

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05323

研究課題名(和文) DNA構造をテンプレートとした 共役分子集積体の構築と光機能材料への応用

研究課題名(英文) Construction of stacked molecular assembly using DNA structure as a template

研究代表者

高田 忠雄 (TAKADA, TADAO)

兵庫県立大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60511699

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)：DNA内部に分子の結合と反応空間を酵素的に発生させ、光機能性分子を共有結合で位置特異的に導入した人工DNAを合成した。発光色素であるチアゾールオレンジ(TO)を導入したDNAを作製し、隣接塩基配列とTOの分子数によって、発光のon-offと発光波長を制御できることが示された。分子イメージングを可能とする発光性核酸センサーとしての応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAは配列情報に基づく自己組織化能を有し、官能基導入や分子修飾による化学修飾が可能であることから、機能性材料やナノ構造体を構築するための生体分子材料として近年注目されている。本研究では、DNA構造をテンプレートとしてチアゾールオレンジを集積した人工DNAを開発し、発光評価から光応答型分子センサーとして有用であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Artificial DNA was synthesized by enzymatically generating reactive sites and binding cavity inside DNA and covalently introducing photofunctional molecules in a location-specific manner. DNA with thiazole orange (TO), a fluorescent dye, was prepared, and it was shown that the on-off and emission wavelength of the fluorescence could be controlled by the adjacent base sequence and the number of TO molecules. It is expected to be applied as a fluorescent nucleic acid sensor that enables molecular imaging.

研究分野：生体関連化学

キーワード：DNA 蛍光 酵素反応 自己組織化 テンプレート合成

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。

1. 研究開始当初の背景

DNA は核酸塩基対がスタックした二重らせん構造を有し、塩基配列と長さが決まった DNA を化学合成で得られること、化学修飾が可能であること、配列情報に基づく自己組織化によって任意のナノ構造を構築することが可能である。これらの特徴に合わせ、機能性分子を組織化、集積化させる構造テンプレートとして DNA を利用することで、様々な物性を示す機能性 DNA の作製が可能となる。核酸合成技術の発展により、様々な官能基や機能分子を特定の位置に導入した人工 DNA の合成が可能となっている。一方で、核酸合成は DNA 合成機が必要であり、核酸化学に関する実験・合成技術、経験を要することが問題となる。したがって、ポスト修飾法や酵素反応を利用して分子を導入する方法や、DNA 構造を基にした分子の自己組織化など、多様なアプローチによって核酸合成に依存せずに機能性 DNA を作製する方法論の進展が求められている。

2. 研究の目的

DNA は配列情報に基づく自己組織化能を有し、官能基導入や分子修飾による化学修飾が可能であることから、機能性材料やナノ構造体を構築するための生体分子材料として近年注目されている。DNA の塩基配列や構造を基にして任意の機能性分子を集積・配列するアプローチを確立することで、目的とする機能性 DNA ナノ構造体の作製が簡便になると期待される。これまで我々は、1) DNA 内の人工疎水空間を利用した π 共役分子の組織化制御、2) 塩基除去反応を利用した分子修飾法、の手法を確立してきた。本研究では、これらのアプローチを基にして更なる進展、応用展開を目指し、様々な機能性 π 共役分子の集積体を内部に持つ DNA の作製とその光特性評価を行った (図 1)。

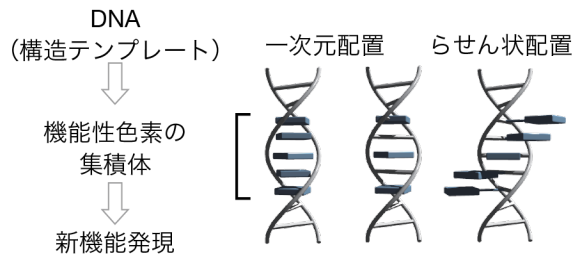


図 1. DNA 上に構築された機能分子集積体
DNA 構造を基盤として機能分子を自在に配置、集積化することで、新機能を発現するナノ構造体を構築する。

3. 研究の方法

一本鎖 DNA にデオキシウリジン(dU)を導入した DNA を化学合成した。アミノ基を有する光機能性分子としてペリレンジイミドとチアゾールオレンジ誘導体を化学合成した。dU を選択的に除去して abasic site (AP site) を発生させる酵素 uracil-DNA glycosylase と dU を含む DNA を作製し、アミノ基を有する光機能性分子を還元的アミノ化反応させることで、目的の分子を DNA の特定の位置に導入した人工 DNA を作製した。(図 2)。反応後、エタノール沈殿で簡易精製したのち、HPLC で再度精製を行い、MALDI-TOF MS によって目的物質であることを確認した。作製した機能化 DNA の化学的特性、光化学的特性を各種分光法、電気化学法を用いて調べた。

