

平成 31 年 4 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05853

研究課題名(和文) 発光モード変化で微細環境を識別する新規蛍光核酸の開発と遺伝子検出プローブへの応用

研究課題名(英文) Development of dual-fluorescent ODN probes for SNPs typing

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、分子の平面-ねじれ構造が変化し、それに応じてLE発光とICT発光の2種類の発光が切り替わる新しい環境感応型蛍光核酸塩基を開発している。本研究ではこれを発展させ、より長波長側で感度よくDNAの一塩基変異を検出することが出来る蛍光核酸である3n7nzAおよび37nzAの開発を行った。3n7nzAを含むODNプローブは、標的DNAとの二重鎖形成時に対面塩基がマッチのチミン塩基のときにのみ、蛍光発光波長が長波長側にシフトし、従来のプローブよりも大きな波長変化で感度よく一塩基変異を識別することができた。また、発光波長も従来より長波長側であり、従来より優れたプローブの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

極性、粘性やなどの周辺のマイクロ環境変化に応じて蛍光強度や波長を鋭敏に変化させる環境感応型蛍光核酸塩基を開発し、標的核酸とハイブリダイズした際のマッチ-ミスマッチの違いによるマイクロ環境変化を蛍光色の変化で検出できれば、一塩基変異を含む標的核酸の新たな検出法へと繋がる。さらにこれを応用することで、細胞内での核酸の局所的な構造変化(一塩基変異等も含む)やタンパク質との結合状態変化などを色の変化でリアルタイムに検出できるプローブへと展開が可能である。このような技術は、病院等での瞬時の病気の診断にもつながり、オーダーメイド医療の発展に大きく役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The novel environmentally sensitive fluorescent nucleosides, 3,7-bis-(naphthalen-1-ylethynyl)-8-aza-3,7-dideaza-2'-deoxyadenosine (3n7nzA) and 7-(naphthalen-1-ylethynyl)-8-aza-3,7-dideaza-2'-deoxyadenosine (37nzA), have been synthesized. Both 3n7nzA and 37nzA possess large π -conjugated systems which extend into both the major and minor grooves or the major groove alone, respectively. The nucleosides showed large solvatochromic shifts (3n7nzA: $\lambda_{em} = 45$ nm, 37nzA: $\lambda_{em} = 78$ nm) and were examined for their ability to fluorimetrically report hybridization events. When incorporated into DNA probes, the bis-substituted 3n7nzA selectively recognized T base on target strands which was reported by a distinct change in its emission wavelength in the long wavelength region. Thus, 3n7nzA has the potential for use as a fluorescent probe for structural studies of DNAs including the detection of single-base alterations in target DNA sequences.

研究分野：生物有機化学

キーワード：蛍光核酸 プローブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに、周辺の環境変化に伴い鋭敏に蛍光発光波長を変化させる環境応答型のアミノ酸が開発され、これをタンパク質に導入することで、タンパク質の会合や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開始されている。一方で、マイクロ環境変化に呼応して蛍光強度、波長を変化させる環境応答型の蛍光核酸の検討もなされている。環境応答型の蛍光核酸や、それらを導入した蛍光 DNA プローブが実現すれば、核酸の検出や SNPs (一塩基多型) タイピングのみならず、核酸の構造変化のモニタリング、生体内での RNA の分子イメージング、核酸の一分子計測など様々な分野への応用が可能となる。さらに、DNA 上のタンパク質結合部位に環境応答型蛍光核酸を導入し、タンパク質の結合による極性環境変化に伴う蛍光の変化をモニターすれば、核酸とタンパク質の相互作用をリアルタイムで解析することも可能となり、化学・生命化学やその関連分野での強力な武器になり得る。このようなことから我々は、環境応答型蛍光核酸の開発を行い、それらを含む蛍光 DNA プローブへの応用についての検討を行ってきた。特にこれまで、DNA の二重鎖形成や一塩基変異が生じた際の微細な環境変化に着目し、環境応答型蛍光核酸塩基を用いた遺伝子検出ツール・手法の開発に取り組んできた。

