

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目： 基盤研究(A)
 研究期間： 2005～2008
 課題番号： 17205009
 研究課題名（和文） 特異性を有する分子認識界面の構築とその化学センシングへの応用
 研究課題名（英文） Molecule recognition interface with specificity and its application for chemical sensing
 研究代表者 寺前 紀夫 (Teramae Norio)
 東北大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号： 70114569

研究成果の概要：

化学センサーの構築で界面など新たな分析反応場を用いることは、従来の体系下では達成できなかった新規な選択性や特異性の発現へと発展しうる。この点に着目して、脱塩基部位を有するオリゴDNAを用い、疎水的ナノ空間であるDNA脱塩基部位における蛍光性有機小分子による核酸認識、また核酸塩基による有機小分子の分子認識について検討を進めた。また、アルミナ細孔膜にメソ細孔を有するシリカ界面活性剤ナノチャンネル集合体を充填した薄膜(NAM)について、細孔構造の制御法の開発、メソ細孔内部のキャラクタリゼーション、メソ細孔を反応場とした分離機能やセンシング機能の開発などを検討し、それぞれに対して成果を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	21,900,000	6,570,000	28,470,000
2006 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2007 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	37,900,000	11,370,000	49,270,000

研究分野： 化学

科研費の分科・細目： 複合化学・分析化学

キーワード： 化学センシング, 分子認識, 核酸, 脱塩基, メソ細孔

1. 研究開始当初の背景

化学センサーの構築で界面など新たな分析反応場を用いることは、従来の溶液化学の体系下では達成できなかった新規な選択性や特異性の発現へと発展しうる。例えば、水素結合を介した分子認識とセンシングでは、認識反応が水中であると錯生成反応は殆ど進行で

きない。しかし、生体内ではタンパク質がその折り畳まれた構造内部に疎水空間を構築して水中で高い選択性と結合能を有する分子認識を達成している。この点に着目して、DNA二重鎖内や多孔性膜中にナノサイズの空間を作成し、ナノ空間の評価並びにナノ空間での反応について検討し、新規化学センシング系の開拓を目指した。

2. 研究の目的

ナノ空間における化学反応に着目して、脱塩基(AP)部位を有するオリゴ DNA を用い、疎水的ナノ空間である DNA 脱塩基部位における蛍光性有機小分子による核酸認識、また核酸塩基による有機小分子の分子認識について検討を進めた。また、アルミナ細孔膜にメソ細孔を有するシリカ界面活性剤ナノチャンネル集合体を充填した薄膜(NAM)について、細孔構造の制御法の開発、メソ細孔内部のキャラクタリゼーション、メソ細孔を反応場とした分離機能やセンシング機能の開発などを検討することとした。

3. 研究の方法

DNA の脱塩基空間を利用する核酸塩基認識の方法として、標的塩基を含む標的 DNA 鎖に対し、標的塩基と対向する部位の塩基が欠損し、それ以外は標的 DNA と相補的な塩基配列を有するプローブ DNA 鎖をハイブリダイズさせて二重鎖を形成させる。これに蛍光性リガンドを添加したとき、リガンドが脱塩基空間に取り込まれて標的塩基と結合すればリガンドの環境の変化に対応した蛍光変化が期待できる。脱塩基部位としては、天然に存在する形態を模したテトラヒドロフラニル(THF)基が残存するもの(dSpacer)や、THF 基を除去してプロピレン鎖が残存するもの(Spacer-C3)、また標的塩基に相補的な2本の DAN 鎖を用い、標的塩基の対向部位に空間があるもの(gap site)を用いた。分子認識機能の評価は、紫外・可視吸収、蛍光、CD、NMR などの分光法及び熱力学的解析により行った。

