

環境応型蛍光性新規デオキシアデノシン誘導体の 合成と遺伝子診断プローブへの応用

齋藤義雄

日大工・生命

【序】

我々はこれまでに、溶媒極性の変化に伴い蛍光発光色が変化する種々の環境応型蛍光核酸を報告している^{1),2),3)}。最近では、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型蛍光核酸塩基の開発に成功している²⁾。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。従って、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で、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として有用である。しかしながら、この蛍光核酸は近傍の GC 塩基対などによって強い蛍光消光をうけてしまうために、塩基配列に制限されることなく、より塩基識別能に優れた新規な蛍光核酸プローブの開発が求められる。本研究では、LE 発光と ICT 発光の2種類の発光を示す新たな蛍光核酸のデザイン、および DNA 二重鎖

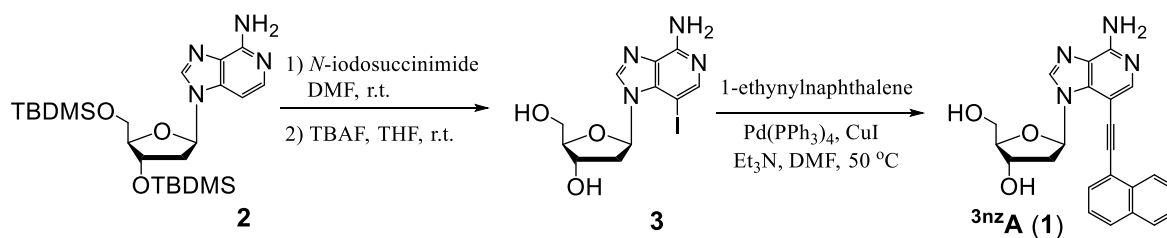
構造を形成した際に、溝の幅が狭いマイナーグループに、修飾基（蛍光色素部位）が位置することで、修飾塩基が共平面構造をとることが期待できる3位置換3-デアザプリンヌクレオシドの開発を目指した。

【実験】

まず、既報により合成した3',5'-ビス-*O*-(*tert*-ブチルジメチルシリル)-3-デアザ-2'-デオキシアデノシン²⁾から、ヨウ素化、TBDMS 基の脱保護の二段階を経て3-ヨード-3-デアザ-2'-デオキシアデノシン³⁾を得た。続いて³⁾と1-エチルナフタレンとを菌頭反応により、カップリングすることで目的化合物である^{3nz}A(1)を合成した(Scheme 1)。得られた^{3nz}A(1)を様々な極性や粘性の異なる溶媒中での蛍光、吸収スペクトルの測定を行った(Figure 1(a)-(c))。

【結果と考察】

粘度の高いグリセロール中では、振動構造を伴った短波長領域での発光が観測された(Fig.1a)。^{3nz}A(1)は、基底状態では、3-デアザアデニン-ナフタレン骨格間にかけて、ねじれ構造をとっており、グリセロール中で観測



Scheme 1. Synthesis of 3-deaza-2'-deoxyadenosine derivative ^{3nz}A(1)

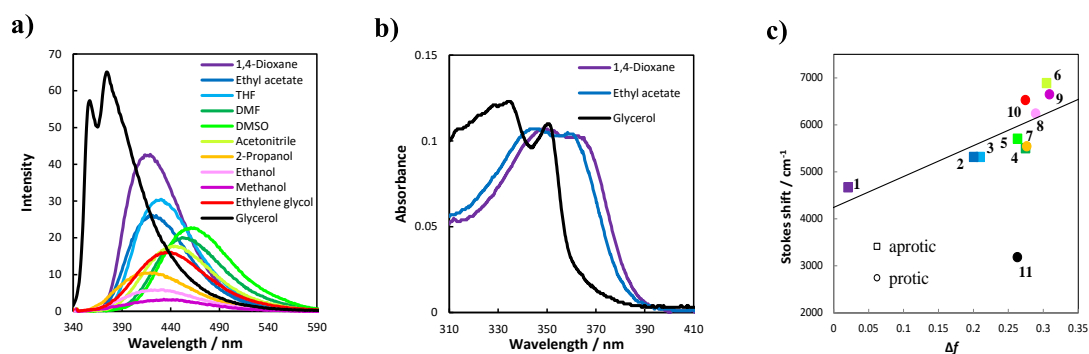


Figure 1. (a) Fluorescence spectra of $^{3nz}\mathbf{A}$ (**1**, 10 μM) in various solvents. (b) Absorption spectra of $^{3nz}\mathbf{A}$ (**1**, 10 μM) in 1,4-dioxane, ethyl acetate and glycerol. (c) Lippert-Mataga plot showing the Stokes shift of $^{3nz}\mathbf{A}$ (**1**) as a function of solvent orientation polarizability (Δf): 1, 1,4-dioxane; 2, ethyl acetate; 3, THF; 4, DMF; 5, DMSO; 6, acetonitrile; 7, 2-propanol; 8, ethanol; 9, methanol; 10, ethylene glycol; 11, glycerol. Glycerol data spot was omitted in the linear model fitting.

された発光は、分子周辺の粘度環境が高いために、分子の回転が抑制されたことによって現れたナフタレン骨格由来の LE 発光であると考えられる。一方、低粘度溶媒中では、 π 共役の拡張を示すブロード化と長波長シフトを伴う蛍光スペクトルを示した。また、高粘度溶媒のグリセロール中に比べて極大吸収波長の長波長シフトが観測されたことから新たな共役系を形成していることが確認できた(**Fig.1b**)。すわなち、低粘度溶媒中では、3-デアザアデニン-ナフタレン骨格との間で、自由に分子回転が可能になるために、共平面構造を形成していると考えられる。また、非極性溶媒の 1,4-ジオキサン中では 417nm の発光を示したのに対して、極性の高い DMSO 中では 461nm の発光が観測された ($\Delta\lambda = 44$ nm)。さらに、溶媒の極性のパラメータ Δf と各溶媒中で観測されたストークスシフト値をプロットすると、 $^{3nz}\mathbf{A}$ (**1**)の蛍光スペクトルは、溶媒の極性の増加に伴い、長波長シフトすることが確認できた(**Fig.1c**)。従って、この化合物は、分子構造がねじれている状態では、LE 発光を示す一方で、共平面構造をとると、溶媒極性に伴う ICT 発光を示すことが明らかとなった。

そこで、 $^{3nz}\mathbf{A}$ (**1**)をホスホロアミダイト化した後に、DNA 自動合成機により目的とする ODN 鎖へ導入した。合成した $^{3nz}\mathbf{A}$ (**1**)を含む

オリゴデオキシヌクレオチドプローブは、相補鎖の相手塩基がマッチとなるチミンの場合にのみ、ICT 由来の発光が観測されたことから、発光波長変化で対面塩基の識別を行うことに成功した。また、修飾塩基の近傍に GC 塩基対が存在するような配列でも蛍光消光を受けないことが確認できた。本発表では、それらの詳細について報告する。

【参考文献】

- 1) Suzuki, A. Takahashi, N. Okada, Y. Saito, I. Nemoto, N. Saito, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 886.
- 2) Saito, Y. Suzuki, A. Okada, Y. Yamasaka, Y. Nemoto, N. Satio, I. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 5684.
- 3) Suzuki, A. Nemoto, N. Saito, I. Saito, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 660.
- 4) Minakawa, N. Sasabuchi, Y. Kiyosue, A. Kojima, N. Matsuda, A. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44, 288.