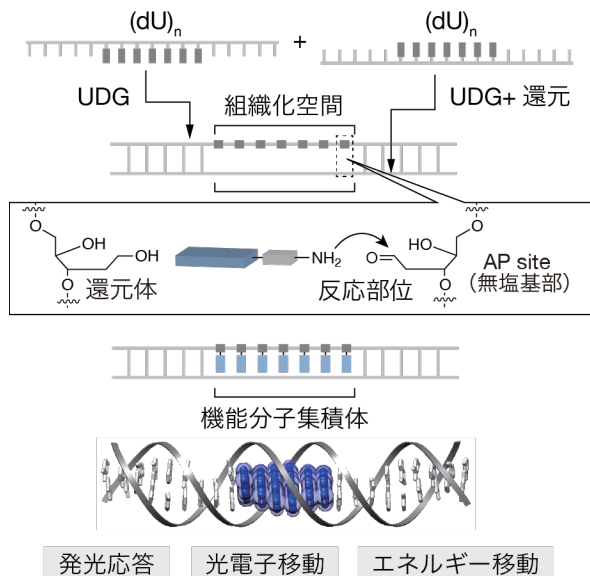


図 2. DNA 配列と構造をテンプレートとした機能分子集積体の構築。DNA 構造を利用して機能色素を自在に配置、集積化することで、新しい機能を発現するナノ構造体を構築できる。

4. 研究成果

チアゾールオレンジ(TO) 分子の DNA への共有結合は、以前に報告した方法に基づく酵素反応によって生成された abasic site (AP) 部位での還元的アミノ化によって行った (図 3)。TO の修飾は、に示すスキームに従って行った。AP 部位とスペーサーリンカー(Sp)を持つ一本鎖 DNA を混合し、反応部位を持つ DNA 二重鎖を調製した。dsDNA を TO-NH₂ と複合化した後、NaBH₃CN の存在下で還元的アミノ化反応により共役反応を行い、HPLC によって反応の進行を調べた。一晚反応させた後に分析を行ったところ、AP を持つ ssDNA のピークが減少し、新たなピークが現れた。このピークには DNA の吸収とともに、チアゾールオレンジに帰属される 500 nm 付近に吸収を示した。この

新しい生成物を単離し、MALDI-TOF MS によって目的の TO が導入された DNA であることを確認した。HPLC のピーク面積から反応収率は 74%と推定された。同様に、AP サイトの数を変えて、複数の TO 色素を持つ DNA を調製した。

TO 色素間の基底状態での相互作用を UV/vis 吸収測定により調べた (図 4)。TO 色素は、隣接する核酸塩基の影響を単純化するために、18-mer DNA のチミン塩基またはアデニン塩基の間に配置した。TO 色素を 1 つ結合させた場合(TO1)、一本鎖および二本鎖 DNA のいずれにおいても、510 nm および 480 nm にピークを持つ典型的な TO の吸収スペクトルが観測された。2 つの TO を DNA に結合させた場合(TO2)、TO 間の励起子相互作用に起因するブルーシフトが観察され、これは既報と一致した。さらに、TO を追加すると、短波長側での吸収がさらに増大し、励起子相互作用が強くなることが分かった。これらは、3 つの TO 色素が電子的に結合し、DNA 構造中に TO 色素の積層した会合体が形成されていることを示唆している。一本鎖、二本鎖のいずれにおいても同様のスペクトル変化が見られたことから、TO 色素は自発的に会合体を形成することがわかった。

次に、TO を導入した DNA の熱安定性を融解温度測定により調べた。還元スパーサー部位(Sp)を持つ DNA と比較して、TO を結合させた DNA では非常に高い T_m 値が得られた。TO の導入による DNA の安定化は AT 塩基対と同等であり、TO 色素が構造を乱すことなく隣接する塩基対と積層していることが示された。2 つ以上の TO 色素を持つ DNA では、わずかに低いか、同程度の T_m 値が得られた。これらの結果は、TO 色素を二重鎖に含むことにより、TO 色素の積層による安定化が構造の乱れを補償しているためと考えられる。

TO 修飾 DNA の構造情報を得るために、TO 結合 DNA の円二色性 (CD) スペクトルを測定した。すべての DNA において、250-300nm の CD スペクトルから、TO で修飾した DNA は B 型コンフォメーションを維持していることが確認され、TO を 1 つ組み込んだ場合、負の誘起 CD が 500 nm に観測され、TO 色素が塩基対の間に置かれ二重鎖の内部に収容された際のインターカレーション結合に起因することがわかった。2 つの TO 色素を連続的に有する DNA 二重鎖では、DNA 二重鎖内でらせん状に配置された TO 色素間の励起子結合に起因する分裂パターンが観察された。

