

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：36102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670008

研究課題名(和文)分岐型DNA合成を基盤とするDNAカプセルおよびDNAシートの創製

研究課題名(英文)Assembly of DNA capsule and sheet based on the syntheses of branched DNA molecules

研究代表者

今川 洋 (Imagawa, Hiroahi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：80279116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNAは一本鎖であるが、核酸塩基の持つ相補的な水素結合形成により、二重螺旋構造となる。もし、三本に枝分かれしたDNAを化学的に調整できれば、これを構成単位とする、二重螺旋以外の多様な構造の分子会合体が形成可能になると考えられる。本研究では、三方向に核酸を配置した分岐型DNAを合成し、これを会合させることで、シート状やカプセル状の新規なDNA会合体を合成することを目指して研究を展開した。その結果、相補的な塩基を持つ分岐型DNA二種と、塩基性のゲスト分子1分子を水中で混合することで、ゲスト分子を取り込んだカプセル型構造を取っている可能性がある、新規な三成分系錯体が形成する現象を見出した。

研究成果の概要(英文)：The DNA double helix is held together by complementary base pairing stabilized by hydrogen bonds. However, chemical synthesis of a branched form of DNA act as a unit molecule, will facilitate the formation of a variety of nucleic acid structures other than the double helix. In this study, we designed and synthesized novel threefold-symmetric branched DNA molecules containing 1, 3, 5-trisubstituted benzene as a planar central unit. The properties of the synthetic DNA molecules were then studied, which revealed a novel ability of the branched DNA species to complex with guest molecules. Structural properties of the complex were analyzed using spectroscopic measurements as well as computer simulation methods, which demonstrated the formation of a novel three-component complex.

研究分野：有機合成化学

キーワード：機能性分子 人工DNA 分岐型DNA 包接化合物 超分子化学 分子カプセル

### 1. 研究開始当初の背景

1978年, Lehn らによって定義され, 1987年のノーベル賞に輝いた「超分子化学」は, 近年急速に進歩している「自己集合性分子の化学」の原点であり, 材料化学や機能性分子化学, また最近では分析化学の新しい手法に発展するなど, 幅広い科学分野の基盤へと進化している。たとえば, デザインされた配位子と金属を組み合わせて超分子を合成することで, 分子の籠や, 分子の反応フラスコを生み出す技術や, 最近報告された, 分子が規則正しく整列した超分子構造を, 分子を整列させる間仕切りとして利用して, 液体状の分子のX線結晶解析に成功した東京大学の藤田らの報告などがある。

このように現在幅広い分野で発展している「超分子の化学」であるが, その定義は, 複数の分子が弱い非共有結合性の分子間力相互作用で会合し, 高い秩序で分子集合体を形成することによって現れる新しい機能を対象とする学問とされている。見方を変えれば, これはすでに知られている生体内分子の機能の解釈にも当てはまる。たとえば, 生命の遺伝子情報の伝達を担うDNAの二重らせん構造は, シトシン, アデニン, チミン, グアニンの四種の核酸塩基のうち, 互いに相補的な二組の塩基対がお互いを認識し, 安定な水素結合を形成することにより形成されるが, これは核酸塩基の持つ精密な分子認識能を基盤とした超分子形成に他ならない。このような考えのもと, DNAの超分子形成を利用して, 複雑な形状の会合体を調整しようとする試みが行われている。例えば Seeman らは, 天然型二本鎖DNAで構築されたDNAブロックで多様な立体を組み上げる先駆的な研究を行っている。最近, ドイツ Stuttgart 大学の Richert らは, 人工分子をコアとして, 多方向に核酸を配置する分子デザインにより, DNA超分子会合体の生成を報告しているが, 詳細な機能の検討までは実施していない。

