総合論文

水素結合性小分子による核酸塩基認識と一塩基多型蛍光検出

西沢 精一¹, 吉本敬太郎¹, 清野 文博¹, 許 春燕¹, 寺前 紀夫^{®1}

Nucleobase recognition by hydrogen bond forming ligands and its use for fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms

Seiichi NISHIZAWA¹, Keitaro YOSHIMOTO¹, Takehiro SEINO¹,
Chun-Yan XU¹ and Norio TERAMAE¹

¹ Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8578

(Received 6 January 2004, Accepted 5 February 2004)

In combination with abasic site (AP site)-containing oligodeoxynucleotides (ODNs), we demonstrate the potential use of hydrogen bond-forming ligands, 2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine (AMND) and 2-amino-4-oxopteridine (pterin), for the recognition of nucleobases in the aqueous phase. Our strategy is based on the construction of an AP site in ODN duplexes, which allows small synthetic and/or biotic ligands to strongly bind to target nucleobases; an AP site-containing ODN is hybridized with a target ODN so as to place the AP site toward a target nucleobase, by which hydrophobic microenvironments are provided for ligands to recognize target nucleobases through hydrogen-bonding. From an examination of the binding behaviors by melting temperature (T_m), fluorescence and circular dichroism spectra measurements, it has been found that AMND selectively binds to a cytosine base with a 1 : 1 binding constant of $>10^6 \text{ M}^{-1}$, while pterin shows selectivity for a guanine base ($K_{11} = 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) over other nucleobases. The observed high stabilities of 1 : 1 complexes can be explained by a cooperative binding event, *i.e.*, hydrogen-bonding with target nucleobases and stacking with nucleobases flanking the AP site. The potential use of these ligands is also presented for the fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the cancer repression gene p53.

Keywords : ligand; hydrogen bond; stacking; abasic site; fluorescence detection; nucleobase; single-nucleotide polymorphism.

1 諸 言

生体中における特異的な分子間相互作用や生体高分子の構造維持に、水素結合が果たす役割は広く知られている。なかでも DNA の特異的な塩基対形成に水素結合が必要であることは周知の事実で、DNA が遺伝情報の担い手として正確に複製、あるいは転写されるのは、まさに水素結合を介した相補的な塩基対形成に起因している。

一般に、水素結合は弱い相互作用と考えられがちであるが、分子間力としては比較的強く ($10 \sim 40 \text{ kJ mol}^{-1}$)、本

質的には静電相互作用を主とするものである¹⁾。また水素結合の重要な特徴は結合の方向性を示すことで、このことがタンパク質や核酸などの巨大分子構造を決める上で特に重要となる。

このような水素結合の特色は、分析試薬を設計する際に大きな魅力であり、精密な分子認識を達成するための不可欠な相互作用の一つと見なすことができる。標的基質に合致した分子間相互作用を選択する必要があることはいうまでもないが、特に核酸塩基類をターゲットとする場合、選択性発現のために水素結合形成をベースとする試薬設計を行うことは、ごく自然なアプローチといえる。実際、DNA 中での核酸塩基間の分子認識のモデル系として多くの報告

¹ 東北大学大学院理学研究科化学専攻: 980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

Fig. 1 Schematic illustration of nucleobase recognition by hydrogen bond forming ligands, in combination with an abasic site (AP site)-containing oligodeoxynucleotide (ODN) duplex

例があり^{2)~9)}, なかには天然の塩基対形成を超える結合定数や選択性を発現する合成化合物も報告されている. しかしながら, これらの化合物の特異性が発現するのは有機溶媒中に限られており, 分析試薬として完全水系へ適用することは極めて困難な状況にあった. 例えば, J. Rebeck, Jr. らは⁶⁾, 1 分子の中に水素結合部位や電荷相互作用部位, 更にスタッキング相互作用部位を組み入れた, いわば合成的アプローチの完成型とも見なせるレセプターを報告しているが, 水中におけるサイクリック AMP (adenosine 2',3'-cyclic monophosphate) との 1 : 1 結合定数は, わずか 660 M^{-1} ($I = 0.05 \text{ M}$) にすぎない. これは, 水和により水素結合形成が著しい妨害を受けるため, ここに水素結合形成を主な駆動力とする合成小分子の大きな限界が存在していた.

