

博士論文

生体分子の簡易検出を目指した凝集誘起発光色素
ラベル化プローブの開発と検出メカニズムの解明

甲南大学大学院 フロンティアサイエンス研究科 生命化学専攻

河村 浩司

目次

第1章 序論	1
1.1 がんとアルツハイマー病 (AD) の現状と各疾患におけるバイオマーカー	2
1.2 がんとテロメア	5
1.3 テロメラーゼ活性測定法	6
1.4 蛍光プローブによる DNA の検出	9
1.5 AD と A β ペプチド	10
1.6 A β ペプチドの測定法	12
1.7 凝集誘起発光 (AIE) 色素およびセンサー分野における AIE 色素の応用例	13
1.8 本研究の目的	14
1.9 参考文献	15
第2章 FRET を利用した新規なテロメラーゼ活性測定法の開発	20
2.1 実験操作	22
2.1.1 UV 測定による DNA および蛍光プローブの濃度決定	22
2.1.2 非変性 PAGE	23
2.1.3 CD スペクトル測定用サンプルの調製	23
2.1.4 蛍光測定用サンプルの調製と測定条件	23
2.1.5 異なる鎖長のテロメア DNA を含有するサンプルの調製と測定条件	24
2.1.6 K ⁺ 及び Mg ²⁺ 含有緩衝溶液を用いたサンプルの調製と測定条件	24
2.1.7 HeLa extracts (5 \times 10 ³ cells/ μ L) の調製	25
2.1.8 TRAP assay およびテロメア伸長反応	25
2.1.9 テロメラーゼ伸長反応後のサンプル調製と蛍光測定	26
2.2 結果と考察	27
2.2.1 CD スペクトルの測定	27
2.2.2 PAGE による DNA の構造解析	27
2.2.3 蛍光測定	28
2.2.3 a) テロメア鎖長の違いによる蛍光消光率の変化	28
2.2.3 b) テロメア DNA 濃度の違いによる蛍光消光率の変化	30
2.2.3 c) テロメア混合物およびそれぞれの濃度における蛍光消光率の変化	31
2.2.4 HeLa 細胞のテロメラーゼ活性評価	32
2.2.4.1 K ⁺ および Mg ²⁺ イオンによる蛍光消光率への影響	32

2.2.4.2	TRAP assay による HeLa 細胞中のテロメラーゼ活性の確認	33
2.2.4.3	HeLa extracts を用いた新規測定法によるテロメラーゼ活性測定	34
2.3	結論	35
2.4	参考文献	36
第3章 AIE 色素ラベル化 DNA プローブを用いたテロメア DNA 検出法の開発		37
3.1	実験操作	39
3.1.1	TICT 型 AIE 色素 (TPA-COOH) の合成	40
3.1.2	Fmoc-Acp-phosphoramidite monomer の合成	41
3.1.3	DNA の固相合成及び AIE 色素のラベル化	41
3.1.4	AIE-DNA probe の HPLC 精製	42
3.1.5	AIE-DNA 蛍光測定用サンプルの調製	44
3.1.6	蛍光増大率の算出	45
3.2	結果と考察	45
3.2.1	TPA-DNA プローブの TICT による蛍光消光	45
3.2.2	反復配列 DNA を用いた TPA-DNA プローブの蛍光増大メカニズムの解明	46
3.2.3	蛍光増大に対する DNA の立体障害の影響	48
3.2.4	蛍光融解曲線解析による蛍光の温度依存性	50
3.2.5	DNA 濃度の変化による蛍光増大への影響	51
3.2.6	他の二重鎖 DNA 存在下におけるテロメア DNA の定量	52
3.3	結論	53
3.4	参考文献	53
第4章 AIE 色素ラベル化 PNA プローブを用いたテロメア DNA 検出法の開発		55
4.1	実験操作	57
4.1.1	TPE-CHO の合成	58
4.1.2	TPE-CN-COOH の合成	59
4.1.3	Fmoc 固相合成法による PNA の合成及び AIE 色素のラベル化	60
4.1.4	AIE-PNA probe の HPLC 精製	60
4.1.5	AIE-PNA 蛍光測定用サンプルの調製	61
4.2	結果と考察	61
4.2.1	水及び水/ACN 混合溶媒中での AIE-PNA プローブの蛍光スペクトル測定	61
4.2.2	DLS 測定によるナノ粒子形成の確認	62

4.2.3	AIE-PNA プローブの二重鎖形成時及び非形成時の蛍光測定	63
4.2.4	AIE-PNA プローブによる DNA 高次構造の識別	64
4.2.5	AIE-PNA プローブによるテロメア DNA の定量	64
4.2.6	蛍光消光に対するテロメア鎖長の影響	65
4.3	結論	66
4.4	参考文献	67

第5章 AIE 色素ラベル化ペプチドを用いた簡便なアミロイドベータ (A β) 検出法の開発

		68
5.1	実験操作	69
5.1.1	TPE-CHO の合成	69
5.1.2	Py-C5-COOH の合成	69
5.1.3	TPE-Py の合成	70
5.1.4	Fmoc 固相合成法による AFPP の合成及び AIE 色素のラベル化	71
5.1.5	AIE-AFPP の HPLC 精製	72
5.1.6	Amyloid- β (1-40) の調製	72
5.1.7	Amylin の調製	73
5.1.8	AIE-AFPP 蛍光測定用サンプルの調製	73
5.2	結果と考察	74
5.2.1	CD スペクトル測定による AIE-AFPP の初期構造及び β -シート構造形成の確認	74
5.2.2	時間経過による蛍光強度変化	75
5.2.3	AIE-AFPP を用いた A β の定量	75
5.2.4	A β 及び Amylin サンプルにおける蛍光強度の比較	78
5.3	結論	78
5.4	参考文献	79

第6章 本研究のまとめ

謝辞

公表論文、学会発表、招待講演リスト

第1章 序論

蛍光色素は有機 EL などの発光デバイス分野だけではなく、種類の豊富さ、多彩な蛍光波長（紫外領域～近赤外領域）、高感度センサーへの応用、簡便性などの観点から汎用性が高く、医療分野においても必要不可欠なものとなっており、特に、蛍光プローブによるセンシング技術やイメージング技術は大きく発展してきた。蛍光色素の中でも、500 nm 以上に吸収・蛍光極大を有し、輝度（モル吸光係数×蛍光量子収率）が高いフルオレセイン^{1), 2)}やローダミン^{2), 3)}、シアニン^{2), 4)}、ボロンジピロメテン (BODIPY: Boron dipyrromethene)^{2), 5)}などの各種誘導体は、生体試料由来の自家蛍光による影響を抑えつつ、検出感度も高いことから現在使用または市販されているプローブの大半を占めている。しかしながら、現在においても新規な蛍光色素が開発されて続けている。これは、汎用されている蛍光色素がどのような場面においてもその能力を十分に発揮できるわけではないことに起因している。汎用されている蛍光色素において最も懸念される事象が濃度消光であり⁶⁾、例えばプローブが集積することによって濃度消光が起こる可能性が考えられる。生体内で生成されるバイオマーカーは局所的に濃度が高くなるケースが存在し、典型的な例としてアルツハイマー病 (AD: Alzheimer's Disease) のバイオマーカーである Amyloid- β ペプチドが挙げられる⁷⁾。このペプチドは、線維化（凝集）する性質があることから汎用的な蛍光色素の利用は適していない。従って、蛍光色素の可能性を拡張、発展させるためには、従来の蛍光色素が抱える欠点を解消する必要がある、これまでにない性質を有する蛍光色素の開発、または、従来の蛍光色素では成し得なかった新規な方法論の開発が必須である。

本研究では、医療（診断）分野における蛍光色素の応用範囲を拡張することをテーマとし、従来の蛍光色素では適用が制限されるバイオマーカーの検出法を開発を検討した。従来の蛍光色素の利用が困難な疾患の中で、申請者は社会的に大きな問題となっているがんと AD の2つの疾患を主たるターゲットとして選択した。これらの疾患は、数ある疾患の中でも早期診断技術の開発が最も望まれているものである。安価・簡便・高感度・ハイスループットな新規診断技術の開発によって定期健康診断レベルでの検査が可能になれば、これら疾患の早期発見による死亡率の低下や根治治療に大きく貢献することができる。がん及び AD を診断するためには、反復配列 DNA や線維化ペプチドを検出する方法を開発しなければならない。そこで、これらの疾患の診断に最適な性質を有する蛍光色素として凝集誘起発光 (AIE: Aggregation-Induced Emission) 色素⁸⁾に着目した。汎用されている蛍光色素は希薄条件下で強い蛍光を示し、高濃度条件下では濃度消光により蛍光は弱くなる。一方、AIE 色素は希薄溶液中では無蛍光または弱蛍光であるが、高濃度条件下では著しく蛍光強度が増大する。この性質は、蛍光色素の分子内回転運動の可否が関与しており、“結合”や“凝集”に伴い蛍光色素の分子内回転が抑制されると蛍光シグナルが得られる。従って、複数結合サイトが

ある反復配列 DNA や凝集ペプチドの検出において AIE 色素は潜在的な能力を十分に発揮できると考えた。しかしながら、従来の蛍光プローブと比較して AIE 色素ラベル化プローブの報告例は少なく、優れた蛍光プローブの開発には、プローブの挙動やターゲット分子の検出メカニズムの解明が必要である。また、プローブの挙動や検出メカニズムの解明によって得られた知見は、がんや AD だけではなく、汎用的な蛍光色素の適用が制限される他の疾患の診断法を開発する上でも重要なものとなる。ゆえに本研究では、[新規診断法の開発と AIE 色素ラベル化プローブに関する知見を得ることを目的とし、1\) がん診断のための AIE 色素ラベル化プローブの合成と物性評価、2\) AD 診断のための AIE 色素ラベル化プローブの合成の物性評価](#)、以上の 2 点を検討した。まず第 1 章では、がんや AD の現状と既存の各バイオマーカー検出法、そして AIE 色素について述べる。

1.1 がんとアルツハイマー病 (AD) の現状と各疾患におけるバイオマーカー

1981 年以降、日本では死因別死亡率で悪性新生物 (がん) が第 1 位となり、それ以降現在に至るまで死因別死亡率で第 1 位となっている⁹⁾。また、アルツハイマー病 (AD) などの認知症患者も近年増加傾向にあり¹⁰⁾、早期診断技術の発展によるこれら疾病の早期発見が死亡者数の減少や根治治療、症状の進行を遅らせることにおいて最も重要である。例えば、がんの場合、医療技術の発展により初期の段階でがんを発見することができれば完全に治癒することも可能となっている。しかしながら、初期でない場合は、根治治療は困難かつ生存率も低下する。また、抗がん剤は副作用が強いために患者への肉体的、精神的及び金銭的にも負担が大きいことから早期発見による患者への負担軽減が求められる。一方、AD の場合、これまでに開発された治療薬はアセチルコリンエステラーゼ阻害剤、あるいは NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) 型グルタミン酸受容体阻害剤のいずれかであり、これらの薬は進行を遅らせることしかできないため、早期発見による治療薬の効果的な処方が必要である。AD を含む認知症は、患者のみならず家族または介護者にもストレス等の精神的な影響が懸念されており、QOL (Quality of Life) の向上において最も弊害のある疾病の一つと考えられる。

非侵襲的な病気の診断には、画像化あるいはバイオマーカーが利用されることが多い。前者の例としては、汎用されている MRI (Magnetic Resonance Imaging) や CT (Computed Tomography) に加え PET (Positron Emission Tomography)、イメージング用蛍光プローブなどがある。PET は陽電子 (ポジトロン) 放出核種 (^{11}C , ^{18}F , ^{64}Cu など) でラベル化した生体分子あるいは有機低分子化合物をプローブとして用いる手法であり¹¹⁾、PET プローブを生体内に導入すると、生体分子は代謝され生体内の各組織にプローブが集積する。例え

ば、がんの診断には ^{18}F でラベル化した ^{18}F -FDG (Fluorodeoxyglucose) がよく用いられている¹²⁾。 ^{18}F -FDG は、グルコースのアナログとしてヘキソキナーゼによりリン酸化されて ^{18}F -FDG-6-リン酸 (^{18}F -FDG6P) となり細胞内に蓄積する (Fig. 1-1)¹³⁾。がん細胞では細胞分裂が活発に行われるため、多量の ATP (Adenosine triphosphate) が必要となる。従って、多量のグルコースが消費され、結果とし

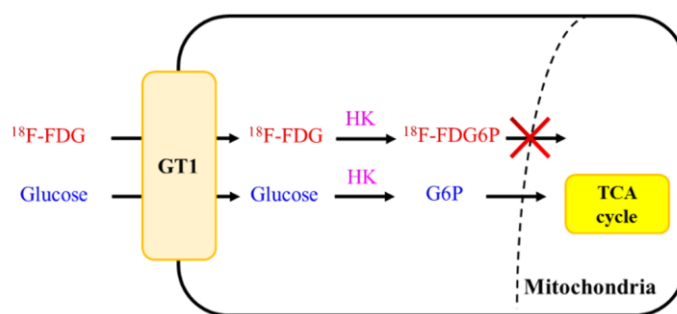


Fig. 1-1 Schematic illustration of ^{18}F -FDG in tumor cells. ^{18}F -FDG6P: ^{18}F -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose-6-phosphate, HK: hexokinase, GT1: glucose transporter 1.

てがん細胞に多くの PET プローブが蓄積する。この PET プローブから放出される放射線量を画像化することで、ガンの有無の判別やがん化した部位を容易に発見することができる。

AD の診断の場合では、アミロイド線維に結合する ThT (Thioflavin T)¹⁴⁾ のアナログである Pittsburgh Compound-B (PIB) が標準的な診断薬として利用されている¹⁵⁾。PIB はピッツバーグ大学の W. E. Klunk らによって開発された化合物で、陽電子放出核種として ^{11}C が使用されている (Fig. 1-2)。アミロイド線維を形成するアミロイドベータ ($\text{A}\beta$: Amyloid beta) ペプチドは AD の早期診断のバイオマーカーとして有力視されており、PET によるアミロイド線維の可視化技術は $\text{A}\beta$ の蓄積や AD の発症の関係を明らかにする上で重要である。しかしながら、PET による画像化診断の欠点として装置が大型で 1 回の測定のコストが高いことや、 ^{11}C と ^{18}F の半減期がそれぞれ 20.4 分、110 分と短いことが挙げられる¹⁶⁾。短寿命の核種を用いることから、放射性核種をラベル化する施設に近接している病院などでしか検査が行えないという問題がある¹⁷⁾。

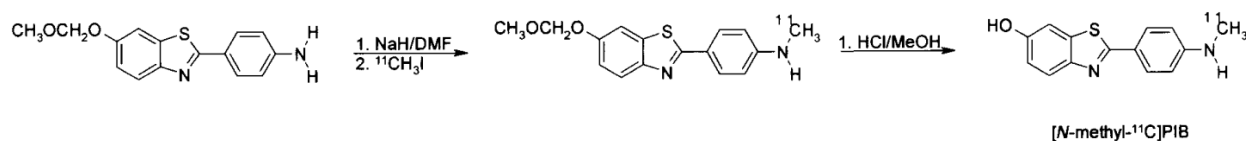


Fig. 1-2 Synthetic scheme of PIB with ^{11}C as a positron-emitter⁷⁾.

画像化診断と比較して、より簡便かつ安価で検査場所を限定しない手法がバイオマーカーによる診断である。バイオマーカーによる診断は画像化診断のように腫瘍部位やアミロイド形成部位の可視化は困難であるが、大型の装置が不要であり、放射性核種を取り扱う際に問題となる半減期等も考慮する必要がない。さらに、一度に多くの検体を検査することが可能であり、そのことが安価な診断に繋がっている。

腫瘍マーカーとしては AFP (α -fetoprotein) をはじめ、CEA (Carcinoembryonic antigen)、p53 抗体などがある (Table 1-1)¹⁸⁾。腫瘍マーカーによる検査は、病院内での検査あるいは病院に近接していない検査施設でも検査が可能である。しかしながら、腫瘍マーカーの多くは特異的にがん細胞のみで高い値を示すのではなく、正常細胞においても高い値を示す可能性がある¹⁹⁾。また、各腫瘍マーカーの陽性率も高くないために複数のマーカーを調べて総合的に判断されなければならない (Fig. 1-3)²⁰⁾。さらに、がんの早期段階で検出可能な腫瘍マーカーの種類は限定されており、ある程度進行したがん組織の検出のみが可能であるという問題点がある。そこで、新規な腫瘍マーカーとして注目されているのがテロメラーゼ (Telomerase) と呼ばれる酵素である。テロメラーゼは正常細胞中ではほとんど発現していないが、がん細胞で特異的に (80-90%程度) で発現しているため既知の腫瘍マーカーに替わる新規なマーカーとして期待されている。

Table 1-1 Type and location of tumor markers²¹⁾.

腫瘍部位	代表的な腫瘍マーカー
食道がん	SCC*、p53 抗体
肝臓がん	AFP、PIVKA-ii*
胃がん	CEA、STN*
乳がん	CEA、CA-125*、CA15-3*、NCC-ST-439
大腸がん	CEA、NCC-ST-439、STN

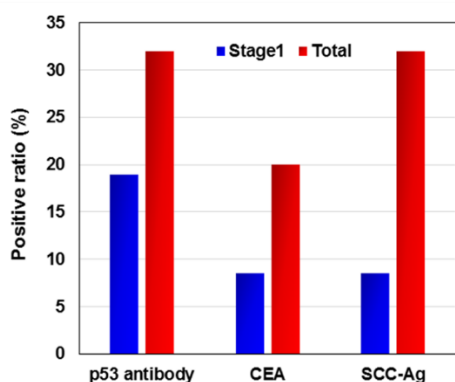
*SCC: Squamous cell carcinoma antigen

*PIVKA-ii: Protein induced by vitamin K absence or antagonist-2

*STN: Serial Tn antigen

*CA: Carbohydrate antigen

*NCC-ST: Nation Cancer Center-Stomach



	p53 antibody	CEA	SCC-Ag
Stage 1	11/57 (19%)	4/47 (8.5%)	4/47 (8.5%)
Total	108/337 (32%)	50/249 (20%)	80/249 (32%)

Fig. 1-3 Tumor markers and positive ratio at stage1 or total²⁰⁾.

一方、AD の場合は、前述のように A β がバイオマーカーとして有力視されている。これは、認知症の各種症状があらわれる時期よりも早期、すなわち認知症の発症前の段階で A β 量が増加することが理由として挙げられる (Fig. 1-4)²²⁾。測定には、A β 量の多い脳脊髄液 (Cerebrospinal Fluid : CSF) を採取して行うことが理想的である²³⁾。しかしながら、CSF の採取には腰椎穿刺を行うため、危険性が高く、より低侵襲な方法により A β 量を測定する技術が求められる。そこで、低侵襲な手法として血液サンプルを採取し、血中 (または血漿中) の A β 量を測定する手法の開発が望まれている。

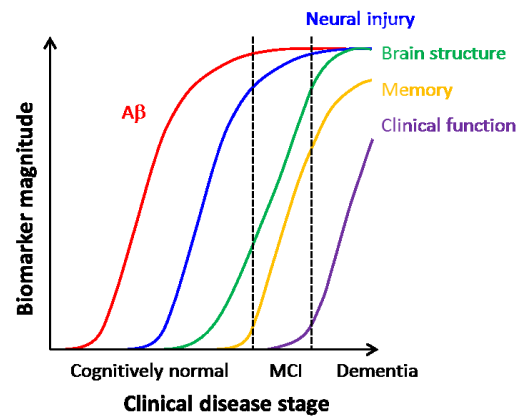


Fig. 1-4 Biomarkers of AD and the changes at clinical disease stage²²⁾.

1.2. がんとテロメア

染色体の末端部分にはテロメア (Telomere) DNA と呼ばれる 5'-(TTA GGG)_n-3'の反復配列領域が存在し、テロメアはこの反復配列 DNA と複数の関連タンパク質で構成される²⁴⁾。また、テロメア DNA の 3'末端側では 100-200 塩基がオーバーハングしていることが知られており²⁵⁾、細胞内のように K⁺イオンの多い条件下では G-quadruplex と呼ばれる四重鎖構造を形成することが知られている (Fig. 1-4)²⁶⁾。また、Na⁺イオン存在下でも G-quadruplex 構造を形成するが、Li⁺イオンのみ (あるいは Li⁺イオンが他のイオンよりも多く含まれている) 場合では二重鎖構造 (Duplex) を形成することが明らかとなっている²⁷⁾。

テロメア DNA は細胞分裂が行われると 3'末端側が短縮される²⁸⁾。正常細胞では、細胞分裂の限界数である Hayflick Limit に達すると細胞分裂が停止し、アポトーシスが誘導される。一方、多くのがん細胞ではテロメラーゼの発現によってテロメア DNA は一定の鎖長を保持する²⁹⁾。従って、テロメラーゼの発現ががん細胞の不死化や無限増殖に繋がっている (Fig. 1-5)。

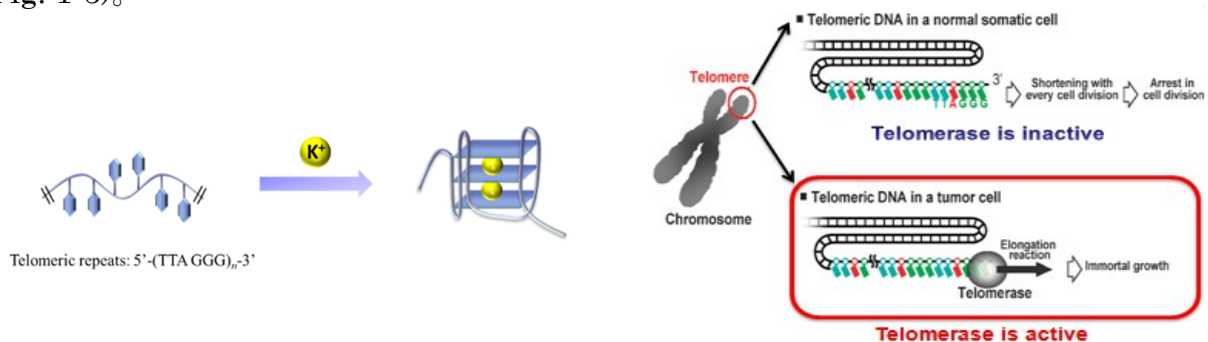


Fig. 1-4 G-quadruplex structure in K⁺ condition.

Fig. 1-5 Biological roles of telomeric DNA and telomerase²⁶⁾.

テロメラーゼは、逆転写酵素ユニットである hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) と RNA ユニットである hTERC (human Telomerase RNA Component) で構成されているリボタンパク質である³⁰⁾。テロメラーゼは、自身の RNA を鋳型として逆転写と転座を繰り返すことでテロメア DNA を伸長する³¹⁾。正常細胞では検出可能なレベルのテロメラーゼが発現していないのに対し、がん細胞では Table 1-2 で示すように高いテロメラーゼ活性陽性率であることが知られている³²⁾。p53 抗体などの腫瘍マーカーの陽性率が 30%程度であることを踏まえると、テロメラーゼは有用ながん診断マーカーとなり得る。

Table 1-2 Positive ratios of the telomerase activity³²⁾.

Tissue	Positive ratio (No. positive/ No. test)
Gastric cancer	85% (72/85)
Colorectal cancer	89% (123/138)
Breast cancer	88% (300/339)
Liver cancer	86% (149/173)
Pancreatic cancer	95% (41/43)

1.3 テロメラーゼ活性測定法

テロメラーゼを腫瘍マーカーとして利用するには、テロメラーゼ活性を評価するための測定法が必要となる。テロメラーゼ活性測定に関しては、これまでに数多くの手法が報告されている。一部を Table 1-3 に抜粋した。

Table 1-3 Conventional telomerase activity assay.

Assay	Detection (probe)	Ref.
TRAP assay	SYBR® green (PCR + PAGE)	33
ELISA	Digoxigenin-labeled oligonucleotides	34
Electrochemical assay	Electrochemical active spices	35
DNAzyme	Hemin (Peroxidase-like catalytic activity)	36
HPA	Chemiluminescent probe (acridinium ester)	37
Quantum dots (QDs)	QDs labeled primer and Texas Red-labeled dUTP	38

これらの中で最も一般的な方法は、Kim らによって報告された TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) assay である³³⁾。この方法では、次の 3 つの工程が行われる。i) 伸

長反応：テロメラーゼの基質となるプライマー (TS primer) に、細胞から抽出したタンパク成分を含む溶液を加えて TS primer にテロメア配列を付加させる。この際、テロメラーゼ活性の高いサンプルでは、長さの異なる伸長産物が得られる。ii) 増幅：伸長産物を PCR (Polymerase Chain Reaction) により、検出可能なレベルまで増幅する (30-33 cycles)。

iii) 解析：非変性 PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) にて増幅した DNA を泳動させた後、EB (Ethidium Bromide) や SYBR® Green 等で染色した後、蛍光イメージングアナライザー等で解析する。正常細胞では内部標準コントロール (S-IC: Standard-Internal Control) のバンドのみが確認できる。一方、がん細胞では S-IC の他に 6 塩基ごとに複数のバンドが観測される (Fig. 1-6)。従って、6 塩基ごとのバンドの有無によって測定に用いた細胞が正常あるいはがんであるかを診断できる。TRAP assay は、PCR による増幅を行うため検出感度は高い (10-50 cells/assay) が、PCR 阻害物質の影響による偽陰性⁴⁰⁾やプライマーダイマーの形成による偽陽性⁴¹⁾の可能性が指摘されている。また、電気泳動は煩雑かつ時間のかかる操作であり、これらの操作には熟練を要する。従って、病院内での診断が難しいため検査業者への委託となり、サンプル輸送の際にテロメラーゼの活性が低下する恐れが生じてしまう。このことから、操作に熟練を要せず病院内で（もしくは検査業者へ委託する場合においても）容易にがん診断が可能な測定法が開発されることが望ましい。

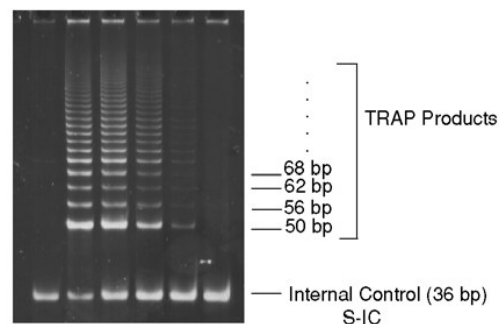


Fig. 1-6 Gel image in TRAP assay³⁹⁾.

TRAP assay に替わる手法として、Table 1-3 で示す測定法の他に QCM (Quartz Crystal Microbalance)⁴²⁾, Magnetic Bead⁴³⁾, SPR (Surface Plasmon Resonance)⁴⁴⁾ などを利用した手法も開発されている。これらの代替法は、PCR または PAGE フリーな手法であることが多いが問題点も指摘されている。例えば、Electrochemical assay や ELISA などは、TS プライマーの基板への固定化 (e.g.; チオール化 TS プライマーの金基板への固定化、ビオチン化 TS プライマーのストレプトアビジン被覆マイクロウェルプレートへの固定化) や抗体を用いるなど、測定の前処理の煩雑さや高コスト化が問題となっている。TS プライマーの固定化操作は、生体試料由来の夾雑物の影響を洗浄により排除できる利点はあるが、上記の問題だけではなく固定化密度の再現性を得るのが困難かつ固定化前の基板の洗浄に細心の注意を払う必要がある (Fig. 1-7)。従って、簡便性や低コスト化といった観点からは、測定の前処理が不要で煩雑な操作を必要としない手法が適しており、蛍光を利用した手法等がこれにあたる。

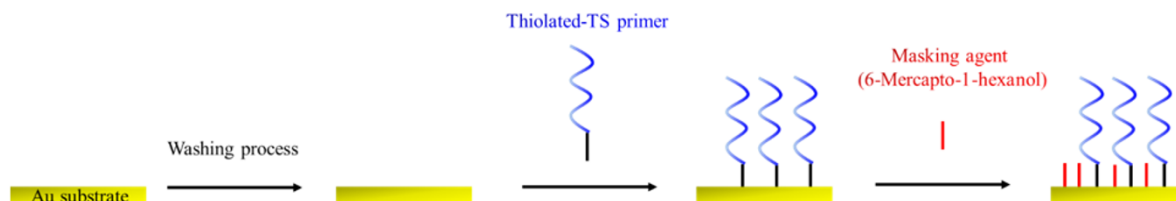


Fig. 1-7. Schematic illustration of immobilization process of TS primer and masking process with 6-mercapto-1-hexanol.

2003年にWillnerらは、Quantum dots (CdSe-ZnS) と Texas Red ラベル化 dUTP を用いて FRET によるテロメア伸長反応を追跡した例を報告している³⁸⁾。Texas Red を標識した dUTP を伸長反応の際に取り込ませることで、TS プライマーを固定化した QDs (Quantum dots) から Texas Red に FRET が起こり、Texas Red の蛍光強度からテロメア伸長反応を追跡することが可能となる (Fig. 1-8)。しかしながら、この方法は QDs に TS primer を固定化する必要がある。さらに、汎用される蛍光プローブのように末端に蛍光色素をラベル化するのではなく、dUTP に対して修飾を施すためにコストが高くなってしまう。低コスト化の観点からも、プローブの合成の簡便さからも、生体分子を 2 種類の蛍光色素でラベル化することは避けるべきであり、生体分子にラベル化する場合は 2 種類の蛍光色素のうち 1 種類のみでラベル化する、あるいは 1 種類の蛍光色素でラベル化したプローブのみで測定することが望ましい。

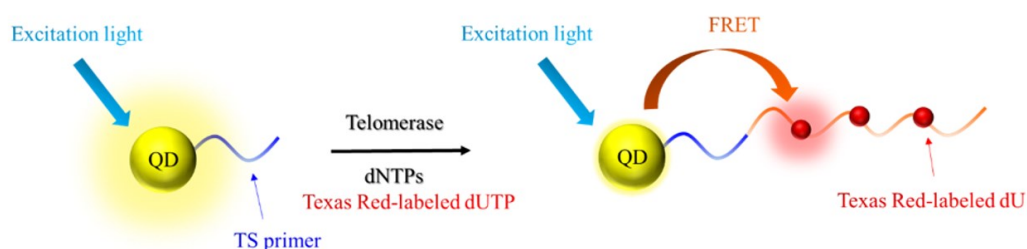


Fig. 1-8 FRET method using QDs (CdSe-ZnS) and Texas Red-labeled dUTP.

1.4 蛍光プローブによる DNA の検出

蛍光プローブを用いた DNA の検出にはすでに良く知られたいくつかの方法があり、汎用的なプローブとしては Molecular beacon⁴⁵⁾と FRET 型プローブ⁴⁶⁾が挙げられる。各測定法の DNA 検出原理の概略図を Fig. 1-9 に示す。

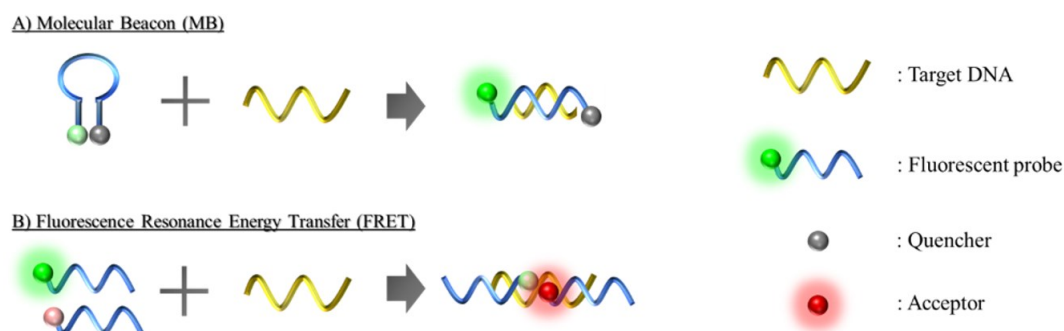


Fig. 1-9 Principles of DNA detection methods. A) Molecular beacon, B) FRET.

