

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5360647号
(P5360647)

(45) 発行日 平成25年12月4日(2013.12.4)

(24) 登録日 平成25年9月13日(2013.9.13)

(51) Int.Cl.

F I

| | | | |
|--------------------------------|---------|-------|-------|
| C 1 2 Q 1/04 (2006.01) | C 1 2 Q | 1/04 | Z N A |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q | 1/68 | A |
| G O 1 N 21/64 (2006.01) | G O 1 N | 21/64 | F |
| G O 1 N 33/58 (2006.01) | G O 1 N | 33/58 | A |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N | 15/00 | A |

請求項の数 9 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-550172 (P2008-550172)
 (86) (22) 出願日 平成19年12月19日(2007.12.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2007/074424
 (87) 国際公開番号 W02008/075718
 (87) 国際公開日 平成20年6月26日(2008.6.26)
 審査請求日 平成22年12月17日(2010.12.17)
 (31) 優先権主張番号 特願2006-341245 (P2006-341245)
 (32) 優先日 平成18年12月19日(2006.12.19)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-239235 (P2007-239235)
 (32) 優先日 平成19年9月14日(2007.9.14)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 503359821
 独立行政法人理化学研究所
 埼玉県和光市広沢2番1号
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 阿部 洋
 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人
 理化学研究所内
 (72) 発明者 伊藤 嘉浩
 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人
 理化学研究所内
 (72) 発明者 王 瑾
 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人
 理化学研究所内

最終頁に続く

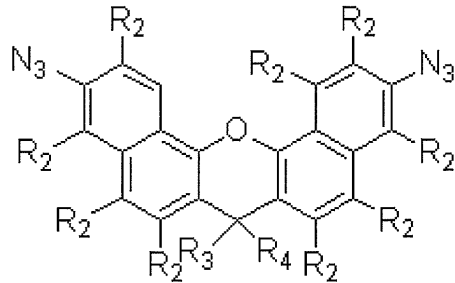
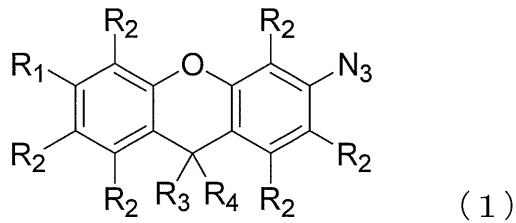
(54) 【発明の名称】 蛍光発生分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

還元剤と組み合わせて使用される、下記式(1)又は(2)で示される化合物を含む、生体関連物質を検出するための標識試薬。

【化1】



10

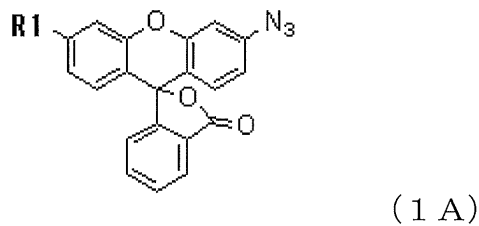
(式中、 R_1 は炭素数 1 から 6 のアルキル基、アミノ基、保護基若しくは置換基を有していてもよいアミド基、ハロゲン原子、又は水素原子を示し、 R_2 はそれぞれ独立に炭素数 1 から 6 のアルキル基、ハロゲン原子、又は水素原子を示し、 R_3 は炭素数 1 から 6 のアルキル基、アリール基、又は水素原子を示し、 R_4 は酸素原子を含む基または水素原子を示し、 R_3 と R_4 は結合して環を形成していてもよい。)

20

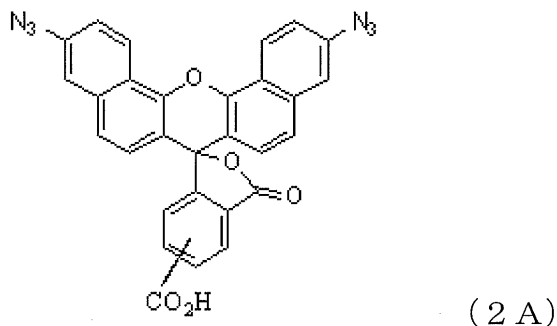
【請求項 2】

還元剤と組み合わせて使用される、下記式 (1A) 又は (2A) で示される化合物を含む、生体関連物質を検出するための標識試薬。

【化 2】



30



40

(式中、 R_1 は、アミノ基、又は保護基若しくは置換基を有していてもよいアミド基を示す。)

【請求項 3】

核酸の標識のために用いる、請求項 1 又は 2 に記載の試薬。

【請求項 4】

標的核酸配列の一部の領域と相補的な核酸配列を有する第一の核酸プローブであって、請求項 1 から 3 の何れか 1 項に記載の試薬で標識した上記の第一の核酸プローブと、標的核酸配列の別の一部の領域と相補的な核酸配列を有する第二の核酸プローブであって、還元

50

作用を有する分子で標識した上記の第二の核酸プローブとを、標的核酸配列にハイブリダイズさせる工程、及び第一の核酸プローブ中の上記試薬のアジド基がアミノ基に還元させることにより生成する蛍光を検出する工程を含む、インビトロでの標的核酸配列の検出方法。

【請求項 5】

標的核酸配列が RNA である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

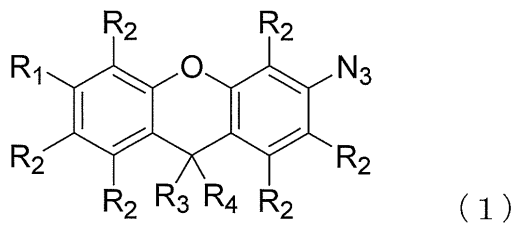
標的核酸配列の一塩基多型を検出する、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 7】

下記式 (1) 又は (2) で示される化合物あるいは下記式 (1A) 又は (2A) で示される化合物を用いて生体分子を標識し、該化合物に光を照射してアジド基をアミノ基に還元させることにより生成する蛍光を検出することを含む、インビトロでの生体分子の分析方法。

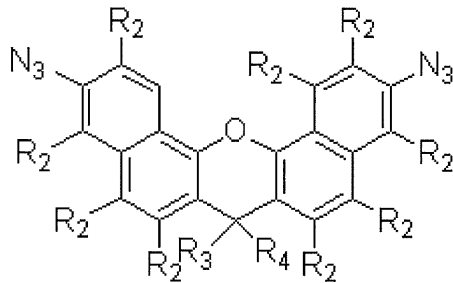
10

【化 3】

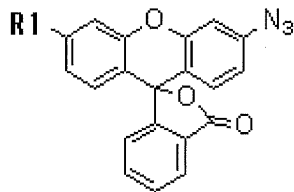


(1)

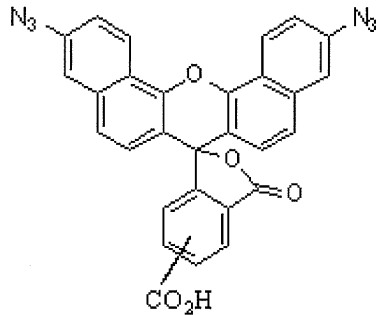
20



【化4】



(1A)



(2A)

(式中、R1は、アミノ基、又は保護基若しくは置換基を有していてもよいアミド基を示す。)

【請求項8】

式(1)又は(2)で示される化合物あるいは式(1A)又は(2A)で示される化合物を用いて細胞内の生体分子を標識する、請求項7に記載のインビトロでの生体分子の分析方法。