### 2. 研究の目的

本研究では, DNAの持つ精密な超分子構築能を利用して, 三本鎖分岐型DNAを合成し, これをユニット分子とすることで, これまで例が無い, DNAカプセルを始めとする, 二重らせん以外の多様な分子会合体の創製を目的とした。すなわち, 三方向に同一の核酸を配置した人工DNA分子を, 相補的な塩基を持つ二種類準備して, これらを混合することで, 高次のDNA会合体を組み上げることに挑戦した。(図1)合成が期待される, DNAカプセルもしくはDNAシートは, これまで例が無い生体親和性が高い新規な機能性素材となると考えた。

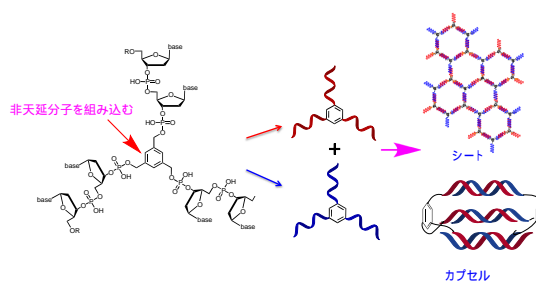


図1 DNAシートやカプセルの構造

### 3. 研究の方法

三方向に核酸を配置するコア分子には, 生体中での代謝の容易さも考慮して, benzene-1,3,5-triyltrimethanolを用いることとし, 液層法にて核酸を順次延長するルートでの合成を検討した。核酸の縮合法には, 核酸の固層合成において実績のあるアミダイト法を用い, トリオールに対して三カ所同時に同じ種類の核酸を縮合し, これを順次繰り返してDNA多量体の合成を目指す計画を立てた。得られた三本鎖DNAの構造解析は, NMRでの解析の他, 質量分析装置による分子量の測定により, その構造を確認できると考えた。

### 4. 研究成果

合成計画に従い, benzene-1,3,5-triyltrimethanol(4)の調整から開始した。メシチレン(1)をAIBNとNBSにより臭素化してトリプロモ体2とし, 酢酸ナトリウムとの求核置換反応によりトリアセテート体3とした。ナトリウムエトシキドを用いて加溶媒分解

を行うことで目的の **4** を得ることが出来た。

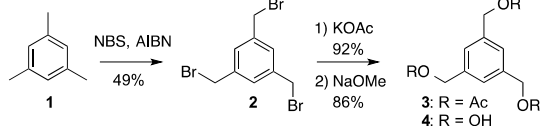


図2 トリオール体 **4** の合成

次に、定法によって合成したアミダイト体と **4** を用いて分岐型 DNA の合成を行った。 **4** を各核酸のアミダイト体とテトラゾールを触媒に縮合させた後、*tert*-butylhydroperoxide を用いて亜リン酸部を酸化した。まずは三量体の合成を目指し、ここで全ての保護基の脱保護を行うこととした。すなわち、アンバーライトを用いて5'位水酸基の脱トリチル化を行い、得られた脱トリチル体をアンモニウムとメチルアミンを用いてリン酸部のシアノエチル基と塩基上の保護基の脱保護を行うことで、分岐型 DNA 三量体 **8A**, **8T**, **8G**, **8C** をそれぞれ合成した。(図3)

