

モノマー／エキシマースイッチングを利用した DNA 二重鎖を骨格とする 蛍光プローブ・センサ

藤本和久*, 井上将彦

DNA Duplex-Based Fluorescence Probes/Sensors Using Monomer-Excimer Switching

Kazuhisa FUJIMOTO* and Masahiko INOUE

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama,
2630 Sugitani, Toyama City 930-0194, Japan

(Received July 29, 2008)

In this review, we report DNA duplex-based fluorescence probes/sensors using pyrene monomer-excimer switching. The review mainly comprises two topics: 1) excimer-monomer switching molecular beacons (EMS-MB) and 2) monomer-excimer switching sensors based on the structural motif of antibodies. The EMS-MBs have two pyrene fluorophores connected both at 3' and 5' ends of a single-stranded oligonucleotide. Emission switching occurs from excimer to monomer accompanying isoemissive points when the probes hybridized with target DNAs. The isoemissive points indicate the presence of only two fluorescent species, nonhybridized and hybridized probes in the mixtures, and thereby unambiguous detection of the targets is available. The probes can detect target 19-mer DNAs and can discriminate the targets from their single-nucleotide mismatches at 1 nM concentration. Furthermore, the EMS-MBs have been recently applied to kinetic study for RNase H activity by Tan *et al.* The structures and emission-switching properties of the EMS-MBs encourage us to develop a new class of fluorescent sensors based on the structural motif of antibodies. The sensors consist of three functional regions, benzo-15-crown-5 ether (or per-*O*-methylated β -cyclodextrin), DNA, and pyrene as guest-binding, dimerizing, and sensing sites, respectively. The crown- and CD-modified sensors can detect potassium cation and porphyrin derivatives, respectively, by monomer-excimer emission switching.

Key words—DNA duplex; pyrene; monomer-excimer switching; fluorescence probe/sensor

1. はじめに

ピレンは代表的な疎水性蛍光分子であり、単独ではモノマー発光を、二分子が近接するとエキシマー発光を示す。¹⁾ エキシマーとは同一分子種の基底状態と励起状態とが錯形成したもので、溶液中でのモノマーに対する存在比は濃度に依存する。すなわち、濃度が増大にするにつれ、エキシマーの存在比が大きくなる。発光スペクトルの特徴は、モノマー発光においては振動バンドが観測されるのに対し、エキシマー発光はモノマー発光に比べて長波長側にシフトしたブロード（バンドレス）なスペクトルを示す。このため、DNA、タンパク質、細胞膜といった生体分子の位置・空間情報を得るための蛍光色素として多用されてきた。²⁻⁵⁾ また、ピレンのモノ

マー発光とエキシマー発光のスイッチングを利用したプローブ・センサ分子も開発されている。⁶⁾ 標的分子を認識する際、センサ分子のコンフォメーションが変化することで2枚のピレン環の位置関係も変化し、その結果発光のスイッチングが生じる。2つの発光波長の変化を利用することで、レシオメトリックな検出が可能となる。われわれは、DNAの二重鎖形成とピレンのモノマー／エキシマースイッチングを組み合わせることで、今までにない有用な新規プローブ・センサ分子を構築できると考え、研究を行ってきた。本稿において、われわれがこれまでに開発した「ピレンモノマー／エキシマースイッチングを利用したDNA二重鎖を骨格とする蛍光プローブ・センサ」を中心に、それに関連した研究をいくつか織り交ぜて紹介する。まずDNA検出プローブ分子である「エキシマー／モノマースイッチングモレキュラービーコン」を、続いて「抗体構造をモチーフとしたモノマー／エキシマースイッチン

富山大学大学院医学薬学研究部（〒930-0194 富山市杉谷 2630）

*e-mail: fujimoto@pha.u-toyama.ac.jp

本総説は、日本薬学会第128年会シンポジウムS16で発表したものを中心に記述したものである。

グ型センサ分子」を紹介する

2. エキシマー／モノマースイッチングモレキュラービーコン

2-1. モレキュラービーコン モレキュラービーコン (Molecular Beacon; 以下 MB と表記) とは, 1996 年に Tyagi らによって開発された DNA/RNA 検出プローブ分子である.⁷⁾ 現在までに, 様々な MB が開発されている. 細胞内での使用例も報告されており, さらに PCR における増幅鎖のリアルタイム検出 (Real-Time PCR) 等に応用されている.^{8,9)} Figure 1 に示すように, MB はステム・アンド・ループ (ヘアピンループ) 構造を有する一本鎖 DNA を基本骨格とし, その末端の一方を蛍光団, もう一方を消光団で化学修飾されている. 溶液中で MB のみが存在する場合, 相補的な塩基配列からなるステム領域で二重鎖が形成されているため蛍光団と消光団が近接位に存在し蛍光団からの発光は消光されている. ループ領域に相補的な配列を有するターゲット鎖を加えると, ループ領域とターゲット鎖との間で二重鎖が形成されると同じくしてステム領域の二重鎖が解離し, 蛍光団からの発光が復活する. 消光は, 蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET) によ

て生じる.¹⁰⁾ 最も一般的な MB は, 蛍光団としてフルオレセイン, 消光団としてダブシルが導入されている. フルオレセインの励起光を照射すると, その励起エネルギーをダブシルが吸収し, 熱エネルギーとして消費することで消光される仕組みである. しかしながら, MB にも問題点がある. FRET による消光が完全ではないため, バックグラウンド蛍光が残ってしまう. また, 細胞内をはじめとする *in vivo* で使用する際, 消光団以外が原因となって消光されてもそれに気付くことはできない. そこでわれわれは, ピレンのモノマー／エキシマー発光の性質を利用すれば, これらの問題を解決できると考えた.

