

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05315

研究課題名(和文) グアニン四重鎖構造に基づくスイッチング可能なDNA金属酵素の開発

研究課題名(英文) Development of G4DNA-based switchable metalloenzymes

研究代表者

朴 昭映 (Park, Soyoung)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：10628556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ビピリジン配位子を含む四重鎖-二本鎖ハイブリッドDNAを構築し、不斉マイケル付加反応において良好なエナンチオ選択性で目的物を得ることに成功した。興味深いことに、ビピリジン配位子とユリア基を組み合わせた触媒では、逆のエナンチオマーが得られた。このことから、DNAハイブリッド触媒の反応性や選択性は、機能性分子の空間的配置によって生じる反応場の構造に依存していることがわかった。さらに、申請者はアミノ酸が持つ金属配位能やルイス酸触媒機能に着目し、アミノ酸と核酸を融合した新しいバイオハイブリッド分子を開発し、ペルオキシダーゼとして応用できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球の資源を有効に活用することや環境に負荷をかけない不斉触媒の開発は持続可能な社会の実現のため重要な課題になっている。本研究は、生体高分子であるDNAを用いてハイブリッド触媒を開発し、環境調和型合成プロセスを確立するという学術的重要性と社会的な貢献を満たすプロジェクトである。また、申請者の研究はDNAナノテクノロジーと融合することにより、疾患に関連する特定の配列を切断するDNAナノ酵素を開発することが期待できる。さらに、アミノ酸-DNAコンジュゲートは生理活性を持つペプチドをミミックした機能性分子としてバイオメディカル領域への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Asymmetric catalysis based on DNA/RNA scaffolds has been actively studied and the field has consistently expanded. Our group has site-specifically introduced a metal-binding bipyridine ligand and steric moieties into double-stranded DNA. In this study, we focused on the potential of quadruplex-duplex (QD) hybrids to facilitate the structural engineering of DNA-based hybrid catalysts. We devised modular DNA QD hybrids with a bipyridine ligand (X) and a hydrogen (H)-bond donor moiety (Y) on the G-quadruplex core and investigated their conformation and thermal stability. The QD hybrid-based DNA catalysts have been successfully applied to the asymmetric Michael addition reactions. We also demonstrated that enantioselectivity could be controlled by a spatial arrangement of a metal-binding ligand and a functional group in the active site, without the inversion of overall DNA structure.

研究分野：Chemical Biology

キーワード：DNA Amino acid Hybrid catalyst quadruplex Asymmetric catalysis peroxidase

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA は、周辺環境に応じて多様な立体構造を形成する特徴を持ちながら、安定性も有するユニークな生体分子であり、DNA の二重らせん構造は、不斉合成における不斉源としても用いることができる。DNA を不斉源とする反応は、2005 年 Feringa らが、銅を用いる Lewis 酸触媒反応を報告して以来、世界的に注目を浴びている。申請者は、2010 年よりこの分野の研究を開始し (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3870.), DNA を陽イオン性シリカゲル担体の表面上に固定化するという新しいコンセプトの触媒を開発した (*Biomat. Sci.* **2013**, *1*, 1034, *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 1165.). また、申請者は DNA のリン酸骨格にビピリジン配位子のような非核酸型リンカーを導入するというオリジナルの手法を確立し (*ACS Catalysis.* **2014**, *4*, 4070.), DNA ハイブリッド触媒を開発している。具体的には、分子内 Friedel-Crafts アルキル化反応において多環インドール誘導体を良好な選択性で得ることに成功し、今まで不明確であった活性部位の DNA 塩基が不斉反応に与える影響を解明している。さらに、申請者は人工的な官能基を導入することなく、DNA と銅イオンの相互作用のみで不斉 Diels-Alder 反応という炭素-炭素結合反応が進行することを見出した (*ACS Catal.* **5**, **2015**, 4708.). 以上のように申請者は DNA を機能化する優れた技術を有しており、既存のタンパク質酵素、RNA 酵素とは異なる新しいタイプの金属酵素として DNA 金属酵素を開拓している。一方で、生体触媒の立体構造と優れた機能を保ったままでの熱的不安定性や狭い基質適用範囲などの欠点を克服した人工金属酵素の開発は学術的に重要な課題であるが、タンパク質酵素の場合、触媒活性を示す立体構造、すなわちユニークな折りたたみ (フォルディング) 構造を再現することは極めて難しい。各アミノ酸を積み上げて特定の立体構造を構築していくという bottom-up 戦略は、現段階の技術力では不可能であり、生体触媒の機能を模倣した触媒を開発するためのブレークスルーが必要となっている。