【請求項9】

式(1)又は(2)で示される化合物あるいは式(1A)又は(2A)で示される化合物を用いて細胞内の生体分子を標識し、該化合物に光を照射してアジド基をアミノ基に還元させることにより生成する蛍光をフローサイトメトリーで検出する、請求項7又は8に記載のインビトロでの生体分子の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸などの生体関連物質を検出するための標識試薬として有用な蛍光発生分子に関する。より詳細には、本発明は、アジド基を有する無蛍光性分子であって、該アジド基がアミノ基に還元されると蛍光を発生することを特徴とする分子に関する。さらに本発明は、上記の蛍光発生分子を含む標識試薬、及び上記の蛍光発生分子を用いた標的核酸配列の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

特定の標的核酸配列を有する核酸分子を検出するための方法としては、その標的核酸配列に相補的な塩基配列を有するプローブを用いるハイブリダイゼーション法が広く使用されている。ハイブリダイゼーション法では、標的核酸配列に相補的な塩基配列を有するプローブを用意し、そのプローブの塩基配列と相補的な塩基配列を持つ試料のみが高い選択性でハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションの結果として形成されるハイブリッド体を検出するための手段としては、プローブ核酸をラジオアイソトープで標識する方法、蛍光物質で標識する方法、発光試薬を利用する方法などが挙げられる。核酸の標識に使用することができる蛍光物質としては、フルオレセイン、テトラメチルローダミン、Cy3、Cy5等が挙げられるが、これらの蛍光物質で標識した蛍光核酸プローブは、バックグラウンド蛍光シグナルが高く、高感度測定が困難であった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

本発明は、上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、安定性が高く（即ち、長期間において活性である）、かつ高感度であり、微量の遺伝子シグナルを増幅し、観察することを可能とする、遺伝子解析用の蛍光on/off型蛍光化合物（蛍光発生分子システム）を提供することを解決すべき課題とした。さらに、本発明は、上記の蛍光on/off型蛍光化合物を用いた生体関連物質を検出するための標識試薬を提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

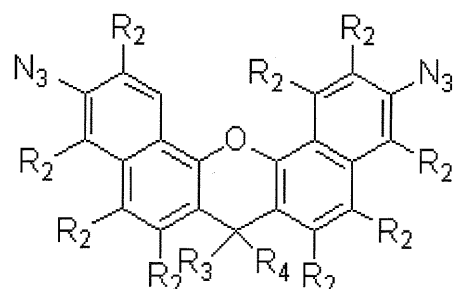
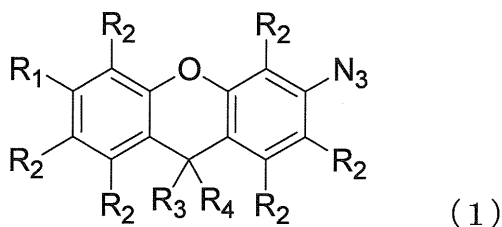
【 0 0 0 4 】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、ローダミン骨格などの蛍光物質骨格を有し、かつ分子内にアジド基を有する無蛍光性分子であって、該アジド基がアミノ基に還元されると蛍光を発生することを特徴とする分子を合成することに成功した。さらに、上記の無蛍光性分子で標識した第一の核酸プローブと、還元作用を有する分子で標識した第二の核酸プローブとを、標的核酸配列にハイブリダイズさせることによって、第一の核酸プローブ中の無蛍光性分子のアジド基をアミノ基に還元し、これにより生成する蛍光を検出することによって標的核酸配列を検出できることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

【 0 0 0 5 】

即ち、本発明によれば、下記式（1）又は（2）で示される化合物が提供される。

【化1】



(2)

（式中、R₁は炭素数1から6のアルキル基、アミノ基、保護基若しくは置換基を有していてもよいアミド基、ハロゲン原子、又は水素原子を示し、R₂はそれぞれ独立に炭素数1から6のアルキル基、ハロゲン原子、又は水素原子を示し、R₃は炭素数1から6のアルキル基、アリール基、又は水素原子を示し、R₄は酸素原子を含む基または水素原子を示し、R₃とR₄は結合して環を形成していてもよい。）

【 0 0 0 6 】

好ましくは、本発明によれば、下記式（1A）又は（2A）で示される化合物が提供される。

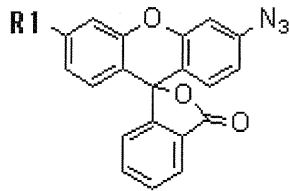
10

20

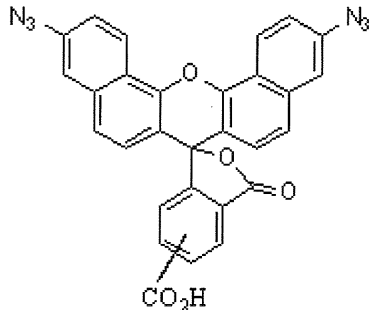
30

40

【化2】



(1A)



(2A)

(式中、R1は、アミノ基、又は保護基若しくは置換基を有していてもよいアミド基を示す。)

【0007】

本発明によればさらに、上記した本発明の化合物を含む、生体関連物質を検出するための標識試薬が提供される。

本発明の標識試薬は、好ましくは、核酸の標識のために用いるものであり、好ましくは、還元剤と組み合わせて使用されるものである。

【0008】

本発明によればさらに、標的核酸配列の一部の領域と相補的な核酸配列を有する第一の核酸プローブであって、ローダミン骨格、クマリン骨格、エチジウムプロミド由来骨格、アクリジン骨格又はダンシル骨格から選択される骨格を有し、かつ分子内にアジド基を有する無蛍光性分子で標識した上記の第一の核酸プローブと、標的核酸配列の別の一部の領域と相補的な核酸配列を有する第二の核酸プローブであって、還元作用を有する分子で標識した上記の第二の核酸プローブとを、標的核酸配列にハイブリダイズさせる工程、及び第一の核酸プローブ中の無蛍光性分子のアジド基がアミノ基に還元させることにより生成する蛍光を検出する工程を含む、標的核酸配列の検出方法が提供される。

【0009】

好ましくは、上記無蛍光性分子として、ローダミン骨格を有し、かつ分子内にアジド基を有する無蛍光性分子を使用する。

好ましくは、上記無蛍光性分子として、上記した本発明の化合物を用いる。

好ましくは、標的核酸配列はRNAである。

好ましくは、標的核酸配列の一塩基多型を検出する。

【0010】

本発明によればさらに、上記した本発明の化合物を用いて生体分子を標識し、該化合物に光を照射してアジド基をアミノ基に還元させることにより生成する蛍光を検出することを、生体分子の分析方法が提供される。

好ましくは、上記した本発明の化合物を用いて細胞内の生体分子を標識する。

好ましくは、上記した本発明の化合物を用いて細胞内の生体分子を標識し、該化合物に光を照射してアジド基をアミノ基に還元させることにより生成する蛍光をフローサイトメトリーで検出する。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、アジド基の還元反応をトリガーとする蛍光発生分子システムが提供さ

10

20

30

40

50

れる。さらに本発明によれば、この蛍光発生分子システムを応用して、生体関連物質を検出するための標識試薬が提供される。本発明の標識試薬は、標的DNAあるいは、RNA分子に結合して、還元されることにより蛍光を発することができるようになる。本発明の化合物は、高いシグナル・バックグラウンド比を持つため、高感度遺伝子検出が可能になるとともに、細胞内、生体内での遺伝子検出イメージングが可能となる。さらに本発明は、他の試薬や酵素を用いる必要がないため、簡便・安価であり、試験管内のみではなく、細胞内あるいは生体内での遺伝子検出が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