2-2. エキシマー／モノマースイッチングモレキュラービーコン

2-2-1. ピレンのモノマー／エキシマー発光スイッチングを利用した DNA 検出プローブ われわれが開発した DNA 検出プローブ分子である「エキシマー／モノマースイッチングモレキュラービーコン」について述べる前に, ピレンのモノマー／エキシマー発光スイッチングを利用した DNA 検出プローブを紹介する. Masuko らは, モノマー／エキシマースイッチング型の DNA 検出プローブ分子を

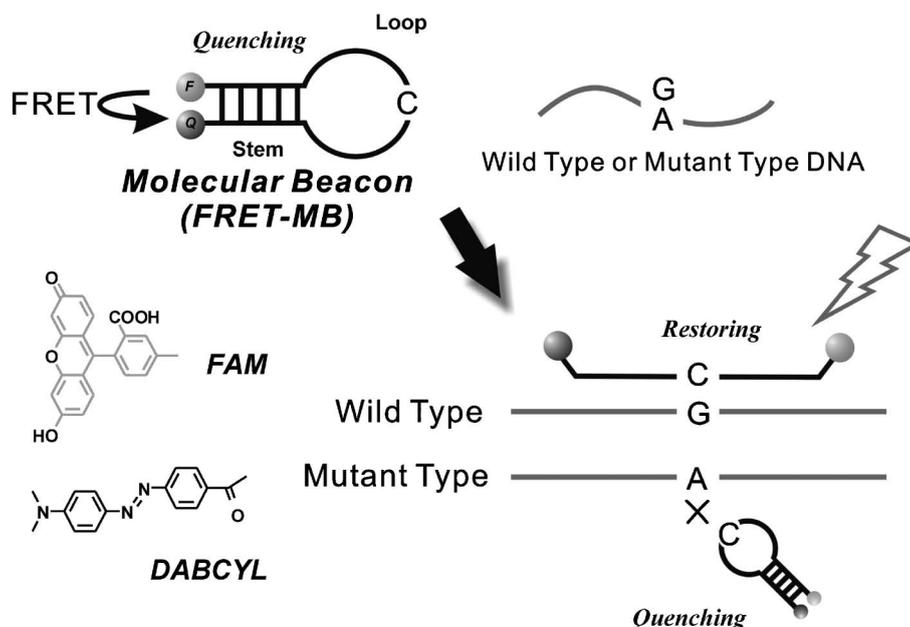


Fig. 1. Traditional Molecular Beacons (FRET-MBs).

FRET-MBs were labelled with FAM and DABCYL at 5' and 3' ends of single-stranded oligonucleotides with a stem-and-loop-structure, respectively. Upon hybridization with a wild type DNA, the FRET-MBs undergo the dynamic conformational change and the fluorescence restores. On the other hand, the conformational change can not occur in the presence of a mutant DNA.

報告している (Fig. 2).¹¹⁾ 彼らのプローブ分子は 2 種類のピレン修飾 DNA から構成されている。一方は 5'末端に、もう一方は 3'末端にピレンが連結されている。プローブ分子のみでは、一本鎖で存在するのでモノマー発光が観測される。そこにターゲット鎖を加えると、2本のプローブ DNA との間で三元的な二重鎖が形成される。三元錯体の中央で 2 枚のピレン環が会うことでモノマー発光からエキシマー発光へと切り替わる仕組みである。Kool らもほぼ同時期にピレンのモノマー/エキシマー発光スイッチングを利用した DNA 検出プローブを報告している (ピレンは、リボースのアノマー位に α -グリコシド結合によって導入されている)。¹²⁾ 三元的な錯形成を利用したスイッチングプローブ分子は、当然のことながら 2 種のプローブを必要とするため、汎用性に問題がある。

2-2-2. エキシマー/モノマースイッチングモレキュラービーコン エキシマー/モノマースイッチングモレキュラービーコン (Excimer/Monomer Switching Molecular Beacon; 以下 EMS-MB と表記) の構造、並びにターゲット鎖検出の機構を Fig. 3 に示す。¹³⁾ EMS-MB は、29 塩基からなるステム・アンド・ループ構造の DNA 鎖の両末端にピレンが導入されている。ステム領域は 5 塩基対から、ループ領域は 19 塩基から構成されている。5'末端は、ピレンを骨格とするホスホロアミダイト体を用いて、DNA 固相合成機で修飾する。一方、3'末端側には、DNA 側に導入されたリンカーの末端アミ

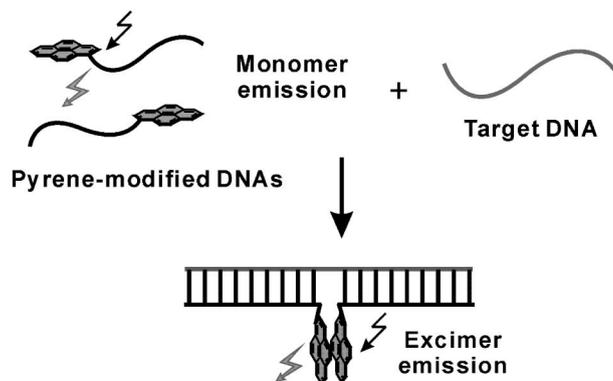


Fig. 2. A Schematic Representation of Monomer-excimer Switching Probes Reported by Masuko *et al.*

Fluorescence changes from monomer to excimer upon the formation of ternary complexes between the pyrene-modified two probes and target DNAs.