メソ細孔の評価・解析では時間分解蛍光の測定が主体であり、その概略を図1に示す。光源には、SP社のフェムト秒レーザーシステムを用いた。CW 固体レーザー(Millennia-Pro)でポンプしたモードロック Ti: サファイアレーザー(Tsunami 3960)からのパルス光をパルスセクター(Model 3980)により変調(80 MHz から 4 MHz)し、第二高調波発生装置(GWU)によって波長変換したパルス光(385 nm or 390 nm, 100 fs, 4MHz)を励起光とした。パルス光は、クマリン色素をシリカメソ細孔内部に取り込んだ NAM に対して入射角度 45° で照射した。NAM から発生する蛍光を分光した後、ストリークカメラ(浜松ホトニクス, C43345)で検出した。なお、本測定系での装置応答関数はストリークカメラの観測時間領域に依存し、50 ps (2 ns フルスケール)、100 ps (5 ns フルスケール)、170 ps (10 ns フルスケール)、200 ps (20 ns フルスケール)である。測定によって得られた時間分解

蛍光スペクトルの極大波長は、測定データを log-normal 関数を用いたフィッティングにより算出した。

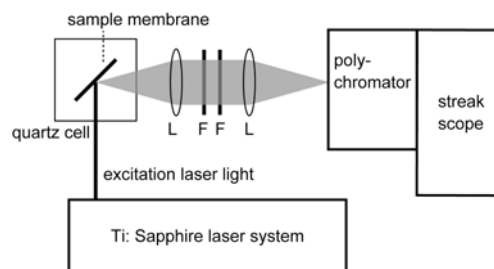


図1 時間分解蛍光測定系

4. 研究成果

C 選択性を示す AMND、G 選択性を示すプテリンや 2,3-ジメチルプテリジン、A 選択性を示すアロキサジン、T 選択性を示す、アミロリド、などについて AP 部位含有 DNA 二重鎖との錯生成能を検討した。その結果の一部を図2に示す。これらのリガンドを使い分けることによって AP 部位に対向する特定の塩基を選択的に検出できる。このことは、AP 部位含有 DNA とリガンドの組み合わせによって SNPs の検出が行えることを意味する。リガンドとしてアロキサジンを用いて AP 部位の上下の塩基が各

4種類異なる配列について検討した結果を図3に示す。AP 部位の 5'側がピリミジン塩基の時には蛍光消光効率は小さいものの、プリン塩基に対しては解離定数(結合定数の逆数)にして 1 μM 以下の消光効

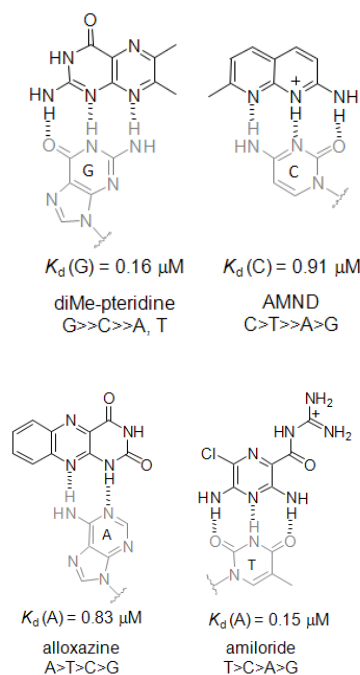


図2 蛍光性リガンド

率を示すので、少なくとも半数以上の A に関連した SNPs 検出にアロキサジンを適用できることが分かった。

そこで、PCR 産物を用いた K-ras 遺伝子 codon12 の GGT から GAT への変異の検出を

センス鎖に対して行った。G 選択的なジメチルプテリジンと A 選択的なアロキサジンの二種類のリガンドを用いて蛍光法により SNPs タイピングした結果、G/G と A/A のホモ接合、G/A のヘテロ接合を明瞭に分離検出でき、AP 部位含有 DNA と蛍光性リガンドの併用により、PCR 産物の前処理無しに迅速に SNPs タイピングする方法の確立を達成した。

