

平成22年 5月24日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19350062
 研究課題名（和文）DNAポリカテナンの合成と光制御および機能の探索
 研究課題名（英文）Synthesis, photo-regulation of DNA polycatenanes and the development of their functions
 研究代表者
 大矢 裕一 (OHYA YUICHI)
 関西大学・化学生命工学部・教授
 研究者番号：10213886

研究成果の概要（和文）：

DNAは、相補的水素結合により結合する相手の鎖を認識でき、酵素による切断や接合が可能であるなど、ナノメートルレベルでの分子組織体を構築するのに最適な素材である。本研究では、このDNAの特徴を利用して、数個の環が互いに絡み合っただけで連結した構造を有する超分子化合物であるオリゴカテナンの合成をおこなった。その結果、酵素および光反応による連結によりオリゴカテナンを合成することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

DNA can recognize their complementary counter strand by hydrogen bonding. Ligation and scission of DNA are possible by enzymes. These characteristics of DNA are useful for construction molecular organizations in nanometer scale. In this study, we carried out to synthesize oligo-catenanes with interlocked supramolecular structures. As results, we succeeded to synthesize oligo-catenanes by enzymatic and photochemical ligation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：機能性高分子

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：超分子化学，自己組織化，ポリカテナン，DNA，核酸，光反応，分子マシン

1. 研究開始当初の背景

1980年代に J. M. Lehn らの手によって超分子化学という分野が開拓され、分子が機械的に連結したトポロジカル超分子構造を持つ様々なインターロッキング化合物（ロタキサン、カテナンなど）の合成が試みられてきた。こうしたインターロッキング化合物は、その特

異な構造による機能発現が期待されており、近年では分子デバイスやナノテクノロジー材料として重要な役割を果たすのではないかと注目されている。これらのインターロッキング化合物の中でも、特に多数の輪が連なった分子構造を持つポリカテナンは、通常の線状の高分子とは異なる特殊な物性を示す機

能性材料素材として期待されているが、その合成に成功した例は未だ無く、依然として超分子・高分子領域の合成化学者が合成目標とする分子の1つである。

2. 研究の目的

本研究では、独自に開発した Template Assisted Polycatenation (TAPC)法という方法を用いて、酵素反応および光反応により、合成困難とされている環が多数連結したポリカテナンの合成の方法論を確立することを目指して、環が数個連結したオリゴカテナンを得ることを目的として研究を行った。

まずこの酵素を使用した TAPC 法の確立と最適化を行い、得られたオリゴカテナンの超分子構造に基づく分子マシンとしての機能の発現についても検討を加えた。さらに特定の波長の光照射により連結・開裂するビニルウラシル（およびカルボキシビニルウラシル）を用いて光反応によるオリゴおよびポリカテナン合成とその構造解離の光制御についても検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) TAPC 法による DNA[n]-カテナンの合成

以下のように TAPC 法を用いて酵素 (DNA ligase) により DNA[n]-カテナンの合成を行った。

① DNA5' 末端のリン酸化

合成 DNA を DNA ligase で連結するためには、5' 末端をリン酸化しておく必要がある。受託合成した DNA のうち環を構成する DNA の 5' 末端のリン酸化を T4 polynucleotide kinase を用いて行った。

② T4 DNA ligase による連結 : DNA[3]-カテナンの合成

10 倍濃度 T4 DNA ligases buffer (T4 DNA ligase 酵素キット付属) に各 DNA を含んだ超純水を混合し、80°C に加熱後 10 時間かけて徐々に室温まで冷却 (アニーリング) した。その後、ATP および T4 DNA ligase を加え、軽く攪拌し 4°C で 12 時間反応させる。フェノール抽出を 3 回行うことで酵素を除去し、エタノール沈殿および、エタノールリンスを各 3 回行うことで精製した。

③ カテナン構造の確認

電気泳動法により、DNA[n]-カテナンの生成を確認する。8M の尿素を含む 12% ポリアクリルアミドゲルを調製し、100V で 5 時間泳動させる。染色は SYBR Gold により行い、302nm の UV 光を照射することにより発色させ、電気泳動結果を出発物質および既に合成している [2]-カテナンなどと比較する。また、環状構造を確認するため、直鎖の DNA を末端から分解する酵素 Exonuclease V を作用させ、同様に電気泳動を行い、反応前後を比較した。