ノ基と 3-(1-pyrenyl) propionic acid のスクシンイミジルエステルを反応させることでピレンを導入することができる。EMS-MB はステム形成時にエキシマー発光を示すので (従来の MB は消光されている)、HPLC 精製を行う際に蛍光検出器を用いることができる。また、その溶出液はエキシマー発光由来の yellow-green 色を示すので肉眼による確認もできる。

Figure 4 にループ領域に対する相補鎖を加えていた際の EMS-MB の蛍光スペクトル変化を、Fig. 5 に EMS-MB と同じ塩基配列からなる従来型 MB の蛍光スペクトル変化を示す (蛍光団としてフルオレセイン、消光団としてダブルシルを使用)。EMS-MB の溶液にターゲット鎖を加えていくと、エキシマー発光の強度が減少し、モノマー発光の強度が増大する。430 nm に等発光点が観測されたことから、系中には 2 種類の発光化学種、すなわちステム・アンド・ループ構造のプローブ分子とターゲット鎖と二重鎖を形成したもののみ存在していることが分かる。EMS-MB におけるエキシマー発光強度に対するモノマー発光強度の比 ($I_{382\text{ nm}}/I_{498\text{ nm}}$) を取ると、ターゲット鎖不在時には 0.2 であったのが、発光強度変化が完全に飽和するまでターゲット鎖を加えるとその値は 20 に増大した。すなわち、

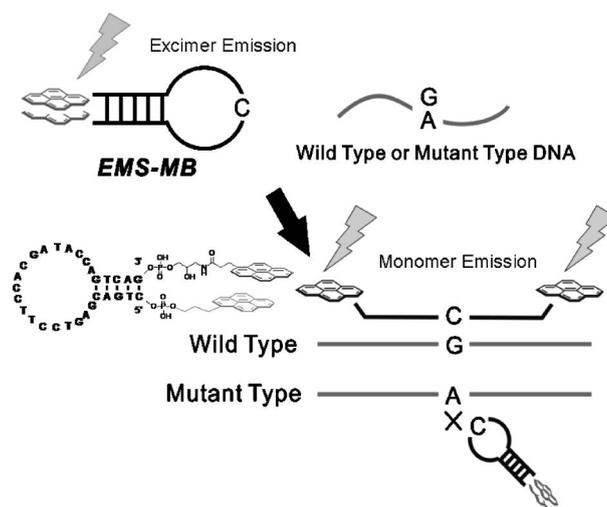
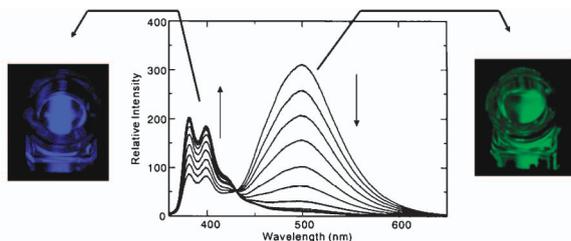


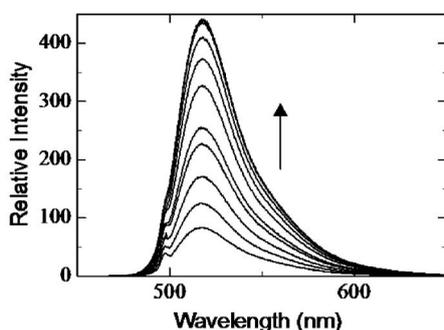
Fig. 3. Excimer-monomer Switching Molecular Beacons (EMS-MBs).

EMS-MBs were dually labelled with pyrene at both 3' and 5' ends of single-stranded oligonucleotides with a stem-and-loop structure. The stem-close-shaped EMS-MBs predominantly emit the excimer fluorescence (yellow-green). In the presence of a wild type DNA, the EMS-MBs hybridize with it to emit the monomer fluorescence (pale blue).



EMS-MB 5'-pyrenyl-CTGACGAGTCCTTCCACGATACCAGTCAG-pyrenyl-3'
full match 5'-TGGTATCGTGAAGGACTC-3'

Fig. 4. Fluorescence Titration Spectra of EMS-MB ([EMS-MB]: 200 nM, [MgCl₂]: 5 mM, [KCl]: 50 mM, [Tris-HCl]: 20 mM, at pH 8.0) in the presence of a fully complementary target DNA (0.1–1.0 equiv.); $\lambda_{\text{excitation}}=345$ nm. Photographs represent that a visual discrimination of the color change for EMS-MB (2 μ M): yellow-green (right) and pale blue (left) fluorescences in the absence and presence of 1 equiv. of the target, respectively.



MB 5'-FAM-CTGACGAGTCCTTCCACGATACCAGTCAG-DABCYL-3'
full match 5'-TGGTATCGTGAAGGACTC-3'

Fig. 5. Fluorescence Titration Spectra of FRET-MB ([FRET-MB]: 200 nM, [MgCl₂], 5 mM, [KCl]: 50 mM, [Tris-HCl]: 20 mM, at pH 8.0) in the presence of a fully complementary target DNA (0.1–1.0 equiv.); $\lambda_{\text{excitation}}=495$ nm.

