

博士学位論文

環境感応型蛍光プリンヌクレオシドの
開発と DNA プローブへの応用

*Development of environmentally sensitive fluorescent purine
nucleosides and their applications to DNA probe*

2014 年

日本大学大学院工学研究科
物質化学工学専攻

鈴木 梓

目次

| | | |
|------------|--|----|
| 第1章 | 序論 | 1 |
| 1.1 | はじめに | 2 |
| 1.2 | 核酸の特殊構造 | 2 |
| 1.3 | 遺伝子検出技術の研究 | 4 |
| 1.4 | 様々な蛍光核酸塩基誘導体 | 6 |
| 1.5 | 環境感応型の蛍光特性を示す分子 | 8 |
| 1.6 | 本研究の目的 | 9 |
| 1.7 | 本論文の構成 | 10 |
| | 参考文献 | 11 |
| 第2章 | ナフタレン含有環境感応型蛍光 2'-デオキシアデノシン誘導体の合成と遺伝子検出への応用 | 14 |
| 2.1 | 緒言 | 15 |
| 2.2 | 実験と結果 | 18 |
| 2.2.1 | C8 位にナフチルエチニル基を有する 2'-デオキシアデノシン誘導体の合成 | 18 |
| 2.2.2 | C8 位にナフチルエチニル基を連結した 2'-デオキシアデノシン誘導体の光学特性 | 19 |
| 2.2.3 | 環境感応型蛍光 2'-デオキシアデノシン誘導体を含む ODN の合成 | 23 |
| 2.2.4 | 塩基対形成能についての考察 | 25 |
| 2.2.5 | 遺伝子検出プローブについての評価 | 25 |
| 2.3 | 結論 | 29 |
| 2.4 | 実験項 | 30 |
| | 参考文献 | 45 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 第3章 | DNA 二重鎖構造を不安定化しない環境感応型蛍光 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の開発 | 47 |
| 3.1 | 緒言 | 48 |
| 3.2 | 実験と結果 | 50 |
| 3.2.1 | C7位にアリールエチニル基を有する7-デアザ-2'-デオキシアデノシン 誘導体の合成 | 50 |
| 3.2.2 | 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の光学特性 | 50 |
| 3.2.3 | 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の構造確認 | 56 |
| 3.2.4 | 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体を含むODNの合成 | 57 |
| 3.2.5 | ^{cnz} A含有二重鎖DNAのCD測定による構造確認 | 59 |
| 3.2.6 | ^{atz} Aおよび ^{cnz} A含有ODNの遺伝子検出プローブについての評価と考察 | 60 |
| 3.3 | 結論 | 63 |
| 3.4 | 実験項 | 64 |
| | 参考文献 | 71 |
| 第4章 | ワトソン-クリック塩基対形成可能な環境感応型蛍光 プリンヌクレオシドの開発と遺伝子検出能評価 | 72 |
| 4.1 | 緒言 | 73 |
| 4.2 | 実験と結果 | 74 |
| 4.2.1 | 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン誘導体 ^{na} Gの合成 | 74 |
| 4.2.2 | 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン誘導体 ^{na} Gの光学特性 | 74 |
| 4.2.3 | 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン誘導体 ^{na} G含有ODNの合成 | 77 |
| 4.2.4 | ^{na} G含有二重鎖DNAのCD測定による構造確認 | 79 |
| 4.2.5 | ^{na} G含有ODNの塩基対形成能および塩基認識能評価 | 80 |
| 4.2.6 | ^{na} Gを用いたbcr/abl遺伝子検出プローブへの応用 | 84 |
| 4.3 | 結論 | 87 |
| 4.4 | 実験項目 | 88 |
| | 参考文献 | 91 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 第5章 | 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の蛍光特性と一塩基変異識別プローブへの応用 | 92 |
| 5.1 | 緒言 | 93 |
| 5.2 | 実験と結果 | 94 |
| 5.2.1 | 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 ^{cna} A の合成 | 94 |
| 5.2.2 | 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 ^{cna} A の光学特性 | 94 |
| 5.2.3 | 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 ^{cna} A 含有 ODN の合成 | 99 |
| 5.2.4 | ^{cna} A 含有二重鎖 DNA の CD 測定による構造確認 | 102 |
| 5.2.5 | ^{cna} A 含有 ODN の塩基対形成能および塩基認識能評価 | 103 |
| 5.2.6 | ^{cna} A 含有オリゴヌクレオチドを利用した RNA 検出プローブとしての評価 | 106 |
| 5.3 | 結論 | 108 |
| 5.4 | 実験項 | 109 |
| | 参考文献 | 112 |
| 第6章 | 総括 | 113 |
| | 謝辞 | 118 |
| | 本論文を構成する査読論文 | 119 |

第 1 章

序論

1.1 はじめに

地球上に存在するあらゆる生物の基本的な構成単位である細胞の核には、遺伝情報を担う DNA (デオキシリボ核酸 : deoxyribonucleic acid) が存在している。DNA は、糖 (デオキシリボース)、リン酸、塩基から構成されるデオキシヌクレオチドが、自身のリン酸と他のヌクレオチドの糖部分の 3'-水酸基とホスホジエステル結合を介して、連続的に連結し、鎖状の分子構造 (ポリマー) を形成している。モノマーであるヌクレオチドの一部をなす塩基には、プリン塩基であるアデニン (A)、グアニン (G)、ピリミジン塩基であるシトシン (C)、チミン (T) の四種類があり、DNA の配列はヌクレオチドの塩基部分の違いによって決定されるため、塩基配列と呼ばれている。この塩基配列は、タンパク質をつくるアミノ酸配列を決定するための重要な遺伝情報となっている。

DNA は二本のデオキシヌクレオチド鎖が、互いに反対向きに配向し、右巻きの二重らせん構造を形成していることが、1953 年、ワトソンとクリックによって提唱された¹⁾。二本の DNA 鎖は相補的な塩基対となるアデニン(A)-チミン(T)、グアニン(G)-シトシン(C) でそれぞれ水素結合を形成することによって結合しており、さらに A-T 間に二つ、G-C 間に三つの水素結合が存在することが示された。その他にも DNA の内側は疎水性環境により、塩基対が上下で近づくような力が働き、 π - π スタッキング効果によって二重らせん構造が安定化されていることなどが解明されている。そのために、二重鎖構造は完全に規則正しいらせん構造ではなく、らせん内に幅の大きい主溝 (メジャーグループ)、小さい副溝 (マイナーグループ) という二種類の溝ができ、この溝はタンパク質などの小分子が DNA を認識するうえで重要な役割を果たしていると考えられている。

1.2 核酸の特殊構造

DNA 二重鎖は様々な立体構造をとることが知られている (Fig. 1-1)。生体内で最も一般的なワトソンとクリックが提唱した右巻きの B 型構造 (B-DNA) 以外にも、立体構造が少し異なる A 型、左巻きの Z 型など多様な構造を形成することが X 線結晶構造解析や NMR などによって明らかにされている。例えば、低塩濃度の条件下や RNA 二重鎖の場合には A 型構造をとり^{2,3)}、シトシン塩基とグアニン塩基が交互に繰り返して並ぶ配列において、塩濃度が高い場合に、B 型から Z 型への構造転移が見られる⁴⁻⁶⁾。

DNA は二重らせん以外の構造を形成することも報告されている (Fig. 1-2a,b)。一方のオリゴヌクレオチド鎖がすべてプリン塩基で、もう一方がすべてピリミジン塩基の配列において、新たな第 3 のピリミジン塩基からなる鎖が、プリン塩基の N7 位との間でフーグスティン塩基対⁷⁾ と呼ばれる水素結合を組むことによって、三重鎖構造をとることが可能となる^{8,9)}。また、DNA や RNA 配列にグアニン塩基が多いとフーグスティン塩基対型の四重鎖

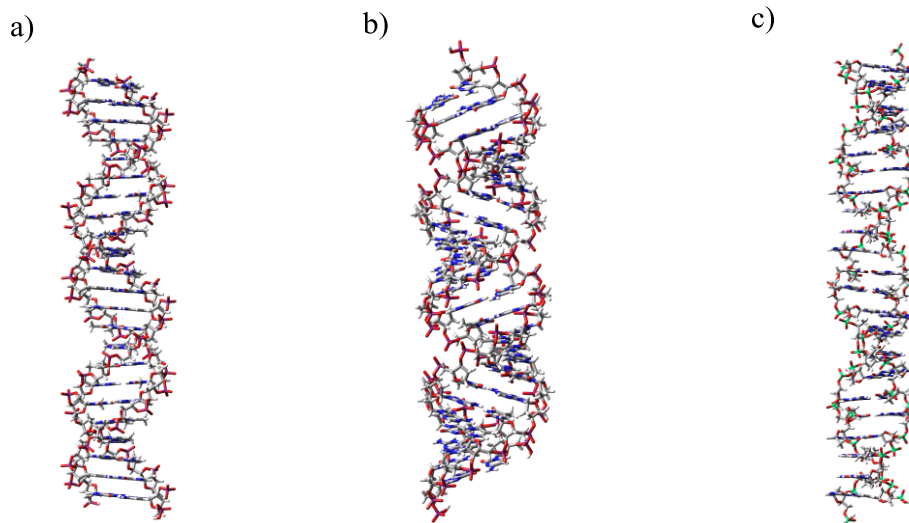


Figure 1-1. Structure of DNA duplexes (a) B-form, (b) A-form, and (c) Z-form.

構造 (G-カルテット) をとることが知られており¹⁰⁻¹²⁾、これらの多重らせん構造は生体内で存在し得ることから、DNA の重要な機能を担っていると考えられている。

生体内には、フーグスティン型塩基対以外にもミスマッチ塩基対や、塩基対を形成していない状態のバルジ、ヘアピンループ、アベーシックサイト (AP site) などが存在し、特殊構造として、ワトソン-クリック塩基対と組み合わせたり、二重らせんを形成している場合がある (**Fig. 1-2c**)。特に、RNA にはこれらの特殊構造が含まれており、例えば、RNA とタンパク質とが相互作用する際の認識部位とされていたり、遺伝子の損傷部位や欠陥部位など、生体内で重要な役割を果たしている。つまり、核酸の高次構造に伴う微細な特殊構造を認識できれば、それらの役割や機能を解明できるだけでなく、それらを標的とした薬剤などの機能性分子の設計に有用であると考えられる。

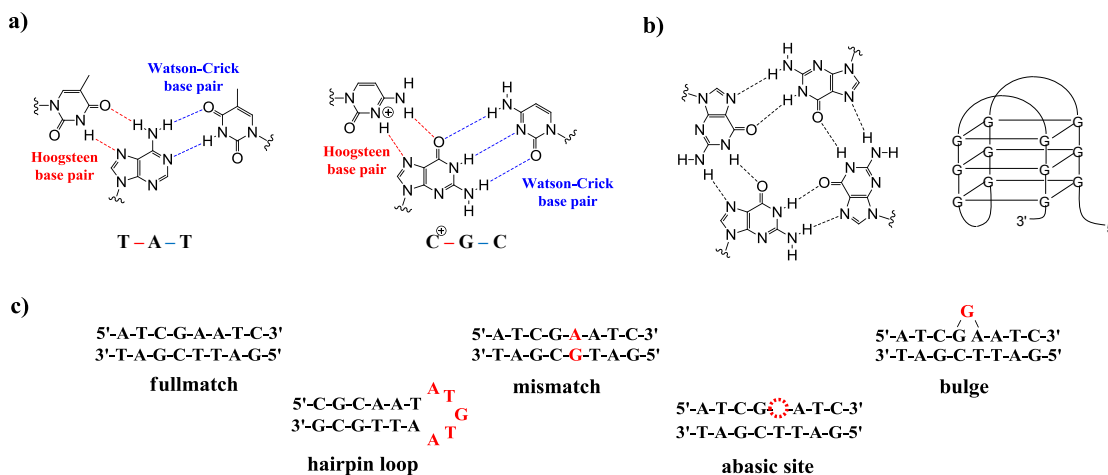


Figure 1-2. Structure of (a) Hoogsteen base pairs, (b) G-quadruplex, and (c) fullmatch, mismatch, bulge, hairpin loop, and abasic site.

1.3 遺伝子検出技術の研究

近年、DNA マイクロアレイ (DNA チップ) を始めとする遺伝子検出技術の研究や開発が盛んに行われている。ヒトゲノムには約三十億の塩基対からなるが、数千塩基に一つ程度、各個人によって異なる配列部分が存在する。それを一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) と言い、個人の外見や性格、体質に至るまで個性を決定する最小単位である。さらに、一塩基多型は疾病リスクや薬剤代謝に関わりを持つことから、SNPs の解析が瞬時に可能になると個人の体質に合わせた治療 (テーラーメイド医療) への可能性が広がると期待されている^{13,14)}。従って、臨床検査や医療診断で使用するための多くの SNP タイピング技術が開発されている。現在では、DNA チップの他にも、TaqMan RCR 法¹⁵⁾、Invader assay 法¹⁶⁾、モレキュラービーコン(MB)法^{17,18)}、QP 法¹⁹⁾などが挙げられる。これらは、全て、標的遺伝子を蛍光標識することで、蛍光測定により検出できるシステムとなっているが、ハイブリダイゼーション後の、標的となるものとそうでないものを熱安定性の差を利用した洗浄操作を行ってから、蛍光検出するという一連の流れが基本であり、条件的に厳しいものとなっている。そこで、より単純な操作で精度よく検出できるシステムの開発が求められる。

遺伝子配列や SNP など DNA の構造変化を簡便に検出するには、やはり、蛍光シグナルによる検出方法が最も有効な手段であり、齋藤らによって開発された塩基識別型蛍光性 (BDF: base discriminated fluorescent) 核酸塩基 (Fig. 1-3) は、あらかじめ色素などの蛍光発色団を連結したヌクレオシドを含む DNA と標的遺伝子をハイブリダイゼーションさせ、人工ヌクレオシドの相手側の塩基の種類を蛍光の強さで判別できるというものである²⁰⁻²⁸⁾。また、標的の塩基を単に蛍光強度を測定するだけで識別できるこの方法は、サンプルの蛍光標識のラベル化やその洗浄操作が不要であるために、工程を大きく簡略化することが可能であった。共役系拡張型蛍光核酸塩基である **MDA** および **MDI** は標的遺伝子 (相補鎖) の相手塩基がそれぞれシトシン、チミンの時、最も強い蛍光を示すことから BDF 塩基の機能を果たしている^{21,27)}。さらに発展させた BDF 塩基として、**PyU** および **PyC** がある。**PyU** および類似の **PyC** は標的遺伝子 (相補鎖) の相手塩基がそれぞれアデニン、グアニンの時、最も強い蛍光を示す特徴を持っている^{22,27)}。特に、ピレン-1-カルボキシアリドを含む蛍光分子は、周辺の溶媒の極性環境に鋭敏な蛍光を示す (無極性溶媒中ではほとんど発光しないが、極性溶媒中では、発光する) ことを利用して、**PyU**、**PyC** は相手塩基と水素結合をした場合のみ、その蛍光分子が、DNA 二重鎖の外側である極性環境下に押し出されることで、マッチしたときのみ強い蛍光を示すようになっている。従って、BDF 塩基のようなプローブを使った SNP タイピング法は従来の SNP タイピングに代わる強力な方法になった。

しかしながら、BDF 塩基の発光波長は 400 nm と短いことから、DNA チップなどのガラス基板上で用いるためには、検出感度の点で欠点が見られた。そこで、500 nm の長波長領域で発光するペリレン骨格にした BDF 塩基 (ミスマッチである C を認識) や蛍光共鳴エネ

ルギー移動 (FRET: fluorescence resonance energy transfer) を利用することで、520-550 nm の蛍光で検出できる BDF 塩基へと改良されている²⁸⁾。

上述したように、蛍光標識化の省略やハイブリダイゼーション後の洗浄の不要は、解析の簡略化やコストの低減などに十分に期待できる。さらに、FRET 型 BDF 塩基は検出波長も長いことから、実用的で、DNA チップや細胞系に応用することも可能と考えられるが、天然のヌクレオシドに二種類の蛍光色素を導入しなければならないために、合成的にはかなり、手間がかかる。そこで、従来の BDF 塩基に代わる新たな蛍光修飾核酸塩基の開発が望まれている^{29,30)}。

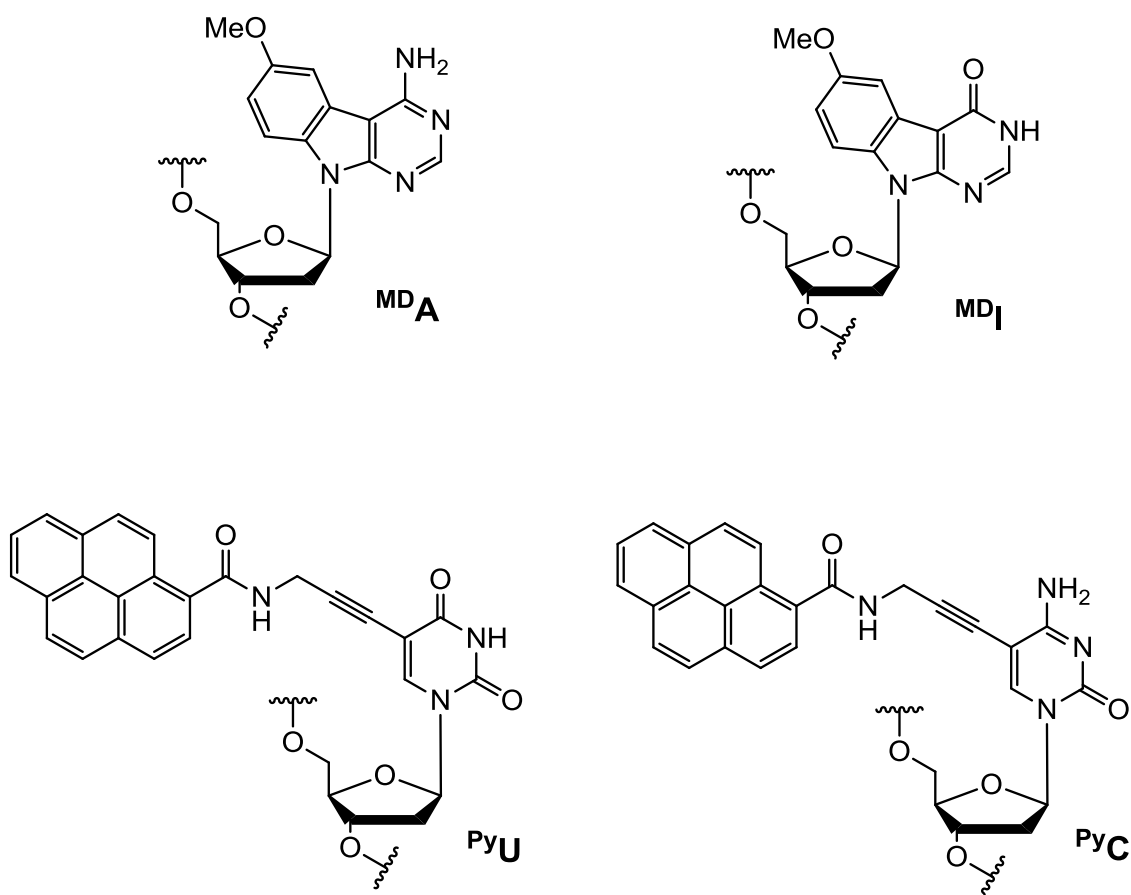


Figure 1-3. Chemical structure of BDF nucleobase, **MDA**, **MDI**, **PyU**, and **PyC**.

1.4 様々な蛍光核酸塩基誘導体

これまでに様々な蛍光を示す核酸塩基誘導体が報告されている (Fig. 1-4)。2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、フォルマイシンは単純な構造ながら、340-370 nm の蛍光を示すアデニンの類似体である。その中でも特に、2-アミノプリンは2,6-ジアミノプリン ($\Phi_f = 0.01$)、フォルマイシン ($\Phi_f = 0.06$) に比べて、高い蛍光量子収率 ($\Phi_f = 0.68$) を示すことが知られている³¹⁾。アデニンの代わりに DNA や RNA に導入すれば、相補鎖側の相手塩基であるチミンと塩基対を形成することができるが、その認識能力は低く、さらに、近傍の塩基とのスタッキングで消光してしまう特徴もみられるが、その興味深い光物理的特性について、多くの研究の対象となっている誘導体である³²⁻³⁵⁾。

また、ナフタレンよりもアントラセンの方が、より長い波長で高い発光強度を示すように、天然の核酸塩基の一部の環を拡張することで、蛍光を示すことが可能である。天然のアデニンは蛍光を示さないが、Leonard らによって報告された benzo-A は 358-395nm の波長で蛍光を示し、高い蛍光量子収率 ($\Phi_f = 0.44$) を示す化合物である³⁶⁻³⁸⁾。その他にも etheno-A^{39,40)}をはじめとする様々な共役系拡張型蛍光核酸塩基が登場しており⁴¹⁻⁴³⁾、シトシン類縁体である tC は 500nm の長波長で蛍光を示し、DNA 中では、相補鎖側のグアニン塩基と水素結合を形成するだけでなく、周辺の塩基配列に蛍光消光を受けないことが確認されている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。

その他にも、天然塩基の代わりに直接、蛍光色素を置換した疑似ヌクレオシドなども開発されている。その中でも、ピレンヌクレオシドは、水素結合による相手塩基の認識がないだけでなく、2-アミノプリン同様、周辺の塩基対の相互作用によって蛍光消光してしまう特徴が見られる。しかしながら、相補鎖側の相手の塩基部位が欠如したような構造 (アベシックサイト) では、ピレンなどの多環芳香族化合物が二重鎖の内側に入り込みインターカレーションすることによって、二重鎖構造の安定化が示されている⁴⁷⁻⁴⁹⁾。

これまで紹介してきたのは蛍光性塩基類縁体であったが、最も単純に蛍光を示す方法として天然の塩基構造を保持しつつ蛍光色素などを直接置換することである。天然のプリン塩基の 8 位やピリミジン塩基の 5 位は置換基を導入することが可能であるが、特に、ピリミジン塩基の 5 位の修飾位置は DNA 二重鎖のメジャーグループの大きな空間となっており、DNA 二重鎖形成の立体障害とならないために、上記で示した PyU など、蛍光色素を導入する上で最適な置換位置であると考えられる。そのため、様々な研究者らによって C5 位置換ピリミジン誘導体が開発されている^{22,50-52)}。

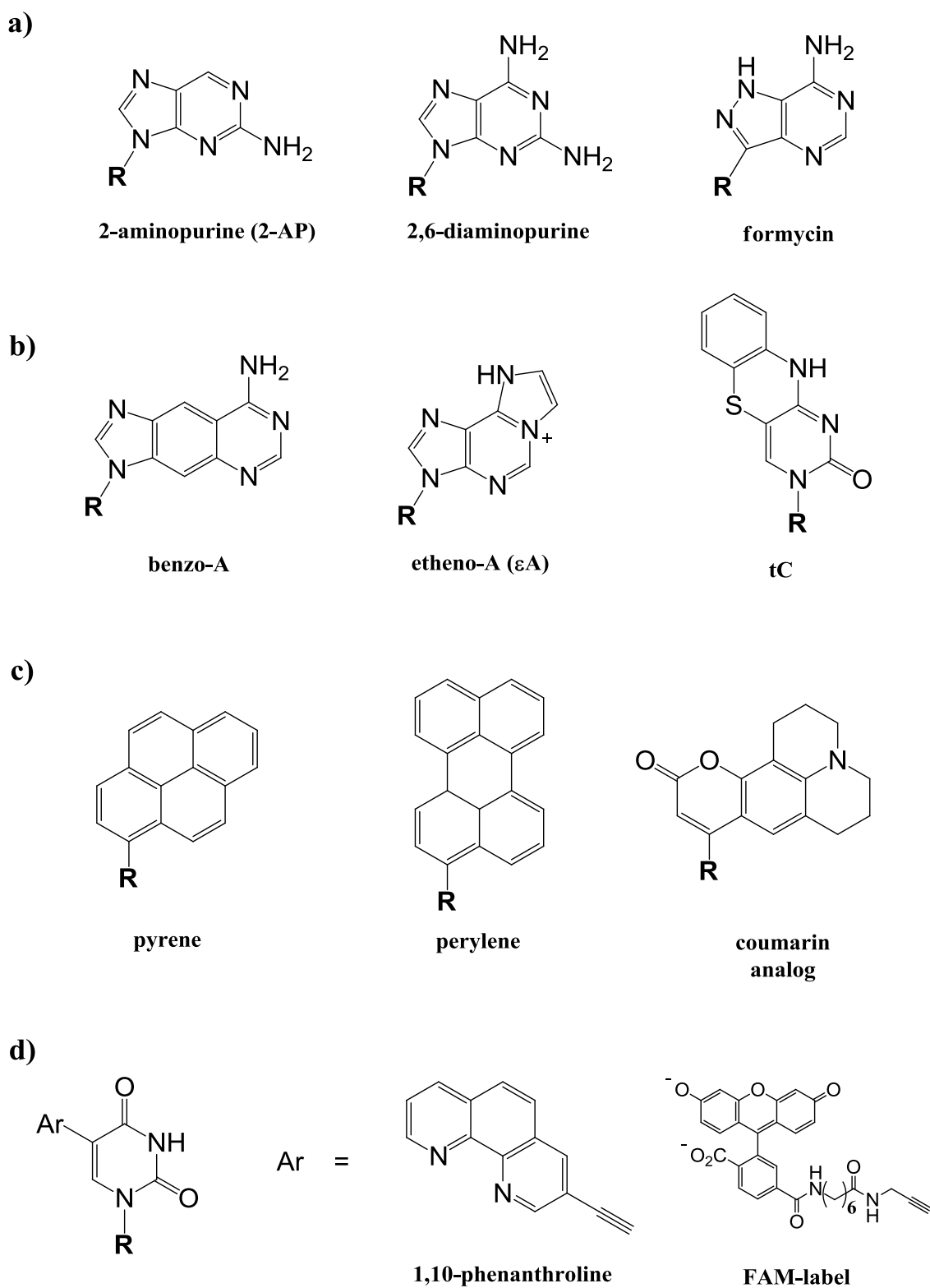


Figure 1-4. Structure of fluorescent nucleoside analogs; (a) isomorphous, (b) π -expanded, (c) chromophoric, and (d) fluorescent conjugated nucleobases (**R** = ribose or 2'-deoxyribose).

1.5 環境感応型の蛍光特性を示す分子

これまで数多くの研究者らによって蛍光核酸塩基の報告や開発がされてきたが、BDF 塩基のように、例えば、DNA 二重鎖のマッチ-ミスマッチの違いを蛍光強度の増大で明瞭に識別できるようなインテリジェントな分子はほとんど報告されていない。また、生体分子の局所的な構造変化や極性変化は、それら生体分子間の相互作用に大きく関わっているとされていることから、DNA のマッチ-ミスマッチに関わらず、これらの変化を解析することができるプローブの開発が望まれる。その 1 つのアプローチとして周辺の局所的な環境変化に応答する蛍光分子を用いる方法が挙げられる。そのような極性変化に応じて蛍光発光が変化する分子として、4-ジメチルアミノベンゾニトリル (DMABN)⁵³⁻⁵⁵⁾ がある。DMABN は分子内に *N,N*-ジメチルアミノ基とシアノ基を共存する芳香族化合物であり、無極性溶媒中では、光励起によって LE (Local Excited) 発光を示し、極性溶媒中では、分子内電荷移動 (ICT: Intramolecular Charge Transfer) 発光が起きる特徴を持っている。つまり、分子内に電子供与性基と電子吸引性基が共役されるような構造を持つと、溶質の基底状態と励起状態が、溶媒の極性や性質によって、安定化もしくは不安定化されることで、蛍光波長や強度に影響を与える。その結果、分子内の電荷移動による ICT 状態の蛍光が起きると蛍光波長が長波長シフトするケースが多い^{56,57)}。また、6-dimethylamino-2-acrylnaphthalene を基本骨格とする化合物は、電子供与性基として、*N,N*-ジメチルアミノ基、電子吸引性基としてアシル基を含むことで、鋭敏なソルバトフルオロクロミックな性質を示す。そこで、PRO DAN (6-propionyl-2-*N,N*-dimethylaminonaphthalene)をはじめとするその誘導体は、極性環境変化をモニターするレポーター分子として利用されており、生体分子に起こる構造変化や分子認識、DNA-タンパク質の相互作用などにおける微視的な環境変化をモニターするプローブとして有用であると示されている⁵⁸⁻⁶³⁾。

上述したように、周辺の極性変化に応じて蛍光発光が劇的に変化することで、その分子周辺の局所的な環境変化を追跡することが可能であることから、そのような性質を示す蛍光核酸塩基の開発が盛んに行われている⁶⁴⁻⁶⁹⁾。近年では、Srivatsan らが開発したベンゾフランを直接連結させたウリジン誘導体をはじめ^{64,65)}、Hocek らによって開発された aminobenzoxazolyl-fluorophenyl 基や緑色蛍光たんぱく質 (GFP: green fluorescent protein) 発色団を含むピリミジン誘導体はいずれもソルバトフルオロクロミックな性質を示すことに成功している^{66,67)}。これらはオリゴヌクレオチド中で、極性や pH 変化の違いを利用して、アベシックサイトやタンパク質の相互作用を蛍光波長の変化で識別できるプローブとして利用しているが、その波長変化は大きくなく、DNA 二重鎖のマッチやミスマッチ構造などのさらに微細な構造変化を蛍光波長の変化で識別するには至っていないのが現状である。

1.6 本研究の目的

1.5 で述べたように、近年では、周辺の極性変化や pH 変化に鋭敏に応答して、蛍光強度だけでなく波長が変化する環境感応型蛍光核酸やその類縁体の開発が盛んに行われている。そのような特性を示す化合物は標的遺伝子の検出のみならず、マッチ-ミスマッチといった一塩基の違いや脱塩基などの欠損部位といった DNA の局所的な構造変化や、タンパク質との相互作用部位における微細な極性変化を蛍光発光の変化でリアルタイムに追跡できるプローブとしての応用が期待できる。これまでに、優れたソルバトフルオロクロミックな蛍光ヌクレオシドは数多く存在しているが、しかしながら、その機能性ヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドレベルで、蛍光波長の劇的な変化でセンサー機能を有する報告例は少ない。また、様々な機能を有するような置換基を簡便に修飾することが可能なことから、そのほとんどが、ピリミジン塩基誘導体である。一方、本研究では、当研究グループで数年前からのデザインコンセプトである、単純に、蛍光色素を修飾するだけでなく、核酸塩基自身も共役させることで蛍光色素の一部とする、環境感応型蛍光核酸の開発を目指した。より長波長で発光させるために、共役構造の置換基を変えることによって核酸塩基自身も含めた分子内電荷移動 (ICT) 発光を創出させる分子デザインとした。天然の核酸塩基は四種類あるが、電子供与・受容の能力がそれぞれの塩基で異なるために、どの核酸塩基に修飾するかによって、その蛍光特性が大きく変わることが予想される。グアニンは電子供与体であることが知られており、電子供与能の強さは自身の持つ酸化電位の大きさによって位置付けられる (G: +1.47 V, A: +1.94 V, T: +2.09 V, and C: +2.12 V vs NHE⁷⁰)。また、アデニンの酸化電位はグアニンの次に低く、ピリミジン塩基に比べて、電子供与能を示すと予想できることから分子内電荷移動状態を形成させるうえで、プリン塩基の方が優れていると考えられる。また、プリン塩基に蛍光色素などを修飾した誘導体は、ピリミジン塩基に比べて、少ないことから、今後の応用展開が期待される未知の化合物であるため、プリン塩基を主体とした環境感応型蛍光核酸塩基の開発を目指した。そこで、まず、ソルバトフルオロクロミックな性質となるプリン塩基誘導体を各種合成し、その物性を調べ、そして得られた知見をもとに、優れた誘導体をオリゴヌクレオチド鎖へ導入し、得られた ODN 鎖の融解温度による熱安定性及び光学特性を評価することで、塩基識別の有無や遺伝子検出プローブとしての性能を明らかにすることを目的とし、研究を行った。

1.7 本論文の構成

本論文の第2章以降の構成は、次の通りである。

第2章では、プリン塩基であるアデニンを主体とした環境感応型蛍光核酸塩基の開発について述べている。ソルバトフルオロクロミックな性質を示すための蛍光発色団の選択および置換基効果をあらかじめ検討し、アデノシン誘導体の合成を行なった。得られた各誘導体や蛍光DNAプローブとしての性能評価について、それらの光学特性をもとに考察した。

第3章では、7-デアザアデニンの7位に置換基を修飾した蛍光プリンヌクレオシドの開発について述べている。第2章で得られた知見をもとにデザインした7位置換7-デアザアデノシン誘導体を合成した。さらに、優れた光学特性を示した誘導体をオリゴヌクレオチド鎖へ導入し、標的DNAとのハイブリダイズによる塩基対形成能について、特に、二重鎖融解温度測定の結果をもとに明らかにした。

第4章では、8-アザ-7-デアザグアニンを骨格にもつ新しい環境感応型蛍光核酸の開発について述べている。分子設計としては、7位に置換基を修飾することが可能であり、水素結合部位が三つあることで、シトシン塩基と安定な塩基対を形成することが期待される8-アザ-7-デアザグアニンを選択した。本章では、8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン誘導体ならびに、それを含むオリゴヌクレオチド鎖を合成し、相補鎖側の相手塩基との形成能や識別能について、二重鎖融解温度および蛍光測定により評価を行った。

第5章では、DNA二重鎖のフルマッチとミスマッチ構造を、より明瞭に識別できるプローブの開発について述べている。本章で開発した8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体は、粘度環境変化に応じて、短い波長のLE発光と長い波長のICT発光の二重蛍光を示すことが明らかになった。さらに、その蛍光特性を利用して、標的DNAのチミン塩基を識別できるプローブの開発に成功しており、その結果について、種々の物性測定により考察した。

最後に、第6章では、本論文の成果についての総括を述べた。

参考文献

- 1) J.D. Watson, F.H.C. Crick, *Nature*, 1953, **171**, 737.
- 2) S. Arnott, D.W.L. Hukins, S.D. Dover, W. Fuller, A.R. Hodgson, *J. Mol. Biol.*, 1973, **81**, 107.
- 3) A.G.W. Leslie, S. Arnott, *J. Mol. Biol.*, 1980, **143**, 49.
- 4) F. M. Pohl, T.M. Jovin, *J. Mol. Biol.*, 1972, **60**, 375.
- 5) A.H.J. Wang, G.J. Quigley, F.J. Kolpak, J.L. Crawford, J.H. van Boom, G. van der Marel, A. Rich, *Nature*, 1979, **282**, 680.
- 6) T.J. Thamann, R.C. Lord, A.H.J. Wang, A. Rich, *Nucleic Acid Res.*, 1981, **9**, 5443.
- 7) K. Hoogsteen, *Acta Cryst.*, 1963, **16**, 907.
- 8) A.H.J. Wang, T. Hakoshima, G. van der Marel, A. Rich, *Cell*, 1984, **37**, 321.
- 9) H. E. Moser, P.B. Dervan, *Science*, 1987, **237**, 645.
- 10) J.-L. Mergny, C. Hélène, *Nat. Med.*, 1998, **4**, 1367.
- 11) N.V. Anantha, M. Azam, R.D. Sheardy, *Biochemistry*, 1998, **37**, 2709.
- 12) G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.*, 2013, **5**, 182.
- 13) M.K. Halushka, J.-B. Fan, K. Bentley, L. Hsie, N. Shen, A. Weder, R. Cooper, R. Lipshutz, A. Chakraborti, *Nature Genet.*, 1999, **22**, 239.
- 14) R. Sachidanandam, *et al.*, *Nature*, 2001, **409**, 928.
- 15) P.M. Holland, R.D. Abrahamson, R. Watson, D.H. Gelfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1991, **88**, 7276.
- 16) J.G. Hall, P.S. Eis, S.M. Law, L.P. Reynaldo, J.R. Prudent, D.J. Marshall, H.T. Allawi, A.L. Mast, J.E. Dahlberg, R.W. Kwiatkowski, M. de Arruda, B.P. Neri, V.I. Lyamichev, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 8272.
- 17) S. Tyagi, F.R. Kramer, *Nat. Biotechnol.*, 1996, **14**, 303.
- 18) S. Tyagi, D.P. Bratu, F.R. Kramer, *Nat. Biotechnol.*, 1998, **16**, 49.
- 19) S. Kurata, T. Kanagawa, K. Yamada, M. Torimura, T. Yokomaku, Y. Kamagata, R. Kurane, *Nucleic Acids Res.*, 2001, **29**, E34.
- 20) A. Okamoto, K. Tainaka, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4972.
- 21) A. Okamoto, K. Tanaka, T. Fukuta, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 9296.
- 22) A. Okamoto, K. Kanatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 4820.
- 23) Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Chem. Commun.*, 2004, 1704.
- 24) A. Okamoto, T. Ichiba, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 8364.
- 25) C. Dohno, I. Saito, *ChemBioChem*, 2005, **6**, 1075.
- 26) Y. Saito, K. Hanawa, K. Motegi, K. Omoto, A. Okamoto, I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 7605.
- 27) A. Okamoto, Y. Saito, I. Saito, *J. Photochem. Photobiol. C*, 2005, **6**, 108.

- 28) Y. Saito, S.S. Bag, Y. Kusakabe, C. Nagai, K. Matsumoto, E. Mizuno, S. Kodate, I. Suzuka, I. Saito, *Chem. Commun.*, 2007, 2133.
- 29) K. Tainaka, K. Tanaka, S. Ikeda, K.-I. Nishiza, T. Unzai, Y. Fujiwara, I. Saito, A. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 4776.
- 30) Y. Saito, K. Kugenuma, M. Tanaka, A. Suzuki, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 3723.
- 31) D.C. Ward, E. Reich, L. Stryer, *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 1228.
- 32) T.M. Nordlund, S. Andersson, L. Nilsson, R. Rigler, A. Graslund, L.W. Mclaughlin, *Biochemistry*, 1989, **28**, 9095.
- 33) T.M. Nordlund, D.G. Xu, K.O. Evans, *Biochemistry*, 1993, **32**, 12090.
- 34) L. Serrano-Andres, M. Merchan, A.C. Borin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 8691.
- 35) B. Mennucci, A. Toniolo, J. Tomasi, *J. Phys. Chem. A*, 2001, **105**, 4749.
- 36) N.J. Leonard, A.G. Morrice, M.A. Sprecker, *J. Org. Chem.*, 1975, **40**, 356.
- 37) N.J. Leonard, M.A. Sprecker, A.G. Morrice, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 3987.
- 38) J.W. Longworth, R.O. Rahn, R.G. Shulman, *J. Chem. Phys.*, 1966, **45**, 2930.
- 39) J.A. Secrist, G. Weber, N.J. Leonard, J.R. Barrio, *Biochemistry*, 1972, **11**, 3499.
- 40) J.A. Secrist, J.R. Barrio, N.J. Leonard, *Science*, 1972, **175**, 646.
- 41) F. Godde, J.J. Toulmé, S. Moreau, *Biochemistry*, 1998, **37**, 13765.
- 42) F. Godde, J.J. Toulmé, S. Moreau, *Nucleic Acid Res.*, 2000, **28**, 2977.
- 43) K. Miyata, R. Mineo, R. Tamamushi, M. Mizuta, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, T. Santa, M. Sekine, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 102.
- 44) K.Y. Lin, R.J. Jones, M. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 3873.
- 45) K.C. Engman, P. Sandin, S. Osborne, T. Brown, M. Billeter, P. Lincoln, B. Nordén, B. Albinsson, L.M. Wilhelmsson, *Nucleic Acid Res.*, 2004, **32**, 5087.
- 46) P. Sandin, L.M. Wilhelmsson, P. Lincoln, V.E. Powers, T. Brown, B. Albinsson, *Nucleic Acid Res.*, 2005, **33**, 5019.
- 47) R. X.-F. Ren, N.C. Chaudhuri, P.L. Paris, S. Rumney IV, E.T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 7671.
- 48) S. Smirnov, T.J. Matray, E.T. Kool, C. de los Santos, *Nucleic Acid Res.*, 2002, **30**, 5561.
- 49) R.S. Coleman, M.L. Madaras, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 5700.
- 50) D.J. Hurley, S.E. Seaman, J.C. Mazura, Y. Tor, *Org. Lett.*, 2002, **4**, 2305.
- 51) G.T. Hwang, Y.J. Seo, B.H. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 6528.
- 52) R.T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.*, 2005, 5487.
- 53) K. Rotkiewicz, K.H. Grellmann, Z.R. Grabowski, *Chem. Phys. Lett.*, 1973, **19**, 315.
- 54) A.L. Sobolewski, W. Domcke, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, **250**, 428.
- 55) A.L. Sobolewski, W. Domcke, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, **259**, 119.

- 56) M.A. Haidekker, T.P. Brady, D.Lichlyter, E.A. Theodorakis, *Bioorg. Chem.* 2005, **33**, 415.
- 57) E. Benedetti, L.S. Kocsis, K.M. Brummond, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 12418.
- 58) G. Weber, F. J. Farris, *Biochemistry*, 1979, **18**, 3075.
- 59) R.B. MacGregor, G. Weber, *Nature*, 1986, **319**, 70.
- 60) D.W. Pierce, S.G. Boxer, *J. Phys. Chem.*, 1992, **96**, 5560.
- 61) B.E. Cohen, T.B. McAnaney, E.S. Park, Y.N. Jan, S.G. Boxer, L.Y. Jan, *Science*, 2002, **296**, 1700.
- 62) H.S. Lee, J.Guo, E.A. Lemke, R.D. Dimla, P.G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 12921.
- 63) A. Chatterjee, J.Guo, H.S. Lee, P.G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 12540.
- 64) A. A. Tanpure, S. G. Srivatsan, *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 12820.
- 65) M. G. Pawar, S. G. Srivatsan, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 1114.
- 66) J. Riedl, R. Pohl, L. Rulišek, M. Hocek, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 1026.
- 67) J. Riedl, P. Ménová, R. Pohl, P. Orság, M. Fojta, M. Hocek, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 8287.
- 68) R. W. Sinkeldam, P. Marcus, D. Uchenik, Y. Tor, *ChemPhysChem*, 2011, **12**, 2260.
- 69) D. Dziuba, V.Y. Postupalenko, M. Spadafora, A.S. Klymchenko, V. Guérineau, Y. Mély, R. Benhida, A. Burger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 10209.
- 70) C.A.M. Seidel, A. Schulz, M.H.M. Sauer, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 5541.

第 2 章

ナフタレン含有環境感応型蛍光 2'-デオキシ
アデノシン誘導体の合成と遺伝子検出への応用

2.1 緒言

分子内に電子供与（ドナー）性置換基と電子吸引（アクセプター）性置換基をもつ芳香族化合物は、光励起によって分子内電荷移動(ICT)が生じるために、周辺の極性や誘電率変化に応じて光化学的性質が変化することが知られている¹⁻⁷⁾。この性質を示すような分子は、例えば、DNA やタンパク質のような生体分子の局所的な極性変化をモニターするプローブとして利用することができる⁸⁻¹¹⁾。

以前、分子内電荷移動状態を創出するような核酸分子として、グアニンの C8 位にエチニル基を介して 4-[2-(1-Pyrenyl)ethynyl]benzotrile を連結した 2'-デオキシグアノシン誘導体 **1,6-C^NG** を開発した (Fig. 2-1)。**1,6-C^NG** は光励起すると、電子吸引性基であるシアノ基の存在によって、グアニンから電荷の移動が起きる分子内電荷移動 (ICT) 状態を創出することで、溶媒の極性変化に鋭敏に反応して、蛍光波長を変化させ、さらに長波長領域で発光 (480 ~ 540 nm) を示すことに成功している。その誘導体を筆頭に、当研究グループでは、グアニン塩基の酸化電位の低さを利用し、電子吸引性基を持つ芳香族発色団をグアニンの C8 位から三重結合や二重結合で共役させた分子内ドナー・アクセプター構造を有する push-pull 型のグアノシン誘導体を開発に取り組んできた¹²⁻¹⁴⁾。その中でも、**A^vG** を含むオリゴデオキシヌクレオチドは、極性環境変化がより大きくなるように修飾核酸部位がバルジ構造を形成する標的 DNA をターゲットにすることで、標的 DNA の有無を蛍光色の橙色から黄色への変化で認識することに成功している¹²⁾。また、**A^cG** を含む DNA 二重鎖は **A^cG** の相手側の塩基がチミンのときに蛍光強度が増加することから、標的 DNA のチミン塩基を認識できるプローブとして利用できることを明らかにした¹³⁾ (チミン塩基の場合に蛍光強度が増加した理由は解明されていない)。従って、ピレンのような大きい蛍光分子を導入しなくても、電子吸引性置換基を有するコンパクトなサイズの蛍光発色団を連結するだけで、周辺の極性環境に応じて蛍光発光を変化させる環境感応型グアノシン誘導体を得ることができることを見出した。

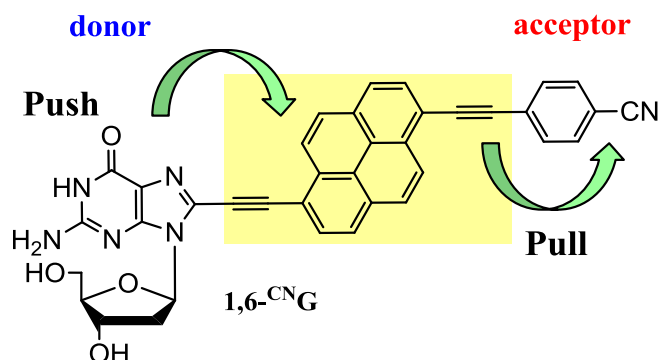


Figure 2-1. Structure of push-pull type fluorescent 2'-deoxyguanosine derivative (**1,6-C^NG**).

