

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05700

研究課題名(和文) 幅の狭いDNA副溝における分子のねじれを利用した蛍光ペプチド核酸プローブの開発

研究課題名(英文) Development of novel environmentally sensitive fluorescent PNA probes

研究代表者

齋藤 義雄 (SAITO, Yoshio)

日本大学・工学部・教授

研究者番号：40385985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、蛍光DNAプローブの開発で培ってきた蛍光色素データーを基に、これに分子の「ねじれ」の要素を加えて実用的なPNA型のプローブ開発を目指すものである。本研究の前半では、いくつかのDNAプローブを作成し、その過程で新規PNAプローブ設計に適用可能な候補となる最適な蛍光核酸塩基を見出した。候補となる核酸塩基部位をいくつか作成し、光学特性の検討も行った。その後、確立した合成ルートに基づき、ペプチド固相合成法に適合する形でのモノマーユニットの合成に成功し、モノマーレベルでの光学特性の評価を行った。これらをペプチド鎖に導入し、現在プローブ鎖の構造確認中である。今後は塩基識別能の評価を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸などの生体分子の会合やフォールディングなどの構造変化を蛍光の変化で直接モニターする研究が盛んにおこなわれている。解析のためのより優れたツールが得られれば、より強力な武器になり得るため、様々なグループがプローブ分子の開発にしのぎを削っている。このような研究は、市販の蛍光色素を導入したDNAプローブを用いることが多いが、これらは単に光るだけで本研究のようなインテリジェントな蛍光色素とは一線を画する。本研究のようなICT/LEの2種類の発光モードが切り換え可能な新しい環境感応型蛍光核酸塩基の基本設計はこれまでに全く報告されていないため、学術的にも社会的にも非常に大きな意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Numerous efforts to impart useful photophysical features upon non-emissive natural nucleobases have been reported. In this study, we have developed novel environmentally sensitive fluorescent PNA building blocks. The newly synthesized environmentally sensitive fluorescent PNA monomer exhibited strong solvent polarity and viscosity dependent fluorescence emission at longer wavelength region. This newly synthesized environmentally sensitive fluorescent PNA monomer can be a powerful tools for structural studies of nucleic acids and also in molecular diagnostics.

研究分野：生物有機化学

キーワード：PNA DNA プローブ

1. 研究開始当初の背景

分子周辺の環境変化に伴い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波長変化により直接モニターする研究が行われている。特に最近では、周辺の微細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についての検討もなされている。環境応答型の蛍光核酸を導入したプローブが実現すれば、DNA や RNA などの核酸の検出や 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、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・生命科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、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、DNA の二重鎖形成時の構造変化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。

その過程において、特に、極性、粘性、pH などの蛍光核酸塩基周辺の微細な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の開発を行ってきた。標的 DNA や RNA とハイブリダイズした際のマッチ-ミスマッチの違いを周辺の極性、粘性、pH などの変化として蛍光波長(色)や寿命の変化で検出できれば、従来法に比べ検出感度は向上し、一塩基変異検出を含む標的核酸の新たな検出法へと繋がると考えた。さらにこれを応用すれば、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の足掛かりになると考えた。このような考えに基づき、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の開発を重点的に行ってきた。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。さらに、細胞内での核酸構造のリアルタイム検出を見据えたプローブデザインを目指す、酵素耐性やハイブリダイゼーション能に劣る DNA プローブそのものの設計について再検討する必要があると考えられた。

そこで、従来の DNA プローブより酵素耐性やハイブリダイゼーション能に優れ、細胞導入や局在化のための修飾が容易なペプチド核酸 (PNA) プローブに着目し、さらに従来の極性環境応答型塩基部位に「ねじれ」の要素を追加した、新しいコンセプトを導入することで、蛍光発光波長変化や寿命の大幅な変化が期待できる実用的なプローブの開発を目指した。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、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塩基識別型蛍光性核酸塩基を発表し、これをオリゴ DNA 鎖(プローブ)に導入することで核酸中の一塩基識別法の開発を行ってきた。本研究では、これを発展させ、従来の極性環境応答型塩基部位に「ねじれ」の要素を追加した、新しいコンセプトを導入することで、蛍光波長(色)や寿命の違いにより標的核酸の局所的な構造変化や一塩基変異を簡便に識別する手法の開発を行った。さらに細胞内リアルタイム検出を目指して、上述の理由により、ペプチド核酸 (PNA) プローブへの展開を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

