

平成 21 年 3 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590038

研究課題名（和文）

核酸の塩基および高次構造を特異的に認識する金属錯体試薬の開発と認識機構の解明

研究課題名（英文）Development of metal complexes that specifically recognize both nucleobases and higher-order structures of nucleic acids, and their recognition mechanism

研究代表者

青木 克之（Katsuyuki Aoki）

豊橋技術科学大学・工学部・教授

研究者番号：30087514

研究成果の概要：核酸の塩基および高次構造を特異的に認識する金属錯体としてデザイン・合成した強固な八面体配位構造をもつジロジウム錯体を用いて、核酸の塩基配列および高次構造が既知の DNA オリゴヌクレオチドあるいは DNA ポリマーとの反応を行い、ジロジウム錯体が核酸塩基を特異的に認識すること、一本鎖 DNA および左巻二本鎖 DNA と結合するが、右巻二本鎖 DNA と結合しないこと、この塩基および高次構造特異的認識が配位子間相互作用（水素結合、静電的相互作用、立体障害）に基づくことを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物無機化学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：核酸塩基・核酸高次構造・金属錯体・分子認識・配位子間相互作用・結晶構造・ロジウムカルボキシラト錯体・ロジウムアミダト錯体

1. 研究開始当初の背景

核酸と金属イオンとの相互作用に関する研究は、現在、生物無機化学の分野で主要な研究領域を占めており、多くの知見が得られているが、核酸と金属イオンとが関わる諸現象を分子レベルで理解するための基礎となる、どのような金属イオンあるいは金属錯体が核酸のどの高次構造（右巻および左巻二本鎖らせん構造、一本鎖構造が存在）のどの部位（5種類の塩基の各部位、糖部位、リン酸部位が存在）で結合するかを説明し予測でき

る、核酸と金属イオンとの相互作用の構造原理は解明されていない。我々はこれまでに、 $[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]$ 錯体がアデニン塩基を特異的に認識することを明らかにし、この塩基特異的認識機構として配位子間相互作用（水素結合、静電的相互作用、立体障害）を提案している（*Inorg. Chim. Acta*, **339**, 427-437 (2002)）。また嵩高い金属イオンによる核酸の高次構造認識の可能性を提案している（*Comprehensive Supramolecular Chemistry*, ed. J.-M. Lehn, Vol. 5, Chap. 8, 249-294, Pergamon, 1996）。

2. 研究の目的

本研究は「配位子間相互作用による核酸の塩基および高次構造の認識」を作業仮説として核酸の塩基および高次構造を特異的に認識する金属錯体をデザイン・開発し、この作業仮説を X 線結晶構造解析および電子顕微鏡によるその場観察により実証することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) X 線結晶構造解析のための DNA-Rh 錯体結晶の調製

塩基配列および高次構造が既知の A 型 DNA[d(GGTATACC)], B 型 DNA[d(CGCGAATTCGCG)], Z 型 DNA[d(CGCGCG)]と $[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]$ (1), $[\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{CONH})_4]$ (2)との 20°C, 40°C, 60°C での蒸気拡散法による共結晶化

上記の DNA オリゴヌクレオチドの単結晶を得た後、ソーキング法による DNA-Rh 錯体結晶の調製

(2) Rh 錯体の DNA 高次構造認識能を調べるために Rh 錯体 - DNA 混合溶液を調整し、温度変化 (20°C, 50°C, 75°C) による反応溶液の色の変化の観察 (Rh 錯体が DNA の窒素原子に結合すると反応液は Rh 錯体溶液の青緑色から紫色に変化するので、色の変化を結合 (反応) の有無の指標とすることができる)

(3) CD 測定による, Rh 錯体の DNA 高次構造認識能の検討

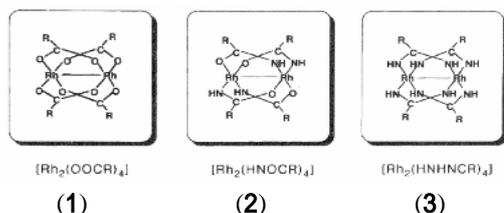
(4) 電気泳動法による, Rh 錯体の環状 DNA 構造に及ぼす影響の検討

(5) Rh 錯体と核酸構成ヌクレオシドとの反応生成物の X 線結晶構造解析

(6) グアニン塩基特異的認識錯体としてデザインした tren 金属錯体 (tren = tris(2-aminoethyl)amine) と各種核酸塩基との反応生成物の X 線結晶構造解析

