々な核酸 (DNA, RNA) に化学的または酵素的に導入し、核酸の局所構造の違い、蛋白との結合の有無等を蛍光でモニターする画期的なシステムを開発する。さらに、ESF 核酸塩基を含む DNA プローブを駆使することにより、これまでは全く例のない構造認識機能をもつ蛍光核酸プローブの開発研究を押し進める。さらに、上記の目的に加えて、実用的な面で重要な周辺の pH 変化をモニターできる蛍光核酸塩基の開発を行い、酸性特有のガンの画像診断に結びつける研究等も行う。

3. 研究の方法

(1) 修飾核酸塩基に二重結合あるいは三重結合を介して置換芳香族化合物を連結した一群の蛍光核酸塩基を化学合成した。これらの化合物は、置換基を変えることにより、分子内に CT 性を創出し、様々な波長の蛍光特性を有する核酸塩基を合成できる。さらに、核酸塩基の骨格であるプリン環の窒素原子を炭素に置き換えたデアザプリン化合物を多数合成し、DNA 内で相手塩基を認識しかつ蛍光を発するよう分子設計した。加えて、Solvchromicity を出すため、様々な置換基を導入し、蛍光波長の溶媒依存性をモノマーレベルで詳しく検討した。

様々な新規蛍光性核酸塩基の蛍光特性をしらべ、Solvchromicity の大きい分子を選び出し、それらを DNA 鎖に導入し、DNA の環境変化によって、蛍光の波長、強度がどのように変化するかを検討し、環境に感応する蛍光核酸塩基 (Environmentally Sensitive Fluorescent Base, ESF) 塩基を開発した。

開発した ESF 塩基を含む DNA 蛍光プローブを用いて、様々な構造の DNA, RNA の構造変化を蛍光の波長、強度をモニターする研究を行った。

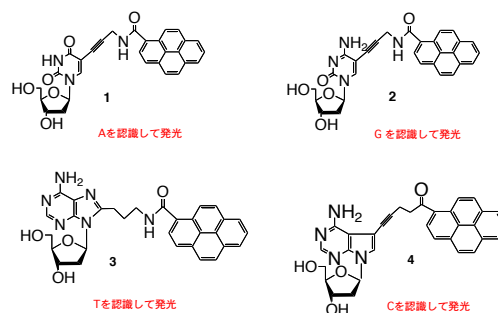
(2) 現在遺伝子の検出に用いられているモレキュラービーコンはヘアピンオリゴヌクレオチドの両末端に蛍光分子と消光剤の双方を導入しなければならないが、我々は ESF 塩基を活用して消光剤を必要としない全く新しいタイプの一本鎖のモレキュラービーコン (MB) の開発を目指した。

(3) 分子内 CT quench 機構を応用して、弱酸性側で特異的に発光する pH センサー核酸塩基をデザイン合成する。

4. 研究成果

(1) 塩基識別型蛍光核酸塩基 (BDF) の分子設計と応用

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。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。



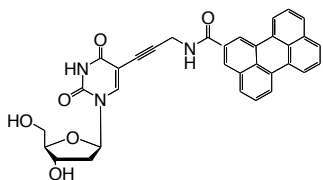
これらの BDF 塩基を塗布した DNA チップを企業と共同で開発し、数種のコンテンツを含む遺伝子診断用 DNA チップを開発した。

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

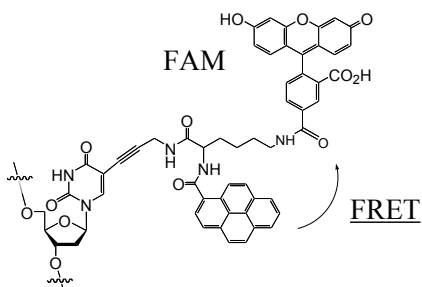
ている。

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。

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。



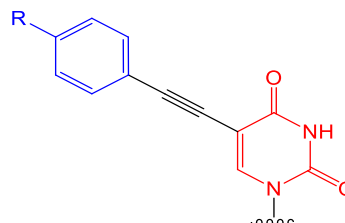
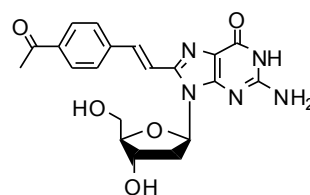
FRETを用いて長波長で蛍光発光を検出する新しいシステムの開発にも成功した。DNAインクに使うのに相応しい新しいBDFの開発にも成功し、企業で現在その有用性が検討されている。