蛍光強度比が 100 倍変化したことになる。一方、従来型の MB ではダブルシルによって消光されていたフルオレセイン由来の発光強度が増大し、消光時の発光強度と飽和時の発光強度の比 ($I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$) を取ると、その値は 5.2 であった。この結果より、従来型の MB には潜在的にバックグラウンド蛍光が存在するため、S/N 比が低下することは明らかである。

Figure 4 の写真は、ターゲット鎖不在時、並びに存在時の EMS-MB 溶液に励起光を照射したものである。ターゲット鎖不在時にはエキシマー由来の yellow-green の発光が、存在時にはモノマー由来の pale blue の発光が観測されるので、EMS-MB を用いた DNA 検出は肉眼での識別も可能にする。また、標準的な蛍光測定装置による完全相補的なターゲット鎖の検出は、EMS-MB の濃度を 1 nM まで希

釈しても可能であった。

次に、1 塩基ミスマッチがターゲット鎖に存在する場合の $I_{382 \text{ nm}}/I_{498 \text{ nm}}$ と完全に相補的なターゲット鎖に対する値とを比較した (検出感度を向上させるために、20% DMF を含む緩衝液を使用)。ターゲット鎖が完全相補的 (塩基は G) である場合、 $I_{382 \text{ nm}}/I_{498 \text{ nm}}$ は、ターゲット鎖の添加量が増大するにつれ、大きく上昇する。一方、1 塩基ミスマッチを含むターゲット鎖を添加していても、ミスマッチ塩基の種類に係わらず $I_{382 \text{ nm}}/I_{498 \text{ nm}}$ はほとんど変化しなかった。EMS-MB は、1 塩基ミスマッチを含むターゲット DNA の中から、完全相補鎖のみを識別することができることが明らかとなった。

さらに、われわれは一層の検出感度の向上をはかるため、高感度かつ酸素による消光を受け難い蛍光色素である“アルキニルピレン”を導入した EMS-MB の開発にも成功している。¹⁴⁾

2.2.3. EMS-MB の応用 Tan らが、われわれの EMS-MB を用いて RNase H の活性をリアルタイムでモニターできるシステムを開発したので、以下に紹介する。¹⁵⁾ RNase H は、RNA/DNA 二重鎖の RNA を分解する非特異的のエンドヌクレアーゼの 1 つで、DNA や一本鎖 RNA は切断しない。EMS-MB を用いた RNase H の速度論的解析の機構を Fig. 6 に示す。EMS-MB のループ領域に対して相補的な配列を有する一本鎖 RNA を加えると、ループ領域との間で二重鎖が形成されモノマー発光へと切り替わる (State 1)。ここに RNase H を加えると、RNA 鎖の切断が進行するにつれ EMS-MB は再びステム・アンド・ループ構造へと変換され、エキシマー発光が徐々に増大する (State 2)。最後にループ領域に対して相補的な配列を有する DNA 鎖 (cDNA) を加えるとエキシマー発光が消失するので、先ほどのエキシマー発光の増大が RNase H による RNA の切断由来であることが確認できる (State 3)。エキシマー発光強度の変化を時間に対してモニターすると、Fig. 6 のインセットのようになる。酵素反応開始前 (RNA/DNA 二重鎖形成時)、エキシマー発光が観測される波長付近にはモノマー発光の裾野に相当する部分がわずかに観測されるのみで、バックグラウンドに与える影響はわずかである。また、酵素反応が進行するにつれエキシマー発光が増大するという事は、酵素反応を off/

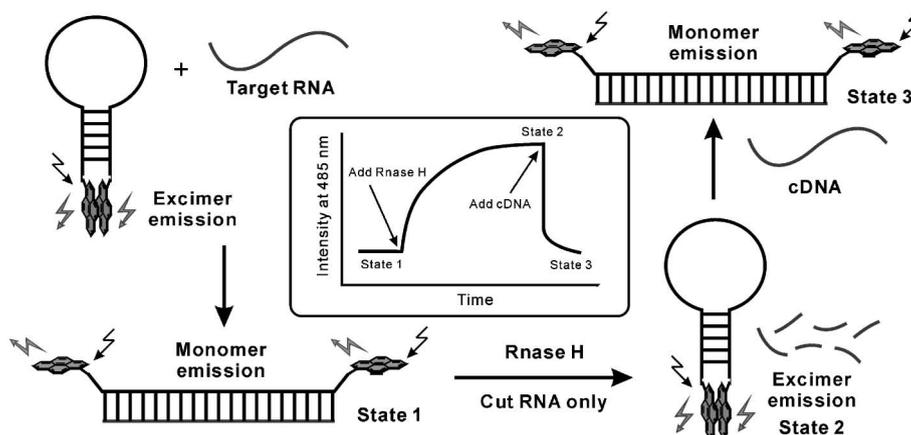


Fig. 6. A Schematic Representation of the Fluorescence Mechanism of Using EMS-MB to Study RNase H Activity
Inset: an image of time-base fluorescence monitoring of RNase H cleavage activity at 485 nm with EMS-MB.