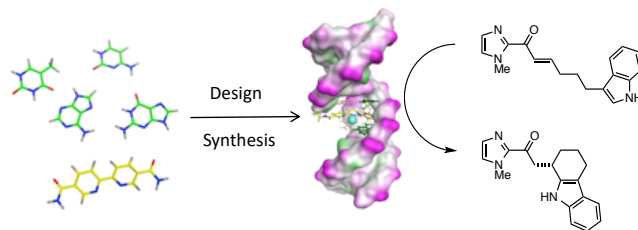


図 1. DNA-based asymmetric catalysis

2. 研究の目的

本研究は、DNA のユニークな四重らせん構造に由来する空間とその動的構造変化に着目し、この特徴を精密制御することで、DNA 金属酵素を開発することを目標とする。四重らせん構造は K⁺ や Na⁺ イオン濃度、分子クラウディング条件など外部環境に依存して動的に変化する特徴を持っており、スイッチング可能な触媒システムを構築することが期待できる。本研究により、生命化学と触媒化学、DNA ナノテクノロジーという多様な研究分野を融合した学際的な研究領域を開拓し、未来を先導する革新的技術を確立することを目指す。

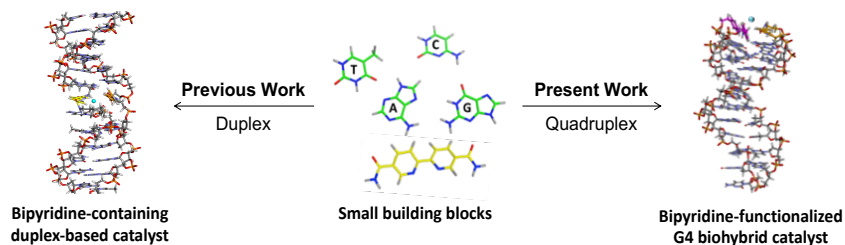


図 2. Design of G4 DNA-based catalyst

3. 研究の方法

具体的な戦略として、グアニン繰り返し配列の中心にビピリジン配位子やアミノ酸を導入し、様々な金属イオンの相互作用により触媒活性を試みる。多様な DNA 塩基配列と金属イオンの組み合わせを基盤とする DNA 金属酵素ライブラリーを構築し、さらなる酵素性能・ユティリティーの向上を目指したスクリーニングを行う。

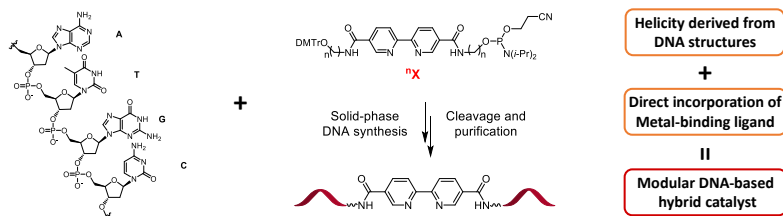


図 3. Construction of DNA hybrid catalyst

(1) グアニン四重鎖構造を形成する DNA ハイブリッド触媒の設計と合成: 四重鎖一本鎖ハイブリッド構造を構築する塩基配列を選択する. ビピリジン配位子やヒスチジン残基を導入することにより, 反応場の位置を設計する. 市販されている 2,2'-ビピリジン-5,5'-ジカルボン酸を基質としてアルキルリンカーを導入したモノマー合成を行う.