10

本発明で開発した蛍光発生分子システムは、アジド基の還元をトリガーとして、無蛍光性分子の構造変化が起こり蛍光を発する蛍光off/on型センサーシステムとして一般化できる(図1)。本発明の実施例として、蛍光分子ローダミンを化学修飾し、アジド基を導入した分子を合成した(図2)。ローダミン110を、モノBOC化した。つづいて、亜硝酸イソアミルで処理することにより、アミノ基をジアゾ化し、ナトリウムアジドを加えることによりアジド体を得た。さらに、4M塩酸-ジオキサン溶液で処理することにより、BOC基を除去した。最後に、アミノ基をプロモアセチル化することにより、目的物であるローダミンのアジド誘導体(図2の化合物4)を得た。

【0013】

このローダミンのアジド誘導体(図2の化合物4)の蛍光特性を解析した。アジド誘導体(図2の化合物4)は、無蛍光性であった。次に、4をメタノール溶液中、還元剤であるTCEP(リン化合物)(トリス[2-カルボキシエチル]ホスフィン)で処理したところ、アジド基はアミノ基に変換され、高い蛍光性を示した。処理前と比較し、約2000倍蛍光強度が増加した(図3)。本蛍光発生分子システムは、有機リン化合物の検出に有用である。

20

【0014】

さらに、上記で合成した蛍光発生分子システムであるローダミン誘導体(図2の化合物4)を核酸鎖に導入して、遺伝子検出用化学反応プローブを開発した。本発明で開発した2つのDNAプローブ(即ち、第一の核酸プローブと第二の核酸プローブ)は、標的DNAあるいはRNA上に標的配列特異的に結合し、化学反応(還元反応)し、初めて高い強度の蛍光を発する(図4)。

30

【0015】

この蛍光シグナルの有無や強度を指標にすることによって、核酸配列を区別又は検出することができる。本反応は、他の試薬や酵素を必要とせず、プローブを検出サンプルに加えるのみで測定できる。さらに、本検出反応は等温条件下、反応サイクルが回転し、蛍光シグナルを増幅することができる(図5)。そのため、微量サンプルの測定が可能となる。細胞内あるいは、生体内においても、本プローブを用いて遺伝子発現の観測が可能になる。

【0016】

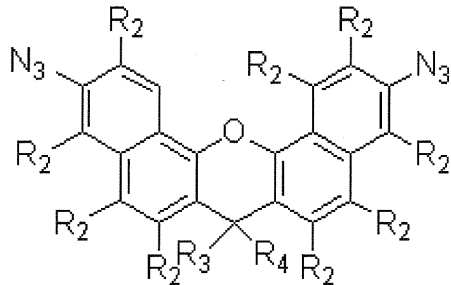
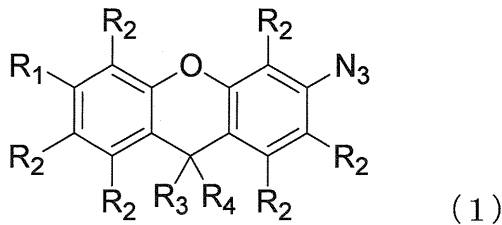
さらに、本明細書の実施例では、本発明のプローブを用いて、ヒトras遺伝子配列の検出実験を行った。標的DNA配列および合成したプローブを図6に示した。標的配列特異的なシグナル発生を確認するため、標的配列が存在しない条件でも蛍光シグナルの経時変化を測定し比較した。その結果、化学反応プローブは、標的配列が存在すると、蛍光シグナルが顕著に増大した。一方、標的配列非存在下では、蛍光シグナルの増加は全く観察されなかった。そのため、本化学反応プローブが標的核酸配列特異的に蛍光シグナルを発生することが明らかとなった(図6)。

40

【0017】

本発明の化合物(蛍光発生分子)は、下記式(1)又は(2)で示される化合物である。

【化3】



10

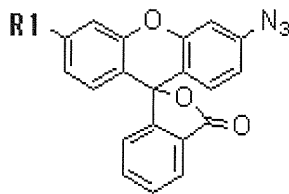
(式中、 R_1 は炭素数1から6のアルキル基、アミノ基、保護基若しくは置換基を有していてもよいアミド基、ハロゲン原子、又は水素原子を示し、 R_2 はそれぞれ独立に炭素数1から6のアルキル基、ハロゲン原子、又は水素原子を示し、 R_3 は炭素数1から6のアルキル基、アリール基、又は水素原子を示し、 R_4 は酸素原子を含む基または水素原子を示し、 R^3 と R^4 は結合して環を形成していてもよい。)

20

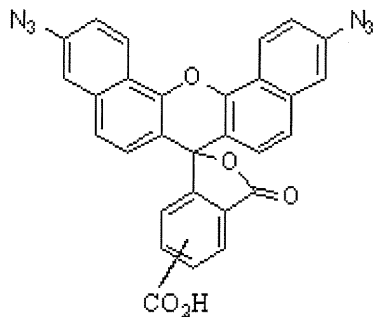
【0018】

好ましくは、本発明の化合物は下記式(1A)又は(2A)で示される化合物である。

【化4】



30



40

(式中、 R_1 は、アミノ基、又は保護基若しくは置換基を有していてもよいアミド基を示す。)

【0019】

本発明において、炭素数1から6のアルキル基としては、直鎖又は分岐鎖の何れでもよく、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、又はヘキシル基を挙げることができる。

【0020】

本発明において、アミド基は、保護基若しくは置換基を有していてもよい。保護基として、*t*-ブトキシカルボニル基などのウレタン系保護基、ベンゾイル基などのアシル系保護

50

基、トリチル基などのアルキル系保護基、ジメチルアセタールなどのイミン系保護基などがあげられる。置換基としては、核酸と反応して結合できる反応性基が好ましく、例えば、ハロゲン原子などを挙げることができる。なお、置換基とアミド基は連結基（例えば、メチレン基などのアルキレン基）を介して結合していてもよい。

【0021】

本発明において、ハロゲン原子のとしては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子を挙げることができる。

本発明において、アリール基としては、フェニル基、又はナフチル基を挙げることができる。

本発明において、酸素原子を含む基としては、 $-O-$ 、又は $-OCO-$ などを挙げることができる。

10

【0022】

本発明によれば、標的核酸配列の一部の領域と相補的な核酸配列を有する第一の核酸プローブであって、ローダミン骨格、クマリン骨格、エチジウムブロミド由来骨格、アクリジン骨格又はダンシル骨格から選択される骨格を有し、かつ分子内にアジド基を有する無蛍光性分子で標識した上記の第一の核酸プローブと、標的核酸配列の別の一部の領域と相補的な核酸配列を有する第二の核酸プローブであって、還元作用を有する分子で標識した上記の第二の核酸プローブとを、標的核酸配列にハイブリダイズさせ、これにより第一の核酸プローブ中の無蛍光性分子のアジド基がアミノ基に還元させ、生成する蛍光を検出することによって標的核酸配列を検出することができる。

20

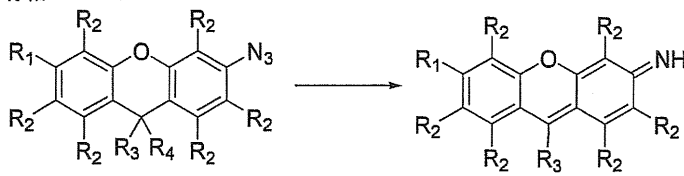
【0023】

ローダミン骨格、クマリン骨格、エチジウムブロミド由来骨格、アクリジン骨格、及びダンシル骨格の具体的構造を以下に示す。

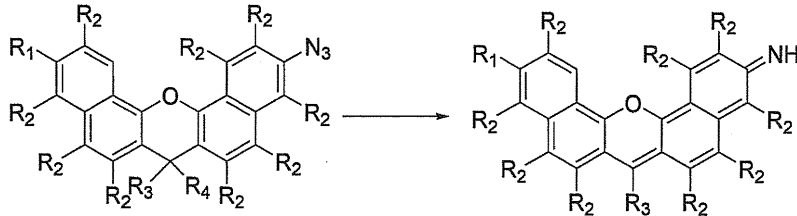
【0024】

【化5】

ローダミン骨格

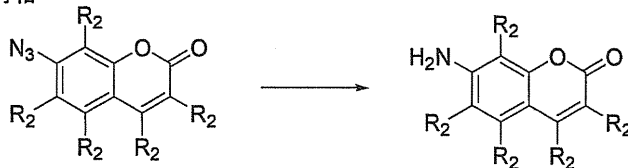
R₁= alkyl, amide, halogen; R₂= alkyl, halogen; R₃=alkyl; R₄=functional group including oxygen

