

細胞内 RNA のイメージングを目指した 蛍光修飾ウリジン三リン酸の合成

所属：上智大学 理工学部 物質生命理工学科

助成対象者：鈴木由美子

概要

蛍光団 2-アミノキナゾリンが単結合あるいは三重結合を介して結合した、標識 RNA ヌクレオシドを合成した。キナゾリン蛍光団のボロン酸誘導体と、5-ヨードウリジンとの鈴木-宮浦カップリング反応にて、ウリジンと蛍光団を単結合にて連結した。本ヌクレオシドは、酸性条件と塩基性条件では、異なる波長にて蛍光発光した。三重結合を介して蛍光団が付加したヌクレオシドは、菌頭反応を利用して得た。本化合物は正のソルバトクロミズムを示し、塩基性条件で強く蛍光し、酸性条件で消光した。環境の変化に蛍光の ON-OFF または波長の変化にて応答する、蛍光標識ヌクレオシドを開発することに成功した。

abstract

RNA nucleosides labeled with a fluorophore 2-aminoquinazoline via a single bond, or a triple bond were synthesized. The former nucleoside showed different emission wavelength maxima under acidic and basic conditions. The latter nucleoside exhibited a positive fluorescence solvatochromism and was highly fluorescent under basic conditions, however, its fluorescence was quenched under acidic conditions. We have developed artificial nucleosides that respond to environmental changes by fluorescence ON-OFF or by emission wavelength shift.

研究内容

背景

細胞内 RNA イメージングを実現する方法として、標識ヌクレオチドを利用した fluorescence in situ hybridization (FISH) 法が広く用いられている。この方法に用いる蛍光標識ヌクレオチドとして、ウラシルに蛍光団を結合させたフルオレセイン-12-UTP が市販されている。しかし、リンカーと蛍光団の嵩高さ故、転写過程で効率的に取り込まれないため、生成した RNA の蛍光強度が低く¹⁾、蛍光標識抗体が併用されている。

細胞内で局在する RNA を、その種類別に同時に検出することができれば、生体機能の解明に大きく貢献する。しかし、現状ではそのような実験系は十分に確立されていない。

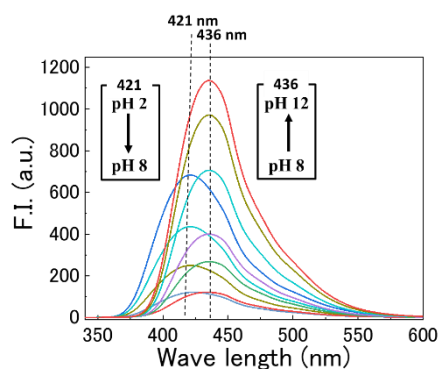
目的

FISH 法への利用を想定した、転写反応に高効率で取り込まれ、高い蛍光強度をもち、かつ、任意波長で蛍光を発する標識ヌクレオチドの開発を目指した。蛍光団として、小分子で、強い蛍光性を示し、合成や置換基による修飾が容易である 2-アミノキナゾリン^{2,3)}を用いることとした。

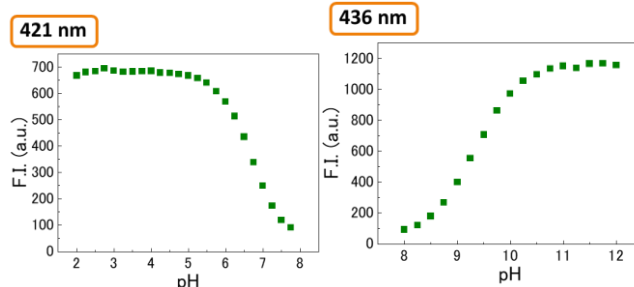
結果

蛍光団が単結合を介して連結した蛍光性ウリジンは、3-ブロモアントラニル酸からキナゾリン環への環化反応、置換反応による蛍光性誘導体への変換、鈴木-宮浦反応によるウリジンとの結合にて合成した。

