

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590043

研究課題名(和文) 蛍光及び超音波を用いるDNAの可視化と切断

研究課題名(英文) Visualization and cleavage of DNA using fluorescence and ultrasonication

研究代表者

中園 学 (Nakazono, Manabu)

九州大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90336074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：様々な非対称型インドリルマレイミド誘導体が合成され、その光学特性が明らかにされた。いくつかのインドリルマレイミド誘導体は、大きいストークスシフト及び550 nm以上の蛍光発光極大波長を有した。二本鎖DNA存在下、インドリルマレイミド誘導体の蛍光が測定された。N-メチルキノリンを有するインドリルマレイミド誘導体の蛍光強度は、二本鎖DNA存在下、増加した。

研究成果の概要(英文)：Various unsymmetric indolylmaleimides were synthesized and the optical property was clarified. Some indolylmaleimides have large Stokes shifts and fluorescence emission maxima wavelengths of more than 550 nm. The fluorescence of indolylmaleimides was measured in the presence of double strand DNA. The fluorescence intensities of indolylmaleimides having N-methyl quinoline increased in the presence of double strand DNA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、物理系薬学

キーワード：蛍光 インドリルマレイミド DNA

### 1. 研究開始当初の背景

新たな蛍光化合物として対称型インドリルマレイミド (IM) 誘導体の開発を行ってきた。しかし、分析試薬としての有用性を示すに至っていなかった。水溶液中での測定を可能とする IM 誘導体が望まれた。そこで、様々な非対称型 IM 誘導体を合成し、特定の測定対象物質に親和性を有する非対称型 IM 誘導体の開発に取り組んだ。

繁用されている DNA 検出用蛍光プローブのほとんどが短波長に吸収を有する化合物である。そこで、420 nm 以上の可視部に吸収を有し、長波長蛍光が期待される低分子の蛍光プローブが必要となる。

### 2. 研究の目的

新規かつ有用性の高い蛍光プローブを開発するには、化合物合成とその光学特性が詳細に解析されなければならない。

化合物合成には、Grignard 反応、鈴木—宮浦カップリング及び Wittig-Horner 反応などの炭素—炭素結合反応を用いた。二本鎖 DNA への親和性を考慮し、同一平面性及びカチオン性を有する非対称型 IM 誘導体を設計した。

現在までに開発されたアミロイドβ (Aβ) の検出用プローブのほとんどがπ-共役を有する芳香族化合物である。合成した化合物のほとんどがπ-共役を有していることから、アミロイドへの親和性が期待されアミロイド検出に適用することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 非対称型 IM 誘導体の合成及び光学特性

非対称型 IM 誘導体の合成を Scheme 1 に基づいて合成した。π-共役の延長による様々な蛍光発光波長を有するであろうと予測される IM 誘導体を設計した。構造内にベンゼン、ナフタレン、キノリン、スチリルベンゼン及びカルバゾールなどの芳香族化合物を導入した。合成には、インドールを出発物質とし、Grignard 反応及び鈴木—宮浦カップリング反応を用いる方法 (Scheme 1a) と鈴木—宮浦カップリング反応及び Wittig-Horner 反応を用いる方法 (Scheme 1b) を採用した。合成した IM 誘導体を Table 1 に示す。構造解析は、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 及び HR TOF-MS を用いた。合成した IM 誘導体は、ジメチルホルムアミド (DMF) 及びアセトニトリル (CH<sub>3</sub>CN) に溶解し、吸収及び蛍光が測定された。

#### (2) 二本鎖 DNA に親和性を有する非対称型 IM 誘導体

二本鎖 DNA の親和性を期待し、同一平面性及びカチオン性に着目し、Table 2 に示す化合物を選択した。Table 2 の IM 誘導体溶液 (10 μM, 2.7 ml) に、二本鎖 DNA (サケ精子、2.31 mg/ml) のリン酸塩緩衝溶液 (pH 7) を加え、蛍光測定する。同様に、化合物 21 に関して、20 mer 及び 30 mer 二本鎖 DNA