特定の遺伝子配列の検出や、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 (T_m 値) の違いに基づいて検出している。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まではクリアーに検出できず、全く新しい概念を用いた高感度な SNPs 検出法の開発が求められていた。我々は、オリゴ DNA 鎖に導入されたある種の蛍光性核酸が、標的 DNA と二重鎖になった時にのみ発光する現象を見出し、その性質を応用した特定塩基配列の識別法の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にのみ蛍光を発する蛍光性核酸塩基を発表している。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ており、これまでに極性環境の変化に伴って蛍光強度 (強度のみ) が変化する蛍光核酸を数十種類合成してきた。しかしながら、これまでの蛍光核酸塩基は、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) が不十分なこと、蛍光強度が変化するのみで発光波長はシフトしないこと、更には DNA の中で最も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ことなど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、さらに高機能化された蛍光核酸の開発が求められていた。

2. 研究の目的

極性、粘性やなどの周辺のマイクロ環境変化に応じて蛍光強度や波長を鋭敏に変化させる環境応答型蛍光核酸塩基を開発し、標的核酸とハイブリダイズした際のマッチ-ミスマッチの違いによるマイクロ環境変化を蛍光波長 (色) や寿命の変化で検出できれば、一塩基変異を含む標的核酸の新たな検出法へと繋がり、さらにこれを応用することで、細胞内での核酸の局所的な構造変化 (一塩基変異等も含む) やタンパク質との結合状態変化などを蛍光波長 (色) や寿命の変化でリアルタイムに検出できるプローブへと展開が可能である。そのため、我々は、周囲の極性環境の違いにより蛍光発光波長を変化させる核酸塩基をこれまでに多数報告してきた。しかしながら、実用化を視野に入れて遺伝子検出プローブの開発を行なうと、このように極性環境の違いだけをモニターしても十分な波長変化が得られないことがわかってきた。そこで新しいコンセプトを導入して波長変化をより大きくする必要があると考え、従来の極性環境応答型分子に「ねじれ」の要素を追加した 2 種類の発光モードを示す環境応答型蛍光核酸塩基を予備実験の段階でデザインした (3 位置換 3-デアザプリンヌクレオシド)。これは分子の回転による平面性の変化により、LE 蛍光と ICT 蛍光の 2 種類の発光モードを切り替える新しい蛍光核酸塩基であり、これを DNA 鎖に導入することで、従来より大きな波長変化で対面塩基の種類を識別できることがわかってきた。しかし、この 2 種類の発光モードを有する蛍光核酸は、非常に大きな波長変化を示すものの発光波長が短く、遺伝子診断プローブとしての実用化は未だに難しい状態にある。そこで本研究では、この蛍光核酸を新たにデザインして、共雑物が多い生体サンプルでの

使用にも堪えるように発光波長の長波長化を実現し、より高感度で検出可能な新しい遺伝子検出、一塩基変異(SNPs)検出プローブの開発を目指した。

3. 研究の方法

前述の通り、粘度環境変化に伴って分子の平面-ねじれ構造が変化し、それに応じて波長の短いLE発光と波長の長いICT発光の2種類の発光が切り替わる新しい環境応応型蛍光核酸塩基を見出している(3位置換3-デアザプリンヌクレオシド)。この修飾塩基を含むオリゴデオキシヌクレオチド鎖は、マッチであるチミンと水素結合を形成した際に、DNAメジャーグループに突き出された蛍光色素部位が、ねじれ構造になることでLE発光を示すことが明らかになっている。したがって、相補鎖側の相手塩基のマッチ-ミスマッチの違いによって、発光モードが切り替わることが重要であり、より鋭敏に発光波長を変化させて識別することができる遺伝子プローブが求められる。そこで、LE発光とICT発光の2種類の発光を示す、より優れた新たな蛍光核酸のデザインを行い、DNA二重鎖形成時に溝の幅が狭いマイナーグループの環境をモニターできるような新たなヌクレオシドの開発を行うこととした。具体的な研究手法としては、予備実験で得られた分子構造を新たに設計しなおし、有機合成的な手法を用いて実際に合成、評価し、このプロセスを繰り返すことで最適化を行った。

