

博士論文

新規遺伝子検出試薬としての
ナフトレンジイミド誘導体の合成と応用

平成 23 年 3 月

著者

渡邊 貞佳

指導教官：竹中 繁織

目次

目次	1
第1章 序論	5
1-1. ナフタレンジイミドの研究	5
1-2. 本研究の目的	13
1-3. 参考文献	16
第2章 zinc-dipicolylamine (Zn-Dpa)を有するナフタレンジイミド (NDI-Dpa-Zn)による DNA リン酸モノエステルの識別	20
2-1. 緒言	20
2-2. 実験	22
2-2-1. 合成	22
2-2-1-1. [3-[(3-Aminopropyl)methylamino]propyl]carbamic acid <i>tert</i> -butyl ester (1)の合成	22
2-2-1-2. N, N-Bis[3-(3- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminopropyl)methylaminopropyl]naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (2)の合成	23
2-2-1-3. N, N-Bis[3-(3-Aminopropyl)methylaminopropyl]naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (3)の合成	23
2-2-1-4. N,N-Bis-3-(3-(2,2-dipicolylaminopropyl)methylaminopropyl)naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (4)の合成	24
2-2-1-5. N,N-Bis-3-(3-(2,2-dipicolylaminopropyl)methylaminopropyl)naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide-Zn complex (NDI-Dpa-Zn)の合成	24
2-2-2. 金属イオンの添加に伴う化合物 4 の蛍光スペクトル変化の測定	24
2-2-3. NDI-Dpa-Zn と 2 本鎖 DNA との相互作用解析	25
2-2-3-1. 仔牛胸腺 DNA (Ct-DNA)の添加に伴う NDI-Dpa-Zn の吸収スペクトル変化による結合能評価	25
2-2-3-2. NDI-Dpa-Zn の添加に伴う Ct-DNA の円二色性 (CD)スペクトル測定	25
2-2-3-3. NDI-Dpa-Zn の添加に伴う poly[dA-dT] ₂ の粘度測定	25
2-2-3-4. NDI-Dpa-Zn の添加に伴うプラスミド DNA の Topoisomerase I assay	25
2-2-3-5. NDI-Dpa-Zn の Topoisomerase I 阻害能評価	26
2-2-3-6. Stopped-flow 測定による Ct-DNA と NDI-Dpa-Zn の速度論解析	26
2-2-3-6-1. 会合速度定数の評価	26

2-2-3-6-2. 解離速度定数の評価	26
2-2-3-6-3. 金属イオンの濃度変化に伴う4の Ct-DNA からの解離速度定数の評価	26
2-2-4. リン酸化 2 本鎖 DNA と NDI-Dpa-Zn の相互作用解析	27
2-2-4-1. 2 本鎖オリゴヌクレオチドの添加に伴う NDI-Dpa-Zn の吸収スペクトル変化の測定	27
2-2-4-2. DNase で処理して得られたリン酸を含む Ct-DNA と NDI-Dpa-Zn との相互作用解析	27
2-2-4-2-1. DNase で処理した Ct-DNA サンプルの調製	27
2-2-4-2-2. DNase で処理した Ct-DNA サンプルの添加に伴う NDI-Dpa-Zn の吸収スペクトル変化による結合能評価	27
2-3. 結果	28
2-3-1. NDI-Dpa-Zn の錯体形成の確認	28
2-3-2. NDI-Dpa-Zn と 2 本鎖 DNA との相互作用解析	30
2-3-3. リン酸化 2 本鎖 DNA と NDI-Dpa-Zn の相互作用解析	39
2-4. 考察	44
2-5. 結言	45
2-6. 参考文献	46

第 3 章 フェロセンとβ-シクロデキストリン (β-CD)を導入したナフタレンジイミド (FNC) による電気化学的 DNA 構造変化検出

3-1. 緒言	48
3-2. 実験	50
3-2-1. 合成	50
3-2-1-1. Mono-6-azido-β-cyclodextrin (N ₃ -βCD)の合成	51
3-2-1-1-1. Mono-6- <i>p</i> -toluenesulfonyl-β-cyclodextrin の合成	51
3-2-1-1-2. Mono-6-azido-β-cyclodextrin (N ₃ -βCD)の合成	51
3-2-1-2. Ferrocenylmethylazido (N ₃ -Fc)の合成	51
3-2-1-3. N-Methylaminopropyl naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (1)の合成	52
3-2-1-4. N, N'-Bis[3-(3-propargyl)methylaminopropyl]naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (2)の合成	52
3-2-1-5. N, N'-Bis-{3-[(Ferrocenylmethyltriazolylmethyl)-6-methyltriazolylmethyl-β-cyclodextrin]methylaminopropyl}naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (FNC)の合成	53
3-2-2. FNC の構造解析	53
3-2-2-1. FNC の円二色性 (CD)スペクトルによる構造解析	53

3-2-2-2. FNC に 1-Adamanthylcarboxylic acid (Ada-COOH)の添加に伴う吸収スペクトルによる構造解析	53
3-2-2-3. FNC に Ada-COOH の添加に伴う蛍光スペクトルによる構造解析	53
3-2-2-4. FNC に Ada-NH ₂ の添加に伴う電気化学挙動による構造解析	54
3-2-3. FNC と二本鎖 DNA との相互作用解析	54
3-2-3-1. 吸光度変化における Ct-DNA と FNC の平衡到達時間の評価	54
3-2-3-2. Ct-DNA の添加に伴う FNC の吸収スペクトル変化による結合能評価	54
3-2-3-3. FNC の添加に伴う Ct-DNA の CD スペクトル測定	54
3-2-3-4. FNC の添加に伴うプラスミド DNA の Topoisomerase I assay	54
3-2-3-5. Stopped-flow 測定による Ct-DNA と FNC の速度論解析	55
3-2-3-5-1. 会合速度定数の評価	55
3-2-3-5-2. 解離速度定数の評価	55
3-2-4. DNA 添加に伴う FNC の電気化学測定	55
3-2-4-1. グラッシーカーボン (GC)電極を用いた電気化学測定	55
3-2-4-2. マスキング電極を用いた電気化学測定	55
3-2-5. FNC 存在下での構造解析	56
3-2-5-1. 直鎖状の plasmid DNA の調製	56
3-2-5-2. Atomic Force Microscopy (AFM)測定による構造解析	56
3-2-6. FNC 存在の DNA のゲル電気泳動の評価	57
3-2-7. DNA 存在, 非存在下における Ada-NH ₂ 添加に伴う FNC の電気化学挙動の評価	57
3-2-8. GC 電極を用いた 1 本鎖 DNA (ssDNA)あるいは 2 本鎖 DNA (dsDNA)添加に伴う FNC の電気化学測定	57
3-3. 結果	58
3-3-1. FNC の合成と物性評価	58
3-3-2. FNC と二本鎖 DNA との相互作用解析	66
3-3-3. FNC を用いた Ct-DNA の電気化学的検出	72
3-3-4. GC 電極を用いた ssDNA あるいは dsDNA 添加に伴う FNC の電気化学測定	84
3-4. 考察	86
3-5. 結言	87
3-6. 参考文献	88

第 4 章 フェロセンをトリアゾールで連結させたナフタレンジイミド (FNF)を用いた電気化学的 DNA 検出	91
4-1. 緒言	91
4-2. 実験	93

4-2-1. N, N'-Bis-[3-(Ferrocenylmethyltriazolylmethyl)methylaminopropyl]naphthalene-1, 4, 5, 8- tetracarboxylic acid diimide (FNF)の合成	93
4-2-2. FNF と 2 本鎖 DNA との相互作用解析	94
4-2-2-1. Ct-DNA の添加に伴う FNF の吸収スペクトル変化による結合能評価	94
4-2-2-2. FNF の添加に伴う Ct-DNA の CD スペクトル測定	94
4-2-2-3. FNF の添加に伴うプラスミド DNA の Topoisomerase I assay	94
4-2-2-4. Stopped-flow 測定による Ct-DNA と FNF の速度論解析	94
4-2-2-4-1. 会合速度定数の評価	94
4-2-2-4-2. 解離速度定数の評価	95
4-2-3. DNA 添加に伴う FNF の電気化学測定	95
4-2-3-1. グラッシーカーボン (GC)電極を用いた電気化学測定	95
4-2-3-2. マスキング電極を用いた電気化学測定	95
4-2-4. GC 電極を用いた 1 本鎖 DNA (ssDNA)あるいは 2 本鎖 DNA (dsDNA)添加に伴う FNF の電気化学測定	96
4-2-5. GC 電極を用いた 1 本鎖 PCR 産物の部分ハイブリダイゼーションサンプルの電気化学的検出	96
4-2-5-1. 1 本鎖 PCR 産物の調製	96
4-2-5-2. 1 本鎖 PCR 産物の部分ハイブリダイゼーションサンプルの調製	97
4-2-5-3. 1 本鎖 PCR 産物の部分ハイブリダイゼーションサンプルの電気化学的検出	97
4-3. 結果	98
4-3-1. FNF と 2 本鎖 DNA との相互作用解析	98
4-3-2. Ct-DNA の添加に伴う FNF の電気化学測定	104
4-3-3. GC 電極を用いた ssDNA あるいは dsDNA 添加に伴う FNF の電気化学測定	110
4-3-4. GC 電極を用いた 1 本鎖 PCR 産物の部分ハイブリダイゼーションサンプルの電気化学的検出	112
4-4. 考察	114
4-5. 結言	115
4-6. 参考文献	116
第 5 章 結論	118
5-1. 本研究の総括	118
5-2. 本研究における今後の展望	121
謝辞	123

第 1 章

序論

1-1. ナフタレンジイミドの研究

ナフタレンジイミドの構造は、ナフタレンを骨格とした平面性ヘテロ芳香環分子である。さらには、ナフタレンジイミドの2つのイミド部位に様々な置換基を対称に導入することが可能となる。ナフタレンジイミドの特徴として、Figure 1-1 に示しているようにナフタレンジイミドは簡単に電子を受けやすい構造であり、ラジカルアニオン性になることが報告されている¹⁻⁶⁾。この特徴を利用して、Iversonらのグループでは^{7, 8)}、Figure 1-2 に示しているように電子ドナーである芳香環と電子アクセプターであるナフタレンジイミドを分子内に交互に連結させたナフタレンジイミド誘導体を開発し、NMR や X線構造解析により、これらの芳香環が溶媒の種類によって交互にスタッキングしていることが明らかとした。さらには、Mukhopadhyay ら⁹⁾によって、電子ドナーである芳香環と電子アクセプターであるナフタレンジイミドをそれぞれ用いて、分子間で交互にスタッキングして色の異なるゲルを作成している。

また、ナフタレンジイミドの π 電子の相互作用により、ナフタレンジイミド同士が分子間でスタッキングすることが報告されている¹⁰⁻¹³⁾。Figure 1-3 に示すように、Shao ら¹⁴⁾によって、ナフタレンの π - π スタッキング相互作用によりリングが形成され、さらにナフタレンジイミドの両置換基に電荷をもつ官能基を導入することで、チューブを形成することに成功している。ナフタレンジイミド誘導体は、その特徴が解析され、それを利用してナノ材料や光学材料の研究¹⁴⁻¹⁶⁾にまで発展している。近年ではナフタレンジイミドを利用してゲルが作成されており、これを半導体材料へ応用した研究が行われている¹⁷⁾。

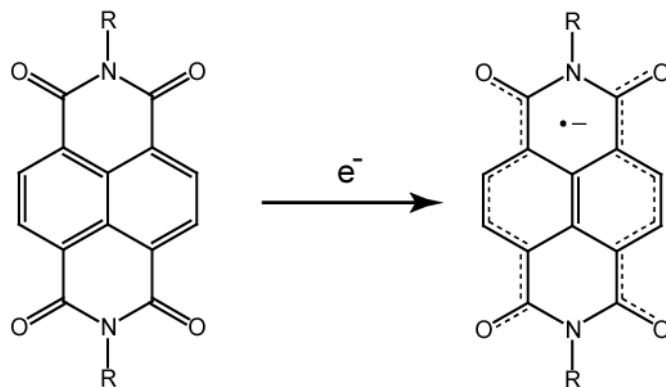


Figure 1-1. ナフタレンジイミドの構造式とその特徴.

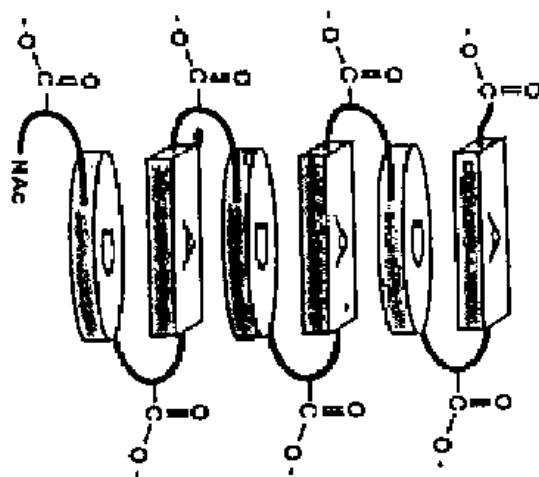


Figure 1-2. ナフタレンジイミドの電子アクセプターを利用して, 電子ドナーと組み合わせることによって作成された折り畳み構造を有するポリマー.

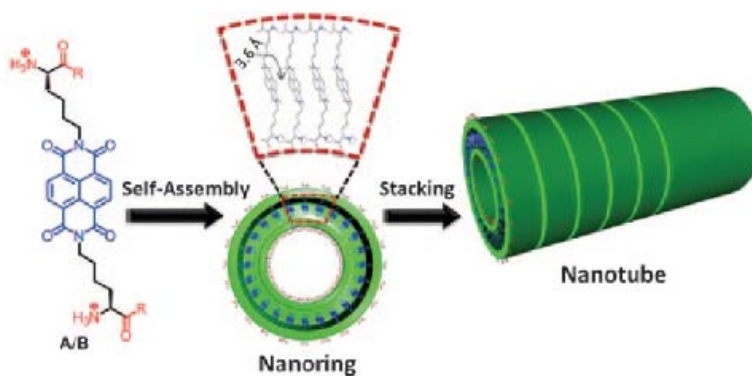


Figure 1-3. ナフタレンジイミド同士のスタッキングを利用して作成したナノチューブの模式図.

ナフタレンジイミドはマテリアル分野での研究だけでなく、バイオ分野での研究でも利用されている。Wilson らのグループ¹⁸⁾によるナフタレンジイミドと DNA との結合挙動の基礎研究によって、ナフタレンジイミドの DNA への結合様式が明らかになっている。DNA は Figure 1-4 に示したように核酸塩基、糖、そしてリン酸で構成されており、アデニン (A)とチミン (T)、グアニン (G)とシトシン (C)が水素結合して二重らせん構造をしている。そこに、ナフタレンジイミドと DNA が作用すると、Figure 1-5 に示しているように、平面分子であるナフタレンジイミド (Figure 1-1 の R = CH₂CH₂CH₂NH₂ を例として示した)が核酸塩基対間に平行挿入し、核酸塩基と芳香環がπ-πスタッキングによって相互作用して複合体を安定にし、芳香環の両置換基末端が主溝と副溝に突出した構造を形成することが明らかとなっている¹⁹⁻²²⁾。さらには、ナフタレンジイミドの両置換基の種類によって、DNA に結合したナフタレンジイミド誘導体の解離速度が非常に遅くなり、安定であることも明らかとなっている²³⁾。このような特徴を有するナフタレンジイミドは、縫い込み型インターカレーターと呼ばれており、多くの研究者がバイオ分野へこれら縫い込み型インターカレーターを応用している²⁴⁻³⁰⁾。

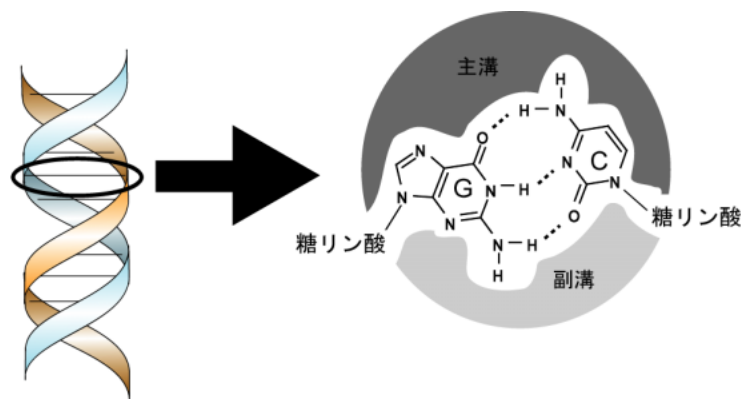


Figure 1-4. DNA の構造式。

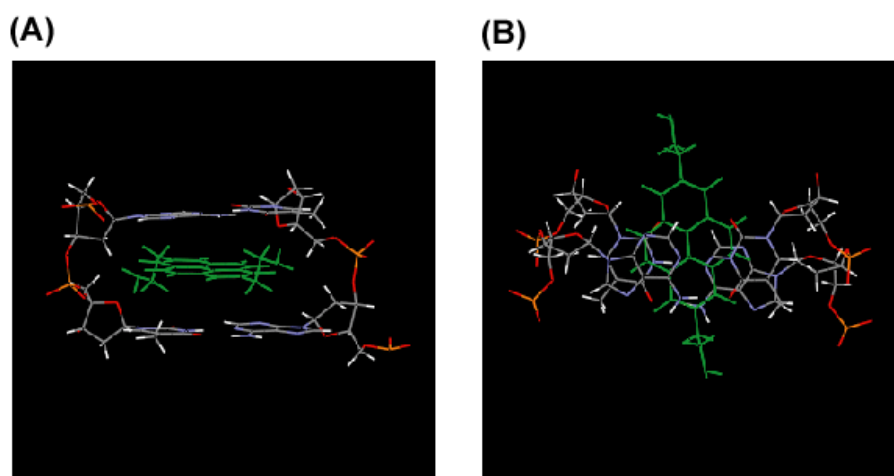


Figure 1-5. DNA に結合したナフタレンジイミド誘導体の横から見たモデル図(A)と上から見たモデル図(B)。

例えば, Takenaka ら²⁴⁾によって, アントラキノン環の両置換基末端にアクリジンを導入したトリスインターカレーターが開発されている. この化合物は, アントラキノンの両置換基に導入されているアクリジンが DNA の塩基対間を通り抜けた後, さらにアクリジンがインターカレート結合することが明らかになっており, さらには AT 塩基対への選択性を有していることが報告された. さらには, Iverson らのグループ²⁵⁾によるペプチドにナフタレンジイミドを連結したポリインターカレーターと DNA との結合を NMR によって, DNA に縫い込み型でポリインターカレート結合していることが証明された. これは, 分子内にナフタレンジイミドが複数個ペプチドで連結した化合物である. これは縫い込み型インターカレーターの特徴である主溝と副溝にペプチド残基が突出した複合体であり, 非常にユニークな結合である (Figure 1-6). さらには, 環状ビスインターカレーターも同様に DNA とインターカレート結合していることも明らかになっている²⁶⁻²⁸⁾. 通常, 環状化合物はインターカレート結合することは考えられない. しかし, DNA は核酸塩基対の水素結合が開裂したり, 形成したりする「breathing」メカニズムによって, DNA に隙間が生じる³¹⁻³³⁾. したがって, この「breathing」の間に環状化合物はインターカレート結合し, 安定化することが知られている. さらには, 環状化合物だけでなく, 通常の縫い込み型インターカレーターについても同様のことが言える. このような縫い込み型インターカレーターは, 薬学分野へも応用されている³⁴⁻³⁶⁾. Krishnamurthy ら³⁴⁾は縫い込み型インターカレーターとペプチドを連結させて環状体にし, その化合物が RNA のバルジ構造に結合することを明らかにした (Figure 1-7). さらに, その複合体を形成することで, RNA からの翻訳を阻害し, 疾病につながるタンパクの発現を抑制することが報告されている. このように, 縫い込み型インターカレーターが特定の遺伝子に結合することによる薬としての効果も期待されている. 実際に, ナフタレンジイミド誘導体も薬学への応用が可能になるものと考えられている^{37, 38)}. Takenaka ら³⁹⁾によって, 両置換末端にチミン塩基を導入したナフタレンジイミドは連続アデニン配列を有したバルジ構造体を安定にすることが報告されている. DNA の変異は疾病に関わるため, このようにナフタレンジイミド誘導体は薬効にも大きな期待がよせられる. このように, 縫い込み型インターカレーターであるナフタレンジイミドの DNA との結合の基礎研究が行われたことで, 遺伝子への結合能が特異的に高い様々なインターカレーターが開発されるようになった. 現在 DNA に結合する試薬の開発が進み, さらには縫い込み型の特徴を利用した遺伝子分析へ応用されている.

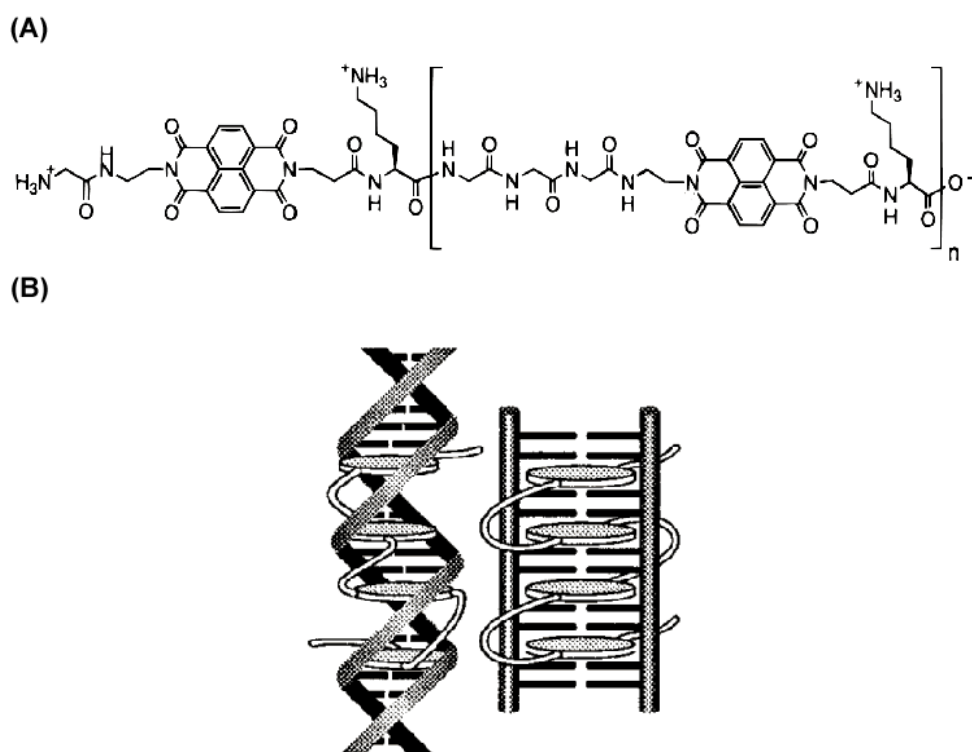


Figure 1-6. ペプチド骨格を利用したポリナフタレンジイミドの構造式(A)とこれを DNA との複合体との概念図(B)

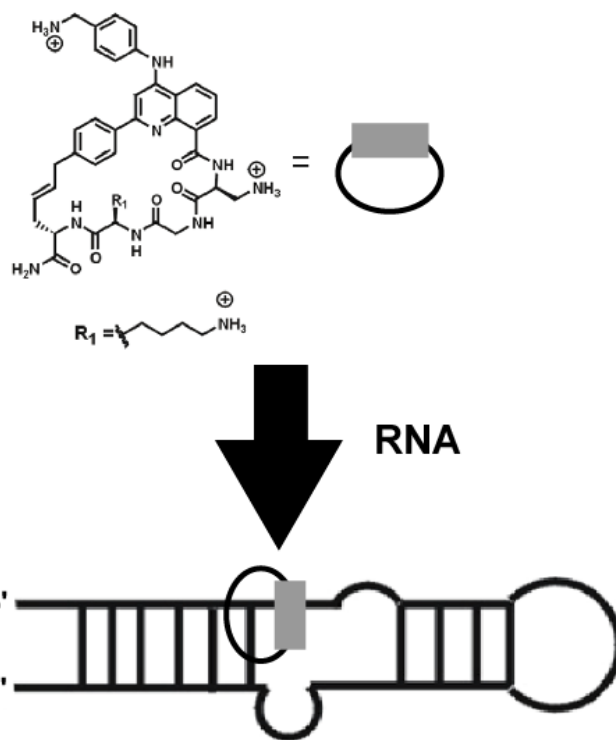


Figure 1-7. 環状縫い込み型インターカレーターを利用した RNA の高次構造の識別.

Takenaka らのグループ⁴⁰⁻⁴³⁾は多くの機能化ナフタレンジイミド誘導体を開発し、遺伝子解析へ応用してきた。Table 1 にナフタレンジイミド誘導体の一部を示している。例えば、ナフタレンジイミドの両置換基にフェロセンを導入したフェロセン化ナフタレンジイミド (FND)を用いた電気化学的遺伝子検出を達成している。この手法は、金電極にプローブ DNA を固定化し、FND を用いて 1 本鎖の電流値を見積もる。その後、ターゲット DNA をハイブリダイゼーションさせ、FND を用いて 2 本鎖の電流値を見積もる。この 1 本鎖と 2 本鎖の電流値の増加率で電気化学的遺伝子検出を行うものである (Figure 1-8)。

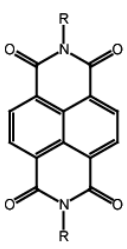
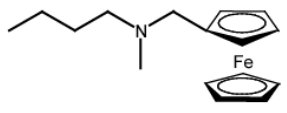
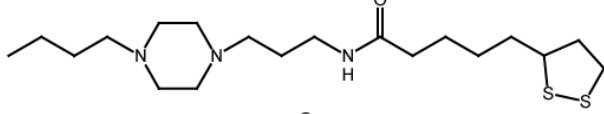
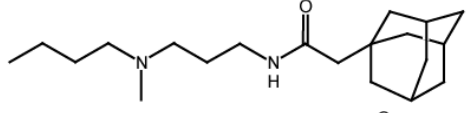
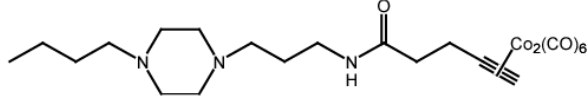
また一方、彼ら⁴⁴⁾は、チオクト酸を導入したナフタレンジイミド (NDI-ss)を用いて、天然の DNA の固定化を達成している。DNA の金電極の固定化法は、DNA にチオール基を導入させて、金電極上に DNA を固定化させることが一般的な手法として知られている。しかし、NDI-ss を用いることで、未修飾の 2 本鎖 DNA を金電極に簡便に固定化させることが可能となり、実際に PCR 産物に適用され、その検出に応用されている (Figure 1-9)。

また、彼ら⁴⁵⁾は、アダマンタンを導入したナフタレンジイミド (AND)とフェロセン化β-シクロデキストリン(Fc-β-CD)を用いた高感度な電気化学的遺伝子検出を達成している。この手法は FND を用いた電気化学的遺伝子検出法と類似しているが、固定化したプローブ DNA に AND と Fc-β-CD を作用させても、1 本鎖の結合能が低いので、AND が結合せずに Fc-β-CD の電流値は得られない。しかし、2 本鎖になることで、AND がインターカレート結合し、さらにはアダマンタンとβ-CD の包接により、Fc-β-CD の Fc が放出し、電流値が得られるものである。このように三元錯体を形成することで、2 本鎖特異的に電流値が得られている (Figure 1-10)。

さらに、彼ら⁴⁶⁾は、コバルト錯体を有するナフタレンジイミド (NDI-Co)を用いた FT-IR RAS による遺伝子検出を達成している。金基板に固定化した 1 本鎖 DNA に NDI-Co を作用させても、これまでのナフタレンジイミド誘導体と同様に結合能が小さいので NDI-Co は弱い相互作用により IR 吸収を持つコバルト錯体のピークは観測されない。それに対して、相補鎖 DNA をハイブリダイゼーションさせて、NDI-Co を作用させることで、コバルト錯体特有のピークが観測される。このように、NDI-Co は、FT-IR RAS による 2 本鎖 DNA 特異的検出法に利用できる (Figure 1-11)。

これらの結果より、機能化ナフタレンジイミドは DNA 精密分析試薬として更に発展できる可能性を秘めている。

Table 1. 種々のナフトレンジイミド誘導体.

	R	Compound
		FND ^{42, 43)}
		NDI-ss ⁴⁴⁾
		AND ⁴⁵⁾
		NDI-Co ⁴⁶⁾

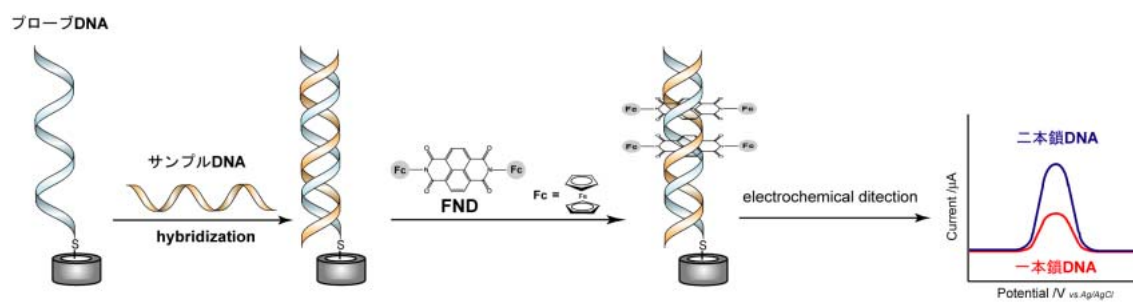


Figure 1-8. FND を用いた電気化学的遺伝子検出の概念図.

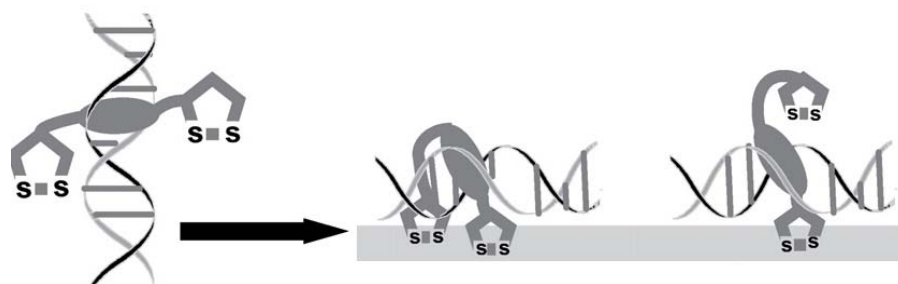


Figure 1-9. NDI-ss を用いた天然 DNA 固定化の概念図.

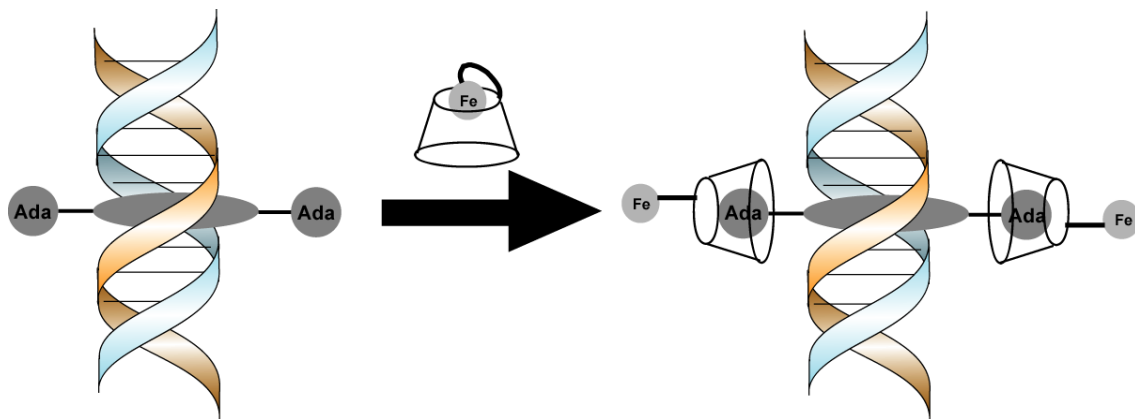


Figure 1-10. アダマンチルナフタレンジイミド (AND)とフェロセン化 β -CD を用いた高感度な電気化学的遺伝子検出の概念図.

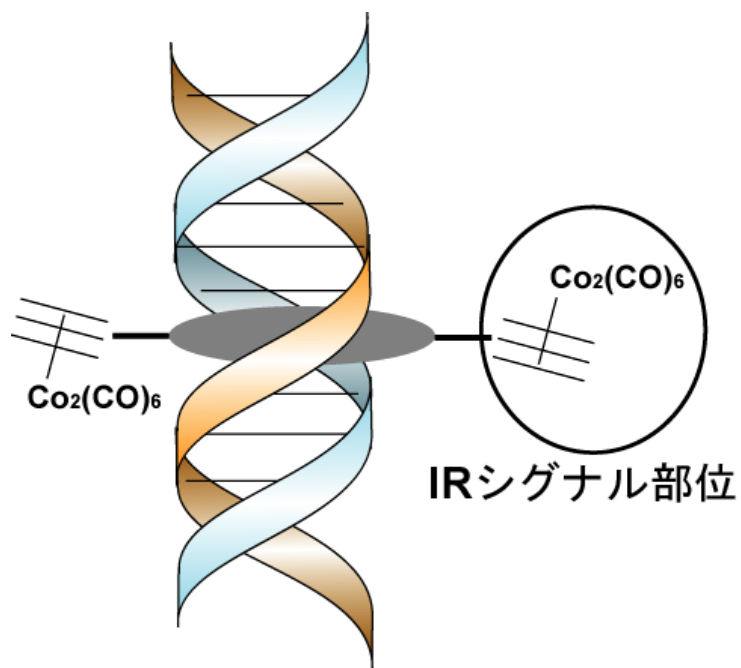


Figure 1-11. NDI-Co を用いた FT-IR による遺伝子検出のメカニズム.

1-2. 本研究の目的

これまで述べてきたように、ナフタレンジイミド誘導体は、その分子設計によって遺伝子解析用試薬として発展できる可能性を有することから、著者は新たに 3 つのナフタレンジイミド誘導体 (Figure 1-12)を設計・合成し、これらを用いた新たな遺伝子検出の構築を目的とした。

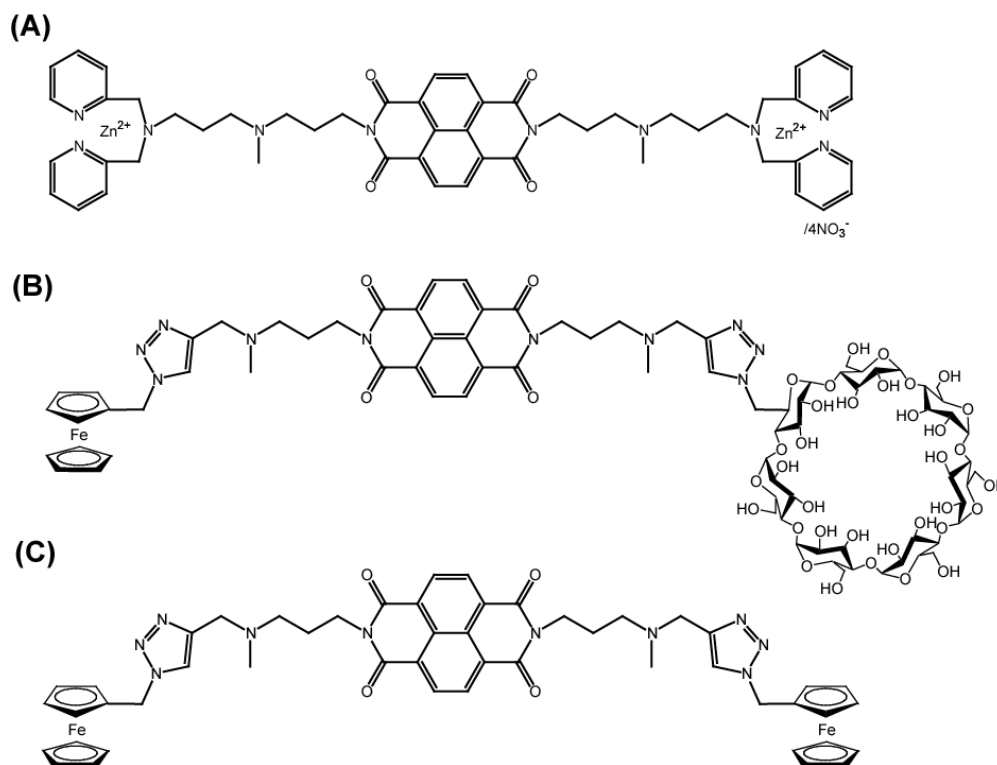


Figure 1-12. 本研究で設計・合成したナフタレンジイミド誘導体 . (A) zinc-dipicolylamine (Zn-Dpa)を有するナフタレンジイミド, (B) フェロセン (Fc)とβ-シクロデキストリン (β-CD)を Huisgen 環化反応で導入したナフタレンジイミド, (C) Fc を両置換基末端に Huisgen 環化反応で導入したナフタレンジイミド.

著者は、初めに zinc-dipicolylamine (Zn-Dpa)を有するナフタレンジイミド (NDI-Dpa-Zn)と DNA との相互作用解析を試みた。Ojida ら⁴⁷⁻⁴⁹⁾によって、Zn-Dpa はリン酸モノエステルと強い相互作用を示すことが報告されている (Figure 1-13)。DNA の場合、DNA 損傷でリン酸モノエステルが生成するので、DNA 骨格のリン酸ジエステルとリン酸モノエステルの識別を、NDI-Dpa-Zn で達成することができると考えられる。これを達成することができれば、DNA 損傷で得られるニック部位へ NDI-Dpa-Zn が強く結合することが期待され、それによって、DNA の損傷部位、またはその割合の検出が期待される。

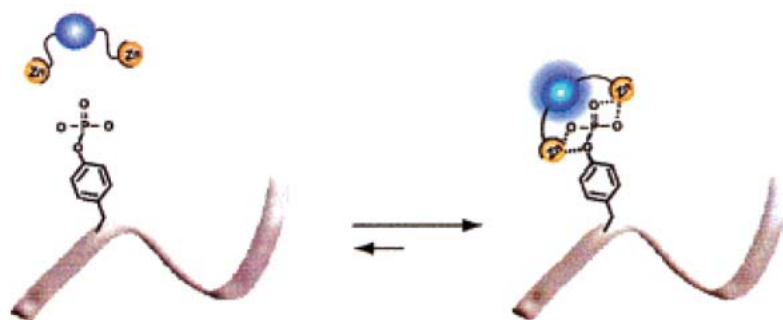


Figure 1-13. Zn-Dpa を有する蛍光色素のリン酸化ペプチド検出の概念図.

次に、設計・合成した試薬は、フェロセン (Fc)と β -シクロデキストリン (β -CD)を有するナフタレンジイミド (FNC)である。 β -CDはそのサイズに合った様々なゲスト分子を包接することができるので、非常に興味深い化合物である。このような特徴を利用して、近年では β -CDを用いた遺伝子検出が行われている。しかし、その多くは β -CDあるいは蛍光色素を導入したDNAを用いた検出系である。それに対して、Satoら^{42, 45)}によって、ナフタレンジイミド誘導体と β -CDを用いたユニークな電気化学的遺伝子検出が達成された。しかし、これらの検出法は、DNA, Fc, そして β -CDの3種類を利用した検出法であり、非常に複雑な検出系である。さらに、DNA修飾電極を用いた電気化学的検出を行っている。そこで、著者はDNA修飾電極を用いない均一溶液中での検出が可能であれば、簡便な電気化学的遺伝子検出を確立できると考えた。均一溶液中での検出を確立することが期待できる試薬として、 β -CDとFcを分子内に導入したFNCを考案した。しかしながら、 β -CDを導入するのは非常に困難である。Postovtsevら⁵⁰⁾によって、Huisgen環化反応により、アジドとアルキンを銅(I)触媒存在下で定量的に反応が進行することが報告されている。この反応の利点は、反応が定量的に進行するので精製が簡便である。そこで、FNCの合成ではこのHuisgen環化反応を用いて導入することにした。設計したFNCを用いての電気化学的遺伝子検出は、Figure 1-14に示しているようにFNCは水溶液中では包接し、DNAに結合することで、Fcが放出し、電流値が回復するのではないかと考えられる。これによって、これまでのDNA, Fc, β -CDの3種類を利用した複雑な検出系から、簡便な検出系を達成できると考えた。

最後に、Fcを両置換基末端にHuisgen環化反応で導入したナフタレンジイミド (FNF)を設計・合成を行った。この化合物は、著者の研究室が開発してきたFND誘導体の一種であり、従来のFNDとは異なり、リンカー部位にトリアゾール基を導入しているため、これがDNAとの相互作用に影響を及ぼすものと考えた。さらには、FNCでの電気化学的検出のコントロール実験として、電気化学的遺伝子検出の検討を行った。このときに、FNFを用いた電気化学的挙動を評価することで、FNCの電気化学的検出の確立に重要な役割を果たすものと期待される。このように、FNFは従来のFNDやFNCのコントロール試薬となり、電気化学的遺伝子検出の新たな手法の確立の手助けになるものと考えた。

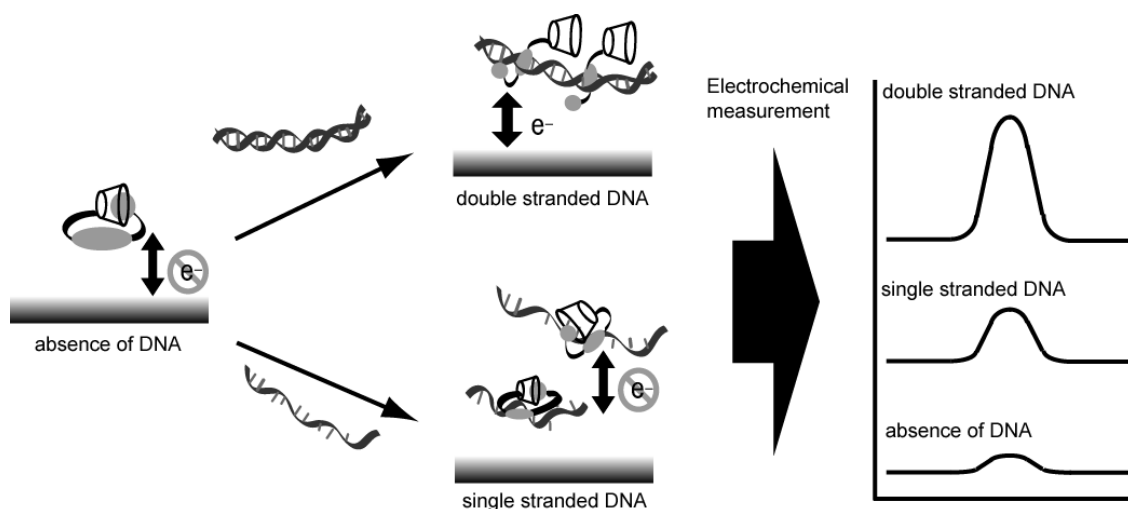


Figure 1-14. FNC を用いた均一溶液中での電気化学的遺伝子検出の概念図.

本論文では5章構成として,これらの成果について述べた.第1章では,縫い込み型インターカレーターであるナフタレンジイミド誘導体について論じた.ナフタレンジイミド誘導体は置換基を様々な機能性に変換することが可能となり,遺伝子の検出に有用である.そこで,著者が設計した3種類のナフタレンジイミド誘導体の遺伝子検出の概要について紹介した.

第2章では,zinc-dipicolylamine (Zn-Dpa)を有するNDI-Dpa-Znを合成し,DNAとの相互作用解析について述べた.さらに,Zn-Dpaの特徴を利用して,DNA損傷で産生されるリン酸モノエステルとDNA骨格のリン酸ジエステルの識別の検出の試みについて論じた.

第3章では,Fcと β -CDをHuisgen環化反応によって導入したFNCを合成し,DNAとの相互作用解析について述べた.また,FNCと結合したDNAの構造を評価し,固相表面の状態,溶液中での状態を検討し,さらに電気化学的遺伝子検出の検討について述べた.

第4章では,2つのFcをHuisgen環化反応によって導入したFNFを合成し,DNAとの相互作用解析について論じた.FNFはFND誘導体の一種であるのでFNDと比較することにした.また,FNCの電気化学的遺伝子検出のコントロール化合物であるFNFを用いた新たな電気化学的遺伝子検出の検討について論じた.

第5章では本論文の総括を述べ,今後の展望について述べた.

1-3. 参考文献

- 1) G. Heywang, L. Born, H.-G. Fitzky, T. Hassel, J. Hocker, H.-K. Müller, B. Pittel, S. Roth, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **28**, 483-485 (1989).
- 2) S. Alp, Ş. Erten, C. Karapire, B. Köz, A. O. Doroshenko, S. İçli, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **135**, 103-110 (2000).
- 3) B. Abraham, S. McMasters, M. A. Mullan, L. A. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4293-4300 (2004).
- 4) S. Green, M. A. Fox, *J. Phys. Chem.*, **99**, 14752-14757 (1995).
- 5) S. R. Greenfield, W. A. Svec, D. Gosztola, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6767-6777 (1996).
- 6) B. M. Aveline, S. Matsugo, R.W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 11785-11795 (1997).
- 7) R. S. Lokey, B. L. Iverson, *Nature*, **375**, 303-305 (1995).
- 8) M. S. Cubberley, B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7560-7563 (2001).
- 9) P. Mukhopadhyay, Y. Iwashita, M. Shirakawa, S. Kawano, N. Fujita, S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 1592-1595 (2006).
- 10) V. Steullet, D. W. Dixon, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1547-1558 (1999).
- 11) T. C. Barros, S. Brochsztain, V. G. Toscano, P. B. Filho, M. J. Politi, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **111**, 97-104 (1997).
- 12) J. Gawroński, M. Brzostowska, K. Kacprzak, H. Kolbon, P. Skowronek, *Chirality*, **12**, 263-268 (2000).
- 13) K. M. Figueiredo, R. O. Marcon, I. B. Campos, I. L. Nantes, S. Brochsztain, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **79**, 1-9 (2005).