本蛍光性ウリジンは、pH 変化に蛍光応答性を持つことが分かった。pH に応じて、420 nm 付近と 435 nm 付近に発光の極大値を示した。酸性条件下では極大波長 421 nm で発光し、塩基性条件下において 436 nm で発光した。即ち、標識 RNA ヌクレオチドとして用いた場合、RNA の存在する細胞内環境の pH の観測に用いること



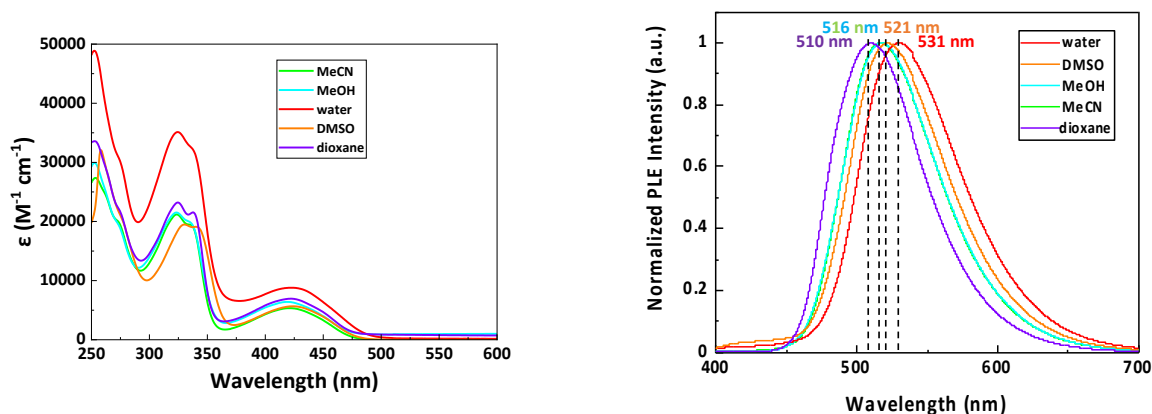
spectra recorded in 1 % DMSO - 99 % water (v/v), pH 7.4 adjusted by HEPES/NaOH buffer, at 25 °C,



ができる。

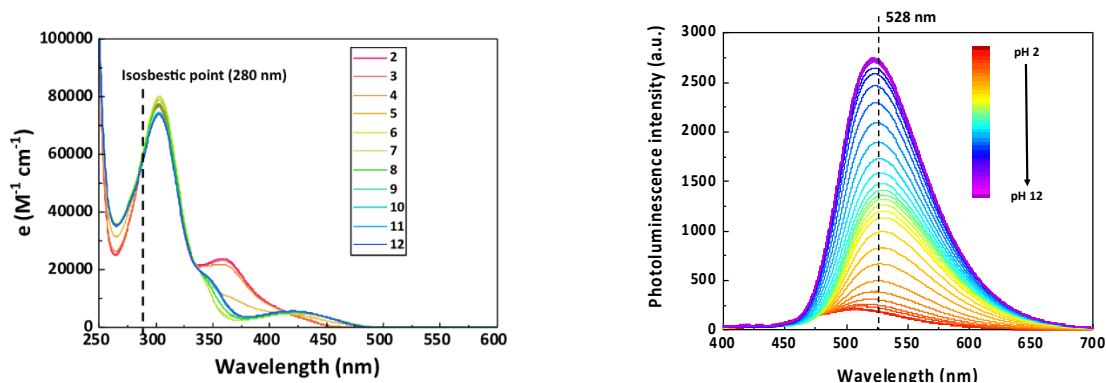
蛍光団がアルキニル基を介して連結した蛍光性ウリジン、ベンゾイレン尿素を出発物質として合成を開始した。キナゾリンの 2,4-ジクロロ体の菌頭カップリングにて、トリメチルシリルエチニル基を導入した後、2 位をジメチルアミノ化し、TMS 基を除去してエチニル体とした。さらに、菌頭カップリングにてウリジンと連結することで、新規蛍光性ウリジンを合成することに成功した。