一方, DNA あるいは RNA を有機小分子に対する分析試薬として利用する試みがある^{10)~13)}. これらの機能性核酸は, アプタマー (aptamer) と名付けられ¹⁰⁾, アミノ酸¹²⁾ や ATP (adenosine 5'-triphosphate)¹³⁾ に特異的に結合するものなど, 多くの報告例がある. また最近では, 水素結合性の小分子リガンド (ナフチリジン誘導体) により DNA 二重鎖のバルジ構造¹⁴⁾¹⁵⁾ やミスマッチ構造^{16)~18)} を認識しうることが中谷らにより報告された. これら一連の結果は, DNA 二重鎖が水素結合を機能させる疎水場環境を有機小分子に提供することを強く示唆するものである. つまり, DNA 二重鎖が形成する特異的な高次構造を「分析反応場」としてうまく利用すれば, 合成小分子による核酸塩基認識が可能になると期待できる.

本論文では, 分析反応場として DNA 脱塩基部位 (AP sites, apurinic/aprimidinic sites) を利用する水素結合性小分子による核酸塩基認識, 並びにこれを一塩基多型 (SNPs, single nucleotide polymorphisms) の蛍光検出に適用した著者らの研究結果^{19)~21)} を紹介する.

2 実験

2.1 試薬

AMND (2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine) は既報²²⁾ に従い合成した. プテリン (2-amino-4-oxopteridine) は市販品 (和光純薬製, 特級) をそのまま用いた. オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) はカスタム合成 (日本遺伝子研究所製) したものをを用い, その濃度は 260 nm におけるモル吸光係数から算出した²³⁾. 純水は, 一次蒸留水 (Autostill WX 710, ヤマト科学製) を Mill-Q Labo システム (ミリポア製) で処理した超純水 ($18.2 \text{ M}\Omega$, 全有機炭素: 5 ppb 以下) を用いた. その他の試薬は, 市販の特級試薬をそのまま使用した.

2.2 装置及び測定条件

ODN 融解温度 (T_m) 測定は, 光路長 1.0 mm の石英セルを用い, Ultraspec 3300pro 分光光度計 (アマシャムバイオサイエンス製) で測定した. 得られた融解曲線を MeltWin²⁴⁾ により解析し, T_m 値を算出した. また, 蛍光スペクトルは, FP-777W 分光蛍光光度計 (日本分光製) あるいは RF-5300PC 分光蛍光光度計 (島津製) で測定した. CD (circular dichroism) スペクトル測定には, J-820 円二色性分散計 (日本分光製) を使用した. なお, いずれの測定においても, ODN を含む試料溶液はアニーリングしたものをを用いた.

3 本系の検出原理: 脱塩基部位と水素結合性リガンド

本研究で提案する DNA 脱塩基部位を利用する核酸塩基認識の概念図を Fig. 1 に示す. 脱塩基部位は生体内における塩基除去修復過程の中間体として生成することが知られているが²⁵⁾, 本研究では DNA 二重鎖中に意図的に構築

Fig. 2 Structures of fluorescence ligands used in the present study

AMND: 2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine; pterin: 2-amino-4-oxopteridine; A: hydrogen bond acceptor; D: hydrogen bond donor

する。つまり、標的塩基を含む一重鎖 DNA と脱塩基部位を有する一重鎖 DNA をハイブリダイゼーションさせることで標的塩基の向側に疎水場空間を構築させた後、同空間において水素結合性リガンドとの錯形成を行うというものである。蛍光性の小分子リガンドを利用することにより、標的塩基選択的な核酸塩基認識反応を蛍光シグナル変化として簡便かつ迅速に検出できると期待される。

上述した検出システムを達成するためのリガンドとして種々の試薬設計が考えられるが、少なくとも、①核酸塩基選択性を発現しうる水素結合部位を有していること、②蛍光性であること、かつ、③水溶性であることが必要である。著者らは、これらの要件を満たす有機化合物として AMND 及びプテリンに着目した (Fig. 2)。

AMND は蛍光性のナフチリジン誘導体で (pH 7, 励起 $\lambda_{\max}$ 353 nm, 蛍光 $\lambda_{\max}$ 405 nm), シトシンと同様の水素結合様式 (DAA, D: 水素結合ドナー; A: 水素結合アクセプター) を有する。これまでに、2-amino-1,8-naphthyridine を基本骨格とする種々の試薬合成並びに有機溶媒中における核酸誘導体との錯形成挙動が報告されている。また、諸言で述べたように、中谷らは 2-amino-1,8-naphthyridine 誘導体がバルジ塩基やミスマッチ塩基対認識に適用できることを報告している^{(14)~(18)}。しかし、これらの誘導体では、アミノ基がアシル化されているために蛍光性が著しく損なわれており、蛍光試薬として利用するためには、本系のようにアミン構造を維持することが肝要である⁽²⁶⁾。