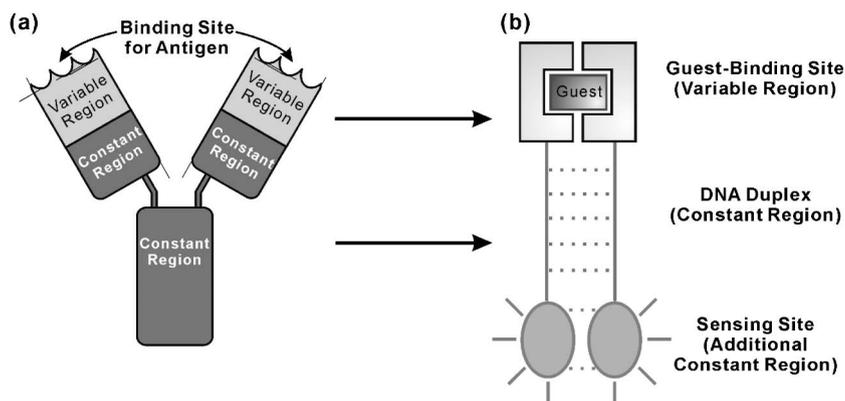


Fig. 7. The Structural Motif of Antibodies (a) and the Molecular Design for Fluorescence Sensors Working in Water (b)

on形式でモニターできるということの意味する。一方、従来型のMBを用いてRNase Hの速度論的解析を行った場合、on/off形式でモニターしなければならない。さらに、State 2においてもバックグラウンド蛍光が残っているため、高いS/N比を得ることは難しいと予想される。彼らが構築したシステムから得られた K_m や k_{cat} の値は、基質として放射線ラベル化された二重鎖を用いた実験から得られた値とほぼ同じであることも報告されている。

3. 抗体構造をモチーフとしたモノマー/エキシマースイッチング型センサ分子

われわれは以前より、抗体の構造上の特徴を分子認識センサに応用できないかと考えていた。抗体は一定の構造を取る定常部と、各種抗原に対して形状を変化させる可変部から構成されている [Fig. 7 (a)]。この可変部の存在により、抗体は抗原に対して多様性を獲得することができる。また抗体は、2

つのユニットがジスルフィド結合を介して二量化することでその機能を発揮することができる。二量化をキーワードとしてEMS-MBのステム領域を利用すれば、抗体構造をモチーフとしたモノマー/エキシマースイッチング型センサ分子を創製できるのではないかと考えた。そこで、ゲスト分子に対して多様性を備えたセンサ分子群を構築することを目指し、抗体構造をモチーフとして分子設計を行った [Fig. 7 (b)].¹⁶⁾ 抗体の定常部に相当する部位としてDNA鎖並びに蛍光発色団(ピレン)、すなわちEMS-MBのステム領域を利用する。ステム領域のもう一方の末端に可変部として様々なゲスト分子認識部位を導入することで、ゲスト分子に対して多様性を有するセンサ分子群へと展開できる。ゲスト分子認識部位は、これまでに開発された既存の人工ホスト分子からペプチド・糖といった天然分子まで、DNA鎖の末端に導入さえできれば限定されること

はない。さらに、同一種の分子認識部位を2つ導入したセンサ、すなわちホモ型に限定されず、ヘテロ型のセンサ分子も構築することが可能である。

抗体構造をモチーフとしたモノマー/エキシマースイッチング型センサ分子のセンシング機構について述べる (Fig. 8)。ターゲット分子 (ゲスト分子) が認識されることが駆動力となって2つのユニットが二量化し、ピレンのモノマー発光からエキシマー発光へのスイッチングが起こる。定常部としてのDNA鎖はセンサ分子の水溶性に寄与するだけでなく、次のような特長を与える。それは“ターゲット分子に対する認識能を調節できる”という点である。従来のセンサ分子の場合、センシング機能が発揮される ΔG_{total} は分子認識部位とターゲット分子との相互作用のみで決定される。われわれが設計したセンサ分子の場合、センシングの起こる ΔG_{total} はDNA二重鎖形成の ΔG_1 とターゲット分子との会合による ΔG_2 の合計で決定される。ターゲット分子との会合が弱い場合 (ΔG_2 の負の絶対値が小さい) でも、それに合わせてDNA鎖の鎖長・配列を変えることで、センシング機能を発揮させることが可能となる。

3-1. クラウンエーテルをゲスト分子認識部位として用いた水溶性カチオンセンサ 15-クラウン-5-エーテルは、カリウムカチオン (K^+) とサンドイッチ型 (2:1) の錯形成をすることが知られている。¹⁷⁾ 15-クラウン-5-エーテルを用いた代表的な K^+

センサとして Teramae らによって開発されたものがある。^{18,19)} 彼らのセンサ分子は、アルキル鎖の一方にアミド結合を介してベンゾ 15-クラウン-5-エーテル、もう一方にピレンが直接連結されている。 K^+ と γ -シクロデキストリン (2枚のピレンを取り込み、二量化を促進させるため) をセンサ分子の水溶液に加えるとピレンのモノマー発光からエキシマー発光へのスイッチングが起こる。しかしながら、彼らのセンサ分子は、過剰の γ -シクロデキストリンを必要とするだけでなく、少量の有機溶媒を必要とする。

