



Active agingを支援するバイオメディカル工学の研究拠点  
—福島県の震災復興に貢献する医工連携研究—

# DNAプローブへの応用を目指した 環境感応型蛍光核酸の開発

## 研究背景と目的

我々はこれまでに数十種におよぶ蛍光DNAプローブを合成し、標的DNAとただ混ぜてUV照射するだけで、判別したい一塩基の変異を発光強度の違いで簡単に識別する手法を開発している。しかしながら、一塩基変異等を含む核酸の局所的な構造変化をより高感度で検出するためには、僅かな環境変化に応じて発光波長(色)や寿命を極めて大きく変化させる新規蛍光核酸塩基の開発が必要である。本研究では、pHや極性環境、DNA二重鎖中における局所的な立体構造などの微細環境の変化に伴い発光波長(色)や蛍光寿命を大きく変化させる新規蛍光核酸塩基を設計し、これを導入した核酸プローブを開発することで、細胞内でDNAやRNAなどの核酸の局所的な構造変化(一塩基変異も含む)を簡便に検出できる新手法の開発を目指す。

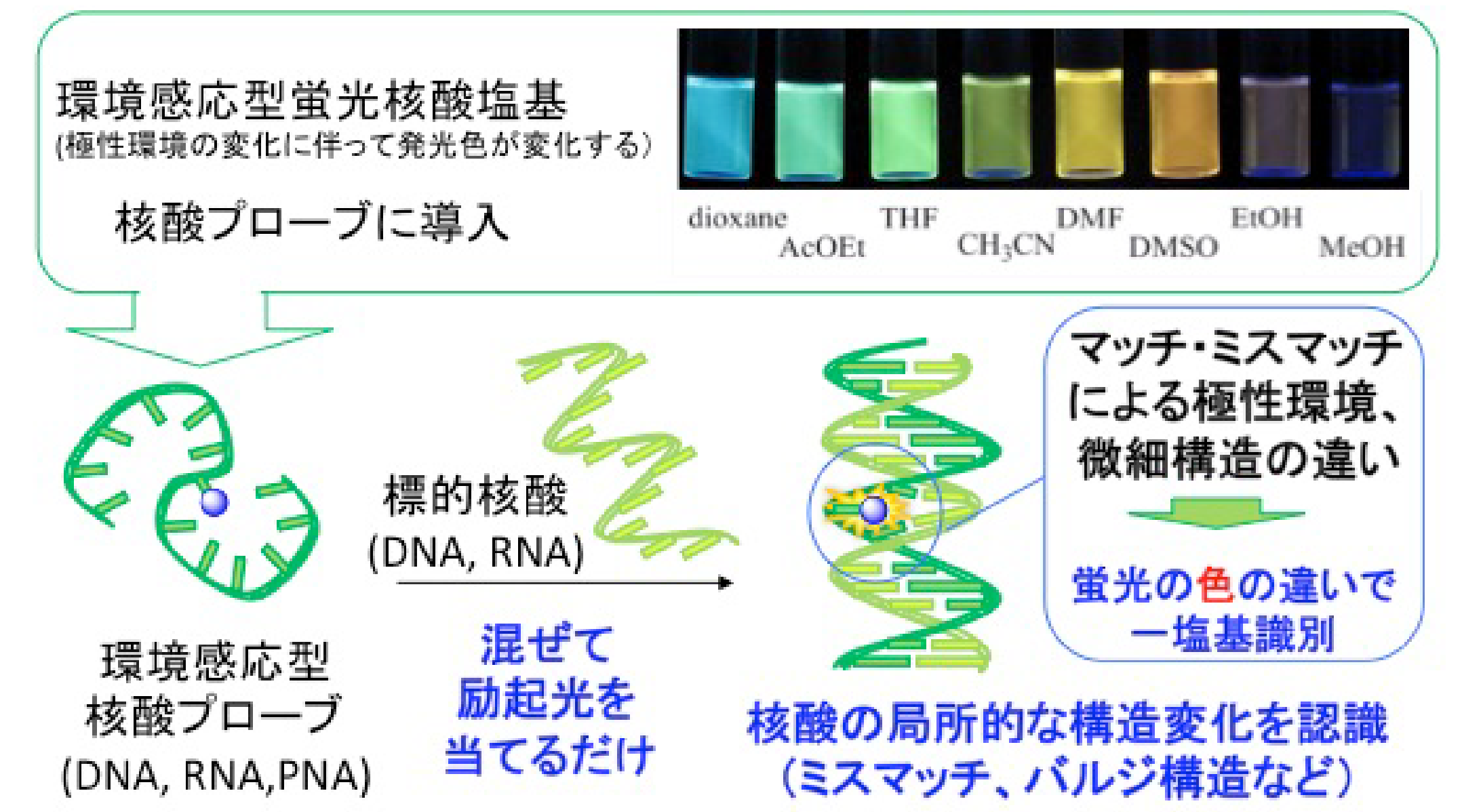


Fig.1. Design of environmentally sensitive fluorescent nucleosides

## 実験方法

核酸構造を保持しながら、周辺のマクロ環境変化(二重鎖、一本鎖やバルジ、ループ構造など)に鋭敏に反応し、その蛍光強度のみならず波長を大きく変化させるソルバトフルオロクロミックナ分子を設計することで標的DNA中の一塩基の変異を大きな蛍光色(蛍光波長)の変化として検出することが可能であると考えられる。同様にpH変化に応じて分子内のプロトン化/脱プロトン化に応じて蛍光スペクトルを大きく変化させる分子を利用すれば二重鎖形成時やミスマッチ塩基対形成時の僅かなpH変化を検出することが可能になると考えられる。環境の変化により、カメレオンのように蛍光色(波長)や強度を変化させる様々な次世代型の環境感応型蛍光核酸の開発を行い、それらを含むより高度な機能を持つ蛍光DNAプローブの開発について検討を行った。

