

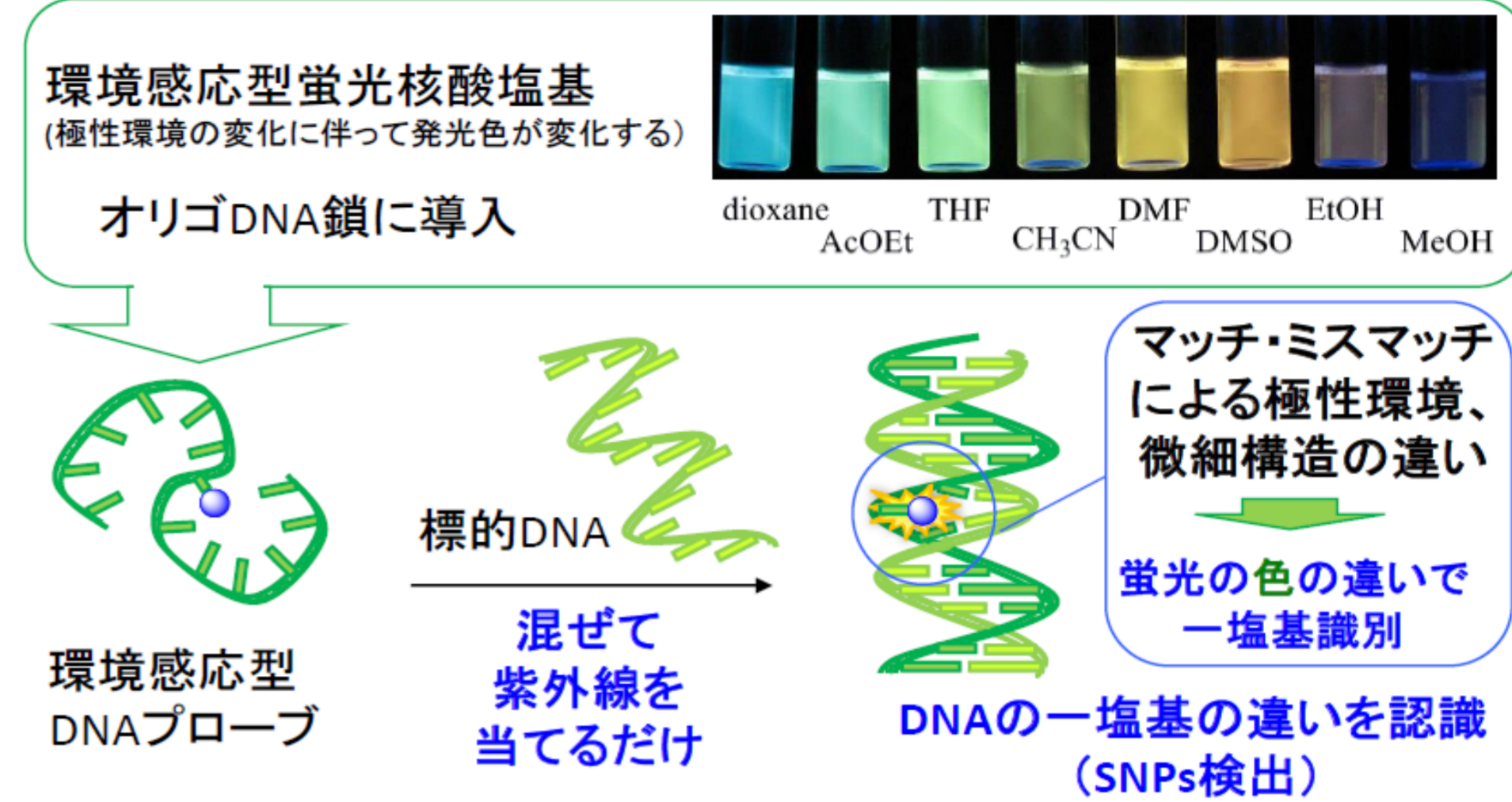
新しい環境感応型蛍光核酸塩基の開発

8-アザ-3,7-ジデアアデニン骨格を有する新規核酸とそれらを用いた蛍光DNAプローブの開発

工学部 生命応用化学科 教授 齋藤義雄

目的・背景

近年、周辺環境の変化に伴い鋭敏に蛍光発光波長を変化させる環境感応型のアミノ酸が開発され、これをタンパク質に導入することで、タンパク質の会合やフォールディングなどの構造変化を蛍光で直接モニターする研究が開始されている。一方で、マイクロ環境変化に呼応して蛍光強度、波長を変化させる環境感応型の蛍光核酸の検討もなされている。環境感応型の蛍光核酸や、それらを導入した蛍光DNAプローブが実現すれば、核酸の検出やSNPs(一塩基多型)タイピングのみならず、核酸の構造変化のモニタリング、生体内でのRNAの分子イメージング、核酸の一分子計測など様々な分野への応用が可能となる。更に、DNA上のタンパク質結合部位に環境感応型蛍光核酸を導入し、タンパク質の結合による極性環境変化に伴う蛍光の変化をモニターすれば、核酸とタンパク質の相互作用をリアルタイムで解析することも可能となり、化学・生命化学やその関連分野での強力な武器になり得る。