

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410180

研究課題名(和文)新規pH応答性蛍光核酸による高感度なDNA一塩基識別法の開発

研究課題名(英文)Development of pH-responsive fluorescent nucleosides for SNPs detection

研究代表者

齋藤 義雄 (SAITO, Yoshio)

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：40385985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ピリジン骨格を含む種々の新規蛍光ヌクレオシドを合成し、それらがpHに鋭敏に反応して発光-消光の切り替えを行うセンサー分子に成ることを示してきた。そしてさらに改良を加え、On-Offの切り替えが、より中性に近くなるような分子のスクリーニングも行ってきた。また、これらをODN鎖に導入して、一塩基変異識別プローブへの応用も検討した。最終年度にはピリジン部位に置換基を導入することで、pH変化に応じて蛍光発光波長(発光色)を切り替えることが可能であることを見出した。当初の予想よりも優れた光学特性を有する分子が得られたため、今後は細胞内イメージング等への応用も検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：We have synthesized various pH-responsive fluorescent deoxyuridine derivatives containing pyridine skeleton. These fluorescent nucleosides exhibited distinctive fluorescence at 470-550 nm in aqueous solvents at basic to neutral pH values. Interestingly, 2-aminopyridine derivative exhibited strong fluorescence emission at 470 nm at pH range of 1.6-3.0 with a pKa value of 3.4 whereas exhibited emission at 550 nm at pH > 4.0. Such pH-sensitive fluorescent nucleosides can be used as fluorescence switch for monitoring pH change in biological systems.

研究分野：生物有機化学

キーワード：蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災とそれに伴う福島第一原発の事故による放射能汚染は、我々が研究拠点を置く福島県内に未曾有の人的および経済的被害を与えている。現在でも、放射能汚染や震災による家屋の倒壊で、福島県内だけでも、10万人近くが避難生活を余儀なくされ、仮設住宅の住民も3万人を超えている。慣れない避難生活や狭い生活スペースによるストレス等のために様々な健康への不安を訴えている住民も多く、特に放置しておくとう重篤な症状に陥るがんや糖尿病などの遺伝子関連疾患において、簡単に測定可能な診断法の開発が望まれている。また、原発事故当初に大量に排出された放射性ヨウ素の乳幼児への健康影響、低線量の長期的放射線暴露による健康影響など、遺伝子レベルで追跡調査する必要がある、遺伝子疾患の有無を簡単に測定する技術の開発が求められている。

そのような特定の遺伝子の検出や、DNA 配列中の一塩基の違い (SNPs) の検出に用いられる最も一般的な手法としては、TaqMan プローブ法、Invader 法、DNA マイクロアレイ法など様々なものが知られているが、従来法のほとんど全てがマッチ・ミスマッチ配列における標的 DNA へのハイブリダイゼーションの安定性の違い (T_m 値の違い) に基づいて検出するものである。そのため、避けて通れないハイブリダイゼーションエラーにより標的配列中の一塩基の違いをクリアーに検出できていなかった。そのため、全く新しい概念を用いた高感度な一塩基多型 SNPs 検出法が開発が求められていた。

2. 研究の目的

我々のグループは、オリゴヌクレオチドに導入されたある種の蛍光性核酸は、そのオリゴヌクレオチドが相補反応により二重鎖になった時に蛍光発光能を持つ現象を見出し、その性質を応用した特定塩基配列の識別法を開発を検討してきた。その結果、特定の核酸塩基と塩基対を形成した時のみ蛍光を発する蛍光性核酸塩基 (塩基識別型蛍光性核酸塩基-BDF 塩基 (Base-Discriminating Fluorescent Nucleobase)) を発表している。この手法は、DNA 二重鎖の内側と外側で極性環境が異なることを利用したものであり、そのため極性環境の変化に伴って蛍光強度が変化する蛍光核酸をこれまでに数十種

