

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22750149

研究課題名（和文）

“DNAドット”を活用した高感度ラベル化法の開発

研究課題名（英文）

Development of highly-sensitive labeling agents by using “DNA dots”.

研究代表者

櫻田 啓 (KASHIDA HIROMU)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：30452189

研究成果の概要（和文）：本研究では DNA 中に蛍光色素を導入することにより高輝度蛍光ラベル化剤の開発を目指した。従来の蛍光色素による核酸ラベリングにおいては電子移動による消光が大きな問題であった。そこで、本研究では電子移動を遮蔽するシクロヘキサン誘導体による人工塩基対を蛍光色素-核酸塩基間に導入することにより、蛍光色素の高輝度化を目指した。その結果、ピレンやペリレンジイミドといった蛍光色素の量子収率を飛躍的に向上させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop highly-sensitive labeling agents by incorporating fluorophores into DNA. We developed artificial base pairs by incorporating cyclohexane derivatives between a fluorophore and nucleobases. As a result, quantum yields of fluorophores such as pyrene and perylenediimide were drastically enhanced. In addition, we demonstrated that the quantum yield of FITC was also improved by incorporating cyclohexane derivatives.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：核酸化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：DNA・電子移動・インスレーター・シクロヘキサン・蛍光・人工塩基対・NMR・量子収率

## 1. 研究開始当初の背景

CdSe、CdTe などのナノ粒子は量子ドットと呼ばれ、現在核酸やタンパク質などの生体物質のラベリングや一分子観察などに広く用いられている。この量子ドットは従来の有機分子による蛍光ラベリングと比べ、光化学的に非常に安定であり、大きな発光強度及びストークスシフトを有していることから高感度な検出が可能である。更に、粒子のサイズを変化させることで発光波長を自由に制御することが出来る。そのため、従来の蛍光色素によるラベリングに変わる次世代のラ

ベル化剤として期待されている (X. Michalet, *et al. Science*, **2005**, 307, 538)。しかしながら、量子ドットにはそれ自身細胞毒性を持つという非常に大きな問題点がある。そのため、細胞毒性を抑制するために様々な表面修飾の手法が開発されてきたが、調製法が煩雑であるという欠点があった。

それに対し、有機蛍光色素によるラベル化は簡便であることからバイオテクノロジーにおいて盛んに利用されている。しかしながら、蛍光色素一分子によるラベル化はその感度が低い点が大きな問題であった。吸光係数

を増大させるために複数の蛍光色素による単純なコンジュゲートも報告されているが、蛍光色素の自己消光により感度の低下することが報告されている。更に、核酸のラベル化においては核酸塩基との電子移動によって蛍光色素の量子収率が低下することも問題となっていた。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では蛍光分子をDNAに導入することによって、高感度なラベル化剤（“DNAドット”）の開発を目指した。具体的には、核酸塩基との電子移動による消光を防ぐために、電子移動を抑制する非平面分子（インスレーター）を開発した。また、そのインスレーターを核酸塩基—蛍光色素間に導入することによって、蛍光色素の量子収率の向上を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 電子移動の抑制を目指したインスレーター塩基対の開発

2. で述べたように従来の蛍光色素による核酸のラベル化においては、電子移動による消光が大きな問題であった。そこで、イソプロピルシクロヘキサンを電子移動を遮蔽するインスレーターとして用いた。具体的にはこの分子を人工塩基対として導入することによって、電子移動を抑制することを目指した。しかしながら、これまで芳香環を持たない非平面性分子が人工塩基対として機能した例は報告されていない。そこで、この分子を対応する位置に導入した二重鎖についてNMRによる構造解析を行った。また、二重鎖の融解温度を測定することによって、人工塩基対として機能するかどうかを調べた。

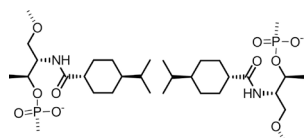


図1. 非平面性人工塩基対の構造

(2) インスレーターを用いた蛍光色素の高輝度化

(1) のインスレーター塩基対を核酸塩基—蛍光色素間に導入することによって蛍光色素の量子収率の増大を目指した。具体的な色素としては核酸塩基との電子移動によって消光することが知られている、ペリレンジイミド、ピレンを用いた。また、極性により発光波長を変化させるナイルレッドの周囲にインスレーター塩基対を導入することによって、疎水性の効果についても検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 図1に示す分子が「塩基対」として機能するためには二重鎖内部に位置する必要がある。そこで、非平面性人工塩基対を導入した二重鎖についてNMRによる構造解析を行った。その結果、シクロヘキサン誘導体は非平面構造を持つにもかかわらず、二重鎖内部に位置することが分かった（図2）。これはDNA二重鎖内部に位置することによって電子移動を抑制する可能性があることを示している。

