

機関番号：32665
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21750176
 研究課題名（和文） 多情報 DNA 検出システムのための蛍光プローブの開発
 研究課題名（英文） Development of novel Ends-Quencher-Free molecular beacon for DNA sequence analysis
 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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、DNA インク検出技術に応用可能な新規蛍光プローブを搭載した DNA チップの開発と、それらに応用した新しい DNA インク検出法の開発を行ってきた。本研究期間内に開発したプローブを用いて溶液系での塩基識別能の評価を行った結果、これまでのプローブの結果を上回る高い S/N 比を示すものが得られた。同時に、これまでに開発してきた蛍光ヌクレオシドよりも合成が容易で、長波長で発光する蛍光分子の開発も行った。得られた蛍光ヌクレオシドのモノマー段階での蛍光特性を評価した結果、いくつかの化合物が従来に比べて優れた蛍光特性を示すことがわかり、新たなプローブを開発する上で有望な化合物が得られた。

研究成果の概要（英文）：

We synthesized various substituted fluorescent deoxyadenosine derivatives. Among them cyano-substituted deoxyguanosine analog showed a remarkable solvatochromicity. Such environmentally sensitive solvatochromic fluorescent adenosine analog may be useful for sequence specific DNA detection with high efficiency.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：DNA, 蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

東南アジアをはじめ世界各地で小切手や金券等に代表される有価証券類や、遺言状のような様々な印刷物の偽造事件があとを絶たず、それらの真贋を迅速に判別する方法の開発が急がれている。「何時でも」、「何処でも」、「誰にでも」、印刷物の真贋が簡単に判定できるような技術が開発されれば、非常に高い需要があると考えられている。そのよう

な要求を満たし得る代表的な真贋判定技術として高セキュリティインクがあり、その代表的なものとして DNA インクが知られている。

現在、既に一部で真贋判定のための DNA インクの実用化が試みられているが、従来の検出方法では DNA の抽出から判定までに長時間を要してしまい、誰もが簡単に使用できるといった状況からは程遠い。つまり、この DNA イ

ンクが一般に実用化されるようにするため、更に、インクそのものに情報を持たせるような高度なシステムを構築するためには、特定の DNA 塩基配列の有無を簡単、迅速かつ確実に検出できる、安価でハイスループットな方法の開発が必要となる。そのためには、従来のコンセプトとは異なる、全く新しい DNA 検出法の実現が必要であり、それを可能とするための新しい DNA 検出プローブの開発が不可欠である。

そこで、簡単、迅速かつ確実なうえ、低コストでハイスループットに検出が可能な DNA インク検出用プローブとして、新たにエンドフリー・クエンチャーフリーモレキュラービーコン (EQF-MB) を開発し、DNA インク検出システムを確立することを考えた。

2. 研究の目的

これまで我々は、DNA 鎖に導入されたある種の蛍光性核酸が、DNA 二重鎖を形成した時にのみ蛍光発光あるいは蛍光消光を持つ現象を見出し、このようなインテリジェントな性質を応用した特定塩基配列の識別法の実現を目指してきた。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核酸塩基 (BDF 塩基) を発表している。この核酸塩基の開発過程において、一部の蛍光色素が DNA 塩基配列中のグアニン塩基により強く消光され、更に DNA が二重鎖を形成した際にその消光の度合いが強くなる現象を見出した。そこで、この蛍光色素を改良し、従来の遺伝子検出プローブであるモレキュラービーコン (MB) に応用して DNA チップに搭載すれば、低コストかつ紫外線を照射するだけの簡単な操作で、特定の DNA 配列の検出が可能になると考えた。さらに本申請で開発する新規なエンドフリー・クエンチャーフリーモレキュラービーコン (EQF-MB) を利用すれば、DNA の両末端に蛍光分子とクエンチャー分子が必要な従来のモレキュラービーコンとは異なり、DNA の両末端の修飾が容易にでき、ハイスループットな解析が可能な DNA チップ化が容易に出来るものと考えられる。そこで本研究では、これまで検討を重ねてきた核酸塩基の特性を活かし、DNA チップに搭載可能な改良型新規蛍光プローブである EQF-MB を開発し、さらにこれまですすめてきた BDF プローブのチップ化技術を応用してチップ化を試みることを目的とする。