本化合物の水、メタノール、アセトニトリル、DMSO、1,4-ジオキサン溶液を調整し、光物性測定に利用した。DMSO 以外の有機溶媒や水への溶解性が非常に低いため、DMSO に溶解した後、各溶媒にて希釈し、それぞれ 1%DMSO 溶液となるよう調整した。Uv-vis 測定では、いずれも吸収極大波長が 320 nm 付近であった。励起光を 300 nm とした蛍光スペクトルでは、極性の高い溶媒中でより長波長側で発光した。



各溶媒中における化合物 1 の UV-vis (左) 及び発光スペクトル(右)

複数の異なる pH 下での UV-vis スペクトルの測定を行い、観測された等吸収点の一つ 280 nm を励起光として、発光スペクトルを測定したところ、528 nm 付近で極大値を示し、塩



spectra recorded in 1 % DMSO – 99 % water (v/v),
pH 7.4 adjusted by HEPES/NaOH buffer, at 25 °C,

spectra recorded in 1 % DMSO – 99 % water (v/v),
pH 7.4 adjusted by HEPES/NaOH buffer, at 25 °C,

各 pH における化合物 2 の UV-vis (左) 及び発光スペクトル(右)

基性条件下でより強く発光した。中性、酸性となるにつれ、その蛍光強度は減弱し、pH 応答性があることが分かった。蛍光強度の変化は、pH5 前後、pH8 前後で大きく変化し、pH6-7 ではほぼ変化しなかった。この結果より、キナゾリンのプロトン化過程は、キナゾリン環 1 位と 3 位の 2 か所において 2 段階で進行すると推測した。

結果

蛍光の ON-OFF、消光、波長の変化にて、存在環境に応答する蛍光標識 RNA ヌクレオシドを開発することに成功した。三リン酸化によるヌクレオチドへの変換も試みたが、生成物の単離精製に至っていない。

今後

ヌクレオチドとした後、FISH 法を用いた細胞内 RNA の可視化実験に用いて、その機能を確認する。同様の手法にて、pH 応答性の蛍光標識 DNA ヌクレオシドも合成可能と考えられる。ホスホロアミデート体へと誘導すれば、DNA 自動合成装置を利用した、pH 応答性の DNA および RNA の合成が可能となる。遺伝子の周辺など、細胞内には局在的に pH が他の細胞基質とは異なる部分が存在し、細胞内分子の機能の制御に大きく関わっていると考えられている。本研究成果の pH 応答性ヌクレオシドの利用により、細胞内の局在 pH の観察が可能になり、DNA および RNA の機能解明に貢献すると期待される。

引用文献

- 1) T. Baladi, J. R. Nilsson, A. Gallud, E. Celauro, C. Gasse, F.e Levi-Acobas, I. Sarac, M. R. Hollenstein, A. Dahlén, E. K. Esbjörner, L. M. Wilhelmsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 5413-5424.
- 2) Y. Suzuki, J. Sawada, P. Hibner, H. Ishii, K. Matsuno, M. Sato, B. Witulski, A. Asai, *Dyes Pig.* **2017**, *145*, 233-238.
- 3) M. Motoyama, T.-H. Doan, P. Hibner-Kulicka, R. Otake, M. Lukarska, J.-F. Lohier, K. Ozawa, S. Nanbu, C. Alayrac, Y. Suzuki, B. Witulski, *Chem. Asian J.* **2021**, *16*, 2087-2099.

本助成に関わる成果物

[口頭発表]

- 1) 牧 丈, 尾迫竜治, 鈴木 由美子「pH 応答型蛍光性キナゾリン類の合成とその特性評価」
日本化学会第 103 春季年会 (2023)、2023 年 3 月 24 日
- 2) 大森一輝, 鈴木 由美子「細胞内 RNA の可視化を目指した蛍光標識ウリジンの合成と蛍光特性評価」日本化学会第 103 春季年会 (2023)、2023 年 3 月 24 日