- 14) H. Shao, J. Seifert, N. C. Romano, M. Gao, J. J. Helmus, C. P. Jaroniec, D. A. Modarelli, J. R. Parquette, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 7688-7691 (2010).
- 15) S. Burattini, B. W. Greenland, D. H. Merino, W. Weng, J. Seppala, H. M. Colquhoun, W. Hayes, M. E. Mackay, I. W. Hamley, S. J. Rowan, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 12051-12058 (2010).
- 16) J. Zheng, W. Qiao, X. Wan, J. P. Gao, Z. Y. Wang, *Chem. Mater.*, **20**, 6163-6168 (2008).
- 17) H. Shao, J. R. Parquette, *Chem. Commun.*, **46**, 4285-4287 (2010).
- 18) S.-F. Yen, E.J. Gabbay, W.D. Wilson, *Biochemistry*, **21**, 2070-2076 (1982).
- 19) S. Takenaka, T. Ihara, M. Takagi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1485-1487 (1990).
- 20) S. Takenaka, N. Shigemoto, H. Kondo, *Supramol. Chem.*, **9**, 47-56 (1998).
- 21) R. E. McKnight, J. Zhang, D. W. Dixon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 401-404 (2004).
- 22) L. Xie, X. Qian, J. Cui, Y. Xiao, K. Wang, P. Wu, L. Cong, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 8713-8718 (2008).
- 23) F.A. Tanious, S.-F. Yen, W.D. Wilson, *Biochemistry*, **30**, 1813-1819 (1991).
- 24) S. Takenaka, S. Nishira, K. Tahara, H. Kondo, M. Takagi, *Supramol. Chem.*, **2**, 41-46 (1993).
- 25) R. S. Lokey, Y. Kwok, V. Guelev, C. J. Pursell, L. H. Hurley, B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 7202-7210 (1997).
- 26) A. Slama-Schwok, M.-P. Teulade-Fichou, J.-P. Vigneron, E. Taillandier, J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6822-6830 (1995).
- 27) M. Jourdan, J. Garcia, J. Lhomme, M.-P. Teulade-Fichou, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, *Biochemistry*, **38**, 14205-14213 (1999).
- 28) Y. Chu, D. W. Hoffman, B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3499-3508 (2009).

- 29) V. Steullet and D. W. Dixon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2935-2940 (1999).
- 30) R. E. McKnight, A. B. Geleson, J. A. Keyes, S. Sahabi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 1013-1017 (2007).
- 31) M. Nakanishi, M. Tsuboi, *FEBS Lett.*, **81**, 61-64 (1977).
- 32) M. Nakanishi, Y. Mitane, M. Tsuboi, *Biochim. Biophys. Acta*, **798**, 46-52 (1984).
- 33) H. Takashima, M. Nakanishi, M. Tsuboi, *Biochemistry*, **24**, 4823-4825 (1985).
- 34) M. Krishnamurthy, N. T. Schirle, P. A. Beal, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 8914-8921 (2008).
- 35) C. B. Carlson, M. Vuyisich, B. D. Gooch, P. A. Beal, *Chem. Biol.*, **10**, 663-672 (2003).
- 36) H.-S. Huang, K.-F. Huang, C.-L. Li, Y.-Y. Huang, Y.-H. Chiang, F.-C. Huang, J.-J. Lin, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 6976-6986 (2008).
- 37) V. Tumiatti, A. Milelli, A. Minarini, M. Micco, A. G. Campani, L. Roncuzzi, D. Baiocchi, J. Marinello, G. Capranico, M. Zini, C. Stefanelli, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.*, **52**, 7873-7877 (2009).
- 38) J. B.-H. Tok, J. Fenker, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2987-2999 (2001).
- 39) S. Takenaka, M. Yokoyama, H. Kondo, *Chem. Commun.*, 115-116 (1997).
- 40) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo, *Anal. Chem.*, **72**, 1334-1341 (2000).
- 41) S. Sato, S. Fujii, K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, **637-639**, 476-483 (2001).
- 42) S. Sato, T. Nojima, M. Waki, S. Takenaka, *Molecules*, **10**, 693-707 (2005).
- 43) S. Sato, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, **693**, 1177-1185 (2008).
- 44) S. Sato, A. Hirano, S. Takenaka, *Anal. Chim. Acta*, **665**, 91-97 (2010).

- 45) S. Sato, T. Nojima, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, **689**, 4722-4728 (2004).
- 46) K. Ohtsuka, K. Komizo, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, **695**, 1281-1286 (2010).
- 47) A. Ojida, Y. Mito-oka, M. Inoue, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6256-6258 (2002).
- 48) A. Ojida, Y. Mito-oka, K. Sada, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2454-2463 (2004).
- 49) T. Sakamoto, A. Ojida, I. Hamachi, *Chem. Commun.*, 141-152 (2009).
- 50) V. V. Postovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2596-2599 (2002).

第 2 章

zinc-dipicolylamine (Zn-Dpa)を有する

ナフタレンジイミド (NDI-Dpa-Zn)による DNA リン酸モノエステルの識別

2-1. 緒言

細胞内で起きている DNA 複製では, DNA ポリメラーゼの働きによって dNTP のトリリン酸からピロリン酸への加水分解が起こり, DNA が合成される. また, シグナル伝達系で, タンパク質がリン酸化されることで上流から下流へとシグナルが伝達されることが知られている. このように, リン酸は生体内で非常に重要な役割を果たしている. さらには, リン酸は生命維持と密接な関係がある. 例えば, DNA 骨格であるリン酸ジエステルは, 紫外線あるいは X 線など光照射や活性物質などのストレスがかかると, リン酸ジエステルのニックや切断が生じ, リン酸モノエステルが産生される¹⁾. 生体内では, DNA が損傷しても, 修復する機能が備わっている. しかし, この修復機能が低下すると, DNA は損傷したままとなり, 様々な疾病を引き起こすことになる²⁻⁵⁾. したがって, DNA 損傷して得られたリン酸モノエステルを定性的あるいは定量的な検出は, 薬学の観点で重要になる. 現在, DNA 損傷の検出では, ターゲット DNA を伸長させ, それからゲル電気泳動やオートラジオグラフィなどによって解析する DNA footprinting 法によって検出が行われている⁶⁾. しかしながら, DNA footprinting の操作は煩雑で時間を要する. そこで, この検出法に変わりうる簡便な手法が開発されてきた⁷⁻⁹⁾. これらの手法は, DNA 損傷に関与している H₂O₂ や O₂ ラジカルなどの活性酸素を用いた検出である. しかしながら, 活性酸素に関しても生体内では重要な役割を担っており, DNA 損傷に関わっているかどうかの識別が困難になる. そこで, 著者は, DNA 損傷して得られるリン酸モノエステルに着目した. リン酸モノエステルを検出することができれば, DNA 損傷, そして疾病の早期発見につながるものと期待される. DNA 損傷で必要になるのが, DNA 骨格のリン酸ジエステルとリン酸モノエステルの識別能の違いである. 近年, リン酸検出において zinc(II)-dipicolylamine (Zn-Dpa)錯体が着目されている¹⁰⁻¹³⁾. この錯体は, リン酸モノエステルとリン酸ジエステルの識別能が高いことが報告されている. したがって, 著者は DNA にインターカレート結合するナフタレンジイミドに Zn-Dpa を導入した NDI-Dpa-Zn (Figure 2-1)を設計し, NDI-Dpa-Zn は Figure 2-2 に示しているように DNA 損傷したリン酸モノエステルだけを識別するものと期待される.

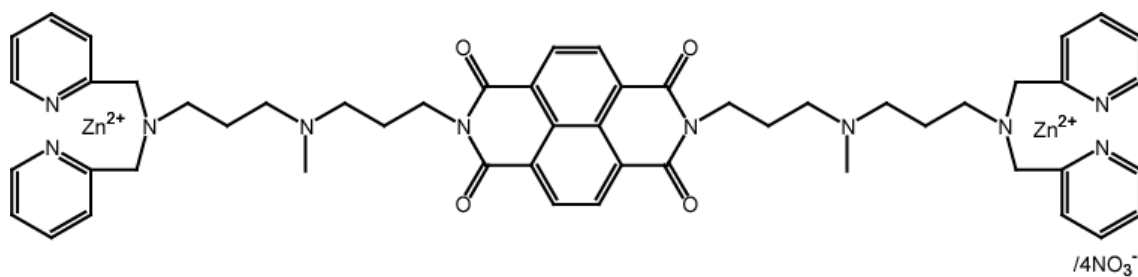


Figure 2-1. NDI-Dpa-Zn の構造式 .

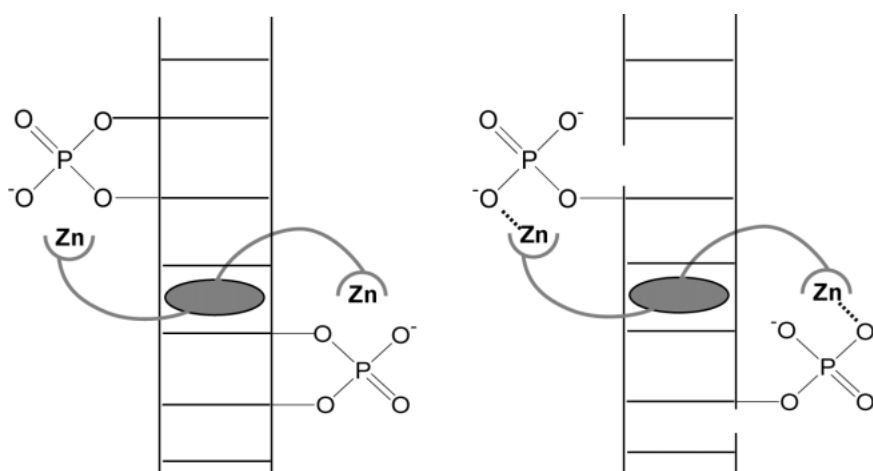


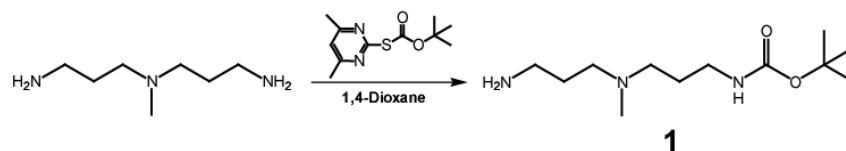
Figure 2-2. NDI-Dpa-Zn による DNA のリン酸ジエステルとリン酸モノエステルの相互作用モデル .

本章では、基礎実験として、リン酸モノエステルを導入したオリゴヌクレオチドと開発した NDI-Dpa-Zn を用いて相互作用解析を行い、DNA 骨格であるリン酸ジエステルとリン酸モノエステルの識別能を評価した。さらに、DNase I で仔牛胸腺 DNA (Calf thymus DNA, Ct-DNA) を処理し、擬似的に DNA 損傷を起こし、NDI-Dpa-Zn との相互作用解析を行い、NDI-Dpa-Zn は DNA 損傷に適応可能であるか評価した。

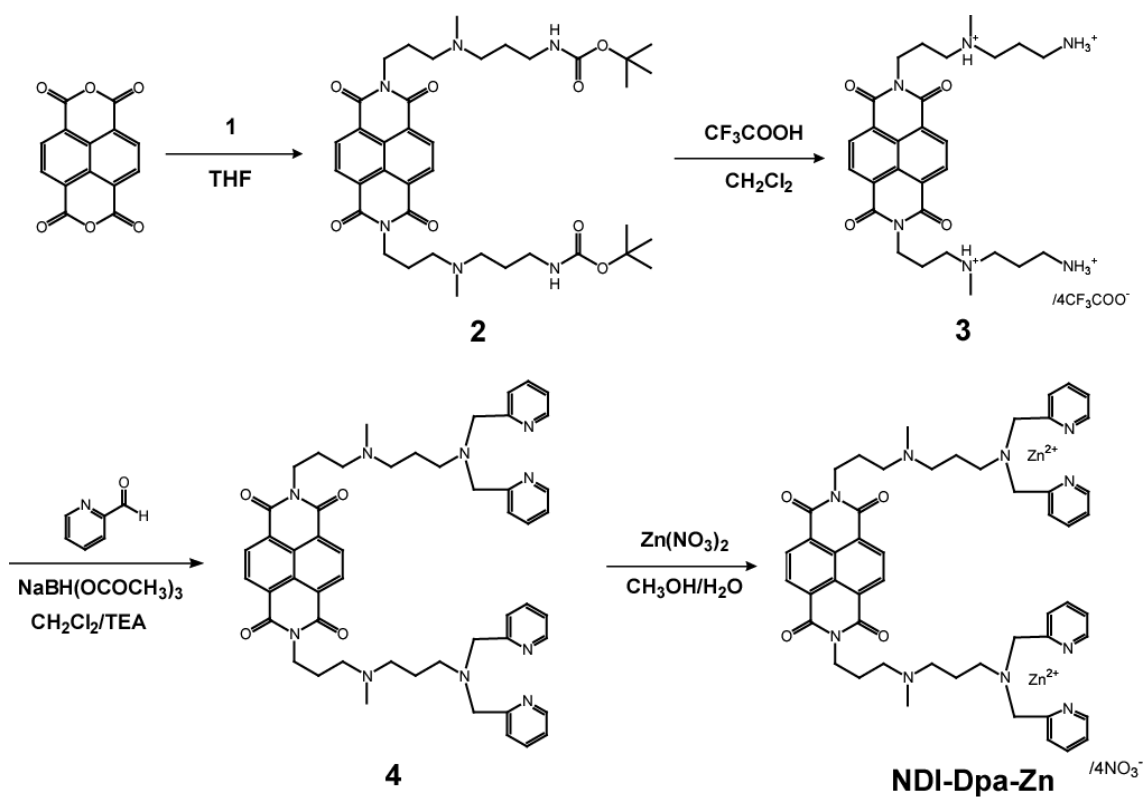
2-2. 実験

2-2-1. 合成

化合物 3 までは過去の合成法¹⁴⁾を参考にして合成し, 下記のスキームに従って Zn-Dpa 錯体を有する新規ナフトレンジイミド (NDI-Dpa-Zn)の合成を行った.



Scheme 2-1



Scheme 2-2

2-2-1-1. [3-[(3-Aminopropyl)methylamino]propyl]carbamic acid *tert*-butyl ester (1)の合成

N, N-Bis(3-aminopropyl)methylamine 14.53 g (0.1 mol)を 30 ml の 1,4-ジオキササンに溶かし, この溶液に S-*tert*-butyloxycarbonyl-4, 6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine 12.11 g (0.05 mol)を 80 ml の 1,4-ジオキササンに溶かした溶液を約 14 時間かけてゆっくりと滴下した. 滴下が終わった後, 6 時間攪拌した. 攪拌後, MilliQ 水を加え, 得られた白色固体を溶かし, 自然濾過を行った. 濾過した後, 1,4-ジオキササンを減圧留去した. 減圧留去した後, MilliQ 水を加え, NaCl を飽和になるまで加えた. しばらく放置し, 析出した沈殿物と NaCl を吸引濾過で取り除き, 濾液を分液ロートにかけ酢酸エチ

ルを加えて, [3-[(3-Aminopropyl)methylamino]propyl]carbamic acid *tert*-butyl ester を抽出した(20 ml × 3 回). 酢酸エチル相に MgSO₄ を加え, 1 時間乾燥した. その後, 自然濾過し, 酢酸エチルを減圧留去した. 3 時間, 減圧乾燥して黄色の油状物質を得た. 収量 8.32 g (33.9 mmol), 収率 34 % (文献値 25 %). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.44 (9H, s), 1.63 (4H, m), 2.19 (3H, s), 2.36 (4H, m), 2.75 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.17 (2H, d, *J* = 5.7 Hz) ppm.

2-2-1-2. N, N-Bis[3-(3-*tert*-butoxycarbonylamino)propyl]methylaminopropyl]naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (2)の合成

[3-[(3-Amino-propyl)methyl-amino]propyl]carbamic acid *tert*-butyl ester 2.0 g (8.0 mmol)を 25 ml のテトラヒドロフラン(THF)に溶かし, この溶液を Naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid dianhydride 0.54 g (2.0 mmol)に加え, 80 °C で 18 時間還流した. 還流後, 溶液を室温で放冷し, THF を減圧留去したところ黒褐色の固体が得られた. この固体にクロロホルム約 50 ml 加えて溶かし, 自然濾過をした. 濾液を減圧留去したところ黒褐色の固体が得られた. この固体にメタノール約 30 ml 加えて溶かし, 自然濾過した. メタノールを減圧留去し, 黒褐色の油状物質を得た. この生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(展開溶媒: THF)で処理し, R_f 値 = 0.41 の成分を分取して展開溶媒を減圧留去した. 3 時間減圧乾燥し, 橙色の固体を得た. 収量 1.17 g (1.62 mmol). 収率 81 % (文献値 62 %¹⁴). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.42 (18H, s), 1.65 (4H, m), 1.90 (4H, m), 2.23 (6H, s), 2.41 - 2.49 (8H, m), 3.21 (4H, t, *J* = 6.2 Hz), 4.26 (4H, t, *J* = 7.6 Hz), 8.76 (4H, s) ppm. MALDI-TOF-MS (positive mode, α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (α-CHCA)): *m/z* = 725.91 (理論値: C₃₈H₅₄N₆O₈+H⁺ = 723.87). 融点: 106 - 109 °C (文献値 115 - 120 °C¹⁴).

2-2-1-3. N, N-Bis[3-(3-Aminopropyl)methylaminopropyl]naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (3)の合成

約 20 ml のジクロロメタンに化合物 2 1.0 g (1.38 mmol)を溶かし, この溶液にトリフルオロ酢酸 (TFA)を約 6 ml (約 135 mmol)加え, 5 時間攪拌し, TLC (展開溶媒: クロロホルム : メタノール : トリエチルアミン = 9 : 1 : 1, ニンヒドリン)で反応が終了したことを確認した. ジクロロメタン, TFA を減圧留去し, 48 時間加熱減圧乾燥し, 白黄色の固体を得た. 収量 1.33 g (1.36 mmol). 収率 98 % (文献値 97 %¹⁴). ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.10 - 2.25 (8H, m), 2.92 (6H, s), 3.05 (4H, t, *J* = 7.6 Hz), 3.30 (4H, t), 4.30 (4H, t, *J* = 6.7 Hz), 4.85 (4H, t), 8.76 (4H, s) ppm. MALDI-TOF-MS (positive mode, α-CHCA): *m/z* = 525.96 (理論値: C₂₈H₃₈N₆O₄+H⁺ = 523.64). 融点 228 - 233 °C.

2-2-1-4. N, N-Bis-3-(3-(2,2-dipicolylaminopropyl)methylaminopropyl)naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (4)の合成

反応前に系に水が入らないように窒素置換を行った。化合物 3 0.10 g (0.10 mmol)をトリエチルアミン 0.11 ml (0.80 mmol)と乾燥ジクロロメタン 10 ml に溶かし、この溶液に 2-Pyridinecarboxaldehyde 0.095 ml (1.0 mmol)を加えて 30 分間攪拌した。30 分後、sodium triacetoxyborohydride 0.42 g (2.0 mmol)を加え、室温で 18 時間攪拌した。攪拌後、TLC (展開溶媒: クロロホルム : メタノール = 9 : 1, ニンヒドリン)で反応が終了したことを確認した。2 M NaOH を 0.50ml 加え、1 M HCl を加えて pH 6 にした。水相とジクロロメタン相を分け、水相をクロロホルムで抽出した (10 ml × 3 回)。ジクロロメタン相とクロロホルム相を混ぜ、飽和食塩水で洗浄した (20 ml × 1 回)。有機相を硫酸ナトリウムで 3 時間乾燥させた。有機相を減圧留去し、茶色の油状物質が得られた。生成物をジクロロメタン 20 ml に溶かし、水で洗浄した (30 ml × 2 回)。ジクロロメタン相を Na₂SO₄ で 3 時間乾燥させ、ジクロロメタン相を減圧留去し、茶色の油状物質を得た。収量 0.03 g (0.03 mmol)。収率 34 %。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.81 - 1.94 (4H, m), 2.18 - 2.30 (4H, m), 2.50 - 2.70 (4H, m), 2.57 (6H, s), 2.80 - 2.90 (4H, m), 2.90 - 3.10 (4H, m), 3.73 (8H, s), 4.12 - 4.28 (4H, m), 7.08 (4H, m), 7.33 (4H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.60 (4H, m), 8.46 (4H, d, *J* = 4.1 Hz), 8.60 (4H, s) ppm. MALDI-TOF-MS (positive mode, α-CHCA): *m/z* = 888.99 (理論値: C₅₂H₅₈N₁₀O₄+H⁺ = 888.08)。

2-2-1-5. N, N-Bis-3-(3-(2,2-dipicolylaminopropyl)methylaminopropyl)naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide-Zn complex (NDI-Dpa-Zn)の合成

化合物 4 0.02 g (0.02 mmol)をメタノール 2 ml に溶かし、この溶液に硝酸亜鉛・6 水和物 0.01 g (0.04 mmol)を MilliQ 水 1 ml に溶かした溶液を加え、30 分間攪拌した。メタノールを減圧留去し、一晩、水を凍結乾燥し、赤白色の粉末を得た。収量 0.03 g (0.02 mmol)、収率 100 %。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.70 - 1.87 (8H, m), 2.70 - 2.80 (4H, m), 3.12 (6H, s), 3.25 - 3.48 (8H, m), 3.94- 4.02 (4H, m), 7.73 (4H, dd, *J* = 0.7, 7.4 Hz), 7.75 (4H, d, *J* = 6.7 Hz), 8.10 (4H, t, *J* = 7.4 Hz), 8.64 (4H, d, *J* = 2.2 Hz), 8.70 (4H, s) ppm.

2-2-2. 金属イオンの添加に伴う化合物 4 の蛍光スペクトル変化の測定

初めに、5 μM 4 を含む 100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.2)溶液を調製し(全量 3000 μl)、蛍光測定を行った。その後、1 mM Zn(NO₃)₂ 溶液を各最終濃度 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, そして 40 μM)になるよう添加し、蛍光測定を行った。また、1 mM Zn(NO₃)₂ 溶液と同様に、1 mM Mg(NO₃)₂ 溶液を各最終濃度 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, そして 110 μM)になるよう添加し、蛍光測定を行った。励起波長はλ_{ex} = 360 nm、蛍光波長はλ_{em} = 396 nm、測定温度は 25 °C で行った。

2-2-3. NDI-Dpa-Zn と 2 本鎖 DNA との相互作用解析

2-2-3-1. 仔牛胸腺 DNA (Ct-DNA) の添加に伴う NDI-Dpa-Zn の吸収スペクトル変化による結合能評価

4.3 μM NDI-Dpa-Zn を含む 100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.2) 溶液を調製し (全量 3000 μl), 吸光度測定を行った。その後, 3 mM/bp Ct-DNA を添加に伴う吸光度測定を行った。測定温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ で行った。

2-2-3-2. NDI-Dpa-Zn の添加に伴う Ct-DNA の円二色性 (CD) スペクトル測定

80 μM /bp Ct-DNA を含む 100 mM NaCl を含む 50 mM HEPES (pH 7.2) 溶液を調製し (全量 3000 μl), CD 測定を行った。その後, 645 μM NDI-Dpa-Zn を各最終濃度 (1, 3, 6, 10, 15, そして 21 μM) になるように添加し, CD 測定を行った。測定条件は走査速度 20 nm/min, レスポンス 2 sec, データ間隔 0.1 nm, 感度 100 mdeg, バンド幅 2 nm, 積算回数 4 回, 測定温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ で行った。

2-2-3-3. NDI-Dpa-Zn の添加に伴う poly[dA-dT]₂ の粘度測定

50 μM poly[dA-dT]₂ を含む 100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.2) 溶液を調製し (全量 3000 μl), 粘度測定を行った。次に, 645 μM NDI-Dpa-Zn 溶液を 2, 4, 6, 8, 10, 12, そして 14 μl 添加し, 粘度測定を行った。測定温度は 30 $^{\circ}\text{C}$ で行った。その後, $[\eta/\eta_0]^{1/3} = [(t - t_0)/(t_{\text{DNA}} - t_0)]^{1/3} = 1 + v$ の式より, NDI-Dpa-Zn 非存在下に対する粘度の比を算出した。 t_0 は毛細管中を buffer のみの測定時間, t_{DNA} と t はそれぞれ NDI-Dpa-Zn 非存在下, 存在下の時の測定時間, v は DNA 塩基対当りに結合したインターカレーターの本数である。

2-2-3-4. NDI-Dpa-Zn の添加に伴うプラスミド DNA の Topoisomerase I assay

plasmid DNA として pUC19 (2686 bp) 0.25 μg を含む 0.1 % BSA, 1 \times Reaction buffer (1 \times Reaction buffer の組成: 35 mM Tris-HCl (pH 8.0), 72 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM ジチオスレイトール (DTT), 5 mM スペルミジン), 5 U Topoisomerase I 溶液を調製し, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間インキュベートした。その後, NDI-Dpa-Zn を各最終濃度 (1, 2, 3, 4, そして 5 μM) になるように 1 μl ずつ加えて調製し, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。酵素反応後, 10 % SDS 2 μl , 20 mg/ml proteinase K 0.5 μl 加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ でさらに 15 分間インキュベートし, 酵素反応停止を行った。インキュベート後, 1 \times TE を 100 μl ずつ加え, さらにフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1 を 100 μl 加えて 1 分間攪拌, 遠心し, フェノール相を取り除いた。この操作を 3 回繰り返した。その後, クロロホルム : イソアミルアルコール = 24 : 1 を 100 μl 加えて 1 分間攪拌し, 遠心した後, 有機相を取り除いた。この操作を 3 回繰り返した。その後, 1 % アガロースゲルにより 1 \times TAE 中で 18 V, 3.5 時間泳動を行った。3.5 時間後, 1 \times TAE 100 ml に Gelstar 5 μl を加え, 30 分間染色を行った。

2-2-3-5. NDI-Dpa-Zn の Topoisomerase I 阻害能評価

plasmid DNA として pUC19 (2686 bp) 0.25 μg を含む 0.1 % BSA, 1 \times Reaction buffer (1 \times Reaction buffer の組成: 35 mM Tris-HCl (pH 8.0), 72 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 5 mM スペルミジン)溶液を調製し, NDI-Dpa-Zn を各最終濃度 (1, 2, 3, 4, そして 5 μM)になるように 1 μl ずつ加えて, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間インキュベートした. その後, 5 U Topoisomerase I 溶液を加えて, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートした. 酵素反応後, 10 % SDS 2 μl , 20 mg/ml proteinase K 0.5 μl 加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ でさらに 15 分間インキュベートし, 酵素反応停止を行った. インキュベート後, 1 \times TE を 100 μl ずつ加え, さらにフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1 を 100 μl 加えて 1 分間攪拌, 遠心し, フェノール相を取り除いた. この操作を 3 回繰り返した. その後, クロロホルム : イソアミルアルコール = 24 : 1 を 100 μl 加えて 1 分間攪拌し, 遠心した後, 有機相を取り除いた. この操作を 3 回繰り返した. その後, 1 %アガロースゲルにより 1 \times TAE 中で 18 V, 3.5 時間泳動を行った. 3.5 時間後, 1 \times TAE 100 ml に Gelstar 5 μl を加え, 30 分間染色を行った.

2-2-3-6. Stopped-flow 測定による Ct-DNA と NDI-Dpa-Zn の速度論解析

2-2-3-6-1. 会合速度定数の評価

2.5, 5, 7.5, 10, そして 12.5 μM NDI-Dpa-Zn を含む 100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.2)溶液 (全量 3000 μl)と 25, 50, 75, 100, そして 125 $\mu\text{M}/\text{bp}$ Ct-DNA を含む 100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.2)溶液を調製し (全量 3000 μl), NDI-Dpa-Zn 溶液と Ct-DNA 溶液を混ぜたときの 384 nm の吸光度変化の測定を Stopped-flow 分光光度計を用いて行った. 測定温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ で行った.

2-2-3-6-2. 解離速度定数の評価

5 μM NDI-Dpa-Zn と 50 $\mu\text{M}/\text{bp}$ Ct-DNA を含む 100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.2)溶液 (全量 3000 μl)と 1 % SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)を含む 100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.2)溶液 (全量 3000 μl)を調製し, NDI-Dpa-Zn と Ct-DNA の複合体溶液と SDS 溶液を混ぜたときの 384 nm の吸光度変化の測定を Stopped-flow 分光光度計を用いて行った. 測定温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ で行った.

2-2-3-6-3. 金属イオンの濃度変化に伴う 4 の Ct-DNA からの解離速度定数の評価

5 μM 4 と 50 $\mu\text{M}/\text{bp}$ Ct-DNA に金属イオン溶液を各最終濃度 (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, そして 20 μM)になるように添加した 100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.2)溶液 (全量 3000 μl)と 1 % SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)を含む 100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.2)溶液を調製し(全量 3000 μl), 2 つの溶液を混ぜたときの 384 nm の吸光度変化の測定を Stopped-flow 分光光度計を用いて行った. ここで金属イオン溶液は, Zn(NO₃)₂ と Mg(NO₃)₂ を用いた. 測定温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ で行った.

2-2-4. リン酸化 2 本鎖 DNA と NDI-Dpa-Zn の相互作用解析

2-2-4-1. 2 本鎖オリゴヌクレオチドの添加に伴う NDI-Dpa-Zn の吸収スペクトル変化の測定

用いたオリゴヌクレオチドの配列は自己相補的な配列であり、Table 2-1 に示している。4.3 μM NDI-Dpa-Zn を含む 100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.2) 溶液を調製し (全量 3000 μl)、UV-Vis 測定を行った。その後、128 μM /strand ODN 溶液、あるいは 125 μM /strand pODN 溶液を添加し、UV-Vis 測定を行った。測定温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ で行った。

Table 2-1. 用いたオリゴヌクレオチドの配列。

配列	
ODN	5'-GCA CGT GC-3'
pODN	5'-P O ₃ ²⁻ -GCA CGT GC-3'

2-2-4-2. DNase で処理して得られたリン酸を含む Ct-DNA と NDI-Dpa-Zn との相互作用解析

2-2-4-2-1. DNase で処理した Ct-DNA サンプルの調製

1 \times buffer (1 \times buffer の組成: 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.2), 0.5 mM MgCl₂) と 331.2 U/900 μl DNase I (DNase I の組成: 20 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.5), 5 mM CaCl₂, 0.1 mM PMSF, 50 % グリセロール) を含む 1 mM/bp Ct-DNA 溶液を調製し、15 $^{\circ}\text{C}$ で 4 分間 DNase の反応を行った。その後、サンプルを 80 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間インキュベートした。サンプル溶液に TE 飽和フェノールとイソアミルアルコールを含んだクロロホルムを 500 μl 加え、1 分間振とうさせ、12000 rpm で 3 分間遠心分離させた後、水相を回収した。この操作を 2 回行った。回収した水相にイソアミルアルコールを含んだクロロホルムを 500 μl 加え、振とうさせ、12000 rpm で 3 分間遠心分離させた後、水相を回収した。この操作を 2 回行った。回収した水相を 2 時間、加熱減圧乾燥した。5 M NaCl を 50 μl 、100 % エタノールを 1 ml 加え、2 分間振とうさせた。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 g で 10 分間遠心分離させた。上清を捨て、80 % エタノールを 300 μl 加え、軽く混ぜ、12000 g で 2 分間遠心分離させた。上清を捨て、加熱減圧乾燥し、滅菌水を 100 μl 加え、5.16 mM/bp の Ct-DNA サンプル (DNase I 処理済) を調製した。

2-2-4-2-2. DNase で処理した Ct-DNA サンプルの添加に伴う NDI-Dpa-Zn の吸収スペクトル変化による結合能評価

4.3 μM NDI-Dpa-Zn を含む 100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.2) 溶液を調製し (全量 3000 μl)、吸光度測定を行った。5.16 mM/bp の Ct-DNA サンプル (DNase で処理済) を添加し、吸光度測定を行った。測定温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ で行った。

2-3. 結果

2-3-1. NDI-Dpa-Zn の錯体形成の確認

Scheme 2-2 にしたがって NDI-Dpa-Zn の合成を行った。 $^1\text{H-NMR}$ 測定により, NDI-Dpa-Zn と **4** を比較したところ, Zn が配位することで **4** のピリジンのピークが低磁場にシフトしていることが明らかとなった (Figure 2-3)。このことから, Zn^{2+} の配位によって, ピリジンの電子雲の環境が変化したためであると考えられる。さらに, Figure 2-4 には, 蛍光測定における **4** と金属イオンの濃度比における 396 nm の蛍光強度の変化を示す。Figure 2-4 より, どちらの金属イオンも蛍光が増大し, Mg^{2+} イオンよりも Zn^{2+} イオンの方がピリジンに対する配位能が強いことが明らかとなった。また, **4** と Zn^{2+} イオンの化学量論比はモル比法により 1 : 2 であることが明らかとなった。したがって, 1 等量の **4** に対して 2 等量の Zn^{2+} イオンであるので, Dpa に対して Zn^{2+} イオンが 1 等量相互作用していることが明らかとなった。したがって, NDI-Dpa-Zn は安定に存在することができる Zn-Dpa を有した化合物であることが示された。

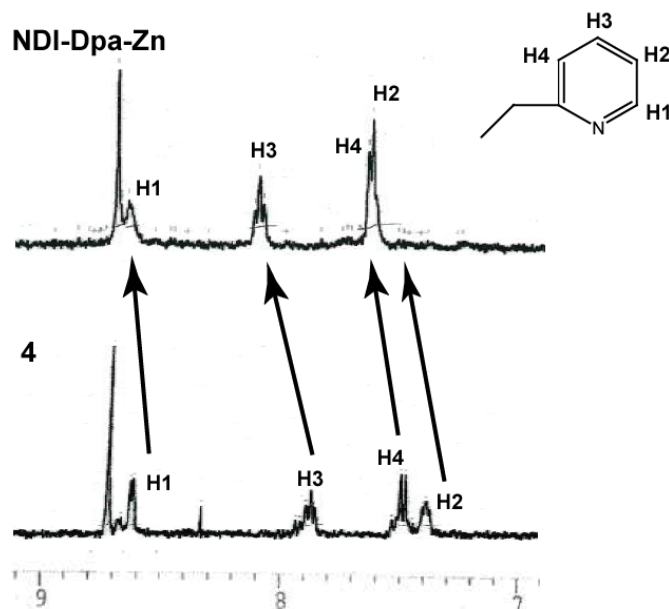


Figure 2-3. $^1\text{H-NMR}$ (溶媒: $\text{DMSO-}d_6$)測定における NDI-Dpa-Zn 及び化合物 **4** のピリジンのピークの比較。

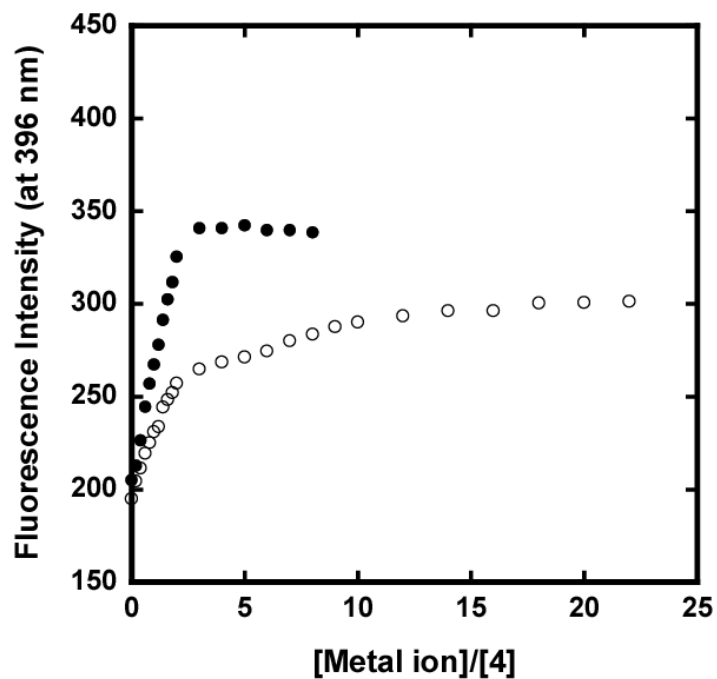


Figure 2-4. Mg^{2+} イオン (●)及び Zn^{2+} イオン (○)と4の濃度比に対する蛍光強度変化. 測定溶液: [4] = 5 μM , 50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl, $[Zn(NO_3)_2]$ = 0 - 40 μM あるいは $[Mg(NO_3)_2]$ = 0 - 110 μM , 測定温度: 25 $^{\circ}C$, 励起波長: λ_{ex} = 360 nm.

2-3-2. NDI-Dpa-Zn と 2 本鎖 DNA との相互作用解析

Figure 2-5, 2-6, 2-7 に Ct-DNA 添加に伴う NDI-Dpa-Zn の吸収スペクトル変化, 384 nm の吸光度変化, Scatchard 解析の結果をそれぞれ示している. Figure 2-5 より, 等吸収点を通っていることから結合様式が単一であることが考えられる. インターカレーターと 2 本鎖 DNA の吸収スペクトルは淡色効果とレッドシフトが観測される. この挙動は, これまでのナフタレンジイミド誘導体と同様の縫い込み型インターカレート結合の挙動¹⁵⁻¹⁸⁾であることが分かった. Figure 2-5 より, Ct-DNA 添加に伴い, 大きな淡色効果と小さなレッドシフトしていることから, Ct-DNA との結合様式はインターカレート結合であると示唆される. さらに, 383 nm における吸収スペクトル変化 (Figure 2-6)を基に, 過去に報告された McGhee & von Hippel の式を用いて結合定数と座位数を算出した (Figure 2-7)¹⁹⁾.

$$v/c = K(1-nv) \times \{(1-nv)/(1-(n-1)v)\}^{n-1}$$

v は塩基対当りに結合したインターカレーターの数, c は結合していないインターカレーターの濃度, n は座位数 (インターカレートすることにより覆われる塩基対の数), そして K は結合定数.

算出した結果, $K = 1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n = 4.3$ となった. 同様に, NDI-Dpa-Zn の前駆体である 4 も算出したところ, $K = 6.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n = 3.0$ であり, これより, NDI-Dpa-Zn の結合定数は, 4 に比べて約 30 倍大きくなった. これは, Zn が配位し, DNA へのインターカレート結合によって, NDI-Dpa-Zn と DNA 複合体を安定にしているためであると考えられる. このように, NDI-Dpa-Zn のナフタレンジイミド (NDI) は核酸塩基にスタッキングして相互作用し, さらには錯体部分である Zn-Dpa が DNA 骨格のリン酸ジエステルと多かれ少なかれ相互作用しているものと考えられる.

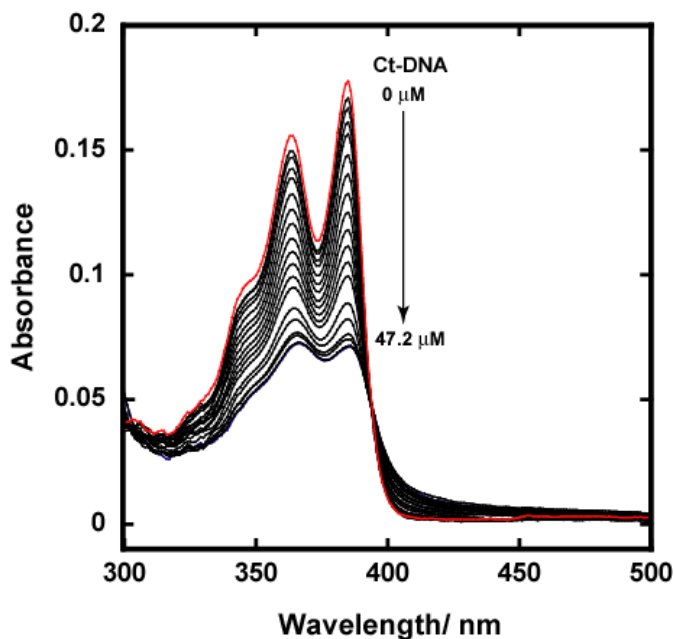


Figure 2-5. Ct-DNA 添加に伴う NDI-Dpa-Zn の吸収スペクトル変化. 測定溶液: [NDI-Dpa-Zn] = 4.3 μM , 50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl 溶液, 測定温度: 25 .

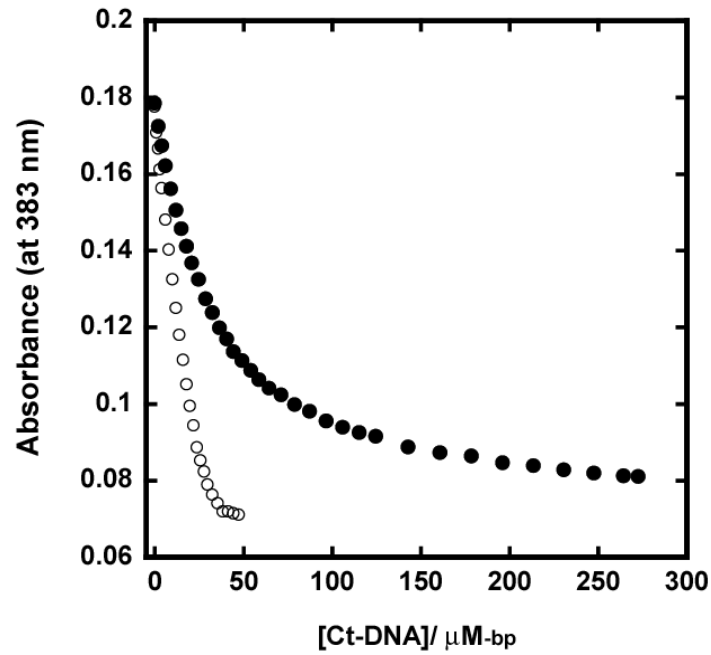


Figure 2-6. Ct-DNA 添加に伴う NDI-Dpa-Zn (●) 及び化合物 4 (○) の 383 nm の吸光度変化 .

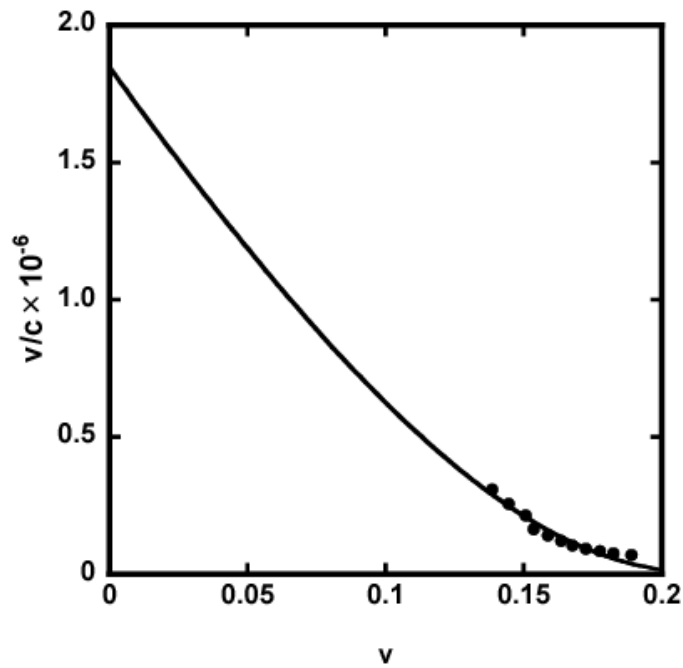


Figure 2-7. NDI-Dpa-Zn と Ct-DNA との相互作用における Figure 2-6 の 383 nm の吸光度変化を基にした Scatchard 解析の結果 .

次に, Ct-DNA に NDI-Dpa-Zn を添加したときの CD スペクトル変化を Figure 2-8 に示す. Figure 2-8 より, NDI-Dpa-Zn の添加に伴い NDI に由来する 383 nm 付近に負の誘起 CD が観測された. これより, NDI-Dpa-Zn が DNA にインターカレートしていることが解釈される. この誘起 CD を Figure 2-9 に示した bis-intercalator **5**²⁰⁾ と比較した. **5** は 10 倍量の Ct-DNA を添加したとき, 誘起 CD が $-2560 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2/\text{decimol}$ であるのに対して, NDI-Dpa-Zn は 11 倍量の Ct-DNA を添加したとき, 誘起 CD が $-1370 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2/\text{decimol}$ となった. また, 最大吸収波長におけるモル吸光係数に関して, **5** は $\epsilon = 27,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, NDI-Dpa-Zn は $\epsilon = 40,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ である. そこで, 誘起 CD をモル吸光係数で割ると, その比は, **5** は 0.95, NDI-Dpa-Zn は 0.38 となり, この 2 つの ligand は同じモードで結合しているものと考えられる. それに対して, **4** も同様に算出すると, 0.080 となり, NDI-Dpa-Zn に比べて非常に小さいことが明らかとなった. したがって, NDI-Dpa-Zn と **4** は DNA にインターカレート結合した構造が異なっているものと解釈される.

吸収スペクトル変化と CD スペクトル変化によって, NDI-Dpa-Zn は Ct-DNA にインターカレート結合している可能性があるので, 粘度測定と Topoisomerase I により NDI-Dpa-Zn がインターカレート結合の証明をすることにした.

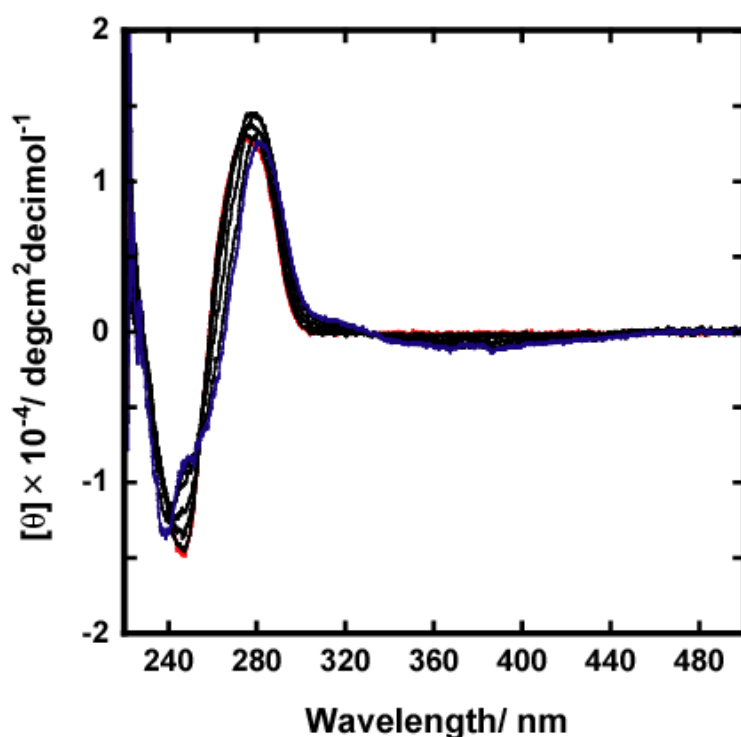


Figure 2-8. NDI-Dpa-Zn 添加に伴う Ct-DNA の CD スペクトル変化. 測定溶液: [Ct-DNA] = 80 $\mu\text{M}/\text{bp}$, 50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl, [NDI-Dpa-Zn] = 0 - 21 μM , 測定温度: 25 .

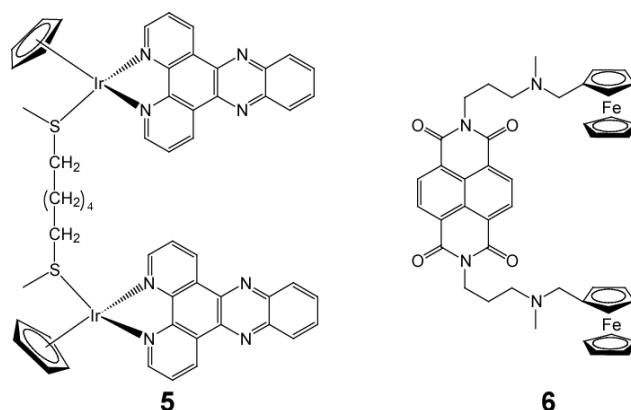


Figure 2-9. 比較した化合物の構造式 . bis-intercalator (5) , フェロセン化ナフタレンジイミド(FND, 6) .