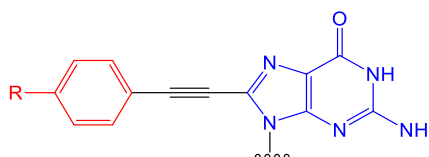
(2) 環境感応型蛍光核酸塩基 (ESF 塩基) 分子設計のコンセプトとその応用

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 (ESF 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。ESF 塩基は下の例に示すように分子内で Donor 部と Acceptor 部を合わせ持つ構造が重要であり、分子内 CT 励起状態が溶媒極性や水素結合により変わるため Solvchromicity が生じ、その結果周りの環境 (極性、水素結合、疎水性、pH、分子の混み合い) に依存した蛍光波長、強度を示す。数十種類の蛍光核酸塩基の中から見つけた ESF 塩基の代表例を以下に示す。

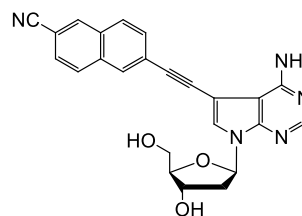
Acceptor Donor



Donor Acceptor



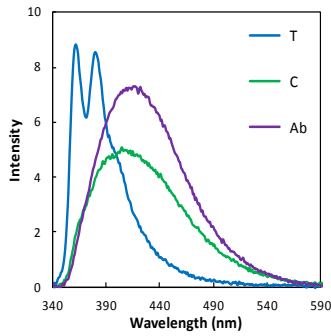
Acceptor Donor



Acceptor Donor

上記のいずれの核酸塩基も強い Solvchromicity を示し、水、エタノールなどの極性溶媒中では長波長の蛍光を発し、酢エチ、THF などの非極性溶媒では短波長により強い蛍光を発する。

更に重要な ESF 塩基の分子設計のポイントは、ESF 塩基が DNA 中に導入されても、天然塩基と同様に 2 重鎖を安定に形成し、相手塩基をきちんと認識することである。我々は、多くの ESF 塩基の中から、7-deazadenosine 誘導体 ^{CNd}A および 7-deazaguanosine 誘導体 NdG が、対塩基 T および C をそれぞれ厳密に認識し、安定な塩基対を作り、かつ周辺の環境によりその蛍光波長および強度を著しく変える事を見いだした。代表的な環境依存型蛍光核酸塩基 (ESF 塩基) による対面塩基識別の例を以下に示す。

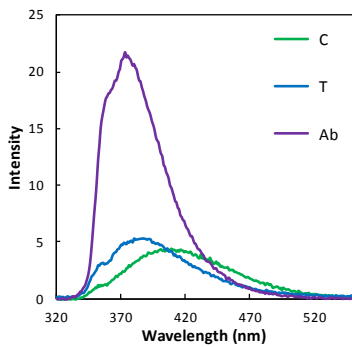


T
Abasic
A

波長

^{CNd}A を用いた結果

SF 塩基 ^{CNd}A は対塩基が full match の T の時にのみ短波長にシフトし強い dual 蛍光を発する。



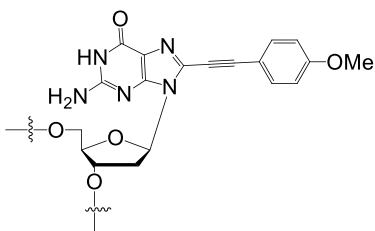
C
A
Abasic

波長

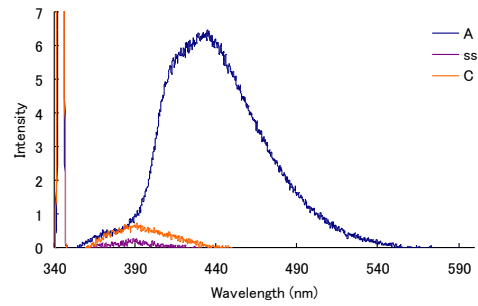
NdG を用いた結果

一方、ESF 塩基 NdG は、full match の C の時に、超波長にシフトする。いずれの場合にも、Abasic Site (塩基が欠損) の時には、極めて強い蛍光を発する。従って、蛍光の波長や強度で対塩基や塩基欠損を判定することができる。