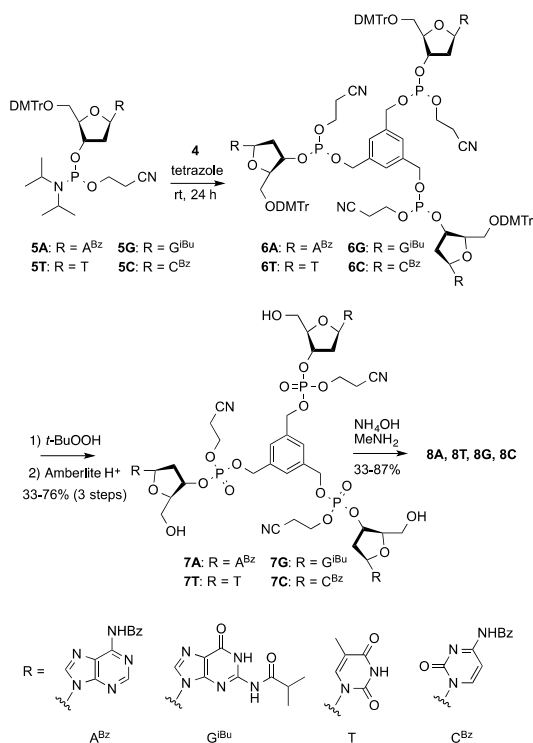


図3 DNA 三量体の合成

図4に合成できた分岐型 DNA 三量体 **8A**, **8T**, **8G**, **8C** の構造を示す。

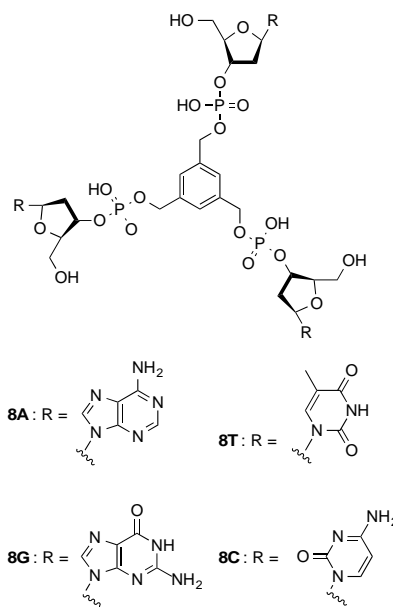


図4 合成した DNA 三量体の構造

次に、合成できたこれらの分岐型 DNA 三量体を用いて水中での会合能について検討した。まず、相補的塩基を持つ分岐型デオキシアデノシン三量体 **8A** と分岐型チミジン三量体 **8T** を 1:1 の比率で重水中にて混合し  $^1\text{H}$  NMR を測定した。もし、混ぜ合わせた三量体間で相互作用しているのであれば、スペクトルのシグナルは混合前と比較して、シフトが観測されると予想できる。しかしながら、期待に反し  $^1\text{H}$  のケミカルシフトに一切変化は見られなかった。また、分岐型デオキシチジン三量体 **8C** と分岐型デオキシグアノシン三量体 **8G** でも同様に、ケミカルシフトに変化は一切見られなかったことから、やはり水中での水素結合による会合体形成は難しいと考えられた。そこで、次に DNA の蛍光染色剤である臭化エチジウム(以下、EtBr と省略) **9** を添加し、何らかの相互作用が観測されるか検討してみることにした。 **9** は、DNA にインターカレートし、疎水的環境におかれることで水による消光から逃れて蛍光を発するとされている。この **9** と分岐型 DNA 三量体を 1:1 で混ぜ合わせ、365 nm の UV 照射による蛍光を観測してみた。(図5)

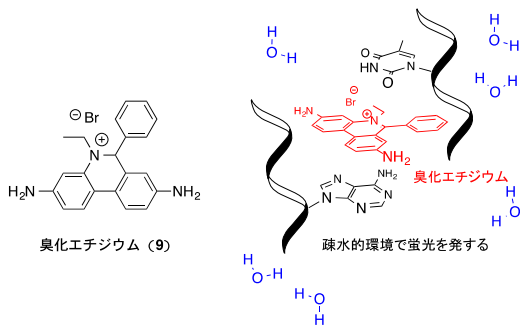


図5 臭化エチジウム (9) の蛍光

図6中の左端が9のみ、他の三つが分岐型DNA三量体8G, 8Cと9を混合したものであるが、驚いたことに二重らせんが存在しないにも関わらず、分岐型DNA三量体の存在により、その溶液が蛍光を発する現象が観察された。8A, 8Tにおいても同様の結果が得られた。(図6)