類以上合成してきた (*J. Photochem. Photobiol. C: Photochemistry Reviews*, 6, 108-122, (2005))。しかしながら従来開発してきた蛍光核酸塩基は、その発光波長が約 400 nm 前後と短いことや、シグナルとノイズの比 (S/N 比) が十分でなかったこと、更には酸化電位の低いグアニン塩基から蛍光消光を受けてしまうといった理由から高感度で一塩基の違いを検出できなかった。そのため実用化に向けた更に新しい蛍光核酸塩基の開発が必要となった。そこでより高感度な検出法を開発するために、我々は新しい蛍光核酸塩基として環境応答型蛍光核酸塩基の開発を行っている。例えば蛍光核酸周辺の微細な環境変化に応答して発光色 (発光波長) がカメレオンのように変化する蛍光核酸塩基や、あるいは周辺の pH 変化にともなって蛍光発光が On-Off で切り替わる全く新しい蛍光核酸塩基である。特に最近、一本鎖 DNA と二重鎖 DNA で DNA 内部の微細な pH 環境が大きく変化することが報告されており、pH 応答性蛍光核酸を蛍光 DNA プローブ用に改良して、更にこれまでの BDF プローブの手法と組み合わせることで DNA 配列中の一塩基の違いを簡単に識別できると考えた。本申請で開発する pH 応答性蛍光核酸塩基は、化合物のプロトン化/脱プロトン化により蛍光発光が On-Off で切り替わるため高い S/N 比を示すと考えられ、飛躍的な感度の向上が期待できる。

本研究においては、環境応答型蛍光核酸塩基の中でも特に pH 環境変化に敏感に反応して蛍光のスイッチングを行う pH 応答性蛍光核酸塩基の開発を行い、この技術を応用して高感度で一塩基の違いを識別する DNA プローブ (SNPs 検出プローブ) を完成させることを目的とする。

3. 研究の方法

これまでに申請者は、DNA 二重鎖中で相補鎖塩基と塩基対を形成することが可能な蛍光性核酸塩基を多数報告してきた。特に最近では、DNA を構成する核酸塩基を蛍光分子の一部とみなした環境応答型蛍光核酸塩基の開発を行っており、例えば、DNA を構成する塩基の中で最も酸化電位の低いグアニン塩基に電子吸引性の置換基を導入した芳香環を結合させ、ドナー・アクセプタ型の核酸分子を合成することで、極めて単純な構造ながら、溶

媒極性の変化に伴い鋭敏に蛍光発光波長が変化する極性環境感応型蛍光核酸塩基を得ることに成功している (*TL*, 2010, 51, 2817 など)。本申請は、環境感応型蛍光核酸塩基の中でも特に pH 環境応答型の蛍光核酸塩基の開発を行い、さらにこれを用いることで新しいメカニズムで DNA 二重鎖中の一塩基の変異 (SNPs) を検出するプローブの開発を目指すものである。

既に予備実験として、独自のコンセプトに基づき、天然の核酸塩基に三重結合を経て置換芳香族化合物を連結した一群の蛍光核酸塩基を合成している。このなかで、最近、アニリン誘導体およびアントラセンを導入した核酸塩基誘導体が、pH 環境に鋭敏に反応して発光 - 消光のスイッチングを行うことが分かってきた。この化合物は中性 - 塩基性環境において、電子供与性基であるアニリンとアントラセン部位との間で光誘起電子移動 (PET) により消光されるのに対して、酸性環境ではアニリン誘導体がプロトン化され蛍光発光するものと考えられる。すなわち、pH 変化に伴うプロトン化-脱プロトン化により蛍光発光の On-Off のスイッチングが可能となっており、化合物の pKa を分子設計に基づいて調整することで様々な pH 領域でのスイッチングが可能になると考えられる。実際に同様の分子設計に基づき、のピリジン誘導体を用いることで、これとは逆に塩基性領域で発光する分子も得られることがわかってきているが、現段階では蛍光強度や発光波長の点で不十分である。

そこで、このような予備実験から得られた結果に基づき、目的とする pH 領域で蛍光スイッチングを行い、さらに長波長側で強く発光する pH 環境応答型の蛍光核酸塩基を種々デザインし、合成することとした。「コンピュータを用いた分子モデリング - pH 環境応答型の蛍光核酸塩基 - 性能評価」を可能な限り繰り返し行い、より高性能で合目的とする蛍光分子が得られ次第、それらをオリゴヌクレオチド等に導入して蛍光核酸プローブを作成することとして実験を進めた。