2本鎖DNAにインターカレーターがインターカレートすると、二本鎖DNAは巻き戻されて伸長し、剛直になることで、2本鎖DNA溶液の粘度が上昇することが知られている²¹⁾。そのため、DNA溶液の粘度を測定することにより、インターカレート結合しているか確認できる。そこで、Figure 2-10にNDI-Dpa-Znの粘度測定結果を示している。また、Figure 2-9に示しているフェロセン化ナフタレンジイミド(FND, 6)²²⁾と比較とした。Figure 2-10より、どちらのligandも粘度が直線的に上昇し、直線の傾きは、6が1.3に対して、NDI-Dpa-Znは2.3となった。これは、DNAと結合したNDI-Dpa-Znが6に比べてrigidな構造をとっているためだと考えられる。したがって、NDI-Dpa-ZnがDNAと結合することでZn-DpaとDNAの骨格であるリン酸ジエステルと相互作用し、DNAのフレキシブルな構造体がrigidになったものと解釈される。また、Topoisomerase I assayも同様に比較した。

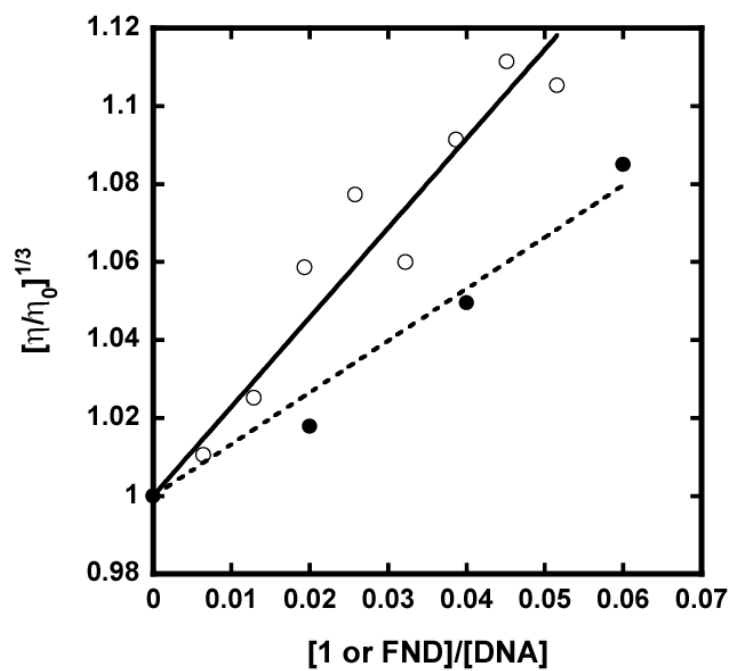


Figure 2-10. NDI-Dpa-Zn (○)及び化合物6 (●)の添加に伴う poly[dA-dT]₂ の粘度変化 . 測定溶液: 50 mM HEPES (pH 7.2) , 100 mM NaCl , [poly[dA-dT]₂] = 50 μM , [NDI-Dpa-Zn] = 2 - 14 μl , 測定温度: 30 .

Figure 2-11 に NDI-Dpa-Zn の Topoisomerase I assay の結果を示している。この結果より、pUC19 は Topoisomerase I によって open circle 状態となるが、NDI-Dpa-Zn を添加するに伴い、pUC19 は supercoil 状態へとバンドのシフトが観測された。インターカレーターとグルーブバインダーの Topoisomerase I assay での比較において、グルーブバインダーでは、結合の際に plasmid DNA の巻き戻しが起きず、Topoisomerase I で open circle になり、グルーブバインダーを取り除いても open circle のままである。それに対して、インターカレーターは plasmid DNA にインターカレートし、Topoisomerase I で処理した後に、インターカレーターを除くと supercoil になることが報告されている²³⁾。したがって、pUC19 は NDI-Dpa-Zn の添加に伴い supercoil 状態へとバンドがシフトしていることから、インターカレーター添加に伴う典型的な結果と同様となり、NDI-Dpa-Zn は DNA にインターカレート結合することが示された。また、NDI-Dpa-Zn が pUC19 の巻き戻しが観測された NDI-Dpa-Zn の濃度は 5 μM であった。これに対して、6 (Figure 2-9)では、50 μM の時に巻き戻しが観測され、NDI-Dpa-Zn は 6 に比べて 10 倍低い濃度で巻き戻しが起きることが示された。これより、NDI-Dpa-Zn は効率良く DNA の巻き戻しができることが明らかとなった。したがって、粘度測定と Topoisomerase I assay により、NDI-Dpa-Zn は DNA とインターカレート結合していることが示された。

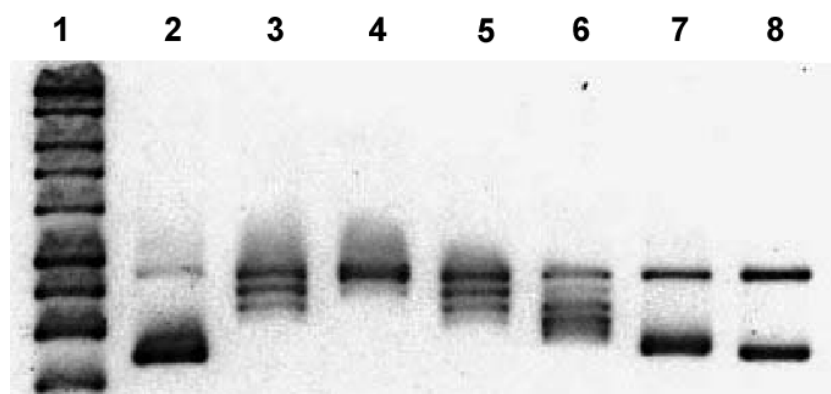


Figure 2-11. NDI-Dpa-Zn の添加に伴う pUC 19 の Topoisomerase I assay の結果。lane 1 と 2 はそれぞれ 1 kb Ladder と pUC19 のみ。lane 3 から 8 は pUC19 と Topoisomerase I を含むサンプルに NDI-Dpa-Zn の最終濃度を左から 0, 1, 2, 3, 4, そして 5 μM に変化させたときの結果。

このように、NDI-Dpa-Zn はインターカレート結合であることが明らかとなったので、Figure 2-12 に 5 μM NDI-Dpa-Zn と 50 μM Ct-DNA との会合過程における 384 nm の吸光度の時間変化と 5 μM NDI-Dpa-Zn と 50 μM Ct-DNA の複合体と 1% SDS との解離過程における 384 nm の吸光度の時間変化を Stopped-flow 分光光度計で測定した。吸光度変化を下記に示す式で fitting し、得られたパラメーター (A_1 , A_2 , R_1 , R_2)を用いて、下記に示す式に代入し、見かけの解離速度定数 k_{app} を算出した¹⁵⁾。

$$\text{Abs} = -A_1 \exp(-R_1 \times t) - A_2 \exp(-R_2 \times t)$$

$$k_{\text{app}} = (A_1 \times R_1 + A_2 \times R_2) / (A_1 + A_2)$$

Abs は吸光度, t は会合時間, A_1, A_2, R_1, R_2 は係数である.

DNA の濃度に対して, 得られた k_{app} をプロットし (Figure 2-13), 直線の傾きから会合速度定数を算出した. Figure 2-13 より, NDI-Dpa-Zn の会合速度定数は $k_a = 6.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった. 同様に 4 との会合速度定数を算出したところ, $k_a = 2.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった. NDI-Dpa-Zn はこれと比較すると約 3.2 倍小さくなった. NDI-Dpa-Zn は, フレキシブルな Dpa 部位が Zn^{2+} と配位することにより, rigid 構造になり, インターカレート結合しにくいものと考えられる.

さらに, 解離過程における速度定数も同様に上記の式で fitting し, 得られたパラメーター (A_1, A_2, R_1, R_2) を用いて, $k_d = (A_1 \times R_1 + A_2 \times R_2) / (A_1 + A_2)$ に代入し, 解離速度定数 k_d を算出した¹⁶⁾. 算出した結果, $k_d = 0.4 \text{ s}^{-1}$ となった. 同様に, 4 の解離速度定数も算出したところ, $k_d = 3.6 \text{ s}^{-1}$ であった. したがって, NDI-Dpa-Zn は 4 に比べて 9 倍遅いことが明らかとなった. つまり, DNA のリン酸ジエステルと Zn-Dpa が相互作用, あるいはリンカーがストッパーの役割を果たし, 複合体を安定にしたものと考えられる.

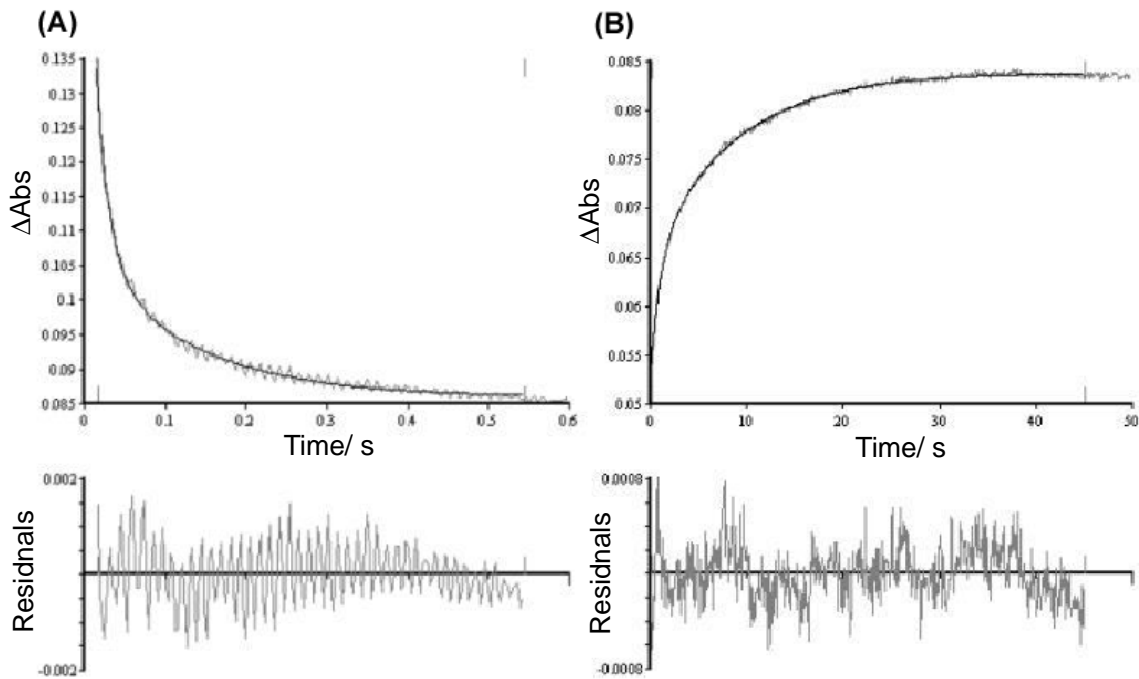


Figure 2-12. Ct-DNA に対する NDI-Dpa-Zn の会合過程の Time Trace (A), 解離過程の Time Trace (B)の結果. 測定溶液: 50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl 溶液を含む 7.5 μM NDI-Dpa-Zn 溶液と 50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl 溶液を含む 75 $\mu\text{M}/\text{bp}$ Ct-DNA 溶液 (A), 50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl 溶液を含む 5 μM NDI-Dpa-Zn と 50 $\mu\text{M}/\text{bp}$ Ct-DNA の複合体溶液と 50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl 溶液を含む 1 % SDS 溶液 (B), 測定温度: 25 .

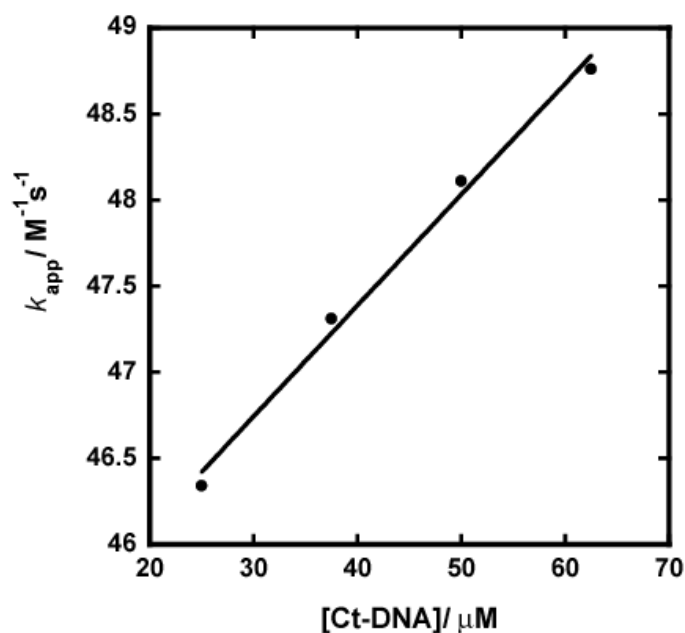


Figure 2-13. DNA の濃度と得られた k_{app} の関係 .

実際に DNA 骨格のリン酸ジエステルと NDI-Dpa-Zn の Dpa-Zn 部位が相互作用しているのかを確かめるために、金属イオンの濃度変化に伴う 4 の Ct-DNA からの解離速度定数の評価と NDI-Dpa-Zn の Topoisomerase I の阻害能を評価することにした。まず初めに、Ct-DNA からの解離速度定数の評価を行ったところ、 Mg^{2+} イオンに比べて Zn^{2+} イオンの方が、濃度の増加とともに解離速度定数は減少していることが明らかとなった (Figure 2-14)。これは、4 と DNA の複合体が Zn^{2+} イオンと Dpa 部位が配位することにより、DNA のリン酸ジエステルと Zn-Dpa が相互作用、あるいはリンカーがストッパーの役割を果たし、解離速度定数が減少したものと考えられる。次に、Topoisomerase I の阻害能を評価した。Figure 2-11 にインターカレート結合の証明を示しているが、その実験操作は Topoisomerase I を加えた後に、NDI-Dpa-Zn を加えている。阻害能評価の実験操作はこの手順を逆にした。このような操作をすることで、DNA に先に NDI-Dpa-Zn が結合し、Topoisomerase I の阻害を評価することが可能になる。実際に、ゲル電気泳動を評価したところ、Figure 2-11 に比べて、同じ濃度の NDI-Dpa-Zn で行っているにも関わらず、巻き戻しのバンドの挙動が異なっていた (Figure 2-15)。Topoisomerase I はリン酸ジエステルの加水分解を起こし、open circle 状態にする酵素であるが、Zn-Dpa がリン酸ジエステルと相互作用することによって加水分解が困難になったためだと考えられる。したがって、NDI-Dpa-Zn の Zn-Dpa は、リン酸ジエステルと相互作用しているものと解釈される。

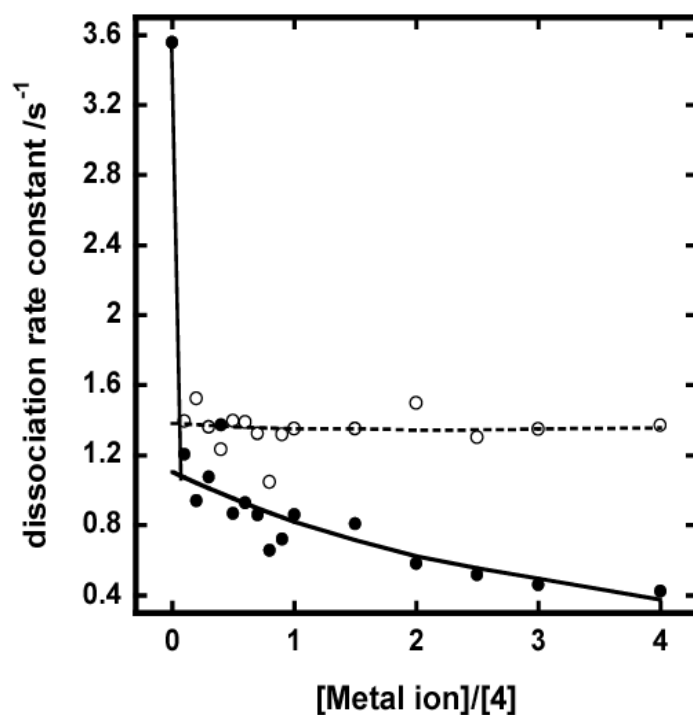


Figure 2-14. Mg²⁺イオン (●)及び Zn²⁺イオン (○)の濃度比に対する解離速度定数の関係. 測定溶液: 50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl, [4] = 5 μM, [Ct-DNA] = 50 μM/bp, [Zn(NO₃)₂]あるいは[Mg(NO₃)₂] = 0 - 20 μM, 測定温度: 25 °C.

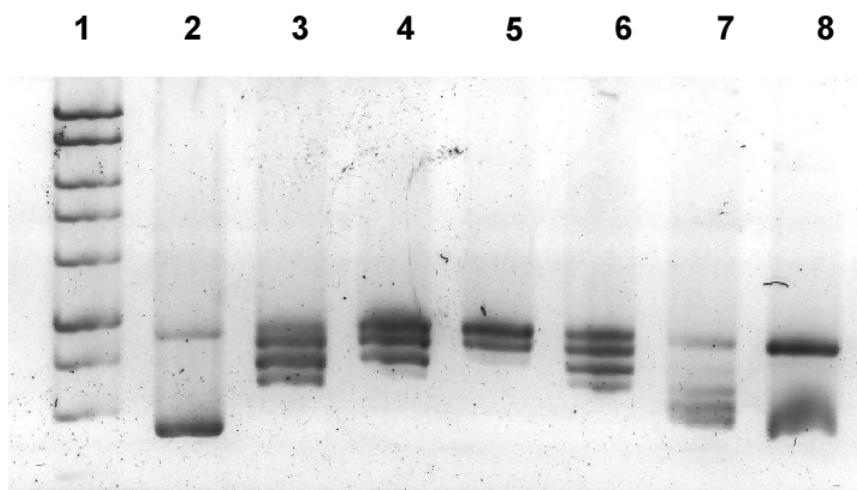
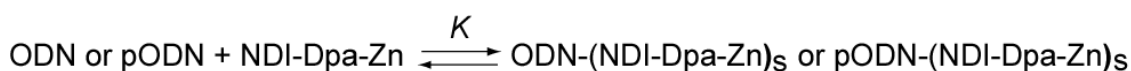


Figure 2-15. NDI-Dpa-Zn の pUC 19 の Topoisomerase I 阻害能の評価. lane 1 と 2 はそれぞれ 1 kb Ladder と pUC19 のみ. lane 3 から 8 は pUC19 と Topoisomerase I を含みサンプルに NDI-Dpa-Zn の最終濃度を左から 0, 1, 2, 3, 4, そして 5 μM に変化させたときの結果.

2-3-3. リン酸化 2 本鎖 DNA と NDI-Dpa-Zn の相互作用解析

Zn-Dpa はリン酸と強く相互作用することが知られている。本実験では、Table 2-1 に示している 5' 末端にリン酸化 (pODN) と非リン酸化 (ODN) である 8 量体の自己相補的なオリゴヌクレオチドを用いて、吸収スペクトル変化を基に NDI-Dpa-Zn との相互作用を評価することにした。Figure 2-16 に pODN あるいは ODN を添加した時の 383 nm における吸光度変化を示している。この結果より、どちらのオリゴヌクレオチドも NDI-Dpa-Zn の極大吸収波長の 383 nm の吸光度が減少していることが明らかとなった。この変化を Scheme 2-3 の平衡式のように NDI-Dpa-Zn が ODN あるいは pODN に結合するものと考え、Johnston らの解析法²⁴⁾を基にして考えた式 (Eq. 1) で解析を行うことにした。



Scheme 2-3.

$$\text{Abs} = A_f + (A_b - A_f) \frac{a - (a^2 - 2K^2[\text{NDI-Dpa-Zn}]_0 C/s)^{1/2}}{1 + 2K[\text{NDI-Dpa-Zn}]_0} \quad (1)$$

$$a = 1 + K[\text{NDI-Dpa-Zn}]_0 + KC/2s \quad (2)$$

$$C = [\text{ODN or pODN}] \quad (3)$$

A_f と A_b はそれぞれフリーの NDI-Dpa-Zn とオリゴヌクレオチドに結合した NDI-Dpa-Zn の吸光度であり、 $[\text{NDI-Dpa-Zn}]_0$ は NDI-Dpa-Zn の最初のフリー状態の濃度、 C は各オリゴヌクレオチドの濃度、 K は結合定数、そして s は結合個数である。

この式で Figure 2-16 に示している吸光度変化を fitting したところ、 $R=0.99$ の非常によい精度での fitting 結果が得られた。そこで、得られた結合定数と結合個数を算出したところ、ODN は $K = 1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $s = 1.5$ となった。それに対して、pODN は $K = 4.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $s = 1.2$ となった。これらの結果から、ODN と pODN は同じ結合様式で結合しているものと考えられ、5 塩基おきに 1~2 個の NDI-Dpa-Zn が結合していることが明らかとなった。X 線構造解析により、自己相補鎖である 6 量体のオリゴヌクレオチド (5'-TGTACA-3') とノガラマイシン 2 分子が結合していることが報告されており²⁵⁾、NDI-Dpa-Zn においても同等な個数で結合しているため、これは、妥当な結果であることが示された。それにも関わらず、ODN に比べて、pODN の方が NDI-Dpa-Zn と約 4 倍強く結合することが分かった。おそらく、pODN の末端のリン酸モノエステルが NDI-Dpa-Zn の結合能に寄与しているものと考えられる。つまり、Figure 2-17 に示しているように、ODN の 7 つのリン酸ジエステルのうちの一つの酸素よりも 1 つのリン酸モノエステルの酸素の方が、NDI-Dpa-Zn の Zn の 4 番目の配位子として適しているためだと考えられる。このように、NDI-Dpa-Zn はリン酸モノエステルの識別能が高いことが明らかとなった。

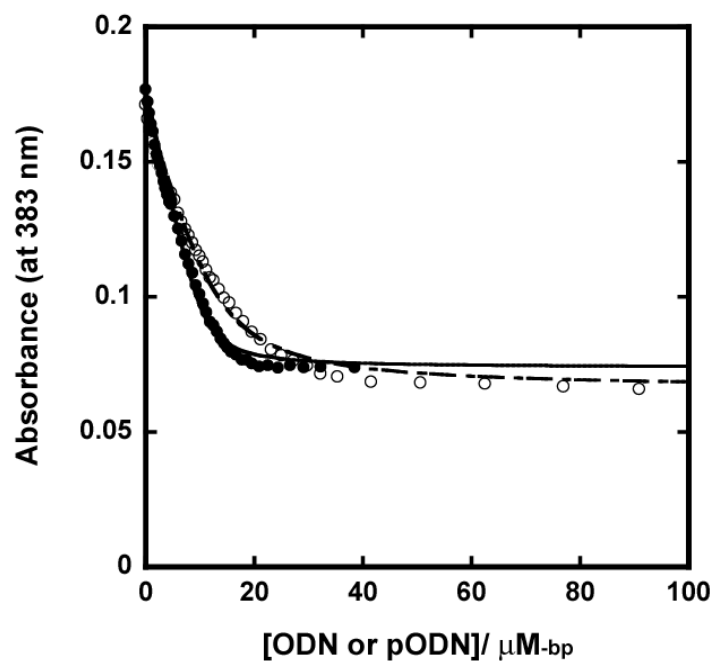


Figure 2-16. 各オリゴヌクレオチドの添加に伴う NDI-Dpa-Zn の 383 nm の吸光度変化. ○ : 0 - 90.9 $\mu\text{M}/\text{bp}$ ODN, ● : 0 - 38.5 $\mu\text{M}/\text{bp}$ pODN. 測定溶液は 50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl, [NDI-Dpa-Zn] = 4.3 μM , 測定温度: 25 $^{\circ}\text{C}$.

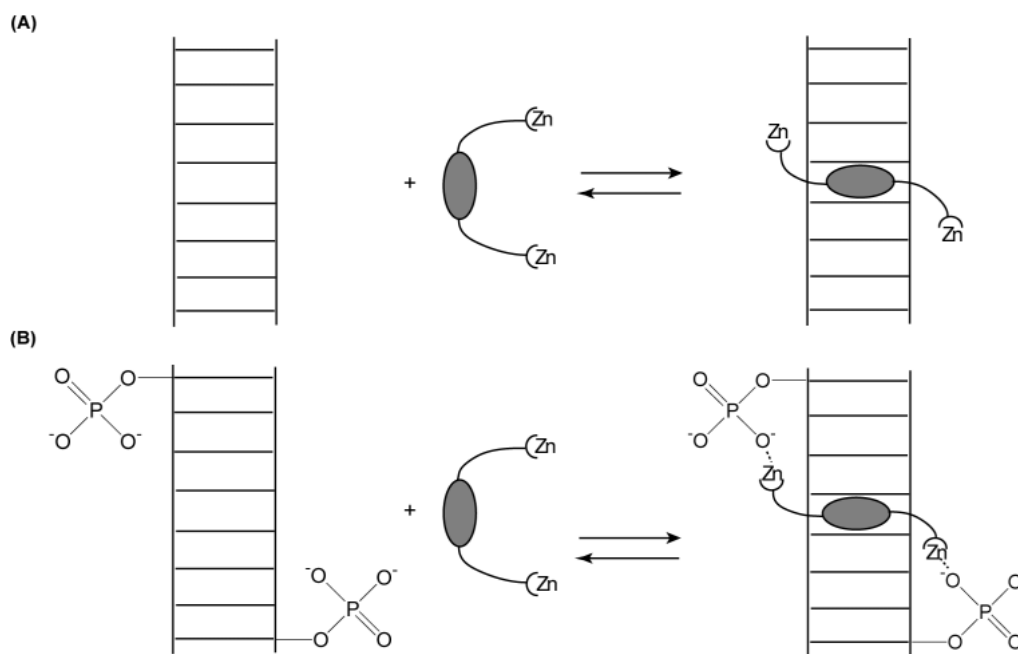


Figure 2-17. NDI-Dpa-Zn と ODN (A)あるいは pODN (B)との 1 : 1 結合のモデル図.

さらに、DNA 損傷のモデル実験として、Ct-DNA を DNase I で処理してリン酸モノエステルを産出させ、擬似的なモデルサンプルを調製した。DNase I で処理する前のサンプルはゲル電気泳動で平均 1 kb のサイズであったのに対し、DNase I で処理したところ 200 bp のサイズとなり、切断されていることを確認した。そこで、調製したサンプルと NDI-Dpa-Zn との結合能を評価することにした。Figure 2-18 に DNase I で処理、未処理サンプル添加に伴う NDI-Dpa-Zn の UV スペクトルを示している。これを基にして、Figure 2-19 に DNase I で処理したサンプルを添加した時の 383 nm の吸光度変化を示している。また、比較として DNase I で処理していないサンプルを添加した時の吸光度変化も示した。この結果より、DNase I で処理したサンプルを添加するに伴い、NDI-Dpa-Zn の極大吸収波長である 383 nm の吸光度が減少していることが分かった。この淡色効果の度合いは、DNase I で処理していないサンプルと比較すると、吸光度の変化が大きいことも示された。つまり、DNase I で処理したサンプルの方が NDI-Dpa-Zn との相互作用が強いものと考えられる。実際に、この吸光度変化を基に、2-3-2 と同様にして McGhee & von Hippel の式から結合定数と座位数を算出した。算出した結果、 $K = 4.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $n = 3.8$ となった (Figure 2-20)。また、2-3-2 で算出した結果は NDI-Dpa-Zn と Ct-DNA との相互作用、つまり DNase I で処理していないサンプルの結果となるが、 $K = 1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $n = 4.3$ である。これらの結果を比較すると、DNase I で処理したサンプルは未処理サンプルの約 2 倍の強さで結合していることが分かった。これは、オリゴヌクレオチドでのリン酸モノエステルの識別能ほどではなかった。おそらく、8 量体のオリゴヌクレオチドに対して、今回の場合は、DNA サイズが大きくなり、インターカレート結合する NDI-Dpa-Zn の量が増え、リン酸モノエステルの識別能が減少したためである。しかしながら、座位数は同程度であるので、わずかな結合能の増大は切断して得られたリン酸モノエステルとの NDI-Dpa-Zn の Zn-Dpa 部位が相互作用したものと考えられる。

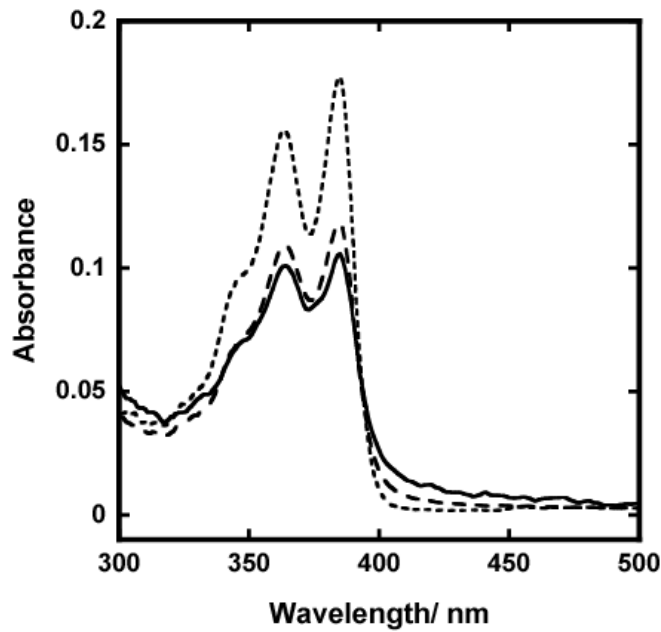


Figure 2-18. DNase I 処理あるいは未処理の Ct-DNA 添加に伴う NDI-Dpa-Zn の吸収スペクトル変化. 点線: NDI-Dpa-Zn の吸収スペクトル, 破線: DNase I で処理なしの Ct-DNA を添加した時の吸収スペクトル, 実線: DNase I で処理した Ct-DNA を添加した時の吸収スペクトル. 測定溶液は [NDI-Dpa-Zn] = 4.3 μ M, 50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl 溶液, 測定温度: 25 $^{\circ}$ C.

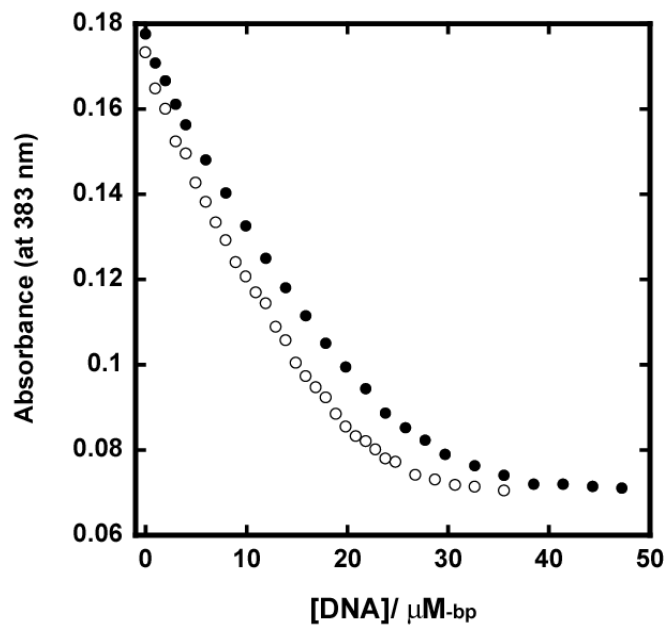


Figure 2-19. 各 DNA サンプルの添加に伴う NDI-Dpa-Zn の 383 nm の吸光度変化. \bullet : 0 - 35.6 μ M/bp DNase I で処理した Ct-DNA, \circ : 0 - 47.2 μ M/bp DNase I で処理していない Ct-DNA, 測定温度: 25 $^{\circ}$ C.

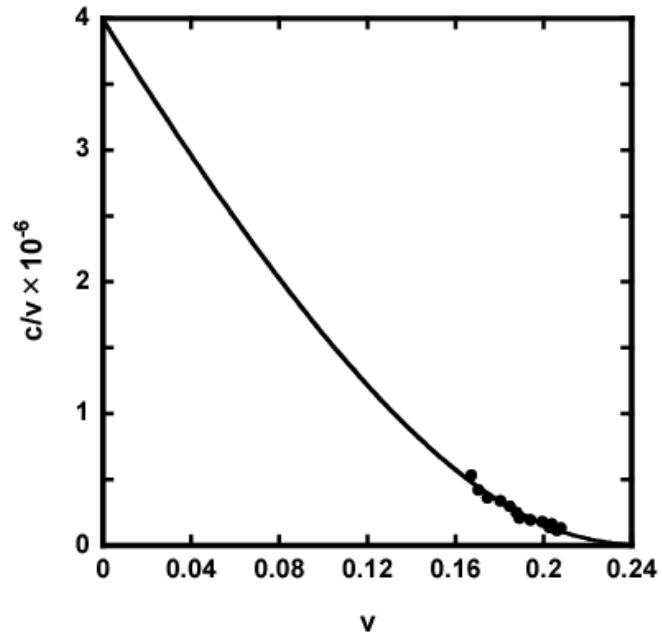


Figure 2-20. DNase I で処理した Ct-DNA の添加に伴う 384 nm の吸光度変化を基にした Scatchard 解析の結果 .

2-4. 考察

生体内では、多くの物質はリン酸化した構造体で存在することがあり、ピロリン酸やトリポリリン酸と同様にモノリン酸、ジリン酸、そしてトリリン酸は、細胞内では広く分布しており、重要な役割を担っている。そのような物質の識別や特定は、生体内での作用を解明するのに重要である。それらを解明するのに利用可能な手法は数多く存在するが、簡便な検出法は未だ確立されていない。近年、Zn-Dpa 錯体を基にした手法が着目されている。Ojida らによって、Zn-Dpa を有するアントラセンを用いることにより、リン酸モノエステルを有したペプチドを蛍光により効率良く検出することに成功した (Figure 2-21, 7)^{10, 11)}。また、Lee らによって、Zn-Dpa を有するナフタレンジイミドを用いることにより、ピロリン酸の酸素と配位し、ナフタレンジイミドの dimer を形成することで excimer 発光を引き起こすことが報告された (Figure 2-21, 8)¹²⁾。さらには、Dpa を有したフルオレセインが細胞内の Zn と配位し、pH 変化をモニタリングすることにも成功した (Figure 2-21, 9)²⁶⁾。このように、Zn-Dpa は生体内でも適応が可能であり、生体内でのリン酸化機構を解明するのに重要な役割を果たすと言える。そこで、著者は Lee らが開発した ligand の構造に類似した Zn-Dpa を有するナフタレンジイミド NDI-Dpa-Zn を開発し、これを用いてリン酸モノエステルとリン酸ジエステルの識別に成功した。今回は 8 量体のオリゴヌクレオチドで評価したが、リン酸モノエステルを有していないオリゴヌクレオチドよりもリン酸モノエステルを有したオリゴヌクレオチドの方が NDI-Dpa-Zn との結合能が高いことが明らかとなった。おそらく、リン酸モノエステルの酸素原子は、リン酸ジエステルの酸素原子よりも塩基性が高く、さらに - 電荷を帯びた酸素原子は、リン酸ジエステルは 2 つに対してリン酸モノエステルは 3 つあるので、金属と配位しやすくなったものと考えられる。このように、オリゴヌクレオチドとの NDI-Dpa-Zn の結合能は、末端にリン酸モノエステルを有している者に対して増大した。さらには、天然の DNA を DNase I で処理したものと NDI-Dpa-Zn の結合能も増大していることが明らかとなった。これは、リン酸モノエステルの影響はそれほど大きくないが、この検出系は DNA 損傷の検出モデルとして、基礎なるものと期待される。

しかしながら、NDI-Dpa-Zn はリン酸モノエステルと DNA 骨格のリン酸ジエステルの識別能がそれ程高いものとは言えない。しかし、著者は Ojida らが開発した ligand や Lee らが開発した ligand は発色団やインターカラーターと Zn-Dpa 間のリンカーの長さが短いことに着目した。これらはリンカーの長さを短くすることで、検出系を確立している。そこで、NDI-Dpa-Zn も NDI と Zn-Dpa 間のリンカーの長さを最適化することで識別能が向上するものと考えている。

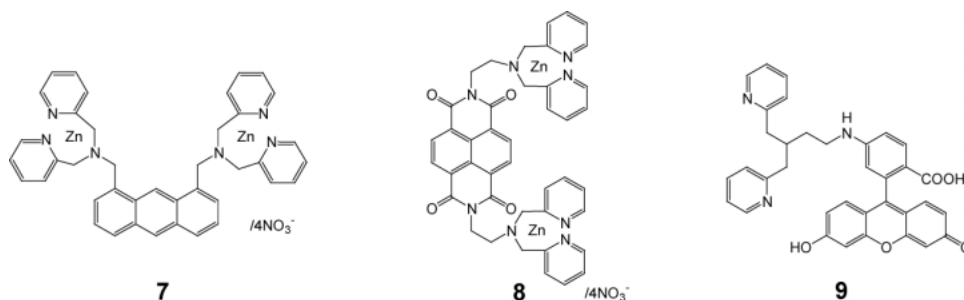


Figure 2-21. 過去に開発された Zn-Dpa 及び Dpa を有した ligand の構造式。

2-5. 結言

本章では, NDI-Dpa-Zn を開発し, リン酸モノエステルを有した DNA の識別を試みた. 初めに, NDI-Dpa-Zn の Zn-Dpa が形成しているかどうかを評価した. 前駆体である **4** と比較したところ, $^1\text{H-NMR}$ や Zn^{2+} 添加に伴う蛍光強度の増加により, Dpa 部位は Zn^{2+} と配位することが明らかとなった. この開発した NDI-Dpa-Zn を用いて, DNA との結合能を評価した. そこでは, NDI-Dpa-Zn と前駆体である **4** と DNA との結合能を比較した. **4** に比べて, NDI-Dpa-Zn の方が DNA の結合能が高いことが明らかとなった. 平衡状態での結合能と速度論的な観点から, Zn が Dpa に配位することにより, Dpa 部位が rigid 構造になり, 会合するのが困難であるが, 会合した NDI-Dpa-Zn は DNA 骨格のリン酸ジエステルと Zn-Dpa 部位が相互作用して解離しにくくなり, 結合能が高くなったことが明らかとなった.

そこで, 実際に DNA 損傷で得られるリン酸モノエステルと DNA 骨格であるリン酸ジエステルとの識別が行えるかどうかを評価した. 今回は 8 量体のオリゴヌクレオチド, あるいはリン酸モノエステルを有した 8 量体のオリゴヌクレオチドと NDI-Dpa-Zn との結合能を評価した. NDI-Dpa-Zn はリン酸モノエステルを有したオリゴヌクレオチドの方が, リン酸モノエステルを有していないオリゴヌクレオチドよりも約 4 倍強く結合することと NDI-Dpa-Zn が結合している個数も同じであることが明らかとなった. したがって, NDI-Dpa-Zn の Zn-Dpa は DNA 骨格のリン酸ジエステルよりもリン酸モノエステルの方に強く相互作用し, リン酸モノエステルとリン酸ジエステルを識別することができる試薬であることが示された.

さらには, DNA 損傷の擬似的なサンプルを DNase I を用いて調製し, NDI-Dpa-Zn と DNase I 処理サンプルあるいは未処理サンプルとの結合能を評価した. DNase I で処理したサンプルは未処理サンプルの約 2 倍の強さで結合し, 座位数が同じであることが示された. これは, オリゴヌクレオチドでの基礎検討と同様な結果となり, 長い DNA にも関わらず, リン酸モノエステルを選択的に相互作用していることが明らかとなった. したがって, NDI-Dpa-Zn はこれまでに開発されてきた DNA 損傷検出よりも, 簡便に検出することができる試薬であることが明らかとなった.

2-6. 参考文献

- 1) Z. Li, P. Cloutier, L. Sanche, J. R. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 5612-5613 (2008).
- 2) F. Cerimele, T. Battle, R. Lynch, D. A. Frank, E. Murad, C. Cohen, N. Macaron, J. Sixbey, K. Smith, R. S. Watnick, A. Eliopoulos, B. Shehata, J. Arbiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 175-179 (2005).
- 3) S. Lassoued, B. Gargouri, A. e. F. E. Feki, H. Attia, J. V. Pelt, *Bio. Trace Elem. Res.*, **137**, 13-22 (2009).
- 4) L.-Y. Chung, C.-H. Chen, L.-C. Wang, S.-J. Chang, C.-M. Yen, *Exp. Parasitol.*, **126**, 178-183 (2010).
- 5) J. Huang, T. Li, Z. Chen, X. Liu, S. Liu, *Electrochem. Commun.*, **10**, 1198-1200 (2008).
- 6) T. Brown, Z. Taherbhai, J. Sexton, A. Sutterfield, M. Turligton, J. Jones, L. Stallings, M. Stewart, K. Buchmueller, H. Mackay, C. O'Hare, J. Kluza, B. Nguyen, D. Wilson, M. Lee, J. A. Hartley, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 474-483 (2007).
- 7) Y. Zu, N. Hu, *Electrochem. Commun.*, **11**, 2068-2070 (2009).
- 8) C. X. Yin, T. Yang, W. Zhang, X. D. Zhou, K. Jiao, *Chin. Chem. Lett.*, **21**, 716-719 (2010).
- 9) W. Zhang, T. Yang, W. Li, G. Li, K. Jiao, *Biosens. Bioelectron.* **25**, 2370-2374 (2010).
- 10) A. Ojida, Y. Mito-oka, M. Inoue, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6256-6258 (2002).
- 11) A. Ojida, Y. Mito-oka, K. Sada, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2454-2463 (2004).
- 12) H. N. Lee, Z. Xu, S. K. Kim, K. M. K. Swamy, Y. Kim, S.-J. Kim, J. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3828-3829 (2007).
- 13) K. M. DiVittorio, J. R. Johnson, E. Johansson, A. J. Reynolds, K. A. Jolliffe, B. D. Smith, *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 1966-1976 (2006).

- 14) S. Sato, S. Fujii, K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, **637-639**, 476-483 (2001).
- 15) F.A. Tanious, S.-F. Yen, W.D. Wilson, *Biochemistry*, **30**, 1813-1819 (1991).
- 16) S.-F. Yen, E. J. Gabbay, W.D. Wilson, *Biochemistry*, **21**, 2070-2076 (1982).
- 17) Z.-R. Liu, K. H. Hecker, R. L. Rill, *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **14**, 331-339 (1996).
- 18) R. E. McKnight, A. B. Gleason, A. Keyes, S. Sahabi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 1013-1017 (2007).
- 19) J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.*, **86**, 469-489 (1974).
- 20) M. Kokoschka, J.-A. Bangert, R. Stoll, W. S. Sheldrick, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2010**, 1507-1515 (2010).
- 21) S.-F. Yen, E.J. Gabbay, W.D. Wilson, *Biochemistry*, **21**, 2070-2076 (1982).
- 22) S. Sato, T. Nojima, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, **689**, 4722-4728 (2004).
- 23) Y. Pommier, J. M. Covey, D. Kerrigan, J. Markovits, R. Pham, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 6713-6731 (1987).
- 24) D. H. Johnston, H. H. Thorp, *J. Phys. Chem.*, **100**, 13837-13843 (1996).
- 25) C. K. Smith, J. A. Brannigan, M. H. Moore, *J. Mol. Biol.*, **263**, 237-258 (1996).
- 26) T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6555-6562 (2002).

第 3 章

フェロセンとβ-シクロデキストリン (β-CD)を導出した ナフタレンジイミド (FNC)による電気化学的 DNA 構造変化検出

3-1. 緒言

これまでにホスト-ゲストの研究が数多く研究がなされており, その中でもホストとして巨大分子であるβ-CD を用いたホスト-ゲストの研究が行われている. これらの研究は, β-CD とゲストの結合能を様々な手法により評価しており¹⁻¹³⁾, このようにゲストの分子構造によって結合力が異なることから, β-CD とゲスト分子との特異的包接作用を利用して, マテリアル分野¹⁴⁻¹⁶⁾, 医薬分野¹⁷⁻²⁰⁾, バイオ分野²¹⁻²³⁾など様々な分野へと発展されている.

近年, β-CD を利用した遺伝子検出が蛍光法を利用して達成されている²⁴⁻²⁶⁾. これらの手法によって, 均一溶液中での蛍光検出に成功している. 一方, Sato ら^{27, 28)}によって, β-CD を利用した電気化学的遺伝子の検出も報告されている. この検出法によって, 遺伝子検出の精度や感度の向上が確認されている. このように遺伝子検出におけるβ-CD の利用は効果的であると期待される. しかし, 報告されているβ-CD を用いた電気化学的検出は, DNA 修飾電極を用いており, さらに3種類の化合物による複雑な検出系である. 本検出系をこの固定化操作が不要な系への発展ができれば, より簡便な検出法へ発展できるものと期待される.

このような背景を基に, 新規なインディケーターを利用した従来の電気化学的遺伝子検出よりもさらなる簡便な検出法を確立することを目的とした. 過去に, DNA と電気活性種を作用させて, 均一溶液中での電気化学的検出が報告されたが, これらは電流値がDNA作用後で減少している手法である¹⁹⁻²⁰⁾. このように, 固定化操作なしでの電気化学測定では「電流値増加」型の検出は報告されていない. これを達成する系として, 著者は同一分子内にβ-CD とフェロセン (Fc)を導出した新規ナフタレンジイミド (FNC, Figure 3-1)を設計した. FNC は Figure 3-2 に示すように, 水溶液中ではFcがβ-CDに包接されており, DNAに結合することでFcがβ-CDから放出されるものと考えられる. すなわち, DNA存在下によって, 「電流値増加」型の検出を達成することが期待される.

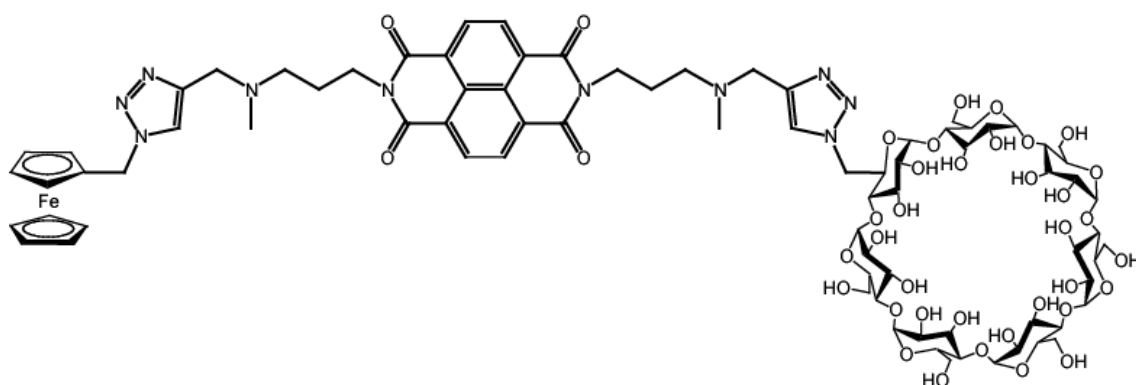


Figure 3-1. FNC の構造式 .

