

## 自己評価報告書

平成23年 5月 6日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20350038

研究課題名 (和文) 機能性核酸及びペプチド核酸複合体を基体とする柔軟な情報変換システムの構築

研究課題名 (英文) Universal strategy for constructing the signal transduction systems based on functional nucleic acids and peptides assembly

研究代表者

井原 敏博 (IHARA TOSHIHIRO)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：40253489

研究分野：生物分析化学、生体機能関連化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：オリゴヌクレオチド、DNA コンジュゲート、PNA、電気化学、蛍光、金属イオン、化学センサー

## 1. 研究計画の概要

ソフトマテリアルを基体とした情報変換、増幅のための機能モジュールの開発、さらにそれらを組織化した多様なセンシングシステムの構築を行う。具体的には、ケミカルゲノミクスを基盤技術として、DNA、およびPNA (ペプチド核酸) などの核酸や核酸アナログに適切な機能性分子を化学修飾した特殊な機能性コンジュゲートを合成する。これら核酸コンジュゲートは、その機能をアロステリックに変化させる仕組みをもつ。例えば特定イオンとの相互作用、酸化還元、光照射などの刺激によりその構造や性質を変化させる。特定の相補的な核酸を足場とするとこれら複数の異なるコンジュゲート (機能モジュール) を規定された配向、距離に自在に配置することで高度に組織化された分子複合システムを精度よく構築することが可能となる。すなわち、本研究では、コンジュゲートの機能発現に関連したアロステリズムを積極的に利用して化学的 (または物理的) シグナルを変換することのできる汎用性の高い方法論を提案する。化学センサー、バイオプローブ、さらには分子マシンなど様々な応用が期待できる

## 2. 研究の進捗状況

(1) 金属イオンによる複合体形成の制御  
三本鎖構造の安定化に及ぼす銀イオンの影響を調べた結果、 $Ag^+$ がCG.C<sup>+</sup>トリプレット中のシトシン N3 プロトンを置換することで熱安定性が著しく上昇することがわかった。5つのCG.C<sup>+</sup>を含む15量体三本鎖に関しては、pH7で約30°Cもの安定化であった。

## (2) 光による核酸の可逆的連結

DNAのそれぞれの末端の一つずつ2つのア

ントラセンを化学修飾したコンジュゲートを合成した。この構造に、LEDランプにより366 nmの光を照射するとわずか数秒で末端の両アントラセンが二量化して環状のDNAを形成することがわかった。さらに、短波長 (312 nm) の光照射により可逆的に開裂することを利用して環化したDNAを再び線状化できることもわかった。このことは、テンプレートDNAという入力シグナルをDNAのコンフォメーションというかたちで記録し、さらに消去できる (rewritable memory) ことを意味する。

(3) 一塩基変異の蛍光シグナルへの変換  
末端にシクロデキストリン、またはシクロファンを修飾したDNAを合成した。塩基選択性を持つ低分子蛍光性リガンドと併用することでテンプレートDNA (標的) 上の一塩基の違いを蛍光シグナルとして取り出すことができることを示した。核酸超分子複合体上での特異的相互作用を利用しているため、従来のDNAプローブのように測定温度を厳密に制御する必要がない。また、同様にRNAを標的とすることも可能であるが、相互作用のパターンはその高次構造の相違をよく反映したものであった。

## 3. 現在までの達成度

## ②おおむね順調に進展している

計画した系のうち、一部の困難な系 (電気化学シグナルの情報変換) を除いてほぼ、何らかの結果が出てきており、それぞれ、学会発表や国際的に権威のある学術雑誌に掲載されている。

## 4. 今後の研究の推進方策

## (1) 電気化学シグナルの変換

酸化還元電位に応答する新規人工 DNA が共同研究者より供給された。現在、これを電極上に固定化する技術を確立しつつある。この DNA はそのコンフォメーションを電気化学により可逆的に制御できるので、複合体形成の電位制御が可能になる。また、逆にその酸化還元電位をモニタすることによりハイブリダイゼーションを電気化学シグナルに変換することもできる。