第 2 章では、より優れた環境感応型蛍光核酸塩基を開発することを目指して、グアニンと同様に C8 位に置換基を修飾することが可能なアデニン塩基に着目した。天然のプリン塩基の C8 位の置換基の導入は簡便に合成できることから、他の研究グループによって数多くの蛍光核酸分子が報告されている¹⁵⁻²³⁾。しかしながら、アデノシン誘導体の多くは、それらの光物性について調べた研究がほとんどであり²¹⁻²³⁾、プローブやセンサーとして利用されている例は少ない。そこで、新規な蛍光性アデノシン誘導体の開発を試みた。

はじめに、どのような蛍光発色団を修飾するかを考えた。そこで、第 1 章で述べた PRODAN (6-propionyl-2-*N,N*-dimethylaminonaphthalene) および、その類縁体に着目した²⁴⁻²⁶⁾。ナフタレンの 2,6-配位にそれぞれ電子供与性、電子吸引力を有する PRODAN は、理想的なドナー・アクセプター型の構造をとるために、ソルバトフルオロクロミックな蛍光特性を示し、極性環境の違いをモニターする蛍光分子として古くから利用されている。また、天然の核酸塩基に PRODAN を修飾させた誘導体も開発されている²⁷⁾。さらに、ナフタレンはベンゼンよりも環が一つ増えた芳香族化合物であるため、より長い波長で発光することも可能であることから、蛍光特性の面で適切な分子であると言える。従って、置換基を付与したナフタレンを蛍光分子として用いることを考えた。また、アデニンは、グアニンよりも酸化電位が低く²⁸⁾、グアニン塩基よりも電子供与能が低下することが容易に考えられるため、芳香族発色団に修飾する置換基の選択範囲を広げることができるのではないかと予想した。すなわち、電子吸引力であるシアノ基やアセチル基のみならず、電子供与性置換基を含む芳香族発色団でも、分子内電荷移動を引き起こすことが可能になると考えられる（一方、グアニンの C8 位に電子供与性である *N,N*-ジメチルアニリンを連結させた誘導体はソルバトフルオロクロミックな性質は示さない¹³⁾）。そこで、置換基として、電子吸引力基であるシアノ基および電子供与性基である *N,N*-ジメチルアミノ基を含むナフタレンをアデニンの 8 位に修飾した ^{2,6}cnA (**1a**) および ^{2,6}dnA (**1b**) をデザインし、分子軌道計算ソフト(Gaussian 09)により構造最適化を行なった。また、置換基の有無による効果を調べるため、無置換ナフタレンを修飾した化合物 ²ⁿA (**1c**)もあわせて計算した。なお、Gaussian 09 を用いた密度汎関数(DFT)法(B3LYP/6-31G*)により計算を行った (Fig. 2-2)。

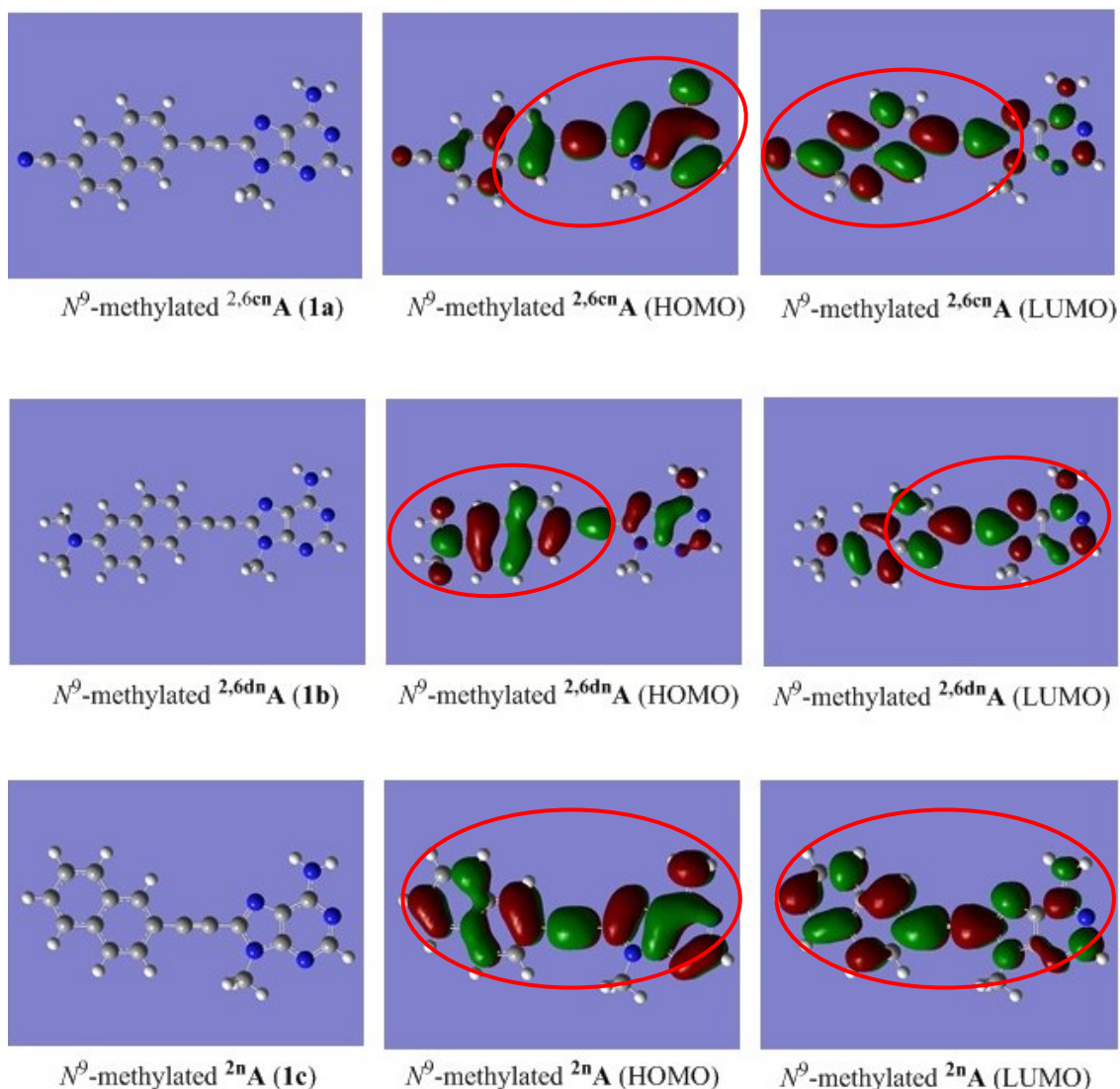


Figure 2-2. HOMO and LUMO of N^9 -methylated $2,6^{cn}\mathbf{A}$, $2,6^{dn}\mathbf{A}$, and $2^n\mathbf{A}$ calculated at the DFT(B3LYP) 6-31G* level.

シアノ基を含む構造 ($2,6^{cn}\mathbf{A}$) の HOMO では電子密度がアデニンに偏っているのに対して、光励起された LUMO では、アデニンからナフタレンの方へ電子密度が移動していることから、理想的な push-pull 構造を示していることが確認できた。また、 N,N -ジメチルアミノ基を含む構造 ($2,6^{dn}\mathbf{A}$) では、 $2,6^{cn}\mathbf{A}$ の場合とは逆に HOMO では N,N -ジメチルアミノ基周辺に電子密度が偏っており、LUMO ではアデニンの方へシフトしていることが確認できたが、置換基のない $2^n\mathbf{A}$ では、 $2,6^{cn}\mathbf{A}$ と $2,6^{dn}\mathbf{A}$ に比べて、HOMO-LUMO 間の電子密度の偏りがあまり見られないことがわかった。従って、シアノ基や N,N -ジメチルアミノ基を有することで、両者ともドナー・アクセプター型の構造になることから、環境感応型の蛍光特性を示すことが示唆される (Fig. 2-3)。また、ナフタレンの置換位置が異なる構造異性体でも同様の効

果を得ることが可能であると考えられるので、それらを実際に合成し、それぞれの誘導体の光化学的性質を調べた。

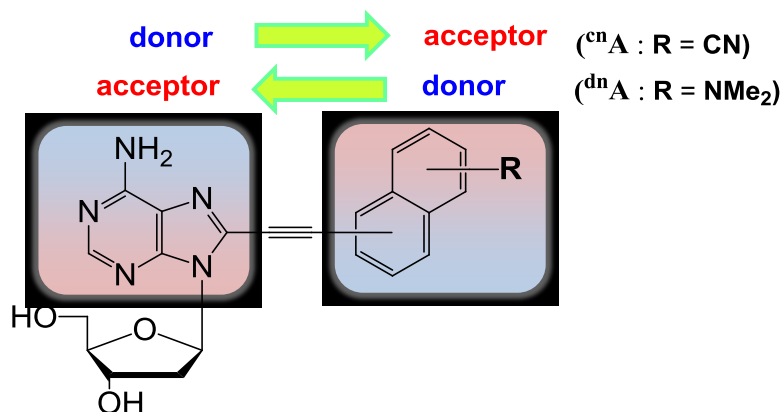


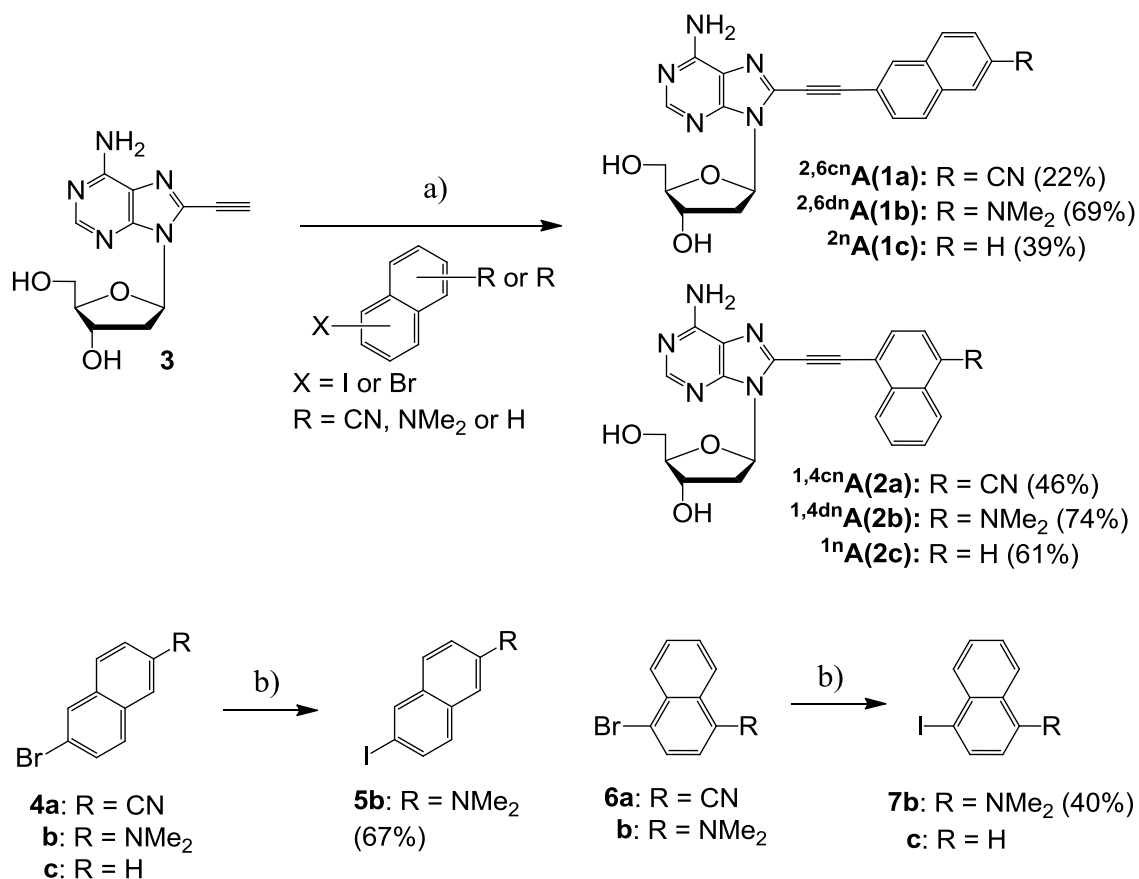
Figure 2-3. Design of fluorescent nucleosides ^{cn}A and ^{dn}A with donor-acceptor system.

2.2 実験と結果

2.2.1 C8位にナフチルエチニル基を有する-2'-デオキシアデノシン誘導体の合成

ナフチルエチニル基を含む 2'-デオキシアデノシン誘導体 **1** を開発するために、まず、既知化合物である 8-エチニル-2'-デオキシアデノシン **3** ²⁹⁾ を出発物質とした。なお、化合物 **3** は 8-ブロモ-2'-デオキシアデノシン ³⁰⁾ から、2 段階経路で合成することができる。**3** と電子吸引性置換基であるシアノ基を環外に持つ 6-ブロモ-2-ナフトニトリル **4a** ³¹⁾ および無置換の 2-ブロモナフタレン **4c** とをパラジウム-銅触媒を用いた菌頭反応 ³²⁾ により、カップリングさせ、^{2,6}cnA (**1a**) と ²ⁿA (**1c**) をそれぞれ得ることが出来た。また、電子供与性置換基である *N,N*-ジメチルアミノ基を環外に持つブロモナフタレン **4b** ³³⁾ では、カップリングによる反応性が低いため、**4b** のブロモ基をヨード基に置換した 6-ヨード-*N,N*-ジメチルナフタレン-2-アミン **5b** を合成し、**3** とカップリング反応させることで、^{2,6}dnA (**1b**) を得ることに成功した。

また、配向性の異なるナフタレン分子も同様の反応条件により、1,4-配向のナフチル基を有する 2'-デオキシアデノシン誘導体 ^{1,4}cnA (**2a**)、^{1,4}dnA (**2b**) および ¹ⁿA (**2c**) を合成した。その詳細は、4-ブロモ-1-ナフトニトリル **6a** ³⁴⁾、そして、**6b** からヨウ素化させた 4-ヨード-*N,N*-ジメチルナフタレン-1-アミン **7b** および、1-ヨードナフタレン **7c** を **3** とそれぞれカップリングさせることで得ることができた。合成ルートを **Scheme 2-1** に示す。



Scheme 2-1. Reagents and conditions: a) **4a**, **4c**, **5b**, **6a**, **7b**, or **7c**, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, 50-80 °C, 30 min - 3 h; b) *n*-BuLi, THF, -78 °C, 30 min, and then I₂, THF, r.t., 30 min.

2.2.2 C8位にナフチルエチニル基を連結した2'-デオキシアデノシン誘導体の光学特性

続いて、得られた2'-デオキシアデノシン誘導体 **1a-c**, **2a-c** を様々な極性の異なる溶媒に溶解させ、どのような蛍光特性を示すのかを調べた。

まず、各誘導体のUVスペクトルの測定を行い (p.38: **Fig. S2-1**)、どの溶媒中でも吸光度がほぼ一定であること (濃度が均一であること、また、確実に溶解していること) を確認した。続いて、得られた各誘導体の最大吸収波長をもとに光励起させ、蛍光スペクトルの測定を行なった (測定条件 10 μM)。**2,6^{cn}A (1a)**、**2,6^{dn}A (1b)** および **2ⁿA (1c)** の測定結果は **Fig. 2-4** に示す。また、UVスペクトル測定によって得られた最大吸収波長 ($\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$) および蛍光スペクトル測定によって得られた最大蛍光波長 ($\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$) をそれぞれ **Table 2-1** に示す。蛍光量子収率 (Φ_{fl}) は9,10-ジフェニルアントラセン ($\Phi_{\text{fl}} = 0.95$ in ethanol) を標準物質として用いて算出した³⁵⁾。

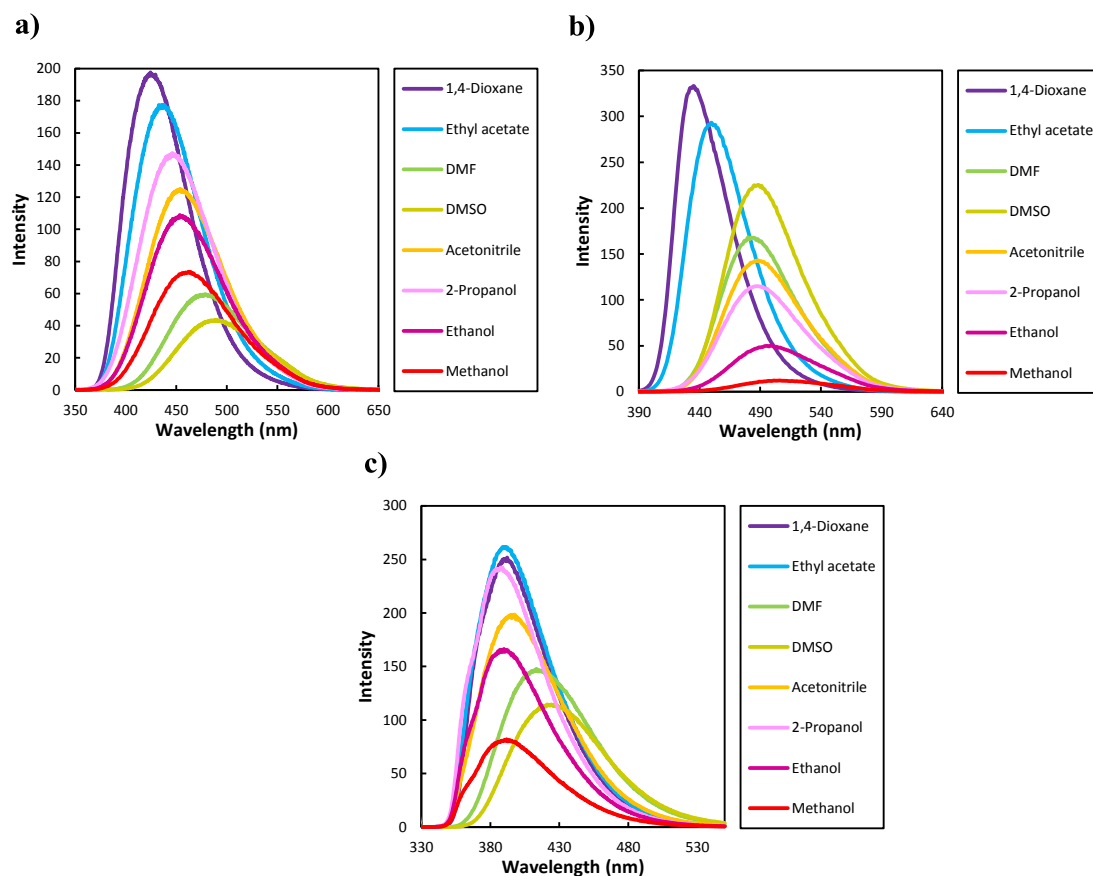


Figure 2-4. Fluorescence spectra of (a) $^{2,6\text{cn}}\mathbf{A}$ (**1a**, 10 μM), (b) $^{2,6\text{dn}}\mathbf{A}$ (**1b**, 10 μM) and (c) $^{\text{2n}}\mathbf{A}$ (**1c**, 10 μM) in various solvents. The excitation was conducted at (a) 340 nm, (b) 382 nm and (c) 326 nm. The slit width was 1.5 nm.

電子吸引性であるシアノ基を有する $^{2,6\text{cn}}\mathbf{A}$ (**1a**) では、1,4-ジオキサン中で 340 nm の波長で光励起させると、424 nm の非常に強い発光が観測された ($\Phi_{\text{fl}} = 0.82$)。一方、1,4-ジオキサン中よりも極性の高いアセトニトリル中では、454 nm の発光が得られ ($\Phi_{\text{fl}} = 0.58$)、メタノール中では 462 nm、DMSO 中では 490 nm の発光が観測され、 $^{2,6\text{cn}}\mathbf{A}$ 周辺の極性環境が変化する（主に極性が高くなる）ことによって、最大蛍光発光が長波長にシフトする典型的なソルバトフルオロクロミックな性質を示した (**Fig. 2-4a**, $\Delta\lambda = 66$ nm)。また、電子供与性である *N,N*-ジメチルアミノ基を有する $^{2,6\text{dn}}\mathbf{A}$ (**1b**) では 382 nm の光励起で蛍光測定を行うと、極性の低い溶媒から、極性の高い溶媒になるにつれて、蛍光量子収率の減少とともに最大蛍光発光の長波長シフトが観測された (**Fig. 2-4b**, $\Delta\lambda = 71$ nm)。しかしながら、ナフタレン環外に置換基のない $^{\text{2n}}\mathbf{A}$ (**1c**) では、ほとんどの溶媒中で、最大蛍光波長のシフトは見られなかったため（DMSO 中や DMF 中ではわずかながらの蛍光波長シフトは見られた）、ソルバトフルオロクロミックな性質を示さないと断言できる (**Fig. 2-4c**)。

つまり、ナフタレン環外にシアノ基を含む場合には、アデニンが電子供与（ドナー）性

として機能し、*N,N*-ジメチルアミノ基を含む場合には、アデニンが電子吸引（アクセプター）性として機能することが考えられる。これは、分子軌道計算による計算結果と対応しており、お互いが構造的には全く逆のドナー・アクセプター型の分子構造を形成するが、両者とも、光励起されると分子内電荷移動（ICT）状態による発光が観測されると考えられる。

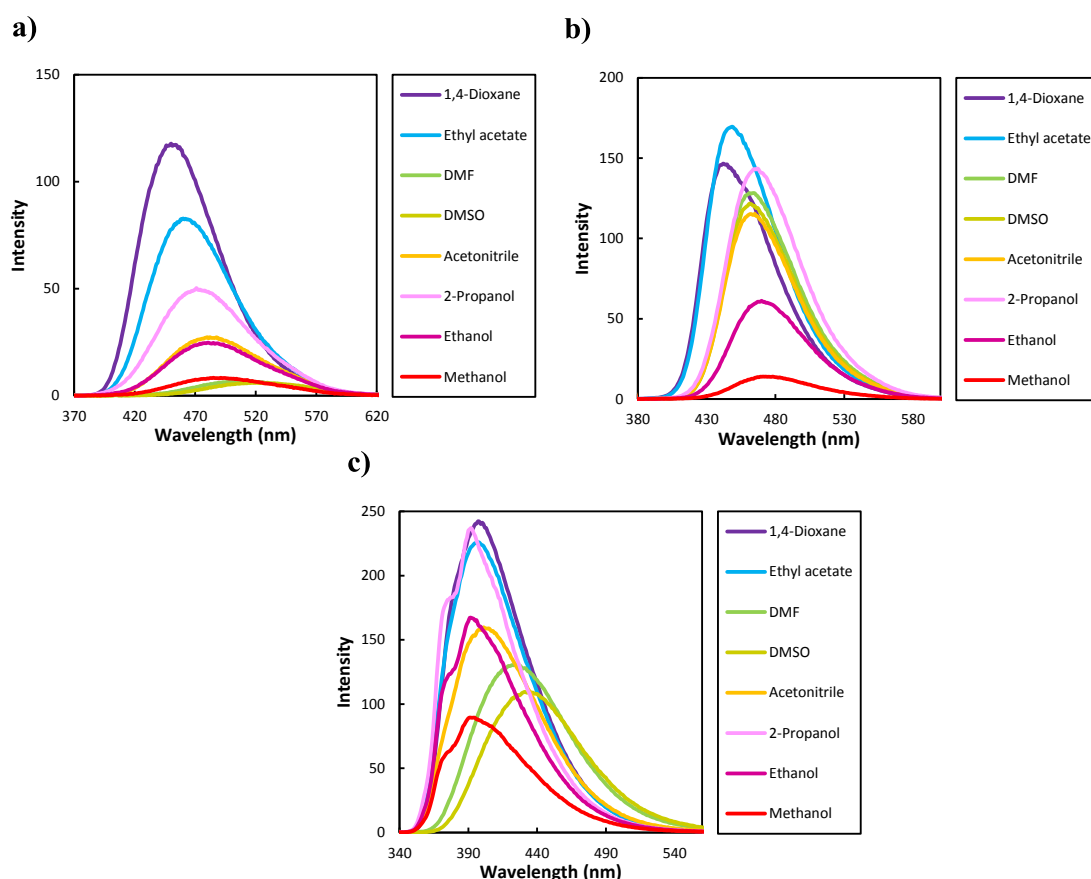


Figure 2-5. Fluorescence spectra of (a) $1,4^{cn}\mathbf{A}$ (**2a**, 10 μM), (b) $1,4^{dn}\mathbf{A}$ (**2b**, 10 μM) and (c) $1^n\mathbf{A}$ (**2c**, 10 μM) in various solvents. The excitation was conducted at (a) 360 nm, (b) 375 nm and (c) 337 nm. The slit width was 1.5 nm.

続いて、 $1,4^{cn}\mathbf{A}$ (**2a**)、 $1,4^{dn}\mathbf{A}$ (**2b**) および $1^n\mathbf{A}$ (**2c**) の蛍光スペクトルを **Fig. 2-5** に示す。結果として、1,4-配向ナフタレンを含む誘導体であっても誘導体 **1** とほぼ同様の結果が得られた。つまり、無置換ナフタレンの1位から連結したアデノシン誘導体 $1^n\mathbf{A}$ (**2c**) では、溶媒の変化に伴う蛍光発光波長の変化は観測されなかったのに対して、置換基を有する $1,4^{cn}\mathbf{A}$ (**2a**) および $1,4^{dn}\mathbf{A}$ (**2b**) では、極性の低い溶媒中では、比較的、短波長での発光が見られ、極性の高い溶媒中になると、蛍光強度の減少を伴う長波長での発光が観測された ($1,4^{cn}\mathbf{A}$: $\Delta\lambda = 71$ nm, $1,4^{dn}\mathbf{A}$: $\Delta\lambda = 36$ nm)。

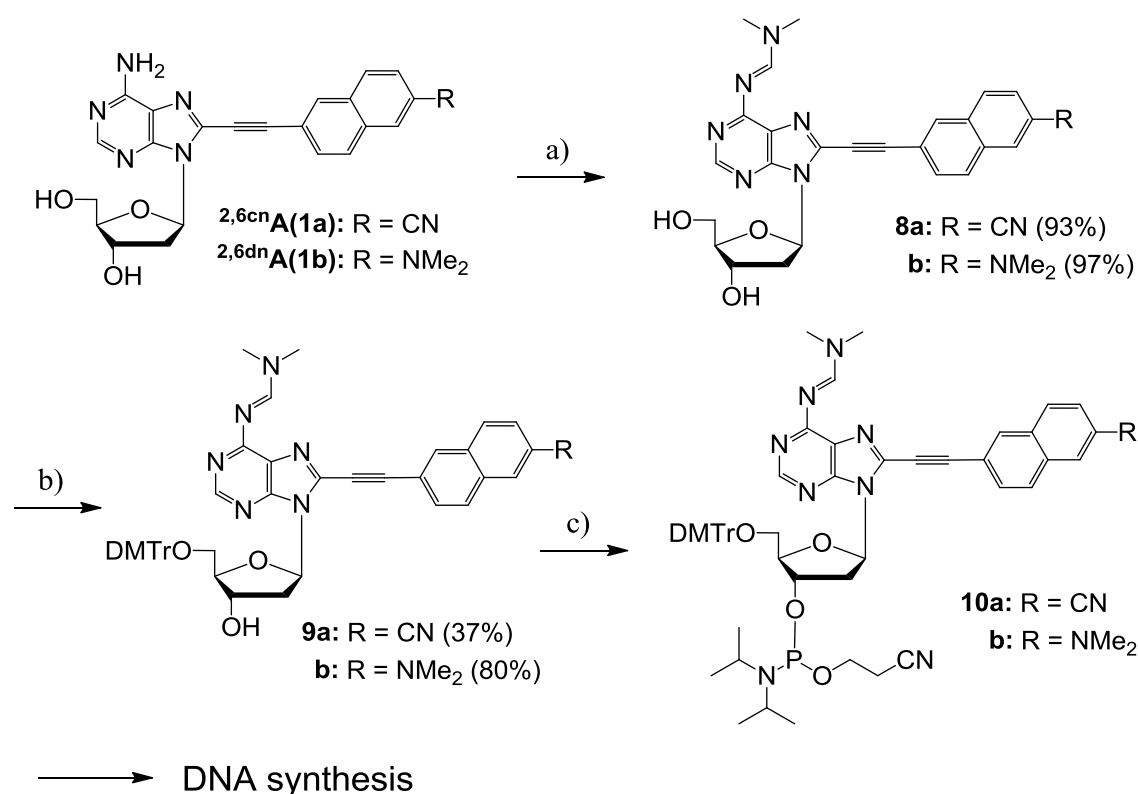
従って、シアノ基を有する **2,6^{cn}A (1a)** と **1,4^{cn}A (2a)** および *N,N*-ジメチルアミノ基を有する **2,6^{dn}A (1b)** と **1,4^{dn}A (2b)** では高いソルバトフルオクロミックな性質を示していることから、環境感応型の 2'-デオキシアデノシン誘導体を開発することに成功したと言える。その中でも特に、*N,N*-ジメチルアミノ基を有する **2,6^{dn}A (1b)** では、極性の低い 1,4-ジオキサン中では、高い蛍光量収率 $\Phi_{fl} = 0.88$ という高い値を示す一方、極性の高いメタノール中では、 $\Phi_{fl} = 0.05$ と大幅に下がるが、506 nm の長波長で発光する特徴を持つことから、極性変化をモニターできる優れたプローブとして利用できると考えられる。

Table 2-1. Photophysical properties of fluorescent 2'-deoxyadenosine derivatives

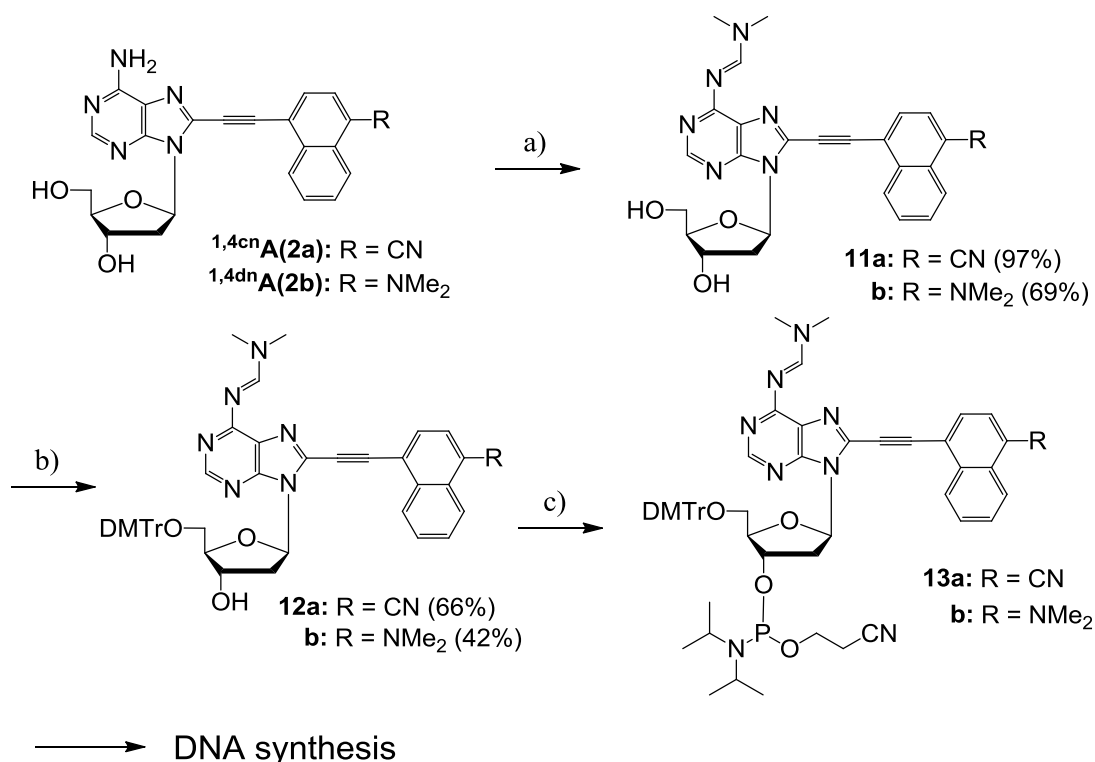
| compound | solvent | λ_{max}^{abs} (nm) | λ_{max}^{fl} (nm) | Φ_{fl} |
|-------------------------------|--------------|----------------------------|---------------------------|-------------|
| 2,6^{cn}A (1a) | 1,4-Dioxane | 347 | 424 | 0.82 |
| | Acetonitrile | 338 | 454 | 0.58 |
| | DMF | 348 | 478 | 0.33 |
| | Methanol | 338 | 462 | 0.36 |
| 2,6^{dn}A (1b) | 1,4-Dioxane | 360 | 435 | 0.88 |
| | Acetonitrile | 365 | 488 | 0.51 |
| | DMF | 385 | 480 | 0.62 |
| | Methanol | 385 | 506 | 0.05 |
| 2ⁿA (1c) | 1,4-Dioxane | 330 | 392 | 0.66 |
| | Acetonitrile | 325 | 398 | 0.57 |
| | DMF | 333 | 414 | 0.51 |
| | Methanol | 328 | 392 | 0.20 |
| 1,4^{cn}A (2a) | 1,4-Dioxane | 362 | 450 | 0.51 |
| | Acetonitrile | 357 | 482 | 0.14 |
| | DMF | 365 | 503 | 0.04 |
| | Methanol | 359 | 494 | 0.04 |
| 1,4^{dn}A (2b) | 1,4-Dioxane | 371 | 442 | 0.41 |
| | Acetonitrile | 371 | 465 | 0.40 |
| | DMF | 375 | 464 | 0.47 |
| | Methanol | 374 | 478 | 0.05 |
| 1ⁿA (2c) | 1,4-Dioxane | 339 | 397 | 0.52 |
| | Acetonitrile | 335 | 401 | 0.40 |
| | DMF | 340 | 424 | 0.36 |
| | Methanol | 336 | 391 | 0.20 |

2.2.3 環境感応型蛍光 2'-デオキシアデノシン誘導体を含む ODN の合成

優れた環境感応型の蛍光特性を示した C8 位にナフチルエチニル基を連結した 2'-デオキシアデノシン誘導体 **2,6cnA (1a)**、**2,6dnA (1b)**、**1,4cnA (2a)** および **1,4dnA (2b)** をオリゴヌクレオチドレベルでその性質を調べるために、それぞれを ODN 鎖へ導入することを試みた。ODN 鎖への導入にあたり、DNA 自動合成機を用いたホスホロアミダイト法により行なった。まず、*N,N*-ジメチルホルムアミドジエチルアセタールを用いて、アミノ基の保護、5'-水酸基の保護によりトリチル体を得た。続いて、3'-水酸基を 2-シアノジイソプロピルクロロホスホロアミジトを用いて、ホスホロアミダイトユニットを合成し、DNA 自動合成機で目的とする ODN 鎖へ導入した (Scheme 2-2, 2-3)。Table 2-2 にこの章で使う ODN 配列を示す。



Scheme 2-2. Reagents and conditions: a) *N,N*-dimethylformamide diethylacetal, DMF, 80 °C, 30 min; b) DMTrCl, DMAP, Pyridine, r.t., 3 h; c) 2-cyanoethyl diisopropyl chlorophosphoramidite, Et₃N, acetonitrile, r.t., 30 min.



Scheme 2-3. Reagents and conditions: a) *N,N*-dimethylformamide diethylacetal, DMF, 80 °C, 30 min.; b) DMTrCl, DMAP, Pyridine, r.t., 3 h; c) 2-cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidite, Et₃N, acetonitrile, r.t., 30 min.

Table 2-2. Oligodeoxynucleotides (ODNs) used in this study

| ODNs | Sequences |
|-----------|---|
| ODN 1 (X) | 5'-d(CGCAAT X TAACGC)-3' X = ^{cn} A or ^{dn} A (13-mer) |
| ODN 2 (X) | 5'-d(CGCAAC X CAACGC)-3' X = ^{cn} A or ^{dn} A (13-mer) |
| bIODN 1 | 3'-d(GCGTTA A TTGCG)-5' (12-mer, <u>bulge</u>) |
| bIODN 2 | 3'-d(GCGTTG G TTGCG)-5' (12-mer, <u>bulge</u>) |

合成したオリゴヌクレオチドは ^{cn}A および ^{dn}A が二重鎖を形成した際に、AT 塩基対に挟まれるような ODN 1 (AT-rich) と GC 塩基対に挟まれるような ODN 2 (GC-rich) の二種類を作成した。ODN 1 (X = ^{cn}A or ^{dn}A) と ODN 2 (X = ^{cn}A or ^{dn}A) は通常の DNA 自動合成機での条件で合成することが出来た。得られた ODN 鎖を合成機から切り出し後、アンモニア水 55°C 中で一晩かけて脱保護を行い、翌日、HPLC により分析を行なった。目的物 ODN を精製後、MALDI-TOF mass および酵素分解により同定した (p.39-43: Fig. S2-2~9, Table S2-1)。

2.2.4 塩基対形成能についての考察

精製した $2,6\text{dnA}$ を含むオリゴヌクレオチド ODN 1 をフルマッチとなる相補鎖 cODN 1: 5'-GCGTTATATTGCG-3' (13-mer) とハイブリダイズさせ、融解温度(T_m)測定を行ったところ、 $2,6\text{dnA}$ を含む DNA は天然の配列 (52.6 °C) に比べて、二重鎖構造を大きく不安定化することがわかった (p.44: **Table S2-2**: 43.3 °C, $\Delta T_m = -9.3$ °C)。これは、アデニンの 8 位に剛直なエチニル基を介してナフタレン分子を導入しているために、*N*-グリコシド結合が *syn* 配座をとりやすくなっているためであると考えられる。天然のプリン塩基であるグアノシンやアデノシンは、プリン環の 8 位に置換基を導入すると、*anti* 配座から *syn* 配座をとりやすいことが知られており³⁶⁻³⁹)、二重鎖構造を大きく不安定化したのは、ナフタレン環が周辺の塩基対形成の立体障害を生じるためであると考えると妥当である。さらに、 $2,6\text{dnA}$ の相手塩基がアデニン、グアニン、シトシンとなる二重鎖の T_m 値を測定しても、チミンの場合と同様の融解温度を示したことからも、塩基対形成能はないと言える。また、周辺塩基対が GC 配列となるような[ODN 2 ($\text{X} = 2,6\text{dnA}$) / cODN 2: 5'-GCGTTG N GTTGCG-3' (N = A, G, C, T)] の二重鎖でも同様に不安定化する結果が得られている (p.44: **Table S2-2**)。なお、 T_m 値測定は 2.5 μM ODN, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1 M 塩化ナトリウム存在下で行ない、以降に記す全ての測定結果は同様の条件で行なっている。

2.2.5 遺伝子検出プローブについての評価

次に、本プローブでは cnA および dnA が二重鎖を形成すると、バルジ構造の内部に位置するような 12-mer の相補鎖 bIODN を、極性環境変化の違いを利用して、(すなわち、ターゲットとなる遺伝子配列の有無によって cnA および dnA の存在する極性環境が変化すると考えられるため) 蛍光発光の違いで検出できるのかの検討を行った。 $2,6\text{cnA}$ および $2,6\text{dnA}$ を含むオリゴヌクレオチドの蛍光スペクトルによる遺伝子検出能についての評価を **Fig. 2-6** に示す。

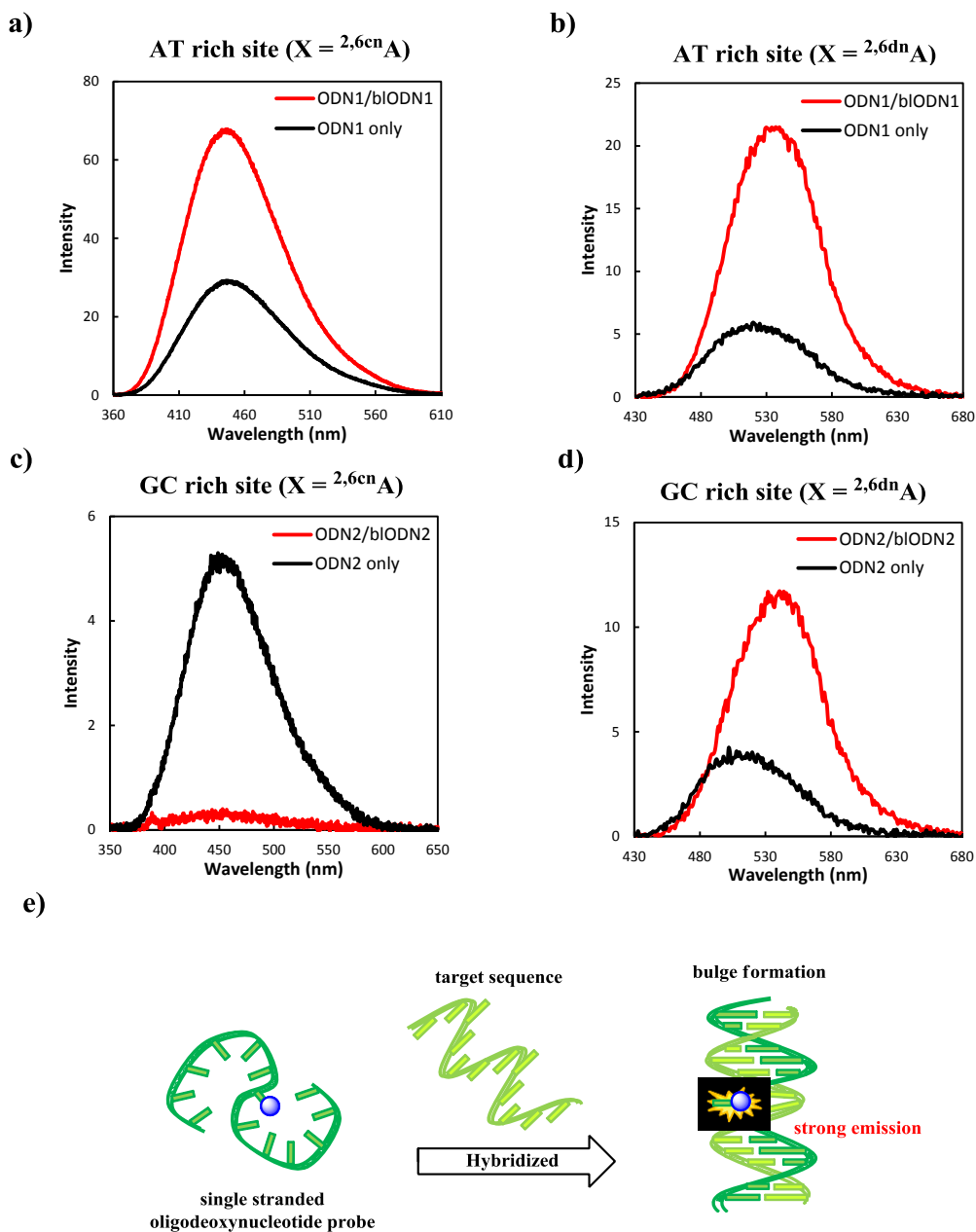


Figure 2-6. Fluorescence spectra of ODN 1 [$X =$ (a) $2,6^{cn}A$, and (b) $2,6^{dn}A$] hybridized with bIODN 1, and of ODN 2 [$X =$ (c) $2,6^{cn}A$, and (d) $2,6^{dn}A$] hybridized with bIODN 2 (2.5 μ M ODNs, 50 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.0, r.t.). The excitation wavelength was (a) 349 nm, (b) 420 nm, (c) 342 nm, and (d) 420 nm; (e) Schematic illustration of the target DNA detection by $2,6^{dn}A$ -containing ODN probe via a bulge formation. The slit width was 1.5 nm.