また、プテリンは葉酸やビオプテリンなどの構成成分で、これらの分解物として尿中に排出される蛍光性化合物である (pH 8, 励起 $\lambda_{\max}$ 353 nm, 蛍光 $\lambda_{\max}$ 450 nm)。シトシンあるいはグアニンと同様の水素結合様式 (DAA あるいは DDA) を有していることから、核酸塩基類似化合

物として人工ヌクレオシド合成⁽²⁷⁾に利用されているほか、最近ではがん診断マーカー⁽²⁸⁾としても注目されつつある。

一方、脱塩基部位についても多彩な構造設計が可能である。ここでは、化学的安定性並びに系のシンプル性を特に考慮し、単に塩基部分が脱離したデオキシリボース構造 (spacer, Fig. 1 参照) を用いた。

4 脱塩基部位における核酸塩基認識

4.1 AMND の認識機能評価

著者らはまず、ODN 融解温度 (T_m) 測定により AMND と核酸塩基との相互作用を評価した。完全相補な ODN 二重鎖と比べて脱塩基部位 (AP site) を含む二重鎖では、その熱力学的安定性が著しく低下することが知られているため、AMND の AP site への挿入の有無を T_m 値の変化として評価できるはずである。つまり、AMND が AP site へ挿入するならば、 T_m 値の増加が期待される。本研究では、AP site が ODN 二重鎖の中央に位置するように設計したモデル ODN 二重鎖 (5'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCYCGTTG-5', X = dSpacer, Y = G, C, A, T) と AMND との相互作用を評価した。また、比較のために、AP site を含まない ODN 二重鎖との相互作用も評価した。

まず、AMND 添加による完全相補な ODN 二重鎖 (5'-TCCAGZGCAAC-3'/3'-AGGTCYCGTTG-5', Z, Y = G, C, A, T) の T_m を測定したところ、有為な変化は観測されなかった。例えば、AMND 添加による 5'-TCCAGGGCAAC-3'/3'-AGGTCCCGTTG-5' 二重鎖の T_m 値の変化はわずか +0.3°C にすぎず、AMND 添加前後における T_m は実験誤差範囲内で一致する。このことから AMND は、多くの多環芳香族化合物 (エチジウムブロマイドなど) で見られるような塩基対間への挿入、いわゆるインターカレーション等により、完全相補な二重鎖とは相互作用しないものと考えられる。一方、次に述べるように、脱塩基部位を含む ODN 二重鎖では、 T_m 値の顕著な増加が観測された。

Table 1 に、AMND 添加による AP site 含有モデル二重鎖 (5'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCYCGTTG-5', X = dSpacer, Y = G, C, A, T) の融解温度 (T_m) 変化を示す。AMND 添加により T_m 値が著しく増加していることが分かる。標的塩基がシトシンの場合、 ΔT_m 値は +13.4°C にも達しており、 ΔT_m (°C) 値の序列は、A (+2.9) < G (+5.0) < T (+10.9) < C (+13.4) である。AP site を含まない完全相補二重鎖ではこのような T_m 値の増加が見られないことから、AMND が AP site へ取り込まれていることは明らかである。更に、 ΔT_m 値が一樣ではなく標的塩基に大きく依存していることから、AMND がシトシンと選択的に錯形成していること、すなわち核酸塩基に対する認識機能の発現が示唆される。

AMND と核酸塩基との相互作用を、更に CD スペクト

Table 1 Melting temperatures of AP site-containing ODN duplexes in the absence ($T_{m(-)}$) and presence ($T_{m(+)}$) of hydrogen-bonding ligands^{a)}

ODN duplex (5'-TCCAG <u>X</u> GCAAC-3'/3'-AGGTC <u>Y</u> CGTTG-5')			Hydrogen-bonding ligands	
X	Y	$T_{m(-)}/^{\circ}\text{C}$	AMND $T_{m(+)} (\Delta T_m)/^{\circ}\text{C}$	Pterin $T_{m(+)} (\Delta T_m)/^{\circ}\text{C}$
G	34.8 ± 0.4	$39.8 \pm 0.2 (+5.0)$	$37.5 \pm 0.2 (+2.7)$
	C	31.6 ± 0.6	$45.0 \pm 0.2 (+13.4)$	$32.5 \pm 0.4 (+0.9)$
	A	34.4 ± 0.1	$37.3 \pm 0.2 (+2.9)$	$34.5 \pm 0.2 (+0.1)$
	T	29.5 ± 0.2	$40.4 \pm 0.2 (+10.9)$	$30.4 \pm 0.1 (+0.9)$

a) [ODN duplex]: 30 μM ; [AMND]: 580 μM ; [pterin]: 290 μM . pH: 7.0 adjusted by 10 mM sodium cacodylate buffer containing 100 mM NaCl and 1.0 mM EDTA. Data are given as averages of at least four measurements.