(2) オリゴヌクレオチドの合成: モノマーをホスホロアミダイト化した後, 自動合成機に導入することで, 設計した場所に配位子やアミノ酸を有するオリゴヌクレオチドを合成する.

(3) DNA ハイブリッド触媒の物性評価: DNA の融解温度や円偏光二色性分析(CD)を測定し, 四重らせん構造の形成を検証する.

(4) DNA を反応場とする触媒的不斉合成および酸化反応への応用: DNA の立体構造から生じる不斉環境に着目し, 不斉マイケル付加反応を試みる. ヒスチジンを導入した四重らせん DNA とヘミン複合体を用いてペルオキシダーゼとしての応用を試みる.

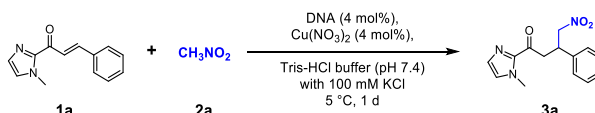
4. 研究成果

四重鎖構造形成部位にビピリジン配位子を導入したオリゴヌクレオチドを設計・合成した後, Cu(II)イオンと組み合わせることで DNA ハイブリッド触媒を構築した. また, 四重鎖構造形成部位にユリア基やスクアラミド基のようなニトロ基との相互作用を有するリンカーを導入し, 活性部位の立体環境を制御した.

モデル化合物として α,β -不飽和 2-アシルイミダゾール (**1a**) を用いて Table 1 で示したような反応条件下で不斉マイケル付加反応を行ったところ, 良好なエナンチオ選択性で目的物 (**2a**) が得られた. 生成物のエナンチオ選択性はビピリジン配位子 (**X**) のリンカーの長さや相補鎖の中心に導入したユリア基やスクアラミド基の骨格に大きく依存することがわかった. Entry 8, Entry 10 で示したように, ビピリジン配位子とユリア基の組み合わせによる DNA ハイブリッド触媒を用いた場合, 逆のエナンチオ選択性を持つ目的物 **2a** が得られた.

本研究で用いた DNA ハイブリッド触媒の構造を検証するため, 円偏光二色性分析(CD)を測定した. グアニン繰り返し配列の中心にビピリジン配位子を導入したグアニン四重鎖構造の場合, K⁺イオン存在下で逆平行 (antiparallel) 型構造を形成することが確認された. ユリア基やスクアラミド基を導入した DNA ハイブリッド触媒も同様に逆平行 (antiparallel) 型構造を形成することが円偏光二色性分析(CD)より確認された.

Table 1. Asymmetric Michael addition reaction catalysed by modular QD hybrid catalysts containing bipyridine and functional moiety conjugates.



entry ^a	DNA	conv.	ee
1	5'-GCATGG- 3X -CACGGT-3' 3'-CGTACC- 3X -GTCCCA-5'	45%	racemate
2	5'-GG- 3X -GG-3' 3'-GG- 3X -GG-5'	12%	39%
3	5'-GG- 3X -GGCGGAAG _C -3' 3'-GG- 3X -GGGCGCTTA-5'	41%	65%
4	5'-GG- 3X -GGCGGAAG-3' 3'-GG- 3X -GGGCGCTTC-5'	24%	63%
5	5'-GG- 4X -GGCGGAAG-3' 3'-GG- 4X -GGGCGCTTC-5'	53%	70%
6	5'-GG- 6X -GGCGGAAG-3' 3'-GG- 6X -GGGCGCTTC-5'	52%	25%
7	5'-GG- 3X -GGCGGAAG-3' 3'-GG- P -GGGCGCTTC-5'	43%	-16%
8	5'-GG- 3X -GGCGGAAG-3' 3'-GG- U -GGGCGCTTC-5'	73%	-55%
9	5'-GG- 3X -GGCGGAAG-3' 3'-GG- Q -GGGCGCTTC-5'	86%	76%
10	5'-GG- 4X -GGCGGAAG-3' 3'-GG- U -GGGCGCTTC-5'	54%	-55%
11	5'-GG- 4X -GGCGGAAG-3' 3'-GG- Q -GGGCGCTTC-5'	81%	52%