4. 研究成果

予備実験および本研究の初期の段階で、我々は、3,7-デアザアデノシン (^{3nz}A)および8-アザ-3,7-デアザアデノシン (^{3nz}A)のC3位にエチルナフタレンを修飾した新規蛍光性核酸塩基を開発しており、マイナーグループの微細環境をモニタリングすることにより対面塩基の識別に成功している。本研究では、これを発展させて同様のメカニズム(2種類の発光モードを示す環境応応型蛍光核酸塩基)で作用する蛍光核酸を何種類か見出すことが出来た。しかしながら、これらの蛍光核酸の発光波長は、

やはりいずれも短く、遺伝子診断プローブとしての実用化は未だに難しい状態にあった。そこで、8-アザ-3,7-デアザアデノシンのメジャーグループ側であるC7位に共役系を伸ばすことで、発光波長の長波長化が期待できる蛍光核酸塩基 ^{3nz}A をデザインすることを試みた。また、同時に、メジャーグループ側の環境をモニタリングした場合でも同様に対面塩基の識別が可能であるとも考えC7位にエチルナフタレンを修飾した ^{3nz}A をデザインした。すなわちC3位からC7位にかかる大きな共役系を有する ^{3nz}A とメジャーグループ側の環境をモニタリングする蛍光核酸である ^{3nz}A を合成し、DNA鎖に導入して塩基識別能の検討を行うこととした(Fig. 1)。

はじめにモノマーユニットの合成を行った。まず、2,4-ジクロロピリジン **3** を出発物質として9段階の反応を経て合成上重要な中間体になる7-ヨード体 **12** を得た。その後菌頭反応によりエチルナフタレンを導入してC7位のみが修飾された ^{3nz}A (**2**) を得ることに成功した。次に得られた7-ヨード体 **12** に対して TBDMSCl を用いて水酸基を保護し、その後N-ヨードスクイミドを用いてC3位をヨウ素化して、C7位とC3位が共に修飾された重要な合成中間体となる3,7-ジヨード体 **14** を合成した。これに対して菌頭反応を行うことでエチルナフタレンを導入し、その後、脱保護を行うことでC7位とC3位が共に修飾された ^{3nz}A (**1**) を得ることに成功した。(Scheme 1)

次に得られた ^{3nz}A および ^{3nz}A の光学特性の検討を行った。まず、C7位にエチルナフタレンを修飾した ^{3nz}A を極性の異なる様々な溶媒中に溶解し、蛍光、UVスペクトルの測定を行った。

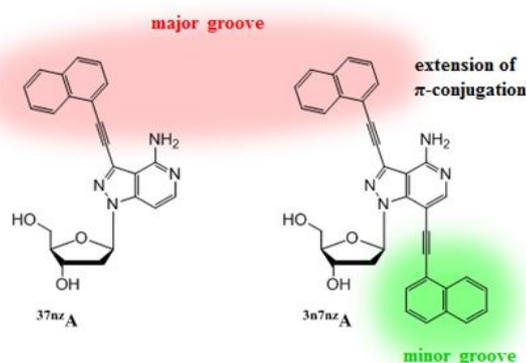
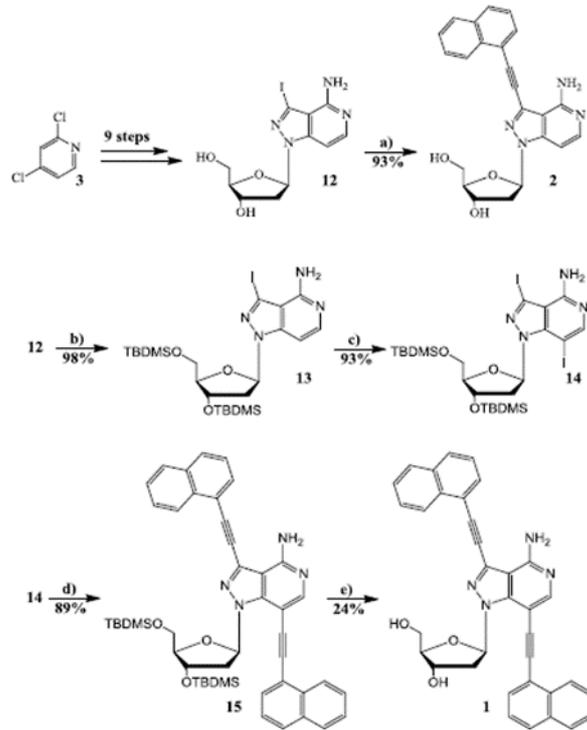