Molecular beacon は、ステム構造を形成する DNA の両末端にそれぞれ蛍光色素と消光剤でラベル化したプローブで、Donor (蛍光色素) と Acceptor (消光剤) 間の距離が 0.1-1 nm の場合に起こる Collisional quenching (衝突消光) を利用する。プローブがターゲットに結合した際に蛍光色素と消光剤の間の距離が離れ、エネルギー移動が誘起されなくなることで蛍光が回復する。Molecular beacon の利点は、バックグラウンド蛍光を低く抑えることが可能で、過剰量のプローブ存在下でもターゲットと結合したプローブのシグナルのみが得られることである。しかしながら、DNA の配列設計や両末端への色素のラベル化といった合成的な部分での難易度が高く、結果として高コストな測定法となってしまう。

FRET は、B)の場合、2 種類の DNA にそれぞれ蛍光色素でラベル化したプローブを用いて測定を行う。場合によっては、DNA の両末端に 2 種類の蛍光色素をラベル化するケースもある⁴⁷⁾。FRET は Donor-Acceptor 間距離が 1-10 nm の際に誘起されるエネルギー移動であり、上図のようにそれぞれのプローブがターゲット DNA に結合した際に Donor-Acceptor 間距離が近接することで Donor から Acceptor へエネルギー移動が起こる。従って、Acceptor の蛍光発光 (あるいは Donor 側の消光) が観測される。この手法はスペクトルに等蛍光点が観測されるため、ターゲットの定量よりもレシオ測定 (結合比など) に適している。欠点としては、励起光の波長が Acceptor の吸収がない波長に限定されてしまう点や、それによって蛍光色素の組み合わせが限定されてしまう点が挙げられる。

これらの問題を解決するためには、プローブ合成や検出方法がより簡素化された DNA 検出システムの構築が必要である。安価で合成が容易なプローブ (または安価なプローブを用

いた新規な検出法)の開発や検出メカニズムの解明は重要な課題であり、これらの実現によって得られる知見は、新規 DNA 検出システムにおける蛍光色素分子の構造最適化、測定条件の最適化及びそれに伴う高感度化の達成に関して重要な役割を果たすと考えられる。

1.5 AD と A β ペプチド

近年増加傾向にある AD は高齢者が発症する認知症の約半数を占めており、今後も AD 患者は増加していくと考えられる。前述のように、AD のバイオマーカーとして有力視されているのが A β ペプチドである。A β は、膜貫通タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク

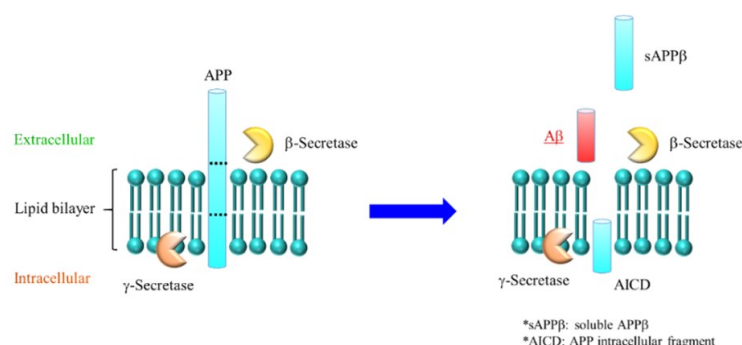


Fig. 1-10 Illustration of A β production.

(APP: Amyloid Precursor Protein) が切断されることによって産生されるペプチドであり、N 末端側は細胞外で β -secretase によって切断され、C 末端側は膜内から γ -secretase によって切断される⁴⁸⁾ (Fig. 1-10)。この際、 β -secretase の切断位置によって、A β (1-38)、A β (1-40)、A β (1-42)、A β (1-43) などの長さの異なる A β が産生されるが、大部分は A β (1-40) 及び A β (1-42) が占める⁴⁹⁾。A β の配列は Table 1-4 に示すとおりである。

Table 1-4 A β sequences.

A β (1-x)	Sequence
A β (1-38)	H-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-OH
A β (1-40)	H-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV-OH
A β (1-42)	H-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVI-A-OH
A β (1-43)	H-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-OH

A β ペプチドは恒常的に産生されるペプチドであり、モノマーの状態では毒性がない。しかしながら、オリゴマーやフィブリルなどの凝集体を形成すると神経毒性を示し、その毒性はオリゴマーの方が強いと考えられている^{48, 50)}。加齢に伴い A β の代謝能が低下することで、モノマーであった A β は毒性の高いオリゴマーやフィブリルへと構造が移行する。A β はフィブリルを形成する際、 β -sheet 構造を形成することが知られており、X-ray fiber diffraction

や ssNMR (solid-state Nuclear Magnetic Resonance) によってフィブリルの構造が明らかにされている (Fig. 1-11)⁵¹⁾。

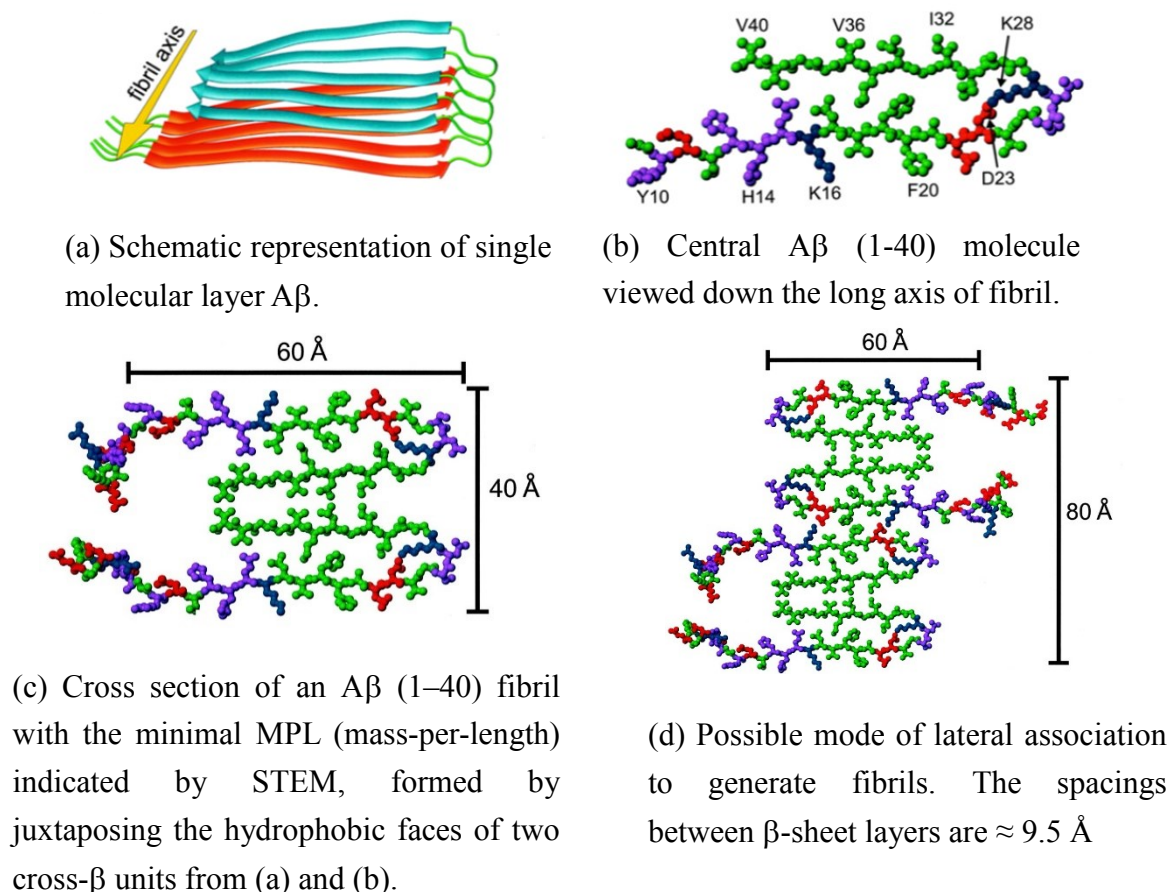


Fig. 1-11. Structural model for Aβ (1-40) fibrils.⁵¹⁾

Aβ (1-40) フィブリルは、β-strand (12-24) / turn (25-29) / β-strand (30-40) が平行に配向している。Aβ (1-42) においても同様の構造を形成することが報告されている⁵²⁾。1-8 残基目までは、構造形成に関与しておらず、配向も無秩序である⁵¹⁾。また、16-20 残基目の KLVFF は、full-length の Aβ を認識して結合する性質を有していることが明らかとなっている⁵³⁾。

Aβの凝集速度は周辺環境により大きく異なり、温度、対イオン種などが凝集速度に影響を与える因子となる。例えば、塩酸塩型 Aβはトリフルオロ酢酸 (TFA: Trifluoroacetate) 塩型 Aβと比較して著しく凝集速度が速いことが報告されている⁵⁴⁾。TFA 塩型は溶解後 24 時間以上ランダムコイルであるのに対し、塩酸塩型は数時間でβ-sheet 構造に変化する。このように Aβの凝集には外的因子の影響があるため、Aβを用いた研究においては測定条件を一定にすることが求められる。

1.6 Aβペプチドの測定法

Aβの測定法として ThT を用いた蛍光測定⁵⁵⁾や ELISA⁵⁶⁾が報告されている。ThT は TICT (Twisted-Intramolecular Charge Transfer) 特性を有しており (Fig. 1-12)、極性溶媒中では分子内回転運動により蛍光が消光するが、フィブリルに対して特異的に結合することで分子内回転が抑制されて蛍光が回復 (増大) する (Table 1-5)⁵⁷⁾。

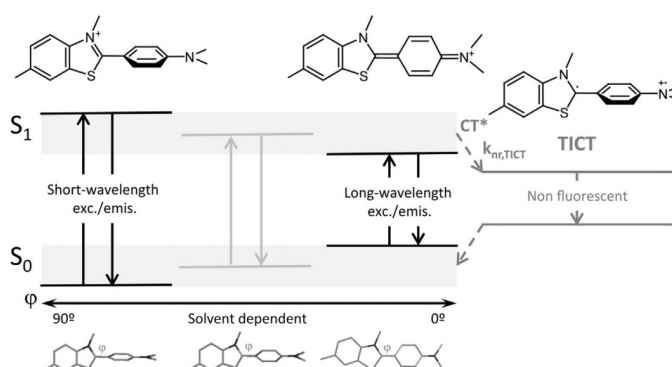


Fig. 1-12 Non-fluorescent TICT state model⁵⁷⁾.

Table 1-5 Fluorescence property of ThT in each solvent⁵⁷⁾.

ThT	Φ	$K (10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3)$
Chloroform	0.017	---
Buffer (water)	0.00033	---
Fibrillar Aβ (1-42)	0.31	5.85 ± 0.07

* Φ : Fluorescence quantum yield

* K : Binding constant of ThT to Aβ (1-42)

Table 1-5 で示すように、水溶液中では TICT により著しく蛍光量子収率が低いが、フィブリルと結合することによって TICT が抑制されて蛍光量子収率が飛躍的に増大する。ThT を用いた測定法は、簡便性に優れていることから汎用されている手法ではあるが、フィブリルのみしか検出することができず、検出感度も低いという欠点を抱えている。一方、ELISA は高感度・高選択性の、優れた測定法ではあるが、Fig. 1-13 で示すように抗体の使用 (Aβ抗体が 2 種類必要) 及びマイクロウェルプレートへの固定化操作を伴うために高価かつ測定に時間を要するなどの欠点がある。従って、抗体を使用せず、固定化操作を伴わない測定法の開発が望まれる。

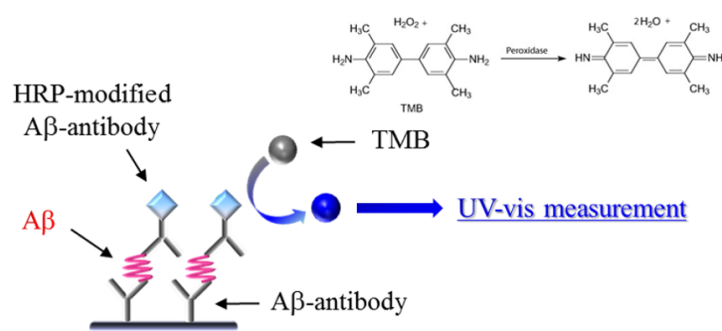


Fig. 1-13 Schematic illustration of ELISA method.

1.7 凝集誘起発光 (AIE) 色素およびセンサー分野における AIE 色素の応用例

がんや AD の診断には、蛍光プローブを用いた方法が既存の方法と比較して簡便性に優れるため適している。しかしながら、前述のように濃度消光や二重ラベル化による高コスト化は避けなければならない。そこで、申請者は AIE 色素と呼ばれる機能性蛍光色素に着目した。AIE 色素は 2001 年に Tang らによって最初に報告された機能性色素であり⁵⁸⁾、今日ではテトラフェニルエチレン (TPE: Tetraphenylethylene)⁵⁹⁾やトリフェニルアミン (TPA: Triphenylamine)⁶⁰⁾、シロール⁶¹⁾、キサランテン⁶²⁾、カルボラン⁶³⁾などの誘導体が数多く報告されるようになった (Fig. 1-14)。

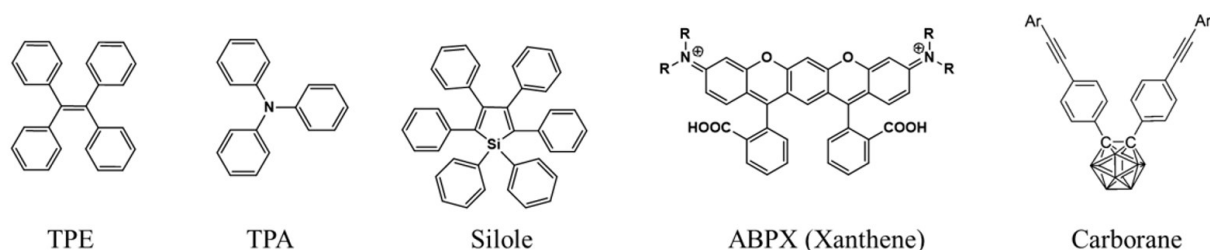


Fig. 1-14 Structures of AIE dyes. ABPX: Aminobenzopyrano-xanthene.

これらの化合物は複数のフェニル基（またはアリール基）を有しており、フェニル基の回転の可否が蛍光特性に大きな影響を与える。AIE 色素が分散している場合は、フェニル基の回転が可能であるために励起エネルギーは回転運動によって消費される。つまり、熱放出を伴う無輻射遷移過程によって、励起された AIE 色素は基底状態に戻る (Fluorescence-OFF)。一方、AIE 色素が凝集している場合は、色素分子が近接することでフェニル基の回転が制限され、励起エネルギーは回転運動で消費されない。つまり、蛍光放出を伴う輻射遷移過程により励起エネルギーが消費されることで励起された AIE 色素は基底状態に戻る (Fluorescence-ON) (Fig. 1-15)。

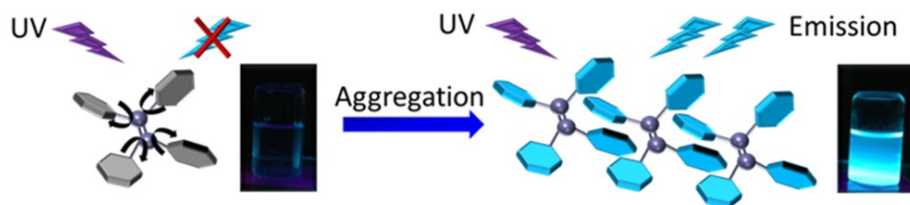


Fig. 1-15 Aggregation-induced emission phenomenon (e.g.; TPE).

AIE 色素をセンサーとして利用する場合、静電的相互作用や疎水性相互作用によりターゲットとなる物質に結合した際に AIE 色素が集積する、あるいはターゲットとの結合によって分子内回転運動が抑制されることで蛍光強度が増大する Signal-ON 型の検出システム

を構築しやすいことが利点として挙げられる。実際、ATP (Adenosine triphosphate)⁶⁴⁾や BSA (Bovine Serum Albumin)⁶⁵⁾、G-quadruplex DNA⁶⁶⁾ の検出例が報告されている。例えば、新海らによって報告された ATP 検出法では、溶液中に分散しているグアニジン修飾 TPE 誘導体がリン酸との静電的相互作用によって結合した後、それら色素間で生じる疎水性相互作用で凝集（会合）が誘起されて蛍光強度が非線形的に増大することが分かっている⁶⁴⁾。BSA の検出の場合は、AIE 色素が疎水性相互作用によって BSA の疎水性部位に結合することで分子内回転運動が抑制されて蛍光が増大する⁶⁵⁾。G-quadruplex DNA の場合も同様であり、AIE 色素が G-quadruplex DNA を認識して結合することにより分子内回転運動が抑制されて蛍光強度が増大する⁶⁶⁾。従って、AIE 色素を用いたセンサーには“凝集によるシグナル応答”と“ターゲットとの結合によるシグナル応答”の 2 種類の検出システムが存在し、検出対象に合わせた検出システムを構築可能な点が AIE 色素を用いたセンサーの魅力である。しかしながら、これらの報告例のように静電的あるいは疎水性相互作用のみでターゲットを検出する場合、ターゲットに対する高い選択性を実現することは難しいため、高度な分子設計が求められる。そこで、認識部位として生体分子を利用することで容易にターゲットに対する高い選択性が得られるのではないかと考えた。

AIE 色素を生体分子にラベル化した例はいくつか報告されており、DNA⁶⁷⁾やペプチド⁶⁸⁾が利用されている。生体分子を用いる利点として、ターゲットに対する選択性の付与だけではなく、親水性の付与によって測定媒体（主に水溶液）中での自己会合による蛍光強度の増大を防ぐことができる点が挙げられる⁶⁸⁾。従って、疎水性の高い AIE 色素を水溶液中で利用することが可能となる。親水性基を導入した AIE 色素の合成と比較して、疎水性の AIE 色素は合成し易く、また固相合成法により合成した生体分子に導入する場合は、精製も容易に行えることから簡便にプローブが合成できる。

1.8 本研究の目的

以上のことを踏まえ、本研究では、がんおよび AD 診断のために、各疾患の測定対象となるバイオマーカーであるテロメア DNA と A β を認識する生体分子（相補鎖 DNA と A β 認識ペプチド）を AIE 色素でラベル化した蛍光プローブの合成、および低コスト・簡便合成可能なプローブによる簡便な生体分子（バイオマーカー）検出システムの構築を検討した。また、合成したプローブの物性評価を行うことによりプローブのシグナル応答メカニズムや有用性についても検証した。

まず、がんの診断法においては、AIE 色素ラベル化プローブの有用性を判断するために、汎用的な蛍光色素である FAM（フルオレセイン誘導体）でラベル化した蛍光プローブ（二

重ラベル化をしていない) とインターカレーターを利用した iFRET による簡便な手法を考案し、各種測定を行った。これにより、二重ラベル化をしていない、安価な汎用的蛍光プローブを用いた測定法と AIE 色素ラベル化プローブを用いた測定法の簡便性、選択性、検出感度を比較することが可能になる。iFRET による方法の詳細は第 2 章で述べる。次に、本研究の目的である AIE 色素をテロメア DNA の相補鎖 DNA にラベル化したプローブを合成し、合成したプローブを用いて各種測定を行い、検出メカニズムの解明やプローブの有用性を検証した。詳細は第 3 章で述べる。また、DNA のアナログであり、DNA プローブよりも高い熱安定性、配列認識能を有するペプチド核酸 (PNA: Peptide Nucleic Acid) に関しても同様に AIE 色素でラベル化したプローブを合成し、検出メカニズムの解明を行った。詳細は第 4 章で述べる。一方、AD に関しては、A β を直接 AIE 色素でラベル化した場合、線維化に通常数日間要するため迅速な診断が行えない。そこで、A β を認識し、凝集を促進するペプチドを AIE 色素でラベル化した蛍光プローブを合成し、従来の ELISA や ThT assay と本手法を比較することにより合成したプローブの有用性を検証した。詳細は第 5 章で述べる。

AIE 色素ラベル化プローブを用いた新規な診断法の開発は、医療 (診断) 分野において限定されていた蛍光色素の応用範囲を拡張することに繋がり、がんや AD だけではなく、蛍光色素の利用が困難であった他の疾患の簡便な診断法の開発における重要な知見になり得ると考えられる。また、固定化操作や酵素反応などを伴わない蛍光色素を利用した簡便な診断法の応用範囲を拡張することは、これまで高価または時間がかかっていたために頻繁に検査を受けられなかった疾患の早期発見にも繋がる。従って、[本研究 \(AIE 色素を利用したプローブの研究開発\)](#) は今後の医療 (診断) 分野の発展に大きく貢献するものであり、[重要な研究分野として位置づけられる。](#)

1.9 参考文献

1. T. A. Robertson, F. Bunel and M. S. Roberts, *Cells*, 2013, **2**, 591-606.
2. M. Sameiro and T. Gonçalves, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 190-212.
3. M. Beija, C. A. M. Afonso and J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2410-2433.
4. A. Toutchkine, P. Nalbant and K. M. Hahn, *Bioconjugate Chem.*, 2002, **13**, 387-391.
5. A. Loudet and K. Burgess, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4891-4932.
6. S. Hamann, J. F. Kiilgaard, T. Litman, F. J. A.-Leefmans, B. R. Winther and T. Zeuthen, *J. Fluoresc.*, 2002, **12**, 139-145.

7. N. Iwata and T. Saido, *Folia Pharmacol. Jpn.*, 2003, **122**, 5-14.
8. J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam and B. Z. Tang, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 11718-11940.
9. <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai11/kekka03.html>. (厚生労働省)
10. http://www.mhlw.go.jp/kokoro/speciality/detail_recog.html. (厚生労働省)
11. a) M. Shokeen and C. J. Anderson, *Acc Chem Res.*, 2009, **42**, 832-841. b) U. D. McCann, D. F. Wong, F. Yokoi, V. Villemagne, R. F. Dannals and G. A. Ricaurte, *J. Neurosci.*, 1998, **18**, 8417-8422. c) E. Fricke, S. Machtens, M. Hofmann, J. van den Hoff, S. Bergh, T. Brunkhorst, G. J. Meyer, J. H. Karstens, W. H. Knapp and A. R. Boerner, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.*, 2003, **30**, 607-611.
12. C. A. B. Saunders, J. E. Dussek, M. J. O'Doherty, M. N. Maisey, *Ann. Thorac. Surg.*, 1999, **67**, 790-797.
13. K. Izuishi, Y. Yamamoto, H. Mori, R. Kameyama, S. Fujihara, T. Masaki and Y. Suzuki, *Oncol. Rep.*, 2014, **31**, 701-706.
14. R. Khurana, C. Coleman, C. I. Zanetti, S. A. Carter, V. Krishna, R. K. Grover, R. Roy and S. Singh, *J. Struct. Biol.*, 2005, **151**, 229-238.
15. W. E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergstroöm, I. Savitcheva, G. Huang, S. Estrada, B. Auseñ, M. L. Debnath, J. Barletta, J. C. Price, J. Sandell, B. J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C. A. Mathis and B. Långstroöm, *Ann. Neurol.*, 2004, **55**, 306-319.
16. H. P. Stoll, G. D. Hutchins, A. T. Nguyen, C. R. Appledom, I. Janzen, H. Seifert, C. Rube, H. Schieffer, K. L. March, *J. Nucl. Med.*, 2001, **42**, 1375-1383.
17. https://lsim-forum.jp/archives/pdf/forum14/forum14_03.pdf.
18. a) Z. Sun, X. Fu, L. Zhang, X. Yang, F. Liu, G. Hu, *Anticancer Res.*, 2004, **24**, 1159-1166. b) T. Soussi, *Cancer Res.*, 2000, **60**, 1777-1788.
19. <http://tumor-marker.com/cancer/problem.htm>.
20. <http://www.natureasia.com/ja-jp/jobs/tokushu/detail/38>.
21. http://ganjoho.jp/public/dia_tre/diagnosis/tumor_marker.html.
22. C. R. Jack Jr, D. S. Knopman, W. J. Jagust, L. M. Shaw, P. S. Aisen, M. W. Weiner, R. C. Petersen and J. Q. Trojanowski, *Lancet Neurol.* 2010, **9**, 119-128.
23. R. B. DeMattos, K. R. Bales, M. Parsadanian, M. A. O'Dell, E. M. Foss, S. M. Paul and D. M. Holtzman, *J. Neurochem.*, 2002, **81**, 229-236.

24. a) E. H. Blackburn, *Nature*, 1991, **350**, 569-573. b) R. K. Moyzis, J. M. Buckingham, L. S. Crams, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff and J. R. Wu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 6622-6626. c) J. Campisi, S. Kim, C. Kim, M. Rubio, *Exp. Gerontol.*, 2001, **36**, 1619-1637.
25. J. D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield, R. M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, T. Lange, *Cell*, 1999, **97**, 503-514.
26. a) Y. Xu, Y. Noguchi, H. Sugiyama, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 5584-5591. b) H. Yaku, T. Fujimoto, T. Murashima, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 6203-6216.
27. D. Miyoshi, M. Inoue, N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 7716-7719.
28. T. Else, *J. Mol. Endocrinol.*, 2009, **43**, 131-141.
29. L. Hayflick and P. S. Moorhead, *Exp. Cell. Res.*, 1961, **25**, 585-621.
30. M. Meyerson, *J. Clin. Oncol.*, 2000, **18**, 2626-2634.
31. X. Zhou, D. Xing, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 4643-4656.
32. J. W. Shay and S. Bacchetti, *Eur. J. Cancer*, 1997, **33**, 787-791.
33. a) N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. C. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, J. W. Shay, *Science*, 1994, **266**, 2011-2015. b) N. W. Kim, F. Wu, *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 2595-2597.
34. H. Kha, W. Zhou, K. Chen, B. Karan-Tamir, T. S. Miguel, L. Zeni, K. Kearns, A. Mladenovic, B. Rasnow, M. Robinson, *Anal. Biochem.*, 2004, **331**, 230-234.
35. a) S. Sato, H. Kondo, T. Nojima, S. Takenaka, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 7304-7309. b) S. Sato, S. Takenaka, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 1772-1775.
36. a) V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, A. Dishon, M. Kotler, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 2152-2156. b) Y. Xiao, V. Pavlov, T. Niazov, A. Dishon, M. Kotler, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 7430-7431.
37. M. Hirose, J. A. Hashimoto, K. Ogura, H. Tahara, T. Ide, T. Yoshimura, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1997, **123**, 337-344.
38. F. Patolsky, R. Gill, Y. Weizmann, T. Mokari, U. Banin, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 13918-13919.
39. <http://www.millipore.com/publications.nsf/.../S7700.pdf>
40. W. E. Wright, J. W. Shay, M. A. Piatyszek, *Nucleic Acids Res.*, 1995, **23**, 3794-3795.
41. D. Kong, Y. Jin, Y. Yin, H. Mi, H. Shen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 699-709.
42. V. Pavlov, I. Willner, A. Dishon, M. Kotler, *Biosens. Bioelectron.*, 2004, **20**,

1011-1021.

43. X. Zhou, D. Xing, D. Zhu, L. Jia, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 255-261.
44. C. Maesawa, T. Inaba, H. Sato, S. Iijima, K. Ishida, M. Terashima, R. Sato, M. Suzuki, A. Yashima, S. Ogasawara, H. Oikawa, N. Sato, K. Saito and T. Masuda, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, e4.
45. D. Horejsh, F. Martini, F. Poccia, G. Ippolito, A. D. Caro and M. R. Capobianchi, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, e13.
46. K. J. Livak, S. J.A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti and K. Deetz, *PCR Meth. Appl.*, 1995, **4**, 357-362.
47. <http://nathan.instras.com/MyDocsDB/doc-801.pdf>
48. J. Hardy and D. J. Selkoe, *Science*, 2002, **297**, 353-356.
49. T. E. Golde, C. B. Eckman and S. G. Younkin, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1502**, 172-187.
50. a) F. G. D. Felice, D. Wu, M. P. Lambert, S. J. Fernandez, P. T. Velasco, P. N. Lacor, E. H. Bigio, J. Jerecic, P. J. Acton, P. J. Shughrue, E. C. Dodson, G. G. Kinney and W. L. Klein, *Neurobiol. Aging*, 2008, **29**, 1334-1347.
51. A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio and R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2002, **99**, 16742-16747.
52. T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. R. Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, and R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2005, **102**, 17342-17347.
53. a) L. O. Tjernberg, J. Näslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlström, J. Thyberg, L. Terenius and C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 8545-8548. b) L. O. Tjernberg, C. Lilliehöök, D. J. E. Callaway, J. Näslund, S. Hahne, J. Thyberg, L. Terenius and C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 12601-12605.
54. I. Kaneko and S. Tutumi, *J. Neurochem.*, 1997, **68**, 438-439.
55. a) H. Levine III, *Protein Science*, 1993, **2**, 404-410. b) H. Levine III, *Methods Enzymol.*, 1999, **309**, 274-284.
56. M. Jensen, T. Hartmann, B. Engvall, R. Wang, S. N. Uljon, K. Sennvik, J. Näslund, F. Muehlhauser, C. Nordstedt, K. Beyreuther and L. Lannfelt, *Mol. Med.*, 2000, **6**, 291-302.
57. S. Freire, M. H. D. Araujo, W. A. Soufi and M. Novo, *Dyes and Pigments*, 2014, **110**, 97-105.
58. J. Luo, Z. Xie, J. W. Y. Lam, L. Cheng, H. Chen, C. Qiu, H. S. Kwok, X. Zhan, Y. Liu,

- D. Zhuc and B. Z. Tang, *Chem. Commun.*, 2001, 1740-1741.
59. a) M. T. Gabr and F. C. Pigge, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 90226-90234. b) A. Chatterjee, D. G. Khandarea, P. Sainia, A. Chattopadhyaya, M. S. Majikbc and M. Banerjee, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 31479-31484. c) Y. Li, Z. Li, T. Ablekim, T. Ren and W. J. Dong, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 26193-26202. d) N. Zhao, S. Chen, Y. Hong and B. Z. Tang, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 13599.
60. a) B. R. Gao, H. Y. Wang, Y. W. Hao, L. M. Fu, H. H. Fang, Y. Jiang, L. Wang, Q. D. Chen, H. Xia, L. Y. Pan, Y. G. Ma and H. B. Sun, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 128–134. b) K. Li, W. Qin, D. Ding, N. Tomczak, J. Geng, R. Liu, J. Liu, X. Zhang, H. Liu, B. Liu and B. Z. Tang, *Sci. Rep.*, 2013, **3**.
61. Z. Zhao, B. Hea and B. Z. Tang, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 5347-5365.
62. a) S. Kamino, Y. Horio, S. Komeda, K. Minoura, H. Ichikawa, J. Horigome, A. Tatsumi, S. Kaji, T. Yamaguchi, Y. Usami, S. Hirota, S. Enomoto and Y. Fujita, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 9013-9015. b) S. Kamino, M. Murakami, M. Tanioka, Y. Shirasaki, K. Watanabe, J. Horigome, Y. Ooyama and S. Enomoto, *Org. Lett.* 2014, **16**, 258–261. c) S. Kamino, A. Muranaka, M. Murakami, A. Tatsumi, N. Nagaoka, Y. Shirasaki, K. Watanabe, K. Yoshida, J. Horigome, S. Komeda, M. Uchiyama and S. Enomoto, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 2131-2140.
63. K. Kokado and Y. Chujo, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 316-319.
64. a) T. Noguchi, T. Shiraki, A. Dawn, Y. Tsuchiya, L. T. N. Lien, T. Yamamoto and S. Shinkai, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 8090-8092. b) T. Noguchi, B. Roy, D. Yoshihara, Y. Tsuchiya, T. Yamamoto and S. Shinkai, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 3863-3867.
65. A. Shao, Z. Guo, S. Zhu, S. Zhu, P. Shi, H. Tian and W. Zhu, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 1383-1389.
66. Y. Hong, H. Xiong, J. W. Y. Lam, M. Häußler, J. Liu, Y. Yu, Y. Zhong, H. H. Y. Sung, I. D. Williams, K. S. Wong and B. Z. Tang, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 1232-1245.
67. a) Y. Li, R. T. K. Kwok, B. Z. Tang and B. Liu, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 10135-10138. b) R. Zhang, R. T. K. Kwok, B. Z. Tang and B. Li, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 28332-28337. c) S. Li, S. M. Langenegger and R. Häner, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 5835-5837.
68. a) Y. Ding, L. Shi and H. Wei, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 6361-6366. b) R. Zhang, Y. Yuan, J. Liang, R. T. K. Kwok, Q. Zhu, G. Feng, J. Geng, B. Z. Tang and B. Liu, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 14302-14310. b) Y. Yuan, R. T. K. Kwok, B. Z. Tang and B. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 2546-2554.

