

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651255

研究課題名(和文) 含ケイ素高輝度蛍光剤の開発とこれによる蛍光応答型ゲノム高精度解析基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of fluorogenic probe for gene-analysis utilizing novel silylated fluorescent material

研究代表者

篠塚 和夫 (Shinozuka, Kazuo)

群馬大学・理工学研究院・教授

研究者番号：20206105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光性物質であるピレンに、修飾が可能なケイ素官能基などを導入することにより、これまで無い高輝度な新規蛍光剤を開発することと、このような蛍光剤を用いた遺伝子解析用プローブ開発の為に基盤技術の確立を目標に研究を行った。

新規な蛍光剤として、ピレン分子にケイ素官能基および電子求引性を持つ官能基を結合させる事で、元のピレンに比べて蛍光強度が2倍に増強された新たな蛍光剤を得る事に成功した。さらにこの誘導体をDNAの末端に導入する事にも成功した。一方、アジド基を持つケイ素官能基を結合したピレンの合成とそのDNA中への導入にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Novel pyrene derivatives having modifiable silylated functional group were developed. Among these, a derivative possessing azide function was successfully incorporated into a modified DNA having alkynyl function via click chemistry. Also, a silylated pyrene possessing strong electron-withdrawing group (cyano function) was synthesized first time. The derivative exhibited marked red-shift on both absorption and emission spectra compare to that of the unmodified pyrene. In addition, fluorescent quantum yield of the derivative was increased almost twice as much as that of the unmodified pyrene. This unique derivative was further derived to the corresponding phosphoramidate derivative and was incorporated into 5'-terminus of oligoDNA.

研究分野：複合新領域

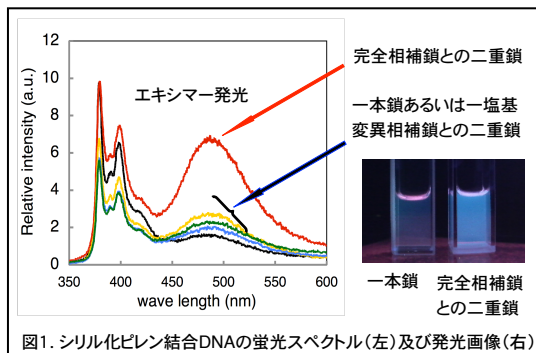
科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：バイオプローブ 含ケイ素高輝度蛍光剤

1. 研究開始当初の背景

近年研究及び医療の両面で、疾病の発症や薬剤感受性を支配する要因となる SNP's や、突然変異を誘発する塩基欠損損傷などを正確かつ迅速に検出する技術の重要性が高まっている。従来これらの正確な検出には、特異な4種類の蛍光標識化ヌクレオチドと酵素 (DNA ポリメラーゼ) を用いる塩基配列直接解析法が多く用いられているが、迅速性や簡便性に劣り、さらに高価な特殊試薬・機器を必要とするなど、医療現場における汎用性の点で大きな問題があった。

筆者らは、トリメチルシリル化された芳香族化合物では、ケイ素の特異な σ - π 共役効果によって光吸収効率及び蛍光強度が増大する (S. Kyushin, et al, *Organometallics*, **15**, 1067, 1996) ことに注目し、それまで例のない、修飾可能なシリル型官能基を持つ高輝度新規ピレン誘導体を開発した。さらに、これを糖部分に結合した修飾ヌクレオチドを2分子連続して導入したオリゴ DNA は、一本鎖状態、或は1塩基変異を持つ相補鎖存在下では蛍光が強く消光され、一方完全に相補的な DNA 鎖存在下では、2分子のピレンが近接して発するエキシマー蛍光を発して、その差は目視によっても充分確認できるほど大きい事を見だし、遺伝子中の一塩基変異を蛍光応答で識別する新たなプローブ開発の可能性を開いた (図1 *Chem. Lett.*, **39**, 1254, 2010, Editor's Choice 論文)。



その後の詳細な解析により、シリル化されたピレンの単分子は、核塩基 T、C、G との強い光励起相互作用によりほぼ完璧に蛍光消光を受ける事を見だし、これが上記の一本鎖状態、及び一塩基変異相補鎖存在下での蛍光性 DNA の消光に強く関係する事を見出した。また、ピレン分子のシリル化反応についてもその基本条件をほぼ確立する事に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、上に述べた様なこれまでの研究成果を基に、以下の点を達成、あるいは明らかにする事を目的とした。

