

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310084

研究課題名(和文) DNAを鋳型とした一次元アセン集積体の構築と光・電子機能の解明

研究課題名(英文) Construction of DNA-templated one-dimensional assembly from acene molecules and the investigation of their opt-electronic properties

研究代表者

岩浦 里愛 (Iwaura, Rika)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品分析研究領域・主任研究員

研究者番号：00450312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNAを鋳型としたチミジル酸-アントラセン誘導体TACTの自己集合により、一次元集積したアントラセン部位を構築し、このアントラセンの光・電子機能を明らかにした。時間分解蛍光スペクトルの結果から、TACTの自己集合体中のアントラセンは動きやすい環境にあるのに対し、TACT/dA20中のアントラセンはDNA鋳型により集合体中央でフェルスター機構によるエネルギー移動が可能な距離に精密に配置され、さらに水分子から十分遮断された環境にある一次元集積体となっているため、効率の良いエネルギー移動のパスとして働くことがわかった。

研究成果の概要(英文)：We report optical properties of one-dimensional anthracene stacks formed from single-component self-assembly of thymidylic acid-appended anthracene TACT and the binary self-assembly of TACT and complementary 20-meric oligoadenylic acid (TACT/dA20) in an aqueous buffer. Time-resolved fluorescence spectra for TACT suggested that the anthracene moieties in single-component assembly from TACT were flexible. Whereas the template-DNA molecule position the anthracene moieties at the center of a one-dimensional assembly, keep them at distances that permit Förster resonance energy transfer, and separate them from the solvent water molecules, which attack fluorescent molecules and cause non-radiative processes. As a result, the columnar anthracene stacks formed from the DNA-templated self-assembly of TACT can act as an energy transfer pathway in aqueous solution.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ・ ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：自己集合 DNA アントラセン 鋳型 蛍光寿命

1. 研究開始当初の背景

アセン分子がカラム状に並んだ一次元アセン集積体は、一次元励起子に由来する大きな非線形光学効果や、 π 軌道の重なりに沿った電荷移動により有機半導体となりうることから、有機デバイス製造素子として非常に注目されている(例えば、Y. Zhang et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 2756; A. D. Guerso et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17984.)。デバイス機能を大きく左右するアセン分子の電子状態は、分子の配列や会合状態に強く影響される。しかし、アセン分子は強い分子間相互作用のために凝集しやすく、また、 π 軌道の重なりが小さいヘリンボーン型の結晶構造を取りやすい。従って、デバイス化のためにはアセン分子の一次元配列・集積化手法の開発が必要不可欠である。一方、近年、DNA は分子集積のための鋳型として有用であることが明らかとなってきた。例えば、DNA 中の核酸塩基の代わりに金属配位子や色素を導入した人工 DNA の二重らせん形成を利用し、金属や色素を一次元クラスター化することが可能である (K. Tanaka et al, *Science*, **2003**, *299*, 1212; H. Asanuma et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6522.)。申請者は、これらの系とは異なる鋳型 DNA 手法により、分子をクラスターよりはるかに長い数百 nm から数 μm のスケールで一次元集積することに成功した。すなわち、DNA との分子認識部位を持つ自己集合性分子(双頭型ヌクレオチド脂質)が、鋳型 DNA との二成分自己集合により相補的核酸塩基対を形成して、らせん状の一次元ナノファイバーとなることを見いだした。以上のような背景から申請者は、アセン部位をもつ自己集合性分子を鋳型 DNA 手法により一次元集積することが可能であり、その集積体は有機デバイス材料として有力であると考えた。

2. 研究の目的

これまでに、長鎖オリゴメチレン鎖の両末端にチミジル酸を連結した双頭型ヌクレオチド脂質 **1** とその相補的成分である種々のオリゴアデニル酸(dAn, $n=2, 4, 6, 8, 10, 20, 40$) との水中での二成分集合を行った結果、**1**/dAn ($n \geq 10$) の二成分系集合体は、直径が 6-7 nm のヘリカルナノファイバーを形成し、ファイバーの長さとなせんのピッチは、用いた dAn の長さや塩基配列に強く依存することを見出した。種々の測定から、このファイバーは **1** 両末端のチミンと、dAn のアデニンが相補的な核酸塩基対を形成し、DNA と類似のヘリカルナノファイバーとなっていることが示された。さらに、アントラセンの 2 位および 6 位にチミジル酸を連結したチミジル酸-アントラセン複合体 TACT を新たに設計・合成した。この化合物 TACT 単一成分および TACT と 20 量体オリゴアデニル酸 dA20 の二成分系(TACT/dA20)の水中での UV-Vis スペ