第2章 FRET を利用した新規なテロメラーゼ活性測定法の開発

AIE 色素ラベル化プローブを用いた測定法を検討する前に、比較対象として汎用的な蛍光色素（蛍光プローブ）を利用した簡便な測定法を考案し、開発した測定法の有用性を検証した。従来のテロメラーゼ活性測定法に替わる汎用的な蛍光色素を用いた新規な測定法として、iFRET を利用した手法を検討した。iFRET は蛍光プローブとインターカレーターを用いた手法であり、Fig. 2-1 で示すように、まず蛍光プローブがターゲット DNA と二重鎖を形成し、次にインターカレーターが形成した二重鎖（蛍光プローブ/ターゲット DNA）の塩基対間にインターカレーションされることでこれら 2 つの蛍光色素間の距離が近接し、エネルギー移動が起こる。

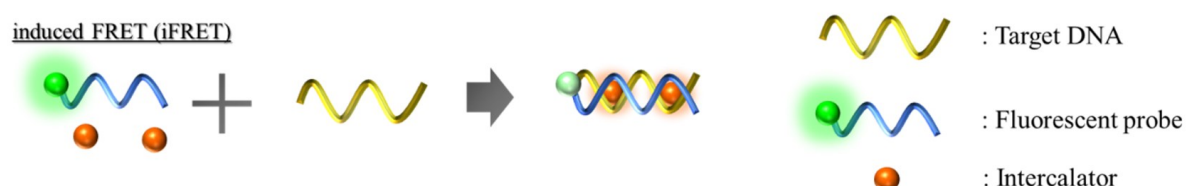


Fig. 2-1 Principle of iFRET type DNA detection method.

iFRET の場合、通常の FRET プローブによる検出とは異なり、2 種類の蛍光色素のうち 1 種類はインターカレーターを利用する¹⁾。従って、生体分子へのラベル化は 1 種類の蛍光色素のみとなり、FRET プローブや Molecular beacon と比較して合成が簡便である。蛍光プローブには市販の FAM (Carboxyfluorescein) や TAMRA (Tetramethylrhodamine) でラベル化したものが使用でき²⁾、インターカレーターには Ethidium Bromide (EB)³⁾や SYBR® Green⁴⁾が使用できる。FRET は、2 つの異なる蛍光色素が 1-10 nm に近接した際に、Donor 側の蛍光色素から Acceptor 側の蛍光色素にエネルギー移動が起こる現象である。この FRET は、フェルスター遷移 (Förster energy transfer) であり、双極子-双極子結合を通じてエネルギー移動が起こる⁵⁾。2 つの異なる色素間の距離が近接するほどエネルギー移動効率は高くなり、また

Donor 側の発光スペクトルと Acceptor 側の励起スペクトルとの重なり部分 (Overlap) が大きいほどエネルギー移動効率が高くなる (Fig. 2-2)⁵⁾。通常、汎用されている FAM や TAMRA で

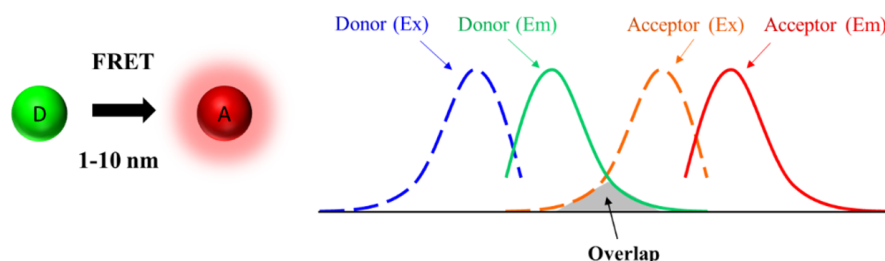


Fig. 2-2 FRET phenomenon and spectral overlap. D: Donor, A: Acceptor, Ex: Excitation spectrum, Em: Emission spectrum.

ラベル化した蛍光プローブのみでは二重鎖の形成によるシグナル応答は得られないが、インターカレーターを使用することでエネルギー移動に起因するシグナル応答が得られる。

本研究では、FRET 効率の観点から蛍光プローブとして FAM ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 494 \text{ nm}/516 \text{ nm}$)、インターカレーターとして EB ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 300, 520 \text{ nm}/600 \text{ nm}$) を選択した。FAM の蛍光波長領域に EB の吸収帯が存在することから、効率的にエネルギー移動が起こると考えられる。蛍光プローブの DNA 鎖にはヒトテロメア配列の相補鎖である 5'-CCC TAA CCC TAA-3' の 12-mer を選択し、FAM は 5'末端に修飾した。テロメア DNA 非存在下では、蛍光プローブとインターカレーター間の距離は離れているため FAM は強く発光するが、テロメア DNA 存在下では、EB へのエネルギー移動によって FAM の蛍光は減衰し、代わりに EB からのシグナルが得られると考えられる (Fig. 2-3)。ただし、FAM の蛍光強度は EB のそれに比べて極めて強いため (e.g.; fluorescein, $\phi = 0.9$, $\epsilon = 9.0 \times 10^4$ in 0.1M NaOH aq.⁶⁾)、EB の蛍光強度からではなく FAM の蛍光消光率からテロメア DNA の定量を検討した。2.2 で実験方法、2.3 で得られた結果及び考察について述べる。

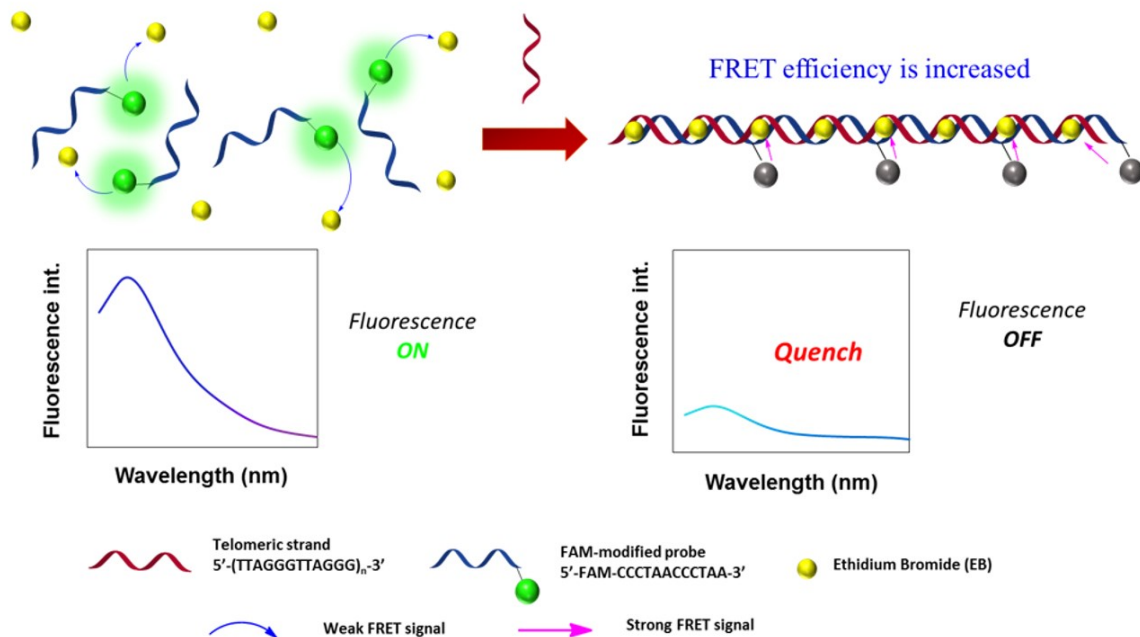


Fig. 2-3 Schematic illustration of iFRET type telomeric DNA detection method.

2.1 実験操作

試薬は、和光純薬工業株式会社より購入した特級または一級試薬を使用した。各鎖長のテロメア DNA 及び FAM ラベル化蛍光プローブは、北海道システムサイエンス社より購入したものをを使用した。TRAP assay に用いた試薬 (TRAPEZE® Telomerase Detection Kit S7700)は、Millipore 社から購入したものをを使用した。

PCR には、ASTEC 社製 GeneAtlas 325 (Thermal cycler) を使用した。CD スペクトルは、日本分光社製 J-820 を用いて測定を行った。蛍光スペクトルの測定は、日本分光社製 FP-6500 を使用した。UV による DNA の濃度決定には島津製作所社製 UV-1800 を使用した。ポリアクリルアミドゲルの撮影には、富士フイルム社製 FLS-5100 を使用した。

2.1.1 UV 測定による DNA および蛍光プローブの濃度決定

テロメア DNA [5'-(TTA GGG TTA GGG)_n-3', $n = 1-7$] および蛍光プローブの濃度は、高温時の吸光度および一本鎖のモル吸光係数 (ϵ_{260})から算出した (HT12: 1.2×10^5 , HT24: 2.4×10^5 , HT36: 3.7×10^5 , HT48: 4.9×10^5 , HT60: 6.1×10^5 , HT72: 7.3×10^5 , HT84: 8.6×10^5 , FAM probe: 1.1×10^5 , FAM-CC probe: 1.1×10^5 , NC48: 4.9×10^5 , 単位は $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。配列は Table 2-1 に示す。これら DNA の吸光度測定は、それぞれ波長 260 nm、90 °Cで行った。

Table 2-1 Probe and DNA sequences in this study.

Name	Sequence
FAM probe	5'-FAM-CCC TAA CCC TAA-3'
FAM-CC probe	5'-FAM-CAC TCA CAC TCA-3'
HT12	5'-TTA GGG TTA GGG-3'
HT24	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₂ -3'
HT36	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₃ -3'
HT48	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₄ -3'
HT60	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₅ -3'
HT72	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₆ -3'
HT84	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₇ -3'
NC12	5'-TGA GTG TGA GTG-3'
NC48	5'-(TGA GTG TGA GTG) ₄ -3'

2.1.2 非変性 PAGE

20%アクリルアミド溶液 (mono/bis = 19/1) に、APS (Ammonium persulfate)を加えて攪拌後、TMEDA (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine) を加えてさらに攪拌した。その後、この溶液を泳動プレートに流し込み 30 分静置してポリアクリルアミドゲルを作製した。作製したゲルに、調製したサンプル 12 μ L に Loading buffer 5 μ L を加えて攪拌したものをアプライし、室温、電圧 100 V で 3 時間泳動させた。泳動終了後、SYBR® Gold で 20 分間染色し、1×TBE buffer で 20 分洗浄し、蛍光イメージングアナライザーで撮影した。

2.1.3 CD スペクトル測定用サンプルの調製

テロメア DNA [5'-(TTA GGG TTA GGG)_n-3', $n = 1-4$] と FAM ラベル化蛍光プローブ (5'-FAM-CCC TAA CCC TAA-3') をそれぞれ緩衝溶液 (100 mM LiCl and 50 mM Tris-HCl, pH 8.4) に溶解させ、10 μ M (二重鎖 DNA における濃度) に調製した。またすべてのサンプルは 90℃で 5 分保持した後、0.5℃/min の降温速度で 4℃まで冷却することによってハイブリダイゼーションを行った。

2.1.4 蛍光測定用サンプルの調製と測定条件

2.2.3 a) の場合、1 μ M の蛍光プローブ 50 μ L と 1 μ M のテロメア DNA 1.0 μ L、100 mM LiCl and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4) 49 μ L を混合し、ハイブリダイゼーションを行った。すべてのサンプルは 90 °C で 5 分保持した後、0.5 °C / min の降温速度で 4℃まで冷却した。ハイブリダイゼーション後、試料溶液 20 μ L を 100 mM LiCl and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4) 1.98 mL で希釈して、目的の濃度 (テロメア DNA: 0.10 nM, 蛍光プローブ: 5.0 nM) に調製した。次いで、このサンプルの蛍光スペクトルの測定を行った。なお、測定の際の励起波長は 494 nm で、温度は 4 °C で測定を行った。また、セルホルダー内を N₂ ガスで置換することによってセル表面の曇りを防止した。蛍光スペクトル測定後は、0.1 mM EB 水溶液 2 μ L をセル内の溶液に加えて攪拌し、蛍光分光計のセルホルダー内で 10 分間静置した(4 °C)。この試料について、再び蛍光スペクトルを測定した。

2.2.3 b) の場合、1 μ M の [1 M LiCl and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4) に溶解させた] 蛍光プローブ 50 μ L と 1 μ M の HT48 (or NC48) をそれぞれ 1.0、3.0、7.0、10、15 μ L を混合し、全量が 100 μ L となるように緩衝溶液で希釈した。その後、2.2.3 a) の場合と同様の方法でハイブリダイゼーション、希釈および蛍光スペクトルの測定を行った。蛍光スペクトル測定後は、1 mM EtBr 水溶液 2 μ L をセル内の溶液に加えて攪拌し、蛍光分光計のセルホルダー内で 10 分間静置した(4 °C)。そして、再び蛍光スペクトルを測定した。

2.1.5 異なる鎖長のテロメア DNA を含有するサンプルの調製と測定条件

測定に使用したテロメア DNA は Table 2-2 の組成比で調製し、平均鎖長を算出した。すべての鎖長のテロメア DNA は 1 μ M に調製したものであり、例えばサンプル A では、14.4-mer の濃度で 1 μ M に相当する。これらのテロメア DNA 溶液を A から G の順に、0.5、1.5、3.0、4.5、6.0、7.0、8.0 μ L と、1 μ M の [1 M LiCl and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4) に溶解させた] 蛍光プローブ 50 μ L を混合し、全量が 100 μ L となるように緩衝溶液で希釈した。その後、2.2.3 a) の場合と同様の方法でハイブリダイゼーション、希釈および蛍光スペクトルの測定を行った。蛍光スペクトル測定後は、1 mM EB 水溶液 2 μ L をセル内の溶液に加えて攪拌し、蛍光分光計のセルホルダー内で 10 分間静置した(4 $^{\circ}$ C)。この試料について、再び蛍光スペクトルを測定した。

Table 2-2 Mixing ratio of various length telomere strands.

	HT12	HT24	HT36	HT48	HT60	HT72	HT84	Ave.*
A	80%	20%						14.4-mer
B	50%	30%	20%					20.4-mer
C	20%	30%	50%					27.6-mer
D		40%	30%	20%	10%			36.0-mer
E		20%	30%	20%	30%			43.2-mer
F			20%	20%	30%	20%	10%	57.6-mer
G			10%	10%	10%	10%	60%	72.0-mer

*HT 溶液はすべて 1 μ M ※Ave.: テロメア混合物の平均鎖長

2.1.6 K⁺及び Mg²⁺含有緩衝溶液を用いたサンプルの調製と測定条件

2.2.4.1 に関して、K⁺および Mg²⁺イオンを含む緩衝溶液で調製する場合、ハイブリダイゼーション時や希釈時において 63 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂ and 20 mM Tris-HCl buffer を用いた。1 M LiCl を用いたサンプルは、1 M LiCl and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4) を、蛍光プローブの溶解およびハイブリダイゼーション時に加えるバッファーとして用いており、希釈時は 100 mM LiCl and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4) を用いた。サンプルの調製と測定は、2.2.3 a) と同様の方法でハイブリダイゼーション、希釈および蛍光スペクトルの測定を行った。蛍光スペクトル測定後は、1 mM EB 水溶液 2 μ L をセル内の溶液に加えて攪拌し、蛍光分光計のセルホルダー内で 10 分間静置した(4 $^{\circ}$ C)。この試料について、再び蛍光スペクトルを測定した。

2.1.7 HeLa extracts (5×10^3 cells/ μL) の調製

HeLa 細胞からのテロメラーゼ抽出は、以下の方法で行った。

- ① 1×10^6 個の HeLa 細胞が入ったチューブにアイスバスで冷却しておいた CHAPS lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 0.1 mM Benzamidine, 5 mM β -mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% Glycerol) を 200 μL 加えた。
- ② この溶液をアイスバス上で 30 分間インキュベートした。
- ③ 遠心分離機を用いて、4 $^\circ\text{C}$ 、12000 rpm で 20 分間遠心した。
- ④ 溶液の上清 160 μL を新しいチューブに移した後、ピペットを用いて攪拌し、25 μL ずつ分注した後 -80 $^\circ\text{C}$ で冷凍保存した。

2.1.8 TRAP assay およびテロメア伸長反応

TRAP assay で使用した薬品類を、Table 2-3 に示す。まず、表の A の部分の HeLa extracts 以外の試薬を 0.2 mL の PCR チューブに加えた後、HeLa extracts を加えた。ピペットを用いて混合した後、37 $^\circ\text{C}$ で 90 分間インキュベートすることによりテロメア伸長反応を行った。その後、90 $^\circ\text{C}$ で 10 分間熱処理することによりテロメラーゼ活性を失活させた。次に、伸長反応溶液を 5 μL 分取し、表の B の部分の試薬を加えた。PCR による増幅は 94 $^\circ\text{C}$ for 30 sec. \rightarrow 59 $^\circ\text{C}$ for 30 sec. \rightarrow 74 $^\circ\text{C}$ for 1 min. を 33 サイクル繰り返すことにより行った。最後に、Loading buffer と試料を混合した後、作製した 12.5 %ポリアクリルアミドゲルに試料をアプライし、室温、電圧 150 V で 1.5 時間泳動させた。泳動後は、SYBR[®] Gold で 30 分間染色し、1 \times TBE buffer で洗浄し、蛍光イメージングアナライザーで撮影した。

Table 2-3 TRAP assay reagents.

Reagents	Volume	
10 μM TS primer	5.0 μL	A
10 \times TRAP reaction buffer*	2.5 μL	
50 \times dNTP mix	0.5 μL	
PCR grade water (RNase free)	13.0 μL	
HeLa extracts (in CHAPS)	4.0 μL	
Primer mix	0.5 μL	B
Taq DNA polymerase (5 units/ μL)	0.4 μL	
PCR grade water (RNase free)	9.1 μL	

* 200 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM MgCl_2 , 630 mM KCl, 0.5% Tween 20, 10 mM EGTA.

2.1.9 テロメラーゼ伸長反応後のサンプル調製と蛍光測定

2.1.8 で示した方法によりテロメア伸長反応を行ったサンプル 25 μ L に、50 nM の蛍光プローブを 2.0 μ L と 1 M LiCl and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4) を 23.0 μ L 加えて攪拌した後、ハイブリダイゼーションを行い (3 hrs、90°C \rightarrow 4°C、0.5°C/min.)、4°C でインキュベートした。その後、150 μ L の 100 mM LiCl and 50 mM Tris-HCl buffer を加えて攪拌し、100 μ L ずつ分注した。一方には何も加えずそのまま蛍光スペクトルを測定し、他方には 1 mM EB 水溶液を 0.5 μ L 加えて攪拌し、4°C で 30 分間静置した後、蛍光スペクトルの測定を行った。

HeLa 細胞抽出物を用いたサンプルでは、細胞中の染色体 DNA に含まれる一本鎖のテロメア DNA 領域に蛍光プローブが二重鎖形成する可能性や、EB のインターカレーションによるシグナルへの影響が考えられるため、予め 90 °C で 10 分間熱処理しておいた HeLa extracts を用意し、dNTP mix を加えず (代わりに PCR grade water を 13.5 μ L とした)、伸長反応も行わないサンプルをバックグラウンド用として同様の方法で調製し、蛍光スペクトルの測定を行った。なお、測定の際の励起波長は 490 nm で、温度は 4°C で行った。

2.2 結果と考察

2.2.1 CD スペクトルの測定

DNA の構造を確認するため、4℃における CD スペクトル測定を行った。前述の方法で調製したサンプルの CD 測定の結果を Fig. 2-4 に示す。その結果、各鎖長のテロメア DNA が含まれるサンプルにおいて 240 nm 付近に負のコットン効果、265 nm 付近に正のコットン効果が確認された。過去の報告で、G-rich および C-rich な配列の DNA を Li⁺イオンを含む弱アルカリ性の緩衝溶液で二重鎖を形成させた場合、240 nm 付近に負のコットン効果および 265 nm 付近に正のコットン効果が観測されていることから⁷⁾、テロメア DNA と蛍光プローブは二重鎖構造を形成していることが確認された。

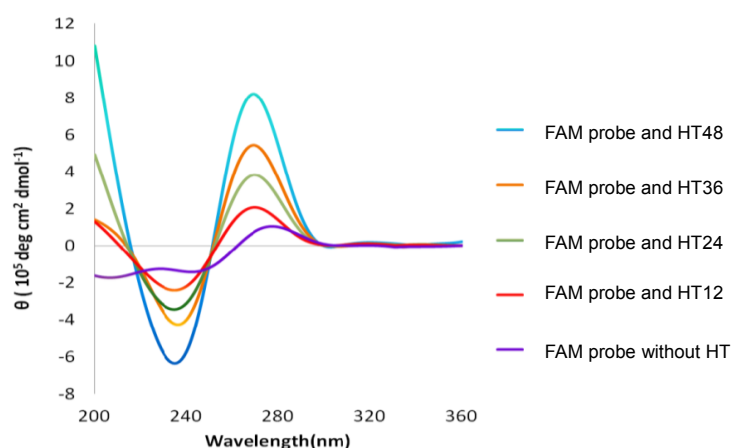


Fig. 2-4 CD spectra of telomeric DNA and FAM probe at a double strand concentration of 10 μ M in 100 mM LiCl and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4), 4°C.

2.2.2 PAGE による DNA の構造解析

DNA の構造についてさらに確証を得るため、非変性 PAGE による検証を行った (Fig. 2-5)。サンプルは、テロメア DNA [5'-(TTA GGG TTA GGG)_n-3', $n = 1-7$] が 0.1 μ M、蛍光プローブが 5 μ M になるように 100 mM LiCl and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4) で調製し、ハイブリダイゼーションを行った。その後、20%ポリアクリルアミドゲル (mono/bis = 19/1) を作製して電気泳動を行った。Lane a)-g) の下の位置に見えるバンドは過剰量の (テロメア鎖と二重鎖を形成していない) 蛍光プローブである。Lane a) から Lane g) にかけて鎖長が長くなっており、ゲル中を泳動した距離もテロメア DNA の長さに対応して短くなっている。もし、G-quadruplex 構造を形成しているのであれば、よりコンパクトな構造をとるため泳動距離は長くなると考えられる⁸⁾。従って、100 mM LiCl and 50 mM Tris-HCl (pH

8.4) 条件下では、二重鎖を形成していることが示唆される。画像の下部に見られるバンドは過剰量の蛍光プローブであるため同じ位置にバンドが確認された。以上の CD および PAGE の結果から、テロメア DNA および相補鎖は、 Li^+ イオンを含む弱アルカリ性の緩衝溶液を用いた場合、二重鎖を形成するということが確認できた。

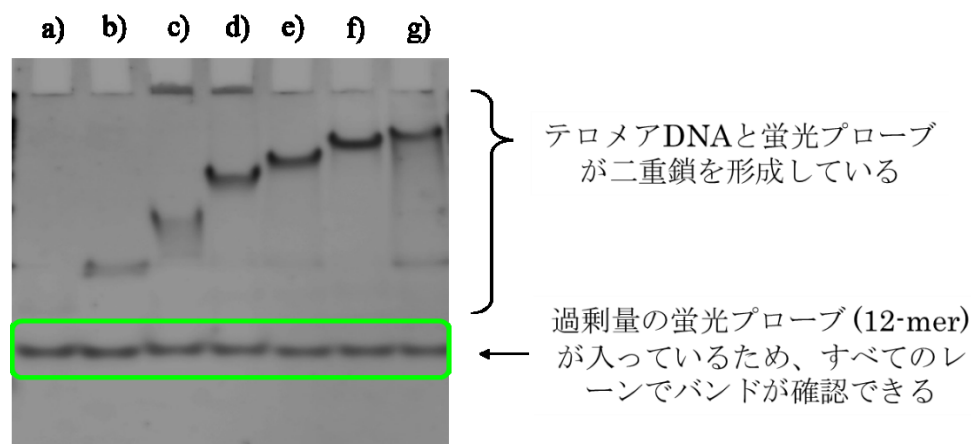


Fig. 2-5 Gel electrophoretogram of telomeric DNA and FAM probe. Lane a) HT12, b) HT24, c) HT36, d) HT48, e) HT60, f) HT72, g) HT84.

2.2.3 蛍光測定

CD 測定及び PAGE により、テロメア DNA と蛍光プローブは二重鎖を形成していることが分かった。そこで、蛍光分光計を用いて以下の3つの場合、a) TS プライマーに付加されるテロメア鎖が長く伸長される、b) 多数の TS primer が伸長される、c) a) 及び b) が同時に起こる、を想定した測定方法で本手法の定量性について検証を行った。

2.2.3 a) テロメア鎖長の違いによる蛍光消光率の変化

第一ステップとして、異なる鎖長 $[5'-(\text{TTA GGG TTA GGG})_n-3', n = 1-7]$ のテロメア DNA をそれぞれ $1 \mu\text{M}$ になるように調製し、すべてのサンプルに同量 (過剰量) の蛍光プローブと EB を加えて測定を行った (Fig. 2-6)。測定時の蛍光セル内における各濃度は、テロメア DNA が 0.10 nM 、蛍光プローブが 5.0 nM 、EB は $0.10 \mu\text{M}$ である。蛍光消光率 (FQ) は、以下の式 (eq. 2-1)を用いて算出した。

$$\text{FQ (\%)} = 100 [(1 - \text{FI}_{\text{EB}}/\text{FI}_{\text{free}}) - (1 - \text{FI}_{\text{eb}}/\text{FI}_{\text{free}})] \quad (\text{eq. 2-1})$$

FQ: Fluorescence quenching ratio

FI_{EB} : Fluorescence intensity of EB-amended sample with telomeric DNA

FI_{free} : Fluorescence intensity of EB-free sample with or without telomeric DNA

FI_{eb} : Fluorescence intensity of EB-amended sample without telomeric DNA

※Fluorescence wavelength: 516 nm.

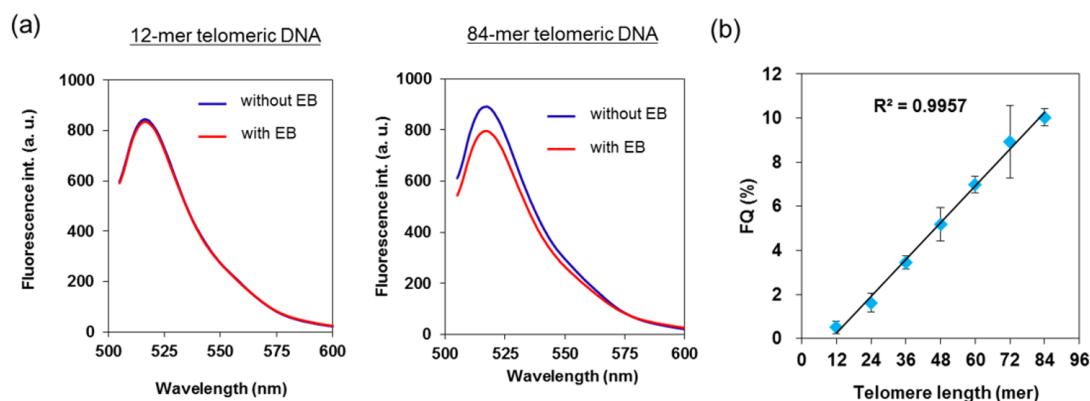


Fig. 2-6 (a) Fluorescence spectra of the FAM probe with HT12 (left) and HT84 (right) with or without EB. (b) Relationship between the FQ value ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 494 \text{ nm}/516 \text{ nm}$) and telomere length measured at 4 °C. Each sample contains 5 nM FAM probe, 0.1 nM telomere strand, and 0.1 μM EB. Error bars represent SD from $n = 4$ experiments.

Fig. 2-6 (a) より、HT12 よりも HT84 の方が EB の添加による蛍光消光の効果が大きかった。これはテロメア DNA の濃度が等しい場合、テロメア鎖長の増加に伴いハイブリダイズしている FAM プロブ数が増加し、FAM から EB への FRET によって蛍光消光されるプロブ数が増加することに起因している。Fig. 2-6 (b) に示す通り、テロメア鎖長に依存して直線的に蛍光消光率が増大していることから、本法によりテロメア鎖長の定量が可能である。Fig. 2-6 (b) のプロットから得られた近似曲線が原点を通過しない理由としては、HT12 の場合、FAM の周囲に DNA 鎖が無いために FAM と EB 間の距離が他のハイブリダイズしているプロブ（鎖長が長い場合）よりも離れており、エネルギー移動効率（蛍光消光の効率）が低下していることが考えられる。故に、鎖長が長い場合であってもテロメア鎖の最も 3'末端側では同様の減少が起こると推察される (Fig. 2-7)。

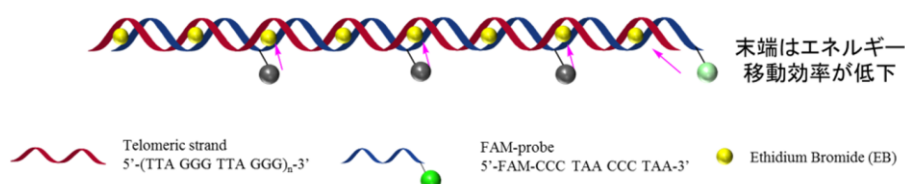


Fig. 2-7. Schematic illustration of FRET efficiency from FAM to EB.

