

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25810094

研究課題名(和文) 緑色蛍光タンパク質のクロモフォアを基本骨格に用いたマルチカラー蛍光核酸の開発

研究課題名(英文) Development of multicolor fluorescent probes for the detection of nucleic acids using GFP chromophores

研究代表者

金森 功史 (Kanamori, Takashi)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：90633446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内で機能する複数のRNAの同時検出を可能にする、マルチカラー蛍光核酸プローブの開発を目指した。本研究では、蛍光核酸プローブを効率的にマルチカラー化するために、すでに複数色の誘導体が知られている緑色蛍光タンパク質(GFP)の核をなす蛍光色素を用いた。さらに、この色素を標的核酸との結合に伴って光らせるため、起案者らが過去に開発したDNA三重鎖形成に基づく蛍光検出系を応用した。

その結果、種々のGFP色素を導入した蛍光核酸プローブの合成に成功し、モデルとなる標的核酸存在下において三重鎖形成させ、蛍光をoffからonへ変化させ検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop multicolor fluorescent nucleic acids probes for the simultaneous detection of a number of functional RNAs. In order to effectively develop multicolor fluorescent probes, we focused on GFP fluorophores. Since several GFP fluorophores derivatives are already known, so that we expected using these fluorophores makes development of multicolor fluorescent probes much easier. To develop fluorescent turn on probes, we used our previous fluorescent turn on system based on DNA triplex formation.

we achieved synthesis of several fluorescent nucleic acids probes that show fluorescence upon binding to target nucleic acids.

研究分野：生物有機化学

キーワード：蛍光核酸 三重鎖DNA RNA 緑色蛍光タンパク質 GFP

### 1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子の発現制御の役割を担う RNA の研究が進み、複数の RNA の簡便、迅速な検出法の開発が急務となっている。このような RNA の検出法として、RNA との結合に伴って蛍光性となる蛍光核酸プローブが多数開発されてきた。さらに、複数の標的 RNA を同時に検出するため、蛍光核酸プローブのマルチカラー化が報告されるようになってきた(例として、Okamoto, A. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* 2009; Seitz, O. *et al. Bioconjugate Chem.* 2012 など)。

従来、蛍光プローブをマルチカラー化する手法として、既存の蛍光色素への置換基の導入や共役系の拡大が行われてきたが、この手法は分子設計・合成・評価の試行錯誤を伴い、多大な労力を必要とする。そこで、合理的な設計に基づく蛍光応答制御法を用いて、効率的なマルチカラー蛍光プローブの開発を目指した。

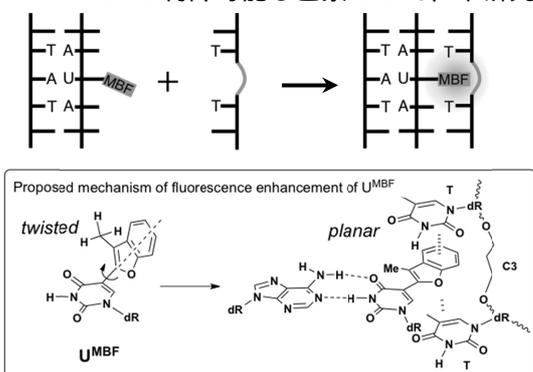
### 2. 研究の目的

本研究は、起案者らがこれまでに開発した DNA 三重鎖形成を利用する蛍光 off/on 型プローブを基本骨格に用い、複数の RNA を一度に検出可能なマルチカラー蛍光核酸プローブの効率的な開発を目指したものである。

Figure 1 に示すように、これまで申請者らは、三重鎖を構成する中央の鎖に、蛍光性の 5-(3-メチルベンゾフラン-2-イル)デオキシウリジン( $dU^{MBF}$ )を導入し、三重らせん応答型の蛍光核酸プローブを開発している。 $dU^{MBF}$  は、三重らせん形成前はウラシル環とベンゾフラン環のねじれによって本来の蛍光が消光されているが、三重鎖形成に伴ってこれらの芳香環が共平面に拘束され、その蛍光を on に変化させることができる(Kanamori, T. *et al. Chembiochem*, 2015)。