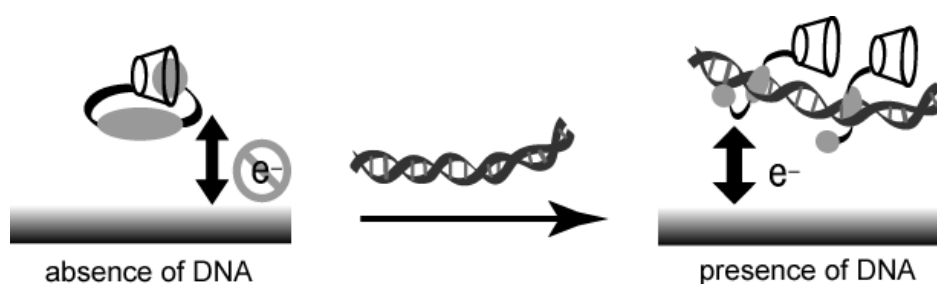


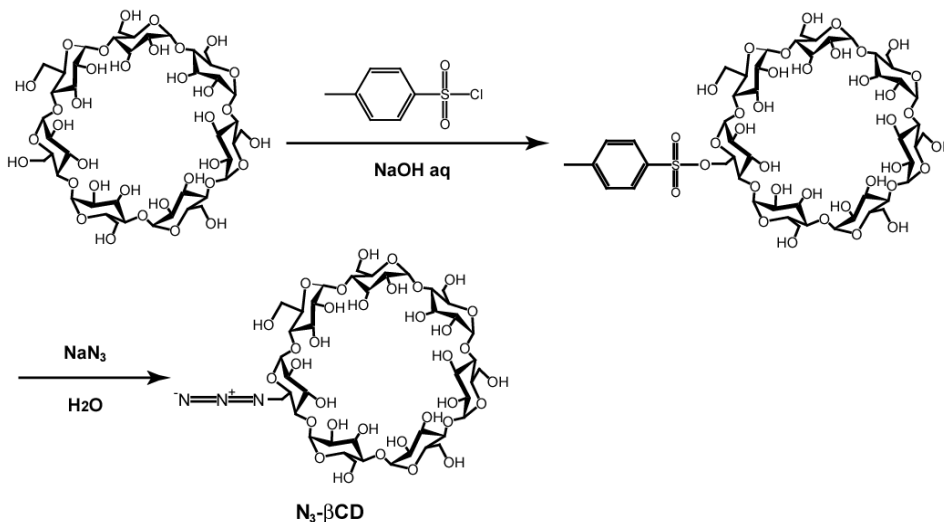
Figure 3-2. DNA 存在下での FNC のモデル図 .

本章では、初めに FNC の合成を行った。FNC の開発において、 β -CD を導入しなければならないが、 β -CD は巨大分子であるために反応効率が減少することが懸念される。そこで定量的に反応が進行する Huisgen 環化反応²⁹⁾を利用した。次に、合成した FNC は β -CD が導入されているので、DNA との相互作用が弱い可能性があり、インターカレート結合しているかを確認する必要があるため、FNC を用いて DNA との相互作用解析を行った。その後、FNC を用いて電気化学的 DNA 検出を試みた。

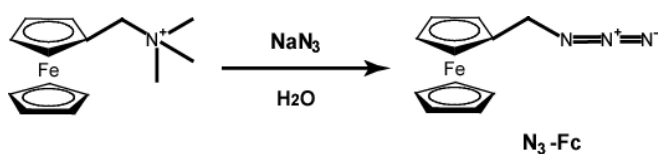
3-2. 実験

3-2-1. 合成

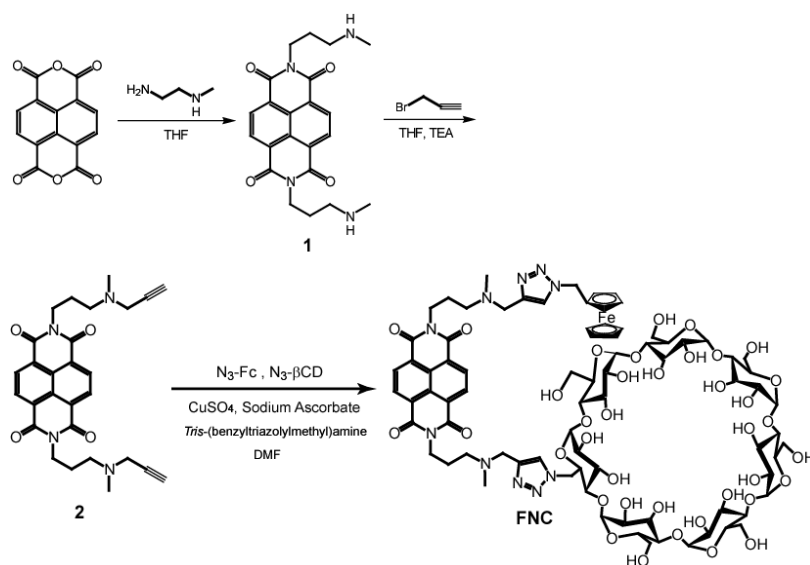
N_3 - β -CD (Scheme 3-1)³⁰⁻³³⁾ と N_3 -Fc (Scheme 3-2)^{34, 35)} は過去の合成法を参考にして合成を行い, 化合物 **1** は過去の合成法²⁸⁾を参考にして合成を行い, その後 Scheme 3-3 に従って FNC の合成を行った.



Scheme 3-1



Scheme 3-2



Scheme 3-3

3-2-1-1. Mono-6-azido- β -cyclodextrin (N_3 - β CD)の合成

3-2-1-1-1. Mono-6-*p*-toluenesulfonyl- β -cyclodextrin の合成^{31, 32)}

0.4 N NaOH 100 ml に β -cyclodextrin (β -CD) 5 g (4.4 mmol)を溶かし, *p*-トルエンスルホニルクロライド 5 g (26 mmol)を加え, 0 で 45 分間, 攪拌させた. 45 分後, 吸引濾過し, ろ液を 1H HCl で pH 7 に調整した. その後, 1 時間冷やして, 沈澱を吸引ろ過したところ, 白い固体が得られた. TLC (展開溶媒: *n*BuOH : EtOH : H₂O = 5 : 4 : 3, 検出: アニスアルデヒドによる検出(*p*-アニスアルデヒド : conc H₂SO₄ : EtOH = 1 : 1 : 18)で確認したところ, マルチ体が確認されたので, 約 60 % アセトニトリル溶液を加えて再結晶を行い, 3 時間減圧乾燥し, 白色固体を得た. TLC で確認したところ単一の成分であったので, 高純度の精製物を得た. 得られた精製物を MALDI-TOF-MS, 融点により同定を行った. 収量 1.31 g (1 mmol), 収率 23 % (文献値 40 %³¹⁾. MALDI-TOF-MS (positive mode, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA)): m/z = 1313.63 (理論値 C₄₉H₇₆O₃₇S+Na⁺ = 1312.17). 融点 169 - 172 (文献値 168 - 170 %³²⁾).

3-2-1-1-2. Mono-6-azido- β -cyclodextrin (N_3 - β CD)の合成³³⁾

MilliQ 水 10 ml に Mono-6-*p*-toluenesulfonyl- β -cyclodextrin 1.26 g (1.0 mmol)を懸濁させ, アジ化ナトリウム 0.65 g (10 mmol)を加え, 80 で 5 時間, 攪拌させた. その後, 2 時間放冷し, アセトン 100 ml に反応溶液を注ぎ込んだ. 得られた沈殿物を吸引濾過し, 3 時間減圧乾燥したところ, 白色固体を得た. その後, TLC (*n*BuOH : EtOH : H₂O = 5 : 4 : 3, 検出: アニスアルデヒドによる検出)で確認したところ単一の成分であったので, 高純度の精製物を得た. 得られた精製物を MALDI-TOF-MS, FT-IR, そして融点測定で同定した. 収量 0.82 g (0.7 mmol), 収率 69 % (文献値 72 %³³⁾. MALDI-TOF-MS (positive mode, 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHBA)): m/z =1183.19 (理論値 C₄₂H₆₉N₃O₃₄+Na⁺ = 1182.98). FT-IR (KBr 板, 積算回数 16 回): 2104 cm⁻¹ (-N=N⁺=N⁻). 融点 225 - 231 (文献値 220³³⁾).

3-2-1-2. Ferrocenylmethylazido (N_3 -Fc)の合成³⁴⁾

メタノール 15 ml 中に Ferrocenylmethyltrimethylammonium iodide を 0.77 g (2 mmol)を溶かし, アジ化ナトリウム 0.26 g (4 mmol)を加えて, 80 で 13 時間還流した. その後, 減圧留去し, 得られた生成物にジクロロメタン 30 ml 加えて吸引ろ過した. ろ液を減圧留去し, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: CHCl₃ : ジエチルアミン(Me₂NH) = 10 : 0.2)で処理し, R_f 値 = 0.65 のところを分取した. 展開溶媒を減圧留去し, 加熱減圧乾燥を行ったところ, 黄褐色の油状物質を得た. 得られた精製物を ¹H-NMR と FT-IR により同定を行った. 収量 0.17 g (0.70 mmol), 収率 35 % (文献値 62 %³⁴⁾. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.11 (2H, s), 4.17 - 4.24 (9H, m) ppm. FT-IR (KBr 板, 積算回数 16 回): 2101 cm⁻¹ (-N=N⁺=N⁻). 参考文献では, 性状が固体であり, 融点が 32 - 34 である³⁴⁾.

3-2-1-3. N-Methylaminopropyl naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (1)の合成²⁸⁾

Naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid dianhydride 1.34 g (5.0 mmol)を 40 ml のテトラヒドロフラン (THF)に懸濁させ, この溶液に N-Methyl-1, 3-diaminopropane 2.56 ml (25 mmol)を加え, TLC (展開溶媒: CHCl_3 : CH_3OH : Me_2NH = 10 : 0.2 : 0.5)で反応追跡しながら 7 時間還流した. 還流後, 溶液を室温で放冷し, THF を減圧留去したところ黒褐色の固体が得られた. この固体にクロロホルム約 30 ml 加えて溶かし, 自然ろ過をした. ろ液を減圧留去した. その後, クロロホルム 20 ml 加えて溶かし, この溶液をヘキサン 300 ml に滴下し, 再沈殿を行った. 1 時間超音波照射し, 4 で 2 時間静置した(この操作を 2 回行った). 吸引ろ過を行い, デシケーターで減圧乾燥を 1 時間行った. その後, 加熱減圧乾燥を行い, 赤色の粉末を得た. この粉末を逆相 HPLC で確認したところ, 高純度の精製物を得た. 精製物の確認の際の逆相 HPLC の測定条件に関して, カラムは Inertsil ODN-3 を用い, 検出波長は 383 nm で行った. グラジエント条件に関して, 0.1 % TFA 溶液で 70 % アセトニトリル溶液を 10 % から 100 % まで 30 分かけて直線的に流した. 得られた精製物を $^1\text{H-NMR}$, MALDI-TOF-MS, 融点により同定を行った. 収量 0.49 g (1.2 mmol), 収率 24 % (文献値 24 %²⁸⁾). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.96 (4H, m), 2.44 (6H, s), 2.68 (4H, t, J = 6.9 Hz), 4.29 (4H, t, J = 7.1 Hz), 8.76 (4H, s) ppm. MALDI-TOF-MS (positive mode, α -CHCA): m/z = 409.99 (理論値 $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{H}^+$ = 409.45). 融点: 177 - 179.5 (文献値 198 - 200²⁸⁾).

3-2-1-4. N,N'-Bis[3-(3-propargyl)methylaminopropyl]naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (2)の合成

化合物 1 0.20 g (0.49 mmol)を 15 ml の THF に懸濁させ, この溶液にトリエチルアミン (TEA) 0.14 ml (0.98 mmol)を加え, 80 で 30 分還流した. その後, Propargyl bromide 0.074 ml (0.98 mmol)を加えて TLC (展開溶媒: CHCl_3 : CH_3OH : Me_2NH = 10 : 0.2 : 0.5)で反応追跡しながら 80 で 3 時間 30 分還流した. 還流後, 溶液を室温で放冷し, 吸引ろ過を行い, ろ液を減圧留去した. この固体にクロロホルム 20 ml 加えて溶かし, TEA 0.14 ml (0.98 mmol)加えた後, 吸引ろ過を行い, ろ液を減圧留去した. シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: CHCl_3 : Me_2NH = 10 : 0.2)で処理し, R_f 値 = 0.24 のところを分取した. 展開溶媒を減圧留去し, 加熱減圧乾燥を行ったところ, 黄色の粉末を得た. この粉末を逆相 HPLC で確認したところ, 高純度の精製物を得た. 精製物の確認の際の逆相 HPLC の測定条件に関して, カラムは Inertsil ODN-3 を用い, 検出波長は 383 nm で行った. グラジエント条件に関して, 0.1 % TFA 溶液で 70 % アセトニトリル溶液を 10 % から 100 % まで 30 分かけて直線的に流した. 得られた精製物を MALDI-TOF-MS, $^1\text{H-NMR}$, 融点により同定を行った. 収量 0.08 g (0.16 mmol), 収率 33 %. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.92 (4H, m), 2.16 (2H, t, J = 2.3 Hz), 2.31 (6H, s), 2.68 (4H, t, J = 6.9 Hz), 3.39 (4H, s), 4.27 (4H, t, J = 7.5 Hz), 8.76 (4H, s) ppm. MALDI-TOF-MS (positive mode, α -CHCA): m/z = 485.7 (理論値 $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{H}^+$ = 485.55). 融点: 188 - 189 .

3-2-1-5. N,N'-Bis-{3-[(Ferrocenylmethyltriazolylmethyl)-6-methyltriazolylmethyl-β-cyclodextrin]methylaminopropyl}naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (FNC)の合成

化合物 2 0.0484 g (0.10 mmol), N₃-Fc 0.0243 g (0.10 mmol), N₃-βCD 0.1183 g (0.10 mmol) を DMF 2.5 ml に溶かし, この溶液に 1 M CuSO₄ 10 μl (0.010 mmol)と 1 M アスコルビン酸ナトリウム水溶液 40 μl (0.04 mmol), Tris-(benzyltriazolylmethyl)amine (TBTA) 0.0053 g (0.010 mmol)を加えた. 調製したサンプルを室温で 50 時間, 攪拌させた. その後, DMF を減圧留去し, 逆相 HPLC で Retention Time (R.T.) = 14 min.のところを分取し, 凍結乾燥を行ったところ, 淡緑色の粉末を得た. この粉末を逆相 HPLC で確認したところ, 高純度の精製物を得た. 分取と精製物の確認の際の逆相 HPLC の測定条件に関して, カラムは Inertsil ODN-3 を用い, 検出波長は 383 nm で行った. グラジエント条件に関して, 0.1 % TFA 溶液で 70 %アセトニトリル溶液を 10 %から 100 % まで 30 分かけて直線的に流した. 得られた精製物を MALDI-TOF-MS, 元素分析により同定を行った. 収量 0.02 g (0.0095 mmol), 収率 10%. MALDI-TOF-MS (positive mode, α-CHCA): m/z = 1907.70 (理論値 C₈₁H₁₀₈FeN₁₀O₃₈+Na⁺ = 1908.61). 元素分析: C 44.16, H 5.25, N 5.97 (理論値 C₈₁H₁₀₈FeN₁₀O₃₈·10H₂O: C 44.51, H 5.71, N 6.11).

3-2-2. FNC の構造解析

3-2-2-1. FNC の円二色性(CD)スペクトルによる構造解析

50 μM FNC を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液を調製し (全量 3000 μl), CD 測定を行った. 測定条件は, 走査速度 50 nm/min, レスポンス 2 sec, データ間隔 0.1 nm, 感度 100 mdeg, バンド幅 2 nm, 積算回数 4 回, 測定温度は 25 °C で行った.

3-2-2-2. FNC に 1-Adamanthylcarboxylic acid (Ada-COOH)の添加に伴う吸収スペクトルによる構造解析

MilliQ 水中に 5 μM FNC, または 5 μM FNC と 5 μM Ada-COOH になるように添加し (全量 3000 μl), 蛍光測定を行った. 励起波長はλ_{ex} = 383 nm, 蛍光波長はλ_{em} = 412 nm. 測定温度は 25 °C で行った.

3-2-2-3. FNC に Ada-COOH の添加に伴う蛍光スペクトルによる構造解析

MilliQ 水中に 50 μM FNC, または 50 μM FNC と 50 μM Ada-COOH になるように添加し (全量 3000 μl), 蛍光測定を行った. 励起波長はλ_{ex} = 383 nm, 蛍光波長はλ_{em} = 412 nm. 測定温度は 25 °C で行った.

3-2-2-4. FNC に 1-Adamantylamine (Ada-NH₂)の添加に伴う電気化学挙動による構造解析

内径 3.0 mm のグラッシーカーボン(GC)電極を 0.05 μm アルミナスラリーで 60 分間物理研磨し、その後 15 分間 (5 分×3)超音波洗浄を行った。10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄を含んだ 50 μM FNC 溶液 (全量 300 μl)に電極を浸し、Cyclic voltammetry (CV)測定を行った。その後、10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄を含んだ 50 μM FNC 溶液と 200 μM Ada-NH₂を添加したサンプル(全量 300 μl)を調製し、CV 測定を行った。CV 測定条件は走査範囲: 0 - 0.6 V, 測定温度は 25 °C で行った。

3-2-3. FNC と二本鎖 DNA との相互作用解析

3-2-3-1. 吸光度変化における仔牛胸腺 DNA (Ct-DNA)と FNC の平衡到達時間の評価

10 μM FNC と 100 μM/bp Ct-DNA を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液を調製し (全量 3000 μl), 攪拌しながら 384 nm の吸光度の時間変化を測定した。測定温度は 25 °C で行った。

3-2-3-2. Ct-DNA の添加に伴う FNC の吸収スペクトル変化による結合能評価

7 μM FNC を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液を調製し (全量 3000 μl), UV-Vis 測定を行った。その後、4 mM/bp Ct-DNA を添加し、10 分攪拌し、1 分静置した後、UV-Vis 測定を行い、吸光度変化が飽和に達するまでこの操作を繰り返した。測定温度は 25 °C で行った。

3-2-3-3. FNC の添加に伴う Ct-DNA の CD スペクトル測定

100 μM/bp Ct-DNA を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液を調製し (全量 3000 μl), CD 測定を行った。その後、694.5 μM FNC を各濃度 (10, 20, 30, 40, 50, そして 60 μM)になるように添加し、CD 測定を行った。測定条件は、走査速度 50 nm/min, レスポンス 2 sec, データ間隔 0.1 nm, 感度 100 mdeg, バンド幅 2 nm, 積算回数 4 回, 測定温度は 25 °C で行った。

3-2-3-4. FNC の添加に伴うプラスミド DNA の Topoisomerase I assay

plasmid DNA として pUC19 (2686 bp) 0.25 μg を含む 0.1 % BSA, 1× Reaction buffer (1× Reaction buffer の組成: 35 mM Tris-HCl (pH 8.0), 72 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 5 mM スペルミジン), 5 U Topoisomerase I 溶液を調製し、37 °C で 5 分間インキュベートした。その後、FNC を各最終濃度 (5, 10, 15, 20, そして 25 μM)になるように 1 μl ずつ加えて調製し、37 °C で 1 時間インキュベートした。酵素反応後、10 % SDS 2 μl, 20 mg/ml proteinase K 0.5 μl 加えて 37 °C でさらに 15 分間インキュベートし、酵素反応停止を行った。インキュベート後、1× TE を 100 μl ずつ加え、さらにフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1 を 100 μl 加えて 1 分間攪拌、遠心し、フェノール相を取り除いた。この操作を 3 回繰り返した。その後、クロロホルム :

イソアミルアルコール= 24 : 1 を 100 μ l 加えて 1 分間攪拌し, 遠心した後, 有機相を取り除いた. この操作を 3 回繰り返した. その後, 1 %アガロースゲルにより 1 \times TAE 中で 18 V, 3.5 時間泳動を行った. 3.5 時間後, 1 \times TAE 100 ml に Gelstar 5 μ l を加え, 30 分間染色を行った.

3-2-3-5. Stopped-flow 測定による Ct-DNA と FNC の速度論解析

3-2-3-5-1. 会合速度定数の評価

5, 7.5, 10, 12.5, そして 15 μ M FNC を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液 (全量 3000 μ l) と 200, 300, 400, 500, そして 600 μ M/bp Ct-DNA を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液を調製し (全量 3000 μ l), FNC 溶液と Ct-DNA 溶液を混ぜたときの 383 nm の吸光度変化の測定を Stopped-flow 分光光度計を用いて行った. 測定温度は 25 $^{\circ}$ C で行った.

3-2-3-5-1. 解離速度定数の評価

6 μ M FNC と 240 μ M/bp Ct-DNA を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液と 1 % SDS を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液を調製し (全量 3000 μ l), FNC と Ct-DNA の複合体溶液と SDS 溶液を混ぜたときの 383 nm の吸光度変化の測定を Stopped-flow 分光光度計を用いて行った. 測定温度は 25 $^{\circ}$ C で行った.

3-2-4. DNA 添加に伴う FNC の電気化学測定

3-2-4-1. グラッシーカーボン (GC)電極を用いた電気化学測定

内径 3.0 mm の GC 電極を 0.05 μ m アルミナスラリーで 60 分間物理研磨し, その後 15 分間(5 分 \times 3)超音波洗浄を行った. 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ を含んだ 50 μ M FNC 溶液 (全量 300 μ l) に電極を浸して CV と Differential pulse voltammetry (DPV) 測定を行った. その後, 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ を含んだ 50 μ M FNC 溶液に 5 mM/bp Ct-DNA を所定濃度 (0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 1.0, 1.5, そして 2.0 mM) 添加したサンプル(全量 300 μ l)を調製し, CV と DPV 測定を行った. CV 測定条件は走査範囲: 0 - 0.6 V, DPV 測定条件は走査範囲: 0.6 から 0 V に走査, Amplitude: 0.05 V, Pulse Width: 0.05 s, Sample Width: 0.005s, Pulse Period: 0.2 s である. 測定温度は 25 $^{\circ}$ C で行った.

3-2-4-2. マスキング電極を用いた電気化学測定

直径 1.6 mm で面積 0.020 cm² の金電極の物理研磨を以下の手順で行った (6 μ m ダイヤモンドスラリーで 30 分研磨, MilliQ 水で洗浄, 1 μ m ダイヤモンドスラリーで 30 分研磨, MilliQ 水で洗浄, 0.05 μ m アルミナスラリーで 30 分研磨). MilliQ 水に浸し, 5 分間超音波照射, MilliQ 水を変えて合計 3 回行った. 次に, 参考文献³⁶⁾の手法に従って, 以下の手順で電解研磨を行った (0.5 M NaOH 溶液に浸し, スキャン速度 2 V/s で -0.35 から -1.35 V (vs. Ag/AgCl) の範囲でボルタモグラムが一定になるまで 1000 から 2000 回 CV 測定を繰り返す. MilliQ で水洗後, 0.5 M H₂SO₄ 溶液に

浸し, 2V で 5s の酸化を行い, -0.35 V, 10s の還元を行った後, スキャン速度 4 V/s で -0.35 から 1.5 V (vs. Ag/AgCl) で 40 回 CV 測定を繰り返す). MilliQ 水に浸し, 1 分間超音波照射, MilliQ 水を変えて合計 3 回行った. この時の真の表面積は 0.033 cm² であった. MilliQ 水で洗浄後, 1 mM 6-メルカプトヘキサノール (6-MCH) 水溶液 100 μl に浸して 45 °C で 1 時間インキュベートした後, MilliQ で洗浄することによりマスキング電極を調製した. 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ を含んだ 50 μM FNC 溶液 (全量 300 μl) にマスキング電極を浸し, CV と DPV 測定を行った. その後, 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ を含んだ 50 μM FNC 溶液に 5 mM/bp Ct-DNA を所定濃度 (0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.5, 1.0, 1.5, そして 2.0 mM) 添加したサンプル (全量 300 μl) を調製し, CV と DPV 測定を行った. CV 測定条件は走査範囲: 0 - 0.6 V, DPV 測定条件は走査範囲: 0.6 から 0 V に走査, Amplitude: 0.05 V, Pulse Width: 0.05 s, Sample Width: 0.005s, Pulse Period: 0.2 s である. 測定温度は 25 °C で行った.

3-2-5. FNC 存在下での DNA の構造解析

3-2-5-1. 直鎖状の plasmid DNA の調製

plasmid DNA として pUC19 (2686 bp) 0.75 μg を含む 1 × H buffer (1 × H buffer の組成: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM NaCl) に 50 U EcoR I を加えて (全量 20 μl), 37 °C で 2 時間インキュベートした. 酵素反応後, フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1 を 20 μl 加えて 1 分間攪拌, 遠心し, フェノール相を取り除いた. この操作を 3 回繰り返した. 3 M Sodium Acetate (pH 5.2) を 2 μl 加え, 100 % エタノールを 20 μl 加え, -30 °C で 2 時間静置した. 4 °C, 15,000 g で 30 分間遠心分離させた. 上清を捨て, 80 % エタノールを 20 μl 加え, 軽く攪拌し, 4 °C, 15,000 g で 1.5 時間遠心分離させた. 上清を捨て, 30 分間加熱減圧乾燥し, 滅菌水を 100 μl 加えて 72.4 ng/μl 直鎖状の pUC19 を調製した.

3-2-5-2. Atomic Force Microscopy (AFM) 測定による構造解析

マイカ基板をクリーブ処理し, 10 ppm poly-L-lysine (PLL) 溶液を基板の上に 25 μl 滴下して 5 分静置した. その後, MilliQ 水で洗浄した (100 μl × 2). 窒素ガスで 30 分乾燥させ, 1 × TE buffer を含む各サンプル (1.5 ng/μl pUC19, 1.5 ng/μl pUC19 + 0.30 ng/μl FNC, 1.5 ng/μl pUC19 + 0.75 ng/μl FNC, 1.5 ng/μl pUC19 + 1.5 ng/μl FNC, 1.5 ng/μl pUC19 + 3.0 ng/μl FNC, 1.5 ng/μl pUC19 + 7.5 ng/μl FNC, 1.5 ng/μl pUC19 + 0.30 ng/μl FNC + 0.30 ng/μl 1-Adamantylamine (Ada-NH₂), 1.5 ng/μl pUC19 + 1.5 ng/μl FNC + 1.5 ng/μl Ada-NH₂, 1.5 ng/μl pUC19 + 7.5 ng/μl FNC + 7.5 ng/μl Ada-NH₂) を滴下し, MilliQ 水 (100 μl × 2) ですぐに洗浄し, デシケーターで一晩乾燥させた. 測定前に窒素ガスで 1 時間乾燥させた後に, AFM 測定を行った.

3-2-6. FNC 存在の DNA のゲル電気泳動の評価

1 × TE buffer を含む各サンプル (1.5 ng/μl pUC19, 1.5 ng/μl pUC19 + 0.30 ng/μl FNC, 1.5 ng/μl pUC19 + 1.5 ng/μl FNC, 1.5 ng/μl pUC19 + 7.5 ng/μl FNC, 1.5 ng/μl pUC19 + 0.30 ng/μl FNC + 0.30 ng/μl 1-Adamantylamine (Ada-NH₂), 1.5 ng/μl pUC19 + 1.5 ng/μl FNC + 1.5 ng/μl Ada-NH₂, 1.5 ng/μl pUC19 + 7.5 ng/μl FNC + 7.5 ng/μl Ada-NH₂) を調製した。その後、0.6 % アガロースゲルにより 1 × TAE 中で 100 V, 30 分電気泳動を行った。30 分後、1 × TAE 100 ml に Gelstar 5 μl を加え、30 分間染色を行った。

3-2-7. DNA 存在下での Ada-NH₂ 添加に伴う FNC の電気化学挙動の評価

0.05 μm アルミナスラリーで GC 電極を 60 分間物理研磨し、その後 15 分間 (5 分 × 3) 超音波洗浄を行った。10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ を含んだ 50 μM FNC と 200 μM Ct-DNA 複合体溶液 (全量 300 μl) と 50 μM FNC と 200 μM Ct-DNA 複合体溶液に 5 mM Ada-NH₂ を 1 mM になるように添加したサンプル (全量 300 μl) を調製し、CV 測定を行った。CV 測定条件は走査範囲: 0 - 0.6 V, 測定温度は 25 °C で行った。

3-2-8. GC 電極を用いた 1 本鎖 DNA (ssDNA) あるいは 2 本鎖 DNA (dsDNA) 添加に伴う FNC の電気化学測定

0.05 μm アルミナスラリーで GC 電極を 60 分間物理研磨し、その後 15 分間 (5 分 × 3) 超音波洗浄を行った。10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ を含んだ 50 μM FNC 溶液 (全量 300 μl) に電極を浸し、CV と DPV 測定を行った。その後、10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ を含んだ 50 μM FNC 溶液に 2 mM/bp Ct-DNA あるいは 2 mM/b poly dT を含んだサンプル (全量 300 μl) を調製し、CV と DPV 測定を行った。CV 測定条件は走査範囲: 0 - 0.6 V, DPV 測定条件は走査範囲: 0.6 から 0 V に走査, Amplitude: 0.05 V, Pulse Width: 0.05 s, Sample Width: 0.005s, Pulse Period: 0.2 s である。測定温度は 25 °C で行った。

3-3. 結果

3-3-1. FNC の合成と物性評価

Figure 3-3 に Huisgen 環化反応前後の FNC の HPLC 結果を示している。今回の合成では、非対称の化合物を合成するために、等量比を化合物 2 : N₃-Fc : N₃-β-CD = 1 : 1 : 1 で混合して反応させた。Figure 3-3 より、反応後では 3 つのピークが観測された。これを HPLC により分取を行い、MALDI-TOF-MS により確認した。Figure 3-4 に示しているように、ピーク 3 は化合物 2 の両置換基末端が β-CD と反応した化合物、ピーク 5 は化合物 2 の両置換基末端が Fc と反応した化合物 (FNF) であることが分かった。それに対して、ピーク 4 は化合物 2 に Fc と β-CD が反応した化合物 (FNC) であることが分かった。したがって、FNC を合成する際に、one-pot 合成が可能であり、簡便に合成することができた。合成に成功したので、水溶液中では FNC がどのような構造体であるのかを確認するために、吸収スペクトル、蛍光スペクトル、CD スペクトル、そして電気化学測定を行うことにした。

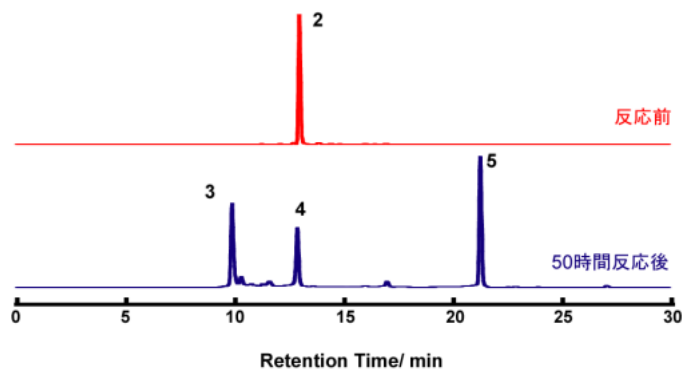


Figure 3-3. Huisgen 環化反応前後の HPLC 結果.

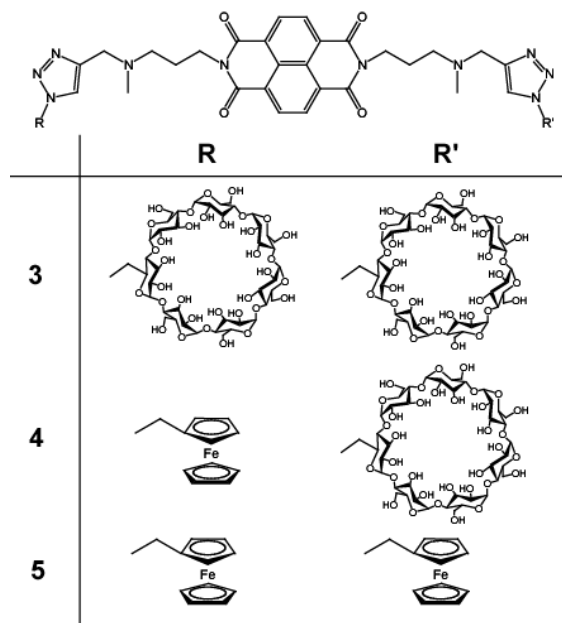


Figure 3-4. Huisgen 環化反応を用いて得られた化合物 3 - 5 の構造式.

FNC の水溶液中での構造体を評価するために、吸収スペクトルにより検討した。また、 β -CD が Fc に置き換わった FNF をコントロール化合物として比較検討することにした。ここで、FNC はナフタレンジイミド誘導体 **6** (Figure 3-5) のモル吸光係数を用いて濃度決定を行った。このとき FNC のモル吸光係数はその置換基の影響を受けて、化合物 **6** と異なることのないように DMSO 中で測定を行い、同様の同条件下で測定した化合物 **6** のモル吸光係数より算出した。また、FNF のモル吸光係数はクロロホルムで測定し、化合物 **6** と比較することにより決定した。Table 1 に得られた結果をまとめた。FNF、そして FNC の有機溶媒中でのモル吸光係数はそれぞれ、 $2.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、 $2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ となり、水溶液中ではそれぞれ $1.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、 $2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ となった。これらの結果を比較すると、FNF は有機溶媒中でのモル吸光係数の方が大きく、FNF は水溶液中ではスタッキング構造を形成しているものと考えられる。Sato らによって、従来の FND は buffer 溶液中よりも有機溶媒ではモル吸光係数が約 1.2 倍増加していることが報告されている³⁷⁾。このモル吸光係数の差はナフタレンジイミドと Fc のスタッキングによるものであると報告している。したがって、FNF に関しても、ナフタレンジイミド同士のスタッキングではなく、Fc とのスタッキングが起きているのではないかと考えられる。それに対して、FNC は有機溶媒中と水溶液中でのモル吸光係数が同じであることから、水溶液中ではスタッキング構造を有していないことが明らかとなった。さらには、化合物 **6** に比べて、FNC は同等のモル吸光係数であったが、FNF は約 1.5 倍小さくなった。このことから、化合物 **6** のモル吸光係数を用いて決定した濃度は妥当であると判断した。このモル吸光係数を用いて、FNC と FNF の正確な濃度を調製し、吸収スペクトル、蛍光スペクトル、CD スペクトル、そして電気化学測定にて評価することにした。Figure 3-6 に FNC あるいは FNF に Ada-COOH を添加した時の吸収スペクトルを示している。今回は、buffer 中で測定すると、塩濃度によって Ada-COOH と FNC の β -CD との相互作用効果を阻害する可能性が考えられるので、MilliQ 水中で行うこととした。Figure 3-6 より、Ada-COOH を添加することで、FNF の吸光度が増加した。これは、FNF のスタッキングが Ada-COOH により、解消され、吸光度が増加したのではないかと考えられる。さらに、ナフタレンジイミドが dimer 形成することで 383 nm の吸収波長がシフトするが、Figure 3-6 よりシフトしていないことも確認された。それに対して、FNC はあまり変化が得られなかった。この原因を追及するために、蛍光測定を行うこととした。

Figure 3-7 に蛍光スペクトルを示している。これより蛍光強度は化合物 **6** > FNF > FNC > FND となっている。化合物 **6** の 420 nm の蛍光はナフタレンジイミドに基づく蛍光である。それに対して、従来の FND は蛍光が得られないのは、Figure 3-8 に示しているようにナフタレンジイミドの π 電子を励起させると、スタッキングしているフェロセンの電子は移動し、ナフタレンジイミドの蛍光が消光されるものと考えられる。しかしながら、FNF では、蛍光が得られていることから、FNF はナフタレンジイミドへの Fc の直接的な電子移動が起っていないことが示された。したがって、Fc によるスタッキングではなく、トリアゾール基がナフタレンジイミドと相互作用しているものと解釈される。それに対して、FNC の蛍光は FNF よりも小さくなった。吸収スペクトルからスタッキング構造は示唆されないため、Fc やトリアゾールの影響を受けていないことが解釈される。したがって、Ada-COOH の有無に関わらず、吸光度の変化は起こらなかったと考えられる。つまり、蛍光が減少したのは、Fc とのスタ

ッキング構造ではないが, Fc が β -CD に包接されてナフトレンジイミドへの Fc の電子移動が起こりやすくなったためではないかと考えられる. そこで, FNC の構造解析のため, CD スペクトル測定を行った (Figure 3-9). 300 - 400 nm に負のコットン効果が得られた. これは β -CD による誘起 CD であるものと解釈される. また, 400 - 500 nm には, β -CD に包接された Fc の鉄の d-d* 遷移の誘起 CD が観測されることが報告されている³⁸⁾. このときの誘起 CD は $[\theta] = 600 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2/\text{decimol}$ であることが報告されている. Figure 3-9 に示しているように誘起 CD は $[\theta] = 520 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2/\text{decimol}$ となり, 報告されたモル楕円率と同等な値を示したため, 包接しているものと解釈される.

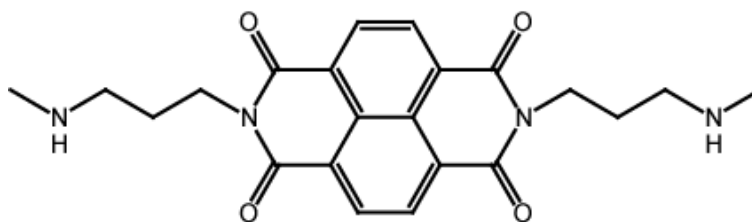


Figure 3-5. ナフトレンジイミド 6 の構造式.

Table 1. 各ナフトレンジイミド誘導体の有機溶媒と buffer 中でのモル吸光係数の比較.

	$\epsilon \times 10^{-4} \text{ max} / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	
	有機溶媒	buffer ^a
化合物6	2.9 ^b	2.7
FNF	2.3 ^c	1.8
FNC	2.6 ^b	2.7

a: 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl. b: DMSO, c: CHCl₃

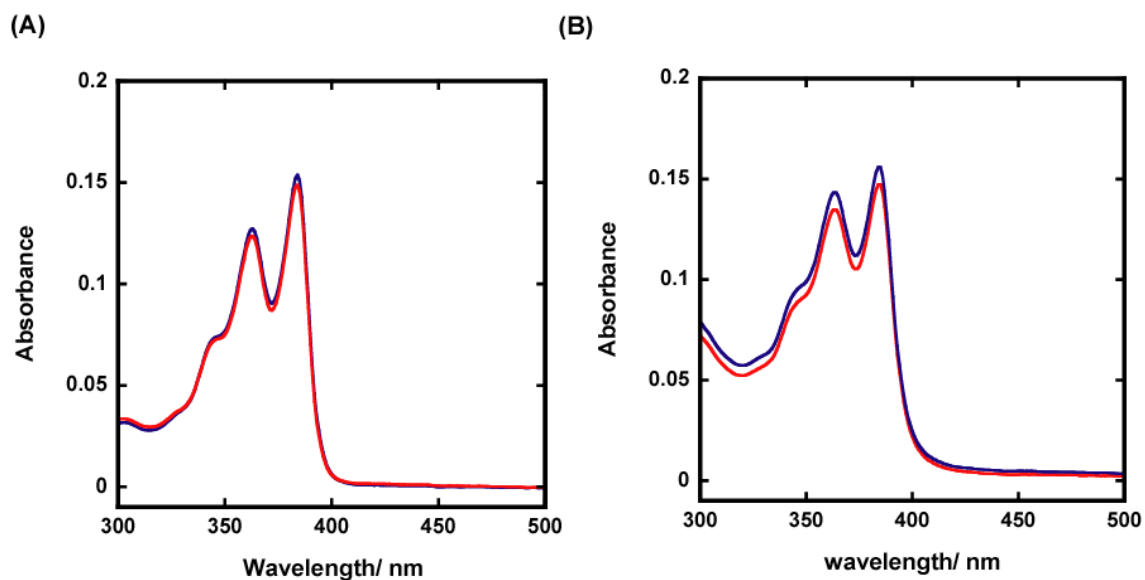


Figure 3-6. 各サンプルの吸収スペクトル測定結果. FNC (A), FNF (B). 赤線: 5 μ M 化合物, 青線: 5 μ M 化合物と 5 μ M Ada-COOH 混合溶液. 測定溶液: MilliQ 水, 測定温度: 25 $^{\circ}$ C.

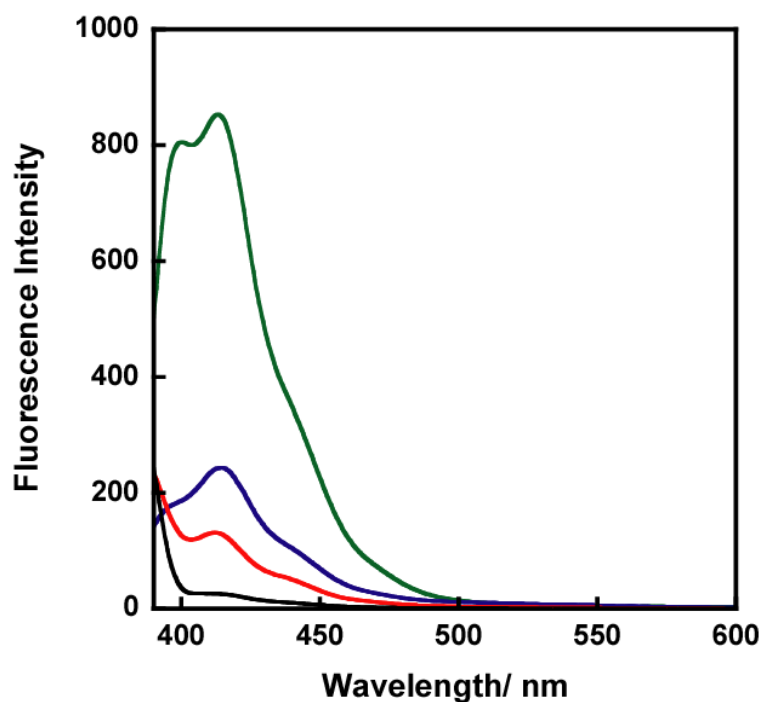


Figure 3-7. 各サンプルの蛍光スペクトル測定. 黒線: 50 μ M FND, 赤線: 50 μ M FNC, 青線: 50 μ M FNF, 緑線: 50 μ M 化合物 6, 測定溶液: MilliQ 水, 測定温度: 25 $^{\circ}$ C, 励起波長 λ_{ex} = 383 nm.

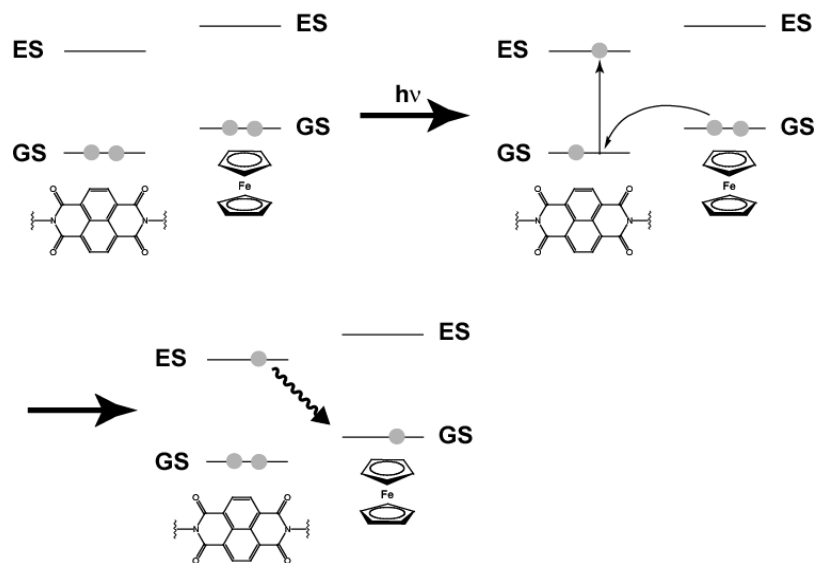


Figure 3-8. 光誘起電子移動によるナフタレンジイミドの蛍光消光メカニズム.

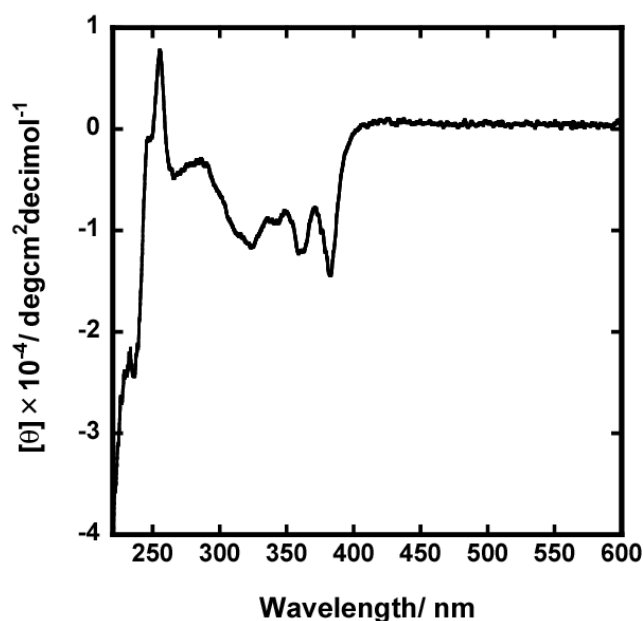


Figure 3-9. FNC の CD スペクトルの結果. 測定溶液: 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, [FNC] = 50 μ M, 測定温度: 25 .