## 結果・まとめ

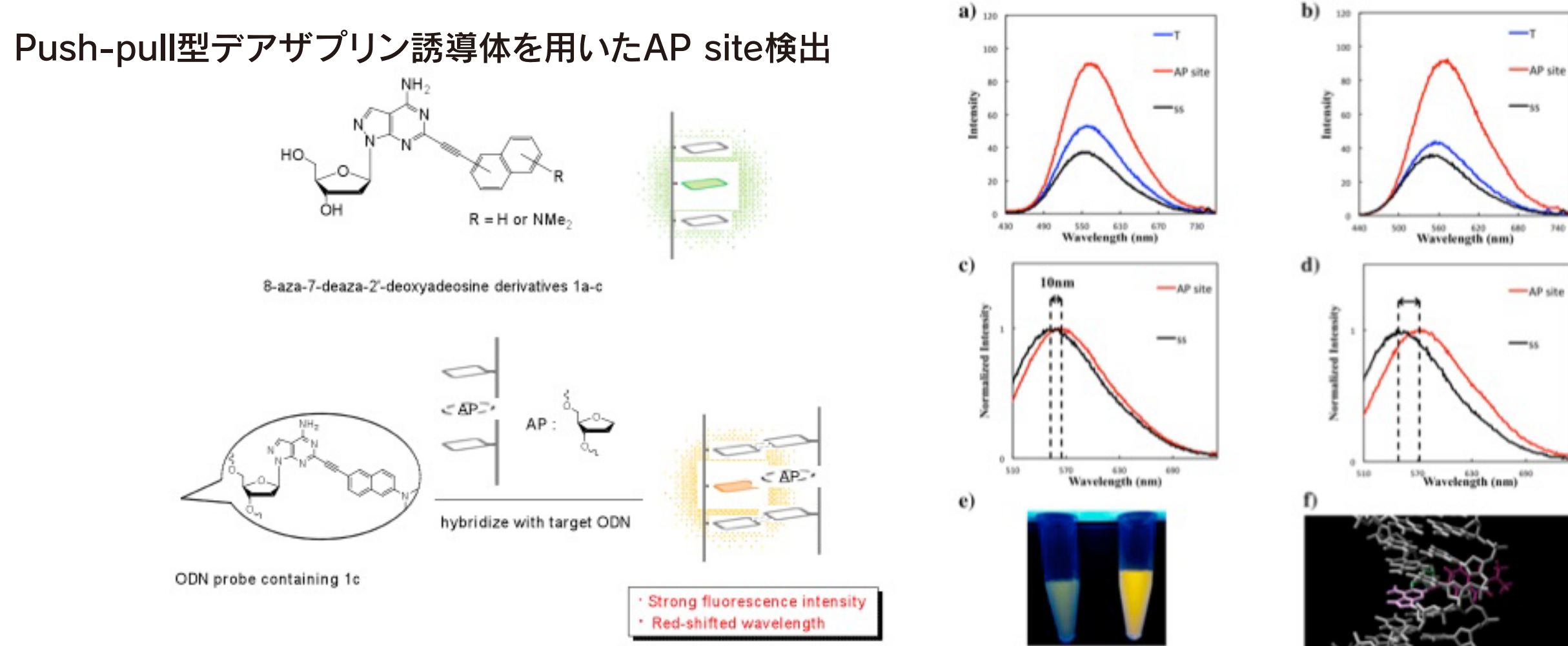


Fig. 2. Fluorescence spectra of (a) ODN1(1c), and (b) ODN2(1c) hybridized with ODN1(match or AP) and cODN2 (match or AP), respectively (2.5 mM ODNs, 50 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.0, rt). "ss" denotes single-stranded ODN(1c). Normalized fluorescence spectra of (c) ODN1(1c), and (d) ODN2(1c) hybridized with cODN1(AP) and cODN2(AP), respectively. (e) Photograph of fluorescence from ODN2(1c) and duplexes formed with cODN2(AP) excited at 365 nm. (f) Molecular model of ODN2(1c)/cODN2(AP) duplex. The model was optimized by the AMBER\* force field in water using MacroModel ver. 9.0.