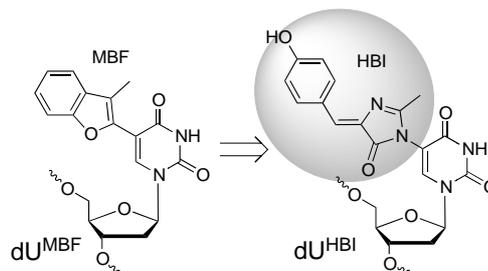
このような蛍光色素の構造変化に基づく蛍光変化の機構を応用し、ベンゾフランの代わりに種々の蛍光色素を用いれば、蛍光の off/on 制御可能かつマルチカラーな蛍光核酸を開発できると考えた。

この off/on 制御可能な色素として、本研究

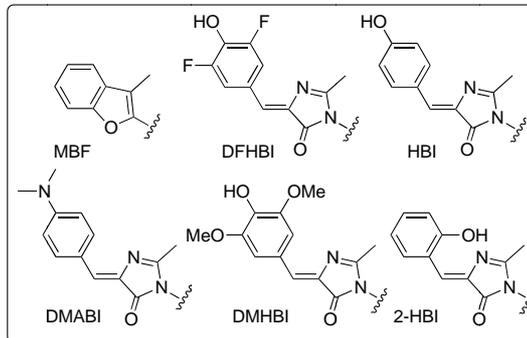


**Figure 1.** Triple helix formation-induced fluorescent off to on probe.

では、緑色蛍光タンパク質(GFP)のクロモフォアである、ヒドロキシベンジリデンイミダゾリノン骨格(HBI)に着目した。HBI 色素は、分子が単独で存在する場合は分子振動により消光しているが、分子振動が抑制されると蛍光性となることが知られている。さらに、これまでの研究から種々の蛍光波長を有する HBI 誘導体が開発されている(Jaffery, S. R. *et al. Science*, 2011)。そこで、種々の HBI 誘導体をデオキシウリジンの 5 位に導入し、三重鎖形成によって蛍光 on となるマルチカラー蛍光核酸プローブの開発を目指した(Fig2)。



MBF and HBI derivatives



**Figure 2.** Chemical structures of  $dU^{HBI}$  and several HBI derivatives.

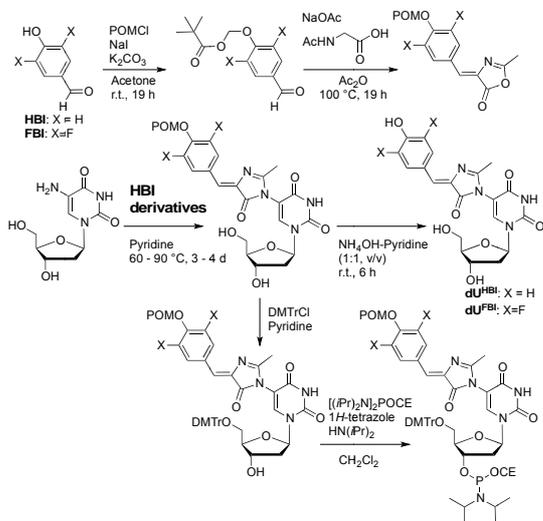
### 3. 研究の方法

本研究では、Figure 2、Scheme 1 に示すヌクレオシド誘導体を化学合成し、モノマーユニットの蛍光特性を評価した。つづいて、それらのモノマーのホスホロアミダイトユニットを合成し、DNA オリゴマーに導入し、蛍光核酸プローブを作成した。さらに、標的核酸存在下において、熱融解温度測定を行い、三重らせん構造の形成を確かめた。合わせて、標的核酸存在下における蛍光核酸プローブの蛍光強度変化を評価した。