(7) 電子顕微鏡による DNA-Rh 錯体のその場観察

(8) グアニン塩基特異的認識錯体としてデザインした $[\text{Rh}_2\{\text{CH}_3\text{CNH}(\text{NH})\}_4]$ (3)の合成と DNA との反応



4. 研究成果

上記「3. 研究の方法」の各項目(1)~(8)について成果 (あるいは結果) を記述する。

(1) DNA-Rh 錯体の単結晶の調製

蒸気拡散法による共結晶化は現在のところ成功せず今後なお継続する。

20°C, 2~3 週間静置し、蒸気拡散法により A 型 DNA[d(GGTATACC)], B 型 DNA[d(CGCGAATTCGCG)], Z 型 DNA[d(CGCGCG)]それぞれの結晶を得た (図 1)。その後, $[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]$ および $[\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{CONH})_4]$ 溶液に浸して DNA-Rh 錯体結晶を調製し, Spring-8 で X 線回折測定を行ったが, 十分な回折強度が得られていない。引き続き良質の複合体結晶を得るべく継続する。

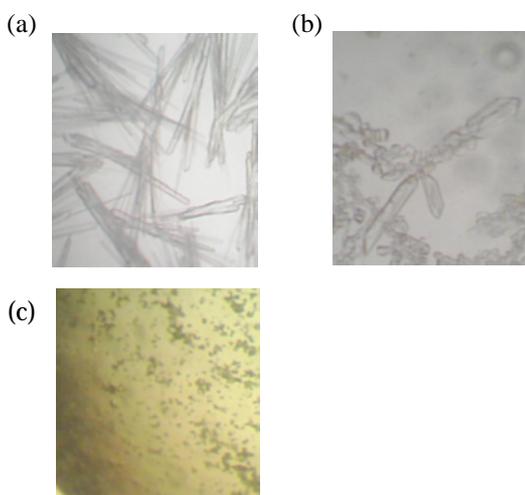


図 1. (a) A 型 DNA の針状・柱状結晶, 50% MPD リザーバー。(b) B 型 DNA 粒状・柱状結晶, 30% MPD。(c) Z 型 DNA 粒状結晶, 30% isopropanol

(2) Rh 錯体 - DNA 混合溶液の温度による色の変化

$[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]$ - DNA 混合溶液 (水溶液) A 型 DNA[d(GGTATACC)]では, 50°C 付近で溶液が青緑色から紫色に変化し紫色の沈殿が生じた。B 型 DNA[d(CGCGAATTCGCG)]では, 50°C 付近で沈殿ができ始め, 70°C 付近で紫色の沈殿が多く生じ, 溶液の青緑色が薄くなった。Z 型 DNA[d(CGCGCG)]では, 75°C まで温度を上げても色は青緑色のままで変化はなかった (図 2)。これらの結果は, $[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]$ が二本鎖らせん構造の A 型および B 型 DNA には結合しないが, 温度を上げて変性させ一本鎖になると塩基と結合すること, 一方, d(CGCGCG)に対しては, 温度を上げて一本鎖になっても結合しないことを示す。それ故, $[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]$ は一本鎖 DNA のアデニン塩基を特異的に認識することが示される。このアデニン塩基特異的結合は (Rh 原子は

アデニン環の N7 部位に結合), アデニン塩基の N6 アミノ基とアセタト配位子の O 原子との配位子間水素結合の形成によること, グアニン塩基と結合しないのは, もし Rh 原子がグアニンの N7 に結合したとすると O6 カルボニル基とアセタト配位子の O 原子との間に静電的反撥を起こすこと, シトシン塩基と結合しないのは, もしシトシンの N3 部位に結合したとすると O2 のカルボニル基とアセタト配位子の O 原子との間に静電的反撥を起こすこと, また右巻二本鎖 DNA と結合しないのは, 八面体配位構造をもつ Rh 原子が DNA の狭い溝に位置しているアデニン塩基の N7 に結合しようとする, 5' 側の隣の塩基と立体障害を起こすこと, により説明することができる。

