

学 位 論 文 の 要 旨

Development of New Fluorogenic OligoDNA Probes Utilizing Silylated Fluorescent Material

(シリル化された蛍光物質を用いた新規な蛍光発光性オリゴ DNA プロブの開発)

氏 名 Jakir Ahmed Chowdhury 印

Fluorescence labeled oligonucleotide probe is remarkably important as a tool in modern life science for medical diagnostics and genetic studies. Until date, there are many reports on fluorescent oligonucleotide probes for the detection of specific gene through the binding to complementary region of the target oligonucleotide. One of the most useful probes for the detection of nucleic acid is a so-called molecular beacon (MB) probe. MB probe undergoes a close to open conformational change in the absence and presence of target oligonucleotide with simultaneous characteristics changes in its fluorescent intensities. Traditional molecular beacon probe forms a stem-loop structure and doubly end-labeled with a fluorophore and a fluorescence quencher. The stem structure brings the fluorophore and quencher in close proximity allowing energy to be transferred directly from the fluorophore to the quencher. When the probe meets a target oligonucleotide (DNA or RNA) molecule, the stem-loop structure is resolved into a linear probe-target complex that is longer and more stable than the stem hybrid of MB probe itself. As a result of this conformational rearrangement, the fluorophore and the quencher move apart from each other, restoring fluorescence emission. Since the first invention of MB probe by Tyagi *et al*, many approaches of improvements on the molecular design and development of new types of molecular beacon have been reported.

Meanwhile, our research group has developed a novel silylated pyrene derivative possessing dimethylsilyl function with modifiable terminal group as a new labeling agent of biological substances such as oligoDNA and lipids. The compound is more advantageous as a fluorescent labeling agent compared to original pyrene since it exhibits enhanced (more than 2 times) fluorescent quantum yield along with the bathochromic shift in both absorption and emission, due to the Si-associated σ - π interaction. Once the derivative is incorporated into 5'-terminus of DNA molecule, however, the fluorescence signal of the derivative is severely quenched by neighboring nucleobase including thymine, cytosine and guanine because of the photoinduced electron transfer. Utilizing these unique features of silylated pyrene molecule, I have prepared a series of novel pseudo-dumbbell type molecular beacon probe without end labeled-quencher molecule.

The probes have several unique features as follows; the probes have a large loop-portion consisting of 15 nucleotide units expected to act as the binding portion to an oligonucleotide having complementary sequence. The small loop-portion as well as the short stem-portion are expected to put the silylated pyrene of the 5'-terminus to the proximal position of the

quencher nucleotide (C) at 3'-terminus. In the stem-portion, natural T residues are substituted with C-5 polyamine-bearing deoxyuridine residues (U). The polyamine-bearing deoxyuridine is effective to increase thermal stability of the duplex involved.

In the study, I found that the **Probe 1** having 5-bp stem with 3 polyamine-bearing deoxyuridine residues gives only a weak fluorescence signal while it stays alone in near physiological conditions. Whereas, the signal substantially increases upon binding to the complementary DNA with the loop portion. Thus, the probe possesses target-detecting ability in terms of its characteristic change on fluorescence signal. An experiment using a reference probe which does not have polyamine-bearing deoxyuridine residues revealed that the fluorescence quenching mentioned above was not effective as the case of **Probe 1**.

Based on these findings, I further designed and synthesized four related pseudo-dumbbell type probes (**Probe 2~Probe 5**) to investigate the mechanism of emission and quenching on silylated pyrene for the development of effective fluorescence probe. As the results, I found that there is some tendency between the efficiency of the fluorescence quenching and the thermal stability of the stem-portion of the probes. The higher thermal stability of the stem-portion brings about more efficient quenching. Meanwhile, substitution of one polyamine-bearing deoxyuridine residue in front of the silylated pyrene with an deoxyuridine derivative having anthraquinone moiety at its C-5 position (**Probe 3**) resulted substantial enhancement of the thermal stability of the stem as well as the effective quenching of the fluorescence signal. At the same time, an experiment using **Probe 5** having the identical modification as **Probe 3** but lacking 3'-terminal deoxycytidine revealed that the effective quenching observed in **Probe 3** is mainly due to the presence of anthraquinone moiety.

On the other hand, these probes also gave fluorescence signal under the presence of the target oligonucleotides having one-base alternation at various position of the complementary region to the loop-portion of the probes. However, the signal was much weaker compared to that of the probes under the presence of the fully complementary target. The finding indicates that these pseudo-dumbbell type probes would have the ability to detect a single mutation in genome in terms of the fluorescence signal.

As described above, I found that the newly developed pseudo-dumbbell type probes would be useful and practical probes to detect certain gene fragment in solution, in terms of the characteristic change on their fluorescence signal. In addition, the probes could also be used as the tool to detect one-base mutation on certain genome sequence. These findings are quite useful and variable for further development of safe and easy-handling sequence-specific probe to detect oligonucleotide in solution.