Fig. 3 CD (circular dichroism) spectra of AP site-containing ODN duplexes (5'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCYCGTTG-5', X = dSpacer, Y = A, C, G, T) in the absence (broken curve) and in the presence (solid curve) of AMND

[AMND]: 72.5 μM ; [ODN duplex]: 30 μM in 10 mM sodium cacodylate buffer solution (pH 7.0) containing 100 mM NaCl and 1.0 mM EDTA

ル測定により検討した。Fig. 3に示したように、標的塩基がプリン塩基 (A, G) の場合にはスペクトル変化が見られないのに対し、ピリミジン塩基 (C, T) の場合にはスペクトル変化が見られることが分かる。特に標的塩基がシトシンの場合、AMND添加によりODN由来のCD強度 (280 nm) が顕著に増加しており、二重鎖構造の秩序性が増していることが示唆される。また、240 nm 付近及び 300~400 nm には、AMNDに帰属される誘起CDバンドが見られることから、AMNDのAP site空間への挿入が示唆される。以上の結果は、 T_m 測定の結果とよく対応しており、AMNDがシトシン選択性を示すことを強く示唆している。

以上の結果を踏まえて、AP site空間におけるAMNDとシトシンとの錯形成挙動をより詳細に検討した。AP site含有ODN二重鎖 (5'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCYCGTTG-5', X = dSpacer) の T_m の、AMND濃度依存性を検討したところ、ODN二重鎖に対してAMNDが一当量存在する場合に T_m の増加がほぼ飽和することが分かった。同様に、ODN二重鎖由来のCDスペクトル変化もAMNDが一当量存在する場合に飽和を示した。これらの

結果は、AP site空間においてAMNDとシトシンが1:1錯体を形成していることを示唆するもので、CD強度 (280 nm) 変化から算出した1:1錯形成定数は、 $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上にも達することが分かった。

蛍光分光法による検討もまた、AMNDとシトシンが非常に強力な1:1錯体を形成していることを示唆するものであった。AMNDは、AP siteを含まない完全相補なODN二重鎖には全く蛍光スペクトル変化を示さないのに対し、AP site含有二重鎖 (5'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCYCGTTG-5', X = dSpacer) に対して著しい蛍光消光を示す (Fig. 4)。また、Fig. 4に示したように、AMNDの蛍光は一当量のODN二重鎖の存在下ではほぼ完全に消光していることが分かる。以上のことから、AP siteにおいてAMNDとシトシンが1:1錯体を形成していること、更に非線形フィッティングにより、その錯形成定数が $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上であることが結論付けられる。

ここで、 $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上という1:1結合定数は、合成小分子試薬で達成した完全水中での核酸塩基認識として特筆に値する。このような強力な結合定数が得られるのは、本系における核酸塩基認識反応が、AMND/シトシン

Fig. 4 Fluorescence spectra of AMND (30 μ M) in the presence of AP site-containing ODN duplex (5'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCCCGTTG-5', X = dSpacer). pH = 7.0 adjusted by 10 mM sodium cacodylate buffer containing 100 mM NaCl and 1.0 mM EDTA

Excitation wavelength: 355 nm. Inset: Fluorescence intensities of AMND (30 μ M) at 405 nm in a titration with AP site-containing ODN duplex (5'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCCCGTTG-5', X = dSpacer).

間の水素結合形成 (Fig. 5 参照) だけでなく, AP site 上下に位置する隣接塩基とのスタッキングによる協同的効果によって達成されているためであると考察している. これは, DNA 構造の安定化における疎水性相互作用, つまり構成塩基間のスタッキング相互作用の役割とよく類似しており, AP site 空間において AMND が, あたかも構成塩基のように挙動しているものと考えられる.