(2) 金属イオンとの相互作用を利用した機能性核酸の制御

最近、複数の terpyridine を DNA 骨格中に組込んだ DNA の化学合成に成功した。この DNA の相補鎖との二本鎖形成能を確認した結果、Fe<sup>2+</sup>や Ni<sup>2+</sup>存在下、分子内 1 : 2 錯生成により DNA 全体がΩ型の構造をとり、両端の DNA とターゲットから成る二本鎖構造の安定性を可逆的に制御することが可能であることがわかった。本年度は、この可逆的Ω構造形成を利用して機能性核酸の機能制御を行う。すなわち、例えば、DNA アプタマーの活性部位を分子内に導入した相補的な塩基配列によってブロック (caged) する。金属イオンの添加により構造を変化させ、活性部位がフリーになるような分子設計を行う。DNAzyme を用いれば金属イオンという化学的な刺激を異なるシグナルとして増幅することも可能である。

#### 5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計 12 件) 全て査読付き

1. P. Arslan, A. Jyo, T. Ihara, "Reversible Circularization of an Anthracene-modified DNA Conjugate through Bimolecular Triplex Formation and Its Analytical Application", *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 4843-4848 (2010). **front cover**
2. T. Ihara, A. Uemura, A. Futamura, M. Shimizu, N. Baba, S. Nishizawa, N. Teramae, A. Jyo, "Cooperative DNA Probing Using a β-Cyclodextrin-DNA Conjugates and a Nucleobase-specific Fluorescent Ligand", *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 1386-1387 (2009).
3. M. Mukae, T. Ihara, M. Tabara, A. Jyo, "Anthracene-DNA Conjugates as Building Blocks of Designed DNA Structures Constructed by Photochemical Reactions", *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 1349-1354 (2009). **front cover**
4. T. Ihara, T. Ishii, N. Araki, A. W. Wilson, A. Jyo, "Silver Ion Unusually Stabilizes the Structure of a Parallel-Motif DNA Triplex", *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3826-3827 (2009).
5. A. Kuzuya, T. Ohnishi, T. Wasano, S. Nagaoka, J. Sumaoka, T. Ihara, A. Jyo, M. Komiyama, "Efficient Guest Inclusion by β-Cyclodextrin Attached to the Ends of DNA Oligomers upon Hybridization to Various DNA Conjugates", *Bioconjugate Chem.*, **20**, 1643-1649 (2009).

〔学会発表〕(計 47 件)

1. T. Ihara, Y. Kitamura, A. Uemura, N. Baba, S. Nishizawa, N. Teramae, A. Jyo, "DNA probing by cooperative luminous complex formation on the target", *PacificChem 2010*, 2010 年 12 月 16 日, Honolulu **招待講演**
2. 井原敏博, "核酸上でのデザインされた特異反応およびその分析化学的応用", 第 20 回アンチセンスシンポジウム、2010 年 12 月 2 日、神戸市 **招待講演**
3. T. Ihara, A. Futamura, A. Uemura, Y. Kitamura, A. Jyo, Y. Sato, S. Nishizawa, N. Teramae, "Rational Construction of Luminous Structures on DNA Scaffold for Analytical Applications", *The 19th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRTXIX)*, 2010 年 8 月 30 日, Lyon
4. T. Ihara, T. Ishii, A. Jyo, "Interaction of silver ion with CG.C<sup>+</sup> base triplets in DNA triplex", *The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2009 (6ISNAC2009)*, 2009 年 9 月 28 日, Takayama
5. T. Ihara, "DNA Probing Using Luminous Complexes Assembled on the Targets", *2nd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium (SJBCS 2009)*, 2009 年 9 月 11 日, Tokyo **招待講演**

〔図書〕(計 8 件)

1. 井原敏博 (共同執筆), "核酸とカチオンの特異な相互作用", *CSJ カレントレビュー 核酸化学のニュートレンド*, 化学同人 印刷中 (2011).
2. 井原敏博, "協同的分子認識に基づく核酸プロービング", *未来材料*, NTS Inc., **10**, 10-18 (2010).
3. 井原敏博, "核酸上でのデザインされた特異反応およびその分析化学的応用", *生体機能関連化学部会研究レター*, 日本化学会生体機能関連部会, **25**, 4-8 (2010).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

1. 名称: Method of Electrochemically Detecting Nucleic Acid with the Use of DNA Conjugate  
発明者: 井原敏博  
権利者: 熊本大学  
種類: 特許権  
番号: PCT/JP2009/054542  
出願年月日: 2009 年 3 月 10 日  
国内外の別: 国際特許
2. 名称: DNA コンジュゲートを利用した核酸の電気化学的検出法  
発明者: 井原敏博  
権利者: 熊本大学  
種類: 特許権  
番号: 2008-168127  
出願年月日: 2008 年 6 月 27 日  
国内外の別: 国内特許