1) これまでの研究成果の基づき、シリル化されたピレン分子を基盤として、電子供与性のシリル基に加えて、強力な電子求引性を

併せ持つ事で、いわゆるプッシュ・プル効果により蛍光輝度を飛躍的に向上させた新たな含ケイ素蛍光剤の開発。また、一級アミノ基やアジド基などの様々な置換基を持つ事で、縮合反応やクリック反応等を用いて核酸等の生体材料に容易に導入できる新たな含ケイ素蛍光剤の開発。

2) 得られた新規なシリル化ピレン誘導体をオリゴ核酸中に導入する事で、核酸の一本鎖状態及び相補的二重鎖状態などの構造変化と連動して蛍光の発光・消光が生起する、新規な機能性蛍光核酸プローブを開発し、従来の蛍光核酸プローブでは実現困難な「蛍光応答、あるいは蛍光増幅による標的遺伝子、およびその塩基欠損損傷や一塩基変異 (SNP's) の検出」を簡便かつ正確に行うことのできる、新たな遺伝子精密分析プローブへと発展させるための基盤技術の開発。

3. 研究の方法

本研究で新たに開発を目指した「様々な生体材料に適用可能な多様な置換基を持ち、かつ蛍光輝度を飛躍的に向上させた新たな含ケイ素蛍光剤」の構造を図-2に示す。

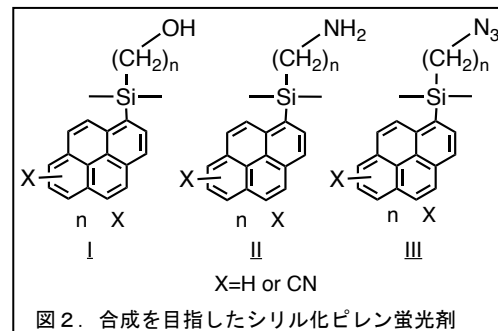
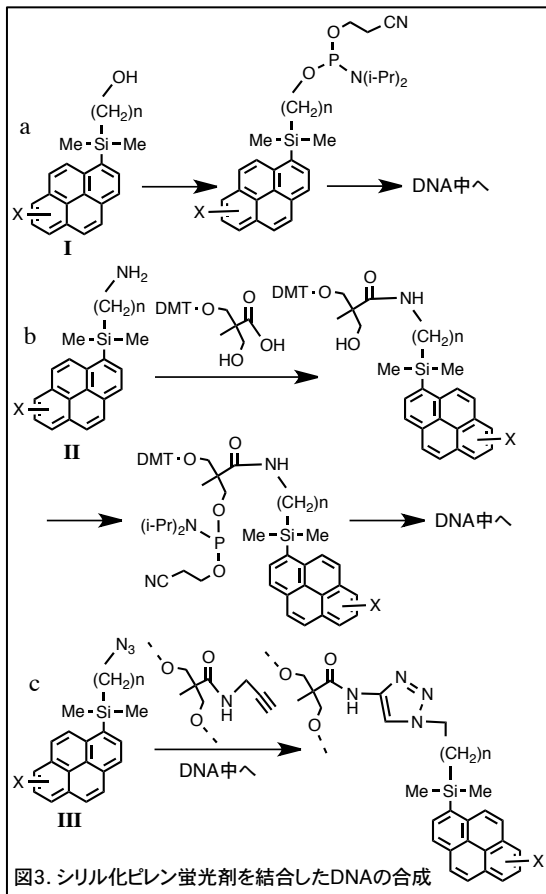


図2. 合成を目指したシリル化ピレン蛍光剤

本研究では先ずこれらの新規な蛍光剤についての合成研究を行った。合成に当たってはこれまでの筆者らの研究により開発されたピレン分子のシリル化反応を拡張し、さらに適宜適当な化学反応を組み合わせる実施した。さらに、得られたシリル化ピレン誘導体については紫外・可視分光光度計及び蛍光分光光度計等を用いて、光吸収特性及び発光波長、ストークスシフト、発光輝度などの分光学的特性について解析を行った。

また、「一本鎖状態及び相補的二重鎖状態などの、核酸自身の構造変化と連動して蛍光の発光・消光が生起する、新規な機能性蛍光核酸プローブの開発」においては、上記の研究で得られた新規なシリル化ピレン誘導体を DNA 自動合成機に適用可能な修飾体へと変換し、これを用いて DNA の末端に導入する手法を用いた (図-3a)。同様に、シリル化ピレン誘導体をこれまで筆者らが開発した非ヌクレオシド型核酸スcaffoldingと結合し、さらにこれらを DNA 中の任意の位置に導入する手法についても検討を行った (図-3b 及び図-3c)。