### pH応答性ベンゾイミダゾキノリンヌクレオシド (BIQA) を用いたシトシン塩基の識別

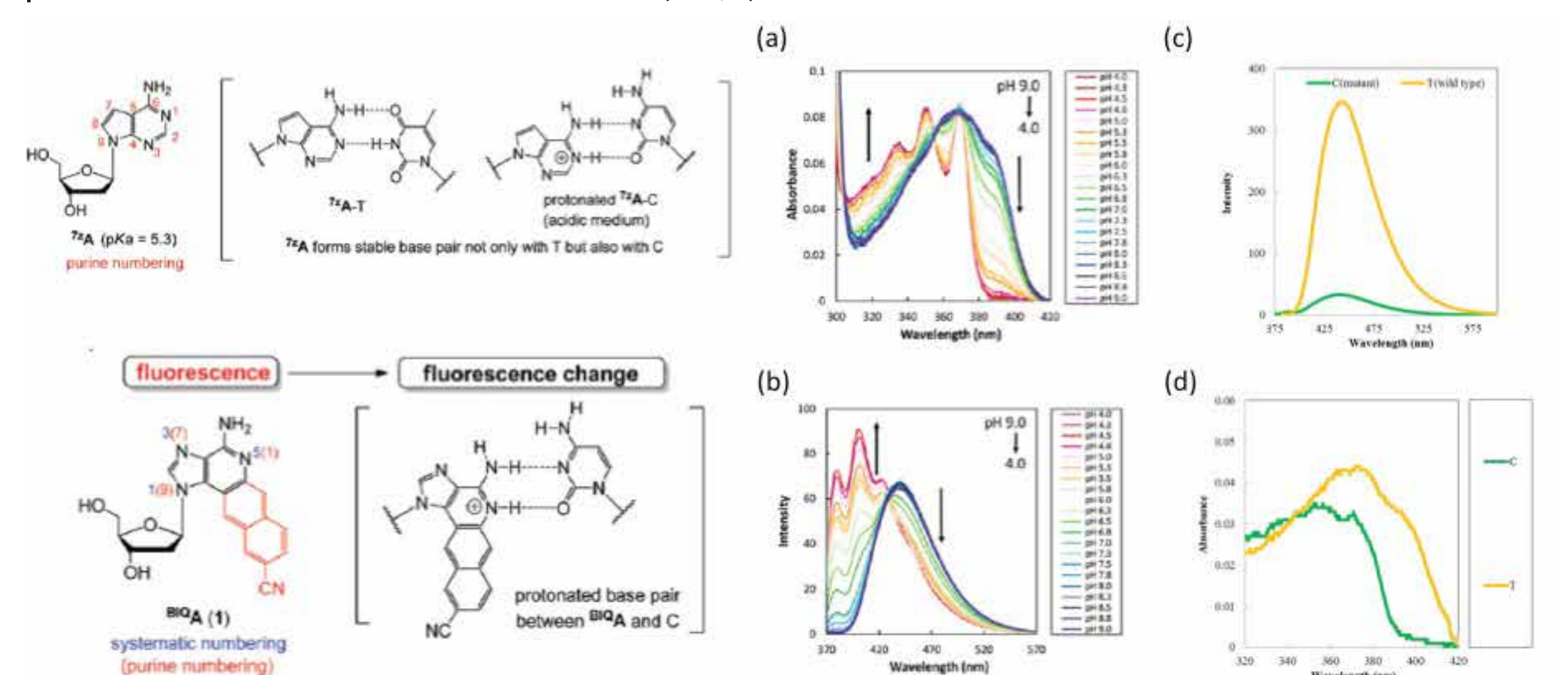


Fig. 3.(a) Absorption and (b) fluorescence spectra of BIQA (10 μM) at various pH values. (c) Absorption and (d) fluorescence spectra of ODN