このようなことから我々は、環境感応型蛍光核酸の開発を行い、それらを含む蛍光DNAプローブへの応用についての検討を行っている。特にこれまで、DNAの二重鎖形成や一塩基変異が生じた際の微細な環境変化に着目し、環境感応型蛍光核酸塩基を用いた遺伝子検出ツール・手法の開発に取り組んできている。



環境感応型蛍光核酸塩基による標的DNA鎖や一塩基変異 (SNPs) の識別

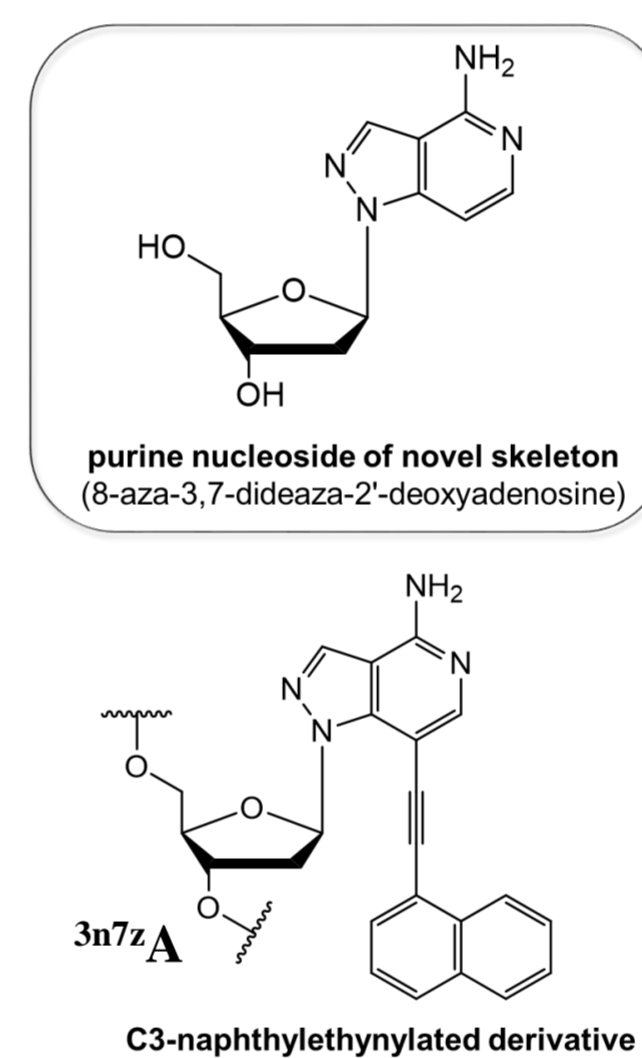
原理・方法

核酸塩基構造を保持しながら周辺のマイクロ環境変化 (例えば核酸の二重鎖形成、一本鎖状態やバルジ、ループ構造など) とそれに伴う周辺環境の変化) に敏感に反応し、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な分子を設計することで、一塩基の変化を大きな蛍光色 (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。そこで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プローブへの応用についての検討を行った。

