

論文の内容の要旨

氏名：鈴木 梓

博士の専攻分野の名称：博士（工学）

論文題名：環境感応型蛍光プリンヌクレオシドの開発とDNAプローブへの応用

極性、粘性、pH などの環境変化に応じて蛍光強度や蛍光波長が劇的に変化するようなセンサー機能を有する環境感応型蛍光 (ESF: Environmentally Sensitive Fluorescent) 核酸は、標的となる DNA や RNA の検出のみならず、SNP タイピングのような一塩基変異の検出、塩基欠損などによる核酸の微細な構造変化やタンパク質との相互作用部位における局所的環境変化を蛍光発光色の変化で調べるためのプローブとして応用が期待されている。以上の背景から、本研究では、分子内電荷移動 (ICT) 発光を利用した環境感応型蛍光プリンヌクレオシドのデザインと合成を行い、蛍光 DNA プローブへ展開し、それらの機能評価を行った。

本論文は 6 章で構成されている。第 1 章は、本論文の序論にあたり、研究計画の背景、目的や意義、ならびに本論文の構成について述べている。

第 2 章では、天然塩基であるアデニンの 8 位に様々な置換基を有するナフタレン分子を三重結合で共役させた 2'-デオキシアデノシン誘導体を合成し、それらの光学特性および遺伝子検出能の評価を行った。各誘導体を極性の異なる様々な溶媒中で蛍光測定を行った結果、ナフタレンの環外置換基が電子吸引力 (アクセプター) であるシアノ基、電子供与性 (ドナー) である *N,N*-ジメチルアミノ基のどちらの置換基であっても、ソルバトフルオロクロミックな蛍光特性を示すことが明らかとなった。これは、シアノ基を有する場合には、アデニンがドナーとして働く一方で、*N,N*-ジメチルアミノ基を有する場合には、アデニンがアクセプターとして働くことで、分子内電荷移動 (ICT: Intramolecular Charge Transfer) 発光が有効に機能したためであると考えられる。また、置換基の配向が異なっても同様の性質を示すことや、無置換ナフタレンの場合にはソルバトフルオロクロミックな性質を示さなかったことは、置換基が起因していることを支持するものであった。

さらに、ソルバトフルオロクロミックな性質の 1 つである極性の低い環境下で強い蛍光を示す特徴を利用して、標的 DNA とのハイブリダイズにより、ヌクレオシドが 1 つ抜け落ちたバルジ構造となるようにプローブ DNA をデザインした。その結果、修飾核酸塩基周辺に意図的に疎水的な空間と環境が構築されることで、蛍光強度の増加で相補鎖 (ターゲット配列) を検出することが可能であった。さらに、シアノ基を有する誘導体では、グアニン塩基からの光誘起電子移動 (PET: Photo-induced Electron Transfer) による蛍光消光が観測された一方で、*N,N*-ジメチルアミノ基を有する誘導体では、近傍のグアニン塩基による蛍光消光を受けないことが明らかとなった。このように、グアニン塩基による蛍光消光を受けない現象は、標的 DNA を選択する際に、様々な塩基配列に適用可能であることから遺伝子検出能の優れたプローブであることを示している。

第 3 章では、7-デアザアデニンの 7 位に様々なアリアルエチニル基を連結させた 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体およびオリゴ DNA 鎖を合成し、光学特性や核酸塩基認識能の評価を行った。第 2 章で機能評価を行ったナフタレン分子を含む 2'-デオキシアデノシン誘導体は優れた光学特性を示したが、DNA 二重鎖の融解温度 (T_m) 測定の結果、二重らせん構造を大きく不安定化してしまうことが明らかになっている。また、プリン塩基の 8 位に置換基を導入すると、糖と塩基とのグリコシド結合が通常 *anti* 配座から *syn* 配座へと反転し、相補鎖の相手塩基との水素結合形成能がないのも理由の 1 つであると考えられる。そこで、DNA を構成する天然プリンヌクレオシドであるアデノシン及びグアノシンと同様な水素結合パターンを持つ 7-デアザプリンヌクレオシドに着目した。7-デアザプリン *anti* 配座が保持される 7 位に化学修飾が可能であると同時に、その修飾基は、大きな空間が空いている DNA 二重らせん構造のメジャーグループに位置することから、二重らせん構造の不安定化は見られないと予想した。前章の結果も踏まえて、分子デザインを行い、様々なアリアルエチニル基を有する 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の合成を行った。各誘導体を様々な溶媒中に溶解させ、蛍光測定を行った結果、ナフタレンの環外置換基として、電子吸引基であるシアノ基やアセチル基を含む 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体は、ソルバトフルオロ

クロミックな性質を示す一方で、電子供与基である *N,N*-ジメチルアミノ基や置換基を持たない誘導体では、そのような性質を示さないことが明らかとなった。この結果は、7-デアザアデニンの酸化電位がアデニンよりも低く、さらにグアニンと同等の値を示すことに起因している。すなわち、7-デアザアデニンは電子供与能が高いために、電子吸引基と分子内で共役することで、ドナー・アクセプター型の分子内電荷移動 (ICT) 発光が発現される理想的な構造となっているのに対して、*N,N*-ジメチルアミノ基では分子内電荷移動が発現されにくい構造になっているからだと考えられる。