Figure 9 にわれわれが開発した水溶性カチオンセンサ **1** の構造とカチオンセンシングの概要を示す。¹⁶⁾ **1** の塩基配列は室温において、二重鎖を形成しないぎりぎりの状態になるよう7塩基対とした。**1** は2種類のモノマーユニットからなり立っている。DNA鎖の5'末端にピレン、3'末端にベンゾ 15-クラウン-5-エーテルを連結することで **1a** とし、**1b** はピレンとベンゾ 15-クラウン-5-エーテルが **1a** に対して相補的な配列を有するDNAに逆の様式で連結されている。**1 (1a/1b)** が存在する水溶液中に K^+ を加えれば、ベンゾ 15-クラウン-5-エーテルとの間で2:1錯体が形成されると同時にDNA二重鎖形成が起こり、ピレンのモノマー発光からエキシマー発光へのスイッチングが起こると期待される。

センサ **1** のカチオン認識能の評価は、ターゲットカチオン存在下での蛍光滴定実験により行った

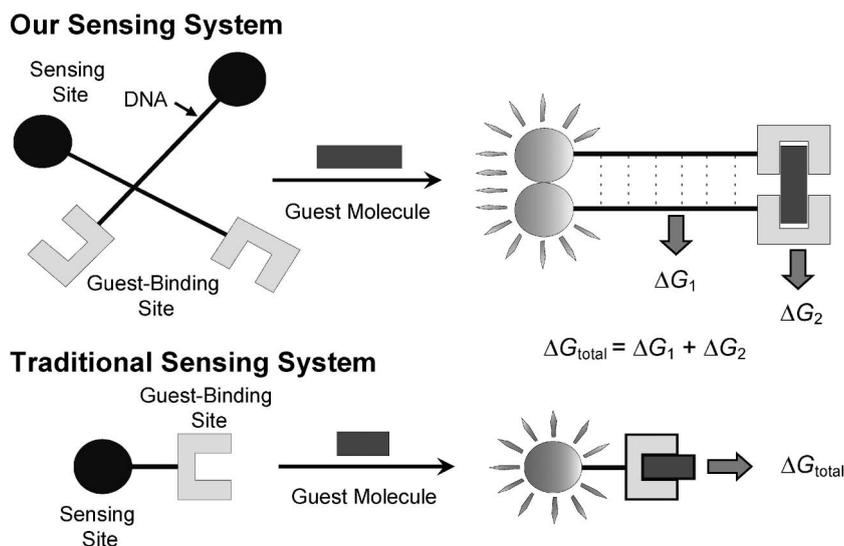


Fig. 8. A Comparison of Our Sensing System with a Traditional One

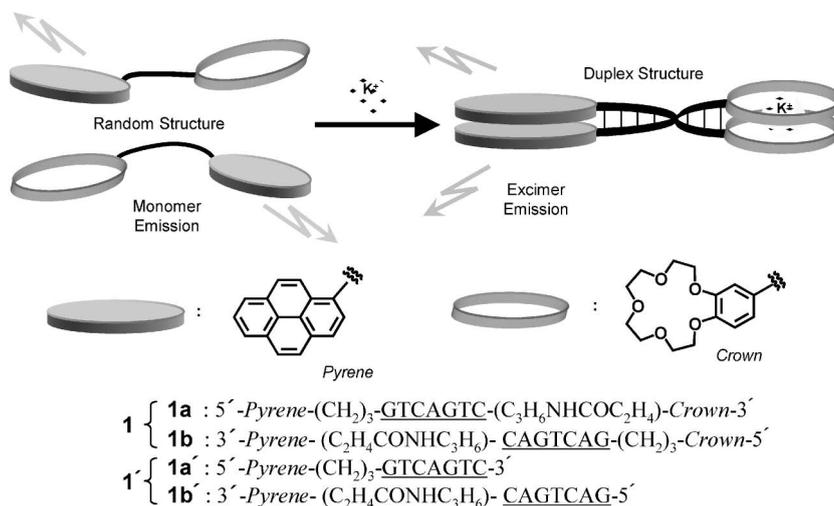


Fig. 9. A Schematic Representation of a Duplex-based Potassium Sensor **1** (**1a** + **1b**) with Monomer-excimer Switching, and the Chemical Structures of **1** and **1'** (**1a'** + **1b'**)

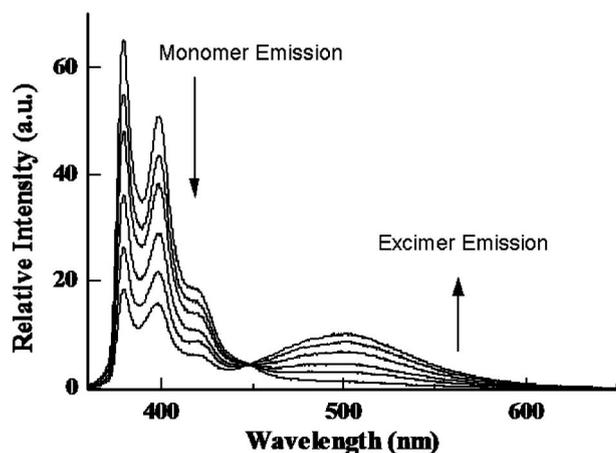


Fig. 10. Fluorescence Titration Spectra of **1** ([**1a**] = [**1b**]: 200 nM, [Tris-HCl]: 20 mM, at pH 8.0) on Titration with KCl (5–100 mM); $\lambda_{\text{excitation}} = 350$ nm.

