

遺伝子検出を目指した新規蛍光核酸塩基の開発

齋藤 義雄

日大工・生命

【緒論】

極性、粘性、pH などの環境変化に応じて発光波長が劇的に変化するような機能を有する蛍光核酸を開発することが出来れば、標的 DNA/RNA の検出のみならず、遺伝子配列中の特定の位置の塩基の違いといった構造変化の認識を蛍光発光色の変化で簡便に検出できるプローブとしての応用が期待される。そこで、我々はこれまでに、周辺の環境変化に伴って蛍光発光が変化する様々な7-デアザプリンヌクレオシドの開発に取り組んできた。それらのなかでも、8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン **cnaA** はチミンと塩基対を形成した際にのみ、エチルナフトニトリル由来の LE 発光を示すことで簡便にチミンを識別することに成功している。これは、メジャーグループに突き出されたナフトニトリル部位が核酸塩基間とで、ねじれ構造を形成しているためであると考えられる (**Figure 1**)。本研究では、「新規環境感応型蛍光核酸塩基の開発と遺伝子検出へ

の応用」を目指して、さらに高感度な蛍光核酸塩基のデザインを行った。デザインのコンセプトとして、核酸塩基部位に蛍光色素となる多環芳香族化合物を、エチル基を介することなく直接導入すれば、環境の違いで分子内のねじれ/平面性がより変化しやすくなると考え、様々なナフチル基を有する 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 **1** の開発を試みた。

【実験結果】

まずはじめに、各ナフチルボロン酸ピナコールエステル体 **3a-d** の合成を検討した。続いて、8-アザ-7-デアザ-7-ヨード-2'-デオキシアデノシンと得られた各ナフチルボロン酸ピナコールエステル体を鈴木-宮浦クロスカップリングにより反応させ、ナフチル基を連結させた新規蛍光性 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 **1a-d** を合成した。また、それらの中で、特に優れた光学特性を示す誘導体を DNA 自動合成機によりオリゴデオキシヌクレオチド鎖 (ODN 鎖) へ導

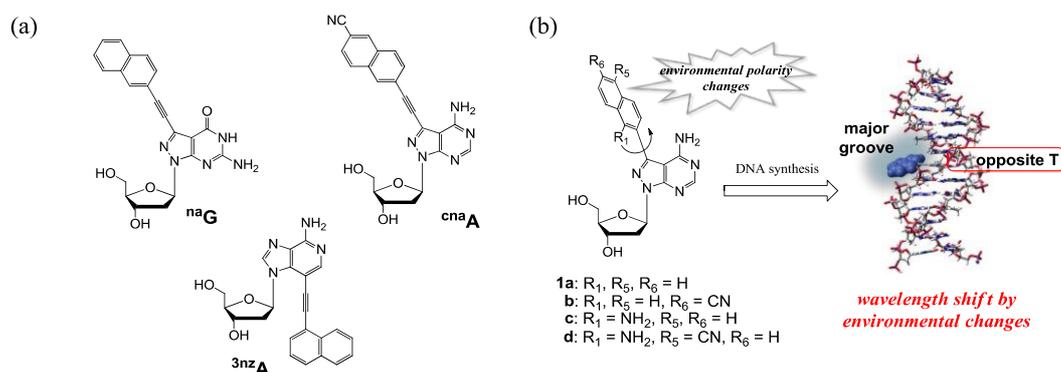


Figure 1. (a) Structure of previously reported ESF nucleoside. (b) Structure of newly designed 7-naphthylated 8-aza-7-deaza-2'-deoxyadenosine derivatives

Table 1. Photophysical properties of fluorescent 8-aza-7-deaza-2'-deoxyadenosine derivatives.

