

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750198

研究課題名(和文) DNA上の疎水空間配列を用いた機能分子集積法の開発

研究課題名(英文) Control of formation of molecular assembly using artificial hydrophobic cavity in DNA

研究代表者

高田 忠雄 (Takada, Tadao)

兵庫県立大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60511699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：DNA内部に人工的に導入した疎水空間を機能性色素分子が結合する場として利用することで、DNAへの位置特異的な分子結合を実現し、疎水空間の配列に基づく機能分子の集積を通じた機能性DNAの構築と構造・機能評価に関する研究を行った。また、機能性発光色素とDNAの変異部位に対する結合様式を詳細に調べ、結合変化に伴う発光性変化を利用した高感度蛍光センサーの開発を行った。

研究成果の概要(英文)：We have established a convenient way to construct the molecular assembly of functional dyes within DNA using an artificial hydrophobic pocket created in DNA by replacing nucleotides with abasic site analogs. We also investigated the photochemical properties of the molecular assembly in the complex composed of DNA and the functional dyes. The facially stacked functional dyes in DNA were found to generate a long-lived charge separated state by photo-excitation and display photocurrent with high efficiency. We have also developed the fluorescence sensor for the target nucleic acid or metal ions using the unique binding behavior of the hydrophobic fluorescent dyes to the mutation sites in DNA.

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 光電子移動反応 蛍光センサー 光電流 分子デバイス

### 1. 研究開始当初の背景

DNA は核酸塩基対が $\pi$ スタックした構造を有しており、化学合成によって塩基配列と長さ(塩基数)が明確に決まった DNA を容易に得ることができること、化学修飾によって機能分子を自在に導入することが可能であることから、機能性材料としての DNA の応用研究が広く行われている。さらに近年、DNA の塩基配列情報に基づく自己組織化を利用したナノ構造体の構築の研究が盛んに行われている。これらの特徴に合わせて、目的に応じて修飾機能性 DNA を設計・合成しそれらを組み合わせることにより、様々な機能を有する DNA ナノデバイスを構築する研究が広く行われている。

### 2. 研究の目的

近年 DNA はナノテクノロジーにおける分子材料として注目を集め、核酸塩基の配列情報に基づく自己組織化によりナノ構造体を構築する研究が活発に行われている。しかしながら、核酸塩基のみから構成される DNA 構造体は発光性・磁性・導電性等の機能・物性を示さない。従って、DNA 分子構造に起因する機能や物性を有するナノ組織体の創成するためには、何らかの方法を通じて DNA に機能を付与することが必要であり、DNA ナノ構造体の構築法とともに DNA に機能分子の集積・配列する方法の開拓が極めて重要である。ナノスケールで機能性色素が組織化された構造体は、効率的かつ方向性を持った電荷輸送を可能にすることから、光応答デバイスや分子エレクトロニクスへの応用が期待されている。化学修飾や組織化によって機能性色素の集積・配列を可能とする DNA は、優れた分子材料として有望視されている。

本研究では、DNA 内部に人工的に創り出した疎水空間を機能分子な結合の場と利用することで機能分子の位置特異的な結合を実現し、DNA 上の疎水空間配列をテンプレートとした分子集積・分子配列法を確立することを行った。さらに、分子配列に依存した発光および電子移動特性の評価を行い、機能分子の配列・集積によって初めて発現される新規 DNA ナノ構造体および DNA ナノデバイスの構築に関する研究を行った。また、強い発光性を示す疎水性色素分子の DNA の変異部位に対する特異な結合様式を調べ、結合変化に伴う発光挙動変化を利用した蛍光センサーの開発を行った。

### 3. 研究の方法

DNA 内部に人工疎水空間を導入することを目的に、塩基部を持たないデオキシリボスペーサー(dS)で塩基対を置換した DNA を設計した。DNA 上に配列するためのリガンド分子として水溶性ペリレンジイミド(PDI)誘導体を合成し、DNA に導入した空間への結合を各種スペクトル測定により評価した。また、作製した PDI と DNA の複合体の物性・