(Fig. 10). **1** を含む水溶液中に KCl を加えていくと、モノマー発光 (380 nm) が徐々に減少し、それにつれてエキシマー発光 (500 nm) の増大が観測された。EMS-MB の場合と同様に等発光点 (448 nm) が観測されたことから、溶液中に存在する化学発光種は 2 種のみであるといえる。

しかしながら、アルカリ金属カチオンは DNA のリン酸基と非特異的に相互作用して、リン酸基の陰イオン間の静電反発を遮蔽し、二重ラセン構造を安定化することが知られている。²⁰⁾ そこで、クラウン部位の存在が蛍光発光スイッチングに寄与していることを示すために、クラウンエーテル部位を持たない **1'** (**1a'**/**1b'**) を用いた参照実験を行った (Fig.

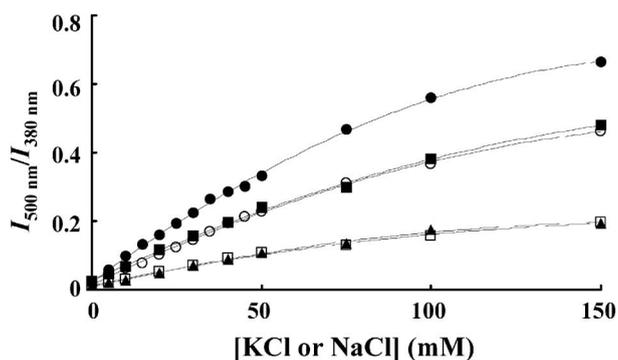


Fig. 11. Plots of the Intensity Ratio ($I_{500 \text{ nm}}/I_{380 \text{ nm}}$) against the concentration of KCl and NaCl

([Sensor]: 200 nM, [Tris-HCl]: 20 mM, at pH 8.0). ●: **1a/1b** and KCl, ■: **1a'/1b'** and KCl, ○: **1a/1b** and NaCl, □: **1a'/1b'** and NaCl. Plot for **1a'/1b'** and KCl was almost identical to that for **1a/1b'** and KCl.

11). KCl 添加時の発光強度比 ($I_{500 \text{ nm}}/I_{380 \text{ nm}}$) の変化を、(**1a** + **1b**)、(**1a** + **1b'**)、(**1a'** + **1b**)、(**1a'** + **1b'**) それぞれの組み合わせにおいて測定した。発光強度比変化の大きさは、(**1a'** + **1b'**) < (**1a** + **1b'**) ≃ (**1a'** + **1b**) < (**1a** + **1b**) という順になった。ともにクラウン部位を持たない (**1a'** + **1b'**) の組み合わせにおいても、わずかに発光強度比の変化がみられた。この結果は前述の遮蔽効果により、DNA 二重ラセン構造が安定化されたためだと考えられる。また、一方のモノマーユニットのみクラウン部位を持つ (**1a** + **1b'**)、(**1a'** + **1b**) の組み合わせでの発光強度比の変化量は、(**1a'** + **1b'**) と (**1a** + **1b**) の組み合わせにおける値の中間程度であった。このことから、クラ

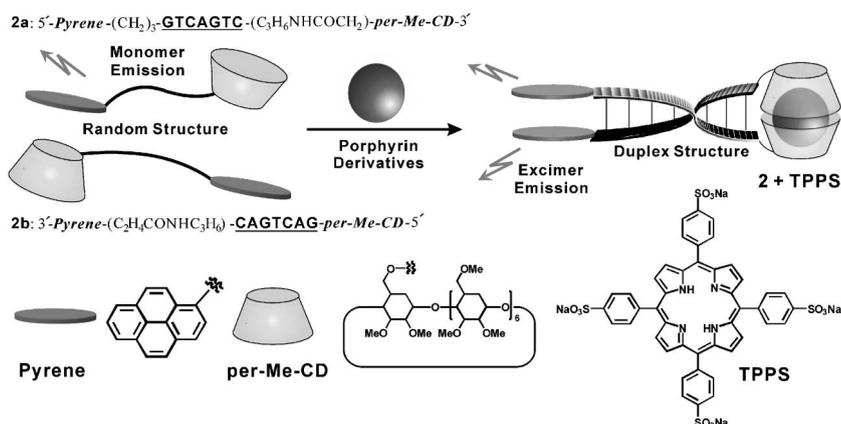


Fig. 12. A Schematic Representation of a Duplex-based Fluorescent Sensor **2** with Monomer-excimer Switching in the Presence of TPPS as a Guest Molecule and Chemical Structures of **2** (**2a**+**2b**) and TPPS

ウン部位と K⁺ との間で 2 : 1 錯体が形成され、クラウン部位が発光スイッチングに寄与していることが示唆された。また、Na⁺ と K⁺ に対する選択性を調べると、**1** はクラウン部位の存在により K⁺ に対する選択性を有することが分かった。

現在までに水中で K⁺ をセンシングする分子は数例報告されており、²¹⁻²³⁾ それらと比べるとわれわれのセンサ分子が特異的に高い選択性を有する訳ではない。しかしながら、抗体構造をモチーフとした分子設計の妥当性を証明することができた。そこで、可変部に様々なゲスト分子認識部位を導入することで、多様性を備えた水溶性センサ分子群の構築を目指すことにした。