対塩基がアデニンの時のみ Exciplex を形成し、長波長に exciplex 特有の 480nm の強い蛍光を発する塩基識別能をもつ下の蛍光核酸塩基 BDF を開発した。この塩基を DNA プロープに導入すると、特定配列のなかの対塩基 A のみを認識し長波長発光する蛍光プローブとして使うことができる。



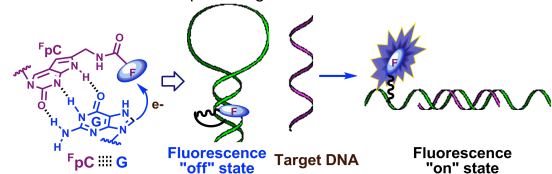
A と exciplex を形成する ESF 塩基



(3) 消光剤を必要としないモレキュラービーコン(MB)の開発

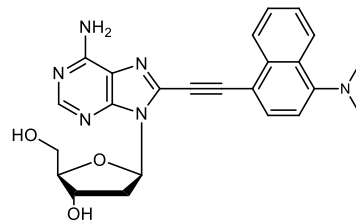
従来の MB はヘアピンループの両末端に蛍光分子と消光剤をもつ構造のものであるが、消光剤と蛍光分子双方をいれなければならない、手間もかかり高コストである。我々の開発した MB は、天然のグアニン塩基 (G) を消光剤とするもので、簡便性とコストの点で従来の MB をはるかに凌がするものである。

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光するが、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も成功している。

さらに、従来のヘアピンループ構造をもつ MB に対して、一本鎖で中央部に ESF 塩基 X をもつ蛍光プローブが DNA 検出にきわめて有効である事をつきとめ、世界で初めて消光剤を必要としない一本鎖 MB の開発に成功した。

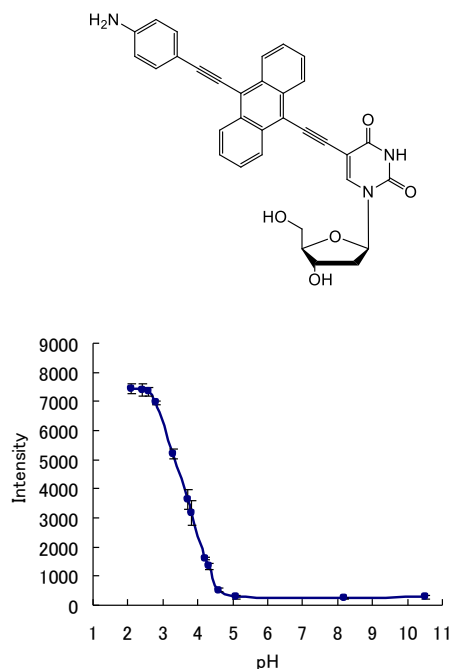


一本鎖 MB のための ESF 塩基 X

(4) pH センサー蛍光核酸塩基の開発

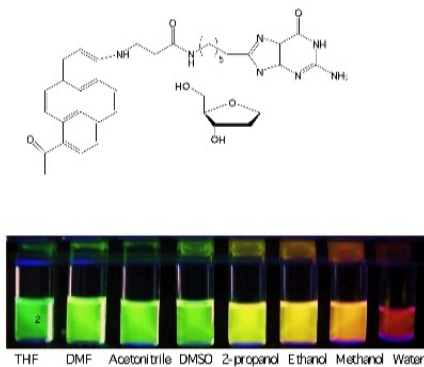
弱酸性になった時のみ蛍光を発光する pH センサー核酸塩基の開発を目指し、下記のアミノ置換ベンゼン核を有するアントラセン