また、アミノ酸と DNA を融合・精密制御することで新しいハイブリッド触媒を開発した。Fmoc 基で保護されたアミノ酸と D-スレオニノールの縮合反応を行い、ヒスチジン残基を導入したホスホロアミダイトを合成した。ホスホロアミダイト化した後、合成機に導入することで、ヒスチジンを含むオリゴヌクレオチドを合成した (図 5)。

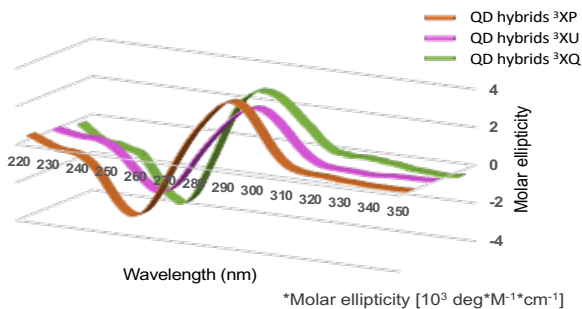


図 4. CD spectra of the unimolecular modular QD hybrids with the bipyridine ligand and functional moieties

モデル化合物としてアザカルコンとシクロペンタジエンのディールス・アルダー反応を行った結果、90%の conversion, 95%のエナンチオ選択性 (endo isomer)で目的物が得られた。

さらに、ヒスチジンを導入した四重らせん DNA を合成し、触媒反応におけるヒスチジン修飾四重らせん DNA の有用性を検証した。ヘミン/G4 DNA 複合体はペルオキシダーゼのように過酸化水素を介して ABTS の酸化反応を触媒することが知られている。それに着目し、ヒスチジン修飾四重らせん DNA とヘミンの複合体を用いてペルオキシダーゼとしての応用を試みた。

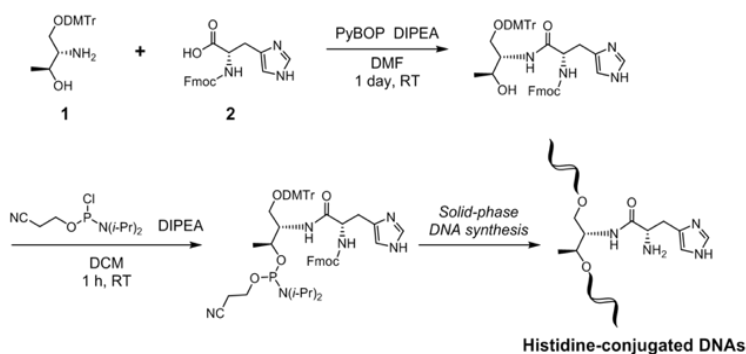


図 5. Synthesis of histidine-conjugated DNA oligonucleotides.

その結果、ヒスチジン残基を含むヘミン/四重鎖二重鎖ハイブリッド触媒は ABTS 酸化反応を促進することがわかった。一般的に、ABTS 酸化反応では、四重らせん DNA の平行構造 (parallel) の方が反平行構造 (antiparallel) よりも活性が高い傾向がある。興味深いことに、今回開発したヒスチジン修飾四重らせん DNA は、反平行構造にもかかわらず、ABTS 酸化反応を効率的に促進する結果が得られた。