クトルと蛍光スペクトルを測定・比較した結果、TACT/dA20 の二成分系では、アントラセンの短軸方向の遷移モーメントに帰属される吸収バンドから head-to-tail 型の配向をし、らせん構造を形成しながら J 会合(分子の双極子が一次的に並び、電子が非局在化した会合体)していることを見いだした。この結果は、DNA 鋳型によるアセン分子の一次元集積が可能であることを示すものである。以上から、本研究では、次の二項目を目的とした。

1. 鋳型 DNA による一次元アセン分子集積体の創製とその構造・形成機構の解明

DNA 鋳型による一次元アセン分子集積体を創製する。原子間力顕微鏡観察や各種分光測定から、得られた集積体の構造を明らかにする。また、この集合体の光・電子機能特性を測定するための安定な集合体形成手法を確立する。

2. 一次元アセン分子集積体の光・電子機能の解明

レーザー分光などを用いて、一次元アセン分子集積体の構造解析と分光測定を行い、集積構造と光・電子機能を体系的に明らかにし、非線形光学材料や有機半導体デバイス応用の基盤技術となる機能探索を行う。

3. 研究の方法

3.1. 自己集合体の調製

両端にチミジル酸を付加したアントラセン誘導体 TACT は、アントラセンの 2 および 6 位にペンタノールを導入した後、ホスホロアミダイト法によりチミジル酸を導入した。TACT 自己集合体は、TACT を TE バッファー (pH = 8) に分散させ、90°C で加熱・超音波照射を行って完全に溶解した。二成分自己集合の調製は、加熱・超音波照射した TACT 水溶液にオリゴアデニル酸 20 量体 dA20 を加えた。どちらの集合体も、80 °C から 20 °C まで 0.1 °C/min で降温し、4 °C で一か月静置したものを以降の測定に供した。

3.2. UV/Vis および蛍光スペクトル測定

UV/Vis スペクトル測定は、光路長 0.01 cm の石英セルを用い、各測定ごとに 25°C で 30 分の平衡化を行った。

3.3. 時間分解蛍光スペクトル測定

サンプル溶液を Nd:YAG レーザー (355 nm、パルス幅 30 ps、繰り返し 10 Hz、ビーム出力 1.0 mJ/pulse) で励起し、ストリークカメラが付属した分光器に取り込んで時間分解蛍光スペクトルを得た。

3.4. ゲル濾過クロマトグラフィーによる集合体構造の検討

ゲル濾過クロマトグラフィーは、Tris-HCl バッファーを溶出液として排除限界分子量 40,000 のカラムを用い、25°C で行った。ポリエチレングリコール/ポリエチレンオキサイド (PEG/PEO、232 < Mp < 44,700) を標準物質として自己集合体の分子量を算出した。

4. 研究成果

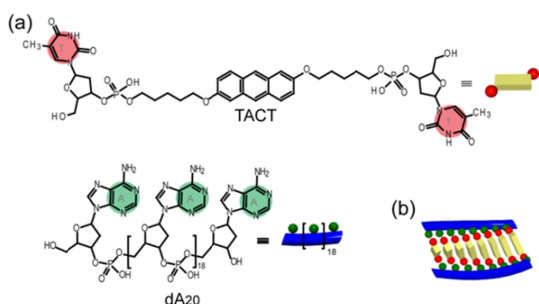


Fig.1 (a)チミジル酸-アントラセン複合体(TACT)およびオリゴアデニル酸 20 量体(dA20)の構造式、(b)TACT/dA20 の二成分系自己集合体構造の予想図