置換ウリジン誘導体が、きわめてすぐれた pH センサーである事を突き止め、実際に微酸性であるガン細胞でのみ強い蛍光を発光する事を確かめた。これは、アニリン部位とアントラセン発色団との間の pH 依存 CT quenching 機構で蛍光の ON-OFF が制御できること実証し、実際の固体ガン細胞にも使えるかどうか検討を予定している。



(5) 環境により色が変わるカメレオン型蛍光核酸塩基の開発

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、このタイプの蛍光核酸塩基のデザインコンセプトを提唱した。天然の核酸塩基、例えばグアノシンにリンカーを経て強い solvchromocity をもつピレン誘導体を連結したもので、溶媒の極性により発光波長が 150 nm 近く変化する。



この種のカメレオン型蛍光核酸塩基を DNA プローブの蛋白結合サイトに導入し、DNA と蛋

白との結合状態を蛍光の波長でモニターするシステムの開発を行った。

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] (総計 14 件)

- ① An Environmentally Sensitive Fluorescent Purine Nucleoside that Changes Emission Wavelength upon Hybridization. Y. Saito, A. Suzuki, Y. Okada, Y. Yamasaka, N. Nemoto, and I. Saito, **Chem. Commun.** 49, 5684-5686 (2013). 査読有り.
- ② Synthesis of Solvatochromic 7-Arylethynylated 7-Deaza-2'-deoxyadenosine Derivatives: Application to the Design of Environmentally Sensitive Fluorescent Probes Forming Stable DNA Duplexes. A. Suzuki, K. Kimura, S. Ishioroshi, I. Saito, N. Nemoto, and Y. Saito, **Tetrahedron Lett.**, 54, 2348-2352 (2013). 査読有り.
- ③ A Peptide Nucleic Acid (PNA) Heteroduplex Containing an Inosine-Cytosine Base Pairs Discriminates a Single Nucleotide Difference in RNA. K. Matsumoto, E. Nakata, T. Tamura, I. Saito, Y. Aizawa and T. Morii, **Chemistry - A European Journal** 19, 5034-5040 (2013). 査読有り.
- ④ Naphthalene-based Environmentally Sensitive Fluorescent 8-Substituted 2'-Deoxyadenosines: Application to DNA Detection. A. Suzuki, N. Takahashi, Y. Okada, I. Saito, N. Nemoto, and Y. Saito, **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 23, 886 (2013). 査読有り.
- ⑤ Efficiency Through DNA by Inserting Consecutive 5-Phenylethynyl-2'-deoxyuridines as a Modulator. M. Tanaka, K. Oguma, Y. Saito and I. Saito, **Chem. Commun.** 48, 9394-9396 (2012). 査読有り.
- ⑥ Fluorometric Detection of Adenine in Target Exciplex Formation with Fluorescent 8-Arylethynylated Deoxyguanosine. Y. Saito, K. Kugenuma, M. Tanaka, A. Suzuki, and I. Saito, **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 22, 3723-3726 (2012). 査読有り.
- ⑦ Fluorescent Nucleosides with 'On-Off' Switching Function; pH-responsive Fluorescent Uridine Derivatives. Y. Saito, S. Miyamoto, A. Suzuki, K. Matsumoto, T. Ishihara and I. Saito, **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 22, 2753-2756 (2012). 査読有り.
- ⑧ Enhancement of Fluorescence Quenching and Exciplex Formation in DNA Major Groove by Double Incorporation of Modified Fluorescent Deoxyuridines. M. Tanaka, K. Oguma, Y. Saito, and I. Saito, **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 22, 4103-4105 (2012). 査読有り.
- ⑨ Design and Application of Novel Nucleobase Analogs as an Environmentally Sensitive Probe. M. Tanaka, K. Oguma, R. Kozakai, K. Kugenuma, Y. Saito

and I. Saito, *Photomedicine. Photobiology*, 33, 47-484 (2011).

⑩ Synthesis and Photophysical Properties of Novel Push-Pull-Type Solvatochromic-7-Deaza-2'-deoxyourine epurine Nucleosides. Y. Saito, A. Suzuki, S. Ishioroshi and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 4726-4729 (2011). 査読有り.