一本鎖および二本鎖 DNA における TO の蛍光挙動を調べた (図 5)。一本鎖 DNA では、隣接する核酸塩基に依存した蛍光強度の変化が観察された。T 塩基の間に TO 色素を配置した場合、540 nm で非常に弱い TO の発光が観察された。この結果は、TO のコンフォメーションの柔軟性により、TO の中央のメチン橋の周りの非発光性回転緩和を通じて蛍光消光が引き起こされたことで説明できる。一方、A 塩基間に位置する TO は強い蛍光を示し、励起状態においてねじれ運動が

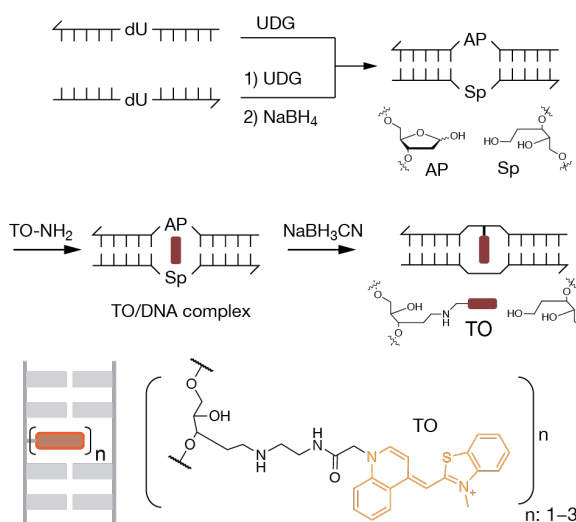


図 3. チアゾールオレンジ(TO)導入の作製。UDG によって発生させた AP site を反応部位として光機能性分子を共有結合によって導入した。

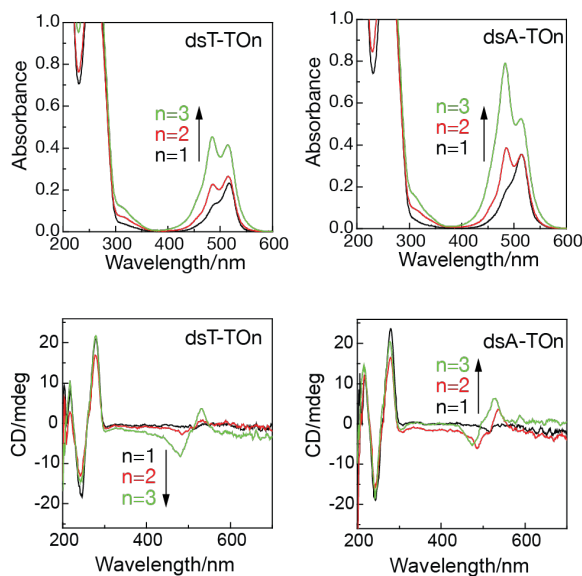


図 4. TO 修飾 DNA の吸収スペクトルと CD スペクトル

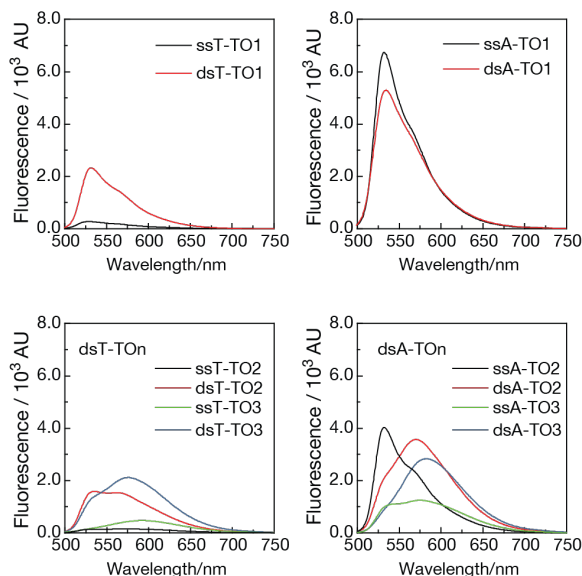


図 5. TO 修飾一本鎖および二本鎖 DNA の蛍光スペクトル

制限されていることが示唆された。この発光応答の違いは、ピリミジン塩基とプリン塩基の分子サイズに起因していると考えられる。A 塩基は T 塩基よりも効果的に TO のねじれ運動を制限し、非放射性緩和の抑制につながると予想される。隣接する塩基に関係なく、二重鎖構造では強い発光が観測され、dsDNA に位置する TO の構造変化が効果的に抑制されていることが示された。これらのスペクトル変化は、T 塩基間に位置する TO 色素が、オンオフの切り替えが可能な蛍光色素として利用できることを示唆している。