機能評価に関して、レーザー時間分解過渡吸収測定法を用いて光電子移動反応を調べ、また複合体を固定した電極を作製し、光電流変換特性についての検討を行った。

### 4. 研究成果

疎水空間を有する DNA 構造をテンプレートとして、機能性有機色素として広く用いられているペリレンジイミド(PDI)を組織化させた PDI/DNA 複合体を作製し、時間分解レーザー過渡吸収法を用いて光誘起電子移動ダイナミクスを調べるとともに、PDI/DNA 複合体の単分子膜修飾電極の光電応答特性について検討を行った。

塩基部を持たない dS を用いて DNA 内部に疎水空間を導入し、PDI 分子の組織化を行った(図 1)。PDI の吸収スペクトルと滴定実験、および会合体の CD スペクトル変化から、dS/dS が一つの場合、PDI は単量体で結合し、dS/dS を連続して導入するとその数に応じて PDI が空間内で組織化することが分かった。

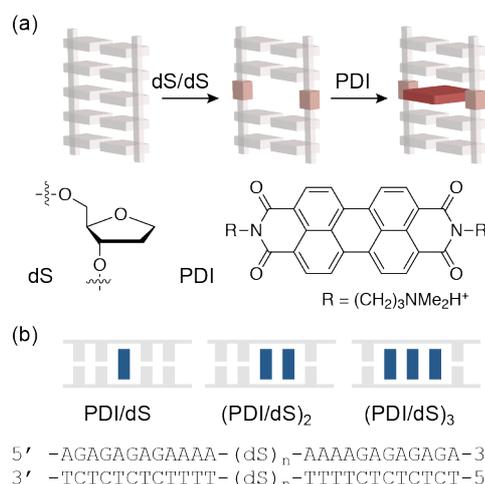


図 1 (a) 疎水空間へのリガンド分子の特異的な結合。(b) 疎水空間を導入した DNA 配列

次に、PDI/DNA 複合体における光誘起電子移動反応について調べた(図 2)。PDI 励起によって、数 ps で PDI<sup>-</sup>に帰属される吸収が 720 nm に観測され、隣接 A との間で電荷分離が起こることが分かった(PDI<sup>-</sup>-A<sup>+</sup>)。その後、再結合が 100 ps 以内で起こり、わずかに残る長寿命成分(> 1 ns)はホールが G まで移動した PDI<sup>-</sup>-G<sup>+</sup>の電荷分離状態と考えられる(図 2a)。PDI 同士がスタックした (PDI/dS)<sub>2</sub> では、1 ns 以上の長寿命成分が観測され、600 nm 付近に新たに吸収が観測された(図 2b)。これは PDI 分子間の電子の非局在化した状態に帰属された。(PDI/dS)<sub>3</sub> においても同様の電子移動プロセスが観測された。次に、(PDI/dS)<sub>n</sub> を修飾した電極の光電応答特性を調べた。PDI 励起により生じる光電流は、PDI の数に応じて 18, 63, 145 nA/cm<sup>2</sup> と大きく増加した。この差は PDI の

分子数に基づく光吸収効率の増加と PDI 間の電子移動によって生じる長い寿命成分に起因すると考えられ、PDI の組織化によって光電応答特性が向上することが実証された (図 3)。

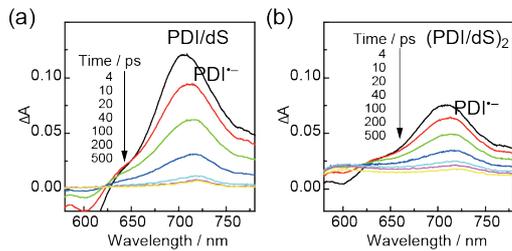


図 2 (a) PDI/dS および (b) (PDI/dS)<sub>2</sub> のレーザー過渡吸収測定結果。

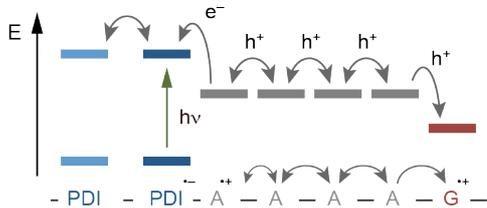


図 3 PDI/DNA 複合体における光電荷分離反応

DNA 内のミスマッチ塩基や無塩基部等の変異部位を認識し特異的に結合するリガンド分子の開発と、その特性を利用した遺伝子センサーの開発が広く行われている。PDI 分子は優れた光化学的性質と強い会合性を持ち、環境応答型の発光センサー分子としてや核酸の高次構造の安定化・構造制御に利用されている。