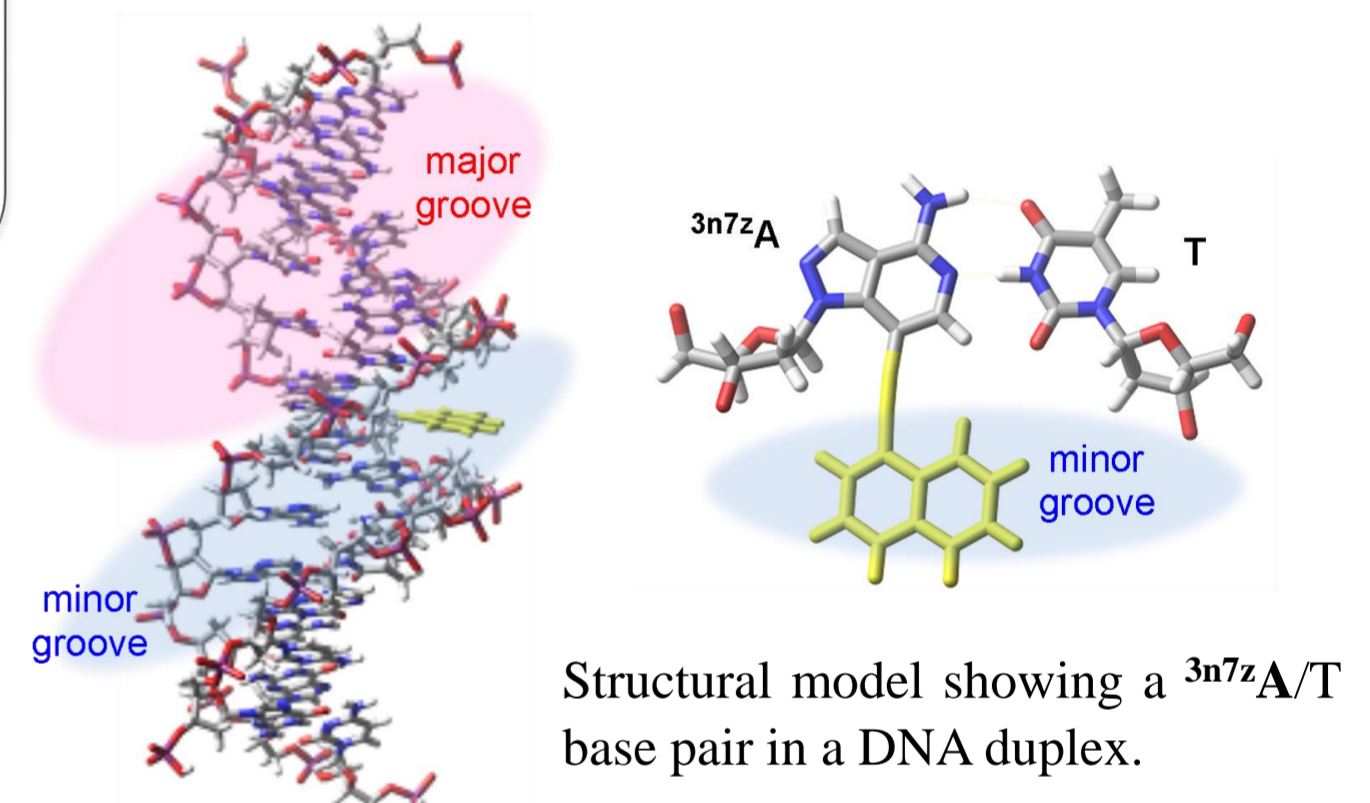
新たな環境感応型蛍光核酸を開発するにあたり、塩基対形成能を保持しつつ、DNA二重鎖の主溝、副溝側の両方の位置に蛍光色素を導入することが可能な新規核酸となる8-アザ-3,7-ジデアアデノシンを開発した (右図上)。さらに、DNA二重鎖において副溝側となる塩基の3位に蛍光色素を導入した新規環境感応型蛍光核酸 (右図下) を開発した。

我々が開発した新規環境感応型蛍光核酸は、大きなソルバトクロシティーを有する。さらに同様な構造を有する分子 (DNAの溝に合わせてねじれる性質を示す分子) と使い分けることで、非常に大きな波長変化を利用することができ、高感度な標的DNAの検出、一塩基変異の検出が可能となる。

Design of ESF purine nucleosides : 8-aza-3,7-dideaza-2'-deoxyadenosine and its derivative ^{3n7z}A