probes containing BIQA (2.5 μM) hybridized with target ODN at pH 7.5.

### ICT/LE蛍光を利用した環境感応型傾向核酸塩基 (I)

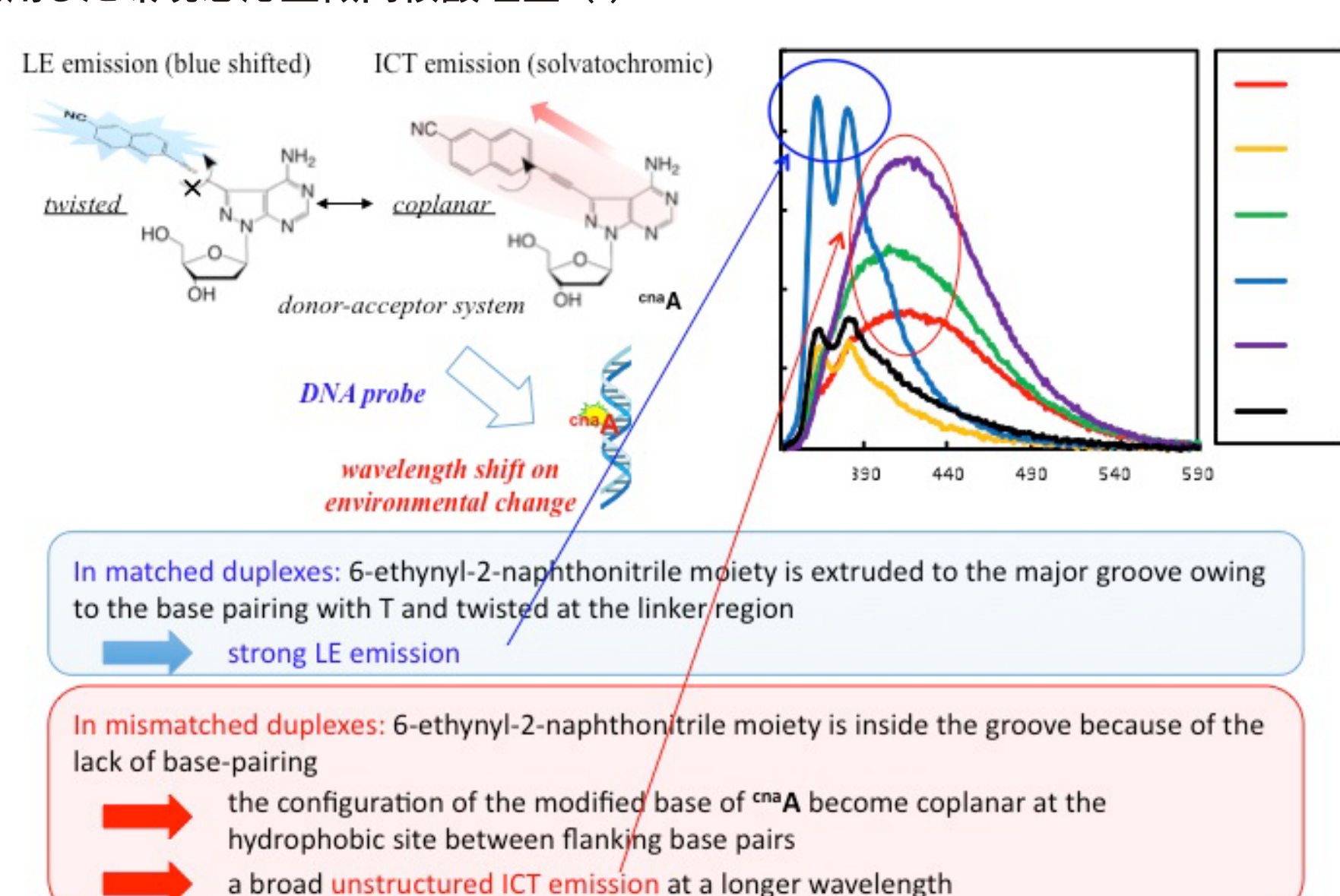


Fig. 4. Specific detection of T by ESF 8-aza-7-deaza-2'-deoxyadenosine derivative cnaA