4.1 ゲル濾過クロマトグラフィーによる集合体形成の確認

自己集合体の分子量を得るため、ゲル濾過クロマトグラフィーによる評価を行った。TACT (Fig.1、 $M_w=990$)を加熱・超音波照射によりバッファーに溶解した直後のサンプルをゲル濾過クロマトグラフィーにより分析したところ、保持時間(RT)が 14.9 分および 17.3 分に二つのピークが確認できた。このピークは、PEG/PEO 換算で分子量が 9700 および 2700 に相当する。この結果は、TACT 分子は水中でただちに会合することを示している。この自己集合体を一か月静置したサンプルを同様に分析すると、新しいピークが $RT=12.9$ に現れるが、これは $M_p=26000$ (PEG/PEO 換算)に相当する(Fig.2a)。従って、TACT の自己集合は一か月放置することで促進されることが明らかとなった。このことは、後述するように、蛍光強度の時間依存的な減少とも一致している(Fig.3)。TACT と dA20($M_w=6600$)との二成分系自己集合 TACT/dA20 は、 $M_p=22000$ (PEG/PEO 換算)に相当する $RT=13.1$ に大きな一つのピークを、 $RT=14.9$ および 17.3 に非常に小さなピークを与えた(Fig.2b)。このことは、TACT/dA20 が比較的均一な会合対を形成していることを示唆している。3.1 で述べたとおり、二成分系自己集合体は DNA のハイブリダイゼーションと同様の手法で非常にゆっくりとした温度降下により調製したため、大きさが比較的均一にそろった会合体が生成しているものと考えられる。

4.2 自己集合体および二成分系自己集合体の UV/Vis スペクトル測定

TACT および TACT/dA20 を含む水溶液の UV/Vis スペクトルは、異なるパターンを示した(Fig.3a)。TACT の自己集合体から得られた UV/Vis スペクトルは、5 つ(310、325、342、385、405 nm)に分裂した特徴的なパターンを示した(Fig.3a、---)。TACT が良く分散する

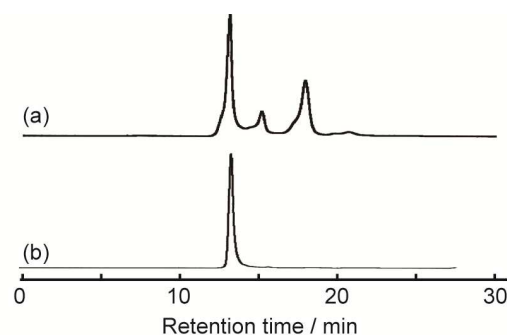


Fig.2 (a)TACT 自己集合体および(b)TACT/dA20 二成分系自己集合体のゲル濾過クロマトグラム

THF/Tris-HCl 混合溶媒中でも同様のスペクトルが得られる(Fig.3a、—)。従って、TACT の自己集合体中では、基底状態および励起状態の電子状態は摂動を受けていないことが示唆される。しかし TACT の自己集合体を含む水溶液の吸光度は THF/Tris-HCl 混合溶媒中のそれより非常に小さい(淡色効果)ことから、アントラセン部位が会合していることを示している。一方、TACT/dA20 の二成分系自己集合の吸収スペクトルは非常にブロードであった(Fig.3a、-.-.-)。加えて、TACT/dA20 の吸収帯は 600 nm 付近にまで広がっていた。このことは、TACT/dA20 中ではアントラセン部位が会合し、基底状態が非常に安定化されていること、二成分系自己集合体 TACT/dA20 に含まれるアントラセンと自己集合体 TACT に含まれるアントラセンは電子状態が異なること、を示している。

4.3. 蛍光スペクトルの時間依存性

自己集合体 TACT と、二成分系自己集合体 TACT/dA20 の励起スペクトルは異なるパターンを示した(Fig.3b、c)。TACT の励起スペクトルは、最大蛍光波長 450 nm、ショルダーを ~540 nm 付近まで示した(Fig.3b)。さらに、調製後 30 日間でその蛍光強度は約 50 %に減少した後、一定値となった。また、THF/Tris-HCl 混合溶媒中の TACT の励起スペクトルと比較すると、TACT のスペクトルはレッドシフトした。このことは、UV/Vis スペクトル測定の結果同様、TACT 自己集合体中のアントラセン部位が会合していることを示す。同様に、TACT/dA20 の励起スペクトル測定においても、最大蛍光波長が 450 nm で ~540 nm 付近までショルダーをもつスペクトルパターンが得られたが、時間経過による蛍光強度の減少は TACT の場合よりさらに顕著であった(Fig.3c)。さらに、最大蛍光波長はサンプル調製後 0 日から 30 日にかけて 450 nm から ~465 nm にシフトした。この見かけのレッドシフトは、長波長成分(~540 nm)の寄与が増大したためと考えられる。

