

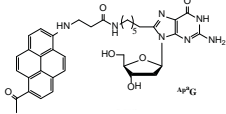
遺伝子検出に応用可能な環境感応型蛍光核酸

Design of Environmentally Sensitive Fluorescent (ESF) purine nucleosides for DNA detection

工学部 生命応用化学科 准教授 齋藤 義雄
Yoshio Saito, Nihon University, College of Engineering

結果・まとめ (Summary)

ピレン誘導体Apaをグアニン塩基に導入した蛍光核酸



蛍光色素Apaとそれを導入したApaGを合成し、その光化学的な特性を調べた。その結果、溶媒極性の変化に伴う顕著なStokes shift変化が観察された。また、その際の蛍光発光波長はPRODANやその誘導体であるAnapに比べ40~80nm長波長側にシフトしていることが分かった。ApaGは周囲の環境変化に伴い顕著な蛍光変化を示すことから、環境感応型の蛍光核酸として利用できると考えられる。

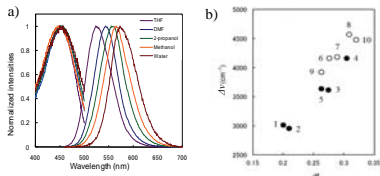
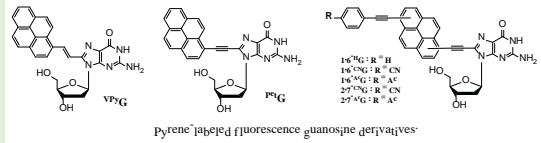


図3 a) Normalized UV and fluorescence spectra of ApaG in different solvents. Spectra are normalized with respect to peak intensities. b) Lippert plot of corrected Stokes shift in wavenumbers ($\Delta\nu$) against the orientational polarizability of solvents (Δf). Filled circles: aprotic solvents, open circles: protic solvents. 1, ethyl acetate; 2, tetrahydrofuran; 3, *N,N*-dimethylformamide; 4, acetonitrile; 5, dimethylsulfoxide; 6, 2-propanol; 7, ethanol; 8, methanol; 9, glycerol; 10, water.

ピレン骨格を有するPush-Pull型グアニン誘導体



Pyrene-labeled fluorescent guanosine derivatives

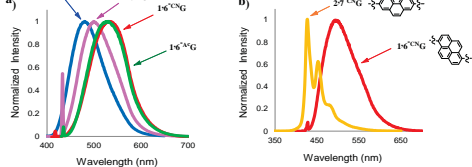


図4 a) Normalized fluorescence spectra of P4G, 1,6-HG, 1,6-CNG and 1,6-AG in THF. b) Normalized fluorescence spectra of 1,6-CNG and 2,7-CNG in CHCl₃.

ジエン構造を有するPush-Pull型グアニン誘導体

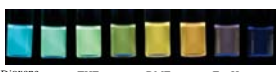
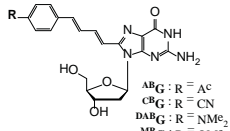


図5 Fluorescence color of ABG in different solvents. The sample solutions were illuminated with a 365 nm transilluminator.

末端に電子吸引性置換基であるシアノ基やアセチル基を有するCBGやABGはピレン誘導体と同様に約500~550nmと長波長領域で顕著な溶媒フルオロクロミックな性質を示した。一方、比較として合成した電子供与性置換基を有するMBGやDABGは、蛍光強度は大きいものの溶媒フルオロクロミックな性質を示さなかった。このことからPush-Pull型の誘導体のみが溶媒フルオロクロミックな性質を示すことが分かった。

より長波長領域で発光し、溶媒フルオロクロミックな性質を有する化合物として新規のピレン骨格を有するグアニン誘導体を開発した。2置換ピレンをコアとして、一方に天然の核酸塩基の中で最も酸化電位の低いグアニン塩基 (donor) を、もう一方に電子吸引基を持つベンゼン環 (acceptor) をそれぞれ三重結合を介して連結させることでπ共役系が拡大し、かつ分子内ドナー・アクセプター構造を有するPush-Pull型のグアニン誘導体をデザインした。