2.2.3 (b) テロメア DNA 濃度の違いによる蛍光消光率の変化

次のステップとして、48-mer のテロメア DNA [(TTAGGG)₈] を異なる濃度に調製し、濃度 (テロメア DNA の物質量) の増加に伴い FAM の蛍光消光率が変化するかを検証した。測定時のセル内の蛍光プローブ濃度は 5.0 nM、EB は 1.0 μ M とし、テロメア DNA の濃度は 0.10~1.5 nM とした。蛍光消光率は eq. 2-1 により算出し、その結果を Fig. 2-8 に示す。テロメア DNA の濃度増加に伴い蛍光消光率の値が直線的に増大したことから、本手法によりテロメア DNA 濃度も定量することが可能である。また、非相補的な配列である NC48 を用いた場合は DNA 濃度を増加させても蛍光の消光は観測されなかった (FQ \approx 0)。NC48 の場合、FAM プローブは二重鎖形成しないため FAM から EB への FRET が誘起されない。従って、ターゲット配列のみを選択的に検出することが可能である (Fig. 2-8 (a))。ネガティブコントロール (NC) 配列の相補鎖 DNA の 5'末端を FAM でラベル化したプローブ (FAM-CC probe) を用いた場合では、HT48 のサンプルは蛍光消光が観測されないのに対し、NC48 は濃度依存的に蛍光消光率が増大した (Fig. 2-8 (b))。

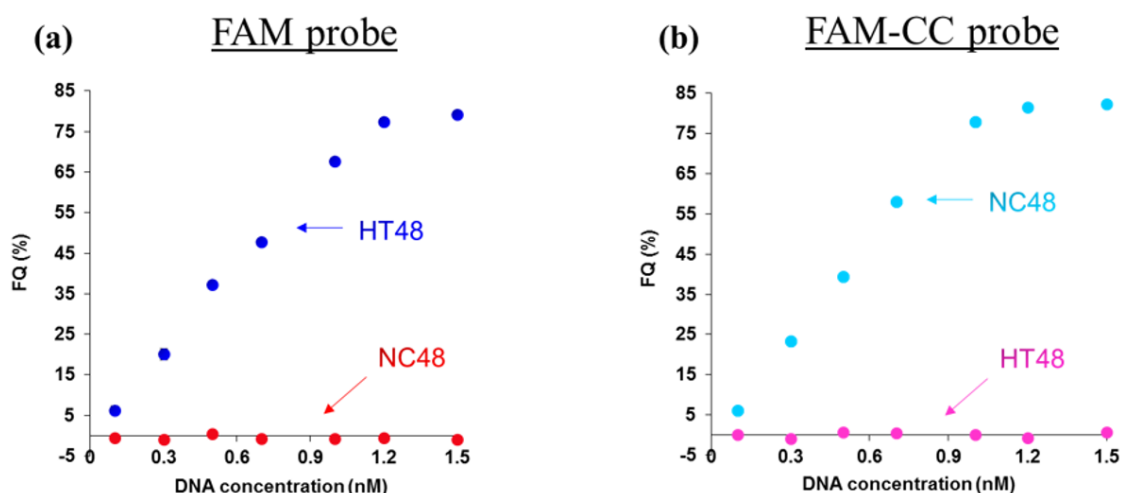


Fig. 2-8 Relationship between the FQ value ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 494 \text{ nm}/516 \text{ nm}$) and the concentration of (a) HT48 (blue) or NC48 (red) with FAM probe, 4°C. (b) NC48 (light blue) or HT48 (pink) with FAM-CC probe, 4°C. Each sample contains 5 nM probe and 1 μ M EB.

これらの結果を併せると、2.2.3 で提示した課題は、テロメア鎖長 (a) の条件とテロメア鎖濃度 (b) の条件を区別することなく蛍光消光率という 1 つの尺度で定量することで解決できることが示唆される。

2.2.3 (c) テロメア混合物およびそれぞれの濃度における蛍光消光率の変化

2.2.3 a) 及び b) の結果から、テロメア DNA の鎖長および同一鎖長の場合では濃度に応じて蛍光消光率が変化するということが分かった。しかしながら、実際の測定では、伸長されるテロメア DNA の長さは不均一であり、かつテロメア DNA が付加される TS primer の物質量も不明である。つまり、さまざまな長さのテロメア DNA を含み、かつ濃度も異なる、という条件で測定を行う必要がある。そこで、Table 2-2 で示すような組成で7種類のサンプルを調製し、それぞれのテロメア DNA のユニット濃度 (TTAGGGTTAGGG の 12 塩基を 1 ユニットとする) を変化させて測定を行った。評価の際、X 軸は、含まれるテロメア DNA の平均鎖長 (TL Ave.) とセル中に含まれるテロメア DNA 混合溶液の体積 (Volume) から算出されたテロメアユニット濃度 (Telomere units)、つまり測定溶液中にどの程度のテロメア DNA が含まれているかという指標である。この値が大きいものほど、測定溶液中に含まれているテロメア DNA のユニット数が多い。結果を Table 2-4 及び Fig. 2-9 に示す。

Table 2-4 Composition of telomeric DNA in sample solution

Sample	TL Ave. (mer)* ¹	Volume(μL)* ²	Telomere units (nM)* ³	FQ (%)
A	14.4	0.1	0.0600	1.75
B	20.4	0.3	0.255	3.47
C	27.6	0.6	0.690	7.64
D	36.0	0.9	1.35	18.0
E	43.2	1.2	2.16	26.8
F	57.6	1.4	3.36	49.8
G	72.0	1.6	4.80	63.6

*1: average length of the mixture of telomeres

*2: each sample was diluted by the buffer in fluorescence cuvette, and total volume was 2.0 mL.

*3: Telomere units concentration [e.g; 72-mer: $1 \mu\text{M} \times (1.6 \mu\text{L}/2.0 \text{ mL}) \times (72\text{-mer}/12\text{-mer})$]

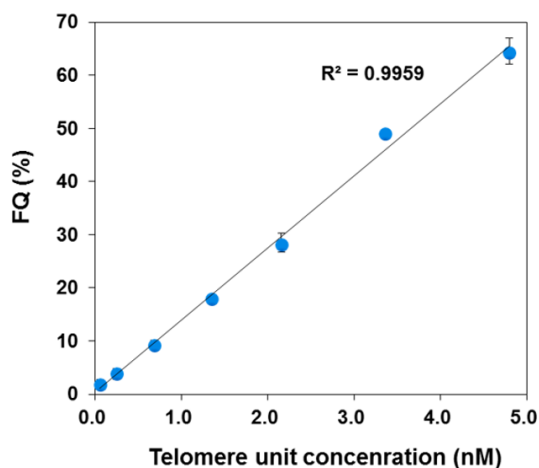


Fig. 2-9 Relationship between the FQ value ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 494 \text{ nm}/516 \text{ nm}$) and the concentration of telomere units at 4 °C. The telomere unit represents the converted concentration (nM) of the mixture of various length telomeres into 12-mers (TTAGGG)₂. Each sample contains 5 nM FAM probe and 1 μM EB. Error bars represent SD from $n = 3$ experiments.

Fig. 2-9 で示すように鎖長の異なるテロメア混合物をさまざまな濃度で混合して調製した場合でも直線関係が得られたことから、本手法の測定原理に基づいた FRET が FAM と EB 間で起こっており、テロメラーゼ活性測定法への応用が可能であると考えられる。

2.2.4 HeLa 細胞のテロメラーゼ活性評価

がん細胞である HeLa 細胞は、TRAP assay における positive control としても利用されている⁸⁾。FRET を利用した PCR フリーかつ簡便なテロメラーゼ活性測定法の実用性を検証するため、HeLa 細胞のテロメラーゼ活性を検出することを試みた。

2.2.4.1 K⁺および Mg²⁺イオンによる蛍光消光率への影響

テロメラーゼによるテロメア DNA の伸長反応を行う際、反応用緩衝溶液には 63 mM KCl と 1.5 mM MgCl₂ が含まれており、これらが含まれていることでテロメア DNA は G-quadruplex 構造を形成しやすくなる^{7,9)}。G-quadruplex 構造の形成による蛍光消光率の低下を防ぐために、ハイブリダイゼーション時に高塩濃度の 1 M LiCl and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4) を用いた。Fig. 2-10 に 63 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂ and 20 mM Tris-HCl buffer のみの場合と 1 M LiCl を含む緩衝溶液を用いた場合の蛍光消光率を示す。

K^+ および Mg^{2+} を含む緩衝溶液のみ（図中赤色丸印）では、蛍光消光率が Fig. 2-6 よりも低下しているが、これはテロメア DNA が G-quadruplex を形成し、ハイブリダイズした蛍光プローブ数が減少したことに起因していると考えられる。一方、1 M LiCl を含む緩衝溶液を用いた場合、Fig. 2-6（図中青色丸印）と同程度の蛍光消光率が得られ、 K^+ や Mg^{2+} イオンの影響を受けない。従って、ハイブリダイゼーション時に 1 M LiCl を含む緩衝溶液を用いることで、テロメア伸長反応で使用する緩衝溶液中の K^+ や Mg^{2+} の影響を考慮することなくテロメア DNA を測定できることが示唆された。

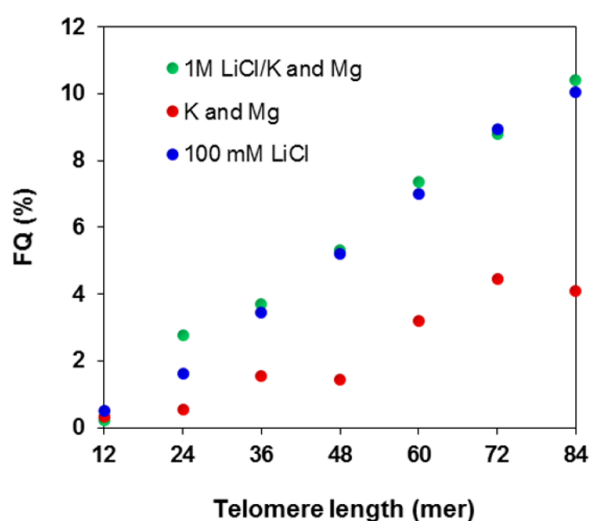


Fig. 2-10 Fluorescence quenching ratio in K^+ and Mg^{2+} and 1 M LiCl buffer (green), K^+ and Mg^{2+} buffer (red) and 100 mM LiCl buffer (blue), 4°C, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 494\text{ nm}/516\text{ nm}$.

2.2.4.2 TRAP assay による HeLa 細胞中のテロメラーゼ活性の確認

実験で使用する HeLa 細胞中のテロメラーゼ活性に関して、活性の有無を TRAP assay により確認した。試料調製などの操作方法は、2.1.8 に記載した方法で行った。

Fig. 2-11 に PAGE の結果を示す。Lane a) はラダー (10-100 bp) で、Lane b) は HeLa extracts を加えていない場合、Lane c) は HeLa extracts を加えた場合を示している。Lane b) でいくつかバンドが見られるが、本来テロメラーゼが含まれていない場合はバンドが見られないため、これは HeLa extracts がサンプルにコンタミネーションしてしまったからではないかと考えられる。TRAP assay を用いたテロメラーゼ活性の測定に関する報告では、Negative control では Internal control のバンドのみが現れた理想的な結果が示されていることが多いが、実際にある程度の熟練と細心の注意をもって行わないと、この場合のように

偽陽性が現れてしまうことも多く、そのことがより簡便な定量法を開発すべき大きな理由ともなっている。一方、Lane c) では、50 bp から 6 bp ごとにバンドが見られ、100 bp ラダーよりも上のあたりにもバンドが見られた。このように 6 bp ごとに伸長産物が見られたことから、本研究で用いた HeLa 細胞中のテロメラーゼは活性を有しているということが分かった。

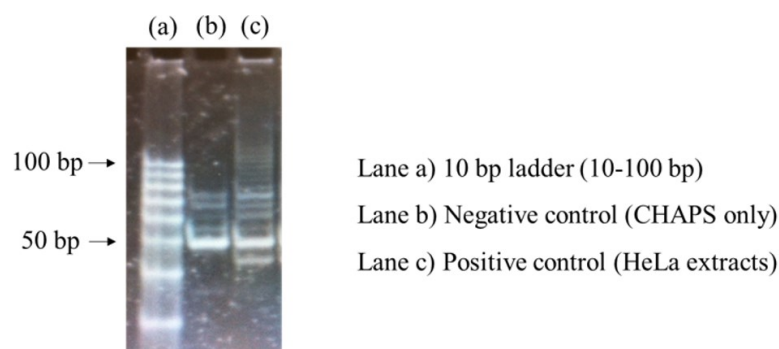


Fig. 2-11 Gel electrophoretogram to confirm the telomerase activity of HeLa extracts by TRAP assay.

2.2.4.3 HeLa extracts を用いた新規測定法によるテロメラーゼ活性測定

FRET を利用した簡便なテロメラーゼ活性測定法が、実際のテロメラーゼ活性試験へ応用可能であるかを検討するため、がん細胞である HeLa 細胞から粗抽出したテロメラーゼを用いて実験を行った。試料の調製および測定方法は、2.1.8 及び 2.1.9 に示した。伸長反応における HeLa extracts の濃度は、200、400、600、800 cells/μL になるように調製した。それぞれの蛍光消光率を図示したものが Fig. 2-12 である。この際の蛍光消光率 (FQ_{HeLa}) は、eq.2-1 で示した式を基に、以下の式で算出した (eq. 2-2)。不活性なテロメラーゼサンプルとして HeLa extracts を熱処理したサンプルを用いるため、染色体 DNA 中にあるテロメア領域に蛍光プローブがハイブリダイズした部分は相殺されることになり、これによる蛍光消光率は無視できると考えられる。

$$FQ_{\text{HeLa}} (\%) = FQ_{\text{NHT}} - FQ_{\text{HT}} \quad (\text{eq. 2-2})$$

FQ_{NHT} : Fluorescence quenching ratio of non-heat-treated (telomerase active) sample

FQ_{HT} : Fluorescence quenching ratio of heat-treated (telomerase deactivated with heat) sample

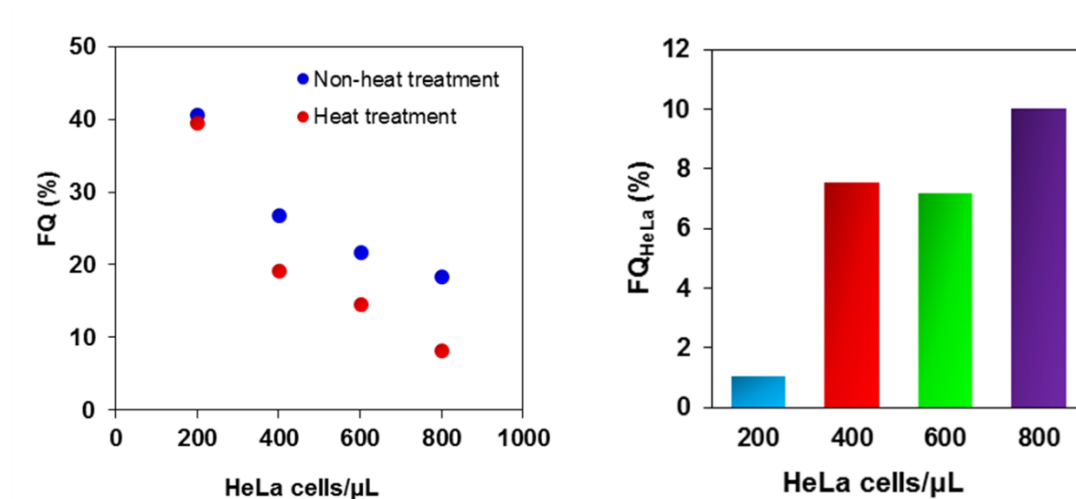


Fig. 2-12 (a) Relationships between FQ_{NHT} (blue) and the FQ_{HT} (red) and cell count. 200-800 cells per μL measured at 4 °C ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}/516 \text{ nm}$). Each sample contained 0.5 nM FAM probe and 5 μM EB. (b) Calculated FQ_{HeLa} values from (a).

Fig. 2-12 より、400 cells/μL における蛍光消光率が高くなっているが、200、600 および 800 cells/μL においては直線関係が得られた。実際のがんの診断においては、テロメラーゼの活性を正確に定量する必要はなく、がん細胞であるか正常細胞であるかが正しく判断できればよい。そのため、TRAP assay ではテロメラーゼ由来のバンドの確認、その他の測定ではしきい値を設定し、その値以下では正常（テロメラーゼが発現されていない）、その値以上ではガン（テロメラーゼが活性化されている）というように判断している。したがって、今回検討している FRET を利用した測定法によって、がん細胞である HeLa 細胞のテロメラーゼの活性が判断できることから、本法をがん診断に応用することが可能であると考えられる。

2.3 結論

本法は、PCR による増幅を行わないため検出感度は TRAP assay と比べて低い、増幅を行わずに測定を行うことで PCR 阻害物質の影響を考慮する必要がない。従って、より精度の高い測定が行えると考えられる。また、TRAP assay ではゲル電気泳動といった煩雑な操作を要するが、本法は蛍光プローブと EB を加えて測定するだけという簡便な測定が可能である点も大きなメリットである。しかしながら、EB の使用には、発がん性の疑いを含めいくつか問題点があり、第 3 章では、iFRET による測定法の欠点を解消できる AIE 色素ラベル化 DNA プローブについて述べる。

2.4 参考文献

1. W. M. Howell, M. Jobs and A. J. Brookes, *Genome. Res.*, 2002, **12**, 1401-1407.
2. a) S. Nagatoishi, T. Nojima, E. Galezowska, B. Juskowiak and S. Takenaka, *ChemBioChem*, 2006, **7**, 1730-1737. b) N. Soh, K. Makihara, E. Sakoda and T. Imato, *Chem. Commun.*, 2004, 496-497. c) M. Torimura, S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa and R. Kurane, *Anal. Sci.*, 2001, **17**, 155-160. d) B. G. Moreira, Y. You, M. A. Behlke and R. Owczarzy, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 2005, **327**, 473-484.
3. a) R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson, *Bio/Technology*, 1993, **11**, 1026-1030. b) S. Nafisi, A. A. Saboury, N. Keramat, J. F. Neault and H. A. Tajmir-Riahi, *J. Mol. Struct.*, 2007, **827**, 35-43.
4. a) C. T. Wittwer, M. G. Herrmann, A. A. Moss and R. P. Rasmussen, *BioTechniques*, 1997, **22**, 130-138. b) H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen and F. Vitzthum, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, e103.
5. T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.*, 1959, **27**, 7-17.
6. 木下一彦・御橋廣眞編、2002、「蛍光測定—生物科学への応用」、学会出版センター.
7. a) D. Miyoshi, M. Inoue, N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 7716-7719. b) R. Funayama, Y. Nakahara, S. Kado, M. Tanaka and K. Kimura, *Analyst*, 2014, **139**, 4037-4043.
8. L. Xu, W. Wu, J. Ding, S. Feng, X. Xing, M. Deng and X. Zhou, *RSC. Adv.*, 2012, **2**, 894-899.
9. M. A. Piatyszek, N. W. Kim, S. L. Weinrich, K. Hiyama, E. Hiyama, W. E. Wright and J. W. Shay, *Methods Cell Sci.*, 1995, **17**, 1-15. b) N. W. Kim, F. Wu, *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 2595-2597.

第3章 AIE 色素ラベル化 DNA プローブを用いたテロメア DNA 検出法の開発

第2章では、蛍光プローブとインターカレーターを用いたテロメア DNA の定量法について述べたが、この方法には改善すべき点として以下の4つが挙げられる。

i) 蛍光色素が2種類必要である。

ii) 染色体 DNA にも EB が結合する。→シグナル応答に影響

iii) EB の発がん性が懸念される (大半のインターカレーターに当てはまる)¹⁾。

iv) “Signal-OFF” 型の検出システムである。

従って、インターカレーターを使用せずに1種類の蛍光色素のみでテロメア DNA を検出できることが望ましい。しかしながら、汎用されている蛍光色素では二重鎖 DNA 形成と一本鎖 DNA への解離によって生じる蛍光強度の差は小さく、1種類のプローブのみで DNA を検出することは困難である。1種類のプローブで DNA を検出するには、プローブの結合(二重鎖形成)に伴って色素部位の環境が変化し、蛍光シグナルが得られるような機能性蛍光色素をラベル化剤として用いる必要がある。機能性蛍光色素として、pH に応じて蛍光の ON/OFF や蛍光波長が変化する pH 応答性蛍光色素²⁾や溶媒の極性(色素周辺の環境の違い)によって蛍光波長が大きく変化するソルバトクロミック蛍光色素³⁾、力を加えたり蒸気を噴霧することによって可逆的に蛍光波長が変化するメカノフルオロクロミック色素⁴⁾などの多様な機能をもつ化合物が報告されている。機能性色素の中で特に、近年注目されているのが AIE 色素であり、申請者も AIE 色素の機能(性質)に着目した。AIE 色素は第1章で述べたように、“結合”や“凝集”に伴う RIR によって蛍光強度が増大する性質がある。そこで、テロメア DNA の相補鎖に AIE 色素を導入したプローブを用いれば、テロメア DNA と二重鎖を形成した際にシグナル応答が得られるのではないかと考えた。DNA は、Fig. 3-3 で示すホスホロアミダイト(phosphoramidite)法⁵⁾により固相上で合成可能で、蛍光色素のホスホロアミダイトモノマーを合成できれば DNA の 5'末端に蛍光色素を導入したプローブが容易に合成できる⁶⁾。あるいは、末端にアミノ基(-NH₂)⁸⁾やアルキニル基(-C≡CH)⁹⁾、チオール基(-SH)¹⁰⁾などを修飾することによりそれぞれカルボキシル基(-COOH)、アジド基(-N₃)、マレイミド基を有する蛍光色素を DNA に導入できる。本研究では、カルボキシル基を有する AIE 色素を利用するため、6-アミノ-1-ヘキサノールのアミノ基を Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) 基で保護したリンカー(Fmoc-Acp-ol)をホスホロアミダイト化し、DNA に導入した後に Fmoc 基を脱保護して 5'末端をアミノ化した DNA の合成を行った。その後、カルボキシル基を有する AIE 色素とアミノ化 DNA とのカップリングにより AIE 色素ラベル化 DNA を合成した。ラベル化に用いる AIE 色素には、TICT (Twisted-Intramolecular Charge Transfer) 特性を有するトリフェニルアミン誘導体を選択した。

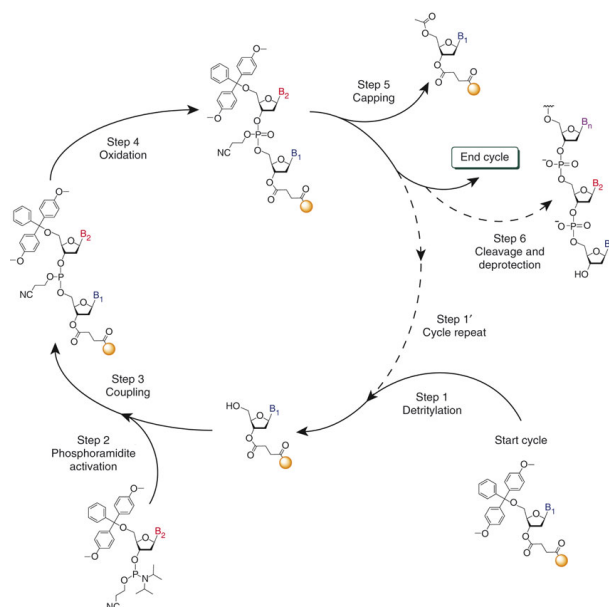


Fig. 3-3. Phosphoramidite synthesis cycle⁷⁾.

TICT とは、電子供与性基 (Donor となる部位) と電子求引性基 (Acceptor となる部位) を有する蛍光色素において観測される現象である。代表的な化合物としては 4-ジメチルアミノベンゾニトリルがあり、この色素は非極性溶媒中では局所励起 (LE: Locally Excited) 状態から基底状態に戻る際に蛍光を示すが、極性溶媒中では励起状態において Donor と Acceptor 部位にねじれが生じ (TICT state)、この分子内回転運動を伴う状態変化により蛍光消光が誘起される (Fig. 3-4)¹¹⁾。また、極性溶媒中では溶媒分子の再配向による安定化効果が大きいために、蛍光波長のレッドシフトが起こる。

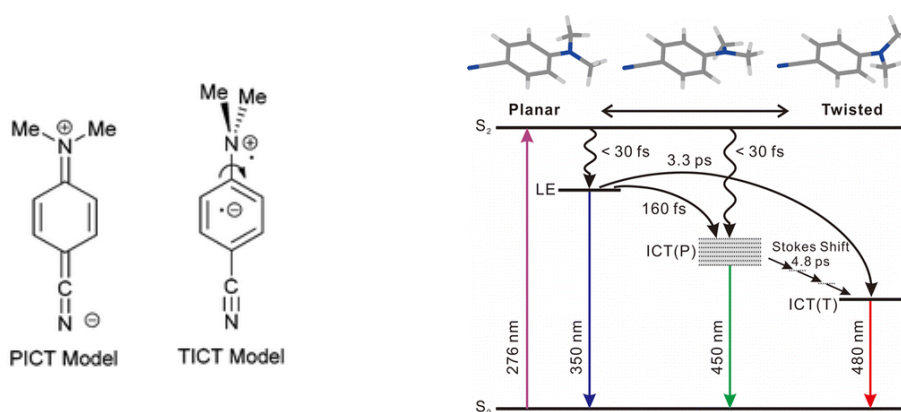


Fig. 3-4 ICT models of DMABN¹²⁾ (left) and Schematic representation of the ICT Pathways of DMABN in Acetonitrile¹¹⁾ (right). DMABN: 4-Dimethylaminobenzonitrile, PICT: Photoinduced-Intramolecular Charge Transfer, TICT: Twisted-Intramolecular Charge Transfer.

TICT 型の蛍光色素は水溶液中では無蛍光または弱蛍光であるが、色素によっては凝集などにより分子内回転運動 (TICT) が抑制されると AIE 色素と同様に蛍光強度が増大することが Tang らによって報告されている¹³⁾。TPE やシロールのように溶媒を問わず蛍光消光が起こる誘導体は少なく、長波長蛍光の蛍光色素を使用したい場合に以下の問題点が生じる。i) 分子サイズが大きくなる (疎水性が高くなる)、ii) 蛍光団部位の構造的平面性が高くなる (AIE 特性が失われる可能性がある)。一方、TICT 型蛍光色素は分子サイズが小さい場合でも長波長蛍光を示すものもあり、TICT 型 AIE 色素を用いて、DNA の検出が可能であるならば、プローブにラベル化する色素の蛍光波長の選択幅を広げることができる。また、テロメア DNA の検出だけではなく、SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)¹⁴⁾ や triplet repeats DNA¹⁵⁾ の検出などにも応用できると考えられる。TICT 型 AIE 色素の合成及びラベル化 DNA プローブの合成は 3.1 に、得られた結果及び考察は 3.2 に示す。

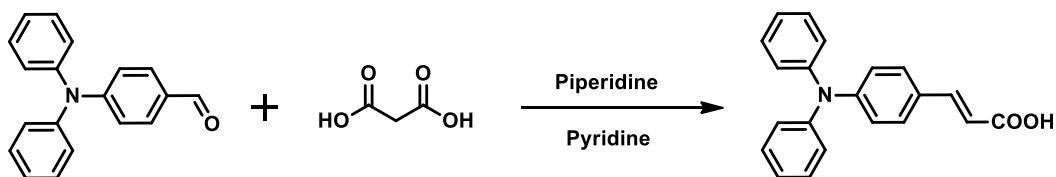
3.1 実験操作

AIE 色素合成用試薬及び反応溶媒は、和光純薬工業株式会社、東京化成工業株式会社及び渡辺化学工業株式会社より購入した特級または一級試薬を使用した。NMR の重溶媒には、和光純薬工業株式会社製の Chloroform-d を使用した。薄層クロマトグラフィー (TLC) には Merck 社製 Silicagel 60 F254 neutral を使用した。カラムクロマトグラフィーには和光純薬工業株式会社製 Wakogel C-200 を使用した。HPLC 用溶離液には、和光純薬工業株式会社より購入した HPLC grade のメタノールを使用した。DNA 合成用試薬及び溶媒は Glen Research 社より購入したものを使用した。各鎖長のテロメア DNA 及びネガティブコントロール DNA は、北海道システムサイエンス社より購入したものを使用した。

HPLC による精製は、Waters 社製 Alliance HPLC e2695 Separation Module を、検出には 2489 UV/Visible Detector を用いた。¹H-NMR 及び ¹³C-NMR スペクトルは、日本電子社製 JNM-ECA500 型核磁気共鳴装置 (共鳴周波数: ¹H, 500 MHz) を用いて測定を行った。ケミカルシフトは、Tetramethylsilane ($\delta = 0$ ppm) を内部標準とした。ESI-MS の測定は、Waters 社製 micromass ZQ 2000 を使用した。MALDI-TOF-MS の測定は、Bruker Daltonics 社製 Autoflex III smartbeam を使用した。DNA のアニーリングには、ASTEC 社製 GeneAtlas 325 (Thermal cycler) を使用した。蛍光スペクトルの測定には、日本分光社製 FP-6200 (4℃条件) と島津製作所社製 RF-5300PC (室温条件) を使用した。UV による DNA の濃度決定には、日本分光社製 V630 を使用した。

3.1.1 TICT 型 AIE 色素 (TPA-COOH) の合成

<反応式>



4-(*N,N*-ジフェニルアミノ)ベンズアルデヒド (277 mg, 1.01 mmol) とマロン酸 (530 mg, 5.10 mmol) をピリジン (5 mL) に溶解させた後、ピペリジン 0.25 mL を加えて 80°C で一晩攪拌した。反応混合物に、1*N*-HCl 水溶液を加えて目的物を沈殿させた後、吸引濾過を行った。濾紙上の固体を蒸留水で洗浄した後、回収し、メタノールで再結晶を行った。得られた橙色結晶は吸引濾過を行った後、濾紙上の結晶を冷メタノールで洗浄した。回収した結晶を真空乾燥することで目的物を得た。

<収率>

77.6% (248 mg, 0.787 mmol)

<ESI-MS>

m/z calcd for C₂₁H₁₇NO₂; 315.13, found 316.20 (M+H⁺).

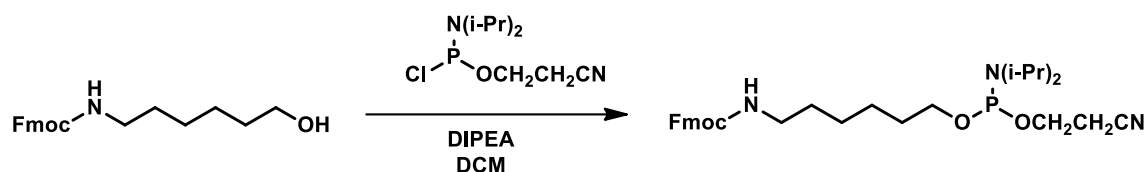
<NMR>

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 7.72 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 8.0 Hz, 4H), 7.13 (d, *J* = 7.0 Hz, 4H), 7.12 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 8.5 Hz), 6.29 (d, *J* = 16 Hz, 1H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 172.57, 150.27, 146.78, 146.65, 129.58, 129.51, 126.89, 125.51, 124.15, 121.41, 114.11.