ODN 1 ($X = 2,6^{cn}A$)は、プローブのみでは、446 nm の弱い蛍光発光を示したのに対して、12-mer のターゲット遺伝子となる bIODN 1 とハイブリダイズさせると、蛍光強度の増大が観測された (Fig. 2-6a)。また、ODN 1 ($X = 2,6^{dn}A$)でも同様に、12-mer の bIODN 1 が存在する場合には、プローブ単独に比べて蛍光強度の増大が観測された (Fig. 2-4b)。従って、両者とも蛍光強度の違いで相補鎖となる ODN を検出することができることがわかった。蛍光強度の増大が観測された原因として、前述した通り、二重鎖のバルジ構造となる位置にナフタレン修飾アデノシン誘導体が存在することができることが挙げられる。すなわち、プローブのみの一本鎖に比べて、二重鎖を形成すると極性環境の低い環境下に修飾塩基が位置されることで、蛍光強度の増大に繋がったと考えられる (Fig. 2-6e)。また、CD 測定により、バルジ構造を形成する ODN 1($X = 2,6^{dn}A$)/bIODN 1 は 280 nm 付近に正のコットン効果、250 nm 付近に負のコットン効果が観測されたことから、天然配列で形成する B 型構造に限りなく近い構造であることが確認できる (p.43: Fig. S2-10)。

一方、ODN 2 ($X = 2,6^{cn}A$) では、相補鎖である bIODN 2 とハイブリダイズさせると、ODN 1 では見られなかった蛍光強度の著しい減少が観測された (Fig. 2-6c)。この原因は、バルジ構造をとる $2,6^{cn}A$ が GC 塩基対の近傍に位置することで、グアニン塩基による光励起電子移動反応(PET)による蛍光消光が起きたためであると考えられる⁴⁰⁻⁴¹)。それに対して、ODN 2 ($X = 2,6^{dn}A$)は bIODN 2 とハイブリダイズさせても、蛍光消光を起こさないどころか、ODN 1/bIODN1 二重鎖で見られたような蛍光強度の増大 (プローブ ODN 2 一本鎖に比べて約 3.8 倍) が観測された (Fig. 2-6d)。ODN2/bIODN2 二重鎖でも同様に、Fig. 2-6e に示したようにナフタレン部位が主鎖の近傍に存在し、特に上下のグアニン塩基に距離が近くなると考えられるが、 $2,6^{dn}A$ を含む ODN 2 はグアニン塩基の消光を引き起こしていないことは Fig. 2-6d を見ても明らかである。以上のことから、 $2,6^{cn}A$ を含む ODN プローブは近傍にグアニンが存在するような場合では、その性能が低くなってしまふことから、検出したい ODN 配列に制限があることがわかった。しかしながら *N,N*-ジメチルアミノ基を含む誘導体からなるプローブでは、グアニン塩基による蛍光消光が見られず、バルジ構造を形成することに伴う蛍光強度の増大により、ODN 配列に制限なく検出したい遺伝子配列を識別できるプローブとして有用であることが言える。

また、 $1,4^{cn}A$ および $1,4^{dn}A$ を含むオリゴヌクレオチドでも、同様の結果が得ることができた(Fig. 2-7)。

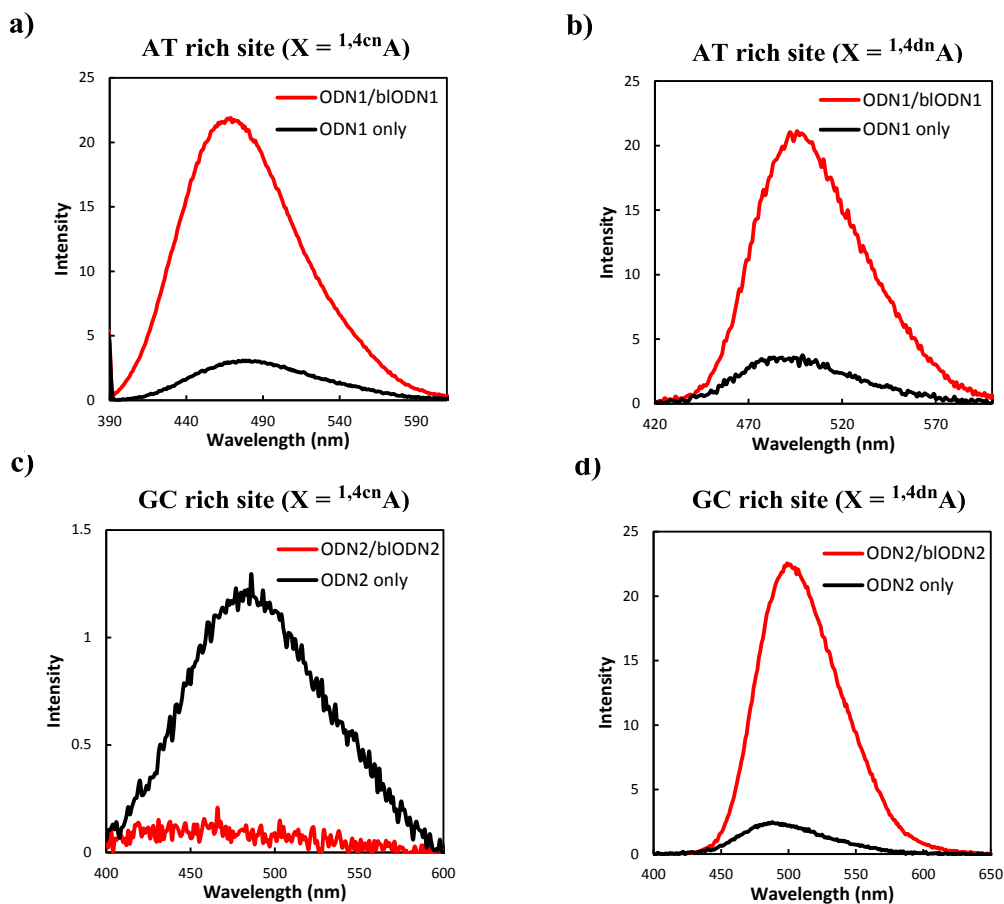


Figure 2-7. Fluorescence spectra of ODN 1 [$X =$ (a) $1,4^{cn}A$ and, (b) $1,4^{dn}A$] hybridized with bIODN 1 and of ODN 2 [$X =$ (c) $1,4^{cn}A$, and (d) $1,4^{dn}A$] hybridized with bIODN 2 (2.5 μ M ODNs, 50 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.0, r.t.). The excitation wavelength was (a) 368 nm, (b) 380 nm, (c) 365 nm and (d) 380 nm. The slit width was 1.5 nm.

2.3 結論

本章では、アデニン塩基の 8 位にナフタレン分子を三重結合で共役させた新しい環境感応型の蛍光核酸の開発を目指して実験を進めた結果について述べた。合成した得られた誘導体を、様々な溶媒中で蛍光測定を行った結果、ナフタレンに電子吸引基であるシアノ基、および電子供与基である *N,N*-ジメチルアミノ基のどちらの置換基を有する場合でもソルバトフルオロクロミックな蛍光特性を示した。これは、アデニンがグアニンよりも酸化電位が大きいため、アデニン塩基に電子吸引性のシアノ基を有する蛍光発色団を共役させると、分子内でアデニン塩基がドナーの性質を示す一方で、電子供与性の *N,N*-ジメチルアミノ基を有する蛍光発色団を共役させると、アデニン塩基がアクセプターを示すためである。

さらに、ソルバトフルオロクロミックな性質の 1 つである極性の低い環境下で強い蛍光を示す特徴を利用して、標的 DNA とのハイブリダイズにより、修飾塩基が 1 つとびだしたバルジ構造となるようにプローブ DNA を作成することで、蛍光強度の増大で相補鎖（ターゲット配列）を検出することに成功した。また、*N,N*-ジメチルアミノ基を持つ **2,6dnA** や **1,4dnA** を含む ODN は近傍のグアニン塩基からの蛍光消光を受けないことから、ODN 配列に制限されることなく検出したい遺伝子配列を識別できるプローブとして期待できる。

2.4 実験項

General: $^1\text{H-NMR}$ spectra (400 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (100 MHz) were measured with Bruker Avance 400F spectrometer. Coupling constants (J values) are reported in hertz. The chemical shifts are shown in ppm downfield from tetramethylsilane, using residual dimethyl sulfoxide (δ 2.50 in $^1\text{H-NMR}$, δ 39.5 in $^{13}\text{C-NMR}$) and chloroform (δ 7.26 in $^1\text{H-NMR}$, δ 77.0 in $^{13}\text{C-NMR}$) as an internal standard. ESI-TOF masses were recorded on a JMS-T100LC “AccuTOF”, Applied DATUM Solution Business Operations.

The reagents for DNA synthesis were purchased from Glen Research. Mass spectra of oligodeoxynucleotides were determined with a MALDI-TOF mass (Shimadzu AXIMA-LNR, positive mode) with 2',3',4'-trihydroxyacetophenone as a matrix. Calf intestinal alkaline phosphatase (Promega), *Crotalus adamanteus* venom phosphodiesterase I (USB), and *Penicillium citrinum* nuclease P1 (Yamasa Shoyu) were used for the enzymatic digestion of ODNs. All aqueous solutions utilized purified water (Millipore, Milli-Q sp UF). Reversed-phase HPLC was performed on CHEMCOBOND 5-ODS-H columns (10 \times 150 mm, 4.6 \times 150 mm) with a JASCO Chromatograph, Model PU-2080, using a UV detector, Model UV-2075 plus at 260 nm.

Procedure for the synthesis of modified nucleosides and naphthalene derivatives

8-Bromo-2'-deoxyadenosine was prepared from 2'-deoxyadenosine according to literature method³⁰.

8-Ethynyl-2'-deoxyadenosine (3) was prepared from 8-bromo-2'-deoxyadenosine according to literature method by 2 step reactions.²⁹⁾

6-Bromo-2-naphthonitrile (4a) was prepared from 6-bromo-2-naphthoic acid according to literature method by 3 step reactions.³¹⁾

6-Bromo-*N,N*-dimethylnaphthyl-2-amine (4b) was prepared from 6-bromo-2-naphthol according to literature method.³³⁾

6-Iodo-*N,N*-dimethylnaphthyl-2-amine (5b) To a solution of **4b** (866 mg, 3.46 mmol) in dry THF (10 ml) was added dropwise a solution of *n*-BuLi (2.38 ml of 1.6 M solution in hexanes, 3.81 mmol) at -78°C . After addition, the mixture was stirred for 30 min at this temperature, then a solution of I_2 (1.14 g, 4.49 mmol) in 5 ml of THF was added. The resulting solution was allowed to warm to room temperature and stirred for another 30 min. The reaction solution was concentrated in *vacuo*, and the residue was diluted with ethyl acetate, washed with saturated $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ for 3 times. The combined

organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford the crude product, which was purified by silica gel column chromatography with hexane-ethyl acetate mixture (9 : 1) to give **5b** as a colorless solid (590 mg, 67 %). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.05 (s, 6H), 6.84 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.14 (dd, *J* = 2.5, 9.1 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.57-7.59 (complex, 2H), 8.05 (m, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 40.6 (2C), 85.7, 105.9, 116.7, 127.6, 127.9, 128.4, 133.7, 134.4, 136.0, 148.8; HRMS (ESI) *m/z* 298.0093 calcd for C₁₂H₁₃IN [M + H]⁺, found 298.0094.

8-[2-(6-Cyano-2-naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine (^{2,6cn}A: **1a)** A mixture of **3** (198 mg, 0.72 mmol), Pd(PPh₃)₄ (83.1 mg, 0.07 mmol), CuI (27.2 mg, 0.14 mmol) and **4a** (198 mg, 0.85 mmol) in DMF (7 ml) and Et₃N (1 ml) was stirred at 80 °C under an argon atmosphere for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 5-10 % methanol in chloroform, to give **1a** (67.5 mg, 22 %) as a yellow solid: ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.32 (ddd, *J* = 2.9, 6.6, 13.2 Hz, 1H), 3.20 (m, 1H), 3.54 (ddd, *J* = 5.0, 7.6, 11.8 Hz, 1H), 3.71 (ddd, *J* = 4.4, 4.5, 11.8 Hz, 1H), 3.94 (m, 1H), 4.56 (m, 1H), 5.33 (dd, *J* = 4.5, 7.6 Hz, 1H), 5.41 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.60 (m, 1H), 7.71 (br, 2H), 7.88 (m, 1H), 7.91 (dd, *J* = 1.6, 8.5 Hz, 1H), 8.18-8.24 (complex, 3H), 8.49 (m, 1H), 8.68 (m, 1H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 37.8, 62.2, 71.2, 80.4, 85.1, 88.4, 93.9, 110.0, 118.9, 119.8, 120.5, 127.6, 129.4, 129.4, 129.5, 131.9, 132.4, 132.5, 133.8, 134.3, 148.6, 153.6, 156.2; HRMS (ESI) *m/z* 449.1338 calcd for C₂₃H₁₈N₆O₃Na [M+Na]⁺, found 449.1309.

8-[2-(6-*N,N*-Dimethylamino-2-naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine (^{2,6dn}A: **1b)** As described for **1a**, a mixture of **3** (203 mg, 0.74 mmol), Pd(PPh₃)₄ (85.2 mg, 0.07 mmol), CuI (16.8 mg, 0.09 mmol) and **5b** (259 mg, 0.87 mmol) in DMF (10 ml) and Et₃N (1 ml) was stirred at 50 °C under an argon atmosphere for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 5-10 % methanol in chloroform, to give **1b** (223 mg, 68 %) as a yellow solid: ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.30 (ddd, *J* = 2.6, 6.5, 13.2 Hz, 1H), 3.07 (s, 6H), 3.19 (m, 1H), 3.54 (ddd, *J* = 4.9, 7.9, 11.8 Hz, 1H), 3.70 (ddd, *J* = 4.3, 4.4, 11.8 Hz, 1H), 3.95 (m, 1H), 4.54 (m, 1H), 5.39-5.42 (complex, 2H), 6.59 (m, 1H), 6.98 (m, 1H), 7.31 (dd, *J* = 2.5, 9.2 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 1.7, 8.5 Hz, 1H), 7.64 (br, 2H), 7.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.12 (m, 1H), 8.18 (s, 1H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 37.8, 40.0 (×2), 62.3, 71.3, 77.8, 85.2, 88.4, 96.2, 105.1, 111.8, 116.9, 119.7, 125.2, 126.6, 127.9, 129.0, 132.3, 133.4, 135.2, 148.6, 149.6, 153.2, 156.0; HRMS (ESI) *m/z* 467.1808 calcd for C₂₄H₂₄N₆O₃Na [M+Na]⁺, found 467.1782.

8-[2-(2-Naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine (²ⁿA: **1c)** As described for **1a**, a mixture of **3** (443 mg, 1.60 mmol), Pd(PPh₃)₄ (186 mg, 0.16 mmol), CuI (92.0 mg, 0.48 mmol) and 2-bromonaphthalene **4c** (601 mg, 2.90 mmol) in DMF (15 ml) and Et₃N (2 ml) was stirred at 80 °C under an argon atmosphere for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 5-10 % methanol in chloroform, to give **1c** (251 mg, 39 %) as a colorless solid: ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.32 (ddd, *J* = 2.8, 6.6, 13.2 Hz, 1H), 3.20 (m, 1H), 3.54 (ddd, *J* = 4.9, 7.7, 11.8 Hz, 1H), 3.71 (ddd, *J* = 4.4, 4.5, 11.8 Hz, 1H), 3.95 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 5.36 (dd, *J* = 4.4, 7.7 Hz, 1H), 5.41 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.60 (m, 1H), 7.62-7.73 (complex, 5H), 8.01-8.07 (complex, 3H), 8.20 (s, 1H), 8.37 (m, 1H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 37.8, 62.2, 71.2, 78.9, 85.1, 88.4, 94.8, 117.2, 119.7, 127.3, 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 128.8, 132.4, 132.5, 132.9, 133.1, 148.6, 153.5, 156.1; HRMS (ESI) *m/z* 424.1386 calcd for C₂₂H₁₉N₅O₃Na [M+Na]⁺, found 424.1409.

4-Bromo-1-naphthonitrile (6a**)** was prepared from 1,4-dibromonaphthalene according to literature method.³⁴⁾

4-Bromo-*N,N*-dimethylnaphthyl-1-amine (6b**)** was prepared from 4-bromonaphthyl-1-amine according to literature method.⁴²⁾

4-Iodo-*N,N*-dimethylnaphthyl-1-amine (7b**)** As described for **5b**, with **6b** (2.09g, 8.34 mmol), *n*-BuLi (9.9 ml, 15.8 mmol), and I₂ (2.54 g, 10.0 mmol): **7b** (983 mg, 40 %). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.90 (s, 6H), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.52-7.56 (complex, 2H), 7.97 (m, 1H), 8.07 (m, 1H), 8.21 (m, 1H).

8-[2-(4-Cyano-1-naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine (^{1,4cn}A: **2a)** As described for **1a**, a mixture of **3** (60.0 mg, 0.22 mmol), Pd(PPh₃)₄ (25.2 mg, 0.02 mmol), CuI (4.2 mg, 0.02 mmol) and **6a** (60.7 mg, 0.29 mmol) in DMF (2 ml) and Et₃N (0.2 ml) was stirred at 60 °C under an argon atmosphere for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 5-10 % methanol in chloroform, to give **2a** (42.8 mg, 46 %) as a yellow solid: ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.36 (ddd, *J* = 2.9, 6.4, 13.2 Hz, 1H), 3.27 (m, 1H), 3.54 (m, 1H), 3.69 (m, 1H), 3.96 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.41 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 6.68 (m, 1H), 7.80 (br, 2H), 7.96 (complex, 2H), 8.13 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.26 (m, 1H), 8.30 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.47 (m, 1H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 37.6, 62.1, 71.2, 85.4, 86.7, 88.3, 90.9, 110.7, 117.0, 120.0, 123.0, 125.3, 126.0, 129.6, 130.1, 130.8, 131.3, 131.9, 132.4, 132.7, 148.7, 153.8, 156.3; HRMS (ESI) *m/z* 449.1338 calcd for C₂₃H₁₈N₆O₃Na [M+Na]⁺, found 449.1319.

8-[2-(4-*N,N*-Dimethylamino-1-naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine (^{1,4}dnA: **2b)** As described for **1a**, a mixture of **3** (605 mg, 2.20 mmol), Pd(PPh₃)₄ (127 mg, 0.11 mmol), CuI (16.8 mg, 0.09 mmol) and **7b** (784 mg, 2.64 mmol) in DMF (20 ml) and Et₃N (2 ml) was stirred at 60 °C under argon atmosphere for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 5-10 % methanol in chloroform, to give **2b** (720 mg, 74 %) as a yellow solid: ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.32 (ddd, *J* = 2.5, 6.5, 13.1 Hz, 1H), 3.26 (m, 1H), 3.36 (s, 6H), 3.55 (m, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.96 (m, 1H), 4.54 (m, 1H), 5.39-5.42 (complex, 2H), 6.66 (dd, *J* = 6.5, 8.0 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.62-7.72 (complex, 4H), 7.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.21 (m, 1H), 8.27 (m, 1H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 37.6, 44.4 (×2), 62.2, 71.3, 82.5, 85.4, 88.3, 93.7, 110.2, 113.2, 119.7, 125.1, 125.5, 125.9, 127.2, 127.6, 132.5, 133.5, 133.9, 148.6, 153.1, 153.2, 156.0; HRMS (ESI) *m/z* 467.1808 calcd for C₂₄H₂₄N₆O₃Na [M+Na]⁺, found 467.1792.

8-[2-(1-Naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine (¹ⁿA: **2c)** As described for **1a**, a mixture of **3** (508 mg, 1.84 mmol), Pd(PPh₃)₄ (221 mg, 0.19 mmol), CuI (74.0 mg, 0.39 mmol) and 1-iodonaphthalene **7c** (691 mg, 2.72 mmol) in DMF (10 ml) and Et₃N (1 ml) was stirred at 80 °C under an argon atmosphere for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 5-10 % methanol in chloroform, to give **2c** (452 mg, 61 %) as a colorless solid: ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.34 (m, 1H), 3.28 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.97 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 5.37-5.41 (complex, 2H), 6.69 (dd, *J* = 6.6, 7.8 Hz, 1H), 7.63-8.31 (complex, 10H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 37.6, 62.2, 71.3, 83.4, 85.4, 88.3, 92.6, 117.3, 124.9, 125.7, 127.2, 128.0, 128.8, 128.9, 130.9, 131.8, 132.4, 132.8, 133.1, 148.7, 153.5, 156.2; HRMS (ESI) *m/z* 424.1386 calcd for C₂₂H₁₉N₅O₃Na [M+Na]⁺, found 424.1400.

8-[2-(6-Cyano-2-naphthyl)ethynyl]-*N*⁶-[(*N,N*-dimethylamino)methylene]-2'-deoxyadenosine (8a**)** To a solution of **1a** (227 mg, 0.53 mmol) in DMF (10 ml) was added *N,N*-dimethylformamide diethyl acetal (1 ml) at room temperature, and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 30 min. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 5 % methanol in chloroform, to give **8a** (239 mg, 93 %) as a yellow solid: ¹H- and ¹³C-NMR data not shown.

8-[2-(6-Cyano-2-naphthyl)ethynyl]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*⁶-[(*N,N*-dimethylamino)methylene]-2'-deoxyadenosine (9a**)** A mixture of **8a** (220 mg, 0.46 mmol), 4-dimethylaminopyridine (11.2 mg, 0.92 mmol) and 4,4'-dimethoxytrityl chloride (301 mg, 0.89 mmol) in anhydrous pyridine (10 ml) was stirred at room temperature for 3 h. After the reaction was completed and quenched by

addition of methanol, and the solvent was concentrated in *vacuo*. The residue was partitioned between ethyl acetate and saturated NaHCO₃, and the separated organic layer was washed with brine. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 3 % methanol and 1 % triethylamine in chloroform, to give **9a** (132 mg, 37 %) as a yellow solid: ¹H- and ¹³C-NMR data not shown.

8-[2-(6-Cyano-2-naphthyl)ethynyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N⁶-[(N,N-Dimethylamino)methylene]-2'-deoxyadenosine 3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite] (10a) To a solution of **9a** (63.9 mg, 0.08 mmol) in anhydrous acetonitrile (1 ml) was added 2-cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidite (100 μl) in the presence of Et₃N (0.5 ml), and the solution was stirred at room temperature under argon atmosphere for 30 min. After completion of the reaction, the solution was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was incorporated into oligonucleotides without further purification.

N⁶-[(N,N-Dimethylamino)methylene]-8-[2-(6-N,N-dimethylamino-2-naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine (8b) As described for **8a**, to a solution of **1b** (105 mg, 0.21 mmol) in DMF (10 ml) was added *N,N*-dimethylformamide diethyl acetal (1 ml) at room temperature, and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 30 min. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 5 % methanol in chloroform, to give **8b** (114 mg, 97 %) as a colorless solid: ¹H- and ¹³C-NMR data not shown.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N⁶-[(N,N-dimethylamino)methylene]-8-[2-(6-N,N-dimethylamino-2-naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine (9b) As described for **9a**, a mixture of **8b** (105 mg, 0.21 mmol), 4-dimethylaminopyridine (49.0 mg, 0.40 mmol) and 4,4'-dimethoxytrityl chloride (215 mg, 0.55 mmol) in anhydrous pyridine (5 ml) was stirred at room temperature for 3 h. After the reaction was completed and quenched by addition of methanol, and the solvent was concentrated in *vacuo*. The residue was partitioned between ethyl acetate and saturated NaHCO₃, and the separated organic layer was washed with brine. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 3 % methanol and 1 % triethylamine, to give **9b** (135 mg, 80 %) as a yellow solid: ¹H- and ¹³C-NMR data not shown.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N⁶-[(N,N-dimethylamino)methylene]-8-[2-(6-N,N-dimethylamino-2-naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine 3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite] (10b) As described for **10a**, to a solution of **9b** (61.0 mg, 0.08 mmol) in anhydrous acetonitrile (1 ml) was added 2-cyanoethyldiisopropylchlorophosphoramidite (100 μ l) in the presence of Et₃N (0.5 ml), and the solution was stirred at room temperature under argon atmosphere for 30 min. After completion of the reaction, the solution was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was incorporated into oligonucleotides without further purification.

8-[2-(4-Cyano-1-naphthyl)ethynyl]-N⁶-[(N,N-dimethylamino)methylene]-2'-deoxyadenosine (11a) As described for **8a**, to a solution of **2a** (108 mg, 0.25 mmol) in DMF (10 ml) was added N,N-dimethylformamide diethyl acetal (0.5 ml) at room temperature, and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 30 min. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 5 % methanol in chloroform, to give **11a** (118 mg, 97 %) as a colorless solid: ¹H- and ¹³C-NMR data not shown.

8-[2-(4-Cyano-1-naphthyl)ethynyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N⁶-[(N,N-dimethylamino)methylene]-2'-deoxyadenosine (12a) As described for **9a**, a mixture of **11a** (101 mg, 0.21 mmol), 4-dimethylaminopyridine (49.0 mg, 0.40 mmol) and 4,4'-dimethoxytrityl chloride (212 mg, 0.55 mmol) in anhydrous pyridine (5 ml) was stirred at room temperature for 3 h. After the reaction was completed and quenched by addition of methanol, and the solvent was concentrated *in vacuo*. The residue was partitioned between ethyl acetate and saturated NaHCO₃, and the separated organic layer was washed with brine. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with 3 % methanol and 1 % triethylamine, to give **12a** (108 mg, 66 %) as a yellow solid: ¹H- and ¹³C-NMR data not shown.

8-[2-(4-Cyano-1-naphthyl)ethynyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N⁶-[(N,N-Dimethylamino)methylene]-2'-deoxyadenosine 3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite] (13a) As described for **10a**, to a solution of **12a** (73.0 mg, 0.09 mmol) in anhydrous acetonitrile (1 ml) was added 2-cyanoethyldiisopropylchlorophosphoramidite (100 μ l) in the presence of Et₃N (0.5 ml), and the solution was stirred at room temperature under argon atmosphere for 30 min. After completion of the reaction, the solution was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was incorporated into oligonucleotides without further purification.

***N*⁶-[(*N,N*-Dimethylamino)methylene]-8-[2-(4-*N,N*-dimethylamino-1-naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine (11b)** As described for **8a**, To a solution of **2b** (312 mg, 0.70 mmol) in DMF (10 ml) was added *N,N*-dimethylformamide diethyl acetal (1 ml) at room temperature, and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 30 min. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column eluted with 5 % methanol in chloroform, to give **11b** (242 mg, 69 %) as a colorless solid: ¹H- and ¹³C-NMR data not shown.

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁶-[(*N,N*-dimethylamino)methylene]-8-[2-(4-*N,N*-dimethylamino-1-naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine (12b) As described for **9a**, A mixture of **11b** (240 mg, 0.48 mmol), 4-dimethylaminopyridine (58.6 mg, 0.48 mmol) and 4,4'-dimethoxytrityl chloride (488 mg, 1.26 mmol) in anhydrous pyridine (5 ml) was stirred at room temperature for 3 h. After the reaction was completed and quenched by addition of methanol, and the solvent was concentrated *in vacuo*. The residue was partitioned between ethyl acetate and saturated NaHCO₃, and the separated organic layer was washed with brine. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel column eluted with 3 % methanol and 1 % triethylamine, to give **12b** (162 mg, 42 %) as a colorless solid: ¹H- and ¹³C-NMR data not shown.

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁶-[(*N,N*-dimethylamino)methylene]-8-[2-(4-*N,N*-dimethylamino-1-naphthyl)ethynyl]-2'-deoxyadenosine 3'-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite] (13b) As described for **10a**, To a solution of **12b** (60.0 mg, 0.07 mmol) in anhydrous acetonitrile (1 ml) was added 2-cyanoethyldiisopropylchlorophosphoramidite (100 μl) in the presence of Et₃N (0.5 ml), and the solution was stirred at room temperature under argon atmosphere for 30 min. After completion of the reaction, the solution was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was incorporated into oligonucleotides without further purification.

Oligodeoxynucleotide synthesis and characterization: Oligodeoxynucleotide (ODN) sequences were synthesized by a conventional phosphoramidite method by using an Applied Biosystems 3400 DNA/RNA synthesizer. ODNs were purified by reverse phase HPLC on a 5-ODS-H column (10 × 150 nm, elution with 50 mM ammonium formate (AF) buffer, pH 7.0, linear gradient over 45 min from 3 % to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min). ODNs containing modified nucleotides were fully digested with calf intestine alkaline phosphatase (50 U/ml), and P1 nuclease (50 U/ml) at 37 °C for 12 h. Digested solutions were analyzed by HPLC on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6 × 150 nm, elution with a solvent mixture of 50 mM AF buffer, pH 7.0, flow rate 1.0 ml/min). The concentration of ODNs was determined by comparing peak areas with a standard solution containing dA, dG, dC, and dT at a concentration of 0.1 mM. Mass spectra of ODNs purified by

HPLC were determined with a MALDI-TOF mass spectrometer.

UV absorption measurements: Absorption spectra were obtained using a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer at room temperature using 1 cm length cell.

Fluorescence spectra: The fluorescence spectra were obtained with a Shimadzu RF-5300PC spectrofluorophotometer at 25 °C using a cell with a 1 cm path length. The excitation and emission bandwidths were 1.5 nm.

Melting temperature (T_m) measurements: All T_m s of the ODNs (2.5 μ M, final concentration) were measured in 50 mM sodium phosphate buffers (pH 7.0) containing 100 mM sodium chloride. Absorbance vs temperature profiles were measured at 260 nm using a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer equipped with a Peltier temperature controller using 1 cm path length cell. The absorbance of the samples was monitored at 260 nm from 4 to 90 °C with a heating rate of 1 °C/min. From these profiles, first derivatives were calculated to determine T_m values.

Circular dichroism (CD) measurements: CD spectra were recorded with a JASCO J-805 CD spectrophotometer. CD spectra of oligonucleotides solutions (2.5 μ M ODNs in 50 mM sodium phosphate buffers (pH 7.0) containing 100 mM sodium chloride at 20 °C) were measured using 2 mm path length cell.

Supplementary data

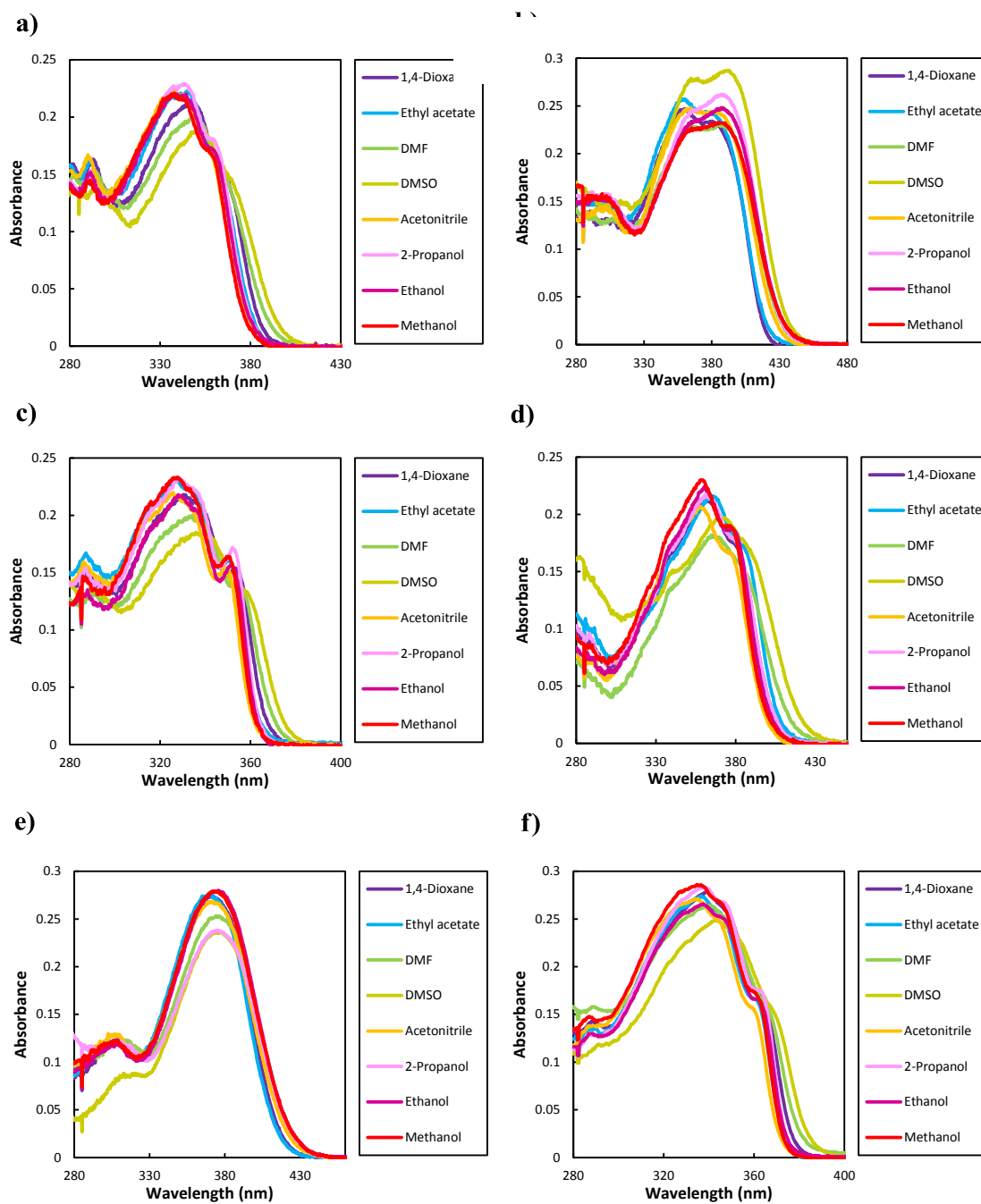


Figure S2-1. UV absorption spectra of (a) $2,6^{cn}A$ (1a), (b) $2,6^{dn}A$ (1b), (c) 2^nA (1c), (d) $1,4^{cn}A$ (2a), (e) $1,4^{dn}A$ (2b), and (f) 1^nA (2c) in various solvents (conc. 10 μM).

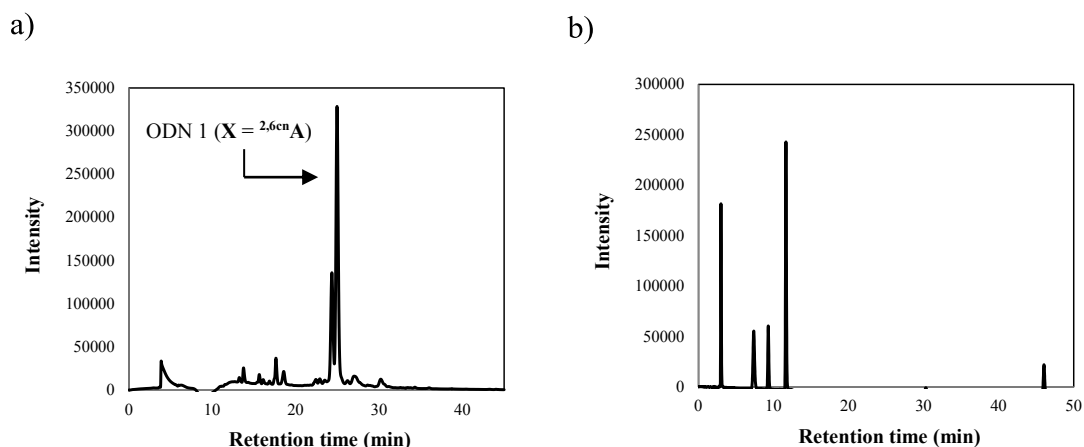


Figure S2-2. (a) HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of 13 mer single-stranded ODN 1 ($X = 2,6^{cn}A$). Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min. (b) HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μ M conc.).

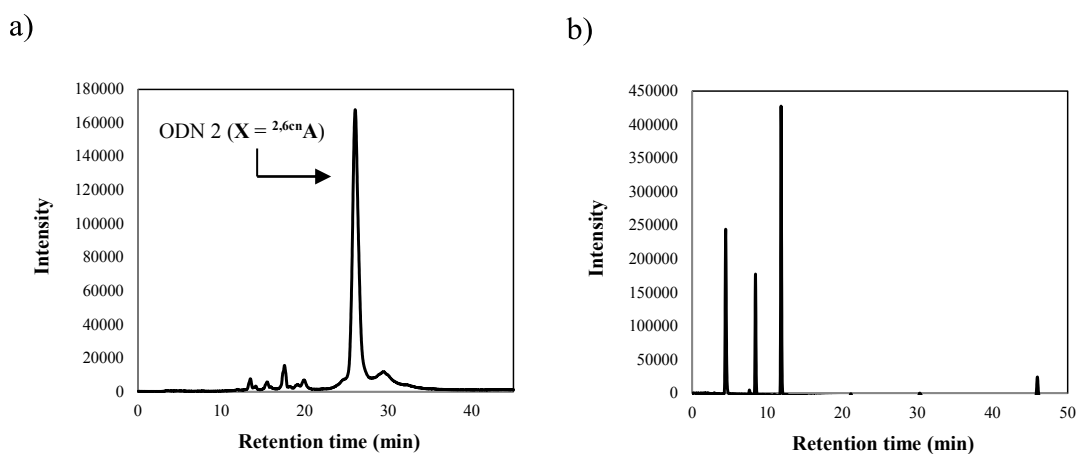


Figure S2-3. (a) HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of 13 mer single-stranded ODN 2 ($X = 2,6^{cn}A$). Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min. (b) HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μ M conc.).

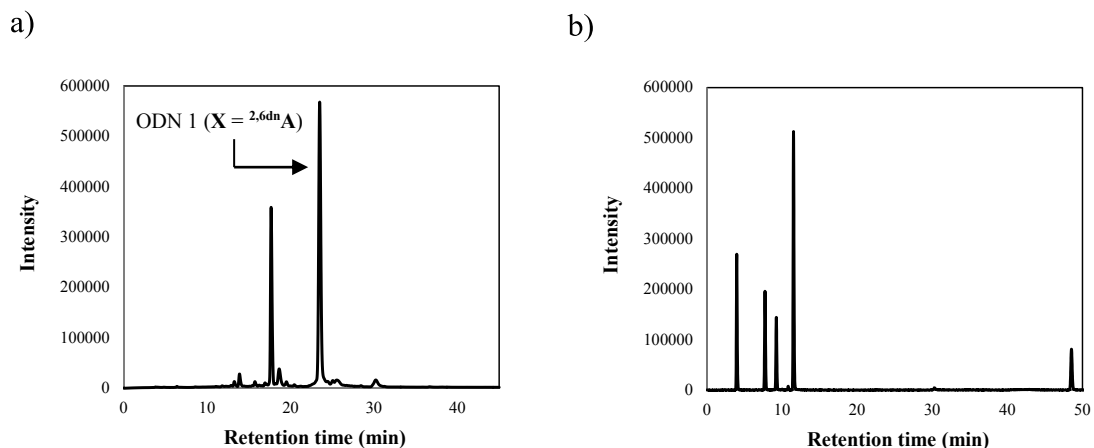


Figure S2-4. (a) HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of 13 mer single-stranded ODN 1 ($X = 2,6^{dn}A$). Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min. (b) HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μ M conc.).

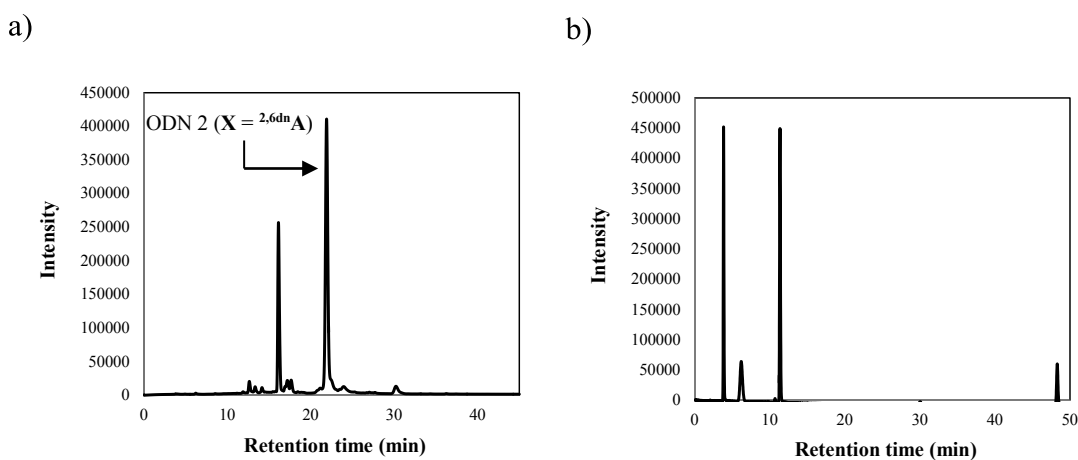


Figure S2-5. (a) HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of 13 mer single-stranded ODN 2 ($X = 2,6^{dn}A$). Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min. (b) HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μ M conc.).

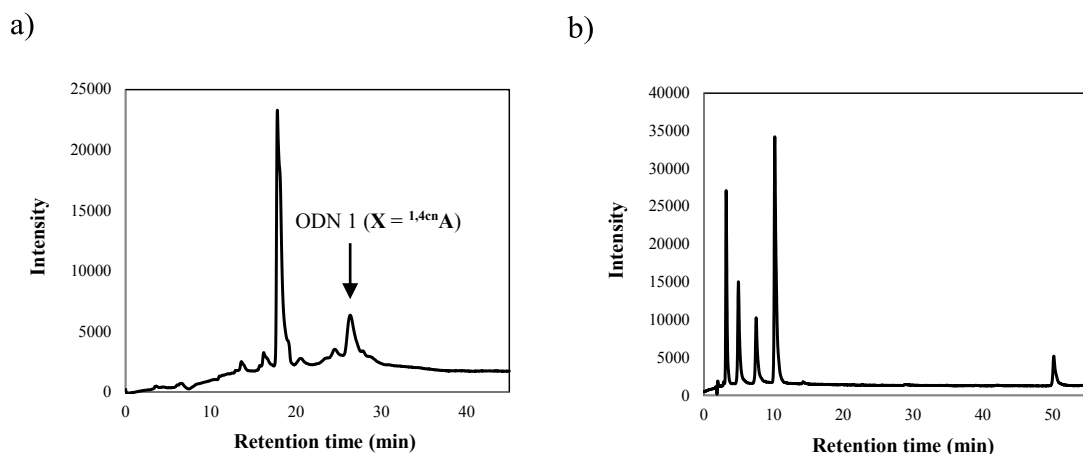


Figure S2-6. (a) HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of 13 mer single-stranded ODN 1 ($X = 1,4^{cn}A$). Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min. (b) HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μ M conc.).

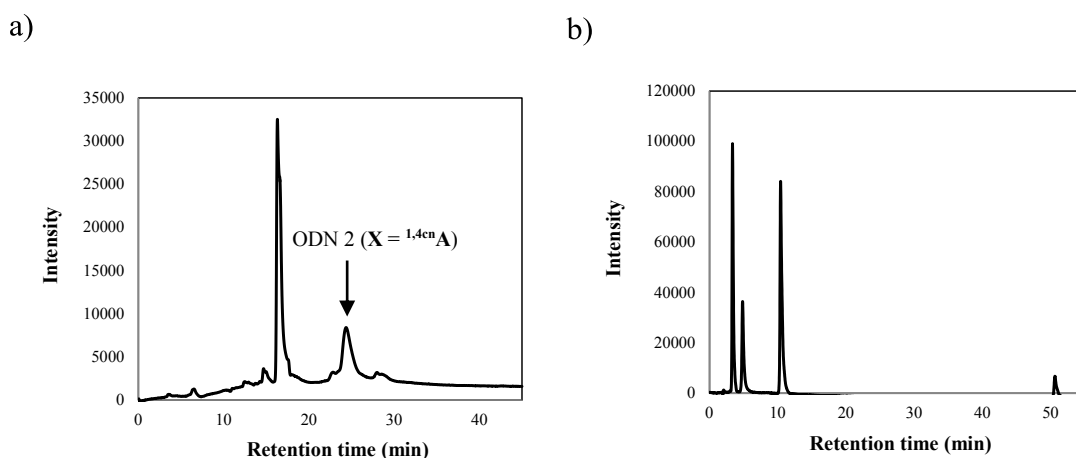


Figure S2-7. (a) HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of 13 mer single-stranded ODN 2 ($X = 1,4^{cn}A$). Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min. (b) HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μ M conc.).