FNC は β -CD が Fc を包接し, ナフタレンジイミド近傍に位置している可能性がある. そこで, FNC の構造を, 電気化学測定により評価することにした. Figure 3-10 に Ada-NH₂ 存在下, 非存在下における CV 測定の結果を示している. Matsue ら¹⁾によって, Fc が β -CD に包接すると, Fc の酸化還元電位が正側にシフトすることが報告されている. これは, 分子間での評価ではあるが, 分子内での包接挙動も同じであるものと考えられる. 仮に, FNC の Fc が β -CD に包接されているとするなら, アダマンタンを添加すると電位が負側にシフトするものと期待される. 実際に Figure 3-10 より,

Ada-NH₂ 非存在下での酸化電位は $E_{pa} = 0.44$ V であった。それに対して、存在下では $E_{pa} = 0.43$ V であり、非存在下に比べて 10 mV 負側にシフトしていることが分かった。さらには、Matsue らによつて、Fc が β -CD に包接すると、酸化還元電流値が減少することも報告している。Figure 3-10 から、Ada-NH₂ を添加することで、電流値がわずかながら増加していることも確認された。さらに、Figure 3-11 に示しているように、比較として FNF も同様に CV 測定を行った (FNF の電気化学測定に関する詳細は第 4 章で述べることにする)。FNF は β -CD を有していないので、酸化還元電位は FNC に比べて負側であると考えられる。実際に、FNC に比べて、負側に位置している。

次に、走査速度依存性を評価することにした。走査速度を変化させたときの I_{pa} と走査速度 (Eq. 1)、あるいは走査速度の 1/2 乗 (Eq. 2) との関係は次式で表すことができる。酸化還元種が電極に吸着しているとき、Eq. 1 の関係式が成り立ち、走査速度に対して I_{pa} が比例関係になる。それに対して、酸化還元種がバルク中を拡散し、拡散律速で電流応答が得られるとき、Eq. 2 の関係式が成り立ち、走査速度の 1/2 乗に対して I_{pa} が比例関係になる。

$$I_{pa} = n^2 F^2 A C v / 4RT \quad (1)$$

$$I_{pa} = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2)$$

n: 電子数, F: ファラデー定数, A: 電極面積, C: 色素濃度, D: 拡散係数, v: 走査速度

これらの関係式を対数にすることで、Eq. 1 と Eq. 2 の傾きがそれぞれ 1 と 0.5 になる。これを受けて、Figure 3-12 に走査速度の対数に対する走査速度を変化させたときに得られる FNC あるいは FNC に Ada-NH₂ を添加した複合体の酸化ピーク電流値 (I_{pa}) の対数を示している。これよりどちらのサンプルも傾きは 0.65 であった。これにより、FNC も FNC に Ada-NH₂ を添加した複合体もバルク中を拡散し、拡散律速であることが示された。したがって、全ての結果を総括すると、Figure 3-13 に示しているように、FND はナフタレンジイミドと Fc がスタッキング構造、FNF はナフタレンジイミドとトリアゾール環、FNC は Fc が β -CD に分子内包接した構造であることが示された。

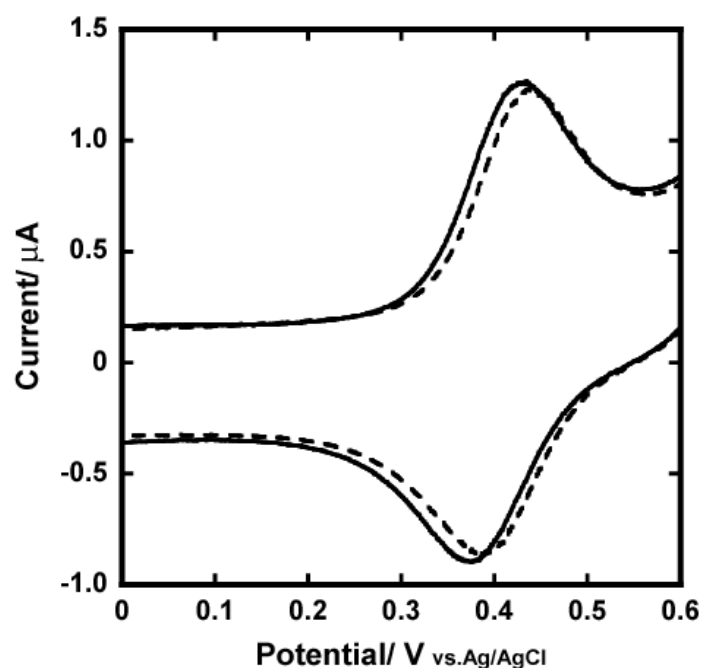


Figure 3-10. 200 μM Ada-NH₂ 存在下 (実線) 及び非存在下 (破線) での 50 μM FNC の GC 電極 (I. D. = 3.0 mm) を用いた CV 測定結果. 測定溶液: 100 mM NaClO₄ を含む 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 走査速度: 100 mV/s, 測定温度: 25 .

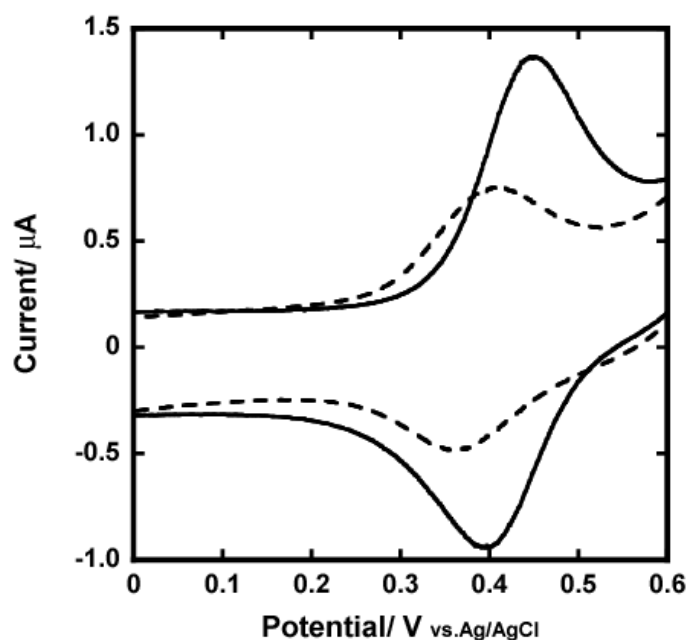


Figure 3-11. GC 電極 (I. D. = 3.0 mm) を用いた 50 μM FNC (実線) 及び 50 μM FNF (破線) の CV 測定結果. 測定溶液: 100 mM NaClO₄ を含む 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 走査速度: 100 mV/s, 測定温度: 25 .

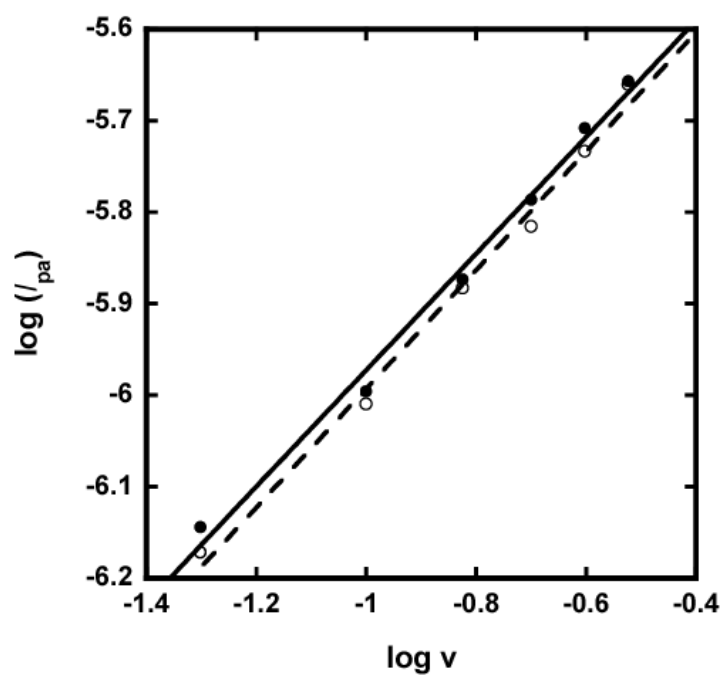


Figure 3-12. 走査速度の対数に対する 200 μM Ada- NH_2 存在下 (●) 及び非存在下 (○) での 50 μM FNC の酸化ピーク電流値の対数のプロット.

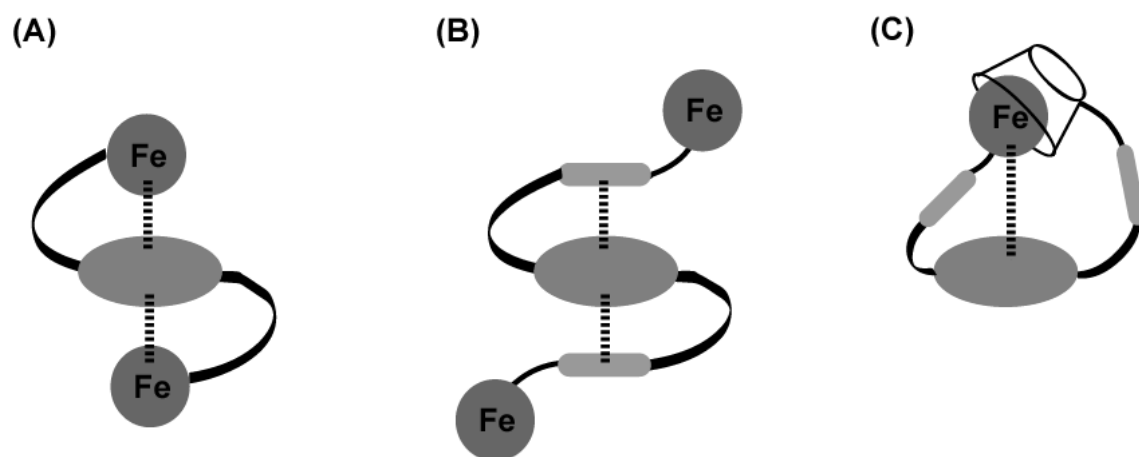


Figure 3-13. 水溶液中での FND (A), FNF (B), FNC (C) の予想される構造体.

3-3-2. FNC と二本鎖 DNA との相互作用解析

Figure 3-14 に Ct-DNA 添加に伴う FNC の吸収スペクトル変化を示している。二本鎖 DNA にインターカレーターが作用すると極大吸収波長のピークは淡色効果とレッドシフトが観測されることが知られている³⁹⁻⁴²⁾。FNC の吸収スペクトル変化より、Ct-DNA 添加に伴い 384 nm のピークは淡色効果と小さなレッドシフトしていることから、Ct-DNA との結合様式はインターカレート結合であると示唆される。また、Figure 3-14 より、等吸収点を通っていることから結合様式が単一であることが考えられる。Figure 3-15 に Ct-DNA を添加したときの FNC の 384 nm の吸光度の時間変化を示す。これより、FNC の平衡に達する時間は約 10 分であることが明らかとなった。したがって、FNC は二本鎖 DNA に対して、非常に遅い結合であることが示された。これは、FNC の CD スペクトルにより、溶液中での FNC の構造は複雑であるので、DNA と結合するためには、FNC は結合しやすい構造に変化して DNA と結合する必要があるので、結合時間が遅いのではないかと考えられる。これより、Ct-DNA 添加に伴う FNC の吸収スペクトル変化による結合能の評価では 10 分間攪拌して測定した。Figure 3-16 にナフトレンジミド (NDI) の 384 nm における吸光度変化を示している。Figure 3-16 を基に、Figure 3-17 に示しているように Scatchard plot を行い、下記に示す McGhee & von Hippel の式から結合定数と座位数を算出した⁴³⁾。

$$v/c = K(1-nv) \times \{(1-nv)/(1-(n-1)v)\}^{n-1}$$

v は塩基対当りに結合したインターカレーターの数、 c は結合していないインターカレーターの濃度、 n は座位数 (インターカレートすることにより覆われる塩基対の数)、そして K は結合定数。

算出した結果、 $K = 8.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 、 $n = 2$ となった。従来の FND と β -CD を用いた DNA との結合能と比較すると、3 種類の複合体での FND の結合能は $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であるので²⁸⁾、約 3.4 倍小さくなっていることが明らかとなった。恐らく、同一分子内に Fc と β -CD を導入しているため、立体的な高高さにより、縫い込みながらインターカレートしにくいために、結合能が小さくなったものと考えられる。

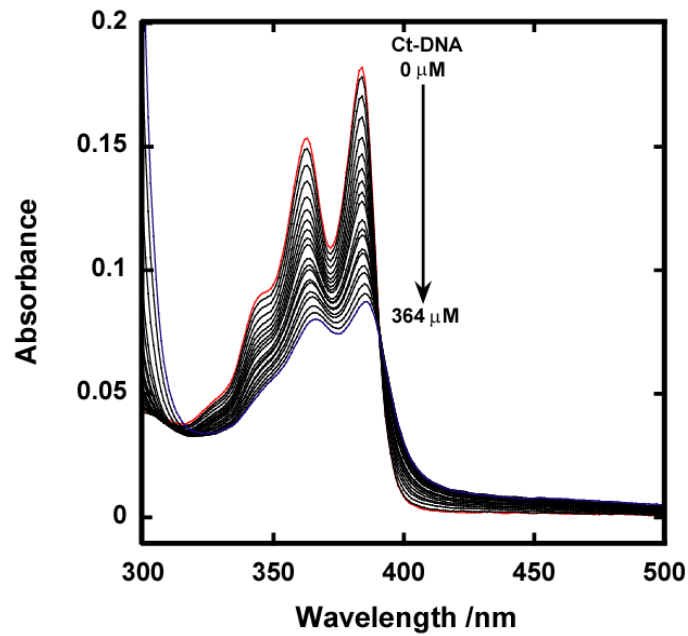


Figure 3-14. Ct-DNA 添加に伴う FNC の吸収スペクトル変化. 測定溶液: 7 μM FNC を含む 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl 溶液, 測定温度: 25 .

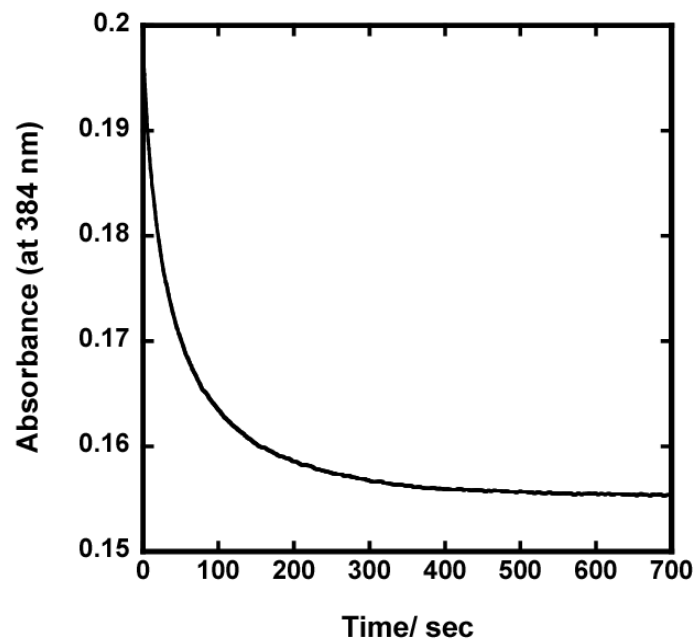


Figure 3-15. 100 μM/bp Ct-DNA を添加したときの時間に対する 10 μM FNC の 384 nm の吸光度変化. 測定溶液: 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl 溶液, 測定温度: 25 .

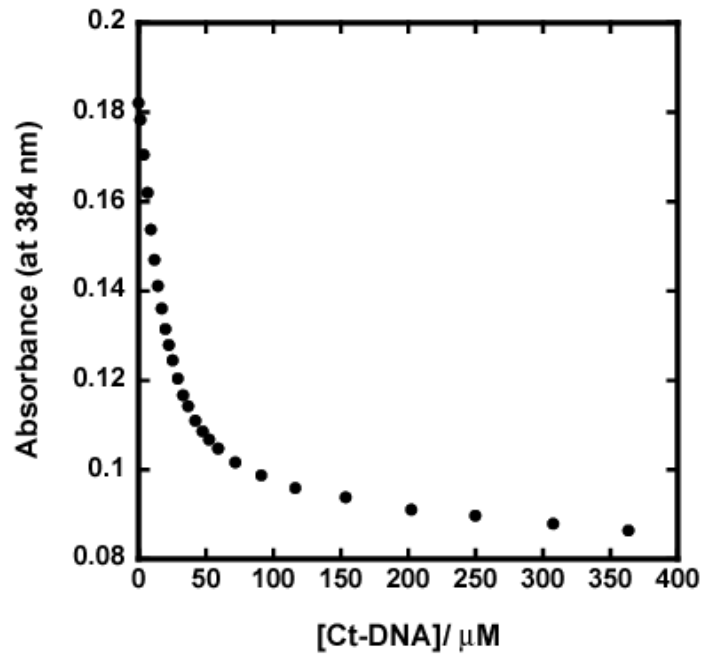


Figure 3-16. Ct-DNA 添加に伴う FNC 溶液中の 384 nm の吸光度変化.

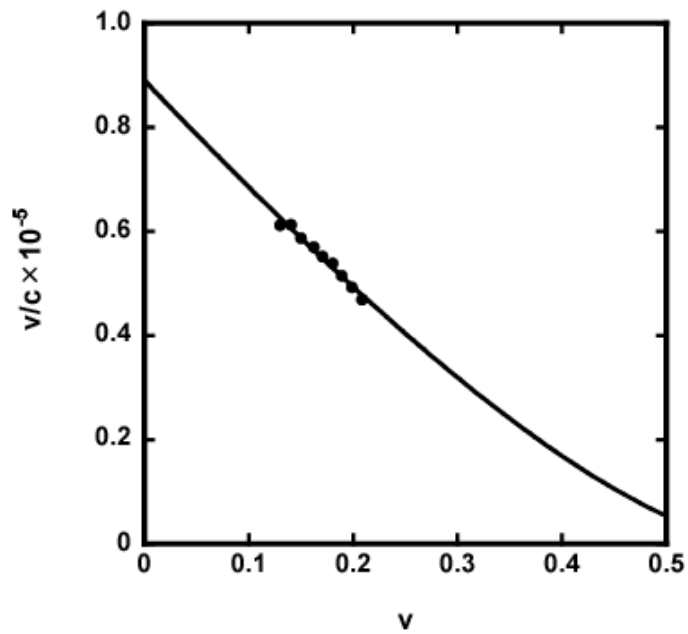


Figure 3-17. FNC と Ct-DNA との相互作用における Figure 3-16 の 384 nm の吸光度変化を利用した Scatchard 解析の結果.

さらに, Ct-DNA 添加に伴う CD スペクトル変化を評価した. Figure 3-18 より, FNC の添加に伴い NDI に由来する 383 nm 付近に負の誘起 CD が観測された. これより, FNC が DNA にインターカレートしていることが CD スペクトルからも解釈される. また, Figure 3-18(B)より 500 nm 付近に正の誘起 CD が確認できた. β -CD に Fc が包接することで, β -CD の軸方向に対して, 遷移双曲子が平行(縦包接)であることで正の誘起 CD が観測されることが報告されている³⁸⁾. したがって, FNC は DNA との相互作用することで, FNC の Fc が β -CD に包接され, Fc の d-d*遷移の誘起 CD が観測されたものと考えられる. しかしながら, Ct-DNA に関しても, DNA の骨格である糖の部分が不斉炭素を有しているため DNA に関しても不斉環境場であり, Ct-DNA によって誘起されている可能性もある.

吸収スペクトル変化と CD スペクトル変化によって, FNC は Ct-DNA にインターカレート結合している可能性が示され, 続いて Topoisomerase I により FNC がインターカレート結合の証明をすることにした.

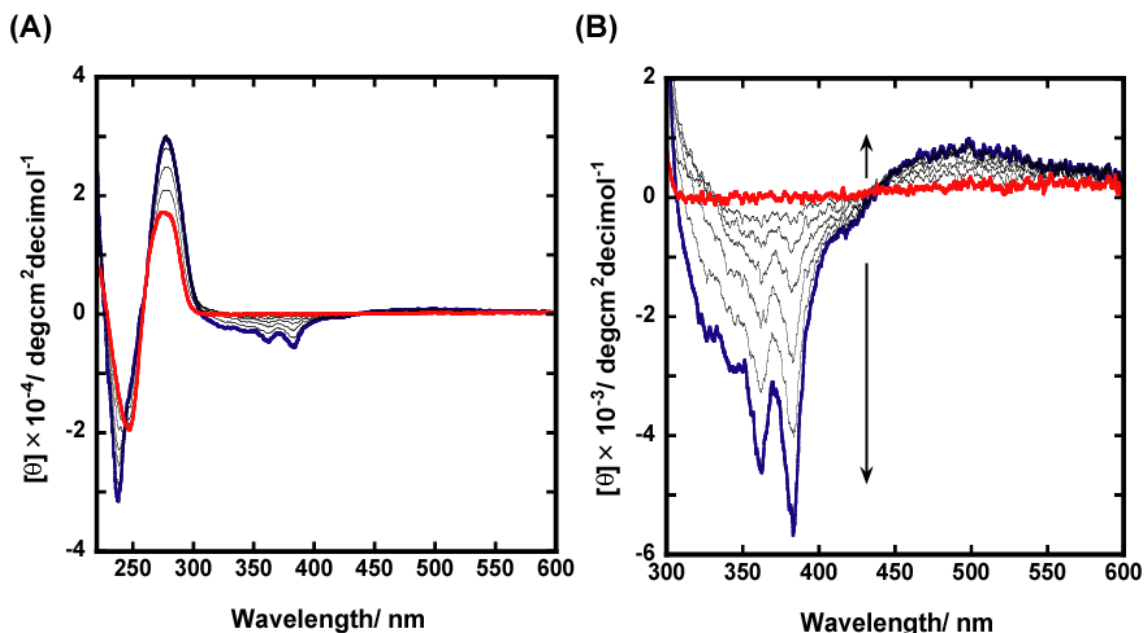


Figure 3-18. FNC 添加 (0 - 60 μ M)に伴う 100 μ M/bp Ct-DNA の CD スペクトル (A)と 300 - 600 nm の CD スペクトル (B). 測定溶液: 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液, 100 mM NaCl, 測定温度: 25 .

Figure 3-19 に FNC の添加に伴う pUC19 の Topoisomerase I assay の結果を示す. この結果より, pUC19 と Topoisomerase I によって open circle 状態から, FNC を添加するのに伴い, pUC19 は supercoil 状態へのバンドのシフトが観測された. これらの結果は, FNC はインターカレーターによる典型的な結果と同様となり, FNC は巨大分子である β -CD を有しているにも関わらず, DNA にインターカレート結合することが示された.

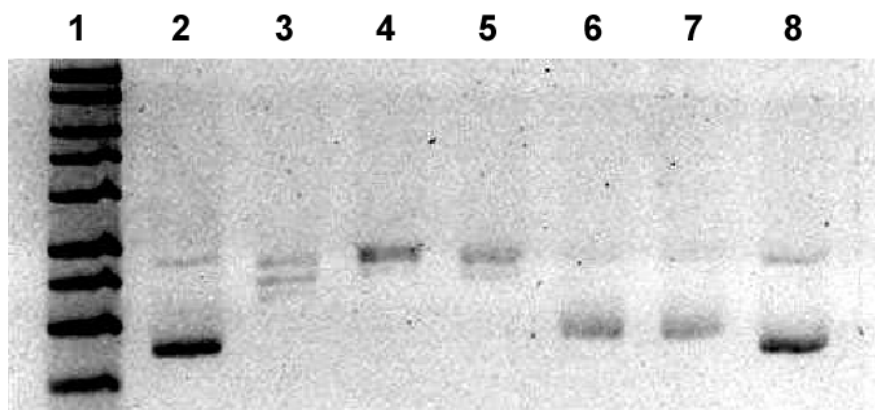


Figure 3-19. FNC の添加に伴う pUC 19 の Topoisomerase I assay の結果 . lane 1 と 2 はそれぞれ 1 kb Ladder と pUC19 のみ . lane 3 から 8 は pUC19 と Topoisomerase I を含むサンプルに FNC の最終濃度を左から 0, 5, 10, 15, 20, そして 25 μM に変化させたときの結果 .

このように , FNC はインターカレート結合であることが明らかとなったので , 実際に FNC の DNA に対する結合速度論を Stopped-Flow 法により評価することにした . Figure 3-20 に 5 μM FNC と 200 μM Ct-DNA との会合過程における 383 nm の吸光度の時間変化と 5 μM FNC と 200 μM Ct-DNA の複合体と 1 % SDS との解離過程における 383 nm の吸光度の時間変化を示す . 吸光度変化を下記に示す式で fitting し , 得られたパラメーター ($A_1, A_2, A_3, R_1, R_2, R_3$)を用いて , 下記に示す式に代入し , 会合速度定数 k_{app} を算出した³⁹⁾ .

$$\text{Abs} = -A_1 \exp(-R_1 \times t) - A_2(-R_2 \times t) - A_3(-R_3 \times t)$$

$$k_{app} = (A_1 \times R_1 + A_2 \times R_2 + A_3 \times R_3) / (A_1 + A_2 + A_3)$$

Abs は吸光度 , t は会合時間 , $A_1, A_2, A_3, R_1, R_2, R_3$ は係数である .

Figure 3-21 に示しているように , DNA の濃度に対して , 得られた k_{app} を plot し , 直線の傾きから会合速度定数を算出したところ , FNC の会合速度定数は $k_a = 1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった .

解離速度の評価も同様に , 得られた吸光度変化を会合過程と同じ式で fitting し , 得られたパラメーター ($A_1, A_2, A_3, R_1, R_2, R_3$)を用いて , $k_d = (A_1 \times R_1 + A_2 \times R_2 + A_3 \times R_3) / (A_1 + A_2 + A_3)$ に代入し , 解離速度定数 k_d を算出した⁴⁰⁾ . 算出した結果 , $k_d = 0.044 \text{ s}^{-1}$ となった . 会合・解離速度定数から結合定数を算出したところ , FNC は $K = k_a/k_d = 1.5 \times 10^4 / 0.044 = 3.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ となった . この結果は Scatchard 解析で得られた結合定数と比べ , 大きくずれている . $\beta\text{-CD}$ は巨大分子であり , FNC はいったん会合してしまうと , 解離しにくくなるものと思われる . さらには , $\beta\text{-CD}$ は親水性であるために , SDS とのミセル形成が行われてなく , 解離速度定数が大幅に減少し , さらには Scatchard 解析から得られた結合定数と比較すると誤差が生じたものと考えられる . そこで , DNA の濃度と k_{app} の関係は , $k_{app} = k_a \times [\text{Ct-DNA}] + k_d$ の関係が成り立つので , これより , $k_d = 0.40 \text{ s}^{-1}$ となった . これから結合定数を算出したところ , $K = k_a/k_d = 1.5 \times 10^4 / 0.40 = 3.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であり , Scatchard 解析で得られた結合定数に近い値となり , $k_a = 1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_d = 0.40 \text{ s}^{-1}$ が FNC の会合・解離速度定数である . $\beta\text{-CD}$ と従来の FND を利用した系では , 会合速度定数は $k_a = 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 解離速度定数 $k_d =$

0.6 s⁻¹ であり²⁸⁾, これと比較すると, FNC は会合速度では約 7.3 倍遅く, 解離速度では同等の値を示していることから, 同一分子内に Fc と β -CD を導入した場合, インターカレート結合は起こりにくいが, DNA からの解離は 3 種類利用した系と同様に解離が困難であることが明らかとなった. したがって, 平衡状態で FNC を用いることで, 3 種類利用した系に匹敵する電気化学的遺伝子検出を達成することができるものと考えられる.

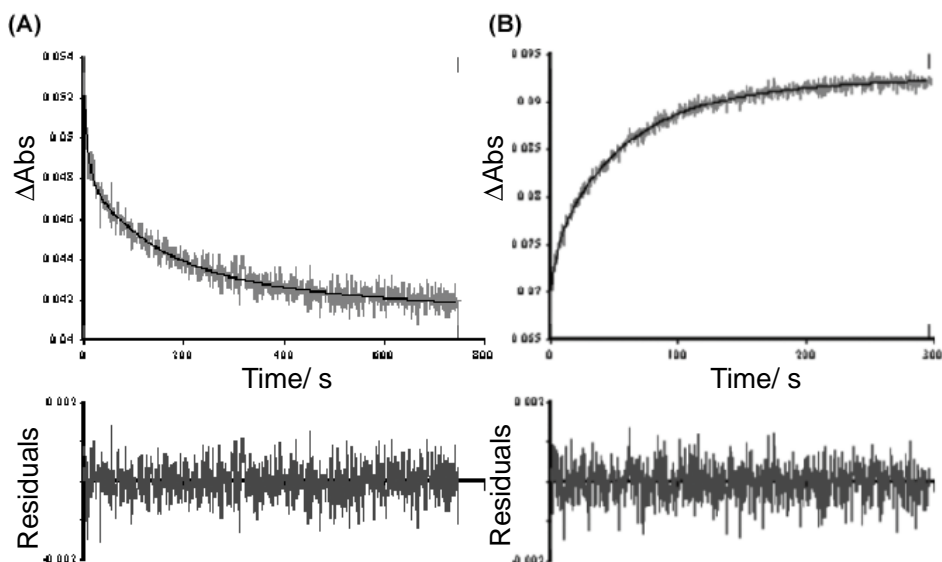


Figure 3-20. Ct-DNA に対する FNC の会合過程の Time Trace (A), 解離過程の Time Trace (B) の結果. 測定溶液: (A) 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, [FNC] = 5 μ M 溶液と 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, [Ct-DNA] = 200 μ M/bp 溶液, (B) 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, [FNC] = 6 μ M と [Ct-DNA] = 240 μ M/bp の複合体溶液と 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS 溶液, 測定温度: 25 .

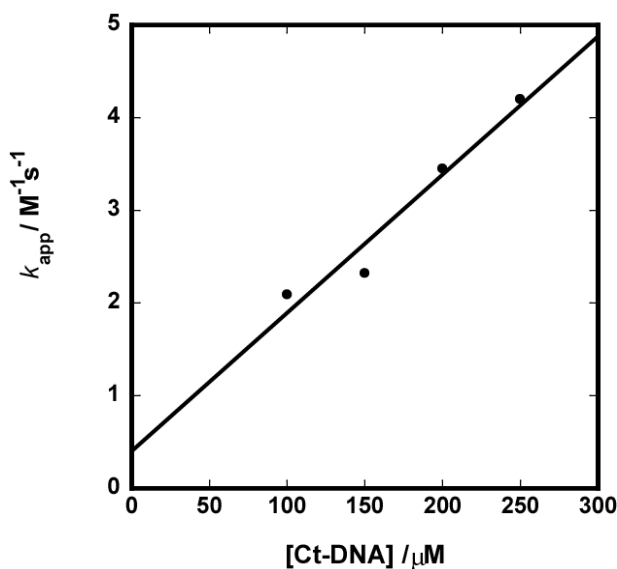


Figure 3-21. Ct-DNA の濃度とパラメーターを用いて算出した k_{app} の関係.

3-3-3. FNC を用いた Ct-DNA の電気化学的検出

Ct-DNA と FNC の複合体の CD スペクトルから (Figure 3-18), FNC が Ct-DNA に結合した上で, Fc が β -CD に包接していることが明らかとなった. そこで, このときの電気化学挙動を評価することにした. Figure 3-22 に Ct-DNA 添加における FNC の CV 測定の結果を示す. Figure 3-22 より, DNA を添加するのに伴い, 還元側で新たなピークが得られた. この新たなピークが得られたことより, FNC は DNA にインターカレート結合することで, 還元されやすい構造と還元されにくい構造が存在しているものと考えられる. Ct-DNA と FNC の複合体の CD スペクトルを考慮に入れると, Ct-DNA と FNC 混合溶液における 0.38 V 付近の還元ピークは Fc が β -CD に包接した構造の還元ピークであり, 0.28 V 付近の還元ピークは Fc が β -CD に包接されていない構造の還元ピークではないかと考えられる.

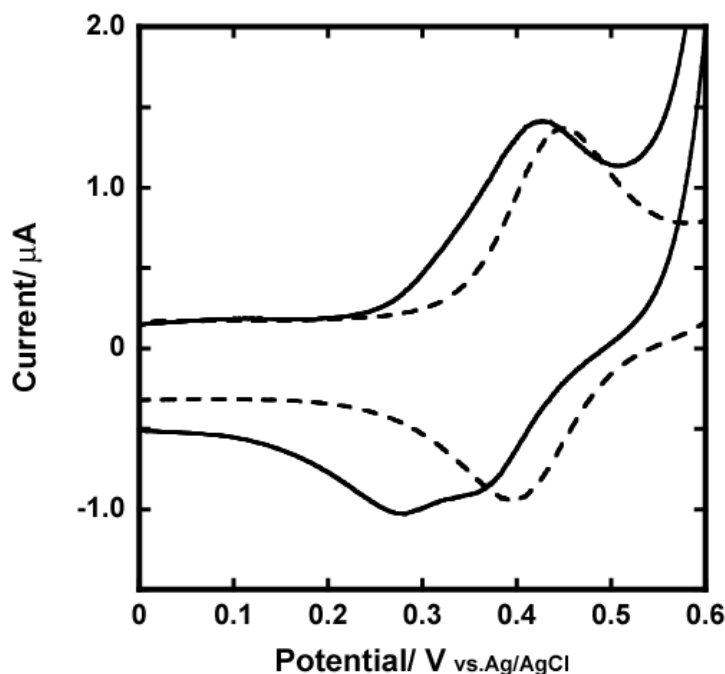


Figure 3-22. 2 mM Ct-DNA 存在下 (実線)及び非存在下 (破線)での 50 μ M FNC の GC 電極 (I. D. = 3.0 mm)を用いた CV 測定結果. 測定溶液: 100 mM NaClO₄ を含む 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0)溶液, 走査速度: 100 mV/s, 測定温度: 25 .

本研究の目的は、FNC を用いた均一溶液中での DNA の検出であるので、FNC と DNA 複合体では拡散電流が得られるものと考えられる。そこで、拡散電流が得られているか確認することにした。Figure 3-23(A)に走査速度を変化させたときの FNC と Ct-DNA 複合体の CV 測定の結果と Figure 3-23(B)走査速度の対数に対する各サンプルの走査速度変化させた時に得られた I_{pa} の対数を示している。3-3-1 の Figure 3-12 と同様な評価で行ったところ、Figure 3-23(B)より FNC のみでは傾きは 0.65 であったのに対し、FNC と Ct-DNA 複合体では、1.1 であった。これにより、FNC のみはバルク中を拡散しているが、Ct-DNA が存在することで電子移動律速となり、電極へ吸着していることが解釈される。

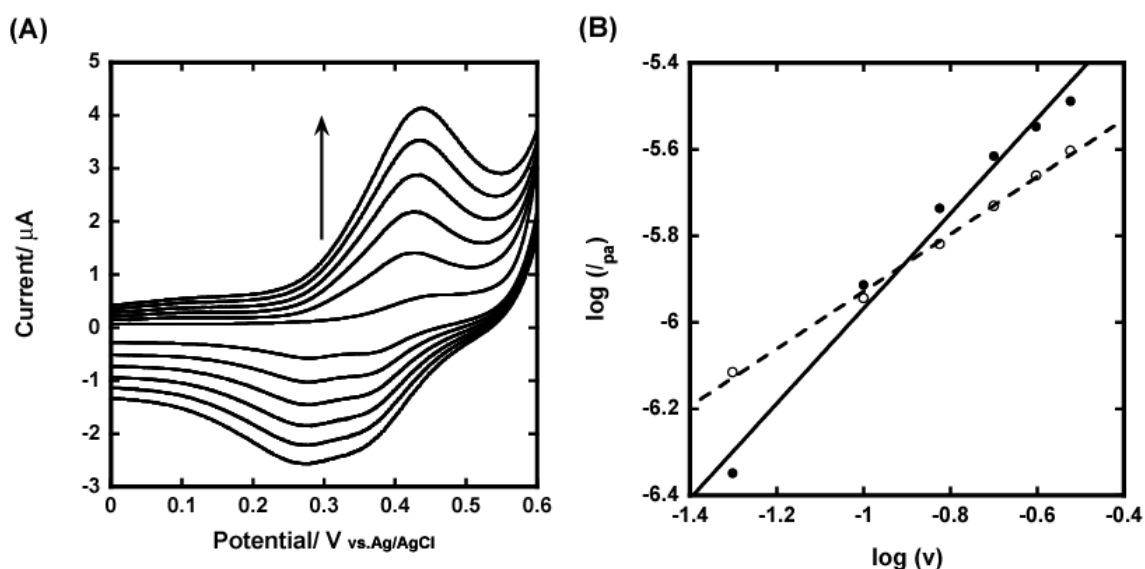


Figure 3-23. (A) 走査速度変化に伴う FNC と Ct-DNA 混合溶液の CV 測定結果. 測定溶液: 50 μM FNC と 2 mM/bp Ct-DNA を含む 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ 溶液, 走査速度: 50 - 300 mV/s, 測定温度: 25 °C である. (B) 走査速度の対数に対する 2 mM Ct-DNA 存在下 (○) 及び非存在下 (●) の 50 μM FNC の酸化ピーク電流値の対数のプロット.

そこで、GC 電極で得られた電流応答が吸着によるものか確かめるために、化合物の吸着を抑えることができるマスキング電極での評価を行うことにした。Figure 3-24 に Ct-DNA 添加に伴う CV 測定の結果、Figure 3-25 に Ct-DNA 存在下、非存在下での FNC の走査速度依存性を示している。GC 電極と同様に評価すると、走査速度依存性において、Ct-DNA 存在下、非存在下どちらも、走査速度の 1/2 乗に対する電流値で比例関係であった。さらには、ピークセパレーション(ΔE_p)においても、非存在下では $\Delta E_p = 78$ mV であり、存在下では $\Delta E_p = 82$ mV であり、拡散系での ΔE_p (= 59 mV)よりも若干高いが、吸着系の挙動ではなく拡散系の挙動であることが明らかとなった。したがって、6-MCH のマスキングにより吸着が抑えられていることが確認され、さらに GC 電極での挙動と比較すると、Ct-DNA 添加に伴い、還元ピーク電流値が大幅に減少していることが明らかとなった。また、GC 電極で起きていた新たな還元ピークも得られなかった。このことから、マスキング電極により FNC の電極への吸着が起こらず、FNC と Ct-DNA との複合体の拡散を認識しているものと考えられる。次に、Ct-DNA 添加における DPV 測定の結果 (Figure 3-26)を基に、金電極の真の表面積で規格化した還元ピーク電流値を Ct-DNA の濃度に対してプロットした (Figure 3-27)。この結果より、Ct-DNA が 25 μ M の時に最大になっていることが明らかとなった。しかしながら、50 μ M から 1 mM で減少し、それ以降一定になった。これは、複合体になったことで拡散係数が減少し、電流値が減少したものと考えられる。したがって、GC 電極では固相表面で FNC と DNA の複合体は吸着した電気化学挙動であり、さらには複合体の吸着を利用することで、均一溶液での検出で必要になる拡散係数を考慮しないでもよい、新たな遺伝子検出法の確立が可能になることが明らかとなった。

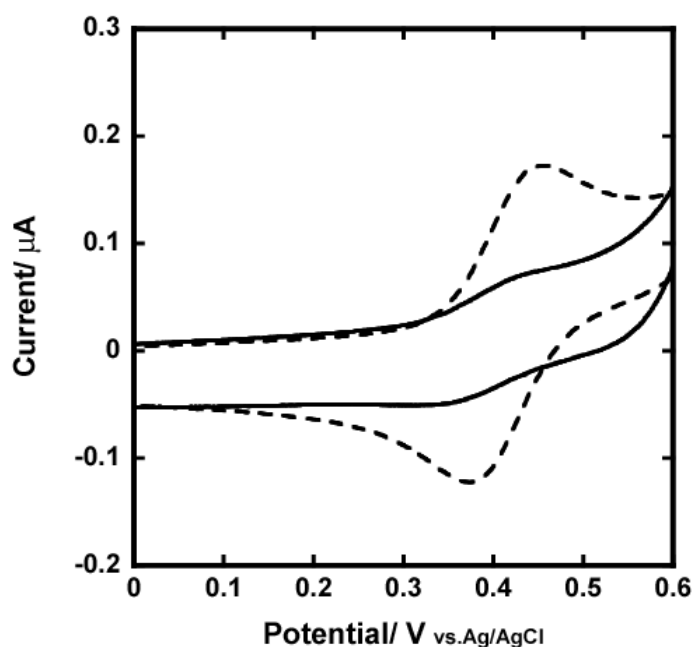


Figure 3-24. 2 mM Ct-DNA 存在下 (実線)及び非存在下 (破線)での 50 μ M FNC の 6-MCH でマスキングした金電極を用いた CV 測定結果. 測定溶液: 100 mM NaClO₄ を含む 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0)溶液, 走査速度: 100 mV/s, 測定温度: 25 .

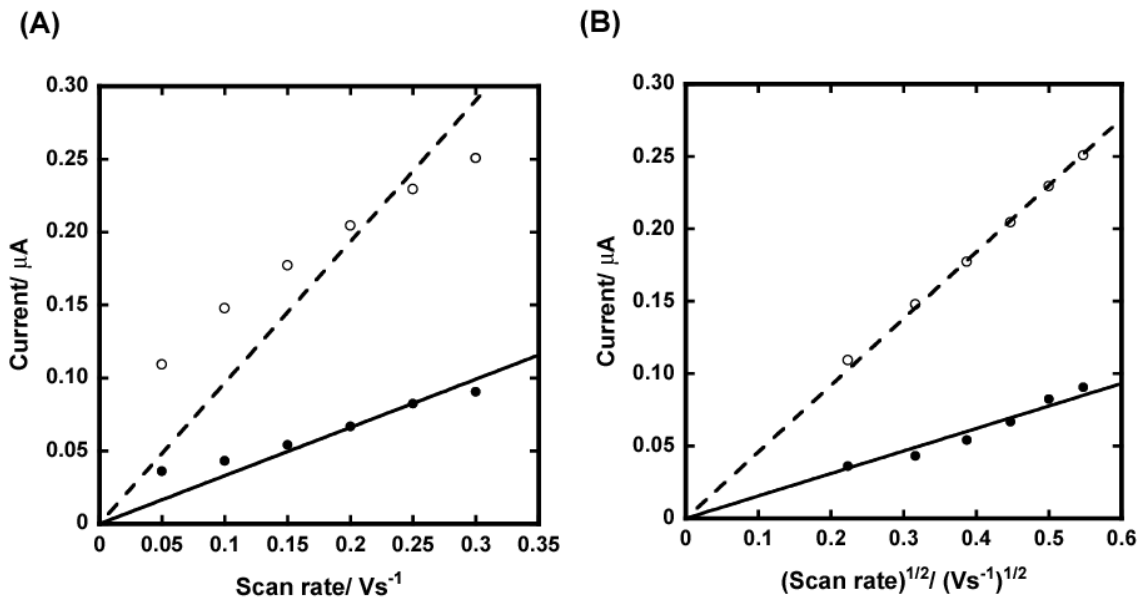


Figure 3-25. (A) 走査速度に対する走査速度の対数に対する 2 mM Ct-DNA 存在下 (○)及び非存在下 (●)での 50 μM FNC 酸化ピーク電流値のプロット, (B) 走査速度の 1/2 乗に対する走査速度の対数に対する 2 mM Ct-DNA 存在下 (○)及び非存在下 (●)での 50 μM FNC 酸化ピーク電流値のプロット.

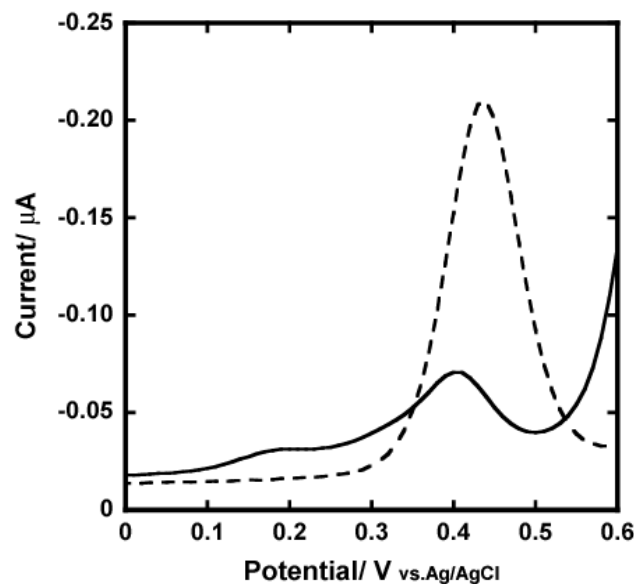


Figure 3-26. 2 mM Ct-DNA 存在下 (実線)及び非存在下 (破線)での 50 μM FNC の 6-MHC でマスキングした金電極を用いた DPV 測定結果. 測定溶液: 100 mM NaClO₄ を含む 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0)溶液, 測定温度: 25 .

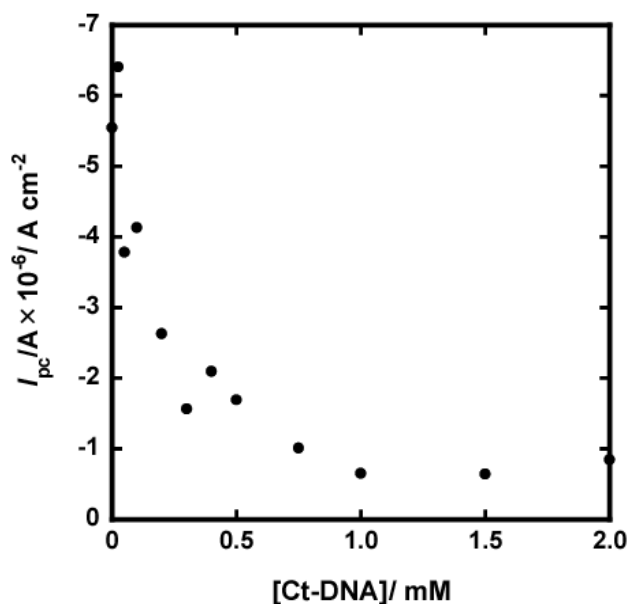


Figure 3-27. 各濃度の Ct-DNA 添加における各還元電位の電流値のプロット.

そこで、この挙動を利用して、DPV 測定を行い、Ct-DNA 検出の定量的な評価が行えるかを評価することにした。Figure 3-28(A)に DPV 測定の結果を示しているが、DPV 測定でも新たな還元ピークが得られた。そこで、Ct-DNA 添加における DPV 測定の結果を評価することにした。初めに各濃度の Ct-DNA 添加における DPV 測定で得られた結果を curve deconvolution (ピーク分離)操作を行った (Figure 3-28(B))。ピーク分離操作を行っていない時の各還元ピーク電流値を Ct-DNA の濃度に対してプロットした (Figure 3-29)。Figure 3-29(A)より、0.44 V 付近の還元ピーク電流値では、Ct-DNA が 50 μM の時に最大になっていることが明らかとなった。しかしながら、50 から 500 μM で減少し、1 mM の時で増加し、それ以降一定になった。それに対して、Figure 3-29(B)より、0.33 V 付近の還元ピークは電流値として得られるのは 300 μM であるが、ボルタモグラムではかすかに 200 μM から観測することができた。また、還元電流値は 1 mM まで増加し、それ以降一定となり、Ct-DNA の検出限界は 300 μM となった。そこで、ピーク分離操作を行って得られた各還元ピーク電流値を Ct-DNA の濃度に対してプロットした (Figure 3-30)。Figure 3-30(A)より、0.42 V 付近の還元ピーク電流値では、Ct-DNA がの濃度が高くなるにつれて、還元電流値は減少していることが観測された。それに対して、Figure 3-30(B)より、0.32 V 付近の還元ピークは 1 mM まで増加し、それ以降一定になった。さらに、Ct-DNA の検出限界は 50 μM となった。このように、ピーク分離操作を行うことで、DNA を定量的に検出することが可能になった。

また、DNA の濃度が増加することで、還元されにくい構造が還元されやすい構造へと変化していることが示された。そこで、DNA を添加するに伴い、異なった還元電位を持つ電流値が得られた原因を解析するために、FNC の濃度の変化に伴う DNA の AFM 測定を行うことにした。

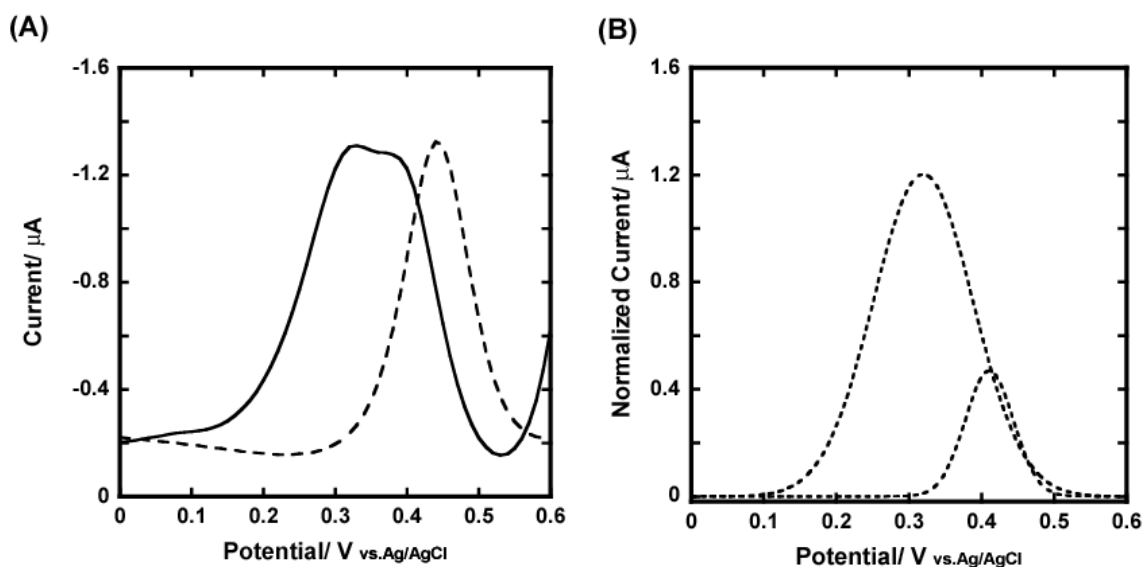


Figure 3-28. (A) 2 mM Ct-DNA 存在下 (実線)及び非存在下 (破線)での 50 μ M FNC の GC 電極 (I. D. = 3.0 mm)を用いた DPV 測定結果. 測定溶液: 100 mM NaClO₄ を含む 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0)溶液, 測定温度: 25 . (B) 50 μ M FNC と 2 mM Ct-DNA 混合溶液の DPV 測定で得られたボルタモグラムをピーク分離した結果.