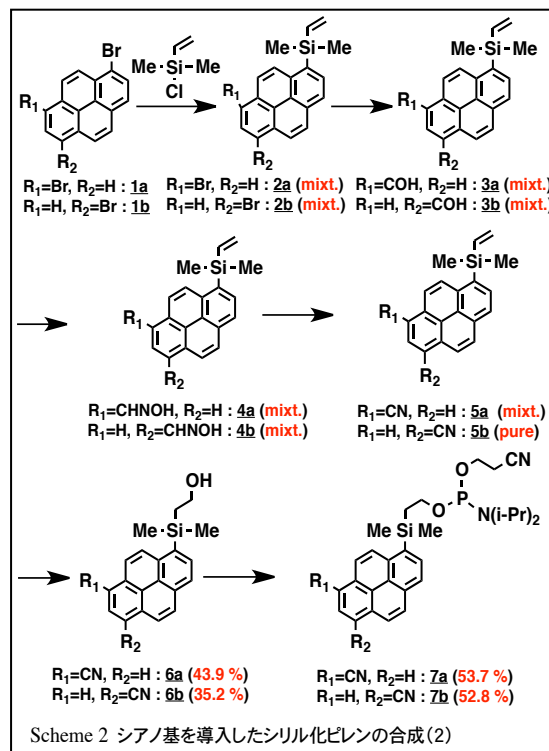
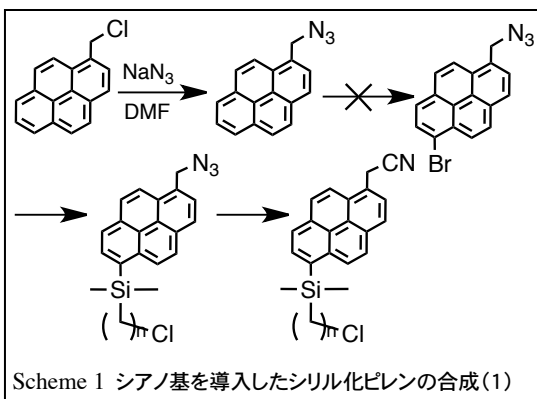


4. 研究成果

【電子供与性のシリル基に加えて、強力な電子求引性を併せ持つシリル化ピレン誘導体の合成】

強力な電子吸引性基としてシアノ基を持つシリル化ピレン誘導体(I)の化学合成を、Scheme 1 に示す当初計画したルートに従って試みた。しかしながら、クロロメチルピレンからアジドメチルピレンへの誘導には成功したもの、これにシリル基を導入する為に必要な臭素化については、種々条件を検討したものの複雑な混合物が生成し、効率よく目的物を得る事ができなかった。

そこで新たに Scheme 2 に示す合成ルートを考案し、これに従って合成を行ったところ、目的とする新規なシリル化ピレン誘導体を得る事に成功した。



本合成ルートではまず、予め臭素置換基を持つジブromoピレンにアリルジメチルシリルクロライドを反応させて一方の臭素置換基のみをシリル基で置換し、その後に残った臭素置換基をホルミル化した後に、さらにこれをシアノ基に変換している。このような合成ルートに変更する事で、目的とする置換可能なシリル基としてヒドロキシエチルジメチルシリル基を持ち、同時に強力な電子吸引性基であるシアノ基を併せ持つ新たなピレン誘導体 **6a** 及び **6b** を合成する事に成功した。

6a 及び **6b** はさらに常法によって DNA 自動合成機に適用可能なホスホロアミダイト体へと変換する事に成功した。

同様の合成ルートによって、単純なトリメチルシリル基とシアノ基を併せ持つ 1-シアノ-6-トリメチルシリルピレン(**8**)についても合成を行った。

【シアノ基を導入したシリル化ピレン誘導体の分光学的特性】

当初計画に従い、今回合成された電子供与性のシリル基に加えて、強力な電子求引性としてシアノ基を併せ持つシリル化ピレン誘導体の分光学的特性について、詳しい解析を行った。解析には上で得られた 1-シアノ-6-トリメチルシリルピレン(**8**)、並びにこれに対応するトリメチルシリル基のみを持つピレン誘導体(**9**)、シアノ基のみを持つピレン誘導体(**10**)をそれぞれ合成し、未修飾のピレンを含む、これらの吸収及び蛍光スペクトル及び蛍光量子収率を比較する事で行った。得られた結果を表-1 に示す。