ローダミン骨格

R₁= alkyl, amide, halogen; R₂= alkyl, halogen; R₃= alkyl; R₄= functional group including oxygen

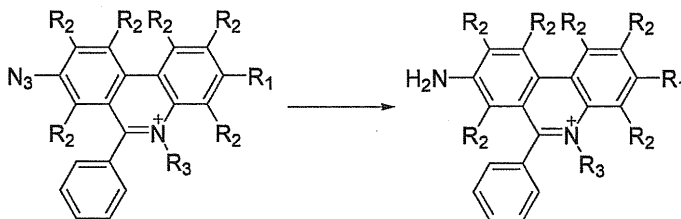
10

クマリン骨格

R₂= alkyl, halogen

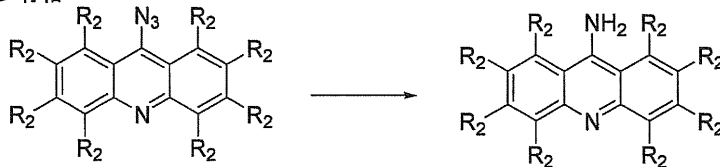
20

エチジウムブロミド由来の骨格

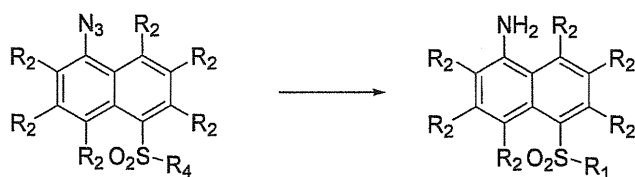
R₁= alkyl, amide, halogen; R₂= alkyl, halogen; R₃= alkyl

30

アクリジン骨格

R₂= alkyl, halogen

ダンシル骨格

R₂= alkyl, halogen; R₄= alkyl, alcohol, amine

40

【0025】

本発明で用いる第一の核酸プローブは、上記した骨格を有し、かつ分子内にアジド基を有する無蛍光性分子で標識されている。

【0026】

本発明で用いる第二の核酸プローブは、還元作用を有する分子で標識されている。本発

50

明で用いることができる還元作用を示す分子として、硫黄化合物や三価のリン化合物などがあげられる。硫黄化合物としては、DTT（ジチオスレイトール）、三価のリン化合物としては、トリフェニルフォスフィン、アルキルフォスフィンなどをあげることができる。

【0027】

本発明において、第一の核酸プローブは、標的核酸配列の一部の領域と相補的な核酸配列を有し、第二の核酸プローブは、標的核酸配列の別の一部の領域と相補的な核酸配列を有する。ここで、第一の核酸プローブと第二の核酸プローブがそれぞれ認識する標的核酸配列の領域は、上記の両プローブが標的核酸配列にハイブリダイズした際に、第一の核酸プローブ中の無蛍光性分子のアジド基が、第二の核酸プローブ中の還元作用を有する分子の作用によりアミノ基に還元されるという条件を満たす限りは、任意に設定することができる。第一の核酸プローブと第二の核酸プローブがそれぞれ認識する標的核酸配列の領域は、上記条件を満たすためには、隣接または近接していることが一般的には好ましい。第一の核酸プローブと第二の核酸プローブがそれぞれ認識する標的核酸配列の領域は、例えば、1から10塩基程度のスペースを介して近接していることが好ましい。

【0028】

式(1)又は(2)、若しくは式(1A)又は(2A)で示される蛍光発生分子を光(例えば、約350nmの紫外光)で照射すると、アジドがアミンに還元され、蛍光を発する。即ち、式(1)又は(2)、若しくは式(1A)又は(2A)で示される化合物は、光照射前は、蛍光はないが、光照射後、490nmの励起波長で観察される蛍光を発する。従って、生体分子に上記の蛍光発生分子を標識した後、特異的に、光を照射することにより、蛍光発生分子を活性化し、光による分子ラベルが可能となる。本現象は、一分子イメージングの実験などに用いることができる。

【0029】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0030】

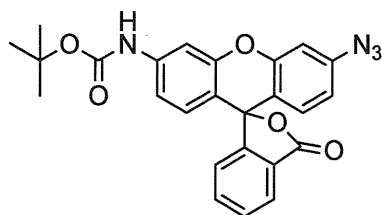
実施例1：ローダミンのアジド誘導体(4)の有機合成

(1) Azido-Rh110-t-Boc (図2の化合物2)の合成

アルゴン雰囲気下、モノBOC化ローダミン(図2の化合物1)(48.0mg, 0.112mmol)をアセトニトリル(8mL)と塩化メチレン(4mL)に溶かした。さらに、0℃下、トリフルオロ酢酸(12.4μl, 0.167mmol)、亜硝酸イソアミル(17.8μl, 0.134mmol)を溶液中加入し攪拌した。0℃下、40分攪拌した後、ナトリウムアジド(15.0mg, 0.223mmol)を加えて室温下30分攪拌した。飽和重曹水を加えて反応停止後、酢酸エチルを加えた。有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することにより、azido-Rh110-t-Boc(図2の化合物2)(36.5mg, 80.0μmol, 71%)を黄色結晶として得た。

【0031】

【化6】



【0032】

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 1.53 (9H, s), 6.61 (1H, brs), 6.68 (1H, d, $J = 3.2\text{Hz}$), 6.71 (1H, d, $J = 3.2\text{Hz}$), 6.77 (1H, d, $J = 8.5\text{Hz}$), 6.87 (1H, dd, $J = 2.2\text{Hz}, 8.8\text{Hz}$), 6.93 (1H, d, $J = 1.9\text{Hz}$), 7.12 (1H, brd, $J = 7.3\text{Hz}$), 7.56 (1H, brs), 7.62 (1H, dt, $J = 1.0\text{Hz}, 7.5\text{Hz}$), 7.66 (1H, dt, $J = 1.2\text{Hz}, 7.6\text{Hz}$)

, 8.02 (1H, brd, J = 7.3Hz)

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3) 28.36, 81.25, 82.19, 105.97, 107.21, 112.87, 114.26, 114.74, 115.59, 123.70, 125.07, 126.22, 128.45, 129.43, 129.78, 135.04, 140.56, 142.37, 151.47, 152.08, 152.95, 169.13

QSTAR (Applied Biosystems/MDS SCIEX) (ESI): $[\text{MH}^+]$ C₂₅H₂₁N₄O₅: 457.1512, found: 457.1509

【 0 0 3 3 】

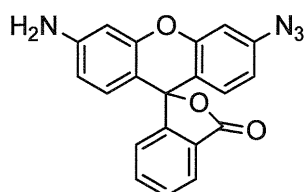
(2) Azido-Rh110 (図 2 の化合物3) の合成

Azido-Rh110-t-Boc (図 2 の化合物2) (30.8mg, 67.5 μmol) を 4 M 塩酸ジオキサン溶液 (3 mL) に溶解し、室温下 2 時間半攪拌した。溶媒を留去し、TLCプレートにより精製することによりAzido-Rh110 (図 2 の化合物3) (23.8mg, 66.8 μmol , 99%) を淡桃色固体として得た。