Solvents	η^a	1a		1b		1c		1d	
		$\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$ (nm)	$\Phi_{\text{fl}}^{\text{b}}$						
1,4-Dioxane	1.44	359	0.11	370	0.37	428	0.03	488	0.47
Ethyl acetate	0.45	358	0.08	382	0.28	433	0.01	494	0.29
DMF	0.92	361	0.13	415	0.22	452	0.02	524	0.21
DMSO	1.99	363	0.15	423	0.25	450	0.03	534	0.18
Acetonitrile	0.34	360	0.10	398	0.26	458	0.01	513	0.23
2-Propanol	2.04	363	0.16	389	0.26	480	0.01	514	0.19
Ethanol	1.20	364	0.14	394	0.27	489	0.01	520	0.13
Methanol	0.59	362	0.14	402	0.25	498	0.01	527	0.07
Ethylene glycol	19.9	365	0.21	400	0.25	493	0.01	529	0.08
Glycerol	1412	372	0.11	374	0.17	404	0.07	522	0.12

^a Viscosity (mPa s; 20°C)^b Fluorescence quantum yields

入し、熱融解温度および光学特性の観点から対面塩基識別能の評価を行った。

次に、合成により得られた蛍光ヌクレオシドモノマー **1a-d** を極性環境の異なる様々な溶媒中において蛍光スペクトルの測定を行った。ナフタレン部位に置換基を含まない化合物 **1a** では、溶媒の極性変化に伴う発光波長変化がそれほど見られないのに対して、置換基を導入した場合には、発光波長変化が大きくなることがわかった (**Figure 2**)。特に、2-ナフトニトリルを含む **1b** ($\Delta\lambda = 53$ nm) および 1-ナフチルアミン($\Delta\lambda = 94$ nm) を含む **1c** は、より優れたソルバトフルオロクロミックな光学特性を示すことがわかった (**Table 1**)。続いて、**1b** および **1c** のホスホロアミダイトユニットを合成し、DNA 自動合成機により ODN 鎖へ導入した。合成した ODN 鎖を相補鎖とハイブリダイズさせ、熱融解温度 (T_m) 測定を行った結果、修飾ヌクレオシド **1b** および **1c** の対面塩基がチミン以外の塩基では、 T_m 値の大きな低下がみられた。従って、今回開発した7位にナフチル基を有する 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体は、チミン塩基とのみワトソン-クリック型の塩基対を形成することが確認できた。さらに蛍光スペクトルの測定を行ったところ、対面塩基が塩

基対を形成することが可能なチミンの場合にのみ、発光波長の短波長シフトがみられた(**Fig. 2**)。以上の結果から **1b** および **1c** を含む ODN プローブは対面塩基のチミンを発光波長変化で識別可能なことが明らかとなった。

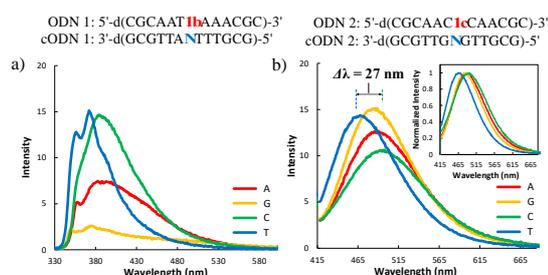


Figure 2. Fluorescence spectra of (a) 2.5 μM ODN 1 hybridized with 2.5 μM cODN 1 (N = A, G, C, or T) and (b) 2.5 μM ODN 2 hybridized with 2.5 μM cODN 2 (N = A, G, C, or T) (50 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.0, r.t.). Inset: Normalized fluorescence spectra.

【結論】

以上のように、目的とするチミン塩基を識別することが可能な蛍光 DNA プローブを得ることができた。現在、これらの蛍光 DNA プローブを搭載した DNA チップの開発に向けた検討を行っている。

【参考文献】

Y. Saito, A. Suzuki, T. Yamauchi, I. Saito, *Tetrahedron Lett., Memorial Symposium-in-Print for Harry Wasserman*, 2015, 56, 3034-3038.