3. 新しい DNA 検出プローブを用いた DNA インクの解析方法

本研究では、DNA インク検出技術に応用可



能な新規蛍光プローブ (EQF-MB) を搭載した DNA チップの開発と、それを用いた DNA インク検出法を開発することを目的として様々な実験を行った。この研究のプローブに用いるインテリジェント蛍光核酸は、我々がこれまで開発してきた特定塩基配列の識別プローブである BDF 塩基の開発過程で見出したものを DNA インク検出用に最適化し、既存の遺伝子検出プローブであるモレキュラービーコン (MB) に応用したものである。BDF 塩基は我々オリジナルの技術であり、この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という特性を活かすことで従来の MB で必要とされた蛍光消光分子が不要となり、低コスト化が実現できる。また、インテリジェント蛍光核酸を用いることで、従来のモレキュラービーコンとは異なり、DNA 両末端の修飾が必要なくなる。これにより DNA チップに搭載するための修飾が容易になり、ハイスループットな検出が可能となる。従って、まず、新しいインテリジェント蛍光核酸を含むプローブの有機合成を徹底して行い、その構造と DNA 検出能の評価を行った後に、チップ化の検討を行い、その後実際の DNA インクに含まれる DNA 配列の検出を検討する。

4. 研究成果

そこで、今までの結果を踏まえた上で、シンプルで合成し易く、かつ実際に利用しやすい化合物を用いてのプローブの作成を検討した。分子設計としては、塩基対を作ることができる天然の核酸塩基に三重結合を介してよりシンプルな芳香族発色団を導入し、芳香族の置換基を変えることにより、分子内電荷移動状態 (ICT) を創出するというもの考えた。ICT 状態からの発光は極性や粘度、水素結合性などに強く依存することが知られているため、この性質を利用することでよりシンプルな環境感応型核酸塩基の開発を試みた。

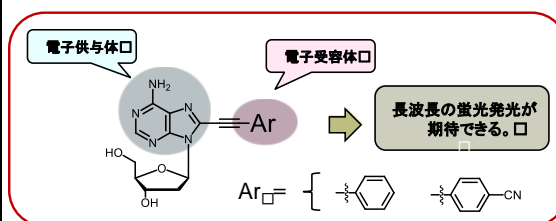
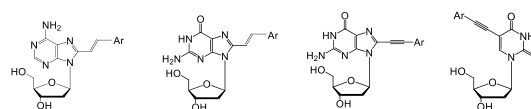
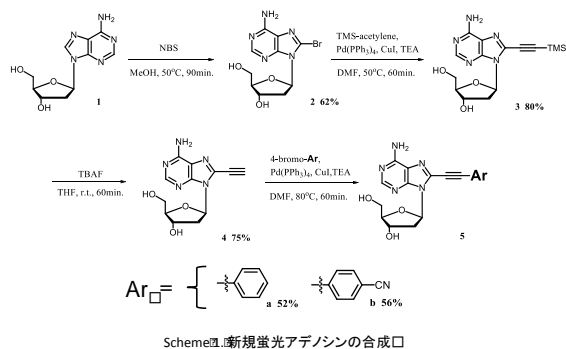