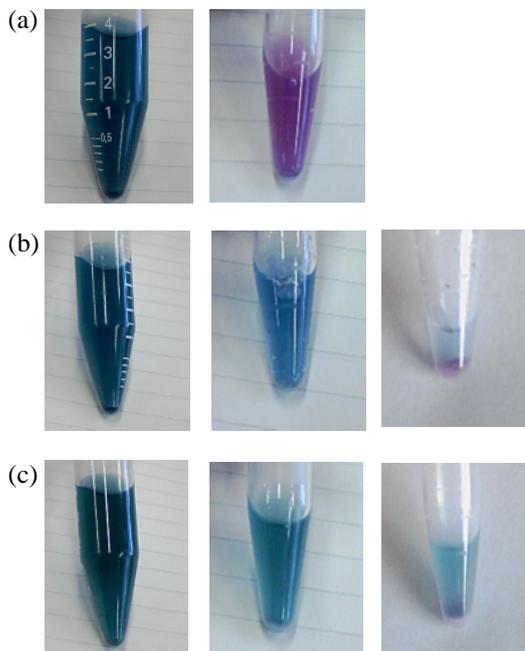


図 2 . それぞれ左が DNA 溶解前の 10mM $[Rh_2(OAc)_4]$ を含む溶液, 真中が溶液温度約 $50^\circ C$ で DNA を溶解した後の溶液, 右が $75^\circ C$ で溶解した後の溶液。(a) A 型 DNA, (b) B 型 DNA, (c) Z 型 DNA

$[Rh_2(CF_3CONH)_4]$ - DNA 混合溶液
 $[Rh_2(CF_3CONH)_4]$ の水への溶解度は極めて低く, 色の変化を観測するのに十分な濃度が得られなかった。 $[Rh_2(CF_3CONH)_4]$ はメタノールには可溶であるが, この場合, 水に溶解した DNA に加えると DNA が析出・白沈してしま

(3) CD 測定による Rh 錯体の DNA 高次構造認識能の検討 (長崎大学・工学部 新留琢朗博士の協力による)

$[Rh_2(CF_3CONH)_4]$ - poly d(G-C)poly d(G-C) 溶液

poly d(G-C)poly d(G-C) 溶液は共存塩の種類・濃度によって右巻あるいは左巻二本鎖らせん構造をとる。図 3 は poly d(GC) に $[Rh_2(CF_3CONH)_4]$ を加えた時の CD スペクトルを示す ($r = Rh$ 錯体/DNA モル比)。poly d(GC) を水に溶解すると右巻らせん構造をとり, これに Rh 錯体を加えても ($r = 5$), 300 nm 付近のピーク (山) の強度は変化しない。一方, 2M $NaClO_4$ の共存下で poly d(GC) は左巻らせん構造をとり, これに Rh 錯体を加えると ($r = 1$), 300 nm 付近のピーク (谷) の強度は時間と共に増す。これらの結果は, Rh 錯体は右巻二本鎖らせん構造に影響を与えない (結合しない) こと, 一方, 左巻二本鎖らせん構造には結合してらせん構造を安定化させることを示す。

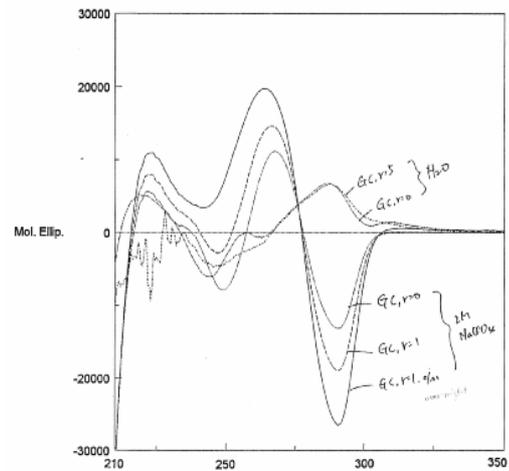


図 3 . $[Rh_2(CF_3CONH)_4]$ - poly d(G-C)poly d(G-C) 溶液の CD スペクトル ($r = Rh$ 錯体/DNA モル比, o/n: overnight)