また, AP site における核酸塩基認識反応のもう一つの特徴は, AMND がグアニンではなくシトシンに選択性を示す点である. Fig. 5 に示したように, AMND はグアニン及びシトシンとそれぞれ三点及び二点水素結合形成をしているものと考えられるが, 1:1 錯形成定数は, それぞれ $2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 及び $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上であり, 二点しか水素結合を形成しえないシトシンと, より安定な錯体を形成する. この結果は, 本系における核酸塩基選択性の発現が, 水素結合以外の他の因子, 例えば, 空間的規制や前述したスタッキング相互作用によっても支配されていることを示唆するものである. 実際, 分子力学計算による錯体構造の検討によると, シトシンと錯形成する場合には, AMND が AP site 上下の塩基ときれいに積重 (スタッキング) していることが示唆された (Fig. 6A). これに対し, Fig. 6B に示したように, グアニンと錯形成する場合には, AP site 上下の塩基との積重が不完全なものとなっていることが分かる. このような錯体構造の違いは, おそらく空

Fig. 5 Possible binding structures of the 1:1 complex between AMND and guanine (G) or cytosine (C) bases

間的な規制に起因するものと思われるが, 現在, ^1H NMR や ^{15}N NMR 分光法, あるいは X 線結晶構造解析などを用いたより詳細な検討を進めている.

4.2 プテリンの認識機能評価

AMND の場合と同様に, プテリンの認識機能を評価した. Table 1 に, プテリン添加による AP site 含有 ODN 二重鎖 (5'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCCCGTTG-5', X = dSpacer, Y = G, C, A, T) の融解温度 (T_m) 変化を示す. T_m の増加値は, AP site 向側の標的塩基に依存しており, $A(+0.1^\circ\text{C}) < C(+0.9^\circ\text{C})$, $T(+0.9^\circ\text{C}) < G(+2.7^\circ\text{C})$ の順に大きくなっている. また, AP site を含まない完全相補二重鎖では T_m の増加が見られない ($\Delta T_m = +0.2^\circ\text{C}$, 5'-TCCAGCGCAAC-3'/3'-AGGTCCCGTTG-5'). 以上の結果は, プテリンがグアニンと選択的に錯形成することによって AP site に挿入し, その結果, AP site 含有 ODN 二重鎖の熱力学的安定性が増加したものと解釈できる.

プテリンがグアニン選択性を示すことは, 蛍光分光法による検討でも得られた. Fig. 7A に, ODN 二重鎖添加前後におけるプテリンの蛍光スペクトル変化を示す. プテリンがグアニンに対してのみ蛍光消光を示し, 他の核酸塩基には有為なスペクトル変化を示さないことが分かる. 440 nm における蛍光強度変化から, 非線形フィッティングによりプテリンとグアニンの 1:1 錯形成定数を算出したところ, $1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であった (Fig. 7B).

プテリン/グアニンの 1:1 錯体構造については, AMND の場合と同様に, X 線結晶構造解析などを用いたより詳細な検討を待つ必要があるが, Fig. 8 に示すようなワトソン-クリック型類似の三点水素結合形成をしているものと考えられている.

5 遺伝子変異蛍光検出への適用

以上に述べたように, 脱塩基部位 (AP site) において AMND 及びプテリンは, それぞれシトシン及びグアニンと選択的に錯形成し, かつ蛍光消光を示す. したがって,

Fig. 6 Proposed binding structures of the complexes between AMND and AP site-containing ODN duplexes (5'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCYCGTTG-5', X = dSpacer, Y = C, G), obtained using MacroModel (version 7.2)

The energy minimizations were performed with Amber* force field and GB-SA treatment water for the initial structure of the complex. AMND, cytosine (C) and guanine (G) bases are colored red, blue and green, respectively.

これらの蛍光性リガンドを用いればシトシンあるいはグアニンが関与する一塩基変異を検出できると期待される。以下に、実在配列への適用性評価として、がん抑制遺伝子 p53 の変異検出を行った結果を述べる。

5・1 実在配列（がん抑制遺伝子 p53）中での変異検出

p53 は 393 個のアミノ酸から構成される核タンパク質で、がん遺伝子治療の標的として最も期待されているがん抑制遺伝子である²⁹⁾。p53 変異の約 80% は点変異であり、ヒトゲノム解析センター（Human Genome Center, HGC）³⁰⁾ のデータベースには、2000 を超える点変異が登録されている。本研究では、AMND を P177R (C/G 変異)³¹⁾ に、プテリンを R175H (G/A 変異)³²⁾ に適用した。P177R はシトシンがグアニンに変異するもので、これによりコドン 177 のアミノ酸がプロリン (P) からアルギニン (R) に変化する、いわゆるミスセンス変異である。また、R175H は p53 変異のホットスポットの一つであり、コドン 175 のアミノ酸がアルギニン (R) からヒスチジン (H) に変化するグアニン/アデニン変異である。ここでは、標的 ODN を 11-meric ODN として合成したものを用いた。また、AP site 含有プローブ ODN としては、標的 ODN と相補的な、かつ AP site が標的塩基の向側に位置するように設計したものを用いた。