4. 研究成果

具体的な研究成果として、初年度は、ピリジン骨格を含む、種々の誘導体のデザイン及び合成を中心として研究を進めた。予

備実験の段階でピリジン骨格を含むヌクレオチドが有望であるという結果が得られていたため、より詳細なモデリングを行い、実際に様々な誘導体をデザインした。

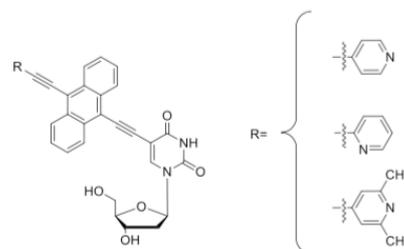
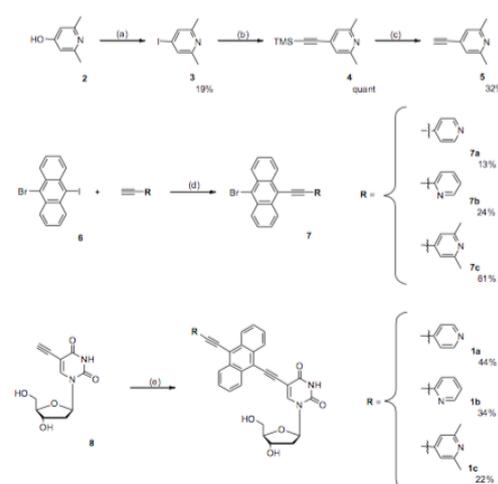


図1 本研究で開発したピリジン骨格を含む蛍光ヌクレオチド

さらに、パラ配向、オルト配向のピリジン骨格を含むヌクレオチド誘導体並びにルチジンを含有するヌクレオチド誘導体を以下の Scheme に従い実際に合成した。



Scheme 1. Reagent and Conditions : (a) i) trifluoromethanesulfonic anhydride, pyridine, MeCN, r.t, 2h ii) NaI, trifluoromethanesulfonic acid, r.t, 12h (c) trimethylsilylacetylene, Pd(PPh₃)₄, CuI, TEA, DMF, 50°C, 2h (b) TBAF, THF, r.t, 5min (d) 4-ethynylpyridine (for 7a), 2-ethynylpyridine (for 7b) and 4-ethynyl-2,6-lutidine (for 7c), Pd(PPh₃)₄, CuI, TEA, DMF, 50°C, 2.5h (e) 7a-7c, Pd(PPh₃)₄, CuI, TEA, DMF, 14h

得られた誘導体の pH センサー分子としての光学特性を評価するために、pH 環境を変化させた際の蛍光スペクトル測定を行った。

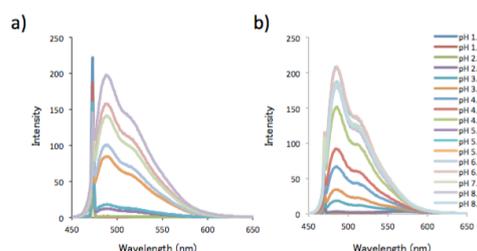


図2 各pHにおける化合物1a(a)及び1b(b)の蛍光スペクトル

その結果、パラ配向の 1a 及び 1c においては、塩基性条件下で蛍光発光が見られ、中性から酸性条件下では消光されるという結果が得られた。一方、オルト配向の 1b の場合には、pH 4 から 10 の範囲で蛍光発

光が見られたが **1a** や **1c** のように蛍光発光の **On-Off** の切り替えは見られなかった。これらの結果から、合目的なセンサーヌクレオシド（蛍光の **On-Off** の切り替えが可能なヌクレオシド）を得るには、パラ配向のピリジン骨格を有するヌクレオシドが好ましいことがわかった。

そこで次に、様々な置換基を有するピリジン骨格を有する蛍光ヌクレオシドの開発に取り掛かった。再度、分子モデリングを行った結果をもとに幾つかの誘導体をデザインし、実際に複数の化合物の合成を行った。その結果、図3に示した2-アミノピリジン骨格を有する蛍光ヌクレオシドが良好な光学特性を示すことがわかった。