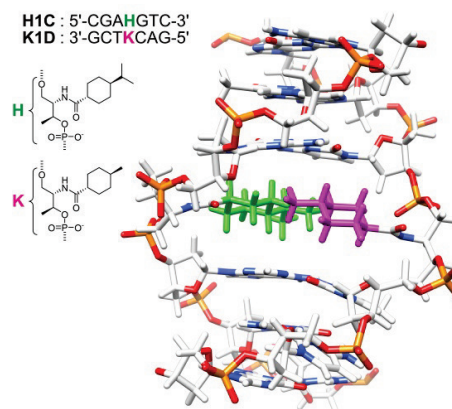


図2. 非平面性人工塩基対導入二重鎖の構造解析結果

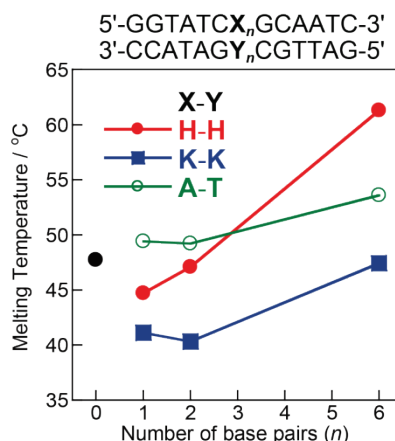


図3. 人工塩基対導入が二重鎖安定性に及ぼす効果。HとKの化学構造は図2参照。

そこで、次にイソプロピルシクロヘキサン(H)による人工塩基対を導入した二重鎖の安定性を融解温度によって評価した（図3）。その結果、人工塩基対を一組導入したところ二重鎖は若干不安定化した。それに対し、導入数の増加とともに二重鎖が飛躍的に安定化することが分かった。特に6組導入した配列では融解温度が60 °C以上となり、天然のA-T塩基対よりも安定であることが分かった。これまで報告された人工塩基対は芳香環を持つものがほとんどであった。それに対し、本研究で開発した分子は芳香環を持たず、

水素結合サイトを持っていないにもかかわらず二重鎖を安定化することを明らかにした。それに対し、メチルシクロヘキサン (**K**) による塩基対を導入しても二重鎖はそれほど安定化しなかったことから、イソプロピル基間の疎水性相互作用によって二重鎖を安定化することを明らかにした。以上のことから、イソプロピルシクロヘキサンは二重鎖の内部に位置し、かつ二重鎖を大きく安定化することから、人工塩基対として機能することを明らかにした。このような非平面性分子による人工塩基対はこれまで報告されておらず、我々が初めて開発した。

(2) イソプロピルシクロヘキサンが人工塩基対として機能することが分かったので、これを蛍光色素—核酸塩基間に導入し、蛍光色素の量子収率向上を目指した。図4に配列を示す。蛍光色素としてはペリレンジイミド (**D**)、ピレン (**P**)、ナイルレッド (**R**) を用いた。また、人工塩基対を核酸塩基—蛍光色素間に一組ずつもしくは三組ずつ導入した配列を合成した (**H2AX** もしくは **H6AX**)。コントロールとして人工塩基対なしの配列も併せて合成した (**H0AX**)。

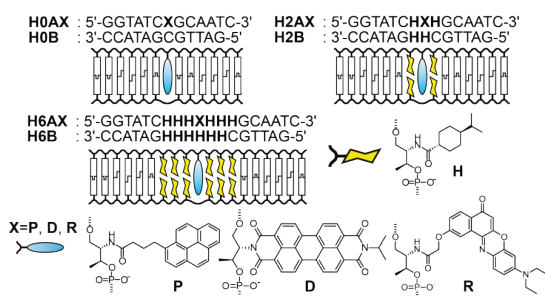


図4. 合成した配列。

図5 Aにピレンについての結果を示す。人工塩基対なしの配列ではほとんど蛍光が観察されなかった。それに対し、人工塩基対を導入した配列では非常に強いピレンの蛍光を観察することが出来た。また、量子収率を算出したところ、人工塩基対なしでは0.01以下であったのに対し、2組導入した配列では0.19、6組では0.32まで増大した。その結果、量子収率を数百倍向上させることに成功した。また、同様の検討をペリレンジイミドについても行った (図5 B)。ペリレンジイミドは核酸塩基によって非常に強く消光されるため、人工塩基対なしの配列では全く蛍光が観察されず、量子収率は0.001以下であった。それに対し、人工塩基対を導入したところ、強い蛍光を観察することが出来た。特に人工塩基対を6組導入した配列では量子収率が0.59まで増大した。その結果、人工塩基対の導入に伴い、量子収率を実に数千倍増大させることに成功した。このように、

