

学位論文の要約

題 目 Fluorescent Nucleoside Analogues for Detection of Nucleic Acids, Their Microenvironment, and Evaluation of Enzymatic Incorporation

(蛍光性ヌクレオシドアナログによる核酸およびその周辺環境の検出と酵素的取り込みの評価)

氏名 熊谷 智孝

序論

DNA や RNA は遺伝情報の保存・伝達を担い、その高次構造やタンパク質との相互作用は遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしている。このような核酸の動態を検出するために、化学修飾を施すことで蛍光特性を持たせた蛍光ヌクレオシドの研究が進められてきた。蛍光ヌクレオシドは、高次構造形成の検出や一塩基多型の識別、細胞内での核酸のイメージングなど多岐にわたる応用が報告されている。近年では、蛍光ヌクレオシドに様々な機能を持たせることで、核酸周辺のより微細な環境変化を検出することを目的とした研究が行われている。本研究では、そのような機能性蛍光ヌクレオシドの一つとして、蛍光分子ローターの機能を持たせることで、核酸周辺環境の微細な変化を鋭敏に検出することを目的とした分子ローター型蛍光ヌクレオシドを開発し、その物性を評価した。さらに、発色団のドナー部位の構造を変えた誘導体を合成し、ドナー強度の違いが蛍光物性に及ぼす影響を検討した。また、これらの蛍光ヌクレオシドを三リン酸化し、DNA ポリメラーゼによる酵素的取り込みについても評価した。

Thiophene-Extended Fluorescent Nucleosides as Molecular Rotor Type Fluorogenic Sensors for Biomolecular Interactions

分子ローターとしての機能を付与するため、*N,N*-ジメチルアニリンとチオフェンからなる発色団を C=C に二重結合を介してチミジン骨格の C5 位に導入した蛍光性チミジンアナログ **ThexT** と 2'-*O*-メチルウリジンアナログ 2'-*OMe*-**ThexU** を新たに設計・合成した。これらの蛍光ヌクレオシドは有機溶媒中で強い蛍光を示し、溶媒粘度に応答した蛍光増加を示したことから、分子ローターとしての機能が確かめられた。また、この性質は量子化学計算においても支持された。**ThexT** は DNA に組み込まれた際にも、分子ローターとしての機能を維持しており、周囲の粘度変化や核酸の高次構造に鋭敏に応答した蛍光を示すことが確かめ

られた。この特性を利用し、**ThexT** と 2'-OMe-**ThexU** を Z-DNA (RNA) に組み込むことで、Z 型核酸結合タンパク質である **Zα** との相互作用をその蛍光の変化から検出することに成功した。

A Variation in Thiophene-Expanded Nucleosides as Microenvironment-Sensitive Fluorescent Probes

前章で開発した **ThexT** は分子ローター型蛍光ヌクレオシドとして機能したが、プロトン性極性溶媒中での消光や、粘度などに応答した際の蛍光強度の増加率に課題があった。そこで、本章では **ThexT** の合成の簡便性や、その調整可能な骨格に着目し、ドナー部位であるジメチルアミノ基をメトキシ基やモルホルル基に置換した誘導体を合成した。これにより、ドナー部位の違いが蛍光物性に及ぼす影響を検討するとともに、前述の課題の克服を試みた。メトキシ基を有した誘導体 (**aniThexT**) は、メタノールや水中での消光が抑えられ、DNA に組み込まれた際にも、強い蛍光強度を維持していた。一方、モルホルル基を導入した誘導体 (**mopThexT**) は、溶媒の粘度変化に対してより高い蛍光応答性を示すことが確かめられた。さらに本章では、**ThexT** とその誘導体を、ヌクレオリンを標的とする G4 DNA アプタマーに組み込むことで、そのヌクレオリンとの相互作用を蛍光強度の変化として特異的に検出できることを示した。加えて、ヌクレオリンががん細胞表面に過剰発現することから、**ThexT** およびその誘導体で修飾したアプタマーを用いることで、がん細胞をイメージングすることにも成功した。

Enzymatic Incorporation of Thiophene-extended Nucleotides and Real-Time Monitoring of Primer Extension Process

これまでに開発された **ThexT** やその誘導体は固相合成法を用いる化学的手法によって DNA に組み込まれてきた。この方法は、**ThexT** などの修飾ヌクレオシドを組み込んだ DNA を合成するうえで有用である一方、長鎖 DNA の合成や複数の修飾ヌクレオシドの導入には課題が多く、多くの有機溶媒を必要とする。そこで、本章ではこれに代わる方法として、DNA ポリメラーゼを用いた **ThexT** やその誘導体の酵素的取り込みについて検討を行った。この方法では、長鎖 DNA に対しても修飾ヌクレオシドを配列特異的に複数個所へ導入できる可能性が期待される。本章ではまず、DNA ポリメラーゼの基質となる **ThexT** やその誘導体の三リン酸を合成し、その物性を評価した。その後、一塩基伸長反応や、プライマー伸長反応、PCR を用いて、これらの三リン酸アナログの取り込みにおける選択性や効率を検証した。さらに、**ThexT** の分子ローターとしての機能を活用することで、DNA ポリメラーゼによるプライマーの伸長過程を、蛍光強度変化としてリアルタイムにモニタリングすることにも成功した。