また、C-選択的なリガンドであるナフチリジン誘導体について、メチル置換基の導入の効果について熱力学的に検討した。メチル基の有無に関わらず、AP site におけるシトシンとの錯形成反応がエンタルピー駆動であることが示され、AP site 空間内における錯形成であることが示唆された。リガンドごとで比較すると、メチル基を持たない AND では、錯形成反応において $\Delta H = -20.5$ kcal/mol であるのに対し、 $-T\Delta S$ は 13.3 kcal/mol であり、エンタルピー変化の 65% 近くをエントロピー損失 ($\Delta H/(-T\Delta S)$) していることがわかる。メチル置換基の数が 1, 2, 3 である AMND、ADMND、ATMND ではそれぞれ 56%、46%、25% をエントロピー損失しており、メチル基の数に対応してエントロピー損失が軽減し、結果として結合親和力が向上していることが明らかとなった。熱力学パラメータをさらに詳細に解析するため、非電解質効果 ΔG_i の詳細を検討した。エンタルピー変化 ΔH の温度依存性から熱容量変化 ΔC_p ($\Delta C_p = \Delta H/\Delta T$) を得れば、 $\Delta G_{hyd} = 80 (\pm 10) \Delta C_p$ より疎水性効果の寄与分 ΔG_{hyd} を求めることができる。並進回転運動変化の寄与 (ΔG_{rot})、コンフォメーション変化の寄与 (ΔG_{conf}) ならびに分子間相互作用の寄与 (ΔG_{mol}) を算出し、AP site 空間におけるナフチリジン誘導体/シトシン相互作用のエネルギープロフィールを得た。AP site におけるナフチリジン誘導体とシトシ

ンとの錯形成反応の駆動力は、錯生成に伴う DNA からの水の放出による疎水性効果 (ΔG_{hyd}) であり、この疎水性効果が錯形成反応に著しく不利な並進回転運動変化の寄与 (ΔG_{rot}) を補い、全体として有利な錯形成反応が進行していることが分かった。また、一般的にコンフォメーション変化は不利な寄与であると考えられるので、水素結合などの分子間相互作用の寄与は有利な寄与をもたらしていると考えられる。このエネルギープロフィールが、グルーブバインダーよりもインターカレーターのエネルギープロフィールと類似していることはリガンドの脱塩基空間への挿入を支持するものである。一方、ATMND の結合親和力がインターカレーターの 10-100 倍近く大きく、チル基を 3 つ有する ATMND では AND に比べて疎水性効果の寄与が著しく有利であり、この効果がシトシンとの結合親和力向上をもたらしている元と考えられた。また、コンフォメーション変化の寄与 (ΔG_{conf}) と分子間相互作用の寄与 (ΔG_{mol}) の和については ATMND の方が若干不利になっており、嵩高い ATMND の結合により AP site 部位でコンフォメーション変化が生じているためと考えられる。

上記の他、リガンドへの置換基の導入により、結合能の向上や選択性の向上を達成した。さらに蛍光性核酸アナログを AP-DNA と組み合わせることでテオフィリンの選択的検出、また AP-DNA をアプタマーと組み合わせることでラベルフリーのアプタセンサーの開発を達成した。

NAM に関連した研究では、シリカメソ細孔内部のクマリン色素 C480 の蛍光減衰曲線で、異なる波長領域 (短波長側: 435-440 nm、中間波長: 470-475 nm、長波長側: 550-565 nm) を比較した結果、短波長側での速い蛍光減衰が中間波長域ではゆるやかになることが観測された。一方、長波長側では、励起パルス光のパルス幅よりも長い時間領域においてゆっくりとした蛍光の立ち上がりを確認できた。得られた蛍光ダイナミックストークシフト (DSS) の寿命値は、CTAB ミセル全体の回転に関する寿命値 (65 ns) に比べて一桁程度小さく、DSS に対する CTAB 全体の回転の影響は小さいと考えられ、観測された蛍光 DSS は、細孔内部のクマリン色素近傍における水分子、CTA、および臭化物イオンの再配向過程を反映すると結論できる。4 種類のクマリン色素の溶媒和ダイナミクスの挙動を