前述の通り、我々は標的核酸と二重鎖を形成した際の微細な環境変化にตอบสนองし、蛍光強度や波長を変化させる、様々な環境応答型核酸塩基の開発を行ってきた。本研究では、これまでの DNA プローブの開発を継続して行うことで、より環境応答性に優れた核酸塩基のスクリーニングを行うこととした。それらの過程で、優れた性質を有する塩基が見いだされた際には、これと並行して、PNA モノマーや PNA プローブへの適用を検討する手法を用いることとした。

4. 研究成果

予備実験から本研究の前半にかけて、様々な骨格を有する蛍光核酸モノマーおよびそれらを含む DNA プローブを作成し、一塩基識別能についての検討を行ってきた。その過程において、我々は新規環境応答型蛍光核酸塩基として C3 位を 1-エチニルナフタレンで修飾した 8'-アザ-3,7 ジデアザ-2'-デオキシアデノシンを見出し、これを導入した DNA プローブを用いることで、蛍光波長変化により標的 DNA 中のチミン塩基をクリアーに識別することに成功している。このように環境応答型蛍光核酸塩基として優れた骨格を見出すことが出来たことから、この 8'-アザ-3,7 ジデアザアデニン骨格を含む PNA プローブの開発に取り掛かった。

前述の通り、一般的に DNA プローブは酵素耐性や細胞膜透過性など、実用化に向けて克服すべき点も多く、より優れたプローブの開発が求められている。PNA は非天然の核酸であるた

め、酵素耐性を有していることが知られている。さらに DNA と異なり、リン酸基が存在しないため、二重鎖形成時に静電反発を生じず、より優れたハイブリダイゼーション能が期待できる。このようなことから、8-アザ-3,7-ジデアザアデニンの C3 位に 1-エチルナフタレンを導入した環境感応型蛍光 PNA プロープの開発を行うこととした (Fig. 1)。

実際の合成ルートとして、はじめに 4-クロロ-1H ピラゾロ[4,3-c]ピリジン 2 を出発物質とし、この塩基基部位に 2,4-ジメトキシベンジルアミンを導入して 3 とした。続いて 3 とプロモ酢酸エチルを反応させて 4 とし、脱ベンジル化することで 5 に変換した。得られた 5 の C3 位をヨウ素化して 6 とした後に、菌頭反応により 1-エチルナフタレンを導入することで 7 を得た。7 のアミノ基を Boc 基で保護して 8 とした後に、エステルを加水分解して 9 を得た。得られた化合物 9 と別途合成した 10 をカップリングさせ化合物 11 を得た。続いて 11 を脱保護することで、ペプチド固相合成法に適用可能な化合物 1 を合成することに成功した (Scheme 1)。

