

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19850006  
 研究課題名(和文) 核酸とのコンジュゲーションによる色素会合体調製法の  
 確立  
 研究課題名(英文) Construction of methods for the preparation of dye cluster by the  
 conjugation with DNA  
 研究代表者  
 榎田 啓(KASHIDA HIROMU)  
 名古屋大学・大学院工学研究科・助教  
 研究者番号：30452189

## 研究成果の概要：

本研究ではDNA二重鎖を“場”として利用し、色素を予め決められた数・配向・配列で整列させた色素超分子を調製することを目指した。D-スレオニノールを介して色素(メチルレッド)を二重鎖の対応する位置に導入したところ、極めて強い励起子相互作用を示した。また、NMRによる構造解析の結果、色素がらせん軸に対して垂直にスタッキングしていることがわかった。また、二重鎖の融解温度は色素数の増加と共に大幅に上昇したことから、導入した色素が“塩基対”として機能することが分かった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,350,000	0	1,350,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
総計	2,700,000	405,000	3,105,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：DNA、色素、H会合体、くし型会合

## 1. 研究開始当初の背景

核酸は遺伝情報の担い手であると同時に、相補鎖を認識し自発的に二重鎖を形成するという超分子として非常に魅力的な性質を有している。また、合成化学の進歩によりDNAを非天然分子で容易に修飾することが可能となった。しかしながら、核酸の修飾に関する従来の研究はそのほとんどが核酸の生物学的機能の向上を志向しており、機能性有機分子の集積化にDNAを利用した例は数えるほどである。DNAは硬い二重らせん構造を有しており、その内部では塩基が厳密

に配列に従って整列している。従って、塩基の代わりに非天然分子を導入すれば、分子を望みの数・配向で会合させることが可能となる。

一方、色素は複数分子の色素が会合することで、単量体では見られない新たな物性(吸収スペクトルの先鋭化や非線形光学効果など)を発現することが知られており、写真材料や光記録材料、非線形光学材料などの幅広い分野で用いられている。しかしながら、従来色素会合体の調製は色素単体の自発的な会合を利用しており、その会合形態の制御が

困難であった。

そこで、本研究ではDNA二重鎖を、色素を整列させる“場”として利用し、数・配向・配列の厳密に制御された色素会合体の調製を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では1. で述べたDNAの超分子性を利用し、色素会合体の形態（数・配向）の完全な制御を目指した。具体的にはDNAに色素を導入したDNA-色素コンジュゲートを合成し、二重鎖形成を利用することで色素数・配向を厳密に制御した色素会合体の調製を試みた。色素会合体の会合数・配向はDNA合成機のプログラミングによって厳密に制御できる。また、DNAの二重鎖形成を利用することでこれまで調製が困難であった複数種の色素による会合体も容易に調製できる。更に分子内に正電荷を持ったカチオン性色素を会合させることでDNA二重鎖の大幅な安定化を図った。このように、本研究では色素に“塩基対”を形成させることで様々な物性を持った色素会合体の調製を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) “くし型”会合体の調製

色素を連続的に導入したDNAを二重鎖形成させることにより、“くし型”会合体の調製を行った(図1)。具体的には色素(メチルレッド:図2)を非天然リンカーであるD-スレオニノールを介して1~6分子導入したDNAを合成した。このようにDNAの配列を設計することで会合体における色素の数を厳密に制御することが出来る。これらの二重鎖形成させた際のUV-VISスペクトル及び二重鎖安定性について検討した。

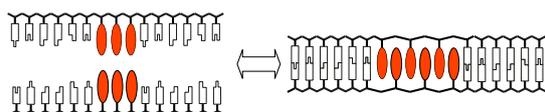


図1. “くし型”会合体の模式図

図2. メチルレッド(左上)、ナフチルレッド(右上)及びp-メチルスチルバズール(下)の化学構造

### (2) ヘテロ色素会合体の調製

(1)の設計で異なる種類の色素を二重鎖のそれぞれに導入すれば、複数種の色素を交互に会合させることができる。このようなヘテロ色素会合体はDNAを用いなければ調製が非常に困難である。本研究ではメチルレッド及びナフチルレッドを導入した配列を合成した。

### (3) カチオン性色素導入による二重鎖の安定化

DNAは主鎖にリン酸ジエステルを持ったポリアニオンである。そのため、正電荷を持つ分子を導入すれば二重鎖の大幅な安定化が期待できる。本研究ではp-メチルスチルバズール(図2)をDNAに導入し“くし型会合”させることでDNA二重鎖の大幅な安定化を試みた。この色素は分子内に正電荷を持ち、かつ平面構造を有している。そのため、静電相互作用及びスタッキング相互作用による二重鎖の大幅な安定化が期待できる。