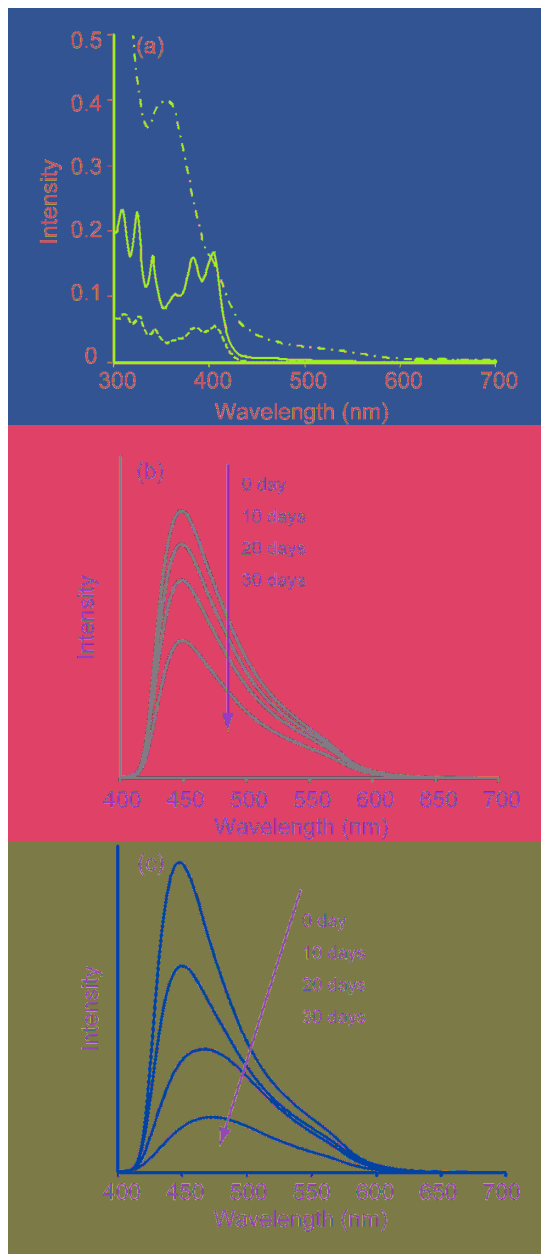


Fig.3 (a)TACT (---)、TACT/dA20(-.-.-)、の Tris-HCl バッファー中、および TACT(—)の THF/Tris-HCl バッファー混合溶液中の吸収スペクトル、(b)TACT および(c)TACT/dA20 の TE バッファー中での蛍光スペクトル(ex=360 nm)

4.4. TACT の時間分解蛍光スペクトル

TACT の自己集合体を含む水溶液のストリークカメラ像および時間分解蛍光スペクトルを Fig.4a および b に示す。図に示すように、励起直後は 450 nm に強い蛍光極大を、530 nm にショルダーをもつスペクトルが得られるが、これは TACT の励起スペクトルは二つの成分が寄与していることを示す。TACT の蛍光減衰曲線を指数関数でカーブフィッティングして蛍光寿命を求めた(Table1、Fig.5a)。興味深いことに、励起して 1 ns 以内に最大蛍光波長は 450 nm から 460 nm へと時定数約 100 ps でシフトしていることがわかる。一般的に、蛍光スペクトルの時間依存的なレッド