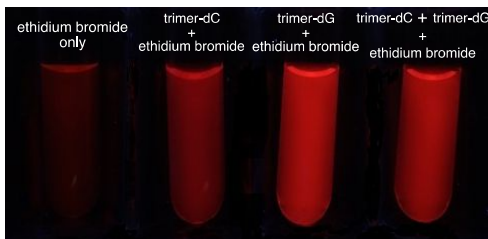


図6 分岐型DNA三量体による9の蛍光

これらの蛍光現象を説明するため、図7に示したような包接錯体の形成を推定した。すなわち9が、核酸塩基が作る疎水的空間に入り込み、蛍光を発したのではないかと考えた。

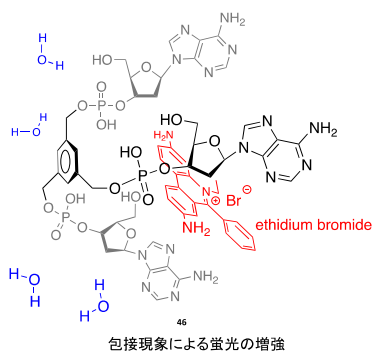


図7 推定される包接錯体の構造

そこでこの包接錯体の生成を確認するために<sup>1</sup>H NMRの測定を行った。図8の上段が9単独、下段が分岐型デオキシアデノシン三量体8A単独、そして中央が9と8Aを1:1で混ぜ合わせたサンプルの<sup>1</sup>H NMRである。図中の矢印で示すように、9と8Aを共存さ

せることで<sup>1</sup>H NMRスペクトルのシグナルにシフトが見られた。

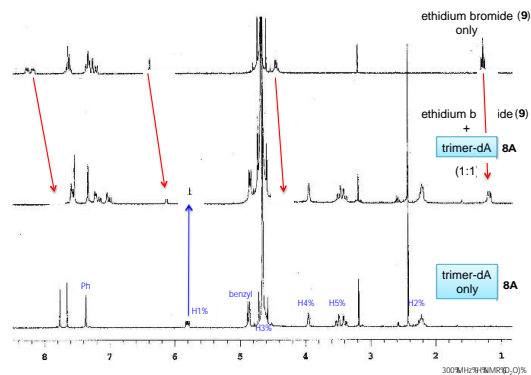


図8 9と8Aの共存によるシグナルのシフト  
分岐型チミジン三量体8Tの場合も、9との共存により、同様に<sup>1</sup>H NMRスペクトルのシグナルにシフトが見られることから、少なくとも水中において分岐型DNAは、9と相互作用していると考えられる。

次に8Aと、相補的塩基対となる分岐型チミジン三量体8T及び9を1:1:1で混合して、その挙動を<sup>1</sup>H NMRにて解析した。(図9)  
図9の上段は分岐型デオキシアデノシン三量体8Aと9の1:1混合物の<sup>1</sup>H NMRスペクトル、下段は分岐型チミジン三量体8Tと9の1:1混合物の<sup>1</sup>H NMRスペクトルである。三者を混合した中段のNMRチャートでは、上下段とは異なる位置にシグナルシフトが見られた。先にも述べたように、単に分岐型デオキシアデノシン三量体8Aと分岐型チミジン三量体8Tを混合しただけでは、NMRのシグナルにシフトは観測されないことから、この結果は、ゲストが共存している場合にのみ、8Aと8Tの間に相互作用が現れたことを示していると考えられる。

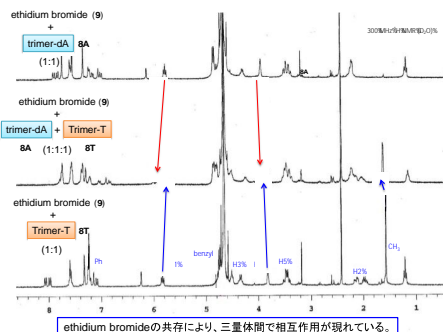


図9 三成分混合物の<sup>1</sup>H NMRスペクトル

この現象を説明するために二つの可能性が考えられた。一つ目は、ホストとゲスト 1:1 の錯体が形成するが、ホストである二種の分岐型 DNA の間で、ゲストのキャッチボールが行われているような現象 (図 10 上段) が起こっている可能性、二つ目は、カプセル型の包接錯体が形成 (図 10 下段) されている可能性があると考えられる。