(2) 光反応による DNA[n]-カテナンの合成

カルボキシビニルウラシルアミダイト (北陸先端大・藤本教授より入手) を用いて、DNA 固相合成機により、5' 末端にビニルウラシルを導入した DNA を合成した。精製したビニルウラシル導入 DNA とテンプレート DNA を用いて (1) と同様に [n]-カテナンを生成するように混合し暗所でアニーリング処理した後、氷冷下 (0°C) でトランスイルミネーター (365nm) で 6 時間照射して光連結反応を行った。得られた 365nm 照射前、照射後、302nm 照射後、365nm 再照射後のサンプルを電気泳動することにより、光連結反応によるポリカテナンの生成、開裂、再生成を確認する。

(3) DNA カテナンのナノマシンとしての検討

蛍光色素としてフルオレセイン (FL) と TAMRA を導入した DNA[2]-カテナンを合成し、それらを回転させる fuel DNA を加えることおよび fuel DNA を DNA[2]-カテナンからひきはがす anti-fuel DNA を加えることにより、カテナン構造の回転に伴う蛍光色素距離の変化をモニターし、DNA カテナンの分子マシンとしての機能を評価した。

4. 研究成果

(1) オリゴカテナンの合成

オリゴカテナン合成技術確立のため、テンプレート DNA の長さとしーケンスを調節することにより、意図した重合度を持つ DNA オリゴカテナンの選択的合成を試みた。TAPC 法を利用して、テンプレート DNA の長さとしーケンスを調節し [3], [4], [5], [6]-カテナンをそれぞれ選択的に合成することを試みた。反応生成物を直鎖状 DNA の末端から切断・分解するエキソヌクレアーゼで処理した後に、8M の Urea を含有した 8% 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって同定を行った。その結果、DNA [3], [4], [5], [6] カテナンの生成を示唆する結果が得られた。

(2) 光連結反応によるカテナン合成

光連結反応が可能なカルボキシビニルウラシル (^{CV}U) を用いて、TAPC の考え方にに基づき、光連結反応による DNA[2] カテナンの調製を試みた。接合部末端に ^{CV}U を導入した 2 種類の 60mer オリゴ DNA とテンプレート DNA を混合し、氷冷下でトランスイルミネーターを用いて 365nm の光照射を行った。反応生成物を直鎖状 DNA を末端から切断・分解するエキソヌクレアーゼで処理した後に、8M の Urea を含有した 8% 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって同定を行った。その結果、DNA [2] カテナンの生成を示唆する結果が得られた。また、光反応後にさらに 302nm 付近の光照射を行った場合には、DNA [2] カテナンのバン

ドは消失し、光照射によりカテナン構造の解離が可能であることが分かった。以上のようにカテナン構造の光による形成と解離を制御可能であることが示された。

(3) DNAカテナンの分子マシンとしての評価

DNA[2]-カテナンのナノ(分子)マシンとしての機能評価についても検討した。蛍光色素としてフルオレセインとTAMRAを所定の位置に導入した蛍光色素導入DNA[2]-カテナンの合成を酵素法により行った。電気泳動法により、目的とする色素導入DNA[2]-カテナンの生成を確認した。電気泳動により、目的とする二種類の蛍光色素を導入したDNA[2]-カテナンが得られていることを確認した。続いて、駆動力となるFuel DNAを添加する前後での蛍光スペクトルを測定し、ナノマシンとしての動作を確認した。このシステムでは、初期状態では、フルオレセインとTAMRAが近接するように、Fuel DNA添加後にはDNAの相補鎖の組み換え・回転が起こり、それらが空間的に離れるよう設計した。初期状態での蛍光スペクトルを測定し、蛍光共鳴エネルギー移動により、フルオレセインの蛍光消光とTAMRAの発光が見られることを確認した。次にFuel DNAを加えて、アニーリングを行い、フルオレセインの蛍光強度が増大することを確認した。さらに、Fuel DNAと相補的なAnti-fuel DNAを加えた後に再度アニーリングを行ったところ蛍光消光が起こり、初期の状態に戻っていることを確認した(図1)。これらの結果から、設計通りにDNA[2]-カテナンがナノ(分子)マシンとして働くことが示唆された。

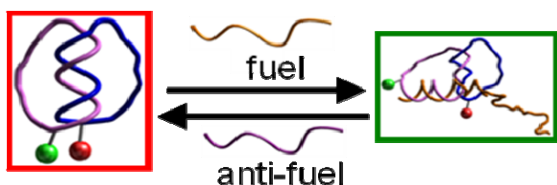


図1 ナノマシンとしてのDNA[2]-カテナンの駆動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- ① 大矢裕二, DNAナノアレイと開閉可能なDNAナノボックス-DNAはナノマテリアルとして実用可能か?, 化学, 64(8), 72-73, 2009, 査読無
- ② Y. Ohya, N. Hashimoto, S. Jo, T. Nohori, T. Yoshikuni, T. Ouchi, H. Tamiaki, Synthesis of Oligo-DNA Containing Hydrophilic Porphyrin in the Main Chain, and Its Energy Transfer Behavior in Duplex State, Supramol. Chem., 21(3-4), 301-309, 2009, 査読