### 4. 研究成果

本研究では、種々の HBI 誘導体で修飾されたデオキシウリジン( $dU^{HBI}$ s)の合成に成功し、それらを DNA オリゴマーへ導入した。

(1)種々の HBI 誘導体で修飾されたヌクレオシド( $dU^{HBI}$ s)の合成



**Scheme 1.** Synthetic route of  $dU^{HBI}$

Scheme 1 に従って  $dU^{HBI}$  誘導体の合成を行った。まず、ベンズアルデヒド誘導体のフェノール性水酸基をピバロイルオキシメチル (POM) 基で保護し、つづいて無水酢酸を溶媒量用い、アセチルグリシンと縮合させ、HBI 前駆体であるオキサゾロン骨格を形成させた。一方、カップリング相手の 5-アミノデオキシウリジンは、デオキシウリジンを原料とし 5 位のニトロ化、つづく Pd-C を用いた還元によって合成した。つづいて、これら 5-アミノデオキシウリジンと HBI 前駆体をピリジン溶媒下縮合させ、5 位に HBI 誘導体修飾したヌクレオシドを得た。つぎに、HBI ヌクレオシドの POM 基を、アンモニア水を用いて脱保護し、 $dU^{HBI}$  および  $dU^{FBI}$  を得た。そこで、まずこれらの蛍光特性を調べた。

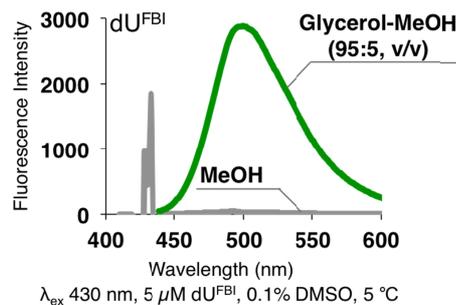
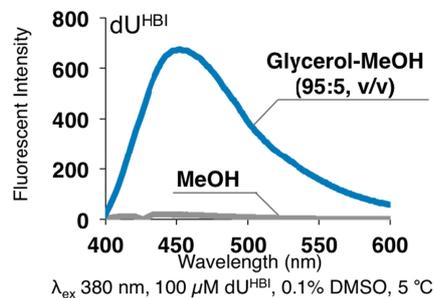
### (2) $dU^{HBI}$ および $dU^{FBI}$ の蛍光特性

過去の知見から、HBI 誘導体が溶媒環境の変化による分子振動の抑制によって蛍光強度が上昇することが分かっている。そこで、 $dU^{HBI}$  および  $dU^{FBI}$  を高粘度溶媒であるグリセロールに溶解した際に蛍光強度が上昇するか調べた。

その結果、 $dU^{HBI}$  および  $dU^{FBI}$  いずれの場合も、メタノール溶媒中ではほぼ無蛍光であったが、グリセロール-メタノール 95:5 の溶媒下では顕著な蛍光強度の増加を示した (Figure 3)。このことから、HBI 誘導体をヌクレオシドに導入しても、色素周囲の粘度変化にตอบสนองする性質は保たれていることが分かり、DNA オリゴマーの合成へと研究を進めた。

### (3) $dU^{HBI}$ または $dU^{FBI}$ を導入した DNA オリゴマーの合成と性質の評価

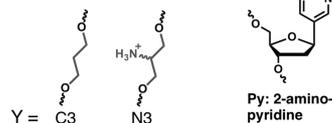
Scheme 1 に従って合成した  $dU^{HBI}$  および  $dU^{FBI}$  のホスホロアミダイトユニットを用い、常法に従い Figure 4 に示す配列の DNA オリ



**Figure 3.** Fluorescent spectra of  $dU^{HBI}$  and  $dU^{FBI}$  in methanol or glycerol-methanol solution.

ゴマーを合成した。その後、アンモニア水を用いて固相担体からの切り出しと保護基の脱保護を行い、HPLC を用いて精製し、MALDI-TOFMS 測定を行い、目的のオリゴマーを同定した。

1st 3'-d(GTTCTTTTTTCTATCTTTTTTTG)-5'  
 2nd 5'-d(CAAGAAAAAGAXAGAAAAAAC)-3'  
 3rd (TFO) 5'-d(TTPyTTTTTTPyTYPyTTTTTT)-3'  
 X =  $dU^{HBI}$  or  $dU^{FBI}$