3-2. シクロデキストリンをゲスト分子認識部位として用いた水溶性センサ 先ほどのカチオンセンサの場合、DNA 鎖と金属カチオンとの相互作用を無視することができないという問題が生じた。そこで、DNA に対して相互作用しないゲスト分子に対する認識部位をセンサに導入すればよいと考え、メチル化 β -シクロデキストリン (per-Me- β -CD) と Tetraphenylporphyrin Tetrasulfonic Acid (TPPS) との錯形成に着目した。per-Me- β -CD はその空孔内に疎水性のゲスト分子を取り込み、特に TPPS とは水中で極めて安定な 2 : 1 の錯形成をすることが知られている。²⁴⁾ 可変部として per-Me- β -CD を導入したセンサ **2** の構造と TPPS のセンシングの概要を Fig. 12 に示す。²⁵⁾

センサ **2** におけるシクロデキストリン部位と TPPS は 2 : 1 の錯形成をし、モノマー発光からエ

キシマー発光へのスイッチングによってターゲット分子を検出できることが分かった。現在、ゲスト分子認識部位として、非修飾のシクロデキストリンや Cucurbit [n] uril を導入したセンサ分子を開発中である。さらに、ゲスト分子認識部位が異なる“ヘテロ型”センサ分子の開発も検討している。

今回紹介した抗体構造をモチーフとした 2 種類のセンサ分子は、二量化して初めてその機能を発揮するので、ターゲット分子をセンシングする際エントロピー損失を避けることができない。より効果的なセンシングを目指すには、二量化を伴わない新しい分子設計が必要となる。例えば、二量化によるエントロピー損失を抑えるため、2 つのモノマーユニットをリンカー (オキシエチレン鎖など) で結ぶのも 1 つの手段である。

4. おわりに

筆者らの研究である「エキシマー/モノマースイッチングモレキュラービーコン」と「抗体構造をモチーフとしたモノマー/エキシマースイッチング型センサ分子」を中心に述べてきた。今回紹介した蛍光プローブ・センサ分子が、ホスト/ゲスト化学・超分子化学さらには分析化学といった分野に新しい風を吹き込み、次世代のプローブ・センサ分子が創出される契機になることを期待する。

REFERENCES

- 1) Winnik F. M., *Chem. Rev.*, **93**, 587-614 (1993).
- 2) Saito Y., Okamoto A., Saito I., *Bioindustry*,

- 23, 56–62 (2006).
- 3) Zama M., Bryan P. N., Harrington R. E., Olins A. L., Olins D. E., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**, 31–41 (1978).
 - 4) Lehrer S. S., “Subcellular Biochemistry, Vol. 24: Proteins: Structure, Function, and Engineering,” eds. by Biswas B. B., Roy S., Plenum, New York, 1995, pp. 115–132.
 - 5) Wieb van der Meew B., “Subcellular Biochemistry, Vol. 13: Fluorescence Studies on Biological Membranes,” ed. by Hilderson H. J., Plenum, New York, 1988, pp. 1–53.
 - 6) Yang R.-H., Chan W.-H., Lee A. W. M., Xia P.-F., Zhang H.-K., Li K., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 2884–2885 (2003).
 - 7) Tyagi S., Kramer F. R., *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303–308 (1996).
 - 8) Fang X., Mi Y., Li J., Beck T., Schuster S., Tan W., *Cell Biochem. Biophys.*, **37**, 71–81 (2002).
 - 9) Tan W., Fang X., Mi Y., Li J., Liu X., *Chem. Eur. J.*, **6**, 1107–1111 (2000).
 - 10) Stryer L., *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 819–846 (1978).
 - 11) Masuko M., Ohtani H., Ebata K., Shimadzu A., *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5409–5416 (1998).
 - 12) Paris P. L., Langenhan J. M., Kool E. T., *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3789–3793 (1998).
 - 13) Fujimoto K., Shimizu H., Inouye M., *J. Org. Chem.*, **69**, 3271–3275 (2004).
 - 14) Maeda H., Maeda T., Mizuno K., Fujimoto K., Shimizu H., Inouye M., *Chem. Eur. J.*, **12**, 824–831 (2006).
 - 15) Chen Y., Yang C. J., Wu Y., Conlon P., Kim Y., Lin H., Tan W., *ChemBioChem.*, **9**, 355–359 (2008).
 - 16) Fujimoto K., Muto Y., Inouye M., *Chem. Commun.*, 4780–4782 (2005).
 - 17) Poomia N. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 1012–1019 (1974).
 - 18) Yamauchi A., Hayashita T., Kato A., Nishizawa S., Watanabe M., Teramae N., *Anal. Chem.*, **72**, 5841–5846 (2000).
 - 19) Yamauchi A., Hayashita T., Nishizawa S., Watanabe M., Teramae N., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2319–2320 (1999).
 - 20) Wolfe A. R., Meehan T., *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3147–3150 (1994).
 - 21) Ueyama H., Takagi M., Takenaka S., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14286–14287 (2002).
 - 22) He H., Mortellaro M. A., Leiner M. J. P., Fraatz R. J., Tusa J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1468–1469 (2003).
 - 23) Gunnlaugsson T., Leonard J. P., *Chem. Commun.*, 2424–2425 (2003).
 - 24) Kano K., Nishiyabu R., Asada T., Kuroda Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9937–9944 (2002).
 - 25) Fujimoto K., Muto Y., Inouye M., *Bioconjugate Chem.*, **19**, 1132–1134 (2008).