3.1.2 Fmoc-Acp-phosphoramidite monomer の合成

<反応式>



Fmoc-Acp-ol (102 mg, 0.300 mmol) を DCM (4 mL)/ACN (1 mL) に懸濁させた後、DIPEA (137 μ L, 0.800 mmol) を加えて室温で 5 分間攪拌した。次いで、2-シアノエチル-*N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (134 μ L, 0.600 mmol) を加えてさらに 10 分間攪拌した。反応終了後、溶液を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (DCM/Ethyl acetate/TEA = 5/1/0.01) で精製した。得られたホスホロアミダイトモノマーはすぐに DNA 合成に使用した。

3.1.3 DNA の固相合成及び AIE 色素のラベル化

本研究に用いたヌクレオチド (5'-CCC TAA-3') 及び (5'-CCC TAA CCC TAA-3') は、ホスホロアミダイト法により固相合成した。まず、3'末端のヒドロキシル基 (OH 基) を CPG (Controlled Pore Glass) 担体に固定した塩基部位がアデニンのヌクレオチドを出発物質とし、5'末端にある DMTr 保護基を 3%トリクロロ酢酸/ジクロロメタン溶液で脱保護した後、リン酸基 β -シアノエチル基を有するホスホロアミダイト体及びテトラゾールを用いて、固相上のヌクレオチドの 5'末端の OH 基とのカップリングを行った。反応時間は通常の核酸塩基のアミダイト体の場合、カップリング時間を 300 秒、リンカー (Fmoc-Acp-ol) のアミダイト体の場合、カップリング時間を 300 秒で反応回数を 2 回とした。未反応の 5'末端 OH 基は無水酢酸及び 1-メチルイミダゾールによってアセチル化し、キャッピング(閉塞)を行った。また、カップリング反応生成物は酸及び塩基に対して不安定な三価の亜リン酸トリエステルであるので、ヨウ素を用いて酸化させ、五価のリン酸トリエステルとした。カップリング反応の効率は、DMTr 基の脱保護の際に生じる 498 nm の吸収波長をもつ DMTr⁺の呈色により確認した。

合成したリンカー修飾 DNA への AIE 色素のラベル化は以下の手順で行った。1) 2%ジイソプロピルアミン/アセトニトリル溶液 3 mL を DNA 合成用カラムに 2 回流し、 β -シアノエチル基の脱保護を行った。2) 20%ピペリジン/DMF 溶液 2 mL を DNA 合成用カラムに加えて 15 分間処理することで Fmoc 基の脱保護を行った。3) N₂ ガスを噴きつけて乾燥

させた後、AIE 色素 (15 mg) を 0.15 M HATU, 0.15 M HOBt, 0.3 M DIPEA を含む NMP (0.5 mL) に溶解させ、溶液を DNA 合成用カラムに加えて 1 時間カップリングを行った。カップリング終了後、アセトニトリルを用いて洗浄し、再び N₂ ガスを噴きつけて乾燥させた。得られた AIE-DNA コンジュゲートは、25%アンモニア水 2.5 ml を 0.5 ml/10 min. の間隔で加えて CPG 担体から切り出した。その後、核酸塩基部位のベンゾイル保護基を脱保護するため 25%アンモニア水中、55℃で 12 時間加熱処理を行い、凍結乾燥した。反応スキームを Fig. 3-5 に示す。

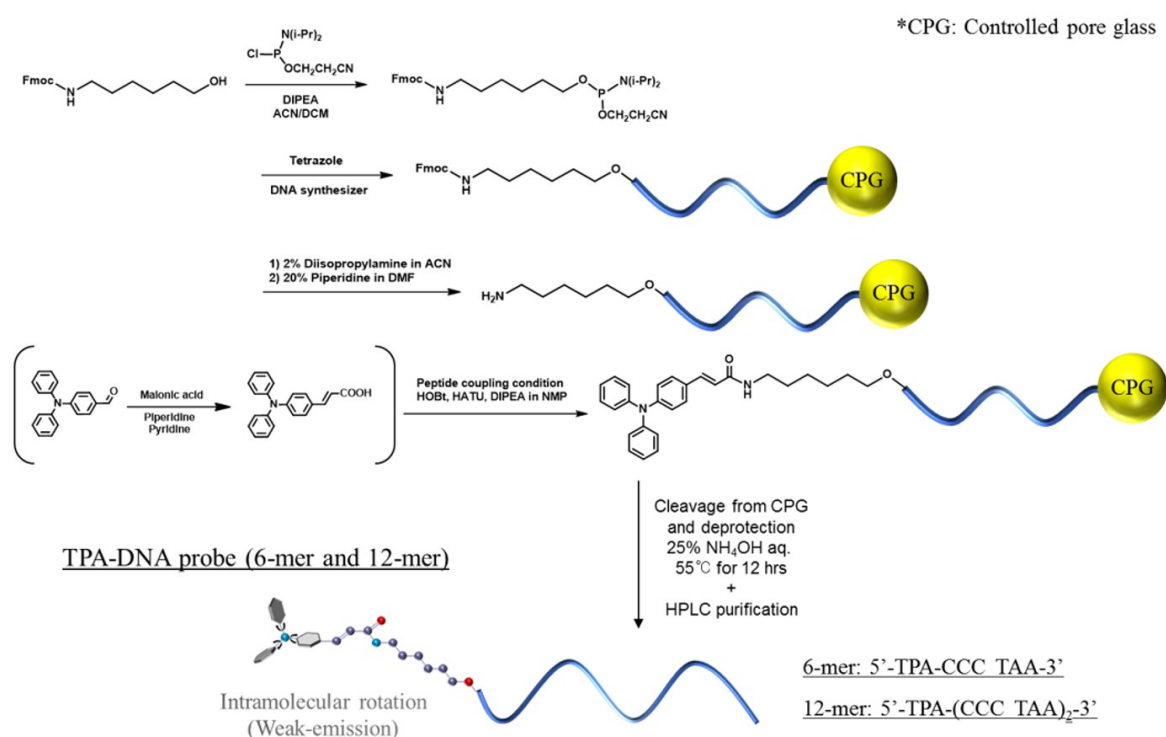


Fig. 3-5 Reaction scheme of TPA-DNA probes. Oligonucleotides (6- and 12-mer) were synthesized on solid support (CPG) with DNA synthesizer.

3.1.4 AIE-DNA probe の HPLC 精製

上記の方法で得られた AIE-DNA は Sep-pak plus C18 cartridge column (Waters 社製) で簡易精製を行った後、HPLC により精製を行った。カラムは GL Sciences 社製 Inertsil® ODS-3 (5 μm, 10×250 mm) column を使用し、温度は 40℃に設定した。溶離液として 0.01 M TEAA/MilliQ water と 0.01 M TEAA/MeOH を使用した。溶離液は以下の組成比 (Table 3-1) で使用し、260 nm 及び 350 nm の吸収を UV 検出器で確認しながら目的物を回収した。精製した AIE-DNA は凍結乾燥後、-20℃で保存した。

Table 3-1 Composition of eluents for purification of AIE-DNA probe.

Time/Solvent	0.01 M TEAA/MilliQ	0.01 M TEAA/MeOH
0 min.	100	0
25 min.	0	100
40 min.	0	100

*TEAA: Triethylamine/acetate buffer

Flow rate: 2 mL/min.

Retention time: 28.0-29.0 min (TPA-DNA6), 25.0-26.0 min (TPA-DNA12).

MALDI-TOF MS

i) TPA-DNA 6-mer: (m/z) calcd for $C_{84}H_{103}N_{23}O_{37}P_6$; 2211.53, found 2213.55 ($M+H^+$).

ii) TPA-DNA 12-mer: (m/z) calcd for $C_{141}H_{176}N_{44}O_{72}P_{12}$; 4008.83, found 4014.08 ($M+H^+$).

*Matrix: ANA (Anthranilic acid), Positive mode で測定

*DNA 6-mer: 5'-CCC TAA-3', DNA 12-mer: 5'-CCC TAA CCC TAA-3'.

UV スペクトル (TPA-DNA6 and TPA-DNA12)

TPA-DNA6 及び TPA-DNA12 を MilliQ に溶解させた後、UV スペクトルを測定し、トリフェニルアミン誘導体が DNA に結合しているかを確認した (Fig. 3-6)。

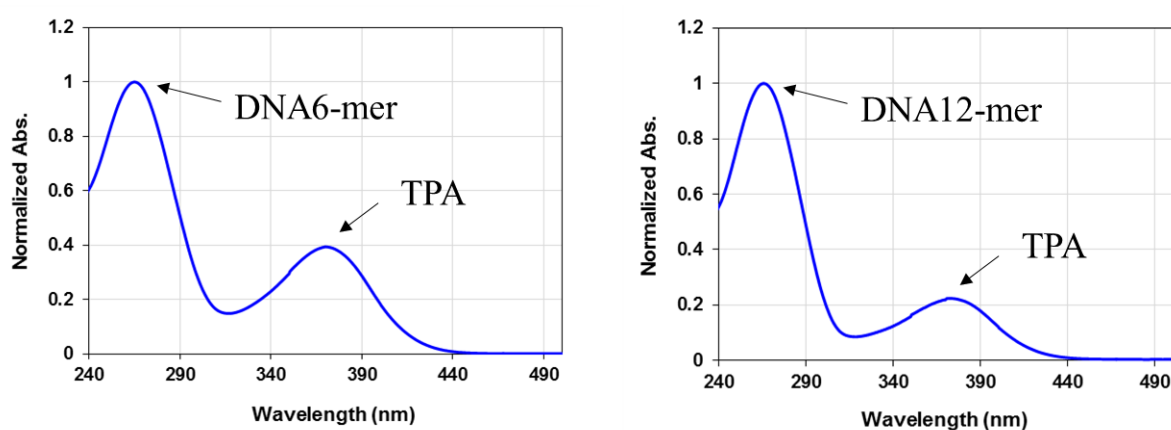


Fig. 3-6 Normalized UV spectra of TPA-DNA6 (left) and TPA-DNA12 (right) in MilliQ water. The absorptions of $\lambda_{(260)}$ and $\lambda_{(370)}$ were derived from DNA bases and TPA moiety, respectively.

3.1.5 AIE-DNA 蛍光測定用サンプルの調製

AIE-DNA プローブは MilliQ に溶解させた後、UV スペクトルを測定し、TPA-DNA6 及び TPA-DNA12 は 370 nm (ϵ_{370} : $3.0 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) の吸光度から濃度を算出した。測定に用いたテロメア DNA も同様に 260 nm の吸光度から濃度決定を行った (HT12: 1.2×10^5 , HT24: 2.4×10^5 , HT36: 3.7×10^5 , HT48: 4.9×10^5 , HT60: 6.1×10^5 , HT72: 7.3×10^5 , HT84: 8.6×10^5 , HT-NC36: 3.7×10^5 , NC48: 4.9×10^5 , NCC12: 1.1×10^5 , NCC48: 4.4×10^5 , 単位は $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 配列は Table 3-2 に示す。

各測定サンプルは、DNA を緩衝溶液 (5×Tris-HCl buffer: 250 mM LiCl and 100mM LiCl buffer, pH 7.5) で希釈して任意の濃度に調製した後、AIE-DNA プローブ溶液を加えた (測定濃度; 緩衝溶液: 50 mM LiCl and 20 mM Tris-HCl, AIE-DNA: 3 μM)。次に、90°C で 2 分間加熱した後、4°C まで冷却し、2 時間アニーリングを行った。室温に戻した後、測定溶液 200 μL を蛍光セルに加えて蛍光スペクトルを測定した。

Table 3-2 Probe and DNA sequences in this study.

Name	Sequence
TPA-DNA6	5'-TPA-linker-CCC TAA-3'
TPA-DNA12	5'-TPA-linker-CCC TAA CCC TAA-3'
HT12	5'-TTA GGG TTA GGG-3'
HT24	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₂ -3'
HT36	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₃ -3'
HT48	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₄ -3'
HT60	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₅ -3'
HT72	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₆ -3'
HT84	5'-(TTA GGG TTA GGG) ₇ -3'
HT-NC36	5'-TGA GTG TGA GTG TTA GGG TTA GGG TGA GTG TGA GTG-3'
NC48	5'-(TGA GTG TGA GTG) ₄ -3'
NCC12	5'-CAC TCA CAC TCA-3'
NCC48	5'-(CAC TCA CAC TCA) ₄ -3'

3.1.6 蛍光増大率の算出

測定したサンプルの蛍光増大率は以下の式から算出した (eq. 3-1)。

$$\text{Fluorescence increase ratio} = \text{FI}_\text{S}/\text{FI}_0 \quad (\text{eq. 3-1})$$

*FI_S: Fluorescence intensity at 505 nm of sample solution

*FI₀: Fluorescence intensity at 505 nm of blank solution (probe only)

3.2 結果と考察

3.2.1 TPA-DNA プロブの TICT による蛍光消光

トリフェニルアミン誘導体である TPA-COOH は TICT により、極性溶媒中では蛍光波長の長波長化及び分子内回転運動による蛍光消光が観測される色素である。この色素でラベル化した DNA が水溶液中で TICT により蛍光消光が誘起されるかを調べた。溶媒として極性の低い順に、テトラヒドロフラン (THF)、アセトン、メタノール、水を使用した。Fig. 3-7 で示すように、溶媒の極性が高くなるにつれて蛍光波長がレッドシフトし、また水溶液中では著しい蛍光消光が観測された。THF やアセトン中では DNA 部位の親水性が高いことから、凝集によってさらに強い蛍光を示したと考えられる。

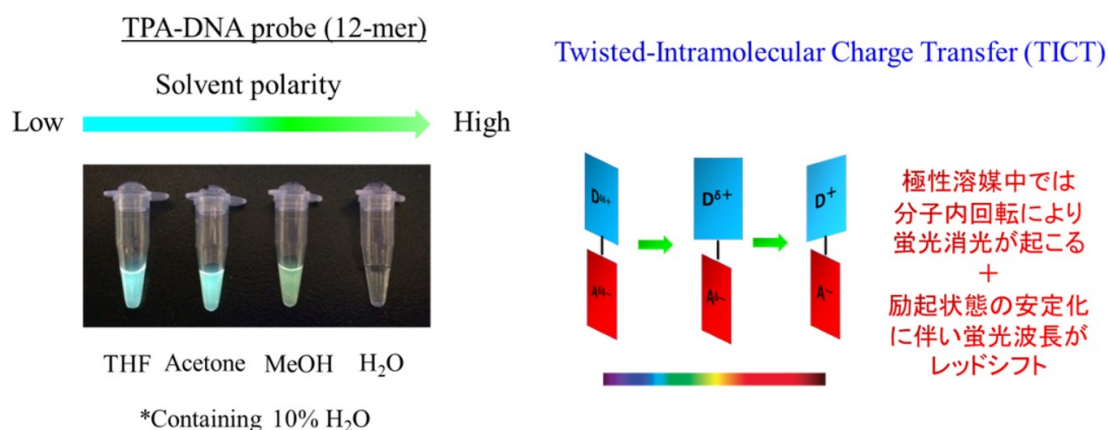


Fig. 3-7 Fluorescence image of 10 μM TPA-DNA12 in each solvent (THF, Acetone, MeOH and H₂O). THF, Acetone and MeOH solutions containing 10% H₂O (left) and schematic illustration of TICT mechanism (right).

3.2.2 反復配列 DNA を用いた TPA-DNA プローブの蛍光増大メカニズムの解明

合成した TPA-DNA プローブの蛍光プローブとしての有用性を検証するために、鎖長の異なるテロメア反復配列 DNA を用いて蛍光測定を行った。プローブ濃度を 3 μM に固定し、テロメア DNA 濃度はユニット濃度 (TTA GGG TTA GGG の 12 残基を 1 ユニットとする) を 1 μM に統一するためそれぞれ以下の濃度に調製した (Table 3-3)。

Table 3-3 Concentration of each telomeric DNA sample.

Sequence	HT12	HT24	HT36	HT48	HT60	HT72	HT84
Conc.	1 μM	0.5 μM	0.33 μM	0.25 μM	0.20 μM	0.167 μM	0.143 μM

蛍光測定の結果を Fig. 3-8 及び Fig. 3-9 に示す。TPA-DNA6 ではすべてのテロメア鎖長において蛍光強度が増大したが、TPA-DNA12 では HT12 のサンプルのみで蛍光強度の増大が見られなかった。また、TPA-DNA6 の場合でも HT12 の蛍光増大率が他の鎖長のサンプルと比較して低くなるという結果が得られた。TPA-DNA12 と HT12 のときのみ、プローブとターゲットの結合比が 1 : 1 であること (※TPA-DNA6 : HT12 = 2 : 1 であるが T_m 値が低いために HT12 1 分子に対して必ずしも 2 分子のプローブが結合しているわけではない)、従って、3'末端に結合している AIE プローブはそれ以外の AIE プローブと環境が異なることが示唆される。Fig. 3-10 で示すように、テロメア DNA の 3'末端がフリーの場合はプローブの蛍光増大は生じず [Fig. 3-10 (B)]、3'側にテロメア鎖が存在する場合は DNA 鎖の立体的な障害によってプローブの AIE 色素部位の分子内回転が抑制されて蛍光強度が増大することにより蛍光が ON の状態になる [Fig. 3-10 (C)]。HT24 や HT36 の場合の蛍光増大率は他の鎖長のサンプルと比較して低くなっており、これは DNA のモル数 (すなわち一本の DNA 鎖におけるテロメアユニットの数) が大きいほど二重鎖形成しても分子内回転が抑制されない (最もテロメア鎖の 3'末端側に結合した) プローブ分子数が増加することが原因であると考えられる。

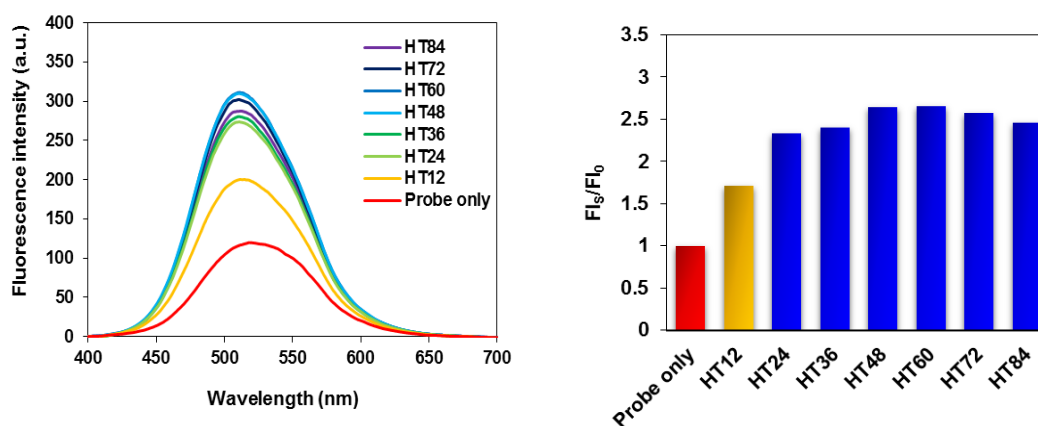


Fig. 3-8 Fluorescence spectra of TPA-DNA6 in the presence of various telomeric DNAs (HT12-HT84) (left) and the increase in the fluorescence ratios (right). [TPA-DNA6] = 3 μ M, [HT12] = 1 μ M, [HT24] = 0.5 μ M, [HT36] = 0.33 μ M, [HT48] = 0.25 μ M, [HT60] = 0.20 μ M, [HT72] = 0.167 μ M, [HT84] = 0.143 μ M in 50 mM LiCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 4 $^{\circ}$ C, λ_{ex} = 360 nm.

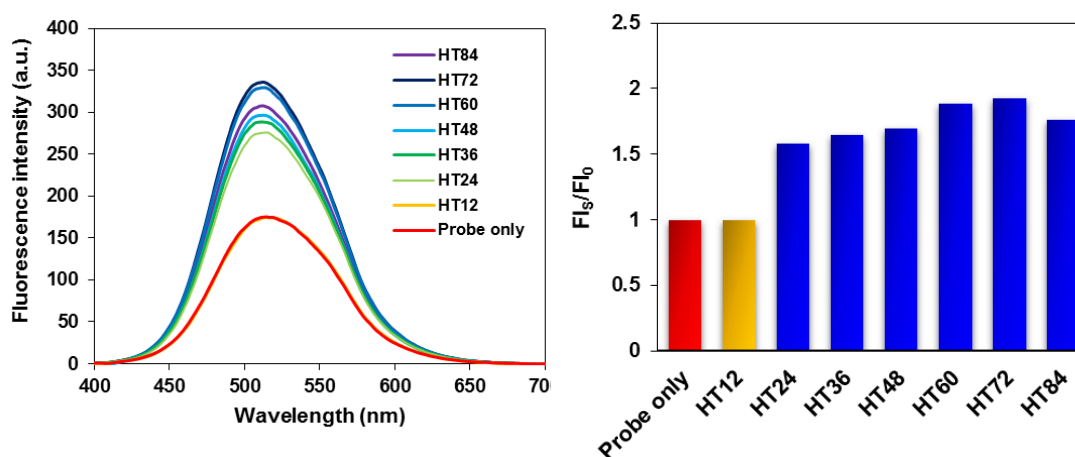


Fig. 3-9 Fluorescence spectra of TPA-DNA12 in the presence of various telomeric DNAs (HT12-HT84) (left) and the increase in the fluorescence ratios (right). [TPA-DNA12] = 3 μ M, [HT12] = 1 μ M, [HT24] = 0.5 μ M, [HT36] = 0.33 μ M, [HT48] = 0.25 μ M, [HT60] = 0.20 μ M, [HT72] = 0.167 μ M, [HT84] = 0.143 μ M in 50 mM LiCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 4 $^{\circ}$ C, λ_{ex} = 360 nm.

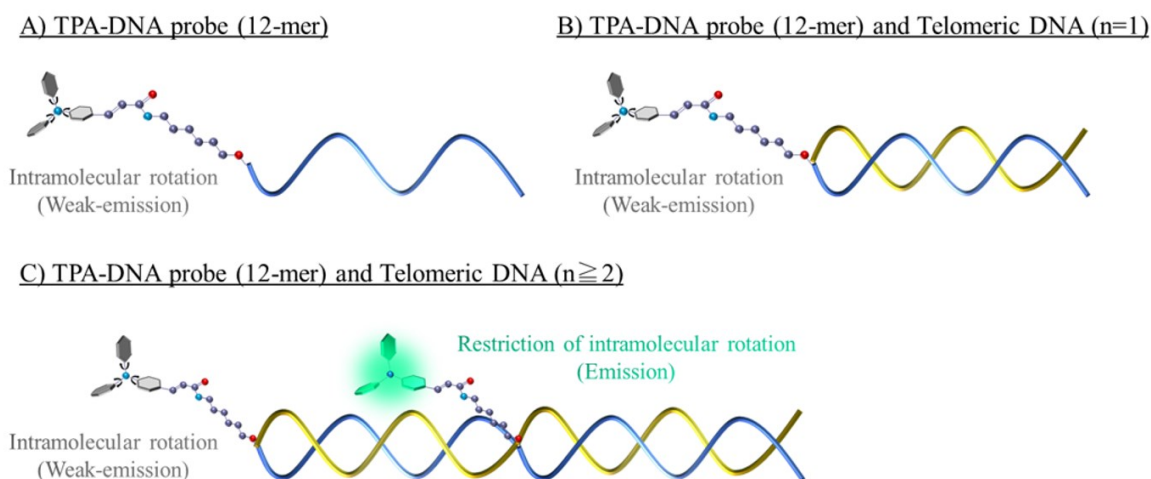


Fig. 3-10 Schematic illustration of the fluorescence enhancement mechanism by restriction of intramolecular rotations. (A) TPA-DNA12, (B) TPA-DNA12 and HT12, (C) TPA-DNA12 and HT24-HT84. n represents repeat number (e.g.; n = 2 → 5'-(TTA GGG TTA GGG)₂-3').

3.2.3 蛍光増大に対する DNA の立体障害の影響

AIE 色素周辺に DNA 鎖が存在するか否かによって蛍光強度が変化するかどうかを検証するために、TPA-DNA12 プローブを用いて、ターゲットとしてテロメア DNA の両端にそれぞれ 12-mer の非相補的な配列を導入した DNA (HT-NC36) 及びその非相補的な配列部分に対応する相補鎖 (NCC12) について蛍光測定を行った。これによりハイブリダイズしたプローブの AIE 色素周辺の ssDNA または dsDNA の影響を調べることが可能である。HT-NC36DNA を使用する前に、非相補的な配列部分がプローブの蛍光増大に影響しないことを 4 回繰り返し配列である NC48 [5'-(TGA GTG TGA GTG)₄-3'] を用いて確認した (Fig. 3-11)。次に、HT12、HT-NC36 (非相補的な配列部分は ssDNA の状態)、及び HT-NC36 と NCC12 (非相補的な配列部分は NCC12 との dsDNA の状態) を用いて、同様にプローブ濃度が一定の条件下でターゲット DNA 濃度を変化させながら蛍光測定を行った結果を Fig (3-12) に示す。HT12 の場合では、DNA 濃度を増加させても蛍光強度は増大しなかった。従って、12-mer と 12-mer で二重鎖を形成した場合には AIE 色素部位の分子内回転を抑制するファクターがないために蛍光強度は増大しないことが確認できた。一方で、ssDNA 及び dsDNA の場合では、DNA 濃度の増加に伴って蛍光強度 (蛍光増大率) が増加した。つまり、AIE 色素の分子内回転抑制による蛍光増大には、ターゲットとプローブがハイブリダイズした時に AIE 色素の回転を抑制するような位置に DNA が存在することが

主な要因となることが明らかとなった。また、ssDNA と dsDNA では蛍光増大率に違いが見られ、ssDNA では約 3.4 倍程度、dsDNA では約 5.4 倍の蛍光増大率であった。このことは、ssDNA がフレキシブルかつ dsDNA よりも立体障害が小さいために、AIE 色素部位の分子内回転抑制の程度が弱いことに起因していると考えられる。

これらの結果から、TPA-DNA プローブは反復配列の DNA をターゲットとした場合には少なくとも 2 回繰り返し以上の反復配列 DNA を選択的に検出可能であり、さらにターゲット配列の 3'側に ssDNA あるいは dsDNA があれば反復配列の DNA でない場合でも検出可能である。

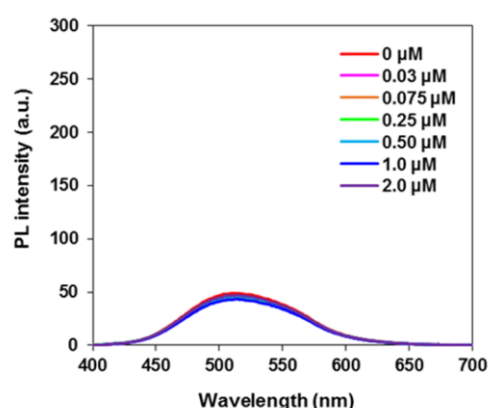


Fig. 3-11 Fluorescence spectra of 3 μM of TPA-DNA12 with each concentration (0.03-2.0 μM) of NC48 in 50 mM LiCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), r.t., $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm.

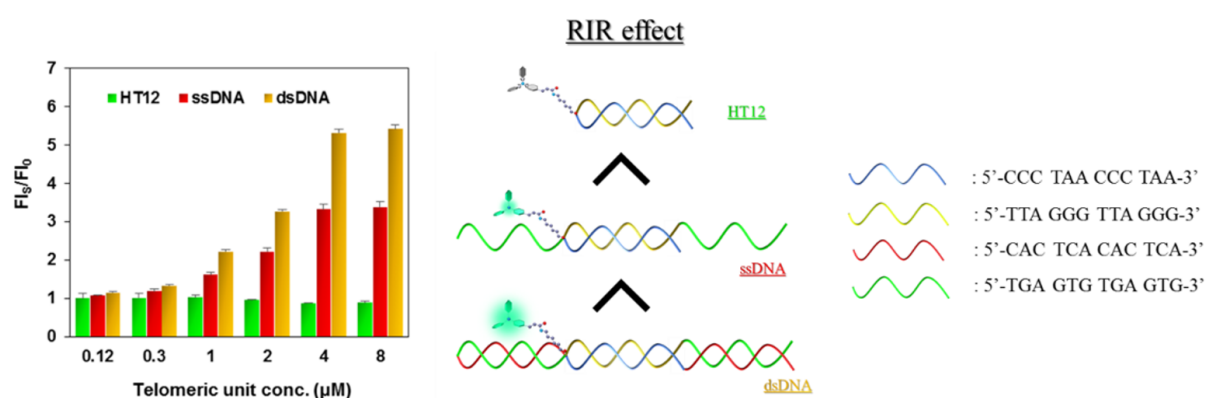


Fig. 3-12 Fluorescence increase ratio of 3 μM of TPA-DNA12 and 0.12–8 μM of HT12, HT-NC36, and HT-NC36/NCC12 in 50 mM LiCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), r.t., $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm (left). Strength of the RIR effect of the AIE dye in HT12, HT-NC36 (ssDNA), and HT-NC36/NCC12 (dsDNA) (right). Error bars indicate the standard error of the mean for $n = 3$.