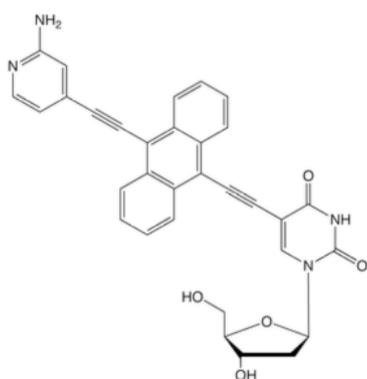


図3 2-アミノピリジン骨格を有する蛍光ヌクレオシド

合成により得られた化合物の蛍光スペクトルを実際に測定したところ、非常に興味深い結果が得られた。これまでのピリジン誘導体は、**pH** の変化に伴い蛍光の **On-Off** が切り替わる分子であったのに対して、2-アミノピリジン誘導体は、ある **pH** を境に蛍光発光波長（蛍光色）が変化する性質を有することがわかった。現在までのところその **pKa** は 3.4 であり、酸性領域に偏っている状況ではあるが、今後はさらに分子に改良を加えることで、より中性に近い **pH** で蛍光色に変化するようなセンサーヌクレオシドの開発につなげたいと考えている。現在までのところ、その発光メカニズムは不明であるが、その解明に取り組んでいるところである。

当初の予想を上回る、蛍光発光波長（蛍光色）が変化するような蛍光ヌクレオシドが得られているので、細胞内でのイメージング等にも応用したいと考えており、現在検討を行っている。

さらに、DNA の一塩基変異を検出する蛍光 DNA プロブの開発を目指して、これらのヌクレオシドモノマーを含むオリゴヌクレオチド鎖の合成も並行して行っている。幾つかのヌクレオシドモノマーを含む蛍光 DNA プロブを作成し一塩基識別能の検討を行ったが、現在までのところ、DNA

中の一塩基の変異を蛍光発光の違いにより検出するには至っていない。今後は、再度、分子の設計をし、一塩基変異検出に適した形での分子の改良をして行きたいと考えている。

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3件）

① Y. Saito^{*}, A. Suzuki, T. Yamauchi, I. Saito^{*}
Design and synthesis of 7-naphthyl-8-aza-7-deaza-2'-deoxyadenosines as environmentally sensitive fluorescent nucleosides, *Tetrahedron Lett., Memorial Symposium-in-Print for Harry Wasserman*, 査読あり (2015) vol. 56, 3034-3038.

② A. Suzuki, T. Yanaba, I. Saito, Y. Saito^{*}
Molecular design of an environmentally sensitive fluorescent nucleoside, 3-deaza-2'-deoxyadenosine derivative: Distinguishing thymine by probing the DNA minor groove (Selected as an "Inside cover"), *ChemBioChem.*, 査読あり (2014) vol. 15, 1638-1644.

③ A. Suzuki, N. Nemoto, I. Saito, Y. Saito^{*}
Design of an environmentally sensitive fluorescent 8-aza-7-deaza-2'-deoxyadenosine derivative with dual fluorescence for the specific detection of thymine, *Org. Biomol. Chem.*, 査読あり (2014) vol. 12, 660-666.

〔学会発表〕（計3件）

① 鈴木 梓、齋藤 烈、齋藤 義雄
7 位にナフチル基を有する環境感応型蛍光性 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシンの開発とチミン塩基識別プローブへの応用

第37回日本光医学・光生物学会、宮崎、2015年7月

② Y. Saito 【Invited Lecture】 Design and synthesis of environmentally sensitive dual fluorescent nucleosides, The 11th Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, Jeju, June,

2015

③ 鈴木梓、齋藤烈、齋藤義雄

ナフタレン含有環境感応型蛍光 3-デア
ザアデノシン誘導体の開発と一塩基識別
プローブへの応用

第36回日本光医学・光生物学会、大阪、
2014年7月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 義雄 (SAITO, Yoshio)

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：40385985