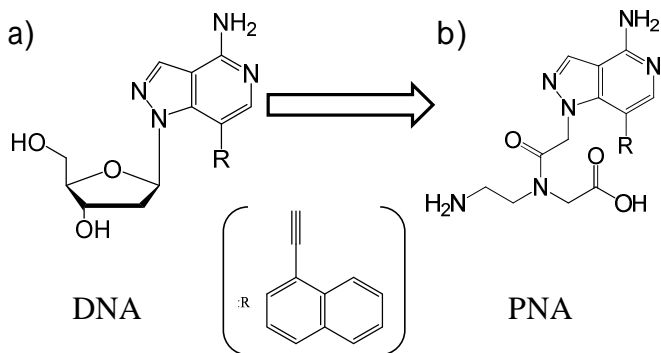
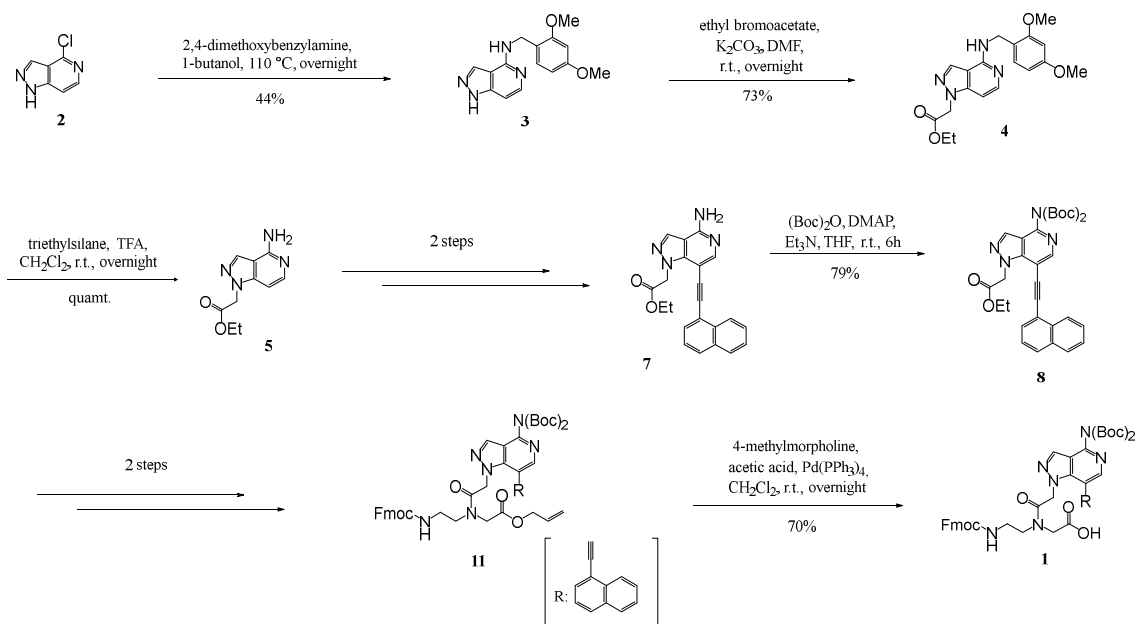


Fig.1 a)従来開発した DNA プロープ (DNA)
b)本研究でデザインした新規 PNA プロープ (PNA)



Scheme 1. C3 位をエチルナフタレンで修飾した 8-アザ-3,7-ジデアザアデニン骨格を有する PNA モノマーの合成

続いて、得られた化合物 7 の光学特性の検討を行った。合成ルートにおいて、化合物 7 以降は塩基部位に Boc 基が導入されており、光学特性に影響を与えることが考えられたため、化合物 7 を用いることとした。

溶媒極性 (誘電率) および粘度の異なる様々な溶媒中で吸収スペクトルを測定した結果、高粘度の溶媒であるグリセロール時のみ吸収スペクトルが短波長側にシフトすることがわかった。また、同様に蛍光スペクトルを測定した結果、誘電率の変化に伴って蛍光発光波長が変化するソルバトクロミックナ性質を有することがわかった (Fig.2 左)。さらに蛍光スペクトルにおいてもグリセロールの時に最も短波長側で発光が見られることがわかった (Fig.2 中、右)。このことから、本研究で開発した PNA モノマーユニットは環境感応型の性質を有することがわかった。