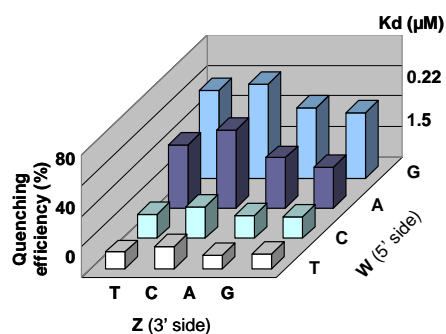


図3 アロキサジンの蛍光に及ぼす脱塩基空間隣接塩基の効果。

比較すると、C480 と C343 では溶媒緩和時間とその成分比共にほぼ同じ値であるのに対し、PAC343 の溶媒緩和時間は他 2 つのクマリン色素に比べて 1.3~1.5 倍程度小さい。このような溶媒和ダイナミクスの違いは、PAC343 近傍の環境が C480、C343 近傍の環境と異なることを意味する。シリカ-CTAB ナノ複合体内部は、CTA のカチオン部位とその対アニオンである臭化物イオンとで構成されるイオン性界面と、CTA のアルキル鎖から成る疎水的な領域とに区分される。シリカ-CTAB ナノ複合体の細孔内部へのアニオン性色素の抽出がアニオン交換により生じることを明らかにした。これにより、アニオン性の C343 はアニオン交換によってシリカ-CTAB ナノ複合体内部に抽出され、CTA のカチオン部位との静電相互作用によってイオン性界面近傍に分布すると考えられる。一方、C480 は CTA のカチオン部位との静電相互作用によってイオン性界面近傍に分布すると考えられる。以上の通り、C480 と C343 が同程度の溶媒和ダイナミクスを示す結果は、両色素が共に同様な環境、つまりイオン性界面近傍に分布することを示唆するものである。一方、疎水的なプロピル鎖を有する PAC343 では、C480 と C343 に比べて速い溶媒緩和時間が得られた。PAC343 の比較的速い溶媒和ダイナミクスは、疎水的な細孔内部に PAC343 のクマリン骨格が分布するためと考えられる。

シリカ-CTAB ナノ複合体内部における一連のフェロセン誘導体の物質移動時間から、フェロセン誘導体の見かけの拡散係数は電荷を有するフェロセン誘導体では電荷の正負に依らずほぼ同程度であるのに対し、中性で疎水的なフェロセン誘導体では拡散係数が 2~5 倍程度大きな値となることが分かった。電荷を有するフェロセン誘導体は、イオン性界面のイオン種との静電相互作用によってイオン性界面近傍を、一方、中性のフェロセンはより疎水的な細孔中央部を拡散するためと考えられる。このように、手法と原理が全く異なる二種の測定から、分子の分布状態とシリカ-CTAB ナノ複合体内部の環境について同一の描像が得られた。さらに、界面活性剤ミセルを取り除いたシリカメソ細孔を有する Ca1-NAM と TMS-NAM を用い、シリカメソ細孔内部に閉じ込められた C153 の溶媒和ダイナミクスについて検討した。その結果、C153 は単分散状態でシリカメソ細孔内部に

存在すると考えられた。また、溶媒和ダイナミクスからエタノール溶媒分子がシリカメソ細孔内部で組織化した構造を有することが示された。

この他、NAM 中のメソ空間を用いる反応について、酵素を導入した膜による触媒能を検討し、良好な結果を得た。また、配位子を含んだ前駆体溶液を用いるワンポット合成について検討した結果、配位子であるバソフェナントロリンの濃度が 20 mM 以上になるとメソ細孔構造の秩序性が保たれなくなることが示されたが、15mM の濃度では溶液中の鉄イオンについて濃度 10 μ M までの定量分析が可能であることが分かった。このほか、各種細孔サイズの作成や nm オーダーの精密サイズ分離を達成した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 47 件)

