

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410173

研究課題名(和文) 含ケイ素高輝度蛍光剤を活用した蛍光応答型高精度ゲノム解析プローブの開発

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・大学院理工学府・教授

研究者番号：20206105

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)：ケイ素官能基(シリル基)が結合することで蛍光発光が増大した種々のピレンあるいはペリレンを合成し、さらに、これらを「ダンベル類似構造」を形成する一部自己相補的DNA中の特異的な位置に導入した蛍光DNAプローブを合成した。こうしたプローブの幾つかは単独で存在する場合には殆ど蛍光を発しなかったが、完全に相補的なDNA存在時には顕著な蛍光シグナルを与えた。一方、適切な条件下(低塩濃度等)においては、一塩基ミスマッチを持つ相補鎖存在下では蛍光増大は殆ど見られないことが判明した。以上のことから、これらが標的鎖の一塩基の違いを識別できる特異性の高い遺伝子検出プローブとして有用であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Novel pyrene and perylene derivatives bearing a sily functional group were synthesized and incorporated into oligoDNA. The silylated pyrene and perylene derivatives possess enhanced fluorescence signal may be due to the characteristic sigma-pi interaction brought about by the sily group. The obtained oligoDNA bearing a silylated pyrene at its 5'-terminus has a partial self-complementary sequence and, therefore, forms dumbbell shaped higher structure. In a buffer solution, the oligoDNA exhibited a faint fluorescence signal while it stays alone. On the other hand, the signal of the modified DNA showed a marked recovery (10 to 40 times) under the presence of the complementary oligonucleotide. In an appropriate conditions the modified DNA gave fluorescence signal under the presence of one-base mismatched complements in same extent as that while it stays alone. Thus, the modified DNA discriminated one-base mismatched complements with showing a fluorescence signal.

研究分野：生物有機化学

キーワード：蛍光性オリゴDNA シリル化ピレン シリル化ペリレン モレキュラービーコン 一塩基ミスマッチ

1. 研究開始当初の背景

(1) 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 の存在や、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、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きたが、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。Tyagi らが開発した、蛍光剤 (F) と消光剤 (Q) を同時に結合したプローブを用いるモレキュラービーコン (*Nature Biotechnology*, **14**, 303-308, 1996) 及びその改良体は、標的鎖との二重鎖形成により蛍光シグナルを与える画期的なプローブであるが、やはり合成が煩雑であるだけでなくバックグラウンド蛍光の高さによる検出感度低下などの問題があった。F と Q を適宜組み合わせたプローブを用いるリアルタイム PCR 法においても同じ問題が存在する。

(2) このような状況において、申請者らはこれまでに先ず、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 $\sigma^*-\pi^*$ 共役効果によって蛍光強度が増大すること (Kyushin, et al, *Organometallics*, **15**, 1067, 1996) に注目し、それまで例のない、修飾可能なシリル置換基を持つ高輝度新規ピレン及びペリレン誘導体を開発するとともに、これを結合させた蛍光性 DNA の開発を行ってきた。その結果 Cl⁻、OH⁻、NH₂⁻ などを持つジアルキルシリル基を結合したピレン誘導体は、モル吸光係数及び蛍光量子収率が共に増大することで未修飾ピレンの3倍の蛍光輝度を持つ事を見いだした (Sekiguchi, et al, *Bioorg. Med Chem. Lett.*, **17**, 6883, 2008)。さらに、シリル化されたピレン誘導体を糖部 2'-水酸基に結合した修飾ヌクレオチドを、配列中に2分子連続して導入したオリゴ DNA は、一本鎖状態、又は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特異な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 Mogi, et al, *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、従来良く言われている様なグアニン塩基 (G) だけでなく、隣接したチミン塩基 (T)、シトシン塩基 (C) との間においてもグアニン塩基とは逆方向の「光励起電子移動」を起こす事によって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シリル化ピレン結合 DNA の消光に強く関係する事を見いだした (未発表成