10

【 0 0 3 4 】

【 化 7 】



20

【 0 0 3 5 】

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) 3.92 (2H, s), 6.36 (1H, dd, J = 2.4Hz, 8.5Hz), 6.52 (1H, d, J = 2.2Hz), 6.55 (1H, d, J = 8.5Hz), 6.67 (1H, dd, J = 2.2Hz, 8.5Hz), 6.74 (1H, d, J = 8.5Hz), 6.92 (1H, d, J = 2.2Hz), 7.16 (1H, d, J = 7.6Hz), 7.61 (1H, dt, J = 1.0Hz, 7.3Hz), 7.66 (1H, dt, J = 1.2Hz, 7.5Hz), 8.01 (1H, d, J = 7.6Hz)

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3) 82.82, 101.15, 106.95, 108.15, 111.67, 114.39, 115.82, 123.63, 124.80, 126.54, 128.93, 129.38, 129.48, 134.73, 142.03, 148.62, 151.97, 152.11, 152.73, 169.06

QSTAR (Applied Biosystems/MDS SCIEX) (ESI): $[\text{MH}^+]$ C₂₀H₁₃N₄O₃: 357.0988, found: 357.0988

30

【 0 0 3 6 】

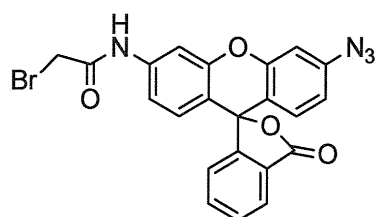
(3) Bromoacetylamido-Rh110-azido (図 2 の化合物4) の合成

Azido-Rh110 (図 2 の化合物3) (17.9mg, 50.2 μmol) をクロロホルム (4 mL) に溶解し、無水炭酸カリウム (138.2mg, 1.0mmol) を加えた。氷零下、プロモアセチルプロマイド (43.7 μl , 0.50mmol) をゆっくりと反応液に加え、反応液を 2 時間室温下攪拌した。その後、飽和重曹水を加えて反応を停止した。水層をクロロホルムで 2 回抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し、目的物であるbromoacetylamido-Rh110-azido (図 2 の化合物4) (22.6mg, 47.4 μmol , 94%) を淡黄色の固体として得た。

40

【 0 0 3 7 】

【 化 8 】



【 0 0 3 8 】

50

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) 4.03 (2H, s), 6.71 (1H, dd, $J = 2.2\text{Hz}$, 8.6Hz), 6.75 (1H, d, $J = 8.5\text{Hz}$), 6.79 (1H, d, $J = 8.6\text{Hz}$), 6.95 (1H, d, $J = 2.2\text{Hz}$), 7.05 (1H, dd, $J = 2.2\text{Hz}$, 8.8Hz), 7.13 (1H, brd, $J = 7.6\text{Hz}$), 7.64 (1H, dt, $J = 1.0\text{Hz}$, 7.6Hz), 7.68 (1H, dt, $J = 1.2\text{Hz}$, 7.6Hz), 7.74 (1H, d, $J = 1.9\text{Hz}$), 8.04 (1H, brd, $J = 6.8\text{Hz}$), 8.33 (1H, brs)

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3) 29.21, 81.89, 107.11, 107.82, 114.86, 115.15, 115.43, 123.57, 125.03, 125.87, 128.38, 129.26, 129.82, 135.12, 138.86, 142.46, 151.09, 151.77, 152.68, 163.60, 169.11

QSTAR (Applied Biosystems/MDS SCIEX) (ESI): $[\text{MH}^+]$ C₂₂H₁₄BrN₄O₄: 477.0198, found: 477.0196

10

【 0 0 3 9 】

実施例 2 : アジド誘導体の蛍光特性の変化

実施例 1 で合成したアジド誘導体 (図 2 の化合物 4) は、無蛍光性であった。次に、この化合物 (図 2 の化合物 4) をメタノール溶液中、還元剤である TCEP (リン化合物) (トリス [2 - カルボキシエチル] ホスフィン) で処理したところ、アジド基はアミノ基に変換され、高い蛍光性を示した。処理前と比較し、約 2 0 0 0 倍蛍光強度が増加していた (図 3) 。

【 0 0 4 0 】

実施例 3 : オリゴヌクレオチドの合成

全てのオリゴヌクレオチドは、0.2 μM スケールのカラムを用いて、一般的なホスホロアミダイト法に基づいて、DNA 自動合成機 (H-8-SE; Gene World) で合成した。塩基の脱保護および CPG 担体からの切り出しは、アンモニア水中で、55 $^\circ\text{C}$ 、4 時間インキュベートすることにより行った。オリゴヌクレオチドの精製は、逆相カラム (MicroPure II; Biosearch Technologies) にて行い、UV absorbance を測定することにより濃度を決定した。

20

【 0 0 4 1 】

(1) 5' Triphenylphosphine-linked DNA の合成

Triphenylphosphine group の付加は、5' amino-modified オリゴと反応させることにより行った。5' amino-modified オリゴの合成には、5' amino-modifier 5 (Glen Research) を用いた。反応は、8 mM の triphenylphosphine NHS ester (in DMF)、50 mM の sodium tetraborate buffer、200 μM の 5' amino-modified オリゴ溶液を含む混合液を、室温で 3 時間激しく攪拌することにより行った (反応液中の DMF 濃度は 46%)。反応産物をエタノール沈殿で回収したのち、逆相 HPLC (グラジエント条件: 0 - 50 % acetonitrile / 50 mM triethylammonium acetate) にて精製を行った。また、ESI-TOF mass spectrometry により目的の産物が得られていることを確認した。

30

5' -TGTGGGCA^{triphenylphosphine}-3': calculated mass, C₁₀₄H₁₂₆N₃₃O₅₁P₉ 2931.6; found 2932.6.

【 0 0 4 2 】

(2) 3' Bromoacetylamido-Rh110-azido-linked DNA の合成

Bromoacetylamido-Rh110-azido (4) の付加は、3' phosphorothioate オリゴと反応させることにより行った。3' phosphorothioate オリゴの合成は、3' -phosphate CPG に始めのモノマーをカップリングしたのち、sulfrizing reagent (Glen research) でホスホロチオエート化することにより行った。反応は、3 mM の Bromoacetylamido-Rh110-azido (in DMF)、80 mM の triethylammonium bicarbonate buffer、300 μM の 3' phosphorothioate オリゴ溶液を含む混合液を、室温で 5 時間激しく攪拌することにより行った (反応液中の DMF 濃度は 80%)。反応産物をエタノール沈殿で回収したのち、逆相 HPLC (グラジエント条件: 0 - 80 % acetonitrile / 50 mM triethylammonium acetate) にて精製を行った。また、ESI-TOF mass spectrometry により目的の産物が得られていることを確認した。

40

5' -GCCGGCGG^{Rh110-azide}-3': calculated mass, C₁₀₄H₁₂₆N₃₃O₅₁P₉ 2942.5; found 2942.5.