1. Minjie Li, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa, Takehiro Seino, Kodai Nakamura, and Norio Teramae, "2-Aminopurine-Modified Abasic Site-Containing Duplex DNA for Highly Selective Detection of Theophylline", *J. Am. Chem. Soc.*, **131** (7), 2448-2449 (2009). 査読有
2. Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa, Keitaro Yoshimoto, Takehiro Seino, Kotaro Morita, and Norio Teramae, Thermodynamic characterization of the binding of naphthyridine derivatives to cytosine in an AP site-containing DNA duplex, *Nucleic Acids Res.*, **37** (5), 1411-1422 (2009). 査読有
3. Akira Yamaguchi, Kazuhiro Hotta, and Norio Teramae, Optical waveguide sensor based on a porous anodic alumina/aluminum multilayer film, *Anal. Chem.*, **81**, (1) 105-111 (2009). 査読有
4. Zhiqiang Ye, Burki Rajendar, Dai Qing, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae, "6,7-Dimethylumazine as a potential ligand for selective recognition of adenine opposite an abasic site in DNA duplexes", *Chem. Commun.*, 6588-6590 (2008). 査読有
5. Toshio Kamijo, Akira Yamaguchi, Shintaro

- Suzuki, Norio Teramae, Tetsuji Itoh, and Takuji Ikeda, "Solvation Dynamics of Coumarin 153 in Alcohols Confined in Silica-Nanochannels". *J. Phys. Chem. A*, **112**, (46), 11535-11542 (2008). 査読有
6. Akira Yamaguchi, Hideaki Kaneda, Wensheng Fu and Norio Teramae, "Structural control of surfactant-templated mesoporous silica formed inside columnar alumina pores", *Adv. Mater.*, **20** (5), 1034-1037 (2008). 査読有
 7. Burki Rajendar, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae, "Alloxazine as a ligand for selective binding to adenine opposite AP sites in DNA duplexes and analysis of single-nucleotide polymorphisms" *Org. Biomol. Chem.*, **6** (3), 670-673 (2008). 査読有
 8. Wensheng Fu, Akira Yamaguchi, Hideaki Kaneda and Norio Teramae, "Enzyme catalytic membrane based on surfactant-templated mesoporous silica formed within porous anodic alumina membrane" *Chem. Commun.*, **2008**, (7), 853-855. 査読有
 9. Burki Rajendar, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa, and Norio Teramae, "Improvement of base selectivity and binding affinity by controlling hydrogen bonding motifs between nucleobases and isoxanthopterin: Application to the detection of T/C mutation", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 3682-3685 (2007). 査読有
 10. Yong Chen, Akira Yamaguchi, Toshiyuki Atou, Kotaro Morita, Norio Teramae, "Template Synthesis of Arrays of Meso-sized One-Dimensional Gold Nanowires by Electrodeposition", *Chem. Lett.*, **35**, 1352-1353 (2006). 査読有
 11. Akira Yamaguchi, Yosuke Amino, Kentaro Shima, Shintaro Suzuki, Tomohisa Yamashita, Norio Teramae, "Local environments of Coumarin Dyes within Mesostructured Silica-Surfactant Nanocomposite", *J. Phys. Chem. B*, **110**, 3910-3916 (2006). 査読有
 12. N. B. Sankaran, Seiichi Nishizawa, Takehiro Seino, Keitaro Yoshimoto, Norio Teramae, "Abasic Sites-Containing Oligodeoxynucleotides as Aptamers for Riboflavin", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 1563-1568 (2006). 査読有

[学会発表] (計 232 件)