3.2.4 蛍光融解曲線解析による蛍光の温度依存性

TPA-DNA プローブの蛍光強度の温度依存性を調べるために、15-60℃の温度範囲で各温度における蛍光強度を測定した。温度勾配は 1℃/min. に設定し、15℃から 1℃間隔で測定を行った。また、TPA-DNA12 と HT48 の濃度比は 4 : 1 になるように調製した。

テロメア DNA を含むサンプルでは、これまでの結果で示したように 40℃以下では二重鎖を形成することによって蛍光強度が著しく増大しており、45℃から 55℃の間では二重鎖の解離に伴って急激に蛍光強度が減少した (Fig. 3-13)。しかしながら、低温下においても緩やかに蛍光強度が減少する現象が観測された。これは、温度の上昇に伴って蛍光分子 (DNA 鎖も同様) の運動性 (並進、振動、回転運動) が増大することに起因しており、プローブのみの場合でも温度上昇 (熱的な効果) に伴う蛍光分子の運動性の増大により蛍光強度は徐々に減少した。従って、図の青色点線矢印の部分がテロメア DNA との結合によって分子内回転が抑制された部分に相当する。

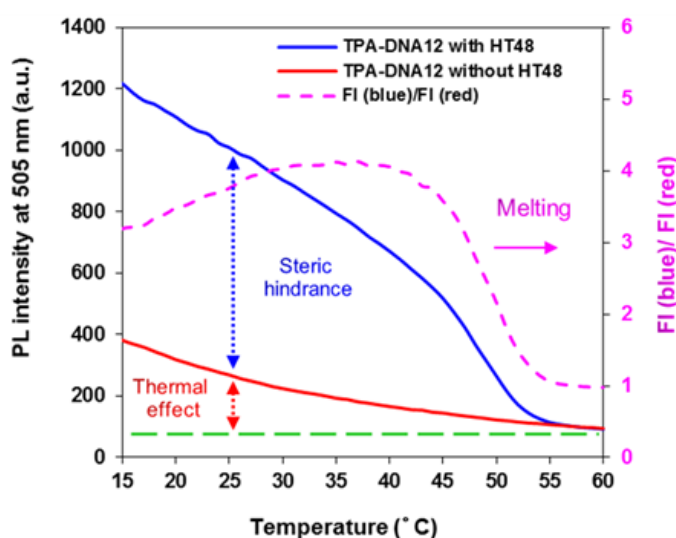
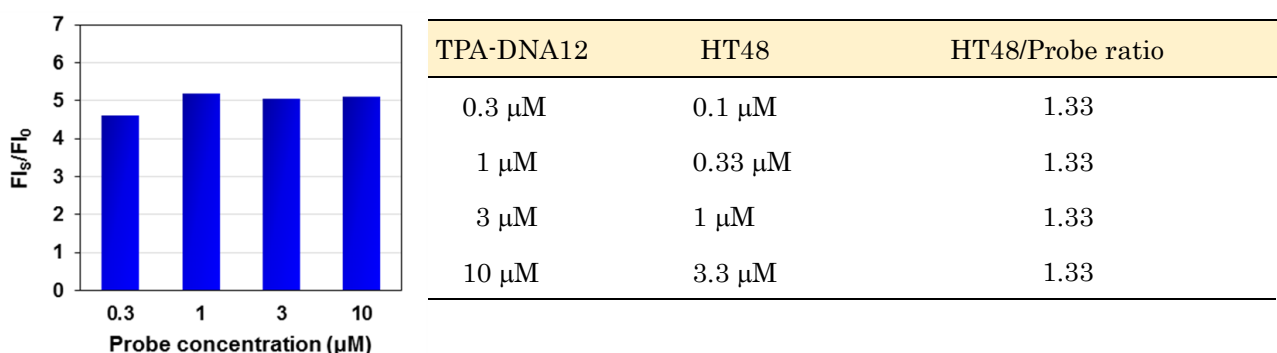


Fig. 3-13 Fluorescent intensity of TPA-DNA12 (3 μ M) without (red) or with (blue) HT48 (0.75 μ M) in 50 mM LiCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), and fluorescent melting curve (pink) where right vertical axis shows the fluorescence increasing ratio: FI (blue)/FI (red), r.t., $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm. Temperature range was 15-60℃ (Temperature slope: 1℃/min).

3.2.5 DNA 濃度の変化による蛍光増大への影響

蛍光増大の現象における別のファクターとして、疎水性の AIE 色素でラベル化したプローブがテロメア DNA のような反復配列 DNA に複数結合した場合、二重鎖 DNA の親水性が低下する可能性が考えられ、これが原因で二重鎖同士が互いに疎水性相互作用で会合する場合、蛍光強度に大きな影響を与えることが予想される。そこで、プローブとテロメア DNA の比 (HT48/Probe = 1.33) を固定したまま DNA 全体の濃度を増減させ、蛍光増大率の濃度依存性を調べた。プローブ濃度が 0.3 μM の場合にわずかな蛍光増大率の低下が見られたが、1 μM -10 μM の範囲では蛍光増大率が約 5 倍で一定であった (Fig. 3-14)。プローブの AIE 色素間で凝集が起こると仮定すると、濃度の増加に伴い蛍光増大率も増大すると考えられるが、この場合はそれが一定であったことからプローブの AIE 色素間での凝集は起こらず、DNA 鎖の立体障害による分子内回転の抑制のみによって蛍光強度が増大することが示唆される。トリフェニルアミン誘導体は疎水性ではあるが、分子サイズが小さく、平面性も低いことから分子間相互作用 (疎水性相互作用、 π - π スタッキング相互作用) は弱く、また DNA の高い親水性によって分散し、これらの相互作用は生じないものと考えられる。



*HT48/Probe ratio = 4 (Binding sites) \times HT48 conc./TPA-DNA12 conc.

Fig. 3-14 Concentration dependency of fluorescence enhancement. HT48/Probe ratio of each sample was 1.33 as a constant.

3.2.6 他の二重鎖 DNA 存在下におけるテロメア DNA の定量

一般的に、DNA を定量する測定法にはターゲット配列に対する高い選択性や他の二重鎖 DNA (e.g.; 染色体 DNA) の存在下でも目的の配列のみを検出できることが求められる。本プローブでは、3.2.3 で述べたように他の配列の DNA では蛍光強度の増大は見られず、選択的にターゲットであるテロメア DNA を他の二重鎖 DNA の影響を考慮せずに測定できると期待できる。したがって、上記の条件はクリアしていると予想できるが、このことを実際に確認するため、ネガティブコントロール DNA である 5'-(TGA GTG TGA GTG)₄-3' (NC48) とその相補鎖 5'-(CAC TCA CAC TCA)₄-3' (NCC48) からなる二重鎖 DNA をターゲット DNA よりも高濃度(10 μ M)になるよう添加し、二重鎖 DNA を添加していない場合の蛍光増大率の比較を行った (Fig. 3-15)。ターゲット DNA には蛍光強度の増大が観測された HT48 を用いた。プローブ DNA の結合が飽和する領域 (HT48 が 1 μ M と 2 μ M のとき) で多少の蛍光増大率の低下は見られたものの、二重鎖 DNA を含まない場合と比較して各テロメア DNA 濃度における蛍光消光率がおおよそ同程度であることから本研究に用いたプローブは他の二重鎖 DNA の影響を受けずにターゲット DNA のみを検出できることが明らかとなった。

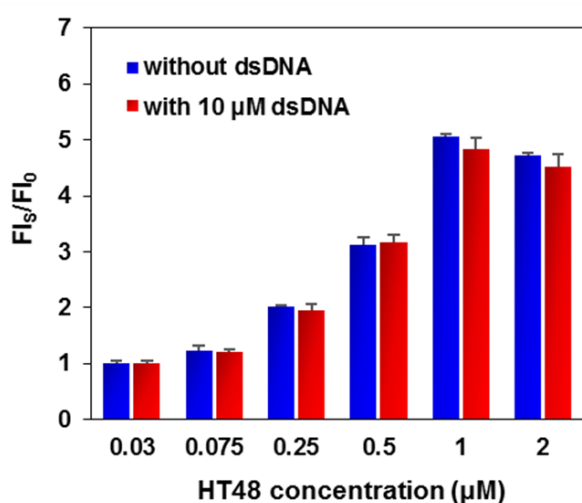


Fig. 3-15 Fluorescence increase ratio of 3 μ M TPA-DNA12 and 0.03-2.0 μ M HT48 without (blue) or with 10 μ M dsDNA (red) in 50 mM LiCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), r.t., $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm. dsDNA: NC48/NCC48. Error bars indicate the standard error of the mean for $n = 3$.

3.3 結論

本手法は、1種類の蛍光色素のみを DNA にラベル化したプローブを用いてターゲット DNA を検出しようとするものである。このプローブは、安価かつ簡便に合成できるものでありながら高い選択性でターゲット DNA を検出可能である点が既存の手法に対する最大の利点である。本手法において、蛍光のシグナル応答は、プローブのターゲット DNA への結合及び DNA 鎖の立体障害で分子内回転運動が抑制されることによって得られることが明らかとなった。従って、ターゲット DNA の 3'末端側にダングリングエンドとなる DNA 鎖が存在しない場合は、選択的に反復配列 DNA (2 個以上のプローブが連続してターゲット DNA に結合する場合) が検出可能である。また、ターゲット DNA の 3'末端側にプローブとは二重鎖を形成しない ssDNA がダングリングエンドとして、あるいは dsDNA が存在する場合は、通常の蛍光プローブと同様にターゲットとの結合によってシグナル応答が得られる。言い換えれば、SNPs のように長鎖 DNA の中間の位置に点在する場合であっても、SNPs に対応する相補鎖部分がこの AIE-DNA プローブに置換されるならば、シグナル応答が得られると考えられる。ゆえに、AIE-DNA プローブはテロメア DNA や triplet repeats DNA¹⁵⁾ などの反復配列 DNA の検出や SNPs の解析などへの応用が期待できる。SNPs の検出では、検出対象となる SNP 部位に合わせた配列の DNA を異なる蛍光波長の AIE 色素でラベル化することで、一度に多種の SNPs を解析することが可能になると考えられる。

3.4 参考文献

1. a) D. G. Ginzinger, *Exp Hematol.*, 2002, **30**, 503-512. b) B. L. V. Duuren, A. Sivak, C. Katz and S. Melchionne, *Br. J. Cancer*, 1969, **23**, 587-590.
2. Y. Urano, D. Asanuma, Y. Hama, Y. Koyama, T. Barrett, M. Kamiya, T. Nagano, T. Watanabe, A. Hasegawa, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Nat. Med.*, 2009, **15**, 104-109.
3. E. Benedetti, L. S. Kocsis and K. M. Brummond, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 12418-12421.
4. M. Tanioka, S. Kamino, A. Muranaka, Y. Ooyama, H. Ota, Y. Shirasaki, J. Horigome, M. Ueda, M. Uchiyama, D. Sawada and S. Enomoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 6436-6439.
5. a) M. H. Caruthers, *J. Biol. Chem.*, 2013, **288**, 1420-1427. b) M. A. Russell, A. P. Laws, J. H. Atherton and M. I. Page, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 3270-3275.
6. a) M. K. Johansson, H. Fidder, D. Dick and R. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, **124**,

- 6950-6956. b) P. Theisen, C. McCullum, K. Upadhyay, K. Jacobson, H. Vua and A. Andrus, *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 5033-5036.
7. N. J. Greco and Y. Tor, *Nature Protocols*, 2007, **2**, 305-316.
 8. L. Wang, V. Reipa and J. Blasic, *Bioconjugate Chem.*, 2004, **15**, 409-412.
 9. a) T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel and J. Ju, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 609-612. b) A. H. E. Sagheer and T. Brown, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1388-1405.
 10. R. L. Williams, M. J. Hadley, P. J. Jiang, N. A. Rowson, P. M. Mendes, J. Z. Rappoport and L. M. Grover, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 4370-4378.
 11. M. Park, C. H. Kim and T. Joo, *J. Phys. Chem. A*, 2013, **117**, 370-377.
 12. W. S. Tan, C. Prabhakar, Y. H. Liu, S. M. Peng and J. S. Yang, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2014, **13**, 211-223.
 13. R. Hu, E. Lager, A. A. Aguilar, J. Liu, J. W. Y. Lam, H. H. Y. Sung, I. D. Williams, Y. Zhong, K. S. Wong, E. Pen˜a-Cabrera and B. Z. Tang, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 15845-15853.
 14. J. C. Venter and M. D. Adams *et al. Science*, 2001, **291**, 1304-1351.
 15. a) H. Y. Zoghbi and H. T. Orr, *Annu. Rev. Neurosci.*, 2000, **23**, 217-247. b) C. T. Ashley Jr. and S. T. Warren, *Annu. Rev. Genetics.*, 1995, **29**, 703-728.

第4章 AIE 色素ラベル化 PNA プローブを用いたテロメア DNA 検出法の開発

前章では、AIE 色素ラベル化 DNA プローブの物性及び DNA 検出におけるプローブの有用性について述べた。AIE プローブを用いた生体分子の検出法は、ターゲットとの結合によってシグナル応答が得られる優れた手法であり、テロメア DNA のみならず SNPs や triplet repeats DNA の検出への応用も期待できる。しかしながら、ターゲット DNA に対してプローブ以外に本来の相補鎖 DNA が存在する条件下でこれらを検出するにはターゲット DNA に対してより親和性（結合能）の高いプローブが必要である。そこで、DNA/DNA 二重鎖よりもより安定な二重鎖を形成するペプチド核酸（PNA: Peptide Nucleic Acid）を用いた手法を検討した。

PNA は糖-リン酸骨格とは異なり、*N*-(2-アミノエチル)グリシンがペプチド結合で繋がった骨格を有している (Fig. 4-1)¹⁾。DNA はリン酸部位に負電荷を帯びているが、PNA は電荷が無いために DNA と比較して親水性は低下する。しかしながら、PNA は電荷による反発がないため、PNA/DNA 二重鎖の

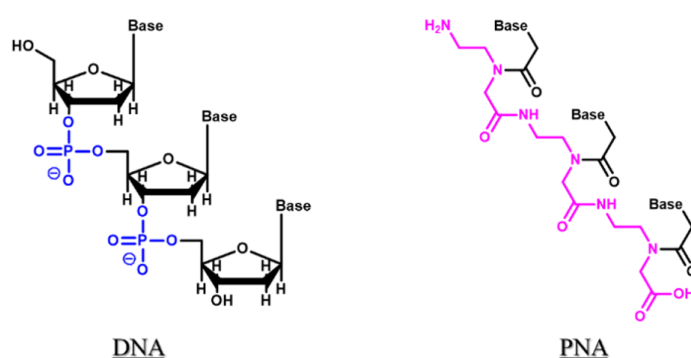


Fig. 4-1 Structures of DNA and PNA backbones.

融解温度 (Tm: Melting Temperature) は一般に DNA/DNA 二重鎖よりも上昇することが知られている²⁾。また、1 塩基の違いによる Tm 値の変化量が大きく、DNA をプローブとして用いた場合よりもターゲットに対する識別能が高い³⁾。

PNA は、2-アミノエチル基のアミノ基部位が Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) 基で、T を除く塩基のアミノ基部位が Bhoc (benzhydryloxycarbonyl) 基により保護されたモノマーを用い、Fmoc 固相合成法により容易に合成できる (Fig. 4-2, 4-3)⁴⁾。

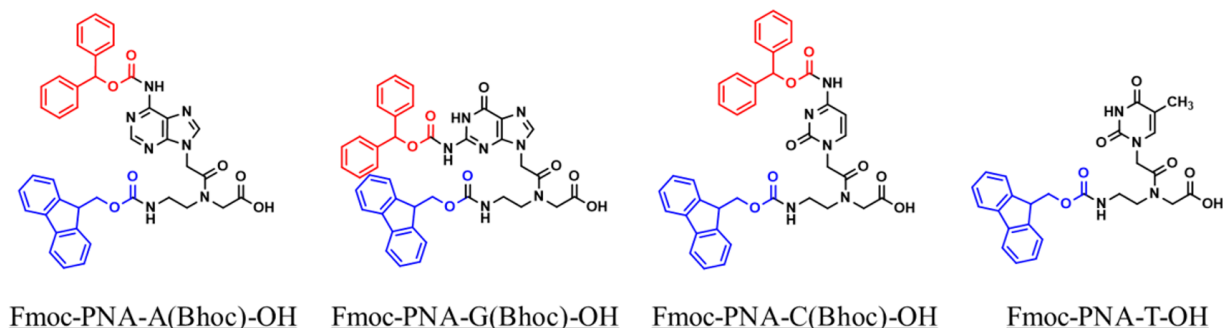


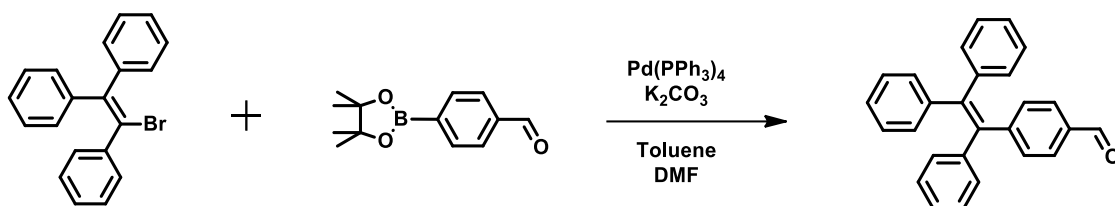
Fig. 4-2 Structures of Fmoc and Bhoc protected PNA monomers. Red and blue lines represent Bhoc group and Fmoc group, respectively.

4.1 実験操作

AIE 色素合成用試薬及び反応溶媒は、和光純薬工業株式会社、東京化成工業株式会社及び渡辺化学工業株式会社より購入した特級または一級試薬を使用した。NMR の重溶媒には、和光純薬工業株式会社製の Chloroform-d を使用した。薄層クロマトグラフィー (TLC) には Merck 社製 Silicagel 60 F254 neutral を使用した。カラムクロマトグラフィーには和光純薬工業株式会社製 Wakogel C-200 を使用した。HPLC 用溶離液には、和光純薬工業株式会社より購入した HPLC grade のアセトニトリル (ACN: Acetonitrile) を使用した。PNA モノマー (A, C, T) は Link Technologies 社より購入したものを使用した。各鎖長のテロメア DNA 及びネガティブコントロール DNA は、北海道システムサイエンス社より購入したものを使用した。

HPLC による精製は、Waters 社製 Alliance HPLC e2695 Separation Module を、検出には 2489 UV/Visible Detector を用いた。 ^1H -NMR 及び ^{13}C -NMR スペクトルは、日本電子社製 JNM-ECA500 型核磁気共鳴装置 (共鳴周波数: ^1H , 500 MHz) を用いて測定を行った。ケミカルシフトは、Tetramethylsilane ($\delta = 0$ ppm) を内部標準とした。ESI-MS の測定は、Waters 社製 micromass ZQ 2000 を使用した。MALDI-TOF-MS の測定は、Bruker Daltonics 社製 Autoflex III smartbeam を使用した。DNA のアニーリングには、ASTEC 社製 GeneAtlas 325 (Thermal cycler) を使用した。蛍光スペクトルの測定には、島津製作所社製 RF-5300PC を使用した。UV による DNA 及び PNA プローブの濃度決定には、日本分光社製 V630 を使用した。粒子径の測定には、Malvern 社製 zetasizer nanoZS を使用した。

4.1.1 TPE-CHO の合成



2-ブromo-1,1,2-トリフェニルエチレン (1.84 g, 5.50 mmol), 4-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)ベンズアルデヒド (1.00 g, 4.32 mmol), K_2CO_3 (2.07 g, 15.0 mmol) と $Pd(PPh_3)_4$ (145 mg, 0.126 mmol) を N_2 置換した 3 ロフラスコに加えた後、脱気したトルエン (22 mL) と DMF (8 mL) を加えて溶解させた。反応溶液を $85^\circ C$ で 19 時間攪拌した。室温に戻した後、反応溶液をシリカゲルパッドに通した (酢酸エチルを通すことにより目的物を回収した)。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Chloroform/*n*-Hexane = 1/2) で精製した。得られたオイル状化合物はメタノールと水を加えて再沈殿により固体を析出させた。得られた沈殿物を吸引濾過により回収し、真空乾燥することで目的物を得た。

<収率>

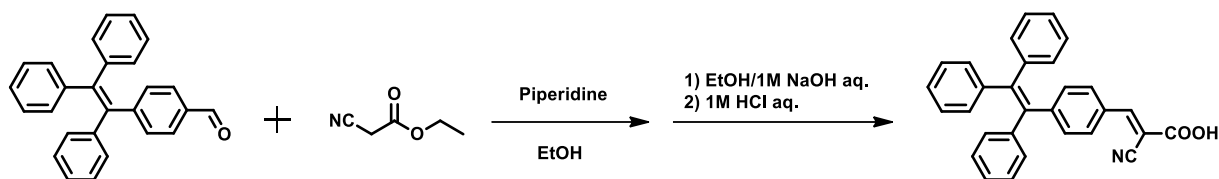
79.1% (1.23 g, 3.42 mmol)

<NMR>

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ (ppm) 9.90 (s, 1H), 7.62 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.13-7.10 (m, 9H), 7.04-7.00 (m, 6H)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ (ppm) 191.93, 150.55, 143.02, 142.97, 142.88, 139.73, 134.23, 131.93, 131.27, 131.22, 129.16, 127.91, 127.73, 127.03, 126.88, 126.85.

4.1.2 TPE-CN-COOH の合成



TPE-CHO (542 mg, 1.50 mmol) を EtOH (15 mL) に溶解させた後、シアノ酢酸エチル (333 mg, 2.94 mmol) と ピペリジン (0.3 mL) を加えた。反応溶液を 80℃で 5 時間攪拌した。5 時間後溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluent: CHCl₃/n-hexane = 1/1) で精製した。次に、得られたエステル体を EtOH (50 mL) と 1 M NaOH aq. (30 mL) に溶解し、1 時間室温で攪拌した。加水分解反応終了後、1 M HCl aq. (35 mL) を加えて溶液を酸性にし、生成物をクロロホルムで抽出し、有機層を蒸留水で洗浄した。有機層を回収した後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluent; Chloroform→Chloroform/MeOH = 10/1) で精製した。得られた目的物にクロロホルムと *n*-ヘキサンを加えて再沈殿を行うことにより黄色の固体が析出した。得られた黄色固体を吸引濾過により回収し、真空乾燥することで目的物を得た。

<収率>

50.5% (325 mg, 0.760 mmol)

<NMR>

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8.18 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.17-7.11 (m, 11H), 7.04-7.00 (m, 6H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 167.46, 156.21, 150.44, 143.63, 142.94, 142.87, 142.72, 139.52, 132.31, 131.31, 131.30, 131.23, 131.06, 129.03, 128.02, 128.00, 127.73, 127.28, 126.97, 115.25, 100.67.

4.1.3 Fmoc 固相合成法による PNA の合成及び AIE 色素のラベル化

本研究に用いた AIE-PNA の配列は AIE-Acp(6)-CCC TAA-Acp(6)-K-OH であり、Fmoc 固相合成法により C 末端から合成した。樹脂は Fmoc-Lys(Boc)-Alko-PEG Resin を使用し、PNA モノマーは Bhoc 基で塩基部位のアミノ基が保護されたモノマーを使用した (T を除く)。リンカーには、Fmoc-Acp-OH (N-ε-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-ε-aminocaproic acid) を使用した。各種モノマー試薬は、Fmoc-PNA(A,G,C,T)-OH の場合、樹脂に対して 10 当量使用した。Fmoc-Acp-OH の場合は 6 当量使用した。

まずカラムに Fmoc-Lys(Boc)-Alko-PEG Resin (42 mg, 10 μmol) を加えた後、Wash 溶液 (DCM/DMF = 1/1) を 1 mL 加えて 1 時間攪拌することで樹脂を膨潤させた。次に、20% ピペリジン/DMF を加えて Fmoc 基の脱保護を行った (1 mL×2)。Wash 溶液で洗浄した後 (1 mL×5)、702 μL の NMP (0.15 M HATU, 0.15 M HOBt, 0.3 M DIPEA を含む) に溶解させた Fmoc-Acp-OH をカラムに加えて 1 時間攪拌した。Wash 溶液で洗浄した後 (1 mL×5)、樹脂を少量取り、Kaiser 試験により反応の進行を確認した。以降のカップリングにおいては同様の方法によりカップリングと Fmoc 基の脱保護を行った。

AIE 色素をラベル化する際は、10 当量以上 (樹脂の一部を使用したため) の AIE 色素を用い、同様のカップリング条件で 2 回カップリングを行った。最後に、500 μL の TFA/m-cresol/Thioanisole (90/5/5) を加えて 2 時間攪拌し、合成 PNA の樹脂からの切り出し及び保護基の切断を行った。回収した溶液に窒素を吹きつけながら TFA を留去し、エーテルを加えて沈殿させた。得られた沈殿は、遠心とエーテル洗浄を 3 回繰り返し行った後に減圧乾燥して粗 AIE ラベル化 PNA を得た。

4.1.4 AIE-PNA probe の HPLC 精製

上記の方法で得られた AIE-PNA は、HPLC により精製を行った。カラムは Waters 社製 XBridge™ C18 (5 μm, 4.6×150 mm) column を使用し、温度は 40℃に設定した。溶離液として 0.1% TFA/MilliQ と 0.1% TFA/ACN を使用した。溶離液は以下の組成比で使用し、260 nm 及び 360 nm の吸収を UV 検出器で確認しながら目的物を回収した。精製した AIE-PNA は凍結乾燥後、-20℃で保存した。

Table 4-1 Composition of eluents for purification of AIE-PNA probe.

Time/Solvent	0.1% TFA/MilliQ	0.1% TFA/ACN
0 min	100	0
30 min	0	100

Flow rate: 1 mL/min. Retention time: 17.0-17.5 min.

MALDI-TOF MS

TPE-CN-PNA 6-mer: calcd for $C_{111}H_{134}N_{38}O_{22}$; 2351.05, found 2352.91 ($M+H^+$, 42), 2374.87 ($M+Na^+$, 98), 2390.82 ($M+K^+$, 100).

*Matrix: CCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)

*PNA 6-mer: 5'-CCC TAA-3'.

4.1.5 AIE-PNA 蛍光測定用サンプルの調製

AIE-PNA プローブは MilliQ に溶解させた後、UV スペクトルを測定し、370 nm の吸光度から濃度を算出した (ϵ_{370} : 1.6×10^4 Lmol⁻¹cm⁻¹)。測定に用いたテロメア DNA も同様に 260 nm の吸光度から濃度決定を行った (HT12: 1.2×10^5 , HT24: 2.4×10^5 , HT48: 4.9×10^5 , NC12: 1.1×10^5 , 単位は Lmol⁻¹cm⁻¹)。AIE-PNA プローブは MilliQ で希釈し、30 μ M に調製した。

蛍光測定用サンプルの調製は以下の手順で行った。1) MilliQ で任意の濃度に希釈したテロメア DNA あるいはネガティブコントロール DNA 溶液 (140 μ L) に 5 \times Tris-HCl buffer [100 mM LiCl (or KCl) and 50 mM Tris-HCl, pH 7.5] を 40 μ L 加えた。2) DNA 溶液を 90 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱した後、20 μ L の 30 μ M AIE-PNA プローブを加えて VORTEX Mixer で攪拌した。3) 12 時間 25 $^{\circ}$ C でアニーリングした。

DLS 測定用サンプルの調製は以下の手順で行った。1) MilliQ で希釈した任意の濃度に希釈したテロメア DNA あるいはネガティブコントロール DNA 溶液 (23.3 μ L) に 5 \times Tris-HCl buffer (100 mM LiCl (or KCl) and 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) を 10 μ L 加えた。2) DNA 溶液を 90 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱した後、16.7 μ L の 30 μ M AIE-PNA プローブを加えて VORTEX Mixer で攪拌した。

4.2 結果と考察

4.2.1 水及び水/ACN 混合溶媒中での AIE-PNA プローブの蛍光スペクトル測定

AIE-PNA プローブの水溶液中での蛍光挙動を調べるために、水、50%ACN/水、90%ACN/水中での蛍光スペクトルを測定した。その結果を Fig. 4-4 に示す。水のみの場合では、ACN を含む場合と比較して飛躍的に蛍光強度が増大した。これは、PNA は DNA よりも親水性が低く、疎水性の AIE 色素でラベル化したプローブは、水溶液中ではプローブの色素間での凝集が誘起されているためであると考えられる。つまり、凝集に伴い色素の分子内回転が抑制されることで蛍光強度が著しく増大したと推察した。一方、ACN のような水よりも低極性の溶媒を混合した場合は、AIE-PNA プローブは凝集せずに分散することが可能で

あり、分子内回転運動により蛍光が消光したと考えられる。

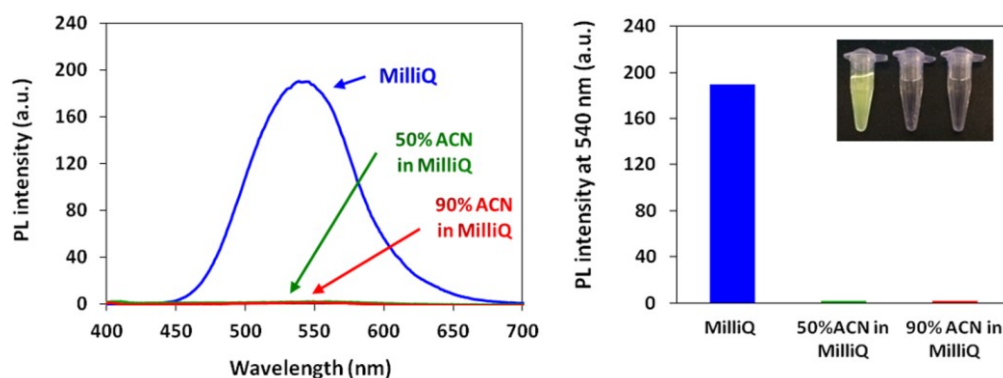


Fig. 4-4 Fluorescence spectra of PNA probe in each solvent (MilliQ, 50% ACN/MilliQ and 90% ACN/MilliQ) (left) and fluorescence intensity of PNA probe at 540 nm (right), in MilliQ (blue), in 50% ACN/MilliQ (green), 90% ACN/MilliQ (red).

4.2.2 DLS 測定によるナノ粒子形成の確認

4.2.1 の結果から AIE-PNA プローブは色素間で凝集が生じていると推察されるが、溶液中に凝集体の存在が確認できず、凝集体による溶液の不透明性も無いことからナノメートルサイズの粒子を形成しているのではないかと考え、DLS の測定を行った。低濃度条件下ではデータが得られないため、プローブ濃度を $10\ \mu\text{M}$ に調製し、測定を行った。その結果を Fig. 4-5 に示す。測定結果からプローブのみでは $10\ \text{nm}$ 付近にピークが観測され、ナノ粒子を形成していることが明らかとなった。4.2.1 の結果において水溶液中での蛍光強度は分散時と比較して 100 倍以上の蛍光強度を示しており、Fig. 4-5 のようにミセル様構造を形成することによって疎水的な内部に位置する AIE 色素の蛍光強度が飛躍的に増大していると考えられる。一方、テロメア DNA ($20\ \mu\text{M}$) を加えた場合、 $10\ \text{nm}$ 付近のピークは観測されなかった。従って、ターゲット存在時にはプローブが形成しているナノ粒子は崩壊し、テロメア DNA と二重鎖を形成する。この際、プローブのみと比較して大幅な蛍光の消光が観測された。このことから、二重鎖形成時には AIE 色素は分散していることが示唆される。AIE-PNA プローブは、DNA と二重鎖を形成することにより親水性が付与され、色素の分散性の向上及びそれに伴う分子内回転の許容が蛍光消光に影響を与えていると考えられる。

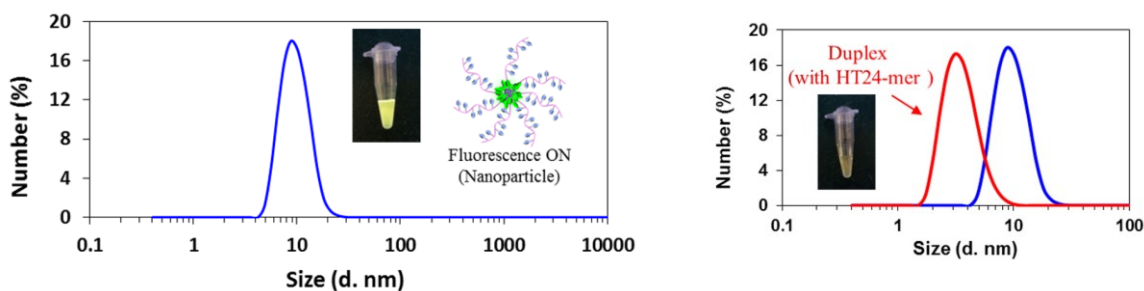


Fig. 4-5 DLS spectra of AIE-PNA probe without HT24 (left), and comparison of non-inclusion of HT24 and inclusion HT24 samples (right). [PNA probe] = 10 μ M, [HT24] = 20 μ M, in 50 mM LiCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 25°C.