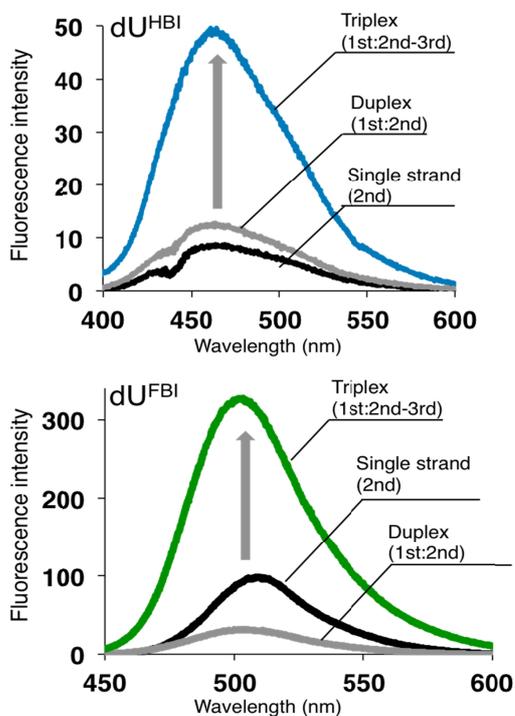


**Figure 4.** Sequences of DNA oligomers used in this study. HBI triplex system: X =  $dU^{HBI}$ , Y = C3; FBI triplex system: X =  $dU^{FBI}$ , Y = N3.

まず標的核酸 (= 第一鎖) 存在下において三重らせんを形成するか確かめるため、それぞれの第一鎖、第二鎖、第三鎖を混合し、UV-熱融解温度測定を行った。その結果、 $dU^{HBI}$  および  $dU^{FBI}$  のいずれの組み合わせにおいても第三鎖の解離が観測され、三重らせんが形成されていることが示唆された。

つづいて、これら三重らせんの蛍光測定を行い、標的核酸存在下における蛍光強度変化を調べた。その結果、 $dU^{HBI}$  および  $dU^{FBI}$  のいずれの組み合わせにおいても蛍光強度の上昇がみられ、標的核酸存在下、三重鎖形成によって蛍光を off から on に変化させることに成功した (Figure 5)。

以上のモデル配列での成功を踏まえ、現在、これらの  $dU^{HBI}$  誘導体を用いて、複数の標的核酸に対応した蛍光核酸プローブの作成を



**Figure 5.** Fluorescent spectra of triplex containing dU<sup>HBI</sup> or dU<sup>FBI</sup>.

進めている。さらに、本蛍光核酸プローブと padlock プローブを組み合わせた RNA の検出 (Kanamori, T. *et al. Chembiochem*, 2015) を行い、複数の RNA の同時検出へと研究を進めて行く予定である。

## 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)

[学会発表](計5件)

1) 第8回バイオ関連化学シンポジウム, GFP のクロモフォアを導入した DNA 三重鎖の蛍光特性, 高村亮宏, 金森功史, 正木慶昭, 大窪章寛, 関根光雄, 清尾康志, 2014年9月11日-12日, 岡山大学津島キャンパス (岡山県)

2) The 21th International Round Table on Nucleosides, Nucleic Acids, Synthesis and properties of fluorescent deoxyridines containing chromophores derived from green fluorescent protein, Kanamori, T.; Takamura, A.; Masaki, Y.; Sekine, M.; Seio, K., 2014年8月25日-26日, Poznan University of Technology (Poland)

3) Fluorescent Biomolecules and Their Building Blocks; Design and Applications (FB3), Fluorescence properties of GFP chromophores embedded in DNA triplexes, Kanamori, T.; Takamura, A.; Masaki, Y.; Sekine, M.; Seio, K., 2014年8月7日-8日, University of California San Diego (U.S.A)

4) 日本化学会第94春季年会, GFP クロモフォアを導入した DNA 三重鎖の蛍光増強を目指した構造探索, 金森功史, 高村亮宏, 正木慶昭, 大窪章寛, 関根光雄, 清尾康志, 2014, 3月27日, 名古屋大学 東山キャンパス (愛知県)

5) The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2013, Fluorescence properties of DNA triplexes containing deoxyridines modified with 4-(p-hydroxybenzilidene)-5-imidazolinoe derivatives, Kanamori, T.; Takamura, A.; Masaki, Y.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K., 2013年11月13日, 神奈川大学 横浜キャンパス (神奈川県)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

金森 功史 (Takashi Kanamori)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：90633446