果)。平成24年度採択の挑戦的萌芽研究においては、様々な置換基によるプッシュ・プル効果によってシリル化ピレンの蛍光の更なる増大とその長波長化を目指し、ジアルキルシリル基とシアノ基を併せ持つ新規なシリル化ピレン誘導体の開発にも成功した。

2. 研究の目的

本研究においては申請者らが開発してきた、通常のピレンと異なるシリル化された高輝度型ピレンの特質を最大限に活用した、「蛍光応答による標的遺伝子、および塩基欠損損傷や一塩基変異 (SNP's) の検出能」を持つ機能性蛍光核酸プローブの創製を目指した。具体的には以下に示すような、これまでの蛍光性核酸プローブの作動原理と異なる、3種の異なるコンセプトによるプローブの合成及びそれらの実用的遺伝子検出プローブとしての物性の解明を目指した。

a) 自己相補的配列の存在によりダンベル類似構造を形成し、かつ、5'-末端の A 残基にシリル化ピレンが結合し、3'-末端に C、T あるいは G 残基が存在することで、相補鎖存在下でのみ蛍光シグナルを与えるプローブの開発及びその物性の解明。

b) 相補鎖非存在下では、配列中に連続して導入されたシリル化ピレンによるエキシマー発光を与えるものの、一塩基欠損を持つ不完全相補鎖との二重鎖形成時にはモノマー発光をあたえることで、塩基欠損部位を検出するプローブの開発及びその物性の解明。

c) さらに、可能であれば「リアルタイム PCR 法」に適用でき、これまでに無い、消光剤との組み合わせが不要な蛍光増幅型プローブとして、T、C、G の何れかに隣接する 5'-末端部位にリン酸ジエステル結合により導入した消光状態のシリル化ピレンが、標的鎖と結合した後、酵素 (Taq ポリメラーゼなど) によってプローブ分子から切り出される事で発光状態へと移行するだけでなく、このサイクルの進展により蛍光が蓄積 (増幅) されるプローブの開発も目指す事とした。

3. 研究の方法

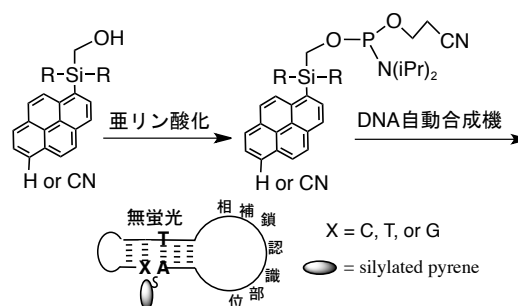


図1. ダンベル類似構造を持つシリル化ピレン導入核酸プローブ合成スキーム

a) 自己相補的配列の存在によりダンベル類似構造を形成し、かつ、5'-末端の A 残基にシリル化ピレンが結合し、3'-末端に C、T ある

いは G 残基が存在することで、相補鎖存在下でのみ蛍光シグナルを与えるプローブの合成は、末端官能基として水酸基を持つシリル化ピレンを対応するホスホロアミダイト体とし、これを用いて図-1の様に合成した。また、ダンベル類似構造中のステム部位において、5'-末端の A 残基に対してリン酸ジエステル結合によって導入したシリル化ピレンに隣接する 3'-末端には、これまでの研究によってシリル化ピレンに対する消光作用が顕著な C あるいは T 残基を用いる事とした。

b) 相補鎖非存在下では、配列中に連続して導入されたシリル化ピレンによるエキシマー発光を与えるものの、一塩基欠損を持つ不完全相補鎖との二重鎖形成時にはモノマー発光をあたえることで、塩基欠損部位を検出するプローブの合成については、図-2のように行う事とした。この合成では、かつて我々の研究グループが核酸へのインターカレーター等の機能性分子の導入に有効である事を実証したビスヒドロキシプロピオン酸を活用し、これにプロピニル基を導入した後に、別途合成するアジド基を持つシリル化ピレンをクリック反応によって結合する。さらに、得られたシリル化ピレン誘導体を対応するホスホロアミダイト体とした後、DNA 自動合成機によってプローブ中に導入する事とした。