Fig. 9A に、AMND を P177R 変異検出に適用した際の

蛍光スペクトル応答を示す。変異型 ODN (5'-CTGCCCGC-CACC-3') に対しては蛍光消光が穏やかであるのに対し (spectrum b), 野生型 ODN (5'-CTGCCCGCCACC-3') の存在下では AMND の蛍光が完全に消光していることが分かる (spectrum c)。この実験条件下では、肉眼による明りような C/G 変異判定が可能となる (Fig. 9B)。

プテリンによる G/A 変異 (R175H) の目視検出も可能であることが分かった。Fig. 10 に示したように、プテリンは変異配列 (5'-GAGGCGCTGCC-3') に対して全く蛍光応答を示さず、野生型 (5'-GAGGCGCTGCC-3') に対してのみ蛍光消光する。また、プテリンは P177R (C/G 変異) 検出にも適用できることから、C/G 変異に関しては、プテリンと AMND の併用により対立遺伝子を識別しうることが分かった。

5・2 検出温度

DNA チップなどのハイブリダイゼーションを利用する検出法では、その検出過程において精密な温度制御を必要とする。これは、ハイブリダイゼーションベースの検出法がパーフェクト/ミスマッチ二重鎖間の熱力学的安定性の差 (つまり T_m の差) を利用しているためで、両者の差を明確化するための至適プローブの設計や検出条件の設定が特に重要となる。一方、本手法では、標的 DNA/プローブ ODN 間の二重鎖形成が AP site 形成の必須条件であるこ

Fig. 7 (A) Fluorescence spectra of pterin (15 μM) in the presence of AP site-containing ODN duplexes (60 μM , 5'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCYCGTTG-5', X = dSpacer, Y = A, C, G, T). pH = 7.0 adjusted by 10 mM sodium cacodylate buffer containing 100 mM NaCl and 1.0 mM EDTA. Excitation wavelength: 360 nm. (B) Fluorescence intensity ratios of pterin at 440 nm in a titration with AP site-containing ODN duplex (5'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCYCGTTG-5', X = dSpacer). F and F_0 denote the fluorescence of pterin (15 μM) with and without ODN duplex, respectively. The experimental conditions are identical to those given in Fig. 7A.

と, また, 蛍光性リガンドを用いて塩基選択性を発現させるために, 検出温度に特に留意することなく塩基変異検出を行うことができる。

Fig. 11 に, AMND を P177R 検出に適用した際の蛍光応答の温度依存性を示す。20~50 $^{\circ}\text{C}$ で明りょうな G/C 変異の蛍光識別が可能であることが分かる。AMND が 50 $^{\circ}\text{C}$ 以上でその識別機能を失うのは, ODN 二重鎖が解離するために脱塩基部位空間が形成されないためで, これは AMND 存在下における標的 ODN/脱塩基部位含有プローブ ODN 二重鎖の T_m 値が 50.6 $^{\circ}\text{C}$ であることとよく合致する結果である。したがって, 本手法では, 原理的に検出温度を T_m 値以下に設定すればよく, 厳密な温度制御やプローブ ODN 設計を必要としないことになる。

6 おわりに

本研究では, DNA 脱塩基部位 (AP site) を分析反応場として利用することにより, 有機小分子による水素結合を介した核酸塩基認識が達成できることを明らかにした。これにより, 水素結合形成をベースとする有機小分子の試薬

Fig. 8 Possible binding structure of the 1 : 1 complex between pterin and guanine (G) base

設計が, 有機溶媒中のみならず完全水系においても適用することが示唆された。また, 本系の錯形成モードの大きな特徴は, DNA 二重鎖中の核酸塩基とワトソン-クリック型類似の錯形成反応ができることにある。この点は, アクチノマイシン³³⁾などの DNA 結合試薬の選択性発現が, DNA 二重鎖の副溝面 (あるいは主溝面) の認識に基づいているのとは大きく異なっている。したがって, 選択性発現のための試薬設計がより容易になるばかりでなく, 人工ヌクレオチドとしてプローブ ODN へ導入する必要もないため, 合成的負担が大幅に軽減される。