得られた蛍光核酸塩基に関して光化学的特性を調べた結果、π共役系拡大に伴い蛍光波長が長波長シフトしていることを確認した。また、2,7-置換ピレン骨格を有する配向性の異なるグアニン誘導体も同様に合成を行い、両者の光学特性の違いについて比較検討を行った結果、1,6-CNGは溶媒極性の変化に伴い蛍光強度、波長が大きく変化した溶媒フルオロクロミックな性質を有することが分かった。一方、2,7-CNGでは顕著な蛍光の変化は観察されず配向性の違いにより光学特性が大きく異なることが確認された。

芳香族発色団を含むプリン塩基誘導体

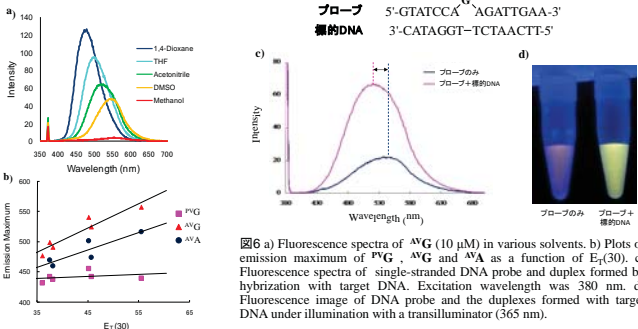


図6 a) Fluorescence spectra of AVG (10 μM) in various solvents. b) Plots of emission maximum of P4G, AVG and AVA as a function of $E_2(30)$. c) Fluorescence spectra of single-stranded DNA probe and duplex formed by hybridization with target DNA. Excitation wavelength was 380 nm. d) Fluorescence image of DNA probe and duplexes formed with target DNA under illumination with a transilluminator (365 nm).

前述のいくつかのアプローチで環境感応型の蛍光核酸塩基を創出したが、その中で最もシンプルな構造で、かつ顕著に溶媒フルオロクロミックな性質を示す蛍光核酸塩基であるAVGを蛍光DNAプローブに導入し、蛍光色の違いで標的DNAを検出できるか検討を行った。AVGを含む16merからなるDNAプローブを実際に合成し、標的DNAに相当するDNA鎖の有無による蛍光スペクトルの変化を測定した。その際プローブDNAは、標的DNAとのハイブリダイズにより修飾核酸部位がバルジ構造を形成する、極性環境変化がより大きくなるようにデザインしたものをを用いた。

蛍光スペクトルを測定した結果、標的DNAを加えることにより蛍光強度が大きくなり、波長も約25nmブルーシフトした。この変化は橙色から黄色への変化として肉眼でも容易に観察でき、標的DNAの有無を色の変化で識別可能であることが分かった。

ICT/LE蛍光を利用した環境感応型蛍光核酸塩基

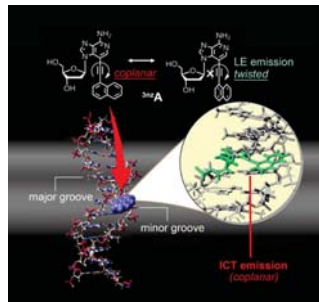
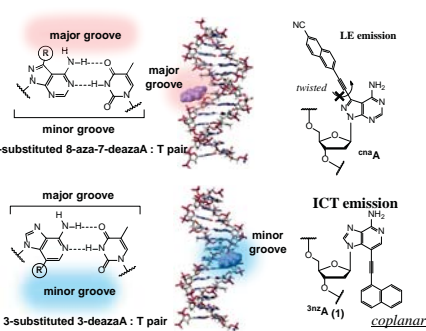


図7 Discrimination of Thymine by fluorescence emission.

新たに、従来の極性環境感応型分子にねじれの要素を追加した2種類の発光モードを示す環境感応型蛍光核酸塩基の開発を行った。

我々は最近、分子の回転による平面性の変化により、LE蛍光とICT蛍光の2種類の発光モードを切り替える新しい蛍光核酸塩基の開発に成功しており、これをDNA鎖に導入することで、従来より大きな波長変化で対面塩基の種類を識別することが可能となった。

左図に示すように、新たに開発した蛍光DNAプローブを用いることで蛍光波長の違いでフルマッチ配列 (チミン塩基) の識別が可能である。

応用分野・用途 (Applications)

- 新しいコンセプトに基づいた SNPs検出用DNAチップ

日本大学産官学連携知財センター (NUBIC)

〒102-8275 東京都千代田区九段南4-8-24 日本学会館

Tel: 03-5275-8139 Fax: 03-5275-8328 E-mail: nubic@nihon-u.ac.jp http://www.nubic.jp