シフトは Franck-Condon の原理および溶質-溶媒の相互作用いわゆる、ダイナミックストロークシフト(DDS)として説明される。しかし、水分子の再配向は通常 20 ps 以下である。従って、TACT の系で観察された ~ 100 ps の時定数は水分子の再配向によるものではなく、励起された TACT 分子を取り囲む隣接した TACT 分子による再配向であると考察した。すなわち、450–460 nm の蛍光は励起された TACT の双極子モーメントを打ち消すために隣接した TACT 分子が再配向できるほど動きやすい柔軟な集合体であると考えられる。TACT の蛍光寿命が短い($\tau = 0.35$ ns)ことは、TACT 分子の無輻射的なプロセスで再配向が起こっていることと一致している。一方、長波長側に観察される 530nm 付近の蛍光成分はアントラセンのエキシマー蛍光として報告された波長の値と一致している。また、励起スペクトルで観察された 600 nm まで拡張したブロードなショルダーや、得られた蛍光寿命($\tau = 3.5$ ns)はこれまで報告されているアントラセンのエキシマーと非常に良く一致した。通常、室温でアントラセンのエキシマーが生成することは難しいと言われるが、我々は TACT の自己集合体中ではアントラセンのエキシマーが生成しやすい状態になっているものと推察した。

4.5. TACT/dA20 の時間分解蛍光スペクトル

二成分系自己集合体 TACT/dA20 の時間分解蛍光スペクトルは TACT と異なる挙動を示した(Fig.4c)。蛍光減衰曲線から、蛍光波長 464nm および 534nm それぞれの成分について、 $\tau = 3.3$ ns($I = 38\%$)および $\tau = 0.4$ ns($I = 62\%$)という蛍光寿命が得られた。TACT よりレッドシフトした最大蛍光波長が 464nm に観察されたことから、TACT/dA20 中のアントラセン部位はより安定化されていると考えられる。さらに、この波長成分の蛍光寿命は TACT のそれより長いこと、DDS が観察されないことから、TACT/dA20 中のアントラセンは励起された後に、無輻射による失活経路がより阻害されていると考えられる。この理由としては、TACT/dA20 の二成分系自己集合では鑄型 DNA の効果により TACT 分子は固定されて動きにくくなっていることや、DNA が集合体を囲む水分子からのアタックを阻害しているためであろう。TACT/dA20 の時間分解蛍光スペクトル中にも、TACT と同様、 ~ 530 nm 付近にショルダーが観測された。しかし、TACT/dA20 の蛍光寿命は、アントラセンのエキシマーより非常に短い値であった。そこで我々は、TACT/dA20 の二成分系自己集合体中ではアントラセンがアントラセンエキシマーの様な安定化した状態を形成し、スタックしたアントラセンを経由してエネルギー移動が起こっているものと考察した。

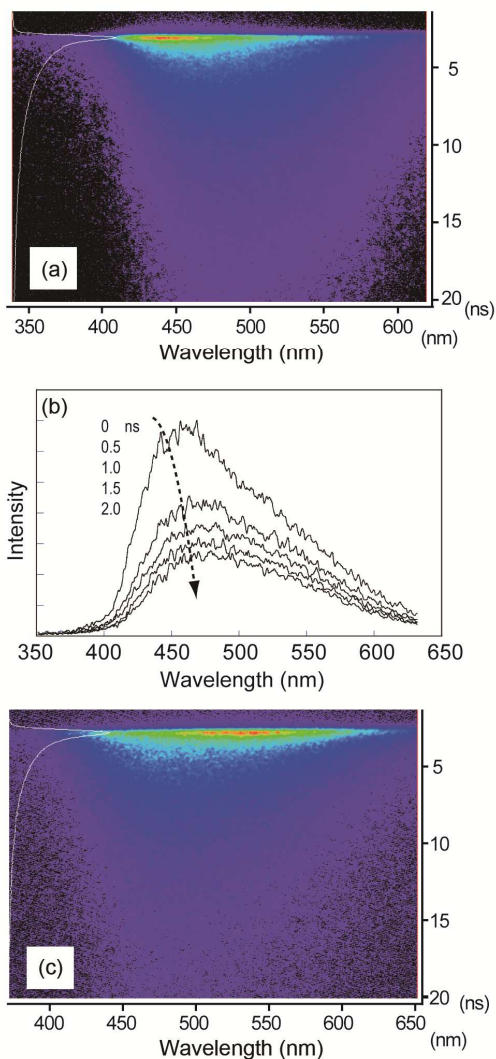


Fig.4 (a)TACT および(c)TACT/dA20 の集合体を含む水溶液のストリークカメラ像(ex=355 nm)および(b)TACT の時間分解蛍光スペクトル