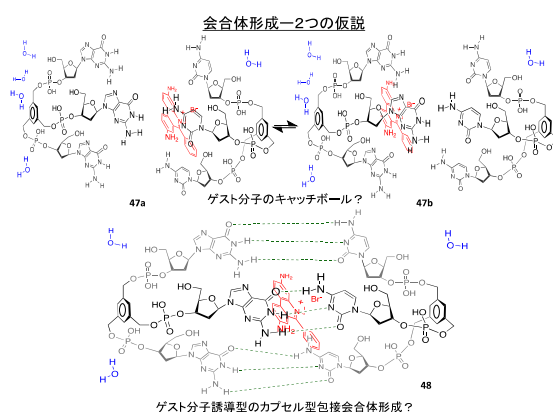


図 10 包接錯体の形成

さらに、分岐型 DNA 三量体の包接錯体に関する情報を得るために、ホスト分子の DNA 三量体とゲスト分子の臭化エチジウムが、どのような比率で錯体形成するのか、会合比を決定することにした。job's plot 解析を行った結果、単一の分岐型 DNA 三量体を用いた場合は、DNA 三量体と臭化エチジウムは 1:1 で包接錯体を形成していることが明らかとなった。次に会合定数の決定を試みた。塩基部の異なる 4 種の分岐型 DNA 三量体と臭化エチジウムの会合について、非線形最小二乗法を用いて求めた会合定数 (K) は、**8A** が  $271.57 \text{ M}^{-1}$ 、**8T** が  $601.15 \text{ M}^{-1}$ 、**8G** が  $1022.3 \text{ M}^{-1}$ 、**8C** が  $499947 \text{ M}^{-1}$  となった。分岐型デオキシグアノシン三量体 **8G** の会合定数が極端な値を示したが、**8G** の溶解性が低く、錯体形成時に沈殿物が生じた影響であると思われる。次に、この包接現象の駆動力は何か明らかにするために、様々なゲスト分子を用いて包接錯体が形成するか調べた結果、中性の化合物では、錯体形成が確認されなかったことから、ゲスト中のアミノ基が三量体のリン酸基と

酸・塩基反応で相互作用することが、錯体形成に大きく寄与していると推察される。

次に DNA の検出に利用されているアクリジンオレンジをゲスト分子に用いて実験を行った。アクリジンオレンジは、核酸にインターカレートするか、静電的に取り組まれて、蛍光を発することが知られている。アクリジンオレンジが、二本鎖 DNA に取り組まれる場合、アクリジンオレンジ本来の緑色の蛍光を発し、また 1 本鎖 DNA に作用した場合は、赤色の蛍光を発するとされている。そこで分岐型 DNA 三量体にアクリジンオレンジを加えることで、どのような蛍光を発するか検討した。その結果、アクリジンオレンジ単独では蛍光を発さないが、単一の分岐型 DNA 三量体に、また相補的な塩基を持つ 2 種の分岐型 DNA 三量体の混合物にアクリジンオレンジをそれぞれ添加したものでは、緑色から緑黄色の蛍光を発することが明らかとなった。またその溶液の  $^1\text{H}$ NMR 測定したところ、混合前と比較して、シグナルにシフトが観測されたことから、包接錯体を形成していると考えられた。さらに、緑色の蛍光を発した相補的な塩基を持つ 2 種の分岐型 DNA 三量体とアクリジンオレンジの混合溶液を ESI 法にて質量分析したところ、ホスト分子 2 分子とゲスト 1 分子の和となる分子量が検出されたことから、三成分系の包接錯体の形成が強く示唆された。この現象が新規なカプセル型包接錯体の形成を意味するのかどうかを解明するためには、さらなる分析が必要であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 9 件) 平成 26 年度

1. Total Synthesis of (-)-Thallusin: Utilization of Enzymatic Hydrolysis Resolution H. Yamamoto, Y. Takagi, T. Oshiro, T. Mitsuyama, I. Sasaki, N. Yamasaki, A. Yamada, H. Kenmoku, Y.