## 4. 研究成果

(1) 調製した“くし型”会合体のUV-VISスペクトルを図3に載せる。色素数の増加と共にピークの顕著な先鋭化が観察された。このことから色素が強く励起子相互作用していることが分かった。また、同時にピークの短波長シフトが観察されたことから、色素がらせん軸に対して垂直に会合したH会合体を形成していることが明らかとなった。また、それぞれの色素会合体における二重鎖の融解温度を図4に示す。色素数の増加とともに二重鎖の融解温度が飛躍的に増加することがわかった。すなわち、色素会合体の導入によって二重鎖が大きく安定化することがわかった。このことは導入した色素が分子間スタッキングによって二重鎖を安定化するいわば“塩基対”として機能することを意味している。このように、色素をDNA二重鎖のそれぞれに導入し、二重鎖形成させれば色素を強く相互作用させることが出来ることがわかった。また、このことを利用すれば色素間の相互作用を二重鎖形成によって制御することも出来る。

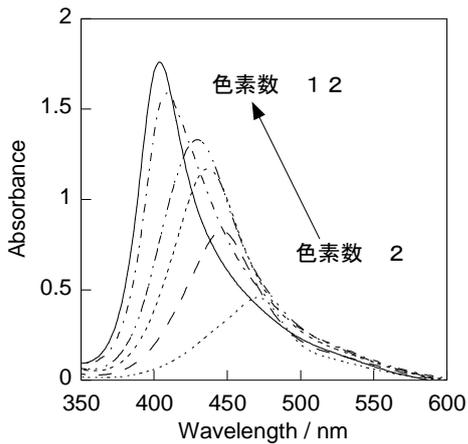


図3. UV-VIS スペクトルに対する色素数の影響

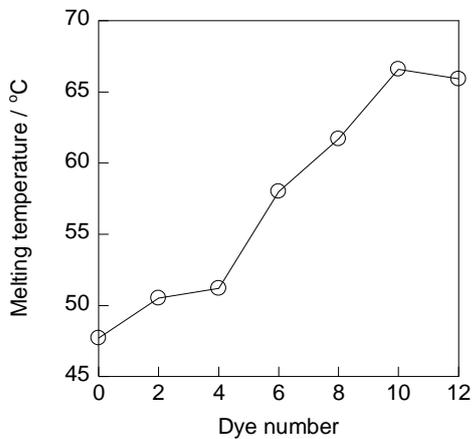


図4. DNA二重鎖の融解温度に対する色素数の影響

(2) 次に、複数種の色素を同様にDNAに導入しヘテロ会合体を調製した。メチルレッド/ナフチルレッド会合体のUV-VISスペクトルを図5に示す。その結果、470 nm付近に非常に先鋭化した新たなバンドが生じた。また、このピークは一本鎖の和(図5点線)とは明らかに異なることから、ヘテロ会合体を形成することでメチルレッドとナフチルレッドが強く励起子相互作用したことが分かった。このような、複数種の色素によるヘテロ会合体はDNAを用いなければ非常に調製が困難であり、今回DNAを用いることで異種色素間の強い励起子相互作用を明らかにすることが出来た。また、メチルレッド/アゾベンゼンのヘテロ会合体ではそれぞれの色素に基づく二つのバンドが観察されたことから、ヘテロ会合体における励起子相互作用の大きさが二つの色素の極大吸収波長の差に大きく依存することがわかった。

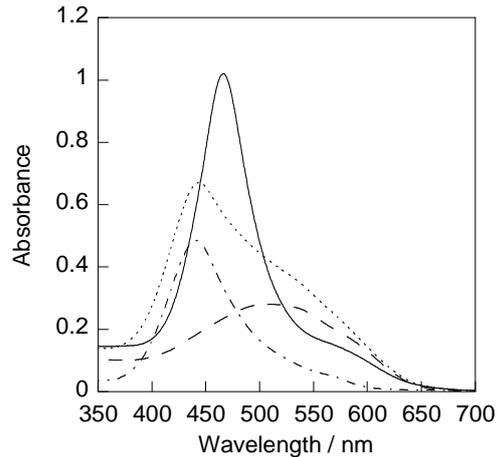


図5. メチルレッド/ナフチルレッド会合体(実線)メチルレッド一本鎖(一点鎖線)、ナフチルレッド一本鎖(鎖線)のUV-VISスペクトル及び一本鎖のスペクトルの和(点線)