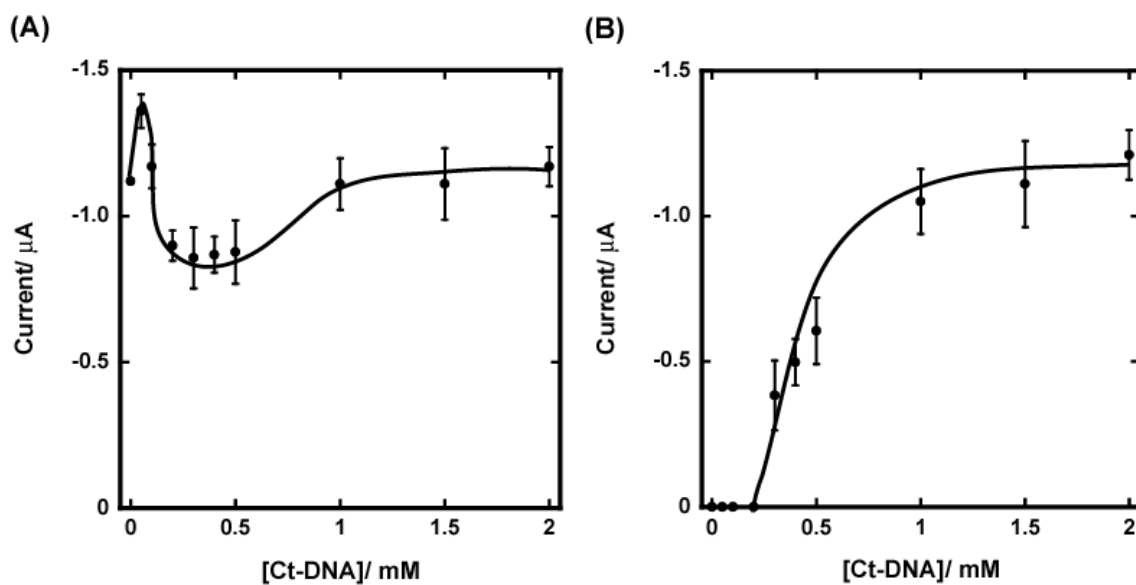


Figure 3-29. DPV 測定結果の Ct-DNA 添加に伴う各電位の還元電流値のプロット. $E_{pc} = 0.42$ V (A), $E_{pc} = 0.32$ V (B).

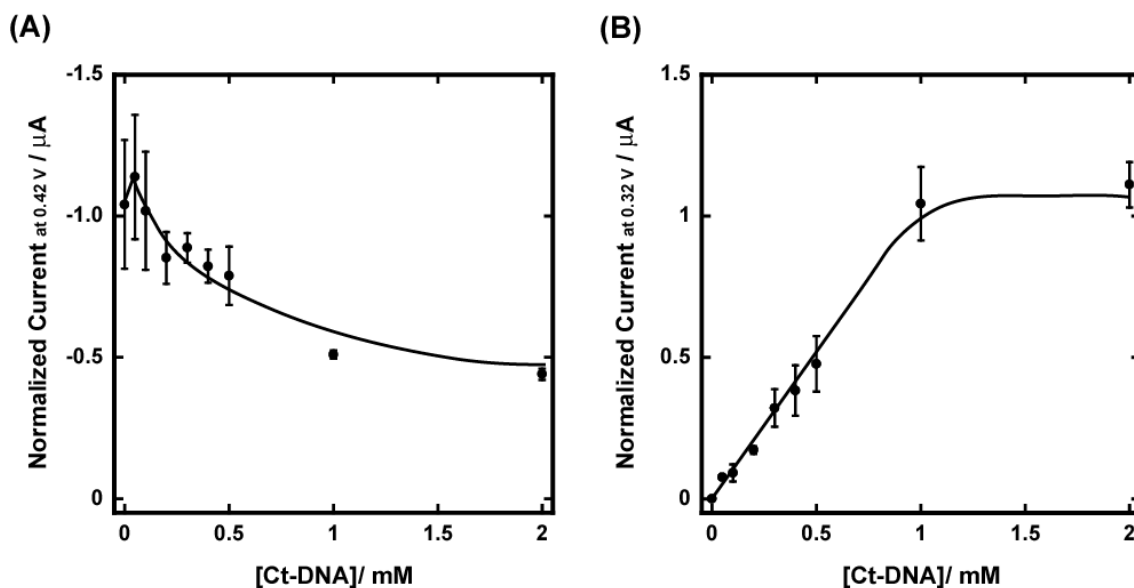


Figure 3-30. DPV 測定結果をピーク分離した際の Ct-DNA 添加に伴う各電位の還元電流値のプロット. $E_{pc} = 0.42 \text{ V}$ (A), $E_{pc} = 0.32 \text{ V}$ (B).

Figure 3-31 に環状 DNA である pUC19 (2686 bp = 913 nm) を制限酵素で切断したサンプルと FNC の複合体とその複合体に Ada-NH₂ を添加した時の AFM 測定結果を示している. Figure 3-31 の(A)と(B)のサンプルを比較すると pUC19 に FNC を添加することで、凝集していることが観測された. したがって、また、(B)から(F)までの結果より、FNC 濃度の割合が高くなるにつれて、pUC19 が凝集されている様子がうかがえる. これより、pUC19 にインターカレート結合する FNC が増加し、結合した FNC の Fc がβ-CD に包接する確率が高くなり、Fc がβ-CD に包接されて架橋して凝集したのではないかと考えられる. そこで、複合体になることで Fc がβ-CD に包接されて架橋して凝集している可能性が考えられるので、Ada-NH₂ を添加することで凝集体が解消されるのではないかと考え、この複合体に Ada-NH₂ を添加することにした. (C), (E), そして(F), あるいは(G), (H), そして(I)を比較すると、pUC19 のみの結果(A)程ではないが、Ada-NH₂ を添加する前 ((C), (E), (F))よりも添加した後 ((G), (H), (I))の方が凝集の解消が観測されていることが明らかとなった. したがって、複合体になることで Fc がβ-CD に包接されて架橋して凝集していることが分かった. したがって、AFM 測定の結果から、「pUC19 は少量の FNC が pUC19 にインターカレート結合すると凝集しやすくなる. さらに FNC の濃度を増やすとともに、インターカレート結合した FNC の Fc がβ-CD に包接されて架橋する確率が高くなり、凝集体が形成される.」ということが明らかになった.

AFM 測定で凝集体を観測することができたので、pUC19 と FNC、さらには Ada-NH₂ の濃度比を同じにしてゲル電気泳動を行うことにした. Figure 3-31 のように構造変化が起こるのなら、バンドのシフトが確認されるものと予想される. Figure 3-32 に 0.6 % アガロースゲル電気泳動の結果を示している. pUC19 は制限酵素で切断しているので直鎖の DNA となっており、早く泳動することができるが、凝集することで、ゲルの網目構造を通りに抜けることが困難になり、泳動が遅くなったものと考

えられる。実際に pUC19 のみと FNC との複合体の結果を比較すると、FNC の濃度が高くなるにつれて、pUC19 のバンドがシフトしていることが明らかとなった。つまり、FNC によって pUC19 が凝集しているものと考えられる。さらに Ada-NH₂ を添加することで、Figure 3-31(G) - (H) のように直鎖の DNA になるので、pUC19 のみのバンド位置になるものと考えた。実際に FNC との複合体の結果よりも若干泳動が早くなったが、期待していた程ではなかった。これは、pUC19 と FNC の複合体に Ada-NH₂ を添加するので、複合体の電荷量が減少し、泳動が遅くなったのではないかと考えられる。しかし、若干ながら早くなっていることから、凝集が解消された構造になっているものと推測される。ゲル電気泳動から AFM 測定で観測された構造変化が pUC19 と FNC が結合し、構造変化をしていることが明らかとなった。

したがって、電気化学測定と AFM 測定の結果を考慮すると、GC 電極に吸着していた構造体に関して、DNA 量が少ない場合では、DNA に対して FNC がインターカレートした量が多く、Fc が β -CD に包接して凝集し、それが電極に吸着した DNA を検出していたものと考えられる。それに対して、DNA 量が増えていくことで、DNA 1 分子に対して結合する FNC の量が減少し、凝集が完全ではなく一部解消され、「Fc が β -CD に包接した構造」と「Fc が β -CD に包接されていない構造」の 2 種類の構造が吸着して得られたのではないかと考えられる。

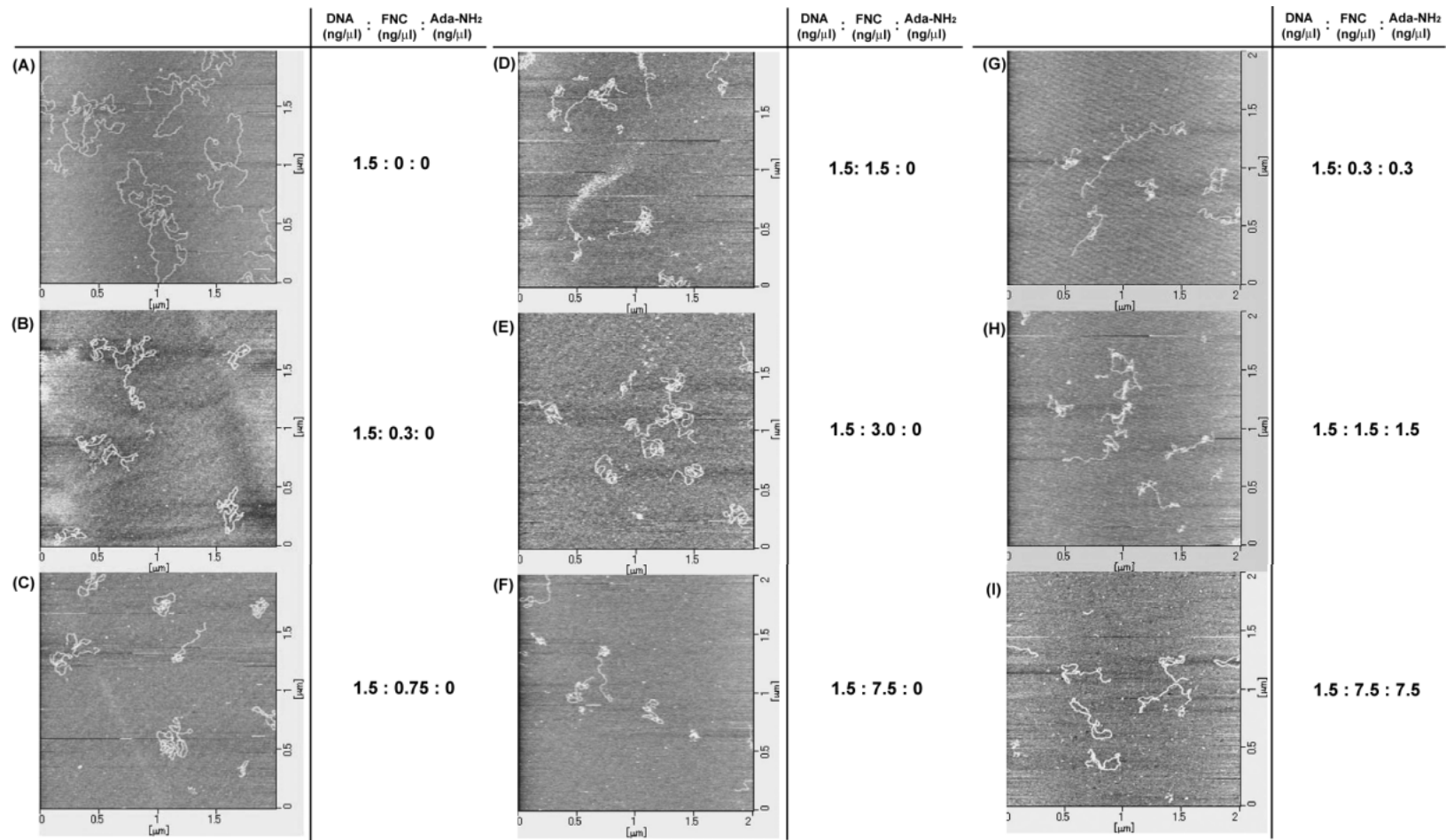


Figure 3-31. マイカ基板上的の直鎖状 pUC19, FNC, そして Ada-NH₂ の濃度比を変化させたサンプルの AFM 測定結果. pUC19 (ng/μl) : FNC (ng/μl) : Ada-NH₂ (ng/μl) = 1.5 : 0 : 0 (A), 1.5 : 0.3 : 0 (B), 1.5 : 0.75 : 0 (C), 1.5 : 1.5 : 0 (D), 1.5 : 3.0 : 0 (E), 1.5 : 7.5 : 0 (F), 1.5 : 0.3 : 0.3 (G), 1.5 : 1.5 (H), 1.5 : 7.5 : 7.5 (I).

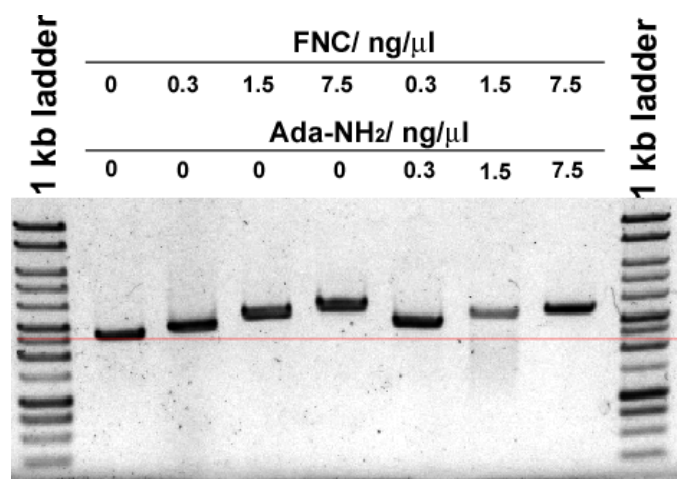


Figure 3-32. pUC19, FNC, そして Ada-NH₂ の濃度比を変化させたサンプルの 0.6 %アガロースゲル電気泳動結果. 泳動条件: 100 V で 30 分, 泳動 buffer: 1 × TAE.

そこで, Ct-DNA 添加に伴う電気化学挙動が, 構造変化にともなった電気化学挙動であるかを評価することにした. ピーク分離操作で得られた新たな還元ピークは Ct-DNA が 50 μM 以降であるが, この条件では新たな還元ピークは本来のピークと重なり, 判別が不可能である. 判別可能な条件を選定する必要がある. ピーク分離操作を行わない DPV 測定結果で新たな還元ピークが得られたのは Ct-DNA が 200 μM 以降であることを述べた. そこで, Ct-DNA が 200 μM の時に Ada-NH₂ を添加することで, 包接している Fc は β-CD から放出し, 酸化還元電位が負側にシフトするのではないかと考えた. Figure 3-33 に各サンプルの CV 測定の結果を示している. この結果より, FNC と Ct-DNA の複合体の酸化ピーク電位は $E_{pa} = 0.45$ V であり, Ada-NH₂ を添加することで $E_{pa} = 0.44$ V となり, 10 mV 負側にシフトしていることが明らかとなった. また, ピーク電流値も Ada-NH₂ を添加することで増加していることが明らかとなった. Figure 3-34 に走査速度の対数に対する各サンプルの走査速度変化させた時に得られた I_{pa} の対数を示している. 3-3-1 の Figure 3-12 と同様な評価を行ったところ, Figure 3-34 で Ada-NH₂ を添加していない状態での傾きが 0.72 であり, 拡散律速に近似でき, 拡散が支配していることが示唆される. したがって, Ct-DNA が 200 μM まで新たな還元ピーク電流値が得られなかったのは, 吸着が支配していないためであると考えられる. それに対して, Ada-NH₂ を添加している状態でも傾きが 0.72 となり, 拡散律速であり, 拡散支配が寄与していることが示唆される. それにも関わらず, 酸化還元電位の負側へのシフトと電流値の増加より, FNC と Ct-DNA 複合体は Fc が β-CD に包接しているものと考えられ, CD スペクトルの結果は妥当である. したがって, 3-3-2 を総括すると, Figure 3-35 に示しているように DNA 量が増加することで架橋している Fc と β-CD が解消されて, 「Fc が β-CD に包接した構造」と「Fc が β-CD に包接されていない構造」の 2 種類の構造を有して, 電極上に吸着しているのではないかと考えられる. さらには, FNC に DNA を添加するとともに, 「Fc が β-CD に包接されていない構造」の量が増え, それが電気化学挙動として現れたものと考えられる. したがって, FNC によって誘起された DNA の構造変化によって識別していることが明らかとなった.

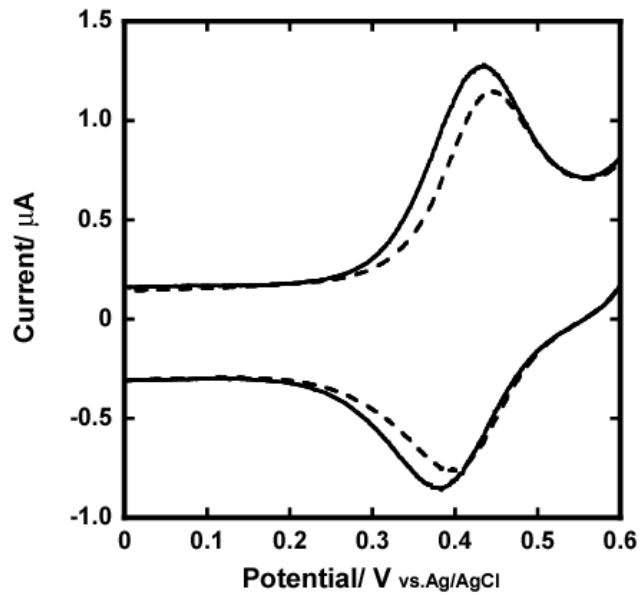


Figure 3-33. 1 mM Ada-NH₂ 存在下 (実線)及び非存在下 (破線)での 50 μM FNC と 200 μM Ct-DNA 混合溶液の GC 電極(I. D. = 3.0 mm)を用いた CV 測定結果. 測定溶液: 100 mM NaClO₄ を含む 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0)溶液, 走査速度: 100 mV/s, 測定温度: 25 .

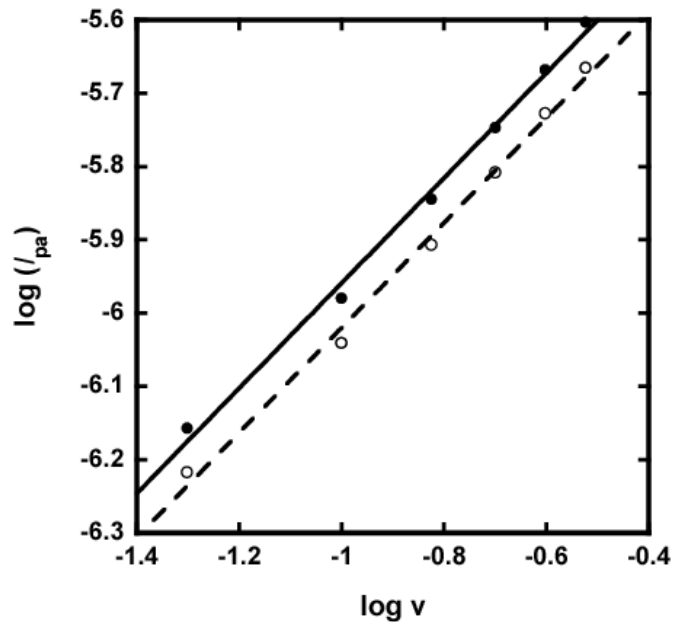


Figure 3-34. 走査速度の対数に対する 1 mM Ada-NH₂ 存在下 (●)及び非存在下 (○)での 50 μM FNC と 200 μM Ct-DNA 混合溶液の酸化ピーク電流値の対数のプロット.

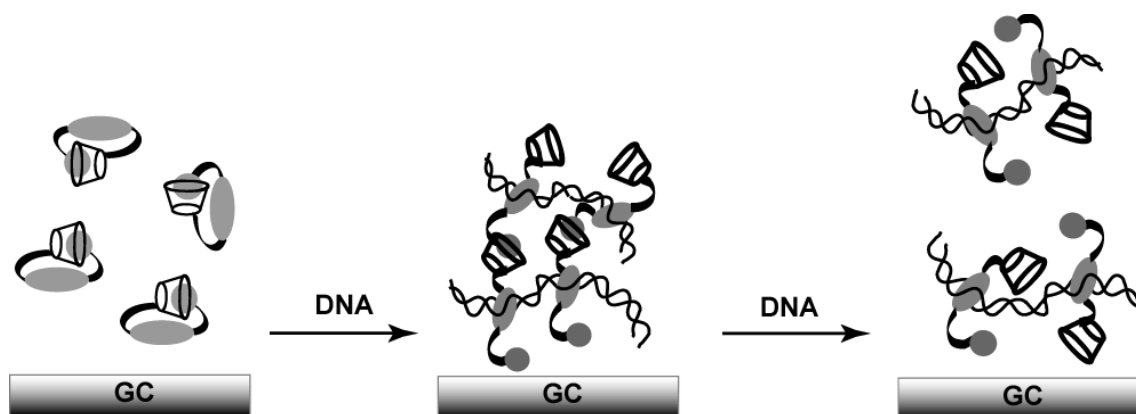


Figure 3-35. FNC と Ct-DNA の複合体の予想される電極上での 2 種類の吸着体 . DNA に比べ FNC の濃度が低い時分子間包接体の形成が期待される .

3-3-4. GC 電極を用いた ssDNA あるいは dsDNA 添加に伴う FNC の電気化学測定

これまでに FNC を用いて DNA の構造変化を誘起させ、電極への吸着により検出が可能であることが明らかとなり、FNC を用いた電気化学的遺伝子検出の確立が期待される。そこで基礎検討として、dsDNA として Ct-DNA、ssDNA として poly dT を用いて電気化学測定を行った。Figure 3-36 に FNC と poly dT 複合体の走査速度の対数に対する酸化ピーク電流値の対数のプロットを、Figure 3-37 に各サンプルの DPV 測定結果を示している。Figure 3-36 より、傾きが 0.5 であることが分かった。前述の Figure 3-23(B)より FNC のみでは傾きは 0.5、FNC と Ct-DNA 複合体では 1 であることを説明した。したがって、FNC のみ、あるいは poly dT 存在下では拡散の挙動を示し、Ct-DNA 存在下では吸着の挙動であることが示された。これは、ssDNA では FNC との結合能が非常に低いため、FNC のみの場合と同じように拡散電流を検出し、電流値の増加は確認できなかった。それに対して、dsDNA の場合では、FNC によって誘起された DNA の凝集体が吸着し、電流値の増加が確認できた。Figure 3-38 に示したように 2 種類の電流値で ssDNA と dsDNA の検出が可能となった。したがって、本系では GC 電極を用いて ssDNA と dsDNA の検出にも適用でき、様々な遺伝子を検出することが可能になるものと考えられる。

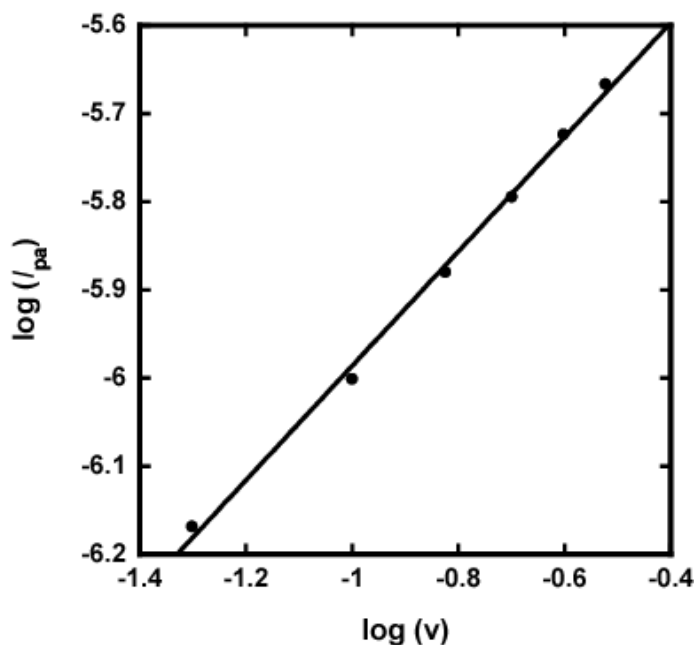


Figure 3-36. 走査速度の対数に対する 2 mM poly dT 存在下での 50 μ M FNC の酸化ピーク電流値の対数のプロット。

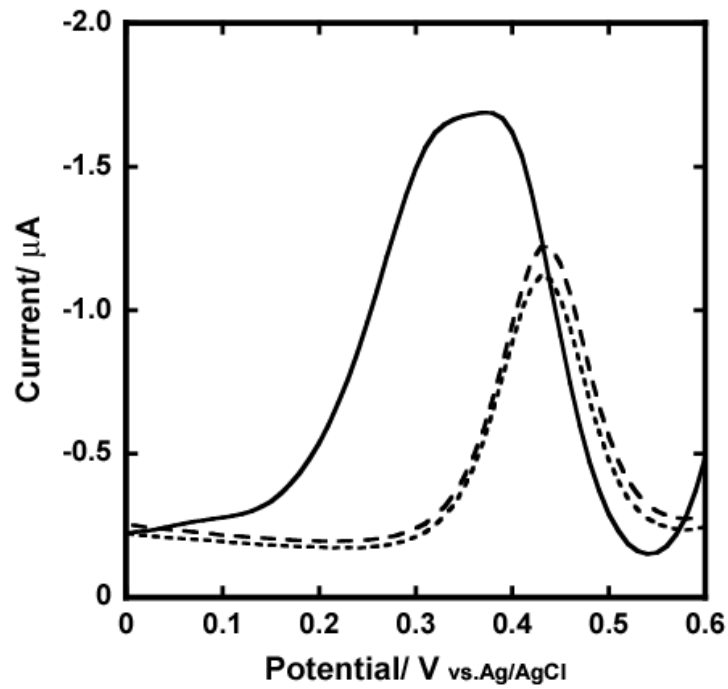


Figure 3-37. 2 mM Ct-DNA 存在下 (実線), 2 mM poly dT 存在下 (破線), そして非存在下 (点線)での 50 μ M FNC の GC 電極 (I. D. = 3.0 mm)を用いた DPV 測定結果. 測定溶液: 100 mM NaClO₄を含む 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0)溶液, 測定温度: 25 .

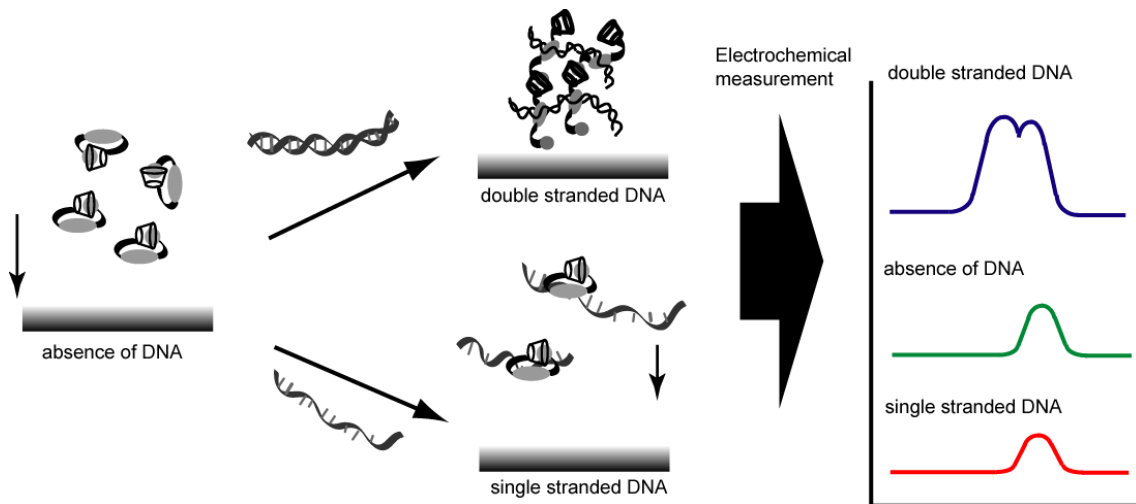


Figure 3-38. FNC を用いた ssDNA と dsDNA の電気化学的検出の概念図.

3-4. 考察

巨大分子である β -CD は、医薬分野、ナノマテリアル分野、バイオ分野など様々な分野で用いられている。これは、 β -CD がゲストを包接するといった特徴を有したものであり、様々な分野への多様性が可能な物質であり、重要な役割を果たしている。そこで、著者はこのことに着目し、 β -CD を導入した新規フェロセン化ナフタレンジイミドを用いた簡便な遺伝子検出法の確立を目的とした。

本章では、FNC を用いて電気化学的遺伝子検出を試みた。過去に、Liu ら¹⁴⁾によって、 β -CD を含むルテニウム錯体が plasmid DNA にインターカレートして凝集することを報告している。このことを考慮に入れると、AFM 画像から FNC が DNA にインターカレートすることで凝集が観測され、さらには Ada-NH₂ を加えることで凝集が解消している様子を観測することに成功した。これを基に DNA を存在下と非存在下における電気化学測定を行ったところ、新たな電流値が得られた。電気化学の結果と AFM 測定の結果を合わせると、吸着した構造の違いを認識したものであることが明らかとなった。さらには、新たな電流値で評価することで、「電流値増加」型で定量的な評価が可能になるものと考えられる。近年、 β -CD を用いた遺伝子検出が行われてきた。Fujimoto ら²⁴⁾によって、オリゴヌクレオチドの両末端に β -CD とピレンを修飾し、ゲスト分子を添加して 2 本鎖を形成することにより、excimer 発光をすることや Kuzuya ら²⁵⁾によって、それぞれのオリゴヌクレオチドに β -CD と蛍光色素を導入し、2 本鎖を形成することによって β -CD に蛍光色素が包接されて発光をすることを報告している。さらには、Ihara ら²⁶⁾によって、 β -CD を導入したオリゴヌクレオチドとグアニンと水素結合する置換基を導入した場合感受性蛍光色素であるダンシルを用いて single nucleotide polymorphism (SNP)を蛍光検出により成功した。このように、 β -CD を用いた蛍光による均一溶液中の検出が行われている。 β -CD が包接するのは蛍光色素だけではなく、電気活性種であるフェロセンも包接することができる。Sato らによって、 β -CD にフェロセンを導入したフェロセン化 β -CD とアダマンタンを有するナフタレンジイミドを用いて、高感度の電気化学的遺伝子検出を達成し²⁷⁾、さらには FND と β -CD を用いて、高精度な電気化学的遺伝子検出を達成している²⁸⁾。これらの検出は DNA 固定化電極を用いたハイブリダイゼーション法による検出である。したがって、著者が行った本系では、電極を浸して生じる FNC と DNA の複合体の吸着を、DNA の構造変化に伴って電気化学的遺伝子検出を達成することができたのは初めての例である。さらには、このように DNA 固定化電極ではなく、電気化学的に検出を達成できたのは非常に有用で意義がある。

しかしながら、迅速に検出でき、DNA を添加するに伴い定量的な検出は可能であるが、非常に濃い濃度のサンプルで行わなければならない、検出限界が μ M オーダーと非常に高く、感度が低いことが問題である。しかし、著者は電極の面積が非常に小さい微小電極を用いて FNC の濃度を低くすることにより、検出限界が低くなり、高感度な検出が可能になるものと考えている。

3-5. 結言

本章では、FNC を合成し、これを用いて電気化学的 DNA 検出を試みてきた。初めに、FNC の合成では、巨大分子である β -CD の反応効率が低いので、これを解決する方法として Huisgen 環化反応を利用した。この方法により、非常に簡便で迅速に反応が進行し、高純度の FNC を合成することに成功した。開発した FNC を分光光度計による測定と電気化学的測定により評価したところ、FNC は水溶液中では Fe が β -CD に包接していることが明らかとなった。次に、開発した FNC を用いて、DNA との相互作用解析を行った。吸収スペクトル、CD スペクトル、Topoisomerase I assay、Stopped-flow 測定より、DNA との結合能は低く、さらには速度論的にも非常に遅いことが明らかとなった。しかしながら、CD スペクトルより、DNA に結合することで FNC の Fe が β -CD に包接しているといった新たな知見が得られた。このように、DNA の存在下と非存在下で、FNC の構造は変化することが明らかとなった。

そこで、DNA 存在下と非存在下で、電気化学測定を行った。DNA 存在下での FNC の電気化学測定では、新たな還元電流値の出現が観測された。この現象を、AFM 測定によって評価したところ、DNA 存在下では凝集が観測され、Ada-NH₂ を加えることで凝集が緩和されている様子が観測された。したがって、AFM 測定による解析から、電気化学的に得られた新たな還元電流値は、FNC によって誘起された DNA の高次構造の変化に伴い、2 種類の構造が電極へ吸着して生じた結果であることが明らかとなり、新たな還元電流値によって DNA の定量的な評価も可能になることが示された。さらには、1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA の識別も FNC を用いて電気化学的に達成することができた。このように、FNC によって DNA の高次構造の変化を誘起させ、電気化学的に有意な差が得られることが明らかとなり、FNC は固定化電極を用いた検出系に変わりうる手法を確立することができる有用な試薬であることが示された。

3-6. 参考文献

- 1) T. Matsue, D. H. Evans, T. Osa, N. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3411-3417 (1985).
- 2) S. R. McAlpine, M. A. Garcia-Garibay, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2750-2751 (1996).
- 3) S. Y. Yang, M. M. Green, G. Schultz, S. K. Jha, A. H. E. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 12404-12405 (1997).
- 4) T. Hoshimoto, M. Miyauchi, Y. Kawaguchi, H. Yamaguchi, A. Harada, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 9876-9877 (2000).
- 5) X. Zhang, W. M. Nau, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 544-547 (2000).
- 6) J. W. Park, S. Y. Lee, H. J. Song, K. K. Park, *J. Org. Chem.*, **70**, 9505-9513 (2005).
- 7) P. Venter, A. F. Kotzé, R. Auzély-Velty, M. Rinaudo, *Int. J. Pharm.*, **313**, 36-42 (2006).
- 8) C. Danel, N. Azaroual, C. Foulon, J.-F. Goossens, G. Vermeersch, J.-P. Bonte, C. Vaccher, *Tetrahedron Asymmetry*, **17**, 975-983 (2006).
- 9) C. Yan, X. Li, Z. Xiu, C. Hao, *J. Mol. Struct.*, **764**, 95-100 (2006).
- 10) P. Walla, V. B. Arion, U. H. Brinker, *J. Org. Chem.*, **71**, 3274-3277 (2006).
- 11) J. M. Casas-Solvas, E. Ortiz-Salmerón, J. J. Giménez-Martínez, L. García-Fuentes, L. F. Capitán-Vallvey, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, *Chem. Eur. J.*, **15**, 710-725 (2009).
- 12) J. M. Casas-Solvas, E. Ortiz-Salmerón, I. Fernández, L. García-Fuentes, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, *Chem. Eur. J.*, **15**, 8146-8162 (2009).
- 13) R. Freeman, T. FINDER, L. Bahshi, I. Willner, *Nano Lett.*, **9**, 2073-2076 (2009).
- 14) Y. Liu, Y. Chen, Z.-Y. Duan, X.-Z. Feng, S. Hou, C. Wang, R. Wang, *ACS Nano*, **1**, 313-318 (2007).
- 15) C. Park, M. S. Im, S. Lee, J. Lim, C. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 9922-9926 (2008).

- 16) T. Ogishi, M. Hashizume, T. Yamagishi, Y. Nakamoto, *Langmuir*, **26**, 3169-3173 (2010).
- 17) T. Cerchiara, B. Luppi, F. Bigucci, V. Zecchi, *Int. J. Pharm.*, **258**, 209-215 (2003).
- 18) J. L. Manzoori, M. Amjadi, *Spectrochim. Acta A*, **59**, 909-916 (2006).
- 19) A. Banerjee, P. K. Sengupta, *Chem. Phys. Lett.*, **424**, 379-386 (2006).
- 20) H. L. Ramirez, A. Valdivia, R. Cao, J. J. Torres-Labandeira, A. Fragoso, R. Villalonga, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 1499-1501 (2006).
- 21) N. Jessel, M. Oulad-Abdelghani, F. Meyer, P. Lavalley, Y. Haïkel, P. Schaaf, J.-C. Voegel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 8618-8621 (2006).
- 22) X. Zhang, K. K. Sharma, M. Boeglin, J. Ogier, D. Mainard, J.-C. Voegel, Y. Mély, N. Benkirane-Jessel, *Nano Lett.*, **8**, 2432-2436 (2008).
- 23) S. Srinivasachari, K. M. Fichter, T. M. Reineke, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4618-4627 (2008).
- 24) K. Fujimoto, Y. Muto, M. Inouye, *Bioconjugate Chem.*, **19**, 1132-1134 (2008).
- 25) A. Kuzuya, T. Ohnishi, T. Wasano, S. Nagaoka, J. Sumaoka, T. Ihara, A. Jyo, M. Komiyama, *Bioconjugate Chem.*, **20**, 1643-1649 (2009).
- 26) T. Ihara, A. Uemura, A. Futamura, M. Shimizu, N. Baba, S. Nishizawa, N. Teramae, A. Jyo, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 1386-1387 (2009).
- 27) S. Sato, T. Nojima, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, **689**, 4722-4728 (2004).
- 28) S. Sato, T. Nojima, M. Waki, S. Takenaka, *Molecules*, **10**, 693-707 (2005).
- 29) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2596-2599 (2002).
- 30) K. Takahashi, K. Hattori, F. Toda, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 3331-3334 (1984).

- 31) W. Tang, S. C. Ng, *Nat. Protoc.*, **3**, 691-697 (2008).
- 32) S. Onozuka, M. Kojima, K. Hattori, F. Toda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53**, 3221-3224 (1980).
- 33) I. W. Muderawan, T. T. Ong, T. C. Lee, D. J. Young, C. B. Ching, S. C. Ng, *Tetrahedron Lett.*, **46**, 7905-7907 (2005).
- 34) D. E. Bublitz, *J. Organomet. Chem.*, **23**, 225-228 (1970).
- 35) L. Xin-hong, C. Yuan-yin, *Wuhan Univ. J. Natural Sciences*, **5**, 348-350 (2000).
- 36) Y. Xiao, R. Y. Lai, K. W. Plaxco, *Nat. Protoc.*, **2**, 2875-2880 (2007).
- 37) S. Sato, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, **693**, 1177-1185 (2008).
- 38) A. Harada, S. Takahashi, *J. Incl. Phenom.*, **2**, 791 (1984).
- 39) F.A. Tanious, S.-F. Yen, W.D. Wilson, *Biochemistry*, **30**, 1813-1819 (1991).
- 40) S.-F. Yen, E. J. Gabbay, W.D. Wilson, *Biochemistry*, **21**, 2070-2076 (1982).
- 41) Z.-R. Liu, K. H. Hecker, R. L. Rill, *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **14**, 331-339 (1996).
- 42) R. E. McKnight, A. B. Gleason, A. Keyes, S. Sahabi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 1013-1017 (2007).
- 43) J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.*, **86**, 469-489 (1974).

第 4 章

フェロセンをトリアゾールで連結させた

ナフタレンジイミド (FNF)を用いた電気化学的 DNA 検出

4-1. 緒言

DNA チップや DNA マイクロアレイは、ハイブリダイゼーション法によって遺伝子の検出が行われているが¹⁻⁹⁾、電気化学的遺伝子検出においても同様である。これまでは、サンプル DNA に電気活性種を導入する手間のかかる手法が行われてきた。このような問題を解決したのが、Figure 4-1 に示しているように DNA を電極に固定化し、ターゲット DNA をハイブリダイゼーションさせ、電気活性 DNA リガンドを作用させて電気化学測定を行う方法である¹⁰⁻¹²⁾。この手法が確立されたことで、様々な遺伝子の電気化学的検出が成功された¹³⁻¹⁷⁾。さらには、DNA チップや DNA マイクロアレイで行われている解析が、DNA 固定化電極を用いた電気化学的検出で試みられている。マルチ電極を DNA チップとして利用された ECA チップを用いて、リポタンパクリパーゼ (LPL) 遺伝子の一塩基多型 (SNP) に成功されており、次世代の DNA チップとして期待されている¹⁸⁾。

しかし、これまでの電気化学的検出は、DNA プローブ固定化電極の作成が必要であった。第 3 章でも論じたが、この固定化操作をしなければ、非常に簡便でユーザーにも安心して使用が可能になるものと期待される。このような背景を基に、従来の電気化学的遺伝子検出よりもさらなる簡便な検出法を確立することを目的とし、第 3 章で FNC を用いた均一溶液中での電気化学的遺伝子検出の確立を述べた。本章では、第 3 章での FNC を用いた電気化学的遺伝子検出のコントロール実験の試薬として、FNC の β -CD を Fc に変えた新規ナフタレンジイミド (FNF) を設計し、合成した (Figure 4-2)。FNF は従来の FND のリンカー部位にトリアゾール基を導入した化合物であるので、DNA との相互作用は類似しているものと期待される。しかし、第 3 章の Figure 3-11 に示したようにグラッシーカーボン (GC) 電極を利用した場合には、フェロセンを 1 つしか持たない FNC に比べ、それ単独では低い電流値しか示さなかった。もし、DNA 結合によって電流値が増加すれば、FNF によっても均一溶液中での電気化学的検出が可能になると期待される。そこで、開発した FNF を用いて、DNA との相互作用解析を行い、Figure 4-3 に示しているように FNC と同様な電気化学的 DNA 検出を試みた。その結果、興味深いことに DNA 結合 FNF がそれ単独に比べ電流値が増大することが明らかとなった。そこで、DNA 修飾電極を用いらずに FNF は臨床検出に応用が可能であるか評価するために PCR 産物を用いて同様な検出を試みた。

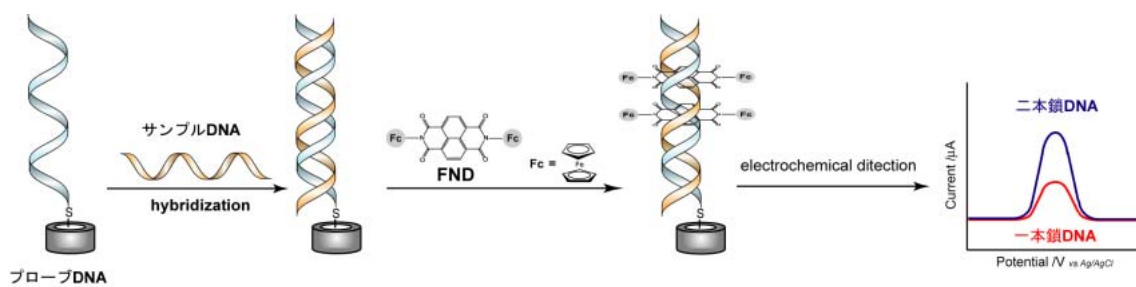


Figure 4-1. 電気活性 DNA リガンドである FND を利用した電気化学的遺伝子検出の概念図.

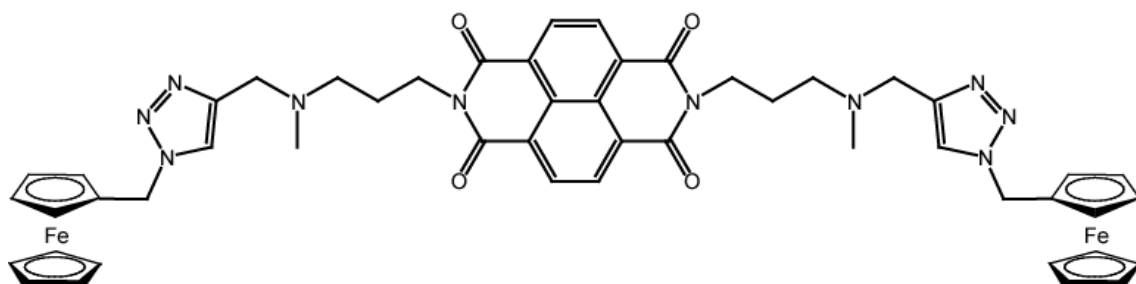


Figure 4-2. トリアゾール基を通してフェロセンが連結されたナフタレンジイミド FNF の構造式.