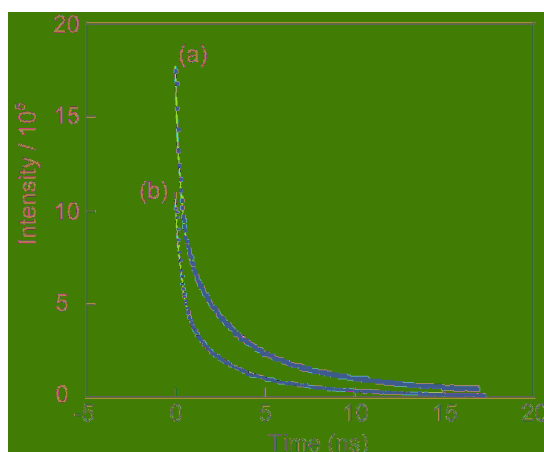


Fig.5 (a)TACT および(b)TACT/dA20 の蛍光減衰曲線

4.6. 二成分系自己集合体中でのエネルギー移動

二成分系自己集合体 TACT/dA20 の 534nm の蛍光成分は、集合体中のアントラセンがエネ

ルギー移動の経路を形成することに起因した非常に短い蛍光寿命を示すものと推察された。TACT/dA20 の二成分系自己集合体中では、アントラセン部位は鋳型 DNA により構造が精密に制御された一次元集合体を形成しているものと考えられる。鋳型 DNA はアントラセン部位を一次元集合体の中心部分に精密に配置させ、それぞれのアントラセン間を Förster 機構によるエネルギー移動が可能な距離に保持するとともに、失活の原因の一つである水分子からアントラセンを保護する役割も担っているであろうと予想できる。TACT/dA20 の集合体中でエネルギー移動が起こっていることを確かめるため、我々は dA20 の 5'末端に HEX 色素(最大吸収波長 530 nm、最大蛍光波長 560 nm)を修飾した 5'-HEX dA20 を鋳型 DNA として TACT との二成分系自己集合体を形成させた (TACT/5'-HEX dA20)。その結果、この TACT/5'-HEX dA20 を含む水溶液の蛍光スペクトルは、非常に小さな 480 nm の蛍光および大きな 580 nm の蛍光を示し、さらに TACT の 530 nm の蛍光成分は完全に消失した(Fig.6)。このことは、TACT/5'-HEX dA20 の二成分系集合体中のアントラセン部位から、HEX へのエネルギー移動が起こっていることを強く示唆する結果である。

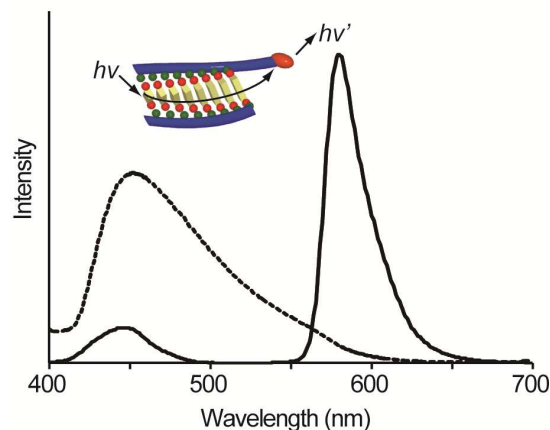


Fig.6 TACT/dA20(---)および TACT/5'-HEX dA20(—)の蛍光スペクトル(ex=360 nm)

Table1. TACT および TACT/dA20 中でのアントラセンの最大蛍光波長、蛍光寿命、および強度割合

Assembly	Wavelength (nm)	τ (ns)	I
TACT	450		
	460	0.35	0.56
	530	3.5	0.44
TACT/dA ₂₀	464	3.3	0.38
	534	0.4	0.62
anthracene	~460	-	
	530	~2 ns	weakest