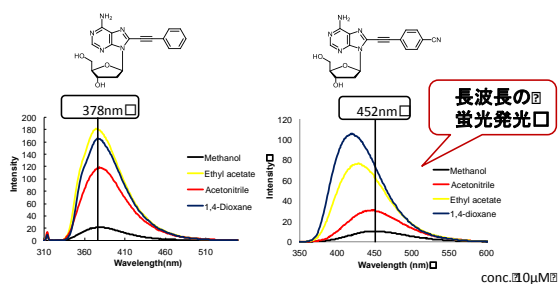
図1.新しい蛍光スクレオンドのデザイン

実際にはScheme 1に示した合成ルートを用

いて図2に示したような、アデニン塩基とシンプルな芳香環とを連結した化合物を合成した。



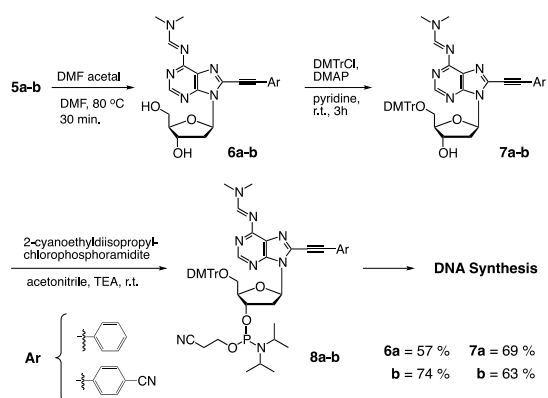
アデニン塩基と無置換のベンゼンを単純に三重結合で連結した化合物では溶媒の極性変化に伴った顕著な蛍光強度や波長の変化は認められなかった。それに対して電子吸引性基であるシアノ基を導入した化合物では非極性溶媒中で強い蛍光発光を示し、極性溶媒中ではレッドシフトし弱い蛍光発光を示すことが分かった。また、置換基の違いによる蛍光発光波長の違いを比較してみると、無置換のベンゼンを導入したときの発光波長は378 nmであったのに対して、シアノベンゼンを導入した場合には452 nmとなり、70 nm以上長波長側にシフトしてことが分かった。このことから、当初考えていた通り電子吸引性置換基を導入した際に顕著な溶媒依存性を示すことが確認され、目的とするような蛍光ヌクレオシドが得られたことが分かった。



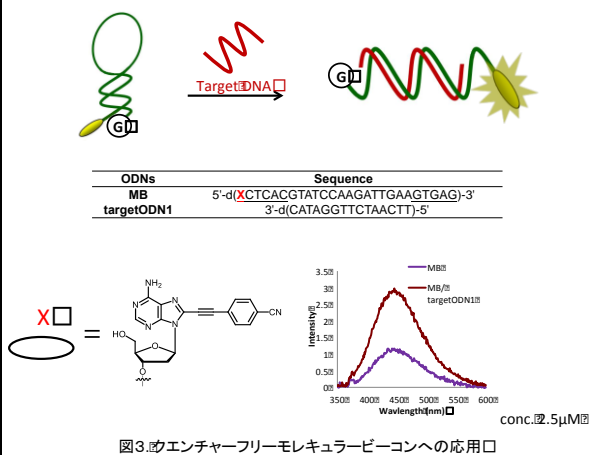
このような蛍光核酸塩基を創出したが、その中で最もシンプルな構造で、かつ顕著に溶媒フルオロクロミックな性質を示す蛍光核酸塩基であるシアノベンゼンを含むヌクレオシド誘導体を用いてクエンチャーフリーモレキュラービーコンを作成し、標的DNAを検出出来るか検討を行った。

まずDNA鎖への導入のために、Scheme 2に

示した合成ルートにより、DNA自動合成機に適用できるアミダイト体へと変換した。これを用いてDNA自動合成機により、目的の配列を有するDNA鎖を合成した。



得られたDNA鎖をHPLCにより生成し、構造確認を行って、目的の配列を有するクエンチャーフリー・モレキュラービーコンを得ることに成功した。この溶媒フルオロクロミックなヌクレオシドを中心に含む16merからなるDNAプローブを用いて、標的DNAに相当するDNA鎖の有無による蛍光スペクトルの変化を測定した (図3)。



その結果、標的DNAが存在しない場合にはほとんど蛍光発光しないのに対して、標的DNAを加えた場合には強い蛍光発光を示すことが分かった。このことから標的DNAの有無を蛍光発光の有無で肉眼でも簡単に検出できることが分かった。

このように、当初目的としていた、よりシンプルな構造を有し、かつ蛍光発光波長の長い新規な蛍光ヌクレオシドを開発することに成功した。また、これをDNA鎖に導入し、標的DNAの有無により蛍光スペクトルを測定することで新しいクエンチャーフリーモレ

キュラービーコンとして応用可能であることを確認した。

これらの実験結果を基に、現在チップ上でのDNA鎖の検出についての応用を検討している段階である。さらに、チップ上のみならず溶液系でのハイスループットなDNA検出系の開発についても検討を行っている段階である。

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4件)

- 1) Singly and doubly labeled base-discriminating fluorescent oligonucleotide probes containing oxo-pyrene chromophore, S.S. Bag, R. Kundu, K. Matsumoto, Y. Saito, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 3227-3230, (2010), 査読有
- 2) Synthesis of Novel Push-Pull-Type Solvatochromic 2'-Deoxyguanosine Derivatives with Longer Wavelength Emission, Y. Saito^{*}, A. Suzuki, K. Imai, N. Nemoto, I. Saito^{*}, *Tetrahedron Lett.*, 51, 2606-2609, (2010), 査読有

[学会発表] (計1件)

- 1) 遺伝子診断のための蛍光 DNA プローブの開発, 齋藤義雄, 第32回日本光医学・光生物学会, 2010年7月21日, 東京【受賞講演】

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 義雄 (日本大学・工学部・准教授)

研究者番号: 40385985