有

- ③ Y. Ohya, T. Nohori, T. Nishi, S. Jo, T. Ouchi, Polyassembly Formation of Complementary Half-sliding Oligo-DNAs and the Atomic Force Microscopic Observation, J. Nanosci. Nanotechnol., 9(1), 313-317, 2009, 査読有
- ④ Y. Ohya, Dye Molecular Arrangement Based on Hybridization of DNA, Proceedings of SPIE, Nanobiosystems: Processing, Characterization, and Applications, 70400, G1-13, 2008, 査読無
- ⑤ Y. Ohya, T. Nishi, T. Nohori, S. Jo, K. Ohta, K. Jozuka, T. Ouchi, Construction of Supramolecular Assemblies and Self-organized Structures using Oligo-DNAs, Nucleic Acids Symp. Ser., 51, 37-38, 2007, 査読無

〔学会発表〕(計14件)

- ① T. Uehara, Synthesis and Characterization of DNA Catenane as Nanomachine, JST-CREST International Symposium 2009, 2009年11月10日, The University of Tokyo
- ② 上原岳暁, 光連結反応によるDNAオリゴカテナン合成手法の検討, 第24回生体機能関連化学シンポジウム, 2009年9月14日, 九州大学
- ③ 上原岳暁, DNAカテナンの合成と分子マシンとしての機能評価, 第19回バイオ・高分子シンポジウム, 2009年7月30日, 東京大学
- ④ 吉國拓郎, DNA鎖中に組み込み可能なポルフィリン誘導体によるポルフィリン・アレイの構築と蛍光共鳴エネルギー移動評価, 第57回高分子討論会, 2008年9月25日, 大阪市立大学
- ⑤ 上原岳暁, 光連結反応を利用した環状DNAオリゴカテナン合成手法の検討, 日本化学会第3回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2008年9月19日, 東京工業大学
- ⑥ 定司健太, 蛍光色素導入DNAカテナンの合成, 日本化学会第3回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2008年9月19日, 東京工業大学
- ⑦ K. Jozuka, Synthesis of DNA Oligo-Catenane by Template Assisted Catenation, Thai-Japan Joint Symposium on Advances in Materials Science and Environmental Technology, 2008年8月19日, Chulalongkorn University, Bangkok

- ⑧ Y. Ohya, Dye Molecular Arrangement based on hybridization of DNA, Proceedings of SPIE, 7040, 70400G1-13, 2008年8月12日, San Diego Convention Center
- ⑨ Y. Ohya, Synthesis of DNA Oligo-Catenane by Template Assisted Catenation, ISMSC 2008, 2008年7月13日, Hotel Rivera, Los Vegas
- ⑩ Y. Ohya, Construction of Supramolecular Assemblies and Self-Organized Structures Using Oligo-DNAs, Fifth International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2007年11月20日, The University of Tokyo
- ⑪ 定司 健太, Template Assisted Polycatenation (TAPC) 法によるDNAオリゴカテナンの選択的合成, 第22回生体機能関連化学シンポジウム, 2007年9月28日, 東北大学
- ⑫ 吉國拓郎, DNA鎖中にポルフィリンを導入したポルフィリン・アレイの構築とエネルギー移動評価, 第22回生体機能関連化学シンポジウム, 2007年9月28日, 東北大学
- ⑬ 定司 健太, Template Assisted Polycatenation (TAPC) 法を応用したDNAオリゴカテナンの合成, 第56回高分子討論会, 2007年9月19日, 名古屋国際会議場
- ⑭ 大矢裕一, 多重会合能を有するオリゴDNAコンジュゲートの設計と多重会合体のモルホロジー, 第17回バイオ・高分子シンポジウム, 2007年7月31日, 上智大学

[図書] (計1件)

- ① Y. Ohya, American Scientific Publishers, Bottom-up Nanofabrication, 2009, 323-335

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大矢 裕一 (OHYA YUICHI)
関西大学・化学生命工学部・教授
研究者番号：10213886

(2) 研究分担者 (平成19年度のみ)

大内 辰郎 (OUCHI TATSURO)
関西大学・化学生命工学部・教授
研究者番号：60067650