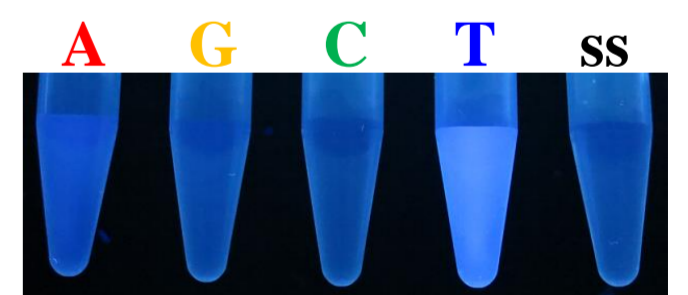
Fluorescent ODN probes containing ^{3n7z}A acted as effective reporter probes for homogeneous single nucleotide polymorphism (SNP) typing.



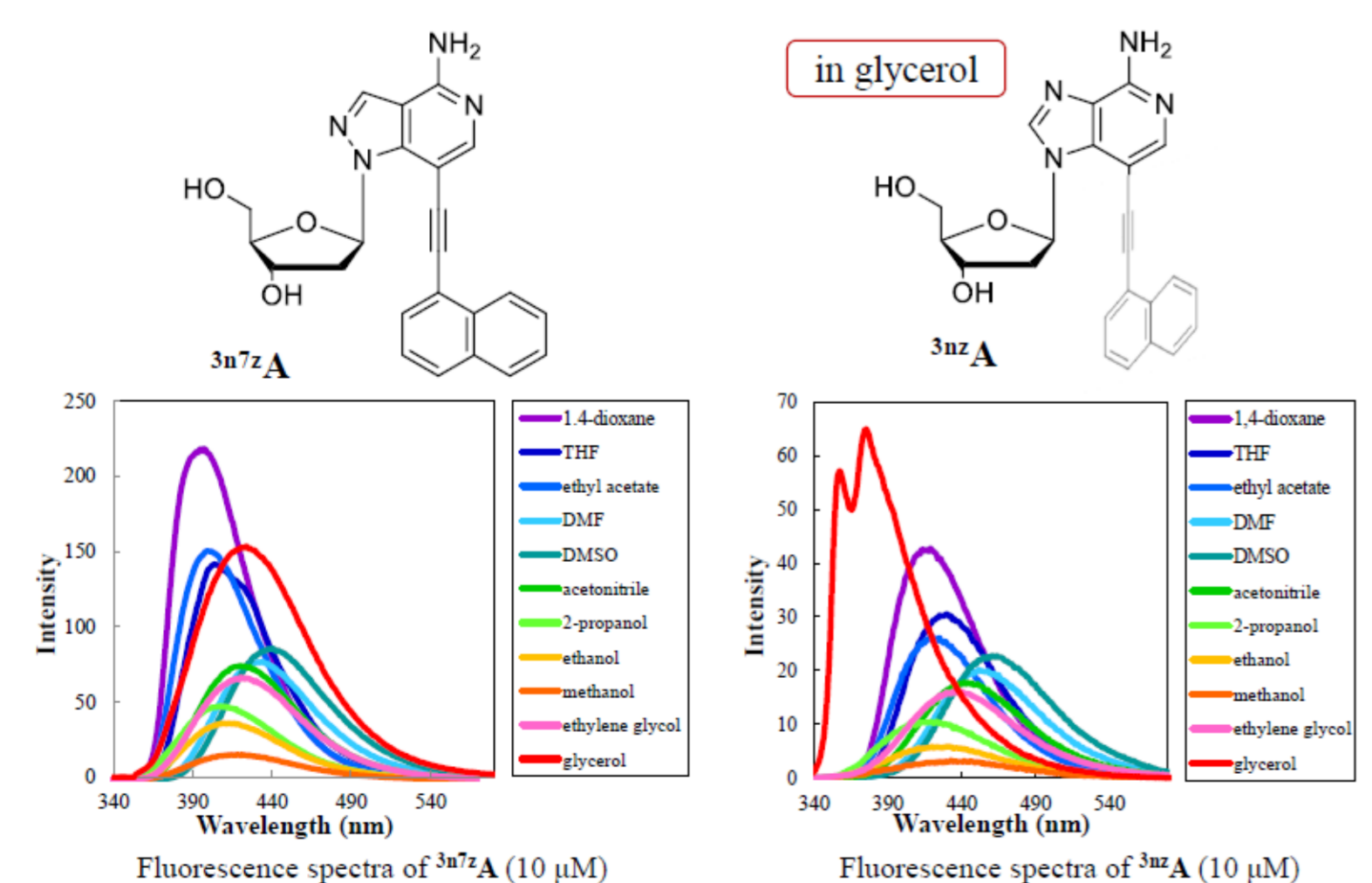
結果・まとめ

我々が開発した環境感応型蛍光核酸である8-アザ-3,7-ジデアアデノシン誘導体および3-デアアデノシン誘導体に関して、極性環境の異なる溶媒中での発光の様子を比べてところ、環境変化に伴い発光波長 (発光色) を大きく変化させる性質を有することがわかる。3-デアアデノシン誘導体に関しては、分子のねじれにより大きな波長変化が見られた。

これらの環境感応型蛍光核酸を含むDNAプローブを用いることで、標的DNA中検出、さらには標的中の一塩基の違いまで、波長の変化として検出することが可能である。