$[Rh_2(CF_3CONH)_4]$ - poly d(A-T)poly d(A-T) 溶液

図 4 は poly d(AT) に $[Rh_2(CF_3CONH)_4]$ を加えた時の CD スペクトルを示す。

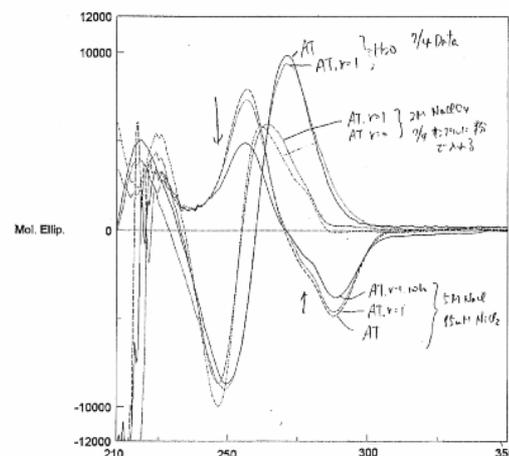


図 4 . $[Rh_2(CF_3CONH)_4]$ - poly d(A-T)poly d(A-T) 溶液の CD スペクトル

水に溶解した poly d(AT)は右巻らせん構造をとり、一方、5M NaCl・95 mM NiCl₂ 共存下で左巻らせん構造をとっている。Rh 錯体を加えると ($r = 1$), 260 - 300 nm 付近の山 (右巻らせん構造) と谷 (左巻らせん構造) のピークの強度は僅かに減少し、谷のピークは 10 時間後に更に減少している。これらの結果は、Rh 錯体は左巻二本鎖らせん構造に結合してらせん構造を不安定化させることを示す。(山のピークの僅かな減少は、右巻らせん構造が一部解けて露出したアデニン塩基の N7 に結合した可能性を示す (poly d(AT)のらせん構造は poly d(GC)のそれに比べて不安定))。

(4) 電気泳動法による Rh 錯体の環状 DNA 構造に及ぼす影響の検討 (豊橋技術科学大学・工学部 Md. Masudur Rahman 博士の協力による)

環状二本鎖らせん構造をもつ pUC19 plasmid-DNA に[Rh₂(OAc)₄]を濃度と反応時間を変えて反応させて DNA の構造変化を電気泳動法により調査した (図 5)。最初、閉環状構造 (CCC) の DNA は反応後 24 時間, 48 時間, 72 時間でそれぞれ, Rh 錯体/DNA モル比 (R_f) が 10, 5, 5 のときその殆どが開環状構造 (OC) に変化した。また, [Rh₂(CF₃COO)₄]を用いた場合には、より短時間で同様の結果が得られた (図省略)。これらの結果は、Rh 錯体は DNA に結合して DNA の閉環状構造を開環状構造に変化させることを示している。

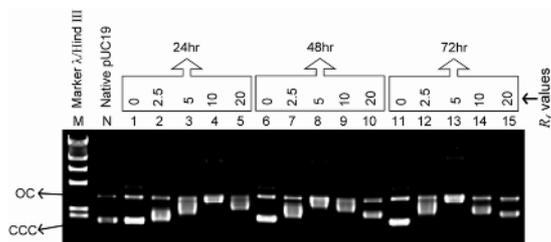


図 5 . pUC19 DNA - [Rh₂(OAc)₄]反応生成物の 1% agarose gel 電気泳動 ($R_f = 0, 2.5, 5, 10, 20$); 反応時間= 24, 48, 72h; CCC = covalently closed circular form and OC = open circular form)