Fig. 1 ^{37nz}A および ^{3nz}A 分子デザイン

^{37nz}A は 1,4-ジオキサンや THF のような極性の低い溶媒中では短波長領域で弱い蛍光発光を示したのに対し、エタノールやメタノールのような極性溶媒中では長波長シフトした発光を示した。溶媒の違いによる波長の差は 96 nm となり、非常に大きな波長の変化が観察された。一方、C7 位と C3 位が共に修飾された $^{3n7nz}A$ (1) は、予備実験で合成した C3 位のみが修飾された ^{3n7z}A と類似のモノマー光学特性を示すことがわかった。すなわち、1,4-ジオキサンのような極性の低い溶媒中では強い発光を示し、DMSO や DMF のような極性の高い溶媒中では、発光強度は中程度で長波長シフトした発光を示した。溶媒の違いによる波長の差は 45 nm でありこちらも非常に大きな波長の変化が観察された。さらに $^{3n7nz}A$ (1) は、C3 位のみが修飾された ^{3n7z}A と同程度の蛍光強度を示しつつも全体的に波長が長波長側へシフトしていることが判った。これらの結果から、 ^{37nz}A および $^{3n7nz}A$ とともにソルバトフルオクロミックな性質を示すことがわかった。したがって、 ^{37nz}A および $^{3n7nz}A$ を含む DNA プローブを作成すれば DNA の微細環境をモニタリングすることが可能と考えられたため、次に、これらの環境感応型蛍光ヌクレオシドの ODN プローブへの導入を検討することとした。

合成により得られた新規ヌクレオシドを DNA 自動合成機を用いて ODN 鎖に導入するために、続いて $^{3n7nz}A$ (1) および ^{37nz}A (2) のトリチル体の合成を行った。Scheme 1 の化合物 1 および 2 のアミノ基をそれぞれ *N,N*-ジピチルホルムアミドジメチルアセタールで保護した後に 5' 位の水酸基をトリチル基で保護した。さらに 3' 位の水酸基をアミダイト化することで各アミダイト体を得ることに成功した。これらを用いて、DNA 自動合成機により 13 mer で配列の真ん中に $^{3n7nz}A$ (1) および ^{37nz}A (2) を導入した DNA 鎖 (ODN プローブ) を作成した。得られた ODN プローブを高速液体クロマトグラフィーを用いて生成し、一塩基識別能等の評価を行った。

得られた ODN プローブを標的 DNA (13 mer の長さで真ん中の塩基が A, T, G, C の 4 種類のものを用意) とハイブリダイズさせて二重鎖の熱安定性および光物理学的性質 (蛍光スペクトル変化による一塩基識別能) を評価したところ、C7 位にエチルナフタレンを修飾した ^{37nz}A を含むプローブでは、大きな蛍光波長シフトが観察されず、対面塩基の識別を行うことが出来なかった ($\Delta\lambda=13\text{nm}$)。それに対して C7 位と C3 位が共に修飾された $^{3n7nz}A$ を含むプローブでは、予備実験で合成した C3 位のみが修飾された ^{3n7z}A よりも長波長シフトした蛍光スペクトルが観察された。さらにフルマッチの時の DNA 配列を明確に識別する ($\Delta\lambda=38\text{nm}$) ことに成功し蛍光プローブとして有用であることがわかった。



Scheme 1 (a) 1-ethylnaphthalene, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, 60 °C, 1.5 h; (b) TBDMSO, imidazole, DMF, rt, overnight; (c) N-iodosuccinimide, DMF, rt, overnight; (d) 1-ethylnaphthalene, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, 50 °C, 3 h; (e) TBAF, THF, rt, 1 h.