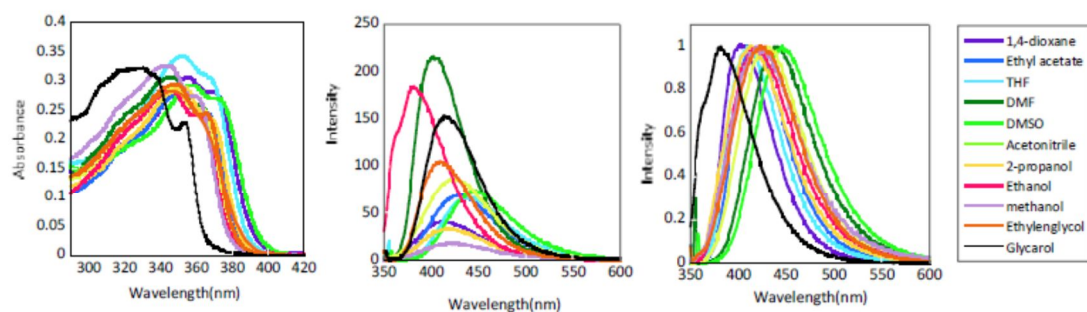


Fig. 2. (a) Absorption spectra of 7 in various solvents of different polarities. (b) Fluorescence and (c) normalized fluorescence spectra of 7 in various solvents of different polarities..

また、溶媒の誘電率とストークスシフトの関係を図に示した結果、グリセロール以外の溶媒では直線関係にあるのに対して、グリセロールのみ直線に乗らず、発光のメカニズムが異なることが示唆された (Fig. 3)。Fig. 2 右の吸収スペクトルの結果と以前の研究結果より、この分子は、高粘度のグリセロール中において、ねじれた状態が維持されているものと考えられ、当初の目的とする、「ねじれ」の性質を持つ蛍光核酸塩基が得られているものと考えられる。

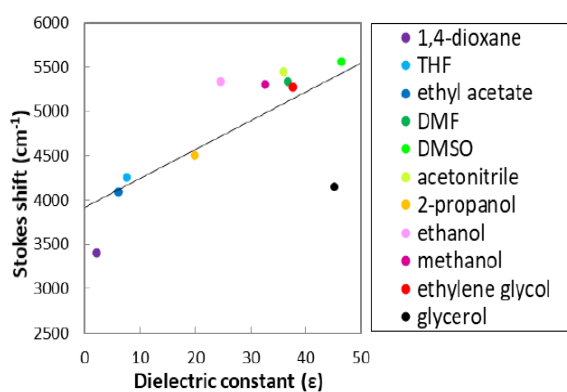


Fig 3. A plot of the Stokes shifts of 7 against the dielectric constants of the solvents

このように合目的の蛍光 PNA モノマーユニットが得られたため、固相合成法により PNA プローブの作成についての検討を行った。10 mer から成る PNA 鎖の真ん中に蛍光 PNA を含むプローブをデザインし、通常の高相合成法に従ってプローブ鎖の作成を行った。通常の出し操作を行い、現在 HPLC による精製を行っている段階である。精製及び同定が終了次第、標的 DNA 鎖の検出能の評価および一塩基変異の検出能の評価を行う予定である。

本研究を通して、当初の研究目的の一つであった、従来の極性環境感応型塩基部位に「ねじれ」の要素を追加した、新しいコンセプトを導入した PNA モノマーユニットを得ることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S. Koboku, M. Yanagi, A. Funato, A. Suzuki, Y. Saito	4. 巻 61
2. 論文標題 2-Ethynyl-naphthalene-modified 8-aza-3,7-dideaza-2'-deoxyadenosine derivative discriminates thymine in target DNA via changes in the fluorescence wavelength	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Lett.	6. 最初と最後の頁 151841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tetlet.2020.151841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 船戸彩加、一色田萌衣、塚田匠、小林彩夏、齋藤義雄
2. 発表標題 C3位に1-フェニルナフタレンを含む8-アザ-3,7-ジデアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の合成と光学特性
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小木聖徳、柳昌樹、鈴木梓、齋藤義雄
2. 発表標題 3-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体を含む環境応応型蛍光DNAプローブの開発
3. 学会等名 2019年光化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小木聖徳、船戸彩加、桑原健、齋藤義雄
2. 発表標題 8-アザ-3,7-ジデアザアデニン骨格を有する新規蛍光ヌクレオシドの合成と光学特性
3. 学会等名 2019年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------