⑪ Stabilization of DNA Duplex by 2-Substituted Adenine as a Minor Groove Modifier. M. Tanaka, R. Kozakai, Y. Saito and I. Saito, *Bioorg. Med. Chem Lett.*, 21, 7021-7024 (2011). 査読有り.

⑫ Synthesis of Environmentally Sensitive 2'-Deoxyguanosine Containing Solvatochromic Pyrene Fluorophore. Y. Saito, Y. Shinohara, S. Ishioroshi, A. Suzuki, M. Tanaka and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 52, 2359-2361 (2011). 査読有り.

⑬ Design and Synthesis of Highly Solvatochromic Fluorescent 2'-Deoxyguanosine and Adenosine Analogs. K. Matsumoro, N. Takahashi, A. Suzuki, T. Morii, Y. Saito and I. Saito, *Bioorg. Med. Chem Lett.*, 21, 1275-1279 (2011). 査読有り.

⑭ Synthesis and Photophysical Properties of 8-Arylbutadienyl 2'-Deoxyguanosines. Y. Saito, M. Koda, Y. Shinohara and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 52, 491-494 (2011). 査読有り.

[学会発表] (総計 9 件)

① A. Suzuki, Y. Yamasaka, I. Saito and Y. Saito, Synthesis and photophysical properties of environmentally sensitive 8-aza-7-deazapurine nucleosides forming stable Watson-Crick base pair, ISNAC 2013 (第 40 回国際核酸化学シンポジウム), 2013 年 11 月 13 日、神奈川大学

② A. Suzuki, I. Saito, N. Nemoto, Y. Saito, Environmentally sensitive fluorescent 8-aza-7-deaza-2'-deoxy-adenosines that form a stable Watson-Crick base pair and their photophysical properties, International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan 2013 年 9 月 東北大学 川内北キャンパス

③ 鈴木 梓・齋藤 烈・根本修克・齋藤 義雄 環境感応型蛍光性 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の開発と DNA プローブへの応用 2013 年光化学討論会 2013 年 9 月 愛媛大学 城北地区

④ 鈴木 梓・齋藤 烈・齋藤 義雄 8-アザ-7-デアザプリン骨格を有する環境感応型蛍光核酸塩基の開発と遺伝子検出への応用 第 35 回日本光医学・光生物学会 2013 年 7 月 アクトシティ浜松 コンgressセンター

⑤ 鈴木 梓・岡田雄慈・本田かおり・齋藤 烈・齋藤 義雄 新規蛍光性 8-アザ-7-

デアザプリンヌクレオシド誘導体の合成と光学と光学特性 日本化学会第 93 春季年会 (2013) 2013 年 3 月 立命館大学びわこ・くさつキャンパス

⑥ A. Suzuki, I. Saito, N. Nemoto, Y. Saito Synthesis and photophysical properties of environmentally sensitive 7-deaza-2'-deoxyadenosine analogs ISNAC 2012 (第 39 回国際核酸化学シンポジウム) 2012 年 11 月 名古屋大学 東山キャンパス

⑦ 鈴木 梓・宮本 茂憲・横山 祥太・石原 務・齋藤 烈・根本 修克・齋藤 義雄 pH 変化に敏感なアントラセン骨格を有する蛍光性ヌクレオシドの開発と応用 2012 年光化学討論会 2012 年 9 月 東京工業大学 大岡山キャンパス

⑧ A. Suzuki, I. Saito, N. Nemoto and Y. Saito Synthesis and photophysical properties of novel push-pull type fluorescent purine and 8-deazapurine 2'-deosynucleotides IS3NA: 2012 年 8 月 カナダ・モントリオール Centre Mont-Royal

⑨ 鈴木 梓・石下真也・築場 匠・齋藤 烈・根本修克・齋藤 義雄 デアザプリン骨格を有する新規蛍光ヌクレオシドの合成と光学特性 日本化学会第 92 春季年会 (2012) 2012 年 3 月 慶応義塾大学 日吉キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 烈 (SAITO, Isao)

日本大学・工学部・研究員

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