(200 μM) を用いて検討した。

Scheme 1 非対称型 IM 誘導体の合成法

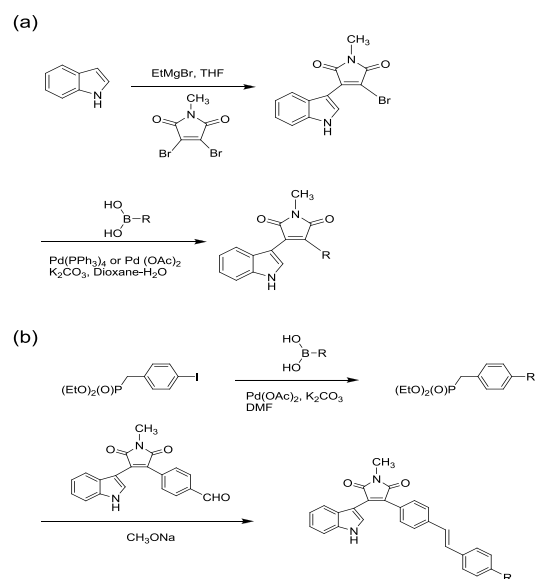
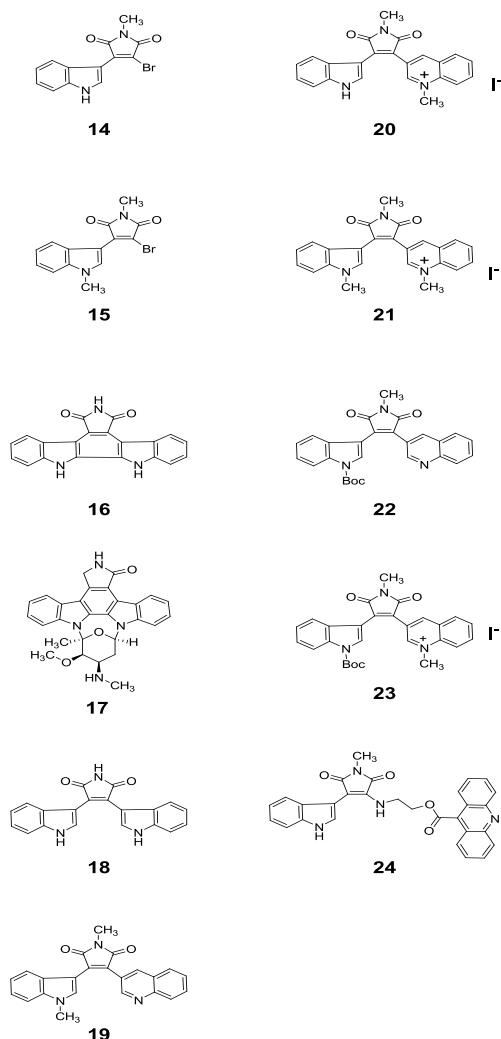


Table 1 非対称型 IM 誘導体

Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
1	H	
2	H	
3	H	
4	H	
5	H	
6	H	
7	H	
8	H	
9	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	
10	H	
11	Boc	
12	H	
13	Boc	

Table 2 二本鎖 DNA との親和性が評価された IM 誘導体



### (3) 非対称型 IM 誘導体によるアミロイド検出

Table 1 の化合物 1-4 及び化合物 6-8 を用いて、アミロイド検出に適するかどうか評価した。蛍光顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 非対称型 IM 誘導体の合成及び光学特性

化合物 1-13 (Table 1) が比較的容易に合成された。DMF 中、ほとんどの化合物の吸収極大波長は、430 nm 以上であった。化合物 5 の吸収極大波長は、約 500 nm であり最も長い。ベンゼン、ナフタレン、スチリルベンゼン及びピチオフェンの導入により蛍光発光波長は長波長にシフトしている (Figure 1)。化合物 7-13 のストークスシフトは 100 nm 以上であった。化合物 13 の蛍光強度が最も強く、化合物 3 の蛍光量子収率が最も高かった。化合物 3, 13, 7, 9 及び 5 は、365 nm の光照射で異なった蛍光が見られた。

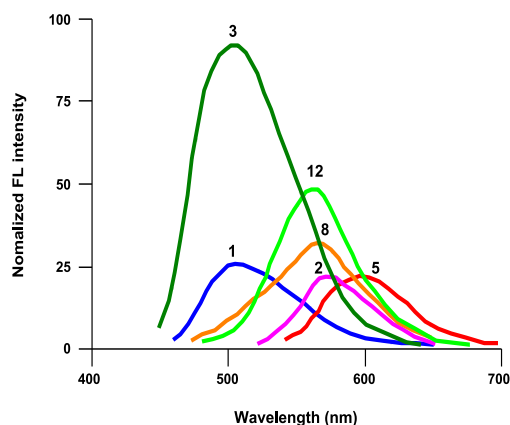


Figure 1 化合物 1, 2, 3, 5, 8 及び 12 の蛍光発光スペクトル

### (2) 二本鎖 DNA に親和性を有する非対称型 IM 誘導体

二本鎖 DNA 存在下、検討した化合物のほとんどが蛍光変化を示さなかった。化合物 20 及び化合物 21 (Table 2) の蛍光励起極大波長は 470 nm 以上、蛍光発光極大波長も 570 nm と長波長であった。化合物 20 及び化合物 21 は、二本鎖 DNA 存在下、その蛍光強度が増加した (Figure 2)。