(5) Rh 錯体と核酸構成ヌクレオシドとの反応生成物の X 線結晶構造解析

Rh 錯体の核酸塩基特異的認識機構を明らかにするために、我々はこれまでに各種核酸塩基・ヌクレオシドとの反応生成物の X 線結晶構造解析を行ってきた (*J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1980**, 186; *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 3691 (1984); *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1986**, 314; *Inorg. Chim. Acta*, **316**, 50 (2001); *Inorg. Chim. Acta*, **339**, 427 (2002))。本研究では、[Rh₂(CF₃CONH)₄]と N6-methyladenosone との反応生成物の X 線結晶構造解析を行った

(図 6) [Rh₂(CF₃CONH)₄]骨格の axial 位に 2 分子の N6-methyladenosone が N7 部位で結合し、同時に N6-methyl アミノ基とアミダト配位子の O 原子との間に水素結合を形成している。この結果は、Rh 錯体のアデニン塩基認識の分子的基礎が N-H...O 配位子間水素結合であることを示している。

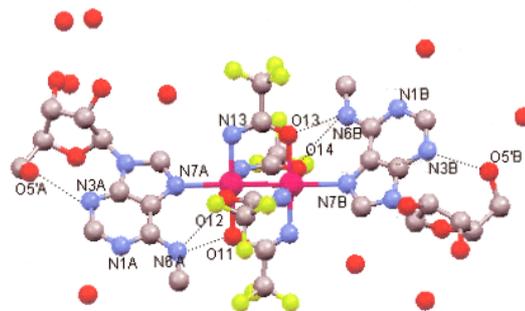


図 6 . [Rh₂(CF₃CONH)₄(N6-methyladenosone)₂] 錯体の結晶構造 (ピンク, Rh 原子; 灰色, C; 青色, N; 赤色, O; 黄色, F)

(6) グアニン塩基特異的認識錯体としてデザインした tren 金属錯体 (tren = tris(2-aminoethyl)amine) と各種核酸塩基との反応生成物の X 線結晶構造解析

xanthine 塩基との反応生成物

グアニン類似体 xanthine (H₃xan)を用いて各種金属イオン (Zn²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺) と反応させ、得られた 4 種類の反応生成物の結晶構造を決定した。図 7 に Zn²⁺ 錯体の結晶構造を示す。Zn²⁺ イオンは xanthine 塩基の N7 に結合し、同時に O6 ケト基と tren 配位子の NH アミノ基との間に水素結合を形成している。

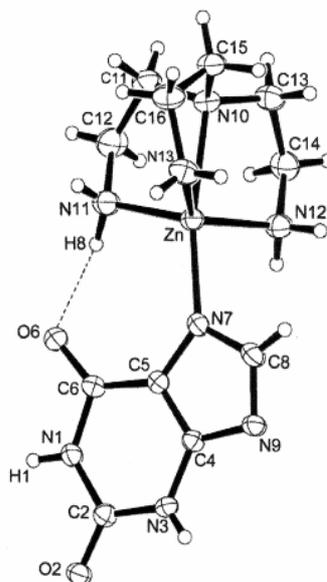


Fig. 1. Molecular structure of the [Zn(tren)(H₂xan)]⁺ cation in 1 with thermal ellipsoids drawn at the 30% level, together with the atomic numbering system. Broken lines denote hydrogen bonds.

図 7 . [Zn(tren)(H₂xan)]⁺ 構造単位の分子構造

この結果は、tren 金属錯体のグアニン塩基認識の分子的基礎が N-H...O 配位子間水素結合であることを示している。〔雑誌論文〕の(1)に報告)

その他の各種核酸塩基との反応生成物各種核酸塩基について各種金属イオン (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}) と反応させ、得られた 7 種類の反応生成物の結晶構造を決定した。観測された各塩基の金属イオンの結合部位は、それぞれ固有の配位子間水素結合を伴い、それ故、それぞれ固有の配位子間水素結合に支配されていることを示している。〔雑誌論文〕の(2)に報告)

(7) 電子顕微鏡による DNA-Rh 錯体のその場観察 (豊橋技術科学大学・工学部 森 浩平氏・桂 進司博士の協力による)