前述の通り、カチオン性側鎖を有する PDI が DNA 内部の疎水空間に特異的に結合し、また空間内で組織化することを見出した。そこで、PDI が有する特異な結合特性を利用し、DNA の特定部位に結合した際の PDI の発光挙動変化に基づく蛍光センサーについて検討を行った (図 4a)。PDI のスペクトル変化の観測から、DNA 内のミスマッチ塩基対に対して PDI は特異的に結合し、T/T、T/C ミスマッチ部位に対して二量体を形成して結合することが分かった (図 4b)。PDI の発光を観測した結果、二量体形成した PDI がエキシマー発光を示すことが分かった (図 4c)。さらに、T/T ミスマッチ塩基対が Hg<sup>2+</sup>と錯体を形成することを利用し、Hg<sup>2+</sup>を蛍光に PDI のエキシマーによって検出することを行った (図 4c)。Hg<sup>2+</sup>の添加に伴い PDI のエキシマー発光は減少し、塩基対形成によって二量体形成が妨げられていることに対応する。これらの結果から、T-Hg-T 形成を PDI のエキシマー発光変化と関連付けることで Hg<sup>2+</sup>の検出が可能であることが示された。

次に、電子供与性基を導入して電子移動消光を抑え発光性を高めた PDI を用いた核酸

検出センサーの開発を行った。PDI 誘導体の DNA への結合と、発光変化を利用した DNA 検出スキームを図 5a に示した。

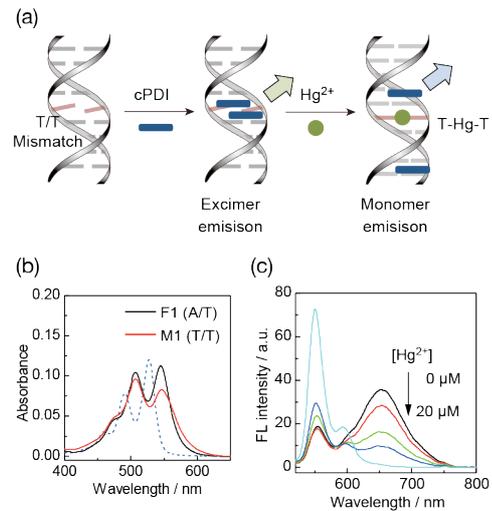


図 4 (a) PDI の T/T ミスマッチ塩基への結合とエキシマー発光。(b) ミスマッチ塩基対に結合した PDI 二量体の吸収スペクトル。(c) T-Hg-T 塩基対形成を利用した蛍光観測による Hg<sup>2+</sup>検出

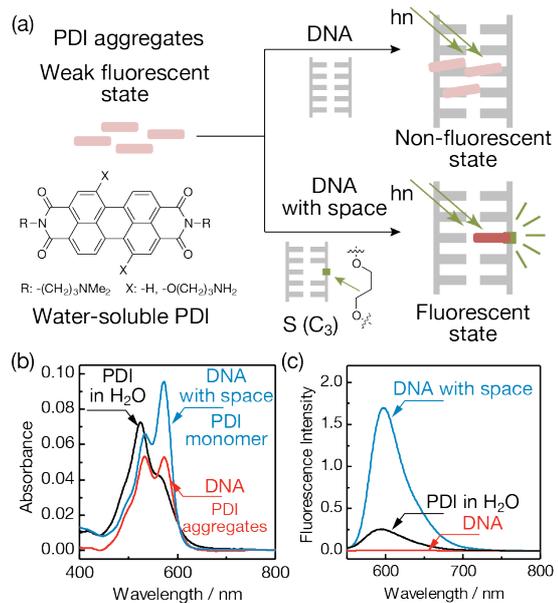


図 5 (a) DNA に結合した PDI 誘導体の発光挙動変化。(b) PDI の吸収スペクトル。(c) 蛍光スペクトル

PDI は DNA 上で会合体を形成し無蛍光状態となるが、結合部位として働く空間(C<sub>3</sub>)を持つ二本鎖 DNA では、PDI はその空間に結合することで消光が抑えられ発光を示すようになることが予想された。吸収スペクトル測定から PDI の結合を調べたところ、空間を持たない DNA では PDI 会合体を形成し、空間を持つ DNA では単量体として結合することを示すスペクトルが観測された (図 5b)。次に蛍光測定を行ったところ、会合状態にある PDI はほとんど発光を示さないのに対し、空間に