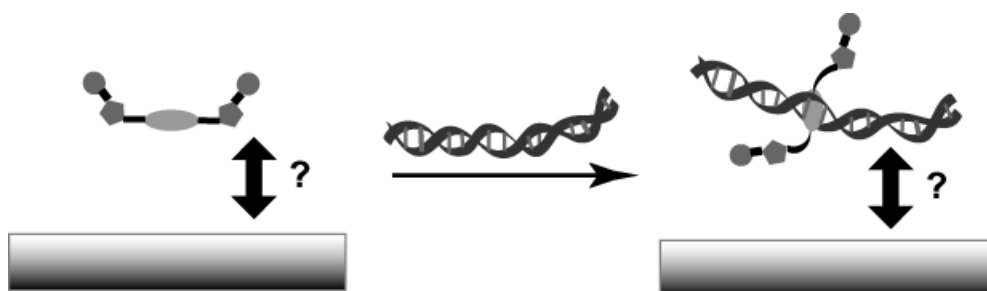
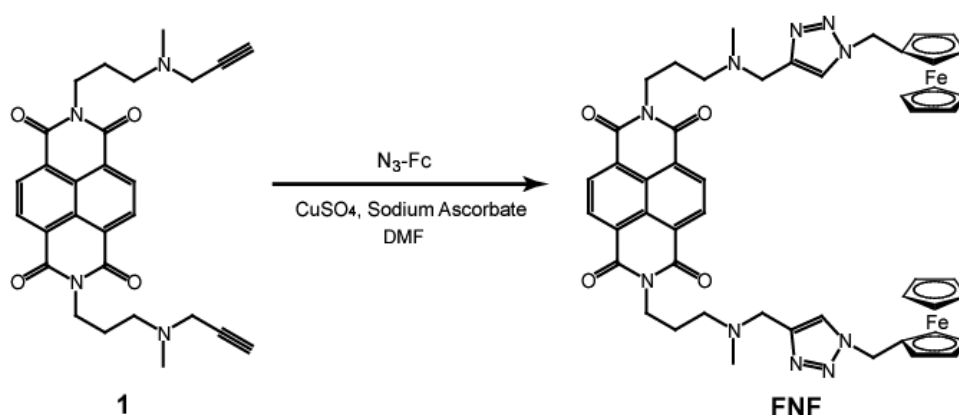


Figure 4-3. DNA 非存在下又は存在下における FNF のグラッシーカーボン (GC)電極への期待される相互作用.

4-2. 実験

4-2-1. N,N'-Bis-[3-(Ferrocenylmethyltriazolylmethyl)methylaminopropyl]naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (FNF)の合成

下記のスキームに従い、フェロセンを Huisgen 環化反応によって、新規フェロセン化ナフタレンジイミド (FNF)の合成を行った。Ferrocenylmethylazido (N_3 -Fc)の合成は第3章の3-2-1-2を参照して合成を行い、N,N'-Bis[3-(3-propargyl)methylaminopropyl]naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide までの合成に関しては、第3章の3-2-1-2と3-2-1-3を参照して合成を行い、得られた化合物を用いて、N,N'-Bis-[3-(Ferrocenylmethyltriazolylmethyl)methylaminopropyl]naphthalene-1, 4, 5, 8-tetracarboxylic acid diimide (FNF)の合成を行った。



Scheme 4-1

化合物 **1** 0.024 g (0.050 mmol), N_3 -Fc 0.024 g (0.10 mmol), をジメチルホルムアミド(DMF) 4 ml に溶かし, この溶液に 1 M $CuSO_4$ 50 μ l (0.050 mmol)と 1 M アスコルビン酸ナトリウム水溶液 200 μ l (0.2 mmol)を加えた。調製したサンプルを室温で 48 時間, 攪拌させた。その後, DMF を減圧留去し, 得られた生成物に $CHCl_3$ 30 ml 加えて溶かし, 飽和 $NaHCO_3$ 溶液を 30 ml 加えて洗浄した。この洗浄操作 4 回繰り返した。その後, 有機相を硫酸ナトリウムで 3 日乾燥した。硫酸ナトリウムをろ過した後, 有機相を減圧留去し, 5 時間減圧乾燥を行ったところ, 黒緑色の粘性固体を得た。逆相 HPLC で確認したところ, 単一な成分であったので, 高純度の精製物を得た。精製物の確認の際の逆相 HPLC の測定条件に関して, カラムは Inertsil ODN-3 を用い, 検出波長は 383 nm で行った。グラジエント条件に関して, 0.1 % TFA 溶液で 70 %アセトニトリル溶液を 10 %から 100 % まで 30 分かけて直線的に流した。得られた精製物を 1H -NMR, MALDI-TOF-MS 測定により同定を行った。収量 0.045 g (0.047 mmol), 収率 93 %。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.97 (4H, m, J = 7.2 Hz), 2.27 (6H, s), 2.58 (4H, t, J = 7.0 Hz), 3.65 (4H, s), 3.39 (4H, s), 4.20 (22H, m), 5.27 (4H, s), 7.27 (2H, s), 8.75 (4H, s) ppm。MALDI-TOF-MS (positive mode, α -CHCA): m/z = 965.41 (理論値 $C_{50}H_{50}Fe_2N_{10}O_4 + H^+ = 967.49$)。

4-2-2. FNF と 2 本鎖 DNA との相互作用解析

4-2-2-1. Ct-DNA の添加に伴う FNF の吸収スペクトル変化による結合能評価

8.04 μM FNF を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液を調製し (全量 3000 μl), UV-Vis 測定を行った。その後, 3 mM/bp Ct-DNA を添加し, 1 分攪拌し, 1 分静置した後, UV-Vis 測定を行い, 吸光度変化が飽和に達するまでこの操作を繰り返した。測定温度は 25 で行った。

4-2-2-2. FNF の添加に伴う Ct-DNA の CD スペクトル測定

100 μM /bp Ct-DNA を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液を調製し (全量 3000 μl), CD 測定を行った。その後, 201 μM FNF を各濃度 (1.02, 2.05, 3.08, 4.10, 5.13, 7.69, 10.26, 12.81, 15.38, そして 17.95 μM) になるように添加し, CD 測定を行った。測定条件は, 走査速度 50 nm/min, レスポンス 2 sec, データ間隔 0.1 nm, 感度 100 mdeg, バンド幅 2 mm, 積算回数 4 回, 測定温度は 25 で行った。

4-2-2-3. FNF の添加に伴うプラスミド DNA の Topoisomerase I assay

plasmid DNA として pUC19 (2686 bp) 0.25 μg を含む 0.1 % BSA, 1 \times Reaction buffer (1 \times Reaction buffer の組成: 35 mM Tris-HCl (pH8.0), 72 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 5 mM スペルミジン), 5 U Topoisomerase I 溶液を調製し, 37 で 5 分間インキュベートした。その後, FNF を各最終濃度 (11, 22, 33, 44, 55, 66, 77, そして 88 μM) になるように 1 μl ずつ加えて調製し, 37 で 1 時間インキュベートした。酵素反応後, 10 % SDS 2 μl , 20 mg/ml proteinase K 0.5 μl 加えて 37 でさらに 15 分間インキュベートし, 酵素反応停止を行った。インキュベート後, 1 \times TE を 100 μl ずつ加え, さらにフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1 を 100 μl 加えて 1 分間攪拌, 遠心し, フェノール相を取り除いた。この操作を 3 回繰り返した。その後, クロロホルム : イソアミルアルコール = 24 : 1 を 100 μl 加えて 1 分間攪拌し, 遠心した後, 有機相を取り除いた。この操作を 3 回繰り返した。その後, 1 % アガロースゲルにより 1 \times TAE 中で 18V, 3.5 時間泳動を行った。3.5 時間後, 1 \times TAE 100 ml に Gelstar 5 μl を加え, 30 分間染色を行った。

4-2-2-4. Stopped-flow 測定による Ct-DNA と FNF の速度論解析

4-2-2-4-1. 会合速度定数の評価

5.1, 7.7, 10.2, 12.8, そして 15.4 μM FNF を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液 (全量 3000 μl) と 50, 75, 100, 125, そして 150 μM /bp Ct-DNA を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液を調製し (全量 3000 μl), FNF 溶液と Ct-DNA 溶液を混ぜたときの 383 nm の吸光度変化の測定を Stopped-flow 分光光度計を用いて行った。測定温度は 25 で行った。

4-2-2-4-2. 解離速度定数の評価

4.3 μM FNF と 50 $\mu\text{M}/\text{bp}$ Ct-DNA を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液(全量 3000 μl)と 1% SDS を含む 100 mM NaCl, 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液(全量 3000 μl)を調製し, FNF と Ct-DNA の複合体溶液と SDS 溶液を混ぜたときの 383 nm の吸光度変化の測定を Stopped-flow 分光光度計を用いて行った. 測定温度は 25 で行った.

4-2-3. DNA 添加に伴う FNF の電気化学測定

4-2-3-1. グラッシーカーボン (GC)電極を用いた電気化学測定

内径 3.0 mm の GC 電極を 0.05 μm アルミナスラリーで 60 分間物理研磨し, その後 15 分間 (5 分 \times 3)超音波洗浄を行った. 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0), 100 mM NaClO_4 を含んだ 50 μM FNF 溶液 (全量 300 μl)に電極を浸し, CV と DPV 測定を行った. その後, 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0), 100 mM NaClO_4 を含んだ 59 μM FNF 溶液に 1 mM/bp Ct-DNA を所定濃度 (0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.75, 0.10, 0.15, そして 0.20 mM)添加したサンプル(全量 300 μl)を調製し, CV と DPV 測定を行った. CV 測定条件は走査範囲: 0 - 0.6 V, DPV 測定条件は走査範囲: 0 から 0.6 V に走査, Amplitude: 0.05 V, Pulse Width: 0.05 s, Sample Width: 0.005s, Pulse Period: 0.2 s である. 測定温度は 25 である.

4-2-3-2. マスキング電極を用いた電気化学測定

直径 1.6 mm の金電極 (面積 0.020 cm^2)の物理研磨を以下の手順で行った (6 μm ダイヤモンドスラリーで 30 分研磨, MilliQ 水で洗浄, 1 μm ダイヤモンドスラリーで 30 分研磨, MilliQ 水で洗浄, 0.05 μm アルミナスラリーで 30 分研磨). MilliQ 水に浸し, 5 分間超音波照射, MilliQ 水を変えて合計 3 回行った. 次に, 参考文献¹⁹⁾の手法に従って, 以下の手順で電解研磨を行った (0.5 M NaOH 溶液に浸し, 走査速度 2 V/s で -0.35 から -1.35 V (vs. Ag/AgCl)の範囲でボルタモグラムが一定になるまで 1000 から 2000 回 CV 測定を繰り返す. MilliQ で水洗後, 0.5 M H_2SO_4 溶液に浸し, 2V で 5s の酸化を行い, -0.35 V, 10s の還元を行った後, 走査速度 4 V/s で -0.35 から 1.5 V (vs. Ag/AgCl)で 40 回 CV 測定を繰り返す). MilliQ 水に浸し, 1 分間超音波照射, MilliQ 水を変えて合計 3 回行った. この時の真の表面積は 0.033 cm^2 であった. MilliQ 水で洗浄後, 1 mM 6-MCH 水溶液 100 μl に浸して 45 $^\circ\text{C}$ で 1 時間インキュベートした後, MilliQ 水で洗浄することによりマスキング電極を調整した. 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0), 100 mM NaClO_4 を含んだ 59 μM FNF 溶液(全量 300 μl)にマスキング電極を浸し, CV と DPV 測定を行った. その後, 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0), 100 mM NaClO_4 を含んだ 59 μM FNF 溶液に 1 mM/bp Ct-DNA を所定濃度 (0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.75, 0.10, 0.15, そして 0.20 mM)添加したサンプル (全量 300 μl)を調製し, CV と DPV 測定を行った. CV 測定条件は走査範囲: 0 - 0.6 V, DPV 測定条件は走査範囲: 0 から 0.6 V に走査, Amplitude: 0.05 V, Pulse Width: 0.05 s, Sample Width: 0.005s, Pulse Period: 0.2 s である. 測定温度は 25 で行った.

4-2-4. GC 電極を用いた 1 本鎖 DNA (ssDNA)あるいは 2 本鎖 DNA (dsDNA)添加に伴う FNF の電気化学測定

内径 3.0 mm の GC 電極を 0.05 μm アルミナスラリーで 60 分間物理研磨し, その後 15 分間(5 分 × 3)超音波洗浄を行った. 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ を含んだ 50 μM FNF 溶液 (全量 300 μl)に電極を浸し, CV と DPV 測定を行った. その後, 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ を含んだ 59 μM FNF 溶液に 100 μM/bp Ct-DNA あるいは 100 μM poly dT を含んだサンプル (全量 300 μl)を調製し, CV と DPV 測定を行った. CV 測定条件は走査範囲: 0 - 0.6 V, DPV 測定条件は走査範囲: 0 から 0.6 V に走査, Amplitude: 0.05 V, Pulse Width: 0.05 s, Sample Width: 0.005s, Pulse Period: 0.2 s である. 測定温度は 25 °C で行った.

4-2-5. GC 電極を用いた 1 本鎖 PCR 産物の部分ハイブリダイゼーションサンプルの電気化学的検出

4-2-5-1. 1 本鎖 PCR 産物の調製

用いた配列は Table 3-1 に示している. Zymotag 溶液, 0.04 nM 鋳型 DNA, 0.4 μM Forward primer, 0.4 μM Reverse primer を含み PCR 溶液 (全量 100 μl)を調製し, 以下の PCR 条件で PCR を行った. PCR の条件は, 94 °C で 10 分間熱変性を行い, 次に 94 °C で 1 分間熱変性, 62 °C で 1 分間アニーリング, 72 °C で 1 分間伸長反応のサイクルを 35 回行い, 最後に 72 °C で 10 分間伸長反応を行った. PCR 反応を行った後, QIAquick PCR purification Kit を用いて, 精製を行った. 次に, 増幅した PCR 産物, 10 U/100 μl Lambda exonuclease, 1 × Reaction buffer を含む酵素反応溶液 (100 μl)を調製し, 以下の反応条件で酵素反応を行った. 酵素反応条件は, 37 °C で 60 分間酵素反応を行い, 80 °C で 10 分間酵素反応の停止を行った. 酵素反応後, QIAquick PCR purification Kit を用いて, 精製を行った.

Table 4-1. PCR に用いたオリゴヌクレオチドの配列.

配列	
鋳型 DNA	5'-GTAGGGAGGTATTTCTGGGAGGTTTCGCGTGTTCGTTTAGGGAGTAAT GCGTTTTCTGGGTCGTTTTTAGTCGCGTTTACGCGTTTTCTGTTTTTTTTT TTACGTTCTGGTATTCGTGGTGTTCGGAGTTCGAC-3' (131 mer)
Forward-primer	5'-PO ₃ ²⁻ -GAG GTA TTT CGG GAC CTT TCG C-3' (22 mer)
Reverse-primer	5'-ACT CCG AAC ACC ACG AAT ACC G-3' (22 mer)

下線部は primer として用いた領域を示す.

4-2-5-2.1 本鎖 PCR 産物の部分ハイブリダイゼーションサンプルの調製

用いた配列は Table 3-2 に示している。2 × SSC を含む酵素反応した 0.13 μM 1 本鎖 PCR 産物及び各種の 1 本鎖オリゴヌクレオチドを 95 °C で 30 分間熱変性を行い、その後 10 時間かけて 25 °C に戻して、2 本鎖を形成させた。

Table 4-2. 2 本鎖形成させた 1 本鎖 PCR 産物と各オリゴヌクレオチドの配列。

配列	
D1	3'-CTCCATAAAGCCCTCCAAAGCGCACAAAGCAAATCCCTCATTACGCAAAA <u>GCCCAAGCAAAAATCAGCGCAAATGCGCAAAAGCAAAAAAAAAAATGCA</u> <u>AGCCATAAGCACCAAGCCTCA</u> -5' (121 mer)
D2	5'-ACT CCG AAC ACC ACG AAT ACC G-3' (22 mer)
D3	5'-CGG GTT CGT TTT TAG TCG CGT T-3' (22 mer)
D4	5'-ACG TTC GGT ATT CGT GGT GTT C-3' (22 mer)

下線部は D3、波線は D4 と 2 本鎖を形成する箇所。

4-2-5-3.1 本鎖 PCR 産物の部分ハイブリダイゼーションサンプルの電気化学的検出

直径が 1.6 mm の GC 電極を 0.05 μm アルミナスラリーで 60 分間物理研磨し、その後 15 分間(5 分 × 3)超音波洗浄を行った。10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ を含んだ 50 μM FNF 溶液 (全量 300 μl) に電極を浸し、CV 測定を行った。その後、10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaClO₄ を含んだ 55 μM FNF 溶液に 3-2-5-2 で調製した 0.13 μM/bp 各サンプル (全量 200 μl) を調製し、CV 測定を行った。CV 測定条件は走査範囲: 0 - 0.6 V, 測定温度は 25 °C で行った。

4-3. 結果

4-3-1. FNF と 2 本鎖 DNA との相互作用解析

Ct-DNA との結合能を評価するために DNA 添加に伴う吸光度変化を測定した。Figure 4-4, 4-5, 4-6 に Ct-DNA 添加に伴う FNF の吸収スペクトル変化, 384 nm の吸光度変化, Scatchard 解析の結果を示している。Figure 4-4 より, 等吸収点を通っていることから結合様式が単一であることが考えられる。2 本鎖 DNA にインターカレーターが作用すると極大吸収波長のピークは淡色効果とレッドシフトが観測される。この挙動は, これまでのナフタレンジイミド誘導体と同様の縫い込み型インターカレート結合の挙動²⁰⁻²³⁾であることが分かった。さらに, Figure 4-5 を基に, 下記に示す McGhee & von Hippel の式から結合定数と座位数を算出した (Figure 4-6)²⁴⁾。

$$v/c = K(1-nv) \times \{(1-nv)/(1-(n-1)v)\}^{n-1}$$

v は塩基対当りに結合したインターカレーターの数, c は結合していないインターカレーターの濃度, n は座位数(インターカレートすることにより覆われる塩基対の数), そして K は結合定数。

算出した結果, $K = 1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n = 2$ となった。従来の FND (第 1 章の Table 1 を参照) は, 速度論解析で算出した結合定数ではあるが, $K = 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であった²⁵⁾。したがって, 従来の FND と同等な結合能を有していることが示された。

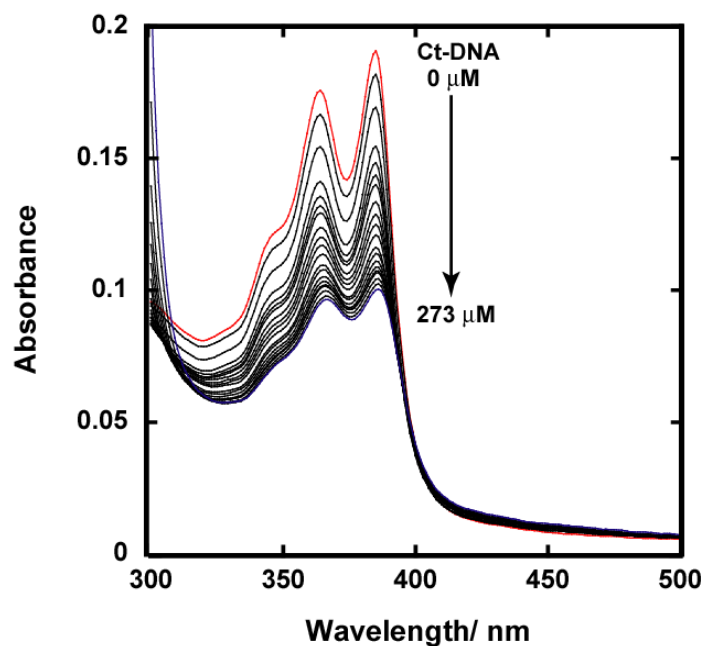


Figure 4-4. Ct-DNA 添加に伴う FNF の吸収スペクトル変化。測定溶液: 8.04 μM FNF を含む 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl 溶液, 測定温度: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

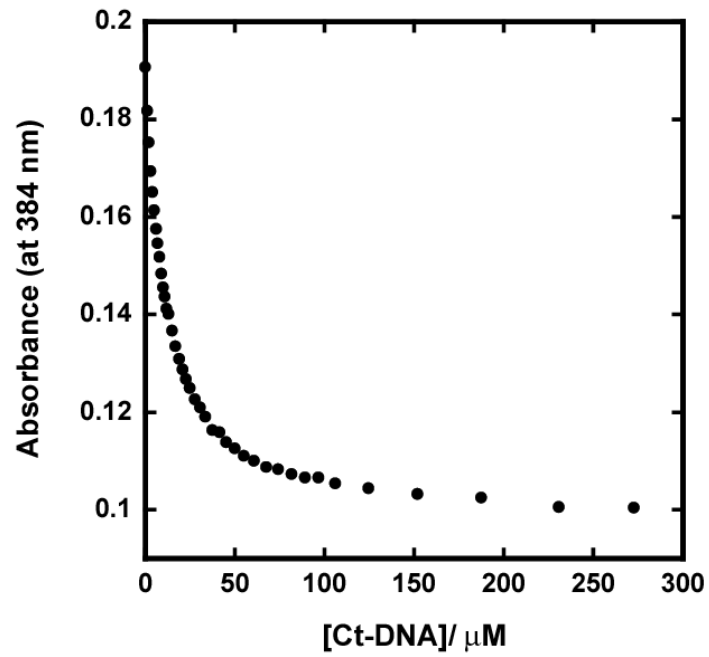


Figure 4-5. Ct-DNA 添加に伴う FNF 溶液中の 384 nm の吸光度変化.

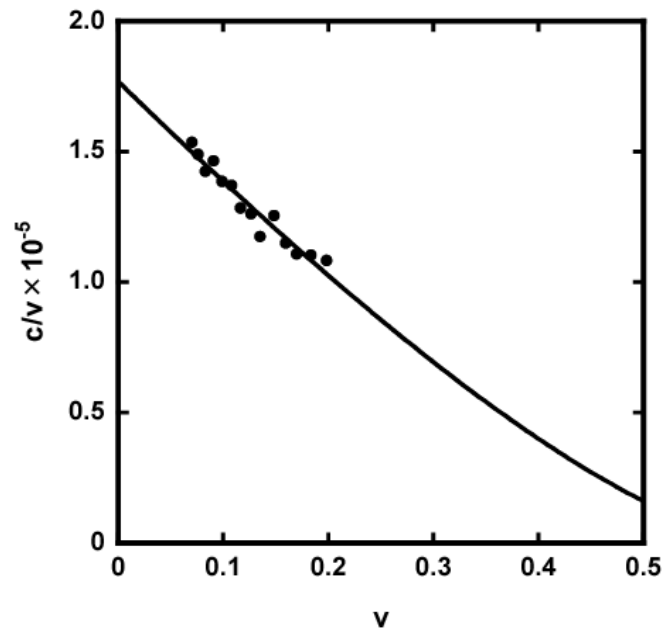


Figure 4-6. FNF と Ct-DNA との相互作用における Figure 4-5 の 384 nm の吸光度変化を利用した Scatchard 解析の結果.

次に, Ct-DNA に FNF を添加したときの CD スペクトル変化を Figure 4-7 に示す . Figure 4-7 より, FNF の添加に伴い NDI に由来する 383 nm 付近に負の誘起 CD が観測された . これより, FNF が DNA にインターカレートしていることが解釈される . また, Figure 4-7(B)より, 500 nm 付近に正の誘起 CD が観測された . これは, FNF と DNA との相互作用することで, DNA の骨格である糖の部分が不斉炭素を有しており, 不斉場を有しているので, FNF の Fc の d-d*遷移による誘起 CD が観測されたものと考えられる .

吸収スペクトル変化と CD スペクトル変化によって, FNF は Ct-DNA にインターカレート結合している可能性があり, Topoisomerase I により FNF がインターカレート結合の証明をすることにした .

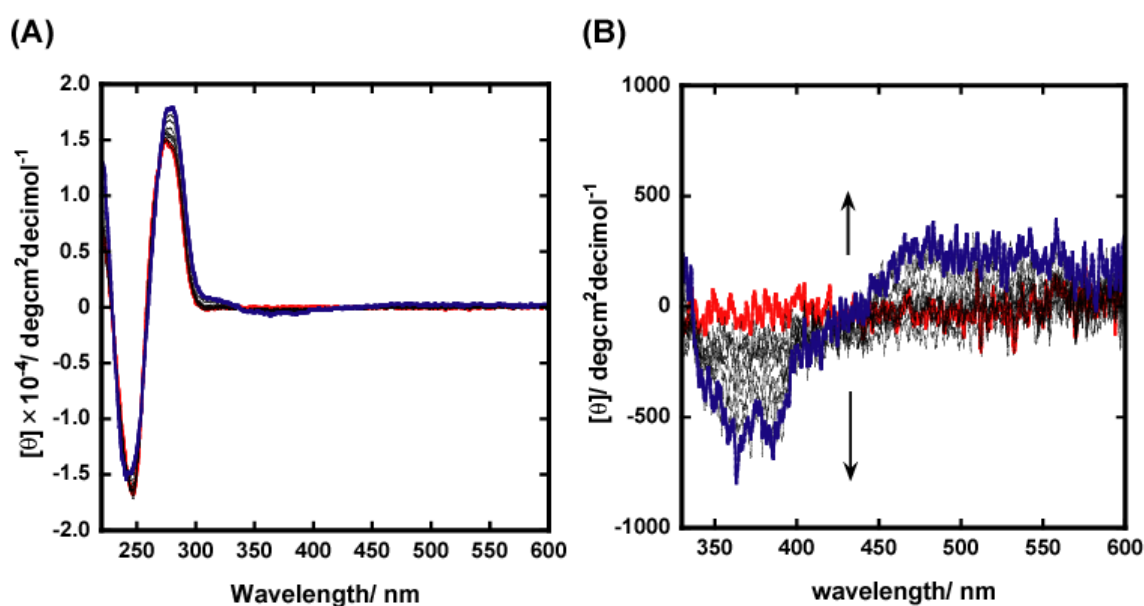


Figure 4-7. FNF 添加(0 - 15.1 μM)に伴う 100 $\mu\text{M}/\text{bp}$ Ct-DNA の CD スペクトル変化 (A)と 300 - 600 nm の CD スペクトル (B). 測定溶液: 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA 溶液, 100 mM NaCl, 測定温度: 25 .

Figure 4-8 に FNF の添加に伴う pUC19 の Topoisomerase I assay の結果を示す。この結果より、pUC19 は Topoisomerase I によって open circle 状態となり、FNF を添加するのに伴い、pUC19 は supercoil 状態へのバンドのシフトが確認された。第 2 章の 2-3-2 で説明したことを考慮に入れると、FNF はインターカレーターによる典型的な結果と同様となっていることから、FNF は DNA にインターカレート結合することが示された。

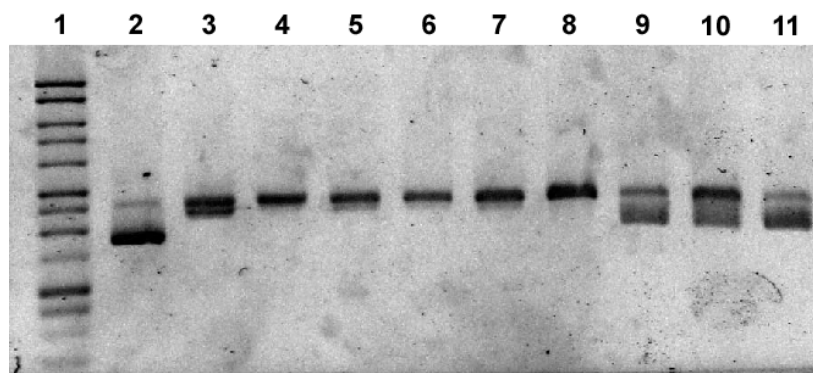


Figure 4-8. FNF の添加に伴う pUC 19 の Topoisomerase I assay の結果. lane 1 と 2 はそれぞれ 1 kb Ladder と pUC19 のみ. lane 3 から 8 は pUC19 と Topoisomerase I を含むサンプルに FNF の最終濃度を左から 0, 11, 22, 33, 44, 55, 66, 77, そして 88 μM に変化させたときの結果.

このように、FNF はインターカレート結合であることが明らかとなったので、Figure 4-9 に 4.3 μM FNF と 50 $\mu\text{M}/\text{bp}$ Ct-DNA との会合過程における 384 nm の吸光度の時間変化、及び 4.3 μM FNF と 50 $\mu\text{M}/\text{bp}$ Ct-DNA の複合体と 1% SDS との解離過程における 384 nm の吸光度の変化を示す。吸光度変化を下記に示す式で fitting し、得られたパラメーター ($A_1, A_2, A_3, R_1, R_2, R_3$) を用いて、下記に示す式に代入し、会合速度定数 k_{app} を算出した²⁰⁾。

$$\text{Abs} = -A_1 \exp(-R_1 \times t) - A_2 (-R_2 \times t) - A_3 (-R_3 \times t)$$

$$k_{\text{app}} = (A_1 \times R_1 + A_2 \times R_2 + A_3 \times R_3) / (A_1 + A_2 + A_3)$$

Abs は吸光度、t は会合時間、 $A_1, A_2, A_3, R_1, R_2, R_3$ は係数である。

DNA の濃度に対して、得られた k_{app} をプロットし (Figure 4-10)、直線の傾きから会合速度定数を算出した。Figure 4-10 より、FNF の会合速度定数は $k_a = 4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。FND との会合速度定数は、 $k_a = 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり²⁵⁾、これと比較すると約 2.2 倍小さくなった。このことから、FNF は FND のリンカーにトリアゾール環を導入した構造であるので、会合速度が遅くなったのはトリアゾール環の影響によるものと考えられる。さらには、リンカーの違いは解離速度にも影響を及ぼしているのではないかと考え、SDS を用いた解離速度定数の測定を行った (Figure 4-9)。得られた吸光度変化を会合過程と同じ式で fitting し、得られたパラメーター ($A_1, A_2, A_3, R_1, R_2, R_3$) を用いて、 $k_d = (A_1 \times R_1 + A_2 \times R_2 + A_3 \times R_3) / (A_1 + A_2 + A_3)$ に代入し、解離速度定数 k_d を算出した²¹⁾。算出した結果、 $k_d = 0.92 \text{ s}^{-1}$ となった。FND の解離速度定数は $k_d = 1.3 \text{ s}^{-1}$ ²⁵⁾ であり、FNF < FND の順で解離が速くなることが分かった。したがって、解離速度では、Fc の高高さだけでなく、リンカー部位の違い

によっても解離速度に影響を及ぼしていることが明らかとなった。これから結合定数を算出したところ、 $K = k_a/k_d = 4.5 \times 10^4 / 0.92 = 4.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であり、Scatchard 解析で得られた結合定数の約 2.6 倍小さくなったが、比較的近い値となった。したがって、 $k_a = 4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k_d = 0.92 \text{ s}^{-1}$ が FNF の会合・解離速度定数となる。これまでの Ct-DNA と FNF の相互作用解析では、FNF はインターカレート結合であることが証明され、会合・解離速度、あるいは結合定数のどちらとも従来の FND に比べて小さいものとなった。

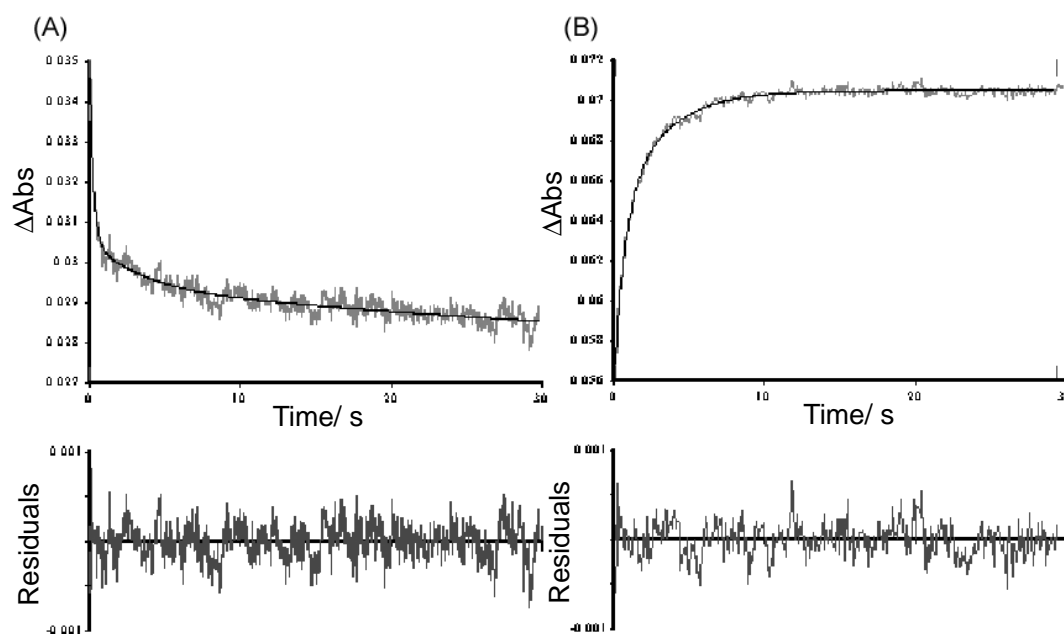


Figure 4-9. Ct-DNA に対する FNF の会合過程の Time Trace (A), 解離過程の Time Trace (B) の結果. 測定溶液: 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, [FNF]= 5.1 μM 溶液と 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, [Ct-DNA] = 50 $\mu\text{M}/\text{bp}$ 溶液 (A), 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, [FNF] = 5.1 μM と [Ct-DNA] = 50 $\mu\text{M}/\text{bp}$ の混合溶液と 10 mM MES (pH 6.25), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS 溶液 (B), 測定温度: 25 .

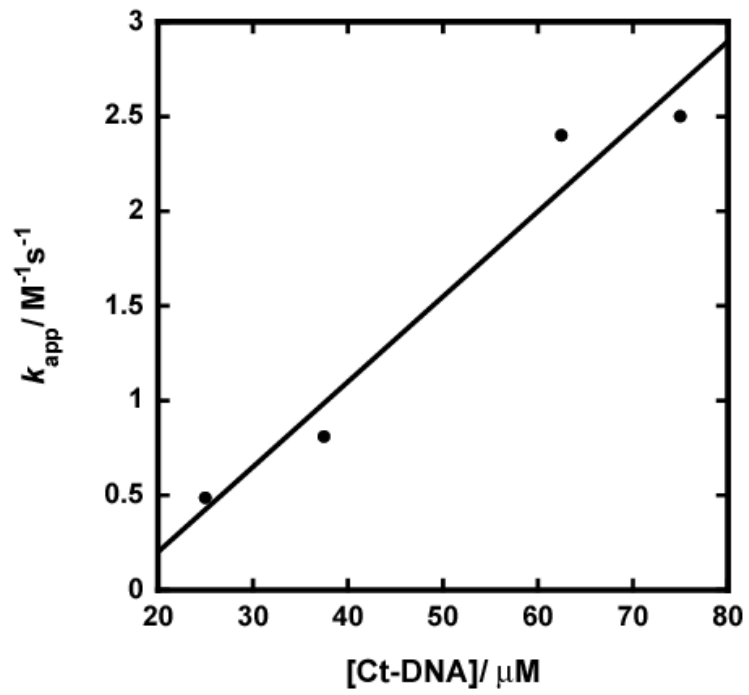


Figure 4-10. DNA の濃度と得られた k_{app} の関係.

4-3-2. Ct-DNA の添加に伴う FNF の電気化学測定

これまでに FNF と DNA との結合挙動解析を行ったところ、従来の FND と比較すると結合能は同程度であることが明らかとなり、電気化学的に遺伝子を検出することが可能になるものと考えた。従来の FND との違いは、FNF は FND のリンカーに Huisgen 環化反応で合成したトリアゾール基を導入しているため、FND に比べて π 電子を多く有している。さらには、第 3 章のコントロール実験での電気化学測定の結果から、FNF のピーク電流値は非常に小さいものであった。これらのことから、FNF はカーボン電極である GC 電極に吸着しやすくなり、Fc の電子移動が阻害されている可能性がある。そこで FNF は DNA に結合することで、Figure 4-11 に示しているように、FNF のみでは電極に吸着し、DNA と複合体になることで電極から脱着が生じ、電極上で異なった挙動が起こるため電気化学的に反映されるのではないかと期待される。実際に、FNF を用いて Ct-DNA 添加に伴う電気化学測定を評価することにした。Figure 4-12 に Ct-DNA 添加に伴う CV 測定の結果も示している。Figure 4-12 より Ct-DNA 添加すると電流値は増加することが明らかとなった。この挙動は、当初予想していたような「FNF のみでは電極に吸着し、DNA と複合体になることで電極に吸着せずに拡散する。」ということが生じているのではないかと考えられる。そこで、走査速度依存性を評価することにした。

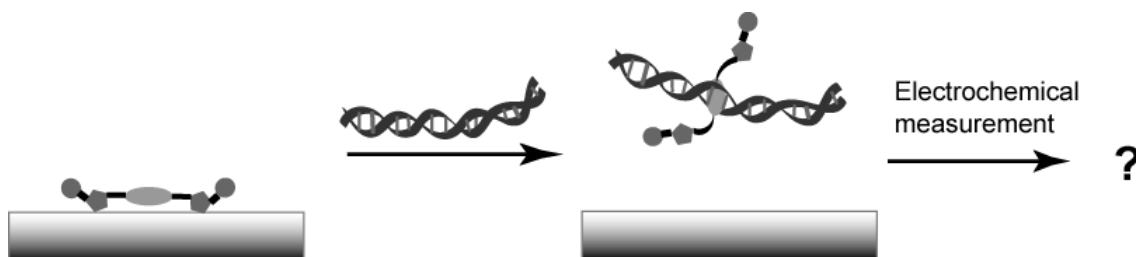


Figure 4-11. 予想される DNA 存在下、非存在下での FNF の電極上での挙動。

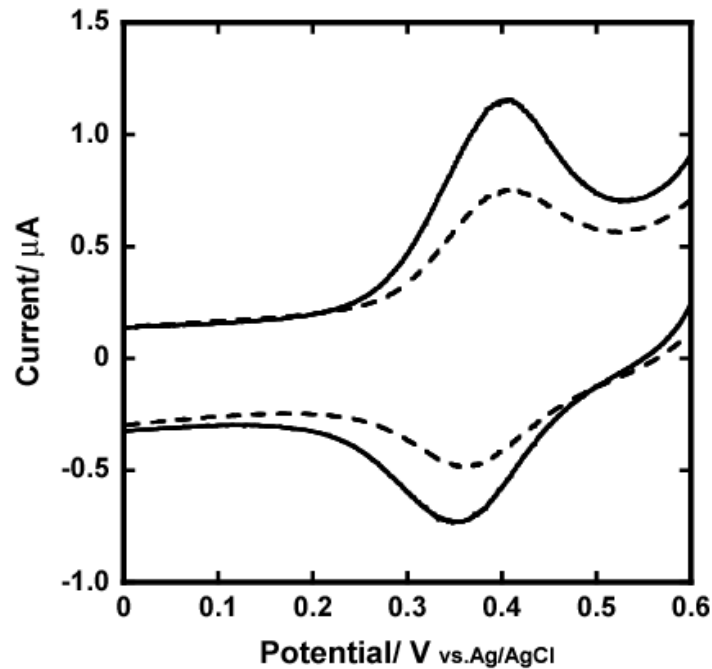


Figure 4-12. 200 μM Ct-DNA 存在下 (実線)及び非存在下 (破線)での 59 μM FNF の GC 電極 (I. D. = 3.0 mm)を用いた CV 測定結果. 測定溶液: 100 mM NaClO_4 を含む 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0), 走査速度: 100 mV/s, 測定温度: 25 .

Figure 4-13 に走査速度の対数に対する走査速度を変化させたときに得られる FNF の酸化ピーク電流値 (I_{pa})の対数を示している. 走査速度を変化させたときの I_{pa} と走査速度 (Eq. 1),あるいは走査速度の 1/2 乗 (Eq. 2)との関係は次式で表すことができる. 酸化還元種が電極に吸着しているとき, Eq. 1 の関係式が成り立ち, 走査速度に対して I_{pa} が比例関係になる. それに対して, 酸化還元種がバルク中を拡散し, 拡散律速で電流応答が得られるとき, Eq. 2 の関係式が成り立ち, 走査速度の 1/2 乗に対して I_{pa} が比例関係になる.

$$I_{pa} = n^2 F^2 A C v / 4RT \quad (1)$$

$$I_{pa} = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2)$$

n: 電子数, F: ファラデー定数, A: 電極面積, C: 色素濃度, D: 拡散係数, v: 走査速度

これらの関係式を対数にすることで, Eq. 1 と Eq. 2 の傾きがそれぞれ 1 と 0.5 になる. これを受けて, Figure 4-13 より FNF のみでは傾きは 0.8 であったのに対し, FNF と Ct-DNA 複合体では, 0.6 であった. FNF のみに関しては, 電極に吸着している FNF と拡散している FNF が共存しているために傾きがその 0.5 と 1 の間の 0.8 になったものと考えられる. それに対して, FNF と Ct-DNA 複合体では, 拡散の挙動を示しており, 電極に吸着していないものと考えられる. そこで, 過去にナフタレンジイミドは電子移動が起こり, ラジカルアニオン性に成りやすいことが報告されている²⁶⁾. したがって, CV 測定の結果で考えられるのは, FNF のみは電極に吸着することで, FNF のナフタレンジイミドと Fe 間の距離が短くなり, 酸化に走査することで Fe の電子がナフタレンジイミドへ移動し, ラジ

カルアニオンを生成して、電極への電子移動を阻害して電流値が小さくなったのではないかと考えられる。それに対して、Ct-DNA を添加することで、DNA と複合体を形成し、ナフタレンジイミドの吸着が起こらず、複合体を形成した Fc の拡散電流を検出したものと考えられる。したがって、このような原因により DNA を添加することで電流値が増加したのではないかと考えられる。

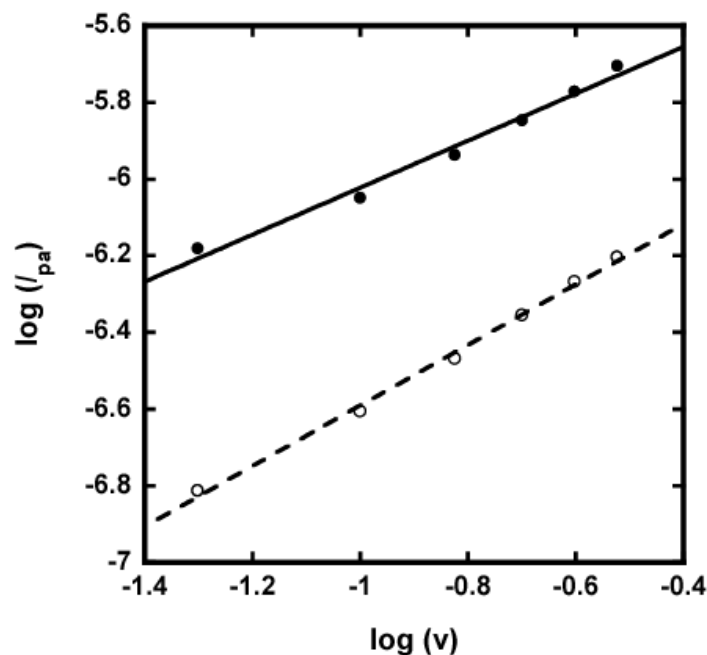


Figure 4-13. 走査速度の対数に対する 200 μM Ct-DNA 存在下 (●) 及び非存在下 (○) での 59 μM FNF の酸化ピーク電流値の対数のプロット。

そこで、実際にそのような挙動が起こっているのかを確かめるために、電極への吸着を抑えることができるマスキング電極を用いて評価することにした。Ct-DNA 存在下、非存在下での CV 測定を行ったところ、GC 電極と同様に Ct-DNA が存在すると電流値は増加することが明らかとなった (Figure 4-14)。また、マスキング電極での走査速度依存性を評価することにした。この場合では、走査速度の対数に対する I_{pa} の対数の直線の傾きが 0.5 になるものと予想される。Figure 4-15 に走査速度の対数に対する各サンプルの CV で得られた I_{pa} の対数を示している。これより、走査速度の対数に対するピーク電流値の直線の傾きが DNA 非存在下では 0.65、DNA 存在下では 0.66 となり、走査速度依存性の結果から、マスキング電極では拡散律速による電気化学挙動であることが明らかとなった。したがって、GC 電極での電気化学挙動において、FNF のみでは GC 電極に吸着してナフタレンジイミドが Fc の電子移動を阻害し、DNA が存在することでナフタレンジイミドが DNA に結合して GC 電極に吸着することができなくなり、拡散電流により電流値が増加したものと考えられる。また、マスキング電極でも Ct-DNA を添加することでピーク電流値が増加したので、GC 電極での結果と比較することにした。Figure 4-12 と Figure 4-14 から 200 $\mu\text{M}/\text{bp}$ Ct-DNA を添加した時の電流増加率を評価したところ、GC 電極では 261 % であり、マスキング電極では 158 % であった。さら

には, Figure 4-17 より, ダイナミックレンジの観点で, マスキング電極で評価するよりも GC 電極で評価する方が精度良く DNA を電気化学的に検出ができるものと考えられる.

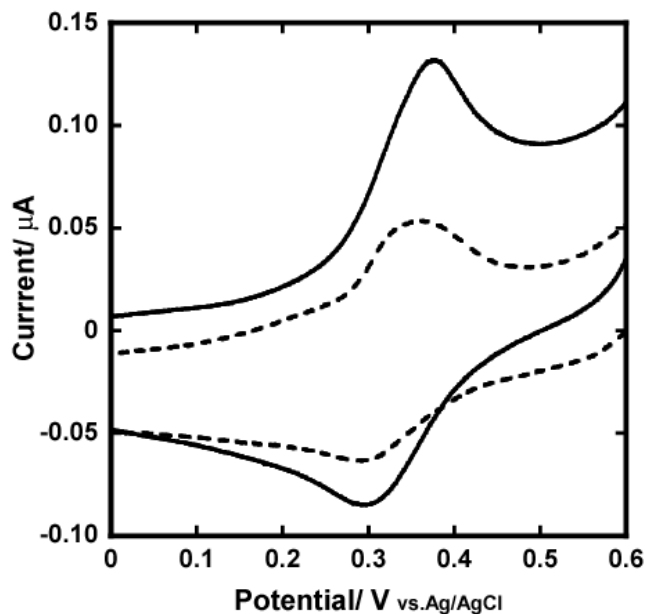


Figure 4-14. 200 μM Ct-DNA 存在下 (実線)及び非存在下 (破線)での 59 μM FNF の 6-MHC でマスキングした金電極を用いた CV 測定結果. 測定溶液: 100 mM NaClO_4 を含む 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0)溶液, 走査速度: 100 mV/s, 測定温度: 25 .

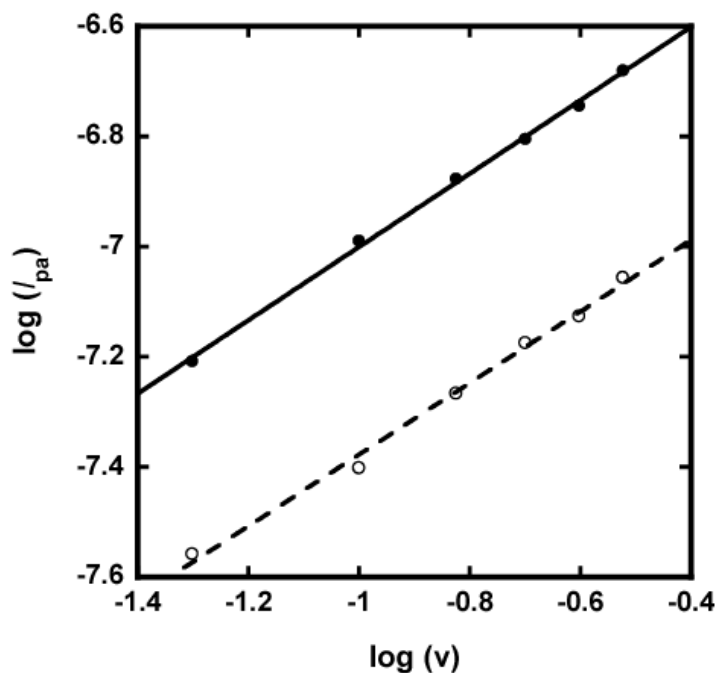


Figure 4-15. 走査速度の対数に対する 200 μM Ct-DNA 存在下 ()及び非存在下 ()での 59 μM FNF の酸化ピーク電流値の対数のプロット.