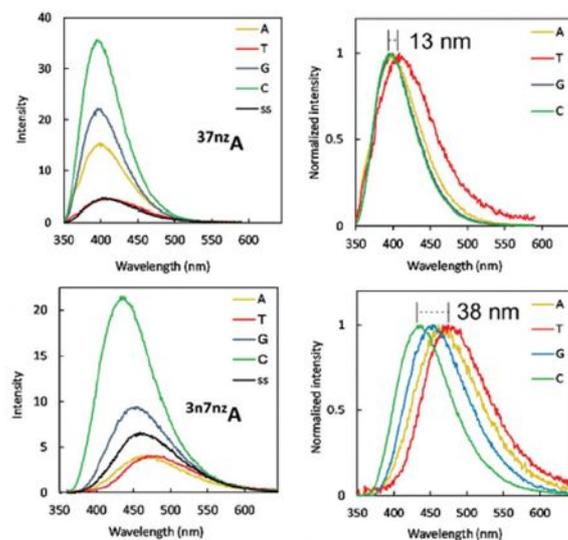


Fig. 2 ^{37nz}A および $^{3n7nz}A$ の蛍光スペクトル

(Fig. 2)。

このように、我々がこれまで開発してきた従来の蛍光プローブと比較して、より検出がしやすいと考えられる長波長側で発光し、かつ、発光波長変化の大きいプローブを得ることが出来た。対面塩基の違いに伴う発光波長変化が大きいことで、一塩基変異の検出感度の向上が期待され、さらに発光波長の長波長化により共雑物の多い、細胞、組織サンプルへの適用も期待できると考えられる。現在 PCR 産物への応用を目指した実験を準備している段階であり、今後さらなる発展を目指して研究を継続中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

M. Yanagi, A. Suzuki, R. H. E. Hudson, Y. Saito

A fluorescent 3,7-bis-(naphthalen-1-ylethynylated)-2'-deoxyadenosine analogue reports thymidine in complementary DNA by a large emission Stokes shift

Org. Biomol. Chem., 査読有り (2018) vol. 16, 1496-1507. (10.1039/C8OB00062J)

A. Suzuki, M. Yanagi, T. Takeda, R. H. E. Hudson, Y. Saito

The fluorescently responsive 3-(naphthalen-1-ylethynyl)-3-deaza-2'-deoxyguanosine discriminates cytidine via the DNA minor groove

Org. Biomol. Chem., 査読有り (2017) vol. 15, 7853-7859. (10.1039/C7OB01931A)

T. Yamauchi, T. Takeda, M. Yanagi, N. Takahashi, A. Suzuki, Y. Saito

C2-substituted 8-aza-7-deaza-2'-deoxyadenosines as environmentally sensitive fluorescent nucleosides for discriminating apurinic/aprimidinic sites in DNA duplex

Tetrahedron Lett. 査読有り (2017) vol. 58, 117-120. (org/10.1016/j.tetlet.2016.11.029)

〔学会発表〕(計 2 件)

柳昌樹、白岩昭吾、齋藤義雄

8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体を含む環境感応型蛍光 DNA プローブの開発

第 29 回万有仙台シンポジウム、仙台、2018 年 6 月

柳昌樹、山内拓史、根本修克、齋藤義雄

新規蛍光性 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体を用いた DNA 配列の識別

2017 年光化学討論会、仙台、2017 年 9 月

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：根本 修克

ローマ字氏名：(NEMOTO, Nobukatsu)

所属研究機関名：日本大学

部局名：工学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 30237812

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。