ソルバトフルオロクロミックな蛍光特性を示した 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン含有プローブ DNA は、標的 DNA とのハイブリダイズにより、修飾核酸塩基の相手塩基の一塩基変異を蛍光波長のシフトで識別することが確認できた。しかしながら、水素結合形成による完全な塩基選択性がなかったことは、課題として残るが、塩基対形成を可能にしたことによって、核酸構造の微細な構造変化を蛍光波長の変化で識別することができたことから、さらに優れた遺伝子検出用プローブを開発できる可能性を見出した。

第4章では、8-アザ-7-デアザグアニンを骨格にもつ新しい環境感応型蛍光核酸の開発について述べている。第3章では、プリン塩基の8位修飾による DNA 二重鎖の不安定化を改善するために、7-デアザアデノシンの7位に蛍光色素を導入することを試みた。その結果、DNA 二重鎖の不安定化 (融解温度の低下) が見られず、塩基対形成能を持つことが可能であることを示している。しかしながら、7-デアザアデノシンおよび7位置換 7-デアザアデノシンは DNA 二重鎖中でマッチすると考えられるチミン塩基のみならず、シトシン塩基とも水素結合を形成することがわかり、塩基対形成識別能の点で不十分であった。そこで、7位に修飾することが可能な 7-デアザアデノシンに代わり、同様に7位に修飾可能なグアニン誘導体にすれば、マッチであるシトシン塩基とのみ安定な塩基対形成と併用して、環境感応型の蛍光特性を示すような誘導体を開発することができると考えた。本章では、8-アザ-7-デアザグアニンの7位に2-エチルナフタレンを連結することで簡単にソルバトフルオロクロミックな蛍光特性を示したことから、オリゴ DNA 鎖へ導入し、核酸塩基認識能の評価を行った。標的 DNA とのハイブリダイズ後の二重鎖融解温度 (T_m)、CD 測定を行った結果、B 型に限りなく近い構造である二重らせん構造をとり、シトシン塩基のみ安定なワトソン-クリック塩基対を形成していることが明らかになった。さらに蛍光測定をすると、ミスマッチ塩基に比べて、マッチであるシトシン塩基の場合のみ、およそ 30 nm もの長波長シフトを伴って蛍光発光することが確認できた。すなわち、標的 DNA のシトシン塩基を蛍光波長の変化で識別することが可能であり、この蛍光特性を利用して、*bcr/abl* 遺伝子を同様に検出することに成功した。このように、DNA 配列の一塩基の違いを水素結合形成と特異的な蛍光発光で識別できる環境感応型蛍光核酸に初めて成功した。

第5章では、DNA 二重鎖のフルマッチとミスマッチ構造を短い波長の LE (Locally Excited) 発光と長い波長の ICT 発光で識別できるプローブの開発について述べている。これまでの章では、従来のものに比べて長波長領域で蛍光検出するために、ドナーとアクセプターを共存することで、ICT 状態由来の蛍光が発現するような分子デザインを行っていた。本章では、6-エチル-2-ナフトニトリルを蛍光分子として修飾した 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体が、分子内ドナー・アクセプター構造を有することで ICT 発光、さらに、粘性の高い環境下では、塩基-蛍光色素間で分子回転が抑制されることにより、ICT 発光に代わり、2-ナフトニトリル由来の LE 発光が発現するといった二重蛍光を示すことを明らかにしている。さらに、この環境感応型蛍光核酸をオリゴ DNA 鎖へ導入し、標的 DNA とのハイブリダイズ後の核酸塩基認識能の評価を行ったところ、二重鎖融解温度 (T_m) 測定によって、チミン塩基とのみ安定なワトソン-クリック型の水素結合を形成することが示された。このことは、シトシン塩基とも安定な塩基対を形成する 7-デアザアデニン骨格をもつ誘導体に比べて、塩基認識能が優れていることと言える。さらに、蛍光測定を行うと、相手塩基がマッチであるチミンの場合のみに、ミスマッチ塩基に比べて、最大蛍光波長のブルーシフトと蛍光挙動の変化が確認された。この現象は 8-アザ-7-デアザアデニンの7位に修飾した 6-エチル-2-ナフトニトリル部位が二重鎖のメジャーグループにねじれた構造で安定化されることによって新たに現れた LE 発光であると考えられる。つまり、チミン塩基と水素結合を形成することによって観測された特異的な現象であり、RNA を構成するウラシル塩基をターゲットにしても同様の結果を得ることができている。従って、このような蛍光特性を利用して、すなわち、LE 発光と ICT 発光の二重蛍光を利用することで、より明確にマッチ構造を検出することが可能であり、タンパク質や細胞内の局所的な粘度環境の変化を認識するプローブとしても応用できる可能性を示唆している。

第6章では、本論文の総括であり、これまでに合成した各誘導体およびその光学特性や遺伝子検出プローブ

ブとしての性能を評価している。本論文における核酸構造の微細な構造変化や環境変化を蛍光発光の違いで識別するには、水素結合認識による塩基識別が重要な役割を果たしており、今後の新たな DNA プローブの設計に有用な知見となることを述べている。