4.2.3 AIE-PNA プローブの二重鎖形成時及び非形成時の蛍光測定

AIE-PNA プローブが二重鎖形成によって蛍光消光が誘起されていることを確認するために、相補的な配列であるテロメア DNA と非相補的な配列であるネガティブコントロール DNA を用いて実験を行った。その結果を Fig. 4-6 に示す。相補的な配列であるテロメア DNA の場合では、テロメア DNA の濃度の増加に伴い蛍光強度の減少が見られた。一方、ネガティブコントロール DNA の場合は、DNA の濃度を増加させても蛍光強度の減少は見られなかった。

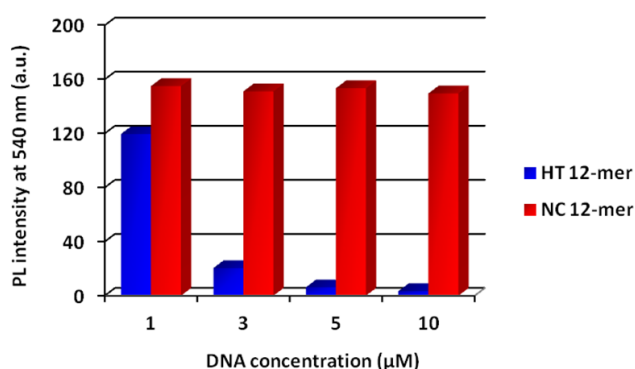


Fig. 4-6 Fluorescence intensity at each DNA concentration. HT and NC represent human telomere and negative control, respectively. Each sample was excited at 360 nm. [PNA probe] = 3 μ M, in 50 mM LiCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 25°C.

4.2.4 AIE-PNA プローブによる DNA 高次構造の識別

テロメア DNA は、カリウムイオンの存在下で四重鎖 (G-quadruplex) 構造を形成することが知られている⁶⁾。従って、AIE-PNA プローブが二重鎖を形成して蛍光が消光しているのであれば、四重鎖 DNA を形成する条件下では蛍光強度の減少が観測されないと考えられる。そこで、KCl を含む緩衝液を用いて蛍光測定を行った。テロメア DNA には 1 分子で四重鎖構造を形成可能な 24-mer [5'-(TTA GGG)₄-3'] を用いた。Fig.4-7 で示すように、二重鎖を形成する条件である LiCl 緩衝液中では 4.2.3 で得られた結果と同様に蛍光の消光が観測されたが、KCl 緩衝液中では蛍光強度の顕著な低下は確認できなかった。従って、同一の配列であっても四重鎖構造をとっている DNA には結合せず、ナノ粒子構造を維持することによって蛍光が ON の状態になっている。これらの結果から本研究に用いたプローブは、二重鎖形成によって蛍光シグナルが OFF になることが明らかとなった。

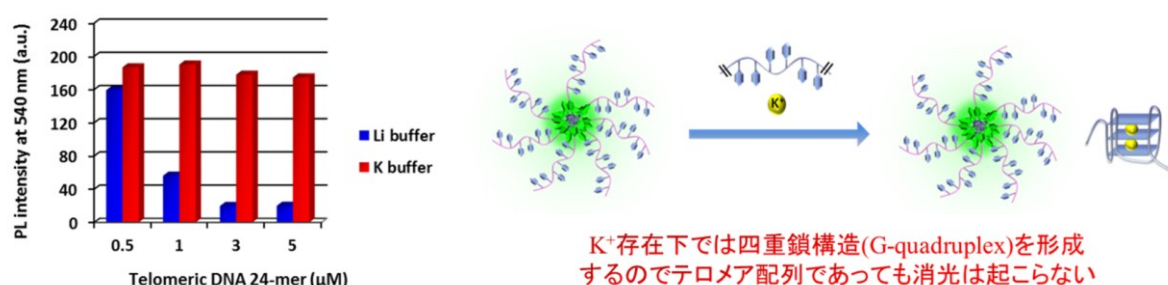


Fig. 4-7 Fluorescence intensity at each DNA concentration in each buffer solution. Each sample was excited at 360 nm. [PNA probe] = 3 μM, in 50 mM each salt (Li⁺: LiCl, K⁺: KCl) and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5).

4.2.5 AIE-PNA プローブによるテロメア DNA の定量

AIE-PNA プローブのターゲットの定量性を検証するために、二重鎖及び四重鎖構造を形成する長鎖テロメア DNA48-mer を用いて蛍光測定を行った。その結果を Fig.4-8 に示す。テロメア DNA 濃度の増加に伴い蛍光強度が減少し、飽和領域（プローブの大部分がテロメア DNA と結合した場合）で蛍光強度の減少は起こらなくなった。0-1 μM のテロメア DNA 濃度範囲では直線関係が得られたことから、AIE-PNA プローブによってテロメア DNA の定量が可能であるといえる。

テロメア DNA 存在下の場合と比較して、プローブのみの場合の蛍光波長がわずかにブルーシフトしていることから、プローブが形成するナノ粒子は内部 (AIE 色素部位) が疎水的な環境にあると考えられる。反対に、プローブが二重鎖を形成した際は、AIE 色素が親水的な環境に置かれることでレッドシフトが起こったと考えられる。

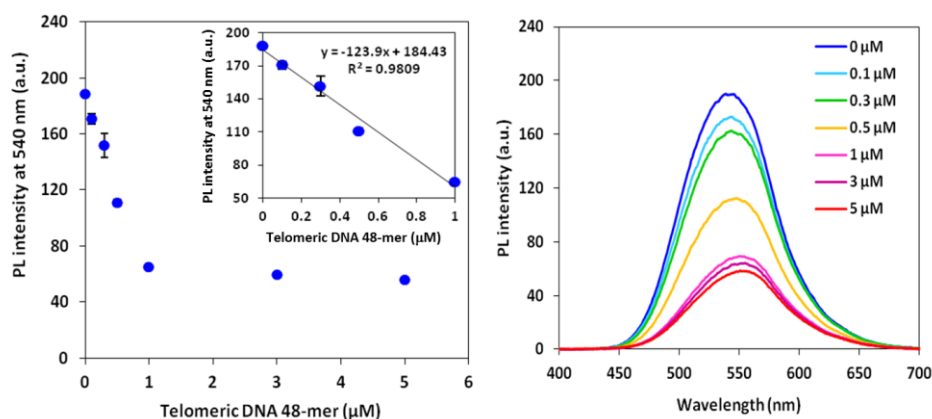


Fig. 4-8 Relationship between the fluorescence intensity and the concentration of telomeric DNA 48-mer (left) and fluorescence spectra of PNA probe with telomeric DNA 48-mer (right). Error bars represent SD from $n = 3$. Each sample was excited at 360 nm. [PNA probe] = 3 μM, in 50 mM LiCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 25°C.

4.2.6 蛍光消光に対するテロメア鎖長の影響

Fig.4-6, Fig. 4-7 及び Fig. 4-8 を比較した場合、テロメア DNA が長くなると飽和(蛍光強度が減少しなくなる) 時の蛍光強度が強く、蛍光消光率は Fig. 4-9 で示すように 48-mer のテロメア DNA では 70%程度にとどまっていた。Fig.4-9 に示す蛍光消光率は以下の式 (eq. 4-1)により算出した。

$$\text{FQ (\%)} = 100\{[\text{FI (Blank)} - \text{FI (Sample)}] / \text{FI (Blank)}\} \quad (\text{eq. 4-1})$$

*FI (Blank) and FI (Sample) represent the fluorescence intensity at 540 nm of the absence of telomeric DNA and the presence of 5 μM of telomeric DNA, respectively.

テロメア DNA との結合によって本来蛍光消光が誘起されるはずであるが、第 3 章の AIE-DNA プローブにおいてはテロメア DNA との結合により蛍光の増大が見られていたことから、PNA プローブにおいても同様に分子内回転運動が抑制されると考えられる。しかしながら、PNA プローブはナノ粒子構造を形成するためプローブ自身で著しく蛍光強度が高くなるという現象が生じてしまう。ゆえに、プローブのみの蛍光強度が非常に強く、テロメア DNA 結合時にプローブの AIE 色素部位の分子内回転運動が抑制されたとしても、

プローブのみの蛍光強度よりも低くなってしまい消光型の検出になったと考えられる。つまり、蛍光消光率の低下した部分（5% in HT12, 11% in HT24 and 30% in HT48）は、PNA プローブの大部分がテロメア DNA と二重鎖を形成した場合の蛍光強度（二重鎖形成に伴って生じた分子内回転抑制の効果による蛍光強度の増大分）に等しい。3.2.2 で述べたように鎖長が短い場合は末端部分の蛍光は完全に消光されるため蛍光強度は鎖長が長いものよりも低下する。また、テロメア DNA 濃度の方が高い場合は HT48 の方が、蛍光強度が増大する結合部位（3'末端側以外の部分で ssDNA あるいは他のプローブ分子が隣接していて dsDNA を形成する場合）が多いため、蛍光強度が他の鎖長より強くなったと考えられる (Fig. 4-9)。

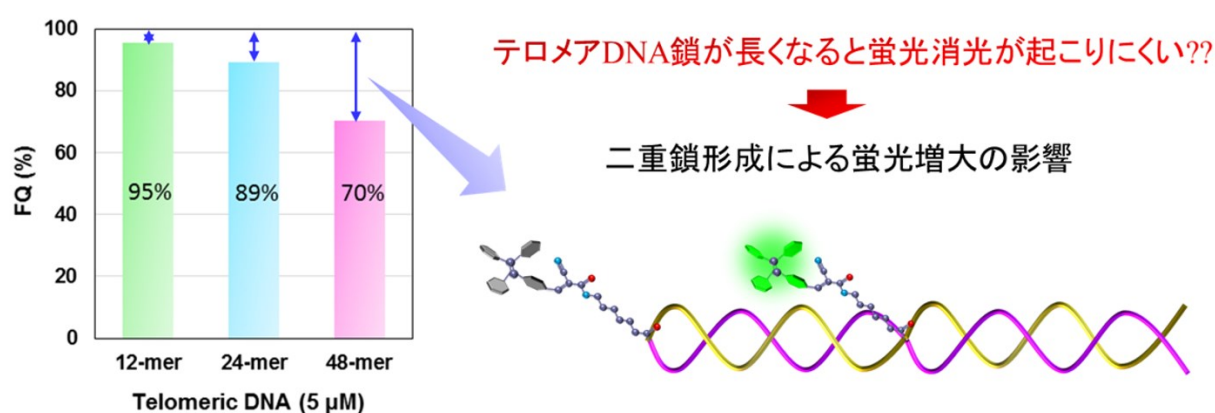


Fig. 4-9 Relationship between fluorescence quenching ratio and telomere length. [PNA probe] = 3 μ M, [Telomeric DNA] = 5 μ M, in 50 mM LiCl and 20 mM tris-HCl buffer (pH 7.5), 25°C.

4.3 結論

AIE-PNA プローブは、水溶液中では比較的高い疎水性に起因する低い分散性のために凝集が誘起され、強蛍光性のナノ粒子を形成することが明らかとなった。この蛍光性ナノ粒子は、ターゲット DNA との結合により崩壊し、それに伴って蛍光強度が減衰する。しかしながら、AIE 色素部位は AIE-DNA プローブ（第 3 章参照）と同様に DNA 鎖の立体障害を受けることで蛍光を示すことが示唆され、本手法による検出は強蛍光性ナノ粒子から弱蛍光性 PNA/DNA 二重鎖への変化に伴う Signal-OFF 型の検出システムであると結論付けられる。従って、プローブへの親水性基の導入により水溶液中での分散性を向上する（強蛍光性ナノ粒子の形成を抑制する）ことができれば、AIE-PNA プローブを用いた Signal-ON 型の検出システムも構築が可能であると考えられる。

4.4 参考文献

1. a) B. Hyrupa, P. E. Nielsen, *Bioorgan. Med. Chem.*, 1996, **4**, 5-23. b) D. Capasso, L. D. Napoli, G. D. Fabio, A. Messere, D. Montesarchio, C. Pedone, G. Piccialli and M. Saviano, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 9481-9486.
2. M. C. Chakrabarti and F. P. Schwarz, *Nucleic Acids Res.*, 1999, **27**, 4801-4806.
3. K. K. Jensen, H. Ørum, P. E. Nielsen and B. Nordén, *Biochemistry*, 1997, **36**, 5072-5077.
4. S. Shakeel, S. Karim and A. Ali, *J Chem Technol Biotechnol*, 2006, **81**, 892-899.
5. K. Namba, A. Osawa, A. Nakayama, A. Mera, F. Tano, Y. Chuman, E. Sakuda, T. Taketsugu, K. Sakaguchi, N. Kitamura and K. Tanino, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 1083-1093.
6. H. Yaku, T. Fujimoto, T. Murashima, D. Miyoshi and N. Sugimoto, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 6203-6216.

第5章 AIE 色素ラベル化ペプチドを用いた簡便なアミロイドベータ (A β) 検出法の開発

第3、4章では、AIE 色素を用いた DNA 検出法というアプリケーションについて述べた。本章では、もう一つのアプリケーションである AIE 色素を用いた A β ペプチドの検出について述べる。

第1、3、4章で述べたように、AIE 色素は凝集によってシグナルが増大する性質を有する。従って、凝集するペプチドにラベル化することでペプチドの凝集に伴いシグナル応答が得られると考えられる。ただし、A β を AIE 色素でラベル化した場合、次の2つの問題点が生じる。i) 低濃度で存在する A β をプローブとして過剰に加えることでターゲットとの識別が困難となる。ii) 凝集速度が遅く、検出には数日間を要する（迅速な検出は不可能である）。そこで求められるのが、A β と異なる配列を有し（必ずしも A β と異なることが必要条件ではない）、比較的短鎖で、かつ A β の凝集速度を促進させることが可能なペプチドである。この条件を満たすペプチドとして、藤井らのグループが AFPP (Amyloid Fibrillization Promoting Peptide) と呼ばれる A β の凝集を促進するペプチドを開発している¹⁾。AFPP の配列は DAEFRHDKLVFFYE VHHQK (19-mer) であり、A β の認識に重要とされる KLVFF 部位を有している²⁾。AFPP の凝集メカニズムは完全に明らかになっているわけではないが、実験結果より A β と共に凝集し、凝集速度は約3時間程度にまで促進できることが明らかとなっている。

本研究では、AFPP を AIE 色素でラベル化したプローブ (AIE-AFPP) の合成を行い、AIE-AFPP による迅速かつ高感度な検出法の開発を検討した。AFPP は自己凝集するため、AIE 色素が疎水性の場合は AFPP の自己凝集作用と色素間の疎水性相互作用が協同的に働くことでプローブの凝集が促進され、蛍光強度が高くなってしまう可能性が考えられる。従って、AFPP にラベル化する AIE 色素は電荷を有し、静電反発によって自己凝集時の蛍光強度増大を抑制する必要がある。このようなプローブを用いることで、自己凝集時には色素間での凝集が抑制され、AFPP よりも鎖長の長い A β と共に凝集した場合にのみ、色素部位の分子内回転運動が制限されることによってシグナル応答が得られると考えられる (Fig. 5-1)。そこで本研究では、TPE-CHO と 4-メチルピリジニウム誘導体との Knoevenagel 縮合反応³⁾によってカチオン部位を導入した AIE 色素を合成及び AFPP にラベル化したプローブを用いて検討を行った。

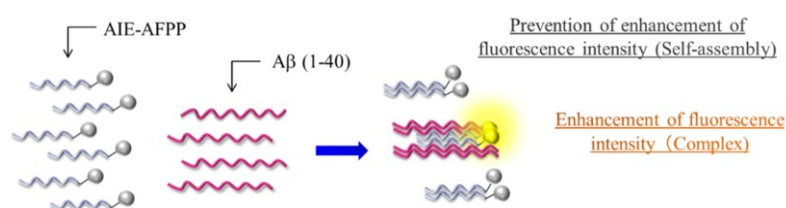


Fig. 5-1 Principle of A β (1-40) detection with AIE-AFPP probe.

5.1 実験操作

AIE 色素合成用試薬及び反応溶媒は、和光純薬工業株式会社、東京化成工業株式会社より購入した特級または一級試薬を使用した。ペプチド合成には渡辺化学工業株式会社より購入した試薬を使用した。NMR の重溶媒には、和光純薬工業株式会社製の Chloroform-d を使用した。薄層クロマトグラフィー (TLC) には Merck 社製 Silicagel 60 F254 neutral を使用した。カラムクロマトグラフィーには和光純薬工業株式会社製 Wakogel C-200 を使用した。HPLC 用溶離液には、和光純薬工業株式会社より購入した HPLC grade のアセトニトリル (ACN: Acetonitrile) を使用した。

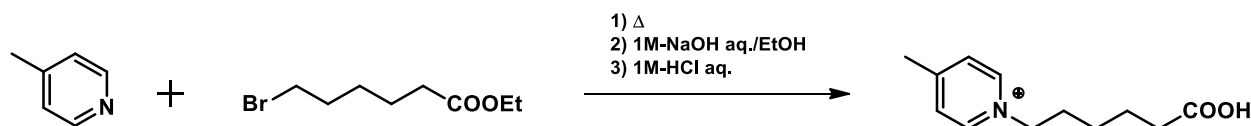
HPLC による精製は、Waters 社製 Alliance HPLC e2695 Separation Module を、検出には 2489 UV/Visible Detector を用いた。 ^1H -NMR スペクトルは、日本電子社製 JNM-ECA500 型核磁気共鳴装置 (共鳴周波数: ^1H , 500 MHz) を用いて測定を行った。ケミカルシフトは、Tetramethylsilane ($\delta = 0$ ppm) を内部標準とした。ESI-MS の測定は、Waters 社製 micromass ZQ 2000 を使用した。MALDI-TOF-MS の測定は、Bruker Daltonics 社製 Autoflex III smartbeam を使用した。蛍光スペクトルの測定には、島津製作所社製 RF-5300PC 及び日本分光社製 FP-6200 を使用した。UV によるプローブ及び A β 、Amylin の濃度決定には、日本分光社製 V630 を使用した。CD スペクトルは、日本分光社製 J-820 を用いて測定を行った。

5.1.1 TPE-CHO の合成

TPE-CHO は 4.1.1 の方法で合成した。

5.1.2 Py-C5-COOH の合成

<反応式>



4-メチルピリジン (1.61 mL, 16.5 mmol) をアセトニトリルに溶解後、6-ブロモヘキサン酸エチル (2.50 mL, 14.1 mmol) を加えて 50°C で一晩攪拌した。その後、溶媒を留去し、EtOH (30 mL) と 1N-NaOH 水溶液 (50 mL) を加えて室温で 1.5 時間攪拌した。1N-HCl 水溶液 (50 mL) を加えて中和した後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Acetone/MeOH = 2/1) で精製した。得られた白色固体を酢酸エチルで洗浄した後、真空乾燥することにより目的物を得た。

<収率>

72.9 % (2.96 g, 10.3 mmol)

<ESI-MS>

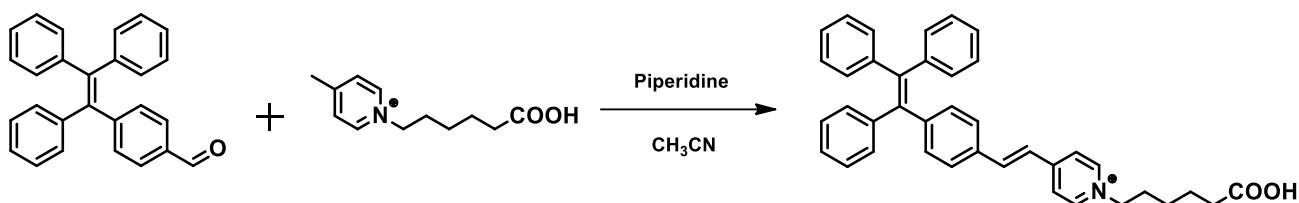
m/z calcd for $C_{12}H_{18}NO_2^+$; 208.1, found 208.3 (M^+).

<NMR>

1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ (ppm) 8.81 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 4.56 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.67 (s, 3H), 2.31 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.03-1.97 (quin, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.69-1.63 (quin, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.43-1.37 (quin, $J = 7.8$ Hz, 2H).

5.1.3 TPE-Py の合成

<反応式>



TPE-CHO (360 mg, 0.998 mmol) と Py-C5-COOH (312 mg, 1.08 mmol) をアセトニトリル (15 mL) に溶解させた後、ピペリジン 0.5 mL を加えて 110°C で 1 時間攪拌した。反応終了後、アセトニトリルを留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Chloroform/MeOH = 5/1 → 1/1 *原料の TPE-CHO を先に溶出させてから溶離液の組成比を変更) で精製した。得られた黄色固体を真空乾燥し、目的物を得た。

<収率>

30.5% (192 mg, 0.305 mmol)

<ESI-MS>

m/z calcd for $C_{39}H_{36}NO_2^+$; 550.27, found 550.53 (M^+).

<NMR>

^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ (ppm) 8.75 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 8.10 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 7.83 (d, $J = 16$ Hz), 7.49 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 16$ Hz), 7.13-6.99 (m, 17H), 4.50 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.17 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.03-1.97 (quin, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.69-1.63 (quin, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.41-1.35 (quin, $J = 7.5$ Hz, 2H).

5.1.4 Fmoc 固相合成法による AFPP の合成及び AIE 色素のラベル化

本研究で用いた AFPP の配列は H-DAEFRHDKLVFFYE VHHQK-OH であり、Fmoc 固相合成法により C 末端から合成した。樹脂は Fmoc-Lys(Boc)-Alko-PEG Resin を使用し、各種モノマーは以下の試薬を用いた。10 残基目までは樹脂に対して 3 当量、11 残基目以降は 4.5 当量のモノマーを使用した。

- ◆ Fmoc-Asp(OtBu)-OH
- ◆ Fmoc-Ala-OH
- ◆ Fmoc-Glu(OtBu)-OH
- ◆ Fmoc-Phe-OH
- ◆ Fmoc-Arg(pbf)-OH
- ◆ Fmoc-His(Trt)-OH
- ◆ Fmoc-Lys(Boc)-OH
- ◆ Fmoc-Leu-OH
- ◆ Fmoc-Val-OH
- ◆ Fmoc-Tyr(tBu)-OH
- ◆ Fmoc-Gln(Trt)-OH

まずカラムに Fmoc-Lys(Boc)-Alko-PEG Resin (208 mg, 50 μmol) を加えた後、Wash 溶液 (DCM/DMF = 1/1) を 2 mL 加えて 1 時間攪拌することで樹脂を膨潤させた。次に、20% ピペリジン/DMF を加えて Fmoc 基の脱保護を行った (2 mL \times 2)。Wash 溶液で洗浄した後 (2 mL \times 5)、1 mL (10 残基目まで) or 1.5 mL (11 残基目以降) の NMP (0.15 M HATU, 0.15 M HOBT, 0.3 M DIPEA を含む) に溶解させた Fmoc-Gln(Trt)-OH をカラムに加えて 30 分攪拌した。Wash 溶液で洗浄した後 (2 mL \times 5)、樹脂を少量取り、Kaiser 試験により反応の進行を確認した。以降のカップリングにおいては同様の方法によりカップリングと Fmoc 基の脱保護を行った。

AIE 色素でラベル化する際は、まず 4.5 当量の Fmoc-Acp-OH を用いてリンカーを導入し、次いで 10 当量以上（樹脂の一部を使用したため）の AIE 色素を用い、同様のカップリング条件で 2 回カップリングを行った。最後に、2 mL の TFA/m-cresol/Thioanisole (90/5/5) を加えて 2 時間攪拌し、AIE 色素ラベル化 AFPP の樹脂からの切り出し及び保護基の切断を行った。回収した溶液に窒素を吹きつけながら TFA を留去し、エーテルを加えて沈殿させた。得られた沈殿は、遠心とエーテル洗浄を 3 回繰り返し行った後に減圧乾燥して粗ペプチドを得た。

5.1.5 AIE-AFPP の HPLC 精製

上記の方法で得られた AIE-AFPP は、HPLC により精製を行った。カラムは Waters 社製 XBridge™ C18 (5 μ m, 4.6 \times 150 mm) column を使用した。溶離液として 0.1% TFA/MilliQ と 0.1% TFA/ACN を使用した。溶離液は以下の組成比 (Table 5-1) で使用し、280 nm (Tyr) 及び 400 nm (TPEPy-AFPP) の吸収を UV 検出器で確認しながら目的物を回収した。精製した AIE-AFPP は凍結乾燥後、-20°C で保存した。

Table 5-1 Composition of eluents for purification of AIE-AFPP probe.

Time/Solvent	0.1% TFA/MilliQ	0.1% TFA/ACN
0 min	100	0
30 min	0	100

Flow rate: 1 mL/min.

Retention time: 22.0-22.5 min.

MALDI-TOF MS

AIE-AFPP: (m/z) calcd for C₁₅₃H₁₉₅N₃₂O₃₁⁺; 2976.47, found 2976.75 (M⁺).

*Matrix: CCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid), Positive mode で測定

5.1.6 Amyloid- β (1-40) の調製

ペプチド研究所から購入した A β (1-40) は、HFIP (1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol)⁴⁾ を 0.5 mL (0.5 mg に対して) 加えて溶解させた後、一晩静置した。翌日、100 μ L ずつ分注し、N₂ を吹きつけながら HFIP を揮発させてフィルム化した。分注した A β (1-40) は、-20°C で保存した。

5.1.7 Amylin の調製

ペプチド研究所から購入した Amylin は、A β (1-40) の調製と同様に HFIP を 0.5 mL (0.5 mg に対して) 加えて溶解させた後、一晚静置した。翌日、100 μ L ずつ分注し、N₂ を噴きつけながら HFIP を揮発させてフィルム化した。分注した Amylin は、-20°C で保存した。

5.1.8 AIE-AFPP 蛍光測定用サンプルの調製

AIE-AFPP プローブ、A β (1-40) 及び Amylin は MilliQ に溶解させた後、UV スペクトルを測定し、AIE-AFPP は 400 nm の吸光度 (AIE-AFPP(ϵ_{400}): 3.4×10^4 Lmol⁻¹cm⁻¹)、A β (1-40) 及び Amylin は 280nm の吸光度から濃度を算出した (A β (ϵ_{280}): 1490 Lmol⁻¹cm⁻¹, Amylin(ϵ_{280}): 1740 Lmol⁻¹cm⁻¹)。

CD (Circular Dichroism) 測定用サンプルの調製は以下の手順で行った。i) A β (1-40) を MilliQ で希釈し、最終濃度が 50 μ M になるように調製した。ii) AIE-AFPP プローブを最終濃度が 50 μ M になるように加えた。iii) 2×EM buffer (EM: 300 mM NaCl and 40 mM *N*-Ethylmorpholine-HCl buffer, pH 7.0) を 60 μ L 加えて全量を 120 μ L とし、CD 測定を行った。

蛍光測定用サンプルの調製は以下の手順で行った。i) A β (1-40) あるいは Amylin を MilliQ で希釈し、任意の濃度に調製した。ii) AIE-AFPP プローブを加えた。iii) 2×EM buffer (EM: 300 mM NaCl and 40 mM *N*-Ethylmorpholine-HCl buffer, pH 7.0) を 100 μ L 加えて全量を 200 μ L とし、3 時間室温で静置した後に蛍光スペクトルの測定を行った。

5.2 結果と考察

5.2.1 CD スペクトル測定による AIE-AFPP の初期構造及び β -シート構造形成の確認

合成した AIE-AFPP の初期構造及び $A\beta$ と β -sheet 構造形成するかどうかを確認するために 5.1.8 の方法で調製した測定用サンプルを用いて 0 時間から 1 時間ごとに CD スペクトルを測定した。Fig. 5-2 で示すように 0 時間では大部分がランダムコイルであるが、3-4 時間後には β -sheet 構造 (220 nm 付近に負のコットン効果) のスペクトルに変化した⁵⁾。CD 測定は高濃度条件で行うために凝集が速やかに起こり、0 時間でも β -sheet 構造由来のピークが観測されたと考えられる。Fig. 5-2 の右下の画像は CD 測定用サンプルと同一濃度 (50 μ M AIE-AFPP and 50 μ M $A\beta$) における試料の 24 時間後の蛍光画像であり、 $A\beta$ を含むサンプル [図中右下(B)] の方には多数の強蛍光性凝集体が見られた。このことから、AIE-AFPP は $A\beta$ と共に凝集することによって蛍光強度が増大することが示唆される。

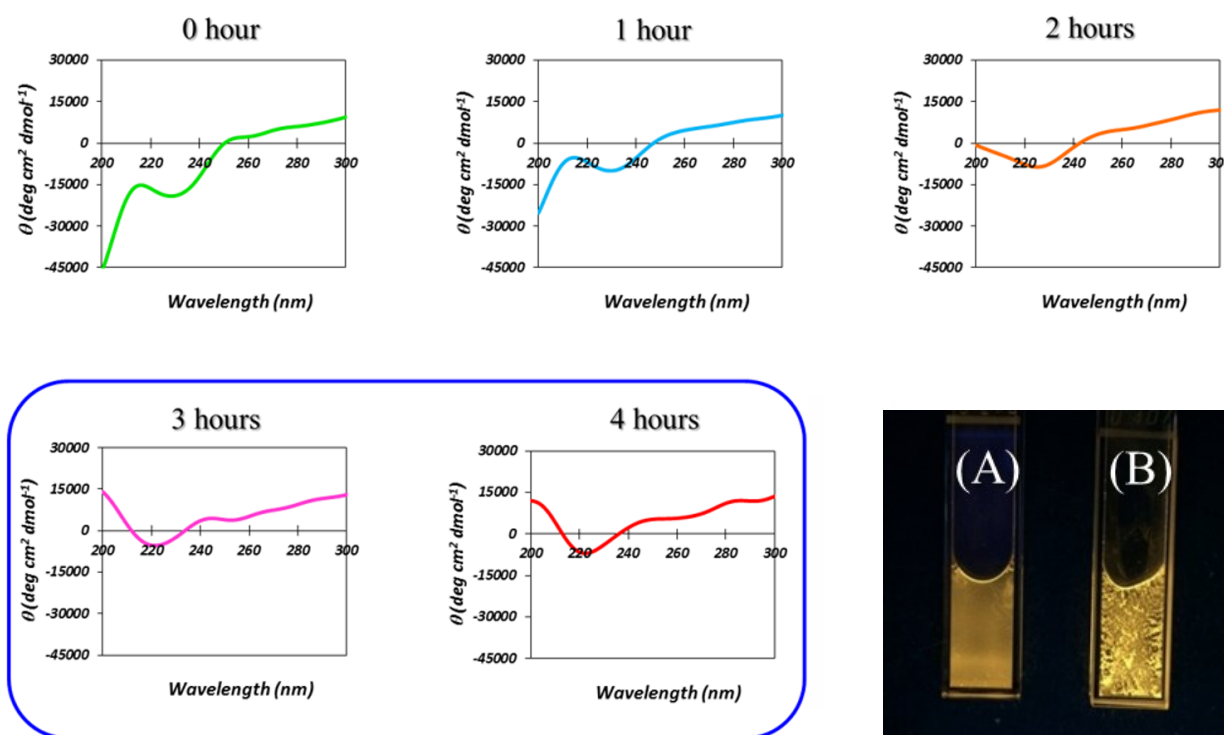


Fig. 5-2 Time-dependent changes in CD spectra of 50 μ M AIE-AFPP and 50 μ M $A\beta$. Fluorescence image of AIE-AFPP A) without $A\beta$, or B) with 50 μ M $A\beta$.