更に本研究では, 一塩基多型 (SNPs) の蛍光検出法として本系を展開した。従来の蛍光ラベル化の代わりに蛍光性有機小分子を利用し, AP site における標的塩基選択的な核酸塩基認識反応を蛍光シグナル変化として検出する点に本手法の独創性がある。したがって, 本手法では, DNA チップ等で問題となるミスマッチとフルマッチ DNA 二重鎖を識別するための精密な温度制御を必要とせず, 更には検出系に特殊な酵素を用いる必要もない。これらのことから, 本手法は安価かつハイスループットな SNPs 検出法になりうる可能性を秘めている。しかしながら, 今後, 本手法を実用レベルへと発展させるには, 幾つかの課題を克服しなければならない。例えば, PCR 産物の迅速な解析のためには, リガンドの結合定数を $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ レベルにする必要があり, また, すべての対立遺伝子 (アレル) 識別を可能にするためには, 全塩基に対する 4 種類のリガ

Fig. 9 (A) Effect of AP site-containing ODN duplexes (60 μ M, 5'-CTGCCYCCACC-3'/3'-GACGGXGGTGG-5', X = dSpacer, Y = C, G) on fluorescence spectra of AMND (30 μ M): a) ODN duplex free, b) mutation (Y: G), and c) wild type (Y = C). pH = 7.0 adjusted by 10 mM sodium cacodylate buffer containing 100 mM NaCl and 1.0 mM EDTA. Excitation wavelength: 350 nm. (B) Detection of P177R (C/G transversion) based on the changes in fluorescence of AMND. The samples are excited with a UV lamp at 302 nm. The other experimental conditions are identical to those given in Fig. 9A.

ンドを開発する必要がある。

迅速、簡便かつ安価な SNPs 検出法の開発が、個人個人に最適化された「テーラーメイド医療」の実現に向けて重要な研究課題の一つとなっている^{18)34)~41)}。この目標の実現に向けて本研究を進展させたいと考えている。

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金「基盤研究 (A) (2)」(14204074), 「基盤研究 (B) (2)」(13554029), 「若手研究 (B)」(13740417), 21 世紀 COE プログラム「大分子複雑系未踏化学」, 日本学術振興会「日中科学協力事業共同研究」, 及び「未来開拓学術研究」によったことを付記し, ここに謝意を表します。

Fig. 10 Fluorescence detection of R175H (G/A transition) based on the changes in fluorescence of pterin [pterin]: 10 μ M; [ODN duplex]: 100 μ M (5'-GAGGCYCTGCC-3'/3'-CTCCGXGACGG-5', X = dSpacer, Y = A, G). pH = 7.0 adjusted by 10 mM sodium cacodylate buffer containing 100 mM NaCl and 1.0 mM EDTA. Excitation wavelength: 302 nm with a UV lamp

Fig. 11 Effect of temperature on fluorescence of AMND (30 μ M) in the presence of target ODN duplexes (60 μ M, 5'-CTGCCYCCACC-3'/3'-GACGGXGGTGG-5', X = dSpacer, Y = C, G)

pH = 7.0 adjusted by 10 mM sodium cacodylate buffer containing 100 mM NaCl and 1.0 mM EDTA. Excitation wavelength: 302 nm with a UV lamp

