ナフタレンを有する蛍光性ヌクレオシドおよびそれらを含むオリゴヌクレオチドライブラリー の合成と性質

東邦大学 渡邊 総一郎

派遣期間 2002年8月1日~2004年2月26日

研究機関 Department of Chemistry, Stanford University, Stanford, California, 94305 USA

研究指導者 Prof. Eric T. Kool

Kool らは核酸塩基部分を蛍光性の化合物に置き換えたヌクレオシド(以下フルオロシドと呼ぶ)を合成し、その性質について研究している。¹⁾これまでの結果から、同種あるいは異種のフルオロシドのオリゴマー(オリゴヌクレオチド)はそれを構成するモノマーとは違った物理化学的性質を持つことが示されている。例えば同じ波長で励起した場合、いくつかのオリゴマーはそれを構成するモノマーより長い波長の蛍光を発することが分かっている。また、モノマーの配列を変えると蛍光波長も変化する。これらの性質は従来の蛍光色素にない利点がある。たとえば、細胞を複数の色素で染色する場合、従来法では各色素に対して異なった励起波長を使う必要があるが、フルオロシドオリゴマーを用いれば、一つの励起波長で多数の蛍光を発する一連の化合物を用いることが可能となる。

この興味深い現象の原因は、接近した蛍光団の相互作用(エネルギー移動、エキシプレック ス形成など)によるものと考えられるが、その機構の詳細は分かっていない。そこで、有用な 蛍光特性を持つオリゴマーの配列を見い出すためには、コンビナトリアルな方法が有効となる。 これまでの検討から、Terphenyl を有するフルオロシドのオリゴマーは大きなストークスシフト を持ち、蛍光の量子収率もよいなどの利点があることが分かった。本研究では、この類縁物質 として、それ自体が蛍光を持つナフタレンを有する Binaphthyl および Ternaphthyl nucleoside を 合成し、それらの性質を検討することを目的とした。

Fig. 1 に Binaphthyl nucleoside 1 および Ternaphthyl nucleoside 2 の合成経路を示す。文献 ²に従 い 3,5 位を保護したラクトン4を合成し、これと 6-Bromonaphthyllithium を反応させ、引き続き 還元することでシリル保護した Bromonaphthyl nucleoside 5 を得た。5 は α , β アノマーの混合物と して得られたが、カラムクロマトグラフィーによって分離精製することができた。NOE の測定 により、主生成物は β アノマーであることが分かり、これを次の反応に用いた。テトラブチル アンモニウムフルオリドを用い脱保護し 6 を得た後、Suzuki coupling 反応により目的とする Binaphthyl nucleoside 1 および Ternaphthyl nucleoside 2 を得た。

<Fig. 1> (横幅 14 cm)

DNA 合成機を用いたオリゴマー合成のためのユニットとして、1 および 2 のホスホロアミダ イトの合成について検討した。常法により 1 および 2 の 5'-DMT 誘導体の合成を試みたが、原 料の各種溶媒への溶解度の低さから、目的物の収率は低く実用的ではなかった。そこで Bromonaphthyl nucleoside 6 を原料とした合成を行った(Fig. 2)。まず 6 の 5'-DMT 誘導体 7 を 合成し、Suzuki coupling 反応により蛍光団を構築した後、ホスホロアミダイト 9a, 9b を合成し た。

<Fig. 2> (横幅 14 cm)

得られたホスホロアミダイトを用いてオリゴヌクレオチドの合成を行った。DNA 合成機による固相合成でホスホロアミダイト 9a, 9b がオリゴヌクレオチドに効率良く取り込まれるかを確かめるために、三量体 TXT(X=1, 2)の合成を行った。収率は良好で、いずれの化合物もマススペクトルで分子イオンピークを与えた。また TXT(X=1)の粗精製物の NMR スペクトルからも、その構造を確認した。以上の結果から、ホスホロアミダイト 9a, 9b は DNA 合成機を用いた固相合成により、効率良くオリゴヌクレオチドに取り込まれることが分かった。