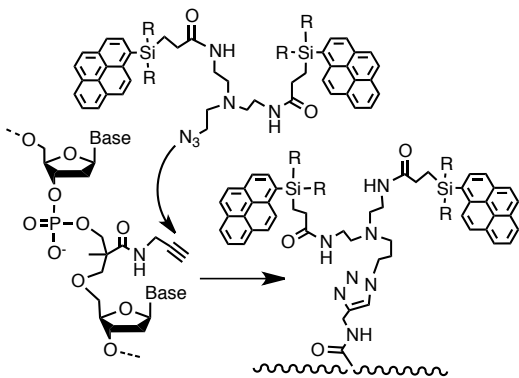


図2. 2分子の連続したシリル化ピレンを持つエキシマープローブ合成スキーム

c) 「リアルタイム PCR 法」に適用でき、これまでに無い、消光剤との組み合わせが不要な蛍光増幅型プローブの合成については、上記 a)あるいは b)と同様の手法により合成する事とした。

このようにして得られた各種プローブについては、標的鎖と形成する二重鎖の熱安定性、プローブ単独時及び相補鎖存在時における蛍光挙動の変化について、UV 分光光度法及び蛍光分光光度法によって検証する事とした。また、これらのプローブの塩基配列については、基本的に子宮頸癌原因ウイルスとして近年我が国においても問題となりつつ有る重症型ヒトパピローマウイルスの亜型遺伝子を標的とした配列とした。

4. 研究成果

a) 先ず、ダンベル類似構造を持つシリル化ピレン修飾 DNA の基本的性質を明らかにする為に、図-3に示すプローブ 1~5 の DNA を合成した。これらのプローブは 5'-末端部位にシリル化ピレンを、また 3'-末端には C 残基を持ち、さらに標的 DNA との認識配列として全て基本的に同一の配列を有している。一方ステム形成部位にはその熱安定性の向上が期待される C-5 ポリアミン結合デオキシウリジン誘導体 (dU)、シリル化ピレンに対する消光作用が期待されるアントラキノン結合デオキシウリジン誘導体(dY)などが導入されている。さらにプローブ 4 ではこれらに加えて、5'-末端のシリル化ピレンに対する遠距離 G 残基の影響を調べるため、シリル化ピレンから 4 残基目の G 残基がデオキシイノシン(dI)に変換されている。

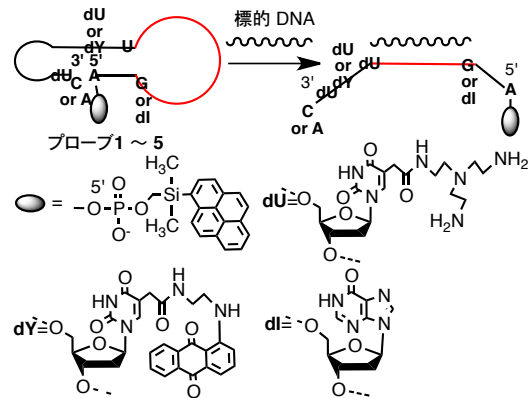


図3. ダンベル類似構造を持つシリル化ピレン導入核酸プローブ1~5

これらのプローブ DNA が形成するダンベル構造の熱安定性をその UV 融解温度(Tm 値)を測定する事によって評価した所、その熱安定性はステム部分の鎖長に依存し、更にステム部分への dU あるいは dY 残基の導入は、ダンベル構造の熱安定性を大きく向上させることが明らかとなった。また、これらプローブ DNA と完全相補的な一本鎖 DNA との二重鎖の熱安定性に付いても同様に検証した所、何れのプローブにおいても完全相補鎖との二重鎖の Tm 値は、ダンベル構造の Tm 値に比べて 10~15 度程上昇していた。これに対して、様々な位置に一塩基ミスマッチを導入した不完全相補鎖との二重鎖の Tm 値は、ミスマッチ塩基の導入位置にもよるが、全て完全相補鎖のそれに比べて 10~15 度程低下した。