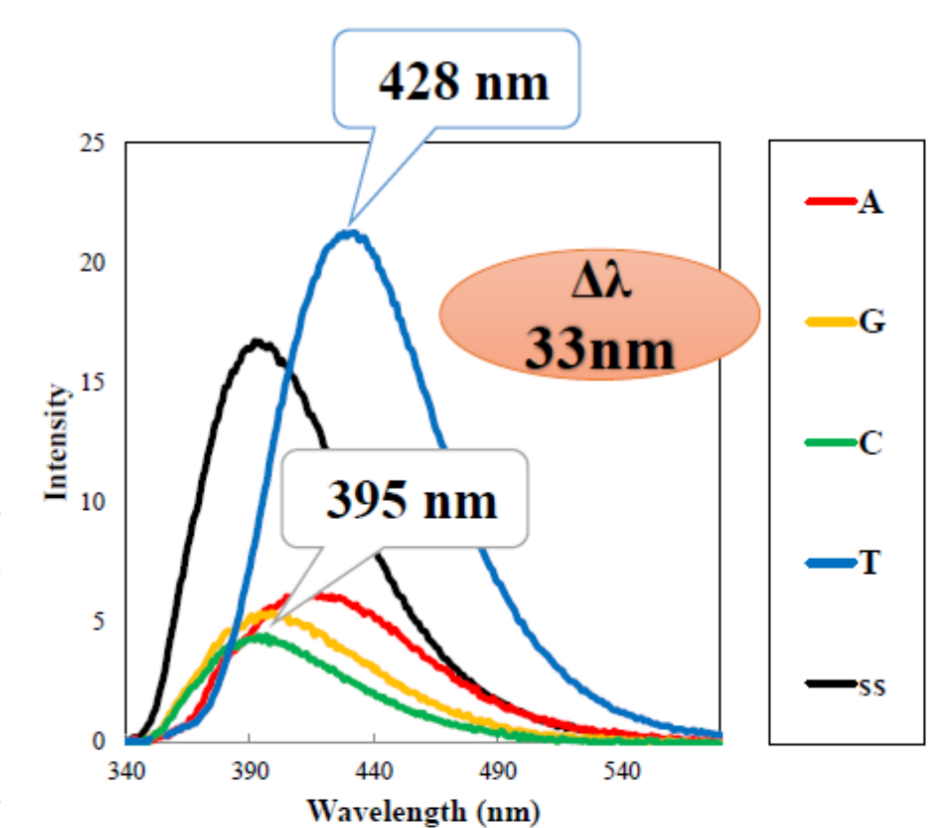
Fluorescence spectra of newly synthesized ^{3n7z}A and previously reported ^{3nz}A in various solvents



Thermal stability and fluorescence spectra of ODN1/cODN1 duplex containing ^{3n7z}A

ODN: 5'-CGCAACXCAACGC-3' (X = ^{3n7z}A)
cODN: 3'-GCGTTGNGTTGCG-5' (N = A, G, C, T)

N	T _m (°C)	ΔT _m (°C)
A	57.0	-6.3
G	57.8	-5.5
C	57.7	-5.6
T	62.3	-1.0
ss (ODN2)	-	-
X = A, N = T	63.3	-



応用分野・用途

○新しいコンセプトに基づいた遺伝子検出試薬や核酸検出チップ (SNPs検出も可能)