フルオロシドオリゴマーの性質を調べるために、1 および 2 の二量体と三量体の合成を行った。目的物の溶解度向上のため、各種 spacer nucleoside を用い合成と HPLC による単離を試みた。Binaphthyl nucleoside 1 の場合 $X_nS_n^3$ (n=2, 3)の合成・単離に成功し、得られた精製物はマススペクトルで分子イオンピークを与えた。ここで、X=1, S³=-P(=O)(OH)OCH₂CH₂CH₂O である。 2 についても種々検討を行い、 $X_nS_{2n}^3$ (n=2, 3)の合成・単離を行ったが、マススペクトルによる構造の確認には至っていない。

Table 1 に Binaphthyl nucleoside 1 および Ternaphthyl nucleoside 2 の吸収スペクトルと蛍光スペ クトルのデータを示す。1 および 2 は糖を含まないナフタレン誘導体とほぼ同じ性質を示した。 また、Table 2 に 1 およびその二量体 $(X_2S_2^3)$ 、三量体 $(X_3S_3^3)$ の吸収スペクトル、蛍光スペ クトル、量子収率のデータを示す。二量体 $(X_2S_2^3)$ 、三量体 $(X_3S_3^3)$ では、1 に比べ 30~40 nm ほど長波長側にシフトしていることが分かった。これは同数の Terphenyl nucleoside のオリゴマ ーのシフト (3, 11 nm) に比べても大きく、1 が本研究の目的を満たす化合物であることが示さ れた。量子収率はユニットの数が増えるに従い低下したが、その低下の割合は大きなものでは なく、実用性に耐えうるものと考えられる。

<Table 1> (横幅 14 cm)

<Table 2> (横幅 14 cm)

Fig. 3 に 1 およびその二量体 (X₂S³₂)、三量体 (X₃S³₃)の励起スペクトルと蛍光スペクトル を示す。励起スペクトルはそれぞれの化合物の吸収スペクトルとほぼ同じで、また、どの化合 物もほぼ同じ形をしていた。これは、基低状態では全ての化合物の蛍光団の電子状態が同じで あることを示している。一方、蛍光スペクトルにおいて二量体、三量体は 1 に比べ長波長側に 発光極大を持ち、またスペクトルの構造も失われている。これは、二量体と三量体は励起状態 においてエキシプレックスを形成していることを示唆している。有機溶媒中でスペクトルの測 定を行うとスペクトルの大きな変化は見られないことから、エキシプレックスは水中でのみ形 成されることが分かった。2 についても HPLC で精製を行った化合物についてスペクトルの測 定を行い、1 と類似した長波長シフトを観測したが、合成・単離の方法や構造決定をさらに検 討する必要がある。

<Fig. 3>(横幅 14 cm)

フルオロシドの相互作用による蛍光特性の変化を調べるために、DNA 合成機を用いて四量体 オリゴヌクレオチドライブラリーの作成を行った。単体にはモノマーとして、今回合成した 1 と 2、これまでに合成されている 8種のフルオロシド、Spacer nucleoside の 11 個を用い、Split and pool 法によりコンビナトリアル合成を行った。フルオロシドの配列は Still tag によってコード 化し、GCMS を用いてその配列を読み取った。このライブラリーは 11⁴ (=14641)個の四量体を 含んでいる。このライブラリーは紫、青、緑、黄、橙色と多彩な蛍光を有することが分かった。 この中には、モノマーユニットの中で最長の蛍光波長を持つ Oxoperylene (λ_{em} =470 nm)よりも長 い波長の蛍光を発するものが多数含まれていた。それぞれの色を持つビーズを蛍光顕微鏡下で 採取し、それぞれの配列を調べた。長波長の蛍光を発する配列の多くは Pyrene や Perylene など を多く含んでおり、エキシプレックス形成が重要であるように思われる。

フルオロシドの配列に依存して生ずる相互作用によって各種の色が得られることから、同じ 配列でも分子間相互作用による摂動によって色の変化が引き起こされる可能性があると考えら れる。このことはフルオロシドオリゴマーが共存する小分子を認識して、色彩や蛍光強度の変 化によって応答するセンサーとして働く可能性を示唆している。これについて検討するために、 ビーズ上に作成したライブラリーを小分子を含む緩衝液に浸し、その前後の蛍光の変化につい て調べた。小分子として、芳香族間の相互作用が期待され、生体分子として重要な芳香族アミ ノ酸とその誘導体を選んだ。ビーズをペトリ皿上に貼付けた両面テープ上に固定し、種々の濃 度の小分子の溶液に浸した後顕微鏡で蛍光像を撮影し、これらを比較することによってその蛍 光の変化を調べた。変化としては主に蛍光強度の減少が観測され、それはビーズ(=配列)に よって異なっていた。センサーとしての機能が期待されたが、液相での確認実験等から蛍光強 度の減少の主な原因は光退色であることが分かった。センサーとしての機能は、現在のシステ ムでは評価するのが難しいと思われる。