(3) 更に、同様の設計を用いてカチオン性色素(*p*-メチルスチルバゾール)による会合体を調製した。従来、カチオン性色素はDNAへの導入が非常に困難であったが、非天然リンカーを用いることで導入することが出来た。図6に二重鎖の融解温度に対する色素数の影響を示す。色素数の増加と共に飛躍的な融解温度の上昇が観察された。これはメチルレッドと比較しても更に大きな安定化であり、検討を行った結果天然塩基対であるA-T及びG-Cペアよりも安定であることが分かった。すなわち、カチオン性色素をDNAに導入することで天然塩基よりも二重鎖を安定化する“塩基対”を調製することに成功した。

また、この二重鎖安定性について更に詳しく検討した結果、二重鎖の安定化は色素とリン酸ジエステルとの静電相互作用及び色素間のスタッキング相互作用が寄与していることが分かった。この結果は、設計次第では天然塩基対よりも安定な人工“塩基対”を調製できることを意味しており、今後DNAの天然塩基対に依存しない新たな色素会合体調製に応用する予定である。

このように本研究ではDNAの二重鎖それぞれに色素を導入し“塩基対”を形成させることで全く新しい人工“塩基対”を調製することに成功した。この“塩基対”内では色素が強く相互作用しており、かつ二重鎖を大幅に安定化したことから、分子クラスター調製の新たなモチーフとなることが期待される。また、二重鎖形成により色素間の相互作用をON/OFF制御できることから、核酸プローブへの展開も可能である。

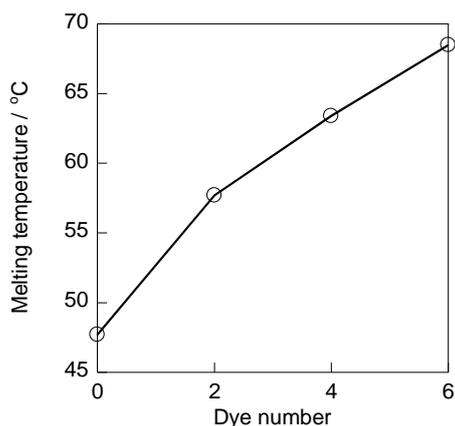


図6. DNA二重鎖の融解温度に対するカチオン性色素数の影響

#### 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 10 件)

1. H. Kashida, K. Sano, Y. Hara, H. Asanuma "Modulation of pKa of Brooker's Merocyanine by DNA Hybridization" *Bioconjugate Chem.*, 査読有 20, 258-265 (2009)
2. H. Kashida, T. Fujii, H. Asanuma "Threoninol as a scaffold of dyes (threoninol-nucleotide) and their stable interstrand clustering in duplexes" *Org. Biomol. Chem.*, 査読有 6, 2892-2899 (2008)
3. H. Asanuma, Y. Hara, A. Noguchi, K. Sano, H. Kashida "Postsynthetic modification of DNA via threoninol on a solid support by means of allylic protection" *Tetrahedron Lett.*, 査読有 49, 5144-5146 (2008)
4. T. Fujii, H. Kashida, H. Asanuma "Preparation of coherent hetero clusters with threoninol scaffold" *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 査読無 52, 699-700 (2008)
5. H. Kashida, H. Itoh, T. Fujii, H. Asanuma "Incorporation of cationic dyes into DNA for distinct stabilization of duplex" *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, 査読無 52, 700-701 (2008)
6. H. Kashida, T. Takatsu, H. Asanuma "Detection of genetic polymorphisms with high sensitivity by DNA-*perylene* conjugate" *Tetrahedron Lett.*, 査読有 48 6759-6762 (2007)
7. H. Nishioka, X. G. Liang, H. Kashida,

H. Asanuma  
2',6'-Dimethylazobenzene as an efficient and thermo-stable photoregulator for the photoregulation of DNA hybridization" *Chem. Commun.*, 査読有 4354-4356 (2007)

8. H. Kashida, T. Fujii, H. Asanuma "Construction of novel dye aggregates based on "comb-type" sequence." *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 査読無 51, 11-12 (2007)
9. T. Fujii, H. Kashida, H. Asanuma "Preparation of "comb-type" hetero aggregates by DNA-dye conjugation." *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 査読無 51, 277-278 (2007)
10. H. Kashida, T. Takatsu, H. Asanuma. "Development of high-sensitive DNA probe by using perylene." *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 査読無 51, 279-280 (2007)

