

ピレンの蛍光消光を利用したチミン塩基識別プローブの開発

齋藤 義雄
日大工・生命

【緒論】

極性、粘性、pH などの周辺の環境変化に応じて蛍光強度や発光波長を劇的に変化させる蛍光ヌクレオシドを開発することが出来れば、標的 DNA や RNA の検出のみならず、遺伝子配列中の特定の位置の一塩基の違いなどの微細な構造変化を検出できるようになると考えられる。したがって、このような蛍光核酸塩基の開発は、核酸の微細構造解析や遺伝子診断のためのツールの開発にとって非常に重要であると考えられる。我々はこれまでに、周辺の環境変化に伴って蛍光強度や波長が変化する様々なデアザプリンヌクレオシドの開発に取り組んできたが、本研究では、新たに、蛍光消光を利用することで高感度で対面塩基（チミン塩基）を識別できる新規蛍光核酸塩基の開発を行った。^{1),2)}

本研究で開発した、非 π 共役系リンカーを有するピレン含有 3-デアザ-2'-デオキシアデノシン **Py^{3z}A (1)** は、オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) 鎖に導入して相補鎖とハイブリダイズさせた際に、**Py^{3z}A (1)** の対面塩基がミスマッチの時に強い

対して、対面塩基がマッチとなるチミン塩基の場合には、ピレンの蛍光発光が強く消光されることがわかった。この性質を利用することで、対面のチミン塩基を非常にクリアに識別可能であることがわかった。

【実験方法および結果】

3-デアザアデニン塩基は、DNA を構成する 4 種類の天然の核酸塩基よりも酸化電位が低く、ピレンと隣接した際にピレンの蛍光を強く消光することができると考えた。そこで Fig. 1 に示したように、3-デアザアデニンとピレンを非 π 共役系リンカー（プロパルギルアミンリンカー）で連結した新規蛍光ヌクレオシドをデザイン・合成した。さらに、DNA/RNA 自動合成機を用いて **Py^{3z}A (1)** を ODN 鎖に導入することにより、新しい蛍光 ODN プローブを作成した (**Table 1**)。

Table 1 Oligonucleotides used in this study

ODNs	Sequences	
ODN1(X)	5'-d(CGCAACXCAACGC)-3'	X = Py ^{3z} A
cODN1(N)	5'-d(GCGTTGNGTTGCG)-3'	N = A, G, C, or T

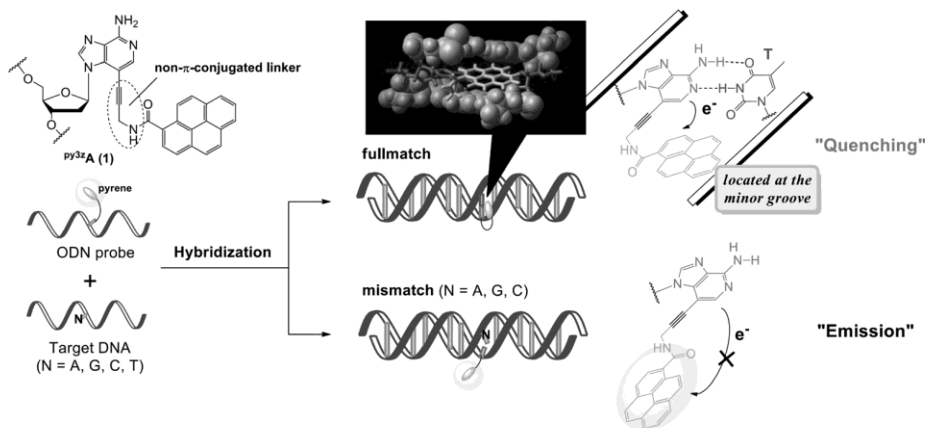


Fig. 1 Structure of pyrene-labeled 3-deaza-2'-deoxyadenosine **Py^{3z}A (1)** and schematic of the detection of a perfectly matched thymine in the target DNA through fluorescence quenching using an ODN probe containing **Py^{3z}A (1)**.

プローブ鎖を標的 DNA とハイブリダイズさせて二重鎖を形成させた際に、対面塩基がフルマッチ（チミン塩基）の時には、立体的に制限された狭い溝であるマイナーグループにピレンが入り込み、3-デアザアデニン塩基がピレンと隣接するようになるため、ピレンの蛍光が強く消光されると考えられた。それに対して、対面塩基がミスマッチの際には、ピレンが DNA の外側に移動し、ピレンと 3-デアザアデニンの距離が離れるためピレン本来の強い蛍光発光が見られると考えられた。実際にプローブ鎖を標的 DNA とハイブリダイズさせて蛍光スペクトルを測定したところ、プローブ鎖単独の場合、あるいは対面塩基がミスマッチ（A, G あるいは C）の場合には、ピレンの強い蛍光発光が観察されたのに対して、対面塩基がマッチとなるチミン塩基の場合には、強い蛍光消光が確認された (Fig. 2)。さらに、この蛍光消光は、Py^{3z}A (1) の前後の塩基配列に制限されないこともわかった。

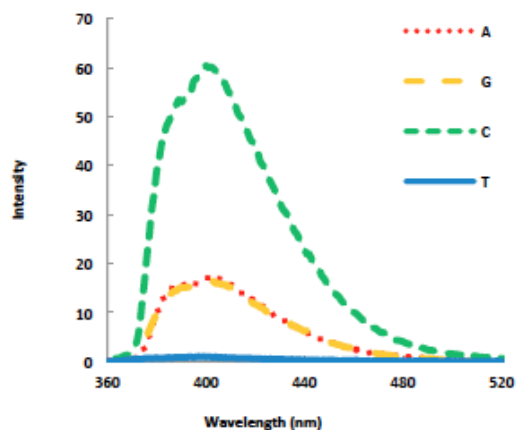


Figure 2. Fluorescence spectra of 2.5 μ M ODNI(Py^{3z}A) hybridized with 2.5 μ M cODNI (N = A, G, C, T) (50 mM sodium phosphate, 0.1M sodium chloride, pH 7.0, rt).

このように、新たに開発した Py^{3z}A (1) を用いたプローブを利用することで、標的 DNA 上の特定部位の位置にあるチミン塩基を、蛍光消光を利用して、蛍光の ON/OFF で識別できることがわかり、新たな蛍光 DNA プローブの開発に成功した。

このようなプローブは、核酸の微細構造解析や遺伝子診断のためのツールとしての利用が期待される。

【参考文献】

- 1) Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito *Chem. Commun.* **2004**, 1704.
- 2) T. Aso, K. Saito, A. Suzuki, Y. Saito, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10540.