単量体として結合した PDI は非常に強い発光を示すことが分かった (図 5c)。PDI 会合体と比較して、空間に結合した PDI は 100 倍以上の強い発光を示すことが分かった。

次いで、PDI の発光変化を利用し、ターゲット DNA 検出および塩基識別を試みた (図 6)。設計した C<sub>3</sub> スペースとステム・ループ構造の MB プロブに対して、ランダムに結合し会合状態を形成した PDI は全く発光を示さないが、ターゲット DNA とハイブリダイズし、それによって形成された空間に結合した PDI は非常に強い発光を示した。スペースに対する塩基が A および G の時に発光が弱くなっていることから、プリン塩基とピリミジン塩基の違いを識別できることが分かった。以上の結果から、空間への結合に伴う PDI の発光変化を遺伝子検出センサーに応用できることが示された。

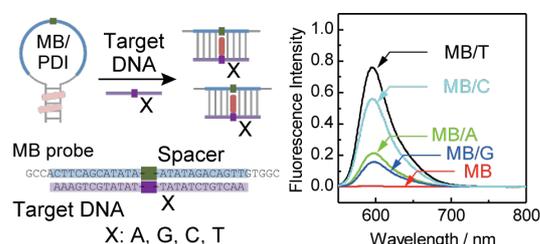


図 6 PDI の結合変化に伴う発光変化を利用した蛍光センサー

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① T. Takada, T. Tochi, M. Nakamura and K. Yamana, Preparation of ferrocene-functionalized gold nanoparticles by primer extension reaction on the particle surface, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 2014, 2661-2663. 査読有  
DOI:10.1016/j.bmcl.2014.04.062
- ② T. Takada, A. Ashida, M. Nakamura, M. Fujitsuka, T. Majima and K. Yamana, Photocurrent Generation Enhanced by Charge Delocalization over Stacked Perylenediimide Chromophores Assembled within DNA, *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 2014, 6814-6817. 査読有  
DOI:10.1021/ja501535z
- ③ T. Takada, Y. Kawano, A. Ashida, M. Nakamura, K. Kawai, T. Majima and K. Yamana, Synthesis and charge transferability of DNA possessing a naphthalimide photosensitizer at an extrahelical position, *Tetrahedron Lett.* **54**, 2013, 4796-4799. 査読有  
DOI:10.1016/j.tetlet.2013.06.140
- ④ T. Takada, A. Ashida, M. Nakamura and K. Yamana, Cationic

perylene-diimide as a specific fluorescent binder to mismatch containing DNA, *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 2013, 6011-6014. 査読有  
DOI:10.1016/j.bmc.2013.07.040

- ⑤ T. Takada, Y. Otsuka, M. Nakamura and K. Yamana, Molecular arrangement and assembly guided by hydrophobic cavities inside DNA, *Chem. Eur. J.* **18**, 2012, 9300-9304. 査読有  
DOI:10.1002/chem.201201469

[学会発表] (計 4 件)

- ① 高田忠雄、DNA 構造を足場に組織化された機能性色素の光電子移動反応、第 34 回光化学若手の会、神戸セミナーハウス、2013 年 6 月
- ② 高田忠雄・芦田茜・中村光伸・川井清彦・藤塚守・真嶋哲朗・山名一成、DNA 上に組織化されたペリレンジイミドの光誘起電子移動反応、2013 年光化学討論会、愛媛大学城北地区、2013 年 9 月
- ③ Tadao Takada, Akane Ashida, Mitsunobu Nakamura, Mamoru Fujitsuka, Tetsuro Majima, and Kazushige Yamana, Photochemical behavior of cationic perylenediimide derivatives bound to defect sites and cavity within DNA, KJFP-2013, ソウル国際大学、2013 年 11 月
- ④ Tadao Takada, Akane Ashida, Mitsunobu Nakamura, Kiyohiko Kawai, Mamoru Fujitsuka, Tetsuro Majima, Kazushige Yamana, Photoinduced charge transfer dynamics of perylenediimide assembly organized in DNA duplexes, ISNAC2013, 神奈川大学、2013 年 11 月

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 忠雄 (TAKADA, Tadao)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：60511699