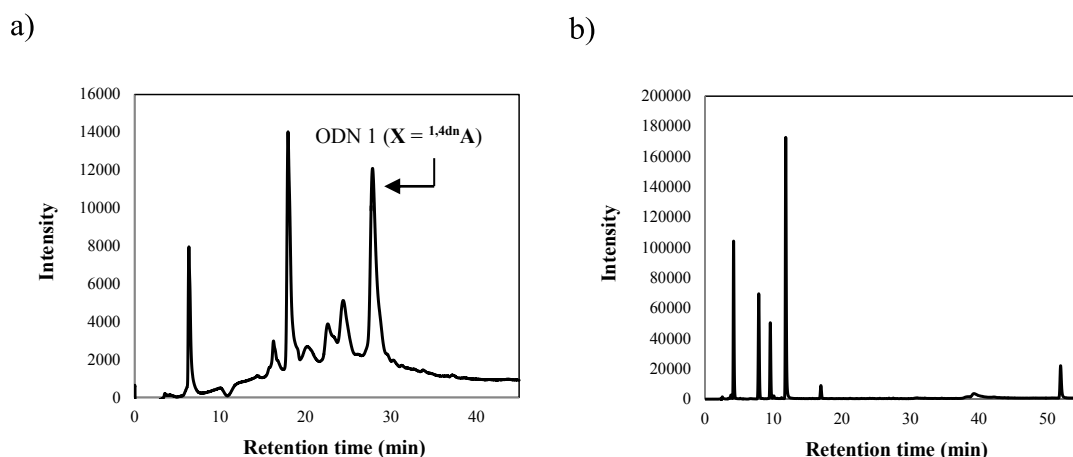


Figure S2-8. (a) HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of 13 mer single-stranded ODN 1 ($X = 1,4dnA$). Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min. (b) HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μ M conc.).

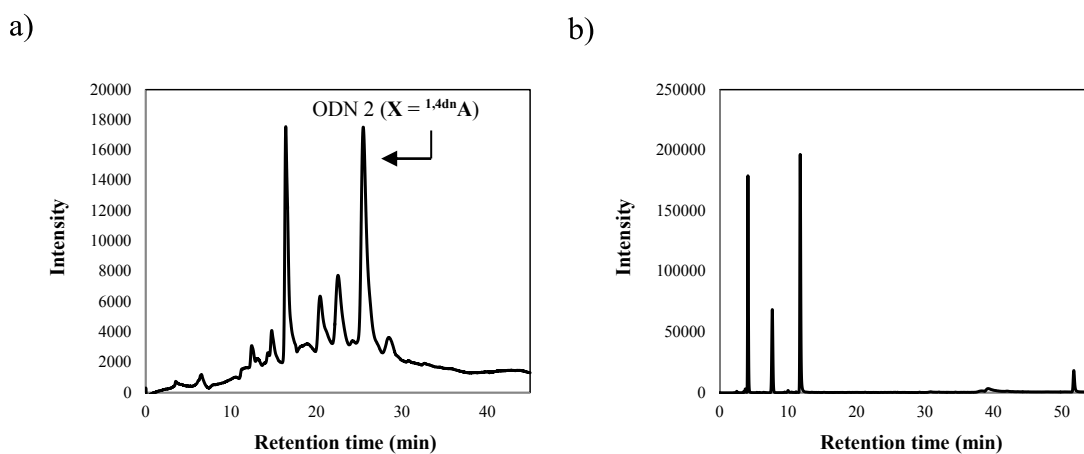


Figure S2-9. (a) HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of 13 mer single-stranded ODN 2 ($X = 1,4dnA$). Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min. (b) HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6×150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μ M conc.).

Table S2-1. MALDI-TOF mass spectral data for the ODNs

| ODNs | MALDI-TOF mass | |
|--|-----------------------------|----------------------------|
| | calcd. [M + H] ⁺ | found [M + H] ⁺ |
| ODN 1: 5'-CGCAAT ^{2,6cn} ATAACGC-3' | 4103.85 | 4102.84 |
| ODN 2: 5'-CGCAAC ^{2,6cn} ACAACGC-3' | 4073.83 | 4072.82 |
| ODN 1: 5'-CGCAAT ^{2,6dn} ATAACGC-3' | 4121.91 | 4121.23 |
| ODN 2: 5'-CGCAAC ^{2,6dn} ACAACGC-3' | 4091.88 | 4092.57 |
| ODN 1: 5'-CGCAAT ^{1,4cn} ATAACGC-3' | 4103.85 | 4103.81 |
| ODN 2: 5'-CGCAAC ^{1,4cn} ACAACGC-3' | 4073.83 | 4074.25 |
| ODN 1: 5'-CGCAAT ^{1,4dn} ATAACGC-3' | 4121.91 | 4121.41 |
| ODN 2: 5'-CGCAAC ^{1,4dn} ACAACGC-3' | 4091.88 | 4091.69 |

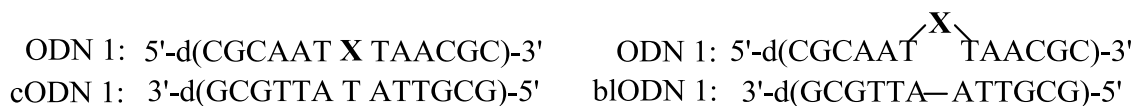
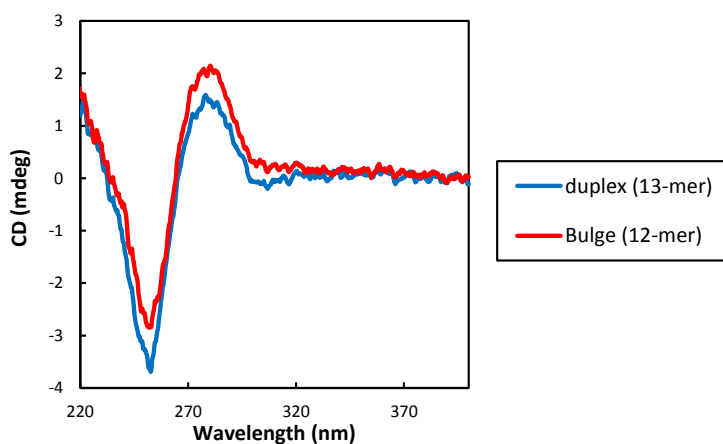


Figure S2-10. CD spectra of ODN 1 (X = ^{2,6dn}A) hybridized with cODN 1 (blue line), and bLODN 1 (red line); 2.5 μM ODNs, 50 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.0, r.t.

Table S2-2. Thermal melting temperature (T_m) of oligodeoxynucleotides*

| ODNs (duplex) | T_m (°C) | ODNs (bulge) | T_m (°C) |
|--|------------|---|------------|
| ODN1 (X = 2,6 ^{dn} A) / cODN1 (N = T) | 43.3 | ODN1 (X = 2,6 ^{dn} A) / bIODN1 | 42.1 |
| / cODN1 (N = C) | 43.0 | ODN1 (X = A) / bIODN1 | 38.0 |
| / cODN1 (N = G) | 43.8 | ODN1 (X = non) / bIODN1 | 52.4 |
| / cODN1 (N = A) | 40.2 | | |
| ODN1 (X = A) / cODN1 (N = T) | 52.6 | | |
| ODN2 (X = 2,6 ^{dn} A) / cODN2 (N = T) | 52.3 | ODN2 (X = 2,6 ^{dn} A) / bIODN2 | 51.0 |
| / cODN2 (N = C) | 50.7 | ODN2 (X = A) / bIODN2 | 46.8 |
| / cODN2 (N = G) | 53.8 | ODN2 (X = non) / bIODN2 | 59.6 |
| / cODN2 (N = A) | 50.0 | | |
| ODN2 (X = A) / cODN2 (N = T) | 60.9 | | |

*All T_m s of ODNs (2.5 μ M) were measured in 50 mM sodium phosphate (pH = 7.0) and 0.1 M sodium chloride at rt.



参考文献

- 1) E. Lippert, W. Lüder, E. Moll, W. Nägele, H. Boos, H. Prigge, I. Seibold-Blankenstein, *Angew. Chem.*, 1961, **73**, 695.
- 2) K. Rotkiewicz, K.H. Grellmann, Z.R. Grabowski, *Chem. Phys. Lett.*, 1973, **19**, 315.
- 3) A.L. Sobolewski, W. Domcke, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, **250**, 428.
- 4) K.A. Zachariasse, M. Grobys, E. Tauer, *Chem. Phys. Lett.*, 1997, **274**, 372.
- 5) N. Chattopadhyay, C. Serpa, M.M. Pereira, J. Seixas de Melo, L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, *J. Phys. Chem. A*, 2001, **105**, 10025.
- 6) Z. Chen, Z. Zhang, T. Zhao, F. Bai, Y. Zhang, Z. Wang, *Spectrochim. Acta A*, 2001, **57**, 419.
- 7) M.A. Haidekker, T.P. Brady, D. Lichlyter, E.A. Theodorakis, *Bioorg. Chem.*, 2005, **33**, 415.
- 8) Y. Waka, N. Mataga, F. Tanaka, *Photochem., Photobiol.*, 1980, **32**, 335.
- 9) B.E. Cohen, T.B. McAnaney, E.S. Park, Y.N. Jan, S.G. Boxer, L.Y. Jan, *Science*, 2002, **296**, 1700.
- 10) M. Sundd, A.D. Pobertson, *Nat. Truct. Biol.*, 2002, **9**, 500.
- 11) R.W. Sinkeldam, N.J. Greco, Y. Tor, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 706.
- 12) Y. Shinohara, K. Matsumoto, K. Kugenuma, T. Morii, Y. Saito, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 2817.
- 13) K. Matsumoto, N. Takahashi, A. Suzuki, T. Morii, Y. Saito, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 1275.
- 14) Y. Saito, M. Koda, Y. Shinohara, I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 491.
- 15) L. Valis, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 3184.
- 16) N.J. Greco, Y. Tor, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 3515.
- 17) A. Collier, G.K. Wangner, *Chem. Commun.*, 2008, **178**, 180.
- 18) K.M. Sun, C.K. McLaughlin, D.R. Lantero, R.A. Manderville, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 1894.
- 19) Z. Lin, C.M. Lawrence, D. Xiao, V.V. Kireev, S.S. Skourtis, J.L. Sessler, D.N. Beratan, I.V. Rubtsov, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 18060.
- 20) A. Omumi, D.G. Beach, M. Baker, W. Gabryeski, R.A. Manderville, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 42.
- 21) A.G. Firth, Ian J.S. Fairlamb, K. Darley, C.G. Baumann, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 3529.
- 22) L. Zilbershtein, A. Silberman, B. Fischer, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 7763.
- 23) L. Zilbershtein-Shklanovsky, M. Weitman, D.T. Major, B. Fischer, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 11999.
- 24) G. Weber, F. J. Farris, *Biochemistry*, 1979, **18**, 3075.
- 25) R.B. MacGregor, G. Weber, *Nature*, 1986, **319**, 70.

- 26) H.S. Lee, J.Guo, E.A. Lemke, R.D. Dimla, P.G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 12921.
- 27) K. Tainaka, K. Tanaka, S. Ikeda, K.-I. Nishiza, T. Unzai, Y. Fujiwara, I. Saito, A. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 4776.
- 28) C.A.M. Seidel, A. Schulz, M.H.M. Sauer, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 5541.
- 29) I. Saito, Y. Saito, N. Takahashi, Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 2011, Patent No. JP 201137796.
- 30) Z. Kazimierczuk, J.A. Vilpo, F. Seela, *Helv. Chim. Acta*, 1992, **75**, 2289.
- 31) Q. Zhou, H.D. Srinivas, S. Dasgupta, M.P. Watson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 3307.
- 32) K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.*, 1975, **16**, 4467.
- 33) A.S. Rao, D. Kim, T. Wang, K.H. Kim, S. Hwang, K.H. Ahn, *Org. Lett.*, 2012, **14**, 2598.
- 34) O. Cakman, I. Kahveci, Í. Demirtaş, T. Hökelek, K. Smith, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 2000, **65**, 1791.
- 35) J.V. Morris, M.A. Mahaney, J.R. Huber, *J. Phys. Chem.*, 1976, **80**, 969.
- 36) T. D. Son, W. Guschlbauer, M. Gueron, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 7903.
- 37) R. H., Sarma, C. -H., Lee, F. E. Evans, N. Yathindra, M. Sundaraligdam, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 7337.
- 38) R. G. Eason, D. M. Burkhardt, S. J. Phillips, D. P. Smith, S. S. David, *Nucleic Acids Res.*, 1996, **24**, 890.
- 39) P.M. Gannett, T.P. Sura, *Chem. Res. Toxicol.*, 1993, **6**, 690-700.
- 40) T. Gareis, C. Huber, O.S. Wolfbeis, J. Daub, *J. Chem. Commun.*, 1997, 1217.
- 41) M. Baruah, W. Qin, N. Basaric, W.M. De Borggraeve, N. Boens, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 4152.
- 42) K. Kumar, R.J. Tepper, Y. Zeng, M.B. Zimmt, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 4051.

第 3 章

DNA 二重鎖構造を不安定化しない環境感応型蛍光
7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の開発

3.1 緒言

プリン塩基の 8 位に、様々な置換基を有する芳香族化合物を導入した蛍光核酸¹⁻⁵⁾ はソルバトフルオロクロミックな性質を示すことが判明し、遺伝子検出、または蛋白質との相互作用部位における局所的な極性環境変化をモニターするプローブとしての利用が期待された。しかしながら、一般的に、プリン塩基の 8 位に置換基を導入すると、糖と塩基とのグリコシド結合が通常 *anti* 配座から *syn* 配座へと反転しやすくなると同時に、そのヌクレオシドを含む DNA は、二重らせん構造を大きく不安定化することが知られている⁶⁻⁸⁾。従って、対面塩基であるピリミジン塩基（グアニンはシトシンと、アデニンはチミンとそれぞれ水素結合能を有する）とワトソン-クリック型の水素結合能形成をすることが出来なくなる。DNA 二重らせん構造が不安定化すると、蛍光ヌクレオシドと対面塩基とのマッチ- mismatches の違いによる周辺の極性環境変化や微細なマイクロ環境変化に正確に応答できない、もしくは全く意図しないような現象が観測されてしまう場合がある。前章で述べたナフタレン骨格を有するアデノシン誘導体は、光学特性の面では優れていたが、より精度の高い遺伝子検出用のプローブや、蛋白質などの構造認識機能を有する蛍光核酸プローブとして実用化するためには分子の改良が必要とされた。

そこで、その課題を解決するために、DNA を構成する天然プリンヌクレオシドであるアデノシン及びグアノシンと同様な水素結合パターンを有する 7-デアザプリンヌクレオシドに着目した⁹⁾。天然のプリン塩基の 7 位は窒素原子であるために 7 位での化学修飾は通常不可能であるが、7-デアザプリンでは 7 位が炭素原子 (C-H) に置換されているため、例えば、ハロゲン原子を導入することでその位置に新たな化学修飾が可能である。また、C7 位修飾は DNA 二重らせん構造のメジャーグループに位置し、大きな空間が空いていることから、C8 位に修飾した時のような DNA 二重らせん構造の不安定化は誘起されないと予想される。

一方、先行研究として、7 位修飾 7-デアザアデノシン誘導体の合成方法やそれらの特性が報告されている¹⁰⁻¹⁶⁾。それらの中でも Seela によって開発された 7-ヘキシニル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシンは、糖-塩基のグリコシド結合が *anti* 配座であり、そのうえ、相手塩基と塩基対を組み、安定な二重鎖を形成できることが判明している¹²⁾。このことから、7-デアザプリンの 7 位に蛍光色素などの様々な置換基を導入しても、安定に DNA 二重鎖を形成できることが示唆される。さらに、8 位修飾プリン誘導体は、周辺の極性環境の違いによる蛍光発光波長の変化をより大きくするために、分子内に電子供与 (ドナー) 性および電子吸引 (アクセプター) 性の置換基を導入するように設計されていたが、7-デアザアデニンは天然のアデニンよりも酸化電位が低く、さらに天然のグアニンよりと同等もしくはそれ以下である¹⁷⁻²⁰⁾。従って、7-デアザアデニンは天然の核酸塩基と同程度かそれ以上の電子供与性を示すと予想される。

以前の研究で、7-デアザアデノシンの 7 位に効果的に共役構造を形成するように三重結合

を介して電子吸引性置換基を有するピレン誘導体である 4-[2-(1-Pyrenyl)ethynyl]benzotrile を導入した **CNZA** を合成した。しかし、**CNZA** は蛍光発光波長を大きく変化させることはできたものの、オリゴ DNA 鎖に導入した場合に DNA の二重らせん構造の安定化は期待されるほど起きなかった。その原因として修飾したピレン誘導体は分子サイズが大きすぎるために、また、非常に水に溶けにくい性質を有するがゆえに DNA 二重鎖構造を大きく歪ませ、結果的に安定構造を保持できなかったのではないかと考えられる。

そこで、第 2 章の結果も踏まえて、置換ナフタレンや例えば、アントラセン程度の分子サイズであれば、従来のヌクレオシド誘導体の優れた光学特性を維持しつつ、DNA 二重らせん構造を不安定化しないと考えた。そこで、**Fig. 3-1** に示す新しい 7-デアザアデノシン誘導体を合成し、それらのホスホロアミダイトユニットをオリゴヌクレオチド鎖へ導入し、光学特性や塩基対形成能について評価を行なった。

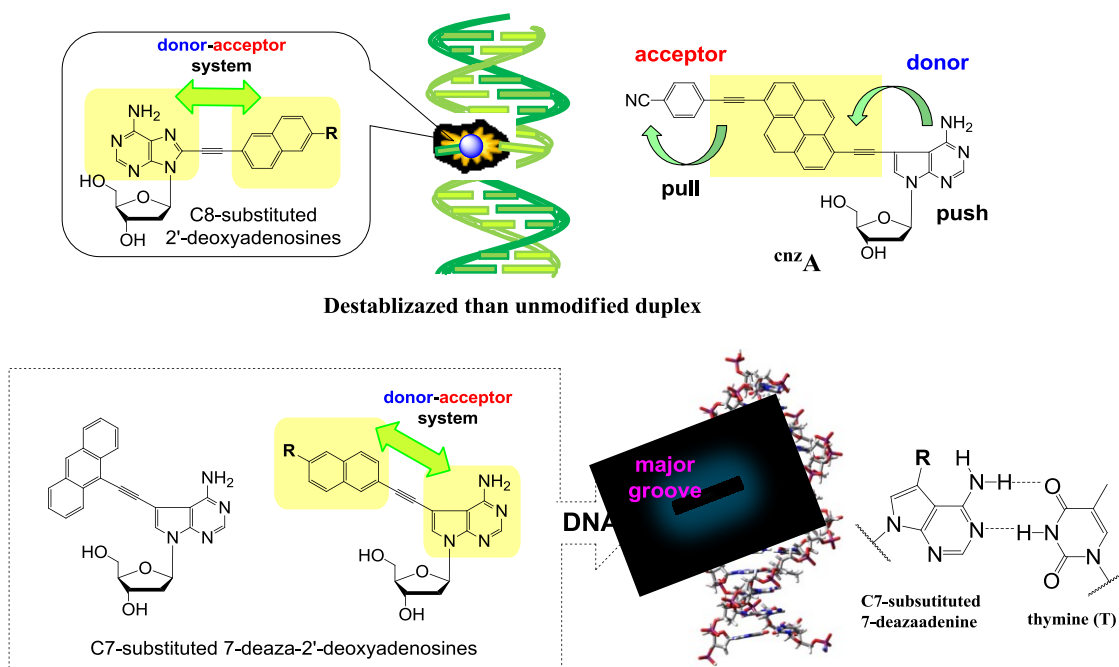
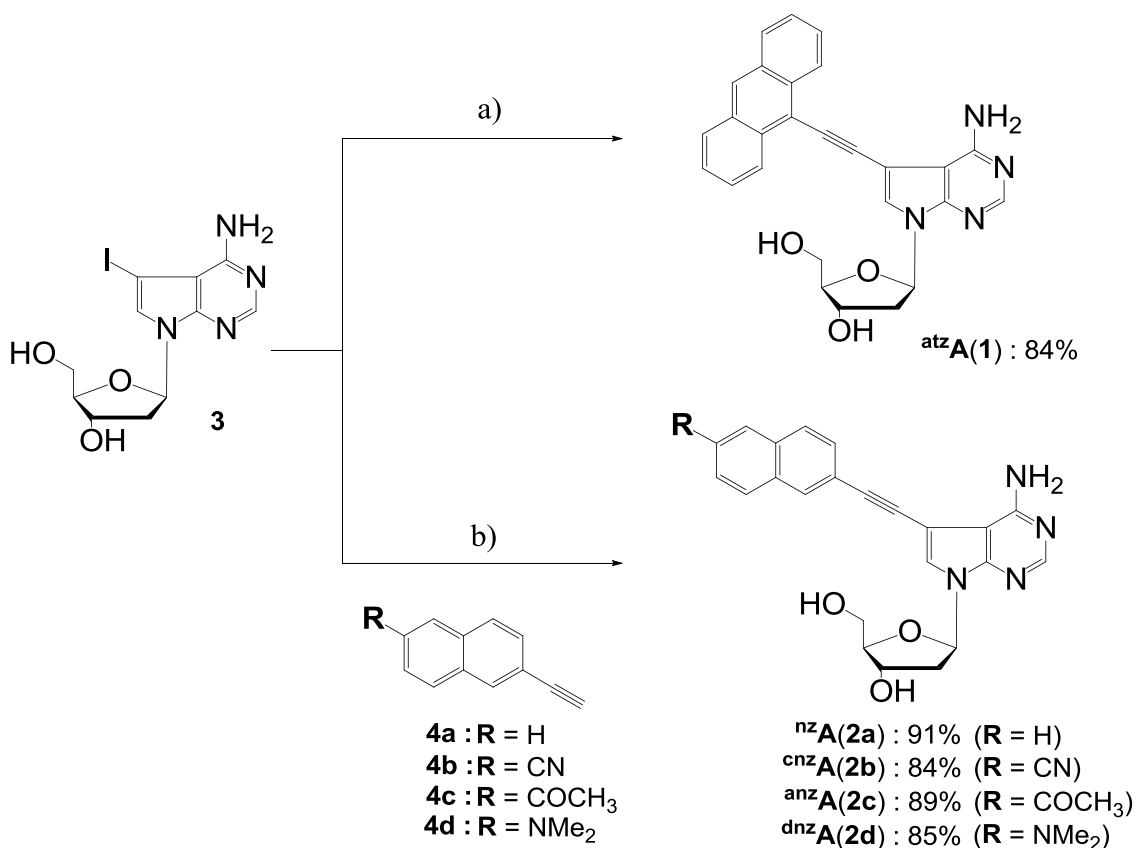


Figure 3-1. Design of C7-arylethynylated 7-deaza-2'-deoxyadenosines.

3.2 実験と結果

3.2.1 C7位にアリールエチニル基を有する7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の合成

7-デアザ-6-クロロプリンから3段階反応で7-ヨード-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン $3^{9,11)}$ を合成し、9-エチニルアントラセンとパラジウム-銅触媒を用いた菌頭カップリング反応 $^{21)}$ によって $atzA(1)$ を得ることに成功した。また、同様にして、 3 とエチニルナフタレン誘導体とをそれぞれ菌頭カップリングすることによって $nzA(2a)$, $cnzA(2b)$, $anzA(2c)$, $dnzA(2d)$ を得た。合成スキームは下記に示す。



Scheme 3-1. Reagents and conditions: a) 9-ethynylanthracene, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, 80 °C, 2 h; b) **4a**, **4b**, **4c**, or **4d**, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, 60 °C, 1 h.

3.2.2 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の光学特性

得られた7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 $1, 2$ の周辺の極性変化に伴う蛍光発光挙動を調べるために、まず、誘導体 1 および 2 を極性の異なる様々な溶媒中にそれぞれ溶解させ、濃度10 μ Mに調整した。続いて、化合物ごとにUVスペクトルの測定を行い、どの

溶媒中でも吸光度がほぼ一定であること（濃度が均一であること、また、確実に溶解していること）を確認するとともに、得られた最大吸収波長をもとに、蛍光スペクトルの測定を行なった。測定結果は **Fig. 3-2, 3-3, Table 3-1** に示す。

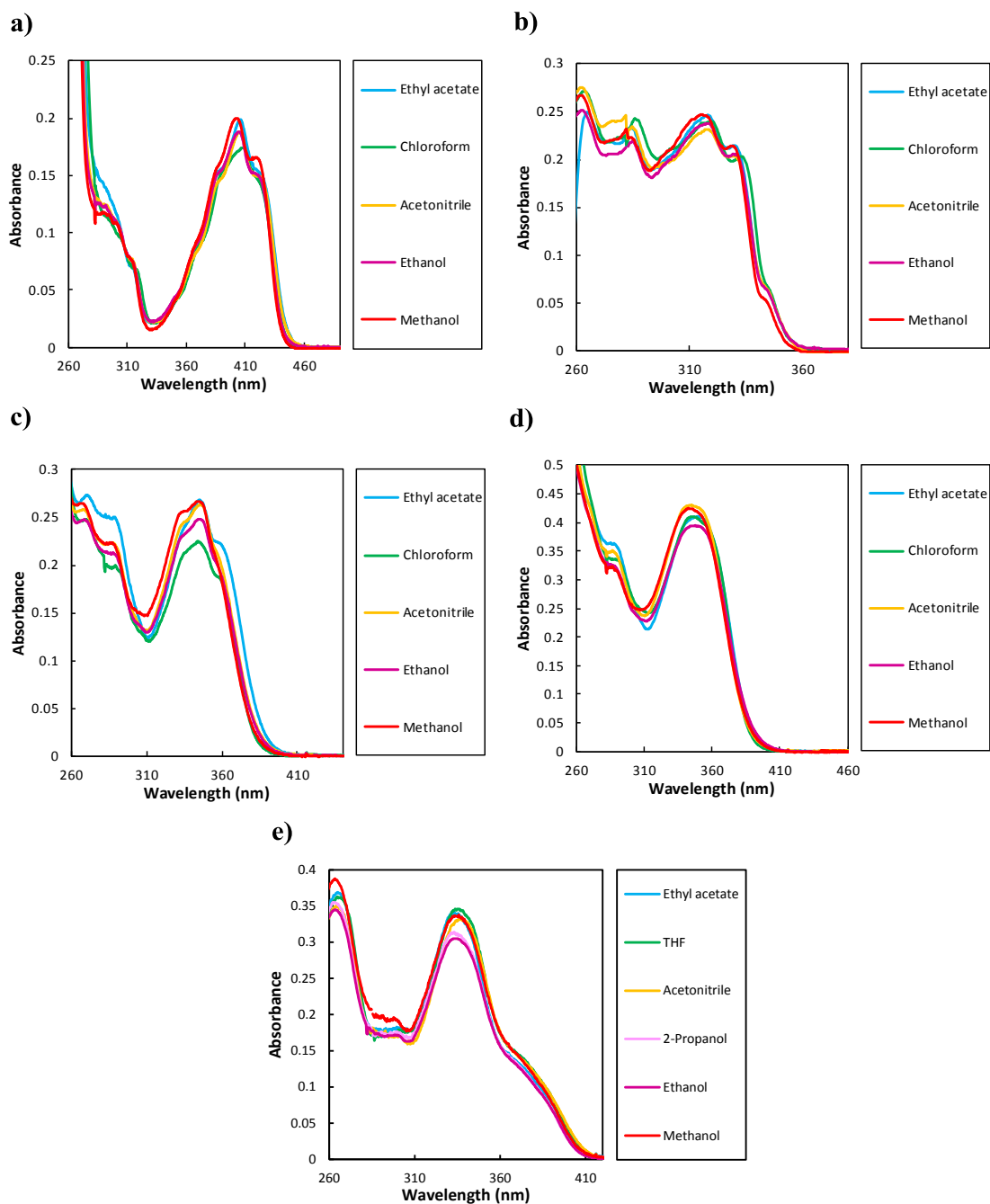


Figure 3-2. UV absorption spectra of (a) *atzA* (**1**), (b) *nzA* (**2a**), (c) *cnzA* (**2b**), (d) *anzA* (**2c**), and (e) *dnzA* (**2d**) in various solvents (each 10 μ M conc.).

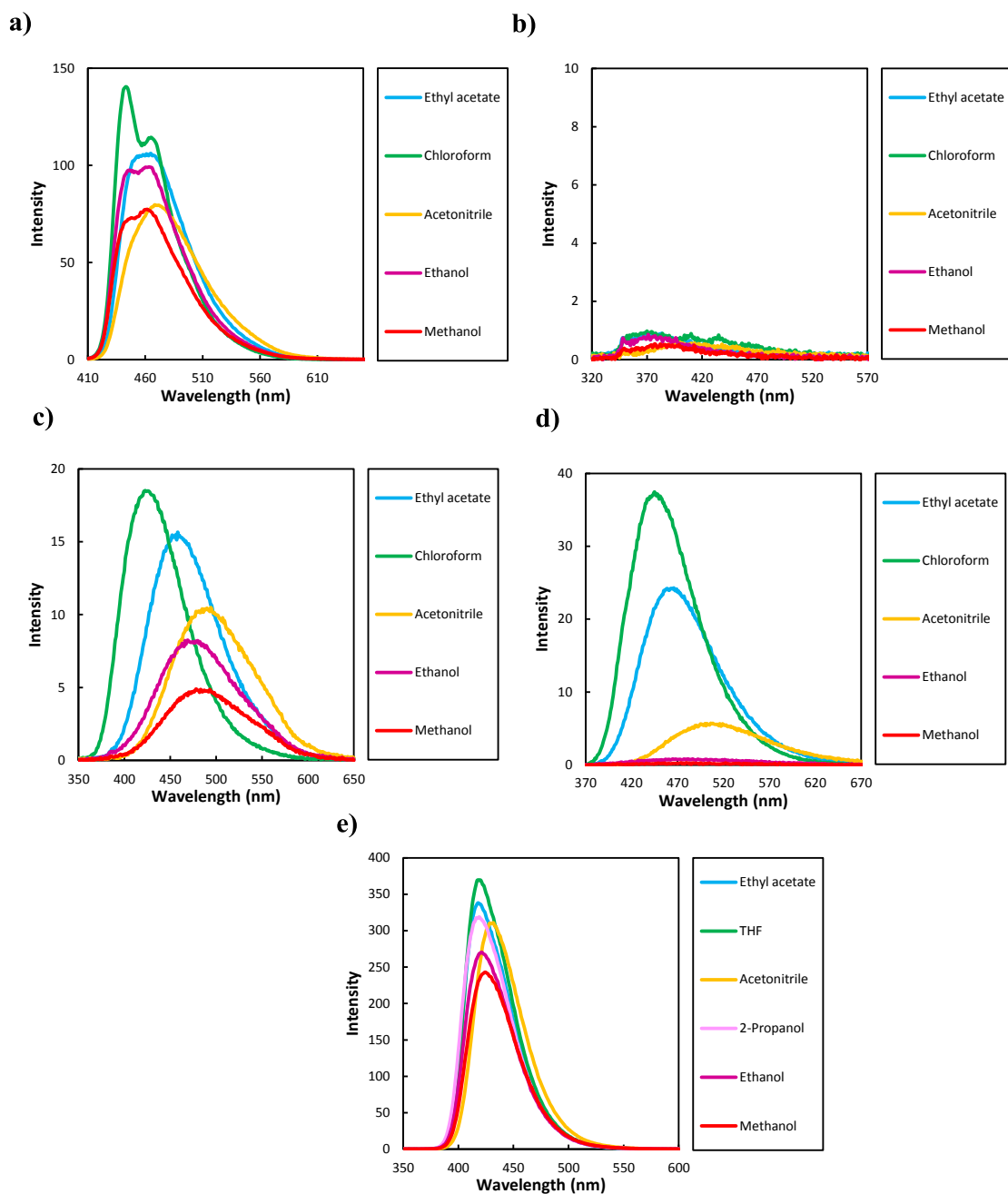


Figure 3-3. Fluorescence spectra of (a) *atzA* (**1**), (b) *nzA* (**2a**), (c) *cnzA* (**2b**), (d) *anzA* (**2c**), and (e) *dnzA* (**2d**) in various solvents (each 10 μ M conc.). The slit width was 1.5 nm.

Table 3-1. Photophysical properties of fluorescent 7-deaza-2'-deoxyadenosine derivatives

| compound | solvent | $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm) | $\lambda_{\max}^{\text{fl}}$ (nm) | Φ_{fl} |
|------------------|---------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| atzA (1) | Ethyl acetate | 405 | 465 | 0.52 |
| | Chloroform | 407 | 443, 462 | 0.71 |
| | Acetonitrile | 405 | 468 | 0.40 |
| | Ethanol | 405 | 441, 463 | 0.50 |
| | Methanol | 403 | 440, 462 | 0.41 |
| nzA (2a) | Ethyl acetate | 318 | 383 | < 0.01 |
| | Chloroform | 319 | 374 | < 0.01 |
| | Acetonitrile | 318 | 400 | < 0.01 |
| | Ethanol | 318 | 371 | < 0.01 |
| | Methanol | 315 | 377 | < 0.01 |
| cnzA (2b) | Ethyl acetate | 345 | 458 | 0.08 |
| | Chloroform | 345 | 423 | 0.10 |
| | Acetonitrile | 345 | 494 | 0.05 |
| | Ethanol | 345 | 469 | 0.04 |
| | Methanol | 345 | 478 | 0.02 |
| anzA (2c) | Ethyl acetate | 347 | 461 | 0.08 |
| | Chloroform | 345 | 445 | 0.12 |
| | Acetonitrile | 344 | 508 | 0.02 |
| | Ethanol | 346 | 475 | < 0.01 |
| | Methanol | 344 | 464 | < 0.01 |
| dnzA (2d) | Ethyl acetate | 333 | 418 | 0.54 |
| | THF | 335 | 418 | 0.58 |
| | Acetonitrile | 336 | 432 | 0.51 |
| | 2-Propanol | 333 | 419 | 0.57 |
| | Ethanol | 334 | 421 | 0.49 |
| | Methanol | 336 | 424 | 0.39 |

各誘導体の UV スペクトル測定によって得られた最大吸収波長($\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$)および蛍光スペクトル測定によって得られた最大蛍光波長($\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$)をそれぞれ **Table 3-1** に示した。また、蛍光量子収率(Φ_{fl})は 9,10-ジフェニルアントラセン($\Phi_{\text{fl}}=0.95$ in ethanol)を標準物質として用い、算出した²²⁾。

まず、無置換の 9-エチニルアントラセンを連結した **atzA (1)** では、全ての溶媒中で、およそ 440-468 nm の高い蛍光強度で発光していることが確認できた。極性の比較的低いクロロホルム中と酢酸エチル中ではそれぞれ、蛍光量子収率(Φ_{fl})が 0.71 と 0.52 と高い値が得られ、また、極性の高いアセトニトリル中では 0.40、メタノール中では 0.41 と、極性の変化に関わらず、**atzA (1)** は高い量子収率で発光することが判明した (**Fig. 3-3a, Table 3-1**)。しかしながら、周辺の極性変化に伴う最大蛍光波長のシフトはほとんど観測されなかった($\Delta\lambda = 28$ nm)。また、無置換の 2-エチニルナフタレンを連結した **nzA (2a)** では、371-400 nm で発光が見られたが、全ての溶媒中でとても蛍光強度が低く、蛍光量子収率(Φ_{fl})は 0.01 以下であり、さらに **atzA (1)** と同様に極性の変化に伴う蛍光発光の変化は観測されなかった (**Fig. 3-3b, Table 3-1**)。これらの結果から、置換基のないアントラセンやナフタレンを連結した 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体はソルバトフルオロクロミックな性質を有さない(電荷移動効果による ICT 発光はされにくい)ことが判明した。

続いて、電子吸引(アクセプター)性のシアノ基を含む **cnzA (2b)** では、345 nm の励起により蛍光スペクトルの測定を行なった結果、クロロホルム中では 423 nm の発光($\Phi_{\text{fl}}=0.10$)、酢酸エチル中では、458 nm の発光($\Phi_{\text{fl}}=0.08$)が観測された (**Fig. 3-3c, Table 3-1**)。また、メタノールやアセトニトリルの極性の高い溶媒中では、最大蛍光波長のレッドシフトが観測されたことからシアノナフタレンを連結した 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン **cnzA (2b)** はソルバトフルオロクロミックな性質を有していると言える($\Delta\lambda = 71$ nm)。また、電子吸引(アクセプター)性のアセチル基を含む **anzA (2c)** でも **cnzA (2b)** とほぼ同様の結果が観測された (**Fig. 3-3d, Table 3-1, $\Delta\lambda = 63$ nm**)。一方、電子供与(ドナー)性の *N,N*-ジメチルアミノ基を含む **dnzA (2d)** は全ての溶媒中で、高い蛍光量子収率(Φ_{fl})が観測されたが、電子吸引性基を有する **cnzA (2b)**、**anzA (2c)** と比較すると、高い極性中でも蛍光発光波長はほとんど変化がないことからソルバトフルオロクロミックな性質を示さないことが明らかとなった (**Fig. 3-3e, Table 3-1, $\Delta\lambda = 14$ nm**)。

また、**nzA (2a)**、**cnzA (2b)** と **dnzA (2d)** を分子軌道計算ソフト(Gaussian 09)により、それぞれ構造最適化を行うと、シアノ基を含む **cnzA (2b)** では、置換修飾のない **nzA (2a)** や *N,N*-ジメチルアミノ基を含む **dnzA (2d)** に比べて、HOMO-LUMO 間での電子密度の移動が大きいので、7-デアザアデニンから、ナフタレン環の細部まで、電荷移動が起きやすい構造となることが判明した。従って、電子吸引性であるシアノナフタレンやアセチルナフタレンを有する **cnzA (2b)** と **anzA (2c)** では、7-デアザアデニンが電位供与性として働くことで、分子内電荷移動状態を創出する ICT 発光により、ソルバトフルオロクロミックな性質を示すことが出来たものだと考えられる。なお、Gaussian 09 を用いた密度汎関数(DFT)法(B3LYP/6-31G*)により計

算を行った (Fig. 3-4)。

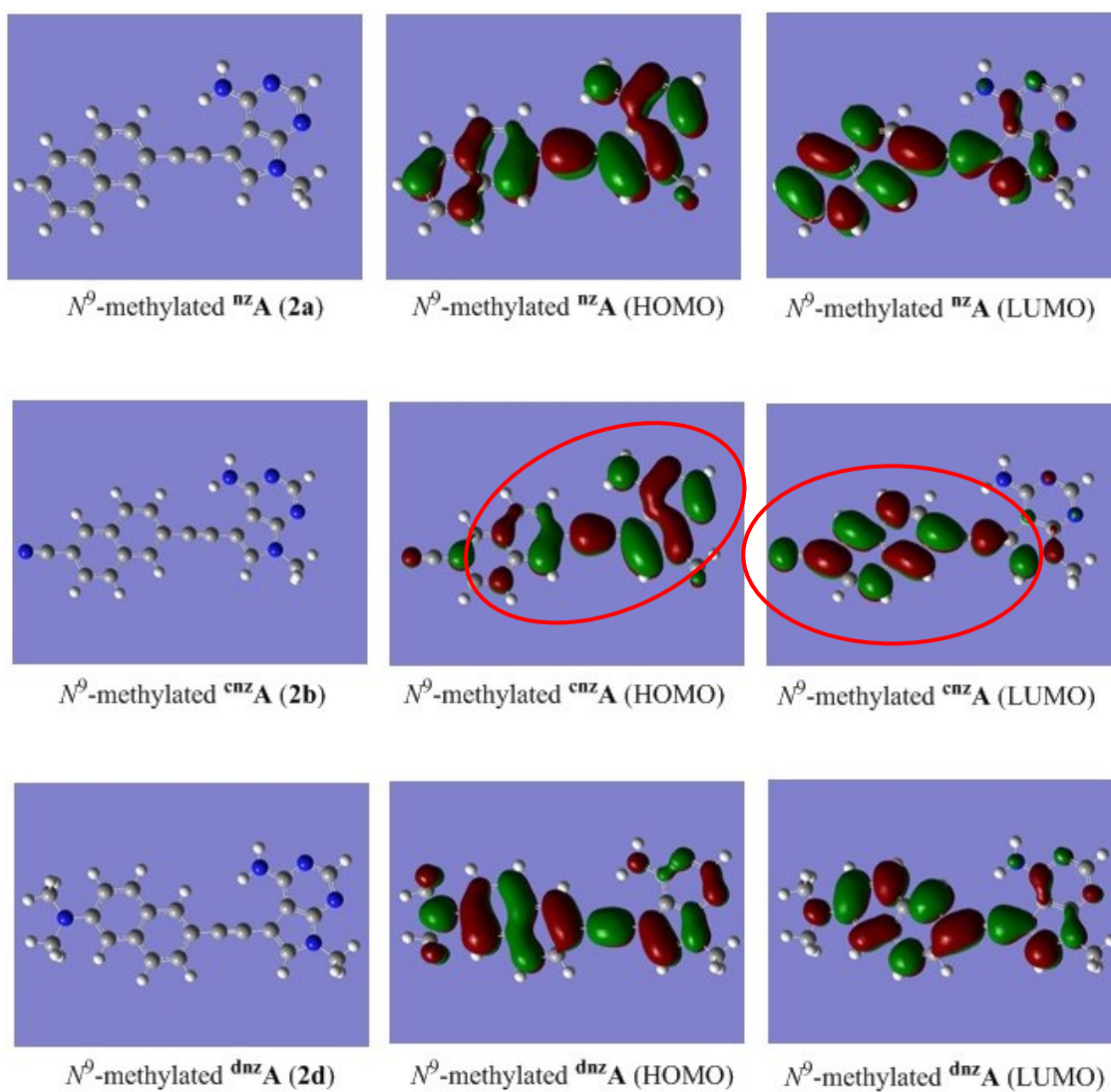


Figure 3-4. HOMO and LUMO of (a) *N*⁹-methylated **nza** (**2a**), **cnza** (**2b**), and **dnza** (**2d**) calculated at the DFT(B3LYP)/6-31G* level.

3.2.3 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の構造確認

7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 **1**, **2** の *N*-グリコシド結合の立体配座を調べるために、¹H-, ¹³C-NMR の測定を行なった。また、DMSO-*d*₆ 中で測定した。測定結果をまとめたデータを **Table 3-2** に示す。

Table 3-2. ¹H- and ¹³C-NMR chemical shifts of 2'-deoxyadenosine and 7-deaza- 2'-deoxyadenosine derivatives in DMSO-*d*₆

| compounds | H (2') | C (1') | C (2') | C (3') | C (4') | C (5') |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A (<i>anti</i>) | 2.72 | 84.0 | 38.9 | 71.0 | 88.0 | 61.9 |
| Br-A ^a (<i>syn</i>) | 3.25 | 86.4 | 37.0 | 71.1 | 88.3 | 62.1 |
| 2,6cnA ^b (<i>syn</i>) | 3.20 | 85.1 | 37.8 | 71.2 | 88.4 | 62.2 |
| ^zA ^c (<i>anti</i>) | 2.50 | 83.3 | d | 71.1 | 87.3 | 62.1 |
| atzA (1) | 2.60 | 83.2 | d | 70.9 | 87.6 | 61.9 |
| nzA (2a) | 2.54 | 83.3 | d | 71.0 | 87.6 | 61.9 |
| cnzA (2b) | 2.54 | 83.3 | d | 71.0 | 87.6 | 61.9 |
| anzA (2c) | 2.50 | 83.3 | d | 71.0 | 87.6 | 61.9 |
| dnzA (2d) | 2.53 | 83.3 | d | 70.9 | 87.6 | 61.8 |

*^a 8-bromo-2'-deoxyadenosine

*^b Chapter 2: C8-substituted 2'-deoxyadenosine derivative

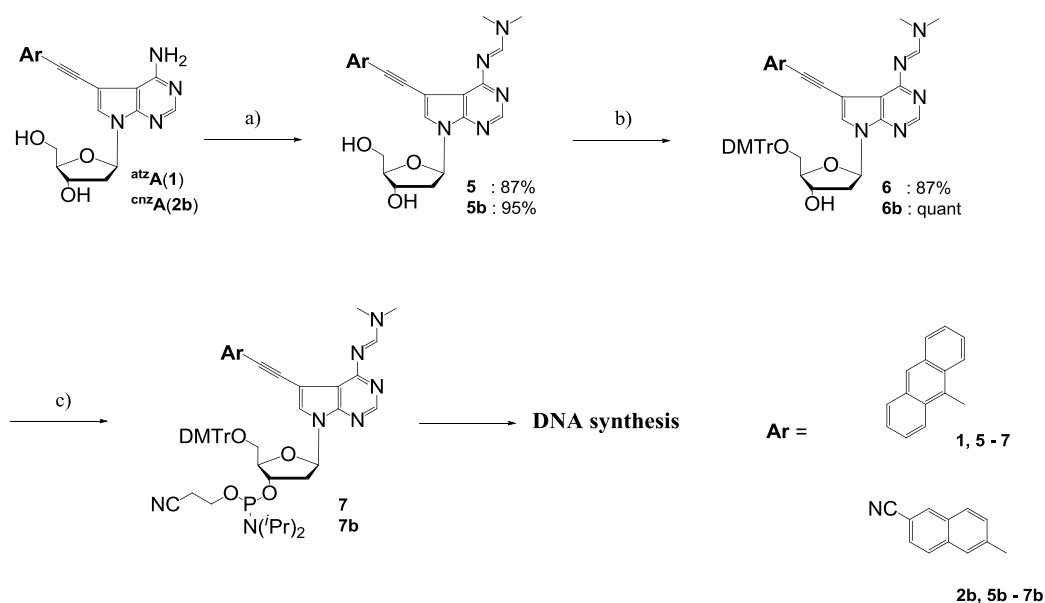
*^c 7-deaza-2'-deoxyadenosine (ref. **12**)

*^d Overlapped with DMSO (39.5 ppm)

前述した通り、一般的に、プリン塩基の 8 位に置換基を導入すると、ヌクレオシドの糖と塩基とのグリコシル結合が通常 *anti* 配座から *syn* 配座へと反転しやすくなり、そのため C8 位に置換基を導入したヌクレオシドを用いた場合には DNA の二重らせん構造が不安定化することが知られている⁶⁻⁸)。さらに、グリコシド結合が *anti* から *syn* へ変わると ¹H および ¹³C-NMR 測定において、C1', C3', C4' および H2' シグナルが低磁場側へ、それと同時に C2' シグナルが高磁場側へシフトすることが判明している¹²)。今回、合成した 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体は *syn* 配座である 8 位置換アデノシン誘導体に比べ、*anti* 配座の化合物と NMR シグナルが酷似しているため、**atzA** (**1**), **nzA** (**2a**), **cnzA** (**2b**), **anzA** (**2c**) および **dnzA** (**2d**) のグリコシド結合は *anti* 配座であることが分かった。

3.2.4 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体を含む ODN の合成

7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体は天然の 2'-デオキシアデノシンと同様の *anti* 配座をとることが確認できたので、DNA 鎖中で相手塩基と水素結合能を有することが示唆される。そこで、オリゴヌクレオチド(ODN)へ導入し、水素結合形成能評価にあたる熱融解温度測定および、遺伝子検出プローブ能として有用であるかの光学特性評価を行うこととした。そこで、ソルバトフルオロクロミックな性質を示さない **atzA (1)** およびソルバトフルオロクロミックな性質を示す環境感応型蛍光性 **cnzA (2b)** を、DNA 自動合成機を用いてホスホロアミダイト法により ODN 鎖への導入を行なった。まず、*N,N*-ジメチルホルムアミドジエチルアセタールを用いて、アミノ基を保護して **5, 5b** とした後、5'-水酸基をトリチル化して **6, 6b** を得た。続いて、3'-水酸基を 2-シアノジイソプロピルクロロホスホロアミジトを用いて、ホスホロアミダイトユニット **7, 7b** を合成し、DNA 自動合成機で目的とする ODN 鎖へ導入した (**Scheme 3-2**)。また、**Table 3-3** にこの章で使う ODN の配列を示す。



Scheme 3-2. Reagents and conditions: a) *N,N*-dimethylformamide diethylacetal, DMF, 60-80 °C, 2-5 h; b) DMTrCl, pyridine, r.t., 3-6 h; c) 2-cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidite, Et₃N, acetonitrile, r.t., 30 min.