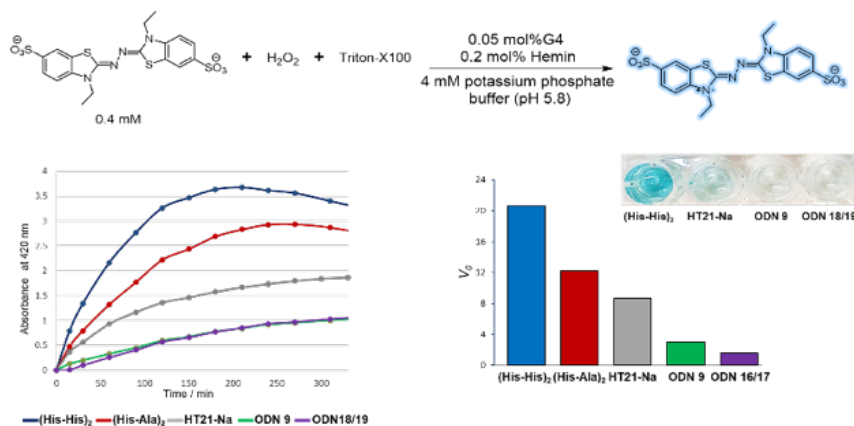


図 6. ABTS oxidative reaction catalyzed by histidine-conjugated quadruplex-duplex hybrids.

今後は、DNA とアミノ酸をコンジュゲーションした汎用性の高いハイブリッド分子を用いて、有用なバイオマテリアルとして応用を試みる。例えば、DNA 金属酵素ライブラリーを基盤として特定の反応に対応するオーダーメイド型金属酵素を開発し、実用的・環境調和的な合成プロセスを確立したい。また、生理活性やタンパク質結合性を持つペプチドをモデルとしたアミノ酸-DNA コンジュゲートのライブラリーを構築した後、物性を評価や生理活性の獲得を試みる。