3-aminopropyltriethoxysilane でコーティングしたスライドガラス上に二本鎖 T4DNA 試料を伸張固定した後、熱変性させて一本鎖とした。これに $[Rh_2(OAc)_4]$ 錯体溶液を滴下して試料を作成し、低真空走査型電子顕微鏡 (E-SEM-2700) で DNA らしきものが観察され (図 8 左)、また、同時に放出される特性 X 線をエネルギー分散形 X 線分光装置 (EMAX-5770W) を用いて Rh 由来と考えられる特性 X 線も僅かであるが検出された (図 8 右)。今後、精度を上げるべく更なる検討を継続する。

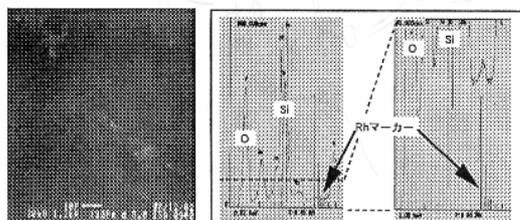


図 8 . E-SEM での観測 (左図) と特性 X 線スペクトル (右図)

(8) グアニン塩基特異的認識錯体としてデザインした $[Rh_2\{CH_3CNH(NH)\}_4]$ (3) の合成と DNA との反応

$[Rh_2(OAc)_4]$ と過剰の $CH_3CNH(NH)$ を溶融して、アミジナト錯体 $[Rh_2\{CH_3CNH(NH)\}_4]$ の合成を試みたが、現在のところ成功していない ($CH_3CNH(NH)$ が加水分解して、アミダト錯体 $[Rh_2(CH_3CONH)_4]$ が得られた)。今後更に合成を検討・継続して DNA との反応を目指す。

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 2 件)

(1) H.Q. Yuan, K. Aoki, I. Fujisawa, Site-specific metal bonding to xanthine in the tripodal tris(2-aminoethyl)amine (tren) ligand-system: Crystal structures of $[Zn(tren)(H_2xan)].ClO_4 \cdot H_2O$, $[Cd(tren)(H_2xan)].ClO_4 \cdot H_2O$, $[Ni(tren)(H_2xan)(H_2O)].ClO_4 \cdot H_2O$, $[Cu_2\{\mu-Hxan\}Cu(tren)_2(\mu-Hxan)_2(H_2O)_2].10H_2O$ ($H_3xan = xanthine$), *Inorg. Chim. Acta*, 査読有, **362**, 2009, 975-984.

(2) M.A. Salam, H.Q. Yuan, T. Kikuchi, N. A. Prasad, I. Fujisawa, K. Aoki, Metal ion interactions with nucleobases in the tripodal tris(2-aminoethyl)amine (tren) ligand-system. Crystal structures of $[Zn(tren)(adeninato)].ClO_4$, $[Zn(tren)(adeninato)].ClO_4$, $[Ni(tren)(adeninato)(ClO_4)]$, $[Zn(tren)(hypoxanthinato)].ClO_4 \cdot H_2O$, $[Cd(tren)]_2(hypoxanthinato).(ClO_4)_3 \cdot 0.5H_2O$, $[Ni(tren)(uracirato)(H_2O)].ClO_4 \cdot (0.5H_2O)_2$, and $[Cu(tren)(uracirato)].ClO_4 \cdot 0.5H_2O$, *Inorg. Chim. Acta*, 査読有, **362**, 2009, 1158-1168.

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) H.Q. Yuan, K. Aoki, Interligand interactions that affect site-specific metal bonding to nucleobases. Crystal structures of four ternary tren-metal ion-xanthine complexes (tren = tris(2-aminoethyl)amine), 第 57 回錯体化学討論会, 2007 年 9 月 25 日, 名古屋工業大学.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

青木 克之

豊橋技術科学大学・工学部・教授

研究者番号: 30087514

(2) 研究分担者

水野 彰

豊橋技術科学大学・工学部・教授

研究者番号: 20144199

(3) 連携研究者

藤澤 郁英

豊橋技術科学大学・工学部・助手

研究者番号: 80345959