化合物	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Φ_f
未修飾ピレン	333	373	0.34
8	365	389	0.76
9	343	377	0.5
10	361	384	0.66

表-1 修飾ピレン誘導体の分光学的データ

表から明らかなように、シリル基とシアノ基を併せ持つ化合物(8)では、未修飾のピレンに比べて吸収極大波長において約 30 nm 以上、また蛍光発光波長においても約 15 nm 以上と、いずれにおいても大きな長波長シフトを示した。一方シリル基のみを導入した化合物(9)では吸収極大波長の長波長シフトは約 10 nm であり、シアノ基のみを導入した化合物(10)では約 28 nm であった。これらのことから、吸収波長の長波長化にはシリル基よりもシアノ基の関与が大きい事が示された。

同様に蛍光波長については、シリル基のみを導入した化合物(9)では約 4 nm、シアノ基のみを導入した化合物(10)では約 10 nm であった。

さらに蛍光量子収率について比較してみると、シリル基とシアノ基を併せ持つ化合物(8)では、傾量子収率が未修飾ピレンの 2 倍以上に増大しているが、化合物(9)及び(10)ではそれぞれ約 1.5 倍、1.9 倍であった。

以上の事から、ピレン分子へのシリル基並びにシアノ基の導入は吸収並びに蛍光波長の長波長化、蛍光量子収率の増大に有効である事が明らかとなった。また、得られたデータからは、これら性質の異なる 2 種類の置換基の同時導入がピレンの分光学的特性に及ぼす影響は相加的なものであることが、強く示唆された。

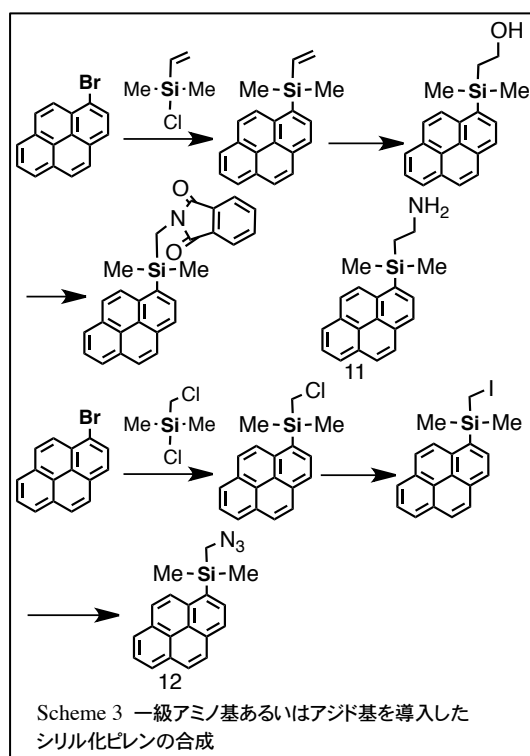
【アミノ基やアジド基を持つシリル化ピレン誘導体の合成】

末端に一級アミノ基を持つシリル化ピレン(11)及びアジド基を持つシリル化ピレン(12)の合成については、Scheme 3 に示すルートによる合成を試みたところ、何れも首尾よく合成する事ができた。

即ち、1-ブロモピレンをアリルジメチルシリルクロライドでシリル化したのち、これをラジカル還元し、さらに水酸化を行う事でアリル基をヒドロキシエチル基に変換した。さらにこれをフタルイミド化したのちにヒドラジン分解する事で、一級アミノ基を持つシリル化ピレン(11)を得る事ができた。ラリ段階における反応率は概ね 80 % 以上であり、実用的にも問題の無いレベルであると考えられる。

一方、アジド基を持つシリル化ピレン(12)の合成は、既に我々が合成を報告しているクロロメチルジメチルシリルピレンのクロロ基をヨウ化ナトリウムで要素に変換したのち、これをさらにアジ化ナトリウムで処理する事で、こちらも 80 % 以上の収率で、対応