<引用論文>

1. Yum, J. H.; Ishizuka, T.; Fukumoto, K.; Hori, D.; Bao, H.-L.; Xu, Y.; Sugiyama, H.; Park, S. **Systematic Approach to DNA Aptamer Design Using Amino Acid–Nucleic Acid Hybrids (ANHs) Targeting Thrombin.** *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7*, 1338–1343.
2. Yum, J. H.; Sugiyama, H.; Park, S. **Modular quadruplex-duplex hybrids as biomolecular scaffolds for asymmetric Michael addition reactions** *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 6812–6817.
3. Park, S.; Matsui, H.; Fukumoto, K.; Yum, J. H.; Sugiyama, H. **Histidine-conjugated DNA as a biomolecular depot for metal ions.** *RSC Adv.* **2020**, *10*, 9717–9722
4. Yum, J. H.; Park, S.; Sugiyama, H. **G-quadruplex as Versatile Scaffolds for Catalysis.** *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 9547–9561.
5. Yum, J. H.; Park, S.; Hiraga, R.; Okamura, I.; Notsu, S.; Sugiyama, H. **Modular DNA-based Hybrid Catalysts as a Toolbox for Enantioselective Hydration of α,β -Unsaturated Ketones.** *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 2548–2553.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 12件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yum Ji Hye, Ishizuka Takumi, Fukumoto Koyuki, Hori Daisuke, Bao Hong-Liang, Xu Yan, Sugiyama Hiroshi, Park Soyoung	4. 巻 7
2. 論文標題 Systematic Approach to DNA Aptamer Design Using Amino Acid?Nucleic Acid Hybrids (ANHs) Targeting Thrombin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 1338 ~ 1343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.1c00060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wee Wen Ann, Yum Ji Hye, Hirashima Shingo, Sugiyama Hiroshi, Park Soyoung	4. 巻 1
2. 論文標題 Synthesis and application of a 19F-labeled fluorescent nucleoside as a dual-mode probe for i-motif DNAs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cb00020a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirashima Shingo, Sugiyama Hiroshi, Park Soyoung	4. 巻 124
2. 論文標題 Construction of a FRET System in a Double-Stranded DNA Using Fluorescent Thymidine and Cytidine Analogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 8794 ~ 8800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c06879	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yum Ji Hye, Sugiyama Hiroshi, Park Soyoung	4. 巻 18
2. 論文標題 Modular quadruplex-duplex hybrids as biomolecular scaffolds for asymmetric Michael addition reactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 6812 ~ 6817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D00B01362E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Park Soyoun, Matsui Haruka, Fukumoto Koyuki, Yum Ji Hye, Sugiyama Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Histidine-conjugated DNA as a biomolecular depot for metal ions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 9717 ~ 9722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ra01267j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Han Ji Hoon, Hirashima Shingo, Park Soyoun, Sugiyama Hiroshi	4. 巻 55
2. 論文標題 Highly sensitive and selective mercury sensor based on mismatched base pairing with dioxT	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 10245 ~ 10248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9CC05123F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirashima Shingo, Han Ji Hoon, Tsuno Hitomi, Tanigaki Yusuke, Park Soyoun, Sugiyama Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 New Size Expanded Fluorescent Thymine Analogue: Synthesis, Characterization, and Application	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry ? A European Journal	6. 最初と最後の頁 9913 ~ 9919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201900843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yum Ji Hye, Park Soyoun, Sugiyama Hiroshi	4. 巻 17
2. 論文標題 G-quadruplexes as versatile scaffolds for catalysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 9547 ~ 9561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9ob01876j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Han Ji Hoon, Hirashima Shingo, Park Soyong, Sugiyama Hiroshi	4. 巻 55
2. 論文標題 Highly sensitive and selective mercury sensor based on mismatched base pairing with dioxT	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 10245 ~ 10248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9CC05123F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirashima Shingo, Han Ji Hoon, Tsuno Hitomi, Tanigaki Yusuke, Park Soyong, Sugiyama Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 New Size Expanded Fluorescent Thymine Analogue: Synthesis, Characterization, and Application	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry ? A European Journal	6. 最初と最後の頁 9913 ~ 9919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201900843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yum, J. H.; Park, S.; Hiraga, R.; Okamura, I.; Notsu, S.; Sugiyama, H.	4. 巻 17
2. 論文標題 Modular DNA-based hybrid catalysts as a toolbox for enantioselective hydration of , - unsaturated ketones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & biomolecular chemistry	6. 最初と最後の頁 2548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9OB00196D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Han, J. H.; Park, S.; Hashiya, F.; Sugiyama, H.	4. 巻 24
2. 論文標題 Approach to the Investigation of Nucleosome Structure by Using the Highly Emissive Nucleobase thdG-tC FRET Pair	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry a European journal	6. 最初と最後の頁 1709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201803382	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Soyoung Park
2. 発表標題 My Decade as a Scientist for DNA-based Catalysis
3. 学会等名 Jeonbuk National University (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Soyoung Park
2. 発表標題 Synthesis and Application of Highly Emissive Nucleic Acid Analogues
3. 学会等名 Sino-Japan Medical Textiles Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Soyoung Park
2. 発表標題 DNA as a Versatile Biomolecular Scaffold for Asymmetric Catalysis
3. 学会等名 KICHe Fall Meeting and International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Soyoung Park
2. 発表標題 DNA as a Versatile Biomolecular Scaffold for Asymmetric Catalysis
3. 学会等名 2020 International Symposium on Blue Carbon (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Soyoung Park
2. 発表標題 DNA as a Versatile Biomolecular Scaffold for Asymmetric Catalysis
3. 学会等名 Yonsei University (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Soyoung Park
2. 発表標題 Modular DNA-based Hybrid Catalyst as a Toolbox for Asymmetric Catalysis
3. 学会等名 ACC2019 (The 18th Asian Chemical Congress and The 20th General Assembly of the Federation of Asian Chemical Societies) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Soyoung Park
2. 発表標題 DNA as a Versatile Biomolecular Scaffold for Asymmetric Catalysis
3. 学会等名 Sogang University (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Soyoung Park
2. 発表標題 Development of New Biohybrid Materials by Merging of DNA and Amino Acids
3. 学会等名 ISNAC2019 (The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------