【 0 0 4 3 】

50

実施例 4 : DNAテンプレート上での反応および蛍光測定

DNAテンプレート上での反応は、それぞれ500 nMのDNAテンプレート、5' Triphenylphosphine-linked プローブ、3' Bromoacetyl-amido-Rh110-azido-linked プローブをLigation buffer中 (70 mM Tris-base, 70 mM boric acid, 10 mM MgCl₂ 6H₂O; pH 8.0) において、25 °C で反応させることにより行った。用いた配列は以下の通りである。

【 0 0 4 4 】

DNAテンプレート : 5'- GTC AGC GCA CTC TTG CCC ACA CCG CCG GCG CCC ACC ACC AGCTTA TA -3' (配列番号 1)

5' Triphenylphosphine-linked プローブ : 5'- TGT GGG CA -3'

5' Bromoacetyl-amido-Rh110-azido-linked プローブ : 5'- GCC GGC GG -3'

10

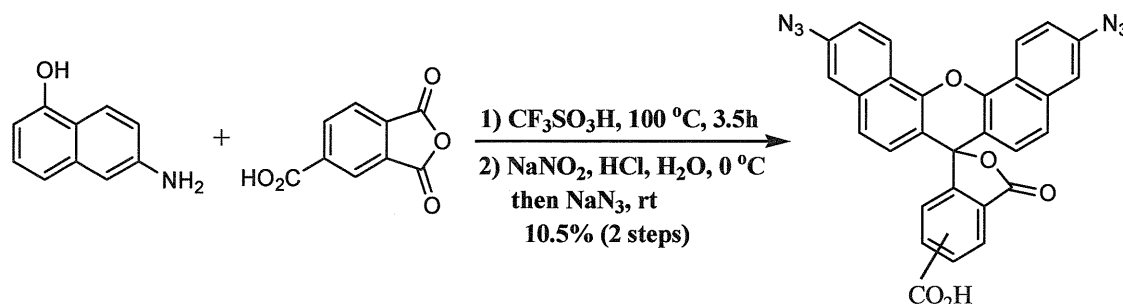
【 0 0 4 5 】

蛍光シグナルは、蛍光分光光度計 (FP-6500; JASCO) を用いて解析した。1分もしくは5分おきに蛍光を測定し、励起波長は490 nm、蛍光波長は550 nmとした。蛍光シグナルの測定結果を図 6 に示す。

【 0 0 4 6 】

実施例 5 :

【 化 9 】



20

【 0 0 4 7 】

6 - アミノ 1 - ナフトール (95.8mg, 0.60mmol)、4 - カルボキシフタル酸無水物 (86.8mg, 0.45mmol) をトリフルオロメタンスルホン酸 (15mL) に溶解し、100 °C で 3 . 5 時間加熱した。その後、反応液を飽和食塩水 / 5 % 硫酸水溶液 (75mL/5ml) に加えて、さらに、その溶液にクロロホルム / メタノール (4 : 1) を加えた。有機層を、飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ により乾燥した。未精製生成物として、カルボン酸に由来する 2 つの位置異性体が得られた。さらに、得られた化合物を水 (5 mL) に溶解し、12 規定塩酸 (1 mL)、及び亜硝酸ナトリウム (92.5mg, 1.34mmol) を 0 °C で加えて、約 1 時間攪拌した。さらに、アジ化ナトリウム (104.5mg, 1.61mmol) を加えて室温下 1 時間攪拌した。その後、反応液にクロロホルムを加えて、有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ により乾燥した。溶媒を留去し、シリカゲルクロマトグラフィ (クロロホルム / メタノール : 7:1) にて精製し、目的物であるビスアジド体 (16.7mg, 31.7 μmol, 2 つの異性体) を黄色結晶として得た。

30

【 0 0 4 8 】

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 6.95-7.12 (2H, m), 7.26-7.37 (2H, m), 7.40-7.53 (3H, m), 7.68-7.80 (2H, m), 8.01-8.21 (2H, m), 8.29-8.32 (1H, m), 8.72-8.80 (1H, m), 12.75 (1H, brs)

QSTAR (Applied Biosystems/MDS SCIEX) (ESI): [MH⁺] C₂₉H₁₄N₆O₅: 527.103, found: 527.117

【 0 0 4 9 】

実施例 6 :

実施例 5 で合成したビスアジド誘導体の蛍光特性を解析した。ビスアジド誘導体は、無蛍光性であった。次に、ビスアジド誘導体をメタノール溶液中、還元剤である TCEP (リン化合物) で処理したところ、アジド基はアミノ基に変換され、高い蛍光性を示した。その

50

蛍光波長は、664に最大強度を示し、赤色蛍光であった。また、処理前と比較し、約1500倍蛍光強度が増加した(図7)。

【0050】

実施例7:

実施例1で合成したアジド誘導体(図2の化合物4)は、無蛍光性であった。次に、この化合物(図2の化合物4)の1 μ Mメタノール溶液を、350nmの紫外光で約60秒間照射した。その後、490nmの励起光により、蛍光スペクトルを測定した(図8)。本化合物は、光照射前は、蛍光はないが、光照射後、490nmの励起波長で観察される蛍光を発する。

【0051】

実施例8: SNP検出およびRNAをテンプレートとした反応

図9にテンプレートおよびプローブの配列を示す(Az:アジド基修飾した蛍光基, Red:還元剤)。テンプレートは、フルマッチのDNAおよび一塩基変異のDNA、さらにフルマッチのRNAを用意した。本プローブを用いて、実施例6と同様の方法で、ヒトras遺伝子配列の検出実験を行った結果、DNAをテンプレートとした場合と同様に、RNAをテンプレートとした場合も、標的配列が存在すると、蛍光シグナルが顕著に増大した(図10)。また、一塩基変異を識別することも可能であった(図11)。

【0052】

実施例9: 大腸菌細胞の検出

E.coli K12 (NBRC 3301)を、オートクレーブ滅菌したLuria-Bertani Broth (NIHON SEI YAKU)の中、30 $^{\circ}$ Cで20時間振とう培養した。培養液を5,000rpmで5分間遠心分離し、上澄みを捨て、菌体をphosphate-buffered saline buffer (pH7.2)中で再分散した。分散させた液を4% paraformaldehydeで固定した (Amann et al. (1990) J. Bacteriol. 172:762-770.)。

【0053】

固定サンプルをスライドガラスに定着させ、最終濃度440nmのrhodamine azideプローブと440nmのphosphine プローブを含むハイブリダイゼーションバッファー[0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl(pH7.2), 0.01 or 0.1% SDS, 2.5% PEG]を各ウェルに9 μ Lずつ滴下し、37 $^{\circ}$ Cで30minインキュベートした。ハイブリバッファーを超純水で洗い流し、乾燥後、褪色防止剤(invitrogen Slow Fade (登録商標) Gold antifade reagent)をはさんでカバーガラスをかぶせた。

【0054】

ターゲットプローブは高圧水銀ランプを光源とする蛍光顕微鏡(Carl Zeiss Axioskop (登録商標) 2 Plus)で、ex. 480/40, em. 510LPの条件で撮影した。全菌画像はハロゲンランプを光源として位相差像として観察し、モノクロデジタルカメラ(Carl Zeiss AxioCam HRm)とソフト(Carl Zeiss AxioVision 3.0)を用いて撮影した。

【0055】

図12Aにターゲットとした大腸菌23S rRNAの配列および作成したプローブの配列を示す。コントロールとして、ミスマッチ配列のプローブも作成した。まず、試験管内で本プローブの性能を評価したところ、フルマッチ配列のプローブでは蛍光の顕著な増加を示したのに対し、ミスマッチ配列のプローブでは、蛍光の増加が見られなかった(図12B)。本プローブを実際に大腸菌細胞に適用した結果、フルマッチのプローブでは細胞から蛍光が見られたのに対し(図12C及びE)、ミスマッチのプローブでは、ほとんど蛍光が見られなかった(図12D及びF)。よって、本プローブは、細胞内のRNA検出手法としても有用であるといえる。