DNA 二重鎖を複数の TO 色素で修飾した場合、特徴的な蛍光が観察された。ssA-TO1 と比較して、ssA-TO2 では著しく発光が減少したが、これは TO のホモダイマーにおける励起子カップリングによる発光消光によって説明できる。一方、dsA-TO2 および dsA-TO3 の場合、580 nm 付近にピークを持つ特徴的なレッドシフトしたブロードスペクトルが観察された。580 nm でモニタリングして得られた励起スペクトルは、積層型 TO 色素の吸収スペクトルに起因するものであった。スペクトルの形状は DNA の濃度に依存せず、自己吸収の影響がないことを意味した。これらのスペクトル変化は、TO2 量体の励起状態からのエキシマー型発光に起因すると考えられる。TO と DNA をつなぐ短いリンカーによって構造自由度が制限され、TO 染料間の分子間相互作用が最大化されず、励起状態からの非放射性失活ではなく、赤色シフトした発光につながったと考えられる。

複数の TO 色素を結合させた DNA を作製し、その光化学的挙動を明らかにした。還元的アミノ化により abasic site に導入した TO 色素は、DNA 二重鎖構造中に適切にらせん状に収容されることが、融解温度および CD 測定により確認された。TO 色素の発光応答は、TO 色素の数に応じてモノマー発光からエキシマー型発光へとユニークに変化し、発光状態と非発光状態の切り替えは、一本鎖から二本鎖 DNA への構造転移によって誘導された。ハイブリダイゼーションに伴う TO 結合 DNA の発光スイッチングと波長シフトは、蛍光バイオセンサーとしての応用の可能性を示唆するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takada Tadao, Syunori Kazue, Nakamura Mitsunobu, Yamana Kazushige	4. 巻 144
2. 論文標題 Photocurrent enhancement by a local electric field on DNA-modified electrodes covered with gold nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 6193 ~ 6196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9an01352k	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 -

1. 著者名 Takada Tadao, Nishida Koma, Honda Yurika, Nakano Aoi, Nakamura Mitsunobu, Fan Shuya, Kawai Kiyohiko, Fujitsuka Mamoru, Yamana Kazushige	4. 巻 22
2. 論文標題 Stacked Thiazole Orange Dyes in DNA Capable of Switching Emissive Behavior in Response to Structural Transitions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2729 ~ 2735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202100309	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 -

1. 著者名 Takada Tadao, Shimogaki Nao, Naruo Moe, Nakamura Mitsunobu, Yamana Kazushige	4. 巻 -
2. 論文標題 Photoresponsive Porphyrin DNA Complexes Constructed through Intercalation like Binding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemPhotoChem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cptc.202200093	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 高田忠雄・西田航磨・中野 葵・中村光伸・山名一成
2. 発表標題 チアゾールオレンジ集積体を有する蛍光核酸プローブの開発
3. 学会等名 2019年光化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadao Takada,* Koma Nishida, Aoi Nakano, Mitsunobu Nakamura, Kazushige Yamana
2. 発表標題 Helically arranged chromophore clusters on DNA as a fluorogenic biosensor for nucleic acid detection
3. 学会等名 ISNAC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fluorescent Nucleic Acid Probes Possessing Stacked Cyanine Dye Chromophores
2. 発表標題 Tadao Takada,* Koma Nishida, Aoi Nakano, Mitsunobu Nakamura, Kazushige Yamana*
3. 学会等名 CISNAC2019日本核酸化学会設立記念国際シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koma Nishida, Tadao Takada, Aoi Nakano, Mitsunobu Nakamura, Kazushige Yamana
2. 発表標題 Fluorescent nucleic acids modified with stacked cyanine dyes
3. 学会等名 ISNAC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadao Takada, Shunya Ishino, Yurika Honda, Mitsunobu Nakamura, Kazushige Yamana
2. 発表標題 Functional Nucleic Acid Probes Possessing Stacked Chromophores
3. 学会等名 IRT2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田航磨・高田忠雄・本多由理佳・中村光伸・山名一成
2. 発表標題 シアニン色素を構造内部に有する発光性核酸プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村弘基・高田忠雄・山下智也・中村光伸・山名一成
2. 発表標題 “Signal-On”型電気化学核酸検出プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会2019
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