Table 3-3. Oligodeoxynucleotides used in this study

| Sequences | |
|-----------|--|
| ODN 1 (X) | 5'-CGCAAT X TAACGC-3' X = atzA or cnzA |
| ODN 2 (N) | 5'-GCGTTA N ATTGCG-3' N = T, G, C, A |

ODN 1は通常のDNA自動合成機での条件で合成することが出来た。得られたODN 1を合成機から切り出し後、アンモニア水 55 °C 中で一晩かけて脱保護を行い、翌日、HPLCにより分析を行なった。ODN 1 (X = ^{atz}A)は 31 min 付近に、ODN 1 (X = ^{cnz}A)は 35 min 付近に目的物らしき ODN ピークが検出された (Fig. 3-5)。目的物 ODN を精製後、HPLCにより純度を確認し (Fig. 3-6)、MALDI-TOF mass (Table 3-4) および酵素分解 (Fig. 3-7) により同定した。

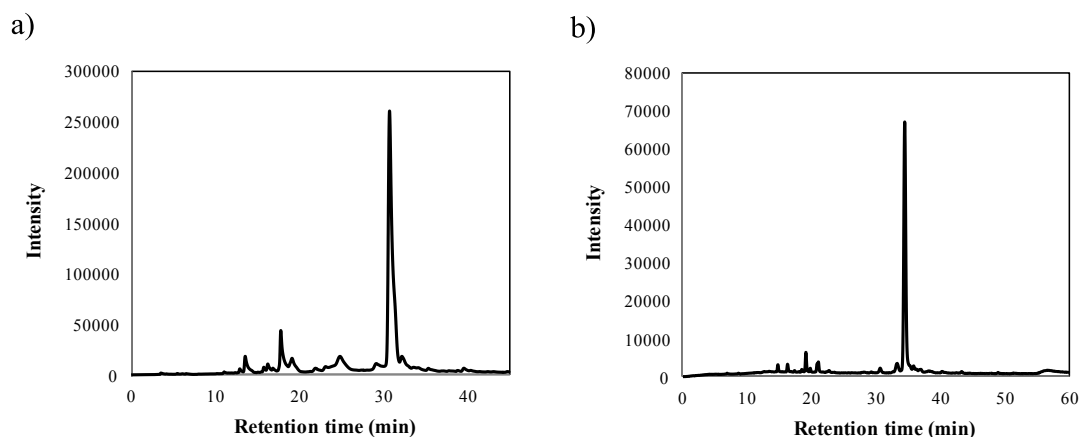


Figure 3-5. HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of 13 mer single-stranded ODN 1 [X = (a) ^{atz}A and (b) ^{cnz}A]. Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 60 min for (a), over 45 min for (b).

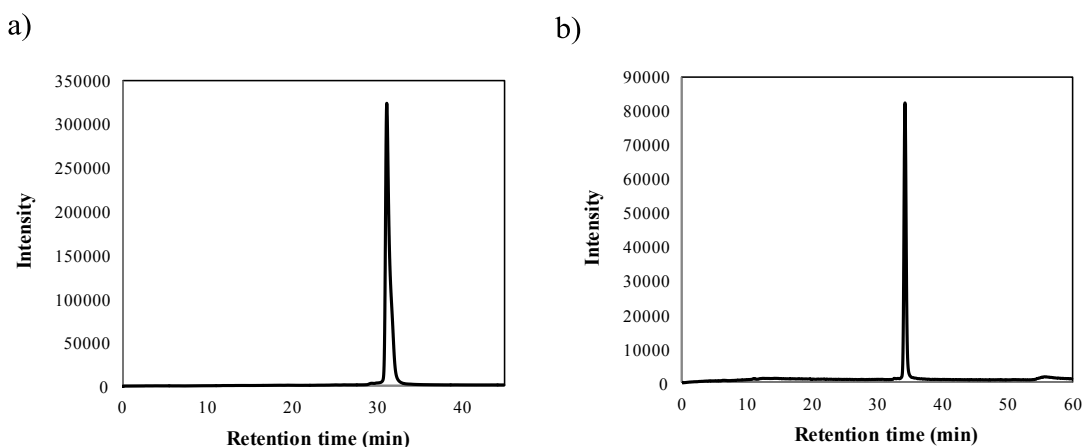


Figure 3-6. HPLC profiles of a pure single-stranded ODN 1 [X = (a) ^{atz}A and (b) ^{cnz}A]. HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 60 min for (a), over 45 min for (b).

Table 3-4. MALDI-TOF mass spectral data for the ODNs

| ODNs | MALDI-TOF mass | |
|--|-----------------------------|----------------------------|
| | calcd. [M + H] ⁺ | found [M + H] ⁺ |
| ODN 1: 5'-CGCAAT ^{atz} ATAACGC-3' | 4128.28 | 4127.91 |
| ODN 1: 5'-CGCAAT ^{cnz} ATAACGC-3' | 4102.86 | 4102.57 |

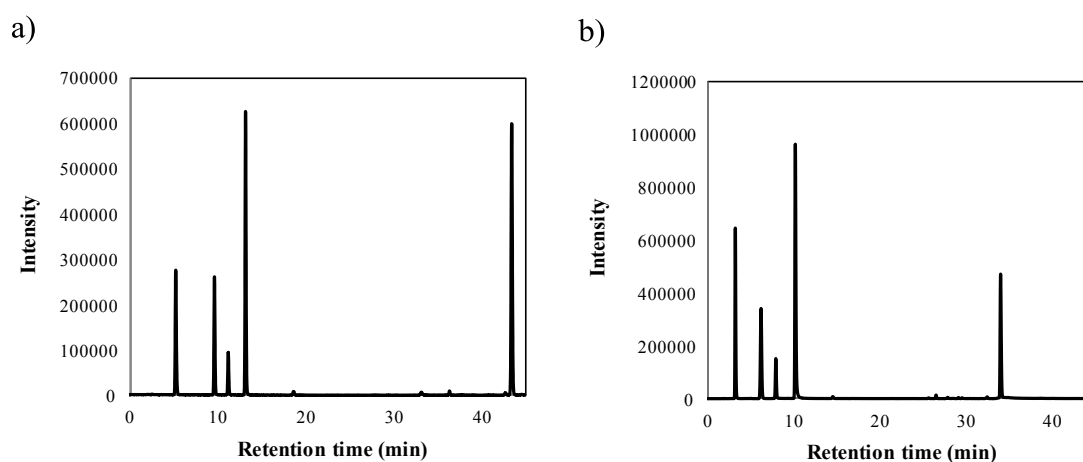
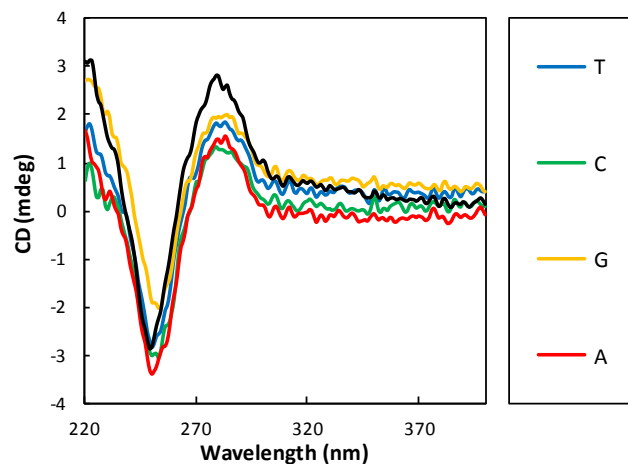


Figure 3-7. HPLC profiles of a mixture obtained by enzymatic digestion of ODN 1 [X = (a) ^{atz}A and (b) ^{cnz}A]. HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μM conc.).

3.2.5 ^{cnz}A 含有二重鎖 DNA の CD 測定による構造確認

^{cnz}A 含有 ODN 1 を市販の相補鎖 ODN2: [5'-GCGTTA N ATTGCG-3' (N = T, C, G, A)] とハイブリダイズさせ、二重鎖を形成させた後、天然の二重鎖と同様に B 型 DNA を形成するのかどうかを CD 測定により確認を行なった。測定条件は 2.5 μM ODN, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1 M 塩化ナトリウム存在下で行なった。また、比較のために天然の配列で測定を行なった結果も示す (Fig. 3-8)。



ODN 1: 5'-CGCAAT X AAACGC-3' (X = ^{cnz}A or A)

ODN 2: 3'-GCGTTA N TTTGCG-5' (N = T, C, G, A)

Figure 3-8. CD spectra of ODN 1 (X = A) hybridized with ODN 2 (N = T) (black line), and of ODN 1 (X = ^{cnz}A) hybridized with ODN 2 (N = T, C, G, A); 2.5 μ M ODNs, 50 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.0, rt.

CD スペクトルの測定結果、ODN 1 (X = ^{cnz}A)は相補鎖と二重鎖 DNA を形成すると相手塩基に関わらず、280 nm 付近に正のコットン効果および 250 nm 付近に負のコットン効果が観測されたことから、7 位置換 7-デアザアデノシン誘導体を含むオリゴヌクレオチドでも、典型的な B 型構造をとることが確認できた。

3.2.6 ^{atz}A および ^{cnz}A 含有 ODN の遺伝子検出プローブについての評価と考察

^{atz}A および ^{cnz}A 含有 ODN の塩基対形成能評価を行うために二重鎖融解温度(T_m)の測定を行なった。さらに、UV・蛍光スペクトルの測定を行うことで、遺伝子検出能プローブとしての評価を行なった。測定条件は ^{atz}A 含有 ODN 1 を市販の相補鎖 ODN 2: [5'-GCGTTA N ATTGCG-3' (N = T, C, G, A)]とハイブリダイズさせ、2.5 μ M ODN, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1 M 塩化ナトリウム存在下で行なった。^{cnz}A 含有 ODN の測定も同様の条件で行なった。また、 T_m 測定に関しては比較のために天然の配列で測定を行なった結果も示す (Table 3-5)。

Table 3-5. Thermal melting temperatures (T_m) and photophysical properties of duplexes ODN1/ODN2; ODN 1: 5'-CGCAATXTAACGC-3' (X = ^{atz}A, ^{cnz}A or A), ODN 2: 3'-GCGTTANATTGCG-5' (N = T, C, G, A)

| Duplex | T_m (°C) | $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm) | $\lambda_{\max}^{\text{fl}}$ (nm) |
|---------------------------------------|------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| ODN 1 (^{atz} A) | - | 410, 430 | 447, 469 |
| ODN 1 (^{atz} A) / ODN 2 (T) | 52.2 | 410, 435 | 447, 472 |
| ODN 1 (^{atz} A) / ODN 2 (C) | 53.1 | 410, 435 | 448, 472 |
| ODN 1 (^{atz} A) / ODN 2 (G) | 49.0 | 410, 435 | 448, 473 |
| ODN 1 (^{atz} A) / ODN 2 (A) | 49.2 | 410, 435 | 449, 472 |
| ODN 1 (^{cnz} A) | - | 351 | 461 |
| ODN 1 (^{cnz} A) / ODN 2 (T) | 52.8 | 350 | 468 |
| ODN 1 (^{cnz} A) / ODN 2 (C) | 50.1 | 336, 351 | 446 |
| ODN 1 (^{cnz} A) / ODN 2 (G) | 46.7 | 351 | 461 |
| ODN 1 (^{cnz} A) / ODN 2 (A) | 44.2 | 352 | 464 |
| ODN 1 (A) / ODN 2 (T) | 52.6 | - | - |
| ODN 1 (A) / ODN 2 (C) | 45.4 | - | - |
| ODN 1 (A) / ODN 2 (G) | 46.7 | - | - |
| ODN 1 (A) / ODN 2 (A) | 41.0 | - | - |

T_m 値測定の結果、^{atz}A および ^{cnz}A 含有二重鎖 ODN とともに天然の配列 ODN 1 (A) / ODN 2 (T) とほぼ同様の熱融解温度(T_m)を示したことから、安定に塩基対を形成できることが分かった。この結果は、7 位置換 7-デアザアデニン誘導体がヌクレオシドモノマーで *anti* 配座を取っているために、相手塩基がマッチであるチミンと安定に塩基対を形成していることを意味しているものと考えられる。しかしながら、^{atz}A では、ミスマッチ塩基に対しても安定化していることが判明した。特に、相手塩基がシトシンの場合では 53.1°C と、最も高い値が得られ、天然の配列以上の安定性を示す結果となった (Table 3-5)。

^{cnz}A でも相手塩基がマッチであるチミンほどではないが、ミスマッチであるシトシンでも高い T_m 値を示していた。つまり、7-デアザアデニンは天然のアデニンと同様の水素結合部位を持ちながらも、シトシン塩基の場合でも安定化するという結果が得られた。Seela らが 7-デアザアデニンの二重鎖形成能評価を検討している研究によると 7-デアザアデニンの N1 の pK_a が天然のアデニン ($pK_a = 3.5$) に比べて、低くなると報告しており ($pK_a = 5.3$)、更に、

二重鎖中ではさらに高くなり、N1 がプロトネーションされることで、7-デアザアデニンはシトシン塩基が相手塩基として存在していると、水素結合を組みやすい構造を取りやすくなると述べていることから¹⁵⁾、Table 3-5 の結果は妥当であると言える。従って、7-デアザアデニンは 7 位置換の有無に関わらず、チミンだけでなくシトシンとも安定に塩基対を形成できることが考えられる。

次に、一本鎖の状態と二重鎖を形成している時の UV スペクトル・蛍光スペクトルを測定した (Fig. 3-9)。

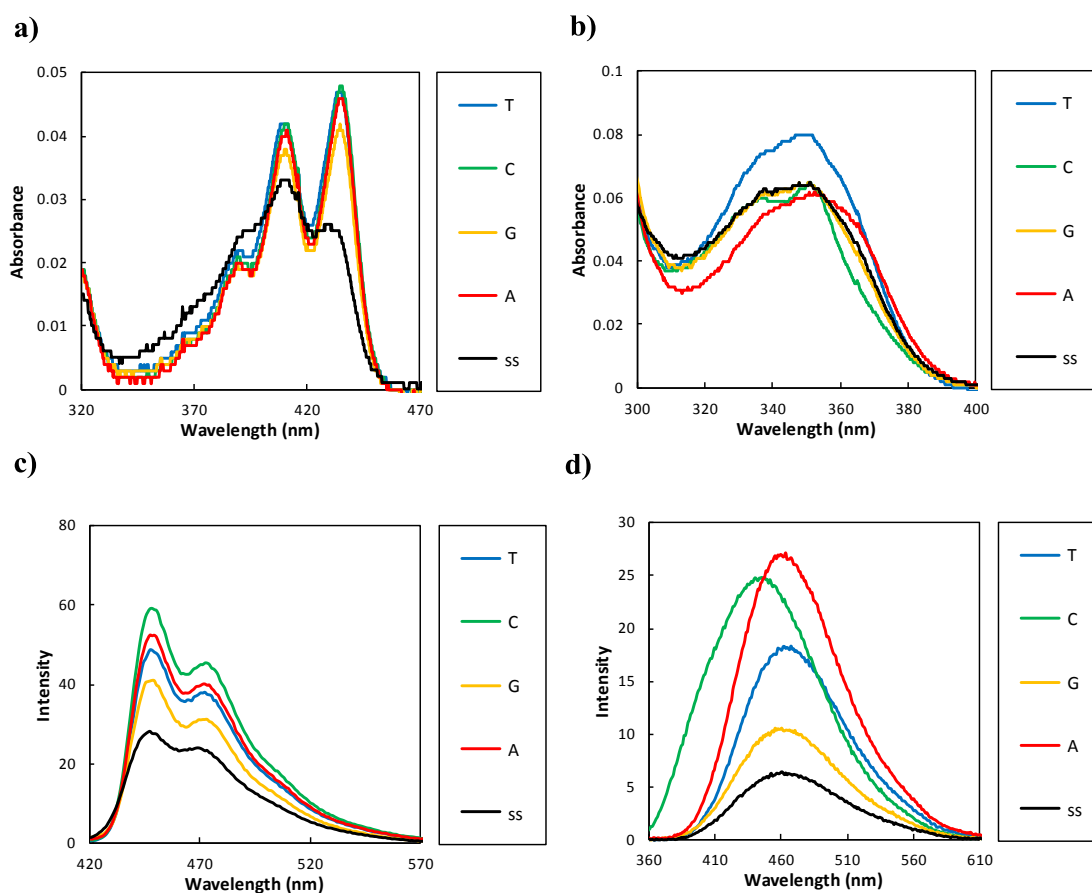


Figure 3-9. UV absorption spectra of ODN 1 [X = (a) atzA and (b) cnzA] hybridized with ODN 2 (N = T, C, G, A) and fluorescence spectra of ODN 1 [X = (c) atzA and (d) cnzA] hybridized with ODN 2 (N = T, C, G, A); "ss" denotes a single-stranded ODN 1 (2.5 μ M ODNs, 0.1 M sodium chloride, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, rt). The slit width was 1.5 nm.

蛍光測定の結果、**atzA** 含有オリゴデオキシヌクレオチドでは、一本鎖時に比べて、ターゲットとなる ODN 配列の存在する（ハイブリダイズし二重鎖を形成する）際には、マッチ-ミスマッチに関わらず、蛍光強度が増大した。しかしながら、一塩基の違いによる特異的な（例えばマッチであるチミンの場合のみ蛍光発光波長が変化する）発光現象は観測されなかった。この結果は、ヌクレオシドモノマーで様々な極性の異なる溶媒中で蛍光スペクトルの測定を行なった際に蛍光発光波長がシフトするソルバトフルオロクロミックな蛍光特性を示さなかったことから妥当な結果であると言える。

一方、モノマー体でソルバトフルオロクロミックな特性を示した **cnzA** 含有オリゴデオキシヌクレオチドでは、フルマッチ ($N = T$) ODN の存在時には、一本鎖時に比べてわずかながらの最大蛍光波長がレッドシフトし (468 nm)、さらに、蛍光強度の増大が観測された。また、興味深いことに、相手塩基がシトシンとなる ODN 配列と二重鎖を形成すると、さらに蛍光強度が増大するとともに、蛍光発光波長のブルーシフトが観測された (446 nm, $\Delta\lambda = 22$ nm)。この現象が起きた原因としては、前述した通り、7-デアザアデニンの N1 がプロトン化されることでシトシン塩基と塩基対を形成したことが考えられる。つまり、**Fig. 3-9d** で示した通り、シトシン塩基のみ蛍光発光波長がブルーシフトする結果が得られたのは 7-デアザアデニンの性質がプロトン化によって僅かながら変化したためである。また、もう一つの原因としては、**cnzA** がモノマー体で環境感応型の蛍光特性を有していることが挙げられる。

3.3 結論

本章では、DNA 二重鎖構造を不安定化させないと考えられる 7 位置換 7-デアザプリン骨格を有する環境感応型蛍光核酸の開発を目指した。その結果、ヌクレオシド体では、7-デアザアデニンの酸化電位が低いことに着目し、分子内に電子吸引性基を導入することで、分子内ドナー・アクセプター構造を形成しやすくなり、周辺の極性変化に伴い、蛍光波長、強度が変化するソルバトフルオロクロミックな蛍光特性を有するデアザプリンヌクレオシドの開発に成功した。さらに、**cnzA** 含有オリゴデオキシヌクレオチドは、DNA 中の一塩基の違いといった微細な構造変化を蛍光発光波長の変化で識別することが可能であった。従来までの蛍光核酸塩基では、塩基対形成能を保持したまま、完全に一塩基の違いを蛍光発光波長変化で識別することは不可能であったが、デアザプリン骨格を用いることで、塩基対形成を可能にしたことによって、今後、さらに優れた遺伝子検出用プローブを開発できる可能性を見出すことができた。

3.4 実験項

General: $^1\text{H-NMR}$ spectra (400 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (100 MHz) were measured with Bruker Avance 400F spectrometer. Coupling constants (J values) are reported in hertz. The chemical shifts are shown in ppm downfield from tetramethylsilane, using residual dimethyl sulfoxide (δ 2.50 in $^1\text{H-NMR}$, δ 39.5 in $^{13}\text{C-NMR}$), methanol (δ 3.31 in $^1\text{H-NMR}$, δ 49.0 in $^{13}\text{C-NMR}$) and chloroform (δ 7.26 in $^1\text{H-NMR}$, δ 77.0 in $^{13}\text{C-NMR}$) as an internal standard. ESI-TOF masses were recorded on a JMS-T100LC “AccuTOF”, Applied DATUM Solution Business Operations.

The reagents for DNA synthesis were purchased from Glen Research. Mass spectra of oligodeoxynucleotides were determined with a MALDI-TOF mass (Shimadzu AXIMA-LNR, positive mode) with 2',3',4'-trihydroxyacetophenone as a matrix. Calf intestinal alkaline phosphatase (Promega), *Crotalus adamanteus* venom phosphodiesterase I (USB), and *Penicillium citrinum* nuclease P1 (Yamasa Shoyu) were used for the enzymatic digestion of ODNs. All aqueous solutions utilized purified water (Millipore, Milli-Q sp UF). Reversed-phase HPLC was performed on CHEMCOBOND 5-ODS-H columns (10 \times 150 mm, 4.6 \times 150 mm) with a JASCO Chromatograph, Model PU-2080, using a UV detector, Model UV-2075 plus at 260 nm.

Procedure for the synthesis of modified nucleosides and ethynynaphthalene derivatives

4-amino-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-iodo-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (3: 7-iodo-7-deaza-2'-deoxyadenosine) was prepared from 4-chloro-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine according to literature method by 3 step reactions. ⁹⁻¹¹⁾

4-Amino-5-[2-(9-anthracenyl)ethynyl]-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (1: ^{at}A). A mixture of **3** (0.12 g, 0.32 mmol), 9-ethynylantracene (64 mg, 0.32 mmol), Pd(PPh₃)₄ (11 mg, 0.09 mmol) and CuI (2.9 mg, 0.02 mmol) in DMF (10 ml) was saturated with Et₃N under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 2 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, the residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH mixture (10 : 1). **1** was isolated as a yellow solid (0.12 g, 84%); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.27 (ddd, J = 2.8, 6.0, 13.2 Hz, 1H), 2.60 (ddd, J = 5.8, 8.0, 13.2 Hz, 1H), 3.54-3.67 (complex, 2H), 3.88 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 5.34 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 6.59 (dd, J = 6.0, 8.0 Hz, 1H), 6.84 (br, 2H), 7.63 (m, 2H), 7.70 (m, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.19 (d, J = 8.4 Hz, 2H) 8.22 (s, 1H), 8.53 (m, 2H), 8.71 (s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 61.9, 70.9, 83.2, 87.4, 87.6, 94.3, 94.9, 102.2, 116.3, 125.9 (\times 2), 126.1 (\times 2), 127.4, 127.4 (\times 2), 127.9, 129.0 (\times 2), 130.8 (\times 2), 131.8 (\times 2), 149.6, 152.9, 157.7, C(2') overlapped with DMSO; HRMS (ESI) m/z 473.1590 calcd for C₂₇H₂₂N₄O₃Na [M+Na]⁺, found 473.1596.

4-Amino-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-[2-(2-naphthyl)ethynyl]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine (2a: ^{mz}A). A mixture of **3** (0.10 g, 0.36 mmol), 2-ethynynaphthalene **4a** (42 mg, 0.43 mmol), Pd(PPh₃)₄ (42 mg, 0.04 mmol) and CuI (2.1 mg, 0.01 mmol) in DMF (5 ml) was saturated with Et₃N under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 1 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, the residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH mixture (10 : 1). **2a** was isolated as a colorless solid (0.13 g, 91%); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.24 (ddd, *J* = 2.6, 5.8, 13.1 Hz, 1H), 2.54 (m, 1H, overlapped with DMSO), 3.52-3.64 (complex, 2H), 3.86 (m, 1H), 4.38 (m, 1H), 5.09 (m, 1H), 5.31 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.54 (m, 1H), 6.87 (br, 2H), 7.57-7.60 (complex, 2H), 7.66-7.69 (complex, 2H), 7.94-7.97 (complex, 4H), 8.23 (s, 1H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 61.9, 71.0, 83.3, 83.5, 87.6, 91.4, 94.7, 102.0, 119.9, 126.9, 126.9, 127.0, 127.6, 127.7, 127.9, 128.2, 130.7, 132.3, 132.6, 149.5, 152.8, 157.6, C(2') overlapped with DMSO; HRMS (ESI) *m/z* 423.1433 calcd for C₂₃H₂₀N₄O₃Na [M+Na]⁺, found 423.1419.

6-Ethynyl-2-naphthonitrile (4b). A mixture of 6-bromo-2-naphthonitrile (251 mg, 1.08 mmol), Pd(PPh₃)₄ (62 mg, 0.05 mmol), CuI (21 mg, 0.11 mmol) and trimethylsilylacetylene (0.18 ml, 1.30 mmol) in DMF (5 ml) and Et₃N (1 ml) was stirred at 50 °C at under an argon atmosphere for 1 h. After allowing to cool to room temperature, The reaction solution was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography with hexane-ethyl acetate mixture (5 : 1) to give a crude product. The mixture was used for the next reaction.

The crude product and K₂CO₃ (220 mg, 1.59 mmol) in methanol (25 ml) was stirred at room temperature for 2 h. After the reaction solution was concentrated in *vacuo*, diluted with ethyl acetate, washed with 0.5 M HCl and brine. The combined organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The concentrated was purified by silica gel column chromatography with hexane-ethyl acetate mixture (4 : 1) to give **4b** as a light yellow solid (157 mg, 82 %); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.26 (s, 1H), 7.62-7.65 (complex, 2H), 7.84-7.89 (complex, 2H), 8.05 (m, 1H), 8.21 (m, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 77.3 80.6, 107.9, 116.6, 120.5, 124.8, 126.2, 126.7, 128.0, 129.4, 129.8, 131.5, 131.7.

4-Amino-5-[2-(6-cyano-2-naphthyl)ethynyl]-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine (2b: ^{cnz}A). A mixture of **3** (0.15 g, 0.39 mmol), 6-ethynyl-2-naphthonitrile **4b** (85 mg, 0.48 mmol), Pd(PPh₃)₄ (46 mg, 0.04 mmol) and CuI (7.6 mg, 0.04 mmol) in DMF (5 ml) was saturated with Et₃N under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 1 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH mixture (10 : 1). **2b** was isolated as a light yellow solid (0.14 g, 84%); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.24 (ddd, *J* = 2.8, 6.0, 13.2 Hz, 1H),

2.54 (m, 1H, overlapped with DMSO), 3.55-3.63 (complex, 2H), 3.86 (m, 1H), 4.38 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 5.32 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 6.54 (dd, $J = 6.0, 7.8$ Hz, 1H), 6.88 (br, 2H), 7.82-7.86 (complex, 2H), 7.98 (s, 1H), 8.09-8.14 (complex, 2H) 8.18 (s, 1H), 8.34 (m, 1H), 8.61 (m, 1H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 61.9, 71.0, 83.3, 85.6, 87.6, 91.0, 94.4, 102.0, 109.0, 119.1, 123.4, 127.3, 127.7, 128.9, 129.1, 129.7, 130.6, 131.1, 134.0, 134.2, 149.6, 152.9, 157.6, C(2') overlapped with DMSO; HRMS (ESI) m/z 448.1386 calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 448.1407.

6-Acetyl-2-ethynynaphthalene (4c). A mixture of 6-acetyl-2-bromonaphthalene (760 mg, 3.05 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (86 mg, 0.07 mmol), CuI (28 mg, 0.14 mmol) and trimethylsilylacetylene (0.44 ml, 3.66 mmol) in DMF (4 ml) and Et_3N (4 ml) was stirred at 50 °C at under argon atmosphere for 1 h. After allowing to cool to room temperature, The reaction solution was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography with hexane-ethyl acetate mixture (10 : 1) to give a crude product. The mixture was used for the next reaction.

The crude product and K_2CO_3 (600 mg, 4.34 mmol) in methanol (30 ml) was stirred at room temperature for 2 h. After the reaction solution was concentrated in *vacuo*, diluted with ethyl acetate, washed with 0.5 M HCl and brine. The combined organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The concentrated was purified by silica gel column chromatography with hexane-ethyl acetate mixture (8 : 1) to give **4c** as a brown solid (520 mg, 88 %); ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.72 (s, 3H), 3.23 (s, 1H), 7.58 (dd, $J = 1.6, 8.5$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.03-8.06 (complex, 2H), 8.42 (m, 1H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 26.7, 79.0, 83.5, 122.1, 124.7, 128.3, 129.5, 129.6, 129.8, 132.0, 132.1, 134.9, 135.2, 197.8.

5-[2-(6-Acetyl-2-naphthyl)ethynyl]-4-amino-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine (2c: ^{anz}A). A mixture of **3** (80 mg, 0.21 mmol), 6-acetyl-2-ethynynaphthalene **4c** (49 mg, 0.25 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7.3 mg, 0.006 mmol) and CuI (2.0 mg, 0.01 mmol) in DMF (3 ml) was saturated with Et_3N under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 1 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl_3 -MeOH mixture (10 : 1). **2c** was isolated as a light yellow solid (84 mg, 89%); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 2.22 (ddd, $J = 2.8, 6.0, 13.2$ Hz, 1H), 2.50 (m, 1H, overlapped with DMSO), 2.70 (s, 3H), 3.53-3.60 (complex, 2H), 3.84 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 5.10 (m, 1H), 5.30 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 6.53 (dd, $J = 6.0, 7.9$ Hz, 1H), 6.77 (br, 2H), 7.76 (d, $J = 1.6, 8.5$ Hz, 1H), 7.96-8.04 (complex, 2H), 8.15-8.17 (complex, 2H), 8.27 (m, 1H), 8.68 (m, 1H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 26.8, 61.9, 71.0, 83.3, 84.9, 87.6, 91.2, 94.5, 102.0, 122.6, 124.4, 127.4, 128.0, 128.9, 129.9, 130.1, 130.4, 131.5, 134.6, 134.7, 149.5, 152.8, 157.6, 197.7, C(2') overlapped with DMSO; HRMS (ESI) m/z 465.1539 calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 465.1550.

6-Ethynyl-*N,N*-dimethylnaphthalen-2-amine (4d). A mixture of 6-iodo-*N,N*-dimethylnaphthalen-2-amine (482 mg, 1.62 mmol), Pd(PPh₃)₄ (94 mg, 0.08 mmol), CuI (31 mg, 0.16 mmol) and trimethylsilylacetylene (0.27 ml, 1.95 mmol) in DMF (10 ml) and Et₃N (1 ml) was stirred at 50 °C at under an argon atmosphere for 1 h. After allowing to cool to room temperature, The reaction solution was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography with hexane-ethyl acetate mixture (7 : 1) to give a crude product. The mixture was used for the next reaction.

The crude product and K₂CO₃ (303 mg, 2.19 mmol) in methanol (30 ml) was stirred at room temperature for 2 h. After the reaction solution was concentrated in *vacuo*, diluted with ethyl acetate, washed with 0.5 M HCl and brine. The combined organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The concentrated was purified by silica gel column chromatography with hexane-ethyl acetate mixture (7 : 1) to give **4** as a yellow solid (243 mg, 77 %); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.07 (s, 6H), 3.08 (s, 1H), 6.86 (m, 1H), 7.16 (dd, *J* = 2.5, 9.1 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 1.6, 8.5 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.87 (m, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 40.6 (×2), 76.0, 84.8, 105.8, 114.8, 116.6, 125.8, 126.1, 128.7, 129.0, 132.0, 134.7, 149.1; HRMS (ESI) *m/z* 196.1126 calcd for C₁₄H₁₄N [M + H]⁺, found 196.1115.

4-Amino-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-[2-(6-*N,N*-dimethylamino-2-naphthyl)ethynyl]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (2d: ^{dnz}A). A mixture of **3** (50 mg, 0.13 mmol), 6-ethynyl-*N,N*-dimethylnaphthalen-2-amine **4d** (28 mg, 0.15 mmol), Pd(PPh₃)₄ (77 mg, 0.07 mmol) and CuI (13 mg, 0.07 mmol) in DMF (5 ml) was saturated with Et₃N under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 1 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH mixture (10 : 1). **2d** was isolated as a colorless solid (49 mg, 85%); ¹H-NMR (DMSO, 400 MHz) δ 2.22 (ddd, *J* = 2.7, 6.1, 13.2 Hz, 1H), 2.53 (m, 1H, overlapped with DMSO), 3.04 (s, 6H), 3.51-3.63 (complex, 2H), 3.85 (m, 1H), 4.37 (m, 1H), 5.10 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 6.53 (dd, *J* = 6.1, 7.8 Hz, 1H), 6.90 (br, 2H), 6.95 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 2.3, 9.2 Hz, 1H), 7.47 (dd, *J* = 1.6, 8.6 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.99 (m, 1H), 8.20 (s, 1H); ¹³C-NMR (DMSO, 100 MHz) δ 61.8, 70.9, 81.6, 83.3, 87.6, 92.5, 95.5, 102.0, 105.3, 114.7, 116.8, 125.5, 126.2, 126.6, 128.1, 128.5, 130.6, 134.3, 149.0, 149.0, 151.7, 156.9, C(2') and NMe₂ overlapped with DMSO; HRMS (ESI) *m/z* 466.1855 calcd for C₂₅H₂₅N₅O₃Na [M+Na]⁺, found 466.1863.

5-[2-(9-Anthracenyl)ethynyl]-7-[2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl]-*N*⁴-[(*N,N*-dimethylamino)ethylidene]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-4-amine (5). A solution of compound **1** (60.4 mg, 0.13 mmol) in DMF (2 ml) was stirred with *N,N*-dimethylformamide diethyl acetal (27 μl, 0.16 mmol) at

80 °C for 5 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH mixture (20 : 1) to give **5** as a yellow solid (59.0 mg, 87%); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.32 (m, 1H), 2.80 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 3.20 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 4.25 (m, 1H), 4.82 (s, 1H), 6.31 (dd, *J* = 5.5, 9.6 Hz, 1H), 7.46-7.55 (complex, 5H), 8.00-8.03 (complex, 2H), 8.41 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.70-8.73 (complex, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 35.2, 40.6, 40.9, 63.6, 73.8, 87.3, 89.3, 90.0, 94.5, 97.6, 112.8, 118.3, 125.6 (×2), 126.1 (×2), 127.0, 127.4 (×2), 128.5 (×2), 130.0, 131.2 (×2), 132.6 (×2), 150.0, 151.8, 156.8, 162.6.

5-[2-(9-Anthracenyl)ethynyl]-7-[2-deoxy-*O*-(4,4'-dimethoxytrithyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-*N*⁴-[(*N,N*-dimethylamino)ethylidene]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-4-amine (6**).** To a solution of compound **5** (55 mg, 0.11 mmol) in anhydrous pyridine (3 ml) was added 4,4'-dimethoxytrityl chloride (207 mg, 0.61 mmol), and the stirring continued at room temperature for 3 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The purification by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH-Et₃N mixture (30 : 1 : 1) yields **6** as a yellow solid (65 mg, 87%); ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 2.52 (m, 1H), 2.66 (s, 3H), 2.69 (m, 1H), 2.77 (s, 3H), 3.31 (complex, 2H), 3.36 (s, 6H), 4.04 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 6.59 (complex, 4H), 6.63 (m, 1H), 6.99 (m, 1H), 7.11-7.38 (complex, 12H), 7.91-7.95 (complex, 3H), 8.33-8.38 (complex, 5H); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 35.4, 41.0, 42.0, 55.4 (×2), 65.2, 73.0, 85.5, 87.9, 88.0, 88.5, 95.9, 99.4, 112.0, 114.1 (×4), 119.1 (×2), 126.8 (×2), 127.6 (×2), 127.9, 128.2 (×2), 128.3, 128.9 (×2), 129.6 (×2), 129.6, 129.7, 131.3 (×2), 131.4 (×2), 132.7 (×2), 133.7 (×2), 137.0, 137.2, 146.0, 152.4, 153.2, 158.7, 160.1 (×2), 163.9.

5-[2-(9-Anthracenyl)ethynyl]-7-[2-deoxy-*O*-(4,4'-dimethoxytrithyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-*N*⁴-[(*N,N*-dimethylamino)ethylidene]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-4-amine 3'-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite] (7**).** To a solution of compound **6** (70 mg, 0.12 mmol) in anhydrous acetonitrile (1.5 ml) was added 2-cyanoethyldiisopropylchlorophosphoramidite (0.12 ml) in the presence of Et₃N (0.5 ml), and stirred at room temperature under an argon atmosphere for 30 min. After completion of the reaction, the solution was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was incorporated into oligonucleotides without further purification.

5-[2-(6-Cyano-2-naphthyl)ethynyl]-7-[2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl]-*N*⁴-[(*N,N*-dimethylamino)ethylidene]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-4-amine (5b**).** A solution of compound **2b** (0.12

g, 0.28 mmol) in DMF (5 ml) was stirred with *N,N*-dimethylformamide diethyl acetal (55 μ l, 0.34 mmol) at 60 °C for 2 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH mixture (30 : 1) to give **5b** as a light yellow solid (0.12 g, 95%); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.29 (m, 1H), 3.04 (ddd, *J* = 5.1, 9.4, 13.4 Hz, 1H), 3.14 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 3.78 (m, 1H), 3.98 (dd, *J* = 1.7, 12.6 Hz, 1H), 4.19 (m, 1H), 4.74 (m, 1H), 6.26 (dd, *J* = 5.6, 9.4 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.58 (dd, *J* = 1.4, 8.4 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 1.5, 8.3 Hz, 1H), 7.81 (complex, 2H), 8.01 (m, 1H), 8.17 (m, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.76 (s, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 35.1, 40.6, 41.0, 50.7, 63.5, 73.2, 86.3, 89.1, 89.6, 90.0, 96.7, 109.5, 112.7, 119.1, 124.9, 127.1, 128.4, 128.8, 130.0, 130.6, 131.2, 133.9, 134.3, 149.9, 151.7, 156.9, 162.0.

5-[2-(6-Cyano-2-naphthyl)ethynyl]-7-[2-deoxy-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-*N*⁴-[(*N,N*-dimethylamino)methylidene]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-4-amine (6b**).** To a solution of compound **5b** (0.10 g, 0.21 mmol) in anhydrous pyridine (10 ml) was added 4,4'-dimethoxytrityl chloride (92 mg, 0.27 mmol), and the stirring continued at room temperature for 6 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The purification by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH-Et₃N mixture (30 : 1 : 1) yields **6b** as a light yellow solid (0.18 g, quant); ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 2.52 (m, 1H), 2.72 (m, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 3.32-3.36 (complex, 2H), 3.66 (s, 6H), 4.10 (m, 1H), 4.66 (m, 1H), 6.69 (m, 1H), 6.80-6.82 (complex, 4H), 7.24-7.46 (complex, 9H), 7.59 (m, 1H), 7.66-7.68 (complex, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.93-7.96 (complex, 2H), 8.34 (s, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.54 (s, 1H); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 35.4, 41.2, 41.7, 55.6 (\times 2), 65.1, 72.6, 85.3, 87.5, 87.7, 87.8, 91.2, 98.8, 110.7, 112.1, 114.2 (\times 4), 120.0, 126.2, 127.9, 128.2 (\times 2), 128.9 (\times 2), 129.5 (\times 2), 129.7, 130.1, 130.1, 131.0, 131.3 (\times 2), 131.5 (\times 2), 132.8, 135.1 (\times 2), 135.8, 137.2, 146.2, 152.3, 153.2, 158.5, 160.1, 160.1, 163.4.

5-[2-(6-Cyano-2-naphthyl)ethynyl]-7-[2-deoxy-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-*N*⁴-[(*N,N*-dimethylamino)methylidene]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-4-amine 3'-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite] (7b**).** To a solution of compound **6b** (0.1 g, 0.13 mmol) in anhydrous acetonitrile (2.0 ml) was added 2-cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidite (0.15 ml) in the presence of Et₃N (1 ml), and stirred at room temperature under an argon atmosphere for 30 min. After completion of the reaction, the solution was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was incorporated into oligonucleotides without further purification.

Oligodeoxynucleotide synthesis and characterization: Oligodeoxynucleotide (ODN) sequences were synthesized by a conventional phosphoramidite method by using an Applied Biosystems 3400 DNA/RNA synthesizer. ODNs were purified by reverse phase HPLC on a 5-ODS-H column (10 × 150 nm, elution with 50 mM ammonium formate (AF) buffer, pH 7.0, linear gradient over 45 min or 60 min from 3 % to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min). ODNs containing modified nucleotides were fully digested with calf intestine alkaline phosphatase (50 U/ml), and P1 nuclease (50 U/ml) at 37 °C for 12 h. Digested solutions were analyzed by HPLC on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6 × 150 nm, elution with a solvent mixture of 50 mM AF buffer, pH 7.0, flow rate 1.0 ml/min). The concentration of ODNs was determined by comparing peak areas with a standard solution containing dA, dG, dC, and dT at a concentration of 0.1 mM. Mass spectra of ODNs purified by HPLC were determined with a MALDI-TOF mass spectrometer.

UV absorption measurements: Absorption spectra were obtained using a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer at room temperature using 1 cm length cell.

Fluorescence spectra: The fluorescence spectra were obtained using a Shimadzu RF-5300PC spectrofluorophotometer at 25 °C using a cell with a 1 cm path length. The excitation and emission bandwidths were 1.5 nm.

Melting temperature (T_m) measurements: All T_m s of the ODNs (2.5 μM, final concentration) were measured in 50 mM sodium phosphate buffers (pH 7.0) containing 100 mM sodium chloride. Absorbance vs temperature profiles were measured at 260 nm using a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer equipped with a Peltier temperature controller using 1 cm path length cell. The absorbance of the samples was monitored at 260 nm from 4 to 90 °C with a heating rate of 1 °C/min. From these profiles, first derivatives were calculated to determine T_m values.

Circular dichroism (CD) measurements: CD spectra were recorded with a JASCO J-805 CD spectrophotometer. CD spectra of oligonucleotides solutions (2.5 μM ODNs in 50 mM sodium phosphate buffers (pH 7.0) containing 100 mM sodium chloride at 20 °C) were measured using 2 mm path length cell.