【0056】

また、上記と同様の大腸菌サンプルをフローサイトメーターにより解析した。蛍光強度を横軸、細胞出現頻度を縦軸にしたヒストグラムを図13に示す。RETFプローブペア(蛍光プローブ、TPPプローブ)を導入した場合のみ、高い蛍光強度を示す細胞分布が観察された。一方、蛍光プローブのみ(TPPプローブなし)を導入した場合は、大腸菌のみの場

10

20

30

40

50

合と全く同じ蛍光強度分布を示した。このことは、アジドメチレン保護基を有する蛍光発生分子が、細胞内において、全くバックグラウンド蛍光を持たないことを意味し、RETFプローブの非常に高い感度(高いシグナル・バックグラウンド比)を保証する結果である。

【0057】

実施例10：ヒト細胞内28S rRNAのイメージング

ラボテックチャンバー(Nunc)上で細胞を培養し、細胞をMg, CaフリーのPBSで2度洗浄した。洗浄した細胞に、600nMのプローブ(28S rRNAを標的としたプローブ)と10U/mlのStreptolysin O(SLO; Sigma-aldrich)を300μL各チャンバーに加え、室温で10minインキュベートした。このときSLOは、100mMのDTT中で2時間インキュベートし、十分に活性化したものを用いた。10分のインキュベート後、0.2g/LのCaCl₂を含むMEM培地を各ウェルに300μL加えてSLOの不活性化した。さらに37℃で1hrインキュベートしたのち、PBSで細胞を1度洗浄した。検出した細胞は、蛍光顕微鏡(Zeiss)下で、ex. 470/40, em. 525/50のフィルターを用いて撮影した。結果を図14に示す。図14において、Aはrhodamine azideプローブ+phosphine プローブ(明視野)、Bはrhodamine azideプローブのみ(明視野)、Cはrhodamine azideプローブ+phosphine プローブ(蛍光)、Dはrhodamine azideプローブのみ(蛍光)を示す。フルマッチのプローブを導入後、約5分で蛍光シグナルが観察された(図14)。一方、ミスマッチプローブにおいては、全くシグナルは観察されなかった。

【産業上の利用可能性】

【0058】

本発明の標識試薬は、標的DNAあるいは、RNA分子に結合して、還元されることにより蛍光を発することができるようになる。本発明の化合物は、高いシグナル・バックグラウンド比を持つため、高感度遺伝子検出が可能になるとともに、細胞内、生体内での遺伝子検出イメージングが可能となる。さらに本発明は、他の試薬や酵素を用いる必要がないため、簡便・安価であり、試験管内のみではなく、細胞内あるいは生体内での遺伝子検出が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】図1は、アジド基の還元をトリガーとして、無蛍光性分子の構造変化が起こり蛍光を発する、本発明の蛍光off/on型センサーシステムを示す。