さらに、相補鎖非存在時、完全相補鎖存在時、ミスマッチ相補鎖存在時におけるプローブ DNA の蛍光変化を測定した。その結果、これらのプローブは何れも相補鎖非存在下では微弱な蛍光しか示さなかったが、アントラキノンを持たないプローブ 1 においても蛍光量子収率が 0.008 であることから、当初の予想通りダンベル構造の形成により、5'-末端に導入したシリル化ピレンが 3'-末端の C

残基と隣接する事で強く消光されることが判明した。このような蛍光消光はステム形成部位中でシリル化ピレンに近接する位置にアントラキノン結合デオキシウリジンを導入する事で更に増強され、このようなプローブ3と5では、相補鎖非存在時の蛍光量子収率はそれぞれ0.002と0.003であった。これに対し、完全相補鎖存在下では何れのプローブでも蛍光シグナルが10~60倍に増大した(図-4)。一方、ミスマッチ相補鎖存在下での蛍光増大は6倍~35倍と大きな幅が認められた。

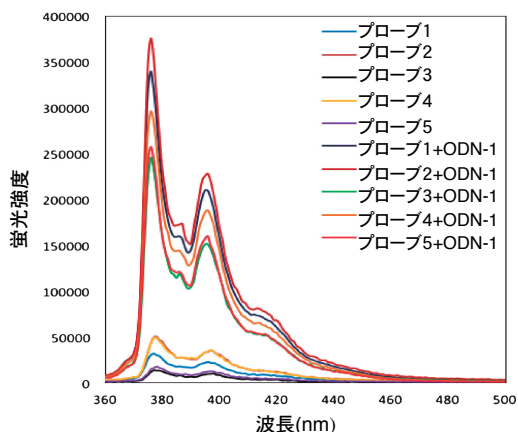


図4. プローブ1~5の完全相補鎖(ODN-1)存在下及び非存在下における蛍光スペクトル 測定条件; 10 mMリン酸緩衝液(pH 7.2), 100 mM NaCl, オリゴマー濃度 1.0 μM, 励起光350 nm

詳しい研究により、ミスマッチ相補鎖存在下における蛍光の回復にはステム部分の熱安定性と相補鎖との二重鎖の熱安定性の差が関係していることが強く示唆された。

以上の結果を踏まえ、新たに作成したジフェニルシリル基を持つピレン誘導体を用い、ダンベル構造の熱安定性に大きな影響を持つと考えられる緩衝液中の塩濃度と、プローブの蛍光挙動の関係についてさらに詳しく調べる事とした。ここで用いた新たなプローブ6は先に述べたプローブ1~5と同様のダンベル類似構造を形成するが、3'-末端にはG残基を有し、さらに5'-末端のシリル化ピレンは、プローブ1~5に導入されたジメチルシリル基と異なり、より高い蛍光量子収率を持つ事が示されたジフェニルシリル基を有している(図-5)。

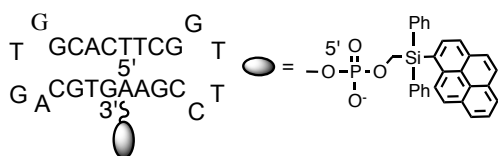


図5. ダンベル類似構造を持つジフェニルシリル化ピレンを導入した核酸プローブ6

プローブ6の高次構造の安定性と塩濃度の関係をTm値を指標に調べた所、核酸研究で通常用いられる生理的条件に近い100 mM NaCl存在下でのTm値が72.1度であるのに対して、塩濃度が半分の50 mMにおいても殆ど変わらない70.9度であった。さらに、塩