人工塩基対を導入することにより、核酸塩基によって強く消光される色素であっても、発光強度を飛躍的に向上させることが出来ることを明らかにした。

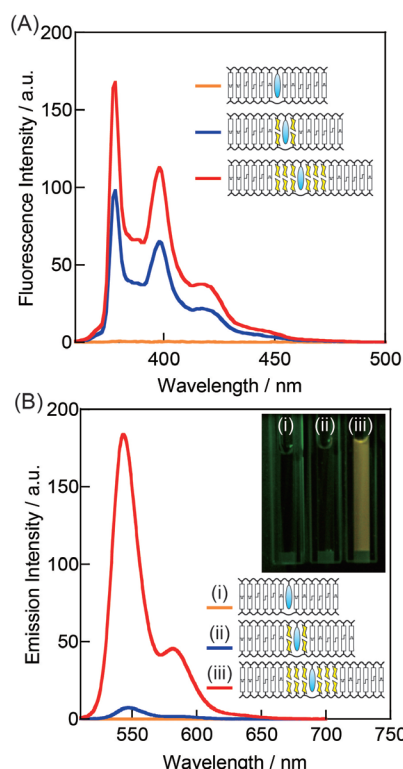


図5 (A) ピレン及び (B) ペリレンジイミドの発光スペクトルに対する人工塩基対の効果。

次に、人工塩基対の疎水性が及ぼす効果について検討を行った。一般的に多くの蛍光色素は疎水的環境において発光が増大することが知られている。そこで、極性により発光波長を変化させるナイルレッドを人工塩基対を介してDNAに導入することによって疎水的環境の効果を検討した。結果を図6に示す。人工塩基対の導入に伴いナイルレッドの発光増大が観察された。特に6組導入した配列では、人工塩基対なしの配列と比べて発光強度が1.2倍増大した。それに対し、発光波長は人工塩基対なしの配列とほとんど変わらなかった。また、これらの発光波長はDNAに導入していない色素の水中での発光波長とほとんど変わらなかった。以上のことから、人工塩基対周囲の環境は疎水的ではなく、天然塩基対同様の親水的環境であることが分かった。換言すれば、人工塩基対は疎水性環境によってではなく、電子移動を遮蔽する“インスレーター”としてはたらくことによって蛍光色素の発光を増大させたことが分かった。

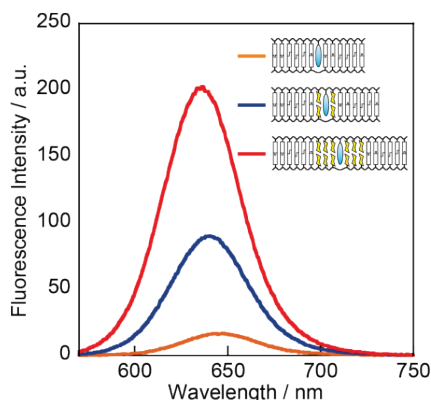


図6 ナイルレッドの発光スペクトルに対する人工塩基対の効果。

更に、汎用性の高い色素である FITC についてインスレーターの効果を検討した。ここでは、通常の核酸ラベリングと同様に末端に蛍光色素を導入し、イソプロピルシクロヘキサンを1もしくは2分子核酸塩基との間に導入した。その結果、図7に示すように、非平面性分子の導入に伴い FITC の発光強度を3倍程度増大させることに成功した。このように、開発したインスレーターは高い汎用性を持つ FITC に対しても有効であることが分かった。