そこで、Ct-DNA の添加濃度を变化させたときの FNF の電気化学測定を行うことにした。Figure 4-16 に Ct-DNA 添加濃度に伴う DPV 測定の結果を示している。Figure 4-16 より、Ct-DNA の添加濃度が増加にともない、電流値が増加していることが明らかとなった。この結果を受けて、Figure 4-17 に Ct-DNA 添加濃度に対する Figure 4-16 で得られた I_{pa} のプロットを示している。また、比較としてマスキング電極での結果も示している。Figure 4-17 より、マスキング電極では Ct-DNA の添加濃度を变化させても I_{pa} はわずかな変化しか示さなかったのに対し、GC 電極では Ct-DNA が 50 μM まで I_{pa} は増加し、その後一定となっていることが明らかとなった。このように、GC 電極を用いることで定量的な電気化学的 DNA 検出を達成することができた。したがって、FNF を用いた電気化学的遺伝子検出は、GC 電極を用いることで FNF のみでは電極に吸着することで Fc の電子移動をナフタレンジイミドが阻害し、DNA が存在することで電極の吸着が抑制されて電流値が回復したものと考えられる (Figure 4-18)。

このように、FNF の電極への吸着を利用した電気化学的遺伝子検出が可能となり、1 本鎖と 2 本鎖の結合能を利用した識別がこの手法を用いて行うことができるものと期待される。

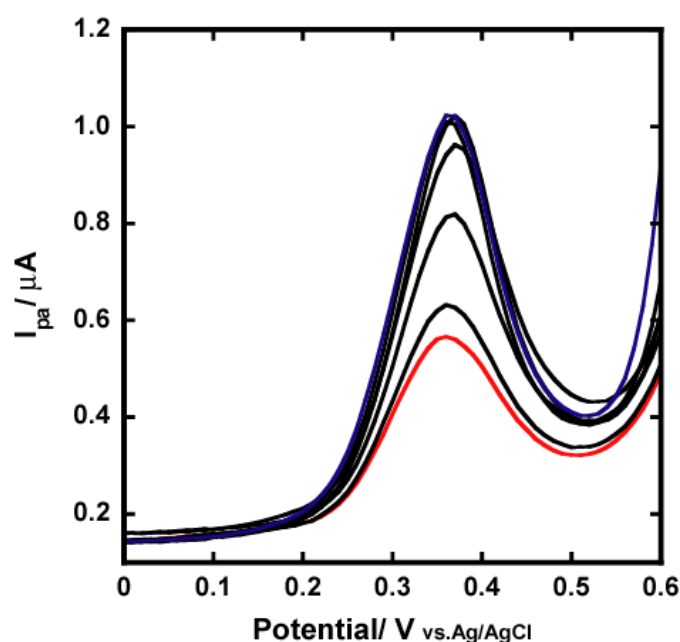


Figure 4-16. FNF に各濃度の Ct-DNA 添加したサンプルの DPV 測定結果. 測定溶液: 59 μM FNF を含む 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0), 100 mM NaClO_4 溶液, 測定温度: 25 $^\circ\text{C}$.

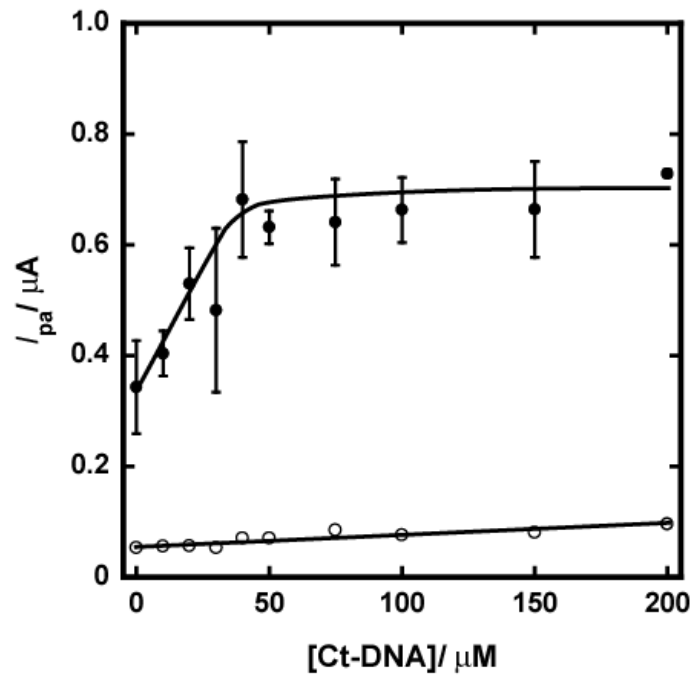


Figure 4-17. 各濃度の Ct-DNA 添加に伴う酸化電位の電流値のプロット.
 ○ : GC 電極, ● : マスキング電極.

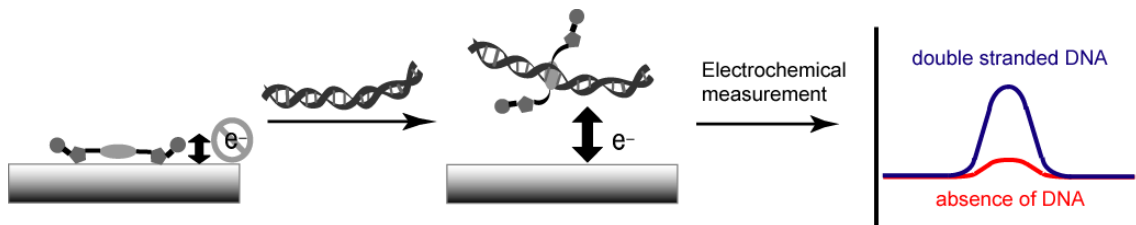


Figure 4-18. DNA 存在下, 非存在下での FNF の電気化学挙動.

4-3-3. GC 電極を用いた ssDNA あるいは dsDNA 添加に伴う FNF の電気化学測定

これまでに FNF の電極への吸着を利用した電気化学的遺伝子検出が可能であることが明らかとなり, FNF の 1 本鎖と 2 本鎖に対する結合能の差を利用することで, Figure 4-19 に示すような 1 本鎖と 2 本鎖の識別を行うことができるものと期待される. そこで基礎検討として, dsDNA として Ct-DNA, ssDNA として poly dT を用いて電気化学測定を行った.

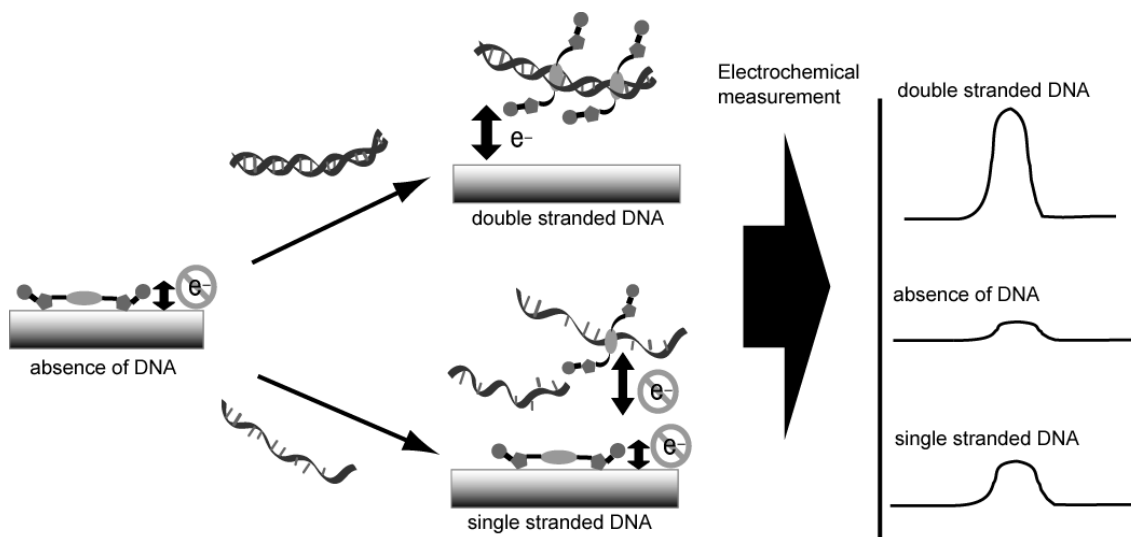


Figure 4-19. GC 電極による FNF を用いた ssDNA あるいは dsDNA の電気化学的識別の概念図.

Figure 4-20 に FNF と poly dT 複合体の走査速度の対数に対する酸化ピーク電流値の対数のプロットを示している. Figure 4-20 の直線の傾きが 0.6 であることが分かった. したがって, これらの結果より, poly dT の複合体に関して FNF が ssDNA である poly dT と結合し, 電極への吸着ではなく拡散していることが明らかとなった. 4-3-2 とこの結果をまとめると, FNF のみでは電極に吸着し, poly dT 存在下, あるいは Ct-DNA 存在下では拡散の挙動であることが示された. さらに Figure 4-21 に各サンプルの CV 測定の結果を示している. この結果から, 酸化ピーク電流値は, FNF のみでは $0.36 \mu\text{A}$, FNF と poly dT 複合体では $0.61 \mu\text{A}$, そして, FNF と Ct-DNA 複合体では $0.69 \mu\text{A}$ となった. この挙動と Figure 4-20 の結果を考慮すると, 電極に吸着して電子移動が障害されている FNF の場合に比べると, ssDNA や dsDNA では FNF との結合し, その複合体の電極への吸着が起これば電流値が増加したのではないかと考えられる. また, ssDNA と dsDNA を比較すると, dsDNA との結合能が ssDNA に比べて高く, FNF は dsDNA と複合体を形成して拡散電流を検出しているのに対し, ssDNA では一部結合していない FNF が電極に吸着し, 電子移動を障害されて電流値が dsDNA に比べて減少したものと考えられる. したがって, 本系では GC 電極を用いて ssDNA と dsDNA の検出にも適用でき, Figure 4-19 に示した概念の通りの検出が行うことが可能になり, 様々な遺伝子を検出することが可能になるものと考えられる.

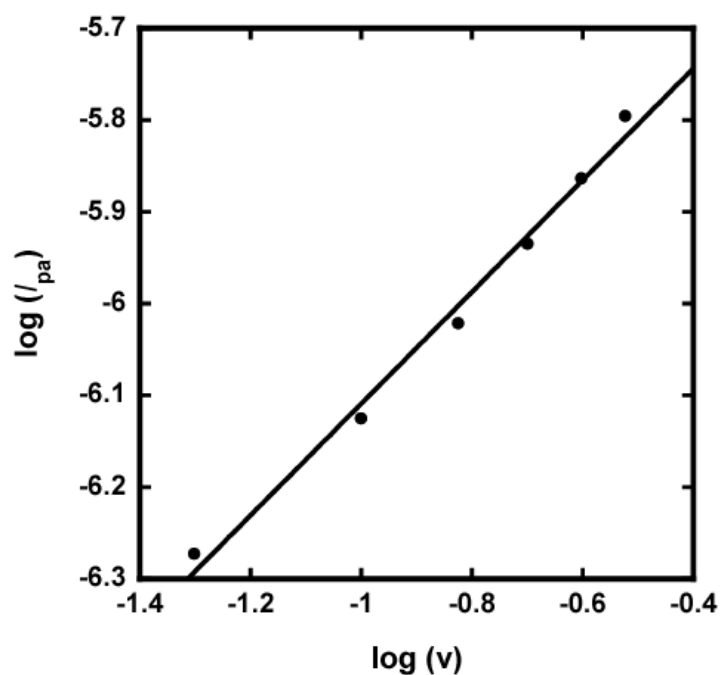


Figure 4-20. 走査速度の対数に対する 100 μM poly dT 存在下での 59 μM FNF の酸化ピーク電流値の対数のプロット.

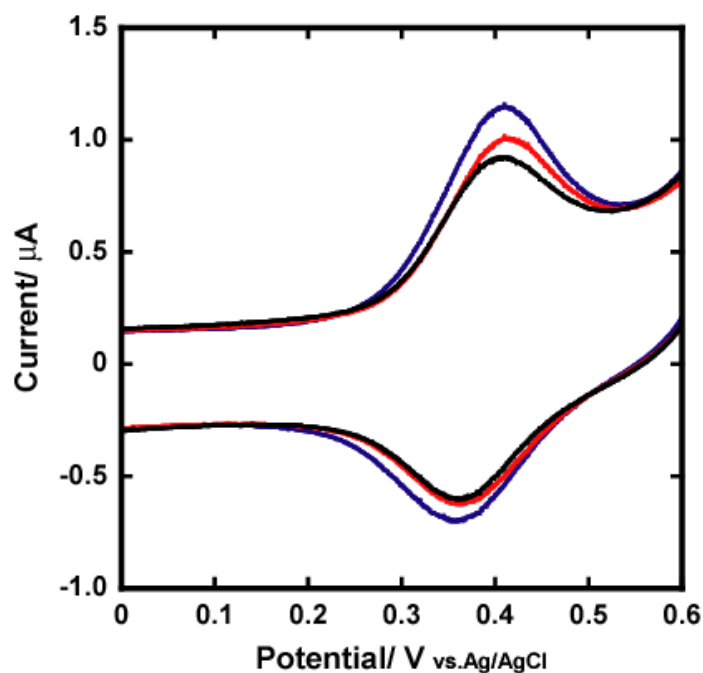


Figure 4-21. 100 μM Ct-DNA 存在下 (青線), 100 μM poly dT 存在下 (赤線), そして非存在下 (黒線)での 59 μM FNF の GC 電極(I.D.=3.0 mm)を用いた CV 測定結果. 測定溶液: 100 mM NaClO_4 を含む 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0)溶液, 走査速度: 100 mV/s, 測定温度: 25 .

4-3-4. GC 電極を用いた 1 本鎖 PCR 産物の部分ハイブリダイゼーションサンプルの電気化学的検出

4-3-3 で 1 本鎖と 2 本鎖の識別が可能であることが示された。そこで、1 本鎖 PCR 産物の一部分をハイブリダイゼーションさせ、そのサンプルを用いて電気化学的に検出を行うことにした。これを達成することができれば、ミスマッチ検出にも応用が可能となり、臨床への発展が可能になるものと期待される。今回は完全に 1 本鎖 PCR 産物の一部分を 2 本鎖形成させたサンプルを用いるために、熱変性とアニーリング操作を行った (Figure 4-22(A))。

Figure 4-22(B)に FNF のみの結果と 1 本鎖 PCR 産物(D1)と D4 をハイブリダイズさせたサンプルの CV 測定結果の一部を示している。各サンプルの CV で得られた酸化電流値をまとめたものを Figure 4-22(C)に示している。Figure 4-22(C)より、FNF のみに比べて、1 本鎖である D1 と D2 では、電流値がほとんど変化はなかった。また、D1 と非相補鎖である D2 を熱変性とアニーリング操作を行った場合、これらには 2 本鎖を形成する箇所がないので D1 あるいは D2 の結果と同じになるものと期待したが、一部が 2 本鎖を形成してしまい、そこに FNF が結合してわずかながら電流値が増大したものと考えられる。しかしながら、D1 と完全に 2 本鎖を形成する D3 と D4 を熱変性とアニーリング操作を行ったサンプルに関して、どちらのサンプルも FNF のみ、あるいは 1 本鎖である D1 と D2 サンプルよりも増大し、さらには D1 と D2 を熱変性とアニーリング操作を行ったサンプルよりも増大していることが明らかとなった。また、部分的に 2 本鎖形成した箇所が異なる場合も電流値にわずかな違いが得られた。D3 と D4 は 2 本鎖を形成した場所がそれぞれ中央あるいは末端である。本系は FNF が 2 本鎖に結合し、複合体が拡散して電流値を得る手法である。したがって、2 本鎖を形成した箇所によって、FNF が結合した複合体の電極への拡散挙動が異なり、電流値に差が得られたものと考えられる。

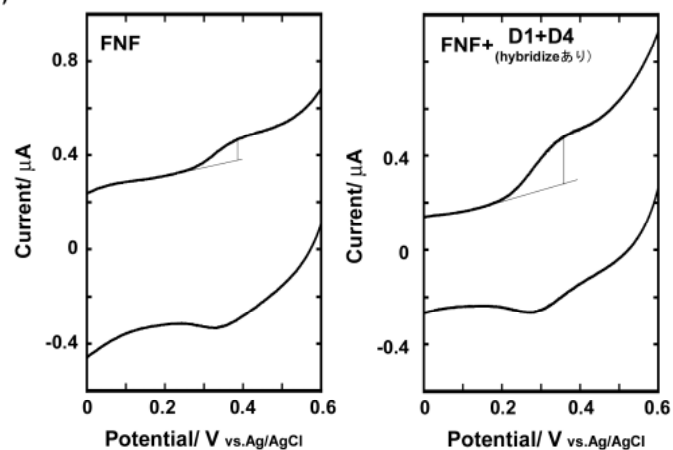
3-3-3 で評価した 1 本鎖と 2 本鎖の識別を考慮すると、今回行った部分的に 2 本鎖を形成しているサンプルに関して、FNF は 1 本鎖領域にはほとんど結合しておらず、2 本鎖領域に結合し、電流応答が得られたものと考えられる。さらには、PCR 産物でも FNF を用いて、1 本鎖と 2 本鎖の識別が可能であることが示された。このように、ミスマッチ検出においても、ハイブリダイゼーション効率の観点から本系は適用が可能となり、臨床診断に用いられる手法になるものと期待される。

(A)

D1: 3'-CTCCATAAAGCCCTCCAAAGCGCACAAAGCAAATCCCTCATTACGCAAAAGCCCAAGCAAAAATCAGCGCAAATGCGCAAAAGCAAAAAAAAAAATGCAAGCCATAAGCACCAACAAGCCTCA-5'
D3: 5'-CGGGTTCGTTTTAGTCGCGTT-3' D4: 5'-ACGTTTCGGTATTCGTGGTGTTTC-3'

D2: 5'-ACTCCGAACACCACGAATACCG-3'
hybridizationしない配列

(B)



(C)

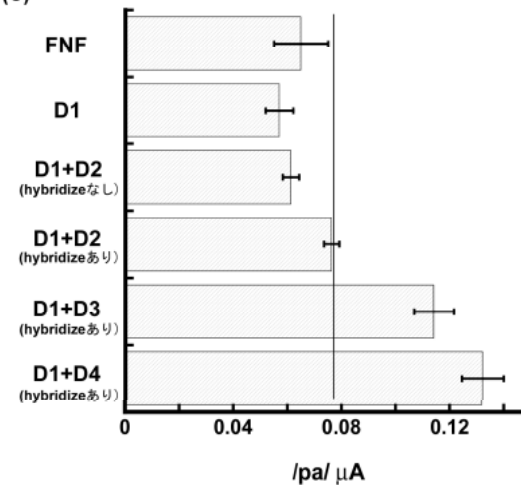


Figure 4-22. 今回用いたサンプルの配列 (A), GC 電極 (I. D. = 1.6 mm)を用いた 55 μM FNF あるいは 0.13 μM/bp 熱変性とアニーリング操作を行ったサンプル (D1+D4)と 55 μM FNF の CV 測定 (B), CV で得られた各サンプルの酸化ピーク電流値 (C). 測定溶液: 100 mM NaClO₄を含む 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 走査速度: 100 mV/s, 測定温度: 25 .

4-4. 考察

電気化学的な遺伝子の検出において、DNA 固定化電極を用いた検出系が主な方法である。この手法には、電気活性種を導入した DNA を用いる方法、あるいは DNA に結合する電気活性種を有した試薬を用いる方法である。これらの手法が開発されて以来、様々な遺伝子の検出に成功している。また、蛍光による DNA チップや DNA マイクロアレイのように大量のサンプルを一斉に解析できることを、この DNA 固定化電極を用いた電気化学的検出でも達成できるものと考えられ、臨床診断で非常に重要な役割を果たすものと考えられる。しかしながら、固定化の手間や時間がかかる問題、電気活性種を DNA に導入する手間がかかる問題、そして DNA に結合する試薬を用いる場合は結合能が弱いと偽陰性になる可能性がある。そこで、著者は固定化電極ではなく、電極を浸すだけで DNA を電気化学的に識別が可能になる試薬を開発し、簡便な遺伝子検出法の確立を試みた。

本章では、第 3 章での FNC のコントロール実験の試薬として FNF を開発した。この FNF の電気化学特性は、電流値がほとんど得られず、DNA が存在することで電流値が回復することが明らかとなった。この現象は非常に興味深く、FNC とは異なった挙動で電気化学的に検出が可能であることが示された。さらには DNA の濃度に応じた定量的な変化を示した。したがって、本研究では DNA 固定化電極のような「電流値増加」型の検出が達成できた。過去に、均一溶液中の電気化学的遺伝子検出が行われていた。Carter らによって、Co(II)錯体あるいは Fe(II)錯体を用いて均一溶液中での Ct-DNA の電気化学挙動を評価し、静電的相互作用あるいはインターカレート結合を同定した²⁷⁾。また、Johnston らによって、Ru(II)錯体と Ct-DNA との電気化学的な相互作用解析を均一溶液中で行った²⁸⁾。しかしながら、どちらの場合も DNA 存在下では電流値の減少が確認された。これは、DNA と相互作用することで拡散係数が減少したためであると考えられる。それに対して、本手法は、FNF の電極での吸着が DNA 存在下で解消されて電流値が増加するものであり、このような検出系は初めての例である。さらには、1 本鎖と 2 本鎖の識別、さらには微量な PCR 産物の一部分を 2 本鎖形成させたサンプルにおいても本手法は識別が可能になったことから、本手法は非常に有用な方法である。

しかしながら、2 本鎖と 1 本鎖の電流値に差はあるものの、大きな差ではないのが問題である。これは、2 本鎖 DNA と 1 本鎖 DNA の結合能にあまり差がないのが原因である。そこで、著者は FNF の pK_a を高くした ligand に改良する必要があると考えている。 pK_a を高くした新規 FNF は 2 本鎖 DNA に対してはインターカレート結合し、さらに DNA 骨格のリン酸ジエステルの数に応じて強い静電的相互作用を示すものと期待される。それに対して、1 本鎖 DNA は静電的相互作用のみであり、さらには DNA 骨格のリン酸ジエステルの数は 2 本鎖 DNA に比べて少なくなるので結合能は 2 本鎖 DNA よりも結合能が小さくなるものと期待される。したがって、FNF を改良することで、2 本鎖 DNA への結合能が向上し、電流値が向上するものと考えている。

4-5. 結言

本章では、FNC のコントロール試薬として、Huisgen 環化反応を用いて、ナフタレンジイミドと Fc の間にトリアゾール基を導入した FNF を開発し、第 3 章で得られた FNC の電気化学特性を評価することにした。まず初めに、開発した FNF と DNA の相互作用解析を行った。従来の FND と比較すると、熱力学的な観点からすると、同じ結合能であったが、速度論的な観点からすると、FND よりも遅い結合であることが分かった。これは、FNF のリンカーに導入されたトリアゾール基によるものと示された。FND に比べて結合時間はかかるが、結合能は同じであるので、電気化学的な遺伝子検出に適用できることが明らかとなった。実際に、FNF 及び FNF と DNA 複合体の電気化学測定を行ったところ、DNA が存在すると電流値が増大することが明らかとなった。したがって、GC 電極に吸着した FNF は酸化に走査することで Fc の電子がナフタレンジイミドへ移動し、ラジカルアニオンを生成して、電極への電子移動を阻害して電流値が小さくなった。そこに DNA が存在すると FNF は DNA に結合し、NDI の電極への吸着が起らず、電流値の回復が確認された。さらには、DNA の濃度に応じて、電流値は定量的な変化を示した。

また、この検出系を利用して、1 本鎖と 2 本鎖の電気化学測定を行ったところ、1 本鎖と 2 本鎖の FNF の結合能の違いによって、1 本鎖に比べて 2 本鎖の電流値が大きいことが明らかとなった。この検出を臨床診断に適用が可能かどうかを評価するために PCR 産物の検出も行った。このように、FNF は 1 本鎖と 2 本鎖の識別を達成することができたので、長い DNA 配列に、部分的にハイブリダイゼーションさせたサンプルの検出を達成することができると考えた。実際に、部分的にハイブリダイゼーションさせたサンプルを高精度に検出することに成功した。したがって、FNF は GC 電極に効率良く吸着することができ、簡便に遺伝子を電気化学的に検出することが可能な試薬であることが示された。

また、本章で用いた PCR 産物はテロメラーゼ活性に関係がある hTERT 遺伝子の検出を行ったが、臨床診断へ応用するためには様々な遺伝子に関して行う必要がある。しかし、本手法はこれまでにない検出系であり、簡便性が必要である臨床診断への適用を秘めた手法である。

4-6. 参考文献

- 1) K. Mukumoto, T. Nojima, S. Takenaka, *Tetrahedron*, **61**, 11705-11715 (2005).
- 2) S. Bütow, F. Lisdat, *Electroanalysis*, **22**, 931-937 (2010).
- 3) X. Jin, Y. Fei, L. Zhang, X. Liu, G. Shen, R. Yu, *Analyst*, **135**, 121-126 (2010).
- 4) S. O. Kelley, N. M. Jackson, M. G. Hill, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 941-945 (1999).
- 5) A. Anne, A. Bouchardon, J. Moiroux, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1112-1113 (2003).
- 6) R. Y. Lai, E. T. Lagally, S.-H. Lee, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Soc.*, **103**, 4017-4021 (2006).
- 7) E. Pavlovic, R. Y. Lai, T. T. Wu, B. S. Ferguson, R. Sun, K. W. Plaxco, H. T. Soh, *Langmuir*, **24**, 1102-1107 (2008).
- 8) R. Ikeda, S. Kobayashi, J. Chiba, M. Inouye, *Chem. Eur. J.*, **15**, 4822-4828 (2009).
- 9) M. N. Hansen, E. Farjami, M. Kristiansen, L. Clima, S. U. Pedersen, K. Daasbjerg, E. E. Ferapontova, K. V. Gothelf, *J. Org. Chem.*, **75**, 2474-2481 (2010).
- 10) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo, *Anal. Chem.*, **72**, 1334-1341 (2000).
- 11) S. Sato, S. Fujii, K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, **637-639**, 476-483 (2001).
- 12) F. Li, W. Chen, S. Zhang, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 781-786 (2008).
- 13) H. Miyahara, K. Yamashita, M. Kanai, K. Uchida, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka, *Talanta*, **56**, 829-835 (2002).
- 14) K. Yamashita, A. Ikeda, M. Takagi, Y. Ikeda, H. Kondo, S. Takenaka, *Bioconjugate Chem.*, **13**, 1193-1199 (2002).

- 15) T. Nojima, K. Yamashita, A. Ikeda, M. Takagi, Y. Ikeda, H. Kondo, S. Takenaka, *Anal. Sci.*, **19**, 79-83 (2003).
- 16) T. Nojima, K. Yamashita, A. Ikeda, Y. Ikeda, H. Kondo, S. Takenaka, *Anal. Sci.*, **21**, 1437-1441 (2005).
- 17) S. Sato, M. Tsueda, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, **695**, 1858-1862 (2010).
- 18) S. Sato, K. Hokazono, T. Irie, T. Ueki, M. Waki, T. Nojima, H. Kondo, S. Takenaka, *Anal. Chim. Acta*, **578**, 82-87 (2006).
- 19) Y. Xiao, R. Y. Lai, K. W. Plaxco, *Nat. Protoc.*, **2**, 2875-2880 (2007).
- 20) F.A. Tanious, S.-F. Yen, W.D. Wilson, *Biochemistry*, **30**, 1813-1819 (1991).
- 21) S.-F. Yen, E. J. Gabbay, W.D. Wilson, *Biochemistry*, **21**, 2070-2076 (1982).
- 22) Z.-R. Liu, K. H. Hecker, R. L. Rill, *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **14**, 331-339 (1996).
- 23) R. E. McKnight, A. B. Gleason, A. Keyes, S. Sahabi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 1013-1017 (2007).
- 24) J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.*, **86**, 469-489 (1974).
- 25) S. Sato, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, **693**, 1177-1185 (2008).
- 26) B. Abraham, S. McMasters, M. A. Mullan, L. A. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4293-4300 (2004).
- 27) M. T. Carter, M. Rodriguez, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8901-8911 (1989).
- 28) D. H. Johnston, H. H. Thorp, *J. Phys. Chem.*, **100**, 13837-13843 (1996).

第 5 章

結論

5-1. 本研究の総括

これまでにナフタレンジイミド誘導体が遺伝子解析で非常に有用な indicator であることがわかっているため、本研究では、新規ナフタレンジイミド誘導体の新たな遺伝子検出の構築を目的とした。そこで、3 種類のナフタレンジイミド誘導体を設計・合成し、これらを用いた遺伝子との相互作用を解析し、新規ナフタレンジイミド誘導体の特徴を利用した遺伝子分析法の開発を行った。

本論文では、これらの成果を 5 章でまとめた。第 1 章では、ナフタレンジイミドの特徴について述べた。ナフタレンジイミドの特徴を利用してナノ材料や光学材料の研究にまで発展しており、マテリアル分野での研究だけでなくバイオ分野での研究でも用いられている。ナフタレンジイミドは DNA に縫い込み型インターカレートすることが明らかとなり、著者の研究室では様々な官能基を導入したナフタレンジイミド誘導体を開発しており、遺伝子解析に有用な試薬である。そこで、著者は、設計・合成を行った 3 種類の新規ナフタレンジイミド誘導体の新たな遺伝子検出への展開について述べた。

第 2 章では、リン酸モノエステルとリン酸ジエステルの識別能が高い zinc-dipicolylamine (Zn-Dpa) を有するナフタレンジイミド(NDI-Dpa-Zn)の設計・合成を行った。まず、NDI-Dpa-Zn の Zn-Dpa の Zn^{2+} イオンが Dpa 部位に配位しているかを確認するために、 1H -NMR や蛍光スペクトル測定により評価を行った。ここでは、NDI-Dpa-Zn の Zn-Dpa 錯体は安定に存在することが明らかとなった。次に、開発した NDI-Dpa-Zn と DNA との相互作用解析を、吸収スペクトル、CD スペクトル、粘度測定、Topoisomerase I assay、そして Stopped-flow 測定により評価を行った。NDI-Dpa-Zn と前駆体である 4 と DNA との結合能を比較した。4 に比べて、NDI-Dpa-Zn の方が DNA の結合能が高いことが明らかとなった。平衡状態での結合能及び速度論的な観点から考察すると、Zn が Dpa に配位することにより、Dpa 部位が rigid 構造になり、会合するのが困難であるが、会合した NDI-Dpa-Zn は DNA 骨格のリン酸ジエステルと Zn-Dpa 部位が相互作用して解離しにくくなり、結合能が高いことが明らかとなった。このように DNA との強い相互作用を示したことから、実際にリン酸モノエステルを有する 8 量体のオリゴヌクレオチドを用いて、吸収スペクトルにより評価した。リン酸モノエステルを有したオリゴヌクレオチドの方が、リン酸モノエステルを有していないオリゴヌクレオチドよりも約 4 倍強く結合することと NDI-Dpa-Zn が結合している個数も同じであることが明らかと

なった。したがって、NDI-Dpa-Zn の Zn-Dpa は DNA 骨格のリン酸ジエステルよりもリン酸モノエステルの方に強く相互作用し、リン酸モノエステルとリン酸ジエステルを識別することができる試薬であることが示された。また、DNA を DNase I で処理したサンプルと NDI-Dpa-Zn との相互作用を吸収スペクトルにより評価した。DNase I で処理したサンプルは未処理サンプルの約 2 倍の強さで結合し、長い DNA にも関わらず、リン酸モノエステルを選択的に相互作用していることが明らかとなった。したがって、NDI-Dpa-Zn はこれまでに開発されてきた DNA 損傷検出よりも、簡便に検出することができる試薬であることが示された。

第 3 章では、Fc と β -CD を有する FNC を設計・合成を行った。Huisgen 環化反応(Click chemistry)により、非常に簡便で迅速に反応が進行し、高純度の FNC を合成することに成功した。次に、開発した FNC を CD スペクトル、吸収スペクトル、蛍光スペクトル、そして電気化学測定により評価したところ、FNC は水溶液中では Fc が β -CD に分子内包接していることが明らかとなった。次に、吸収スペクトル、CD スペクトル、Topoisomerase I assay、Stopped-flow 測定より、開発した FNC と DNA との相互作用解析を評価した。三元錯体を用いた系と比較すると、DNA との結合能は低く、会合速度も遅いが、解離速度は同等であることが示された。また、CD スペクトルより、DNA に結合することで FNC の Fc が β -CD に包接しているといった新たな知見が得られた。このように、DNA の存在下と非存在下で、FNC は興味深い構造であることが明らかとなった。そこで、DNA 存在下と非存在下で、電気化学測定を行った。DNA 存在下での FNC の電気化学測定では、新たな還元電流値の出現が明らかとなった。この現象を、AFM 測定によって評価したところ、DNA に添加する FNC の濃度を高くすることで凝集をしている様子が観測された。つまり、FNC によって誘起された DNA の高次構造の変化に伴い、2 種類の構造が電極への吸着により生じた結果であることが明らかとなった。さらには、新たな還元電流値によって DNA の定量的な評価も可能になることが示された。また、1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA の識別も FNC によって誘起させた DNA の高次構造の変化を利用して有意な差が得られた。このように、FNC は固定化電極を用いた検出系に変わりうる手法を確立することができる有用な試薬であり、「signal on」型の電気化学的遺伝子検出を達成することが可能となった。

第 4 章では、ナフタレンジイミドと Fc の間にトリアゾール基を導入した FNF を設計・合成した。第 3 章と同様に Huisgen 環化反応で高純度の FNF を合成することに成功した。次に、吸収スペクトル、CD スペクトル、Topoisomerase I assay、Stopped-flow 測定より、開発した FNF と DNA の相互作用解析を行った。従来 of FND と比較すると、熱力学的な観点からすると、同じ結合能であったが、速度論的な観点からすると、FND よりも遅い結合であることが分かった。これは、FNF のリンカーに導入されたトリアゾール基によるものと示された。FND に比べて結合時間はかかるが、結合能は同じであるので、電気化学的な遺伝子検出に適應できることが明らかとなった。そこで、GC 電極を用いて、FNF 及び FNF と DNA 複合体の電気化学測定を行ったところ、DNA が存在すると電流値が増大することが明らかとなった。したがって、GC 電極に吸着した FNF は Fc の電子移動が NDI の薄

膜によって阻害されて電流値が小さくなり、そこに DNA が存在すると FNF は DNA に結合し、NDI の電極から脱着が起こり、電流値の回復が観測された。さらには、DNA の濃度に応じて、電流値は定量的な変化を示した。また、この検出系を利用して、1 本鎖と 2 本鎖の電気化学測定を行ったところ、1 本鎖と 2 本鎖の FNF の結合能の違いによって、1 本鎖に比べて 2 本鎖の電流値が大きいことが明らかとなった。このように、FNF は 1 本鎖と 2 本鎖の識別を達成することができたので、著者は長い DNA 配列に部分的にハイブリダイゼーションさせたサンプルの検出を達成することができると考えた。実際に、部分的にハイブリダイゼーションさせたサンプルを高精度に検出することに成功した。本実験で用いた PCR 産物はテロメラーゼ活性に関係がある hTERT 遺伝子の検出を行ったが、臨床診断へ応用するためには様々な遺伝子に関して行う必要がある。しかし、本手法はこれまでにない検出系であり、簡便性が必要である臨床診断への適用を秘めた手法である。

以上の成果から、本研究で開発したナフタレンジイミド誘導体は、均一溶液中での検出が可能な試薬であり、遺伝子検出において簡便に検出することが達成できるものと期待される。さらには、検出したいサンプルに適応が可能であり、ナフタレンジイミドに様々な機能的な官能基を導入することで遺伝子分析へのさらなる発展が可能になることが示された。

5-2. 本研究における今後の展望

本研究の成果から、著者は新たな遺伝子検出を考えた。第4章での1本鎖PCR産物の部分ハイブリダイゼーションサンプルの電気化学的検出を達成したことから、FNFを用いたSNPs検出を考案した。SNPsが存在することで、mRNAへの転写に影響を及ぼし、さらには、mRNAの塩基配列が異なることで、タンパク質のアミノ酸配列も変化し、タンパク質の働きに影響を及ぼすことが言われている。つまり、一塩基の違いにより、異常なタンパク質に翻訳されることで、疾病にかかりやすさや癌になりやすさなどに影響を及ぼすようになる。また、ヒトによっては同じ薬を同じ量だけ飲んだとしても、応答性の違いや副作用の違いがある。このような背景の基、現在の医療現場では疾病の早期診断やゲノム創薬において、遺伝子検出は重要となる。さらには、様々な遺伝子を検出することで、病気のリスク診断や個人にあった薬剤の量を決定するなどオーダーメイド医療へ発展が期待されている。このように、SNPsを検出することは非常に重要となり、迅速に検出が可能なツールが望まれている。そこで、FNFを用いた検出系を利用することで、SNPsの迅速検出が達成できるものと考えられる。その検出法をFigure 5-1に示している。初めに検出したい領域の1本鎖PCR産物を調製し、そこに検体をハイブリダイゼーションさせる。DNAが野生型であれば、ハイブリダイゼーションするとフルマッチを形成する。それに対して、DNAが変異型であれば、ハイブリダイゼーションするとミスマッチを形成する。この違いは、DNAのハイブリダイゼーション効率とミスマッチへの結合能の低下で検出することができるものと期待される。

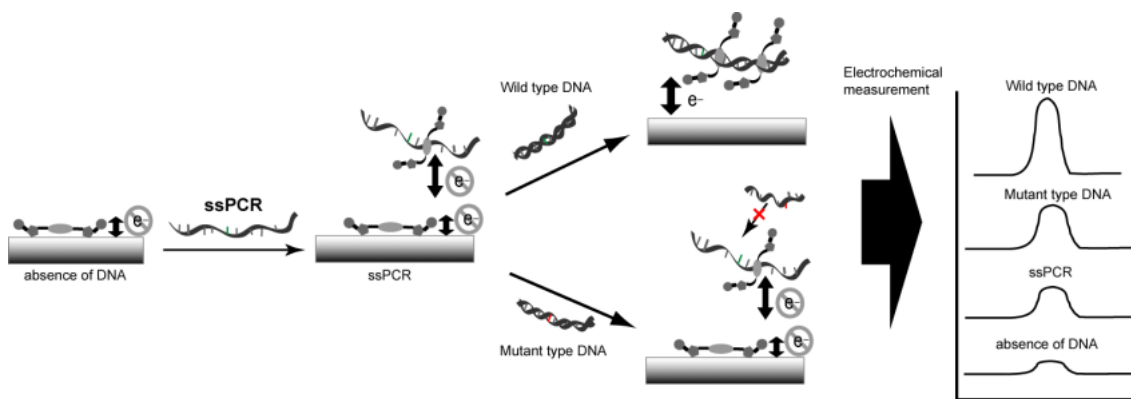


Figure 5-1. FNF を用いた SNPs 検出の概念図.

また, FNF を用いた RNAi の電気化学的モニタリングが可能になるものと期待される. RNAi (RNA interference)のメカニズムは mRNA に siRNA (small interfering RNA)が部分的にハイブリダイゼーションし,その後 RISC によって, mRNA が切断され,短い RNA 断片が得られる. RNAi のメカニズムをモニタリングすることで,医学・薬学分野の進展が期待される.そこで, Figure 5-2 に示しているようなモニタリングの概念図を考えた.ここで, siRNA の量に応じて, mRNA にハイブリダイゼーションした量が異なるので,電気化学的シグナルにも違いが得られるものと考えられる.したがって, mRNA の発現量をモニタリングすることを達成することができ,遺伝子診断での疾病の早期発見が期待される.

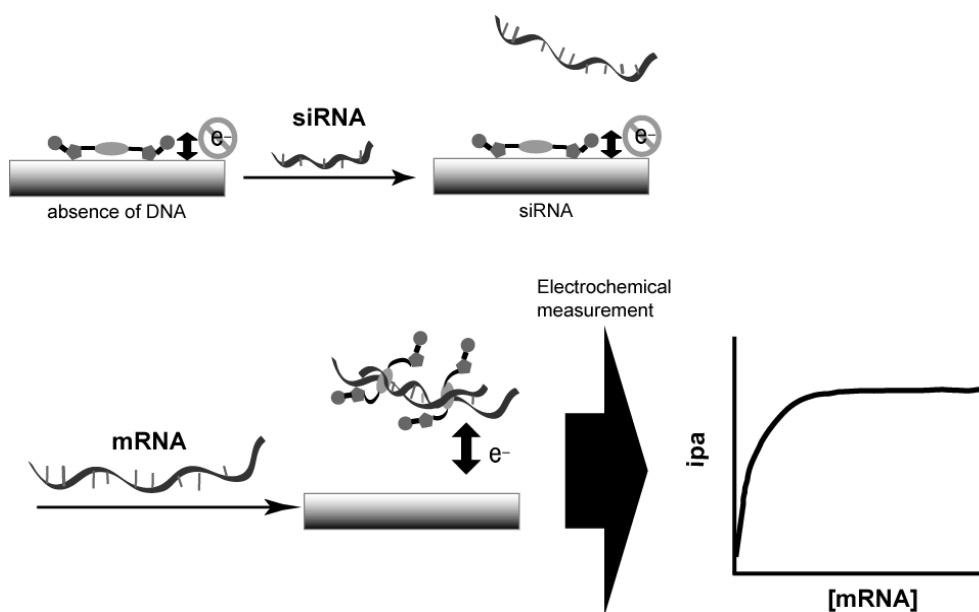


Figure 5-2. FNF を用いた RNAi のモニタリングの概念図.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導頂きました九州工業大学工学研究院物質工学研究系応用化学部門 竹中繁織 教授、九州工業大学 近藤寛樹 名誉教授、九州工業大学工学研究院物質工学研究系応用化学部門 大塚圭一 助教、九州工業大学バイオマイクロセンシングセンター 佐藤しのぶ 博士（現 産学連携研究員）に深く感謝致します。本論文の執筆にあたり、適切なご教示、ご助言を賜りました九州工業大学工学研究院物質工学研究系応用化学部門 吉永耕二 教授、横野照尚 教授、九州工業大学工学研究院基礎科学研究系 出口博之 教授に厚く御礼を申し上げます。また、研究を遂行するにあたり、研究運営費を提供して頂いた独立行政法人 日本学術振興会に深く感謝致します。

竹中繁織 教授には、常日頃から叱咤激励をして頂き、また研究に関するご助言、また自由な研究環境を与えて頂き、重ねて御礼を申し上げます。近藤寛樹 名誉教授には、本研究における有益なご助言、学術論文作成にお付き合いして頂き、重ねて御礼を申し上げます。また、精神的にも鍛えて頂き、見習うべき研究姿勢を先生方から多くのことを学ぶことができました。研究室で培ってきた知識や技術は、今後とも非常に役に立つと思います。誠に有難うございました。合成や装置の扱い方に関して有益なご助言頂き、さらには苦境の時に精神的に支えて頂いた大塚圭一 助教、インターカレーターと DNA との相互作用、電気化学実験に関して様々なご助言を頂き、研究生活を楽しくさせて頂いた 佐藤しのぶ 博士には、心から感謝致します。また、本研究における適切なご指導・ご助言のみならず、実験への取り組む姿勢、後輩の指導方法など多くのことを学ばせて頂き、誠に有難うございました。さらには、公私共に親交が深く、非常に楽しい 6 年間で過ごすことができたのも、お二人のおかげだと思います。本当に有難うございました。実験機具、合成試薬の管理、実験技術的にサポートして頂いた辛川弘行 氏（現 技術職員）、事務的にサポートし、たわいもない話に付き合ってくれた原田香緒里 氏（現 事務補佐員）には、深く感謝致します。有難うございました。また、研究に関する参考文献を提供して頂いた脇道典 先生には、深く感謝致します。また、6 年間という長い研究室生活を全面的にサポートして頂いた先輩、同輩、そして後輩の皆様方に心から感謝致します。振り返ってみますと、私が研究室配属されて、ここまで頑張れたのも、先生方を初め皆様のおかげであります。有難うございました。

就職活動で苦楽を共にし、さらには研究室運営を円滑に進めてくれた大島毅士 君（現 博士前期課程 2 年）、兼崎祐介 君（現 博士前期課程 2 年）、本田聡志 君（現 博士前期課程 2 年）には大変感謝しています。君たちとの 3 年間の思い出は色濃く残り、私の財産です。本当にありがとう。これからは違う道を進みますが、大いなる活躍を期待しています。

何か私の異変に気付いた時にすかさず声をかけて私をバックアップしてくれて、さらには研究室で沢山の思い出を提供してくれた池堂英幸 君（現 博士前期課程 1 年）、久保田真 君（現 博士前期課程 1 年）、古賀太地 君（現 博士前期課程 1 年）、福田圭介 君（現 博士前期課程 1 年）、福永雄祐 君（現 博士前期課程 1 年）、山村浩介 君（現 博士前期課程 1 年）には、大変

感謝しています。君たちのポテンシャルは非常に高いです。これからも頑張って、素晴らしい研究成果を期待しています。2年間同じ研究室生活を送りましたが、君たちと一緒にいて本当に楽しかったです。本当にありがとう。

本論文の第4章の一部に関して、私の厳しい要求にも応えて非常に素晴らしい成果を出してくれた竹中大豊君(現 学部4年)、全員でいつも私を楽しませてくれた大澤信介君(現 学部4年)、大島敏史君(現 学部4年)、緒方宏光君(現 学部4年)、田中智基君(現 学部4年)、長田真一郎君(現 学部4年)、福瀧修司君(現 学部4年)には心から感謝致します。1年間という短い研究生生活ではありましたが、君たちの笑顔で私は救われた部分があります。本当にありがとう。君たちの結束力は、どこにも負けないと思います。これからも、その結束力と笑顔で楽しい研究室を送ってください。そして、素晴らしい研究成果を期待しています。

また、博士後期課程の同期であります固体物性研究室 岡田浩一 氏、有機合成化学I研究室 藏本晃士 氏、有機材料化学研究室 山田修平 氏には、いつも助けて頂きました。みんなのおかげで、研究生生活や大学院生活を頑張れたと思います。本当にありがとう。また、楽しい思い出が沢山でき、有意義な学生生活を送れたと思います。これからはお互い違う道に進みますが、みんなの活躍を大いに期待しています。そして大学9年間で出会った沢山の皆様に心から感謝致します。有難うございました。

最後に、大学9年間という長い学生生活を支えてくれた父 渡邊弘二、母 渡邊陽子、祖母 渡邊美代子、そして親戚の皆さんに心から感謝致します。ここまで成長できたのも家族と親戚の皆さんのおかげです。本当に有難うございました。

H 23 年 3 月

渡邊 貞佳