文 献

- 1) J. N. Israelachvili: "Intermolecular & Surface Forces", p. 122 (1992), (Academic Press, London).
- 2) A. D. Hamilton, D. Vanengen: *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5035 (1987).
- 3) J. Rebeck, Jr.: *Acc. Chem. Res.*, **23**, 399 (1990).
- 4) M. Inouye, K. Kim, T. Kitao: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 778 (1992).
- 5) M. Abe, J. Otsuki, K. Araki: *Chem. Lett.*, **1993**, 1541.
- 6) Y. Kano, M. M. Conn, J. Rebeck, Jr.: *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 9411 (1994).
- 7) W. T. Bell, Z. Hou, C. S. Zimmerman, A. P. Thiessen: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **34**, 2163 (1995).
- 8) S. Amemiya, P. Buhlmann, Y. Umezawa: *Chem. Commun.*, **1997**, 1027.
- 9) M. Inouye, M. Takase: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 1746 (2001).
- 10) A. D. Ellington, J. W. Szostak: *Nature*, **346**, 818 (1990).
- 11) C. Tuerk, L. Gold: *Science*, **249**, 505 (1990).
- 12) M. Famulok, J. W. Szostak: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3990 (1992).
- 13) F. K. Jiang, R. A. Kumar, R. A. Jones, D. Patel: *Nature*, **382**, 183 (1996).
- 14) K. Nakatani, S. Sando, I. Saito: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2172 (2000).
- 15) K. Nakatani, S. Sando, K. Yoshida, I. Saito: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 335 (2001).
- 16) K. Nakatani, S. Sando, H. Kumasawa, J. Kikuchi, I. Saito: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12650 (2001).
- 17) K. Nakatani, S. Sando, I. Saito: *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 2381 (2001).
- 18) K. Nakatani, S. Sando, I. Saito: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 51 (2001).
- 19) K. Yoshimoto, S. Nishizawa, M. Minagawa, N. Teramae: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8982 (2003).
- 20) K. Yoshimoto, C.-Y. Xu, S. Nishizawa, T. Haga, H. Satake, N. Teramae: *Chem. Commun.*, **2003**, 2960.
- 21) S. Nishizawa, K. Yoshimoto, T. Seino, C.-Y. Xu, M. Minagawa, H. Satake, A. Tong, N. Teramae: *Talanta*, **63**, 175 (2004).
- 22) E. V. Brown: *J. Org. Chem.*, **30**, 1607 (1965).
- 23) J. D. Puglisi, I. Tinoco, Jr.: *Meth. Enzymol.*, **180**, 304 (1989).
- 24) J. A. McDowell, D. H. Turner: *Biochemistry*, **35**, 14077 (1996).
- 25) B. Demole, L. Harrison: *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 915 (1994).
- 26) K. Nakatani, S. Horie, I. Saito: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8972 (2003).
- 27) M. E. Hawkins, W. Pfeleiderer, F. M. Balis, D. Porter, J. R. Knutson: *Anal. Biochem.*, **244**, 86 (1997).
- 28) F. Han, B. H. Huynh, H. Shi, B. Lin, Y. Ma: *Anal. Chem.*, **71**, 1265 (1999).
- 29) J. M. Nigro, S. J. Baker, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, R. Hostetter, K. Cleary, S. H. Bigner, N. Davidson, S. Baylin, P. Devilee, T. Glover, F. S. Collins, A. Weston, R. Modali, C. C. Harris, B. Vogelstein: *Nature*, **342**, 705 (1989).
- 30) <http://www.hgc.ims.u-tokyo.ac.jp/index.html>.
- 31) N. Nishida, Y. Fukuda, H. Kokuryu, J. Toguchida, D. W. Yandell, M. Ikenaga, H. Imura, K. Ishizaki: *Cancer Res.*, **53**, 368 (1993).
- 32) M. S. Morris: *Mutation Res.*, **511**, 45 (2002).
- 33) S. Kamitori, F. Takusagawa: *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4154 (1994).
- 34) M. Chicurel: *Nature*, **412**, 580 (2001).
- 35) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo: *Anal. Chem.*, **72**, 1334 (2000).
- 36) S. Sando, E. T. Kool: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9686 (2002).
- 37) A. Okamoto, K. Tainaka, I. Saito: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7972 (2003).
- 38) M. Komiyama, S. Ye, X.-G. Liang, Y. Yamamoto, T. Tomita, J.-M. Zhou, H. Aburatani: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3758 (2003).
- 39) K. Sato, K. Hosokawa, M. Maeda: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8102 (2003).
- 40) H. Aoki, Y. Umezawa: *Analyst*, **128**, 681 (2003).
- 41) S. Sando, T. Sasaki, K. Kanatani, Y. Aoyama: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 15720 (2003).

要 旨

分析反応場として DNA 脱塩基部位 (AP sites, apurinic/aprimidinic sites) を利用する水素結合性小分子による核酸塩基認識, 並びにこれを一塩基多型 (SNPs, single nucleotide polymorphisms) の蛍光検出に適用した結果を述べる. 脱塩基部位は生体内における塩基除去修復過程の中間体として生成することが知られているが, 本研究では DNA 二重鎖中に意図的に構築し, これを分析反応場として利用する. つまり, 標的塩基を含む一重鎖 DNA と脱塩基部位を有する一重鎖 DNA をハイブリダイゼーションさせることで標的塩基の向側に疎水場空間を構築させた後, 同空間中において水素結合性リガンドとの錯形成を行うというものである. 水素結合性リガンドとして AMND (2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine) 及びプテリン (2-amino-4-oxopteridine) の錯形成挙動を評価したところ, いずれのリガンドも著しい蛍光消光を伴って, それぞれシトシン ($K_{11} > 1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) 及びグアニン ($K_{11} = 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) を強力かつ選択的に認識しうることを見いだした. また, 本系をがん抑制遺伝子 p53 の一塩基多型の蛍光検出に適用したところ, AMND によるシトシン/グアニン変異, 及びプテリンによるグアニン/アデニン変異検出が可能であることを明らかにした.