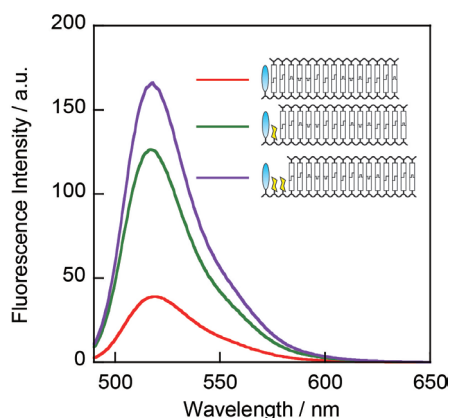


図7 FITC の発光スペクトルに対する人工塩基対の効果。

#### 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 “Preparation of supramolecular chromophoric assemblies using a DNA duplex” H. Kashida and H. Asanuma, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 7196-7204, 査読有, DOI:10.1039/C2CP40520B.
- ② “Cyclohexyl “base pairs” stabilize duplexes and intensify pyrene

fluorescence by shielding it from natural base pairs” H. Kashida, K. Sekiguchi, N. Higashiyama, T. Kato and H. Asanuma, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 査読有, 8313-8320, DOI:10.1039/C1OB06325A.

- ③ “Insulator Base Pairs for Lighting-up Perylenediimide in a DNA Duplex” H. Kashida, K. Sekiguchi and H. Asanuma, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 11554-11557, 査読有, DOI: 10.1002/chem.201001638.

[学会発表] (計14件)

- ① 加藤智博・樫田啓・浅沼浩之 「DNA 二重鎖内部における蛍光色素のエネルギー移動に関する研究」 日本化学会第92春季年会(神奈川)、2012年3月25-28日
- ② 東山尚史・関口康司・樫田啓・浅沼浩之 「インスレーターを用いた蛍光標識核酸プローブの高輝度化」 日本化学会第92春季年会(神奈川)、2012年3月25-28日
- ③ H. Kashida, K. Sekiguchi, T. Kato, H. Asanuma, “Design of novel artificial base pairs for the enhancement of fluorescence” The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (Sapporo), 2011年11月9-11日
- ④ 東山尚史・関口康司・樫田啓・浅沼浩之 「インスレーターを利用した、高輝度 FITC 標識核酸プローブの開発」 第5回バイオ関連化学シンポジウム(つくば)、2011年9月12-14日
- ⑤ 加藤智博・関口康司・樫田啓・浅沼浩之 「蛍光色素の高輝度化を目指した新規人工塩基対の開発」 第5回バイオ関連化学シンポジウム(つくば)、2011年9月12-14日
- ⑥ 東山尚史・関口康司・樫田啓・浅沼浩之 「インスレーターを用いた FITC 標識核酸プローブの高輝度化」 第21回バイオ・高分子シンポジウム(大阪)、2011年7月25-26日
- ⑦ 樫田啓・関口康司・浅沼浩之 「蛍光色素の高輝度化を目指した新規人工塩基対の開発」 第21回バイオ・高分子シンポジウム(大阪)、2011年7月25-26日
- ⑧ H. Kashida, K. Sekiguchi, H. Asanuma, “Development of Insulator Base Pairs for the Drastic Enhancement of Quantum Yield” XVth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components (Czech Republic), 2011年6月5-10日
- ⑨ 関口康司・樫田啓・浅沼浩之 「インスレーター能の向上を目指した人工塩基対

の合成」日本化学会第91春季年会（講演予稿集）、2011年3月11日

- ⑩ H. Kashida, K. Sekiguchi, H. Asanuma, “DNA dot: Accumulation of fluorophores in DNA duplex for the enhancement of emission” PACIFICHEM 2010 (Hawaii), 2010年12月15-20日
- ⑪ 樫田啓・関口康司・浅沼浩之 「蛍光色素の高輝度化を目指したインスレーター塩基対の開発」 第4回バイオ関連化学シンポジウム (大阪)、2010年9月24-26日
- ⑫ 関口康司・樫田啓・浅沼浩之 「“インスレーター塩基対”を用いた高輝度ラベル化法の開発」 第4回バイオ関連化学シンポジウム (大阪)、2010年9月24-26日
- ⑬ 関口康司・樫田啓・浅沼浩之 「“インスレーター塩基対”を用いた蛍光色素の高輝度化」 第59回高分子討論会 (札幌)、2010年9月15-17日
- ⑭ 関口康司・樫田啓・浅沼浩之 「インスレーター塩基対を用いた蛍光色素のライトアップ」 第20回バイオ・高分子シンポジウム (東京)、2010年7月28-29日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

樫田 啓 (KASHIDA HIROMU)  
名古屋大学・工学研究科・助教  
研究者番号：30452189

### (2) 研究分担者なし

### (3) 連携研究者なし