Matsuo, Y. Kasai, H. Imagawa, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 8850–8855.

2. Different effect of vitamin D2 and vitamin D3 on amyloid- $\beta$ 40 aggregation in vitro. Suenaga, M, Takahashi, H, Imagawa, H, Wagatsuma, M, Ouma, S, Tsuboi, Y, Furuta, A, Matsunaga, Y. *Curr Alzheimer Res.* **2014**, 11(8), 745-754.

3. Three lanostane triterpenoids with antitrypanosomal activity from the fruiting body of *Hexagonia tenuis* source, A. Umeyama, C. Ohta, Y. Shino, M. Okada, Y. Nakamura, T. Hamagaki, H. Imagawa, M, Tanaka, A. Ishiyama, M. Iwatsuki, K. Otaguro, S. Ōmura, T. Hashimoto, *Tetrahedron*, **2014**, 70 (44), 8312–8315.

4. Opaliferin, a New Polyketide from Cultures of Entomopathogenic Fungus *Cordyceps* sp. NBRC 106954, Grudniewska, S. Hayashi, M. Shimizu, M. Kato, M. Suenaga, H. Imagawa, T. Ito, Y. Asakawa, S. Ban, T. Kumada, T. Hashimoto, A. Umeyama, *Org. Lett.* **2014**, 16 (18), 4695–4697.

5. Vizantin Inhibits Endotoxin-Mediated Immune Responses via the TLR 4/MD-2 Complex, Oda, M.; Yamamoto, H.; Shibutani, M.; Nakano, M.; Yabiku, K.; Tarui, T.; Kameyama, N.; Shirakawa, D.; Obayashi, S.; Watanabe, N.; Imagawa, H.; Kurosawa, M.; Terao, Y.; Nishizawa, M.; Sakurai, J. *Journal of Immunology*, **2014**, 193(9), 4507-4514.

#### 平成 27 年度

1. A heterogeneous mercury salt catalyst stabilized by *m*-carbaborane, Yamamoto, H.; Yamasaki, N.; Hamauchi, H.; Shiomi, S.; Sasaki, I.; Seyama, K.; Mima, Y.; Nakano, M.; Kawakami, T.; Miyataka, H.; Kasai, Y.; Imagawa, H. *RSC Advances*, 2015, 5 (115), 94737-94742.

2. Kaempulchraols I-O: new isopimarane diterpenoids from *Kaempferia pulchra* rhizomes collected in Myanmar and their antiproliferative activity, Win, N.; Ito, T.; Aimaiti, S.; Kodama, T.; Imagawa, H.; Ngwe, H.; Asakawa, Y.; Abe, I.; Morita, H. *Tetrahedron*, **2015**, 71(29), 4707-4713.

3. A new polyoxygenated cyclohexene and a new megastigmane glycoside from *Uvaria grandiflora*, Ho, D. V.; Kodama, T.; Le, H. T. B.; Phan, K. V.; Do, T. T.; Bui, T. H.; Le, A. T.; Win, N. N.; Imagawa, H.; Ito, T.; Morita, H.; Nguyen, H. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, 25(16), 3246-3250.

4. Kaempulchraols A-H, Diterpenoids from the Rhizomes of *Kaempferia pulchra* Collected in Myanmar, Win, N. N.; Ito, T.; Aimaiti, S.; Imagawa, H.; Ngwe, H.; Abe, I.; Morita, H. *J. Nat. Prod.* **2015**, 78(5), 1113-1118.

#### 〔学会発表〕(計 1 件)

平成 27 年度

日本薬学会第 134 年会(熊本) 2014.3.27-30  
分岐型 DNA の合成とその機能解析  
齋村亜耶, 門田勇輝, 尾川 奨, 岡本育子,  
葛西祐介, 山本博文, 今川 洋

#### 〔図書〕(計 0 件)

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

#### 〔その他〕なし

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

今川 洋 (IMAGAWA Hiroshi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号 : 80279116

##### (2)研究分担者 なし

##### (3)連携研究者 なし