参考文献

- 1) Y. Shinohara, K. Matsumoto, K. Kugenuma, T. Morii, Y. Saito, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 2817.
- 2) K. Matsumoto, N. Takahashi, A. Suzuki, T. Morii, Y. Saito, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 1275.
- 3) Y. Saito, M. Koda, Y. Shinohara, I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 491.
- 4) Y. Saito, Y. Shinohara, S. Ishioroshi, A. Suzuki, M. Tanaka, I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 2359.
- 5) Y. Saito, K. Kugenuma, M. Tanaka, A. Suzuki, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 3723.
- 6) T. D. Son, W. Guschlbauer, M. Gueron, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 7903.
- 7) R. H., Sarma, C. -H., Lee, F. E. Evans, N. Yathindra, M. Sundaraligdam, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 7337.
- 8) R. G. Eason, D. M. Burkhardt, S. J. Phillips, D. P. Smith, S. S. David, *Nucleic Acids Res.*, 1996, **24**, 890.
- 9) For a review: F. Seela, S. Budow, X. Peng, *Curr. Org. Chem.*, 2012, **16**, 161.
- 10) F. Seela, H. Thomas, *Helv. Chim. Acta*, 1995, **78**, 94.
- 11) F. Seela, M. Zulauf, *Synthesis*, 1996, 726.
- 12) F. Seela, M. Zulauf, *Chem. Eur. J.*, 1998, **4**, 1781.
- 13) F. Seela, M. Zulauf, *Helv. Chim. Acta*, 1999, **82**, 1878.
- 14) F. Seela, M. Zulauf, M. Sauer, K. Deimel, *Helv. Chim. Acta*, 2000, **83**, 910.
- 15) X. Peng, H. Li, F. Seela, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 5987.
- 16) M. Vrabel, R. Pohl, I. Votruba, M. Sajadi, S. A. Kovalenko, N. P. Ernsting, M. Hocek, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 2852.
- 17) M.-H. Baik, S. J. Silverman, V. I. Yang, A. P. Ropp, A. V. Szalai, W. Yang, H. H. Thorp, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 6437.
- 18) K. Kawai, H. Kodaera, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 627.
- 19) F. Seela, S. S. Puraji, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 1629.
- 20) A. K. Thazhathveetil, A. Trifonov, M. R. Wasielewski, F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 11485.
- 21) K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.*, 1975, **16**, 2267.
- 22) J. V. Morris, M. A. Mahaney, J. R. Huber, *J. Phys. Chem.*, 1976, **80**, 969.

第4章

ワトソン-クリック塩基対形成可能な環境感応型蛍光
プリンヌクレオシドの開発と遺伝子検出能評価

4.1 緒言

第3章では、プリン塩基の8位修飾によるDNA二重鎖の不安定化を改善するために、7-デアザアデノシンの7位に蛍光色素を導入することを試みた。その結果、7位に置換基を導入しても、糖と塩基のグリコシド結合が、2'-デオキシアデノシンと同様の *anti* 配座であることがわかった。従って、ODNへ導入しても、8位修飾の際に見られたDNA二重鎖の不安定化（融解温度の低下）が見られず、塩基対形成能を持つことが可能であることを見出した。しかしながら、7-デアザアデニンおよび7-位置換7-デアザアデニンはDNA中でマッチすると考えられるチミン塩基のみならず、本来、ミスマッチであるシトシン塩基とも水素結合を形成することがわかり、塩基識別能の点で不十分であった。さらに第3章で述べた^{cmz}Aを含むODNプローブは相補鎖の相手塩基がシトシンのみ蛍光発光がブルーシフトするという、当初予想していない結果となった。

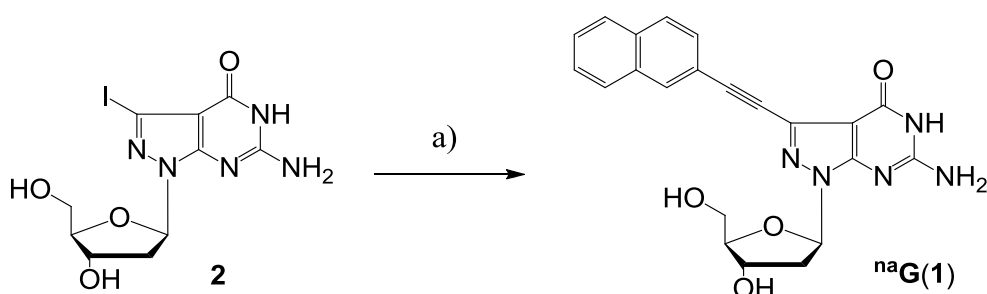
本章では、7位に修飾することが可能な7-デアザアデニンに代わり、同様に修飾可能なグアニン誘導体にすれば、マッチであるシトシン塩基とのみ安定な塩基対を形成し¹⁻⁶⁾、さらに環境感応型の蛍光特性を示すような誘導体を開発することが出来れば、第2章、第3章同様に遺伝子検出プローブへ応用できると考えた。

分子デザインとして7位に置換基を導入することが可能であり、かつ水素結合部位が天然のグアニンと同様なグアニンアナログとして、7-デアザグアニンおよび8-アザ-7-デアザグアニンの2つが挙げられるが、7-デアザプリンは、蛍光色素が近接した場合、7-デアザプリンから蛍光色素にかけて光誘起電子移動(PET)機構により蛍光消光しやすいという特徴がある^{7,8)}。実際に、7-デアザプリンおよび8-アザ-7-デアザプリンの7位にそれぞれ同じ蛍光色素を修飾したヌクレオシド誘導体の光物性を比較したところ、8-アザ-7-デアザプリンヌクレオシド誘導体の方が高い蛍光量子収率を示すということがSeelaらによって明らかにされている^{7,8)}。また、7位に様々な置換基を修飾できる7-ヨード-8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン⁹⁾の合成における反応ステップ数は7-ヨード-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン¹⁰⁾の合成におけるそれにするまでのそれに比べて短いために、合成的にも都合が良い。従って、本章では後者の8-アザ-7-デアザグアニンを骨格にもつ蛍光核酸塩基の開発に取り組んだ。

4.2 実験と結果

4.2.1 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン誘導体 ^{na}G の合成

目的とする 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン誘導体 ^{na}G (1)を得るために、まず、既知化合物である 7-ヨード-8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン⁹⁾ を 2-アミノ-4,6-ジヒドロキシピリミジンから 7 段階反応によって合成した^{9, 11-13)}。続いて、2-エチルナフタレンとパラジウム触媒を用いた菌頭カップリング反応¹⁴⁾ によって ^{na}G (1)を得ることに成功した。合成ルートは **Scheme 4-1** に示す。



Scheme 4-1. Reagents and conditions: a) 2-ethylnaphthalene, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, 50 °C, 30 min, 68 %.

4.2.2 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン誘導体 ^{na}G の光学特性

得られた 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン誘導体 ^{na}G (1) を様々な溶媒中に溶解させ、周辺の極性変化に伴う蛍光発光挙動について調べた。まず、UV スペクトルの測定を行い、どの溶媒中でも吸光度がほぼ一定であること（濃度が均一であること、また、確実に溶解していること）を確認するとともに、得られた最大吸収波長をもとに蛍光スペクトルの測定を行なった。また、^{na}G (1) は溶解性が悪いことが予想されたために、全ての溶媒に 1%の DMF を含有させ、10 μM の濃度に調整し測定を行なった。UV スペクトルの測定結果は **Fig. 4-1a**、蛍光スペクトルの測定結果は **Fig. 4-1b** に示す。

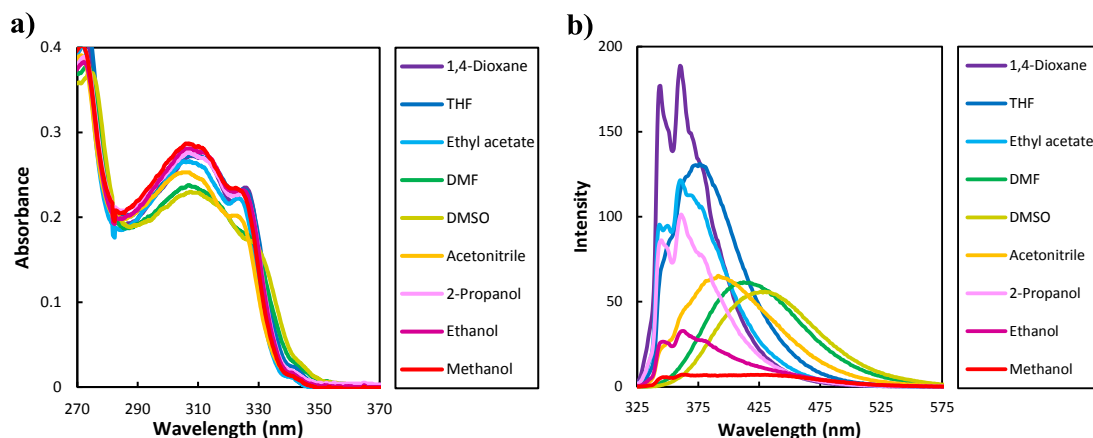


Figure 4-1. (a) UV absorption and (b) fluorescence spectra of ^{na}G (**1**) in various solvents (10 μ M conc.). Solvent is used in the presence of 1 % v/v of DMF because of its low solubility.

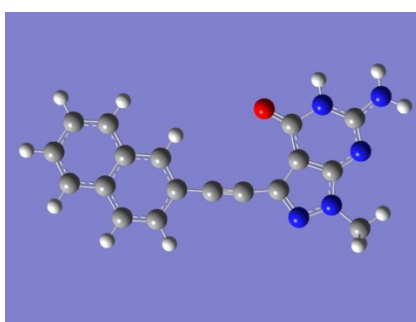
Table 4-1. Photophysical properties of ^{na}G (**1**)

| solvent | $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ (nm) | $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$ (nm) | Φ_{fl} |
|---------------|--|---|--------------------|
| 1,4-dioxane | 307 | 344, 360 | 0.37 |
| THF | 308 | 376 | 0.35 |
| Ethyl acetate | 307 | 343, 360 | 0.28 |
| DMF | 307 | 412 | 0.28 |
| DMSO | 308 | 427 | 0.28 |
| Acetonitrile | 306 | 391 | 0.24 |
| 2-Propanol | 307 | 345, 361 | 0.20 |
| Ethanol | 307 | 346, 363 | 0.08 |
| Methanol | 307 | 349, 362, 418 | 0.03 |

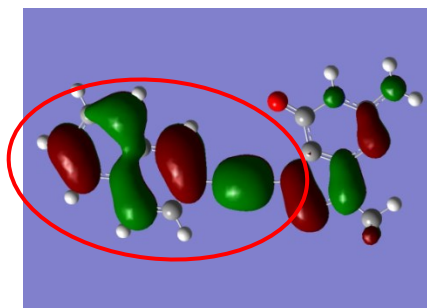
UV スペクトル測定によって得られた最大吸収波長($\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$)および蛍光スペクトル測定によって得られた最大蛍光波長($\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$)をそれぞれ **Table 4-1** に示した。蛍光量子収率(Φ_{fl})は9,10-ジフェニルアントラセン($\Phi_{\text{fl}}=0.95$ in ethanol)を標準物質として用いて算出した¹⁵⁾。

各溶媒中での極大吸収波長をもとに、光励起させ、蛍光スペクトルを測定した結果、極性の低い1,4-ジオキサン中では、344 nm と 360 nm の高い蛍光強度での発光が観測された ($\Phi_{\text{fl}} = 0.37$)。一方、極性の高い溶媒であるアセトニトリル中では、1,4-ジオキサン中に比べて、およそ 30 ~ 40 nm 波長がシフトし、391 nm のブロードな蛍光発光が観測された。DMF や DMSO 中では、412 nm ~ 427 nm の最も長い波長領域での発光が観測された。従って、溶媒の極性の変化に伴い、蛍光発光波長がシフトすることからも ($\Delta\lambda = 67$ nm)、^{na}G (**1**) は環境感応型の蛍光特性を示すことが確認できた。

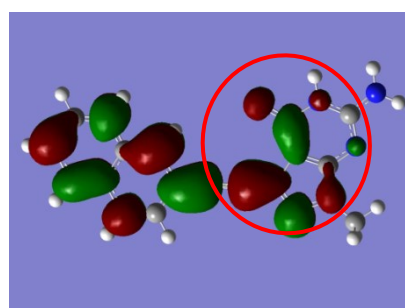
分子軌道計算ソフト(Gaussian 09)による構造最適化を行なった結果、このようなソルバトフルオロクロミックな性質を示した理由として、^{na}G は、HOMO ではナフタレン部位に電子密度が偏っているのに対して、LUMO ではグアニンのケトン基に電子が移動していることから電荷移動が起きる構造となっていることが挙げられる。つまり、溶媒の極性や双極子モーメントによる相互作用を受け(溶媒和)、励起遷移における LUMO の安定性が大きく変化するために、蛍光発光が変化したと考えられる。しかしながら、例えば、1,4-ジオキサン中や酢酸エチル中などで、振動構造を示すような発光が観測された原因は不明である。なお、Gaussian 09 を用いた密度汎関数(DFT)法(B3LYP/6-31G*)により計算を行った (Fig. 4-2)。



*N*⁹-methylated ^{na}G



*N*⁹-methylated ^{na}G (HOMO)

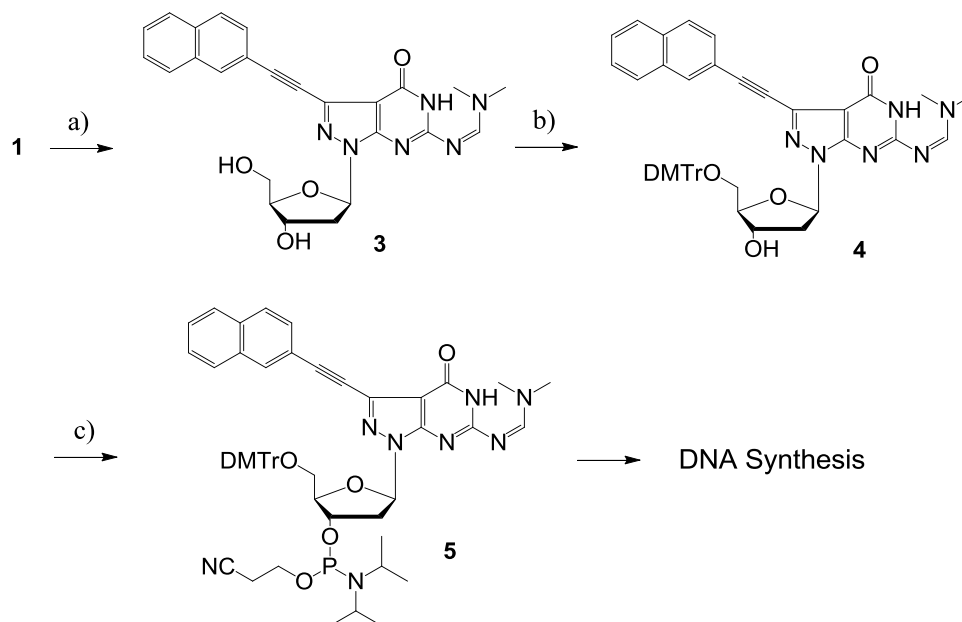


*N*⁹-methylated ^{na}G (LUMO)

Figure 4-2. HOMO and LUMO of *N*⁹-methylated ^{na}G calculated at the DFT(B3LYP)/6-31G* level.

4.2.3 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン誘導体 ^{na}G 含有 ODN の合成

本章で開発した 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン ^{na}G (1) は、これまでの本論文で述べてきたプリンヌクレオシドと同様に環境感応型の蛍光特性を示したことから、蛍光 DNA プローブとして利用できる可能性が示唆された。そこで、ODN 鎖へ導入し、オリゴヌクレオチドレベルでその評価を行うこととした。ODN 鎖への導入にあたり、DNA 自動合成機を用いたホスホロアミダイト法により行なった。まず、*N,N*-ジメチルホルムアミドジエチルアセタールを用いて、アミノ基を保護して **3** とした後、5'-水酸基をトリチル化して **4** を得た。最後に、3'-水酸基を 2-シアノジイソプロピルクロロホスホロアミジトを用いて、ホスホロアミダイトユニット **5** を合成し、DNA 自動合成機で目的とする ODN 鎖へ導入した (Scheme 4-2)。また、Table 4-2 にこの章で扱う ODN の配列を示す。



Scheme 4-2. Reagents and conditions: a) *N,N*-dimethylformamide diethylacetal, DMF, 50 °C, 30 min, 51 %; b) DMTrCl, pyridine, r.t., 1 h, 72 %; c) 2-cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidite, Et₃N, acetonitrile, r.t., 1 h.

Table 4-2. Oligodeoxynucleotides used in this study

| Sequences | |
|-----------|---|
| ODN 1 (X) | 5'-d(CGCAAT X TAACGC)-3' X = ^{na} G or G |
| ODN 2 (X) | 5'-d(CGCAAT X AAACGC)-3' X = ^{na} G |
| ODN 3 (N) | 5'-d(GCGTTA N ATTGCG)-3' N = C, G, T, A, Ab |
| ODN 4 (N) | 5'-d(GCGTTT N ATTGCG)-3' N = C, G, T, A |

*Ab = Abasic site

ODN 1 ($X = {}^{na}G$) と ODN 2 ($X = {}^{na}G$) は通常の DNA 自動合成機での条件で合成することが出来た。得られた DNA 1 を合成機から切り出し後、アンモニア水 55 °C 中で一晩かけて脱保護を行い、翌日、HPLC により分析を行なった。ODN 1 ($X = {}^{na}G$) は 28 min 付近に、ODN 2 ($X = {}^{na}G$) は 27 min 付近に目的物らしき ODN ピークが検出された (Fig. 4-3)。目的物 ODN を精製後、HPLC により純度を確認し (Fig. 4-4)、MALDI-TOF mass (Table 4-2) および酵素分解 (Fig. 4-5) により同定した。

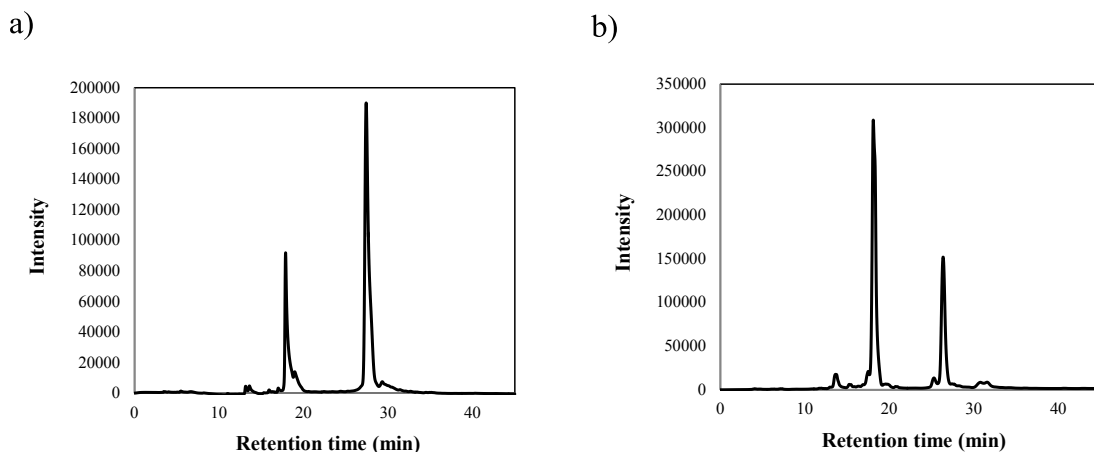


Figure 4-3. HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of 13 mer single-stranded (a) ODN 1 and (b) ODN 2. Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min.

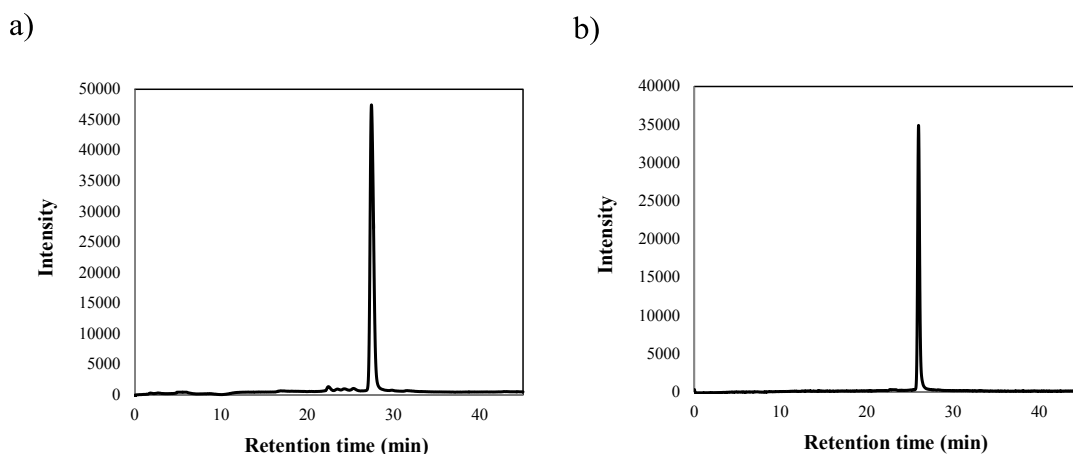


Figure 4-4. HPLC profiles of a pure single-stranded (a) ODN 1 and (b) ODN 2. HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min.

Table 4-3. MALDI-TOF mass spectral data for the ODNs

| | MALDI-TOF mass | |
|---|-----------------------------|----------------------------|
| | calcd. [M + H] ⁺ | found [M + H] ⁺ |
| ODN 1: 5'-CGCAAT ^{na} GTAACGC-3' | 4093.83 | 4094.09 |
| ODN 2: 5'-CGCAAT ^{na} GAAACGC-3' | 4102.84 | 4102.60 |

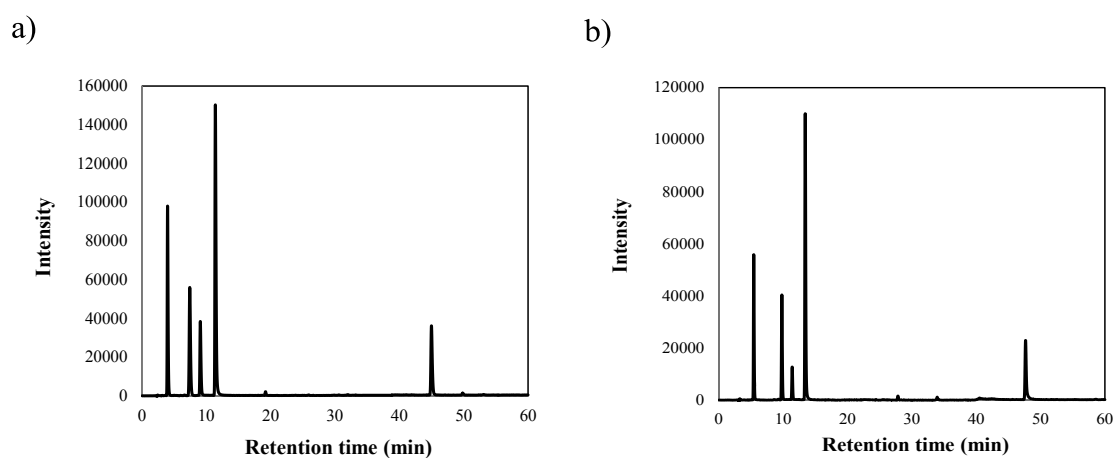


Figure 4-5. HPLC profiles of a mixture obtained by enzymatic digestion of (a) ODN 1 and (b) ODN 2. HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μM conc.).

4.2.4 ^{na}G 含有二重鎖 DNA の CD 測定による構造確認

^{na}G 含有 ss ODN 1 を市販の相補鎖 ODN 3: [5'-GCGTTA N ATTGCG-3' (N = C, T, G, A, Abasic site)] とハイブリダイズさせ、二重鎖を形成させ、天然の二重鎖と同様に B 型 DNA を形成するのかどうかを CD 測定により確認を行なった。測定条件は 2.5 μM ODN, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1 M 塩化ナトリウム存在下で行なった。また、比較のために天然の配列で測定を行なった結果も示す (Fig. 4-6)。

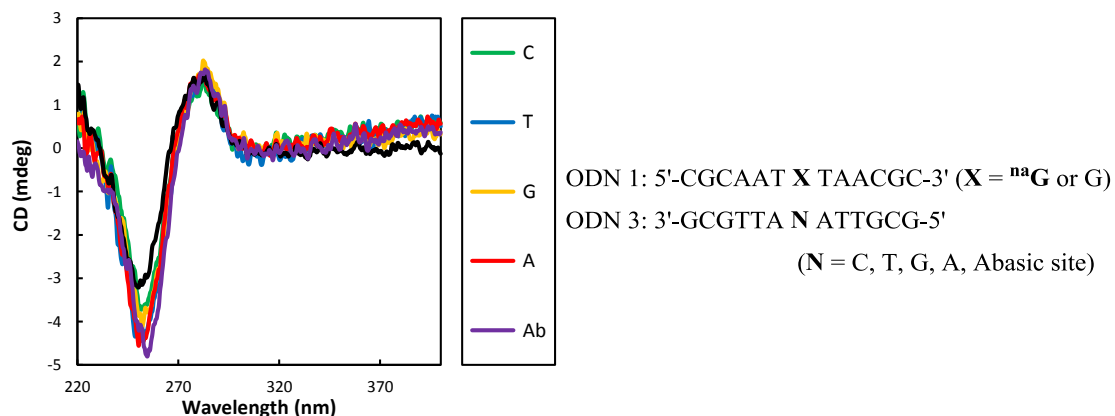


Figure 4-6. CD spectra of ODN 1 (X = G) hybridized with ODN 3 (N = C) (black line), and of ODN 1 (X = ^{na}G) hybridized with ODN 3 (N = C, T, G, A, Ab). "Ab" denotes abasic site (2.5 μ M ODNs, 50 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.0, r.t.).

CD スペクトル測定の結果、ODN 1 (X = ^{na}G)は相補鎖である ODN 3 と DNA 二重鎖を形成すると相手塩基 (塩基欠乏も含む) に関わらず、280 nm 付近に正のコットン効果および 250 nm 付近に負のコットン効果が観測されたことから、典型的な B 型構造であることが確認できた。

4.2.5 ^{na}G 含有 ODN の塩基対形成能および塩基認識能評価

次に、塩基対形成能評価を行うために二重鎖融解温度(T_m)の測定を行なった。さらに、UV・蛍光スペクトルの測定を行うことで、遺伝子検出能プローブとしての評価を行なった。測定条件は CD 測定時の同様の 2.5 μ M ODN, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1 M 塩化ナトリウム存在下で行なった (Table 4-4)。融解温度測定に関しては比較のために天然の配列で測定を行なった結果も示す。

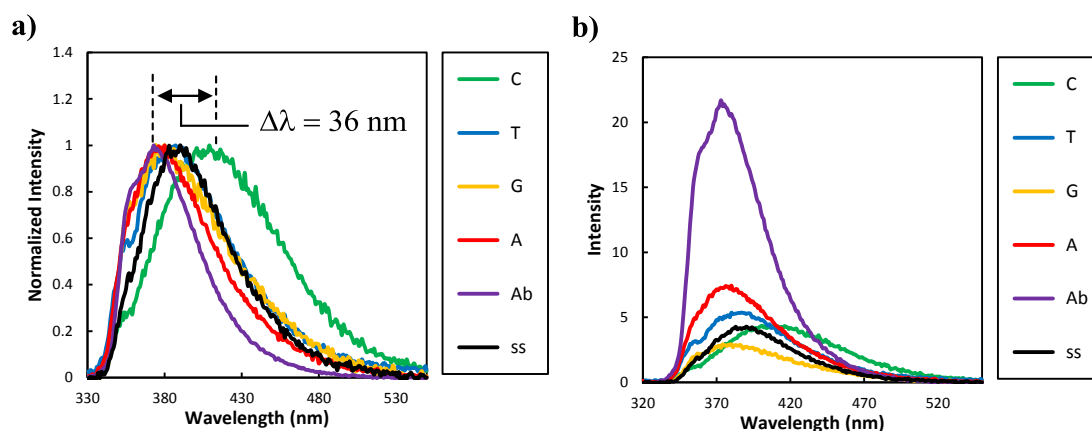
Table 4-4. Thermal melting temperatures (T_m) and fluorescence maximum of duplex ODN1/ODN3.

| ODN 1 (X) / ODN 3 (N) | T_m (°C) | ΔT_m (°C) | $\lambda_{\max}^{\text{fl}}$ (nm) |
|---------------------------------------|------------|-------------------|-----------------------------------|
| ODN 1 (^{na} G) / ODN 3 (C) | 53.9 | - 3.5 | 409 |
| ODN 1 (^{na} G) / ODN 3 (T) | 43.8 | - 13.6 | 385 |
| ODN 1 (^{na} G) / ODN 3 (G) | 41.9 | - 15.5 | 380 |
| ODN 1 (^{na} G) / ODN 3 (A) | 39.4 | - 18.0 | 380 |
| ODN 1 (^{na} G) / ODN 3 (Ab) | 44.9 | - 12.5 | 373 |
| ODN 1 (^{na} G) | - | - | 383 |
| ODN 1 (G) / ODN 3 (C) | 57.4 | - | - |

*Ab = Abasic site

Table 4-4 に示す通り、ODN 1 (X = ^{na}G) / ODN 3 (C) はミスマッチ塩基となる二重鎖に比べて、高い融解温度(T_m)を示した (53.9 °C)。天然配列である ODN 1(G) / ODN 3(C) と比較しても、-3.5 °C の減少が見られたが、ほぼ同等の熱安定性を示した。また、**Fig. 4-6** の CD スペクトルの測定の結果、B 型 DNA 構造をとっていることから、^{na}G はシトシン塩基とのみワトソン-クリック型の塩基対を形成していると言える。以前、Seela らが報告している 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシンや 7 位に置換基を持つ 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシンをオリゴヌクレオチド中で、シトシン塩基とワトソン-クリック塩基対を形成できると報告しているが¹⁻⁶⁾、それらと同様の結果を得ることが出来た。

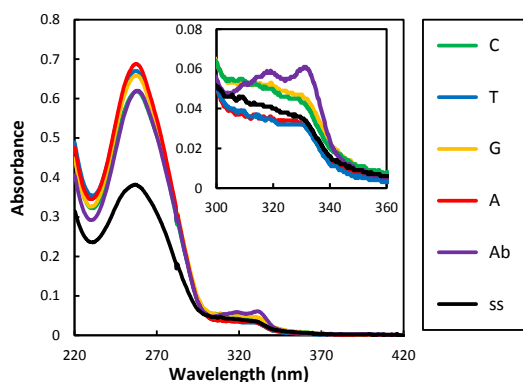
続いて、ODN 1 の UV スペクトルの測定結果を **Fig. 4-7**、蛍光スペクトル測定結果を **Fig. 4-8** に示す。



ODN 1: 5'-CGCAAT ^{na}G TAACGC-3'

ODN 3: 3'-GCGTTA N ATTGCG-5' (N = C, T, G, A, Abasic site)

Figure 4-7. Normalized fluorescence (a) and fluorescence (b) spectra of ODN 1 hybridized with ODN 3 (N = C, T, G, A, Ab). "Ab" denotes abasic site and "ss" denotes single-strand ODN 1 (2.5 μM ODNs, 0.1 M sodium chloride, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, r.t.).



ODN 1: 5'-CGCAAT ^{na}G TAACGC-3'

ODN 3: 3'-GCGTTA N ATTGCG-5'

(N = C, T, G, A, Abasic site)

Figure 4-8. UV absorption spectra of ODN 1 hybridized with ODN 3 (N = C, T, G, A, Ab). "Ab" denotes abasic site and "ss" denotes a single-strand ODN 1 (2.5 μM ODNs, 0.1 M sodium chloride, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, r.t.).

ODN 1 (X = ^{na}G) に対面塩基がマッチである ODN 3 (N = C) が存在する場合には 409 nm における発光が観測された。ミスマッチである ODN 3 (N = T, G, A) が存在する場合に比べて、最大で 29 nm の蛍光発光波長のレッドシフトを確認することができた (Fig. 4-7a)。

さらに、このプローブの特徴として、塩基が欠損したアベーシックサイト構造が向かい側に存在する場合には(N = Ab)、マッチであるシトシンに比べて、36 nm ものブルーシフトを伴って、高い蛍光強度を示すことが挙げられる (Fig. 4-7b)。

この原因として、アベリックサイト構造の場合では、フルマッチおよびミスマッチ二重鎖構造に比べて、吸収スペクトルが変化していることから、本来存在している対面塩基が欠損していることに伴ってできる空間に ^{na}G のナフタレン部位が入り込むために起きたことが考えられる (Fig. 4-8)。ヌクレオシドモノマーである ^{na}G (1) は極性の低い THF 中などでは、比較的短波長領域での発光が観測されており、すなわち、^{na}G が極性の低い環境下に位置することによって、短波長での発光が観測されたと示唆される。

一方、水素結合を形成することが可能なシトシン塩基の場合においては、ナフタレン部位が二重鎖のメジャーグループに突き出され、ナフタレン骨格が極性の高い環境下にさらされることで、蛍光発光波長のレッドシフトが起きたと考えられる。また、配列の異なるオリゴヌクレオチド鎖 ODN 2 にも導入した場合でも同様の結果を得ることが出来た (Table 4-5, Fig. 4-9)。

Table 4-5. Thermal melting temperatures (T_m) and fluorescence maximum of duplex ODN2/ODN4.

| ODN 2 / ODN 4(N) | T_m (°C) | $\lambda_{\max}^{\text{fl}}$ (nm) |
|-------------------|------------|-----------------------------------|
| ODN 2 / ODN 4 (C) | 55.3 | 410 |
| ODN 2 / ODN 4 (T) | 42.4 | 378 |
| ODN 2 / ODN 4 (G) | 43.7 | 375 |
| ODN 2 / ODN 4 (A) | 41.3 | 379 |
| ODN 2 | - | 386 |

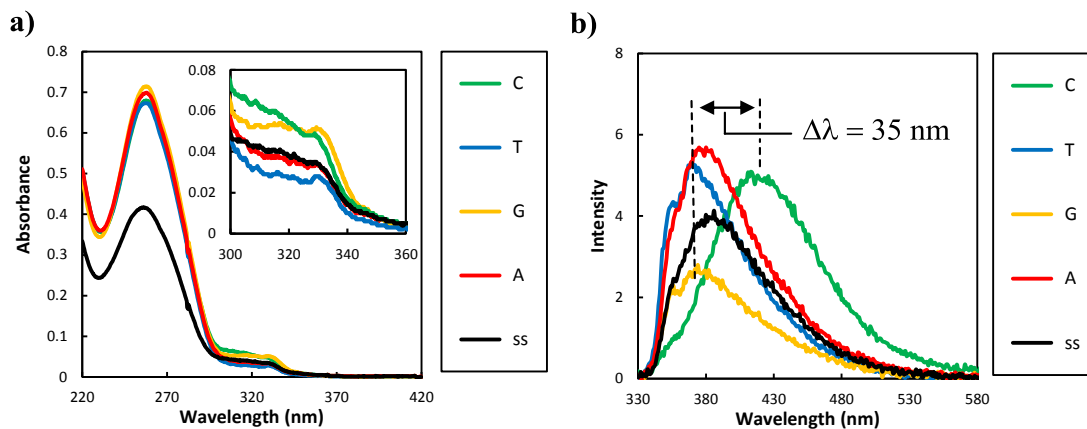


Figure 4-9. (a) UV absorption and (b) fluorescence spectra of ODN 2 hybridized with ODN 4 (N = C, T, G, A). "ss" denotes a single-strand ODN 2 (2.5 μ M ODNs, 0.1 M sodium chloride, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, r.t.).

4.2.6 ^{na}G を用いた bcr/abl 遺伝子検出プローブへの応用

^{na}G を含むオリゴヌクレオチドは水素結合形成能と識別能をあわせもつ優れた遺伝子検出プローブとして利用できると考えられる。そこで、続いてのアプローチとして、実際に変異遺伝子として知られている慢性骨髄性白血病の原因遺伝子となる bcr/abl 遺伝子¹⁶⁾ をターゲットにした 34-mer からなるモレキュラービーコン¹⁷⁻²⁰⁾ プローブ(MB 1) を作成し、蛍光発光色の違いで標的遺伝子の検出の可能性について検討を行った。プローブの作成にあたり、Scheme 4-2 で示したホスホロアミダイトユニット 5 を DNA 自動合成機にて、34-mer のオリゴヌクレオチドの 1 塩基に導入した。得られた MB 1 を合成機から切り出し後、アンモニア水 55 °C 中で一晩かけて脱保護を行い、翌日、HPLC により分析を行なった。HPLC 分析により 15 min 付近に目的物と考えられる MB 1 ピークが検出されたので (Fig. 4-10a)、MB 1 を精製後、HPLC により純度を確認し (Fig. 4-10b)、MALDI-TOF mass (Table 4-6) および酵素分解 (Fig. 4-11) により同定した。また、Table 4-6 にプローブ配列である MB 1 を示す。

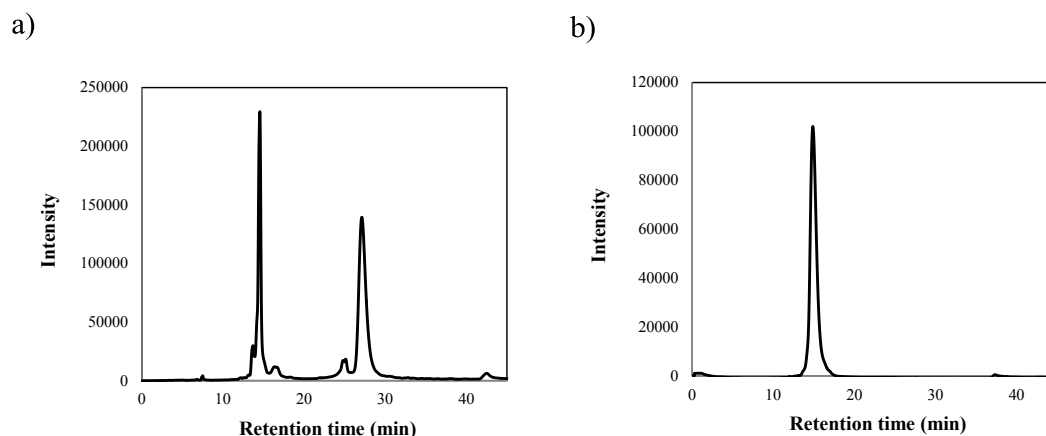


Figure 4-10. (a) HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of MB 1. Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 40 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min. (b) HPLC profiles of the pure MB 1. HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 40 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min.

Table 4-6. MALDI-TOF mass spectral data for the MB 1

| | MALDI-TOF mass | |
|---|-----------------------------|----------------------------|
| | calcd. [M + H] ⁺ | found [M + H] ⁺ |
| MB 1: 5'-CCACATGTGAAGGGCTTTT ^{na} GAACTCTGCATGTGG-3' | 10639.08 | 10640.58 |

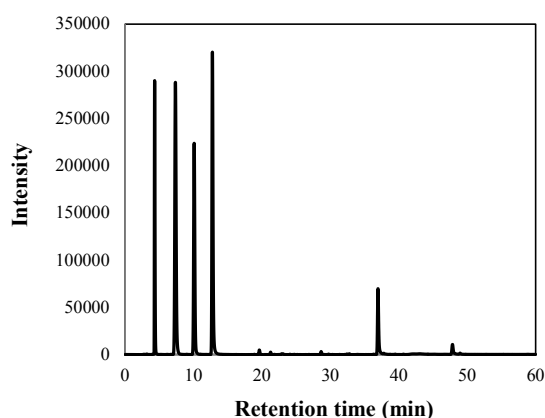
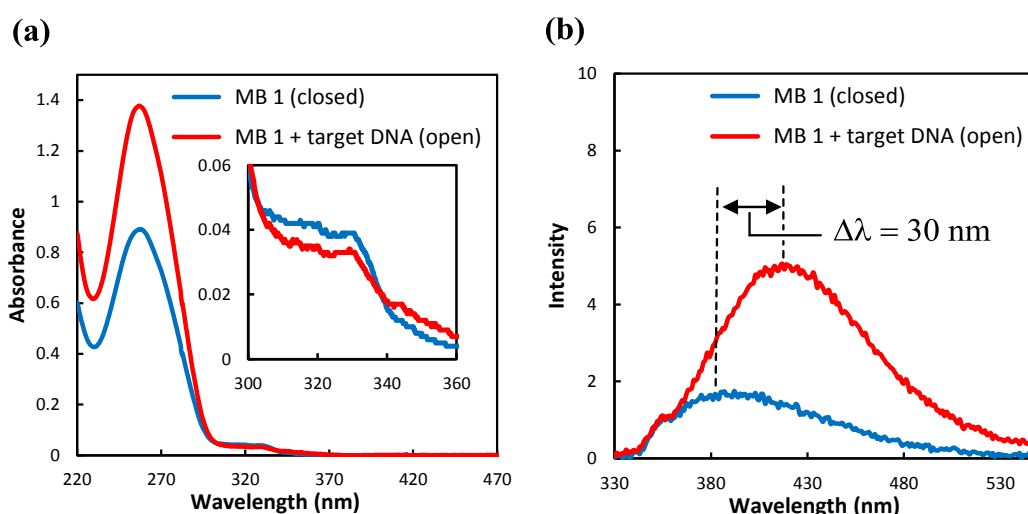


Figure 4-11. HPLC profiles of a mixture obtained by enzymatic digestion of MB 1. HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μM conc.).

精製した ^{na}G 含有 MB 1 なるプローブは両末端から 5 塩基がそれぞれ、相補関係になっている。従って、プローブ自身で水素結合しているステム部分と一本鎖状態のループ構造からなるヘアピン構造(モレキュラービーコン)¹⁷⁻²⁰ を形成していると考えられる。また、^{na}G はそのループ構造にあたる位置に存在していることから、その周辺は一本鎖と同じ環境下にある。そこに、ループ構造と相補鎖になるようなターゲット遺伝子(今回は bcr/abl 遺伝子)を混ぜ合わせると、ハイブリダイズすることによって、二重鎖を形成することが可能になり(それと同時にステム部分は一本鎖となる)、^{na}G はマッチであるシトシン塩基と水素結合を形成することができる。このようにして、bcr/abl 遺伝子の検出能について蛍光スペクトルを測定することによって調べた。測定条件は 2.5 μM ODN, 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)、0.1 M 塩化ナトリウム存在下で行なった。測定結果を Fig. 4-12 に示す。



MB 1: 5'-CCACATGTGAAGGGCTTTT ^{na}G AACTCTGCATGTGG-3'
 target DNA(ODN_{bcr/abl}): 3'-ACTTCCCGAAA ACTTGAGAC-5'

Figure 4-12. (a) UV absorption and (b) fluorescence spectra of hairpin MB 1 and the duplex formed by hybridization with target DNA (2.5 μM ODNs, 0.1 M sodium chloride, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, r.t.).

蛍光スペクトル測定の結果、MB 1 のみの場合では、380 nm に蛍光が観測された。そこに、bcr/abl 遺伝子が存在すると、プローブ単体に比べて、蛍光強度も増大し、さらにおよそ 30 nm もの長波長シフトが確認できた。これは、分子設計通り、プローブのみの場合では、^{na}G が一本鎖で存在しているのに対して、ターゲット DNA を加えることによって、^{na}G がシトシン塩基と水素結合し、二重鎖を形成したために見られた発光現象であると考えられる。従って、蛍光波長のレッドシフトを伴うことから、より明瞭に bcr/abl 遺伝子を検出できるプローブの開発に成功した。

4.3 結論

本章では、8-アザ-7-デアザ-グアニンを骨格にもつ新しい環境感応型蛍光核酸の開発に取り組んだ。その結果、8-アザ-7-デアザグアニンの7位に2-エチルナフタレンを連結する程度で簡単にその蛍光特性を得ることができた。そして、オリゴヌクレオチドに導入しても、シトシン塩基とのみ安定なワトソン-クリック型水素結合を形成し（ミスマッチ塩基と水素結合することはなかった）、さらに、ミスマッチ塩基に比べて、およそ30 nmもの長波長シフトし蛍光発光することが可能であった。すなわち、標的相補鎖のシトシン塩基を認識する効果を持つことを意味しており、実際に、*bcr/abl* 遺伝子を高感度で検出することに成功した。本章で示された結果は、マッチ-ミスマッチといった識別したい一塩基の変異を調べる SNP タイピングへの応用に有効である。

4.4 実験項

General: $^1\text{H-NMR}$ spectra (400 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (100 MHz) were measured with Bruker Avance 400F spectrometer. Coupling constants (J values) are reported in hertz. The chemical shifts are shown in ppm downfield from tetramethylsilane, using residual dimethyl sulfoxide (δ 2.50 in $^1\text{H-NMR}$, δ 39.5 in $^{13}\text{C-NMR}$) and chloroform (δ 7.26 in $^1\text{H-NMR}$, δ 77.0 in $^{13}\text{C-NMR}$) as an internal standard. ESI-TOF masses were recorded on a JMS-T100LC “AccuTOF”, Applied DATUM Solution Business Operations.