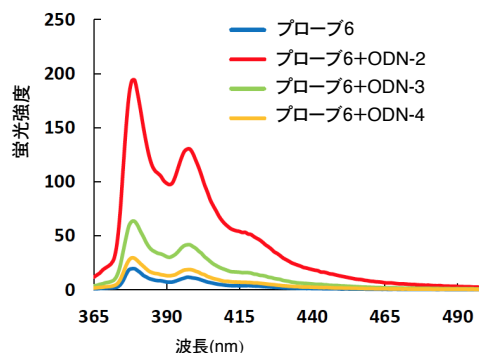
が全く存在しない条件下でもTm値が63.9度と、このダンベル型高次構造が高い安定性を持つ事が判明した(表1)。

DNA	NaCl	Tm (°C)	ΔTm (°C)
プローブ6	100 mM	72.1	-
	50 mM	70.9	-1.1
	0 mM	63.9	-8.2

表1. 10 mMリン酸緩衝液中の塩濃度がプローブ6の高次構造に及ぼす影響

そこで、上記の3種類の条件下における完全相補鎖(ODN-2)、一塩基ミスマッチを含む不完全相補鎖(ODN-3~4)存在下でのプローブ6の蛍光挙動を測定した。

プローブ6は100 mMのNaClを含む緩衝溶液中で、これらの完全相補鎖及びミスマッチ相補鎖補存在下においては微弱な蛍光しか示さないものの、完全相補鎖であるODN-2の存在下ではプローブ単独時に比べて蛍光強度が約20倍に増大した。一方、一塩基ミスマッチ相補鎖であるODN-4存在下の蛍光シグナルはプローブ単独時とほぼ同じであったものの、ミスマッチ塩基が異なるODN-3の蛍光シグナルはプローブ単独時の約5倍に増大していた。このことから、プローブ6はほぼ生理的条件下でミスマッチ相補鎖に対する蛍光に基づく識別能を持つ事が確認されたが、同時にこの条件下では、ミスマッチ部位あるいはミスマッチ塩基の違いにより識別能に相当の差が出る事が明らかとなった(図-6)。



プローブ6 3'-GTG CAG TGG CAC TCC GTG TTC GAA-5'
 ODN-2 5'-C GTC ACC GTG AGG CAC AA-3'
 ODN-3 5'-C GTC ACC ATG AGG CAC AA-3'
 ODN-4 5'-C GTC ACC GTC AGG CAC AA-3'

図6. 100 mM NaCl存在下におけるプローブ6の蛍光挙動

さらに、塩濃度を50 mM、0 mMとした緩衝液中での蛍光測定を行ったところ、プローブ6の単独時及び完全相補鎖存在時の蛍光強度は100 mM NaClを含む緩衝液中のそれらとほぼ同等であった。これに対してミスマッチ相補鎖であるODN-3及びODN-4存在時の蛍光強度は、プローブ6単独時のそれとほぼ同じである事が判明した(図-7)。

以上の研究により、シリル化された蛍光剤を導入したダンベル類似構造を持つプローブは、緩衝液中の塩濃度を通常よりも低下させる等の適当な条件下で、標的核酸の一塩基

の違いを識別する能力を持ち、さらにこれを蛍光応答として提示できる事が明らかとなった。

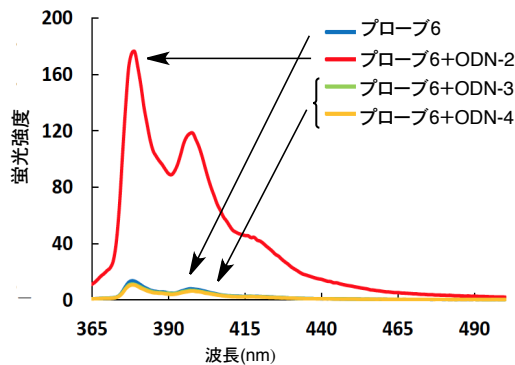


図7. NaCl非存在下におけるプローブ6の蛍光挙動

b) シリル化ピレンを持つエキシマープローブ合成に用いる、シリル化ピレン2分子が結合したアジド誘導体は、図-8に示す様な概要によって合成する事ができた。また、得られた誘導体は、図-9に示す様に2 μ Mと言う低い濃度において480~490 nm付近に顕著なエキシマー蛍光を示し、一方350 nm付近のモノマーに由来する蛍光は殆ど示さないことも確認された。