する目的物(12)へと変換する事ができた。得られた化合物の構造確認は NMR 及びマスペクトルにより行った。



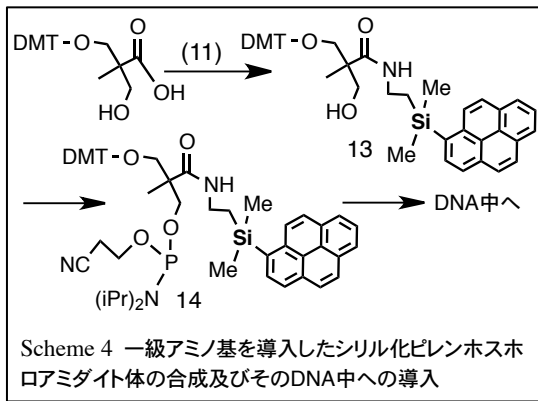
以上の事から、当初の研究目標である「電子供与性のシリル基に加えて、強力な電子求引性を併せ持つ事で、いわゆるプッシュ・プル効果によって蛍光輝度を飛躍的に向上させた新たな含ケイ素蛍光剤の開発。また、一級アミノ基やアジド基などの様々な置換基を持つ事で、縮合反応やクリック反応等を用いて核酸等の生体材料に容易に導入できる新たな含ケイ素蛍光剤の開発」については、ほぼ達成する事ができた。

尚、現在一級アミノ基を持つシリル化ピレン(11)及びアジド基を持つシリル化ピレン(12)についても、さらにこれらに電子求引性基(シアノ基)を導入する事を検討中である。

【核酸自身の構造変化と連動して蛍光の発光・消光が生起する、新規な機能性蛍光核酸プローブの開発】

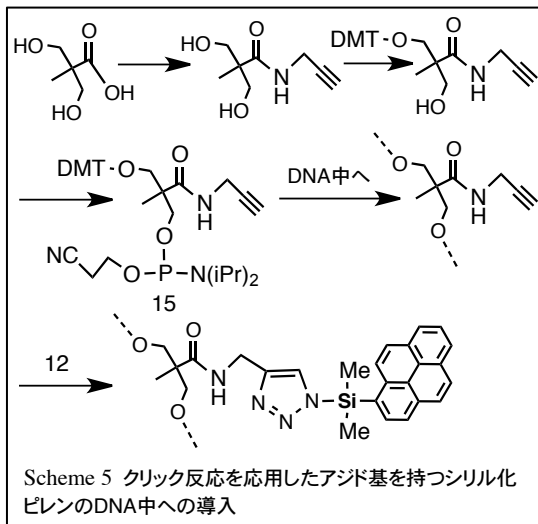
最初に、ここまでの研究で得られた、アミノ基を持つシリル化ピレン(11)及びアジド基を持つシリル化ピレン(12)を、非ヌクレオシド型核酸スカフォールドを用いて DNA 中に導入する手法の確立を試みた。

一方の水酸基のみジメトキシトリチル基(DMT-基)で保護したビスヒドロキシメチルプロピオン酸と(11)を縮合する事で、化合物(13)を良好な収率で得る事ができた。さらに(13)の残った水酸基を常法に従ってホスホロアミダイト化することで化合物(14)を得る事ができた(Scheme 4)。化合物(14)の構造は¹H-NMR 及び³¹P-NMR により行った。



化合物(14)は DNA 自動合成機を用いて 15 量体の DNA 中の配列内部に導入した。トリチルアッセイによる(14)のカップリング収率を見積もったところ約 92%であり、市販の天然型ヌクレオシドホスホロアミダイト体のカップリング収率(>95%)には及ばないものの、ほぼ満足できる値であった。

一方、アジド基を持つシリル化ピレン(12)の DNA 中への導入については、クリック反応の応用を試みた (Scheme 5)。



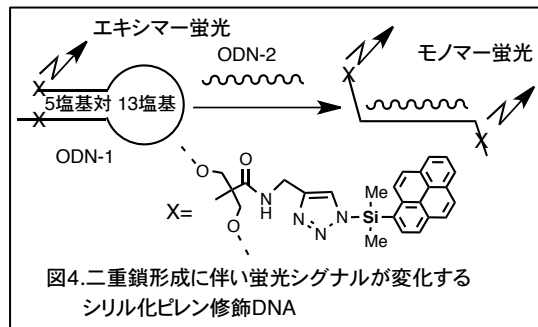
即ち、ビスヒドロキシプロピオン酸のカルボキシル基をプロパギル化したのち、一方の水酸基を DMT-基で保護し、もう一方の水酸基をホスホロアミダイト化して、化合物(15)を得た。化合物(15)は DNA 自動合成機を用いて 21 量体の DNA 中の配列内部に導入した。導入に当たって種々条件を検討したところ、化合物(15)は通常の DNA 合成で用いられる濃度 (0.1 M) ではカップリング収率が約 20%程度であり、これを実用的な値である 90%以上とするには、濃度を 0.3 M 以上にする必要がある事が判明した。