The reagents for DNA synthesis were purchased from Glen Research. Mass spectra of oligodeoxynucleotides were determined with a MALDI-TOF mass (Shimadzu AXIMA-LNR, positive mode) with 2',3',4'-trihydroxyacetophenone as a matrix. Calf intestinal alkaline phosphatase (Promega), *Crotalus adamanteus* venom phosphodiesterase I (USB), and *Penicillium citrinum* nuclease P1 (Yamasa Shoyu) were used for the enzymatic digestion of ODNs. All aqueous solutions utilized purified water (Millipore, Milli-Q sp UF). Reversed-phase HPLC was performed on CHEMCOBOND 5-ODS-H columns (10 \times 150 mm, 4.6 \times 150 mm) with a JASCO Chromatograph, Model PU-2080, using a UV detector, Model UV-2075 plus at 260 nm.

Procedure for the synthesis of modified nucleosides

6-Amino-1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-1,5-dihydro-3-iodo-4H-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one (2: 7-iodo-8-aza-7-deaza-2'-deoxyguanosine) was prepared from 2-amino-4,6-dihydroxypyrimidine according to literature methods by 7 step reactions.^{9, 11-13)}

6-Amino-1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-1,5-dihydro-3-[2-(2-naphthyl)ethynyl]-4H-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one (1) A mixture of **2** (120 mg, 0.31 mmol), Pd(PPh₃)₄ (18.0 mg, 0.02 mmol), CuI (6.0 mg, 0.03 mmol) and 2-ethynyl-naphthalene (60.0 mg, 0.39 mmol) in DMF (5 ml) and Et₃N (0.1 ml) was stirred at 50 °C at under an argon atmosphere for 30 min. After allowing to cool to room temperature, The reaction solution was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography with chloroform-methanol mixture (12 : 1 to 8 : 1) to give **1** as a colorless solid (87.2 mg, 68 %); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.20 (ddd, J = 4.1, 6.6, 13.2 Hz, 1H), 2.72 (m, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.51 (m, 1H), 3.79 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.77 (m, 1H), 5.27 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 6.34 (m, 1H), 6.80 (br, 2H), 7.59-7.63 (complex, 3H), 7.97-8.01 (complex, 3H), 8.23 (m, 1H), 10.84 (s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 37.7, 62.4, 70.9, 82.2, 83.3, 87.6, 91.9, 100.4, 118.9, 127.0, 127.4, 127.8, 127.8, 127.9, 128.5, 129.7, 131.6, 132.5, 132.7, 155.4, 155.7, 157.1; HRMS (ESI) m/z 440.1335 calcd for C₂₂H₁₉N₅O₄Na [M + Na]⁺, found 440.1362.

6-[[*N,N*-Dimethylamino)methylidene]amino]-1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-1,5-dihydro-3-[2-(2-naphthyl)ethynyl]-4*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one (3) A solution of **1** (75.0 mg, 0.18 mmol) in DMF (5 ml) was stirred with *N,N*-dimethylformamide diethyl acetal (45 μ l, 0.27 mmol) at 50 °C for 30 min. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was purified by silica gel column chromatography with chloroform-methanol mixture (9 : 1) to give compound **3** as a colorless solid (43.4 mg, 51 %); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.20 (ddd, *J* = 4.0, 6.7, 13.2 Hz, 1H), 2.75 (m, 1H), 3.08 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 3.42 (m, 1H), 3.53 (m, 1H), 3.82 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 4.78 (m, 1H), 5.30 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 6.51 (m, 1H), 7.58-7.64 (complex, 3H), 7.97-8.01 (complex, 3H), 8.24 (m, 1H), 8.75 (s, 1H), 11.45 (s, 1H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 34.9, 37.9, 40.8, 62.4, 71.0, 82.2, 83.4, 87.7, 92.0, 102.8, 118.9, 127.0, 127.4, 127.8, 127.8, 127.9, 128.5, 129.6, 131.6, 132.5, 132.7, 154.8, 157.9, 158.7, 159.6; HRMS (ESI) *m/z* 495.1757 calcd for C₂₅H₂₄N₆O₄Na [M + Na]⁺, found 495.1786.

6-[[*N,N*-Dimethylamino)methylidene]amino]-1-[2-deoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-1,5-dihydro-3-[2-(2-naphthyl)ethynyl]-4*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one (4) To a solution of **3** (36.0 mg, 0.08 mmol) in anhydrous pyridine (3 ml) was added 4,4'-dimethoxytrityl chloride (39.0 mg, 0.11 mmol), and the stirring continued at room temperature for 1 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The purification by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH-Et₃N mixture (30 : 1 : 0.5) yields compound **4** as a colorless solid (42.8 mg, 72 %); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.37 (m, 1H), 3.02-3.09 (complex, 4H), 3.16 (s, 3H), 3.31 (m, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.70 (s, 6H), 4.05 (m, 1H), 4.83 (m, 1H), 6.63 (m, 1H), 6.78 (m, 4H), 7.16-7.33 (complex, 7H), 7.42 (m, 2H), 7.47-7.52 (complex, 2H), 7.67 (m, 1H), 7.79-7.81 (complex, 3H), 8.17 (m, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.72 (s, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 35.2, 38.0, 41.5, 55.1 (\times 2), 64.5, 73.4, 81.5, 83.5, 85.6, 86.4, 93.3, 103.7, 113.1 (\times 4), 119.9, 126.5, 126.8, 126.8, 127.8, 127.8 (\times 2), 127.9, 128.0, 128.2 (\times 2), 128.6, 129.1, 130.0 (\times 2), 130.1 (\times 2), 132.4, 132.9, 133.1, 136.0, 136.0, 144.8, 155.2, 158.0, 158.4, 158.4, 158.6, 158.7; HRMS (ESI) *m/z* 797.3064 calcd for C₄₆H₄₂N₆O₆Na [M + Na]⁺, found 797.3043.

6-[[*N,N*-Dimethylamino)methylidene]amino]-1-[2-deoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-1,5-dihydro-3-[2-(2-naphthyl)ethynyl]-4*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one 3'-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite] (5) To a solution of **4** (60.0 mg, 0.08 mmol) in anhydrous acetonitrile (1 ml) was added 2-cyanoethyl-diisopropyl-chlorophosphoramidite (70 μ l) in the presence of Et₃N (1 ml), and stirred at room temperature under an argon atmosphere for 1 h. After completion of the reaction, the solution was diluted with ethyl acetate, washed with saturated

NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was incorporated into oligonucleotides without further purification.

Oligodeoxynucleotide synthesis and characterization: Oligodeoxynucleotide (ODN) sequences were synthesized by a conventional phosphoramidite method by using an Applied Biosystems 3400 DNA/RNA synthesizer. ODNs were purified by reverse phase HPLC on a 5-ODS-H column (10 × 150 nm, elution with 50 mM ammonium formate (AF) buffer, pH 7.0, linear gradient over 45 min from 3 % to 20 % or to 50 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min). ODNs containing modified nucleotides were fully digested with calf intestine alkaline phosphatase (50 U/ml), and P1 nuclease (50 U/ml) at 37 °C for 12 h. Digested solutions were analyzed by HPLC on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6 × 150 nm, elution with a solvent mixture of 50 mM AF buffer, pH 7.0, flow rate 1.0 ml/min). The concentration of ODNs was determined by comparing peak areas with a standard solution containing dA, dG, dC, and dT at a concentration of 0.1 mM. Mass spectra of ODNs purified by HPLC were determined with a MALDI-TOF mass spectrometer.

UV absorption measurements: Absorption spectra were obtained using a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer at room temperature using 1 cm length cell.

Fluorescence spectra: The fluorescence spectra were obtained using a Shimadzu RF-5300PC spectrofluorophotometer at 25 °C using a cell with a 1 cm path length. The excitation and emission bandwidths were 1.5 nm.

Melting temperature (T_m) measurements: All T_m s of the ODNs (2.5 μM, final concentration) were measured in 50 mM sodium phosphate buffers (pH 7.0) containing 100 mM sodium chloride. Absorbance vs temperature profiles were measured at 260 nm using a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer equipped with a Peltier temperature controller using 1 cm path length cell. The absorbance of the samples was monitored at 260 nm from 4 to 90 °C with a heating rate of 1 °C/min. From these profiles, first derivatives were calculated to determine T_m values.

Circular dichroism (CD) measurements: CD spectra were recorded with a JASCO J-805 CD spectrophotometer. CD spectra of oligonucleotides solutions (2.5 μM ODNs in 50 mM sodium phosphate buffers (pH 7.0) containing 100 mM sodium chloride at 20 °C) were measured using 2 mm path length cell.

参考文献

- 1) F. Seela, H. Driller, *Helv. Chim. Acta*, 1988, **71**, 1191.
- 2) F. Seela, K. Kaiser, *Helv. Chim. Acta*, 1988, **71**, 1813.
- 3) F. Seela, H. Driller, K. Kaiser, H. Rosemeyer, H. Steker, *Nucleosides Nucleotides*, 1989, **8**, 789.
- 4) F. Seela, G. Becher, *Chem. Commun.*, 1998, 2017.
- 5) Becher, *Helv. Chim. Acta*, 1999, **82**, 1640.
- 6) J. He, F. Seela, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, 5485.
- 7) F. Seela, S. S. Pujari, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 1631.
- 8) S.A. Ingale, S.S. Pujari, V.R. Sirivolu, P. Ding, H. Xiong, H. Mei, F. Seela, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 188.
- 9) F. Seela, G. Becher, *Synthesis*, 1998, 207.
- 10) N. Ramazaeva, F. Seela, *Helv. Chim. Acta*, 1995, **78**, 1083.
- 11) L. Bell, H.M. McGuire, G.A. Freeman, *J. Heterocycl. Chem.*, 1983, **20**, 41.
- 12) F. Seela, H. Steker, *Heterocycles*, 1985, **23**, 2521.
- 13) F. Seela, H. Steker, *Helv. Chim. Acta*, 1986, **69**, 1602.
- 14) K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* 1975, **16**, 2267.
- 15) J. V. Morris, M. A. Mahaney, J. R. Huber, *J. Phys. Chem*, 1976, **80**, 969.
- 16) E. Shtivelman, B. Lifshitz, R.P. Gale, B.A. Roe, E. Canaani, *Cell*, 1986, **47**, 277.
- 17) S. Tyagi, F.R. Kramer, *Nat. Biotechnol.*, 1996, **14**, 303.
- 18) S. Tyagi, D.P. Bratu, F.R. Kramaer, *Nat. Biotechnol*, 1998, **16**, 409,.
- 19) S. Thurley, L. Roglin, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 12693.
- 20) S. Sandhya, W. Chen, A. Mulchandani, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **614**, 208.

第 5 章

8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の
蛍光特性と一塩基変異識別プローブへの展開

5.1 緒言

第4章では、周辺の極性変化に鋭敏に応答し蛍光発光が変化する 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン誘導体 ${}^{\text{na}}\mathbf{G}$ の開発に成功している。また、 ${}^{\text{na}}\mathbf{G}$ を含む ODN は、相補鎖 ODN とハイブリダイズすると、 ${}^{\text{na}}\mathbf{G}$ はシトシンとのみ安定なワトソン-クリック塩基対を形成すると同時に、ミスマッチ塩基に比べて、およそ 30 nm 長波長シフトして蛍光発光させることができた。この理由としては、シトシン塩基と水素結合する場合のみ 8-アザ-7-デアザグアニンの 7 位に修飾したナフチルエチニル基が二重鎖構造のメジャーグループに位置することで、分子内電荷移動 (ICT) 状態からの発光による長波長シフトが観測されたことが挙げられる。

また、これまでは、電子的にドナーとアクセプターが分子内に共存することによって、極性溶媒中の励起で、ICT 状態を生成し、蛍光波長を長波長シフトさせることを狙いとして分子デザインを行っていた。しかしながら、例えば DNA 中の極性環境の違いによる微細な構造変化をモニターするには、さらに極性のほんのわずかな違いで蛍光強度や蛍光波長が変わるようなこれまで以上のセンサー分子の開発が望まれる。第4章の ${}^{\text{na}}\mathbf{G}$ はまさにその性質を付与することに成功したが、さらに高感度の S/N 比で識別するには精度的にまだ不十分であるが、極性環境変化を蛍光波長で識別するような分子デザインには限界がある。

そこで、環境によって異なる 2 つの発光帯を示す二重蛍光を持つような分子に着目した。アントラセン環の 9 位に DMA (ジメチルアニリン) を単結合で連結させた ADMA¹⁻⁴⁾ や 9 位にカルボキシアミド置換基を含む 9-AA⁵⁻⁶⁾ と呼ばれる化合物は、例えば粘性の高い溶媒中では、電子供与基と電子吸引基との間でねじれ構造をとることで、振動構造を持ったアントラセン類似の蛍光 (LE 蛍光) を示すのに対して、低粘性溶媒中では、ねじれ構造から平面構造に近づくことによって、分子内電荷移動状態からの蛍光 (ICT 蛍光) が観測されるという特徴をもっている。従って、極性環境変化による ICT 蛍光だけでなく、粘度環境変化、すなわち、分子のねじれ構造を伴うことによって、 π 共役が分断されることによる振動構造からの LE 発光を出現させることができれば、より環境変化に応じて、蛍光発光波長をシフトさせることができるのではないかと考えた。また、そのような分子内電荷移動やねじれ構造による二重蛍光性を示すヌクレオシドが岡本らによって報告されており、それを含む ODN はターゲット遺伝子を二重蛍光の強度比や蛍光色の違いで検出するプローブとして利用できる⁷⁾ と提案している⁷⁾。その他にも、このような二重蛍光を利用して、タンパクをターゲットにしたプローブも報告されている⁸⁾。

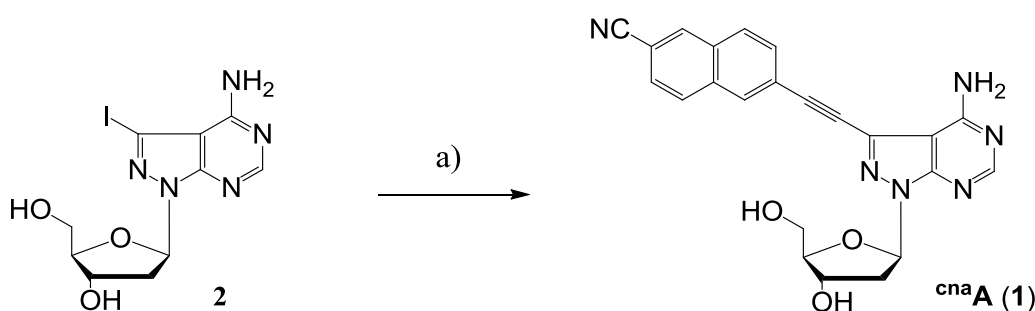
第5章では、DNA 二重鎖のフルマッチとミスマッチ構造を短い波長の LE 発光と長い波長の ICT 発光で識別できるようなプローブの開発を目指した。二重蛍光を示すような蛍光分子はそのほとんどが電子供与基と電子吸引基が単結合で連結することで生じる置換基間の立体反発が、結果的に分子のねじれ構造の安定化に寄与すると考えられている。しかしながら、分子間を単結合で連結しなくても、分子内の電荷移動状態からの発光をある程度

抑えることで、分子の振動構造による蛍光を出現させることが可能になると予想した。そこで、アクセプターとしてナフトニトリル、核酸塩基としては、同様に 7 位に修飾することが可能であり、電子供与能が低いと予想される 8-アザ-7-デアザアデニンを用いた 8-アザ-7-デアザアデノシン誘導体 **cnaA** をデザインした。

5.2 実験と結果

5.2.1 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 **cnaA** の合成

目的とする 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 **cnaA** (**1**)を得るために、まず、既知化合物である 7-ヨード-8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン⁹⁾ をアロプリノールから、6 段階反応により合成した⁹⁻¹³⁾。続いて、6-エチニル 2-ナフトニトリルとパラジウム触媒を用いた菌頭カップリング反応¹⁴⁾ によって **cnaA** (**1**)を得ることに成功した。合成ルートは **Scheme 5-1** に示す。



Scheme 5-1. Reagents and conditions: a) 6-ethynyl-2-naphthonitrile, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, 60 °C, 1 h, 77%.

5.2.2 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 **cnaA** の光学特性

得られた 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 **cnaA** (**1**) を様々な溶媒中に溶解させ、周辺の極性変化や粘性変化に伴う蛍光発光挙動について調べた。まず、UV スペクトルの測定を行い、どの溶媒中でも吸光度がほぼ一定であること（濃度が均一であること、また、確実に溶解していること）を確認するとともに、得られた最大吸収波長をもとに、蛍光スペクトルの測定を行なった。測定は濃度 10 μM に調整して行った。測定結果を **Fig. 5-1, 5-2** に示す。

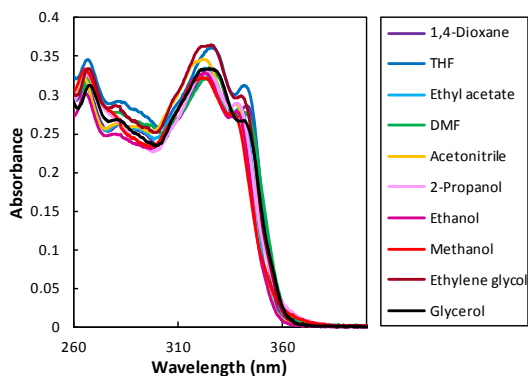


Figure 5-1. UV absorption spectra of $cnaA$ (1, 10 μ M) in various solvents.

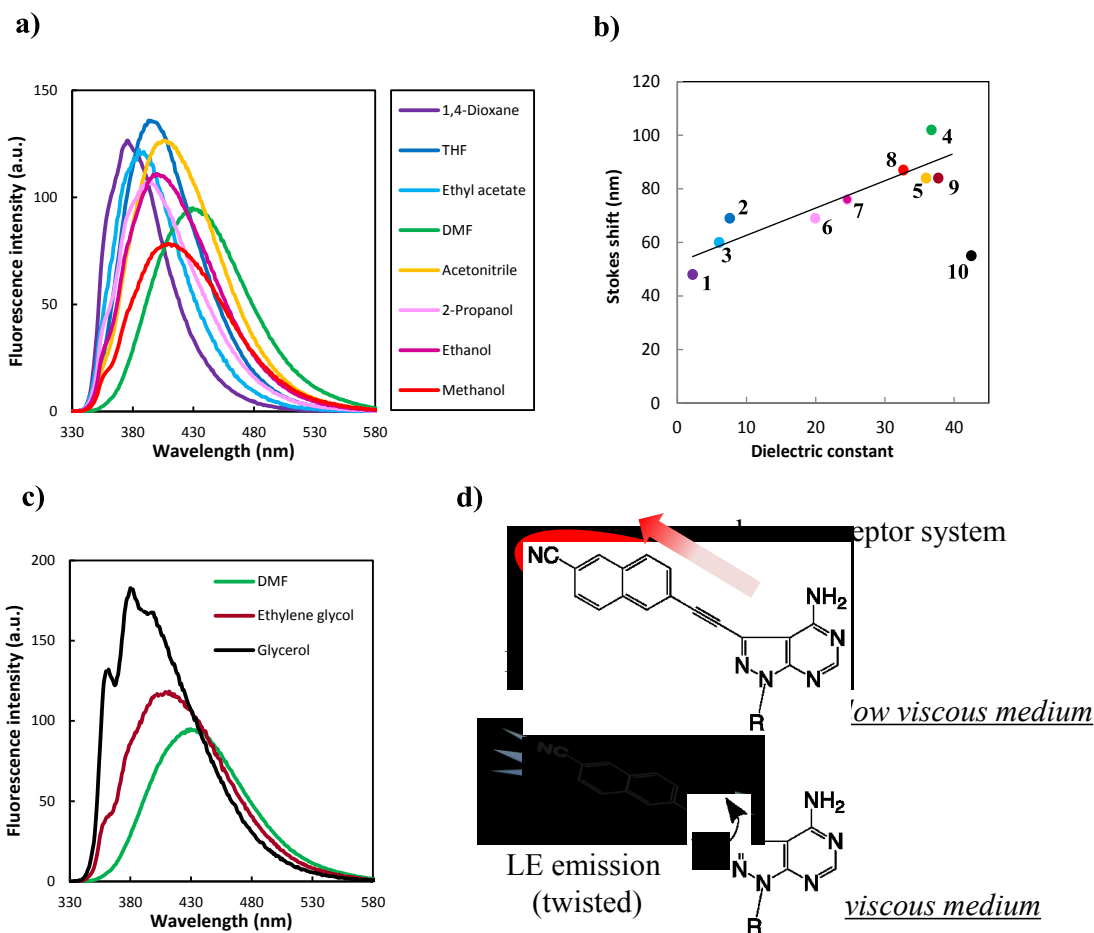


Figure 5-2. (a) Fluorescence spectra of $cnaA$ (1, 10 μ M) in various solvents. (b) A plot of Stokes shift of $cnaA$ (1) against dielectric constants of the solvents. 1, 1,4-dioxane; 2, THF; 3, ethyl acetate; 4, DMF; 5, acetonitrile; 6, 2-propanol; 7, ethanol; 8, methanol; 9, ethylene glycol; 10, glycerol. (c) Fluorescence spectra of $cnaA$ (1, 10 μ M) in DMF, ethylene glycol, and glycerol. (d) Schematic illustration of fluorescence emission of $cnaA$ (1) in solvents of different viscosity ($R = 2'$ -deoxyribose).

Table 5-1. Photophysical properties of **cnaA (1)** together with solvent properties

| Solvent | ϵ^a | η^b | $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm) | $\lambda_{\max}^{\text{fl}}$ (nm) | Φ_{fl}^c |
|-----------------|--------------|----------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 1,4-dioxane | 2.21 | 1.44 | 327 | 375 | 0.29 |
| THF | 7.58 | 0.58 | 326 | 395 | 0.34 |
| Ethyl acetate | 6.05 | 0.45 | 325 | 385 | 0.30 |
| DMF | 36.7 | 0.92 | 327 | 429 | 0.35 |
| Acetonitrile | 35.9 | 0.34 | 322 | 406 | 0.40 |
| 2-Propanol | 19.9 | 2.04 | 324 | 393 | 0.32 |
| Ethanol | 24.6 | 1.20 | 323 | 399 | 0.37 |
| Methanol | 32.7 | 0.59 | 322 | 409 | 0.28 |
| Ethylene glycol | 37.7 | 19.9 | 326 | 410 | 0.39 |
| Glycerol | 42.5 | 1412 | 325 | 362, 380 | 0.65 |

^a Dielectric constant

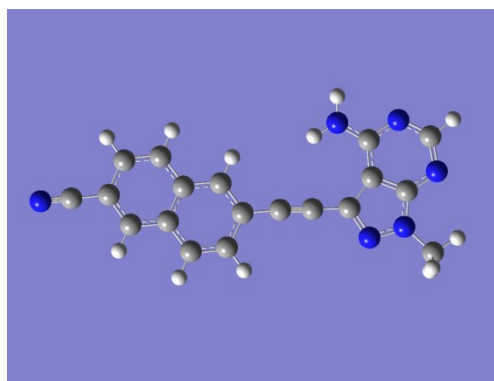
^b Viscosity (mPa s) (20 °C)

^c Quantum yields were calculated according to Ref.15

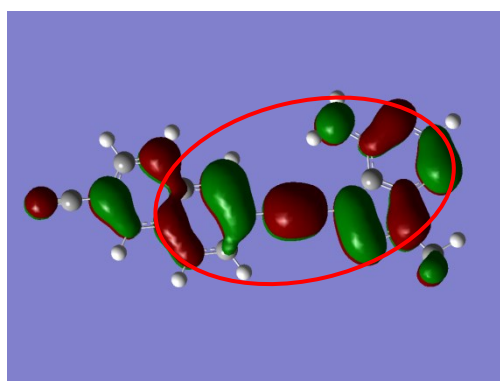
UV スペクトル測定によって得られた最大吸収波長($\lambda_{\max}^{\text{abs}}$)および蛍光スペクトル測定によって得られた最大蛍光波長($\lambda_{\max}^{\text{fl}}$)をそれぞれ **Table 5-1** に示した。蛍光量子収率(Φ_{fl})は9,10-ジフェニルアントラセン($\Phi_{\text{fl}} = 0.95$ in ethanol)を標準物質として用いて算出した¹⁵⁾。また、溶媒ごとの誘電率 ϵ と粘度 η も合わせて示す¹⁶⁾。

cnaA (1) は極性の低い1,4-ジオキサン中で ($\epsilon = 2.21$)、327 nm の励起光を照射して蛍光スペクトルを測定すると、最大蛍光波長 375 nm のブロードな発光が観測された ($\Phi_{\text{fl}} = 0.29$)。一方、1,4-ジオキサンとほぼ同程度での粘性 ($\eta = 1.20$) であり、極性 (誘電率) の高いエタノール ($\epsilon = 24.6$) 中では、399 nm の発光が得られた。さらに誘電率の高いDMF ($\epsilon = 36.7$) 中で測定を行うと、エタノール中よりもさらに蛍光発光波長のレッドシフトが観測された (**Fig. 5-2 a**)。溶媒の誘電率における蛍光発光の相関性をプロットすると、**cnaA (1)** は極性や誘電率の高い溶媒中において蛍光発光波長がレッドシフトする特徴を示した (**Fig. 5-2 b**)。従って、**cnaA (1)** は誘電率の高い極性環境下で長波長領域で発光する特徴を示したから、分子内電荷移動状態 (ICT 発光) を創出する特徴を有していると言える。これまでに開発してきた環境感応型蛍光核酸塩基は分子内ドナー・アクセプター型の構造を取りやすい化合物はソルバトフルオロクロミックな蛍光特性を示したが、今回、開発した **cnaA (1)** は、2-ナフトニトリルがアクセプターとして、8-アザ-7-デアザアデニンがドナーとして働くために起こると推測される。分子軌道計算ソフト(Gaussian 09)により、**cnaA** の構造最適化を行うと、

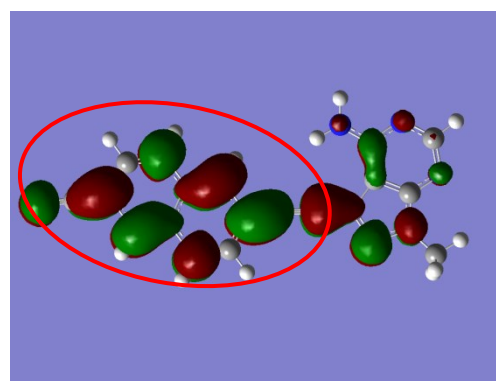
HOMO-LUMO 間で電子密度が 8-アザ-7-デアザアデニンからナフタレン環へ電荷移動が起きていることがわかった。なお、HOMO では、第 3 章で述べた **cnaA** に比べて、ナフトニトリルに電子密度があらかじめ存在しやすい構造となっているため、ソルバトフルオロクロミックな性質は **cnaA** よりも低いことが確認できる。なお、Gaussian 09 を用いた密度汎関数 (DFT)法(B3LYP/6-31G*)により計算を行った (Fig. 5-3)。



*N*⁹-methylated **cnaA**



*N*⁹-methylated **cnaA** (HOMO)



*N*⁹-methylated **cnaA** (LUMO)

Figure 5-3. HOMO and LUMO of *N*⁹-methylated **cnaA** calculated at the DFT(B3LYP)/6-31G* level.

続いて、**cnaA (1)** の粘性変化に伴う蛍光発光の相関性について調べたところ、粘性の比較的低い DMF ($\eta = 0.92$) 中では、429 nm のブロードな蛍光発光が観測されたが、DMF や他の溶媒に比べて僅かながら高い粘性のエチレングリコール中では、短波長側 362 nm 付近に新しい発光が現れ、さらに粘性がエチレングリコールよりもおよそ 100 倍高いグリセロール中では、362 nm と 380 nm に鋭い 2 つの新しい発光が観測された (**Fig. 5-2 c**)。そこで、6-エチニル-2-ナフトニトリルおよび 2-ナフトニトリルの蛍光測定を行った結果、両者とも、2 つのシャープなバンドを持つ蛍光挙動を示した。また、その蛍光発光波長は 6-エチニル-2-ナフトニトリルでは、351 nm と 367 nm であり、2-ナフトニトリルでは、340 nm と 356 nm 付近であり、**cnaA (1)** のグリセロール中で観測された新しい短波長の蛍光発光は、6-エチニル-2-ナフトニトリルの発光と非常に波長・挙動ともに酷似していた。測定結果を **Fig. 5-4** に示す。

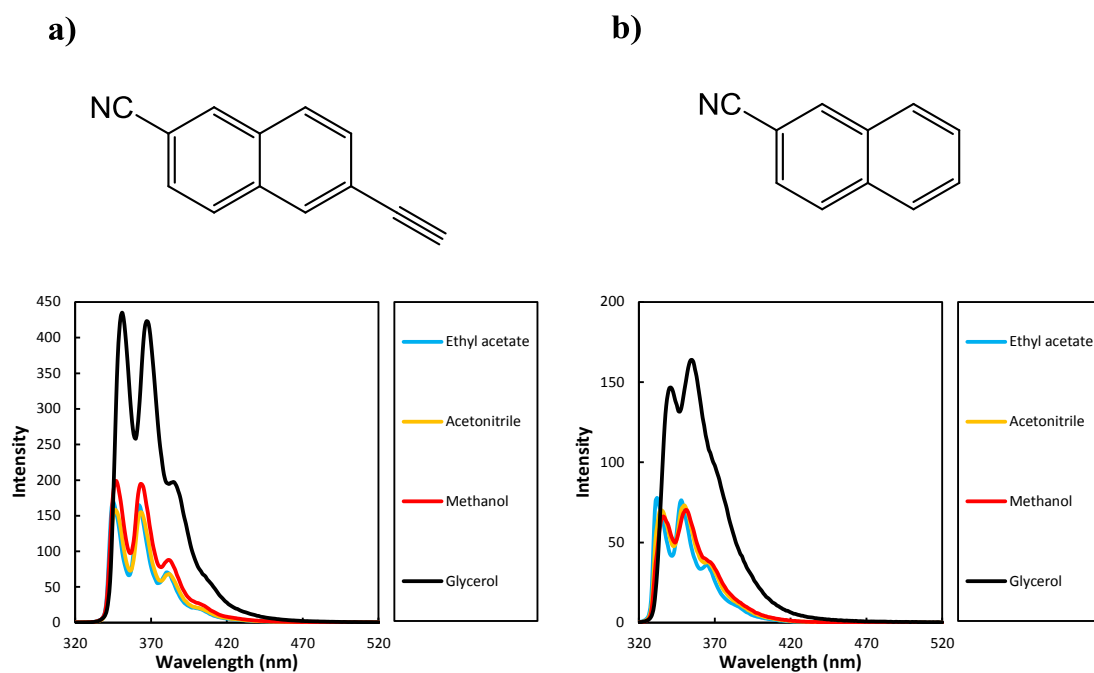


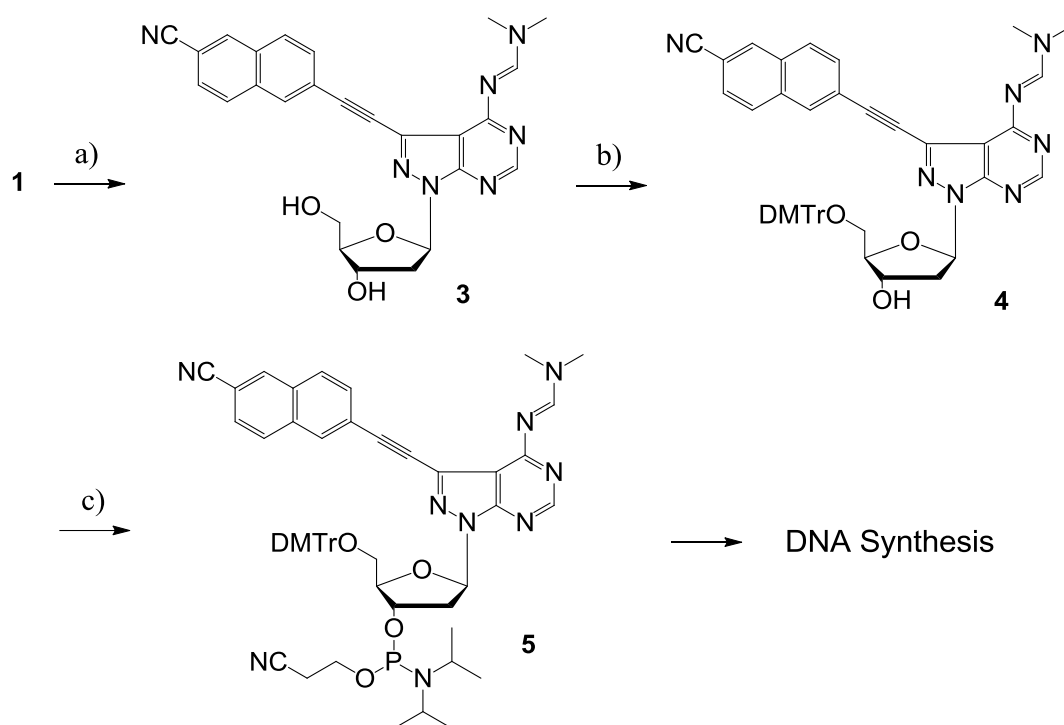
Figure 5-4. Fluorescence spectra of (a) 6-ethynyl-2-naphthonitrile (100 μM) and (b) 2-naphthonitrile (100 μM) in various solvents.

これらの結果から、**cnaA (1)** は基底状態において、8-アザ-7-デアザアデニン部位とエチニルナフトニトリル部位とで、ねじれ構造を形成していると考えられる。UV スペクトルの測定結果を参照すると (**Fig. 5-1**)、高粘性のグリセロール中においても同様の他の溶媒中と同様の吸収帯が得られていることから、グリセロール中にも、ねじれているとは考えられにくい。従って、**cnaA (1)** は粘性の高い条件下では、分子の回転が制御されるために、6-エチニル-2-ナフトニトリル部位の LE 発光が現れたと言える。一方で、粘性の低い環境下では、8-アザ-7-デアザアデニン部位とエチニルナフトニトリル部位との間で自由に分子回転が可能になるために、共平面構造を形成し、 π 共役が拡張し、長波長領域で ICT 性の蛍光発光が観測されることが考えられる (**Fig 5-2 d**)。

このように、LE 発光 (短波長での発光) と ICT 発光 (長波長での発光) が環境変化に応じてスイッチする環境感応型蛍光核酸を利用することで、分子回転を抑制する環境を作り出して、DNA の微細な構造変化を認識するセンサーヌクレオシドとして用いることが示唆された。

5.2.3 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 **cnaA** 含有 ODN の合成

今回、開発した新しい環境感応型蛍光ヌクレオシド **cnaA (1)** は、ターゲット DNA の検出、SNP タイピングなどに利用できるのではないかと考えられるので、オリゴヌクレオチドレベルでその評価を行うこととした。ODN 鎖への導入にあたり、DNA 自動合成機を用いたホスホロアミダイト法により行なった。まず、*N,N*-ジメチルホルムアミドジエチルアセタールを用いて、アミノ基を保護して **3** とした後、5'-水酸基をトリチル化して **4** を得た。最後に、3'-水酸基を 2-シアノジソプロピルクロロホスホロアミジトを用いて、ホスホロアミダイトユニット **5** を合成し、DNA 自動合成機で目的とする ODN 鎖へ導入した (**Scheme 5-2**)。Table 5-2 にこの章で使う DNA の配列を示す。



Scheme 5-2. Reagents and conditions: a) *N,N*-dimethylformamide diethylacetal, DMF, 60 °C, 1 h, 88%; b) DMTrCl, pyridine, r.t., 2 h, 72 %; c) 2-cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidite, Et₃N, acetonitrile, r.t., 30 min.

Table 5-2. Oligonucleotides used in this study

| Sequences | |
|-----------|--|
| DNA 1 (X) | 5'-d(CGCAAT X TAACGC)-3' X = ^{cna} A or A |
| DNA 2 (X) | 5'-d(CGCAAT X AAACGC)-3' X = ^{cna} A or A |
| DNA 3 (N) | 5'-d(GCGTTA N ATTGCG)-3' N = T, G, C, A, Ab |
| DNA 4 (N) | 5'-d(GCGTTT N ATTGCG)-3' N = T, G, C, A, Ab |
| RNA 1 (N) | 5'-r(GCGUUA N AUUGCG)-3' N = U, G, C, A, |

*Ab = Abasic site

DNA 1 (X = ^{cna}A) と DNA 2 (X = ^{cna}A) は通常の DNA 自動合成機での条件で合成することが出来た。得られた DNA 1 を合成機から切り出し後、アンモニア水 55 °C 中で一晩かけて脱保護を行い、翌日、HPLC により分析を行なった。DNA 1 (X = ^{cna}A) は 28 min 付近に、DNA 2 (X = ^{cna}A) は 27 min 付近に目的物らしき DNA ピークが検出された (Fig. 5-5)。目的物 DNA を精製後、HPLC により純度を確認し (Fig. 5-6)、MALDI-TOF mass (Table 5-3) および酵素分解 (Fig. 5-7) により同定した。

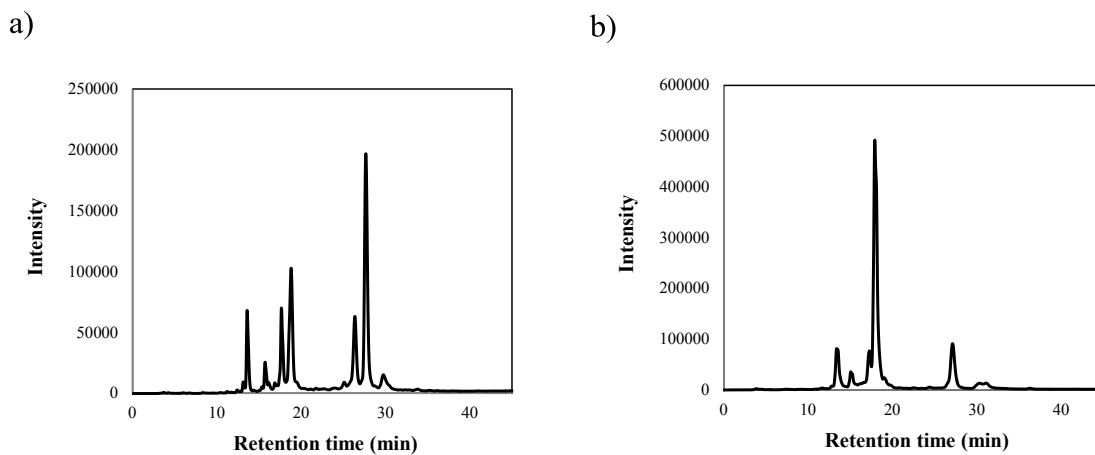


Figure 5-5. HPLC profiles of the crude reaction mixture from automated DNA synthesizer of 13 mer single-stranded (a) DNA 1 and (b) DNA 2. Purification was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min.

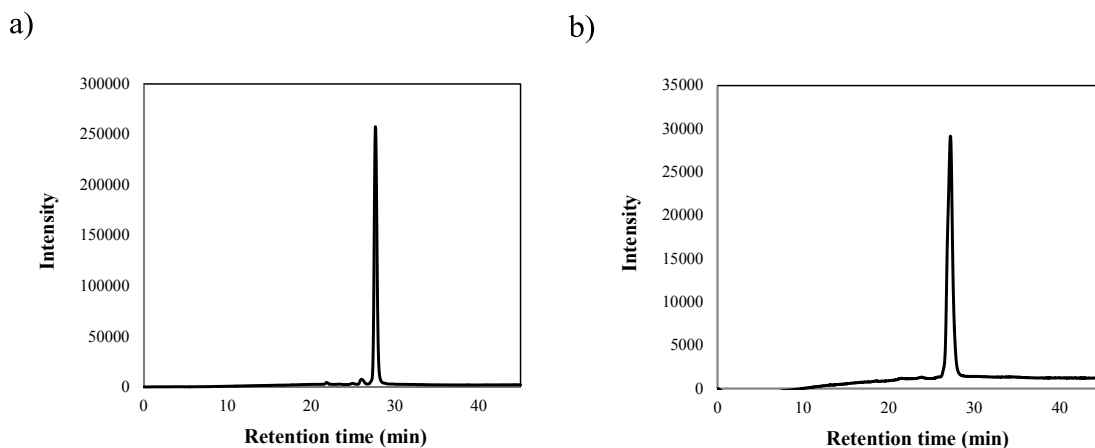


Figure 5-6. HPLC profiles of a pure single-stranded (a) DNA 1 and (b) DNA 2. HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (10 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min over 45 min

Table 5-3. MALDI-TOF mass spectral data for the ODNs

| | MALDI-TOF mass | |
|--|-----------------------------|----------------------------|
| | calcd. [M + H] ⁺ | found [M + H] ⁺ |
| DNA 1: 5'-CGCAAT ^{cna} ATAACGC-3' | 4103.85 | 4102.67 |
| DNA 2: 5'-CGCAAT ^{cna} AAAACGC-3' | 4112.86 | 4112.20 |

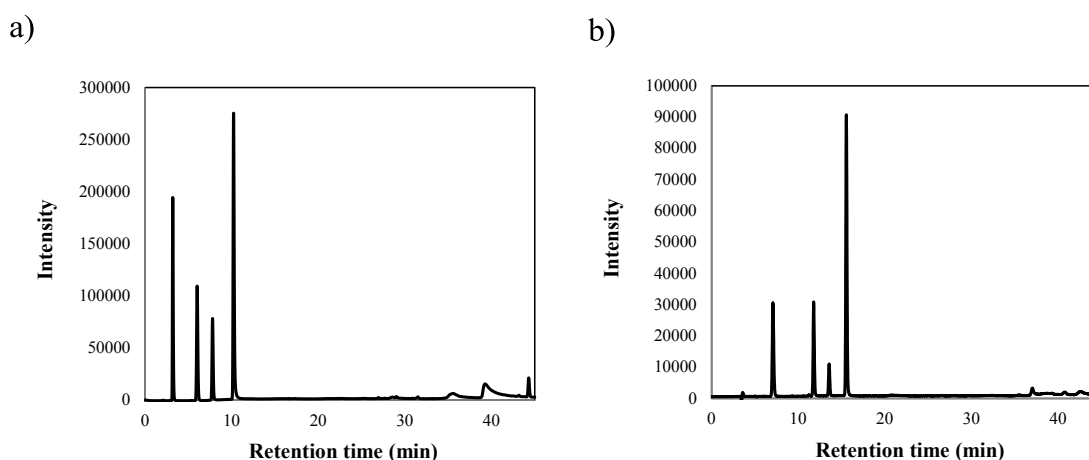
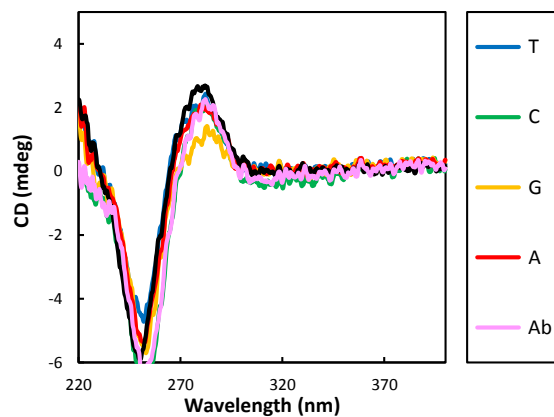


Figure 5-7. HPLC profiles of a mixture obtained by enzymatic digestion of (a) DNA 1 and (b) DNA 2. HPLC analysis was carried out on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6 × 150 mm) eluted with 0.05 M ammonium formate buffer containing acetonitrile. Gradient: from 3 to 50 % acetonitrile at a flow rate 1.0 ml/min over 60 min. Each peak was identified by comigration with an authentic sample (100 μM conc.).

5.2.4 ^{cna}A 含有二重鎖 DNA の CD 測定による構造確認

^{cna}A 含有 DNA 1 を市販の相補鎖 DNA 3: [5'-GCGTTA N ATTGCG-3' (N = T, C, G, A, Abasic site)]とハイブリダイズさせ、二重鎖を形成させ、天然の二重鎖と同様に B 型 DNA を形成するかどうかを CD 測定により確認を行なった。測定条件は 2.5 μM ODN, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1 M 塩化ナトリウム存在下で行なった。また、比較のために天然の配列で測定を行なった結果も示す (Fig. 5-8)。



DNA 1: 5'-CGCAAT X TAACGC-3' (X = ^{cna}A or A)

DNA 3: 3'-GCGTTA N ATTGCG-5' (N = T, C, G, A, Abasic site)

Figure 5-8. CD spectra of DNA 1 (X = A) hybridized with ODN 2 (N = T) (black line), and of ODN 1 (X = ^{cna}A) hybridized with DNA 3 (N = T, C, G, A, Ab); 2.5 μ M ODNs, 50 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.0, r.t.