### ICT/LE蛍光を利用した環境感応型傾向核酸塩基 (II)

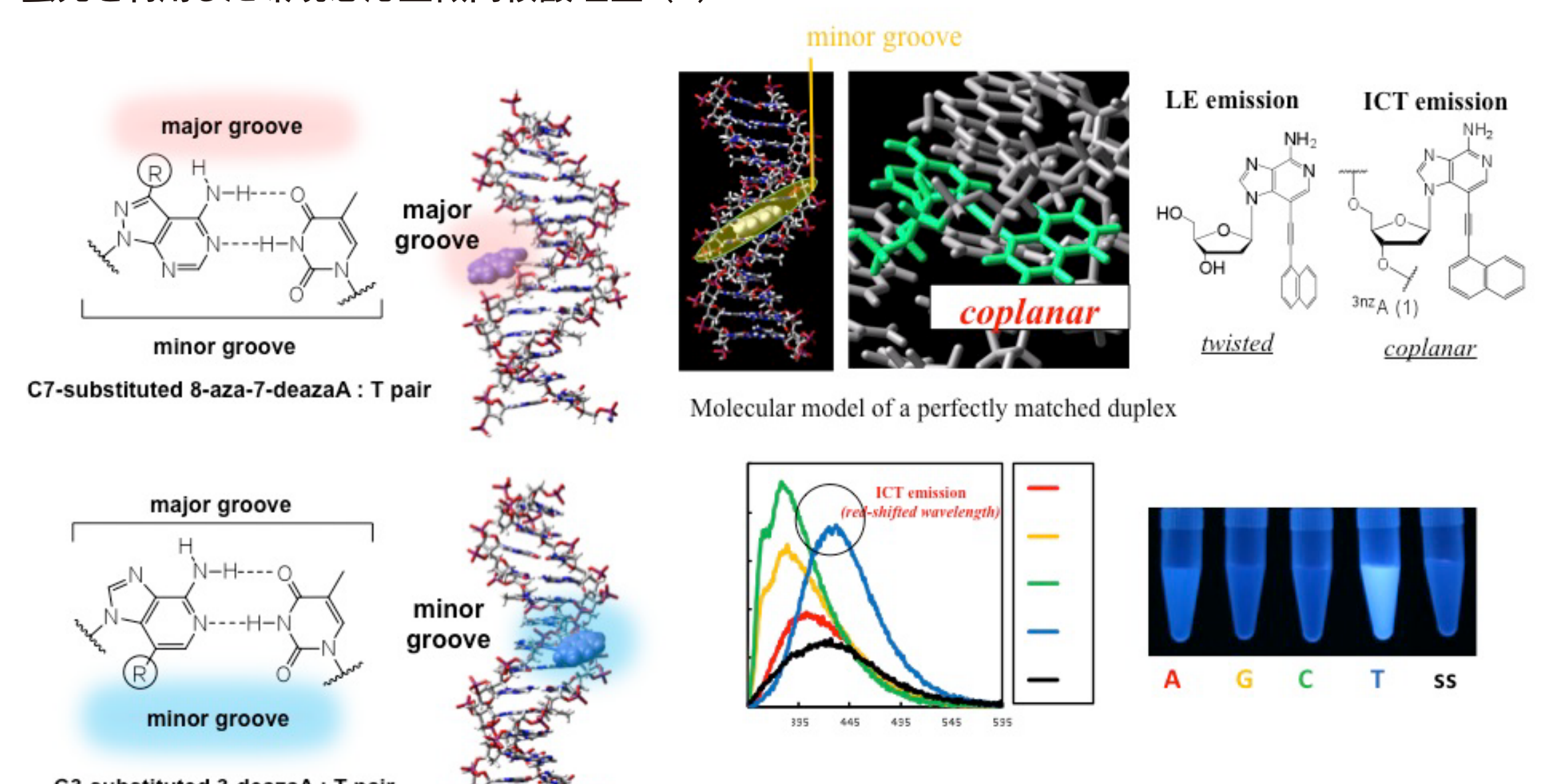


Fig. 5. Discrimination of thymine by fluorescence emission.