国内での学会・学術講演会における招待・特別講演

1. 寺前紀夫, 分光分析化学と分子認識, 日本分光学会年次講演会, 東北大学, 仙台, 2008年11月19日.
2. 西澤精一, DNA 二重鎖/リガンド相互作用解析と分析化学的応用, 「分離機能とセンシング機能の化学」セミナー, 東北大学, 2008年3月22日.
3. 寺前紀夫, メソポーラスシリカ包含アルミナ膜の特性と応用, (社)新化学発展協会, 第287回先端化学技術部会フォーラム, 2008年2月22日.
4. 寺前紀夫, DNA 二重鎖内の脱塩基空間を反応場とする分子認識・遺伝子分析, 21世紀COEシンポジウム, 東北大学, 2007年3月16日.
5. 西澤精一, 新しいDNA結合試薬による核酸塩基認識とSNPs検出, 第9回機能構造と分析化学シンポジウム, 東北大学, 2006年12月2日.
6. 寺前紀夫, 核酸塩基内の微小疎水場空間を反応場とする分子認識・遺伝子分析, 高分子表面研究会, 東京工業大学, 2006年10月13日.
7. 山口 央, ナノチャンネル集積膜の作製と物質創製場への応用, 第23回無機分析化学コロキウム, 川渡セミナーハウス, 2006年6月2-3日.
8. 西澤精一, DNA結合性小分子リガンドによる一塩基多型検出 ~脱塩基空間の構築と精密核酸認識~, 日本薬学会第126年会, 仙台国際センター, 2006年3月28-30日.
9. 寺前紀夫, 光機能性分子認識試薬の開発と規制反応場特異的分子認識, 日本化学会第86春季年会, 日本大学理工学部, 2006年3月27-30日.
10. 寺前紀夫, 水素結合能を持つ蛍光リガンドによる核酸塩基認識, 理研シンポジウム・第6回 分析・解析技術と化学の最先端, 理化学研究所, 2005年12月8日.
11. 寺前紀夫, オリゴDNA二重鎖内のナノ空間を反応場とする一塩基置換検出, 第5回創薬工学シンポジウム, 千里ライフサイエンスセンター, 2005年11月18-19日.

- 1 2. 西澤精一,新しいDNA結合リガンドと一塩基多型 (SNPs) 検出 ～脱塩基部位空間を反応場とする核酸認識～, 日本大学文理学部自然科学研究所、化学科シンポジウム・生命に関わる物質と先端的計測法の接点, 日本大学, 2005年10月22日.
- 1 3. 寺前紀夫, シリカ、界面活性剤メソチャンネルの機能化と応用, ゼオライトフォーラム「ナノ構造規則性材料の新しい合成戦略」, 東京農工大, 2005年9月5日.

〔図書〕 (計 4 件)

1. 寺前紀夫、西澤精一、佐藤雄介、市橋俊希、「第25章 DNA二重鎖内の脱塩基空間を反応場とする遺伝子分析」、pp.346-358、西岡利勝、黒田孝二、遠藤一央編、「高分子表面・界面分析法の新展開」、株式会社シーエムシー出版、2009年3月2日 (第一刷発行)
2. 寺前紀夫、西澤精一、脱塩基DNAの微小空間を反応場とする遺伝子分析」、pp.94-102、北森武彦編、「新しい地平をひらく分析手法の最前線」。東京化学同人、2009年1月10日 (第1版第1刷発行)。
3. 山口 央、寺前紀夫、金属ナノ構造体のラマン測定、(第6章・第3節)、西岡利勝、錦田晃一、寺前紀夫監修、「顕 微赤外・顕微ラマン分光法の基礎と応用」、技術情報協会、2008年3月31日発行。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺前 紀夫 (TERAMAE NORIO)
(70114569)

東北大学・大学院理学研究科・教授
Norio Teramae, Professor (70114569)
Tohoku University, Graduate School of Science.

(2) 研究分担者

西澤 精一 (NISHIZAWA SEI-ICHI)
東北大学・大学院理学研究科・准教授
Seiichi Nishizawa, Associate Professor
(40281969)

Tohoku University, Graduate School of Science.

山口 央 (YAMAGUCHI AKIRA)

東北大学・大学院理学研究科・助教
Akira Yamaguchi, Assistant Professor
(60004470)
Tohoku University, Graduate School of Science.