得られたプロパギル基が結合したビスヒドロキシプロピオン酸残基を持つ DNA に対して、アジド基を持つシリル化ピレン(12)の導入を試みたところ、収率 57%で目的とする修飾 DNA が生成する事を確認した。

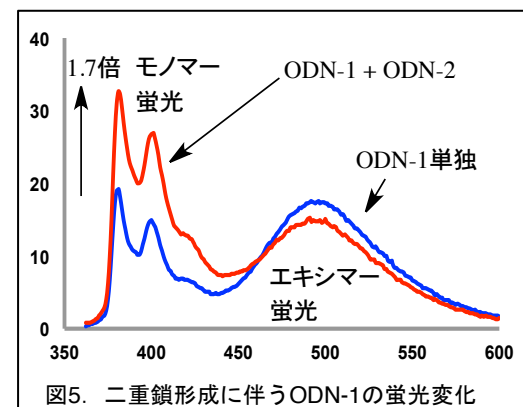
以上の事から、当初の目的であるアミノ基を持つシリル化ピレン(11)及びアジド基を

持つシリル化ピレン(12)を、非ヌクレオシド型核酸スcaffoldsを用いて DNA 中に導入する手法の確立については、ほぼ達成することができた。

さらに、化合物(12)と(15)を用いるクリック反応を応用した手法によって ODN-1 を合成した。ODN-1 は 5 塩基からなるステム中の向かい合う位置にシリル化ピレン誘導体を導入したステム・ループ構造を持つ。そのため 13 塩基からなるループ部分に相補的な核酸(ODN-2)存在下では、これと二重鎖形成を行い、同時にステム・ループ構造は解消する。このような高次構造変化に伴い、ODN-1 では当初ステム中で近接して存在するシリル化ピレンがエキシマー蛍光を発する一方、ODN-2 との二重鎖形成時にはシリル化ピレン間の距離が離れる事で、蛍光シグナルは単純なピレンモノマーの蛍光に変化する事を期待した (図3)。



ODN-1 単独及びその相補鎖である ODN-2 存在下での蛍光変化の結果を図-5 に示す。ODN-1 は単独存在時には予期した様に顕著なエキシマー蛍光を示した。これはステム中の向かい合う位置に導入したシリル化ピレンが近接する事で生じたものと考えられる事ができる。一方 ODN-2 存在時にはエキシマー蛍光が減少し、逆にモノマー蛍光が増大した。しかしながら ODN-2 存在時のモノマー蛍光の増大は ODN-1 単独時の 1.7 倍に留まっており、予期した様な 10 倍以上の増大は見られなかった。



ODN-2 存在時の ODN-1 のモノマー蛍光の不十分な増大の理由については、現在のところ

る不明であるが、ODN-1 自身の高次構造の安定性と、ODN-2 と形成する二重鎖の安定性とに関係したものでは無いかと考え、現在はそれらの詳細な分析を行っている。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 飛田怜実、森口朋尚、篠塚和夫、シリル基を導入した新規二置換ピレンの開発と DNA への導入、日本化学会第 94 春期年会、2014 年 3 月 28 日、名古屋
- ② T. Moriguchi, N. Takayama, S. Watanabe, N. Kanazawa, K. Shinozuka, Development of Quencher-free Dumbbell-form Molecular Beacon Probe Having Silylated Pyrene, The 40th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2013, Nov.13, Yokohama, Japan.
- ③ S. Hida, T. Moriguchi, K. Shinozuka, Development of Novel Push-pull Type Silylated Pyrene Derivatibes as DNA Labeling Agent, The 3rd International Symposium on Element Inovation, 2013, Sep.9, Kiryu, Japan.

[図書] (計 1 件)

- ① K. Shinozuka, T. Takeuchi, Pyrene: Chemical Properties, Biochemistry Applications and Toxic Effects, Ed. P. Ruzicka and T. Kral, Nova Science Publishers Inc. NY, USA. May, 2013, pp167-188.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠塚 和夫 (SHINOZUKA KAZUO)

群馬大学・理工学研究院・教授

研究者番号：20206105