フルオロシドオリゴマーの配列によって光退色の速度が大きく異なることは興味深い。今後、 光退色速度の異なる配列を調べ、それぞれのモノマーのオリゴマー中における役割を検討する とともに、市販の蛍光色素より光退色しにくいオリゴマーを見い出すことなどが課題となる。

(参考文献)

1 Jianmin Gao, Christoph Strassler, Deborah Tahmassebi, and Eric Kool J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 11590-11591.

2 Uthai Wichai and Stephen A. Woski Org. lett. 1999, 1, 1173-1175.



Fig. 1. Synthesis of binaphthyl and ternaphthyl nucleosides. Conditions: (a) 1) Br_2/H_2O , 2) $Cl(iPr)_2SiOSi(iPr)_2Cl$, Imidazole/DMF; (b) 1) 6-Bromo-2-naphthyllithium/THF, 2) Et_3SiH , BF_3Et_2O/CH_2Cl_2 ; (c) Tetrabutylammonium fluoride/THF; (d) $RB(OH)_2$, $Pd(PPh_3)_4$, $NaOH/THF-MeOH-H_2O$, reflux.



Fig. 2. Synthesis of phosphoroamidetes 9. Conditions: (a) DMTCl, DIPEA/Py; (b) $RB(OH)_2$, $Pd(PPh_3)_4$, $NaOH/THF-MeOH-H_2O$, reflux; (c) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite, $DIPEA/CH_2Cl_2$.

_	UV/vis		_	Emission				
	λ_{max} (nm)	$\epsilon (M^{-1}cm^{-1})$	Solvent		λ_{em} (nm)	Solvent		
Binaphthyl	255	77,000	methanol		355, 373	methanol		
nucleoside (1)	306	17,000			(ex 306 nm)			
Ternaphthyl	267 (264)	88,000	DMF		371, 388	methanol		
Nucleoside (2)	332 (325)	39,000	(methanol)		(ex 325 nm)			
Pyrene	342	47,000	methanol		375, 394	methanol		
nucleoside ¹⁾					(ex 323 nm)			
Naphthlene ^{2,3)}	221	133,000	ethanol		330, 343	cyclohexane		
	276	9,300			(ex 295 nm)			
Binaphthyl ^{3,4)}	254	98,000	ethanol		342, 362	cyclohexane		
	306	17,000			(ex 320 nm)			
Ternaphthyl ⁴⁾	266	107,000	dioxane					
	330	43,000	benzene					

Table1. Photophysical data of new fluorosides 1 and 2.

1) J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 11590-11591., 2) Spectrometric identification of organic compounds, Fourth Edition, Silverstein, John Wiley & Sons, Inc. 1981., 3) Anal. Chem. 1960, 32, 1436-1442., 4) Chem. Ber. 1957, 90, 2888-2893.

Table 2. Photophysical properties of binaphthyl nucleoside 1 and X_nS_n .

compounds	binaphthyl	X_2S_2	X_3S_3	binaphthyl ¹⁾
	nucleoside (1)			
λ_{max} (nm)	255, 306	254, 308	253, 308	254, 306 [*]
λ_{ex} (nm)	256, 306	256, 309	256, 309	
	(em 373 nm)	(em 409 nm)	(em 414 nm)	
$\lambda_{em} (nm)$	355, 375	405	412	342, 362#
	(ex 310 nm)	(ex 310 nm)	(ex 310 nm)	(ex 320 nm)
Φ	0.57	0.37	0.21	0.53**
				*ethanol
solvent	methanol	water	water	[#] cyclohexane
				**methanol

1) Anal. Chem. 1960, 32, 1436-1442., Chem. Ber. 1957, 90, 2888-2893., JCS, Faraday Trans. 2, 1989, 85, 65-74.



Fig. 3. Excitation and emission spectra of a binaphthyl nucleoside 1, dimer X_2S_2 , and trimer X_3S_3 .