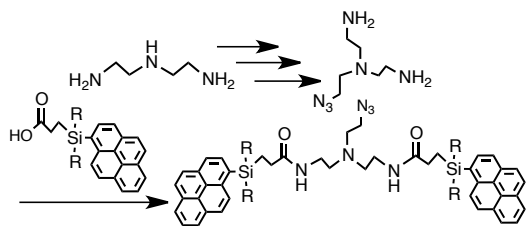


図8. シリル化ピレン2分子が結合したアジド誘導体の合成

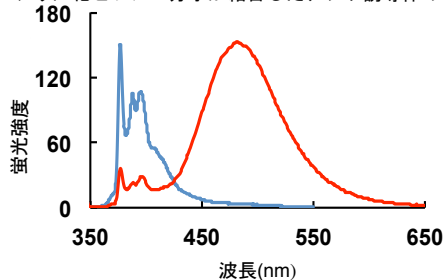


図9. 未修飾ピレン(青)及びシリル化ピレン2分子が結合したアジド誘導体(赤)の蛍光スペクトル

シリル化ピレンが2分子結合したアジド誘導体は、さらに図-2に示すクリック反応によってオリゴDNA中導入した。こうして得られたエキシマープローブ7に付いてその蛍光測定を行った所、プローブ7は単独で存在する場合、予期に反してモノマー蛍光及びエキシマー蛍光の両方を示し、更にエキシマーの蛍光強度はモノマーのそれに約7分の1以下と言う低いものであった。一方、1塩基欠損標的核酸存在時にはモノマー蛍光の強度のみ低下し、その結果エキシマー蛍光の強度はモノマーのそれに比べて約3分の1となり、それに伴って目視によっても溶液の色調の変化が認められた。しかしながらその変化は当初期待していたものに及ばな

かった。これらの結果はエキシマープローブ7中のピレン分子が、プローブ単独時においても近接して存在していない事によると考えられるが、その原因は現在までのところ明らかではない。

c) リアルタイム PCR 法に適用可能な蛍光増幅型プローブとして、5'-末端の T 残基に隣接してシリル化ピレンがリン酸ジエステル結合で連結されたプローブ8を合成した。さらにその核酸分解酵素に対する感受性を調べる為に、プローブ8を蛇毒ホスホジエステラーゼによる分解反応に掛けるとともに、反応に伴う蛍光変化を経時的に観察した。その結果、図-10に示す様に分解反応液の蛍光強度は時間経過と共に増大し、72時間経過後には反応開始時の約100倍近くまで増大した。また、反応液のHPLC分析により、蛍光を示す分解産物としてプローブ8中のシリル化ピレンのリン酸エステル結合が切断された、末端に水酸基を持つシリル化ピレンが生成している事が強く示唆された。これは、シリル化ピレンとDNAを連結するリン酸ジエステル結合が核酸分解酵素に対する感受性を持つ事を示しており、このようなプローブがリアルタイム PCR 法に適用できる蛍光増幅型プローブとなりうる可能性が明らかとなった。

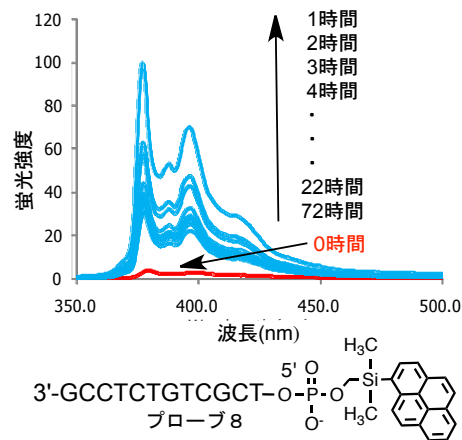


図10. シリル化ピレン結合プローブ8の核酸分解酵素処理による蛍光の経時的変化

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4件)

① Jakir Ahmed Chowdury, Tomohisa Moriguchi, Kazuo Shinozuka, Pseudo-Dumbbell-Type Molecular Beacon Probes Bearing Modified Deoxyuridine Derivatives and a Silylated Pyrene as a Fluorophore, *Bull. Chem. Soc.*, 査読有り, **88**, 496-502, 2015.