4.7. まとめ

以上のように、DNA を鋳型としたチミジル酸-アントラセン誘導体の二成分系自己集合体中では、アントラセン部位が精密に会合し一次元集合体を形成することにより、効率的なエネルギー移動媒体となることを示すことができた。超分子化学と DNA 科学を融合させ、これまでにない有機アセン系分子の集合体構造を精密に制御することで、ナノエレクトロニクス材料やナノ光学材料への発展が期待できる。

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) Rika Iwaura, Hiroharu Yui, Yuu Someya, Mayumi Ohnishi-Kameyama “Construction of energy transfer pathways self-assembled from DNA-templated stacks of anthracene” *J. Photochem. Photobio. B: Biology*, **2014**, *130*, 199-204 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.11.013>
- (2) Rika Iwaura, Mayumi Ohnishi-Kameyama “Construction of supramolecular helical nanofibers using renewable biomaterials: self-assembly of a cytidylic acid-appended bolaamphiphile in lemon juice” *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 6633-6635 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1039/C2CC17787K>

[学会発表] (計 11 件)

- (1) 白井睦, 岩浦里愛, 亀山眞由美 「Delivery of fluorescent nanoparticles into cancer cell nuclei」第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 4 日, 神戸
- (2) 岩浦里愛 「DNA を利用したナノアーキテクチャの構築と制御」第 3 回触媒化学融合研究センター講演会, 招待講演 2013 年 11 月 8 日, つくば
- (3) 白井睦, 岩浦里愛, 亀山眞由美 「ヌクレオチド部位をもつフルオレセイン誘導体の自己集合による蛍光性ナノ粒子の合成と細胞内導入」第 62 回高分子討論会, 2013 年 9 月 13 日, 金沢
- (4) Rika Iwaura, Mayumi Ohnishi-Kameyama 「Construction and application of diverse nanostructures self-assembled from nucleotide-appended bolaamphiphiles」15th Asian Chemical Congress 2013, 2013 年 8 月 20 日, シンガポール
- (5) 岩浦里愛, 由井宏治, 染谷悠, 亀山眞由美 「チミジル酸をもつアントラセン色素の会合挙動と光学特性」第 61 回高分子討論会, 2012 年 9 月 21 日, 名古屋
- (6) 白井睦美, 岩浦里愛, 亀山眞由美 「DNA を鋳型にした双頭型ヌクレオチド脂質の多成分系自己集合とゲル電気泳動による

評価」第 61 回高分子討論会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋

- (7) Rika Iwaura, Mayumi Ohnishi-Kameyama 「Supramolecular helical nanofiber formation from the self-assembly of cytidylic acid-appended bolaamphiphile with di- and tri-carboxylic acid」4th EuChemS Chemistry Congress, 2012 年 8 月 28 日, チェコ共和国
- (8) 岩浦里愛, 亀山眞由美 「双頭型シチジル酸脂質とトリカルボン酸の自己集合による左巻きらせんナノファイバー」シンポジウムモレキュラーキラリティーアジア 2012, 2012 年 5 月 16 日, 福岡
- (9) Rika Iwaura, Tomohiko Iizawa, Mayumi Ohnishi-Kameyama 「Construction of supramolecular nanofiber from nucleotide-appended bolaamphiphile and renewable biomaterials」21st Academic Symposium of MRS-Japan 2011, 2011 年 12 月 19 日, 横浜
- (10) Rika Iwaura, Tomohiko Iizawa, Mayumi Ohnishi-Kameyama 「Helical nanofiber formation from the self-assembly of cytidylic acid-appended bolaamphiphile in acidic solutions」IUMRS-ICA 2011 12th International Conference in Asia, 2011 年 9 月 21 日, 台湾
- (11) 岩浦里愛 「DNA 鋳型によるナノファイバーアーキテクトニクス」第 26 回若手フォーラム, 招待講演 (生体機能関連化学部会) 2011 年 9 月 11 日, つくば

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
岩浦 里愛 (IWAURA, Rika)
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品分析研究領域・主任研究員
研究者番号: 00450312
- (2) 連携研究者
由井 宏治 (YUI, Hiroharu)
東京理科大学・理学部第一部化学科・教授
研究者番号: 20313017