5.2.2 時間経過による蛍光強度変化

AIE-AFPP と A β の複合体の蛍光強度が時間経過に伴って増大していることを確認するために、1 時間間隔で蛍光スペクトルの測定を行った。AIE-AFPP のみの場合では徐々に蛍光強度が低下したのに対して、A β を含むサンプルでは時間経過に伴って蛍光強度が増大した (Fig. 5-3)。AIE-AFPP のみの場合では、プローブの凝集 (線維化) に伴って局所的に AIE 色素が集積するため、励起光が照射されて励起される色素分子が減少することが考えられる。この現象に伴い蛍光強度が時間経過と共に低下したと考えられる。一方、A β を含むサンプルでは、プローブがより鎖長の長い A β と共に凝集 (線維化) することによって AIE 色素部位の分子内回転運動が抑制され、時間経過に伴って蛍光強度が増大したと考えられる。0 時間 (サンプル調製後) の蛍光強度に差が見られたが、これは 5.2.1 の CD スペクトルから分かるように高濃度条件下では凝集が速く、測定を行うまでの数分の間に一部が凝集したことに起因すると考えられる。

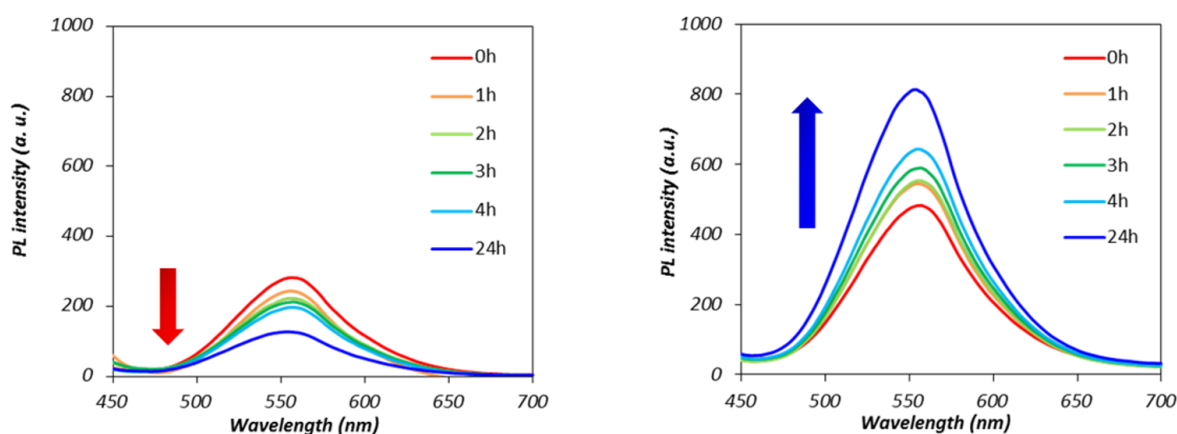


Fig. 5-3 Time-dependent changes in fluorescence spectra of 5 μ M AIE-AFPP without A β (left), or with 50 μ M A β (right), in EM buffer (pH 7.0), λ_{ex} = 400 nm, 25°C.

5.2.3 AIE-AFPP を用いた A β の定量

5.2.2 より、AIE-AFPP を用いることで A β を検出できることが分かった。次に、プローブを用いて A β の定量が可能であるかを調べるために A β 濃度を変化させて蛍光測定を行った。まず、プローブ濃度を 5 μ M に固定し、A β 濃度を 0.05 μ M から 50 μ M まで変化させて蛍光スペクトルを測定したところ、A β 濃度の増加に伴って蛍光強度が増大した (Fig. 5-4)。このことから、A β 濃度の増加に伴って Fig. 5-5 (ii) で示すように A β を取り込んだプローブ量が増加することにより蛍光強度が増大し、また、A β 取り込み量 (凝集体1個当たり) が増加することによって立体障害が大きくなり、結果として AIE 色素の分子内回転運動が抑制されやすくなっていると考えられる。

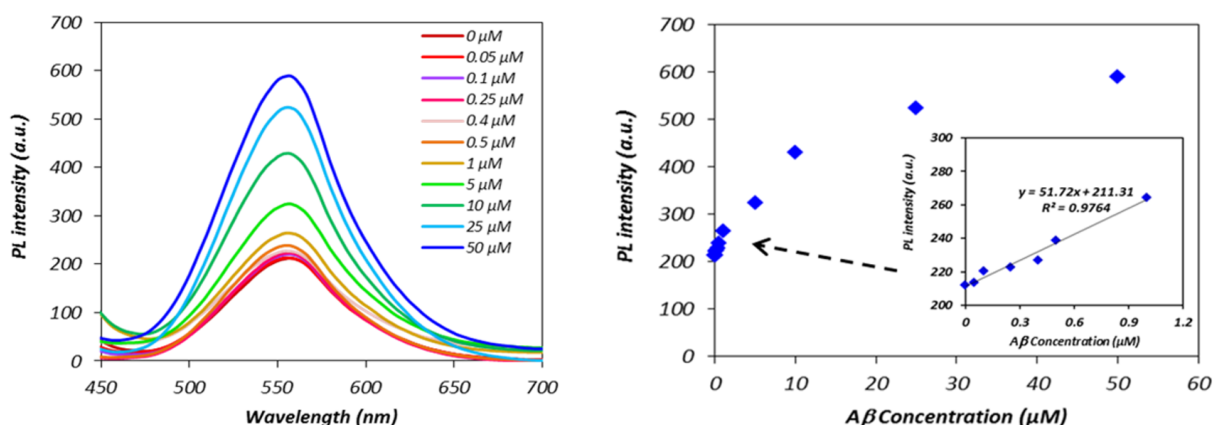


Fig. 5-4 Fluorescence spectra of 5 μM AIE-AFPP (left) and relationship between fluorescence intensity and Aβ concentration (right), in EM buffer (pH 7.0), $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm, 25°C. Inset of right figure is enlarge view in the range of 0-1 μM Aβ.

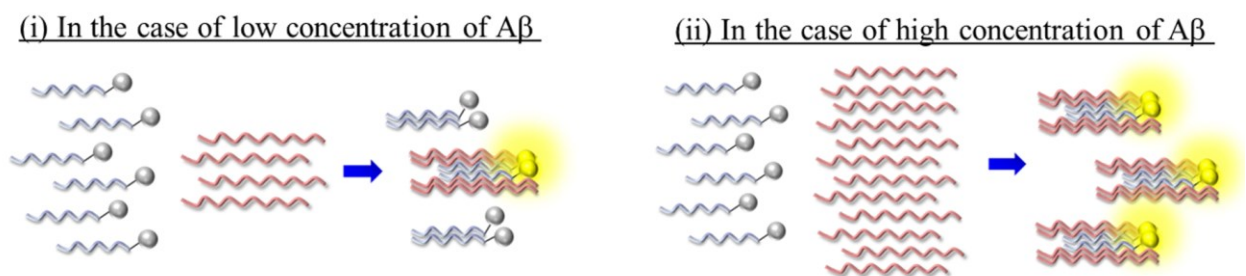


Fig. 5-5 Schematic illustration of fluorescence enhancement mechanism according to Aβ concentration. i) In low concentration (left), and ii) in high concentration of Aβ (right).

プローブ濃度が高い場合、凝集は速やかに進行するが、プローブのみの場合（ブランクサンプル）の蛍光強度が高値を示しやすい。これは AIE 色素にカチオン部位を導入したとしても疎水性（TPE）部位も依然として大きいため、プローブ濃度が高い場合に局所的に多数のプローブが集積すると疎水性相互作用によって AIE 色素間で凝集し、分子内回転が抑制されることが原因であると考えられる。また、Aβ量に対してプローブ量が多いと、Aβとの結合によって受けるプローブ 1 分子（1 凝集体）当たりの分子内回転運動の抑制効果や全プローブ分子における蛍光発光しているプローブ分子の比（ R_{EM} ）が低下するため蛍光増大率も低下する（Fig. 5-6）。故に、プローブ濃度を低く設定し、ブランクの蛍光抑制及び凝集時の蛍光増大率を上昇させることでより低濃度の Aβを検出することが可能になると考えた。

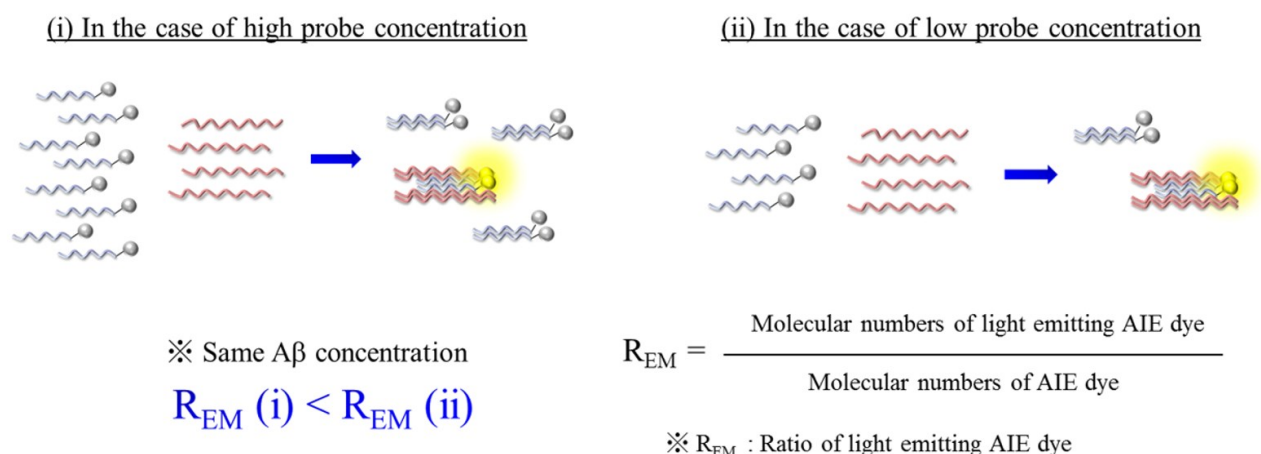


Fig. 5-6 Schematic illustration of the comparison of light emitting AIE dye ratio by the difference of probe concentration. Aβ concentrations are assumed same value in (i) and (ii) both conditions.

プローブ濃度を $0.5 \mu\text{M}$ とし、より低濃度の Aβ を定量できるかを調べた。Aβ 濃度が $5\text{--}500 \text{ nM}$ の場合の蛍光強度をプロットした結果、プローブ濃度が $5 \mu\text{M}$ の場合と比較してより低濃度領域 ($5\text{--}75 \text{ nM}$) の Aβ を定量できることが分かった (Fig. 5-7)。 $0\text{--}75 \text{ nM}$ の範囲で作成した検量線とブランクの標準偏差 ($\sigma = 0.442$) から検出限界 (3σ) を求めたところ、検出限界は 4.2 nM であった。従来の ThT assay は μM レンジでの測定であるのに対し、本手法では nM レンジで測定可能であり、より低濃度の Aβ 量を簡便な手法で定量できることが分かった。

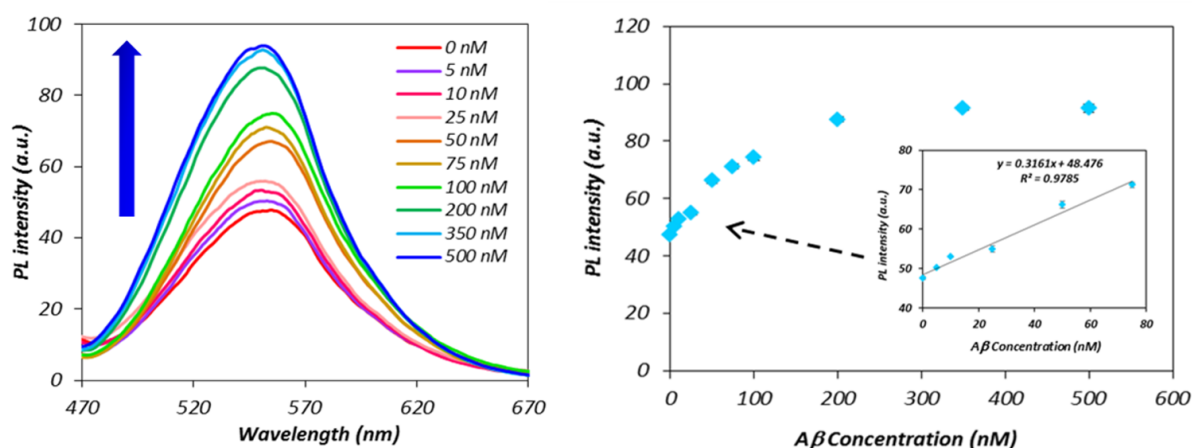


Fig. 5-7 Fluorescence spectra of $0.5 \mu\text{M}$ AIE-AFPP (left) and relationship between fluorescence intensity and Aβ concentration (right), in EM buffer (pH 7.0), $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$, 25°C . Inset of right figure is enlarge view in the range of $0\text{--}75 \text{ nM}$ Aβ.

5.2.4 A β 及び Amylin サンプルにおける蛍光強度の比較

Amylin (human) は 37 残基のペプチド (H-KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAIL-SSTNVGSNTY-OH) であり、A β と同様にアミロイド線維を形成することが知られている⁶⁾。プローブの A β に対する特異性を評価するために、A β と同様の性質を有する Amylin を用いて実験を行った。Amylin の場合、蛍光強度の増大は見られたが、A β と比較して蛍光強度の増加量は少なかった (Fig. 5-8)。AIE-AFPP は Amylin に対しても相互作用し、共凝集している可能性が考えられるが、A β よりも相互作用が弱く、より認識能の高い A β の方が 2 倍程度蛍光強度の増大率が高くなったと推察される。

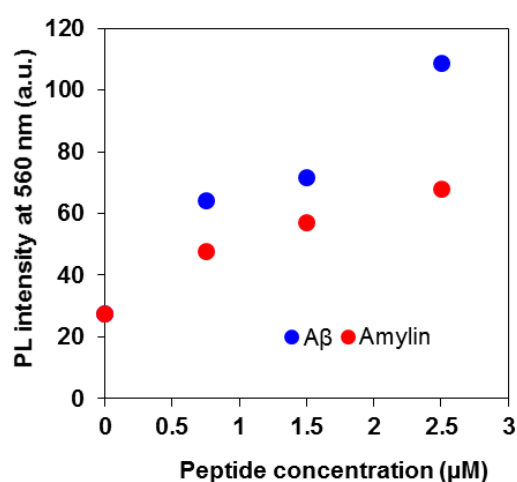


Fig. 5-8 Relationship between fluorescence intensity at 560 nm and peptide concentration (blue: A β , red: Amylin). [AIE-AFPP] = 0.5 μ M in EM buffer (pH 7.0), 25°C.

5.3 結論

AIE-AFPP プローブを用いた本手法により、簡便かつ迅速に A β を検出することが可能であり、従来の ThT assay よりも 2-3 桁以上高い検出感度が得られた。ELISA と比較した場合、検出感度は ELISA が優位であるが、抗体の固定化などの煩雑な操作が不要であること、抗体及び酵素が不要であり測定コストが低く抑えられることが優位な点として挙げられる。更なる高感度化を達成するためには、AIE 色素部位または色素周辺の親水性の向上によるブランクサンプルの蛍光強度の低減 (蛍光増大率の増加に伴う検量線の傾きの上昇)、低濃度領域で測定可能な高輝度 AIE 色素の開発が必要である。今後、これらの課題が達成できれば抗体を用いない安価・簡便・高感度・ハイスループットな A β 検出システムの構築が可能になると考えられる。

5.4 参考文献

1. S. Fujii, D. Sono, K. Matsubara and H. Abe, *Sens. BioSens. Res.* 2015, **6**, 7-12.
2. a) L. O. Tjernberg, J. Näslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlström, J. Thyberg, L. Terenius and C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 8545-8548. b) L. O. Tjernberg, C. Lilliehöök, D. J. E. Callaway, J. Näslund, S. Hahne, J. Thyberg, L. Terenius and C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 12601-12605.
3. a) J. N. Wilson, A. S. Brown, W. M. Babinchak, C. D. Ridge and J. D. Walls, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 8710-8719. b) Y. Zhao, C. Y. Y. Yu, R. T. K. Kwok, Y. Chen, S. Chen, J. W. Y. Lam and B. Z. Tang, *J. Mater. Chem. B*, 2015, **3**, 4993-4996.
4. K. Yanagi, M. Ashizaki, H. Yagi, K. Sakurai, Y. H. Lee and Y. Goto, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 23959-23966.
5. a) C. J. Barrow and M. G. Zagorski, *Science*, 1991, **253**, 179-182. b) L. Otvos Jr, G. I. Szendrei, V. M. Y. Lee and H. H. Mantsch, *Eur. J. Biochem.*, 1993, **211**, 249-257.
6. P. Westermark, A. Andersson and G. T. Westermark, *Physiol. Rev.*, 2011, **91**, 795-826.

第6章 本研究のまとめ

本研究では、第1章で掲げた“[医療（診断）分野における蛍光色素の応用範囲を拡張する](#)”ことをテーマとし、従来の蛍光色素では適用が制限される疾患のバイオマーカーの検出を可能にするため、AIE 色素でラベル化した蛍光プローブによるがんや AD の簡易診断の実現に向けた新規な測定法の開発および各測定法における検出メカニズムの解明を行った。がんの診断においては、腫瘍マーカーであるテロメラーゼの活性評価に必要なテロメア DNA の定量を iFRET、AIE 色素ラベル化 DNA 及び PNA プローブを用いた手法により行った。AD の診断においては、バイオマーカーとして有力視されている A β の定量を AIE 色素ラベル化 AFPP プローブを用いた手法により行った。その結果を以下に示す。

i. FRET を利用した新規なテロメラーゼ活性測定法の開発

FAM ラベル化蛍光プローブとインターカレーターである Ethidium Bromide (EB) を用いた手法は、蛍光プローブのテロメア DNA への結合及び形成された二重鎖への EB のインターカレーションに対応して FAM から EB への FRET に伴う蛍光消光が観測され、この時の蛍光消光量からテロメア DNA 量を定量できることが分かった。選択性に関しては、テロメア配列とは異なる DNA の場合に蛍光消光は観測されず、選択的にテロメア DNA（またはプローブに相補的な配列の DNA）を検出できることが分かった。また、プローブの濃度を最適化することにより pM-nM レベルの DNA を検出可能であった。検出感度の高い本手法では、HeLa 細胞中のテロメラーゼ活性を評価することができ、TRAP assay に替わる簡便なテロメラーゼ活性測定法としての応用が期待される。

ii. AIE 色素ラベル化 DNA プローブを用いたテロメア DNA 検出法の開発

分子内回転運動の抑制によって蛍光強度が飛躍的に増大する AIE 色素でラベル化した DNA プローブは、テロメア DNA と二重鎖を形成した際、DNA 鎖の立体障害の有無によってシグナルの ON/OFF が切り替わることが分かった。DNA 鎖の立体障害による分子内回転運動の抑制効果（RIR effect）は、一本鎖 DNA の場合よりも二本鎖 DNA の方が大きく、DNA 鎖による立体障害が無い場合では RIR effect が全く無いことが明らかとなった。本手法は、AIE 色素の DNA 塩基対間へのインターカレーション、またはメジャーグルーブあるいはマイナーグルーブへのグルーブバインディングによる蛍光増大は生じず、他の二重鎖 DNA の存在下においてもテロメア DNA のみを定量できることが示唆された。検出感度は nM- μ M レンジであり、感度の点では上記の iFRET には劣るが、発がん性の疑いがある EB を使用せず、1 種類の蛍光色素だけで容易にシグナル応答が得られる点で優位である。また、色素の選択やリンカー部位の調整によって

本手法の検出感度をインプルーブすることで有用なプローブになり得ると考えられる。本プローブはテロメア DNA の検出のみならず、各種トリプレットリピートなどの反復配列 DNA の検出への応用も期待できる。

iii. AIE 色素ラベル化 PNA プローブを用いたテロメア DNA 検出法の開発

AIE 色素ラベル化 PNA プローブは、DNA の場合と異なる挙動を示した。DNA の場合はプローブが分散することで蛍光強度は低く抑えられていたが、PNA の場合は DNA と比較して親水性が低いため、プローブ自身が凝集して 10 nm 程度のナノ粒子を形成した。このナノ粒子は非常に明るい蛍光を示し、テロメア DNA との結合によって蛍光強度は著しく減少した。しかしながら、長鎖のテロメア DNA の場合は完全に蛍光は消光せず、これは DNA の場合と同様に AIE 色素部位がテロメア DNA 鎖の立体障害によって蛍光強度が増大するという現象に起因していると考えられる。HT12 の場合は、プローブがテロメア DNA の 3'末端に結合する確率が高いために蛍光が 95%消光したが、HT48 では 3'末端以外の結合サイトが多いために蛍光が 70%しか消光しなかったと推察される。従って、PNA プローブの親水性を向上し、ナノ粒子の形成を抑制して分散させることによって Signal-ON 型の検出システムが構築できると考えられる。PNA は DNA と比較して高価ではあるものの、DNA/DNA 二重鎖よりも優先して PNA/DNA 二重鎖を形成する性質があることからテロメア DNA の検出のみならず、SNPs のように二重鎖を形成しているターゲット DNA の検出への応用も期待できる

iv. AIE 色素ラベル化ペプチドを用いた簡便なアミロイドベータ (A β) 検出法の開発

AIE 色素でラベル化した A β 凝集促進ペプチド (AFPP) は、短時間で自己凝集 (ランダムコイルから β -sheet 構造への変化) が起こり、そこに A β が存在すると濃度依存的に蛍光強度が増大することが分かった。プローブ濃度の最適化により検出限界は 4.2 nM となった。これは ELISA の検出限界 (pM レンジ) には及ばないが、ThT assay よりも優れており、簡便性や測定コストにおいては ELISA よりもはるかに優れている。しかしながら、血中の A β 量を測定するためには少なくとも 1-2 桁ほど更なる高感度化が望まれる。親水性付与によるブランクサンプルの (プローブのみで凝集体形成する場合の) 蛍光の抑制には更なる親水性部位の導入が必要であることが実験結果から示唆され、複数のカチオン部位の導入や、親水性アミノ酸を色素周辺に配置することによって自己凝集時の蛍光を低減することができれば、検量線の傾きの上昇に伴いよりサブ nM レベルの A β 検出が可能になると考えられる。

以上のように、本研究では、蛍光色素を各種生体分子にラベル化したプローブを用いた安価かつ簡便な生体分子検出法の開発を行った。また、AIE 色素を用いた手法について、蛍光増大のメカニズムを精査し、検出原理を解明した。この点において最も有用な知見が得られたのは AIE-DNA プローブであり、AIE-DNA プローブは 5'末端アミノ化 DNA とカルボキシル基を有する AIE 色素から容易に合成（ラベル化）が可能であった。また、脱保護条件に耐性がある蛍光色素であれば固相上でラベル化でき、精製面においても簡便性に優れている（このことは、Fmoc 固相合成法により合成する PNA やペプチドの場合にも当てはまる）。従って、蛍光波長の異なる AIE 色素を異なる配列の DNA にラベル化した複数の蛍光プローブの合成及び精製も容易に行えることが示唆され、本研究で得られた知見により安価なマルチカラーDNA 検出への応用可能性が示された。シグナル応答のメカニズムに関しては、DNA 鎖の立体障害が AIE 色素の RIR に大きく寄与していることを明らかにした。PNA の場合も同様の現象が観測され、ペプチドの場合でも凝集だけではなく鎖長の長い A β と凝集することによって生じる A β 鎖の立体障害が蛍光増大に大きく寄与していたと考えられる。従って、AIE 色素でラベル化したプローブを開発する場合に重要となるのが、ターゲットと結合した際のターゲットの立体障害を考慮した分子設計であり、今後、リンカー鎖の種類（アルキル鎖長が異なるリンカーやエチレングリコール鎖を有するリンカーなど）や色素の疎水部位の大きさなどを検討することによって、AIE 色素を利用したより高感度な検出システムが構築できると考えられる。

安価・簡便・高感度・ハイスループットな生体分子の検出を可能にする優れたプローブの開発には、AIE 色素およびターゲットの性質に合わせた分子設計、検出システムの構築を行うことが重要である。従って、これらの結果は、今後の AIE 色素ラベル化プローブを用いたセンサー分野の発展において重要な知見になり得ると考えられる。

謝辞

終わりに臨み、本研究に関し、終始懇篤なご指導を賜りました、甲南大学フロンティアサイエンス学部 教授 村嶋貴之 先生に心より厚く御礼申し上げます。

本論文をご校閲頂き、ご助言賜りました 甲南大学フロンティアサイエンス学部 教授 川上純司 先生、教授 藤井敏司 先生に心より厚く御礼申し上げます。

CD 測定およびポリアクリルアミドゲル電気泳動、TRAP assay に関しまして、熱心なご指導、ご助言を賜りました、甲南大学フロンティアサイエンス学部 教授 三好大輔 先生、パナソニック株式会社先端技術研究所 夜久英信 様、ならびに分子設計化学研究室の皆様方に深く感謝申し上げます。

AFPP の合成に関しまして、熱心なご指導、ご助言を賜りました、甲南大学フロンティアサイエンス学部 教授 藤井敏司 先生、ならびに生物無機化学研究室の皆様方に深く感謝申し上げます。

常日頃議論に加わり、有用なご助言を下さいました甲南大学フロンティアサイエンス学部有機合成化学研究室の諸先輩方、大学院生並びに四回生の皆様方に深く感謝致します。

最後に、大学4年間及び大学院5年間の計9年間、勉強する機会を与えて頂いた両親・家族に感謝します。

公表論文

1. 「A simple “add and measure” FRET-based telomeric tandem repeat sequence detection and telomerase assay method」, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 936-941.
Koji Kawamura, Hidenobu Yaku, Daisuke Miyoshi and Takashi Murashima
2. 「Facile DNA detection based on fluorescence switching of a hydrophobic AIE dye-labeled peptide nucleic acid probe by aggregation/disaggregation」, *Int. J. Med. Nano Res.*, 2015, **2**:011.
Koji Kawamura, Ai Matsumoto and Takashi Murashima
3. 「Facile Quantification of Alzheimer’s Disease Amyloid- β Based on Aggregation-Induced Emission」, *J. Pharm. Med. Res.*, 2015, **1**, 27-30.
Koji Kawamura, Runa Nakayama, Ai Matsumoto, Satoshi Fujii and Takashi Murashima

学会発表 (国外)

1. 「Syntheses of AIE dye labeled biomolecular probes aiming to the development of facile diagnosis methods for cancer and Alzheimer’s disease」
Pacifichem 2015, Hawaii, 2015/12/15-2015/12/20
Koji Kawamura, Ai Matsumoto, Runa Nakayama and Takashi Murashima
2. 「Construction of nanoparticles using TICT type BODIPYs」
Pacifichem 2015, Hawaii, 2015/12/15-2015/12/20
Ai Matsumoto, Koji Kawamura and Takashi Murashima
3. 「Development of diagnosis tools for Alzheimer’s diseases based on AIE phenomenon」
Pacifichem 2015, Hawaii, 2015/12/15-2015/12/20
Takashi Murashima, Koji Kawamura, Runa Nakayama, Ai matsumoto and Satoshi Fujii

学会発表（国内）

1. 「新規なテロメラーゼ活性測定法の開発を目指したポルフィリン修飾核酸の合成と物性」
日本化学会第 91 春季年会、神奈川、2011 年 3 月
河村浩司、村嶋貴之
2. 「新規なテロメラーゼ活性測定法の開発を目指した FRET プローブの合成」
第 31 回有機合成若手セミナー、京都、2011 年 11 月
河村浩司、村嶋貴之
3. 「蛍光消光を利用した新規なテロメラーゼ活性測定法の開発」
日本化学会第 92 春季年会、横浜、2012 年 3 月
河村浩司、村嶋貴之、三好大輔、夜久英信
4. 「FRET を利用した新規なテロメラーゼ活性測定法の開発」
第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、札幌、2012 年 9 月
河村浩司、夜久英信、三好大輔、村嶋貴之
5. 「Induced FRET で用いる新規なインターカレーター」の合成」
日本化学会第 93 春季年会、滋賀、2013 年 3 月
河村浩司、村嶋貴之
6. 「4 重鎖を Framework とするポルフィリン-DNA ナノコンジュゲートの構築」
第 33 回有機合成若手セミナー、神戸、2013 年 8 月
石田隆真、河村浩司、村嶋貴之
7. 「pH 応答性蛍光色素 BODIPY の合成の検討」
第 33 回有機合成若手セミナー、神戸、2013 年 8 月
池田創、河村浩司、村嶋貴之
8. 「凝集誘起発光(AIE)特性および光誘起電子移動 (PeT) 特性を有する蛍光色素の合成と物性評価」
日本化学会第 94 春季年会、名古屋、2014 年 3 月

河村浩司、池田創、加賀山弘樹、村嶋貴之

9. 「生理的 pH で蛍光 ON/OFF の制御可能な BODIPY 誘導体の合成」

日本化学会第 94 春季年会、名古屋、2014 年 3 月

池田創、河村浩司、村嶋貴之

10. 「DNA とポルフィリンから構成された機能性分子の合成」

日本化学会第 94 春季年会、名古屋、2014 年 3 月

石田隆真、河村浩司、村嶋貴之

11. 「凝集誘起発光 (AIE) プローブ DNA を用いた簡便なテロメア DNA 検出法の開発」

第 34 回有機合成若手セミナー、大阪、2014 年 8 月

河村浩司、松本亜衣、村嶋貴之

12. 「両親媒性凝集誘起発光 (AIE) 型 BODIPY の合成」

第 34 回有機合成若手セミナー、大阪、2014 年 8 月

山口隼平、河村浩司、村嶋貴之

13. 「アルキルアミノ基を有する BODIPY の合成と AIE 特性評価」

第 34 回有機合成若手セミナー、大阪、2014 年 8 月

松本亜衣、河村浩司、村嶋貴之

14. 「凝集誘起発光 (AIE) 色素標識プローブを用いた生体分子検出法の開発」

第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、岡山、2014 年 9 月

河村浩司、松本亜衣、中山瑠奈、藤井敏司、村嶋貴之

15. 「AIE 色素標識プローブを用いた生体分子検出法の開発」

日本化学会第 95 春季年会、船橋、2015 年 3 月

河村浩司、松本亜衣、中山瑠奈、村嶋貴之

16. 「アルキルアミノ基を有する BODIPY の合成と AIE 特性評価」

日本化学会第 95 春季年会、船橋、2015 年 3 月

松本亜衣、河村浩司、村嶋貴之

招待講演

1. 「AIE 色素ラベル化 DNA 及び PNA プローブを利用した簡便な DNA 検出法の開発」、
第 15 回光科学若手研究会、神戸、2015 年 11 月

河村浩司