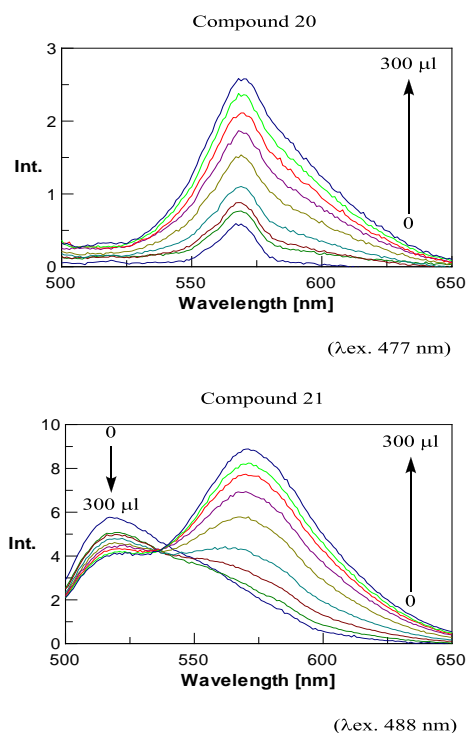


Figure 2 二本鎖 DNA 存在下、化合物 20 及び 21 の蛍光発光スペクトル

キノリン部位の *N*-メチル化が二本鎖 DNA への親和性を増加させたと予測される。二本鎖 DNA に対する化合物 21 の蛍光変化は化合物 20 のそれより大きい。化合物 21 は、20 mer 及び 30 mer 二本鎖 DNA 存在下、その蛍光強度が増加した。Boc 基を導入した化合物 23 は、二本鎖 DNA 存在下、その蛍光変化が見られなかった。

### (3) 非対称型 IM 誘導体によるアミロイド 検出

アミロイドの組織染色に用いられている Congo Red と比較した。3-(1*H*-Indol-3-yl)-1-methyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-2,5-dione (化合物 1、Table 1) がアミロイドに対し親和性及び感度ともに良好であった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- [1] Z. Zheng, Y. Zhao, M. Nakazono, S. Nanbu, Theoretical study of photo-physical properties of indolylmaleimide derivatives, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 査読有、14, 3017–3024 (2012).
- [2] T. Murakami, M. Nakazono, A. Kondorskiy, T. Ishida, S. Nanbu, Photochemical dynamics of indolylmaleimide derivatives, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 査読有、14, 11546–11555 (2012).
- [3] M. Nakazono, K. Obayashi, Y. Oshikawa, K. Tani, Y. Ando, S. Nanbu, R. Kuwano, Unsymmetric indolylmaleimides; Synthesis, photophysical properties and amyloid detection, *Journal of Photochemistry and Photobiology A. Chemistry*, 査読有、289, 39–46 (2014).

〔学会発表〕 (計 6 件)

- [1] 中園 学、発光及びフラーレン化合物の実験と理論、シンポジウム「新生命科学分野開拓とスーパーコンピュータ「京」」、2012 (福岡)
- [2] M. Nakazono, S. Nanbu, R. Kuwano, Fluorescence property of unsymmetric indolylmaleimide derivatives, SCS-2012 Fall Meeting, 2012 (Zürich, Switzerland)
- [3] 中園 学、新規化学発光化合物の開発、第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2013 (東京)

[4] 中園 学、大林光念、押川祐二、多仁一司、末永元輝、安東由喜雄、南部伸孝、桑野良一、非対称型インドリルマレイミド (合成、蛍光特性及びアミロイド検出)、第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2013 (東京)

[5] M. Nakazono, K. Obayashi, Y. Oshikawa, K. Tani, G. Suenaga, Y. Ando, S. Nanbu, R. Kuwano, Unsymmetric Indolylmaleimides (Synthesis, photophysical properties and amyloid detection), The Twelfth Asian Conference on Analytical Sciences, 2013 (Fukuoka, Japan)

[6] 中園 学、大林光念、佐々本一美、富吉勝美、末永元輝、安東由喜雄 様々なアミロイドを検出する化合物の開発、日本薬学会 134 年会 (熊本)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中園 学 (NAKAZONO MANABU)

九州大学大学院薬学研究院・助教

研究者番号：90336074

(3) 連携研究者

南部 伸孝 (NANBU SHINKOH)

上智大学理工学部・教授

研究者番号：00249955