DOI:http://dx.doi.org/10.1246/bcsj.2014037

② Tomohisa Moriguchi, Satomi Hida, Fumio Yoneda, Kazuo Shinozuka, Synthesis and Spectroscopic Properties of a Novel Bifunctional Pyrene Derivative and its Incorporation into OligoDNA, *Aust. J. Chem.*, 査読有り, 68, 256-259, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/CH14477>

③ Tomohisa Moriguchi, Daisuke Moki, Tohru Sekiguchi, Takahiko Kato, Kazuo Shinozuka, Synthesis and Properties of Novel Fluorescently Labeled Oligonucleotides Possessing Silylated Pyrene at the 5'-Terminus, *Chem. Lett.*, 査読有り, 44, 44-46, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.140800>

④ Jakir Ahmed Chowdury, Tomohisa Moriguchi, Kazuo Shinozuka, Development of a Novel Stem-loop-type Molecular Beacon Probe Possessing Polyamine-connected Deoxyuridine and Silylated Pyrene, *Chem. Lett.*, 査読有り, 43, 1915-1917, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.140805>

[学会発表] (計 12 件)

① 川崎昌和, 森口朋尚, 篠塚和夫, 短鎖オリゴマーを用いたモレキュラービーコンプローブの配列識別能の向上, 日本化学会第 97 春季年会, 2017 年 3 月 19 日, 東京.

② 入江勇輔, 森口朋尚, 篠塚和夫, 高リスク型 HPV 検出用モレキュラービーコンの開発, 日本核酸医薬学会第 2 回年会, 2016 年, 11 月 15 日, 東京.

③ Tomohisa Moriguchi, Ryohei Nakayama, Daisuke Moki, Kazuo Shinozuka, Development of Dumbbell-shaped Molecular Beacon Probe bearing Diphenylsilylated Pyrene, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016, Sep. 28, Kumamoto.

④ 森口朋尚, 中山綾平, 篠塚和夫, ジフェニルシリルピレンを挿入したダンベル型モレキュラービーコンの開発, 日本核酸医薬学会第 2 回年会, 2016 年, 12 月 1 日, 京都.

⑤ Yusuke Irie, Tomohisa Moriguchi, Kazuo Shinozuka, Development of Molecular Beacon Probes for High-risk HPV Genotyping, The 5th International Symposium on Element Innovation, 2015, Nov. 30, Kiryu.

⑥ Satomi Hida, Tomohisa Moriguchi, Kazuo Shinozuka, Synthesis and Fluorescent Properties of Modified

Oligonucleotides containing Silylated Cyanopyrene Derivatives, The 4th International Symposium on Element Innovation, 2014, Oct. 24, Kiryu.

⑦ Jakir Ahmed Chowdury, Tomohisa Moriguchi, Kazuo Shinozuka, Development of Novel Quencher-free Fluorescent OligoDNA Probe utilizing Silylated Pyrene as a Fluorophore, The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2014, Nov. 5 to 7, Kitakyushu City.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠塚 和夫 (SHINOZUKA Kazuo)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号：20206105

(2) 研究分担者

井上 裕介 (INOUE Yusuke)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号：90304302

(3) 連携研究者

森口 朋尚 (MORIGUCHI Tomohisa)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号：70334133

(4) 研究協力者

ジャキール アフメド チョードリー
(Jakir Ahmed Chowdury)

川崎 昌和 (KAWASAKI Masakazu)

入江 勇輔 (IRIE Yusuke)

飛田 伶実 (HIDA Satomi)

茂木 大介 (MOKI Daisuke)

時田 和樹 (TOKITA Kazuki)