[学会発表] (計 25 件)

1. 榎田啓・山口恭平ほか 二重鎖形成に伴う pKa の変化を利用した蛍光性 DNA プローブの設計 日本化学会第 89 春季年会 2009 年 3 月 30 日 日本大学
2. 榎田啓ほか カチオン性色素による"塩基対"導入による DNA 二重鎖の安定化 日本化学会第 89 春季年会 2009 年 3 月 30 日 日本大学
3. 藤井大雅・榎田啓ほか 新規ビーコンの設計を目指した Threoninol nucleotide "塩基対"の吸収スペクトルと安定性の評価 日本化学会第 89 春季年会 2009 年 3 月 27 日 日本大学
4. 高津智彦・榎田啓ほか ペリレン導入 Threoninol nucleotide を活用した高感度モレキュラービーコンの設計 日本化学会第 89 春季年会 2009 年 3 月 27 日 日本大学
5. 榎田啓・関口康司ほか 蛍光色素の DNA への多数導入による高感度ラベル化法の開発 日本化学会第 89 春季年会 2009 年 3 月 27 日 日本大学
6. 藤井大雅・榎田啓ほか DNA を足場とした新規ヘテロ会合体の開発: 極大吸収波長と励起子相互作用の関係 第 39 回中部化学関連学協会支部連合秋季大会 2008 年 11 月 9 日 名古屋大学
7. 藤井大雅・榎田啓ほか DNA-色素コンジュゲーションを利用したコヒーレントヘテロクラスターの調製 第 57 回高分子討論会 2008 年 9 月 25 日 大阪府立大学
8. 榎田啓ほか カチオン性色素会合を利用

- したDNA二重鎖の安定化 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
9. T. Fujii, H. Kashida et al. Preparation of coherent hetero clusters with threoninol scaffold 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry September 8-12, 2008 Kyoto
  10. H. Kashida et al. Incorporation of cationic dyes into DNA for distinct stabilization of duplex 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry September 8-12, 2008 Kyoto
  11. H. Kashida et al. Preparation of dye aggregates by means of DNA scaffolds XXII IUPAC Symposium on Photochemistry July 28-August 1, 2008, Gothenburg, Sweden
  12. 榎田啓ほか 蛍光色素導入DNAを用いた塩基欠失多型の高感度検出 第18回バイオ・高分子シンポジウム 2008年7月25日 上智大学
  13. 藤井大雅・榎田啓ほか DNA二重鎖形成による励起子相互作用を伴う新規ヘテロ会合体の開発、第57回高分子学会年次大会、2008年5月30日、パシフィコ横浜
  14. 高津智彦・榎田啓ほか ペリレンを利用した高感度な遺伝子多型検出用DNAプローブの開発 第57回高分子学会年次大会 2008年5月30日 パシフィコ横浜
  15. 榎田啓ほか、色素会合を利用したDNA二重鎖の安定化 第57回高分子学会年次大会 2008年5月30日 パシフィコ横浜
  16. 伊藤栄紘、榎田啓 他 DNA二重鎖形成を利用したカチオン性色素会合体の調製 日本化学会第88回春季年会 2008年3月28日 立教大学
  17. 榎田啓ほか メロシアン系色素導入DNAを用いた新規蛍光プローブの開発 日本化学会第88回春季年会 2008年3月26日 立教大学
  18. H. Kashida, T. Takatsu et al. Development of high-sensitive DNA probe by using perylene The Fifth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2007年11月21日 東京大学
  19. H. Kashida et al. Construction of novel dye aggregates based on "comb-type" sequence The Fifth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2007年11月20日 東京大学
  20. T. Fujii, H. Kashida et al. Preparation of "comb-type" hetero aggregates by DNA-dye conjugation The Fifth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2007年11月20日 東京大学
  21. 藤井大雅・榎田啓ほか “くし型” DNA配列を用いた異種色素の交互積層 第2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
  22. 榎田啓ほか DNA二重鎖形成に伴う“くし型”会合を利用したホモ色素クラスターの調製 第2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
  23. 高津智彦・榎田啓ほか ペリレンのexcimer発光を利用した遺伝子欠失多型検出用DNAプローブの開発 第2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
  24. 榎田啓 DNA二重鎖形成を利用した色素超分子の調製 第121回東海高分子研究会講演会 2007年9月7日ホテル犬山
  25. 榎田啓ほか DNAの二重鎖形成を利用したくし型色素クラスターの調製 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
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
榎田 啓 (KASHIDA HIROMU)  
名古屋大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：30452189