CD スペクトル測定の結果、DNA 1 (X = ^{cna}A)は相補鎖である DNA 3 と二重鎖 DNA を形成すると相手塩基（塩基欠乏も含む）に関わらず、280 nm 付近に正のコットン効果、250 nm 付近に負のコットン効果が観測されたことから、典型的な B 型構造であることが確認できた。

5.2.5 ^{cna}A 含有 ODN の塩基対形成能および塩基認識能評価

次に、塩基対形成能評価を行うために二重鎖融解温度(T_m)の測定を行なった。さらに、UV・蛍光スペクトルの測定を行うことで、遺伝子検出能プローブとしての評価を行なった。測定条件は CD 測定時の同様の 2.5 μ M ODN, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1 M 塩化ナトリウム存在下で行なった。

また、^{cna}A 含有 ss DNA 2 を市販の相補鎖 DNA 4: [5'-GCGTTT N ATTGCG-3' (N = T, C, G, A, Abasic site)]とハイブリダイズさせ、2.5 μ M ODN, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1 M 塩化ナトリウム存在下で行なった。また、 T_m 測定に関しては比較のために天然の配列で測定を行なった結果も示す (Table 5-4)。

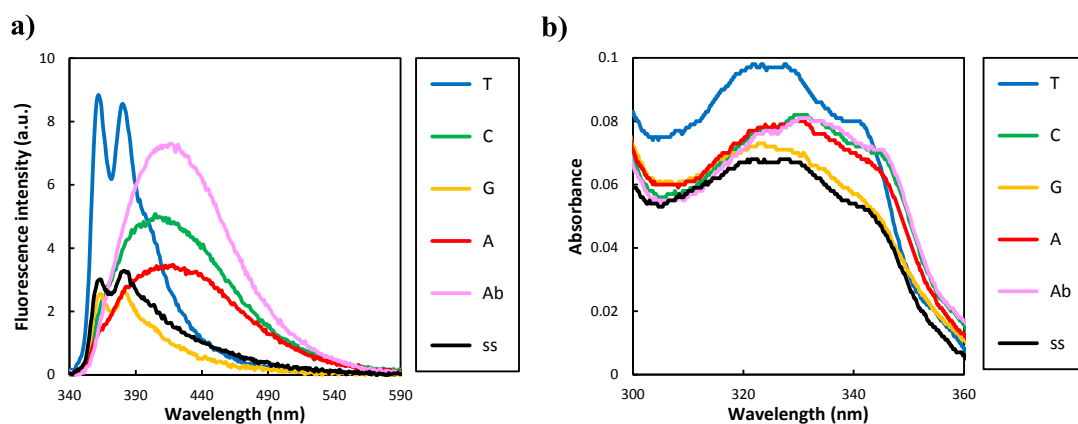
Table 5-4. Spectroscopic data and melting temperature (T_m) of oligonucleotides

| duplexes | $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm) | $\lambda_{\max}^{\text{fl}}$ (nm) | T_m (°C) |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|------------|
| DNA 1 (^{cna} A) / DNA 3 (T) | 322, 328 | 362, 381 | 50.8 |
| DNA 1 (^{cna} A) / DNA 3 (C) | 331 | 405 | 43.7 |
| DNA 1 (^{cna} A) / DNA 3 (G) | 323 | 362, 381 | 44.7 |
| DNA 1 (^{cna} A) / DNA 3 (A) | 330 | 409 | 42.1 |
| DNA 1 (^{cna} A) / DNA 3 (Ab) | 331 | 417 | 45.1 |
| DNA 1 (^{cna} A) | 323, 326 | 362, 381 | - |
| DNA 1 (A) / DNA 3 (T) | - | - | 52.6 |
| DNA 2 (^{cna} A) / DNA 4 (T) | 325, 341 | 362, 381 | 51.2 |
| DNA 2 (^{cna} A) / DNA 4 (C) | 329, 344 | 414 | 44.2 |
| DNA 2 (^{cna} A) / DNA 4 (G) | 328, 345 | 366 | 46.4 |
| DNA 2 (^{cna} A) / DNA 4 (A) | 330, 343 | 441 | 41.0 |
| DNA 2 (^{cna} A) / DNA 4 (Ab) | 331, 344 | 427 | 44.3 |
| DNA 2 (^{cna} A) | 327, 341 | 395 | - |
| DNA 2 (A) / DNA 4 (T) | - | - | 54.9 |

*Ab = Abasic site

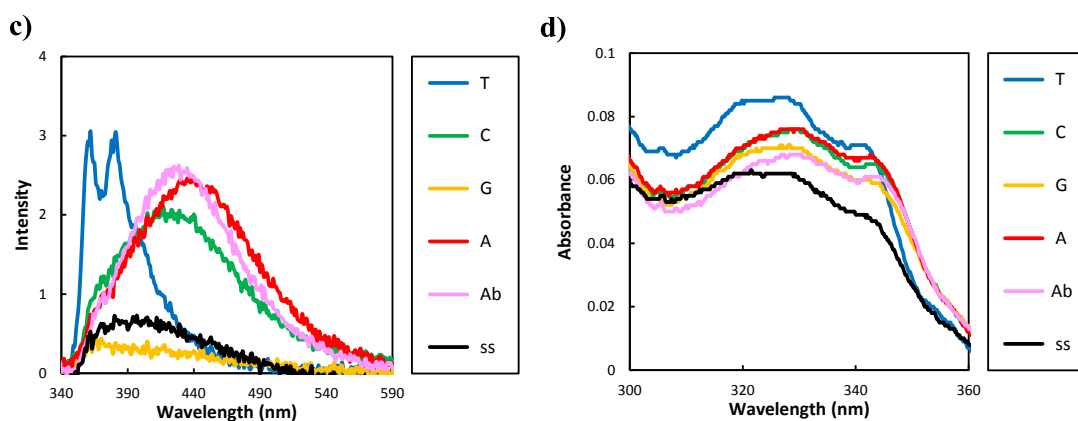
Table 5-4 に示す通り、DNA 1 ($X = \text{cnaA}$) / DNA 3 (T) 二重鎖はミスマッチ塩基対に比べて、高い融解温度(T_m)を示した (50.8°C)。天然配列である DNA 1(A) / DNA 3(T) と比較しても、-1.8°C の減少が見られたが、ほぼ同等の熱安定性を示した。また、**Fig. 5-8** の CD スペクトルの測定結果からも B 型 DNA 構造をとっており、^{cna}A はチミン塩基とのみワトソン-クリック型の塩基対を形成していると言える。さらに、DNA 2 ($X = \text{cnaA}$) / DNA 4 (T) でもほぼ同様の結果を得ることができた。3 章で述べた 7-デアザアデノシン誘導体である ^{cnz}A や ^{atz}A はチミンだけでなくシトシンとも塩基対を形成することが明らかになったが、本章の 8-デアザ-7-デアザアデニン骨格を有する ^{cna}A は、7-デアザアデニン骨格を持つ誘導体に比べて、よりチミン塩基識別能に優れていることが分かった。

続いて、DNA 1 および DNA 2 の UV・蛍光スペクトル測定結果を **Fig. 5-9** に示す。



DNA 1: 5'-d(CGCAAT ^{cna}A TAACGC)-3'

DNA 3: 3'-d(GCGTTA N ATTGCG)-5' (N = T, C, G, A, Abasic site)



DNA 2: 5'-d(CGCAAT ^{cna}A AAACGC)-3'

DNA 4: 3'-d(GCGTTA N TTTGCG)-5' (N = T, C, G, A, Abasic site)

Figure 5-9. (a) Fluorescence and (b) UV absorption spectra of DNA 1 (X = ^{cna}A) hybridized with DNA 3 (N = T, C, G, A, Ab). (c) Fluorescence and (d) UV absorption spectra of DNA 2 (X = ^{cna}A) hybridized with DNA 4 (N = T, C, G, A, Ab). "Ab" denotes abasic site and "ss" denotes a single-strand DNA 1 or DNA 2 (2.5 μ M duplex, 0.1 M sodium chloride, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, rt).

まず、**Fig. 5-9a** に示す通り、DNA 1 ($X = \text{cnaA}$) は相補鎖である DNA 3 が存在しない一本鎖のみの場合では、比較的弱い蛍光発光であるのに対して、相補鎖 DNA 3 と二重鎖を形成すると、蛍光発光の増大が観測された。その中でも特に相手塩基が存在しないアペーシクサイト DNA 3(Ab) の場合に蛍光波長が長波長シフトし (417 nm)、さらに最も高い蛍光強度を示した。また、相手塩基がミスマッチとなるアデニン DNA 3(A) およびシトシン DNA 3(C) が存在する場合でも、蛍光発光のレッドシフトが観測された (それぞれ 409 nm、405 nm)。しかしながら、相補鎖としてミスマッチであるグアニン DNA 3(G) の場合では、グアニン塩基による蛍光消光が起きたことにより、蛍光強度の著しい減少が見られた。一方、フルマッチとなるチミン DNA 3(T) が存在すると、ミスマッチ二重鎖に比べて、最大蛍光波長が 362 nm と 380 nm の鋭い蛍光挙動を伴うブルーシフトが得られた。フルマッチ二重鎖を形成すると、つまり、チミンと水素結合を形成すると、8-アザ-7-デアザアデニンの 7 位に修飾した 6-エチニル-2-ナフトニトリル部位が二重鎖のメジャーグループにツイストした構造で位置することで、 π 共役が分断された LE 発光であると考えられる。それに対して、向かい側がミスマッチ塩基や塩基部位が欠損したアペーシクサイトの場合では、ナフトニトリル部位が二重鎖の中に 8-アザ-7-デアザアデニンと共平面構造を保持したまま位置することで ICT 性の蛍光発光になったと考えられる。**Fig. 5-9b** に示す通り、フルマッチ構造ではミスマッチ構造に比べて、極大吸収波長がブルーシフトしていることから基底状態における構造が双方で異なっていることを示す結果となっている。さらに、DNA 2 ($X = \text{cnaA}$) でもフルマッチ二重鎖 DNA 4 (T) の場合にのみ短波長領域での蛍光挙動が観測され、同様の結果を得ることができた(**Fig. 5-9c, 5-9d**)。このように、 cnaA 含有オリゴヌクレオチドは相手塩基の違いに伴う微細な構造変化を蛍光発光の変化で識別できるプローブとして有用である結果となった。

5.2.6 cnaA 含有オリゴヌクレオチドを利用した RNA 検出プローブとしての評価

cnaA 含有オリゴヌクレオチドはフルマッチ構造となるようなターゲットとなる遺伝子配列を検出できるプローブとして利用できることが明らかになった。そこで、ターゲットを RNA にした場合でも同様の結果を得ることができるかどうか検討を行なった。 cnaA 含有 ssDNA 1 を市販の相補鎖 RNA 1: [5'-GCGUUA N AUUGCG-3' (N = U, C, G, A)] とハイブリダイズさせ、DNA-RNA 混成二重鎖を形成させ、CD・ T_m ・UV・蛍光スペクトルの測定を行なった。測定条件は DNA1/DNA 3 と同様の 2.5 μM ODN, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1 M 塩化ナトリウム存在下で行なった。測定結果を **Table 5-5, Fig. 5-10, 5-11** に示す。

Table 5-5. Spectroscopic data and thermal melting temperature (T_m) of oligonucleotides (DNA/RNA)

| Duplex | $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm) | $\lambda_{\max}^{\text{fl}}$ (nm) | T_m ($^{\circ}\text{C}$) |
|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| DNA 1 (^{cna} A) / RNA 1 (U) | 328 | 362, 382 | 40.6 |
| DNA 1 (^{cna} A) / RNA 1 (C) | 328 | 362, 382 | 34.0 |
| DNA 1 (^{cna} A) / RNA 1 (G) | 325 | 362, 382 | 35.4 |
| DNA 1 (^{cna} A) / RNA 1 (A) | 328 | 393 | 34.9 |
| DNA 1 (A) / RNA 1 (U) | - | - | 44.8 |

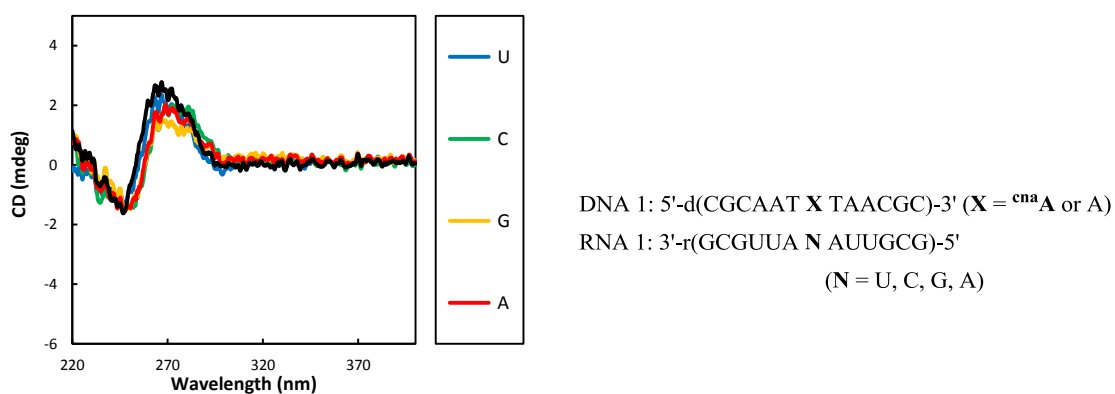


Figure 5-10. CD spectra of DNA 1 (X = ^{cna}A) hybridized with RNA 1 (N = U, C, G, A). black line: DNA 1 (X = A) / RNA 1 (N = U) (2.5 μM ODNs, 50 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.0, r.t.).

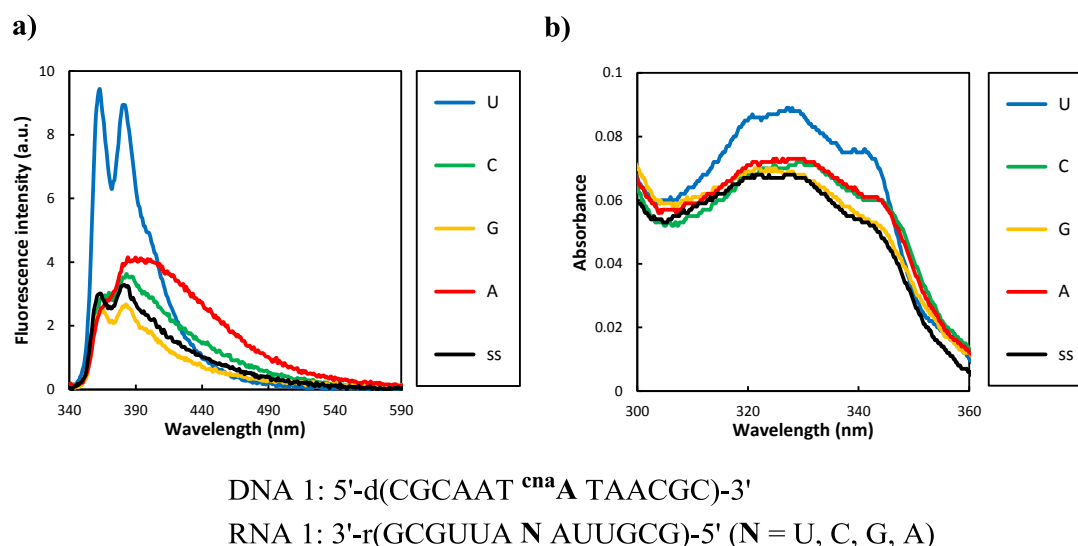


Figure 5-11. (a) Fluorescence and (b) UV absorption spectra of DNA 1 (X = ^{cna}A) hybridized with RNA 1 (N = U, C, G, A) (2.5 μM duplex, 0.1 M sodium chloride, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, r.t.).

CD スペクトル測定の結果、DNA 1 ($X = \text{cnaA}$)は相補鎖となる RNA と混成二重らせん構造を形成しても、相手塩基 (塩基欠乏も含む) に関わらず、280 nm 付近に正のピーク、250 nm 付近に負のピークが見られたことから、典型的な B 型構造とほぼ同様の結果が得られた。従って、B 型に限りなく近い構造であることが確認できた (Fig. 5-10)。

T_m 測定の結果、相補鎖の RNA 1 (U) の場合にのみミスマッチ塩基配列に比べて、高い値を示したことから、DNA のチミンにあたるウラシルと安定な塩基対を形成することが確認できた。さらに、蛍光スペクトルを測定すると、ミスマッチ構造の場合では、ターゲットが DNA の場合に比べて、最大蛍光波長の大きなレッドシフトは観測されなかったが、RNA 1(U)の存在する場合は、DNA 3 (T)とほぼ同様の波長領域で強い鋭い蛍光挙動を示した (Fig. 5-11)。従って、 cnaA 含有オリゴヌクレオチドは RNA をターゲットとしても機能することが出来ることが可能であることが判明した。

5.3 結論

本章では、前章に引き続き、プリン塩基の 7 位に蛍光色素などの置換基を修飾しても DNA 中で塩基対を形成することが可能とされる 8-アザ-7-デアザプリン骨格を有する環境感応型蛍光核酸の開発を目指した。分子設計として、分子内ドナー・アクセプター構造を有することで ICT 発光、さらに、塩基-蛍光色素間で分子回転が抑制されることにより、LE 発光を引き起こす二重蛍光を示すような環境感応型プリンヌクレオシド cnaA の開発に成功した。さらに、 cnaA 含有オリゴデオキシヌクレオチドは、7-デアザアデノシン誘導体で見られたようなシトシン塩基との水素結合能を形成することはなく、マッチであるチミン塩基とのみ安定なワトソン-クリック型の水素結合することが分かった。さらに LE 発光と ICT 発光の二重蛍光を利用することで、より明確にマッチ構造を検出することが可能であった。このような蛍光特性を利用して、蛋白質や細胞内の局所的な粘度環境の変化を蛍光発光の違いで認識するプローブとしても応用できる可能性を見出すことができた。

5.4 実験項

General: $^1\text{H-NMR}$ spectra (400 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (100 MHz) were measured with Bruker Avance 400F spectrometer. Coupling constants (J values) are reported in hertz. The chemical shifts are shown in ppm downfield from tetramethylsilane, using residual dimethyl sulfoxide (δ 2.50 in $^1\text{H-NMR}$, δ 39.5 in $^{13}\text{C-NMR}$), chloroform (δ 7.26 in $^1\text{H-NMR}$, δ 77.0 in $^{13}\text{C-NMR}$) and methanol (δ 3.31 in $^1\text{H-NMR}$, δ 49.0 in $^{13}\text{C-NMR}$) as an internal standard. ESI-TOF masses were recorded on a JMS-T100LC “AccuTOF”, Applied DATUM Solution Business Operations.

The reagents for DNA synthesis were purchased from Glen Research. Mass spectra of oligodeoxynucleotides were determined with a MALDI-TOF mass (Shimadzu AXIMA-LNR, positive mode) with 2',3',4'-trihydroxyacetophenone as a matrix. Calf intestinal alkaline phosphatase (Promega), *Crotalus adamanteus* venom phosphodiesterase I (USB), and *Penicillium citrinum* nuclease P1 (Roche) were used for the enzymatic digestion of ODNs. All aqueous solutions utilized purified water (Millipore, Milli-Q sp UF). Reversed-phase HPLC was performed on CHEMCOBOND 5-ODS-H columns (10×150 mm, 4.6×150 mm) with a JASCO Chromatograph, Model PU-2080, using a UV detector, Model UV-2075 plus at 260 nm.

Procedure for the synthesis of modified nucleosides

4-Amino-1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3-iodo-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (2: 7-iodo-8-aza-7-deaza-2'-deoxyadenosine) was prepared from allopurinol according to literature methods by 6 step reactions.⁹⁻¹³⁾

4-Amino-3-[2-(6-cyano-2-naphthyl)ethynyl]-1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (1). A mixture of **2** (211 mg, 0.56 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (32.3 mg, 0.03 mmol), CuI (10.7 mg, 0.06 mmol) and 6-ethynyl-2-naphthonitrile (119 mg, 0.67 mmol) in DMF (8 ml) and Et_3N (1 ml) was stirred at 60 °C at under an argon atmosphere for 1 h. After allowing to cool to room temperature, the reaction solution was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography with chloroform-methanol mixture (15 : 1 to 10 : 1) to give **1** as a pale-yellow solid (183 mg, 77 %); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 2.30 (ddd, $J = 4.3, 6.8, 13.3$ Hz, 1H), 2.84 (m, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 3.84 (m, 1H), 4.47 (m, 1H), 4.83 (m, 1H), 5.34 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 6.61 (m, 1H), 6.95 (br, 1H), 7.88 (dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz, 1H), 7.98 (dd, $J = 1.5, 8.5$ Hz, 1H), 8.14-8.18 (complex, 3H), 8.30 (s, 1H), 8.54 (m, 1H), 8.65 (m, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) δ 37.9, 62.3, 70.9, 82.7, 84.2, 87.8, 93.0, 100.9, 109.6, 119.0, 121.8, 126.3, 127.4, 128.8, 129.4, 129.9, 131.6, 132.3, 133.8, 134.2, 153.9, 156.8, 157.7; HRMS (ESI) m/z 449.1338 calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_3\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, found 449.1343.

3-[2-(6-Cyano-2-naphthyl)ethynyl]-1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-4-[(*N,N*-dimethylamino)methylidene]amino}-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (3). A solution of **1** (99.0 mg, 0.23 mmol) in DMF (5 ml) was stirred with *N,N*-dimethylformamide diethyl acetal (48 μ l, 0.28 mmol) at 60 °C for 1 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was purified by silica gel column chromatography with chloroform-methanol mixture (20 : 1) to give **3** as a pale-yellow solid (98.8 mg, 88 %); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.49 (ddd, *J* = 2.1, 6.3, 13.6 Hz, 1H), 3.04 (ddd, *J* = 5.6, 8.0, 13.6 Hz, 1H), 3.24 (s, 3H), 3.26 (s, 3H), 3.82 (m, 1H), 4.01 (m, 1H), 4.24 (m, 1H), 4.86 (m, 1H), 5.52 (m, 1H), 6.78 (dd, *J* = 6.3, 8.0 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 1.5, 8.5 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J* = 1.4, 8.5 Hz, 1H), 7.87-7.90 (complex, 2H), 8.16 (m, 1H), 8.23 (m, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.92 (s, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 35.3, 40.8, 41.4, 63.5, 73.2, 84.0, 89.1, 89.3, 92.1, 109.8, 110.3, 118.9, 123.4, 127.3, 128.6, 128.7, 129.0, 129.9, 131.7, 131.8, 133.9, 134.1, 153.8, 155.8, 157.7, 163.0; HRMS (ESI) *m/z* 504.1760 calcd for C₂₆H₂₃N₇O₃Na [M + Na]⁺, found 504.1787.

3-[2-(6-Cyano-2-naphthyl)ethynyl]-1-[2-deoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrithyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-4-[(*N,N*-dimethylamino)methylidene]amino}-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (4). To a solution of **3** (69.5 mg, 0.14 mmol) in anhydrous pyridine (5 ml) was added 4,4'-dimethoxytrityl chloride (58.7 mg, 0.17 mmol), and the stirring continued at room temperature for 2 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The purification by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH-Et₃N mixture (98 : 1 : 1) yields **4** as a pale-yellow solid (81.8 mg, 72 %); ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 2.45 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 3.16-3.27 (complex, 8H), 3.61 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 4.09 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 6.69 (m, 4H), 6.78 (dd, *J* = 4.5, 6.9 Hz, 1H), 7.07 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.25 (m, 4H), 7.39 (m, 2H), 7.67-7.69 (complex, 2H), 7.93-7.98 (complex, 2H), 8.08 (m, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.77 (s, 1H); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 35.6, 39.4, 41.5, 55.6, 55.6, 65.6, 72.9, 85.4, 86.1, 87.3, 87.8, 93.1, 110.2, 111.4, 113.9 (\times 4), 119.8, 124.6, 127.6, 128.4, 128.6 (\times 2), 129.4 (\times 2), 130.0, 130.3 (\times 2), 130.9, 131.0 (\times 2), 131.4 (\times 2), 132.8, 133.3, 135.1, 135.6, 137.3, 137.7, 146.6, 156.0, 157.1, 159.3, 159.8, 159.9, 164.5; HRMS (ESI) *m/z* 806.3067 calcd for C₄₇H₄₁N₇O₅Na [M + Na]⁺, found 806.3075.

3-[2-(6-Cyano-2-naphthyl)ethynyl]-1-[2-deoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrithyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-4-[(dimethylamino)methylidene]amino}-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine

3'-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite] (5). To a solution of **4** (56.7 mg, 0.07 mmol) in anhydrous acetonitrile (2 ml) was added 2-cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidite (100 μ l) in the presence of Et₃N (1 ml), and stirred at room temperature under an argon atmosphere for 30

min. After completion of the reaction, the solution was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO₃ and brine. The combined organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was incorporated into oligonucleotides without further purification.

Oligodeoxynucleotide synthesis and characterization: Oligodeoxynucleotide (ODN) sequences were synthesized by a conventional phosphoramidite method by using an Applied Biosystems 3400 DNA/RNA synthesizer. ODNs were purified by reverse phase HPLC on a 5-ODS-H column (10 × 150 nm, elution with 50 mM ammonium formate (AF) buffer, pH 7.0, linear gradient over 45 min from 3 % to 20 % acetonitrile at a flow rate 2.0 ml/min). ODNs containing modified nucleotides were fully digested with calf intestine alkaline phosphatase (50 U/ml), and P1 nuclease (50 U/ml) at 37 °C for 12 h. Digested solutions were analyzed by HPLC on a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (4.6 × 150 nm, elution with a solvent mixture of 50 mM AF buffer, pH 7.0, flow rate 1.0 ml/min). The concentration of ODNs was determined by comparing peak areas with a standard solution containing dA, dG, dC, and dT at a concentration of 0.1 mM. Mass spectra of ODNs purified by HPLC were determined with a MALDI-TOF mass spectrometer.

UV absorption measurements: Absorption spectra were obtained using a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer at room temperature using 1 cm length cell.

Fluorescence spectra: The fluorescence spectra were obtained with a Shimadzu RF-5300PC spectrofluorophotometer at 25 °C using a cell with a 1 cm path length. The excitation and emission bandwidths were 1.5 nm.

Melting temperature (T_m) measurements: All T_m s of the ODNs (2.5 μM, final concentration) were measured in 50 mM sodium phosphate buffers (pH 7.0) containing 100 mM sodium chloride. Absorbance vs temperature profiles were measured at 260 nm using a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer equipped with a Peltier temperature controller using 1 cm path length cell. The absorbance of the samples was monitored at 260 nm from 4 to 90 °C with a heating rate of 1 °C/min. From these profiles, first derivatives were calculated to determine T_m values.

Circular dichroism (CD) measurements: CD spectra were recorded with a JASCO J-805 CD spectrophotometer. CD spectra of oligonucleotides solutions (2.5 μM ODNs in 50 mM sodium phosphate buffers (pH 7.0) containing 100 mM sodium chloride at 20 °C) were measured using 2 mm path length cell.

参考文献

- 1) A. Siemiarzuk, Z.R. Grabowski, A. Krówczynski, M. Asher, M. Ottolenghi, *Chem. Phys. Letters*, 1977, **51**, 315.
- 2) Z.R. Grabowski, K. Rotkiewicz, A. Siemiarzuk, *J. Luminescence*, 1979, **18/19**, 420.
- 3) K. Tominaga, G.C. Walker, W. Jarzeba, P.F. Barbara, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 10475.
- 4) K. Tominaga, G.C. Waler, T.J. Kang, P.F. Barbara, T. Fonseca, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 10485.
- 5) I. Azumaya, H. Kagechika, Y. Fujiwara, M. Itoh, K. Yamaguchi, K. Shudo, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 2833.
- 6) Y. Oka, S. Nakamura, T. Morozumi, H. Nakamura, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 4814.
- 7) A. Okamoto, K. Tainaka, K.-I. Nishiza, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 13128.
- 8) D. Dziuba, V.Y. Postupalenko, M. Spadafora, A.S. Klymchenko, V. Guérineau, Y. Mély, R. Benhida, A. Burger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 10209.
- 9) F. Seela, M. Zulauf, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1998, 3233.
- 10) F. Seela, M. Zulauf, M. Sauer, M. Deimel, *Helv. Chim. Acta*, 2000, **83**, 910.
- 11) F. Seela, M. Zulauf, H. Debelak, *Helv. Chim. Acta*, 2000, **83**, 1437.
- 12) R.K. Robins, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 6407.
- 13) F. Seela, H. Steker, *Helv. Chim. Acta*, 1985, **68**, 563.
- 14) K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.*, 1975, **16**, 2267.
- 15) J. V. Morris, M. A. Mahaney, J. R. Huber, *J. Phys. Chem.*, 1976, **80**, 969.
- 16) S.L. Murov, I. Carmichael, G.L. Hug, *Handbook of Photochemistry Second Edition, Revised and Expanded*.

第 6 章

総括

極性、粘性、pH などの環境変化に応じて蛍光強度や蛍光波長が劇的に変化するようなセンサー機能を有する環境感応型蛍光(ESF: Environmentally Sensitive Fluorescent)核酸は、標的となる DNA や RNA の検出のみならず、SNP タイピングのような一塩基変異の検出、塩基欠損などの微細な構造変化やタンパク質との相互作用部位における局所的環境変化を蛍光発光色の変化で調べるためのプローブとして応用が期待されている。以上の背景から、本研究では、分子内電荷移動 (ICT) 発光を利用した環境感応型蛍光プリンヌクレオシドのデザインと合成を行い、蛍光 DNA プローブへ展開し、それらの機能評価を行った。その研究成果を以下に総括する。

第 2 章では、天然塩基であるアデニンの 8 位に様々な置換基を有するナフタレン分子を三重結合で共役させた 2'-デオキシアデノシン誘導体を合成し、それらの光学特性および遺伝子検出能の評価を行った。各誘導体を極性の異なる様々な溶媒中で蛍光測定を行った結果、ナフタレンの置換基が電子吸引性 (アクセプター) であるシアノ基、電子供与性 (ドナー) である *N,N*-ジメチルアミノ基のどちらの置換基であっても、ソルバトフルオロクロミックな蛍光特性を示すことが明らかとなった。これは、シアノ基を有する場合には、アデニンがドナーとして働く一方で、*N,N*-ジメチルアミノ基を有する場合には、アデニンがアクセプターとして働くことで、分子内電荷移動 (ICT: Intramolecular Charge Transfer) 発光が有効に機能したためであると考えられる。また、置換基の配向が異なっても同様の性質を示すことや、無置換ナフタレンの場合ではソルバトフルオロクロミックな性質を示さなかったことは、置換基が起因していることを支持するものであった。

さらに、ソルバトフルオロクロミックな性質の一つである極性の低い環境下で強い蛍光を示す特徴を利用して、標的 DNA とのハイブリダイズにより、ヌクレオシドが一つとびだしたバルジ構造となるようにプローブ DNA をデザインした。その結果、修飾核酸塩基周辺に意図的に疎水的な空間と環境が構築されることで、蛍光強度の増加で相補鎖 (ターゲット配列) を検出することが可能であった。さらに、シアノ基を有する誘導体では、グアニン塩基からの光誘起電子移動 (PET: Photo-induced Electron Transfer) による蛍光消光が観測された一方で、*N,N*-ジメチルアミノ基を有する誘導体では、近傍のグアニン塩基による蛍光消光を受けないことが明らかとなった。このように、グアニン塩基による蛍光消光を受けない現象は、標的 DNA を選択する際に、様々な塩基配列に適用可能であることから遺伝子検出能の優れたプローブであることを示している。

第 3 章では、7-デアザアデニンの 7 位に様々なアリールエチニル基を連結させた 7-デアザ 2'-デオキシアデノシン誘導体およびオリゴ DNA 鎖を合成し、光学特性や核酸塩基認識能の評価を行った。第 2 章で機能評価を行ったナフタレン分子を含む 2'-デオキシアデノシン誘導体は優れた光学特性を示したが、DNA 二重鎖の融解温度 (T_m) 測定の結果、二重らせん構造を大きく不安定化してしまうことが明らかになっている。また、プリン塩基の 8 位

に置換基を導入すると、糖と塩基とのグリコシド結合が通常の *anti* 配座から *syn* 配座へと反転し、相補鎖の相手塩基との水素結合形成能がないのも理由の一つであると考えられる。そこで、DNA を構成する天然プリンヌクレオシドであるアデノシン及びグアノシンと同様な水素結合パターンを持つ 7-デアザプリンヌクレオシドに着目した。7-デアザプリンは *anti* 配座が保持される 7 位に化学修飾が可能であると同時に、その修飾基は、大きな空間が空いている DNA 二重らせん構造のメジャーグループに位置することから、二重らせん構造の不安定化は見られないと予想した。前章の結果も考慮しながら、分子デザインを行い、様々なアリールエチニル基を有する 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体の合成を行った。各誘導体を様々な溶媒中に溶解させ、蛍光測定を行った結果、ナフタレンの環外置換基として、電子吸引基であるシアノ基やアセチル基を含む 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体は、ソルバトフルオロクロミックな性質を示す一方で、電子供与基である *N,N*-ジメチルアミノ基や置換基を持たない誘導体では、そのような性質を示さないことが明らかとなった。この結果は、7-デアザアデニンの酸化電位がアデニンよりも低く、さらにグアニンと同等の値を示すことに起因している。すなわち、7-デアザアデニンは電子供与能が高いために、電子吸引基と分子内で共役することで、ドナー・アクセプター型の分子内電荷移動 (ICT) 発光が発現される理想的な構造となっているのに対して、*N,N*-ジメチルアミノ基では分子内電荷移動が発現されにくい構造になっているためと考えられる。

ソルバトフルオロクロミックな蛍光特性を示した 7-デアザ-2'-デオキシアデノシン含有プローブ DNA は、標的 DNA とのハイブリダイズにより、修飾核酸塩基の相手塩基の一塩基変異を蛍光波長のシフトで識別することが確認できた。しかしながら、水素結合形成による完全な塩基選択性がなかったことは、課題として残るが、塩基対形成を可能にしたことによって、核酸構造の微細な構造変化を蛍光波長の変化で識別することができたことから、さらに優れた遺伝子検出用プローブを開発できる可能性を見出した。

第 4 章では、8-アザ-7-デアザグアニンを骨格にもつ新しい環境感応型蛍光核酸の開発について述べている。第 3 章では、プリン塩基の 8 位修飾による DNA 二重鎖の不安定化を改善するために、7-デアザアデノシンの 7 位に蛍光色素を導入することを試みた。その結果、DNA 二重鎖の不安定化（融解温度の低下）が見られず、塩基対形成能を持つことが可能であることを示している。しかしながら、7-デアザアデノシンおよび 7-位置換 7-デアザアデノシンは DNA 二重鎖中でマッチすると考えられるチミン塩基のみならず、シトシン塩基とも水素結合を形成することがわかり、塩基対形成識別能の点で不十分であった。そこで、7 位に修飾することが可能な 7-デアザアデノシンに代わり、同様に 7 位に修飾可能なグアノシン誘導体にすれば、マッチであるシトシン塩基とのみ安定な塩基対形成と併用して、環境感応型の蛍光特性を示すような誘導体を開発することができると考えた。本章では、8-アザ-7-デアザグアニンの 7 位に 2-エチニルナフタレンを連結することで簡単にソルバトフルオロクロミックな蛍光特性を示したことから、オリゴ DNA 鎖へ導入し、核酸塩基認識能

の評価を行った。標的 DNA とのハイブリダイズ後の二重鎖の融解温度 (T_m) および CD 測定を行った結果、B 型に限りなく近い構造である二重らせん構造をとり、シトシン塩基のみ安定なワトソン-クリック塩基対を形成していることが明らかになった。さらに蛍光測定をすると、ミスマッチ塩基に比べて、マッチであるシトシン塩基の場合のみ、およそ 30 nm もの長波長シフトを伴って蛍光発光することが確認できた。すなわち、標的 DNA のシトシン塩基を蛍光波長の変化で識別することが可能であり、この蛍光特性を利用して、bcr/abl 遺伝子を同様に検出することに成功した。このように、DNA 配列の一塩基の違いを水素結合形成と蛍光波長変化で識別できる環境応答型蛍光核酸塩基の開発に初めて成功した。

第 5 章では、DNA 二重鎖のフルマッチとミスマッチ構造を短い波長の LE (Local Excited) 発光と長い波長の ICT 発光で識別できるプローブの開発について述べている。これまでの章では、従来のものに比べて長波長領域で蛍光検出するために、ドナーとアクセプターを共存することで、ICT 状態由来の蛍光が発現するような分子デザインを行っていた。本章では、6-エチニル-2-ナフトニトリルを蛍光分子として修飾した 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体が、分子内ドナー・アクセプター構造を有することで ICT 発光、さらに、粘性の高い環境下では、塩基-蛍光色素間で分子回転が抑制されることにより、ICT 発光に代わり、2-ナフトニトリル由来の LE 発光が発現するといった二重蛍光を示すことを明らかにしている。さらに、この環境応答型蛍光核酸をオリゴ DNA 鎖へ導入し、標的 DNA とのハイブリダイズ後の核酸塩基認識能の評価を行ったところ、二重鎖融解温度 (T_m) 測定によって、チミン塩基とのみ安定なワトソン-クリック型の水素結合を形成することが示された。このことは、シトシン塩基とも安定な塩基対を形成する 7-デアザアデニン骨格をもつ誘導体に比べて、塩基認識能が優れていることと言える。さらに、蛍光測定を行うと、相手塩基がマッチであるチミンの場合のみに、ミスマッチ塩基に比べて、最大蛍光波長のブルーシフトと蛍光挙動の変化が確認された。この現象は 8-アザ-7-デアザアデニンの 7 位に修飾した 6-エチニル-2-ナフトニトリル部位が二重鎖のメジャーグループにねじれた構造で安定化されることによって新たに現れた LE 発光であると考えられる。つまり、チミン塩基と水素結合を形成することによって観測された特異的な現象であり、RNA を構成するウラシル塩基をターゲットにしても同様の結果を得ることができている。従って、このような蛍光特性を利用して、すなわち、LE 発光と ICT 発光の二重蛍光性を利用することで、より明確にマッチ構造を検出することが可能であり、タンパク質や細胞内の局所的な粘度環境の変化を認識するプローブとしても応用できる可能性を示唆している。

最後に、本論文を通して、これまでに合成した各誘導体およびその光学特性や遺伝子検出プローブとしての性能を評価した結果、以下の結論に至った。

核酸構造の微細な構造変化や環境変化を蛍光発光の違いで識別するような環境感応型蛍光核酸塩基を開発するためには、核酸塩基に芳香族発色団を共役させ、芳香族化合物の環外置換基を変えることにより、分子内電荷移動状態(ICT)を創出させることが有効な手段であると同時に、第 4 章では、8-アザ-7-デアザグアノシン誘導体が、シトシン塩基を蛍光波長のレッドシフトにより、第 5 章では、8-アザ-7-デアザアデノシン誘導体が、チミン塩基を蛍光波長のブルーシフトにより、明瞭に識別することが可能であることから、水素結合認識による塩基識別が重要な役割を果たしていると考えている。本研究の成果である、相補鎖のマッチ塩基の時のみ安定なワトソン-クリック塩基対を形成し、さらに塩基対形成によって、蛍光発光波長が劇的に変化する現象は、世界で初めての例であり、これまでの研究者によって開発もしくは報告された様々な蛍光核酸塩基誘導体に比べて格段に優れた環境感応型蛍光核酸塩基であることを示している。しかしながら、8-アザ-7-デアザプリン骨格を有する環境感応型蛍光核酸塩基は、最大蛍光波長が短いことや近傍にグアニン塩基が存在すると著しい蛍光消光が起きてしまうといった課題は残っている。そこで、今後の展望としては、長波長領域での発光や周辺の環境変化で消光されにくい分子デザインが必要であるために、周辺の極性や粘性環境に応じて蛍光発光が変化するのはもちろんのこと、例えば、シス-トランス異性化、プロトン互変異性化、pH 変化に応じた構造変化などを活用することができれば、より優れた環境感応型蛍光核酸塩基の開発が実現することができると考えている。

本論文の成果が、有用な知見となって、今後、新たな環境感応型蛍光核酸塩基の開発や DNA プローブの設計に利用されることを期待したい。

謝 辞

本研究の学位論文をまとめるにあたり、多くのご指導とご支援を賜りました、指導教官である、日本大学工学部生命応用化学科、根本修克教授に深く感謝します。

本研究を行うにあたり、的確なご指導と助言、素晴らしい研究環境を提供して下さいました日本大学工学部生命応用化学科、齋藤義雄准教授に深く感謝します。今後におきましても、ご指導、ご鞭撻を賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。

大学学部生、大学院の修士課程時代の私の指導教員であり、博士課程の今に至るまで、多大なるご指導と研究環境や研究会・雑誌会でのディスカッションなど多くのアドバイスを頂いた日本大学工学部上席研究員、齋藤烈教授に大変感謝します。

また、根本修克教授、齋藤義雄教授、齋藤烈教授には、博士課程の進学へのサポートおよび研究全般にわたるご指導だけでなく、日頃より教育ならびに人生の先輩として研究以外の面でも様々なご支援を賜りました事に対し、深く御礼申し上げます。

本研究を学位論文としてまとめるにあたり、副査として、懇切なご指導とご鞭撻を賜りました日本大学工学部生命応用化学科、加藤隆二教授、ならびに京都大学大学院工学研究科、田邊一仁准教授に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数多くの助言を頂きました日本大学工学部生命応用化学科、奥山克彦教授、CD測定装置を貸して頂きました日本大学工学部生命応用化学科、春木満教授、研究室のPC環境の改善、ならびに分子シミュレーション解析ソフト「SYBYL」の技術指導をしてくださった、日本大学工学部生命応用化学科、山岸賢司助教に感謝致します。

本研究で合成した数々の化合物の、NMR測定ならびに解析等のご協力を賜りました日本大学工学部次世代工学技術研究センターの常磐聡子さん、菅島奈美さん、吉田久美子さん、木村友美さんに感謝致します。

学会発表の際の出張など、長きに渡り、私の研究生生活を快適に行えるように、様々な支援をして頂いた研究室の秘書である鈴木玲子さんに感謝致します。

数々のご協力を頂いた当研究グループであるナノバイオ研究室の先輩後輩各位に感謝致します。

最後に、私が会社を辞め、博士課程に進学することに対して、暖かく見守り、そして研究生生活を経済的、精神的に支えてくださった両親に深い感謝の意を表して、謝辞と致します。

2014年4月1日 鈴木 梓

本論文を構成する査読論文

- 1) Azusa Suzuki, Nobukatsu Nemoto, Isao Saito, and Yoshio Saito, “Design of an environmentally sensitive fluorescent 8-aza-7-deaza-2'-deoxyadenosine derivative with dual fluorescence for the specific detection of thymine”, *Organic & Biomolecular Chemistry*, Vol.12, No.4, Oct.2013, pp.660-669.
- 2) Yoshio Saito, Azusa Suzuki, Yuji Okada, Yuki Yamasaka, Nobukatsu Nemoto, and Isao Saito, “An environmentally sensitive fluorescent purine nucleoside that changes emission wavelength upon hybridization”, *Chemical Communications*, Vol.49, No.50, May.2013, pp.5684-5686.
- 3) Azusa Suzuki, Kohki Kimura, Shinya Ishioroshi, Isao Saito, Nobukatsu Nemoto, and Yoshio Saito, “Synthesis of solvatofluorochromic 7-arylethynylated 7-deaza-2'-deoxyadenosine derivatives: application to the design of environmentally sensitive fluorescent probes forming stable DNA duplexes”, *Tetrahedron Letters*, Vol.54, No.19, May.2013, pp.2348-2352.
- 4) Azusa Suzuki, Naoya Takahashi, Yuji Okada, Isao Saito, Nobukatsu Nemoto, and Yoshio Saito, “Naphthalene-based environmentally sensitive fluorescent 8-substituted 2'-deoxyadenosines: Application to DNA detection”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol.23, No.3, Feb.2013, pp.886-892.
- 5) Yoshio Saito, Azusa Suzuki, Shinya Ishioroshi, and Isao Saito, “Synthesis and photophysical properties of novel push-pull-type solvatochromic 7-deaza-2'-deoxypurine nucleosides”, *Tetrahedron Letters*, Vol.52, No.37, Sep.2011, pp.4726-4729.
- 6) Yoshio Saito, Azusa Suzuki, Kazutoshi Imai, Nobukatsu Nemoto, and Isao Saito, “Synthesis of novel push-pull-type solvatochromic 2'-deoxyguanosine derivatives with longer wavelength emission”, *Tetrahedron Letters*, Vol.51, No.19, May.2010, pp.2606-2609.