【図2】図2は、実施例で行ったローダミンのアジド誘導体の有機合成の反応スキームを示す。

【図3】図3は、本発明のローダミンのアジド誘導体について、還元前(未反応)の蛍光と、還元後(反応後)の蛍光を示す。

【図4】図4は、本発明の蛍光発生分子を用いて標的核酸配列を検出する方法の原理を示す。

【図5】図5は、本発明の蛍光発生分子を用いた標的核酸配列の検出方法における蛍光シグナルの化学的増幅の原理を示す。

【図6】図6は、実施例において本発明の蛍光発生分子を用いて標的核酸配列を蛍光検出した結果を示す。

【図7】図7は、本発明のローダミンのビスアジド誘導体について、還元前(未反応)の蛍光と、還元後(反応後)の蛍光を示す。

【図8】図8は、図3は、本発明のローダミンのアジド誘導体について、還元前(未反応)の蛍光と、還元後(反応後)の蛍光を示す。

【図9】図9は、SNP検出およびRNAをテンプレートとした反応で用いたテンプレートおよびプローブの配列を示す。

【図10】図10は、本発明の蛍光発生分子を用いてRNAをテンプレートとして検出を行った場合の結果を示す。

【図11】図11は、本発明の蛍光発生分子を用いて一塩基変異を識別した結果を示す。

【図12】図12は、本発明の蛍光発生分子を用いて大腸菌細胞を検出した結果を示す。

10

20

30

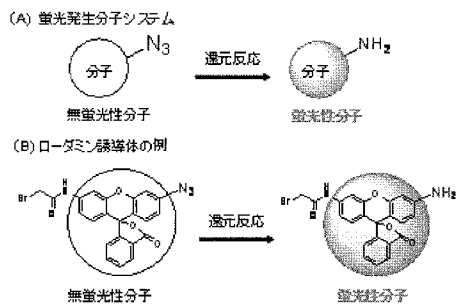
40

50

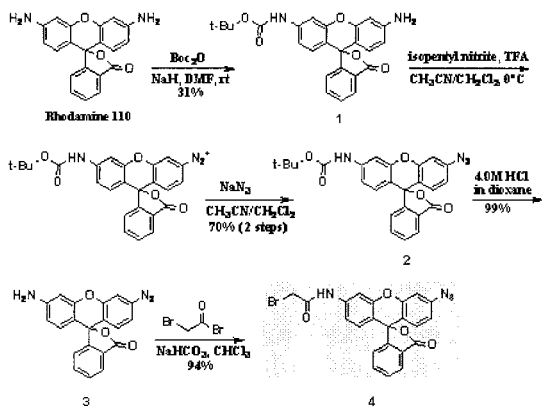
【図13】 図13は、フローサイトメトリーによる大腸菌RNA発現の定量を示す。

【図14】 図14は、本発明の蛍光発生分子を用いたヒト生細胞内rRNAのイメージングを示す。

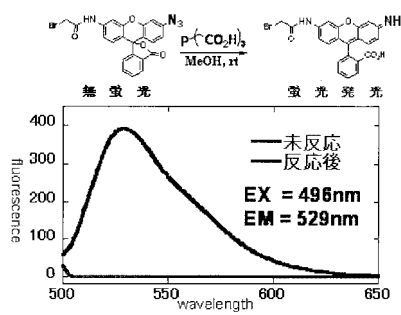
【図1】



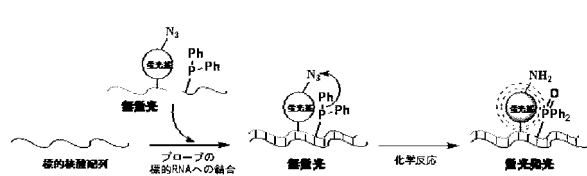
【図2】



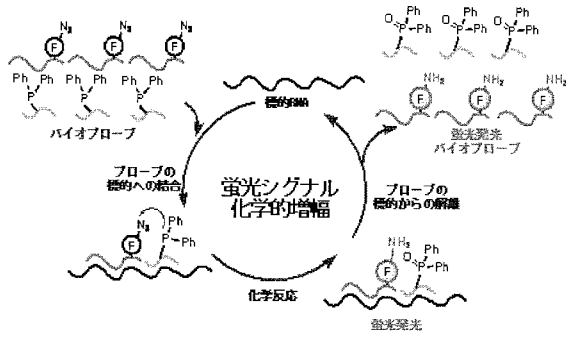
【図3】



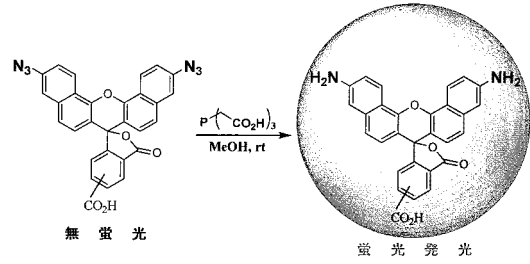
【図4】



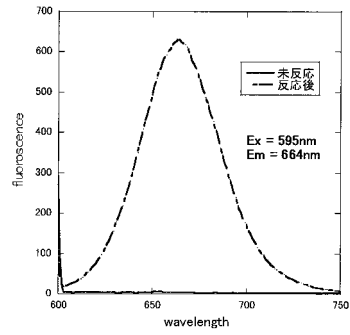
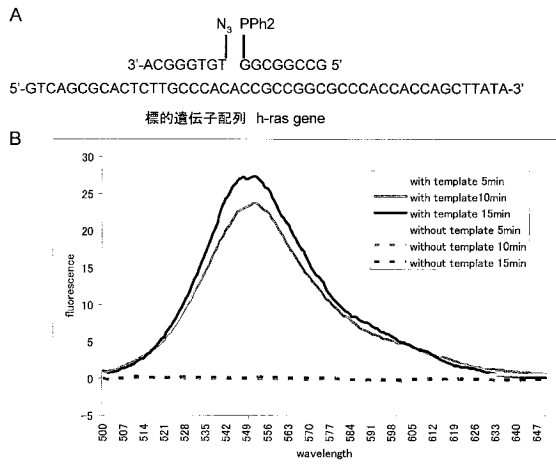
【図5】



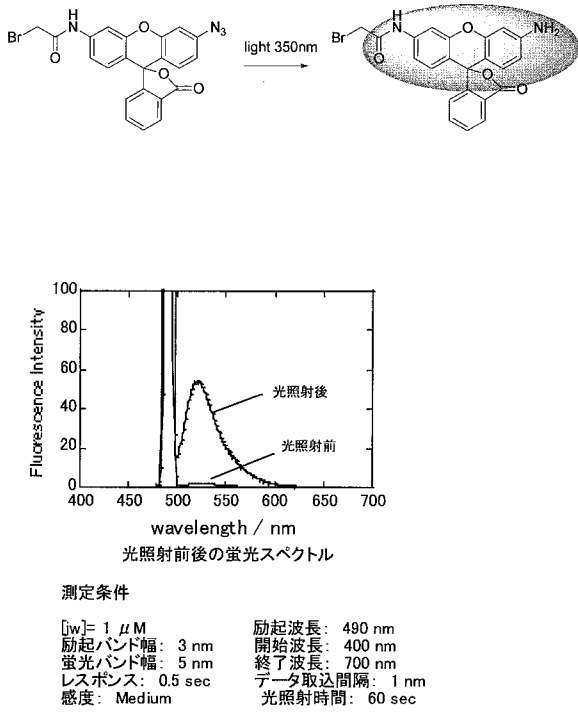
【図7】



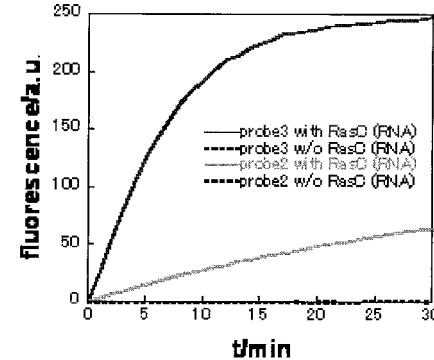
【図6】



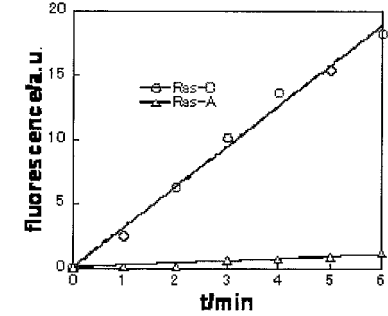
【図8】



【図10】



【図11】



【図9】

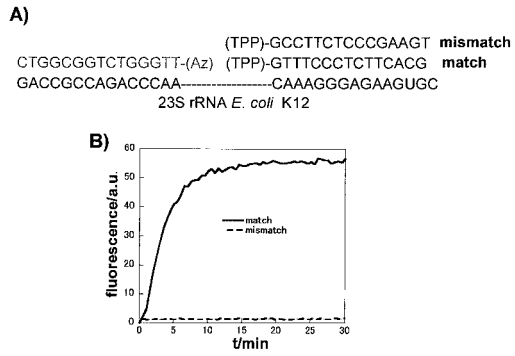
5'-GCCGGCGG(Az) (Red)TGTGGCA-3'

3'-CGCGGCCGCC-----ACACCCGTTTC-5' Ras-C (match)

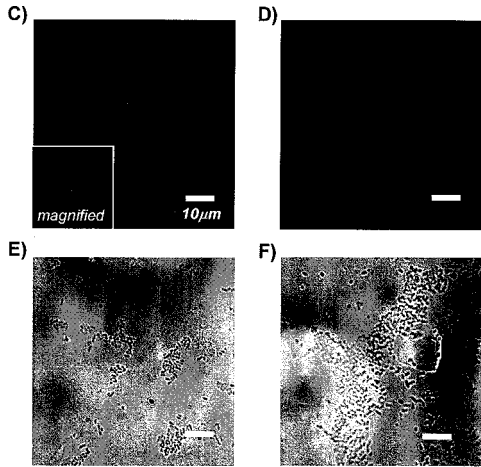
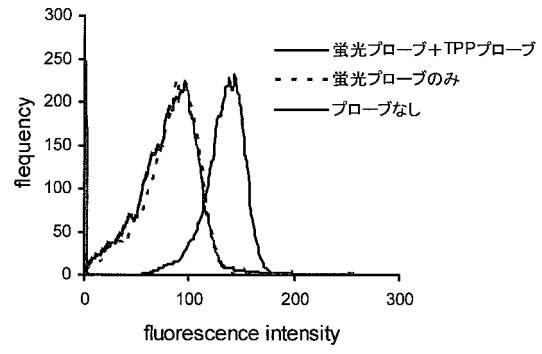
3'-CGCGGCCGCC-----ACA■CCGTTTC-5' Ras-A (mismatch)

3'-CGCGGCCGCC-----ACAC■CGGUUC-5' Ras-C (RNA)(match)

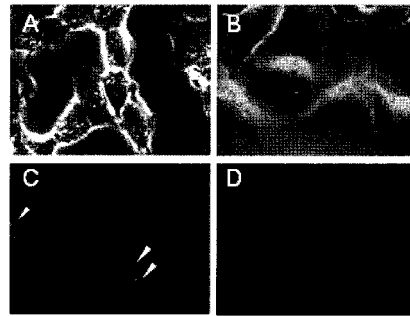
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配列表 】

0005360647000001.app

フロントページの続き

| | | | |
|----------------|-----------|----------------|---|
| (51)Int.Cl. | | F I | |
| C 0 7 D 493/10 | (2006.01) | C 0 7 D 493/10 | E |
| C 0 9 B 11/28 | (2006.01) | C 0 9 B 11/28 | E |
| | | C 0 9 B 11/28 | K |

(72)発明者 古川 和寛
埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内

審査官 谷尾 忍

(56)参考文献 米国特許出願公開第2001/0049091(US,A1)
特開2002-034595(JP,A)
特表2004-532805(JP,A)
特表2010-503860(JP,A)
NOVIKOVA, E. A. et al., Synthesis and structure of some azidofluoran derivatives, Russian Journal of Organic Chemistry, ロシア, 1998年, vol.34, no.12, p.1762-1767

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 Q 1 / 0 4
C 1 2 Q 1 / 6 8
G 0 1 N 3 3 / 5 0
G 0 1 N 3 3 / 5 3 6
C 0 7 D 4 9 3 / 1 0
C 0 9 B 1 1 / 2 8
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CASREACT(STN)