(和訳)

蛍光標識化されたオリゴ核酸プローブは、現代の生命科学における医学的な診断や遺伝学研究のための非常に重要なツールである。今日に至るまでに、標的核酸の相補的な部分に結合する事で特異的な遺伝子検出を可能にする様々な蛍光標識化核酸プローブに関する報告がなされている。核

酸検出における最も有用なプローブの例の一つとして、所謂“モレキュラービーコンプローブ (MB プローブ) “を挙げる事ができる。MB プローブは標的となる核酸の非存在状態から存在状態への変化によって、環状閉鎖型から開環型へと構造上の変化を起こし、さらにそれに伴って蛍光強度が特徴的に変化する。伝統的な MB プローブは両末端にそれぞれ蛍光剤及び消光剤が結合しており、さらにステム・ループ構造を形成する。ステム構造の形成により蛍光剤は消光剤と近接して存在する事になり、蛍光剤から消光剤への直接的なエネルギー移動を可能とする。一方、MB プローブはそのループ部分に相補的な標的オリゴ核酸分子 (DNA あるいは RNA) が存在すると、MB プローブ自身のステム部分よりも熱安定性の高い、より長鎖長の標的鎖・プローブ複合体を形成し、同時にステム構造は解消する。このような特徴的な構造上の変化によって、蛍光剤と消光剤はお互いに離れ、蛍光発光が回復する。Tyagi らによる最初の MB ビーコンに関する報告以来、その分子デザインや新たなタイプの MB プローブの開発に関する研究が、多くの研究者らにより精力的に行われている。

一方、これまでに申請者らの研究グループは、オリゴ核酸や脂質などの生体関連化合物を標識化できる新たな蛍光標識化剤として、修飾可能な官能基を持つ、シリル化された新規なピレン誘導体を合成している。このような化合物は特徴的な σ - π 相互作用によって、ピレンそのものに比べて蛍光量子収率が 2 倍以上に増強されているだけでなく、吸収や発光波長の長波長化など、様々な利点を持つ事が明らかになっている。しかしながら、このようなシリル化されたピレンをオリゴ DNA の 5'-末端に導入すると、チミン、シトシン、グアニン等の隣接する核塩基との光励起電子移動作用によって、その蛍光が顕著に消光される事も明らかとなった。

今回申請者は、このようなシリル化ピレン分子の特徴的な性質を応用し、ステム・ループ構造を持つものの、末端部分に消光剤を用いない一連の新たな pseudo-dumbbell 型 MB プローブの開発を目指した。これらの新たな MB プローブは以下の様な特徴を持つ；本プローブは 15 塩基からなり、相補的な標的オリゴ核酸に対する結合サイトとして機能することが期待される大きなループ部分を持つ。小さなループ部分と短いステム部分は、3'-末端に位置してシリル化ピレンに対する消光剤として機能する事が期待される C 残基が、5'-末端に導入したシリル化ピレン残基と近接できるよう働く。ステム部分には、天然型のチミジン残基に換えて、これまでに核酸二重鎖の熱安定性を向上させることが知られている、C-5 位にポリアミン分子を持つデオキシウリジン誘導体を導入している。

先ず、3 つのポリアミン修飾デオキシウリジン誘導体を含んだ、5 塩基対からなるステム部分を持つ **Probe 1** では、標的オリゴ DNA が存在しない場合、5'-末端に結合したシリル化ピレンの蛍光が顕著に消光されることを見いだした。一方で、15 塩基からなる大きなループ部分に相補的な標的オリゴ DNA の存在下ではその蛍光が顕著に増加し、標的鎖の存在を蛍光変化によって検出できる能力を持つプローブである事を見いだした。さらに、ステム部分に修飾デオキシウリジンを持たない参照プローブでは、**Probe 1** に比べて標的鎖非存在下における消光が効果的ではない事も確認された。以上の成果を元に、このようなプローブの機能向上やその消光・発光メカニズムの解明を目指して、4 種の新たな pseudo-dumbbell 型 MB プローブ (**Probe 2~Probe 5**) を合成し、その蛍光挙動並びに熱安定性等について詳しい解析を行った。その結果シリル化ピレンの消光の効率は、ステム部分の熱安定性と一定の相関が有り、ステム部分の熱安定性が高い程シリル化ピレンは効率よく消光されることが認められた。さらに、ステム中のシリル化ピレンに向き合う位置に、インター

カレーターであり、かつ蛍光消光作用を持つアントラキノン分子を 5-位に結合されたデオキシウリジン残基を導入すると (**Probe 3**)、ステム部分の熱安定性が向上するだけでなく、標的鎖非存在下におけるシリアル化ピレンの蛍光が非常に高効率で消光される事を見いだした。また、3'-末端に消光作用を殆ど示さないデオキシアデノシン残基を持ち、一方、**Probe 3** と同様にアントラキノン結合デオキシウリジン残基をステム中に持つ **Probe 5** を用いた実験により、**Probe 3** における顕著な消光は、その殆どはアントラキノン分子の作用による事も明らかにした。

さらに、1 塩基ミスマッチを導入した標的鎖を用いた一連の実験から、プローブがこれらと形成する複合体の蛍光シグナルが、完全に相補的な標的鎖に比べて顕著に低下していることも見いだした。このことは、今回申請者が開発した新たなプローブは、標的鎖中の一塩基ミスマッチの存在を蛍光シグナル強度によって明らかにする事ができる可能性を持つ事を示している。

申請者らは以上の研究により、**pseudo-dumbbell** 構造を持つ特異な **MB** プローブが、その蛍光シグナル変化により、溶液中で標的オリゴ核酸の存在を示す事ができるだけでなく、標的鎖中の一塩基変異の存在についても識別できる能力を持つことを明らかにした。これらの結果は簡便で安全な新たな核酸検出プローブの開発に向けての重要な知見であると言える。